

生細胞の過酸化脂質を蛍光検出したい

使用製品

Liperfluo	[L248]
MitoPeDPP	[M466]
DMSO	[LU08]

解析装置



I はじめに

過酸化脂質は脂質を構成する不飽和脂肪酸が酸化を受けることで生成する物質である。特に、生体内過酸化脂質の挙動は各種疾患や老化と関連付けられ、酸化ストレスのバイオマーカーのひとつとされている。生体内で発生する活性酸素は過酸化脂質生成の原因物質とされているが、その量は生体内の抗酸化作用により定常的に保たれている。しかしながら、生活習慣の変化やその他の要因によるストレスを受けると、生体内活性酸素の発生と消去のバランスに支障をきたし、種々の生体成分に対する酸化障害が進行する。その酸化作用による脂質過酸化の増加は、動脈硬化や糖尿病・がんなどを引き起こす要因とされ、活発に研究が進められている。

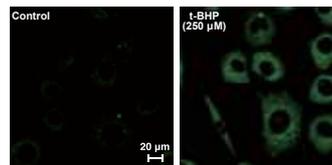
動脈硬化を例に挙げると、酸化的修飾を受けた LDL (低密度リポタンパク質) が動脈硬化の要因とされている。LDL は、apoB タンパク質とコレステロールやリン脂質の脂質成分から構成されており、その脂質部分には酸化を受けやすい不飽和脂肪酸が存在する。活性酸素による攻撃を受け、脂質過酸化反応が起こると連鎖的に近傍の脂質へも同様の反応が起こる。さらに、一部の過酸化脂質は apoB タンパク質のリシン残基のアミノ基へ結合し修飾するとされている。このような修飾を受けた酸化 LDL は、血管内皮細胞下に浸潤したマクロファージに取り込まれ、泡沫細胞へと発展することで、アテローム性動脈硬化症を招くと言われている。¹⁾

これまでに生化学分野において、微量の過酸化脂質を高感度かつ特異的に測定する方法として、ヨウ素滴定法、比色定量法、TBA 法、化学発光法などが利用されている。蛍光 HPLC 法で使用される DPPP (Diphenyl-1-pyrenylphosphine) は^{2,3)}、温和な条件で過酸化脂質と特異的に反応する試薬であるが、短波長励起による細胞へのダメージや細胞の自家蛍光による影響が課題とされていた。

Liperfluo は、トリフェニルホスフィン部で過酸化脂質と特異的に反応し、強い蛍光を発するペリレン環を蛍光基として有している。Liperfluo 酸化体の励起波長および蛍光波長はそれぞれ 524 nm、535 nm を示し、生体試料に対する励起光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できる。また、ペリレンジイミドの片方にテトラエチレングリコール基を導入したことで、小社製品 Spy-LHP と比較して水系バッファ中での分散性が向上している^{4,5)}。Liperfluo 酸化体は水中ではほとんど蛍光を発しないが、細胞膜等の脂溶性の高い部位では蛍光性となることから、蛍光顕微鏡による生細胞の過酸化脂質のイメージングやフローサイトメトリーによる細胞の過酸化脂質量の検出に適用できる。⁶⁾

MitoPeDPP は、分子内にミトコンドリアに局在化するトリフェニルホスホニウム基を持つため、細胞膜を透過してミトコンドリアに集積する。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、膜中の脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発

する。酸化 MitoPeDPP の励起および蛍光波長はそれぞれ 452 nm、470 nm で、測定試料への光によるダメージや試料由来の自家蛍光の影響を軽減できることから、蛍光顕微鏡を用いた過酸化脂質のイメージングが可能である。

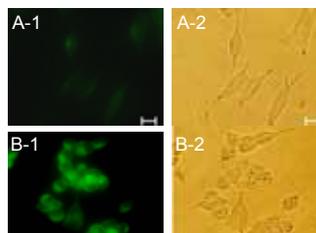


(データ提供: 北里大学薬学部 今井浩孝先生、熊谷剛先生)

図 1 生細胞を用いた過酸化脂質の共焦点顕微鏡イメージング

操作手順

- 使用細胞: L929 細胞 (マウス繊維芽細胞由来培養細胞株)
35 mm ガラスボトムディッシュに播種 (2.5×10^5 cell/well)
↓ 一昼夜 (37°C, CO₂ インキュベート)
- 培地除去後、Liperfluo を含む新しい培地を添加 (終濃度: 1 μmol/l)
↓ 30 min (37°C, CO₂ インキュベート)
- 培地除去後、t-BHP を含む新しい培地を添加 (終濃度: 250 μmol/l)
↓ 2 h (37°C, CO₂ インキュベート)
- 共焦点レーザー顕微鏡で測定
装置: Zeiss LSM510 META
フィルターセット: FITC (GFP, Alexa488) wide filter
HFT UV/488, NFT490, BP505-550



(データ提供: 同志社大学生命医科学部 野口範子先生)

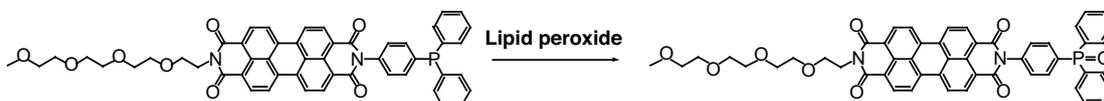
図 2 SH-SY5Y 細胞における各種薬剤刺激による過酸化脂質イメージング

薬剤による酸化ストレス刺激により明確な蛍光増加が確認できる。

(A) Control (B) Cumene それぞれの蛍光及び明視野画像。
Cumene: Cumene Hydroperoxide

操作手順

- 使用細胞: SH-SY5Y
6 well plate に播種 (6.0×10^5 cell/well)
↓ 終夜 (37°C, CO₂ インキュベート)
- Liperfluo の DMSO 溶液を添加 (終濃度: 20 μmol/l)
↓ 15 min (37°C, CO₂ インキュベート)
- Cumene 添加 (終濃度: 100 μmol/l)
↓ 2 h (37°C, CO₂ インキュベート)
- 蛍光顕微鏡で測定
装置: Olympus IX-71 epifluorescent microscope
ミラーユニット: U-MNIBA3
露光時間: 10 sec
ISO 感度: 800



II Liperfluo を用いた細胞過酸化脂質の観察

1. 試薬

- Liperfluo (Code: L248)
- DMSO (Code: LU08)
- PBS(-)

2. 方法

- 1) Liperfluo 50 µg を含むチューブに DMSO 60 µl を添加し、ピペティング等を使用して溶解する (濃度: 1 mmol/l)。
- 2) 操作1で調製したLiperfluo (DMSO) 溶液を細胞懸濁液に添加する。
例: 細胞懸濁液 (細胞数 1.0×10^5 cells/ml) 1 ml に対して適量の Liperfluo (DMSO) 溶液を添加する。
- 3) 37°C で 30 分間インキュベートする。
- 4) 蛍光顕微鏡あるいはフローサイトメトリー等で観察、分析する。

III 注意事項

- 1) Liperfluo は、溶解し難いためピペティングと併用して、ボルテックス、超音波、または加温して溶解して下さい。
- 2) Liperfluo (DMSO) 溶液調製後は、アルミホイル等で遮光し、その日のうちに使用して下さい。
- 3) バックグラウンドが高い場合は PBS に置換して下さい。
- 4) 染色時、DMSO 濃度は 1% 以下になるように Liperfluo 溶液を添加して下さい。

IV MitoPeDPP を用いたミトコンドリア膜中の脂溶性過酸化物の観察

1. 試薬

- MitoPeDPP (Code: M466)
- DMSO (Code: LU08)
- Hanks' HEPES Buffer または PBS (-)

2. 試薬の調製

(0.1 mmol/l MitoPeDPP stock solution の調製)

MitoPeDPP 5 µg を含むチューブに 50 µl の DMSO を加えピペティングにより溶解する。

※ MitoPeDPP (DMSO) 溶液調製後は、アルミホイル等で遮光し、その日のうちにご使用ください。

(MitoPeDPP working solution の調製)

最終濃度が 0.1 ~ 0.5 µmol/l になるように 0.1 mmol/l MitoPeDPP stock solution を Hanks' HEPES Buffer 等で希釈する。

- ※ 最終濃度 0.1 ~ 0.5 µmol/l の範囲でご使用ください。
- ※ 細胞の状態を維持するため Hanks' HEPES Buffer をお勧めします。
- ※ MitoPeDPP working solution は、アルミホイル等で遮光し、その日のうちにご使用ください。

(細胞へのロード)

- 1) 培地を取り除き、Hanks' HEPES Buffer または PBS で 2 回洗浄する。
※ 培地中ではバックグラウンドが高くなる傾向がありますので、MitoPeDPP を添加する前に Hanks' HEPES Buffer などに置換してご使用ください。
- 2) 調製した MitoPeDPP working solution を添加する。

培養器材	working solution の量
35-mm ディッシュ	2000 µl
96 well プレート	100 µl

- 3) 遮光下で 37°C、15 分間インキュベートする。
- 4) 上澄みを除去し、Hanks' HEPES Buffer または PBS で 2 回洗浄する。
- 5) Hanks' HEPES Buffer または PBS を加え、蛍光顕微鏡で観察する。
※ Filter (wavelength/band pass): 470/40 (Ex), 525/50 (Em)

V 使用例

1. *t*-BHP 添加による脂溶性過酸化物の検出例
- 1) µ-slide 8well(ibidi) に HeLa 細胞を播種し、37°C、CO₂ インキュベーターで終夜培養する。
- 2) 培地を除き 250 µl HBSS buffer で 2 回洗浄し、0.1 µmol/l MitoPeDPP working solution と 0.1 µmol/l MitoBright Deep Red を添加する。
- 3) 37°C で 30 分間インキュベートした後、上澄みを除去し、250 µl の HBSS buffer で 2 回洗浄する。
- 4) 上澄みを除去し、HBSS buffer で調整した 100 µmol/l *t*-BHP(*tert*-hydroperoxide) を 250 µl 添加する。
- 5) 37°C で 30 分間インキュベート後、蛍光顕微鏡で観察する (図 3)。

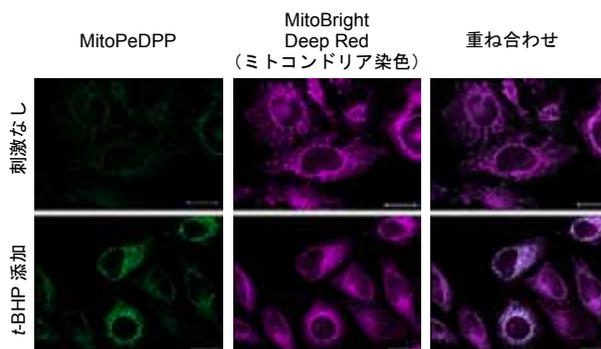


図 3 HeLa 細胞中での *t*-BHP (*tert*-Butylhydroperoxide) 外部添加による過酸化物検出
フィルター (wavelength/band pass)
MitoPeDPP : 470/40(Ex), 525/50(Em)
MitoBright Deep Red : 600/50(Ex), 685/50(Em)

2. Roteone 添加による脂溶性過酸化物の検出例

ミトコンドリア内で重要な役割を担っている電子伝達系のうち、Complex-1 阻害剤として知られる Rotenone により内活性酸素を発生させ、MitoPeDPP により脂溶性過酸化物を検出。

操作手順

- 使用細胞: HeLa 細胞
µ-slide 8 well (ibidi) に細胞を播種
↓ 一昼夜 (37°C, CO₂ インキュベーター)
- Hanks' HEPES buffer で希釈した 0.1 µmol/l MitoPeDPP を添加
↓ 15 min (37°C, CO₂ インキュベーター)
- Hanks' HEPES buffer で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡にセット
↓
- 終濃度が 1 µmol/l になるように Rotenone を加え 30 分毎に蛍光顕微鏡で撮影する。

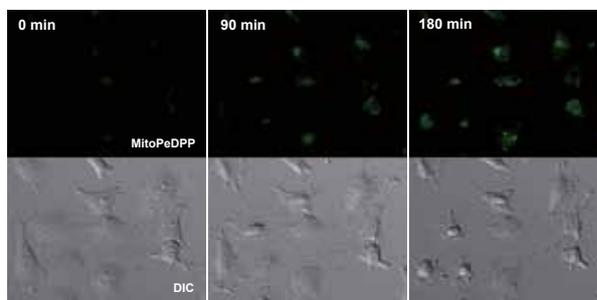


図 4 ミトコンドリア膜中の脂溶性過酸化物を蛍光法にて検出
(左) Rotenone 添加直後、(中) Rotenone 添加 90 分後、
(右) Rotenone 添加 180 分後
装置: Zeiss Observer. Z1
励起フィルター: 470/40 nm
蛍光フィルター: 525/50 nm

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

V 注意事項

アルミラミジップの開封後、未使用の MitoPeDPP はアルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、0-5°Cで保存してください。

参考文献

- 1) 佐藤優子, 沢村達也, “酸化 LDL とその受容体 LOX-1”, 生物試料分析, **2009**, 32, 127.
- 2) K. Akasaka, H. Ohruai and H. Meguro, “Normal-phase High-performance Liquid Chromatography with a Fluorimetric Postcolumn Detection System for Lipid Hydroperoxides”, *J. Chromatogr.*, **1993**, 628, 31.
- 3) Y. Okamoto, A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita and N. Noguchi, “A Novel Fluorescent Probe Diphenyl-pyrenylphosphine to Follow Lipid Peroxidation in Cell Membranes”, *FEBS Lett.*, **2000**, 474, 137.
- 4) N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, K. Nakano, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16(11), 2943.
- 5) N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, H. Nakajima, K. Nakano and T. Imato, “Swallow-tailed Perylene Derivative: a new Tool for Fluorescent Imaging of Lipid Hydroperoxides”, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 3762.
- 6) K. Yamanaka, Y. Saito, J. Sakiyama, Y. Ohuchi, F. Osetob and N. Noguchi, “A Novel Fluorescent Probe with High Sensitivity and Selective Detection of Lipid Hydroperoxides in Cells”, *RSC Adv.*, **2012**, 2 (20), 7894.
- 7) K. Shioji, et al, “Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 3911.