

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500511

研究課題名(和文)細胞内酸素濃度イメージングのための蛍光・りん光同時発光型分子酸素計の開発

研究課題名(英文)Development of ratiometric molecular probes for monitoring oxygen levels in living cells

研究代表者

吉原 利忠 (YOSHIHARA, TOSHITADA)

群馬大学・理工学研究院・助教

研究者番号：10375561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：脂質膜，細胞内の酸素濃度を明らかにするためにレシオ法に基づいたプローブ分子を設計・合成した。合成したプローブ分子の発光は溶液，脂質膜中において酸素感受性の低いクマリン343の蛍光と酸素感受性の高いイリジウム錯体のりん光を示した。これらのプローブ分子のレシオ比(りん光強度/蛍光強度)は酸素濃度が減少するにつれて増加した。また，プローブ分子を培養細胞の培地に添加して蛍光顕微鏡で観察したところ，細胞から蛍光とりん光が観測され，細胞内酸素濃度計測のために有用な分子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ratiometric molecular probes for the measurement of oxygen levels in lipid membranes and living cells were designed and synthesized. The synthesized molecules showed an oxygen-insensitive fluorescence with coumarin 343 and an oxygen-sensitive phosphorescence with iridium complexes. The ratio of the phosphorescence intensity for the fluorescence intensity increased with the decrease of oxygen concentration in the solution under the presence of lipid membranes. These probes were added to the cell medium and cells were incubated. The fluorescence and phosphorescence images of living cells were obtained by using microscopic techniques. These results exhibited that the ratiometric molecular probe has a high advantage for the measurements and the images of oxygen levels in living cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：りん光 レシオ 蛍光 酸素 イリジウム錯体 細胞

1. 研究開始当初の背景

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、生命活動維持にとって欠かせない物質である。一方、細胞や組織内の酸素分圧(濃度)を計測する技術の開発は、細胞生物学の基礎研究だけでなく、我国の3大死亡要因である‘がん’、‘脳卒中’、‘心筋梗塞’など低酸素状態が関与する病態の診断、治療においても重要である。近年、光と発光プローブ分子を用いて生体内の低酸素領域をイメージングする研究が行われている。この手法は、非侵襲的またリアルタイム計測に加えて、蛍光顕微鏡を用いることにより細胞など微小領域内の酸素濃度分布をイメージングすることが可能である。このため、高性能な蛍光顕微鏡や高感度な検出器が開発、市販されている。しかしながら、酸素濃度を直接モニターするための発光プローブ分子の開発は非常に遅れている。

酸素をモニターするためには、酸素濃度に依存してプローブ分子の発光強度、寿命が変化することが必要であり、これらが酸素濃度に大きく依存するりん光プローブ分子が有効である。研究代表者は、イリジウム錯体(Ir錯体)がこれまで報告されている有機金属錯体よりも高効率なりん光を示すことを明らかにし、Ir錯体の1つであるBTP(図1)を用いて、HeLa細胞などの培養細胞において培養中の酸素濃度に依存してりん光強度が変化すること、また、担がんマウス内の腫瘍や虚血部位を選択的にイメージングできることを示した。Ir錯体は、有機EL用発光材料として近年注目されているが、この錯体を生細胞・組織に適応した研究は世界で初めてである。

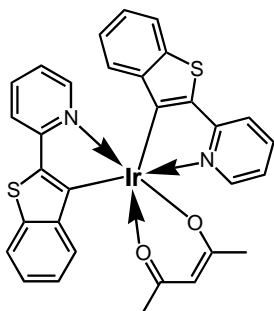


図1 BTPの構造式

この研究において、研究代表者は培養細胞におけるりん光強度が各細胞で均一ではなく、場所場所において強度が異なるデータを得ている。しかし、強度だけの評価ではこの違いが、酸素濃度の違いを反映しているのか、BTPの濃度分布を反映しているのか区別することは困難である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂質二分子膜、細胞内などマイクロメーター領域における酸素濃度および濃度分布を高感度、非侵襲的にリアルタイムイメージング、計測するための蛍光・

りん光同時発光型分子酸素計を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、脂質二分子膜内、細胞内などプローブ分子が不均一に分布していても、酸素濃度をイメージング、計測できる新しい分子酸素計の開発を行った。分子酸素計は、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(Ir錯体)’をペプチドリinkerで結合した分子構造として設計した(図2)。

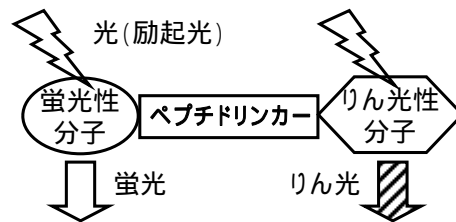


図2 蛍光・りん光同時発光型分子酸素計の概念図

これにより、青色蛍光と赤色りん光を用いた場合、通常酸素濃度では赤色りん光が消光され、主に青色蛍光を示し、酸素濃度が低いときは青色蛍光と赤色りん光が混ざり紫色、赤紫色発光を示す(図3)。

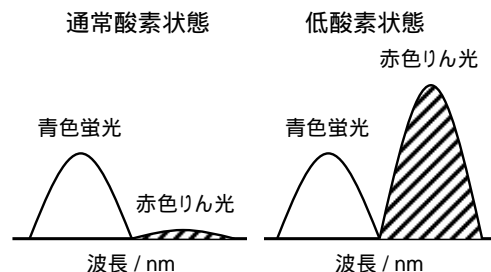


図3 蛍光・りん光同時発光型分子酸素計の作用原理

(2) 開発した分子酸素計の光化学・光物理特性(吸収・りん光スペクトル、りん光量子収率、りん光寿命)を溶液、脂質二分子膜中で測定を行った。また、溶液および脂質二分子膜中における酸素濃度計測は、蛍光強度を内標準としてレシオ法(りん光強度/蛍光強度)を用いた。系中内の酸素濃度は、マスフローコントローラーを用いて窒素ガスと酸素ガスの混合ガスを作製し、それを置換することで制御した。

(3) 細胞内に取り込まれた分子酸素計からの発光は、蛍光顕微鏡に多波長同時観察ユニットを取り付け、得られた発光をフィルターによって分離することで、蛍光とりん光を同時に一つのCCDカメラで取得した。顕微鏡には温度と酸素分圧を任意にコントロールできる簡易培養器を取り付け、細胞の長時間維

持や培養酸素分圧の制御を行った。

4. 研究成果

(1) 図4に合成した分子酸素計(C343-Pro₄-BTP)の構造式を示す。分子酸素計は、青色蛍光を示すクマリン343(C343)、赤色りん光を示すBTPをテトラプロリンリンカーで結合させた構造である。テトラプロリンリンカーは蛍光とりん光の強度比を調節するために用いている。

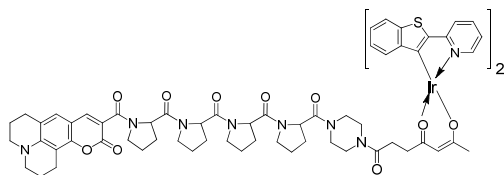


図4 C343-Pro₄-BTPの構造式

空気飽和下アセトニトリル中においてC343-Pro₄-BTPの吸収・発光スペクトルの測定を行った。得られた吸収スペクトルにおいてC343とBTPに由来する吸収が観測された。発光スペクトルは、440-580nmにC343に由来する蛍光スペクトル、580-800nmにBTPに由来するりん光スペクトルが観測された。溶液をArガスで置換して発光スペクトルを測定したところ、C343の蛍光強度はほぼ同じであったのに対して、BTPのりん光は著しく増加した。以上の結果より、C343-Pro₄-BTPは、アセトニトリル中において蛍光とりん光を同時に示し、また、りん光強度が酸素濃度に依存する分子であることが明らかとなった。溶液に400-420nmの光を照射し、発光をカラーCCDカメラで取得したところ、酸素分圧160mmHgでは青色、15mmHgでは紫色、0mmHgでは赤紫色を示し、酸素分圧に依存して発光色が変化した。

図5(a)に脂質(DMPC)膜中にC343-Pro₄-BTPを取り込ませ、溶液中の酸素分圧を変化させて測定した発光スペクトル、図5(b)に酸素分圧に対するレシオ比(R_1^0/R_1)のプロットを示す。酸素分圧変化に対してC343の蛍光強度がほぼ一定であるのに対して、BTPのりん光強度は酸素分圧の増加にともない減少していることがわかる。プロットの傾きより、Stern-Volmer定数(K_{SV})を 0.064 mmHg^{-1} と求めた。この値はBTPのりん光寿命測定をもとに決定した K_{SV} 値 0.064 mmHg^{-1} と一致したため、C343-Pro₄-BTPの発光のレシオ測定を用いて膜中の酸素濃度定量が可能であることがわかった。C343-Pro₄-BTP溶液をHeLa細胞の培養液に $2 \mu\text{M}$ になるように添加し、蛍光顕微鏡で観察したところ、C343に由来する蛍光は、21%および2.5%培養下においてほぼ同様な発光強度であるのに対して、BTPに由来するりん光は、2.5%培養下において21%培養下よりも強度の増加が観測され、培養細胞においてもレシオ測定が可能であることが明らかとなった。

かとなった。

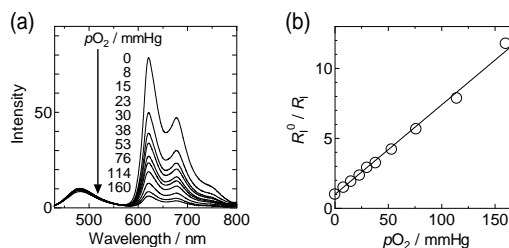


図5 DMPC膜中に取り込まれたC343-Pro₄-BTPの発光スペクトル(a)、レシオ比のプロット(b)の酸素分圧依存性

(2) C343-Pro₄-BTPは、細胞培養液中で一部が凝集体を形成するため、細胞への移行性が低い。この問題を解決するために、カチオン性イリジウム錯体を用いた分子酸素計(C343-Pro₄-BTQ⁺)を設計・合成した(図6)。

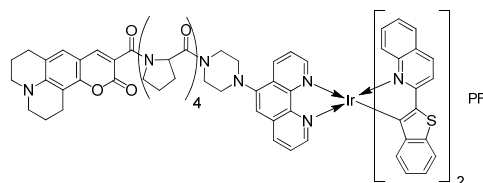


図6 C343-Pro₄-BTQ⁺の構造式

C343-Pro₄-BTQ⁺は、アセトニトリル中において蛍光とりん光を同時に示し、また、りん光は酸素濃度に依存して変化を示した。C343-Pro₄-BTQ⁺あるいはC343-Pro₄-BTPをHeLa細胞およびMCF-7細胞の培養液に最終濃度 $5 \mu\text{M}$ で添加し20時間後、蛍光顕微鏡で観察をおこなったところ、C343-Pro₄-BTPは培養液中で凝集体を形成するため顕微画像の取得が困難であるのに対して、C343-Pro₄-BTQ⁺は細胞内から明瞭な発光が観測された。また、C343に由来する蛍光は、培養酸素濃度に依存しないのに対して、BTQ⁺に由来するりん光は、2.5%酸素条件下において、21%酸素条件下よりも増加した。以上の結果より、C343-Pro₄-BTQ⁺は細胞内酸素濃度計測用の分子酸素計として有効な分子であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

S. Prior, A. Kim, T. Yoshihara, S. Tobita, T. Takeuchi, and M. Higuchi, Mitochondrial Respiratory Function Induces Endogenous Hypoxia, PLOS ONE, 査読有, 9, 2014, e88911, DOI:10.1371/journal.pone.0088911

S. Kato, S. Shimizu, A. Kobayashi, T. Yoshihara, S. Tobita, Y. Nakamura, Systematic Structure-Property Investigations on a Series of Alternating Carbazole-Thiophene Oligomers, *J. Org. Chem.*, 査読有, 79, 2014, 618-629, DOI:10.1021/jo402416f

T. Murase, T. Yoshihara, K. Yamada, S. Tobita, Fluorescent Peptides Labeled with Environment-Sensitive 7-Aminocoumarines and their Interaction with Lipid Bilayer Membranes and Living Cells, *Bull. Chem. Soc. J.*, 査読有, 86, 2013, 510-519, DOI: 10.1246/bcsj.20120314

S. Kato, N. Takahashi, H. Tanaka, A. Kobayashi, T. Yoshihara, S. Tobita, T. Yamanobe, H. Uehara, Y. Nakamura, Tetraalkoxyphneanthrene-Fused Dehydroannulenes: Synthesis, Self-Assembly, and Electronic, Optical and Electrochemical Properties, *Chem. Eur. J.*, 査読有, 19, 2013, 12138-12151, DOI:10.1002/chem.201301262

S. Uchiyama, K. Kimura, C. Gota, K. Okabe, K. Kawamoto, N. Inada, T. Yoshihara, S. Tobita, Environment-Sensitive Fluorophores with BenzoThiadiazole and Benzoselenadiazole Structures as Candidate Compounds of a Fluorescent Polymetric Thermometer, *Chem. Eur. J.*, 査読有, 18, 2012, 9552-9563, DOI:10.1002/chem.201200597

A. Kobayashi, K. Takehira, T. Yoshihara, S. Uchiyama, S. Tobita, Remarkable Fluorescence Enhancement of Benzo[g]chromon-2-ones Induced by Hydrogen-bonding Interaction with Protic Solvents, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 査読有, 11, 2012, 1368-1376, DOI:10.1039/c2pp25055a

T. Yoshihara, Y. Yamaguchi, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Ratiometric Molecular Sensor for Monitoring Oxygen Levels in Living Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 51, 2012, 4148-4151, DOI:10.1002/anie201107557

T. Yoshihara, A. Kobayashi, S. Oda, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Iridium Complex Probes for Monitoring of Cellular Oxygen Levels and Imaging of Hypoxic Tissues, *Proc. SPIE*, 査読有, 8233, 82330A-1-82330A-8, 2012, DOI:10.1117/12.910170

T. Murase, T. Yoshihara, S. Tobita, Mitochondria-specific Oxygen Probe Based on Iridium Complexes Bearing Triphenylphosphonium Cation, *Chem.*

Lett., 査読有, 41, 2012, 262-263, DOI:10.1246/cl.2012.262

[学会発表](計 20 件)

吉原利忠, 村山沙織, 菊池俊毅, 飛田成史, カチオン性イリジウム錯体を用いたミトコンドリア局在性を示す分子酸素センサーの開発, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学

吉原利忠, 増田剛, 畠山泰典, 藤倉大地, 飛田成史, イリジウム錯体を用いた生細胞のりん光寿命イメージングと酸素応答, 第 7 回分子科学討論会 2013 京都, 2013 年 9 月 25 日, 京都テルサ

吉原利忠, 八木橋美樹, 田中亜沙美, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, 細胞膜透過性を向上させた近赤外りん光イリジウム錯体の開発, 2013 年光化学討論会, 2013 年 9 月 13 日, 愛媛大学

T. Yoshihara, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, Phosphorescence Imaging of Living Cells and Hypoxic Tissues Using Iridium Complexes, The Third International Symposium on Element Innovation, 2013 年 9 月 9 日, Kiryu, Japan

吉原利忠, 市川和貴, 村山沙織, 寺田幹, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, カチオン性イリジウム錯体をのりん光を用いた生細胞・小動物イメージング, 第 17 回酸素ダイナミクス研究会, 2013 年 8 月 3, 4 日, 弘前大学

吉原利忠, 細胞・組織内酸素濃度イメージングのためのプローブ分子および計測システムの開発, 第 35 回日本光医学・光生物学会, 2013 年 7 月 13 日, アクトシティ浜松

吉原利忠, 八木橋美樹, 寺田幹, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, 近赤外りん光を示すイリジウム錯体の開発および細胞・組織イメージング, 第 1 回低酸素研究会, 2013 年 7 月 6 日, 早稲田大学

吉原利忠, 八木橋美樹, 田中亜沙美, 寺田幹, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, 低酸素組織の光イメージングを目指したジピリナート類を配位子に有する近赤外りん光イリジウム錯体の開発, 第 8 回日本分子イメージング学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 横浜赤レンガ倉庫

吉原利忠, 八木橋美樹, 穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, ジピリナート配位子を有するイリジウム錯体を用いた低酸素環境イメージング, 日本化学会第 93 回春季年会(2013), 2013 年 3 月 23 日, 立命館大学

T. Yoshihara, A. Tanaka, S. Murayama, S. Kato, Y. Nakamura, S. Tobita, Photophysical Properties of Iridium Complexes Bearing

Trimethylsilyl-substituted
Benzothienylpyridinato Ligands, The
Second International Symposium on
Element Innovation, 2012 年 10 月 19
日, Kiryu, Japan

吉原利忠, 山口祐司, 穂坂正博, 竹内利
行, 飛田成史, 細胞内酸素濃度計測を
目指したレシオ型酸素プローブの開発, 第
6 回分子科学討論会 2012 東京, 2012 年 9
月 18 日, 東京大学

吉原利忠, 八木橋美樹, 穂坂正博, 竹内
利行, 飛田成史, 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, 2012 年 9 月 13 日, 東京工業
大学

T. Yoshihara, M. Hosaka, T. Takeuchi,
S. Tobita, Phosphorescence Imaging of
Tumors Using Iridium Complexes, 14th
International Congress of
Histochemistry and Cytochemistry,
2012 年 8 月 27 日, Kyoto, Japan

吉原利忠, 田中亜沙美, 穂坂正博, 寺田
幹, 竹内利行, 飛田成史, カチオン性イ
リジウム錯体を用いた腫瘍の in vivo 光
イメージング, 第 34 回日本光医学・光
生物学会, 2012 年 7 月 27 日, 神戸国際
会議場

T. Yoshihara, K. Arai, and S. Tobita,
Fluorescent Properties of Cholesterol
Analogues with Dansyl Group in Model
Membranes and Living Cells, XXIV IUPAC
Symposium on Photochemistry, 2012 年
7 月 16 日, Coimbra, Portugal

吉原利忠, 村瀬秋子, 飛田成史, ミトコ
ンドリア局在性を示すイリジウム錯体
を用いた分子酸素センサーの開発, 日本
化学会第 92 春季年会(2012), 2012 年 3
月 26 日, 慶應義塾大学

T. Yoshihara, K. Ichikawa, M. Hosaka,
T. Takeuchi, S. Tobita, Developments
of Hypoxia-Sensing Probes with High
Cellular Uptake Efficiency, The First
International Symposium on Element
Innovation, 2011 年 12 月 9 日, Kiryu,
Japan

吉原利忠, 市川和貴, 大堀優佳, 小林敦,
穂坂正博, 竹内利行, 飛田成史, 生体内
低酸素領域を識別するためのイリジウ
ム錯体の開発および生体内発光特性, 第
5 回分子科学討論会 2011, 2011 年 9 月
21 日, 札幌コンベンションセンター

吉原利忠, 市川和貴, 穂坂正博, 竹内利
行, 飛田成史, 高い細胞膜透過性を示す
イリジウム錯体の開発および in vivo 光
イメージング, 第 33 回日本光医学・光
生物学会, 2011 年 7 月 22 日, 大阪大学
吉原利忠, 市川和貴, 八木橋美樹, 穂坂
正博, 竹内利行, 飛田成史, がんの光イ
メージングのためのりん光プローブ分

子の開発, 第 6 回日本分子イメージング
学会学術大会, 2011 年 5 月 26 日, 神戸
国際会議場

〔産業財産権〕
出願状況(計 4 件)

名称: スフェロイド内酸素濃度測定試薬およ
びこれを用いたスフェロイド内酸素濃度測
定方法

発明者: 吉原利忠, 飛田成史
権利者: SCIVAX ライフサイエンス株式会社,
国立大学法人群馬大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-257906 号
出願年月日: 平成 25 年 12 月 13 日
国内外の別: 国内

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: 国立大学法人群馬大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-244186 号
出願年月日: 平成 25 年 11 月 26 日
国内外の別: 国内

名称: 細胞・組織内酸素濃度測定のための高
感度近赤外りん光イリジウム錯体

発明者: 吉原利忠, 小野寺研一, 菊池俊毅,
飛田成史
権利者: 国立大学法人群馬大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-244120 号
出願年月日: 平成 25 年 11 月 26 日
国内外の別: 国内

名称: レシオ法に基づいた酸素センサー

発明者: 吉原利忠, 間島健太, 飛田成史
権利者: 国立大学法人群馬大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-191551 号
出願年月日: 平成 23 年 9 月 2 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 4 件)

名称: 新規化合物およびそれを含む機能性発
光プローブ

発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹
内利行
権利者: 国立大学法人群馬大学
種類: 特許
番号: 特許第 5500594 号
取得年月日: 平成 26 年 3 月 20 日
国内外の別: 国内

名称: COMPOUND AND FUNCTIONAL LUMINESCENT
PROBE COMPRISING THE SAME

発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹

内利行

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：特許

番号：US8623239

取得年月日：平成 26 年 1 月 7 日

国内外の別：国外

名称：新規水溶性イリジウム錯体化合物およびそれを用いた酸素濃度測定試薬

発明者：吉原利忠，飛田成史，穂坂正博，竹内利行

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：特許

番号：特許第 5392746 号

取得年月日：平成 25 年 10 月 25 日

国内外の別：国内

名称：新規錯体化合物，並びにそれを用いた酸素濃度測定試薬及び癌の診断薬

発明者：吉原利忠，飛田成史，穂坂正博，竹内利行

権利者：国立大学法人群馬大学

種類：特許

番号：特許第 5353509 号

取得年月日：平成 25 年 9 月 6 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://tobita-lab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 利忠 (YOSHIHARA TOSHITADA)

群馬大学・理工学研究院・助教

研究者番号：10375561