3P089

りん光性イリジウム錯体を用いた細胞内酸素濃度計測：細胞内移行機構と局在の検討

(群馬大院・理工[1]，群馬大院・工[2]) ○菊地 亮平[1],
増田 剛[2],村山 沙織[2],吉原 利忠[1],飛田 成史[1]

Intracellular oxygen measurements by using phosphorescent iridium complexes: intracellular uptake mechanisms and localization of probes

(Graduate School of Science and Technology[1],
Graduate School of Engineering[2], Gunma Univ.)
○Ryohei Kikuchi[1], Tsuyoshi Masuda[2], Saori Murayama[2], Toshitada Yoshihara[1], Seiji Tobita[1]

【序】酸素は細胞の活動に必要不可欠であり，細胞の低酸素化はがんをはじめ様々な疾患に関連する．このため，細胞や組織内の酸素濃度を定量する方法はこれらの疾患の医学的研究につながることが期待される．本研究室では、イリジウム錯体のりん光が酸素によって著しく消光されることを利用して，細胞・組織内の酸素濃度定量法の開発を行っている．イリジウム錯体は室温で高いりん光量子収率を示し，配位子を変えることでミトコンドリアや，リソソームなど細胞内オルガネラへの局在が変化する．イリジウム錯体は脂溶性が高いため各オルガネラの膜中に局在していると予想されるが，実験的確証は得られていない．また，これらのイリジウム錯体の細胞内への移行機構についてはまだ解明されていない．そこで本研究では，イリジウム錯体の細胞内局在と細胞内への取り込み機構の検討を行った．

細胞内には様々なオルガネラが存在し，これらはタンパク質，脂質など多種の成分で構成されている．細胞を構成する成分ごとに分画し，それぞれの成分の発光強度，寿命を測定することで，イリジウム錯体の細胞内局在を検討した．

また，細胞による物質の取り込み機構は，細胞内のエネルギー単位である ATP を必要としない受動輸送と ATP を必要とする能動輸送に大別される．これらは取り込みの特徴によってさらに細かく分類される．本研究では、我々の研究室で合成されたイリジウム錯体について、各取り込み機構に対する阻害剤または活性化剤を細胞に投与し，イリジウム錯体の細胞内への取り込み機構を検討した．

【実験】りん光顕微画像は倒立型リサーチ顕微鏡 IX71(OLYMPUS)，Evolve 512(PHOTOMETRICS)で撮影した．細胞分画は EzSubcell Fraction，EzSubcell Extract (各 ATTO)を用いて行った．発光強度測定は，マイクロプレートリーダー Infinite 200 pro (TECAN)を用いて行った．各取り込み機構の阻害剤として sucrose, chlorpromazine, filipin, wortmannin，EIPA，monensin，chloroquine ，活性化剤として phorbol 12-myristate-13-acetate，1,2-dipalmitoyl-rac-diacylglycerol を用いた．りん光プローブとして BTPDM1，BTQPhenDMA，BTQMito を用いた(Fig. 1).

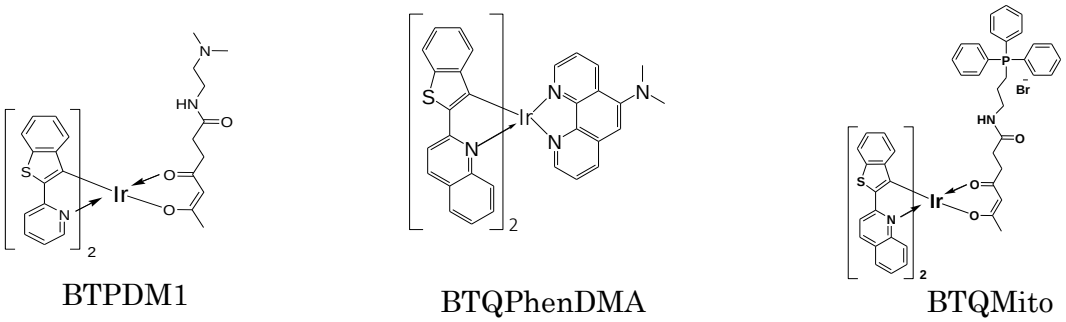

Fig. 1　実験に用いたイリジウム錯体の構造式

【結果・考察】HeLa 細胞に Fig. 1 のイリジウム錯体を添加後 2 時間培養し，EzSubcell Fraction，EzSubcell Extract を用いて分画を行った．EzSubcell Fraction では分画成分として，ミトコンドリア分画，核分画が得られた．得られた分画を，蛍光顕微鏡を用いて観察したところ，各イリジウム錯体は，どちらの分画からも発光が確認されたが，核分画においては核を覆う核膜から発光しているように観察された．また，得られた各分画について，時間相関単一光子計数法に基づく寿命計と蛍光顕微鏡を接続した細胞内りん光寿命測定装置を用いてオルガネラ中における各イリジウム錯体のりん光寿命を測定した．これらの減衰曲線から寿命は二成分であり，酸素応答性が確認された．EzSubcell Extract を用いた分画では，分画成分として細胞質成分，細胞膜中成分，核成分，不溶性タンパク質(細胞骨格)が得られた．これらの分画を用いて発光強度の測定を行った．この結果を Fig. 2 に示す．発光強度はどの錯体においても膜中成分分画が最も大きくなった．このことから，イリジウム錯体は細胞内オルガネラの膜中に局在していることが分かった．BTPDM1，BTQPhenDMA，BTQMito は各オルガネラ集積試薬との共染色実験により BTPDM1 はリソソーム，BTQPhenDMA，BTQMito はミトコンドリアに集積性を持つことが明らかになっている．したがって，BTPDM1 はリソソーム膜，BTQPhenDMA，BTQMito はミトコンドリア膜に主に局在していると考えられる．

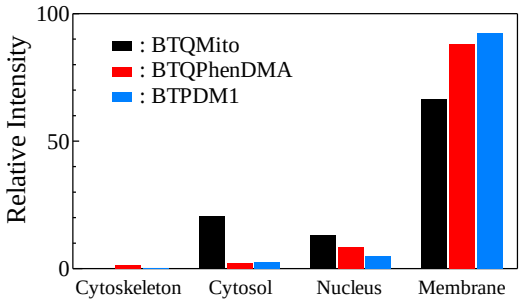

Fig. 2　各分画におけるイリジウム錯体の発光強度

次にイリジウム錯体 BTPDM1 の細胞内への取り込み機構の検討を行った．HeLa 細胞を様々な能動輸送の取り込み機構に対する阻害剤または活性化剤を添加した培地で培養した後に，BTPDM1 を添加して追加培養し，蛍光顕微鏡を用いて発光強度の変化を観察した．その結果，すべての阻害剤，活性化剤において，Control と比較して殆ど変化が見られなかった．また，4 ℃における HeLa 細胞中のイリジウム錯体のりん光顕微観察の結果において，室温に比べて，発光強度の低下が見られた．細胞膜は 4 ℃において，流動性が低下するため受動輸送が制限される．以上の結果から BTPDM1 は受動輸送(拡散)によって細胞に取り込まれていると考えられる．