

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月8日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790050
研究課題名（和文） 生体電子伝達体をプローブとするミトコンドリア機能可視化法の開発
研究課題名（英文） Development of functional mitochondrial imaging using electron mediator
研究代表者 兵藤 文紀（HYODO FUMINORI） 九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授 研究者番号：10380693

研究成果の概要（和文）：

生物の恒常性維持にレドックス状態（酸化と還元）が重要であることが知られている。ミトコンドリアは活性酸素種産生の場合であると同時に体のエネルギー産生の中樞を担う細胞小器官（オルガネラ）である。ATPはミトコンドリア電子伝達系で様々なレドックス反応を介して産生される。本研究では電子伝達系呼吸鎖Ⅲへの電子の授受に重要な役割を果たすユビキノン(CoQ: Coenzyme Q)のOMRIを用いた可視化の可能性を検討した。本研究においてCoQのラジカル中間体であるユビセミキノン(CoQH)の形成に成功し、さらにCoQ特異的なEPR照射磁場におけるOMRI計測において、CoQHの可視化に成功した。本研究成果によりCoQをOMRIのプローブとして生体応用できる可能性が示唆され、さらにミトコンドリア機能の非侵襲可視化への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Regulation of tissue redox status is an important to maintain normal physiological conditions in the living body. Breakdown of redox homeostasis may lead to oxidative stress and can induce many pathological conditions such as neurological disorders, inflammation, cancer, and ageing. Our energy production system in mitochondria produces ATP during various redox reaction using endogenous molecules such as ubiquinone (CoQ) and FAD. Overhauser-MRI (OMRI) enables visualization of tissue redox status in animals based on dynamic nuclear polarization (DNP) using radical probes such as nitroxyl radicals and trityl radical non-invasively. We have developed home-made OMRI systems and more recently constructed high field OMRI system using circularly transporting system of a sample for high-sensitive and redox analysis based on anatomical structure by MRI. In this report, we demonstrate capability of visualization of ubiquinone using OMRI systems for monitoring mitochondrial function non-invasively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イメージング、レドックス、ミトコンドリア、電子伝達体

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア電子伝達系ではユビキノン(CoQ/CoQH₂)やフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD/FADH₂)、ニコチンアミドアデ

ニンジヌクレオチド(NAD⁺/NADH)などの電子伝達体がレドックスサイクル(酸化還元サイクル)により電子の授受を行い生体内のエネルギー産生を担っている。そのエネルギ

一代謝の副産物として活性酸素種が放出されるなどミトコンドリアは最もレドックス反応が活発な場（オルガネラ）である。ミトコンドリアは細胞内外の環境の変化に感受性が高く鋭敏に機能が変動することが知られており、DNAの変異が原因とされるミトコンドリア病、がん、認知症、パーキンソン病、気分障害、糖尿病、脂肪性肝疾患、骨粗鬆症や生活習慣病など多くの疾患でミトコンドリア機能障害が密接に関与することが明らかとなってきた [Lancet Neurol 9(28) 2010, Nat Rev Neurol 6(6) 2010, Nat Rev Drug Discov 9(6) 2010]。従ってミトコンドリア機能変化を個体レベルで可視化/評価することができれば多くのミトコンドリア関連疾患において病態メカニズム解明や治療効果の診断に有用であると考えられる。

ミトコンドリアを可視化する方法としては、膜内外の電位差、pH、抗原抗体反応、ミトコンドリア RNA の標識 [Nature Methods 4 413-9 2007] など様々な原理を利用した蛍光プローブが開発されている。蛍光・発光を検出原理とする場合、高感度・高解像度な画像解析が可能であることから *in vitro* の系によるメカニズム解明に有用である。しかし用いる波長の体内低透過性（最大数 mm）の問題から *in vivo* に応用した場合、主に検出部位が表層のみに限定されるという課題がある。一方、電子スピン共鳴装置（ESR）や MRI などの磁気共鳴法を利用した画像化法は、蛍光法に比べ感度は低いが低周波数帯域（100~1000 MHz）を励起パルスとして用いるので生体透過性（30~2cm）が高く個体（マウス~ヒトまで）をそのまま可視化できる。OMRI は動的核偏極（DNP: Dynamic Nuclear Polarization）を利用し、目的の EPR 磁場で電子スピンを励起することにより、結果的に電子スピン近傍の核スピンのエネルギーを増幅させ、フリーラジカルの情報を高感度に得ることができイメージング装置である。フリーラジカルの情報は EPR ON と OFF の画像より抽出することが可能である。

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリアの電子伝達体である CoQ に着目し、CoQ の OMRI における可視化について検討した。CoQ はミトコンドリア呼吸鎖 I ~ III において Q サイクルと呼ばれる電子の授受に関わる分子である。CoQ はミトコンドリア機能の保持に深く関

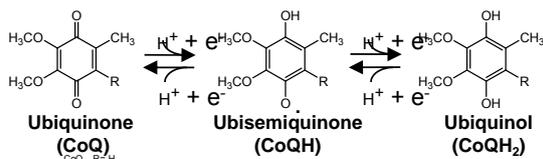


図1. ユビキノンの酸化還元反応

与することが知られており、細胞内のミトコンドリア機能の改善、抗酸化効果、抗アルドステロン効果が期待され心機能補助薬として用いられている。また Q サイクルの過程で CoQ はフリーラジカル中間体（CoQH）を形成することが知られている（図 1）。

従ってこのミトコンドリア電子伝達体である CoQ を OMRI の生体プローブとして活用できれば、ミトコンドリアの状態/機能を直接可視化することが可能であることが推定される。以上から本研究では CoQ を生体プローブとするミトコンドリア機能の *in vivo* 可視化法の開発を目的とした

3. 研究の方法

(1) 本研究では九州大学薬学研究院内海研究室にて独自に開発された、Home-made Overhauser-MRI (OMRI : 図 2) システムを用いた。



図2 Home-made OMRI system

(2) CoQ として本研究では CoQ₁₀ と同様の活性中心（ベンゾキノン誘導体部位）を持つ CoQ₀ を使用した。CoQ₀ は水に可溶であるためプローブとして投与する場合に有効である。CoQ₀ を種々のアルカリ条件下でラジカル中間体の生成の有無を検討した。

(3) 生成した CoQ₀ 溶液について OMRI の 1D シーケンスである DNP スペクトルを取得し、可視化のための最適な EPR 照射磁場を求めた。

(4) 前項で得られた EPR 照射磁場において CoQ₀H を含むファントムを作成し OMRI による可視化を検討した。

4. 研究成果

(1) 図 3 にアルカリ性条件で得られた CoQ₀H の電子スピン共鳴 (EPR) スペクトルを示す。CoQ₀ は NaOH の添加により速やか

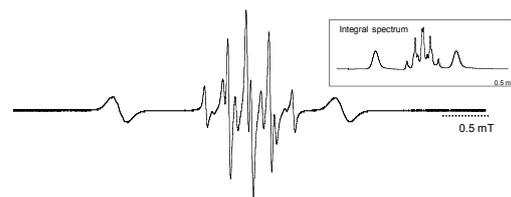


図3 ユビセキノンのEPRスペクトル

にラジカル中間体へと変換された。また CoQ_0H は CoQ_0 の濃度依存的に生成されることが明らかとなった (図4上)。

(2) 次に CoQ_0H 生成の pH 依存性を確認するため、種々の濃度の NaOH を加え EPR にてラジカル生成を検討した (図4下)。その結果 CoQ_0H は pH11.8 で最も効率よく CoQ より生成されることが明らかとなった。

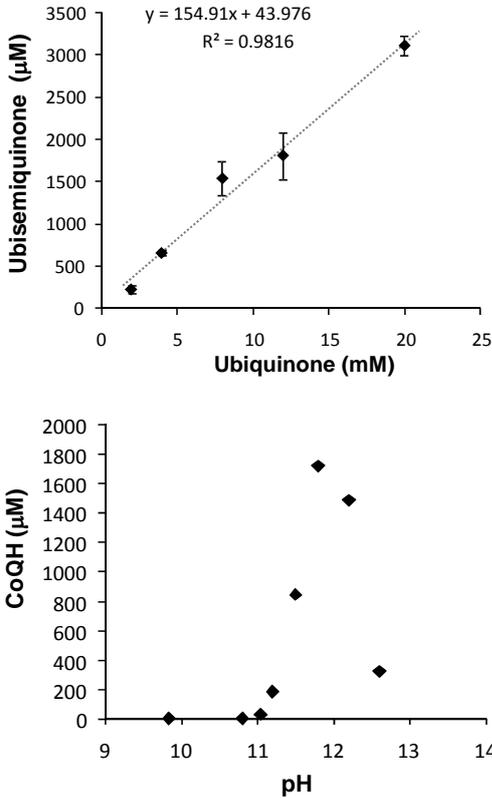


図4 ユビセキキンの濃度依存的生成とpH依存性

(3) CoQ を生体応用するためには中性条件下でのラジカル生成が必要である。そこで生体内で電子供与体 (エレクトロドナー) として働く NADH に着目し CoQ_0H の生成を検討した。その結果図5に示す用に単独では EPR スペクトルにラジカル生成は観測されないが、 CoQ_0 と NADH を混合することで CoQ_0H を効率的に生成できることを明らかにした。

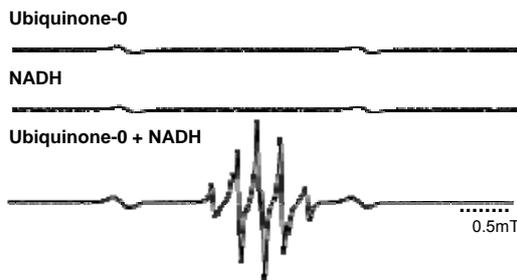


図5 中性条件下でのユビセキキン生成

(4) OMRI での EPR 照射磁場を検討するために生成した CoQ_0H の DNP スペクトルを調べた。(図6) その結果 CoQ_0H のセンターピークの中心磁場は 7.8876mT であることが明らかとなった。

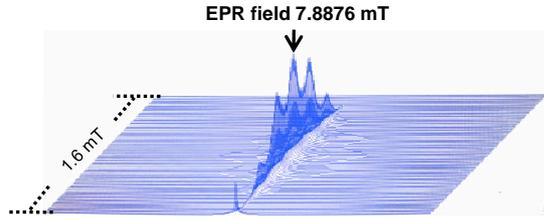


図6 OMRIによるユビセキキンのDNPスペクトル

次に OMRI での可視化を検討するため 1mM~8mM までの CoQ_0 溶液を含むファントムを作成し、 CoQ_0H の中心磁場で EPR 照射を行った。その結果図7に示す用に EPR 照射可で明瞭な CoQ_0H 画像を得ることができた。またその画像強度は CoQ_0 の濃度依存的に上昇した。以上の結果より OMRI を用いることで CoQ_0 由来のラジカルを可視化することができることを示した。

CoQ はミトコンドリア電子伝達系においてレドックス反応を担う重要な分子であり、本研究により OMRI で可視化できることが示されたことから今後 CoQ を生体プローブとすることで疾患でのミトコンドリア機能の可視化への展開が期待される。

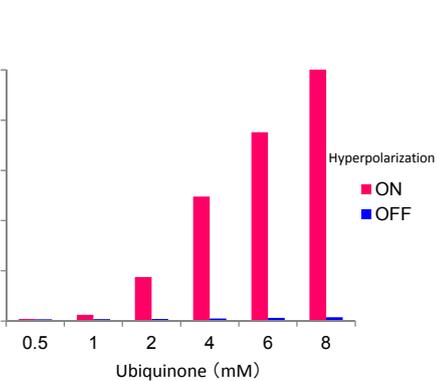
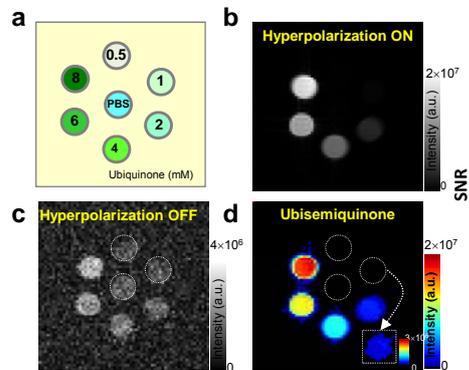


図7 ユビキノンのOMRIを用いた可視化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) **Hyodo F**, Davis RM, Hyodo E, Matsumoto S, Krishna MC, Mitchell JB. The relationship between tissue oxygenation and redox status using magnetic resonance imaging Int J Oncol. 2012 Sep 24. doi: 10.3892/ijco.2012.1638.
- (2) Benial M, Dhas K, Ichikawa K, Yamada KI, **Hyodo F**, Jawahar A Utsumi H: Permeability Studies of Redox-Sensitive Nitroxyl Spin Probes Through Lipid Membranes Using an L-Band ESR Spectrometer Appl Magn Reson In press 2012. doi 10.1007/s00723-012-0383-0
- (3) Kosem N, Naganuma T, Ichikawa K, Phumala Morales N, Yasukawa K, **Hyodo F**, Yamada KI, Utsumi H. Whole-body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI. Free Radic Biol Med. 2012 Free Radic Biol Med. 2012 Jul 15;53(2):328-36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.026.

[学会発表] (計 3 件)

- ① **Fuminori Hyodo** "Non-invasive analysis of redox status and antioxidant efficacy using Overhauser - MRI" Oxidative stress in Congenital and Acquired Hemolytic Anemia, Thaikand, March 22-23 2012
- ② **兵藤文紀** 酸化ストレス疾患解明のための生態レドックスイメージング法の開発 第 51 回日本生体医工学会大会 2012 年 5 月 福岡
- ③ **兵藤文紀** 磁気共鳴イメージング法を用いたレドックス疾患の解析と抗酸化物質の評価 第 51 回電子スピンスサイエンス学会年会 2012 年 11 月 北海道

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Method for detecting endogenous biomolecule

発明者 : Hideo Utsumi, Kazuhiro Ichikawa, Fuminori Hyodo

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : WO2011/052760

出願年月日 : 2011 年

国内外の別 : 国外

[その他]

ホームページ等

<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group7/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

兵藤 文紀 (HYODO FUMINORI)

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授 レドックスイメージング

グループ・グループ長

研究者番号 : 10380693