

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14518

研究課題名（和文）蛍光プローブによる生きたガン細胞での脂肪酸代謝活性解析と阻害剤開発

研究課題名（英文）Evaluation of activity of fatty acid beta oxidation in live cells with a fluorescent probe and its application to drug discovery

研究代表者

内之宮 祥平（Shohei, Uchinomiya）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10770498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生細胞で標的代謝経路の活性をイメージングするための蛍光プローブを開発した。標的としては重要なエネルギー生産経路の1つである脂肪酸酸化を選択し、蛍光団であるクマリンに基質部位である脂肪酸を導入したプローブを設計した。本プローブが生細胞内で脂肪酸酸化を受けてプローブの脂肪酸が分解された後にクマリンを放出することで、脂肪酸酸化活性を生細胞でOff-Onイメージングすることに成功した。さらに、薬剤による外部刺激による脂肪酸酸化活性の変化も蛍光イメージングで検出できること、病態モデルマウスから単離した肝臓の初代培養細胞でも脂肪酸酸化活性を検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝経路の活性は疾病細胞と通常細胞とで大きく異なることから、標的代謝経路の活性を評価可能なツールの開発は疾病メカニズムの解明や創薬に重要である。本研究で開発された蛍光プローブは、重要なエネルギー生産経路である脂肪酸酸化の活性を生細胞で蛍光イメージング可能な世界初のケミカルツールであり、これまでの手法より高分解能かつ簡便に脂肪酸酸化活性を評価可能である。さらに、本プローブは化合物刺激に伴う脂肪酸酸化活性の変化も検出可能であることから、脂肪酸酸化研究や本経路に関連する疾病の新規薬剤開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed a novel fluorescent probe for detection of fatty acid beta oxidation (FAO), an important metabolic pathway for generating energy, in live cells. We designed a fluorogenic probe possessing a fatty acid moiety as a substrate of FAO. We expected the probe to be metabolized by the sequential enzymatic reactions of FAO pathway and release fluorophore, resulting in turn-on imaging of FAO activity in live cells. Using this probe, we successfully achieved the turn-on imaging of FAO activity and FAO activity change upon treatment of drugs in live cultured cells and hepatocytes isolated from mouse.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ 代謝経路活性 脂肪酸酸化 生細胞イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

疾病細胞における代謝は通常細胞とは異なることが知られていることから、これを解明し新しい創薬につなげるための研究が盛んに行われている。例えば、好气的条件においても解糖系に ATP 生産を依存しているという Warburg 効果は、ガン細胞における特異的な代謝の代表例として広く受け入れられている。さらに、疾病の種類によって変化している代謝経路が異なることから、様々な標的代謝経路の活性を検出する手法の開発は疾病ごとの特異的な代謝の理解に必須である。しかし、従来の同位体標識した基質の量を測定する手法では生細胞での解析が困難であり、かつ細胞集団の平均値しか得ることができない。最近の代謝研究では細胞ごとの代謝の違いである代謝不均一性の解明が重要視されていることから、細胞ごとの標的代謝活性の違いを検出する手法の開発が求められている。

一方、蛍光プローブは酵素の活性を生細胞・一細胞レベルで測定することが可能であるため、代謝の観点からの疾病メカニズムの解明や創薬につながると期待出来る。しかし、多様な生体分子を検出するための蛍光プローブが開発されてきたにもかかわらず、これまで代謝経路の活性を検出するための蛍光プローブの開発例はほとんど無いのが現状である。これは、代謝酵素の基質選択性が高く、さらに代謝経路が複数の酵素から構成されているため、代謝経路の活性を検出する蛍光プローブの設計が困難であることが原因と考えられる。そのため、蛍光プローブをはじめとする、代謝経路の活性を検出することが可能な新規ケミカルツールを開発することができれば、疾病における代謝研究に大きく貢献できることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、エネルギー生産経路の1つである脂肪酸β酸化(β酸化)の活性を生細胞で検出可能な蛍光プローブを開発し、代謝経路を検出するケミカルツールの開拓を行うことを目的とする。本プローブを開発することで、刺激に伴うβ酸化活性の変化を一細胞レベルで追跡することや、疾病モデルでのβ酸化活性変化の検出を目指す。さらに、本プローブを用いて生細胞でのβ酸化の活性を変化させる新規化合物探索への展開も目指した。

### 3. 研究の方法

脂肪酸β酸化とは脂肪酸を分解しATP生産に用いられるアセチルCoAやNADH、FADH<sub>2</sub>を生産する経路のことである(図1a)。β酸化は前立腺ガンなどでは解糖系以上のエネルギー生産経路であることが報告されているほか、心筋症や最近重要な健康問題となっている非アルコール性脂肪肝炎(NASH)と深く関連することも報告されている。β酸化のメカニズムは、まず脂肪酸がカルニチンシャトルを通じてミトコンドリア内に輸送される。続いて、酸化・水和・酸化の各反応を経た後、脂肪酸がβ位で開裂することで脂肪酸が2炭素短くなりアセチルCoAが放出される(図1b)。短くなった脂肪酸はさらに同様のメカニズムで2炭素ずつ短くなり、最終的に全ての炭素がアセチルCoAとなる。

これを踏まえ、β酸化を検出するための蛍光プローブとして図2の戦略を考案した。本プローブは蛍光団のヒドロキシ基に奇数の脂肪酸を導入しており、初期状態では蛍光がOff状態となっている。プローブがβ酸化を受けて脂肪酸が短くなり、最終ステップにおいて酸化・水和反応を受けたものにヘミアセタールを生じる。ヘミアセタールは不安定であるため自発的に分解することで蛍光色素が放出され、蛍光Onとなることを期待した。

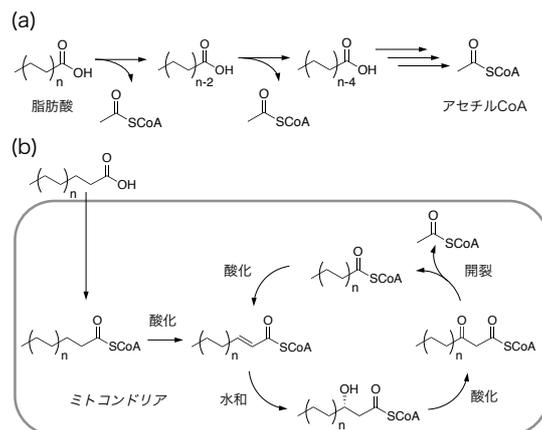


図1. β酸化 (a)一般式 (b)分解メカニズム

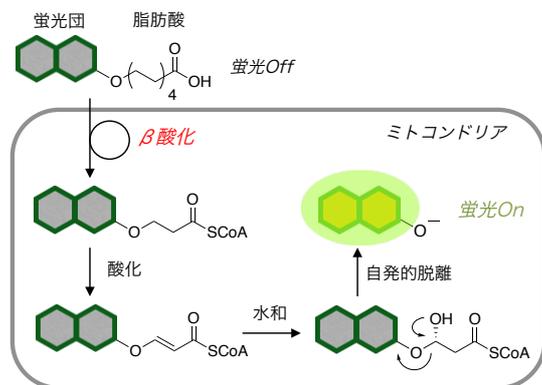


図2. β酸化検出戦略

### 4. 研究成果

本研究では、まずβ酸化の基質となる蛍光色素を探索した。モデル脂肪酸であるノナン酸(炭素数9, C9)にロドール、ナフタルイミド、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリンを導入した3種類のプローブを合成し、これらの細胞内での挙動を追跡した。肝臓ガン由来であるHepG2細胞にプローブを添加し、細胞を破碎後にHPLC/ESI-TOF-MSで解析したところ、ロドール、ナフタルイミドを有するプローブについては構造変化を起こしていないプローブが検出されたことから、β酸化を受けないことが分かった。

一方クマリンを有するプローブの場合は、短くなった脂肪酸(C7, C5)や水和された脂肪酸を有するプローブが検出された。これらのプローブはβ酸化の阻害剤であるエトモキシルを添加した時はピーク強度が大きく減少したことから、クマリンを有するプローブはβ酸化の基質になることが分かった。しかし、このプローブでは長時間インキュベート後も放出されると期待される7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン自体は検出されなかったことから、β酸化が途中で止まることも判明した。そこで、β酸化後にクマリンが放出されるプローブ構造を検討するために、7-ヒドロキシクマリンの3位に様々な置換基を導入したプローブのHepG2細胞内での挙動をHPLC/ESI-TOF-MSで評価した。その結果、3位に*N*-(2-ヒドロキシエチル)カルボキサミド基を導入したプローブ(図3)において、クマリンが放出されることが分かった。さらにクマリンの放出はエトモキシル共存下や炭素数が偶数(C8)のプローブでは確認されなかったことから、プローブがβ酸化を受けて想定している機構でクマリンが放出されたと考えられる。

続いて、β酸化活性の生細胞蛍光イメージングを行った(図3)。β酸化を受ける前のプローブは405 nmに吸収を持たないが、β酸化を受けた後のクマリンは405 nm付近に吸収のピークトップを有するため、共焦点レーザー顕微鏡での検出が可能となる。HepG2細胞にプローブを添加して共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、クマリン蛍光が細胞内から検出された。一方この蛍光はエトモキシル共存下や末端カルボン酸を有さない脂肪鎖のみのプローブでは検出されなかったことから、β酸化活性の生細胞蛍光イメージングに成功したと言える。A549、HeLa、LNCaP細胞株など他のガン由来の細胞でも同様の傾向が見られたことから、様々な細胞でのβ酸化活性の検出が可能であることが分かった。また、細胞から検出されるクマリン蛍光は、β酸化を活性化させることが知られている化合物(Wy14643、AICAR)を添加した時は上昇し、β酸化の阻害剤(ranolazine)を添加した時は減少することも分かり、本プローブによって外部刺激に伴うβ酸化活性の変化を追跡可能であることも見出した。

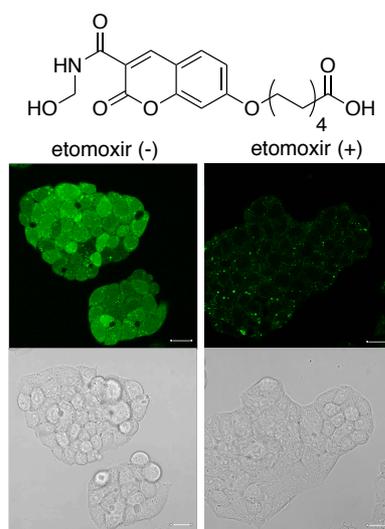


図3. β酸化の生細胞イメージング

最後に、疾病モデルでのβ酸化活性の変化を追跡可能かを検討した。β酸化は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の進行と深く関連していることが分かっている。そこで、NASHモデルマウスを作成し、単離した肝臓の初代培養細胞でのβ酸化活性のイメージングを検討した。まず健康マウス肝臓の初代培養細胞でβ酸化活性が検出可能であることを、蛍光イメージングとHPLCによって確かめた。続いてNASHモデルマウス肝臓の初代培養細胞にプローブを添加したところ、健康マウスの細胞と比較してクマリン蛍光強度が大きく減少することが分かった。一方、NASH症状を改善すると報告されているbezafibrate(β酸化の活性化剤)を経口投与したNASHモデルマウスの肝臓細胞では、クマリン蛍光が健康マウス細胞の場合と比較して大きく増加することが分かった。本プローブを用いて疾病モデルの初代培養細胞でもβ酸化活性の変化を追跡可能であることが分かった。なお、これらの蛍光変化は、肝臓スライスのHE染色による脂肪滴の増減とよく相関が見られた。

以上より、本研究によってβ酸化経路の活性を生細胞で検出可能な新規蛍光プローブの開発に成功した。本プローブはβ酸化経路にとどまらず、ある特定の代謝経路全体の活性を生細胞で検出可能な初めての蛍光プローブである。これらの成果は論文として投稿しており、現在リバイス実験を行っている。

また、本プローブを用いたβ酸化活性の蛍光イメージングは共焦点レーザー顕微鏡のほか蛍光顕微鏡でも可能であり、薬剤刺激に伴うクマリン蛍光強度の変化も検出可能であった。そこで、蛍光イメージングを利用したハイスループットスクリーニングによる、β酸化活性を変化させる新規化合物探索を行う系も構築し、化合物ライブラリーからのスクリーニングを開始した。今後、β酸化活性を変化させる新規薬剤の発見と、それを利用した脂肪酸β酸化が関連する疾病に対する新しい創薬への展開を目指す。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. N. Kurashige, H. Fuchida, S. Tabata, S. Uchinomiya, A. Ojida, Discovery of highly reactive peptide tag by ELISA-type screening for specific cysteine conjugation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 3486-3489 (2017). DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.05.069. 査読あり
2. N. Delsuc, S. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, A host-guest system based on collagen-like triple-helix hybridization, *Chemical Communications*, 53, 6856-6859 (2017).

DOI:10.1039/c7cc03055J. 査読あり

3. Yousuke Takaoka, Shohei Uchinomiya, Daichi Kobayashi, Masataka Endo, Takahiro Hayashi, Yoshiaki Fukuyama, Haruko Hayasaka, Masayuki Miyasaka, Takumi Ueda, Ichio Shimada, Itaru Hamachi. "Endogenous membrane receptors labeling by reactive cytokines/growth factors to chase their dynamics in live cells". Chem, 4, 1451-1464(2018). DOI: 10.1016/j.chempr.2018.03.021. 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 内之宮祥平、川越亮介、中村範章、王子田彰夫、脂肪酸 $\beta$ 酸化を検出するための基質型蛍光プローブの開発、第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年9月
2. 中村範章、内之宮祥平、王子田彰夫、カルボン酸の自発的脱離反応を利用した蛍光センシングシステムの開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月
3. Shohei Uchinomiya, Ryosuke Kawagoe, Mark Weber, Mari Sakamoto, Akio Ojida, Development of a fluorescent probe for live-cell imaging of fatty acid beta oxidation, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月
4. 中村範章, 内之宮祥平, 王子田彰夫, カルボン酸の分子内環化反応を利用した蛍光センシングシステムの開発と酵素反応検出への応用, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月
5. Shohei Uchinomiya, Ryosuke Kawagoe, Weber Mark, Mari Sakamoto, Akio Ojida. Development of a fluorescent probe for live-cell imaging of fatty acid beta oxidation. 日本化学会第 98 回春季年会、2018 年 3 月
6. 内之宮祥平、川越亮介、Weber Mark、坂本茉莉、王子田彰夫、蛍光小分子プローブによる脂肪酸 $\beta$ 酸化の生細胞イメージング、日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会. 2018 年 6 月
7. Mark Weber, Ryosuke Kawagoe, Mari Sakamoto, Shohei Uchinomiya, Akio Ojida, Development of Activity-based Probes for Proteomic Analysis in Fatty Acid Beta Oxidation-Activated Cells., 第 55 回化学関連支部合同九州大会, 2018 年 6 月
8. 坂本茉莉、川越亮介、Weber Mark、内之宮祥平、王子田彰夫、細胞内での $\beta$ 酸化検出を目指した蛍光プローブの開発、第 55 回化学関連支部合同九州大会、2018 年 6 月
9. 内之宮祥平、川越亮介、Weber Mark、坂本茉莉、鴨田光一郎、王子田彰夫、蛍光小分子による脂肪酸 $\beta$ 酸化の 1 細胞イメージング、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年 9 月
10. ウェーバー マーク、川越亮介、内之宮祥平、王子田彰夫、脂肪酸 $\beta$ 酸化の機能解析を行うためのケミカルツールの開発、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年 9 月
11. 内之宮祥平、松永直哉、坂本茉莉、Weber Mark、鴨田光一郎・大戸茂弘、王子田彰夫、代謝検出蛍光プローブの開発 (1) 脂肪酸 $\beta$ 酸化の生細胞蛍光イメージング、日本化学会第 99 春季年会, 2019 年 3 月
12. 坂本茉莉、川越亮介、Weber Mark、鴨田光一郎、内之宮祥平、王子田彰夫、代謝検出蛍光プローブの開発 (2) 代謝中間体の分子内環化反応を利用した $\beta$ 酸化のイメージング、日本化学会第 99 春季年会、2019 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔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://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。