

培養細胞内コレステロール解析のための蛍光プローブ開発

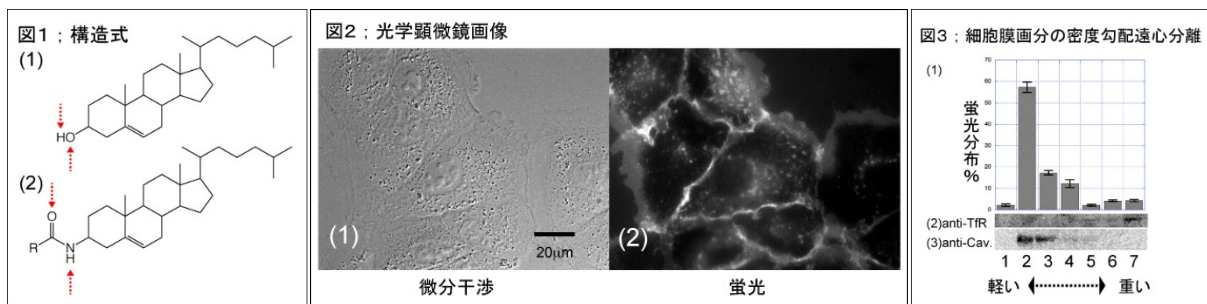
バイオイメーjing研究グループ・小川 昌克

研究のねらい

- 全ての哺乳動物細胞にとってコレステロールは生きる上で必須の分子である。しかし、その細胞内分布の制御機構は、いまま不明な点が多く疾患との関係が示唆されるため解明が期待される。
- 細胞内で遊離コレステロールのふるまいを模倣する蛍光分子（プローブ）を設計・合成する。従来、コレステロールを蛍光基で修飾すると分子認識部位が喪失し、そのふるまいを模倣できなかった。
- 分子認識を損なうことなくコレステロールへ蛍光基を導入した蛍光プローブを開発することにより生きた細胞における遊離コレステロール動態を可視化し、その分布制御機構の解析研究に資する。

新規技術の概要と特長

細胞内の遊離コレステロールはその半数以上が形質膜に局在し、またエンドソーム、ライソソームやゴルジ体に多く分布し、一方で小胞体には少ない等、その局在性は厳密に制御されている。コレステロール（図1(1)）は水酸基、多環式構造、アルキル鎖の3つから構成され、3つ全てが細胞内での分子認識に重要な役割を果たしている。従来、生きた細胞内で遊離コレステロールを可視化するために開発された蛍光プローブ（市販）はこの3部分のどれかに蛍光基を導入したものであるが、形質膜に短時間しか局在しない欠点が指摘されていた。本研究では水酸基をアミド結合に変換した上で蛍光基を導入することにより（図1(2)、R：蛍光基）、水酸基部位の水素結合形成能（図1赤矢印）を保持した蛍光プローブを開発した。この蛍光プローブで生きた培養細胞を染色すると、24時間程度形質膜に蛍光シグナル局在が観察され（図2）、また細胞の界面活性剤耐性膜を密度勾配遠心分離法で分画することで、細胞中の蛍光プローブが主に膜マイクロドメインに分布することが示めされた（図3(2)TfR:Transferrin Receptor、(3)Cav.:Caveolin1、各Western Blot）。



期待される連携・応用分野

- 細胞内コレステロール輸送タンパク質の探索など基礎研究
- 細胞内コレステロールに関連する疾患に効果を有する生理活性物質や薬剤探索など応用研究

関連特許および文献

- 文献:Ogawa Y. et al., Analytical Biochemistry, 492, 49-55(2016).
- 特許:第5004234号；膜マイクロドメイン又はコレステロール認識タンパク質検出用高感度分子プローブ