

細胞内移行性を向上させたレシオ型酸素プローブ分子の開発

(群馬大院・理工) ○吉原 利忠・村山 沙織・飛田 成史

Development of Ratiometric Molecular Probes with High Cellular Uptake Efficiency

(Gunma Univ.) ○Toshitada Yoshihara, Saori Murayama, and Seiji Tobita

【序】酸素は好気性生物の代謝過程において必須の役割を果たしており、生命活動維持において欠かせない物質である。細胞内において90%以上の酸素は、呼吸鎖における電子伝達系の最終電子受容物質として使用される。一方、組織内における酸素濃度低下は、がん・脳卒中・心筋梗塞などで見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。発光法を用いた測定では、強度を計測する方法と寿命を計測する方法がある。前者は簡便な測定法であるが、細胞など発光分子が不均一に分布している場合、得られる信号が発光分子の濃度に依存するため定性的な評価に止まる。後者は、得られる信号が発光分子の濃度に依存しないため定量的な評価として利用できるが、測定装置が複雑で高価であるため汎用性に乏しい。これに対して、レシオ法は2波長の強度比を測定するため、強度測定に必要な機器で定量化が可能であり汎用性が高い。我々はこれまでに、クマリン類(C343)の青色蛍光を内標準として赤色りん光イリジウム錯体(BTP)のりん光強度を測定し、酸素濃度を定量するレシオ型酸素プローブ分子(C343-Pro₄-BTP)を開発した[1]。C343-Pro₄-BTPは、脂質膜中において酸素濃度定量を可能とするプローブ分子として機能するが、生細胞中では、細胞への移行性が低いため定量的な評価は困難である。本研究では、生細胞内の酸素濃度定量を目指し、カチオン性イリジウム錯体を用いて細胞移行性を向上させたレシオ型酸素プローブ分子を新たに設計・合成し、それを用いた細胞内レシオ測定について検討した。

【結果・考察】 Fig. 1 に本研究で開発したレシオ型酸素プローブ分子 (C343-Pro₄-BTQ⁺, C343-Pro₈-BTQ⁺) の構造式を示す。これらプローブ分子は、蛍光団に青色蛍光を示す C343, りん光団に深赤色りん光を示すカチオン性イリジウム錯体 (BTQ⁺) をプロリン残基 4, 8 のオリゴプロリンリンカーで結合させた構造を有する。Fig. 2 に C343-Pro₄-BTQ⁺, C343-Pro₈-BTQ⁺ のアセトニトリル (MeCN) 中における空気飽和下 (黒線) および脱酸素下 (赤線) の発光スペクト

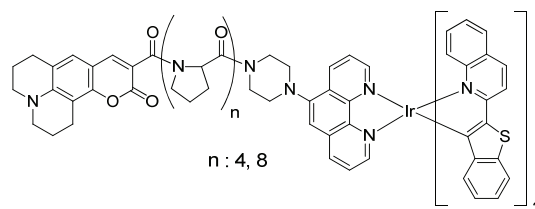


Fig. 1 Chemical structures of C343-Pro₄-BTQ⁺ and C343-Pro₈-BTQ⁺.

ルを示す。475nm, 657nm に極大を示す発光は、それぞれ C343 に由来する蛍光および BTQ⁺に由来するりん光に帰属できる。C343 由来の蛍光は溶液中の酸素濃度にほとんど影響を受けないのに対して、BTQ⁺のりん光は空気飽和下において強度が著しく減少した。空気飽和下における蛍光強度とりん光強度の比 R_1 (I_p / I_f) は C343-Pro₄-BTQ⁺では 0.69, C343-Pro₈-BTQ⁺では 0.23 であり、脱酸素下での比 R_1^0 (I_p^0 / I_f^0) はそれぞれ 14, 4.5 であった。また、両プローブ分子における R_1^0 / R_1 は 20 であった。この値は、空気飽和下および脱酸素下で測定したりん光寿命の値の比と一致しているため、開発したプローブ分子がレシオ型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。

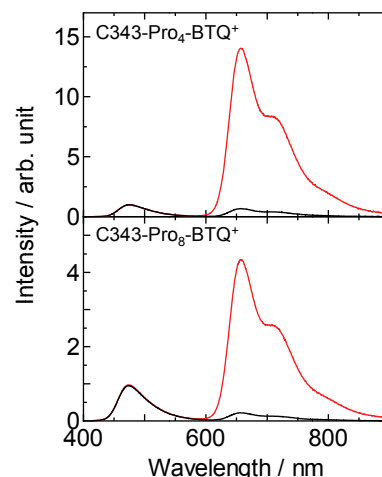


Fig. 2 Emission spectra of C343-Pro₄-BTQ⁺ and C343-Pro₈-BTQ⁺ in MeCN

C343-Pro₄-BTQ⁺, C343-Pro₈-BTQ⁺ の細胞移行性の向上を明らかにするために細胞実験を行った。各プローブ分子を HeLa 細胞の培地に最終濃度 5 μM になるように添加し、37°C で 20 時間培養後に培養液を洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて細胞からの発光画像を観察した (Fig. 3)。

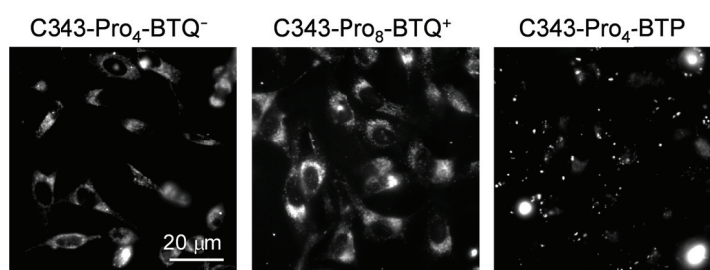


Fig. 3 Emission images of HeLa cells incubated with each iridium complex.

C343-Pro₄-BTP は培養液中で凝集し、細胞からの発光がほとんど観測されなかったのに対して、C343-Pro₄-BTQ⁺, C343-Pro₈-BTQ⁺では明瞭な発光が観測された。よって、りん光団としてカチオン性イリジウム錯体を用いることで、細胞親和性が顕著に向上することが明らかとなった。次に細胞内におけるレシオ画像の測定を試みた。C343-Pro₈-BTQ⁺を MCF-7 細胞の培地に最終濃度 5 μM になるように添加し、37°C で 20 時間培養後に培養液を洗浄し、2 波長同時観察ユニットを取り付けた蛍光顕微鏡を用いて蛍光画像とりん光画像を取得した (Fig. 4)。得られた蛍光画像とりん光画像から解析したレシオ画像は、21%酸素条件下では細胞全体が緑色となりレシオ値が小さく、酸素分圧が高いことを示している。一方、2.5%酸素条件下では細胞全体が赤色となりレシオ値が大きく、酸素分圧が低いことを示している。以上の結果より、細胞内において C343-Pro₈-BTQ⁺は、酸素分圧をりん光強度と蛍光強度のレシオによってイメージングできることが明らかになった。

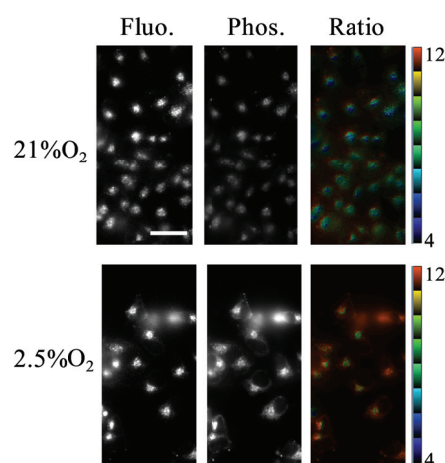


Fig. 4 Emission images of MCF-7 cells incubated with C343-Pro₈-BTQ⁺ under 21 % and 2.5 % O₂.

[1] T. Yoshihara, Y. Yamaguchi, M. Hosaka, T. Takeuchi, and S. Tobita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 4148, 2012.