

脂質内クリック反応による細胞内脂肪滴の蛍光ラベル化

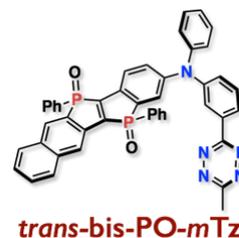
(名大院理¹・名大 ITbM²) ○塩谷 大¹・Junwei Wang²・多喜 正泰²・山口 茂弘^{1,2}
 Fluorogenic labeling of lipid droplets via intralipid click reaction (¹Graduate School of Science, Nagoya University, ²Institute of Transformative Bio-Molecules(WPI-ITbM)) ○Hiro Shiotani,¹ Junwei Wang,² Masayasu Taki,² Shigehiro Yamaguchi^{1,2}

Fluorescent markers for lipid droplets (LDs) are a promising chemical tool for monitoring LD dynamics in cells. To tune the excitation wavelength in a suitable visible range and improve the retention time of the markers in LDs, in this study, we developed *trans*-bis-PO-*m*Tz, a tetrazine-conjugated bis-phosphoryl-bridged fluorophore. We hypothesized that if the inverse electron-demand Diels–Alder (IEDDA) reaction occurs between *trans*-bis-PO-*m*Tz and an artificial lipid containing an alkene in LDs, the release of the dye from the cell would be significantly suppressed. In toluene, *trans*-bis-PO-*m*Tz was efficiently quenched by tetrazine ($\Phi_F = 0.01$), while a 38-fold increase in the fluorescence intensity was observed when treated with methyl 10-undecenoate. HuH-7 cells were incubated in the presence of 14-pentadecenoic acid, followed by the addition of *trans*-bis-PO-*m*Tz, resulting in the emergence of intense fluorescence from LDs. This result suggests that 14-pentadecenoic acid is metabolically incorporated into the LDs as triglycerides followed by the IEDDA reaction in the LDs. The fluorescence intensity of cells retained 95% of the original value even after 24 h of incubation in a culture medium containing serum.

Keywords : Fluorogenic Probe; Lipid Droplets; Click Chemistry; Tetrazine; Live-cell Imaging

細胞内脂肪滴の動態追跡には、脂肪滴蛍光染色剤が有用である。しかし、既存の脂肪滴染色剤は脂肪滴特異性や耐光性に乏しいため、微小な脂肪滴動態を長時間追跡することができなかった。これに対して当研究室では、超耐光性脂肪滴染色剤として LAQ1 を開発し、脂肪滴イメージングにおける有用性を示してきた¹⁾。しかし、生理的条件における脂肪滴動態を理解するためには、血清を含む完全培地中で長時間にわたり観察可能な新たな染色剤開発が必要である。そこで本研究では、励起波長の長波長化と色素の脂肪滴内保持時間の向上を目指し、2つのホスホリル基を有する蛍光色素に対してテトラジンを導入した *trans*-bis-PO-*m*Tz を開発した。テトラジンとアルケンとの逆電子要請型 Diels-Alder (IEDDA) 反応はクリックケミストリーの一種として知られている。脂肪滴内で *trans*-bis-PO-*m*Tz とアルケンを含む人工脂質との間で IEDDA 反応が進行した場合、色素の細胞外への流失が抑制されるものと考えた。

trans-bis-PO-*m*Tz の蛍光は、トルエン中、テトラジンにより効率的に消光されているが($\Phi_F = 0.01$)、10-ウンデセン酸メチルを作用させると蛍光強度が38倍に増大した。次に、HuH-7細胞を14-ペンタデセン酸存在下で培養後、*trans*-bis-PO-*m*Tz を加えたところ、脂肪滴からの強い蛍光が観察された。これは、14-ペンタデセン酸が中性脂肪として脂肪滴内に代謝的に取り込まれ、脂肪滴内でクリック反応が進行したためと考えられる。実際、本手法で染色した場合は、血清存在下で細胞を24時間培養しても蛍光強度は当初の95%を保持することがわかり、長時間観察の可能性が示唆された。



1) M. Taki, K. Kajiwara, E. Yamaguchi, Y. Sato, S. Yamaguchi, *ACS Materials Lett.*, **3**, 42-49 (2021).