

# 弱酸性条件下のみで発光する 新規蛍光物質

群馬大学大学院保健学研究科  
生体情報検査科学講座

准教授 柴田 孝之

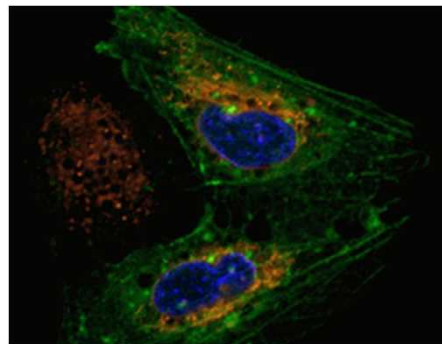
2019年6月27日

# 蛍光

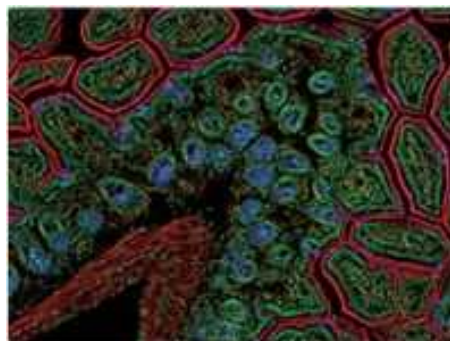
光エネルギーを吸収して励起された物質が  
光を放出して基底状態に戻る現象

生物学的研究に応用されて以来  
ライフサイエンスは飛躍的な発展を遂げた

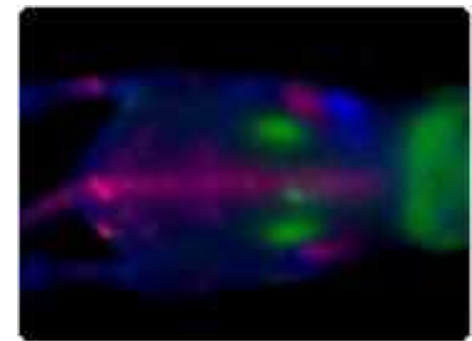
細胞染色  
cell staining








免疫染色  
immunostaining



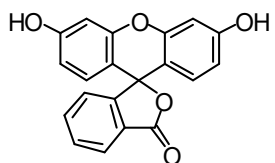
生体イメージング  
in vivo imaging



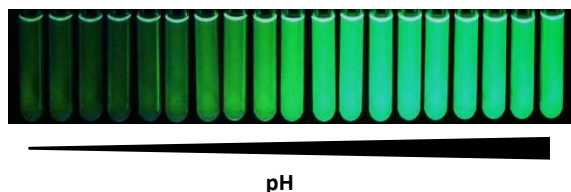
# ライフサイエンスにおける 蛍光色素の利用

- 複数分子を観察  様々な波長の光を発する色素
- 分子の挙動を追跡  ターゲットを蛍光標識するラベル化剤
- 1分子を観察  高い量子収率 and/or モル吸光係数を持つ色素
- 生体内を観察  近赤外領域に励起/蛍光波長を有する色素
- 微小環境を可視化  **環境の変化に応答する機能的色素**

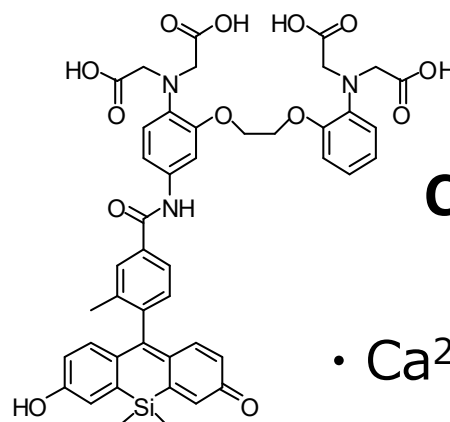
# 機能性蛍光色素



fluorescein

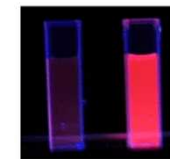


- ・塩基性条件下で蛍光を発するpHセンサー
- ・最も汎用される発色団の一つ



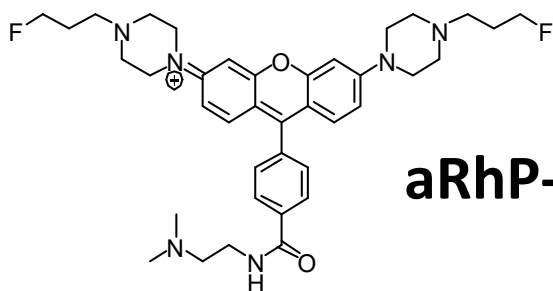
CaTM-2

Low Ca<sup>2+</sup> High Ca<sup>2+</sup>

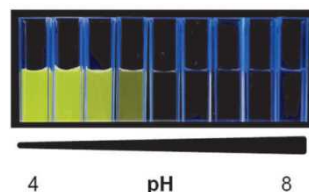


- ・Ca<sup>2+</sup>選択的イオンセンサー
- ・細胞内のCa濃度の定量

*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52(14), 3874-0877 (2013).

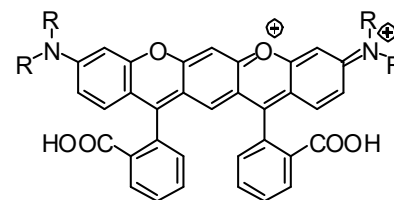


aRhP-EF



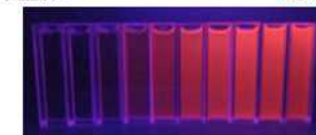
- ・酸性条件下で蛍光を発するpHセンサー
- ・細胞内の酸性オルガネラの染色

*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 53(24), 6085-6089 (2014).



aminobenzopyro-xanthene (ABPX)

単量体 → 凝集体



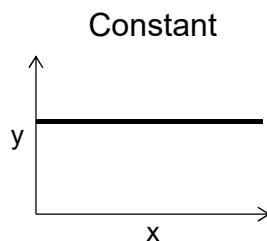
- ・分子の凝集によって蛍光を発する色素
- ・アルツハイマー病などの診断への応用

*Chem. Commun.*, 46(47), 9013-9015 (2010).

# 蛍光色素の分類

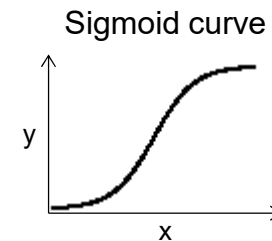
## Always-ON type

色素を取り巻く環境に依らず  
一定の強度の蛍光を発する



## ON/OFF-switch type

色素を取り巻く環境の違いにより  
発光と消光がスイッチする

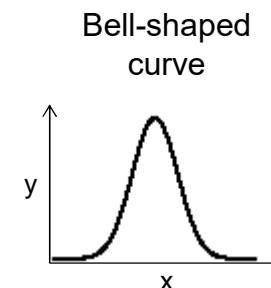


現在までに開発されたほぼ全ての蛍光物質は

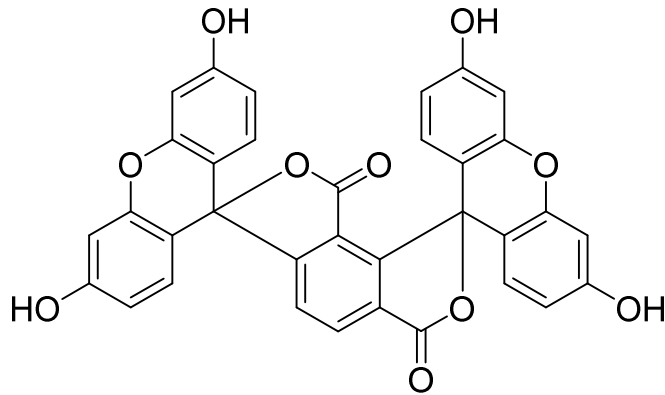
Always-ON型あるいは ON/OFF-switch型のどちらかに分類される

色素を取り巻く環境の違いにより

発光と消光がベル型に変化する色素が存在すれば・・・

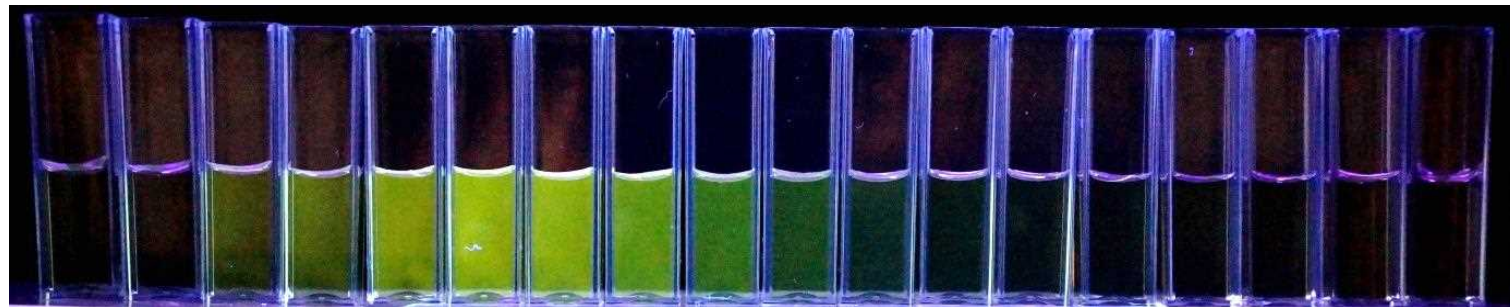


# Partly-ON型蛍光色素

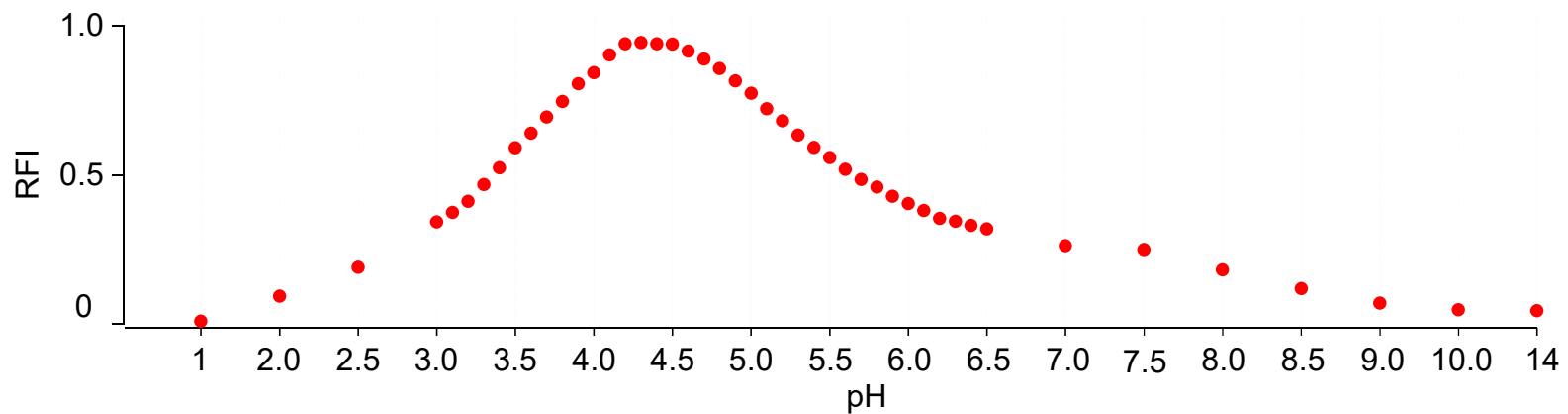


弱酸選択的蛍光色素

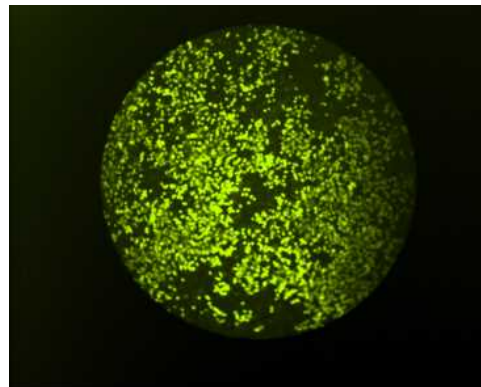
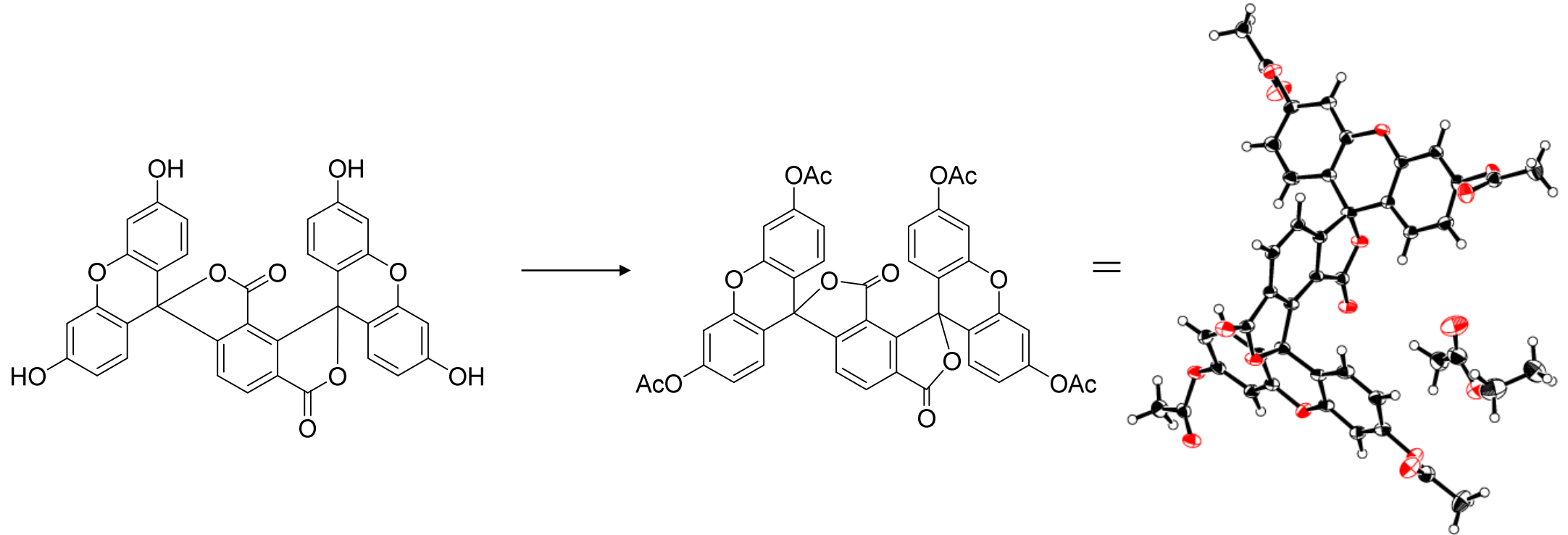
*weak acid selective (WAS) dye*



pH 1 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 10.0 14



# Partly-ON型蛍光色素

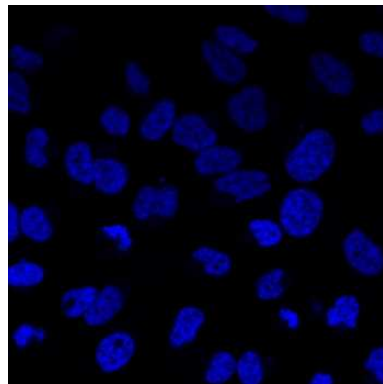


# 細胞イメージング

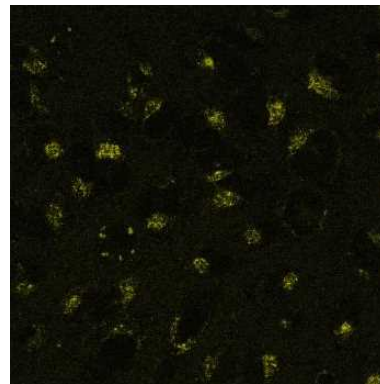
## 蛍光酸性プローブによるリソソームの染色

細胞小器官であるリソソームは酸性 (pH=4.5~5.0) であり  
酸性条件下で発光する蛍光色素によって選択的に染色可能

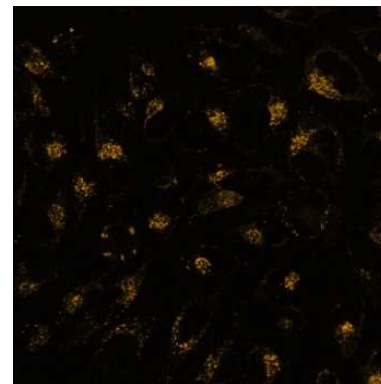
Hoechst 33342  
(Ex = 405 nm)



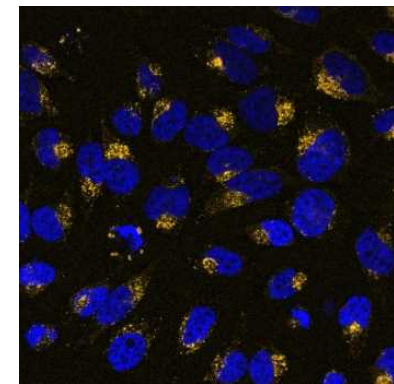
WAS dye  
(Ex = 488 nm)



AcidiFluor Orange  
(Ex = 543 nm)



Merge



HeLa cells incubated with Partly-ON dye (1  $\mu$ M), Acidifluor Orange (1  $\mu$ M) and Hoechst 33342 (1  $\mu$ M)



# 強酸性条件下での弱酸性領域の染色

従来の酸感受性蛍光色素の蛍光強度は  
色素溶液のpHが低くなるにつれて上昇



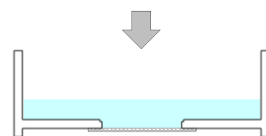
強酸性と弱酸性を区別できない



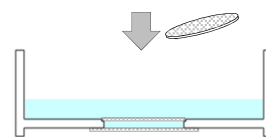
強酸に曝された細胞中の  
酸性オルガネラをWAS色素で染色



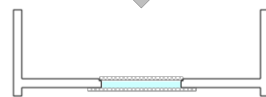
①通常の細胞培養を行う



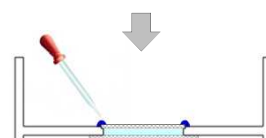
②培地に色素を添加してインキュベーションする



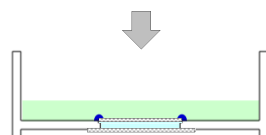
③観察部をカバーガラスで隔離する



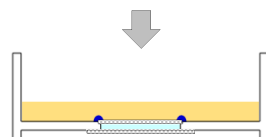
④培地を除去する



⑤カバーガラスを密閉する  
→ 細胞剥離する



⑥②と同じ組成の色素入り培地を添加



⑦外部の培地が強酸性を示すまで塩酸を添加

# 強酸中の弱酸領域の染色

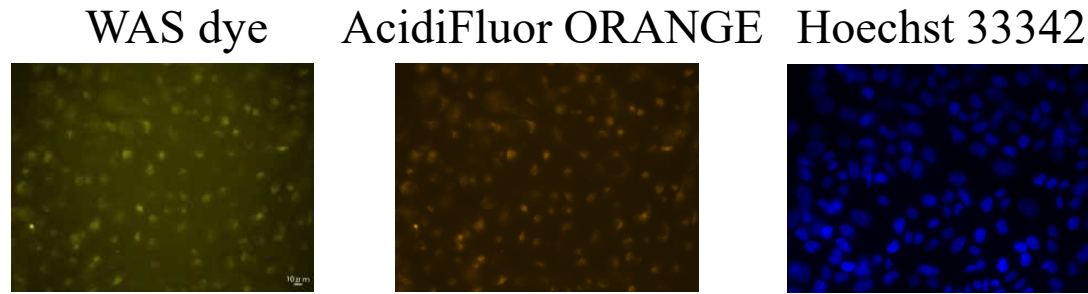
## ～従来技術との比較～

WAS dye + Acidifluor ORANGE + Hoechst

WAS dye + Hoechst

HeLa cell

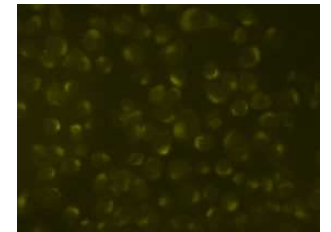
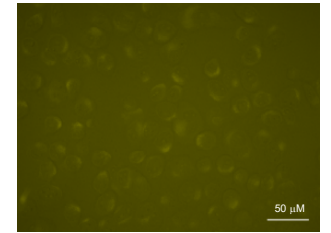
Before  
HCl addition



After  
HCl addition

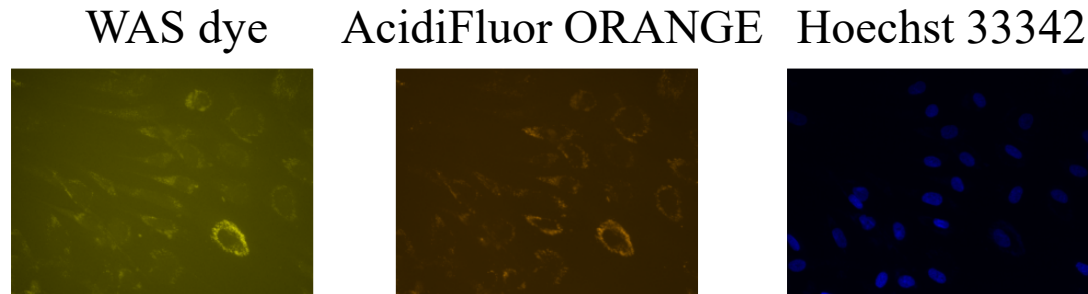


WAS dye



Before  
HCl addition

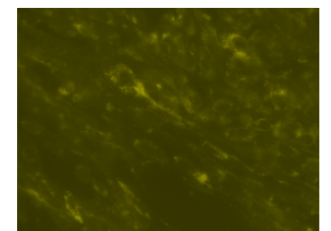
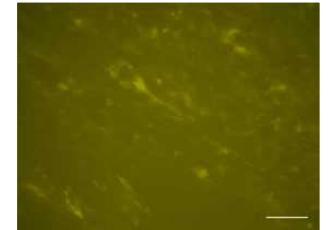
Fibroblast cells



After  
HCl addition



WAS dye



# 想定される用途

## 研究ツールとしての利用

- ① 酸性オルガネラの染色
- ② 微小環境のpH測定
- ③ 様々な標的に対するPartly-ON型色素としての基本骨格

## 疾病診断法への展開

☆ 弱酸性微小環境の特異的染色

酸感受性色素はがん選択的イメージングに応用



上半身の大部分を占める強酸性の胃も発光

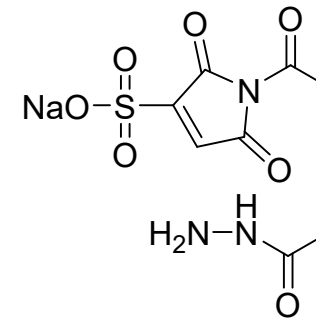
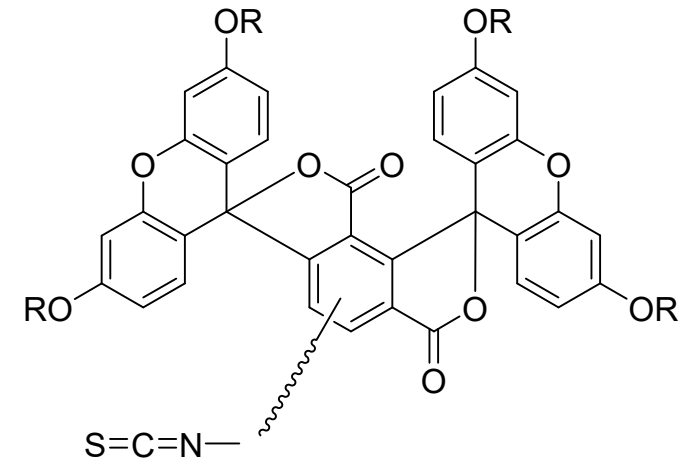


**胃がんや胃周辺のがんを可視化**

# 実用化に向けた課題

## ① WAS dyeは発色団

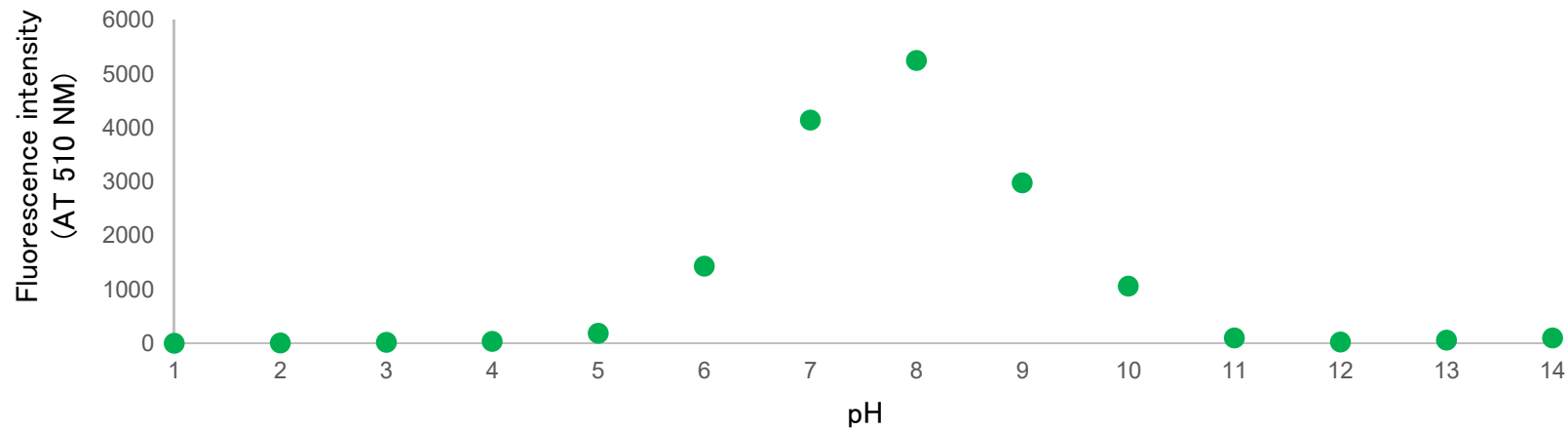
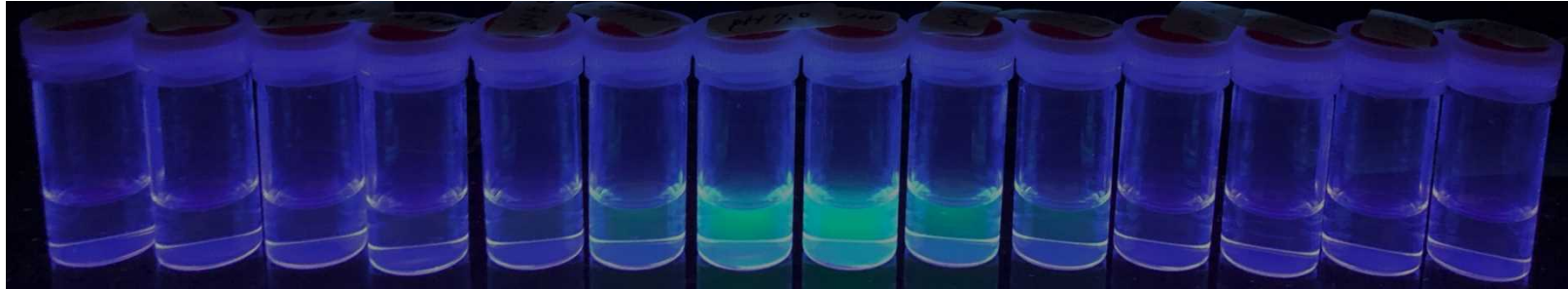
- 免疫学的測定や分子標識に利用するにはtarget of interestに共有結合する必要がある
- WAS dye ラベル化剤の開発



## ② WAS dyeは弱酸領域のみに応答

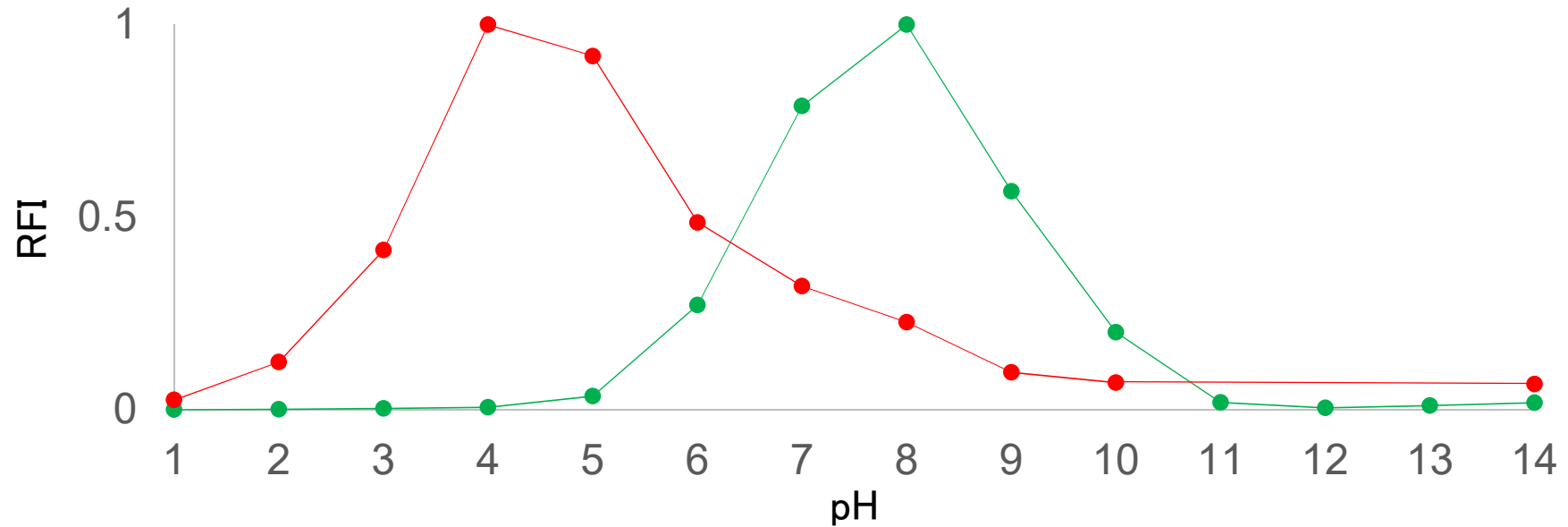
- 別のpH領域に選択的な色素の開発

# 新たなPartly-ON型蛍光色素



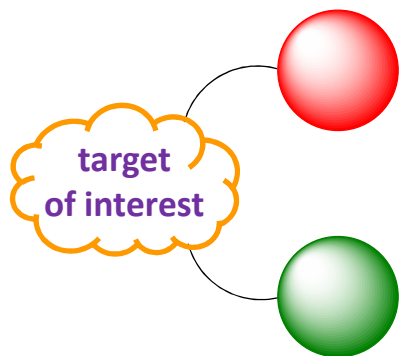
中性領域でのみ蛍光を発する色素の発見

# 2種のPartly-ON型蛍光色素



あるpHにおける**WAS色素の蛍光強度**と**中性選択的色素の蛍光強度**の

比は一定



微小環境pHの絶対値測定法の可能性

# 企業への期待

## ①ラベル化剤の開発

- 👉 色素に反応性官能基を導入する技術をお持ちの企業との共同研究及び共同開発を希望。

## ②様々な色を示すPartly-ON型色素の開発

- 👉 励起/蛍光波長の長波長化に関する技術をお持ちの企業との共同研究及び共同開発を希望。

## ③Partly-ON型色素の新展開

- 👉 本色素の実用化に関する新アイデアをお持ちの企業との共同研究及び共同開発を希望。

# 本技術に関する知的財産権

## 弱酸選択的蛍光色素

- 発明の名称 : pH依存性蛍光化合物
- 出願番号 : 特願2016-068416
- 出願人 : 群馬大学
- 発明者 : 柴田孝之

## 中性選択的蛍光色素

- 出願準備中



# 産学連携の経緯

- 2011年 A-STEP FSステージ 探索タイプ 採択  
「ペプチドの検出方法」特願2011-045491
- 2012年 A-STEP FSステージ 探索タイプ 採択  
「ペプチドの検出方法」バイオジャパン発表
- 2014年 「コラーゲン定量キット」コスモ・バイオ社より販売開始  
[https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/collagen-quantitative-kit-csr.asp?entry\\_id=13513](https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/collagen-quantitative-kit-csr.asp?entry_id=13513)
- (2015年 「ペプチドの検出方法」特許第5817980号)
- 2017年 AMED 橋渡し研究・新規開発シーズ (シーズA) 採択
- 2019年 AMED 橋渡し研究・新規開発シーズ (シーズA) 採択

# お問い合わせ

群馬大学 産学連携・知的財産活用センター

〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1

TEL : 0277-30-1171～75

FAX : 0277-30-1178

e-mail : [tlo@ml.gunma-u.ac.jp](mailto:tlo@ml.gunma-u.ac.jp)