

平成30年 6月18日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15144

研究課題名(和文)ラジカル特異的反応性を利用した新規NO蛍光プローブの開発

研究課題名(英文)New fluorescence NO probe adopting radical-specific reactivity

研究代表者

中川 秀彦(Nakagawa, Hidehiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80281674

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)：本研究では、酸素分圧の影響を受けず一酸化窒素自体の反応性によって発蛍光型検出を可能とする新規蛍光プローブの開発を行った。設計・合成した化合物について、試験管内反応により一酸化窒素との反応性を検証した結果、ニトロニルニトロキシドがオレフィンリンカーを介してクマリン環3位に置換した化合物が良好な反応性を示し、酸素濃度の影響を受けず、一酸化窒素を検出できることが示された。さらに、アスコルビン酸との反応性を低下させる構造の探索を行ったところ、エチル基を導入した化合物についてアスコルビン酸との反応性の低下が見られたが、反応が完全には抑制されなかった。今後、引続く研究計画を立案し開発を継続することとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the development of the fluorescence probe for NO which detects NO independent from oxygen tension in the milieu, but rather dependent on the reactivity of NO itself. We designed and synthesized various compounds bearing coumarin fluorophore moiety and nitronyl nitroxide (NN) moiety connected with various linkers, and examined the relevant combination and positions for NO detection. From the results, the compound in which NN was connected to the position 3 of the coumarin core structure showed good fluorescence response for NO. The probe was also found to show equivalent fluorescence responses both under aerobic and anaerobic conditions, meaning that the probe can detect NO independent from the oxygen tension. Next, we tried to modify the probe so that it is more resistant from the reduction with ascorbic acid. It is found that the derivative with 4 ethyl groups showed the partial resistance against the reduction with ascorbic acid.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 一酸化窒素 蛍光プローブ ニトロン

1. 研究開始当初の背景

(1) NO は血圧調節、神経伝達調節、生体防御など多様な生理機能に関わることが知られている。また、NO の生理機能発見以降、同様なガス状分子が生体内で果たす役割が注目され、一酸化炭素(CO)や硫化水素(H₂S)の生理作用が見いだされ「生体内ガス状メディエーター」として注目されている。NO は酸素やガス状メディエーターとの化学的・生物学的相互作用が知られており、これらの相互作用を考慮してNO の生体内挙動・濃度を解析することが、生体情報伝達ネットワークの中でのNO の機能・役割を解明する意味で重要である。生体試料中のNO を測定する方法として蛍光プローブを利用したイメージング解析は有効である。しかし、頻用されるNO 蛍光プローブは、NO 自体ではなくNO⁺(NO 酸化物)との反応性を利用しており、環境の酸素濃度・酸化剤濃度の影響を大きく受ける。また、NO と遷移金属の錯体を利用した蛍光プローブも知られるが、普及しておらず金属毒性も懸念される。

(2) ガス状メディエーターの化学的・生物学的相互作用の存在やNO 濃度が組織の酸素の影響を受けることを考えれば、NO の酸化物であるNO⁺との反応性を利用するのではなく、NO そのものの反応性を利用した蛍光プローブが有用である。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、酸素分圧の影響を受けず、NO 自体の反応性によって発蛍光検出を可能にする新規蛍光プローブの開発を目的とする。これにより体内環境を考慮した実態に近いNO 測定が可能になる。

3. 研究の方法

(1) NO と選択的に直接反応するニトロシルニトロキシド(NN)構造は、反応前も反応後もいずれもラジカル構造を持つため(図1)消光作用があると考えられ蛍光プローブに用いられてこなかった。しかし、ラジカルの置換位置により消光作用が影響を受けることが我々や他のグループの同様の研究結果から判明した。ラジカル官能基と蛍光団の距離・配向を制御すれば、ラジカル存在下でも十分な消光解除効果を得て、NO 検出を行えると着想した。(図2)

(2) NN 構造を蛍光団の種々の置換位置に導入し、性能を比較する必要があるため、蛍光団として、合成上取り扱いやすい蛍光団としてクマリン骨格を選択し、クマリン環3位および4位にNN構造を導入した化合物を設計・合成した。合成した化合物について、ESR を用いた化合物のラジカル構造の変化、及び蛍光分光光度計を用いた蛍光強度の変化を、NO との反応前後で比較した。

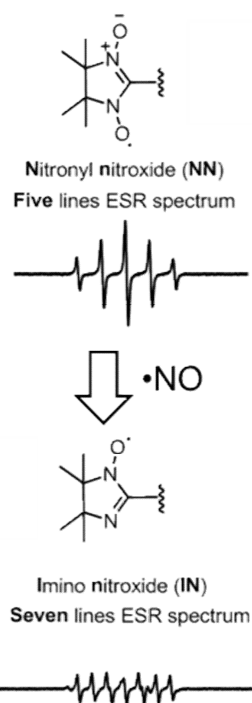


図1 NN 構造とNO の反応によるラジカル構造の変化

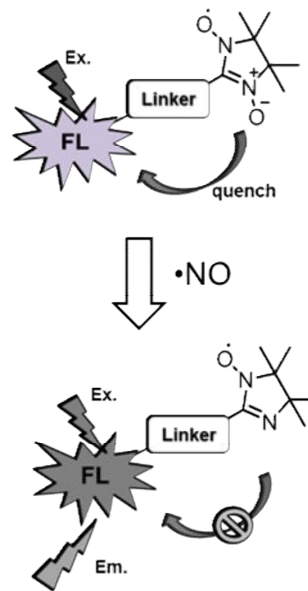


図2 NN 構造とNO の反応性を利用した蛍光検出の原理

4. 研究成果

(1) NN 構造を導入した化合物の1つは蛍光消光が確認され、対応する位置にIN 構造をもつ化合物(化合物 NN-AC6)では蛍光強度上昇(約8.7倍)することが確認された。さらにESR スペクトル測定から、NO との反応によって、NN 構造がイミダゾールニトロキシド(IN)構造に変化したことが示された。これらの結果から、同化合物がNO と反応することで、してIN 構造を有する化合物に変換され、蛍光強度が増加

したことが示された。また、NO との反応をアルゴン雰囲気(嫌気下)で行なったところ、蛍光強度の上昇が同様に観察された。一方、比較のために、汎用される蛍光プローブ DAR-4M を同条件で NO と反応させたところ、好気的な条件では、NN-AC6 の2倍以上の蛍光応答を示したが、嫌気的条件下では、NN-AC6 の6割程度の蛍光上昇に止まり、酸素濃度の影響を大きく受けることが判明した。(図3)

(2) これらの結果から、NN-AC6 は NO そのものと反応する発蛍光性プローブであることが示され、酸素濃度の影響を受けず NO を蛍光検出することができることが示された。

(3) 一方、NN 構造がアスコルビン酸により還元されることが知られていたことから、NN-AC6 をアスコルビン酸存在下に NO と反応させたところ、蛍光上昇は観察されなかった。NN-AC6 とアスコルビン酸を反応させたのち、ESR スペクトルを観察し、NMR で構造を確認したところ、NN 構造が還元された化合物に変換されていることが示された。

(4) アスコルビン酸による還元に対する抵抗性を付与するため、NN-AC6 のメチル基をエチル基に変換した化合物を合成し、アスコルビン酸存在下における NO 検出能を検討したところ、NN-AC6 より NO による蛍光上昇が大きいことが判明したが、アスコルビン酸との反応を完全に抑制することはできなかった。今後、アスコルビン酸との反応性をより抑制する構造展開を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

Yuya Inukai, Naoya Ieda, Mitsuyasu Kawaguchi, Hidehiko Nakagawa, Development of new fluorescent NO probe utilizing the reaction of nitronyl nitroxide, ACS National Meeting, Aug. 21-25, 2016, Philadelphia

犬飼雄哉、家田直弥、川口充康、中川秀彦、クマリン構造を母核としたニトロニルニトロキシド誘導体の合成と一酸化窒素検出能の評価、第47回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2016年11月5-6日、豊橋

[図書] (計0件)

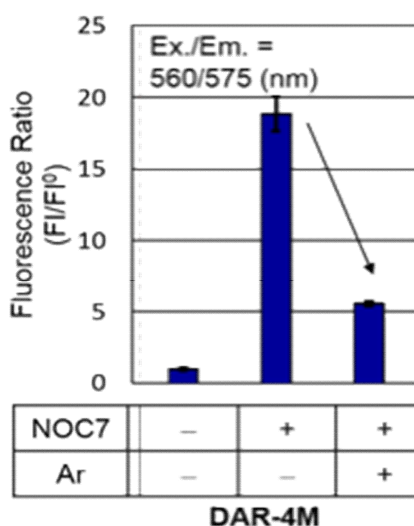
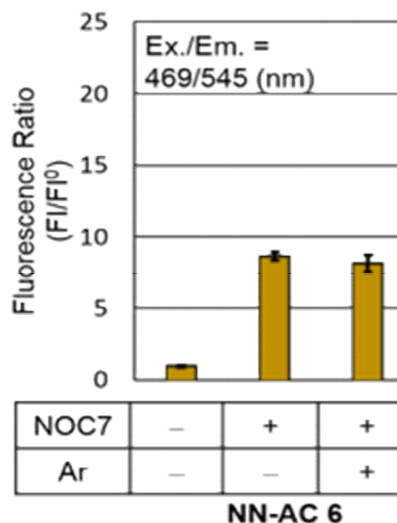


図3 NN-AC6 と DAR-4M による NO の検出および好気的条件下、嫌気的条件下での検出能の比較

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/s oyaku/iyaku/yakka.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 秀彦 (NAKAGAWA, Hidehiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 80281674

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

家田 直弥 (IEDA, Naoya)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号:00642026

川口 充康 (KAWAGUCHI, Mitsuyasu)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号:10735682

(4)研究協力者

犬飼 雄哉 (INUKAI, Yuya)