生細胞内の物質を検出することを指向したプローブ開発

柴田 綾

Development of a Fluorescence Probe for Live Cell Imaging

Aya Shibata

Faculty of Engineering, Gifu University; 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan.

(Received June 1, 2017)

Probes that detect specific biological materials are indispensable tools for deepening our understanding of various cellular phenomena. In live cell imaging, the probe must emit fluorescence only when a specific substance is detected. In this paper, we introduce a new probe we developed for live cell imaging. Glutathione *S*-transferase (GST) activity is higher in tumor cells than in normal cells and is involved in the development of resistance to various anticancer drugs. We previously reported the development of a general strategy for the synthesis of probes for detection of GST enzymes, including fluorogenic, bioluminogenic, and ^{19}F -NMR probes. Arylsulfonyl groups were used as caging groups during probe design. The fluorogenic probes were successfully used to quantitate very low levels of GST activity in cell extracts and were also successfully applied to the imaging of microsomal MGST1 activity in living cells. The bioluminogenic and ^{19}F -NMR probes were able to detect GST activity in *Escherichia coli* cells. Oligonucleotide-templated reactions are powerful tools for nucleic acid sensing. This strategy exploits the target strand as a template for two functionalized probes and provides a simple molecular mechanism for multiple turnover reactions. We developed a nucleophilic aromatic substitution reaction-triggered fluorescent probe. The probe completed its reaction within 30 s of initiation and amplified the fluorescence signal from 0.5 pM target oligonucleotide by 1500 fold under isothermal conditions. Additionally, we applied the oligonucleotide-templated reaction for molecular releasing and peptide detection.

Key words—live cell imaging; glutathione *S*-transferase; oligonucleotide sensing; oligonucleotide-templated reaction

1. はじめに

近年の画像処理技術の進歩により、細胞内の様々な事象の可視化が可能となってきた。それに伴い、特定の物質のみを検出するプローブは、細胞内の様々な現象を理解するうえで必須の技術である。特に生きた細胞内のイメージングを行う際には、検出したい物質があるときにのみ蛍光を発生するプローブが求められている。本稿では、筆者らがこれまでに生細胞内イメージングを指向して開発したプローブについて紹介する。

2. GST 活性検出のための蛍光プローブの開発

グルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ (glutathione *S*-transferase; GST) は、がん細胞で過剰発現していることが古くから知られている。¹⁾ この GST は、疎水性化合物（発がん性物質、治療薬等）とグルタ

チオン (glutathione; GSH) の求核置換反応を触媒する。²⁻⁴⁾ この反応の結果、GSH 抱合体となった化合物はトランスポーターの1種である多剤耐性タンパク質 (multidrug resistance protein; MRP) によって速やかに細胞外に排出される。この GST の過剰発現が抗がん剤耐性の一因となっているため、^{1,5,6)} 細胞内 GST 活性レベルの情報は、抗がん剤等の投薬診断の重要な決定指針となり、いまだ不明な環境変化に対する GST の発現調節機構の解明にも寄与すると考えられる。

これまでも、GST 検出のための蛍光発光プローブはいくつか報告されていた。⁷⁻¹²⁾ しかし、既出のプローブは蛍光を発する際にプローブが GSH 抱合体となり、MRP により速やかに細胞外に排出されることから、細胞内 GST の定量的検出は困難であると予測された。一方、筆者らが開発した GST の基質となる蛍光プローブは、GSH と反応するアリアルスルフォニル保護基と、機能がマスクされた本体から構成される。¹³⁻¹⁵⁾ アリアルスルフォ

岐阜大学工学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1)

e-mail: ashibata@gifu-u.ac.jp

本総説は、平成 28 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. (A) Potential Fluorogenic Substrates GST-catalyzed Reaction with GSH, (B) Fluorescence Measurement of the Fluorogenic Probes in the Absence or Presence of GSH/GST, and (C) Structure of DN-AcRh and DN-Cv

(B) Reactions were performed in 10 mM PBS (pH 7.4) with 1 μ M DN-AcRh, 10 mM GSH and 2 μ g/mL GST for 8 min at 37°C. E_{ex} =490 nm, E_{em} =500–600 nm.

Table 1. Specific Activity of GSTs with Different Fluorogenic Substrates^a

Enzyme Substrate	$[k_{cat}/K_m]/k_{non-cat}$			
	GSTA1-1	GSTM1-1	GSTP1-1	MGST1
DNs-Coum	$(4.1 \pm 0.7) \times 10^6$	$(2.3 \pm 0.6) \times 10^6$	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^6$	$(3.2 \pm 0.9) \times 10^5$
DNs-AcRh	$(6.8 \pm 0.6) \times 10^7$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^7$	$(8.0 \pm 1.8) \times 10^6$	$(1.9 \pm 0.4) \times 10^7$
DNs-CV	$(2.4 \pm 1.1) \times 10^9$	$(3.6 \pm 2.1) \times 10^8$	$(3.6 \pm 2.1) \times 10^8$	$(4.3 \pm 1.2) \times 10^8$

^a Specific activities were obtained in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.5 (with 0.1% Triton for MGST1), 5 mM GSH and DN-Coum, DN-AcRh, DN-CV as second substrate. The concentration of DN-Coum used was 40 μ M, the concentration of DN-AcRh used was 25 μ M, and the concentration of DN-CV used was 2.5 μ M. The final DMSO concentration in all assays was 1.0% (v/v).

ニル保護プローブが細胞内に導入されると、プローブに対し GSH が GST を触媒として求核置換攻撃を行う。この芳香族求核置換反応の結果、プローブから保護基が除去され、蛍光シグナルが発生する [Fig. 1 (A)]。この反応のときに、プローブ自身は GSH 修飾を受けないことから細胞内で安定してシグナルが発生することが可能となる。

まずはじめに、ジニトロベンゼンスルフォニルクロリドと蛍光基質であるモノアセチルローダミン (mono-acetyl rhodamine; AcRh) を反応させることで、DNs-AcRh を合成した。得られた DNs-AcRh は単体では水溶液中でほぼ無蛍光であるのに対し、GSH のみ若しくは GSH/GST で処理すると 520 nm

付近にローダミン由来の蛍光が観測された [Fig. 1 (B)]。このとき、GST 存在下でのほうが蛍光の回復が大きかったことから、プローブに対する GSH の求核攻撃は GST 存在下で促進することが分かった。この結果より、DNs-AcRh は GSH/GST 活性を検出することが可能であること示された。さらにこの手法が他の蛍光基質にも応用可能であるかを検討したところ、クマリンやクレシルパイオレットにも DNs 基を導入することで同様に GST 検出プローブを得ることに成功した [Fig. 1 (C)]。これらプローブを用いて、各種 GST のサブタイプに対する反応性について検討を行ったところ、合成したプローブは、特に GSTA1-1 に対し高い特異性を示す

Probes	R =	Φ^a	σ^-^b
DNs-AcRh	NO ₂	0.008	1.27
CNs-AcRh	CN	0.013	1.01
ANs-AcRh	COCH ₃	0.020	0.87
BNs-AcRh	COO(CH ₂) ₃ CH ₃	0.044	0.76

Fig. 2. Quantum Yields of 4-Substituted-2-nitrobenzenesulfonyl Protected AcRh Probes

^a All measurements were done in PBS (pH 7.4, 100 mM). Compounds were excited at 490 nm. Quantum yields are determined by using fluorescein ($\Phi=0.85$, 0.1 M NaOH) as a standard. ^b Hammett constants (σ^-) were taken from Ref. 19) and 21).

Table 2. Steady-state Kinetic Parameters of GST with 4-Substituted-2-nitrobenzenesulfonyl Protected AcRh^a

		wo GST	GSTA1-1	GSTM2-2	GSTP1-1
DNs	K_m (μM)		2.43 ± 0.18	4.70 ± 0.26	7.42 ± 1.95
	k_{cat} ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)		150.22 ± 7.99	24.59 ± 1.27	15.28 ± 3.68
	k_{cat}/K_m ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)		618.6 ± 24.4	52.4 ± 1.0	20.7 ± 0.5
	$k_{\text{non-cat}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)				
	rate enhancement ($\times 10^4$) ^b	5.56 ± 0.97	111.3 ± 4.4	9.4 ± 0.2	3.7 ± 0.1
CNs	K_m (μM)		3.21 ± 0.26	4.92 ± 0.79	4.15 ± 0.40
	k_{cat} ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)		113.62 ± 7.98	20.85 ± 1.86	8.84 ± 0.64
	k_{cat}/K_m ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)		354.7 ± 6.2	42.8 ± 3.0	21.4 ± 0.8
	$k_{\text{non-cat}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)				
	rate enhancement ($\times 10^4$) ^b	3.60 ± 0.16	98.5 ± 1.7	11.9 ± 0.8	5.9 ± 0.2
ANs	K_m (μM)		7.99 ± 1.62	7.67 ± 1.21	6.65 ± 0.93
	k_{cat} ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)		47.81 ± 8.81	18.36 ± 3.98	7.07 ± 0.89
	k_{cat}/K_m ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)		60.1 ± 2.1	23.8 ± 2.3	10.7 ± 0.3
	$k_{\text{non-cat}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)				
	rate enhancement ($\times 10^4$) ^b	1.45 ± 0.06	41.5 ± 1.4	16.5 ± 1.6	7.4 ± 0.2
BNs	K_m (μM)		1.04 ± 0.06	0.80 ± 0.14	0.66 ± 0.22
	k_{cat} ($\times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$)		5.65 ± 0.06	1.85 ± 0.03	0.70 ± 0.05
	k_{cat}/K_m ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)		54.6 ± 2.9	23.8 ± 4.3	11.4 ± 2.5
	$k_{\text{non-cat}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)				
	rate enhancement ($\times 10^4$) ^b	0.39 ± 0.02	138.7 ± 7.3	60.6 ± 10.8	29.1 ± 6.3

^a The GST (GSTA1-1, GSTM2-2, or GSTP1-1) was assayed in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.5, at 5 mM constant GSH and varying concentrations of DNs-AcRh (1–10 μM), CNs-AcRh (1–10 μM), ANs-AcRh (1–30 μM), or BNs-AcRh (1–50 μM). The final concentration of the solvent DMSO was 1%. Values are means $\pm$ S.E. of the mean ($n=3$). ^b Rate enhancement = $(k_{\text{cat}}/K_m)/k_{\text{non-cat}}$.

ことが明らかとなった (Table 1). 特に DNs 保護クレシルバイオレット (DNs-Cv) は GST 非存在下と比較してその反応効率が 2.4×10^9 倍に増加することが確認できた.¹⁴⁾

一般的に芳香族求核置換反応は置換基の電子吸引力によって反応性が異なることが知られている。GST 検出プローブにおいても、過去に 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene (CDNB) の 2 位若しくは 4 位の置換基を変えて GSH/GST との反応性を検討した報告がなされている。^{16–20)} それらの論文ではラット由来の GST が触媒する GSH と 2 位若しく

は 4 位置換 CDNB アナログとの反応は、一部の例外はあるものの、ハメットの置換基定数 (σ^-) に比例することが示されている。そこで筆者らも、アリールスルフォニル基に求電子性の異なる様々な置換基を導入し、各種アリールスルフォニル基で保護したプローブと GST の反応性について検討を行った (Fig. 2 and Table 2). 得られた結果を基に、触媒効率 (k_{cat}/K_m) と σ^- をグラフにプロットしたところ、 k_{cat}/K_m と σ^- との間には直線性が示されたが、GST のサブタイプによって置換基の影響は異なることが明らかとなった (Fig. 3). GSTA1-1 が

Fig. 3. Hammett Plot of $\log (k_{\text{cat}}/K_{\text{m}})$ or $\log (k_{\text{non-cat}})$ vs. σ for Non-enzyme or Enzyme-catalyzed Reaction

Hammett constant are from Fig. 2 and value of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ and $k_{\text{non-cat}}$ are from Table 2. Lines are least-square fits to the data points by Microsoft Excel.

Fig. 4. Fluorescence Image of HL-60 Cells

(a–d) Image of cells incubated with $10 \mu\text{M}$ probe for 60 min at 37°C . (e–l) Control image of cells pretreated with (e–h) $50 \mu\text{M}$ EA or (i–l) 1 mM NMM for 60 min at 37°C and then incubated with $10 \mu\text{M}$ probe for 60 min at 37°C . (left) Bright field image; (right) Fluorescence image. Microscope settings were as follows: excitation: 470/40 bandpass filter; emission: 525/50 bandpass filter.

触媒する反応では、結合している置換基の電子吸引力は GST 非存在下での芳香族求核置換反応と同程度影響することが分かった。この結果は、GSTA1-1 が触媒する反応では一般的な芳香族求核置換反応と同様に Meisenheimer 錯体の形成が律速であることを示している。一方で GSTM2-2 や P1-1 が触媒する反応では反応に対する置換基の電子吸引力の影響は小さいものに留まることが分かった。X 線構造解析から、GSTM2-2 や P1-1 は触媒部位にチロシン残基を持ち、このチロシン残基が 2 位のニトロ基と水素結合することで遷移状態を安定化することが分かっている。²²⁾ そのため、この結果は Meisenheimer 錯体がチロシン残留物によって安定したため、4 位の置換基を変化させても錯体形成の安定化に影響をほとんど及ぼさなかったことに起因すると考えられる。

DNs-AcRh, CNs-AcRh 及び ANs-AcRh を用いて

生細胞内の GSH/GST 活性のイメージングを試みた (Fig. 4)。結果、プローブのみを添加した細胞では、DNs-AcRh 若しくは CNs-AcRh を用いた場合には、強い蛍光が観察されたが、ANs-AcRh を用いた場合には蛍光はほとんど観察されなかった。一方で、GST 阻害剤であるエタクリン酸 (ethacrynic acid; EA)²³⁾ であらかじめ処理した細胞にプローブを添加した場合には、DNs-AcRh を用いた場合にのみ蛍光が観察された。また、GSH のブロッキング剤である *N*-メチルマレイミド (*N*-methylmaleimide; NMM) で処理した細胞ではいずれのプローブを用いた場合でも、蛍光は観察されなかった。以上のことから、DNs-AcRh は細胞内の GSH のみでも反応してしまうことが分かった。それに対し、CNs-AcRh は GST 活性がある細胞でのみ蛍光を発生させたことから、生細胞内の GST 活性を検出するのに適したプローブであることが分

Scheme 1. Synthetic Scheme of Chemiluminogenic Probe

Fig. 5. (A) Mechanism of Chemiluminogenic Probes for GST Detection, and (B) Luminescence Measurement in the Absence or Presence of GST

(B) Reactions were performed in 10 mM PBS (pH 7.4, 1% DMSO as a cosolvent) with 50 μ M probe, 1 mM GSH, and 0 or 10 μ g/mL GST (α and μ mixture) for 60 min at room temperature. ^a S/B ratios were calculated based on signal intensity in the presence or absence of GST.

かった。

3. GST 活性を引き金とする化学発光プローブ、¹⁹F-NMR プローブ及びプロドラッグの開発

筆者らが開発したアリールスルフォニル基を制御ユニットとして用いる GST 活性検出プローブの戦略は他のシグナル発生分子にも容易に応用できる。そこで次に、GST 活性検出プローブとして、化学発光プローブと ¹⁹F-NMR プローブの開発を試みた。²⁴⁾ また、抗がん剤のプロドラッグ化への応用も併せて検討を行った。²⁵⁾

生物発光プローブの合成は、Scheme 1 に示すように発光ユニットとして用いるアダマンタニル 1,2-ジオキセタン基を有するフェノール誘導体 (AMPD)²⁶⁻²⁹⁾ を合成したのちに水酸基に制御ユニットであるアリールスルフォニル基を導入することで行った。このとき、アリールスルフォニル基が異なる 3 つの分子を合成した。Figure 5 (A) に示すように、アリールスルフォニル保護 AMPD (R-AMPD) は、GST/GSH と反応することにより不安定な中間体が形成される。この中間体は速やかに分解され、ジオキセタンの開裂と同時に 470 nm の

発光を示す。合成した発光プローブの GST 検出能を検討した結果、4-アセチル-2-ニトロベンゼンスルフォニル基 (ANs) で保護した ANs-AMPD のシグナル/バックグラウンド (S/B) 比が最も大きく、生物発光プローブとして有用であることが示された [Fig. 5 (B)]。ANs-AMPD を用いて各種 GST サブタイプ (GSTA1-1, GSTM2-2, GSTP1-1, MGST1) に対する酵素反応速度をミカエリスメンテンの式により解析した (Table 3)。その結果、ANs-AMPD は GSTA1-1 に対して高い反応性を示し、その反応速度は GST 非存在下と比較し約 10⁶ 倍に増大した。次に、大腸菌細胞を用いて細胞内 GST 検出を検討した (Fig. 6)。GST を発現している大腸菌培養液中に ANs-AMPD を添加したところ、顕著な生物発光シグナルが生じた。一方、GST を発現していない大腸菌では、生物発光は検出されなかった。この結果は、ANs-AMPD が細胞膜透過性であり、生細胞中の GSH/GST と反応することで自動発光することを示している。ANs-AMPD/GSH/GST を用いた系はルシフェリン/ルシフェラーゼの系と同様な生物発光システムとしての利用が期待される。

Table 3. Steady-state Kinetic Parameters of GST with ANs-AMPD

Parameters	Enzyme			
	GSTA1-1	GSTM1-1	GSTP1-1	MGST1
ANs-AMPD K_m (μM)	24 ± 6.1	2.8 ± 0.53	3.7 ± 0.59	13 ± 3.6
k_{cat} (s^{-1})	$(27 \pm 5.5) \times 10^{-3}$	$(0.6 \pm 0.09) \times 10^{-3}$	$(0.9 \pm 0.7) \times 10^{-3}$	$(7 \pm 1) \times 10^{-3}$
k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$(11 \pm 0.6) \times 10^2$	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^2$	$(2.0 \pm 0.07) \times 10^2$	$(5.1 \pm 0.4) \times 10^2$
rate enhancement	$(11 \pm 0.6) \times 10^5$	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^5$	$(2.0 \pm 0.07) \times 10^5$	$(17.5 \pm 1.0) \times 10^5$

The cytosolic GST (GSTA1-1, GSTM1-1 or GSTP1-1) was assayed in 0.01 M PBS (pH 7.4), at a constant GSH concentration of 1 mM and varying concentrations of ANs-AMPD (0.156–80 μM). Whereas MGST1 was assayed in 0.01 M PBS (pH 7.4) with 0.05% Triton, at a constant GSH concentration of 1 mM and varying concentrations of ANs-AMPD (0.5–100 μM). The final concentration of the solvent DMSO was 10% (v/v). Error limits are given by Graphpad Prism 5 after fitting by non-linear regression; in general at least 15 observations were included in the datasets. Rate enhancements produced by GSTs. Values are means $\pm$ S.E.M. of k_{cat}/K_m divided by $k_{\text{non-cat}}$.

Fig. 6. (A) Detection of GST Activity Using ANs-AMPD in the *E. coli* of GST Expression or Nonexpression, and (B) Detection of Intracellular GST in the *E. coli* by Fluorescence Microscopy

(A) Reactions were performed in *E. coli* cells [the value of O.D₆₀₀ was adjusted 1.4 in 10 mM PBS (pH 7.4, 0.6% DMSO as a cosolvent)] with 50 μM probe and 1 mM GSH for 60 min at room temperature. (B) Reactions were performed in *E. coli* cells [the value of O.D₆₀₀ was adjusted 1.4 in 10 mM PBS (pH 7.4, 0.6% DMSO as a cosolvent)] with 250 μM probe and 1 mM GSH for 6 h at room temperature. Top: ANs-AMPD probe in *E. coli* (GST expression), bottom: ANs-AMPD probe in *E. coli* (no GST expression), left: luminescent signal only, right: bright field image.

核磁気共鳴画像法 (MRI) は感度及び解像度においては蛍光プローブに劣るが、個体深部での観測が可能なことから診断技術として有用である。³⁰⁾ また、¹⁹F 核は生体内でほとんど存在しないことから、S/B 比の高い観測が可能となる。そこで、MRI を用いた GST イメージングに基づくがん診断法を目指して、¹⁹F MRI プローブを設計した。7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン (AFC) のアミノ基にアリールスルフォニル基を導入することで ¹⁹F MRI プローブ DNs-AFC, ANs-AFC, MNs-AFC を設計・合成した。設計した ¹⁹F MRI プローブは、GST/GSH 触媒作用によりアリールスルフォニル基が脱離することにより、磁場環境下の ¹⁹F の化学シフトが移動する [Fig. 7(A)]. 同時に AFC による蛍光シグナルも発生することから、二重機能性を有

するプローブである。¹⁹F MRI プローブの GST 活性検出能について比較したところ、化学発光プローブと同様に ANs 基を用いた ANs-AFC のシグナル/バックグラウンド比が最も大きくなることが分かった。そのため ANs-AFC を用いて実際に ¹⁹F-NMR 測定による反応解析を行った。ANs-AFC を GST/GSH 溶液中に添加したところ、はじめ ANs-AFC 由来の 10.88 ppm のピークが観測された [Fig. 7 (B)]. 時間経過とともに、0.12 ppm 低磁場側に生成物 AFC 由来のピークがあらわれ、60 分後には ANs-AFC 由来のピークが完全に消失した。一方で、GST 非存在下では 60 分後でも反応の進行は全くみられなかった。さらに GST を発現する大腸菌培養液中に ANs-AFC を添加し ¹⁹F-NMR 測定を検討したところ、溶液中と同様にケミカルシフトの移動が観察された (Fig. 8)。このピークシフトは GST を発現しない大腸菌では観測されなかった。また、フローサイトメーターを用いて大腸菌内 GST を解析したところ、GST 非存在下と比較し、3.2 倍の蛍光シグナルを示した。以上の結果から、ANs-AFC は、生体内 GST を検出するための ¹⁹F MRI/蛍光の二重機能性プローブとしての利用が期待される。

抗がん剤であるドキソルビシン (doxorubicin; DOX) は、毒性・副作用が強いことががん化学療法において問題となっている。³¹⁻³⁴⁾ そこでアリールスルフォニルがん細胞で高発現する GST を利用して、がん細胞で選択的に活性化される DOX のプロドラッグを開発することを試みた [Fig. 9(A)]. DOX の薬理活性発現には、糖部アミノ基が重要であることが知られている。そこで、制御ユニット DNs を DOX のアミノ基に導入することで、活性をマスクすることができると予想した。プロドラッグ

Fig. 7. (A) Mechanism of ¹⁹F-MRI Probes for GST Detection, and (B) Time Course of ¹⁹F-NMR Spectra in the Presence or Absence of GST

(B) Reactions were performed in 10 mM PBS (pH 7.4, 1.2% DMSO as a cosolvent, 20% D₂O) with 50 μM ANs-AFC, 4 mM GSH, and 10 μg/mL sjGST for 60 min at 37°C. The standard was TFA (0 ppm).

Fig. 8. (A) Detection of Intracellular GST in *E. coli* Cells by Flow Cytometry, and (B) Time Course of ¹⁹F-NMR Spectra in the *E. coli* of GST with Expression (+) or without Expression (-)

(A) Histograms of fluorescence intensity (constructs using flow cytometer) of ANs-AFC in *E. coli* cells with expression (+) or without expression (-) of GST. Reactions were performed in *E. coli* cells, O.D₆₀₀ was adjusted 0.8 in 10 mM PBS (pH 7.4), 0.2% DMSO as a cosolvent with 25 μM probe and 1 mM GSH for 60 min at 37°C. (B) Reactions were performed in *E. coli* cells, O.D₆₀₀ was adjusted 68 in 10 mM PBS (pH 7.4), 0.6% DMSO as a cosolvent with 300 μM ANs-AFC and 1 mM GSH for 145 min at 20°C. The standard of chemical shift was TFA (0 ppm).

グ DNs-DOX 及び DOX をヒト細胞株に添加したところ、DNs-DOX は GST 活性に依存して細胞殺活性を示すのに対して、DOX は GST 活性に関係なく細胞殺活性を示した [Fig. 9(B)]. 本知見は、活性制御ユニット DNs を用いることで、がん細胞選択的に薬理活性を示すプロドラッグの設計が可能であることを示す。

4. 芳香族求核置換反応を利用した高感度遺伝子検出プローブの開発

生きた細胞内での遺伝子検出は過剰の試薬の洗浄等の操作を行うことができないことから、標的核酸存在下でのみシグナルを発生させる機構が必要となる。その 1 つに標的核酸を鋳型とした化学反応プ

ローブがある。このプローブは、標的となる核酸を触媒として等温下でシグナルを増幅できる利点があるため、微量の遺伝子を検出するのに有利であると言われている。³⁵⁻³⁸ これまでに外部刺激を必要としない化学反応プローブとして、Native chemical ligation,^{39,40} 加水分解反応,⁴¹ Staudinger 反応,^{37,38,42,43} 転移反応,^{44,45} S_N2 反応^{46,47} や金属触媒反応⁴⁸ を利用した系などが報告されている。これらのプローブを開発する際の課題としてプローブの水溶液中での安定性(バックグラウンド蛍光の軽減)と反応回転数の向上が挙げられる。特に、反応回転数の改善は微量のシグナルを効率よく増幅するのに重要である。一般的に化学反応プローブは Fig. 10

Fig. 9. (A) Prodrug Activated by GST Activity, and (B) GSTP Overexpressing V79 Cells with GSTP Accumulated in the Nucleus (NLS) and GSTP Accumulated in the Mitochondria (MIT) and Vector Control Cells were Exposed to DOX and DNs-Dox in Long Term Clonogenic Assay ($n=3$)

(B) The results are expressed as mean values $\pm$ S.D. Significance levels for NLS vs. control are $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$ and for MIT vs. control $*p<0.05$, and $***p<0.001$. CFE=Colony Forming Efficiency.

に示すように (1) 標的遺伝子へのプローブの結合, (2) 標的遺伝子上での化学反応, (3) 標的遺伝子からのプローブのかい離の三段階を一サイクルとしてシグナルを増幅する. これまでの報告例では (2) の化学反応の速度が会合やかい離の段階に比べ遅く, サイクルを回転させるうえでの律速段階になっていた. そこで筆者らはこの化学反応速度を改善することで, 高いシグナル増幅能を持つ遺伝子検出プローブの開発が可能であると考え, 芳香族求核置換反応による蛍光シグナルの off/on 制御の機構を利用した遺伝子検出プローブの開発を試みた. このプローブは蛍光プローブと求核プローブの二本一組からなるプローブであり, 各プローブを最適化することで高感度遺伝子検出を目指した.⁴⁹⁾

はじめに, 求核基の検討を行った. 求核基としてはフォスホロチオエート基と, チオフェノール基の2種類を用いた. これらのチオールの pK_a 値はいずれも7以下^{50,51)}であることから, 中性条件下で安定なチオアニオンを形成することが期待された. 蛍光プローブにはDNs保護クマリン (DNs-AMCA) を5'末端に修飾したものをを用い, 反応の進行は保

護基が脱保護されることにより発生するクマリンの蛍光を測定した [Fig. 11(B)]. 結果, フォスホロチオエート基を用いた PS probe を用いた場合には, ほとんど反応は進行しなかった. 一方で, チオフェノール基を求核基に用いた MBA probe はテンプレート存在下, DNs-AMCA probe との反応が約20秒で完結することが分った. しかし, MBA probe を用いた場合にはテンプレート非存在下でのバックグラウンド蛍光の上昇も合わせてみられた. 微量の遺伝子を検出するためにはこのようなバックグラウンド蛍光の上昇は致命的であることから, 次に蛍光プローブの改善を試みた. DNs基の代わりにCNs基を用いて蛍光プローブ CNs-AMCA probe を合成し, MBA probe との反応性を検討した [Fig. 11(C)]. 結果, テンプレート存在下ではCNs-AMCA probe を用いた場合も DNs-AMCA probe と同様に20秒程度で反応の完結がみられた. 一方で, テンプレート非存在下では, 蛍光シグナルの増加はほとんどみられなかった. 実際, CNs-AMCA probe/MBA probe の組合せの場合, S/B比は30秒の段階で223倍であった [Fig. 11

Fig. 10. Turn over Cycle of the Templated S_NAr Reaction

(D)]. 次に、得られた CNs-AMCA probe/MBA probe の組合せを用いて微量遺伝子の検出を試みた [Fig. 11 (E)]. 測定は反応系中で標的遺伝子に両プローブが同時に結合している状態が約 50% 存在する温度条件 (22°C) で行った. 結果, 0.5 pM テンプレート存在下で, そのシグナルを 1500 倍にまで増やすことに成功した. 細胞内の 1 コピーの RNA の濃度は約 1 pM であることから, 筆者らが開発したプローブは十分な検出感度を持つことが明らかとなった. また, 本プローブを大腸菌内に導入したところ, 標的である 23S rRNA 相補の配列を持つプローブを用いた場合にのみ, クマリン由来の青色蛍光が観察された.

過去に, 化学反応プローブにおけるシグナル増幅サイクルの各段階を詳細に検討した報告はなかったため, 筆者らは開発した CNs-AMCA probe/MBA probe の各段階での速度定数を求めた. その結果を Fig. 12 に示す. CNs-AMCA probe/テンプレート及び MBA probe/テンプレートの会合速度はそれぞれ $51.6 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ と $89.6 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$, 解離速度はそれぞれ $2.2 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ と $18.6 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ であった. それに対し, 反応速度はテンプレート存在下で $8.5 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$ とテンプレート非存在下で $3.2 \times 10^{-6}\text{ s}^{-1}$ と求めることができた. このことから, テンプレ

ート存在下での反応速度が, テンプレートからのプローブの解離速度に非常に近い値にまで改善されていることが見て取れる. 以上のことから, CNs-AMCA probe/MBA probe の組合せからなる遺伝子検出プローブが高いシグナル増幅を達成できたのは, 律速段階であった化学反応速度を改善できたことに起因すると考えられる.

5. テンプレート反応による分子放出プローブの開発

創薬研究において標的細胞選択的に薬剤を作用させることは非常に重要である. 2000 年に Ma らによって化学反応プローブを用いた標的遺伝子選択的な分子放出システム⁴¹⁾ が初めて報告されて以降, これまでに複数のグループが様々な分子放出プローブを開発している.^{35,44,52-57)} しかし, 放出された分子が生体内で機能を発揮した報告例はほとんどない. そこで筆者らは細胞内でタンパク質発現を誘導するアジド基の還元反応を利用した標的遺伝子選択的な分子放出システムの構築を試みた.⁵⁸⁾ Figure 13 にその概略を示す. このシステムでは還元剤であるトリフェニルホスフィン (triphenylphosphine; TPP) を持つ TPP プローブと分子放出プローブの二本一組のプローブを用いる. 分子放出プローブはアジドメチル基で保護されており, Staudinger 反応

Fig. 11. DNA-templated S_NAr Reactions

(A) Sequences of oligonucleotides used in this study. The DNAs- or CNs-AMCA probe was an 8 mer ODN modified with DNAs- or CNs-AMCA at the 5' terminal. The nucleophilic probe was a 7 mer ODN modified with MBA or phosphorothioate at the 3' terminal. The DNA targets were 52 mer ODNs (SR). The target sequence is underlined. (B), (C) Time course of the yield in the reaction between 500 nM MBA or PS probe and 500 nM R-AMCA probe (B: DNAs-AMCA, C: CNs-AMCA) with or without 500 nM SR in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 100 mM MgCl₂ at 22°C. Reaction was monitored by excitation at 375 nm and emission at 450 nm. (D) The yield of templated reaction after 30 s. (E) The reaction yields after 15 h and turnover numbers (TO). Reactions were performed 50 nM CNs-AMCA and MBA probe at shown SR concentrations (50 nM–0.5 pM) in Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 100 mM MgCl₂ at 22°C. The reaction yields were reported as average of values from four times.

によりこの保護基が除去されると、ついで1,6-転移反応が起こり結果、分子が系中に放出される。放出分子はイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) である。lac オペレーターで発現が制御されている GFP 発現ベクターでは lac リプレッサーが IPTG と結合して lac オペレーターから外れることで GFP の発現が誘導される。⁵⁹⁾ そのため、このプローブが大腸菌内に導入された際の、標的遺伝子に基づく分子放出について GFP の蛍光強度で評価することができる。

まずはじめに、アジド基の還元による分子放出が

起こるかどうか、消光剤である *p*-メチルレッド (MR) 放出プローブを用いて、試験管内で FRET の解消による蛍光の経時変化を測定することで検討した (Fig. 14)。その結果、テンプレート非存在下では蛍光強度は全く上昇しないのに対し、テンプレート存在下では時間依存的に蛍光の上昇がみられたことから、MR の放出が起こっていることが確認できた。一方、テンプレート上に1つミスマッチを含む配列を標的とした場合、蛍光の上昇は全くみられなかったことから、この放出プローブは高い塩基配列認識能を有することも明らかとなった。このプ

Fig. 12. (A) Scheme of Kinetic Parameters, and (B) Kinetic Parameters for the Hybridization of Each Probe and DNA-templated Reaction

(B) SR 2 was 21 mer ODN containing target sequence. ^a van't Hoff plot, ^b $k_{off} = k_{on}/K$, ^c $k_r^{-'} = k_r^- \times 50 \text{ nM}$.

Fig. 13. IPTG Release by Templated Reaction Induced Expression of GFP Protein

ローブを大腸菌内に導入したところ、標的である 23S rRNA に相補の配列を持つプローブでのみ蛍光の増加がみられたことから、テンプレート上での Staudinger 反応を引き金として分子放出が起きていることが確認できた。

最後に IPTG 放出プローブを大腸菌内に導入し、標的遺伝子選択的にタンパク質発現誘導が起こ

るかどうかを検討した (Fig. 15)。プローブ導入から 24 時間後の大腸菌をフローサイトメーターと蛍光顕微鏡を用いて観察した。結果、マッチ配列プローブを用いた場合の S/B 比は 1.8 倍とわずかではあるがプローブ未処理のコントロールよりも有意な蛍光発光を得ることに成功した。また、蛍光画像の結果からもスクランブル配列を用いた場合には

Fig. 14. (A) Sequences of Oligonucleotides Used in This Study and (B) Time Course of the Fluorescence Intensity in the Reaction

(A) The ON 1 was a 10 mer ODN modified with MR at the 3' terminal. The ON 4 was a 10 mer ODN modified with TPP at the 5' terminal. The target sequence is underlined. (B) Reactions were performed with 50 nM ON 1, 250 nM ON 4, 0 or 50 nM template [match (ON 6) or mismatch (ON 10)] in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 100 mM MgCl₂ and 1 μg/mL BSA. Reactions were monitored by excitation at 490 nm and emission at 522 nm.

Fig. 15. Detection of the Expression of the GFP under *lac* Operator Control in *E. coli* JM109 (DE3) Cells

(A) Flow cytometry histogram showing cell-count frequency vs. fluorescence intensity for each probe. These histograms correspond to cells that were treated by no probe (control); by IPTG (positive control); by match probe; by scramble probes. (B) Means of fluorescence intensity and signal to background calculated from the flow cytometry histogram. (C) Imaging of GFP in *E. coli* JM109 (DE3). Microscope settings were as follows: excitation: 488 bandpass filter; emission: 500/10 bandpass filter.

GFPを発現している細胞は観測されなかったのに対し、マッチ配列プローブを用いた場合には明らかなGFPの発現が観測された。以上のことからアジド基の還元反応を利用した放出プローブを用いて遺伝情報に基づくタンパク質発現に成功した。

6. ペプチド検出への化学反応プローブの応用

蛍光タンパク質を用いたタンパク質標識技術は生体内のタンパク質の発現や局在を調べるうえで重要である。⁶⁰⁻⁶²⁾しかし、蛍光タンパク質は分子量が大きいと、融合タンパク質を構築した際に標的タンパク質の構造や機能に影響を及ぼす可能性がある。^{61,62)}一方、特定のタンパク質に選択的に結合する核酸分子としてアプタマーがある。近年、このアプタマーを利用したタンパク質検出が複数のグループから報告されている。⁶³⁻⁶⁹⁾この手法はモレキュ

ラービーコンを利用した系⁶⁶⁻⁶⁸⁾とアプタマーを分割する系⁶³⁻⁶⁵⁾の2つに大別される。これらはいずれもFRETを用いており、発生するシグナルは標的タンパク質と等しい。そこで、筆者らはシグナルを増幅できる化学反応プローブをタンパク質検出に応用すべく検討を試みた。⁷⁰⁾

HIV-1のRevタンパク質の一部であるarginine-rich motif (ARM)^{71,72)}に結合するアプタマーを分割して、Staudinger反応を用いた検出プローブを設計した。検出プローブはアプタマー構造を2つに分割したモチーフからなっており、一方にはアジドメチル基で保護された蛍光化合物を、もう一方には電子供与基であるトリフェニルホスフィンが結合している。これらプローブは標的タンパク質が存在するときにのみ、元のアプタマー構造を形成し、プロー

Fig. 16. (A) Illustration of the Azidemethyl Reduction, Which Can Generate Signals in Presence of Target Peptide, and (B) Time-course Analysis of the Fluorescence Intensity of the Reaction of BAF Probe with the TPP Probes

(B) The emission of fluorescence at 522 nm was monitored by excitation at 490 nm. Reactions were performed 100 nM BAF probe, 0 or 100 nM TPP probe, 100 nM ARM or peptide in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.13% Triton x-100.

ブ間での還元反応が起こることによって蛍光シグナルを発生する (Fig. 16). 合成したプローブを用いて水溶液中での ARM ペプチドの検出を試みたところ、標的ペプチドが存在する場合、非存在下と比較して約 19 倍の蛍光強度の増加を観察することができた。以上のことから、化学反応プローブがペプチド検出にも応用可能であることを示すことができた。しかしながら、反応系中で予期しない TPP プローブの酸化が起こり、十分にプローブ間での還元反応が起こったとは言えない結果となった。化学反応プローブを用いた汎用性の高いタンパク質検出プローブの開発にはさらに反応条件や用いる化学反応種の検討を行っていく必要がある。

謝辞 本稿は、著者らが論文として報告した研究成果を中心にまとめたものです。各論文の共著者の方々に、この場を借りて感謝の意を表させていただきます。特に、名古屋大学大学院理科学研究科の阿部洋先生、理化学研究所の伊藤嘉浩先生、鶴澤尊規先生、カロリンスカ研究所の Ralf Morgenstern 先生には大変お世話になりました。心よりお礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Moscow J. A., Fairchild C. R., Madden M. J., Ransom D. T., Wieand H. S., O'Brien E. E., Poplack D. G., Cossman J., Myers C. E., Cowan K. H., *Cancer Res.*, **49**, 1422–1428 (1989).
- 2) Chasseaud L. F., *Adv. Cancer Res.*, **29**, 175–274 (1979).
- 3) Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130–7139 (1974).
- 4) Mannervik B., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **57**, 357–417 (1985).
- 5) Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Center M., Keppler D., *Cancer Res.*, **54**, 4833–4836 (1994).
- 6) Ping J., Wang H., Huang M., Liu Z. S., *Toxicol. Sci.*, **89**, 438–443 (2006).
- 7) Zimniak P., Singh S. P., “Toxicology of Glutathione Transferases,” ed. by Awasthi Y. C., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007, p. 11.
- 8) Morgenstern R., DePierre J. W., Ernster L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 657–

- 663 (1979).
- 9) Morgenstern R., Meijer J., Depierre J. W., Ernster L., *Eur. J. Biochem.*, **104**, 167–174 (1980).
- 10) Morgenstern R., Svensson R., Bernat B. A., Armstrong R. N., *Biochemistry*, **40**, 3378–3384 (2001).
- 11) Shimoji M., Aniya Y., Morgenstern R., “Toxicology of Glutathione Transferases,” ed. by Awasthi Y. C., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007, p. 293.
- 12) Svensson R., Alander J., Armstrong R. N., Morgenstern R., *Biochemistry*, **43**, 8869–8877 (2004).
- 13) Ålander J., Johansson K., Heuser V. D., Farebo H., Järvliden J., Abe H., Shibata A., Ito M., Ito Y., Morgenstern R., *Anal. Biochem.*, **390**, 52–56 (2009).
- 14) Zhang J., Shibata A., Ito M., Shuto S., Ito Y., Mannervik B., Abe H., Morgenstern R., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14109–14119 (2011).
- 15) Shibata A., Nakano Y., Ito M., Araki M., Zhang J., Yoshida Y., Shuto S., Mannervik B., Mogenstern R., Ito Y., Abe H., *Analyst*, **138**, 7326–7330 (2013).
- 16) Keen J. H., Habig W. H., Jakoby W. B., *J. Biol. Chem.*, **251**, 6183–6188 (1976).
- 17) Chen W. J., Graminski G. F., Armstrong R. N., *Biochemistry*, **27**, 647–654 (1988).
- 18) van der Aar E. M., Buikema D., Commandeur J. N., te Koppele J. M., van Ommen B., van Bladeren P. J., Vermeulen N. P., *Xenobiotica*, **26**, 143–155 (1996).
- 19) Van der Aar E. M., Bouwman T., Commandeur J. N., Vermeulen N. P., *Biochem J.*, **320**, 531–540 (1996).
- 20) van der Aar E. M., de Groot M. J., Bouwman T., Bijloo G. J., Commandeur J. N., Vermeulen, N. P., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 439–449 (1997).
- 21) Swain C. G., Lupton E. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4328–4337 (1968).
- 22) Prade L., Huber R., Manoharan T. H., Fahl W. E., Reuter W., *Structure*, **5**, 1287–1295 (1997).
- 23) O'Dwyer P. J., LaCreta F., Nash S., Tinsley P. W., Schilder R., Clapper M. L., Tew K. D., Panting L., Litwin S., Comis R. L., *Cancer Res.*, **51**, 6059–6065 (1991).
- 24) Ito M., Shibata A., Zhang J., Hiroshima M., Sako Y., Nakano Y., Kojima-Aikawa K., Mannervik B., Shuto S., Ito Y., Morgenstern R., Abe H., *ChemBioChem*, **13**, 1428–1432 (2012).
- 25) Johansson K., Ito M., Schophuizen C. M. S., Thengumtharayil S. M., Heuser V. D., Zhang J., Shimoji M., Vahter M., Ang W. H., Dyson P. J., Shibata A., Shuto S., Ito Y., Abe H., Morgenstern R., *Mol. Pharmaceutics*, **8**, 1698–1708 (2011).
- 26) Schaap A. P., Chen T. S., Handley R. S., Desilva R., Giri B. P., *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1155–1158 (1987).
- 27) Richard J. A., Jean L., Romieu A., Massonneau M., Noack-Fraissignes P., Renard P. Y., *Org. Lett.*, **9**, 4853–4855 (2007).
- 28) Matsumoto M., *J. Photochem. Photobiol.*, **5**, 27–53 (2004).
- 29) Beck S., Koster H., *Anal. Chem.*, **62**, 2258–2270 (1990).
- 30) Ahrens E. T., Flores R., Xu H. Y., Morel P. A., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 983–987 (2005).
- 31) Šimůnek T., Štěrbá M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V., *Pharmacol. Rep.*, **61**, 154–171 (2009).
- 32) Pabla N., Dong Z., *Kidney Int.*, **73**, 994–1007 (2008).
- 33) Rybak L. P., *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **15**, 364–369 (2007).
- 34) McWhinney S. R., Goldberg R. M., McLeod H. L., *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 10–16 (2009).
- 35) Sando S., Kool E. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9686–9687 (2002).
- 36) Abe H., Kool E. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 263–268 (2006).
- 37) Furukawa K., Abe H., Hibino K., Sako Y., Tsuneda S., Ito Y., *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1026–1036 (2009).
- 38) Pianowski Z., Gorska K., Oswald L., Merten C. A., Winssinger N., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6492–6497 (2009).
- 39) Dose C., Seitz O., *Org. Lett.*, **7**, 4365–4368 (2005).
- 40) Dose C., Ficht S., Seitz O., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 5369–5373 (2006).
- 41) Ma Z., Taylor J. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11159–11163 (2000).
- 42) Cai J., Li X., Yue X., Taylor J. S., *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **126**, 16324–16325 (2004).
- 43) Li H., Franzini R. M., Bruner C., Kool E. T., *ChemBioChem*, **11**, 2132–2137 (2010).
- 44) Grossmann T. N., Seitz O., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15596–15597 (2006).
- 45) Grossmann T. N., Seitz O., *Chem. Eur. J.*, **15**, 6723–6730 (2009).
- 46) Silverman A. P., Kool E. T., *Chem. Rev.*, **106**, 3775–3789 (2006).
- 47) Silverman A. P., Kool E. T., *Adv. Clin. Chem.*, **43**, 79–115 (2007).
- 48) Franzini R. M., Kool E. T., *Org. Lett.*, **10**, 2935–2938 (2008).
- 49) Shibata A., Uzawa T., Nakashima Y., Ito M., Nakano Y., Shuto S., Ito Y., Abe H., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14172–14178 (2013).
- 50) Jaffe E. K., Cohn M., *Biochemistry*, **17**, 652–657 (1978).
- 51) Gough J. D., Gargano J. M., Donofrio A. E., Lees W. J., *Biochemistry*, **42**, 11787–11797 (2003).
- 52) Pianowski Z. L., Winssinger N., *Chem. Commun.*, 3820–3822 (2007).
- 53) Furukawa K., Abe H., Hibino K., Sako Y., Tsuneda S., Ito Y., *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1026–1036 (2009).
- 54) Okamoto A., Tanabe K., Inasaki T., Saito I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2502–2504 (2003).
- 55) Ma Z. C., Taylor J. S., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 679–683 (2003).
- 56) Boll I., Krämer R., Brunner J., Mokhir A., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 7849–7856 (2005).
- 57) Gorska K., Manicardi A., Barluenga S., Winssinger N., *Chem. Commun.*, **47**, 4364–4366 (2011).
- 58) Shibata A., Ito Y., Abe H., *Chem. Commun.*, **49**, 270–272 (2013).
- 59) Boos W., Schaedel P., Wallenfels K., *Eur. J. Biochem.*, **1**, 382–394 (1967).
- 60) Giepmans B. N., Adams S. R., Ellisman M. H., Tsien R. Y., *Science*, **312**, 217–224 (2006).
- 61) Chen I., Ting A. Y., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 35–40 (2005).
- 62) Soh N., *Sensors*, **8**, 1004–1024 (2008).
- 63) Heyduk T., Heyduk E., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 171–176 (2002).
- 64) Heyduk E., Knoll E., Heyduk T., *Anal. Biochem.*, **316**, 1–10 (2003).
- 65) Zhang S., Metele V., Tabatadze D., Zamecnik P. C., Bogdanov A. Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 4156–4161 (2008).
- 66) Li J. J., Fang X., Schuster S. M., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 1049–1052 (2000).
- 67) Wang K., Tang Z., Yang C. J., Kim Y., Fang X., Li W., Wu Y., Medley C. D., Cao Z., Li J., Colon P., Lin H., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 856–870 (2009).
- 68) Yamamoto R., Baba T., Kumar P. K., *Genes Cells*, **5**, 389–396 (2000).
- 69) Heyduk E., Heyduk T., *Anal. Chem.*, **77**, 1147–1156 (2005).
- 70) Shibata A., Abe H., Furukawa K., Tsuneda S., Ito Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1223–1226 (2009).
- 71) Levy M., Ellington A. D., *J. Mol. Evol.*, **56**, 607–615 (2003).
- 72) Wilkinson T. A., Zhu L., Hu W., Chen Y., *Biochemistry*, **43**, 16153–16160 (2004).