

## 細胞内グルタチオン濃度変化のリアルタイム追跡を可能にするホスファローダミン色素の開発

(名大院理<sup>1</sup>, 名大 ITbM<sup>2</sup>) ○師 悠季<sup>1</sup>・Wu Qian<sup>1</sup>・多喜 正泰<sup>2</sup>・山口茂弘<sup>1,2</sup>  
 Phospha-rhodamine Dyes for Real-time Monitoring of Glutathione Changes in Cell (<sup>1</sup>*Graduate School of Science, Nagoya University*) Yuki Moro,<sup>1</sup> Wu Qian,<sup>1</sup> Masayasu Taki,<sup>2</sup> Shigehiro Yamaguchi<sup>1,2</sup>

Since changes in intracellular glutathione (GSH) concentration are related to cellular functions and some diseases, it is desirable to develop fluorescent probes that enable long-term observation of the GSH variation in living cells. In this study, we developed fluorescence probes that exhibit fluorescence intensity changes depending on the GSH concentration, by taking advantage of the high electrophilicity of a NIR-emissive phospha-rhodamine scaffold. First, to tune the binding affinity for GSH, we synthesized a series of phospha-rhodamines that furnish a various type of heteroaryls at the 9-position of the rhodamine skeleton. Among them, probe **1** showed a reversible change in fluorescence intensity in response to GSH with the  $K_d$  value of 0.99 mM. We then synthesized probe **2** with a HaloTag-ligand to control the subcellular localization of the probe. When cells expressing HaloTag fusion proteins were treated with probe **2**, the probe was localized in the target organelle. Thus, this probe is membrane-permeable and suitable for the detection of GSH in living cells. In addition, we successfully observed the fluorescence intensity change in real time upon addition of intracellular thiol scavenger NEM or cysteine derivative NAC.

**Keywords :** Glutathione; Fluorescent Probes; NIR emissive Dyes; Live cell imaging; Long-term Observation

グルタチオン (GSH) は多様な細胞機能や疾病と関連することから、その生体内動態を低侵襲かつ長時間に渡り観察可能な蛍光プローブの開発が望まれている。本研究では、近赤外蛍光色素であるホスファローダミンの高い求電子性を利用し、GSH の付加反応によって蛍光応答を示すプローブの開発に取り組んだ。まず、GSH との親和性を制御するため、ローダミン骨格の9位に様々なヘテロアリール基を導入した一連の化合物を合成した。中でも 3-カルボキシチエニル基を結合したプローブ **1** は、GSH との解離定数 0.99 mM を有し、GSH 濃度に応答した可逆的な蛍光強度変化を示した。次に、プローブの細胞内局在を制御するため、HaloTag リガンドを導入したプローブ **2** を合成した。HaloTag 融合タンパク質を発現した細胞に対してプローブ **2** を添加したところ、標的オルガネラへの局在が認められた。したがって、本プローブは膜透過性を有しており、生細胞内の GSH 検出に適しているといえる。実際、細胞内チオールと反応する NEM やシステイン誘導体 NAC の添加により、蛍光強度変化のリアルタイム観察にも成功した。

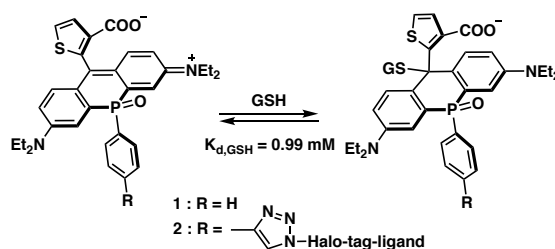


Figure 1. Probe for GSH.