

29S-am02

生細胞における酸性小胞の pH 測定が可能な蛍光寿命イメージングプローブの開発
○國府田 絹子¹, 神谷 真子¹, 櫻井 千恵², 浅沼 大祐¹, 和田 郁夫²,
浦野 泰照^{1,3} (¹東大院医, ²福島県立医大, ³科学技術振興機構 研究加速課題)

【目的】 リソソームに代表される細胞内酸性小胞の pH は、小胞内部に含まれる酵素の活性や蛋白質の機能に大きく影響することが知られており、がん・炎症性疾患・免疫疾患・感染症の病因解明や治療法開発の上で非常に重要とされている。しかしながら未だ、その値を正確に測定可能な手法は確立されていないというのが現状である。当研究グループではこれまでに、蛍光強度観察により pH 変化を測定可能な pH 感受性蛍光色素 4-RhPM を開発した。今回新たに、この 4-RhPM 及びその誘導体が、pH 変化に伴い適切な蛍光寿命変化を示すことを見出し、これを用いて生細胞における酸性小胞の pH を蛍光寿命イメージング法で正確に決定する手法を検討した。

【方法】 まず 4-RhPM 及びその誘導体について各 pH における蛍光寿命を *in vitro* で評価した。次に、4-RhPM を抗体 (Erbitux : Cetuximab 製剤) にラベル化して、その標的タンパク質である Her1 (EGFR 受容体) が過剰発現している細胞 (A431) に取り込ませ、エンドサイトーシスに伴い生じる小胞の酸性化を蛍光寿命イメージング法により測定した。

【結果および考察】 4-RhPM 及びその誘導体の *in vitro* における蛍光寿命測定の結果、ピペラジンの N 置換基の電子求引性に従い蛍光寿命の pKa が変化し、これが細胞内酸性小胞の pH (pH 5~6.5) の測定に好適であることが明らかとなった。また、4-RhPM をラベル化した Erbitux を A431 細胞に適用した結果、エンドサイトーシスに伴う pH 低下を *in vitro* と同様に蛍光寿命変化として検知できることが確認された。これらの結果から、4-RhPM 及びその誘導体を用いることで、ターゲット環境の pH を蛍光寿命測定により正確に決定することが可能になったといえる。