

電子顕微鏡で特定の細胞小器官を観察するための電子染色プローブ開発

森田 健太*

Staining Probe for an Observation of Cell Organelle by Using Electron Microscope

Kenta MORITA*

A transmission electron microscope (TEM) has the highest resolution compared to other optical microscopes. However, it has been difficult to stain and observe the desired cell organelles because conventional electron staining agents do not express enough specificity and spatial resolution. In this study, I designed peptide lipids that can be used as electron staining agents. I combined the peptide sequence that complexes with a palladium atom and the lipid chain that localizes to specific organelles. First, I conjugated the peptide lipid with a fluorophore to observe its intracellular localization using confocal laser scanning microscopy. The peptide lipid was localized at the cellular lipid droplet. Next, the absorbance measurements suggested that the peptide lipid formed a metal complex with palladium in D-PBS solution under acidic conditions. Thus, I thought that the peptide-palladium complex can be used as an electron staining agent for the cellular lipid droplet.

1. 背景と目的

透過型電子顕微鏡 (TEM) は最新の超解像光学顕微鏡と比べても 400 倍以上という分解能を持つにもかかわらず、細胞内小器官の選択的観察には光学顕微鏡が用いられる。その大きな理由として、TEM 写真はモノクロであり色による染め分けができないことが挙げられる。細胞内小器官を TEM で選択的に可視化するには金属イオンを集積させる必要があるが、この特異的電子染色を簡便に行う試薬は存在しない。ここで、私の研究グループでは貴金属イオンと錯体を形成するペプチド配列¹ (GGH) と炭化水素鎖を組み合わせたペプチド脂質を報告している²。一方、最近の研究では、ペプチド脂質の炭化水素鎖の長さを制御すると細胞膜や小胞体などの細胞小器官へ指向性を持つことが示唆されている³。そこで、金属イオンと錯体形成するペプチド脂質の炭化水素鎖を様々に変え、細胞内の望んだ部位に金属イオンを局在化させることで電子顕微鏡にて観察可能にすることを目的とした。具体的な方法としては、金属イオンを担持して細胞膜系に局在化するペプチド脂質を合成し、細胞内の局在を TEM にて確認する。そして、ペプチド脂質の炭化水素鎖の長さや種類を様々に変化しその局在を確認することで電子染色剤として利用可能な配列を探索する。本研究では、コンセプト実証のためパラジウムイオン (Pd^{2+}) と C16-GGGH または GGGH-C16 が形成するペプチド金属錯体について検討した (図 1)。

2. 実験方法

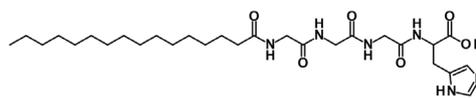
ペプチド脂質の合成

C16-GGGH と GGGH-C16 は Fmoc ペプチド固相合成法を用いて合成し、再結晶によって精製した。MALDI-TOF/MS を用いて合成の確認を行った (図 1)。また、合成したペプチド脂質の細胞内動態を評価するため、に 5-aminofluorescein を縮合させることで蛍光ラベル化した F1-C16-GGGH を作製した。HPLC を用いて精製し、MALDI-TOF/MS を用いて合成の確認を行った。

ペプチド脂質の細胞内動態

35 mm のディッシュに 1.0×10^5 cells の肝臓がん細胞 (HepG2) を播種した。24 h 後に 100 μ M F1-C16-GGGH を溶解した培地に交換し、所定の時間インキュベートした。その後、市販の蛍光染色液を用いて細胞核、または、小胞体、リソソーム、脂肪滴を共染色した。

Palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His (C16-GGGH)



Gly-Gly-Gly-His-Hexadecylamine (GGGH-C16)

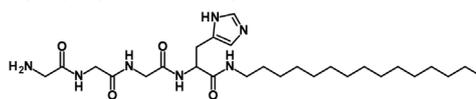


図 1 本研究で用いたペプチド脂質の分子構造。

2024年2月28日 受理

* 豊田理研スカラー

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

ペプチド脂質とパラジウムイオン (Pd²⁺) の錯体形成

塩酸を添加し強酸性溶液とした D-PBS を溶媒として、ペプチド脂質と PdCl₂ をモル比 5:1 で溶解した。混合開始時と 4 時間経過後に、この混合溶液の吸光度を測定し、Pd²⁺に由来する 280 nm の吸光度の変化を確認した。

ペプチド金属錯体を用いた培養細胞の電子染色

0.05 mM GGGH-C16 と 0.25 mM PdCl₂ を D-PBS (pH<1) 中に溶解し、一晩静置した。錯体の形成を確認した後、Na₂CO₃ 飽和溶液を用いて pH 7 に調整し錯体溶液とした。HepG2 細胞をディッシュで培養し、トリプシン処理によって試験管に回収した。ここに錯体溶液を添加し、30 分間インキュベートした。その後、細胞をグルタルアルデヒドで固定し、樹脂に包埋した後、超薄切片を作製した。切片を無染色のまま TEM で観察した。

3. 結果と考察

まず、合成したペプチド脂質の細胞内動態を確認するため、蛍光修飾した F1-C16-GGGH を HepG2 に投与し共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて蛍光観察を行った。細胞核、または、小胞体、リソソーム、脂肪滴との共染色によって局在部位も検討した。F1-C16-GGGH は、投与後 30 分では細胞膜に局在していた (図 2 左)。投与後一晩経つと、脂肪滴に局在していた (図 2 右)。以上から、アルキル鎖として C16 を持つペプチド脂質は処理時間を制御することで細胞膜あるいは脂肪滴の特異的染色剤として利用できることが示唆された。

次に、GGGH を持つペプチド脂質と Pd²⁺ と錯体形成を分光学的に検証した。その結果、C16-GGGH は錯体形成反応が完全に進行するまで一晩を要したが、GGGH-C16 は 4 時間で反応が完了した。そのため、以降は GGGH-C16 を用いて検討を行った。

F1-C16-GGGH の細胞内動態を参考にし、GGGH-C16 と Pd²⁺ の錯体を HepG2 に 30 分処理することで HepG2 の細胞膜の電子染色を試みた。錯体を処理した HepG2 細胞を樹脂包埋し TEM にて観察を行ったところ、錯体処理していないコントロール細胞では細胞膜が全く観察できないのに対し、錯体処理した細胞では明らかに細胞膜のコントラストが高く観察された (図 3)。そこで TEM-EDS 分析によって元素分析を行ったが、図 3 に示す視野からはいずれも Pd に由来する信号は検出できなかった。これは、細胞膜に送達した Pd 原子が極めて少ないためであると考えられる。

4. 結論

本研究では、Pd²⁺ と錯体形成するペプチド配列である GGGH とアルキル鎖 C16 を結合したペプチド脂質 C16-GGGH, GGGH-C16 を用いて、細胞内小器官の特異的電子染色が可能かどうかを検討した。蛍光修飾したペプチド脂質の細胞内動態を追跡した結果、C16 を持つペプチド脂質は短期的に細胞膜に局在し、最終的に脂肪滴に移行することが示唆された。そこで GGGH-C16 と Pd²⁺ の錯体を用いて培養細胞の細胞膜を指向して電子染色したところ、TEM 観察によって細胞膜のコントラスト上昇が確かめられた。しかし、未だ細胞小器官の特異的電子染色に成功したとは言い難い。Pd 原子の集積量を増やす工夫が必要である。

REFERENCES

- 1) S. L. Best, *et al.*, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **15** (1997) 2587-2596.
- 2) D. Koda, *et al.*, *Chem. Commun.*, **46** (2010) 979-981.
- 3) K. Morita, *et al.*, *JACS Au* (2022), **2** (2023) 9.

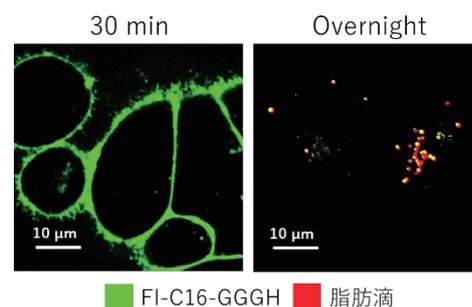


図 2 ペプチド脂質の細胞内動態。

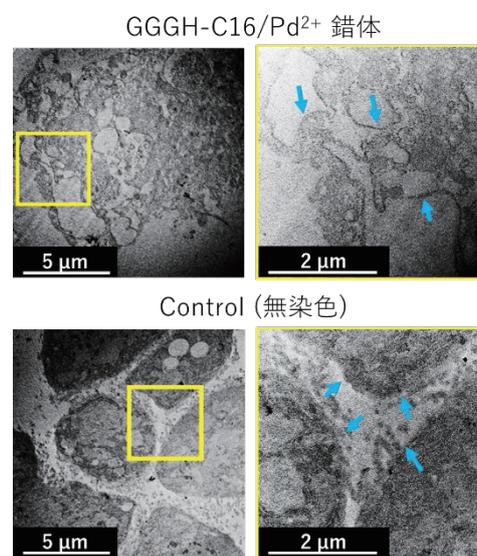


図 3 GGGH-C16 と Pd²⁺ の錯体を用いた培養細胞細胞膜の電子染色。青矢印：細胞膜の位置。