

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713004

研究課題名(和文)ミトコンドリア疾患解明のための電子伝達体プローブ法の開発

研究課題名(英文)Development of mitochondrial functional imaging using electron mediators as a probe

研究代表者

兵藤 文紀 (Hyodo, Fuminori)

九州大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：10380693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア電子伝達体に含まれるユビキノンやフラビン類は酸化還元過程においてフリーラジカル中間体を形成することが知られている。我々は今回これらの分子と生体内重要抗酸化分子であるビタミンE、Kの同時可視化に成功した。ミトコンドリア機能低下マウスの筋肉内に、ユビキノンを生体プローブとして投与した場合に有意なラジカル代謝の低下を観測した。摘出した筋肉の電子伝達系の酸素消費が有意に低下していたことから、ユビキノンをラジカルをプローブとすることで、ミトコンドリア機能異常を検出できることが示唆された。今後ミトコンドリア関連疾患への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In vivo redox reactions that generate free radical intermediates are essential to metabolic processes on homeostasis. We report here the use of in vivo dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging (DNP-MRI) to conduct redox molecular imaging for mitochondrial functional imaging. Using in vivo DNP-MRI, we obtained simultaneous images of free radical intermediates generated from the CoQ10, FMN, and FAD involved in the mitochondrial electron transport chain, as well as the radicals derived from vitamins E and K1. Each of these free radicals was imaged in real time in a phantom comprising a mixture of free radicals localized in either lipophilic or aqueous environments. In addition, CoQH as a in vivo probe could be visualized redox alteration after mitochondrial dysfunction by KCN treatment. This study is the first to report the in vivo DNP-MRI imaging of free radical intermediates that are derived from endogenous species involved in metabolic processes.

研究分野：生体分析化学

キーワード：レドックス イメージング ミトコンドリア DNP 動的核偏極

1. 研究開始当初の背景

我々の体内では無数の代謝反応により恒常性が維持され、その代謝反応の多くに電子移動を伴うレドックス反応(酸化還元反応)が関与し、その過程でフリーラジカル中間体が形成されることが知られている。例えばエネルギー産生のある場であるミトコンドリアの酸化的リン酸化においては、ミトコンドリア内膜に含まれるフラビンモノヌクレオチド(FMN: flavin mononucleotide)やフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD: flavin adenine dinucleotide)などのフラビン類やコエンザイム Q₁₀(CoQ₁₀: coenzyme Q₁₀)などの電子伝達体が、クエン酸回路などで産生されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH: nicotinamide adenine dinucleotide)やコハク酸を利用して電子伝達を行い、最終的には ATP が合成される。例えばユビキノン(UBQ)は二電子還元を受けユビキノールへと還元される。また上記反応途中においてユビキノンの一電子還元体であるユビセミキノンが形成されることが知られており、セミキノン体はフリーラジカルを有するので ESR スペクトルを与える。実際、フラビン類やユビキノン類を含む多くの分子のフリーラジカル中間体の ESR スペクトルは 1970 年代初頭に報告されているがこれら内因性分子由来の ESR スペクトルは複雑な線形や広線幅を示すことが多いため、スペクトル形を利用する画像化法である電子スピン共鳴法では可視化が困難であった。

2. 研究の目的

我々は内因性分子由来のフリーラジカル中間体を可視化し、生体機能プローブとして応用を確立できれば、内因性分子が介在する生体代謝反応を検出できると考え、DNP-MRI による内因分子の可視化法の開発と応用研究を進めてきた。これまでに数

十種の内因性分子に関して網羅的探索を行った結果、数種の内因性分子においてフリーラジカル中間体の可視化に成功している。本課題研究ではミトコンドリア機能を可視化するため、電子伝達体であるフラビン類やユビキノン、さらには抗酸化分子であるビタミン E について DNP-MRI による可視化と生体応用を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

DNP-MRI 装置:九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点にて独自に開発された低磁場型の動物用 DNP-MRI システムを用いて行った。

内因性分子のフリーラジカル中間体:フラビン類(FAD、FMN)のフリーラジカル中間体は電子供与物質である NADH の添加により作製した。ユビキノン(CoQ₁₀)はアセトンに溶解後アルカリ溶液下で作製した。ビタミン E もしくは K は難水溶性であるため有機溶媒に溶解した後、NaOH もしくは KO₂ の添加により作製した。ミトコンドリア機能低下モデルはマウスの背部皮下にシアン化カリウムを皮下投与にて作製後、ユビキノンラジカルをプローブとして DNP-MRI にて可視化の検討をおこなった。

4. 研究成果

ユビキノンや FAD、FMN などの電子伝達物質に、同じく生体内因性分子である NADH を負荷すると、セミキノン体であるフリーラジカル中間体を得られることがわかった。様々な方法により得られたフラビン類、ユビキノン、ビタミン E、K のフリーラジカル中間体の ESR スペクトルを示す(図 1)。5 種の内因性分子のフリーラジカル中間体は、それぞれラジカル安定性や生成効率が異なるのでスペクトルは後述する DNP-MRI イメージングで用いたサンプルと同条件にて得た。FAD や FMN などのフ

ラビン類は carbamoyl-PROXYL に比べ広線幅 (約 19

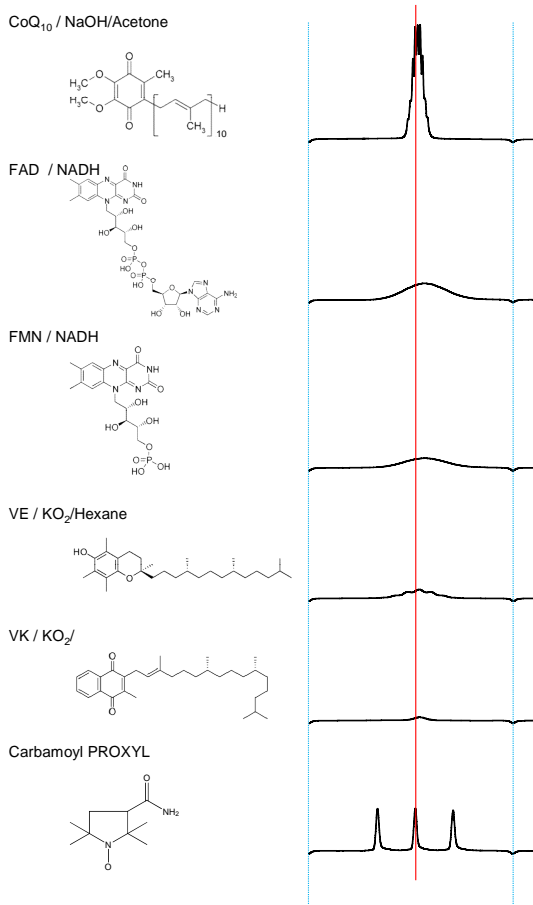


図1 内因性分子のフリーラジカルスペクトル

Gauss) を有することがわかる。一方 CoQ₁₀ やビタミン K、E は脂溶性分子であるため有機溶媒に溶解後、フリーラジカル中間体を調製した。図中の縦の線は carbamoyl PROXYL の中心ピークの周波数である 527.5MHz を示し、本周波数で ESR 励起することで 5 種の内因分子すべてが同時に励起可能であることがわかったため、DNP-MRI による同時可視化実験においては本周波数を用いることとした。

次にこれら 5 種のフリーラジカル中間体を含む疑似資料 (ファントム) を作製し DNP-MRI による可視化を試みた。この時、5 種の内因分子を励起する周波数は、上述の通り 527.5MHz に設定した。図 2 左下図には ESR 励起をしない、通常 MRI 画像を示している。本装置の外部磁場は低磁場(15mT)であるため予想された通り、フ

アントムの画像強度は低く、溶媒に依存した画像強度を示した。一方 ESR 励起すると、5 種すべての内因性分子のフリーラジカル中間体を含むファントムで明確な画像強度の上昇を確認した。興味深いことに、DNP-MRI イメージングにおいては、FAD や FMN などの carbamoyl PROXYL に比べ 10 倍以上の広線幅を持つラジカル種においても十分な DNP 効果を得られることがわかった。またビタミン K のラジカル濃度は 27 μ M と carbamoyl PROXYL (200 μ M) に比べ約 1/7 であるにも係わらず両者は同程度の画像強度を示した。本結果に関しては溶媒効果など今後物理学的検討が必要となるが、DNP-MRI により既存の手法では困難な分子を新たに測定対象として画像化できる可能性が示された。

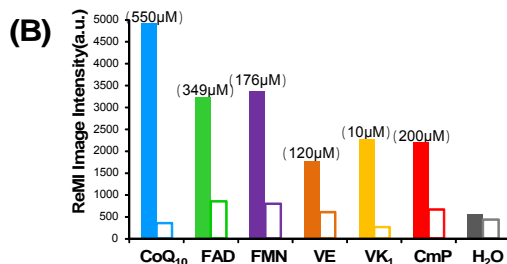
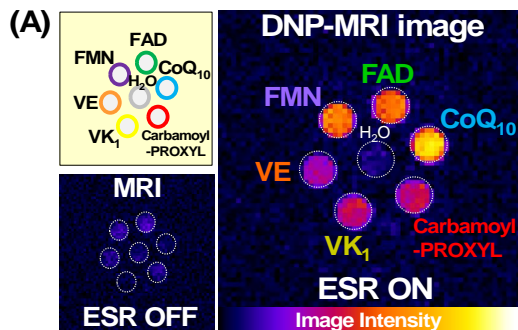


図2 5種の内因性分子の同時画像化 (Hyodo et al. Anal Chem 2014)

また今回可視化に成功した分子の中でもミトコンドリア電子伝達系に關与するフラビンと CoQ に着目し、生体応用へ展開した。FADH と CoQH をマウス下肢に投与すると、CoQH を投与した場合においては、速やかにラジカルが消失されたのに対し、FADH を投与した場合においてはラジカルの消失は見られなかった。そこで、ミトコ

ンドリア電子伝達系のコンプレックスの阻害剤であるシアン化カリウム (KCN) をマウスに投与してミトコンドリア機能低下モデルマウスを作製した。CoQH を生体プローブとして DNP-MRI にて可視化したところ、KCN 投与マウス下肢のラジカル代謝はコントロールマウスに比べ有意に低下した。また採取した筋肉のミトコンドリア電子伝達系による酸素消費速度を比較したところ、KCN 投与マウスの筋肉では有意にミトコンドリア酸素消費が低下していたことから、CoQH をプローブとすることで、ミトコンドリア機能低下に由来する生体レドックス代謝変動を検出できることが示唆された。

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4件)

Ito S and Hyodo F, Dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging at low ESR irradiation frequency for ascorbyl free radicals **Scientific Reports** 19;6:21407 2016

Eto H, Hyodo F*, Kosem N, Kobayashi R, Yasukawa K, Nakao M, Kiniwa M, Utsumi H Redox imaging of skeletal muscle using in vivo DNP-MRI and its application to an animal model of local inflammation **Free Radical Biology and Medicine** 23;89:1097-1104 2015

Utsumi H, Hyodo F. Free Radical Imaging using *in vivo* Dynamic Nuclear Polarization - MRI **Methods in Enzymology** 2015 35(5):739-43 2015

Hyodo F, Ito S, Yasukawa K, Kobayashi R, Utsumi H. Simultaneous and spectroscopic redox molecular imaging of multiple free radical intermediates using dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging. **Analytical Chemistry** 5 86(15) 7234-8 2014

[学会発表](計6件)

兵藤文紀、中路睦子、江藤比奈子、伊藤慎治、内海英雄「水溶性ビタミン類の可視化と機能イメージングへの応用」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学学会大会合同大会 (BMB2015) ワークショップ 2015年 神戸

兵藤文紀「生体動的核偏極(DNP)-MRIを用いた新たなレドックスイメージング法の開発と応用」第43回日本共鳴医学会 シンポジウム 2015年 東京

兵藤文紀「磁気共鳴イメージングによる新たなレドックス代謝イメージング法の開発」日本分析化学会第64年会 シンポジウム 2015年 福岡

兵藤文紀「生体内分子・医薬品を用いた新たな代謝イメージング法の開発」日本薬学会第135回年会 シンポジウム 2015年 神戸

Fuminori Hyodo 「*in vivo* Functional Imaging Using Free radical Molecules」The 2ndCMS International Symposium 2015 Fukuoka Japan

兵藤文紀「生体磁気共鳴レドックスイメージング法の開発と応用」日本生物物理学会九州支部・熊本大学イメージングセミナー 2014年 熊本

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：生体における酸化還元反応を検出する方法

発明者：内海英雄、兵藤文紀、伊藤慎治

権利者：九州大学

種類：特許

番号：PCT/JP2014/064341

出願年月日：2014年5月29日

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

研究者番号 : 10380693