

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670003

研究課題名(和文)二重蛍光標識セラミドの合成とそれを用いる動的細胞内スフィンゴ脂質代謝の網羅的解析

研究課題名(英文) Synthesis of double labeled ceramide fluorescent probes to analyze metabolism of sphingolipids

研究代表者

西田 篤司(Nishida, Atsushi)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80130029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：主鎖および側鎖を二重蛍光標識したセラミド誘導体を開発し、細胞内の特定部位(器官)におけるセラミド代謝を動的かつ網羅的に測定し、がんなどの疾病に深く関わるセラミド代謝の生理的意義の解明を行うことを目的として研究を行ってきた。これまで緑色蛍光を有するNBDを発色団とするセラミド誘導体を合成してきたが、新たに赤色蛍光を有するBODIPY型の発色団を有するセラミド蛍光プローブの開発に成功した。またNBDおよびBODIPYを同時に有する二重標識セラミドでは蛍光団間のエネルギー移動が観測された。

研究成果の概要(英文)：Doubly labeled fluorescent probe at main and side chain on ceramide has been developed to obtain information of ceramide metabolism in cell. Such information will be useful to evaluate role of ceramide in connection with many diseases such as cancers. We developed first several green fluorescent ceramide probes. One of the ceramide probe which has NBD at main chain and an acetyl group on a primary hydroxy group was less toxic compared to commercially available C6-NBD ceramide and stain golgi system for a long period without damage on cell. We also developed a red fluorescent ceramide probe which has a BODIPY type group at main chain of ceramide. We also observed energy transfer between two fluorescent group such as NBD and BODIPY in the same ceramide molecule. Those results will be useful to develop a new fluorescent probes which is useful to analyze ceramide metabolism in living cells.

研究分野：有機合成化学

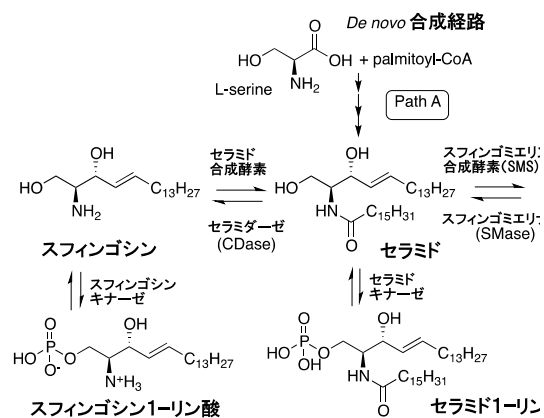
キーワード：セラミド 代謝 蛍光標識 NBD BODIPY ゴルジ

1. 研究開始当初の背景

生体膜の構成成分であるスフィンゴ脂質はその一部が分解することでわずかに生産されるセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)などの代謝産物が、細胞死、増殖、分化などを制御するシグナリング分子として機能することから注目されている¹⁾。更に、脂質代謝ががん治療の標的となり得るという報告も多く見られる²⁾。Path A に示す生合成経路において小胞体で生合成されたセラミドはゴルジ体に移送され代謝を受けスフィンゴミエリンへと変換される(式 1)。

その後スフィンゴミエリンは細胞質、細胞膜内側、細胞膜外側で代謝され、セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1-リン酸へと変換され様々な機能を発揮していると予想されるが、どのようなタイミングでどの場所で、どの程度の変換が行われているかは未だ明らかにされていない。

式 1 スフィンゴ脂質の生合成



2. 研究の目的

本研究では主鎖および側鎖に蛍光発色団を配し、セラミド N-アシル基が切断され、更に再アシル化が生じる過程まで追跡できる脂質プローブを開発する。更に二重蛍光標識セラミドの細胞取り込み、細胞内器官への集積、細胞内代謝、細胞外への放出課程を LC-MS にて追跡し、ストレス下における細胞、がん細胞と正常細胞における代謝の違いを検討することを目的とした。

本研究ではセラミドとスフィンゴシンの間の相互変換を蛍光標識により区別可能なプローブを開発することにより、これまで明らかになっていない脂質代謝をより明確に、より網羅的に調査することが可能となる。本研究により脂質代謝と疾病の関わりが明らかになると期待される。

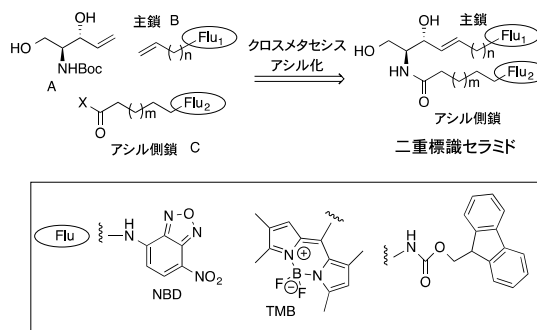
3. 研究の方法

スフィンゴ脂質は生体内で相互に変換され、

細胞間の認識や炎症反応、細胞死などに関わっている。セラミドはその相互変換経路の中心にあり、その細胞内動態の解明に向けて盛んに研究されている。研究代表者は、これまで、種々のセラミド誘導体を合成し、細胞膜透過性や細胞障害性、アポトーシス誘導活性などを調査してきた。

セラミドの細胞内における代謝、アミド側鎖の切断に着目し、その観察に適した標識セラミド誘導体の合成を検討した。セラミドの主鎖またはアミド側鎖に標識官能基を導入した誘導体の合成例は多いが、その両方を標識した例は少ない³⁾。主鎖と側鎖の両方に標識官能基をもつ誘導体を用いることにより、細胞内におけるセラミドの代謝や、代謝後の各部位の動態などが詳細に観察できるようになると期待し、標識化合物を設計した。標識官能基には、従来当研究室で用いていた蛍

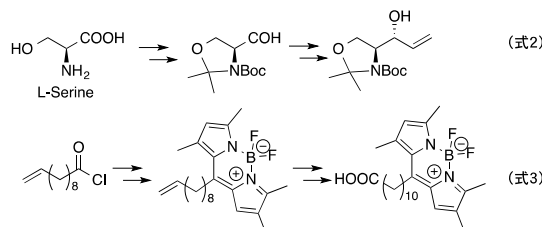
図 1



光発色団 NBD に加えて、細胞染色の分野で頻用される tetramethylbodipy(TMB)を採用した(図 1)。

4. 研究成果

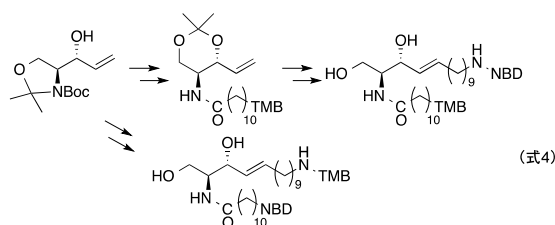
標識部位は合成の後半でアミド化反応およびクロスメタセシス反応を用いて導入し、既知の共通中間体を合成するものとした。L-serine を原料とし、Garnar 's aldehyde⁴⁾を経由する経路でビニル基を導入し⁵⁾保護された光学活性アミノペンテンジオール誘導



体へと導いた(式 2)。ウンデセニルクロロドを原料とし、末端オレフィン体を合成し⁵⁾、メタセシス反応によりアクリル酸部位を導

入、続く接触還元で蛍光発色団 TMB を有するカルボン酸へと導いた(式3)。

NBD ブロックとアミノアルコールブロックおよびカルボン酸ブロックをアミド化とクロスメタセシス反応を用いて導入し、二重標識セラミドを合成した。また、標識官能基の導入部位を入れ替えたセラミド誘導体も、同様の経路にて合成した(式4)。



合成した二種のセラミド誘導体は、細胞膜透過性の試験に供され、低温下でも速やかに細胞に取り込まれゴルジ体染色剤として機能することが判明した。現在、TMB に代わり赤色蛍光を発する蛍光団の合成を行い、異なる波長にて、スフィンゴミエリン部分と脂肪酸部分を検出可能なセラミドプローブの開発を検討している。

参考文献

- 1) 谷 元洋, 生化学, 83 巻, 7 号, 623-627 (2011 年)
- 2) Y. H. Zeidan, R. W. Jenkins, J. B. Korman, J. S. Norris, Y. A. Hannun, *Curr. Drug Targets*, 9, 653-661 (2008).
- 3) P. K. Bhabak, A. Hauser, S. Redmer, S. Babhart, D. Heuer, C. Arenz, *ChemBioChem*, 14, 1049 (2013).
- 4) P. Garner, *Tetrahedron Lett.*, 25, 5855 (1984).
- 5) P. Herold, *Helv. Chim. Acta.*, 71, 354 (1988).
- 6) T. Ullrich, M. Ghobrial, C. Peters, A. Billich, D. Guerini, P. Nussbaumer, *Chem. Med. Chem.*, 3, 356 (2008).

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)

T. Makiyama, H. Nakamura, N. Nagasaka, H. Yamashita, T. Honda, N. Yamaguchi, A. Nishida, T. Murayama, Trafficking of Acetyl-C16-Ceramide-NBD with Long-Term Stability and No Cytotoxicity into the Golgi Complex, *Traffic*, 16, 476-492 (2015) (DOI: 10.1111/tra.12265) (査読有り)

[学会発表](計5件)

- 1) 中村浩之、牧山智彦、長坂伸夫、山下尚大、本田拓也、山口直人、西田篤司、村山俊彦、長時間安定的にゴルジ体を認識する新規蛍光標識セラミド誘導体、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、横浜。
- 2) 王 亜賓、楊井理信、橋本直宏、中村浩之、村山俊彦、西田篤司、新規赤色蛍光標識セラミドプローブの合成研究、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~29日、横浜。
- 3) Morikawa, T., Harada, S., Nishida, A., Enantioselective construction of multi-substituted hydrocarbazoles by chiral holmium/bisthiourea catalyst, 15th Tetrahedron Symposium, Nov. 3 to 5, 2014, Singapore.
- 4) Amako, Y., Arai, S., Nishida, A., Development of Regio- and Stereoselective Hydrocyanation of Alkene and Its Application to Hydrocyanative Cyclization under Nickel Catalysis, The 4th Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia, Nov. 28-30, 2014, Bangkok, Thailand.
- 5) 柳井理信、長坂信夫、牧山智彦、中村浩之、村山俊彦、西田篤司、標識セラミドの合成研究、鯛6回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2013年11月30日、東京。

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: Ceramide Derivative and Golgi Apparatus-Labeling Fluorescent Probe Using Some

発明者: A. Nishida, T. Makiyama, H. Nakamura, T. Murayama

権利者: A. Nishida, T. Makiyama, H. Nakamura, T. Murayama

種類: 特許

番号: US2014/0329266 AI

取得年月日: 2014年11月6日

国内外の別: 米国

[その他]

千葉大学大学院薬学研究院薬品合成化学研究室ホームページ

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/gousei/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田 篤司 (Nishida Atsushi)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：80130029

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし