

オルガネラ特異的イリジウム錯体を用いた細胞内酸素濃度測定

(群馬大学大学院理工学府)

○平野 翔太・高橋 一平・吉原 利忠・飛田 成史

Intracellular oxygen measurements using organelle-specific iridium complexes

(Graduate School of Science and Technology, Gunma University.)

○Shota Hirano, Ippei Takahashi, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita

【序】酸素は生命活動の維持に不可欠である。細胞内ではミトコンドリアが酸素のシンクとして働くため、酸素濃度勾配が生じると予想されるが、細胞内の酸素濃度は未だ不明な点が多く、解明が望まれている。細胞内の酸素濃度測定には分子の発光を用いた光学的測定が有用であり、本研究室では酸素によって顕著に消光するイリジウム錯体(Ir 錯体)のりん光を利用して、細胞内の酸素濃度計測に成功している[1]。

本研究では細胞内のライソソームに集積性を持つ BTQDM、小胞体集積性を持つ BTQSA、ミトコンドリア集積性を持つ BTQbpyDCM の3種類のオルガネラ特異的イリジウム錯体(Fig. 1)を用いて、それぞれのオルガネラの酸素分圧を測定し、生細胞(MCF-7 細胞)内における酸素濃度勾配について解明した。

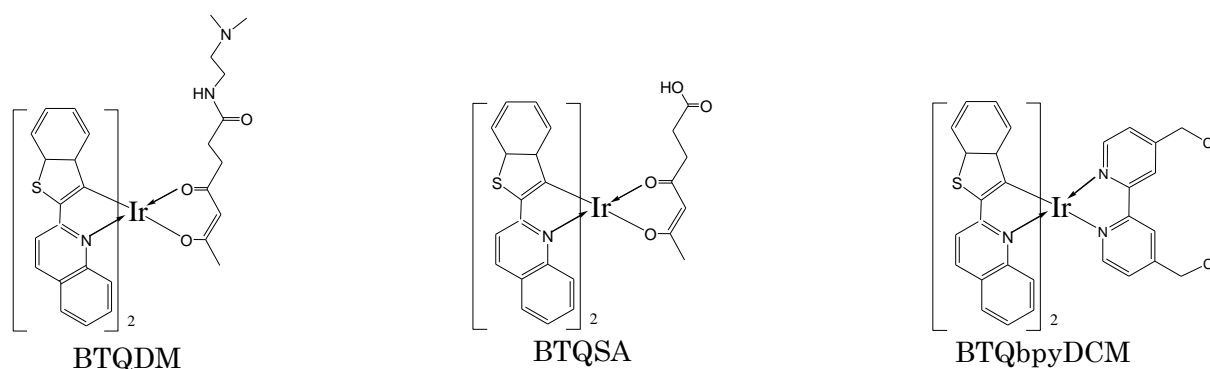


Fig. 1 イリジウム錯体の構造式

【実験】 Fig. 2 に細胞内に分布した Ir 錯体のりん光寿命を測定する装置の概略図を示す。光源には Nd^{3+} : YAG レーザーの第二高調波(532 nm、繰り返し: 20 kHz)、またはレーザーダイオード(488 nm、繰り返し: 18~40 kHz)を用いた。細胞内に取り込まれた Ir 錯体からの発光寿命は、時間相関単一光子計数法に基づいて測定した。培養器内の温度、酸素分圧は任意に変えることができ、測定時の培養器内の温度は 37°C とした。

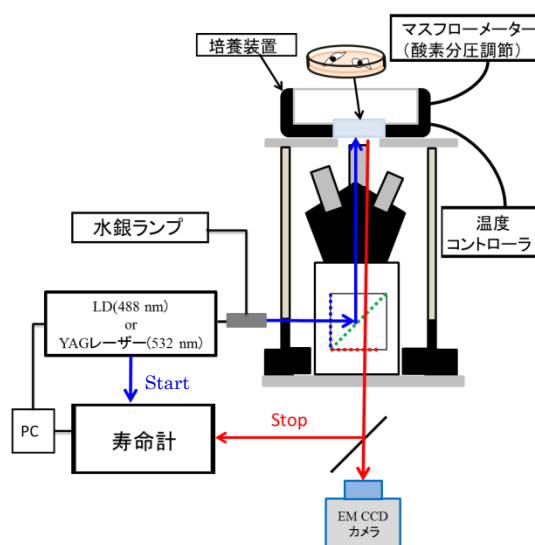


Fig. 2 培養細胞のりん光寿命測定システム

【結果・考察】溶液中でのりん光寿命(τ_p)と酸素分圧(pO_2)の間には(1)式の関係が成り立つことが知られている。ここで τ_p^0 は酸素分圧 0%でのりん光寿命、 k_q はりん光消光速度定数を示す。

$$\frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 pO_2 \quad \dots(1)$$

従って、あらかじめりん光消光速度定数 k_q 及び τ_p^0 を求めておくことで、細胞内のりん光寿命 τ_p を測定し、(1)式に代入することで細胞内の酸素分圧を求めることができる。細胞中の Ir 錯体のりん光減衰は、単一指数関数からはずれたため、double exponential function で解析し、平均寿命を求めて(1)式に基づく解析を行った。また、 k_q を求める際には、細胞の呼吸の影響を除くため、呼吸阻害剤である Antimycin A を培地に加え、細胞呼吸を停止した状態でりん光寿命の calibration を行った。

Fig. 3 に pO_2 に対する τ_p^0/τ_p のプロットを示す。このプロットを(1)式を用いて解析し、傾きから各プローブにおける k_q 値をそれぞれ決定した (Table 1)。

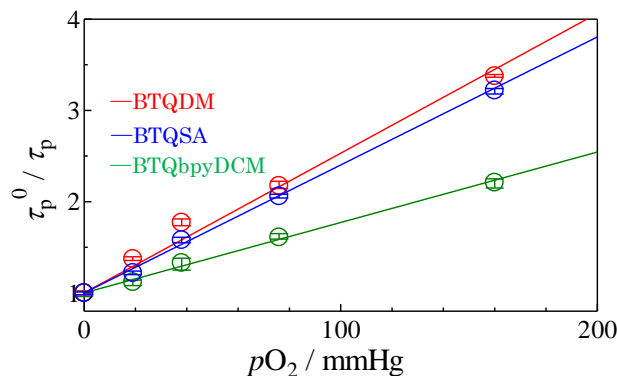


Fig. 3 pO_2 に対する τ_p^0/τ_p のプロット

Table 1 MCF-7 細胞中における各錯体の k_q 及び τ_p^0

Ir complex	$k_q / 10^3 \text{ mmHg}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\tau_p^0 / \mu\text{s}$
BTQDM	5.41	2.83
BTQSA	4.99	2.81
BTQbpyDCM	1.66	4.65

各 Ir 錯体を用いて 21% O_2 ($pO_2 = 160 \text{ mmHg}$) 条件下における MCF-7 細胞中の各オルガネラでのりん光寿命を計測し、酸素分圧に変換することで、細胞内における酸素濃度勾配の有無について検討した。MCF-7 細胞中で各 12 回ずつりん光寿命を測定し、(1)式を用いて酸素分圧に変換した値の平均値を Fig. 4 に示す。ライソソーム、小胞体、ミトコンドリアの酸素分圧はそれぞれ、 173 ± 12 、 154 ± 12 、 $135 \pm 13 \text{ mmHg}$ であった。Fig. 4 より、細胞呼吸を担うミトコンドリアが最も低酸素であることが明らかとなった。以上の結果から、細胞内ではミトコンドリアでの呼吸によって酸素が消費され、細胞内に酸素濃度の勾配が生じ、ミトコンドリアに向かって酸素が拡散していることが明らかとなった。

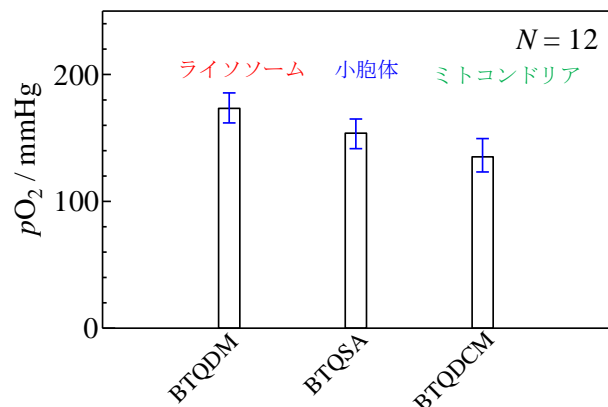


Fig. 4 MCF-7 細胞中の各オルガネラにおける酸素分圧

[1] Yoshihara, T. et al. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 2710.