

マグネシウム蛍光分子プローブ

鈴木 祥夫

1. はじめに

細胞内情報伝達は、医学、生物学の幅広い分野で研究されており、生細胞や組織中でのダイナミクスに関する情報を与える種々の試薬が市販されている。細胞情報を得る検出手段には、吸光、蛍光、化学発光および放射線を利用する方法が挙げられ、中でも蛍光法は感度や操作性等の面から最も取り扱いやすく、しかも生きた単一細胞内での化学過程の非破壊分析手段として利用されている。例えば、イオンあるいは小分子のダイナミクスを観察するための蛍光プローブとして、カルシウムイオン、亜鉛イオン、塩化物イオン、cAMP、NO 蛍光プローブ等が報告されている。中でも 1980 年代に始まったカルシウムイオンプローブの開発は、蛍光プローブの代表的な成功例であり、単一細胞内のカルシウムイオンのダイナミクスに関して多くの知見が得られている。一方、マグネシウムイオンはカルシウムイオンと同様、生体に必要不可欠な物質であり、細胞内のエネルギー通貨である ATP あるいは記憶と学習の観点から注目されているグルタミン酸受容体と結合し、種々の酵素反応を制約したり、タンパク質の立体構造の安定化、さらに筋肉の収縮、ホルモンの分泌に関与していることが知られている。しかしながら、マグネシウムイオンの細胞内ダイナミクスに関する研究は、カルシウムイオンと比較して進展していないというのが現状である。その大きな理由は、細胞内でマグネシウムイオンを選択的に捕捉し（特にカルシウムイオンの妨害が大きいいため、この影響を排除する必要がある）観察することができる有効な分子プローブがないためである。

今回我々が開発した蛍光分子プローブ **KMG-20-AM** (AM : Acetoxymethyl)は、蛍光色素としてクマリンを有している。マグネシウムイオン結合部位として、これまでの我々の研究の知見から、 β -ジケトン類似構造を選択した。また、分子内の分極状態を大きくし、錯形成に伴う蛍光スペクトル変化を大きくするための 3 級アミンを有している。さらに、脂溶性化合物から水溶性化合物に容易に変換させるためアセトキシメチル基を導入している。この化合物を用いて、マグネシウムイオンをはじめとした種々の金属イオンに対する応答特性、熱力学的パラメータの算出、さらに生きた細胞内のマグネシウムイオンの動態について検討した。

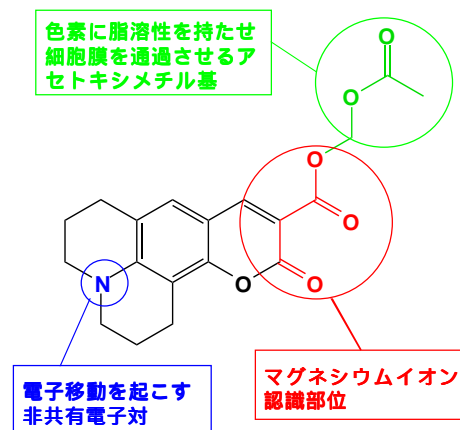


図 1 KMG-20-AM の構造

2. 実験と結果

2.1 キャリブレーション測定

蛍光強度からマグネシウムイオン濃度を求めるために、遊離のマグネシウムイオン濃度と蛍光強度の関係を予め測定する必要がある。そこで生理的条件下([HEPES] = 10.0 mM、[KCl] = 130.0 mM、[NaCl] = 20.0 mM、[EGTA] = 2.0 mM、pH 7.4)において、マグネシウムイオン濃度を変化させたときの **KMG-20** 応答特性を、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを用いて観察した。図 2A にマグネシウムイオン添加前後における **KMG-20** の吸収スペクトルを示す。極大吸収波長は 428 nm から 448 nm にシフトしたスペクトル変化が観察された。これは、マグネシウムイオンと **KMG-20** が強く複合体を形成すること

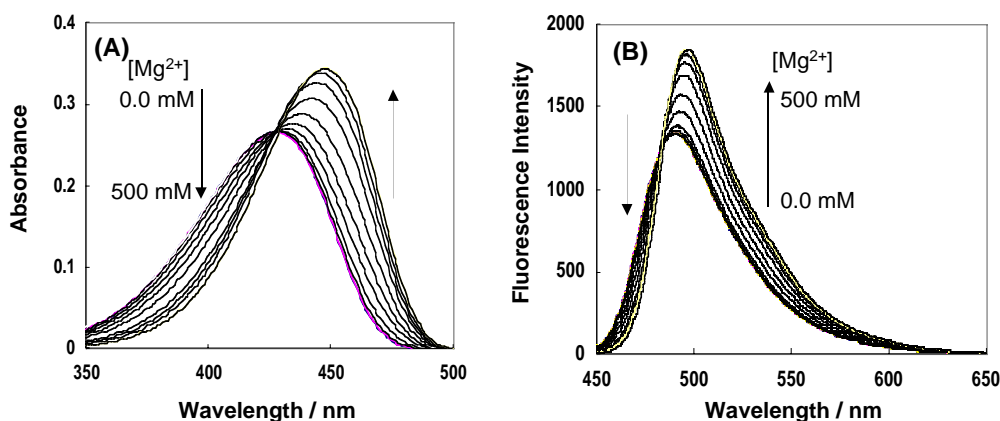


図2 マグネシウムイオンを添加前後のKMG-20の吸収スペクトル(A)と蛍光スペクトル(B)

により、**KMG-20** の分子内の電子状態が大きく変化していることを示している。さらに、430 nm に等吸収点を持つ”シーソー型”のスペクトル変化を示していることから、2 波長励起 1 波長蛍光測光法が可能となるため、より正確にマグネシウムイオン濃度を定量することが可能となる。

次に、マグネシウムイオンの添加の前後で、**KMG-20** の蛍光スペクトルを測定した。結果を図 2B に示す。マグネシウムイオン濃度の増加に伴い、蛍光強度が増加し、極大発光波長が、470nm から 480nm にシフトした。さらに 470 nm にマグネシウムイオン濃度を変化させても蛍光強度が変化しない点が観察された。

ナトリウムイオン、カリウムイオンを添加した場合、吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルともに変化が生じなかった。カルシウムイオンについては、数ミリモル添加した時点から応答ははじめた。しかし生細胞中のカルシウムイオン濃度は、ナノモルから数マイクロモルであるため、**KMG-20** に対するカルシウムイオンの妨害はない。

以上の結果を基に、**KMG-20** とマグネシウムイオン及び妨害イオンとなるカルシウムイオンとの錯形成定数を Benesi-Hildebrand プロットを用いて算出し、表 1 にまとめた。さらに、現在市販されているマグネシウムイオン蛍光指示薬(mag-fura-2、mag-indo-1、mag-fura-5、Magnesium Green)の値も併せてまとめた。**KMG-20** とマグネシウムイオンの結合定数は 100.0 M^{-1} 、カルシウムイオンとは 33.3 M^{-1} であり、カルシ

表 1 マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンとの錯形成定数

蛍光プローブ	$K_{\text{Mg}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{Ca}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{Mg}} / K_{\text{Ca}}$
KMG-20	100.0	33.3	3.0
mag-fura-2	526.3*	40000*	0.013
mag-indo-1	370.4*	28570*	0.013
mag-fura-5	434.8*	35710*	0.012
Magnesium Green	500.0*	166660*	0.003

*参考文献5)を参照

ウムイオンに対するマグネシウムイオンの選択性は 3.0 倍であった。一方、市販されているマグネシウムイオン指示薬においては、カルシウムイオンとの錯形成定数の方が、マグネシウムイオンよりも約 100 倍から 300 倍高いため、カルシウムイオンの妨害を受けることが予想される。実際に、**KMG-20** と Magnesium Green についてカルシウムイオンの妨害について検討するため、測定溶液([蛍光プローブ] = $10 \mu\text{M}$ 、 $[\text{MgCl}_2] = 1.0 \text{ mM}$)に、カルシウムイオンを 140 nM から 850 nM となるように濃度を変化させて添加し、蛍光強度の経時変化を測定した。その結果、図 3 に示したように、**KMG-20** はカルシウムイオンを添加しても、錯形成していたマグネシウムイオンとカルシウムイオンは置き換わらないために蛍光強度は変化しなかった。一方、Magnesium Green の場合、マグネシウムイオンよりもカルシ

ウムイオンの方が錯形成定数が高く、錯形成していたマグネシウムイオンとカルシウムイオンは置き換わり妨害を受けたため、蛍光強度の増加が観察された。以上のことから、KMG-20はマグネシウムイオンに対する選択性が高く、かつカルシウムイオンの妨害を受けないため、正確に生体内のマグネシウムイオン濃度を定量出来ることが明らかとなった。

2.2 細胞内のマグネシウムイオン測定

KMG-20-AMの細胞内への投与は、以下の操作法で行った。まず、濃度が10 μ molとなるようにKMG-20-AMをDMSOに溶解し、これをPC12細胞の培養液に最終濃度が10 μ Mになるように加えた。37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡(Axiovert S 100, Zeiss社)を用いて観察した。励起波長は440 nm、検出波長は500 ~ 530 nmとした。

PC12細胞にKMG-20-AMを投与した後の微分干渉像および蛍光像を図4に示す。蛍光像においては、赤色から黄色になるほど蛍光強度が高いことを示している。KMG-20は、細胞質および樹状突起部分である成長円錐に均一に分散しており、核を除いた部分を染色していることが確認された。

次にKMG-20-AMを細胞内に投与した状態で、細胞膜を脱分極させるために、120mMのカリウムイオンを添加した。結果を図5に示す。Aは刺激剤を投与する前、Bは投与した後の蛍光顕微鏡写真、Cは細胞の各部位ごとの蛍光強度の経時変化である。カリウムイオンを投与してから数秒後、細胞質および成長円錐部分が明るくなった。特に成長円錐部分で、大きな蛍光強度の増加が確認された。さらに1分後、蛍光強度が減少しはじめ、4分後には初期状態に戻った。この現象のメカニズムを模式的に図6に示す。刺激(高濃度のカリウムイオン)を与えることにより膜電位が変化し、イオンチャンネルを介して細胞内にカルシウムイオン

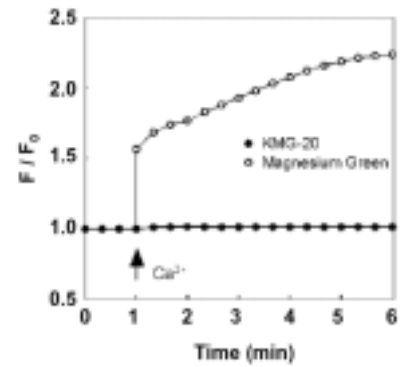


図3 カルシウムイオンを添加したときのKMG-20とMagnesium Greenの蛍光強度の経時変化

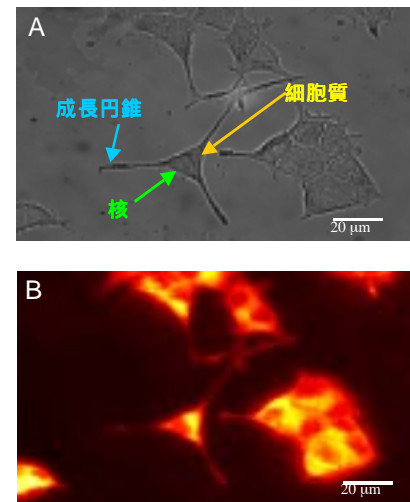


図4 PC12細胞にKMG-20-AMを投与したときの微分干渉像(A)と蛍光顕微鏡像(B)

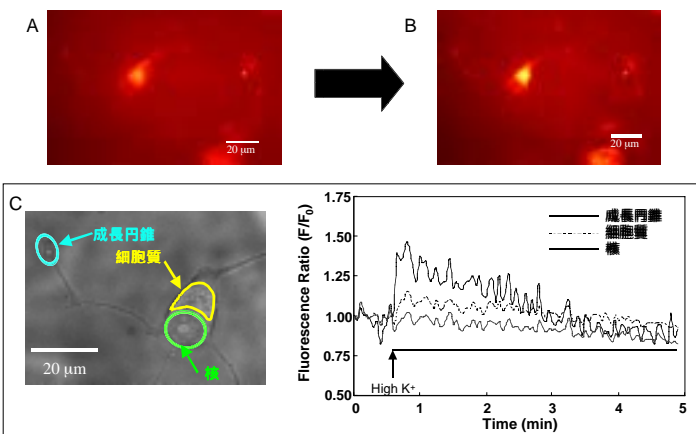


図5 カリウムイオン添加前後の蛍光顕微鏡像(A,B)および細胞の各部位の蛍光強度の経時変化(C)

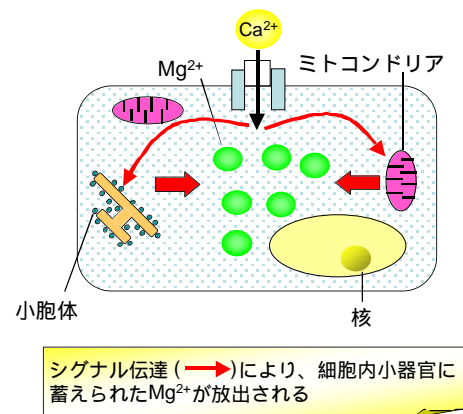


図6 カリウムイオン投与によるマグネシウムイオン濃度増加の模式図

が流入する。ミトコンドリア等のオルガネラにシグナル伝達が伝わり、細胞内のカルシウムイオン濃度を低減させるために、マグネシウムイオンが放出される。その結果、試薬とマグネシウムイオンが錯体を形成し、明るくなったと考えられる。さらにマグネシウムイオン放出源となるミトコンドリアは細胞質よりも成長円錐部分に局在していることが実験的に証明されたことから、図 5C において、成長円錐部分のマグネシウムイオン濃度は細胞質部分よりも高く、蛍光強度の変化率に違いが生じたものと考えられる。PC12 細胞以外にもウシ血管内皮細胞においても同様の結果が得られている。

3. 考察及び今後の展望

開発した蛍光プローブは、生きた細胞中のマグネシウムイオンを選択的にかつ高感度に同定することに有用であることが示された。1980 年代後半以降、同じ 2 価金属イオンであるカルシウムイオンの生理学的知見が増えたのは、簡便に利用可能な蛍光プローブが開発されたためである。今後、さらに研究が進めば今まで明らかにされてこなかったマグネシウムイオンを中心とした分子生理学を展開でき、細胞の専門家や医療関係者の基礎研究に活用されるものと期待している。

4. 参考文献

- 1) Suzuki, Y., Saito, N., Komatsu, H., Citterio, D., Kitamura, Y., Kubota, T., Oka, K., Suzuki, K.: *Anal. Sci.*, **17**, i1451 (2001).
- 2) Suzuki, Y., Komatsu, H., Ikeda, T., Saito, N., Araki, S., Citterio, D., Hisamoto, H., Kitamura, Y., Kubota, T., Nakagawa, J., Oka, K., Suzuki, K.: *Anal. Chem.*, **74**, 1423 (2002).
- 3) 鈴木祥夫, 岡浩太郎, 鈴木孝治, 和光純薬時報, Vol.72, No.3, 2-5 (2003).
- 4) Kubota, T., Tokuno, K., Nakagawa, J., Kitamura, Y., Ogawa, H., Suzuki, Y., Suzuki, K., Oka, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 332 (2003).