

生体分子可視化を目指した環境応答型蛍光プローブの開発

Development of environmental responsive fluorescence molecular probe toward for biomolecular imaging

○ 嶋村美来¹, 小林浩規¹, 西尾 忠¹, 金澤秀子¹, 岡野光夫²

1. 慶應義塾大学薬学部, 2. 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

○Mirai SHIMAMURA¹, Hiroki KOBAYASHI¹, Tadashi NISHIO¹, Hideko KANAZAWA¹ and Teruo OKANO²

1. Faculty of Pharmacy, Keio University

2. Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

1. はじめに

近年、病態を識別可能とする生体イメージング研究が精力的に行われている。このうち蛍光プローブを用いた手法では、細胞レベルで疾患に関する分子の時空間的挙動が観察可能である。我々は、機能性蛍光高分子を基盤として、温度や pH 変化を感知し、その蛍光強度が変化するバイオハイブリッド型蛍光プローブの研究を行っている。すなわち正常時とは異なる病態時の細胞内 pH, 温度を認識し選択的に発光させることで疾患の早期発見に繋がること期待される。

2. 目的

ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) は外部温度刺激に応答し、下限臨界溶解温度 (32°C) を境に低温で親水性、高温で疎水性変化を起こし構造を可逆的かつ鋭敏に変化させる性質を持つ。我々はこの高分子に pH 応答性を有する蛍光団などを導入して、シグナル伝達や疾患に関与する生体分子の蛍光イメージングの開発を目指している。今回は 4 種類の蛍光性高分子を開発した。さらに膜透過性を高めるために膜融合性脂質を縮合させ、バイオハイブリッド化を行い細胞イメージングへの適用を検討した。

3. 実験

3-1. 蛍光性高分子

蛍光試薬として fluorescein *o*-acrylate (FL), 7-(4-trifluoromethyl)coumarin acrylamide (CO), methacryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B (RH) 又は dansyl aminoethylacrylamide (DA) を用い、NIPAAm と共重合させて P(NIPAAm-*co*-FL) (1), P(NIPAAm-*co*-CO) (2), P(NIPAAm-*co*-RH) (3), P(NIPAAm-*co*-DA) (4) をそれぞれ合成した。これらの水溶液における温度及び pH 変化に伴う蛍光強度の測定を行い、環境応答性を評価した。

3-2. バイオハイブリッド型蛍光プローブ

蛍光性高分子の末端カルボキシ基を活性エステル化後、膜融合性脂質の phosphatidyl ethanolamine, dioleoyl (DOPE) を縮合させ、バイオハイブリッド型蛍光プローブを作製した。更に RAW264.7 細胞を用いて細胞実験を行った。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞膜透過性を評価した。

4. 結果

開発した蛍光性高分子 (1~4) はいずれも温度応答性を有し、LCST を 30°C 付近に有していた。このうち、(1)~(3) は低温側一発蛍光、高温側一消光という性質を有し、(4) はこれらと逆の性質を有していた。さらに (1) は FL 由来の pH 応答性も有していた (低 pH-弱発光, 高 pH-強発

光)。このことから、温度、pH の両環境に応答する蛍光性高分子が開発できた。バイオハイブリッド型蛍光プローブを用いた細胞実験では、細胞質内でプローブ由来の蛍光が観察され、細胞膜透過性が確認された。さらに DOPE 修飾前後における膜透過性の比較を行ったところ、バイオハイブリッド型蛍光プローブは蛍光性高分子単独の場合より細胞取り込みの亢進が確認された。今後、DOPE を各種疾患特異的なリガンド分子に変更することで、疾患選択的な細胞イメージングが可能になると考えられる。

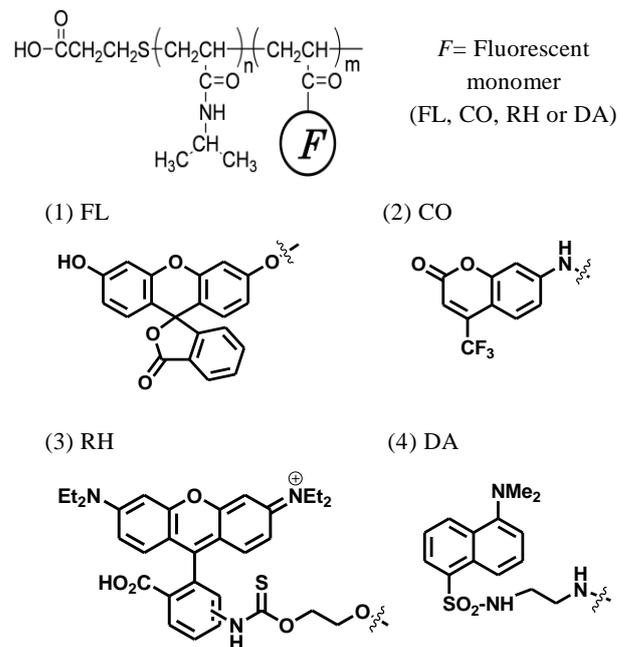


Fig.1 Chemical structures of fluorescent monomers.

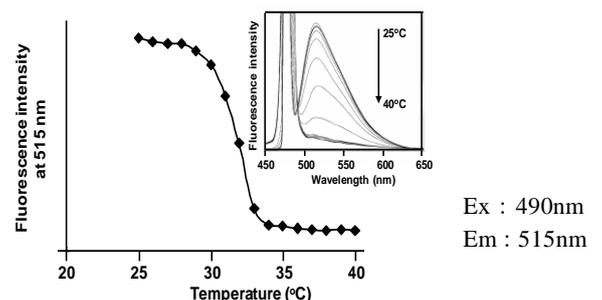


Fig.2 Properties of thermo-responsive P(NIPAAm-*co*-FL)