

Potassium sensing oligonucleotide を用いた細胞膜上での蛍光 K⁺イメージング Fluorescence imaging of potassium ion on cell membrane using potassium sensing oligonucleotide

曾田浩二郎、大澤信介、佐藤しのぶ、竹中繁織 (九工大院工)

神経細胞の活動電位は K⁺が大きく関与している。神経細胞に電流などにより刺激を加えると Na⁺が細胞内へ流入し、K⁺が流出する。従って K⁺濃度変化をイメージングできれば、脳の機構解明等につながると期待される。

パッチクランプ法はシングル K⁺濃度変化をモニタリング可能であるが、細胞集団の K⁺濃度変化を広範囲にセンシングするためには K⁺特異的蛍光イメージング試薬が有効である。最近、TAC-Red を用いたマウスの脳での K⁺流出のイメージングに報告されている。しかし、TAC-Red は 1 波長イメージングなのでプローブの濃度、褪色、プローブの移動によっても蛍光が変化するため定量性が乏しい。当研究室では 2 波長イメージング試薬 Potassium Sensing Oligonucleotide (PSO)を開発してきた。

PSO は 387 倍 K⁺/Na⁺選択的に K⁺選択的に 4 本鎖構造を形成するトロンビン結合アプタマー配列をもつ DNA の両末端に FAM と TAMRA の蛍光色素を有しており、K⁺濃度が増加するに伴って FRET が観察される。(Fig. 1B&C)。従って FRET 効率の変化(レシオ値, Fig. 2 の縦軸)を用いることによりプローブ濃度や褪色による変化をキャンセルできるので定量性に優れている。発表者はビオチンを有する PSO-5 (Fig. 1A)を合成し、ストレプトアビジンおよびビオチン化コンカナバリン A を介して、細胞の細胞膜上に均一にプローブを局在化させることに成功した。また、KCl 滴下に伴いレシオ値の増加が確認できた。また、細胞の経過観察から PSO-5 は細胞毒性を示さないことも明らかとなった。K⁺イメージングとし、アポトーシス誘導剤 (Amphotericin B, Bumetanide, Ouabain)添加に伴う時間経過によってレシオ値の増大が確認され (Fig 2)、細胞表面でのアポトーシスに伴う K⁺蛍光イメージングに成功した。

<参考文献>

- 1) K. Ohtsuka, S. Sato, Y. Sato, K. Sota, S. Ohzawa, T. Matsuda, K. Takemoto, N. Takamune, B. Juskowiak, T. Nagai, and S. Takenaka, Chem. Comm., in press.

発表者紹介

氏名 曾田浩二郎 (そたこうじろう)
所属 九州工業大学 物質工学研究系
学年 修士前期課程 1 年
研究室 機能設計化学研究室

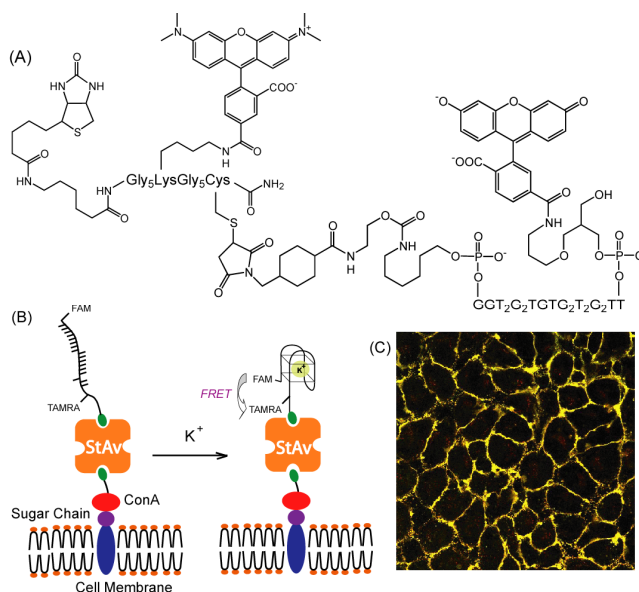


Fig.1. (A) PSO-5 の構造. (B) PSO による K⁺検出概念図. (C) K⁺存在下,非存在下での PSO 蛍光スペクトルの変化. (C) 細胞の蛍光イメージング図

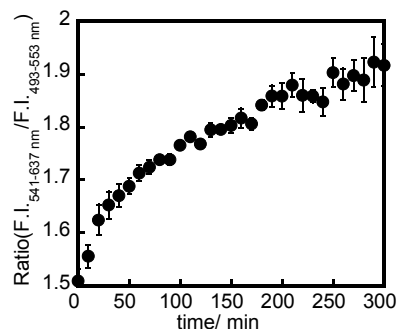


Fig.2. アポトーシス誘導剤による Ratio 値の時間変化.

アポトーシス誘導剤 (Amphotericin B, Bumetanide, Ouabain)添加に伴う時間経過によってレシオ値の増大が確認され (Fig 2)、細胞表面でのアポトーシスに伴う K⁺蛍光イメージングに成功した。

