

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702011

研究課題名(和文) 高度に機能化した分子酸素計を用いた細胞内酸素濃度計測およびイメージング

研究課題名(英文) Intracellular oxygen imaging using small ratiometric oxygen probes

研究代表者

吉原 利忠 (YOSHIHARA, Toshitada)

群馬大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：10375561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内の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した。開発した分子酸素計は、クマリン蛍光団とカチオン性イリジウム錯体をオリゴプロリンあるいはオリゴアルギニンリンカーで連結させた構造である。特にオリゴアルギニンリンカーを用いた場合、高い細胞移行性を示すことが明らかとなった。また、開発した分子酸素計を用いて、細胞内の酸素化状態のリアルタイムセンシングに成功した。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized ratiometric molecular probes consisting of a blue fluorescent coumarin and a red phosphorescent cationic iridium complex connected by oligo proline or oligo arginine linkers, respectively, for real time sensing of oxygen levels in living cells. The introduction of oligo arginine linkers improved dramatically the cellular uptake efficiency compared to that of oligo proline linkers. We succeeded the detection of oxygen levels in living cells using our small ratiometric oxygen probes.

研究分野：光化学

キーワード：りん光 レシオ イリジウム錯体 酸素 蛍光 顕微鏡

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要不可欠な分子であり、細胞は生命活動維持のために酸素を消費している。細胞内の酸素濃度が減少すると、低酸素誘導因子である HIF-1 が細胞内に蓄積することで、代謝過程に変化が生じることが指摘されている。一方、生きた細胞および組織内の酸素濃度(分圧)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大死亡原因である‘がん、脳卒中、心筋梗塞’などの低酸素状態が関与する病態の診断や治療においても重要である。近年、細胞内にプローブ分子と呼ばれる小分子を取り込ませて、細胞外から光を照射し、プローブ分子から得られる発光をもとに、細胞内の微小環境や代謝過程を明らかにする光イメージング研究が進められている。この方法の利点は、細胞を生かしたまま、リアルタイムで長時間観察できることである。このため、共焦点レーザー顕微鏡や多光子蛍光顕微鏡など高性能な顕微鏡およびEMCCDカメラなど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’を直接モニターするための発光プローブ分子(分子酸素計)の開発は国内外において非常に遅れている。

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[Chem. Phys. Lett., 460, 155-157, 2008.], 赤色りん光を示すBTP(図1A)を用いて HeLa 細胞などの培養細胞において、低酸素培養下でりん光強度が顕著に増加すること(図1B)、また、担がんマウス内の腫瘍や虚血部位を選択的に光イメージングできることを示した[Cancer Res., 70, 4490-4498, 2010.]。

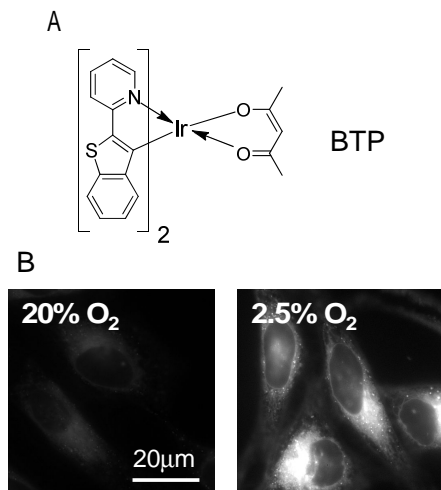


図1 (A)BTPの構造式,(B)BTPのりん光イメージングにおける酸素応答性

研究代表者は、上記研究を基に細胞・組織内における酸素濃度イメージングや酸素消費量をリアルタイム定量するために、レシオ法を用いた分子酸素計の開発を進めている。通常、細胞・組織内のプローブ分子濃度は不均一であるため、発光強度測定では定量化は困難である。そこで、研究代表者は、酸素濃度に発光強度が依存しない‘蛍光’と酸素濃度に発光強度が著しく依存する‘りん光’を同時に示す分子を開発し、(りん光強度)/(蛍光強度)を計測することで定量化を目指している。

これまでに、青色蛍光を示すクマリン色素(C343)、赤色りん光を示すIr錯体(BTP)をテトラプロリンリンカーで結合させたC343-Pro₄-BTPを開発し、溶液中および脂質二分子膜中の酸素濃度定量が可能であること、また、HeLa細胞中においてC343-Pro₄-BTPの青色蛍光が培養酸素濃度に依存しないのに対して、赤色りん光が低酸素培養下で顕著に増加することを示した[Angew. Chem. Int. Ed., 51, 4148-4151, 2012.]。しかしながら、プローブ分子の細胞への移行度が低いいため、定量的な解析に至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高機能化したレシオ型分子酸素計(図2)を設計・合成し、生細胞(2次元、3次元培養)内の酸素濃度および酸素濃度分布を高感度、非侵襲的にリアルタイム計測・イメージングすることである。レシオ型分子酸素計は、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’をオリゴペプチドで結合した分子構造である。蛍光を内標準としてりん光を測定することで、細胞のような分子酸素計の濃度が不均一な状態においても、定量的な計測が可能となる。また、ペプチドの分子構造を様々に設計することで、細胞内の特定のオルガネラに分子酸素計を配置させ、その近傍の酸素濃度計測を目指す。

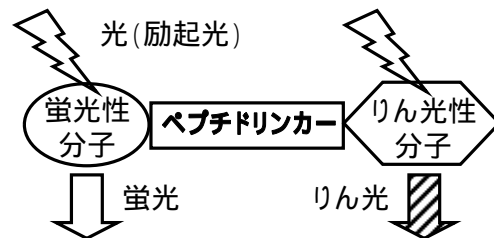


図2 レシオ型分子酸素計の概念図

3. 研究の方法

(1)本研究では、細胞内に取り込まれやすいレシオ型分子酸素計の設計・合成を行った。そのために、りん光性分子としてカチオン性イリジウム錯体、ペプチドリンカーとしてオリゴプロリンリンカーおよびオリゴアルギ

ニンリンカーを用いた。オリゴプロリンリンカーは液相合成法により合成を行った。一方、オリゴアルギニンリンカーはペプチド自動合成装置 (Initiator+Alstra, BiotageAB 社) を用いて固相合成法により合成を行った。また、分子酸素計の精製は、分取 HPLC (Prominence, 島津製作所) を用いた。

(2)開発した分子酸素計の光化学・光物理特性 (吸収・発光スペクトル, 発光量子収率, 発光寿命) を溶液中で測定を行った。溶液中の溶存酸素濃度は, マスフローコントローラで制御した。

(3)細胞内に取り込まれた分子酸素計からの発光は, 蛍光プレートリーダー (Infinite 200 Pro, Tecan) を用いて取得した。また, 細胞のイメージング画像は, 蛍光顕微鏡に取り付けた多波長同時観察ユニットを用いて, 得られた発光を蛍光とりん光に分けて取得した。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型培養器を取り付け, 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 3 に合成したレシオ型分子酸素計の構造式を示す。RP1, RP2 は蛍光性分子としてクマリン 343 (C343), りん光性分子としてカチオン性イリジウム錯体 (BTQPhen), リンカーとしてテトラ (RP1) あるいはオクタプロリン (RP2) から成る。RP3, RP4 は, 蛍光性分子として 7-ジエチルアミノクマリン (7DEAC), りん光性分子としてカチオン性イリジウム錯体 (BTQPhen), リンカーとしてテトラ (RP3) あるいはオクタアルギニン (RP4) から成る。

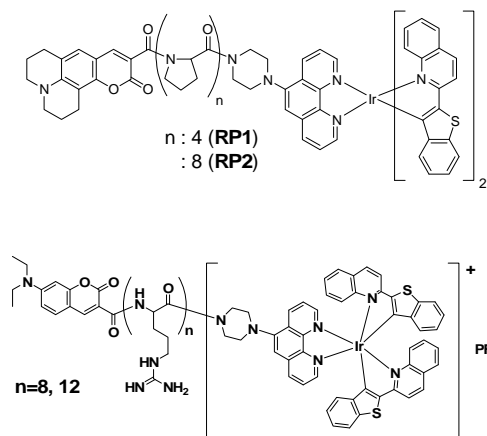


図 3 レシオ型分子酸素計 (RP1, RP2, RP3, RP4) の構造式

(2)図 4 に RP1 および RP2 のアセトニトリル中における発光スペクトルの酸素分圧依存性を示す。両化合物とも蛍光強度は酸素分圧変化に対して一定であるのに対して, りん光強度は酸素分圧が増加するにつれて顕著に

減少している。また, RP2 の蛍光強度は, RP1 よりも高い。これは RP2 において, C343 と BTQPhen の距離が RP1 よりも長いこと, C343 から BTQPhen へのエネルギー移動速度が, 減容したことに由来する。同様な傾向は, RP3 および RP4 においても見られた。以上より, 開発した分子酸素計は, 溶液中においてレシオ酸素プローブとして機能することが明らかとなった。

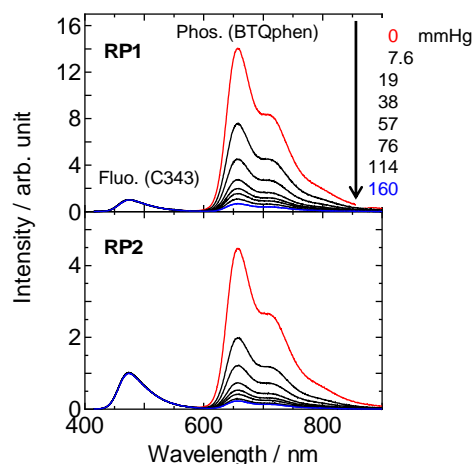


図 4 RP1 および RP2 の発光スペクトル

(3)レシオ型分子酸素計の細胞への移行性を明らかにするため, HeLa 細胞に分子酸素計を添加して蛍光顕微鏡で観察を行った。RP1 および RP2 は, 以前に研究代表者が開発した化合物 C343-Pro₄-BTP に比べて細胞移行性が顕著に増加した。図 5 に RP2, RP3, RP4 を HeLa 細胞に添加して, 2 時間後蛍光顕微鏡で観察した画像を示す。アルギニンリンカーを有する RP3 および RP4 において, 明瞭な画像が観測されたため, RP3 および RP4 は RP2 よりも細胞移行性が高いことがわかる。一般に, 正電荷を有する化合物は細胞移行性が高いことが知られている。アルギニンは, 培養液中においてグアニジノ基にプロトンが付加し正電荷を有する。RP3 および RP4 では, RP2 に比べて正電荷数が多いため, より細胞移行性が向上したと考えられる。

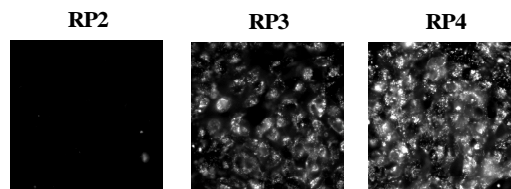


図 5 HeLa 細胞中における RP2, RP3, RP4 の発光顕微画像

(4)最も良い性質を示した RP4 を用いて, エフェクター添加による細胞内酸素濃度変化の追跡を行った。エフェクターは呼吸促進剤である FCCP および呼吸阻害剤であるアンチ

マイシン A (Anti A) を用いた。図 6 に MCF-7 細胞にエフェクターを添加した後のレシオ (R_I) 変化を示す。FCCP では、添加後レシオの増加が見られたため、細胞内酸素濃度が減少していることがわかる。一方、Anti A ではレシオはほぼ変化しなかったため、酸素濃度はほぼ変化していないことがわかる。以上より、レシオ変化を測定することで、生きた細胞内の酸素濃度のリアルタイム追跡は可能であることが明らかとなった。

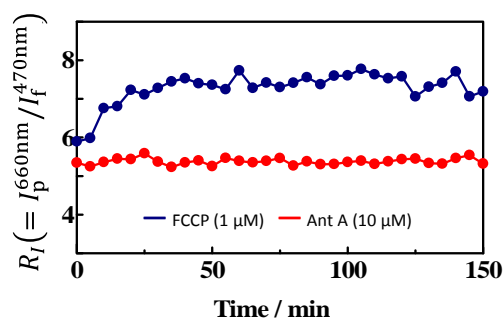


図 6 FCCP および Anti A 添加後のレシオ変化

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)

T. Yoshihara, Y. Hirakawa, M. Hosaka, M. Nangaku and S. Tobita, Oxygen Imaging of Living Cells and Tissues Using Luminescent Molecular Probes, J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev., 査読有, 30 巻, 2017, 75-95. DOI:10.1016/j.jphotochemrev.2017.01.001

S. Tobita and T. Yoshihara, Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing Using Phosphorescent Iridium(III) Complexes, Curr. Opin. Chem. Biol., 査読有, 33 巻, 2016, 39-45. DOI:10.1016/j.cbpa.2016.05.017

Y. Hirakawa, T. Yoshihara, M. Kaniya, I. Mimura, D. Fujikura, T. Masuda, R. Kikuchi, I. Takahashi, Y. Urano, S. Tobita, and M. Nangaku, Quantitating Intracellular Oxygen Tension *In Vivo* by Phosphorescence Lifetime Measurement, Sci. Rep., 査読有, 5 巻, 2015, 17838-1-10. DOI: 10.1038/srep17838

T. Yoshihara, S. Murayama, and S. Tobita, Ratiometric Molecular Probes Based on Dual Emission of a Blue

Fluorescent Coumarin and a Red Phosphorescent Cationic Iridium(III) Complex for Intramolecular Oxygen Sensing, Sensors, 査読有, 15 巻, 2015, 13503-13521.

DOI: 10.3390/s150613503

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., 査読有, 87 巻, 2015, 2710-2717.

DOI: 10.1021/ac5040067

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., 査読有, 299 巻, 2015, 172-182.

DOI:10.1016/j.jphotochem.2014.11.004

4

[学会発表](計 28 件)

T. Yoshihara and S. Tobita, Intracellular and *in vivo* Oxygen Sensing by Using Phosphorescence Lifetime Methods, Frontiers 2016 Symposium, 2016 年 12 月 5 日, Lausanne (Switzerland).

T. Yoshihara, S. Murayama, S. Tobita, Developments of Ratiometric Oxygen Probes for Intracellular Oxygen Sensing, 第 11 回日本分子イメージング学会学術大会, 神戸, 2016 年 5 月 28 日, 神戸国際会議場(兵庫県, 神戸市).

T. Yoshihara, S. Murayama, Y. Yamaguchi, and S. Tobita, Ratiometric Optical Sensors for Intracellular Oxygen Sensing, Third International Symposium on the Photofunctional Chemistry of Complex Systems, 2015 年 12 月 13 日, Maui (U. S. A.).

吉原利忠, 村山沙織, 飛田成史, レシオ型分子酸素計の光物理特性および細胞内酸素センシング, 2015 年光化学討論会, 大阪, 2015 年 9 月 11 日, 大阪府立大学(大阪府, 堺市).

吉原利忠, 村山沙織, 菊池俊毅, 飛田成史, 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光物理特性および

び細胞内挙動，2014 年光化学討論会，
2014 年 10 月 11 日，北海道大学（北海道，
札幌市）。

T. Yoshihara, Phosphorescent
Molecular Probes for Imaging Oxygen
Levels in Living Cells and Hypoxic
Tissues, China/Japan Young Chemists
Forum: Molecular Imaging for Chemical
Biology, 2014 年 8 月 5 日, Beijing
(China).

〔図書〕(計 1 件)

吉原利忠，飛田成史，化学同人，DOJIN
BIOSCIENCE SERIES 22 がんの分子イメ
ージング，2015，269 (130-137)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：レシオ法を用いた酸素濃度測定試薬
発明者：吉原利忠，安カ川真美，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 2016-205799
出願年月日：2016 年 10 月 20 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
[http://tobita-lab.chem-bio.st.gunma-u.a
c.jp/](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)
群馬大学大学院理工学府・准教授
研究者番号：1 0 3 7 5 5 6 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()