

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 9 月 8 日 (08.09.2006)

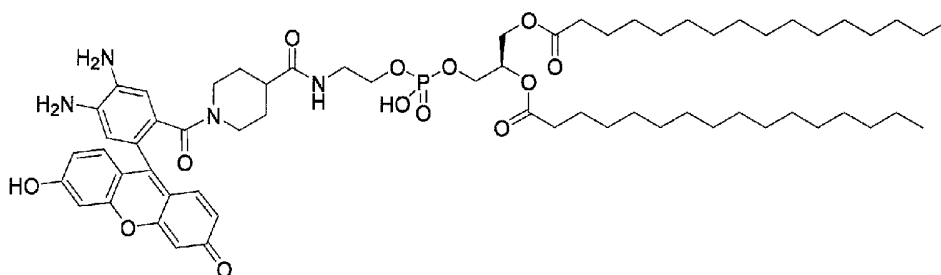
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/093252 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/304054
- (22) 国際出願日: 2006 年 3 月 3 日 (03.03.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
60/658,177 2005 年 3 月 4 日 (04.03.2005) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO)
[JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷 7 丁目 3 番 1 号
Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長野 哲雄
(NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京
区本郷七丁目 3 - 1 国立大学法人東京大学内
Tokyo (JP). 小島 宏建 (KOJIMA, Hirotsu) [JP/JP]; 〒
1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 - 1 国立大学法
人東京大学内 Tokyo (JP). 大崎 隆 (OSAKI, Takashi)
[JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 - 1
国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &
CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号
京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MEMBRANE-ANCHORING FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称: 膜アンカー型蛍光プローブ

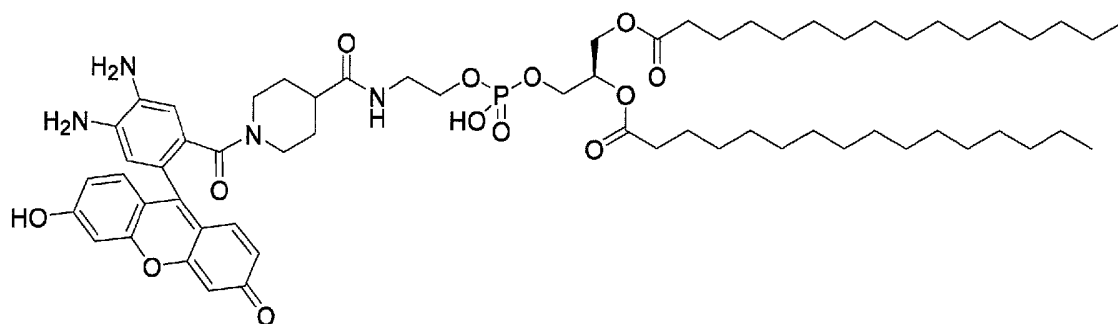


(57) Abstract: Disclosed is a membrane-anchoring fluorescent probe which is composed of a compound wherein a residue of a phospholipid is bonded with a residue of a fluorescent probe compound via a linker (for example, a compound represented by the formula below).

[続葉有]

(57) 要約:

リン脂質の残基と蛍光プローブ化合物の残基とがリンカーを介して結合した化合物(例えば以下の式で表される化合物)からなる膜アンカー型蛍光プローブ。



明 細 書

膜アンカー型蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、細胞膜に固定化可能な膜アンカー型の蛍光プローブに関する。

背景技術

[0002] 細胞や組織中の一酸化窒素や亜鉛イオンなどを測定可能な蛍光プローブが各種開発されている。現在までに開発された蛍光プローブは細胞内物質の捕捉や電位の変化により蛍光を発するように設計されているが、蛍光プローブ自体が細胞の内外や細胞間を自由移動できるため、細胞内から外への測定対象物質の移動や細胞間情報伝達物質の移動を観察することはできないという問題を有している。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明の課題は、細胞内から外への測定対象物質の移動や細胞間情報伝達物質の移動を観察することができる蛍光プローブを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行なった結果、細胞膜内に埋没可能なアンカー部分をリンカーを介して蛍光プローブに結合させた化合物が細胞膜に効率的に固定されること、及び細胞膜に固定化された上記化合物の蛍光プローブ部分の特性が損なわれずに、細胞膜固定型(以下、本明細書において「膜アンカー型」と呼ぶ。)の蛍光プローブとして極めて良好に機能することを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成された。

[0005] すなわち、本発明により、リン脂質の残基と蛍光プローブ化合物の残基とがリンカーを介して結合した化合物からなる膜アンカー型蛍光プローブが提供される。

別の観点からは、上記の膜アンカー型蛍光プローブを用いて、細胞内から細胞外への測定対象物質の移動を測定する方法、及び上記の膜アンカー型蛍光プローブを用いて、細胞間情報伝達物質である測定対象物質の移動を測定する方法が本発明により提供される。

図面の簡単な説明

[0006] [図1]DAF-PIPAに一酸化窒素溶液を加えたときのHPLCチャート(左図)及び蛍光変化(右図)を示した図である。

[図2]DAF-PIPAに一酸化窒素放出剤であるNOC13を添加してNOとの反応の時間変化を測定した結果を示した図である。

[図3]DAF-PIPA-TのpHプロファイルを示した図である。

[図4]FL-PIP-DPPEを負荷したHeLa細胞の様子を示した写真である。左の写真は共焦点顕微鏡写真であり、右の写真は透過光像との重ねあわせを示した写真である。

[図5]FL-PIP-DPPEを負荷したHeLa細胞における細胞外pH変化による蛍光強度変化を示した写真及び図である。左の写真は $t=0$ (sec.)における顕微鏡写真であり、右図は蛍光強度時間変化 $t=90$ (sec.), $t=230$ (sec.)においてpHを $7.4 \rightarrow 6.7 \rightarrow 6.4$ に変化させたときの結果を示した図である。

[図6]DAF-PIP-DPPEのHeLa細胞膜上での一酸化窒素用蛍光プローブとしての機能を示した写真及び図である。a)及びb)は蛍光顕微鏡写真を示す((a)は $t=0$ sec. (b)は $t=2800$ sec.)。c)は蛍光強度時間変化 $t=120$ (sec.), 1800 (sec.)にそれぞれ $100 \mu\text{mol/L}$ 及び $1 \mu\text{mol/L}$ となるようにNOC13を加えた結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

[0007] 本発明の膜アンカー型蛍光プローブは、リン脂質の残基と蛍光プローブ化合物の残基とがリンカーを介して結合したことを特徴としている。

蛍光プローブ化合物としては、測定対象物質の測定のための蛍光プローブとして用いられるものであれば特に限定されない。測定対象物質の種類は特に限定されず、タンパク質、酵素(例えば、 β -ラクタマーゼ、チトクロームP450酸化酵素、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼ、ラクターゼ、アルカリホスファターゼなどの還元酵素、酸化酵素、加水分解酵素など)、金属イオン(例えば、ナトリウムイオンやリチウムイオンなどのアルカリ金属イオン、カルシウムイオンなどのアルカリ土類金属イオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンなど)、非金属イオン(炭酸イオンなど)、活性酸素種(例えば、一酸化窒素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、及びスーパーオキシドなど)などのいずれであってもよい。

例えば、一酸化窒素などが好ましい例として挙げられる。

[0008] 蛍光プローブ化合物は、測定対象物質を捕捉する基、測定対象物質と反応可能な基、あるいは測定対象物質との接触により切断される基など、測定対象物質の存在を検出できる基を有しており、測定対象物質の検出後に蛍光強度が高まるなど蛍光強度が変化する性質を有するものであれば、その構造は特に限定されない。蛍光プローブ化合物としては、従来、フルオレセイン、ローダミン、又は4,4-ジフルオロ-1,3,5,7-テトラメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン(BODIPY、登録商標、505/515, モレキュラー・プローブス社製)などを母核として種々提案されているが、これらに限定されることなく、多様な種類の蛍光プローブが利用可能である。また、測定対象物質の存在を検出可能な基としては、3,4-ジアミノフェニル基(一酸化窒素測定用試薬)などのほか、極めて多様な基が知られている。

[0009] 例えば、特開平10-226688号公報、国際公開WO 99/1447、国際公開WO 99/51586、特開2000-239272号公報、国際公開WO 01/62755、国際公開WO 01/64664、国際公開WO 02/18362、国際出願PCT/JP2004/13185、国際出願PCT/JP2005/2753、Analyst, 128, 719-723 (2003)などに記載された蛍光プローブ化合物を本発明のために用いることができる。また、モレキュラープローブス社のカタログ(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Ninth Edition)の第20章(カルシウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、及び他の金属イオン)、第21章(pHインディケーター)、及び第23章(ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオン、及び他の無機イオン)に記載された測定対象物を捕捉するための置換基を用いることもできる。これらの刊行物の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。一酸化窒素の測定用の蛍光プローブ化合物として、例えばジアミノフルオレセイン(DAF)(特開平10-226688号公報)などを用いることが好ましい。

[0010] 本明細書において、「蛍光プローブ化合物の残基」とは、蛍光プローブ化合物から水素原子などの適宜の原子又は水酸基やハロゲン原子などの適宜の官能基を除いてできる残基のことであり、好ましくは1価の基を意味している。例えば、フルオレセインやフルオレセイン誘導体の2-カルボキシフェニル基のカルボキシル基から水酸基を除いた残基などが好ましい。

[0011] リン脂質の種類は特に限定されないが、例えば、リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファリジルコリン類、ホスファチジルセリン類、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグリセロール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン類、セラミドホスホリルエタノールアミン類、セラミドホスホリルグリセロール類、セラミドホスホリルグリセロールホスファート類、1,2-ジミリストイル-1,2-デオキシホスファチジルコリン類、プラスマロゲン類、又はホスファチジン酸類などを用いることができる。

これらのリン脂質における脂肪酸残基は特に限定されない。例えば、炭素数12～20個程度の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を1個又は2個有するリン脂質を用いることができ、具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等の脂肪酸由来のアシル基を1個又は2個有するリン脂質を用いることができる。これらのうち、ホスファチジルエタノールアミン類が好ましく、特に好ましいのはジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)である。

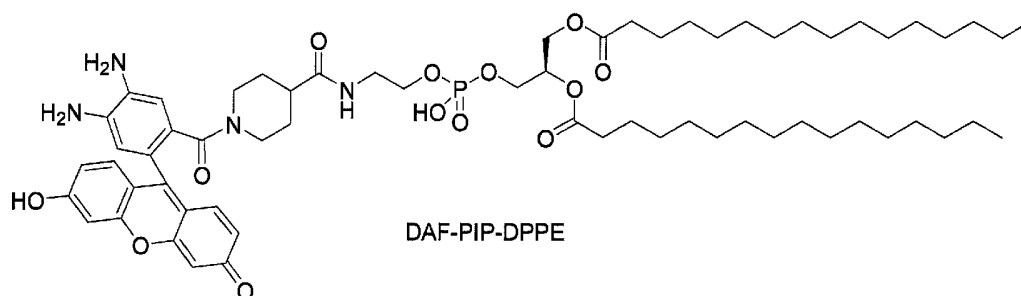
[0012] リン脂質の残基とは、上記のリン脂質又は化学修飾されたリン脂質から水素原子などの適宜の原子又は水酸基やハロゲン原子などの適宜の官能基を除いて得られる基を意味しており、好ましくは1価の基を意味している。例えば、リン脂質のリン酸部分の水酸基から水素原子を除いて得られる残基、リン脂質のリン酸部分の水酸基を除いて得られる残基、リン脂質の炭素原子に結合する水素原子を除いて得られる残基、あるいはリン脂質中にアミノ基が存在する場合には、そのアミノ基から水素原子を除いてできる残基などを例示できるが、これらに限定されることはない。

[0013] リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、リンカーを構成する最短原子数が4～6個程度のリンカーを用いることが好ましい。本明細書において、リンカーについて「最短原子数」という用語は、リン脂質の残基又は蛍光プローブ化合物の残基との結合に関与するリンカー中の2個の原子のうちの1個の原子と他の1個の原子とを結ぶ原子の数のうちの最小の数を意味している。例えば、1,3-プロペニレン基の場合には最短原子数は3であり、1,2-プロペニレン基の場合には2であり、1,5-(4-ブトキン-3-ペンテニレン)基の場合には5である。また、1,3-フェニレン基の場合には3であり、1,2-フェニレン基の場合には2であり、2,4-キノリンジイル基の場合には3であり、1,5-ナフチレンの場合には4である。エチレンジオキシ基では4であり、マロニル基では3

であり、フタロイル基では4である。

[0014] 本発明の膜アンカー型蛍光プローブの一例として、一酸化窒素測定用の蛍光プローブを下記に示すが、本発明の範囲は特定の測定対象物に限定されることはない。蛍光プローブ化合物は、ジアミノフルオレセイン (DAF) などを用いることが好ましく、下記にその構造を示すが、本発明の範囲は下記の特定の化合物に限定されることはない。下記式中、蛍光プローブ化合物の残基はDAFのカルボキシル基から水酸基を除いた残基であり、リン脂質残基はジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) の末端アミノ基から水素原子を除いた残基であり、4-カルボニルピペリジン部分がリンカー部分に相当する。

[化1]



[0015] 本発明の膜アンカー型蛍光プローブは、それ自体は強い蛍光を発する性質を有していないが測定対象物質の存在下で強い蛍光を発するようになるなど、測定対象物質の検出後に蛍光強度が変化する性質を有するものである。また、この膜アンカー型蛍光プローブは、生細胞の細胞膜の外側にアンカー部分 (リン脂質部分) を埋没させることにより、細胞膜の外側に固定される性質を有している。従って、本発明の膜アンカー型蛍光プローブは、細胞内から外への測定対象物質の移動や細胞間情報伝達物質である測定対象物質の移動を測定するための蛍光プローブとして有用である。一方、本発明の膜アンカー型蛍光プローブをマイクロインジェクション等の手段により細胞内に投与すれば、生細胞の細胞内の膜組織にアンカー部分 (リン脂質部分) を埋没させることができる。従って、細胞内の膜組織に膜アンカー型プローブが固定されるため、本発明の膜アンカー型蛍光プローブは、細胞内の膜近傍の測定対象物質の移動や細胞間情報伝達物質である測定対象物質の移動を測定するための蛍光プローブとして有用である。特に、一酸化窒素 (NO) やグルタミン酸など細胞から細

胞外に放出された細胞間情報伝達物質や、細胞内の膜近傍で機能する物質が測定対象物質として好ましい。本明細書において用いられる「測定」という用語については、定量及び定性を含めて最も広義に解釈すべきものである。

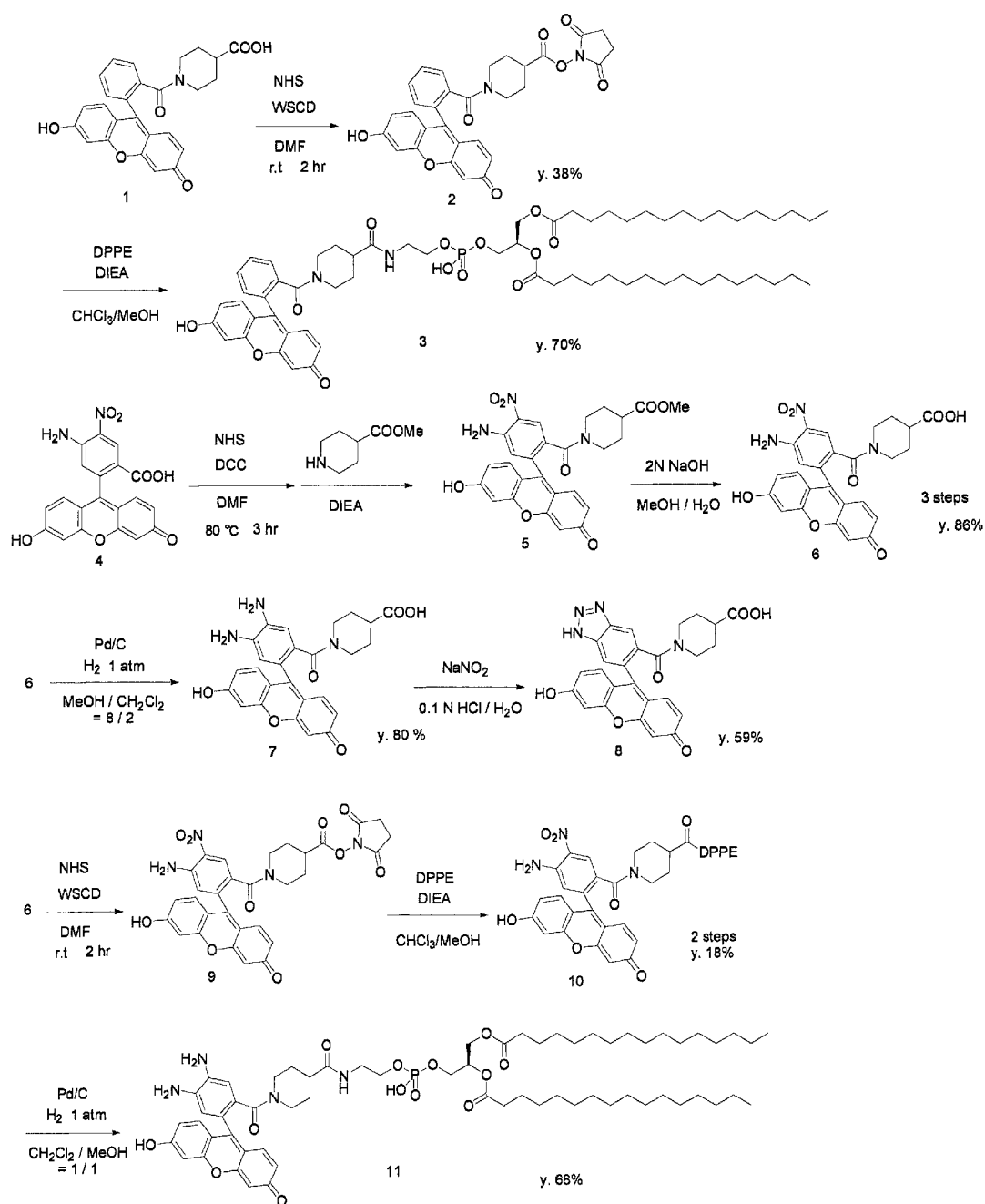
- [0016] 本発明の膜アンカー型蛍光プローブの使用方法は特に限定されず、従来公知の蛍光プローブと同様に用いることが可能である。通常は、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との混合物などに膜アンカー型蛍光プローブを溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。本発明の膜アンカー型蛍光プローブを適切な添加物と組み合わせて組成物の形態で用いてもよい。例えば、緩衝剤、溶解補助剤、pH調節剤などの添加物と組み合わせることができる。また、本発明の膜アンカー型蛍光プローブをリポソームなどの脂質微粒子の構成脂質として用いて蛍光プローブ結合リポソームなどを調製し、これを水性懸濁液などの形態で生細胞に接触させたり、あるいはヒトを含む哺乳類動物にインビボ測定用試薬として投与するなど可能である。

実施例

- [0017] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1: 本発明の膜アンカー型蛍光プローブの製造

[化2]



[0018] (a)化合物2の合成

化合物1(30 mg, 0.068 mmol)を蒸留ジメチルスルホキシド(DMSO) 2 mLに溶解し、氷浴中、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS) (9.4 mg, 0.081 mmol), 1-エチルー3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(WSCD) (15.6 mg, 0.081 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下0 °Cにて30 分,室温にて30 分 攪拌した。その後、NHS (5 mg, 0.043 mmol), WSCD (10 mg, 0.052 mmol)を加え、室温にてさらに1 時間攪拌した。溶媒を減圧溜去後、シリカゲルクロマトグラフィー(メタノール 5% / ジクロロメタン 95%)に

より精製して化合物2を得た(12 mg, 収率33%)。

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 1.30 (br, 2H), 1.79 (br, 2H), 2.54 (br, 1H), 2.70 (br, 1H), 2.79 (s, 4H), 2.97 (br, 1H), 3.54 (br, 1H), 3.92 (br, 1H), 6.56 (d, 4H, J = 8.4 Hz), 6.94 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.43 (m, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.66 (m, 2H)
MS (ESI⁺) 540(M+H)

ール7% / ジクロロメタン 93% - メタノール 25% / ジクロロメタン 75%)にて精製して化合物6を得た(220 mg, 収率86%)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 1.23 (br, 2H), 1.68 (d, 2H, $J = 12.4$ Hz), 2.34 (br, 1H), 3.83 (d, 2H, $J = 12.6$ Hz), 4.10 (br, 2H), 6.44 (s, 2H), 6.50 (d, 2H, $J = 9.5$ Hz), 6.99 (s, 1H), δ 7.05 (d, 2H, $J = 9.5$ Hz), 7.80 (br, 2H), 8.06 (s, 1H)

MS (ESI^+) 504(M+H)

[0021] (d)化合物7 DAF-ヒペリジン酸(DAF-PIPA)の合成

化合物6 (20 mg, 0.040 mmol)を4 mLの溶媒(メタノール / ジクロロメタン = 8 / 2)に溶解し、ここへパラジウムカーボン(Pd-C)(2%)を加え水素(1気圧)雰囲気下で30分攪拌した。反応溶液をセライト濾過してPd-Cを除き、母液を濃縮して化合物7を得た(15 mg, 収率80%)。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 1.22 (br, 2H), 1.65 (d, 2H, $J = 12.0$ Hz), 2.30 (br, 1H), 3.80 (d, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.09 (br, 2H), 5.04 (br, 4H), 6.46 (s, 2H), 6.47 (d, 2H, $J = 2.1$ Hz), 6.51 (dd, 2H, $J = 9.2$ Hz, 2.1 Hz), 6.66 (s, 1H), 7.12 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz)

HRMS (ESI^+) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_6$ 474.1665 (M+H). found 474.1714

[0022] (e)化合物8の合成

化合物7(20 mg, 0.042 mmol)を塩酸酸性水に溶解し、ここへ亜硝酸ナトリウム(3 mg, 0.042 mmol)の水溶液を氷浴下ゆっくり滴下し、室温にて30分攪拌した。2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液により中和後、溶媒を溜去し、逆相シリカゲルクロマトグラフィー(水 100%)により精製した。純度はODSカラムHPLCにより確認した(12 mg, 収率59%)

HRMS (ESI^-) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$ 483.1305 (M+H). found 483.1329

HPLC(eluent A / B = 80 / 20 (0分), 60 / 40 (10分))

溶媒A = 水 (0.1%トリフルオロ酢酸含有), B = アセトニトリル / 水 (0.1%トリフルオロ酢酸) = 80 / 20

[0023] (f)化合物10の合成

まず化合物1から化合物2を合成した時と同様に、化合物6を用いて化合物9を合成した。続いて化合物2から化合物3を合成した時と同様に、化合物9を用いて化合物1

0を合成した。精製はシリカゲルクロマトグラフィー(メタノール 15% / ジクロロメタン 85%)により行なった(化合物6より収率 18%)。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD} = 1 / 1$) δ (ppm) 0.89 (t, 6H, $J = 6.8$ Hz), 1.27 (br, 50H), 1.60 (br, 4H), 1.76 (d, 2H, $J = 11.9$ Hz), 2.32 (m, 5H), 3.41 (br, 2H), 3.67 (br, 2H), 3.89 (br, 2H), 3.98 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz), 4.17 (br, 2H), 4.18 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz, 5.7 Hz), 4.41 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz, 3.5 Hz), 5.25 (br, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.81 (br, 2H), 7.02 (s, 1H), 7.25 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 8.26 (s, 1H)

HRMS (ESI⁺) calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{92}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{P}_1$ 1175.6297 (M-H). found 1175.6265

[0024] (g)化合物11 (DAF-PIP-DPPE)の合成

化合物10(14 mg, 0.012 mmol)を4 mLの溶媒(メタノール / ジクロロメタン = 1 / 1)に溶解し、Pd-C(2%)を加え水素 (1気圧)雰囲気下30 分攪拌した。反応溶液をセライト濾過してPd-Cを除き、母液から目的物を濃縮して化合物11を得た(9 mg, 収率 68%)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD} = 1 / 1$) δ (ppm) 0.88 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz), 1.27 (br, 50H), 1.61 (br, 4H), 1.80 (d, 2H, $J = 12.9$ Hz), 2.32 (m, 5H), 3.41 (br, 2H), 3.67 (br, 2H), 3.96 (br, 2H), 4.03 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 4.18 (dd, 3H, $J = 12.1$ Hz, 5.9 Hz), 4.43 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz, 3.5 Hz), 5.25 (br, 1H), 6.73 (s, 2H), 6.95 (s, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.27 (br, 2H), 7.77 (d, 2H, $J = 9.4$ Hz)

HRMS (ESI⁺) calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{94}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}_1$ 1145.6555 (M-H). found 1145.6555

[0025] 例2

DAF-PIPA を2 mmol/Lになるように溶解した水溶液に一酸化窒素(NO)溶液をNO濃度がそれぞれ0.38 mmol/L, 0.76 mmol/Lになるように加えたときの反応をHPLCにより確認した。またその水溶液をナトリウムリン酸バッファーにより1000倍希釈し蛍光(励起波長 498 nm, 測光波長 521 nm)を測定した。HPLCにおいてDAF-PIPAの保持時間は17.3分である。DAF-PIPAがNOと反応した後に保持時間20.3分の物質が生成したが、このものはESI-MSより、DAF-PIPAのジアミノ部分がNOと反応してトリアゾールとなったDAF-PIPA-Tであることを確認した(図1)。

[0026] 37°CのDAF-PIPA 1.27 $\mu\text{mol/L}$ のPBS(-)溶液にそれぞれ5 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 500 $\mu\text{mol/L}$ になるように徐放性のNO放出剤であるNOC13を加え、NOと

の反応の時間変化を測定した。NO濃度依存的に蛍光強度が大きくなることがわかった(図2)。

NOとの反応生成物である蛍光物質DAF-PIPA-Tの蛍光強度のpH プロファイルを示す。蛍光強度はキサンテン部位のフェノール性水酸基に依存しpKaは約6.3であった(図3)。

[0027] 例3

(a)膜アンカー型蛍光プローブが膜に存在していることの確認

DAF-PIP-DPPEの蛍光強度はNOと反応前は弱い。このため、観察の容易性を考慮し、強い蛍光強度が得られるフルオレセインが結合したFL-PIP-DPPEを用いて確認を行なうこととした。HeLa細胞に対して10 μ mol/LのFL-PIP-DPPEのDMEM溶液(無血清、1% DMSO含)を細胞培養液として用い、22°Cで10分間静置した。その後、細胞培養液をpH 7.4 PBS(+)溶液に交換し、細胞を光軸方向に輪切りにして蛍光観察できる共焦点レーザー顕微鏡($\times 60$)を用いて観察した。細胞膜にFL-PIP-DPPEの蛍光が分布し、FL-PIP-DPPEが細胞膜に局在していることが確認できた(図4)

[0028] (b)細胞膜内外に存在する蛍光色素部位の量の検証

FL-PIP-DPPE を負荷した細胞の細胞外液pH 7.4 PBS(+)(1 mL)にpH 4.5 PBS(+)を500 μ Lずつ加えることにより、細胞外液のpHを7.4 $\rightarrow$ 6.7 $\rightarrow$ 6.4と変化させ、その蛍光強度変化を蛍光顕微鏡で観察した(図5)。フルオレセインの蛍光強度は図3と同様に、pH依存的に変化する。従って細胞外に蛍光色素部分があるならば、FL-PIP-DPPEの蛍光強度もpH変化に応じて図3とほぼ同様に変化し、蛍光が減少するはずである。実際、その予測どおりに確かに減少が認められ、細胞外液pHの変化に伴い蛍光強度は40%減少した。この値は、図3のpH プロファイルでの蛍光強度変化において見られる減少量40%と合致する。

[0029] 一方、対照実験として、細胞膜を透過し、細胞質のエステラーゼにより加水分解されることで、細胞内部にフルオレセインを分布させることができるフルオレセインエステル誘導体(fluorescein diacetate)を細胞に負荷して同様の操作を試みたところ、pHの変化に伴う蛍光強度の変化は認められなかった。細胞内pHは細胞外液pHの変化の影響を受けにくいと言える。先のFL-PIP-DPPEが細胞膜の外側に負荷した後に、

そのフルオレセイン部分が細胞内に取り込まれているならば、蛍光強度はpHプロファイルに合致する40%も減少しないはずである。従って、FL-PIP-DPPEのフルオレセイン部分は細胞膜の外側にあることが確認できた。

[0030] 以上の検討から、膜アンカー型蛍光プローブのフルオレセイン部分は細胞膜を透過しないことが確認できた。従って、細胞外液に溶解させる等の方法で細胞膜の外側に負荷した場合は細胞膜の外側の、マイクロインジェクション等の方法で細胞膜の内側に負荷した場合は細胞膜の内側の測定対象物の観察が可能であることが確認できた。

[0031] (c)細胞膜でのNO プローブとしての機能

DAF-PIP-DPPE ($7.5 \mu\text{mol/L}$)を負荷した細胞の細胞外液(pH 7.4 PBS(+)) 1 mLに、直前に調製したNOC13溶液 $500 \mu\text{L}$ を観察開始120秒後に $100 \mu\text{mol/L}$ 、1800秒後に 1 mmol/L になるように加え、そのときの蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡で観察した。細胞膜上の蛍光強度の著しい増加が確認され、HeLa細胞膜上においてNOプローブとして機能することが確認された(図6)。

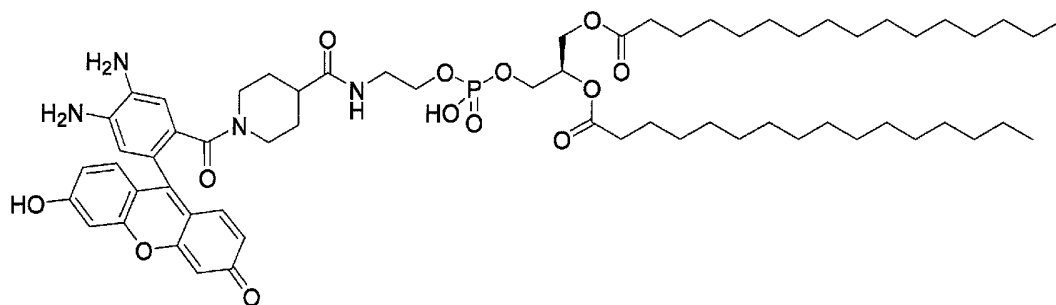
産業上の利用可能性

[0032] 本発明の蛍光プローブを用いて細胞内から外への測定対象物質の移動や細胞間情報伝達物質の移動などを観察することができる。

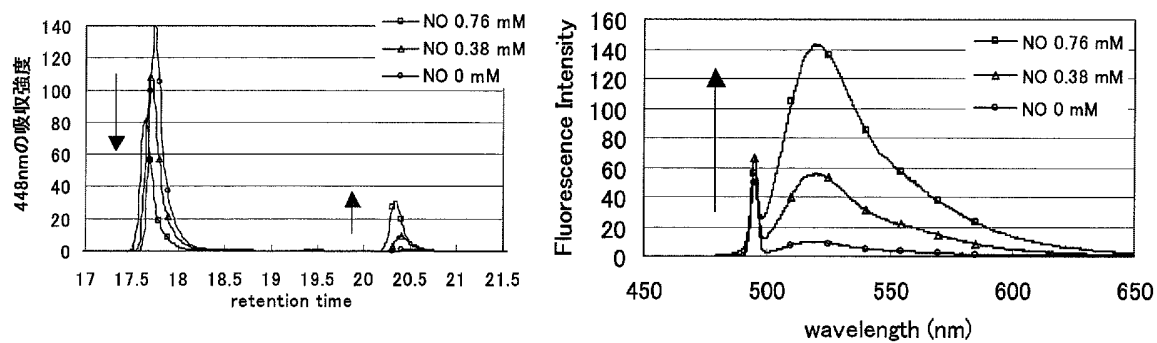
請求の範囲

- [1] リン脂質の残基と蛍光プローブ化合物の残基とがリンカーを介して結合した化合物からなる膜アンカー型蛍光プローブ。
- [2] 以下の式で表される請求項1に記載の膜アンカー型蛍光プローブ。

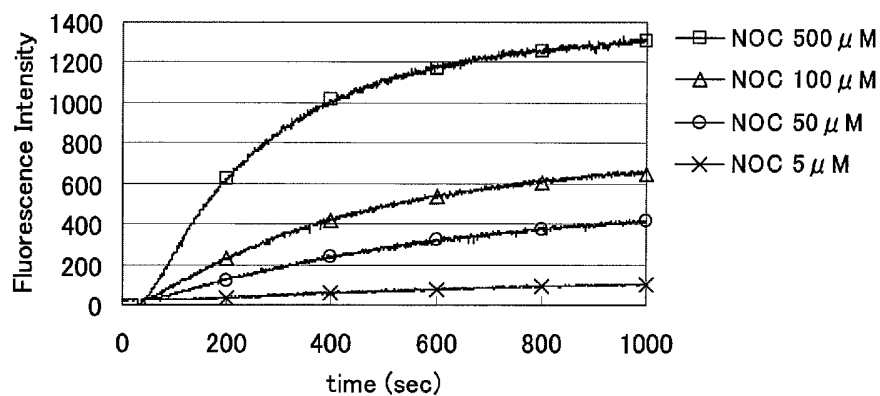
[化1]



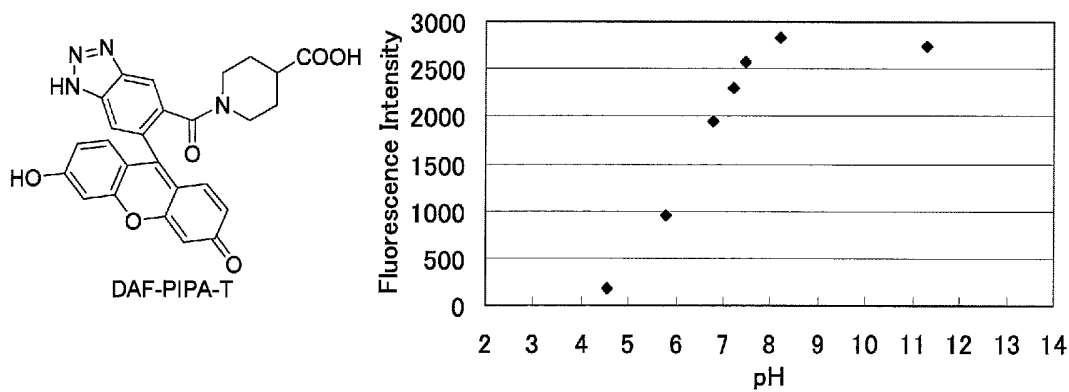
[図1]



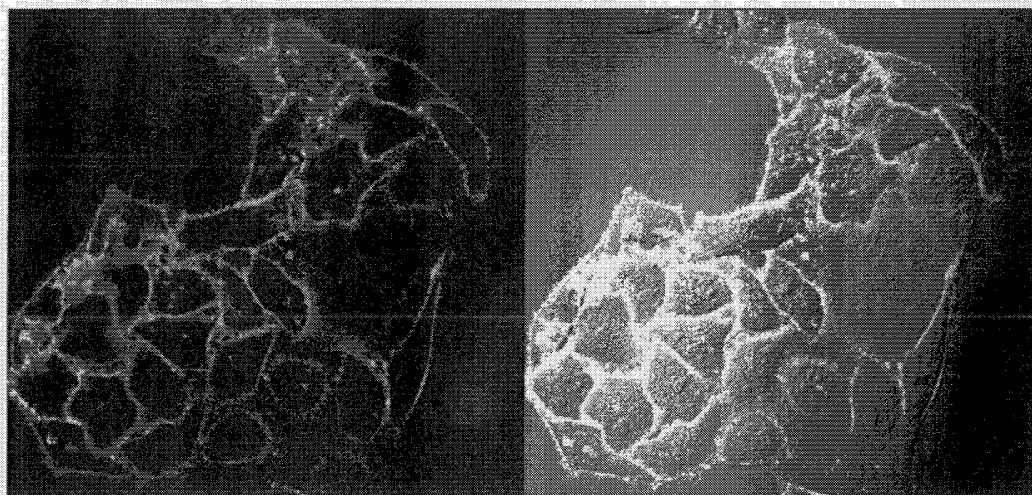
[図2]



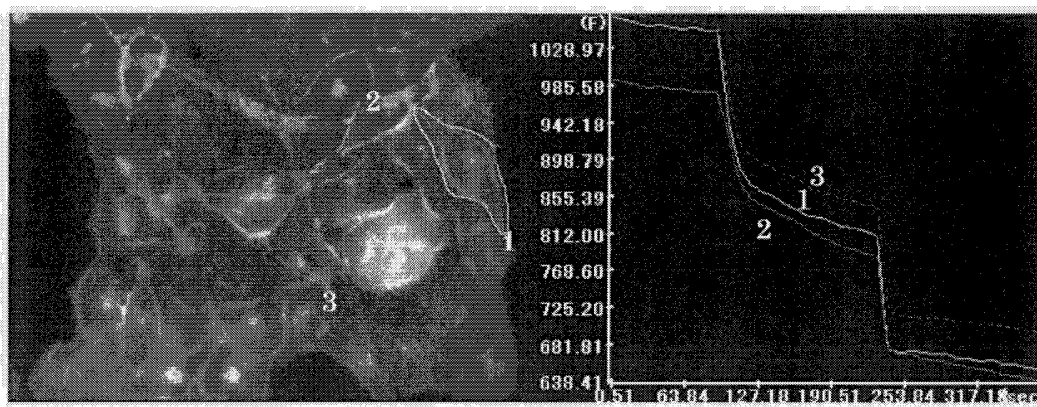
[図3]



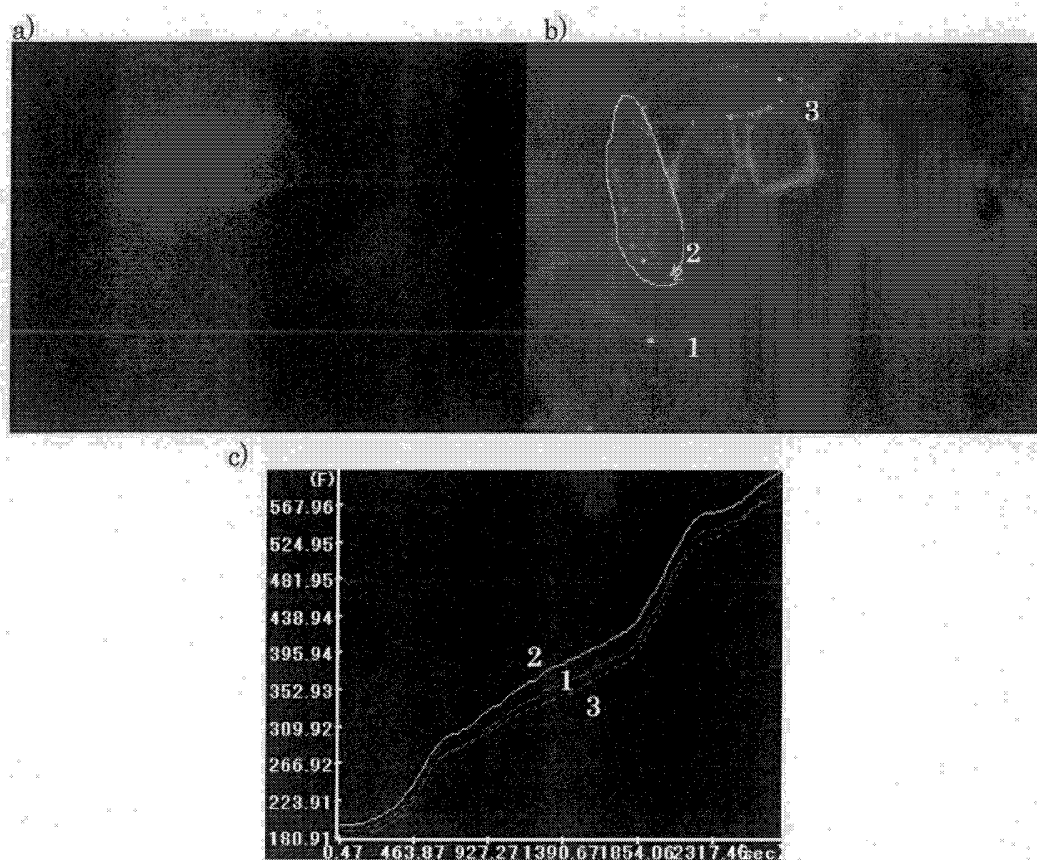
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/304054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/52 (2006.01), **G01N33/58** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/52 (2006.01), **G01N33/58** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2003-344419 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 03 December, 2003 (03.12.03), & WO 2003/102596 A	1 2
X A	JP 2003-518246 A (The Regents of the University of California), 03 June, 2003 (03.06.03), & WO 2001/042211 A & EP 1409456 A & US 6342379 A	1 2
A	JP 10-226688 A (Tetsuo NAGANO), 25 August, 1998 (25.08.98), & US 5874590 A & CA 2218641 A	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 June, 2006 (15.06.06)

Date of mailing of the international search report
27 June, 2006 (27.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/52 (2006. 01), G01N33/58 (2006. 01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/52 (2006. 01), G01N33/58 (2006. 01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 2 0 0 3 - 3 4 4 4 1 9 A (理化学研究所) 2 0 0 3. 1	1
A	& WO 2 0 0 3 / 1 0 2 5 9 6 A	2
X	J P 2 0 0 3 - 5 1 8 2 4 6 A (ザ リージェンツ オブ ザ	1
A	ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2 0 0 3. 0 6. 0 3	
	& WO 2 0 0 1 / 0 4 2 2 1 1 A	2
	& EP 1 4 0 9 4 5 6 A & US 6 3 4 2 3 7 9 A	

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

2 7 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典

2 J

9 5 0 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 10-226688 A (長野哲雄) 1998.08.25 & US 5874590 A & CA 2218641 A	1-2