

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03977

研究課題名(和文)ラジカロミクス技術開発

研究課題名(英文)Development of Radicalomics Technique

研究代表者

山田 健一 (Yamada, Kenichi)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60346806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々の体は、活性酸素を産生する。この活性酸素は、脂質や蛋白質などを酸化し、その後炎症反応などを引き起こす。しかしながら、これら酸化物の中間体であるラジカル体の検出は、その反応性の高さなどから測定手法は限定的であった。そこで本研究では、蛋白質ラジカルの検出する蛍光プローブを開発し、評価することを目的とした。その結果、蛋白質ラジカルのみならずDNAラジカルなどの検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の体では、常に酸化障害が生じており、例えば活性酸素が生成する。これら活性酸素は、脂質や蛋白質など、より大きな分子を酸化障害し、その機能を消失させる。今回我々は、この酸化障害のラジカル中間体の検出に成功した。このことは、生体内で生じている酸化障害のメカニズム解明に役立つのみでなく、その阻害を目的とした創薬研究を加速することに大いに貢献できるであろう。

研究成果の概要(英文)：Our body produces reactive oxygen species (ROS). ROS oxidizes lipids and proteins, and these oxidized products induce inflammation. However, the detection method of these radicals, which are intermediates of these oxides, is limited because of their quite high reactivity. Hence, the purpose of this study was to develop and evaluate a fluorescent probe that detects protein and DNA-derived radicals. As a result, we succeeded in detecting not only protein radicals but also DNA radicals.

研究分野：薬学

キーワード：ラジカル 蛍光検出 高分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質は、容易に酸化され過酸化物を生じる。この過酸化脂質は、さらに数百種類ものアルデヒド体に分解され、そのひとつひとつが高血圧や糖尿病など多くの疾患を惹起する。近年、この代謝産物が細胞死を引き起こすこと、また、蛋白質と複合体を形成し、血管新生や加齢黄斑変性の原因に密接に関与する分子として注目された。

一方、蛋白質も容易に酸化障害を受け代謝産物を生じ、アルツハイマー病や糖尿病など多くの疾患の発症に関与すると報告された。ここで、これら脂質・蛋白質酸化代謝産物の生成は、いずれもラジカルが反応起点になる。さらに、連鎖反応を引き起こし、生成物を爆発的に増幅させる。すなわち、脂質・蛋白質ラジカルなどのいわゆる高分子ラジカル体などは、疾患に至る過程での最もアクティブな場・分子であり、これらを検出・抑制できれば、疾患の早期発見・予防に大きく貢献できると考えられる。しかし、これら高分子ラジカルは、極めて反応性が高く極微量なために検出が極めて困難であった。

そこで我々は、これら脂質・蛋白質ラジカルの検出を目的とし、異分野で利用されている技術に着目した。それは、材料工学分野でのスピン化合物の炭素中心ラジカル結合能、および物理化学分野でのスピン化合物の蛍光消光作用である。すなわち、これら技術を融合できれば、脂質ラジカル、蛋白質ラジカルの共通分子である炭素中心ラジカルを高選択的に検出できるのではと考えた。そこで、まず、炭素中心ラジカルとの反応性を高めるためスピン化合物の新規合成法を考案した。次に、脂質ラジカルをターゲットとした高選択性スピン化合物を合成し、蛍光団と共有結合させた。その結果、脂質ラジカルと結合すると蛍光が ON になる新たな蛍光検出プローブ開発に成功した。実際に、肝炎症モデルであるニトロソアミン誘発培養細胞、および動物モデルに本プローブを投与したところ、脂質ラジカルが非常に早い時期に生成していることがわかった。加えて、我々が開発した脂質ラジカル特異的阻害剤を投与すると、炎症ならびに発がんは劇的に減少した。以上の結果より、肝炎症反応に脂質ラジカルが密接に関与していることは間違いないということがわかった。

一方で、アミノ酸や蛋白質もこのような機能性分子の一つであり、ラジカル中間体を介して生成したカルボニルタンパクなどの酸化最終産物は種々の酸化ストレス疾患に関与することが報告されている。この際、酸化を受ける部位はペプチド鎖主鎖や、側鎖のアミノ酸残基など多岐にわたり、酸化タンパク質生成までのメカニズムは未だ不明確な点が多い。よって、この反応中間体であるラジカル中間体の検出・構造解析は、疾患発症につながる酸化メカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、「疾患の発症に密接に関与する蛋白質ラジカルの高感度検出・構造解析技術開発」を目的とした。そのために、1) 生体利用可能な高感度・高機能性プローブ開発、2) 高分子ラジカル構造解析技術開発、を研究項目とした。

### 3. 研究の方法

各種アミノ酸、蛋白質、ヌクレオチド、DNA、薬剤を、過酸化水素や horseradish peroxidase、その他酸化刺激剤を用いて酸化刺激を行った。その後、新たに合成した蛍光プローブを加え、それぞれのラジカル体が結合しているかどうか評価した。評価項目としては、プローブ内含まれるラジカル体量を電子スピン共鳴法にて、また電子スピン消失による蛍光強度の増加量を蛍光検出器、あるいは SDS-PAGE などで蛍光検出した。さらに、結合したプローブ-ラジカル複合体は、質量分析装置を用いてその構造解析を行った。

### 4. 研究成果

1) 生体利用可能な高感度・高機能性プローブ開発、2) 高分子ラジカル構造解析技術開発  
我々は、すでに脂質ラジカル検出プローブの開発に成功している。そこで、これら技術を蛋白質ラジカルに応用できないか検討した。さらに本研究は、(1) 蛋白質ラジカルにとどまらず、(2) ヌクレオチドラジカル・DNA ラジカル、(3) 薬剤由来ラジカルに応用展開した。これは、本研究の将来的な目的である「ラジカロミクス (radical + omics) 技術の提唱」を目指したものである。

#### (1) 蛋白質ラジカル

まず、我々は、蛍光団とニトロキシドを結合したラジカル検出蛍光プローブを合成した。次に、本プローブがアミノ酸ラジカルを検出できるか否か検討した。その結果、本検討では、7 種のアミノ酸とグルタチオンについて測定した結果、構造中にチオール部位をもつ N-acetyl-L-cysteine やグルタチオン由来のラジカル種と、本プローブが特に高い反応性を有することが示された。さらに、本条件における反応生成物について質量分析を行ったところ、プローブと各ラジカル種で付加体を形成することがわかった。以上のことから、本プローブは、アミノ酸ラジカルと共有結合することが示された。

次に、本プローブが蛋白質ラジカルの検出にも応用できるか否か検討した。遊離のチオール基を有するタンパク質である albumin を用い、本プローブによる蛍光検出に取り組んだ。その結果、albumin の分子量である 66 kDa 付近に、酸化刺激剤である horseradish peroxidase 濃度依存的に蛍光強度の増強するバンドが検出された。また、この蛍光強度は、抗酸化剤であるアスコルビン酸を添加することにより有意に抑制された。したがって、本プローブは、蛋白質中のラジカルと共有結合し、SDS-PAGE などでの蛍光検出にも適用できることがわかった。

次に、生体由来サンプルとしてマウス血漿を用いて、同様の検討を行った。その結果、酸化刺激濃度依存的に蛍光強度の増強するバンドが検出された。また、ウエスタンブロッティングの結果より、このタンパク質が albumin、および蛋白質 A であった。

以上の結果より、本プローブがアミノ酸ラジカル、蛋白質ラジカルの検出ができること、また、生体由来サンプルへも応用可能であることが示唆された。

### (2) ヌクレオチド、DNA ラジカル

一方で、DNA も酸化障害により、炎症や細胞死、さらには疾患に関与することが報告されている。しかしながら、実際に DNA ラジカルを検出した報告はほとんどない。そこで、蛋白質のみならずヌクレオチドラジカル、DNA ラジカルの検出を試みた。まず、ヌクレオチド・DNA ラジカル検出用に新たにプローブを合成した。次に本プローブを用いて、ヌクレオチド由来ラジカルの検出を試みた。その結果、 $H_2O_2$  処理により dT, dC ラジカル付加体の検出に成功し、また、dT-Probe のフラグメンテーション、塩基-糖のフラグメンテーションを検出できたことから、確かにヌクレオチドとプローブが結合していることがわかった。本手法をさらに仔牛胸腺由来 DNA に適用し、ラジカル付加体を電気泳動により検出するとともに、酵素消化後、LC-MS/MS によって DNA 由来ラジカル付加体を検出した。

### (3) 薬剤由来ラジカル

さらに、いくつかの薬剤について、光照射時などに生成するラジカル中間体の検出を試みた。その結果、例えば、ケトプロフェンやアルテミシニンなどの薬剤にて、光照射時などに生成するラジカルの検出に成功した。これら薬剤のラジカル中間体についての構造解析も行った。

以上の結果より、これまで報告してきた脂質ラジカルのみならず、蛋白質ラジカル、ヌクレオチドラジカルなどの検出に成功し、本研究の将来的な目的であるラジカロミクス提案における基盤技術が完成したと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Emoto MC, Sato-Akaba H, Matsuoka Y, Yamada KI, Fujii HG.   | 4. 巻<br>690           |
| 2. 論文標題<br>Non-invasive mapping of glutathione levels in mouse brains by in vivo electron paramagnetic resonance (EPR) imaging: Applied to a kindling mouse model. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Neurosci Lett.   | 6. 最初と最後の頁<br>6-10    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.neulet.2018.10.001.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Araki T, Fuchi Y, Murayama S, Shiraishi R, Oyama T, Aso M, Aoki I, Kobayashi S, Yamada KI, Karasawa S.   | 4. 巻<br>8(10)         |
| 2. 論文標題<br>Fluorescence Tumor-Imaging Using a Thermo-Responsive Molecule with an Emissive Aminoquinoline Derivative.   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Nanomaterials.   | 6. 最初と最後の頁<br>782-791 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nano8100782.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Shinto S, Matsuoka Y, Yamato M, Yamada KI.   | 4. 巻<br>62(2)         |
| 2. 論文標題<br>Antioxidant nitroxides protect hepatic cells from oxidative stress-induced cell death.  | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>J Clin Biochem Nutr.   | 6. 最初と最後の頁<br>132-138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/bpb.b18-00558.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Ishida Y, Okamoto Y, Matsuoka Y, Tada A, Janprasit J, Yamato M, Morales NP, Yamada KI.   | 4. 巻<br>113           |
| 2. 論文標題<br>Detection and inhibition of lipid-derived radicals in low-density lipoprotein.  | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Free Radical Biol. Med.  | 6. 最初と最後の頁<br>487-493 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.388.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Enoki M, Shinto S, Matsuoka Y, Otsuka A, Kaidzu S, Tanito M, Shibata T, Uchida K, Ohira A, Yamato M, Yamada KI. | 4. 巻<br>53                |
| 2. 論文標題<br>Lipid radicals cause light-induced retinal degeneration.   | 5. 発行年<br>2017年           |
| 3. 雑誌名<br>Chem Commun.  | 6. 最初と最後の頁<br>10922-10925 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/c7cc03387g.   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>日下部 大樹, 松岡 悠太, 山田 健一        |
| 2. 発表標題<br>脂肪酸添加はがん細胞のフェロトーシス感受性を亢進させる |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>進藤 早紀, 松岡 悠太, 山田 健一             |
| 2. 発表標題<br>脂質ラジカル抑制剤探索に向けたスクリーニング系の構築とその応用 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>齋藤 耕太, 松岡 悠太, 山田 健一              |
| 2. 発表標題<br>脂質過酸化反応における抗酸化物質の作用点および反応抑制機序の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>阿部 雅史, 松岡 悠太, 高橋 政友, 和泉 自泰, 馬場 健史, 山田 健一 |
| 2. 発表標題<br>酸化脂質由来アルデヒド化合物の体系的解析法開発                  |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                              |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>山田 健一               |
| 2. 発表標題<br>脂質ラジカルの可視化と構造解析技術開発 |
| 3. 学会等名<br>第30回ヒタミンE研究会(招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2019年                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>生津 慎, 松岡悠太, 和泉自泰, 高橋政友, 馬場健史, 山田健一 |
| 2. 発表標題<br>生体内組織サンプルより生成する脂質ラジカルの検出と構造解析      |
| 3. 学会等名<br>第35回日本薬学会九州支部大会                    |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北島綾子, 日下部 大樹, 進藤 早紀, 松岡 悠太, 山田 健一 |
| 2. 発表標題<br>非アルコール性脂肪肝炎モデルへの脂質過酸化抑制剤の応用       |
| 3. 学会等名<br>第35回日本薬学会九州支部大会                   |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宗 茉里恵, 進藤 早紀, 松岡 悠太, 山田 健一            |
| 2. 発表標題<br>脂質過酸化反応を抑制する化合物の探索と両側総頸動脈狭窄モデルマウスへの応用 |
| 3. 学会等名<br>第35回日本薬学会九州支部大会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>阿部 雅史, 松岡 悠太, 高橋 政友, 和泉 自泰, 馬場 健史, 山田 健一 |
| 2. 発表標題<br>酸化脂質由来アルデヒド化合物の構造解析手法の開発とその応用            |
| 3. 学会等名<br>第35回日本薬学会九州支部大会                          |
| 4. 発表年<br>2018年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>齋藤耕太, 松岡 悠太, 山田 健一            |
| 2. 発表標題<br>脂質過酸化反応における抗酸化物質の作用点および反応機構解明 |
| 3. 学会等名<br>第35回日本薬学会九州支部大会               |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田 健一                        |
| 2. 発表標題<br>酸化脂質の起点として脂質ラジカルの検出と構造解析技術開発 |
| 3. 学会等名<br>第91回日本生化学会大会                 |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山田 健一                       |
| 2. 発表標題<br>脂質ラジカル検出手法の開発と疾患モデルへの応用     |
| 3. 学会等名<br>第31回バイオイメージング分析シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>山田 健一              |
| 2. 発表標題<br>脂質ラジカルの検出と構造解析技術開発 |
| 3. 学会等名<br>第71回日本酸化ストレス学会     |
| 4. 発表年<br>2018年               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ken-ichi Yamada  |
| 2. 発表標題<br>Functional fluorescence probe for lipid derived radicals detection |
| 3. 学会等名<br>SFRR12018（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ken-ichi Yamada  |
| 2. 発表標題<br>Detection and Inhibition of Lipid-derived Radical                                  |
| 3. 学会等名<br>Thai Pharmacological Society Meeting 40th “ Innovation in Pharmacology（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石田南人, 進藤早紀, 山田健一     |
| 2. 発表標題<br>漢方薬の加齢黄斑変性症モデル動物への応用 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第138年会          |
| 4. 発表年<br>2018年                 |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>齋藤耕太, 松岡悠太, 山田健一        |
| 2. 発表標題<br>脂肪酸酸化酵素を用いた脂質過酸化反応機序の解明 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第138年会             |
| 4. 発表年<br>2018年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田健一                             |
| 2. 発表標題<br>脂質ラジカル構造解析技術開発                   |
| 3. 学会等名<br>第15回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ken-ichi Yamada   |
| 2. 発表標題<br>Lipid Radicals Cause Light Induced-Retinal Degeneration |
| 3. 学会等名<br>24th Annual SfrBM meeting (国際学会)                        |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ken-ichi Yamada  |
| 2. 発表標題<br>Detection and Inhibition for Lipid Derived Radicals                      |
| 3. 学会等名<br>A Workshop on Drawing Biological Information through Quantum Spin System |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三倉唯, 松岡悠太, 山田健一                   |
| 2. 発表標題<br>Click Chemistryを応用した脂質ラジカル標識化剤の開発 |
| 3. 学会等名<br>第34回日本薬学会九州支部大会                   |
| 4. 発表年<br>2017年                              |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>多田有佐, 松岡悠太, 山田健一         |
| 2. 発表標題<br>四塩化炭素誘発肝障害における脂質過酸化反応の役割 |
| 3. 学会等名<br>第34回日本薬学会九州支部大会          |
| 4. 発表年<br>2017年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ken-ichi Yamada  |
| 2. 発表標題<br>Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals     |
| 3. 学会等名<br>8th Pacific Symposium on Radical Chemistry (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 馬場 健史<br><br>(Banba Takeshi)<br><br>(10432444)    | 九州大学・生体防御医学研究所・教授<br><br><br>(17102)     |    |
| 連携研究者 | 大和 真由実<br><br>(Yamato Mayumi)<br><br>(30380695)   | 九州大学・先端融合医療創成センター・准教授<br><br><br>(17102) |    |
| 連携研究者 | 柴田 貴広<br><br>(Shibata Takahiro)<br><br>(80447838) | 名古屋大学・生命農学研究科・准教授<br><br><br>(13901)     |    |