

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659020

研究課題名(和文) 環境・脂質ラジカル応答型蛍光化合物の開発と評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of fluorescence probe response to environment and lipid derived radicals

研究代表者

山田 健一 (Yamada, Kenichi)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60346806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種により生じる脂質ラジカルは、脂質過酸化反応に寄与し細胞損傷を引き起こす。さらに、脂質過酸化反応の最終生成物が変異原性を持つことが報告されていることから、脂質ラジカルの検出手法の開発は重要である。しかしながら、その高感度検出手法は未だ確立されていない。我々は、安定有機ラジカルであるニトロキシドの反応性制御を目的に、ピペリジン系ニトロキシドのラジカル近傍に置換基を導入可能な合成法開発を行ってきた。そこで本研究では、蛍光団とニトロキシドの相互作用を利用し、脂溶性環境下で脂質ラジカルを検出できる新規プローブの開発を目的とした。

研究成果の概要(英文)：Lipid derived radicals generated by reactive oxygen species produce the lipid peroxidation resulting in cell damage. Moreover the end products of lipid peroxidation were reported to have mutagenicity. Therefore, to develop the lipid radical detection method is important. However, the detection technique with high sensitive is not yet established. We have been developed the synthetic method to substitute the methyl group of piperidine nitroxides at 2,6-position to give the selectivity. In this study, we aimed to develop and evaluate the fluorescence probe to detect lipid radicals under hydrophobic condition based on interaction between fluorophore and nitroxide.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学

1. 研究開始当初の背景

過酸化脂質は、高血圧や糖尿病など多くの疾患で有意に生成することが報告されている。最近、この過酸化脂質代謝産物とタンパク質との複合体が、がんや炎症反応を誘導し、さらにその抑制により疾患の発症を抑えることが明らかにされた。すなわち、この反応基点となる脂質ラジカル中間体を検出・抑制できれば、酸化ストレス疾患発症のメカニズム解明やその治療薬の開発に大いに貢献できる。しかし、これまで脂質ラジカルを直接検出する手法はなく、その酸化体である過酸化脂質の、さらに代謝産物の検出・定量が行われてきた。

一方我々は、最近、脂質ラジカルと鋭敏に反応する新規有機スピン化合物を開発した。さらに、この化合物は、炭素中心ラジカルと“ラジカル - ラジカル共有結合”する。

2. 研究の目的

以上の研究背景のもと、「培養細胞や実験動物モデルに適した脂質ラジカル検出蛍光分子を開発すること」を目的とし、以下3点を達成目標とする。

環境応答性蛍光団を利用した蛍光有機スピン化合物の開発

モデル系での脂質ラジカルの同定・評価
培養細胞、あるいは実験動物を用いた評価・検証

3. 研究の方法

環境応答性蛍光団を利用した蛍光有機スピン化合物の開発
様々な蛍光原子団を有するニトロキシド誘導体を合成し、それらの光物性の測定を行った。続いて電子移動による消光過程を考慮し、それぞれの酸化還元電位を測定した。Rehm-Weller の式より電子移動におけるギブズエネルギー変化量を算出し、消光作用の度合いとの関係性の検討を行った。さらに実際に消光過程においてどのような中間体が生成されているか、時間分解分光法による検出を行った。

モデル系での脂質ラジカルの同定・評価
不飽和脂肪酸、蛍光ニトロキシド、およびリ

ポキシゲナーゼを混和し、一定時間後、蛍光スペクトルを測定した。

培養細胞、あるいは実験動物を用いた評価・検証

培養細胞にアラキドン酸、および蛍光ニトロキシドを加え、37℃でインキュベートした。細胞を固定後、測定した。蛍光強度は単位細胞当たりの強度平均値として算出した。

4. 研究成果

環境応答性蛍光団を利用した蛍光有機スピン化合物の開発

今回合成した蛍光ニトロキシドは、結合させた蛍光原子団によって消光作用の度合いが大きく変化した。また、酸化還元電位の結果から、蛍光原子団の HOMO-LUMO 準位間にニトロキシドに由来する分子軌道が存在し、熱力学的にも電子移動は起こり得ることが分かった。さらに得られた結果をもとに Rehm-Weller の式を用いて電子移動におけるギブズエネルギー変化量を算出したところ、ニトロキシドの消光作用との間により相関が得られた。さらに、特に消光作用の強かった蛍光ニトロキシドでは電子移動により電荷分離状態が生じることを時間分解分光法にて確認した。

モデル系での脂質ラジカルの同定・評価
脂肪酸・リポキシゲナーゼ系を用いて検討したところ、酵素濃度依存的に蛍光強度が上昇した。さらに LC-MS を用いて構造推定を行ったところ、確かに炭素中心ラジカルが結合していることがわかった。

培養細胞、あるいは実験動物を用いた評価・検証

アラキドン酸は、細胞内のシクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼによって代謝され、プロスタグランジン類やロイコトリエン類を生成する。この過程で、アラキドン酸由来脂質ラジカル中間体が生じ、リン脂質の過酸化反応が進行する。そこで、脂質由来炭素中心ラジカルの発生源としてアラキドン酸を選択した。始めに、アラキドン酸添加により細胞内に脂質由来炭素中心ラジカルが生成するか否か、スピントラップ剤である PBN を用いて検討した。その結果、アラキドン酸

添加によって脂質ラジカル由来の特徴的な 6 本の ESR シグナルが得られた。

次に、培養細胞にアラキドン酸、および蛍光ニトロキシドを添加し、37 °C でインキュベート後、蛍光スペクトル変化を測定した。その結果、アラキドン酸刺激によって蛍光強度が有意に上昇した。

本研究は、ラジカル応答・環境応答の 2 つのアイデアを融合し、その分子設計・開発を中心に行った。その結果、ニトロキシドによる蛍光団の消光機構を明らかにすることができた。さらに、本化合物が脂質ラジカルを捉えている可能性を示すことに成功した。今後、本化合物を基礎とし改良を加えることで、酸化ストレス疾患で発生したフリーラジカル及び疾患部位周辺のレドックス環境の解明が期待できる。

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 1 件)

1. Yamasaki T, Matsuoka Y, Mito F, Yamato M, Yamada K. Redox Potential of Nitroxides is an Index to Evaluate Superoxide Dismutase Mimic Activity. *Asian J Org Chem* 2:388-391.2013. *Featured Articles. Inside Cover*

[学会発表](計 11 件)

1. Ken-ichi Yamada, Fumiya Mito, Yuta Matsuoka, Toshihide Yamasaki, Kana Kitagawa, Mayumi Yamato. Fluorescence Detection Method for Lipid-derived Radical. 16th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRRI 2012). September 6-9, 2012, Londonn UK.
2. Ken-ichi Yamada, Fumiya Mito, Yuta Matsuoka, Kana Kitagawa, Toshihide Yamasaki, Taketoshi Oishi, Mayumi Yamato. Development of fluorescence detection method for lipid-derived radical. World Congress on Oleo Science (WCOS 2012)

and 29th ISF Congress. September 30-October 4, 2012. Nagasaki, Japan.

3. 松岡悠太、山崎俊栄、白水智則、中西郁夫、大久保敬、福住俊一、山田健一．蛍光ニトロキシドの消光機構解析．第 51 回電子スピンサイエンス学会年会．2012 年 11 月 1 日～3 日．北海道
4. 山崎俊栄、水戸文弥、松岡悠太、大石健稔、大和真由実、山田健一．2,6 位置換ピペリジン系ニトロキシドを用いた脂質ラジカル検出手法の開発．第 51 回電子スピンサイエンス学会年会．2012 年 11 月 1 日～3 日．北海道．
5. 山田健一、水戸文弥、大石健稔、井手臯月、松岡悠太、山崎俊栄、大和真由実．脂質ラジカルを標的とした蛍光検出プローブの開発．第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会．2013 年 6 月 13 日-14 日．愛知．
6. 山田健一、水戸文弥、松岡悠太、井手臯月、大石健稔、山崎俊栄、大和真由実．脂質ラジカル検出蛍光プローブの開発と応用．日本ケミカルバイオロジー学会第八回年会．2013 年 6 月 19 日-21 日．東京．
7. 松岡悠太、山崎俊栄、白水智則、中西郁夫、大久保敬、福住俊一、山田健一．蛍光ニトロキシドの論理的設計に向けた消光メカニズムの解析．第 29 回日本薬学会九州支部大会．2013 年 12 月 8 日～9 日．熊本．
8. 大石健稔、水戸文弥、有吉美幸、松岡悠太、山崎俊栄、山田健一．生体内脂質ラジカル検出蛍光プローブの開発と疾患モデルへの応用第 29 回日本薬学会九州支部大会．2013 年 12 月 8 日～9 日．熊本．
9. 白水智則、松岡悠太、山崎俊栄、山田健

二．新規長波長蛍光ニトロキシドの開発に向けた基礎的検討．第30回日本薬学会九州支部大会．2013年12月7日～8日．長崎．

10. 井手皐月、水戸文弥、松岡悠太、大石健稔、山崎俊栄、式町和茂、大和真由実、山田健一．脂質ラジカル検出蛍光プローブの開発と肝癌モデルへの適用．第30回日本薬学会九州支部大会．2013年12月7日～8日．長崎．

11. 山崎俊栄、水戸文弥、松岡悠太、井手皐月、山田健一．ニトロキシドによるラジカル反応および消光機構を利用した脂質ラジカル検出手法の開発．第30回日本薬学会九州支部大会．2013年12月7日～8日．長崎．

〔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：