

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15109

研究課題名(和文)還元ストレス検出蛍光プローブ開発

研究課題名(英文)Development of fluorescent probe for detection of reductive stress

研究代表者

山田 健一(Yamada, Ken-ichi)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60346806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くの疾患の発症に、酸化還元反応の変動が関与することが報告されている。我々は、このレドックス変動の中で、特に、還元ストレスの検出を目的とした。そのために、新たにミトコンドリア移行性蛍光ニトロキシドプローブを開発した。その結果、本プローブは、ミトコンドリアでの還元ストレスを引き起こす過剰な電子供与体を細胞内で検出できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In development of many oxidative disease, change of redox reaction have been reported to be involved. Here, in this study, we aimed to develop a detection probe for reductive stress. We herein designed a mitochondrial targeting profluorescent nitroxide probe for the detection of reductive stress. We demonstrated that this probe can detect an excess amount of electron donating compound in living cell, which causes the mitochondrial reductive stress.

研究分野：生物物理化学

キーワード：薬学 分析科学 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは様々な疾患の発症・進展に密接に関与している。この酸化ストレスの原因である活性酸素 (ROS) の産生源は、ミトコンドリア電子伝達系や、NAD(P)H オキシダーゼなどである。さらにこれら酵素の基質は、NADH やコハク酸である。すなわち、酸化ストレスの亢進には、還元物質の蓄積が必要である。事実、高血糖、肥満や虚血時には、過剰の NADH が蓄積している (Brownlee M, *Nature* 2001)。また最近、ミトコンドリア中でコハク酸の過剰な蓄積により ROS が生成するとの報告がなされた (Chouchani ET, *et al.*, *Nature*, 2014)。つまり、還元ストレスが、後の酸化ストレス・生体内組織の障害を惹起する言わば「疾患発症の開始点」であると我々は考えた。この還元ストレスの重要性については、最近になりようやく認識されるようになってきている (Yan LJ, *J Diabetes Res*, 2014)。しかしながら、酸化ストレスをターゲットとした検出プローブは、多数報告があるにもかかわらず、この還元ストレスに特異的な蛍光プローブはこれまでほとんど報告がない。つまり検出プローブ法を開発できれば、疾患メカニズム解明に大いに貢献できるのは間違いない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、有機スピン化合物であるニトロキンド化合物が持つ特徴、①電子供与性物質に対する高い反応性、②不対電子の有無による蛍光 OFF-ON 特性に着目し、さらに③ミトコンドリア内膜移行性基を付与することで、「ミトコンドリア内における還元ストレス検出蛍光プローブの開発とその評価」を目的とした。

## 3. 研究の方法

ニトロキンドにミトコンドリア移行性基、蛍光原子団を導入し、ミトコンドリア還元ス

レス検出蛍光プローブを合成した。本プローブにおいて反応選択性を評価した。評価に用いた化合物は、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{NaClO}$ 、TBHP、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{CoQ}_{10}$ 、 $\text{CoQ}_{10} + \text{NADH}$  である。また、ラット肝抽出ミトコンドリアにおける反応性を評価した。具体的には、ラット肝臓より抽出したミトコンドリアに、酸化的リン酸化基質(リンゴ酸・ピルビン酸)を加え、本プローブを用いて還元ストレスの検出を行った。また、酸化ストレス検出試薬である MitoSox も同様に用い比較した。さらに、培養細胞を用いてミトコンドリア内における還元ストレスを検出できるか否か検討した。HUVEC 細胞を基質にて刺激し、本プローブ添加後、共焦点蛍光顕微鏡にて撮像した。

## 4. 研究成果

1) 酸化還元電位を制御した還元ストレス検出蛍光プローブ開発：ミトコンドリアでの還元ストレスを測定可能な蛍光プローブを開発した。ミトコンドリア内膜中の電子供与性分子の検出のために、蛍光原子団として Nitrobenzofurazan 基、ミトコンドリア移行性基としてメチレン基をスペーサーとして持つ Triphenyl-phosphonium 基を導入したニトロキンド結合型蛍光プローブを合成した。

2) 反応性評価：本プローブが電子供与性分子を検出可能であるか、さらに、抽出ミトコンドリアにおける還元ストレスを検出可能であるか検討した。本プローブは、ミトコンドリア内に存在する電子供与性分子である、還元型ユビキノン ( $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ ) と選択的に反応し自身の蛍光強度を回復させた。さらに、本プローブはその他の生体内還元物質や活性酸素種に対してはほとんど蛍光応答性を示さなかった。以上の結果より、本蛍光プローブは  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  に対して高い反応選択性を有することが示唆された。

次に、本プローブがミトコンドリア内の還元ストレスを検出できるか否か評価した。ミ

トコンドリアに対し、クエン酸回路の基質分子であるリンゴ酸やピルビン酸を過剰量投与すると、内膜中に電子供与性分子が蓄積する。そこで、抽出したミトコンドリアに過剰な基質を加え、蓄積した電子供与性物質を本プローブによって検出可能であるか検討した。その結果、ミトコンドリアへの基質刺激後直後から、本プローブの顕著な蛍光上昇が観測された。また、ミトコンドリア内スーパーオキシド検出試薬 (MitoSox) を用い、同様の検討したところ、その蛍光上昇は刺激直後には観測されず、刺激後 24 時間後に上昇が観測された。以上の結果より、本蛍光プローブはミトコンドリア内において ROS 生成のさらに上流に生じる電子供与性分子の蓄積を検出していることが示唆された。

3) 培養細胞モデルを用いた検証実験：合成したミトコンドリア移行性還元ストレス蛍光プローブを用いて、培養細胞モデルを用いて検討した。ミトコンドリアでの還元刺激として、解糖系の基質のひとつであるリンゴ酸あるいはピルビン酸を添加した。その結果、添加 10 分以内に、還元ストレス検出プローブの蛍光強度は有意に上昇した。また、ミトコンドリア染色蛍光プローブとの共染色により、開発したプローブは、ミトコンドリアに局在していることがわかった。さらに非常に興味深いことに、この時点では、ミトコンドリアでの ROS 検出プローブの蛍光強度は上昇せず、24 時間後によく亢進した。すなわち、ミトコンドリア解糖系の基質を添加することにより、酸化ストレスに先立って還元ストレスが亢進していることが示唆された

以上の結果より、ミトコンドリア内還元ストレスを検出可能な化合物を開発した。本プローブは電子供与性分子と選択的に反応し、蛍光強度が上昇した。また、培養細胞での検討により本プローブは、ミトコンドリア内膜

に高い移行性を示し、還元ストレスを誘発させると顕著に蛍光強度が上昇することがわかった。一方、従来のミトコンドリア内酸化ストレス検出試薬では、添加 24 時間後以降検出可能であった。したがって、今回ミトコンドリア還元ストレス検出プローブを新たに開発したことで、酸化ストレス発生前に還元ストレスの蓄積が生じていることが示唆された。本プローブにより、今まで有用な検出試薬が存在しなかった還元ストレスを評価することが可能となり、疾患メカニズムの解明や的確な投薬タイミングの提案に貢献できると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Emoto MC, Matsuoka Y, Yamada KI, Sato-Akaba H, \*Fujii HG. Non-invasive imaging of the levels and effects of glutathione on the redox status of mouse brain using electron paramagnetic resonance imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 485(4):802-806, 2017. 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.134
- ② Yasui H, Yamamoto K, Suzuki M, Sakai Y, Bo T, Nagane M, Nishimura E, Yamamori T, Yamasaki T, Yamada KI, \*Inanami O. Lipophilic triphenylphosphonium derivatives enhance radiation-induced cell killing via inhibition of mitochondrial energy metabolism in tumor cells. *Cancer Lett.* 390:160-167, 2017. 査読有, doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.006.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yuta Matsuoka, Toshihide Yamasaki, Ken-ichi Yamada, Synthesis and evaluation of 2,6-substituted TEMPO derivatives, 第

16回 日本NO学会学術集会、第9回国  
際NO学会, 2016年05月20日～2016  
年05月22日, 仙台

② 松岡 悠太, 大久保 敬, 福住 俊一, 山田  
健一, アスコルビン酸の迅速かつ高感度  
な検出に向けた長波長蛍光ニトロキシ  
ド化合物の開発, 第29回バイオメディ  
カル分析科学シンポジウム, 2016年9月  
2日～2016年09月03日, 京都

③ 三倉 唯, 松岡悠太, 山田 健一, レドッ  
クス応用型プローブ・HPLC蛍光検出  
系を用いた細胞内レドックスバランス  
の評価手法の開発, 日本薬学会 第137  
年会 2017年3月24日～2017年3月27  
日 仙台

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 健一 (YAMADA, Kenichi)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号: 60346806

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )