

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14331

研究課題名(和文)細胞内外で高感度・経時測定可能な過酸化水素イメージングの開発

研究課題名(英文)Highly sensitive and continuous hydrogen peroxide imaging inside and outside of cells

研究代表者

伊藤 栄紘(Ito, Hidehiro)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70707918

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本申請研究では、リン光性色素を利用した細胞外および細胞内の過酸化水素プローブを開発し、細胞実験への利用を目指した。細胞外過酸化水素プローブとして、カタラーゼを固定化した白金ポルフィリン含有ポリスチレンビーズを開発し、培地中の過酸化水素濃度変化をビーズからの発光量で観察できた。またグルコースオキシダーゼを固定化することで、グルコース濃度も同様に観察できた。細胞内過酸化水素プローブとして、白金ポルフィリン修飾カタラーゼを調製し、過酸化水素濃度応答性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究では、リン光性色素の可逆的な酸素応答性を利用して、酵素反応による酸素の増減を介した新規小分子プローブの開発に取り組んだ。カタラーゼを利用した過酸化水素プローブでは、従来の蛍光性色素プローブでは困難であった過酸化水素の経時的な増減が観察可能となる。さらに、本研究で開発したプローブ技術は、グルコースオキシダーゼを利用することでグルコースプローブとして機能することが明らかとなり、使用する酵素によって様々な低分子プローブとしての応用が示された。

研究成果の概要(英文):In this study, we have developed extracellular and intracellular hydrogen peroxide probes using phosphorescent dyes. As an extracellular hydrogen peroxide probe, the catalase immobilized platinum porphyrin-containing Polystyrene beads were developed. Phosphorescence intensity from the beads changes in the concentration of hydrogen peroxide in the medium. The glucose oxidase immobilized platinum porphyrin-containing Polystyrene beads could be observed the glucose concentration as well. As an intracellular hydrogen peroxide probe, platinum porphyrin-modified catalase was prepared and could be observed the hydrogen peroxide concentration.

研究分野：生物無機化学

キーワード：過酸化水素 イメージング リン光色素 グルコース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

過酸化水素は、生体内で産生され様々な生体分子に酸化障害を与える活性酸素種の一つである。しかし、過酸化水素が細胞の成長や分化、移動などを促すシグナル伝達物質として働くことが近年新たに見出され、生命活動の重要な因子として注目されている (Rhee, *Science*, 2006)。例えば、膜タンパク質 NADPH oxidase (Nox) は、副生成物ではなく真の産生物質として、過酸化水素の基となる活性酸素種を積極的に産生しており、生命活動に不可欠な過酸化水素のシグナル伝達に関連すると考えられている。しかしながら、生体内の過酸化水素動態は未だに不明な点が多く、その役割が未解明のままとなっている。これは、過酸化水素の局所濃度や経時的な濃度変化を可視化する良いプローブが無かったためである。すなわち、生体内過酸化水素の機能解明に必要な不可欠な、細胞内および細胞外過酸化水素の優れたプローブ開発が急務である。

過酸化水素の検出手法で広く用いられているのは、過酸化水素と蛍光物質や金属イオンとの化学反応を利用したプローブである。代表的なものに、過酸化水素による酸化反応で蛍光性を示すフルオレセイン誘導体 (Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993) や、過酸化水素で酸化された鉄イオンと錯形成して呈色する色素がある。しかし、既存の過酸化水素プローブの課題として、1) 過酸化水素の選択性が低い、2) 過酸化水素との反応が遅い、3) 不可逆的な化学反応のため経時的な過酸化水素増減の測定が困難である、4) 細胞内と細胞外の過酸化水素濃度を同時測定できない、などが挙げられる。したがって、これらの問題を解決する新たな過酸化水素プローブが強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、過酸化水素生体内動態解明のために、高選択性・高感度・経時測定を可能とする過酸化水素プローブによる細胞内および細胞外過酸化水素イメージングシステムを開発することである。本研究では既存のプローブとは異なり、観察対象となる過酸化水素自身ではなく、カタラーゼによる過酸化水素分解産物の酸素に着目した。申請者らが先行研究で開発したリン光寿命測定共焦点顕微鏡による酸素濃度イメージングは、1細胞内の酸素濃度分布画像を高分解能かつ経時的に得られる (Ito, *Kamachi, Sci. rep.*, 2015)。このシステムにカタラーゼを組み合わせることで、過酸化水素の濃度を酸素濃度イメージングによって表すことができる。本研究の過酸化水素プローブは過酸化水素の増加だけでなく減少も観察可能である。また、培地中にカタラーゼ固定化リン光性色素ビーズを共存させることで、同じ顕微鏡下で細胞内外の過酸化水素濃度変化の同時観察が可能となる。

## 3. 研究の方法

申請者らが先行研究で開発したリン光寿命測定共焦点顕微鏡による酸素濃度イメージングは、酸素分子による色素のリン光強度および寿命の増減を共焦点レーザー顕微鏡で測定・解析することで高速・高感度・高分解能の酸素濃度イメージングが可能である。特にリン光寿命の増減は酸素濃度のみ依存するため、色素分子やレーザー強度が不均一な生体成分内でも精度良く酸素濃度イメージングが達成できた。さらに、培養液中の酸素濃度イメージングのために細胞サイズのリン光性色素含有ビーズを開発し、細胞内外酸素濃度の同時イメージングにも成功している。本研究では、このリン光寿命測定共焦点顕微鏡による酸素濃度イメージングを利用して、細胞内外の過酸化水素イメージン

グを可能とする手法を開発する。過酸化水素分解酵素であるカタラーゼは、高速かつ選択的に過酸化水素を酸素分子と水分子に分解する。すなわち、過酸化水素存在下のカタラーゼ近傍は局所的に酸素濃度が増加する。この時カタラーゼの極近傍にリン光性色素が存在していれば、発生した酸素分子によってリン光強度および寿命が変化する。このカタラーゼの過酸化水素分解による局所的な酸素濃度増加現象を酸素濃度イメージングで観察することで、過酸化水素の高感度・経時測定可能なイメージングが達成される。

細胞外過酸化水素プローブとして、リン光性色素を内包した細胞サイズの酸素センシングビーズに過酸化水素分解酵素カタラーゼを固定化したものを調製する。リン光性色素含有ビーズは、色素に白金ポルフィリン PtOEP、ビーズ本体には片側末端がカルボン酸のポリスチレンを用いて、液中乾燥法で直径 10  $\mu\text{m}$  程度の均一なビーズを形成する。調製した酸素センシングビーズ表面にカチオン性ポリマー (poly-L-lysine) を修飾させ、牛肝臓由来カタラーゼをポリマーとの静電的相互作用で固定化する。さらに、固定化する酵素をグルコースオキシダーゼとすることで、細胞外グルコースプローブを調製する。これらのプローブを 96well プレート中の緩衝液に分散させて、蛍光顕微鏡により観察する。この溶液に過酸化水素またはグルコースを添加することで、ビーズからの発光量の変化を観察し、目的のプローブとしての機能を評価する。

細胞内過酸化水素プローブとして、リン光性色素である白金ポルフィリン PtTCPP を化学修飾したカタラーゼを調製する。PtTCPP は、細胞内酸素濃度イメージングで用いる色素である。PtTCPP の末端カルボン酸をカタラーゼ表面のアミノ基に結合させる。さらに、生体適合性向上のためポリエチレングリコールを修飾したカタラーゼにも同様に PtTCPP を修飾させる。リン光色素を修飾したこれらのカタラーゼをカラムクロマトグラフで精製し、細胞内過酸化水素プローブとする。

#### 4. 研究成果

調製した細胞外過酸化水素プローブを蛍光顕微鏡で観察したところ、直径が 10-20  $\mu\text{m}$  のビーズから白金ポルフィリン由来の発光が観察された。このプローブを含む緩衝溶液に過酸化水素を所定濃度添加したところ、ビーズからの発光が減少し、およそ 1 分後に一定の発光強度になった (図 1)。この時の発光強度の減少値は、溶液中の過酸化水素

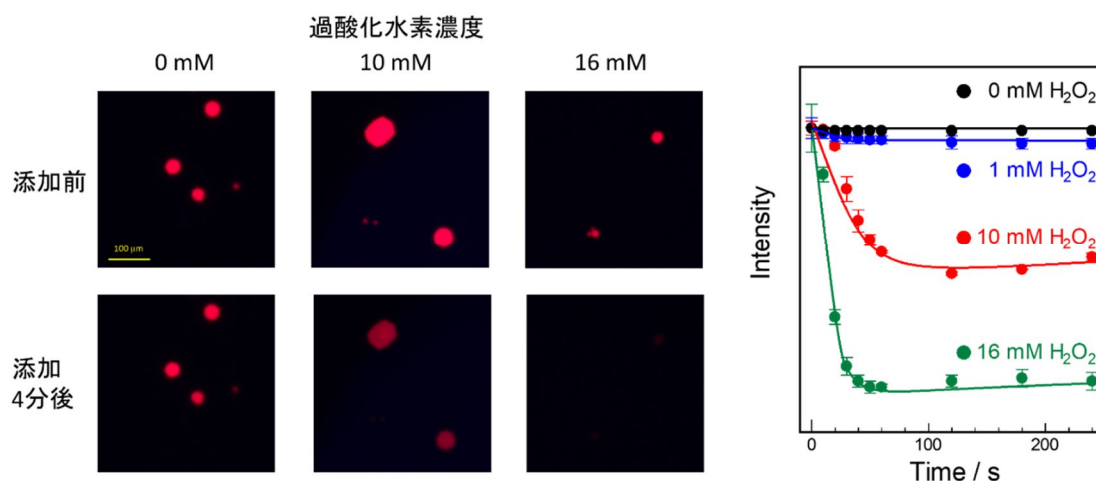


図 1. 細胞外過酸化水素プローブへの過酸化水素添加実験

左：過酸化水素添加前後の蛍光顕微鏡画像、右：蛍光強度の経時変化

濃度に応答した。カタラーゼは過酸化水素を分解する反応を触媒し、その副産物として

酸素が発生する。発生した酸素によって白金ポルフィリンの発光が減少するため、この実験結果は想定通りである。コントロールとして過酸化水素不含溶液を添加した場合は、ビーズからの発光は変化しなかった。また、カタラーゼを固定化していない状態のビーズも過酸化水素添加による発光の反歌は観察されなかった。以上の結果から、溶液中の過酸化水素濃度を蛍光顕微鏡による観察で測定できる細胞外過酸化水素プローブが開発できたと言える。

細胞外過酸化水素プローブで使ったビーズに、カタラーゼの代わりにグルコースオキシダーゼを固定化したグルコースプローブを開発した。グルコースオキシダーゼは、グルコースと酸素からグルコン酸を生成する反応を触媒する。そのため、グルコース添加により酵素周辺の酸素濃度が減少し、白金ポルフィリンの発光は増加すると考えられる。このグルコースプローブを含む溶液にグルコースを添加したところ、時間経過とともにビーズからの発光強度が増加した(図2)。したがって、溶液中のグルコース濃度を蛍光顕微鏡で間接的なグルコースプローブを開発できたと言える。これらの低分子プローブの研究成果は2019年11月7日に特許として出願した(リン光性色素分子を内包する酵素固定化ビーズ、特願2019-202000)。

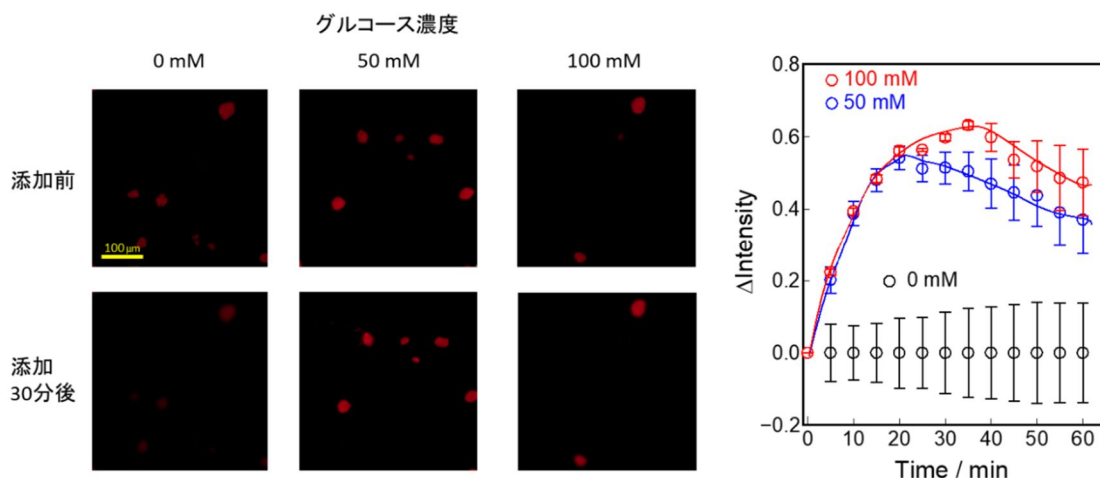


図2. 細胞外グルコースプローブへのグルコース添加実験

左: グルコース添加前後の蛍光顕微鏡画像、右: 蛍光強度の経時変化

調製した細胞内過酸化水素プローブからは、修飾した白金ポルフィリン由来の吸収・発光スペクトルが観察された。この細胞内過酸化水素プローブを含む溶液に過酸化水素を添加すると、白金ポルフィリン由来の発光が減少した。この結果は、細胞内過酸化水素プローブと同様にカタラーゼによる過酸化水素分解で生じた酸素によるものである。したがって、細胞内過酸化水素プローブを細胞内に取り込ませることができれば、目的とする過酸化水素濃度の顕微鏡観察が可能となるであろう。

以上の研究結果から、目的とする細胞内外の過酸化水素プローブの開発を達成した。さらに使用する酵素の種類を変えることで、様々な低分子プローブとしての活用への展望が示された。今後これらの低分子プローブを利用して、細胞実験における標的分子の動態が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Odai Shunsuke, Ito Hidehiro, Kamachi Toshiaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Dendrimer porphyrins as the oxygen sensor for intracellular imaging to suppress interaction towards biological molecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 178 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.19-13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hidehiro Ito, Shunsuke Odai, Toshiaki Kamachi
2. 発表標題 Hydrogen peroxide imaging using polystyrene beads containing platinum porphyrin
3. 学会等名 日本化学会第99春期年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidehiro Ito, Kazuma Maeda, Shunsuke Odai, Toshiaki Kamachi
2. 発表標題 Intracellular oxygen concentration change related to mitochondrial respiratory chain in 3T3-L1 adipocyte
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉家 怜央、松崎 真衣、伊藤 栄紘、蒲池 利章
2. 発表標題 A549細胞における低酸素環境下でのCOX4タンパク質の発現と細胞内酸素濃度イメージング
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 栄紘、前田 和真、蒲池 利章
2. 発表標題 寿命イメージング測定を用いた3T3-L1脂肪細胞の脂肪滴と細胞内酸素濃度の同時観察
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内 杏里彩、尾台 俊亮、伊藤 栄紘、岡本 昌樹、蒲池 利章
2. 発表標題 白金ポルフィリン修飾メソポーラスシリカナノ粒子を用いた細胞内酸素濃度イメージング
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 リン光性色素分子を内包する酵素固定化ビーズ	発明者 伊藤栄紘、蒲池利章	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-202000	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----