

新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の 生細胞における作用解析

東京大学大学院 薬学系研究科

菊 地 和 也

Nitric Oxide (NO) is produced by a variety of cells and is involved in a broad array of physiological and pathophysiological processes. It is reported that NO perform in vasodilation, immunoregulation and neurotransmission. However, many proposed physiological roles of NO were not proved directly by measuring NO. One of the reasons for this is the difficulty of direct, real-time detection of this gaseous, free radical species. Although several methods of detecting NO, which is unstable and produced at low concentration, have been developed, a new method is required which is satisfactory for studies in living cells in terms of selectivity, sensitivity, and experimental feasibility. In order to obtain direct evidence for NO functions in cultured dermatological cells, I designed and synthesized fluorescent NO indicators to detect NO in living cells as a means to examine the physiological functions of NO. First, the reactivity of NO was examined in order to find a suitable reaction for selective NO trapping. I found that aromatic amines react with NO in the presence of dioxygen to produce the corresponding triazenes.

We started to investigate the design and synthesis of fluorescent compounds based originally on 2,3-diaminonaphthalene as a vicinal diamine. Based on these findings, we designed diaminofluoresceins (DAFs, Figure 1) as indicators for NO. The N-nitrosation of DAFs, yielding the highly green-fluorescent triazole form, offers the advantages of specificity, sensitivity, and a simple protocol for the direct detection of NO (detection limit: 5 nM). Fluorescence detection with visible light excitation and high sensitivity enabled the practical assay of NO production in living cells. These dyes were applied to NO detection from cultured macrophages, which have inducible NO synthase. The macrophages were cultured in a plate reader wells and the extracellular NO production was measured by their fluorescence intensity. These results were successfully shown to establish the basic fundamental of detecting NO from cultured dermatological cells.

1 緒 言

本研究は一酸化窒素 (NO) をターゲットとして、蛍光測定で可視化できるプローブを合成し、生きた状態での分子の作用を明らかにし、生細胞における NO の作用を示すことを目的とする。具体的には、まず、一酸化窒素 (NO) と反応して蛍光特性の変化する蛍光プローブを、分子種の化学反応性に基づいてデザイン・合成する。次に、作成したプローブを用いて生理活性物質をリアルタイムで画像として捉えること (バイオイメーjing) で、動的作用機序の解明を行う。

細胞生物学研究のゴールの1つは生きている状態における分子の働きをその場で明らかにすることである。細胞内での情報伝達物質やその物質を認識する分子が単離され、試験管内での性質が明らかにされるにつれ、次の目標である生理的条件下での機能が重要視されるようになってきた。具体的には、細胞のどこで、いつ、どれくらい情報伝達物質が生成し作用するか？ 情報伝達物質の濃度変化の分布や時間経過が異なるとシグナルの意味が異なるか？ 情報伝達物質のシグナルが細胞内のある一部に対してのみ向けられるか？ 等である。これらの問題点を解決するために

は細胞をすりつぶさないで、生きたまま機能を調べることができれば多くの情報が得られると考えられる。生体内分子を標的として生きたままの状態でも可視化することは、Ca²⁺を測定する蛍光色素の合成より細胞生理学的研究に広く用いられるようになった¹⁾。この成功の理由は、従来電極などで局部的に調べていた生理学的現象が、細胞あるいは組織全体として刻々変化する様子が観察でき新しい情報を得ることが出来るからである。

さて、NO は 1987 年に EDRF であると報告されて以来²⁾、循環系のみならず³⁾、免疫系や中枢系においても⁴⁾、その役割が論じられるようになっていく。この発見が 1998 年のノーベル賞受賞対象になったことは記憶に新しいところである。しかし、その真の活性に関しては未だに議論のあるところで、混沌としているのが現状である。その原因の一つとして、NO が生理的条件下不安定であり、低濃度での放出のために測定が困難であることから、生理的に機能している「生きた」NO の動きを直接捉え、議論することができないことが挙げられる⁵⁻⁷⁾。この状況下、NO の作用解析に有効な検出法という観点から、特異的な検出に向けた分子デザインが可能な蛍光法に基づくことにした。蛍光法に基づく測定法を開発し、バイオイメーjingできれば NO の役割の解明に寄与できると考えた。

蛍光法に基づく方法としては、2,3-diaminonaphthalene (DAN) を用いる NO₂⁻ の測定法が知られていた⁸⁾。申請者らは、NO の反応性を精査したところ、このようなジアミンで NO をダイレクトに測定できることを見出し、新しい測定法を開発した⁹⁾。しかし、DAN をそのまま用いたのでは、様々な化合物をデザイン・合成しつつ検討した結果、ジア



Detection and Functional Analysis of Nitric Oxide on Living Cells Using Novel Fluorescence Probe

Kazuya Kikuchi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

ミノフルオレセイン (DAF 類, Fig. 1) の開発に至った^{10, 11)}。

2 実験

2.1 ジアミノフルオレセイン (DAF) 類の合成

(Fig. 1)

2,3-Dimethyl-6-nitroacetanilide (I)

25.3g の 2,3-Dimethyl-6-nitroaniline を 290mL の酢酸中、15mL の無水酢酸を加え、1h 還流する。溶媒溜去後、EtOH から再結晶。(29.3g, y.98%)

3-Acetamido-4-nitrophthalic acid (II)

29.2g の (I) を 1L の水に懸濁させ、100g の MgSO₄ を加え、還流させ、133g の KMnO₄ を合計 2L の水に懸濁させながら、小分けにして入れる。熱時ブフナー濾過し、濾液に食塩を飽和させ、冷後 HCl で酸性にし析出物を濾取、濾液は AcOEt で抽出し、溶媒を溜去する。(19.6g, y.52%)

3-Acetamido-4-nitrophthalic anhydride (III)

0.538g の (II) を 10mL の無水酢酸に 80°C で溶かし AcCl 1mL を加え、2h そのまま撹拌。溶媒を溜去し、少量の無水 CH₂Cl₂ を加え、析出物を濾取。(0.29g, y.58%)

3-Amino-4-nitrofluorescein (IV)

(III) と 2 当量の Resorcinol を 180°C で溶融し、2h 後 0.25 当量の ZnCl₂ を加え、210°C で乾燥固化させる。黒い固まりを砕いた後、0.6N HCl を加え、2h 還流。冷後沈殿物を濾取し、乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。(y. 5% 以上)

3,4-Diaminofluorescein

(DAF-1)

(IV) を Na₂S および NaSH の水溶液中、24h 還流し、冷後 HCl で pH4 にし、沈殿物を濾取。乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。(y. 76%) 必要であれば、硫黄を除くため、2N HCl で再結晶した後、NaOH 水溶液に溶かし、再度 HCl で pH 4 にし、沈殿物を濾取。

DAF-2、DAF-3 も同様の手順で作成した。

2.2 DAF-2 の NO による蛍光スペクトルの変化の測定

(Fig. 2)

ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4、

100mM) 中に 10μM の濃度で DAF-2 を溶かし、100μM の NO 溶液を各最終濃度になるよう添加した。撹拌後、蛍光強度が安定した後、各スリット幅 2.5nm で励起光 (515nm の蛍光測定) 及び蛍光 (495nm の励起光測定) をスキャンして測定した。

2.3 DAF-2 の NO Donor による蛍光強度変化の時間経過の測定 (Fig. 3)

ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4、100mM) 中に 10μM の濃度で DAF-2 を溶かし、各濃度の NO 放出生化合物 (NONOate) を添加した。37°C で撹拌後、蛍光強度の時間変化を 495nm 励起、515nm 蛍光において測定した。

2.4 DAF を用いたマクロファージ (RAW 264.7) からの NO の測定

96 穴マイクロプレート上でマクロファージ (RAW 264.7) を 10% FBS、13mM NaHCO₃、20mM glucose、70mg/mL benzylpenicillin、100mg/mL streptomycin を含む DMEM 中 5%

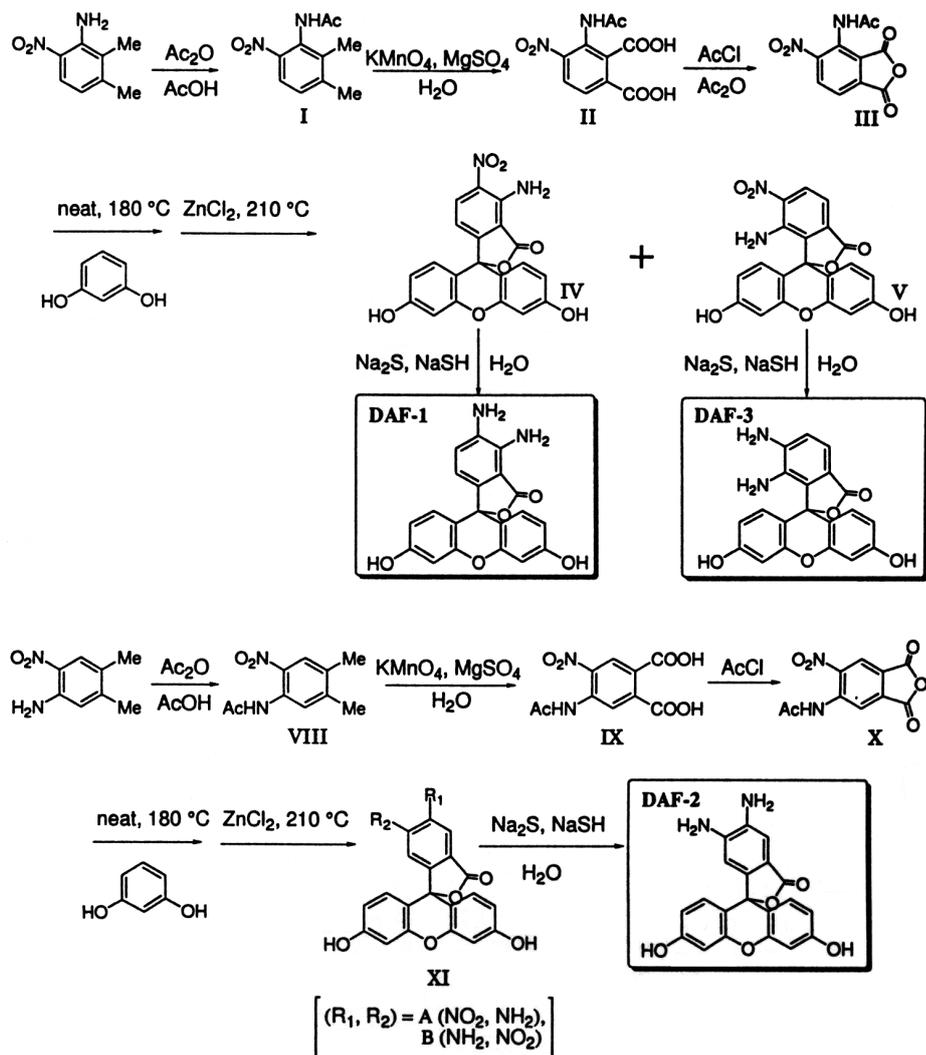


fig. 1 1DAF-1, 2, 3 の合成スキーム

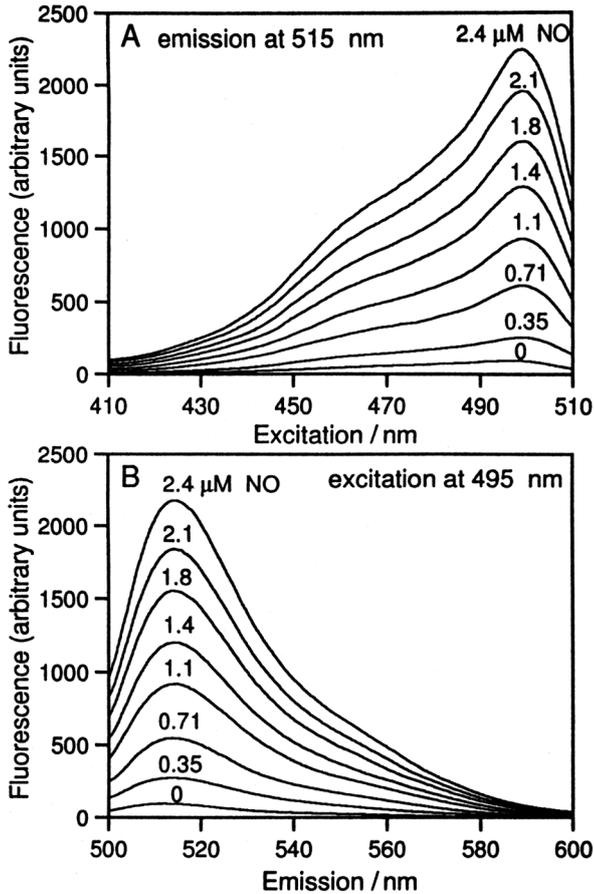


Fig. 2 NO添加によるDAF-2の蛍光スペクトル変化
(A) 515nm 蛍光測定による励起光変化
(B) 495nm 励起光変化による蛍光変化

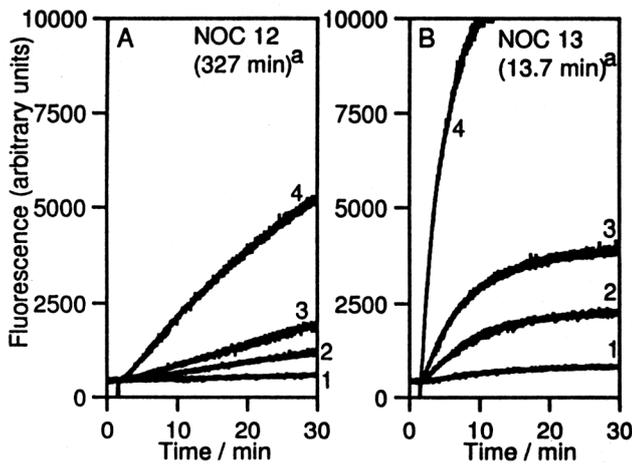


Fig. 3 NONOate から生成するNOによる蛍光強度変化
(A) 長寿命型 NOC12 (半減期 327min)
による用 依存的時間経過
(B) 短寿命型 NOC13 (半減期 13.7min)
による用 依存的時間経過

CO₂/95% air incubator にて培養 (37°C) する (1 × 10⁶ cells/well)。

実験の前に無血清の D-MEM に取り替える。24 時間後各種濃度の LPS、IFN- γ を含む DMEM で培養細胞を刺

激し、i-NOS を誘導する。16 時間後、2 回 Krebs Ringer Phosphate (KRP) で洗い、DAF-2 (10mM)、L-Arg (1 mM)、NOS 阻害剤等を溶かした KRP (200mL/well) に取り替えて更に培養する。2 時間後、培養液の上清を蛍光測定用マイクロプレートに取り (180mL/well)、蛍光用マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を測定した (Ex.485nm -Em.538nm)。

2.5 血管平滑筋細胞のイメージングの方法

細胞培養：雄性 Wistar ラットの大動脈血管平滑筋細胞を Ross らの方法により摘出し¹²⁾、10% FBS と抗生物質を含む DME 培地で培養する。底がガラス製のシャーレ (MatTek 社 P35G-101) 上に移して培養する。実験の前に無血清の DME 培地に取り替え、24 時間培養後、25 U/mL IL-1 β 、30 ng/mL TNF- α 、150 U/mL IFN- γ 、12.5mg/mL LPS を培地に加え、細胞を刺激し、さらに 12 時間ほど培養する。

実験には 10 ~ 20 代の細胞を用いた。

イメージング：それぞれの色素 (10mM) の KRP 溶液 (0.2% DMSO 含) に細胞の上清を取り替え、37°C で 1 時間ほどかけて色素を負荷する。wash out 後 L-Arg、L-NMMA を含む KRP に取り替え、DAF-2 誘導体の場合、励起フィルター 490nm、dichroic mirror 505nm、バリアフィルター 515nm (long pass) の付いた蛍光顕微鏡 (オリンパス IX-70) で観察する。なおステージは 37°C に保った。露光時間、撮像間隔は DAF-2 誘導体の場合 132ms、30s に設定した。

Charge-coupled device カメラに取り込んだ画像は MCID (Imaging Research 社) で処理、記録した。

3 結果と考察

3.1 NO 検出蛍光プローブ DAF-2 の開発とその化学的性質

申請者はすでに DAN のジアミノ基と NO が特異的に反応してトリアゾール体を生成することを見出したため⁹⁾、プローブをさらに最適化し生体サンプルから容易に NO を測定することを目指した。高感度かつ特異的に NO を検出できる蛍光プローブのデザインにあたり着目した点は、

- 1) 生理的な pH 及び温度で水中において NO と速やかに反応が進行すること
- 2) NO との反応により水中において量子収率が大きく増大すること
- 3) 可視光領域に励起光を持ち光照射により細胞内分子の自家蛍光が無視でき光照射により細胞への傷害が小さいこと

の 3 点である。フルオレセインは 500nm 付近の長波長に励起光を持つ。また、水中でも量子収率が減らず蛍光強度が環境要因によって影響されにくいいため広く生物応用が行

われている。モノアミノフルオレセインは量子収率が小さいことが報告されているが¹³⁾、この理由は電子供与性のアミノ基がフルオレセインのフタル酸部分に入り、キサンテン環とフタル酸部分の両方とも電子供与を行い電子の非局在化が起りにくいためと考えた。この原理を利用し、ジアミノフルオレセイン (DAF) 類を合成すれば量子収率が小さくなり、NO との反応でトリアゾール体を形成してはじめて蛍光強度が強くなることをもくろんだ。これをもとに DAF-1、DAF-2、DAF-3 をデザインし Fig. 1 に示すスキームで合成した。これら 3 つの分子ともそれぞれ自身ではほとんど蛍光を持たなかった。

作成した分子のうち DAF-2 は NO との反応で 100 倍もの蛍光増強が確認された。DAF-2 による NO の検出限界は 5 nM 程度であり、これは DAN に比べ約 30 倍、検出感度が改良されたことになる。NO との反応により、励起波長が 495 nm、蛍光波長が 515 nm (黄緑色) の蛍光が増強し、前述の可視光励起という目標を達成することができた (Fig. 2)。中性のバッファーへの溶解度も良いので、使用濃度の 10 mM で析出することはなく扱いやすい。NO 溶液だけではなく、NO を自然分解により生成する分子 NONOate を用いた場合でも、蛍光強度が時間を追って容量依存的に増強した (Fig. 3)。

pH 変化における蛍光強度の変化を Fig. 4 に示した。DAF-2 とそのクロル化体である DAF-4 について示したが、pH が 6 以下になると蛍光強度は大きく減弱する。この原因はフェノール性水酸基の脱プロトン化であると考えられたため、クロル化体の DAF-4 を合成した。DAF-4 ではフェノール性プロトンの pKa が小さくなったが、中性付近での蛍光安定性が低くなった。この原因はトリアゾール環上のプロトンの脱プロトン化によるものと考えられる。これらの結果より、細胞系の実験では、中性付近での蛍光強度のより安定な DAF-2 を用いることにした。

3.2 培養細胞を用いた NO 検出系の確立

生体サンプルとして、培養細胞から生成する NO を測定した。マクロファージの誘導型 NO 合成酵素 (i-NOS) の発現量は LPS 及び IFN- γ の濃度に伴って増加することが知られている¹⁴⁾。i-NOS は一旦誘導されれば酵素自身の発現量が増加するため、c-NOS とは異なり Ca^{2+} 非依存的に NO を産生し続けるので、LPS 及び IFN- γ の濃度依存的に NO 生成量は増加する。そこで、刺激する LPS、IFN- γ 及び細胞数を変化させてマクロファージを一定時間培養後、DAF を添加し、2 時間後の蛍光強度を測定した。なお、マクロファージは D-MEM 中で培養するのが一般的であるが、培地中のフェノールレッドおよび FBS による蛍光の消光を懸念したため DMEM は用いず、DAF を用いる際には KRP 中に溶解して用いた。

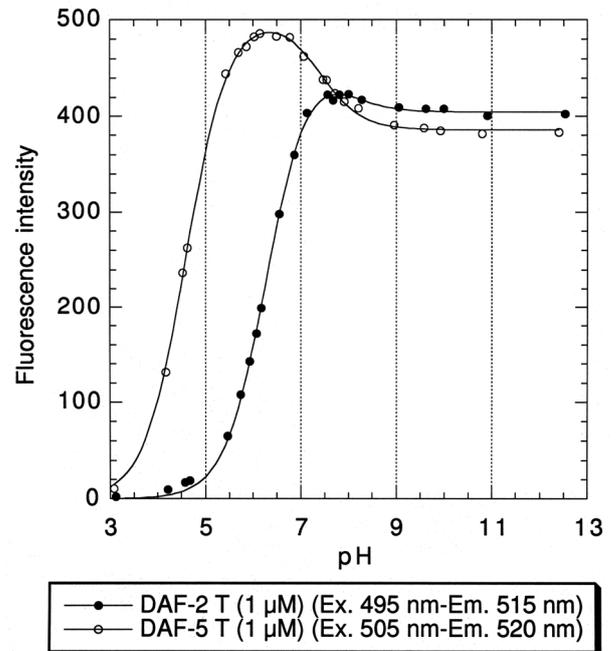


Fig. 4 トリアゾール体の蛍光強度への pH の影響

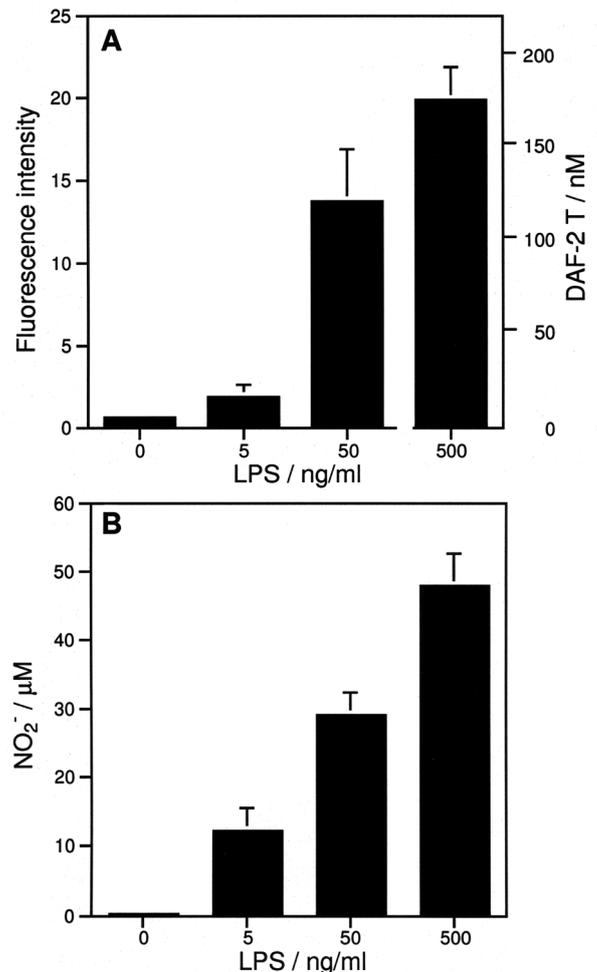


Fig. 5 マクロファージを用いた DAF-2 と Griess 反応による NO 検出の比較

- (A) DAF-2 を用いたマクロファージ (10^6 cells/well) からの NO 検出。LPS 各濃度による i-NOS 誘導後、L-Arg 刺激 2 時間後の測定
(B) Griess 反応による NO 検出。L-Arg 刺激 48 時間後の培養土清の測定

Fig. 5はIFN- γ を加えない時の蛍光強度の増加率で、細胞数が 10^6 cells/wellと多いものの2時間の培養時間で蛍光強度はLPS濃度依存的に増加した。吸光度法を利用した既存のNO $_2^-$ 測定法であるグリース法でも同様の結果(Fig. 5)であったが、感度が低いため9~40時間の培養時間が一般的には要求される^{15, 16)}。両方法を比較して分かるように、DAFを用いることによってより短時間での簡便な手法によるNO測定が可能となった。

更に、この蛍光強度の増加はIFN- γ の添加によって顕著に増加した。マクロファージにおいてはLPSとIFN- γ を同時に刺激することによって、相乗的にNO産生能が増大することが知られており¹⁵⁾、以上の結果はマクロファージが生成するNOをDAFが捉えていることを示している。

3.3 DAF誘導体を用いたバイオイメーjing

DAFを用いたNO測定法が確立したので、培養細胞内でのNO産生の検出に応用することにした。そこで細胞に局在化のため、DAF-2を誘導化した。

3.3.1 NOイメーjingプローブ(DAF-2誘導体)のデザイン、合成

細胞膜を透過し、細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けるものとしてDAF-2 DAの2つのフェノール性水酸基をアセチル化することでデザイン、合成した(Fig. 6)。Rotmanらはフルオレセインのジアセチル体が細胞の中のエステラーゼにより加水分解を受けることを報告している¹⁷⁾。アセチル体はフェノール性水酸基及びカルボン酸の負電荷がなくなっており、脂溶性のため細胞膜を通過する。通過後、エステルの加水分解により再び電荷を生じ、細胞質内にとどまる。

3.3.2 DAF-2 DAを用いた血管平滑筋細胞の産生するNOのイメーjing

DAF-2 DAは非蛍光性であるため、エステルが加水分解されない限り蛍光を発しない。これを細胞外に加えることで、ラット大動脈由来血管平滑筋培養細胞に適用した。血管平滑筋細胞はi-NOSを有することが知られている。細胞にDAF-2 DAを負荷後細胞を観察すると明らかに蛍光強度は負荷していない細胞よりも強く、エステラーゼによりエステルが加水分解されていることが分かった。

Fig. 7aは刺激によりNOSを誘導した細胞の上清に1 mMのL-Argがあるとときの蛍光強度の経時変化、bはaの増加している後で上清を1 mMのL-NMMAに置換したときの経時変化、cはその後、さらに10 mMのL-Argに置換したときの経時変化、dは1 mMのL-Argに10 mMのL-NMMAを添加したものの、eは無刺激の細胞の上清に1 mMのL-Argを加えたときのものである。aで

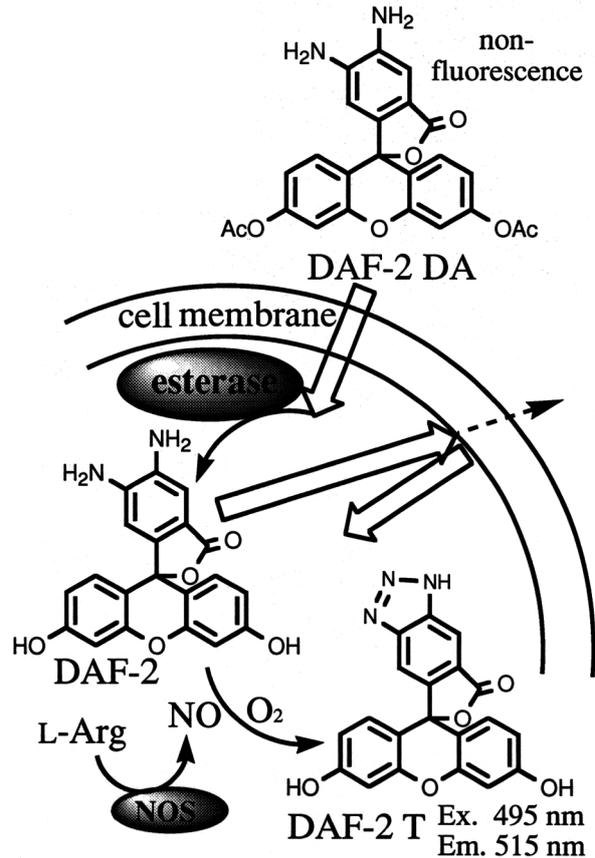


Fig. 6 DAF-2誘導体を用いたバイオイメーjingの原理

は蛍光が増加、dでは最初は阻害剤が効いていない細胞もあるが徐々に増加が止まる、eでは全く蛍光が増加しないという結果になり、NOをDAF-2 DAにより捕らえていることが分かる。bでは蛍光の増加が阻害されていく様子が、cでは蛍光の増加がNOSの基質のL-Argの供給により復活する様子が分かる。この様子をFig. 8に画像として示す。個々の細胞がNO産生により、蛍光を生じるようになる経時変化が示された。

DAF-2が捕らえるのはNO自身ではなく、酸化したNO $^+$ 等価体である。このためNOの持つ薬理作用はブロックしない。この性質はCa $^{2+}$ 等の他の生理活性物質との同時変化を調べるときに有利であると考えられる。

4 総括

NOの特異的蛍光プローブを作成するために、ジアミノベンゼン誘導体(DAF類)をデザイン・合成した。このうちDAF-2は感度、蛍光波長ともに最適であり生体サンプルから発生したNOを測定するために有用であった。生体サンプルとして誘導型NOSを持つマクロファージを用いた結果、細胞外に放出されたNOを蛍光強度変化として捉えることに成功した。細胞内に細胞無侵襲に加えることのできるDAF-2の誘導体を合成し、細胞内のNOの産生

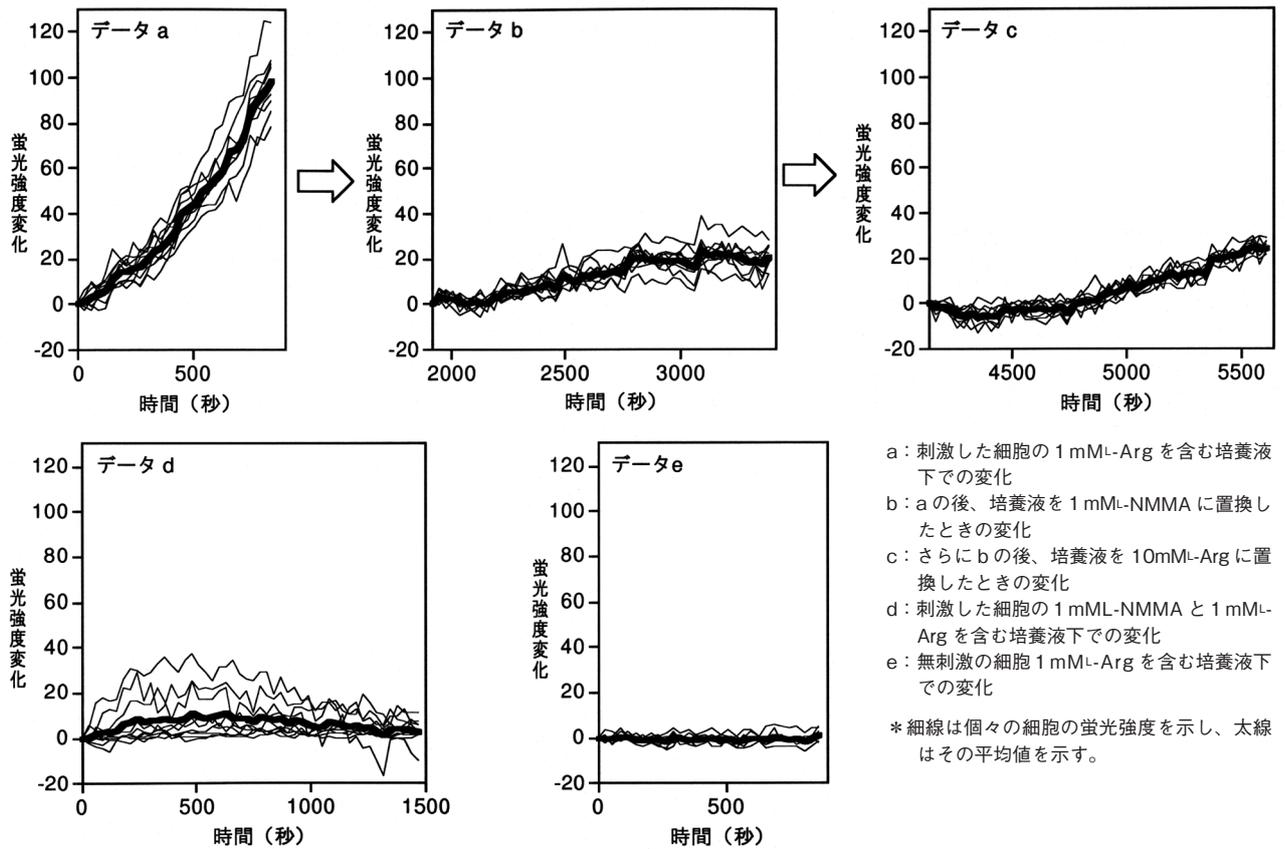


Fig. 7 各条件下における個々の血管平滑筋細胞の蛍光強度変化

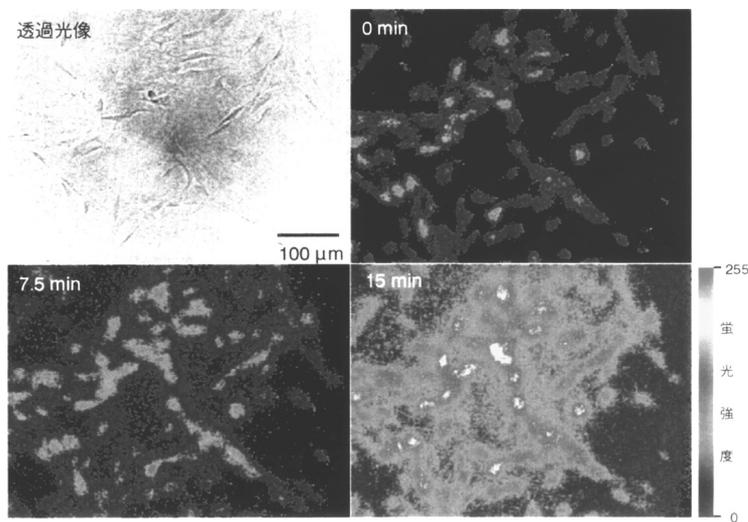


Fig. 8 ラット大動脈血管平滑筋細胞が生成する NO の可視化

を画像化することに成功した。これらの結果は、種々の培養細胞や組織に応用が可能であると考えられ、皮膚細胞及び組織の NO 産生機構を明らかにする上での基盤的研究である。

(参考文献)

1) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved

fluorescence properties, J. Biol. Chem., 260, 3440-3450, 1985.

2) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, Nature., 327, 524-526, 1987.

3) Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, et al.: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric

- oxide is an intermediate, *Biochemistry*, 27, 8706-8711, 1988.
- 4) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH; Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, *Nature*, 347, 768-770, 1990.
- 5) 長野哲雄, : NO の検出・測定法. NO 化学と生物, 日本化学会編, : 季刊化学総説, 30, 学会出版センター, 東京, 1996, 79-86 頁.
- 6) Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, et al., : Real time measurement of nitric oxide production ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method, *J. Biol. Chem.*, 268, 23106-23110, 1993.
- 7) Kojima H, Kikuchi K, Hirobe M, et al. : Real-time measurement of nitric oxide production in rat brain by the combination of luminol-H₂O₂ chemiluminescence and microdialysis, *Neurosci. Lett.*, 233, 157-159, 1997.
- 8) Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, et al., : A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, *Anal. Biochem.*, 214, 11-16, 1993.
- 9) Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, et al., : Development of a fluorescent indicator for the bioimaging of nitric oxide, *Biol. Pharm. Bull.*, 20, 1229-1232, 1997.
- 10) Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, et al., : Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins, *FEBS Lett.*, 427, 263-266, 1998.
- 11) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al., : Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins, *Anal. Chem.*, 70, 2446-2453, 1998.
- 12) Ross R, Glomset J, Kariya B, et al. : A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1207-1210, 1974.
- 13) Munkholm C, Parkinson DR, Walt DR, : Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 2608-2612, 1990.
- 14) Lorschach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, et al., : Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem.*, 268, 1908-1913, 1993.
- 15) Gross SS, Levi R, : Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 267, 25722-25729, 1992.
- 16) Lewis RS, Tamir S, Tannenbaum SR, et al., : Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro, *J. Biol. Chem.*, 270, 29350-29355, 1995.
- 17) Rotman B, Papermaster BW, : Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, 134-141, 1966.