

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590039

研究課題名（和文） 生理活性物質を識別するセンサー開発とその応用

研究課題名（英文） Development and application of sensors selective to biologically active substances

研究代表者

勝 孝 (KATSU TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40112156

研究成果の概要（和文）：本研究では、カフェインと活性酸素種（ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオン）を識別するセンサーを開発した。とくに、市販の酸素電極を活性酸素種の検出に使用したことが特徴である。また、薬物が細胞膜に開けた孔のサイズや光照射したポルフィリンの細菌膜に対する作用などをセンサーを利用して検討した。

研究成果の概要（英文）：We developed new sensors selective to caffeine and reactive oxygen species such as hydroxyl radical and superoxide anion. We utilized a commercially available oxygen electrode to detect reactive oxygen species. Applications of sensors were performed to determine the precise channel sizes of biologically active substances formed in cellular membranes and to elucidate the mechanism of photo-inactivated action of porphyrins on bacterial membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：イオンセンサー、酸素電極、カフェイン、活性酸素、ポルフィリン、膜電位、呼吸阻害、膜透過

1. 研究開始当初の背景

本研究は2004～2006年度に受けた科学研究費補助金（基盤研究(C) 課題番号16590027：高性能イオン電極の開発と応用）をさらに発展させるために計画された。イオン電極などのセンサー開発は国内外を問わず精力的になされているものの、生理活性物質を識別するセンサー開発および生細胞系への応用については研究例が極めて少ない。私たちは、センサー法が溶液の濁り・色にはまったく影響を受けない簡便な測定方法であることから、とくに生理活性物質が引き起こす細胞膜・人工膜の透過性変化の測定にセンサー法を積極的に利用してきた。代表的な研究成果として、大腸菌外膜の透過性変化を引き起こす薬物の基本構造を明らかにし、さらにその作用機構を解明した点があげられる。この研究を通じて、センサー法は薬物による膜透過性変化の機構解明に極めて有用なツールになることを明らかにした。

2. 研究の目的

上述した背景を踏まえ、本研究では、薬物作用解明のツールとなる優れたセンサーの開発とその応用に焦点をあてた。とくに、これまで研究が進展してこなかった生理活性物質を識別するセンサー開発および様々なセンサーシステムを構築して、センサー法を生物科学領域への新しい研究手法の一つとして確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、特定の生理活性物質に対して識別能をもつ高分子膜を利用したセンサー開発のほかに、酸素電極を用いた活性酸素種の定量法についても検討した。応用研究を含め

た研究の方法は以下の通りである。

(1) 高分子膜を利用したセンサーでは、センサー膜材料となるイオン交換体と膜溶媒の選択が重要であることから、これらの組み合わせを系統的に検討した。

(2) 活性酸素種の検出では、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンがスカベンジャーと反応したときに引き起こされる酸素の消費・発生を市販の酸素電極を利用して計測した。

(3) センサーの応用研究として行った細胞膜に対する薬物作用の検討では、カリウムイオンセンサーと光ファイバーとを組み合わせたセンサーシステムを構築した。

(4) ポルフィリン類による細菌の光不活性化機構を解明するためには、テトラフェニルホスホニウムセンサー（膜電位測定用センサー）、カリウムイオンセンサー（膜透過性変化測定用センサー）および酸素電極（呼吸測定用センサー）を利用した。

(5) また、非ステロイド系抗炎症薬が引き起こす胃粘膜培養細胞膜障害に対する熱ショックタンパク質の効果はカリウムイオンセンサーを用いて検討した。

4. 研究成果

得られた研究成果を、「3. 研究の方法」に示した(1)～(5)の順に記述すると以下の通りである。

(1) 高分子膜を利用したセンサーでは、カフェインセンサーの開発に成功した。本研究では、過去に報告されたカフェインセンサーの開発上の問題点を指摘し、カフェインセンサー開発で最も重要となるイオン交換体と膜溶媒の組み合わせを系統的に検討し、選択性に優れたセンサーを開発した（「5. 主な発表

論文等」〔雑誌論文〕の④を参照)。

(2) 酸素電極を利用したセンサーでは、活性酸素種の定量に焦点をあて、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンの新規計測法を開発した。酸素電極法によるヒドロキシルラジカルの定量は、マンニトールなどのヒドロキシルラジカルスカベンジャー存在下で酸素消費速度を測定することを原理としている。例えば、マンニトールの場合では、生成したマンニトールラジカルが酸素分子と反応して溶存酸素が減少することを利用している(「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の③を参照)。さらに、この研究を発展させ、酸素電極法によるスーパーオキシドアニオンの定量にも成功した。本研究は、短寿命ラジカルの計測を市販の酸素電極を用いて行った初めての研究であり、センサー開発の新しい展開になるものと期待している。

(3) カリウムイオンセンサーと光ファイバーを利用した分光法とを組み合わせたセンサーシステムでは、薬物による赤血球の溶血現象とカリウムイオンの流出を同時に測定し、薬物が細胞膜に開けたチャンネルサイズの定量に応用した。この研究は、センサー研究の新しい動向として注目論文として掲載された(「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の②を参照)

(4) ポルフィリン類による細菌の光不活性化機構を解明するために、細菌細胞質膜に対する作用をセンサーを用いて系統的に検討した。その結果、ポルフィリン類による光不活性化は、主に呼吸阻害による膜電位低下が引き金になっていることが示された。

(5) インドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬が引き起こす胃粘膜培養細胞膜障害に対する熱ショックタンパク質の保護作用は、抗炎症薬が細胞膜に対して引き起こす直接的な損傷とは無関係であることを明らかにした

(「5. 主な発表論文等」〔雑誌論文〕の①を参照)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

① Shintaro Suemasu, Ken-ichiro Tanaka, Takushi Namba, Tomoaki Ishihara, Takashi Katsu, Mitsuaki Fujimoto, Hiroaki Adachi, Gen Sobue, Koji Takeuchi, Akira Nakai, Tohru Mizushima, A role for HSP70 in protecting against indomethacin-induced gastric lesions, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol.284, No.29, 2009, pp.19705-19715

② Takashi Katsu, Shiho Okada, Tomonori Imamura, Keiko Komagoe, Kazufumi Masuda, Tsuyoshi Inoue, Satoshi Nakao, Precise size determination of amphotericin B and nystatin channels formed in erythrocyte and liposomal membranes based on osmotic protection experiments, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol.24, No.12, 2008, pp.1551-1556

③ Keiko Komagoe, Hiroaki Takeuchi, Takashi Katsu, Oxygen electrode as a new tool to evaluate hydroxyl radical-scavenging ability, *Sensors and Actuators B*, 査読有, Vol.134, No.2, 2008, pp.516-520

④ Takashi Katsu, Yumi Tsunamoto, Nobumitsu Hanioka, Keiko Komagoe, Kazufumi Masuda, Shizuo Narimatsu, A caffeine-sensitive membrane electrode: previous misleading report and present approach, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, Vol.620, No.1-2, 2008, pp.50-54

〔学会発表〕 (計12件)

- ① 駒越圭子、大腸菌外膜の透過性を亢進する物質の探索:アミジノ基を2個有する両親媒性物質、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山
- ② 加藤久登、カチオン性ポルフィリンによる細菌の光不活性化機構、第48回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2009年11月7日、徳島
- ③ 亀井里枝、アミジノ基を2個有する両親媒性物質の大腸菌外膜に対する作用、第48回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2009年11月7日、徳島
- ④ 勝 孝、赤血球及びリポソーム膜中に形成されたポリエーテル抗生物質のチャンネルサイズの定量、日本薬学会第129年会、2009年3月27日、京都
- ⑤ 駒越圭子、酸素電極を用いたスーパーオキシドアニオン消去剤の活性評価、日本薬学会第129年会、2009年3月27日、京都
- ⑥ 竹内宏明、3価鉄による過酸化水素の分解反応:酸素電極を用いたアプローチ、第47回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2008年11月9日、岡山
- ⑦ 宮本佳奈、ポルフィリンによる細菌の光不活性化:抗菌作用と膜電位低下との相関、第47回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2008年11月9日、岡山
- ⑧ 駒越圭子、酸素電極を用いたヒドロキシルラジカル消去剤の活性評価、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
- ⑨ 今村友則、浸透圧保護実験を利用したポリエーテル抗生物質のチャンネルサイズの定量、第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2007年11月10日、高知

- ⑩ 宮本佳奈、ポルフィリンによる細菌の光不活性化:細菌膜への作用機構の解明、第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2007年11月10日、高知
- ⑪ 竹内宏明、酸素電極を用いたヒドロキシルラジカル定量法の開発と消去剤の活性評価への応用、第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2007年11月10日、高知
- ⑫ 綱本優美、カフェイン電極:過去の報告に対する再評価と新規電極の開発、第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2007年11月10日、高知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝 孝 (KATSU TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号:40112156

(2) 研究分担者

駒越 圭子 (KOMAGOE KEIKO)

岡山大学・薬学部・技術専門職員

研究者番号:50437563