

26R-am06S

細胞膜局在型二価鉄イオン蛍光プローブの開発とその応用

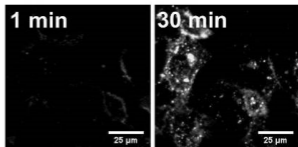
○丹羽 正人¹, 平山 祐¹, 奥田 健介¹, 永澤 秀子¹ (岐阜薬大)

【目的】鉄は、タンパク結合鉄として機能する一方、輸送過程において、タンパク非結合鉄(自由鉄)としても存在する。近年、鉄の細胞膜輸送に関する分子機構解明が進展し、トランスフェリン及びトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスによる細胞内輸送機構に加え、細胞膜上の二価金属イオントランスポーター(DMT-1)を介した取りこみやフェロポルチンによる排出機構が存在することが明らかになった。そこで本研究では、鉄の動態制御機構を解明すべく、これまで検出が困難であった自由鉄の主成分である二価鉄イオンを対象とし、細胞膜上で機能する蛍光プローブの開発を行なった。

【方法・結果】N-オキシドの化学を基盤とする細胞膜局在型二価鉄イオン蛍光プローブは、12段階でその合成を達成した。続いて、蛍光スペクトル測定を行ない、二価鉄イオンに対して発蛍光応答を示すことを確認し、生細胞を用いた蛍光イメージングを実施した。

まず、合成したプローブで処理した生細胞に二価鉄イオンを添加したところ、細胞膜上における蛍光シグナルが増大し、設計通りにプローブが細胞膜に局在することを確認した。

続いて、トランスフェリンのエンドサイトーシスにより鉄イオンが取り込まれる過程を解析すべく、プローブで処理した細胞に鉄含有トランスフェリン(holoTf)を添加し、タイムラプス蛍光イメージング観察を行なった。結果、トランスフェリンの取り込みに伴い、時間依存的にエンドソームにおける蛍光シグナルが増大する様子を観察することに成功した(右図)。



HepG2 cells were incubated with 0.2 μ M probe for 5 min, then 5 μ M holoTf. Imaging pictures were acquired 1 min (left) or 30 min (right) after addition of holoTf.