

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310157

研究課題名(和文)イリジウム錯体をプローブとする細胞内オルガネラ酸素濃度計測法の開発

研究課題名(英文)Organelle-specific intracellular oxygen measurements using iridium complex probes

研究代表者

飛田 成史(Tobita, Seiji)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：30164007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に容易に取り込まれ、それぞれ、細胞内のミトコンドリア、小胞体、リソソームに集積性をもつイリジウム錯体BTQ-Mito、BTQSA、BTQDMを合成した。これらの錯体はほぼ同じ光物理特性(吸収発光スペクトル、りん光量子収率、りん光寿命)を有し、周囲の酸素濃度に応答してりん光寿命とりん光強度が大きく変化する。BTQ-Mito、BTQSA、BTQDMを取り込んだ生細胞のりん光寿命を顕微鏡下で計測することにより、細胞内の異なるオルガネラの酸素化状態を低侵襲的に調べる技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：We synthesized new phosphorescent iridium complexes BTQ-Mito, BTQSA and BTQDM which are internalized into biological cells without any transfection reagents and show specific localization to mitochondrion, endoplasmic reticulum (ER) and lysosome, respectively. These complexes exhibit oxygen-dependent phosphorescence in living cells. Phosphorescence lifetime measurements of living HeLa cells stained with these probes under a microscope enabled us to examine the subcellular oxygen status. The phosphorescence lifetimes of these probes internalized in HeLa cells were calibrated for the oxygen partial pressure of an incubator according to Stern-Volmer analyses, providing the oxygen quenching rate constant and the average lifetime in the absence of oxygen. Using the values of the oxygen quenching rate constant and the average lifetime, the oxygen level of HeLa cells was evaluated by lifetime measurements.

研究分野：光化学

キーワード：酸素プローブ イリジウム錯体 低酸素 りん光 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

好気性生物の代謝過程において、酸素は必須の役割を果たしており、生命活動維持にとって欠かせない物質である。従って、細胞や組織中の酸素濃度(分圧)を計測する技術の開発は、細胞生物学等の基礎研究のみならず、がん、動脈硬化プラーク、脳梗塞など低酸素が関係する病態の解明においても重要な課題となっている。

我々はイリジウム錯体のりん光が酸素分子によって消光されることを利用して、生細胞や生体組織内の酸素濃度を高感度・非侵襲的に計測する技術の開発を行っている。本研究ではこのような背景のもとで生細胞内の酸素濃度の定量化に向けて、新たなプローブ分子の設計と合成、顕微鏡下での酸素濃度計測技術の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、上記の方法に基づいて、細胞内酸素動態のリアルタイム計測法の開発を目的とした。特にオルガネラ特異的に集積するプローブを設計・合成し、生細胞内での発光寿命測定に基づいてミトコンドリア等の特定のオルガネラの酸素分圧をリアルタイムで計測する手法を構築し、細胞内酸素濃度を簡便に測定する手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

発光プローブとして、イリジウム(III)錯体 (btp)2Ir(acac) (btp = benzothienylpyridine, acac = acetylacetonone) (略号 BTP) のアセチルアセトン配位子にアミノ基を導入した BTPNH₂、ジメチルアミノ基を導入した BTPDM1、カルボキシル基を導入した BTPSA、トリフェニルホスホニウムカチオン (TPP) を置換した BTP-Mito、ピリジン基にジメチルアミノ基を導入した BTPDM2 を合成し、その光物理的性質、細胞内取り込み効率、細胞内局在を明らかにした。さらに、顕微鏡下で培養細胞の発光寿命を測定する装置を製作し、酸素濃度のオルガネラ依存性を検討した。励起光には YAG レーザーの第 2 高調波(波長 532 nm、パルス幅: 1 ns、繰り返し 20 kHz)を用い、りん光寿命は時間相関単一光子計数法に基づいて測定した。

4. 研究成果

BTP 誘導体の光物理的特性

図 1 に BTP、BTPDM1 の、室温、テトラヒドフラン(THF)中の吸収、りん光スペクトルを示す。BTPDM1 の THF 中、脱気下のりん光寿命、りん光量子収率は、それぞれ 5.6 μ s、0.29 と求められ、BTP の値 (5.7 μ s、0.30) とほぼ同様であった。以上の結果から、BTP と BTPDM1 の吸収、発光特性はほぼ同様で、アセチルアセトン配位子部分での化学修飾は、錯体の光物理特性にほとんど影響を及ぼさないことがわかった。

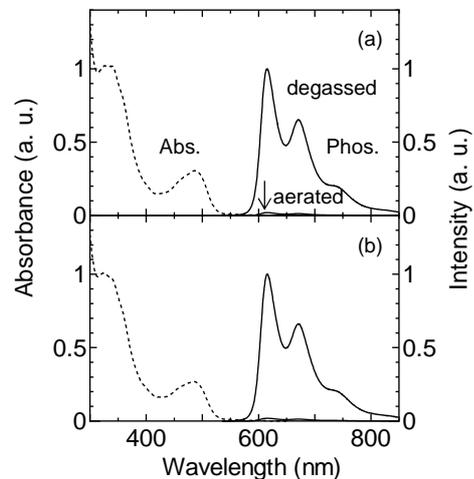


図 1 (a)BTP, (b)BTPDM1 の吸収・りん光スペクトル

BTP 誘導体の細胞特性

図 2 に BTP、BTPSA、BTPNH₂、BTPDM1、BTPDM2 を培養 HeLa 細胞の培養液にそれぞれ 5 μ M 添加し、2 時間培養後洗浄してから測定した顕微りん光画像を示す。CCD カメラの露光時間に注意すると、BTPNH₂、BTPDM1、BTPDM2 の細胞内移行性は BTP に比べて向上していることがわかる。ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析法) を使って詳細に検討したところ、BTPDM1 は BTP に比べて約 20 倍細胞内移行能が向上していることが分かった。

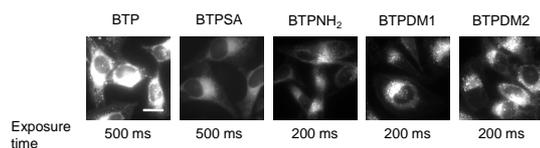


図 2 HeLa 細胞内に取り込まれた BTP 誘導体のりん光顕微画像

また、オルガネラ染色試薬との共染織実験によりプローブの細胞内局在を検討したところ、BTP と BTPSA は細胞内の小胞体に、BTPNH₂、BTPDM1、BTPDM2 は主にライソソームに、BTP-Mito はミトコンドリアに集積性をもつことがわかった。

BTQ 誘導体の光物理的特性と細胞特性

次に、BTP の配位子の π 電子系を拡張した (btq)2Ir(acac) (btp = benzothienylquinoline, acac = acetylacetonone) (略号 BTQ) とそのジメチルアミノ基置換体 (BTQDM)、カルボキシル基置換体 (BTQSA)、トリフェニルホスホニウムカチオン誘導体 (BTQ-Mito) を合成した。これらの錯体は励起波長 532 nm において上述の BTP 誘導体に比べて大きなモル吸収係数を有するため、より高感度な酸素計測が期待できる。BTQ とその誘導体の溶液中における光物理的性質 (吸収・りん光スペクトル、りん光寿命、りん光量子収率等) を検討したとこ

る、BTP 誘導体と同様に BTQ 誘導体もほぼ同じ光物理特性を示した。また、培養細胞の培養液に添加したところ効率よく細胞内に取り込まれ、細胞内局在も BTP 誘導体と同様に BTQ と BTQSA は主に小胞体、BTQDM はライソソーム、BTQ-Mito はミトコンドリアに集積性をもつことがわかった(図3)。

また、図3に示すように培養器の酸素分圧を20%から2.5%に低下させてHeLa細胞のりん光顕微画像を測定したところ、どの錯体において発光輝度が大きく上昇し、細胞内でも酸素応答性があることが確認された。

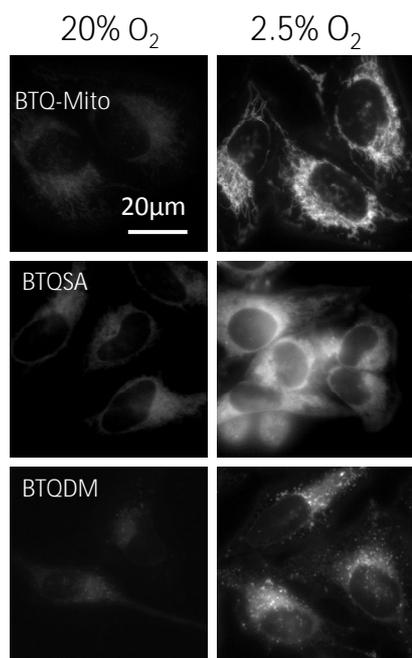


図3 HeLa 細胞内に取り込まれた BTQ-Mito ,BTQSA ,BTQDM のりん光顕微画像と細胞内における酸素応答性

細胞内における寿命測定

HeLa 細胞内に取り込まれた BTQ-Mito , BTQSA ,BTQDM について、YAG レーザーの第2高調波(波長532nm、パルス幅:1ns、繰り返し20kHz)を用いて、りん光減衰を時間相関単一光子計数法に基づいて測定した。その結果、培養器の酸素分圧が通常の20%の条件では、どのプローブも約1.0マイクロ秒の寿命を与え、酸素分圧2.5%では寿命が約2.0マイクロ秒となり、低酸素下で顕著な増加を示した。この結果から、細胞に取り込まれたイリジウム錯体のりん光寿命が溶液中と同様に酸素濃度に応答していることが確認できた。次に酸素分圧が20%の下で培養シャーレに高純度オイルを静注し、細胞への酸素の供給を遮断したところ、徐々に寿命の増加が観測され、細胞による酸素消費によって細胞内の酸素濃度が低下していることが確認できた。さらに細胞中のミトコンドリア

のプロトン濃度勾配を解消する脱共役剤として、valinomycin、細胞中のミトコンドリアの複合体IIIを破壊する呼吸阻害剤として antimycin A を培養液に添加したところ、antimycin A の添加では寿命の変化はほとんど見られなかったが、valinomycin の添加で寿命の増加を観測した。これは valinomycin の添加によって細胞呼吸が活性化し、酸素濃度が減少したためと解釈される。

また、同一条件下では BTQ-Mito ,BTQSA , BTQDM でりん寿命に大きな違いが見られなかったことから、異なるオルガネラであるミトコンドリア、小胞体、リソソームで酸素濃度に大きな違いがないと思われる。この結果は、本実験条件下では、外部からの拡散による酸素の供給が十分速く、明確な濃度勾配を生じていないことを示唆している。

さらに BTQ-Mito , BTQSA , BTQDM を取り込んだ細胞のりん光寿命を、培養器の酸素分圧に対してプロットとすることにより検量線を作成し、細胞内の酸素分圧の定量を行った。

以上の結果から、細胞内に取り込まれたイリジウム錯体のりん光寿命は、細胞内の酸素濃度に依存して変化し、細胞の活性状態を反映していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

T. Yoshihara, M. Hosaka, M. Terata, K. Ichikawa, S. Murayama, A. Tanaka, M. Mori, H. Itabashi, T. Takeuchi, and S. Tobita, Intracellular and In Vivo Oxygen Sensing Using Phosphorescent Ir(III) Complexes with a Modified Acetylacetonato Ligand, *Anal. Chem.*, 87, **2015**, 2710-2717. 査読有
DOI: 10.1021/ac5040067

N. Hasebe, K. Suzuki, H. Horiuchi, H. Suzuki, T. Yoshihara, T. Okutsu, and S. Tobita, Absolute Phosphorescence Quantum Yields of Singlet Molecular Oxygen in Solution Determined Using an Integrating Sphere Instrument, *Anal. Chem.*, 87, **2015**, 2360-2366. 査読有
DOI: 10.1021/ac5042268

T. Yoshihara, S. Murayama, T. Masuda, T. Kikuchi, K. Yoshida, M. Hosaka, and S. Tobita, Mitochondria-targeted Oxygen Probes Based on Cationic Iridium Complexes with a 5-Amino-1,10-Phenanthroline Ligand, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 299, **2015**, 172-182. 査読有
DOI: 10.1016/j.jphotochem.2014.11.004

S. Prior, A. Kim, T. Yoshihara, S. Tobita, T. Takeuchi, M. Higuchi, Mitochondrial Respiratory Function Induces Endogenous Hypoxia, *PLoS*

ONE, 9, 2014, e88911. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0088911

T. Murase, T. Yoshihara, S. Tobita, Mitochondria-specific oxygen probe based on iridium complexes bearing triphenylphosphonium cation, *Chem. Lett.*, 41, 2012, 262-263. 査読有
DOI: 10.1246/cl.2012.262

T. Yoshihara, Y. Yamaguchi, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Ratiometric Molecular Sensor for Monitoring Oxygen Levels in Living Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 2012, 4148-4151. 査読有
DOI: 10.1002/anie.201107557

T. Yoshihara, A. Kobayashi, S. Oda, M. Hosaka, T. Takeuchi, and S. Tobita, "Iridium Complex Probes for Monitoring of Cellular Oxygen Levels and Imaging of Hypoxic Tissues, *Proc. SPIE*, 8233, 2012, 82330A1-82330A8. 査読有
DOI: 10.1117/12.910170

〔学会発表〕(計 45 件)

S. Tobita, Intracellular Oxygen Measurements by Using Phosphorescent Iridium(III) Complexes, The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bordeaux (France), 2014 年 7 月 14 日

T. Yoshihara, Photophysical Properties of Cationic Iridium Complexes with Mitochondria Specificity and Their Intracellular Behavior, The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bordeaux (France), 2014 年 7 月 14 日

飛田成史, りん光プローブを用いた低酸素細胞・組織イメージング技術の開発, 第 53 回生体医工学大会シンポジウム, 仙台, 2014 年 6 月 26 日

飛田成史, ゲート ICCD カメラを用いたりん光寿命計測に基づく in vivo 酸素イメージング, 第 9 回日本分子イメージング学会学術大会, 横浜, 2014 年 5 月 23 日

吉原利忠, ミトコンドリア局在性を示すカチオン性イリジウム錯体の開発および生細胞イメージング, 第 9 回日本分子イメージング学会学術大会, 横浜, 2014 年 5 月 23 日

飛田成史, イリジウム錯体を用いた生体用りん光プローブの開発, 日本化学会第 93 春季年会特別企画, 京都, 2013 年 3 月 22 日

飛田成史, 金属錯体を発光プローブとする低酸素細胞・組織イメージング, 第 1 回低酸素研究会, 東京, 2013 年 7 月 6 日

飛田成史, イリジウム錯体のりん光を用いた低酸素組織イメージング, 第 17 回酸素ダイナミクス研究会, 弘前, 2013 年 8 月 3 日

飛田成史, 発光性金属錯体の生命科学分野への展開, 2013 光化学討論会, 愛媛, 2013 年 9 月 11 日

S. Tobita, Organelle-specific Cellular Oxygen Probes Based on Modified Iridium Complexes, International Conference on Photochemistry, Leuven (Belgium) 2013 年 7 月 23 日

T. Yoshihara, Phosphorescence Imaging of Tumors Using Iridium Complexes, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto (Japan) 2012 年 8 月 27 日

S. Tobita, Imaging of cellular oxygen levels and hypoxic tissues using iridium complex probes", 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 20 日

吉原利忠, 細胞内酸素濃度計測を目指したレンショ型酸素プローブの開発, 第 6 回分子科学討論会, 東京, 2012 年 9 月 18 日

吉原利忠, 低酸素環境イメージングを指向した近赤外光領域にりん光を示すイリジウム錯体の開発, 2012 年光化学討論会, 東京, 2012 年 9 月 13 日

村山沙織, ミトコンドリア選択的酸素プローブを目指したカチオン性イリジウム錯体の開発, 日本分子イメージング学会第 7 回学術集会, 浜松, 2012 年 5 月 25 日

〔図書〕(計 4 件)

飛田成史 他, りん光プローブの設計・開発に基づく in vivo 低酸素環境イメージング, 実験医学, Vol.30, No. 7, 2012, 82-88. 羊土社

飛田成史 他, 光学的方法による細胞・組織内酸素計測, 細胞, Vol. 45, No.12, 2013 42-45, ニューサイエンス社

吉原利忠 他, りん光性分子プローブによる低酸素細胞イメージング, 細胞, Vol.45, No. 9, 2013, 21-24, ニューサイエンス社

吉原利忠 他, リジウム錯体のりん光を用いた低酸素細胞・組織イメージング, 光化学, Vol.44, No.2, 2013, 86-89, 光化学協会

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)
名称: 新規化合物およびそれを利用した酸素濃度測定試薬

発明者：吉原利忠，村山沙織，飛田成史
権利者：群馬大学
種類：特許権
番号：特願 2013-244186
出願年月日：2013 年 11 月 26 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飛田 成史 (TOBITA, Seiji)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号：30164007

(2) 研究分担者

吉原 利忠 (YOSHIHARA, Toshitada)
群馬大学・大学院理工学府・助教
研究者番号：10375561