

2C07

イリジウム錯体の室温りん光をプローブとする脂質二分子膜中の酸素の挙動

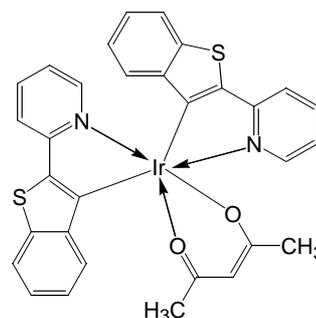
(群馬大院・工*, 群馬大生調研**) 吉原 利忠, 唐澤 靖之*, 小林 敦*, 穂坂 正博**, 竹内 利行**, 飛田 成史*

【序】細胞中や生体組織内の酸素挙動の解明は、細胞生物学や医療において重要な課題の一つである。特に癌細胞は、正常細胞と比較して酸素濃度が低いため、癌細胞に対して放射線治療や光線力学療法を用いる場合、癌組織の酸素濃度が治療効果に大きな影響を与える。一般に、生体組織内の酸素濃度計測は、クラーク電極など微小電極を挿入して測定する。この方法では、電極周辺の僅かな場所しか測定できないだけでなく、侵襲的である。近年、水溶性ポルフィリン誘導体やルテニウム錯体の発光寿命を用いて血液中の酸素濃度を計測する方法が開発されている。これらは、非侵襲的に酸素分圧を測定することができる利点を有する。本研究では、細胞中および生体組織内の酸素分圧、挙動を非侵襲的に可視化して観測できるりん光プローブ分子の開発を目指す。

我々が注目した化合物は、室温溶液中で強いりん光を示すイリジウム錯体である。イリジウム錯体は、配位子によって、吸収領域や発光領域が大きく異なる。ここでは、高感度に酸素挙動を解析するためにりん光寿命が長い N-*cis*, C-*cis*, iridium(III)bis[2-(2'-benzothienyl)-pyridinato-N,C^{3'}]

(acetylacetonate) (BTP, Scheme 1)を用いる。また、BTPは赤色りん光を示すため、*in vivo* 計測においても他のイリジウム錯体よりも感度が良いと期待される。本報告では、*in vitro* および *in vivo* 計測を行うための前段階として BTP の室温

りん光をプローブに用いた脂質二分子膜中における酸素挙動について報告する。



Scheme 1 Molecular structure of BTP

【実験】1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) の単層膜は、溶媒に Tris-HCl 緩衝溶液 (pH = 7.0) を用い、エタノールインジェクション法により調製した。BTP はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、マイクロシリンジを用いて注入した。試料溶液の体積組成は、Tris-HCl 緩衝溶液:エタノール:DMSO = 2.85:0.1:0.05 (Tris-HCl 95%) である。DMPC 膜と BTP の最終濃度は、それぞれ 1.0×10^{-3} M, 1.0×10^{-5} M であり、膜とプローブ分子の濃度比を 100 : 1 とした。

【結果・考察】 Fig. 1 に Ar 置換下, 35 °C, Tris-HCl 95% 溶液中における DMPC 膜存在下および非存在下での BTP のりん光スペクトルを示す。DMPC 膜非存在下では、BTP のりん光は非常に弱く、一方、膜存在下ではりん光強度は著しく増加し、620nm に極大波長を示す赤色発光を与えた。また、りん光寿命を測定したところ、膜が存在しないときは、96ns と短く、膜が存在すると 5.25 μ s と顕著に増加した。膜存在下において、

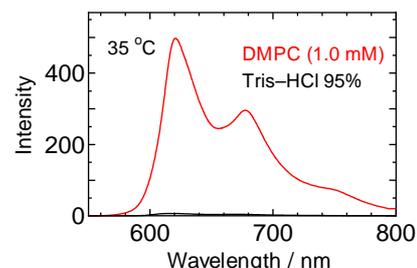


Fig. 1 Phosphorescence spectra of BTP in ULV of DMPC and Tris-HCl (95%) at 35 °C.

短い寿命成分(96ns)が観測されないことから, BTP は効率良く DMPC 膜に取り込まれていることがわかる。

Fig. 2 に 35 °C, DMPC 膜存在下における Ar 置換溶液, 空気飽和溶液, 1atm 酸素飽和溶液中の BTP のりん光スペクトルを示す。Ar 置換溶液中と比較して, 溶存酸素溶液中では, りん光強度が顕著に減少し, 酸素による消光を受けていることがわかる。酸素によるりん光消光を定量的に解析するために, BTP のりん光減衰曲線を DMPC 膜存在下, Ar 置換溶液, 空気飽和溶液, 1atm 酸素飽和溶液中で測定した。りん光減衰曲線は, すべての溶液中において単一指数関数を用いて解析できた。Fig. 3 に酸素分圧に対して得られたりん光寿命比(τ_p^0/τ_p)のプロット(Stern-Volmer plot)を示す。ここで, τ_p^0 は Ar 置換溶液中のりん光寿命($\tau_p^0 = 5.25 \mu\text{s}$ at 35 °C, $\tau_p^0 = 5.55 \mu\text{s}$ at 15 °C)である。Stern-Volmer plot の傾きから 35 °C, 15 °C におけるりん光消光速度定数(k_q)をそれぞれ $1.0 \times 10^7 \text{ atm}^{-1}\text{s}^{-1}$, $0.3 \times 10^7 \text{ atm}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定した。15 °C における k_q 値は 35 °C と比較して約 1/3 程度小さな値である。この理由として, (1)膜中の酸素濃度が減少したこと, (2)膜中の酸素の拡散速度が減少したことが挙げられる。ヘキサンのなどのアルキル溶媒は, 温度が減少するとともに溶存酸素濃度が増加する。よって, 前者の寄与は少ないと考えられる。DMPC 膜は 23 °C を相転移温度として, それ以上の温度では流動性の高い液晶状態, それ以下の温度では流動性の低い液晶状態を取ることが知られている。よって, k_q 値の違いは DMPC 膜の流動性の違いが主に寄与していると考えられる。そこで, 空気飽和下における BTP のりん光寿命の温度効果(40 °C から 10 °C)について検討を行った。

Fig. 4 に溶液温度に対する τ_p 値のプロットを示す。 τ_p 値は温度の減少とともに増加傾向を示した。この増加傾向は, DMPC 膜の相転移温度である 23 °C 付近を境にして大きく異なり, 40 °C から 23 °C (液晶状態)では緩やかに増加し, 23 °C から 10 °C (ゲル状態)では顕著に増加している。これより, 膜内酸素の拡散速度は膜の状態および流動性に大きく依存することがわかる。

以上のことから, 脂質二分子膜内の BTP のりん光強度, 寿命は酸素濃度と拡散速度に大きく依存し, 細胞内や生体組織内の酸素挙動を検討するためのプローブとして大きな利点があることが明らかとなった。

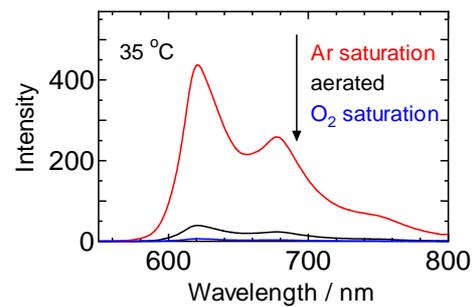


Fig. 2 Phosphorescence spectra of BTP in ULV of DMPC under Ar saturated, aerated, and O₂ saturated condition at 35 °C.

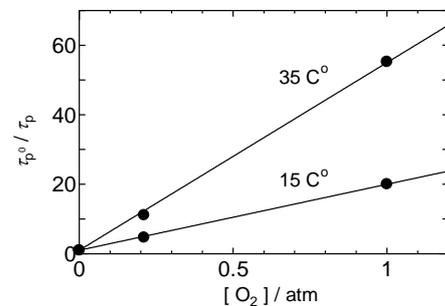


Fig. 3 Stern-Volmer plot of phosphorescence lifetime of BTP in ULV of DMPC at 35 and 15 °C.

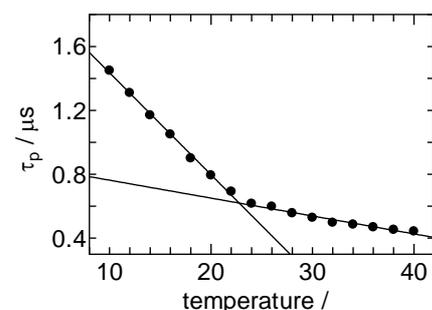


Fig. 4 Plots of phosphorescence lifetime as a function of temperature in ULV of DMPC.