ナノレベル計測工学基礎　講義資料

様々な分子プローブ

分子プローブには、細胞や個体内で用いるものと、体外診断などに用いるものがある。

ここでは、種々の対象に対するそれら分子プローブを対象ごとにまとめた。

【酵素活性検出用プローブ】

　酵素活性を検出する目的は、その酵素の活性そのものを調べたい場合と、その酵素をレポーターとして別種の物質の濃度を知りたい場合がある。

特に体外診断では、後者のようにレポーターとして酵素を用いる場合が多く、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、ぺルオキシダーゼ、種々のオキシダーゼなどが用いられる。

　血中コレステロールのように、もし対象分子の濃度が比較的高く、しかも、その分子を基質とする酵素がある場合には、この酵素反応を別の発色反応とカップルさせることで、発色基質や蛍光基質を用いて活性を検出することが可能である。後述するグルコースオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼを用いる場合がそれに当たる。

　一方で、対象物質濃度が低い場合には、検出シグナルを増幅するためにレポーター酵素が用いられる。典型的な例は、ＥＬＩＳＡである。この場合には、固定化抗体に対象物質を捕捉した後、レポーター酵素を標識した検出抗体を結合し、その酵素の発色基質や蛍光基質を用いて検出する。直接酵素標識抗体を用いず、まず、抗体を結合させてから、その

抗体に対する2次抗体に酵素を標識するサンドイッチ法でさらにＳ／Ｎ比を上げることができる。

1. ホスファターゼ活性検出用

　アルカリホスファターゼは、多用されるELISA用レポーター酵素の一つである。リン酸基を蛍光基に導入して蛍光を消光させておき、これが切断されて蛍光を回復する、あるいはリン酸基が切断されて初めて発色反応が進行するという設計がなされる。

ＥＬＦ９７



水溶性で弱い青色の蛍光を持つ試薬で、抗体などに修飾されたアルカリホスファターゼの存在下で脱リン酸化されると、沈殿して強い緑の蛍光を発する。

ＢＣＩＰとＮＢＴ



ＢＣＩＰがアルカリホスファターゼで脱リン酸化されると、ＮＢＴ（テトラゾリウム）で酸化されてインジゴとなり、ＮＢＴもホルマザン色素となるので、両者ともに暗紫色の沈殿となる。

ＤＰＦ



無蛍光からアルカリホスファターゼによりフルオレセイン（緑色蛍光）を生成する。

ＤｉＦＭＵ



チロシンホスファターゼで脱リン酸化されてクマリンを生成。

Fhit検出用プローブ



Fhitは、肺がんで不活性化しているアポトーシスに関わるジアデノシンポリリン酸結合を切断するホスファターゼ。上記試薬は、BOBIPYとグアニン（あるいはアデニン）とのPETで蛍光が消光しているが、切断で、520 nm（励起480 nm）の蛍光が回復する。

1. キナーゼ活性（リン酸化）検出

　ペプチドのリン酸化を検出するには、蛍光基にアミノ基を導入した試薬を用いて、水溶性カルボジイミド（EDC）でリン酸基と結合してホスホアミド結合で蛍光基を導入できる。

それ以外では、蛍光基を標識した基質ペプチドが標的チロシンキナーゼでリン酸化された後、テルビウム標識抗リン酸化チロシン抗体を結合して、両者の蛍光エネルギー移動を検出する方法もある。

セリン／スレオニンキナーゼに関しては、よいリン酸化アミノ酸に対する抗体が無いので、亜鉛化合物であるPhosTagなどが用いられる。



1. ガラクトシダーゼ

以下のように、色素や蛍光基にガラクトースを直結すると、無色、無蛍光となる。糖が遊離することで、発色あるいは蛍光回復が起こる。ELISAなどのレポーター酵素の検出剤として用いられることが多い。





1. β―グルクロニダーゼ

　β―グルクロニダーゼプローブは、大腸菌のコンタミ検出や植物を用いた実験でのレポーター遺伝子の検出として用いられる。



1. ペプチダーゼ・プロテアーゼ

一般に下記のように蛍光基に蛍光が消光するようにペプチド基質を結合すると、これが標的酵素で切断されて蛍光が回復する。



以下の様なカスパーゼ類のプローブも報告されている。



ＨＩＶプロテアーゼ用プローブ

このように基質の両端に蛍光基と消光基を連結させてＦＲＥＴで消光させておけば、標的プロテアーゼで切断されて蛍光が回復する。



1. オキシダーゼ

　オキシダーゼは酸素を用いて基質を酸化するが、その時、過酸化水素を発生するので、これを検出することで活性を測定する。この種の酵素は、測定対象物質に特異的なものを用い、その反応と発色、あるいは蛍光回復反応をカップルさせる。

例えば、グルコースオキシダーゼでは、グルコースをグルクロンに酸化するときに発生する過酸化水素を検出する。現在では、その他にコレステロールオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなどが用いられる。

これらにより、対象とする基質濃度を計測して診断に用いられる。

過酸化水素は、以下のプローブで検出できる。



1. その他

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

　この酵素は、転写レベルと活性がきれいに相関しているので、レポーターとして用いられる。



ルシフェラーゼ



1. Ｃａプローブ

細胞内カルシウムイオンプローブは、細胞研究用蛍光分子プローブの代表格である。カルシウムイオンは、細胞外では1 mM、細胞内では、70～100 nMと濃度差が1万倍あるため、細胞内濃度変化は大きなものになる。そのため、蛍光分子プローブが有効な対象である。ただし、細胞内にはサブmMレベルのマグネシウムイオンが存在するので、カルシウムイオンに高い特異性が必要である。そこで、ＥＧＴＡ骨格を利用し、さらに高い応答速度を実現するため、アミンを芳香族にしてプロトン化を抑えたＢＡＰTA骨格が利用される。

これらのプローブは細胞へは入らないが、分子内のカルボキシル基をアセトキシメチルエステル化（ＡＭ化）すると膜を糖化可能となる。細胞内に入った後、ＡＭ基はエステラーゼで加水分解されて元のプローブとなるため、細胞内にプローブを蓄積させることができる。

Quin2

Ｑｕｉｎ２は、最初に報告されたカルシウムプローブで、カルシウムを結合して蛍光強度が大きく増大する。ただ、モル吸光係数が小さいのと蛍光量子収率が0.14と小さいため、高い試薬濃度が必要であることと、Ｋｄが110 nMと小さく、細胞内の遊離カルシウムイオンを全て結合してしまうため、細胞機能への影響が無視できない。



Fura2

Fura2は、Quin2の欠点を補うために開発されたプローブであり、蛍光量子収率が高く、Quin2では、細胞内濃度が30 uM必要であるのが、1 uMですむため、細胞への影響が少ない。また、励起波長がカルシウムを結合することで、380 nmから340 nmへとシフトするため、２波長で励起した蛍光強度の比をとることで、細胞の厚みや自家蛍光に影響されないイメージを得ることができるという大きなメリットを有する。蛍光波長は、550 nmである。Ｋｄは224 nM



Indo1

　Indo1も、改良型のカルシウムプローブである。



こちらは、カルシウムイオンの結合により励起波長は変わらない（330 nm）が、蛍光波長が485 nmから410 nmにシフトするので、蛍光波長の比をとる。Ｋｄｈａ，250 nMである。

長波長型プローブ(Fluo3, Rhod2)

これらのプローブは、比をとって測定することはでき菜が、蛍光波長が長波長であり、しかも、カルシウムイオンの結合による蛍光増大が大きいという特徴があり、視覚的なイメージを得るには優れている。

高濃度カルシウムイオン測定用プローブ



　細胞内（細胞質）の遊離カルシウムイオンは、高くても1 uM以下であるが、興奮性細胞の中にはそれを超えるものもある。また、細胞外から入ってくるカルシウムと小胞体から細胞質に放出されるカルシウムイオンは、細胞機能に異なる影響を与えるので、これを区別して計測したいという要望がある。そのためには、小胞体内のカルシウムイオンの減少をみることが有効であるが、このような高濃度のカルシウムイオンの計測のためには、より高濃度のカルシウムイオンに応答するＫｄ値の大きなプローブが必要である。このため、骨格にフッ素やニトロなどの電子吸引性基を導入したプローブが商品化されている。



1. 細胞内亜鉛イオンプローブ

　亜鉛イオンは、細胞のＺｎフィンガータンパクなどに結合しているが、アポトーシスの初期に細胞内に遊離の亜鉛イオンが増大することが知られており、亜鉛イオンはアポトーシスを初期段階で知るためのプローブとして有効であると考えられている。



1. 塩素イオン

　塩素イオンは、クロライドチャネルにより細胞内濃度が制御されている。塩素イオンを結合して蛍光を増大させるプローブは知られていないが、これが衝突することで蛍光が消光するプローブが知られている。あらかじめ検量線を書いておくことで、いずれも、0～50 mMの塩素イオンが定量できる。



1. 一酸化窒素プローブ

　一酸化窒素は、ＮＯ合成酵素（ＮＯS）によりアルギニンから合成される。血管内皮で作られるＮＯは、血管平滑筋のグアニル酸シクラーゼを活性化させて血管を弛緩させる。また、好中球等の免疫細胞から発生するＮＯは、侵入した菌等の殺傷に、神経では神経機能のモデュレーターとしてなど多彩な機能を発揮している。

プローブとしては、ＮＯが反応することで蛍光体（トリアゾール誘導体）が生成するような設計となっている。





1. 細胞内ｐＨプローブ

細胞内ｐＨは、厳密に7.4前後にコントロールされているが、これがわずかに変化することは細胞機能変化に密接に関わっている。特にがんの増殖が激しい場所では低ｐＨになっている。これ等を計測するｐＨ蛍光プローブは、pH 7付近でプロトンが解離して蛍光が変化するように設計されている。また、その際に蛍光波長がシフトする2波長型（比をとることができる）のSNARF類も市販されている。



1. オルガネラプローブ

　細胞以内のオルガネラを特異的に染色する蛍光プローブが知られている。

一般にミトコンドリアにはローダミン類が蓄積することが知られている。また、弱塩基性のアミノ基を有する分子は、低ｐＨであるライソゾームに捕捉される。







