

近赤外蛍光ホスファローダミン色素によるオルガネラ標識法の開発

(名大院理¹・名大 ITbM²) ○田中 良来¹・多喜 正泰²・山口 茂弘^{1,2}

Organelle labeling with NIR-emissive phospho-rhodamine dyes (¹Graduate School of Science, Nagoya University, ²Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University) ○Yoshiki Tanaka,¹ Masayasu Taki,² Shigehiro Yamaguchi^{1,2}

Protein-tag system has been a widely used technique to label target proteins with organic fluorescent dyes. Although various labeling reagents are available, the development of near infrared (NIR) fluorescent ligands with membrane permeability, high chemical stability, and photostability are still demanded. In this study, we have developed a series of NIR-emissive phospho-rhodamine dyes with the polarity sensitivity based on an intramolecular spirocyclization. With reducing the number of alkyl groups on the terminal amino groups, the absorption and emission spectra were hypsochromically shifted, and the spirocyclization equilibrium was shifted to a closed form at neutral pH. The closed form can be stabilized by the replacement of the carboxy group with a sulfonamide. All the compounds were successfully employed to stain target organelles in cells expressing HaloTag fusion protein. In particular, a dye bearing a sulfonamide group showed excellent membrane permeability and significantly shortened the time for labeling. The dye visualized the target organelle even with low concentrations less than 50 nM, indicating its practical utility as a fluorescent labeling reagent. **Keywords** : NIR fluorescent dyes; HaloTag ligand; Intramolecular spirocyclization; Membrane permeability; Live-cell imaging

タンパク質タグは、任意のタンパク質を有機蛍光色素によって標識する技術として広く用いられている。現在、多種多様のタンパク質タグ標識剤が市販されているが、波長の多様性や自家蛍光抑制の観点から、近赤外領域に傾向を示し、かつ細胞膜透過性、化学的安定性、耐光性を併せもつ優れた蛍光標識剤の開発が強く求められている。本研究では、近赤外蛍光特性をもつホスファローダミン色素に対し、分子内スピロ環化平衡に由来する極性応答能を付与した色素の開発に取り組んだ (Figure 1)。

まず、分子構造と物性の相関について検証した。化合物 **1-3** において、アミノ基上のアルキル基数の減少に伴って、吸収・蛍光スペクトルは短波長シフトし、加えて中性 pH 付近では閉環構造側に平衡がシフトすることがわかった。また、チオフェン環上の R² 基としてスルホンアミド基を導入した **4** では、色素骨格に対する求核性が高くなり、閉環構造が大きく安定化されることがわかった。

次に、HaloTag 融合タンパク質を発現させた細胞に対して、**1-4** を作用させたところ、いずれの化合物も蛍光標識剤として機能した。アルキル基数が同じである **1** と **4** を比較すると、スルホンアミドを有する **4** の方が優れた細胞膜透過性を示し、標識に要する時間の大幅な短縮が認められた。また、低濃度 (50 nM) の色素を用いた場合でも標的オルガネラの染色が可能であった。

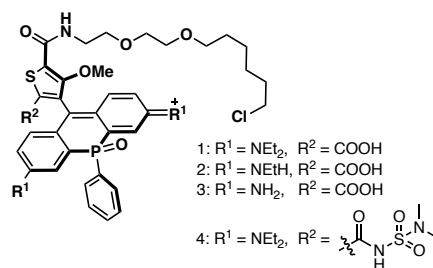


Figure 1 Structure of dyes conjugated with a HaloTag ligand.