

細胞内酸素濃度計測を目指したレシオ型酸素プローブ分子の開発

(群馬大院・工¹, 秋田県立大², 群馬大学³) 吉原利忠¹・山口祐司¹・穂坂正博²・竹内利行³・飛田成史¹

Development of Ratiometric Molecular Probe for Monitoring Oxygen Levels in Living Cells

(Gunma Univ.¹, Akita Prefectural Univ.²) Toshitada Yoshihara¹, Yuji Yamaguchi¹, Masahiro Hosaka², Toshiyuki Takeuchi¹, and Seiji Tobita¹

【序】好気性生物の生命活動において、酸素は必要不可欠な物質であり、細胞内において酸素は、呼吸鎖における電子伝達系の最終電子受容物質である。一方、組織内における酸素濃度低下は、がん・脳卒中・心筋梗塞などで診られる共通した病態である。このため、細胞、組織などの微小領域内における酸素濃度計測法の開発は、細胞生物学だけでなく臨床医学においても重要である。組織内の酸素濃度計測法として微小電極を用いる方法がある。この方法は、測定中電極周辺の酸素消費を伴うだけでなく、組織に直接電極を挿入するため侵襲的である。また、細胞など μm スケールの微小領域測定は困難である。一方、発光法は高感度および低侵襲的測定が可能な方法として、近年、研究・開発が進められている。本研究では、発光法を用いて微小領域内における酸素濃度を計測するための発光プローブ分子を設計・開発し、それらの溶液、脂質二分子膜、生細胞内における発光特性を明らかにした[1]。

【結果・考察】本研究で設計したレシオ型酸素プローブ分子は、酸素濃度に発光強度が依存しない蛍光性分子と、酸素濃度に発光強度が著しく依存するりん光性分子をリンカーで結合した分子構造を有する。酸素濃度の定量は、蛍光強度を内標準としてりん光強度を測定し、それらの強度比（レシオ比）を用いて行う。これにより、細胞内など不均一系においても、プローブ分子濃度や励起光強度に依存することなく定量化が可能となる。図1に酸素プローブ分子（C343-Ster-BTP）の構造式を示す。蛍光団として青色蛍光を示すアミノクマリン誘導体（C343）、りん光団として室温で赤色りん光を示すイリジウム錯体（BTP）、リンカーとして剛直構造を有するステロイド誘導体を用いた。アセトニトリル（MeCN）中、アルゴン置換下においてC343-Ster-BTPの発光スペクトルを測定したところ、480nm付近にC343に由来する蛍光、615nmにBTPに由来するりん光が観測された。空気飽和下において同様に測定したところ、C343の蛍光強度は一定であったのに対して、BTPのりん光は著しく減少した。次に、りん脂質二分子膜存在下において発光スペクトル測定を行ったところ、BTPのりん光強度に対する酸素濃度依存性が小

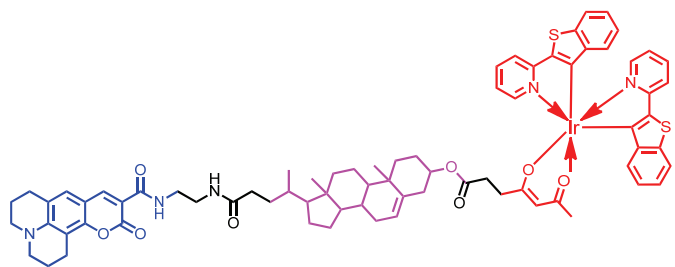


図1 C343-Ster-BTPの構造式

さい結果となった。この原因を明らかにするために、C343-Ster-BTP のりん光寿命 (τ_p) 測定を行った。得られた τ_p 値は $0.14\mu\text{s}$ であり、BTP の膜中の τ_p 値 $5.2\mu\text{s}$ と比較して著しく小さな値であった。これは C343-Ster-BTP のステロイドスペーサーが膜中で凝集し、BTP のりん光が自己消光したためと推察される。以上の結果から、C343-Ster-BTP は MeCN 中において、レシオ型酸素プローブ分子として機能するが、膜中においては使用が困難であり、スペーサーの改良が必要であることが明らかとなった。

図 2 に、スペーサーをステロイド誘導体からテトラプロリンに変えた C343-Pro₄-BTP の構造式を示す。テトラプロリンはアミド水素を有していないため、分子間凝集（例えば β シート構造）が起こりにくいと考えられる。

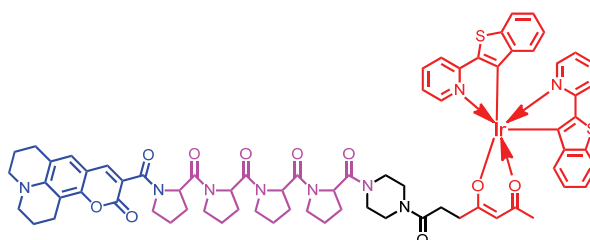


図2 C343-Pro₄-BTPの構造式

C343-Pro₄-BTP の発光スペクトルをりん脂質二分子膜存在下において測定したところ、プローブ濃度が $1\mu\text{M}$ において MeCN 中と同様に、蛍光とりん光が観測され、酸素濃度が増加するにつれて、BTP のりん光強度が顕著に減少した（図 3）。定量的な解析を行うために、酸素濃度に対してレシオ比（りん光強度 / 蛍光強度）をプロットし、Stern-Volmer 式より Stern-Volmer 定数 (K_{SV}) の決定を行った。MeCN 中および DMPC 膜中において、 K_{SV} 値はそれぞれ 0.11 mmHg^{-1} , 0.064 mmHg^{-1} であった。この値は、BTP のりん光寿命を測定して得られた K_{SV} 値と一致したことから、C343-Pro₄-BTP の発光のレシオ比から膜中においても酸素濃度を決定できることが明らかとなった。

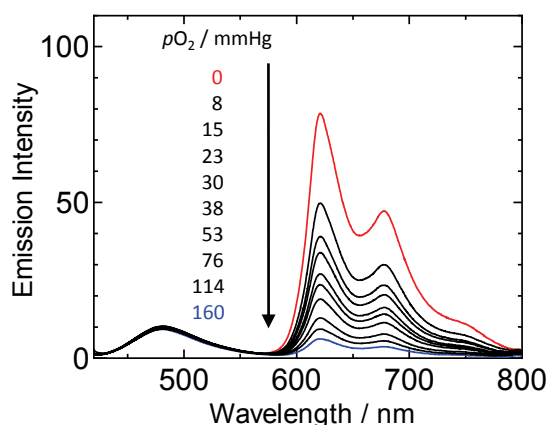


図3 りん脂質二分子膜中におけるC343-Pro₄-BTP の発光スペクトルの酸素濃度依存性

C343-Pro₄-BTP が生細胞内においても酸素プローブ分子として機能するか明らかにするために、異なる酸素濃度で培養した HeLa 細胞の培養液に C343-Pro₄-BTP 溶液を最終濃度 $2\mu\text{M}$ になるように添加した。2 時間後、りん酸緩衝液で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察を行った。20% 培養条件下において C343 に由来する蛍光が観測されたのに対して、BTP に由来するりん光はほとんど観測されなかった。これに対して、2.5% 培養条件下では、C343 の蛍光と BTP のりん光が観測された。これより、C343-Pro₄-BTP は、生細胞中においても酸素プローブ分子として機能することが明らかとなった。しかしながら、プローブ分子の細胞内への取り込み量が低いため、定量的な解析は困難であり、今後、細胞移行性を高めたレシオ型酸素プローブ分子をさらに設計・開発する必要がある。