

環境応答型蛍光性コレステロールの脂質膜および細胞内発光特性

(群馬大院・工*, 群馬大生調研**, 群馬大学***) ○吉原 利忠*, 荒井 健太郎*, 林 良介*, 追川 竜介*, 穂坂 正博**, 竹内 利行**, 飛田 成史*

【序】コレステロールは生体中に存在する代表的な中性脂質であり、細胞膜の構成成分、胆汁酸やビタミン D などの前駆体として重要な物質である。また、コレステロールは脂質ラフトの形成に大きく関与していることが指摘されており、脂質膜中や細胞内に分布するコレステロールの動態を明らかにすることが重要視されている。近年、生体関連化合物を発光物質で標識し、それらの発光から調べたい化合物の分布や動態を可視化する蛍光イメージング技術の開発が進められており、コレステロールに対しても適用されている。特に、ニトロベンゾフラザン (NBD) 類を蛍光団に有する 22NBDcho (図 1)

は可視光領域に吸収、蛍光を示すため、細胞観察時において細胞への光ダメージを低減させたり、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光イメージングできるなどの利点を有する。また、NBD は蛍光特性が周辺の環境に応答して変化するため、蛍光特性から細胞内において 22NBDcho が分布している周辺の微環境を明らかにすることもできる。しかしながら、近年の研究から 22NBDcho は細胞内において主にミトコンドリアに分布し、コレステロールの動態を反映していないことが指摘されている [1]。

本研究では、コレステロールの特性を保持した蛍光性コレステロールの開発を目指して、コレステロールと NBD を異なる位置で結合させた 24NBDcho (図 1) および NBD のニトロ基をジメチルアミノスルホアミド基に変えた 24DBDcho (図 1) を新規に合成し、それらの発光特性を溶液中、リン脂質膜中および生細胞中で検討した。

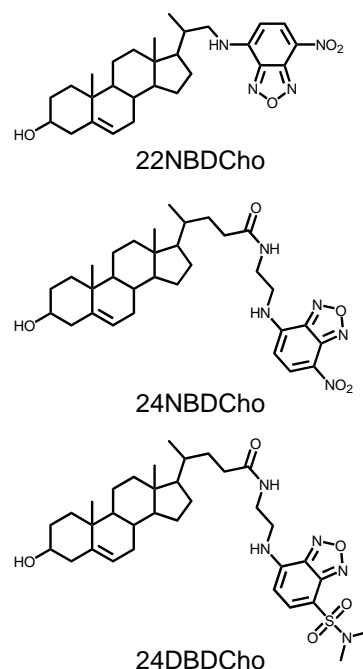


図1 蛍光性コレステロールの構造式

【結果・考察】24NBDcho および 24DBDcho の蛍光極大波長は、ジエチルエーテル中で 518nm, 533nm, アセトニトリル中で 536nm, 561nm であり、溶媒の極性の増加に伴い長波長シフトを示す。また、プロトン性溶媒であるメタノール中では 542nm, 579nm に観測され、水素結合によってさらに長波長シフトを示す。図 2 (a) に DMPC 膜存在下、35°C における 24NBDcho の蛍光スペクトルを、(b) に DMPC 膜濃度に対する 24NBDcho の蛍光積分強度のプロットを示す。膜濃度が増加するにつれて蛍光強度も増加しており、24NBDcho が膜中に取り込まれることがわかる。蛍光極大波長は 547nm であり蛍光団周辺の微環境はメタノール中に近く、蛍光団は膜の親水性領域に位置している。図 2 (b) のプロットを、式 (1) を用いて解析し、得られた分配係数 (K_p) および DMPC 膜 1mM に対する分配率 (α) を表 1 に示す。

$$I = \frac{I_w + K_p \gamma_{\text{DMPC}} [\text{DMPC}] I_{\text{DMPC}}}{1 + K_p \gamma_{\text{DMPC}} [\text{DMPC}]} \quad (1)$$

ここで I_w は $[\text{DMPC}] = 0 \text{ M}$ のときの蛍光強度、 I_{DMPC} はすべてのプローブ分子が膜中に存在するときの蛍光強度、 γ_{DMPC} は DMPC のモル体積である。24NBDcho および 24DBDcho は 35°C において 90% 以上の分配率を示し、効率的に膜に取り込まれることがわかる。また、 15°C では分配率が少し減少している。これは、 35°C において流動性の高い液晶状態の DMPC 膜が 15°C では流動性の低いゲル状態に相転移するためと考えられる。

一般に生体膜はコレステロールを含有しているため、DMPC-コレステロール複合膜中における 24NBDcho および 24DBDcho の蛍光特性の検討を 35°C 、 15°C で行った。24NBDcho は 35°C 、 15°C において、コレステロールのモル分率 (χ_{cho}) に対して蛍光極大波長はほぼ一定の値を示した。一方、24DBDcho は 35°C ではほぼ一定であるが、 15°C では χ_{cho} が $0 \sim 0.2$ での蛍光極大波長と比較して、 0.2 以上では大きく短波長シフトを示した。これは蛍光団周辺の極性が減少したことを示しており、得られた蛍光極大波長から考えると蛍光団周辺の誘電率は 4 から 6 程度であることがわかる。

開発した蛍光性コレステロールの生細胞内での分布の検討を行った。図 3 にマウス由来マクロファージ細胞 (Raw264.7 細胞) の培養液に、22NBDcho, 24NBDcho, 24DBDcho を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように添加し、2 時間培養した後の蛍光顕微画像を示す。

22NBDcho と比較して開発した 24NBDcho, 24DBDcho では細胞内局在が異なることがわかる。また、24NBDcho, 24DBDcho では細胞内においてコレステロールエステルが集まる脂質滴が蛍光イメージングされている。これは 24NBDcho, 24DBDcho の 3 位の OH 基が生体内でエステル化されていることを示しており、これらが既存の 22NBDcho よりもコレステロールに近い特性を持つことが明らかとなった。

[1] S. Mukherjee, X. Zha, I. Tabas, and F. R. Maxfield, *Biophys. J.*, 75, 1915 (1998).

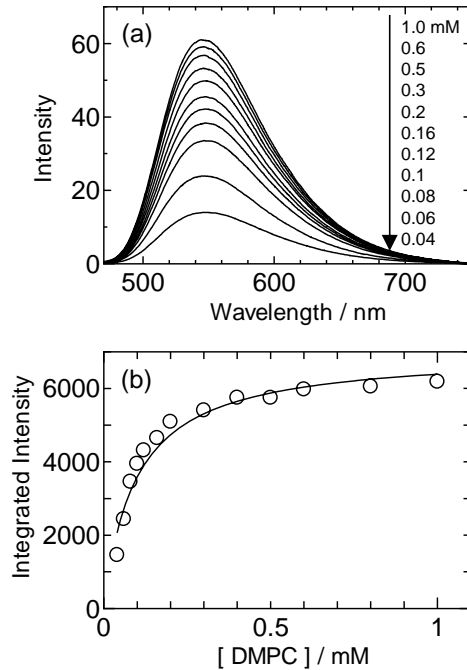


図2 (a)24NBDchoの 35°C におけるDMPC膜濃度に対する蛍光スペクトル
(b)DMPC膜濃度に対する蛍光積分強度のプロット

表1 DMPC膜に対する分配係数, 分配率

プローブ分子	温度 / $^\circ\text{C}$	K_p	$\alpha / \%$
24NBDcho	35	1.6×10^4	91
	15	1.1×10^4	87
24NBDcho	35	1.8×10^4	92
	15	0.7×10^4	82

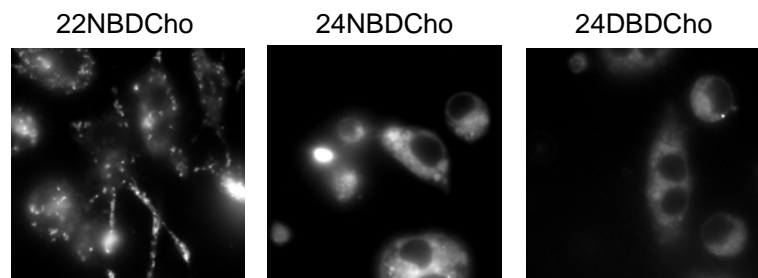


図3 Raw264.7細胞の培養液に蛍光性コレステロールを添加し2時間後に得られた蛍光顕微画像