

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293028

研究課題名(和文) シグナル分子としてのNO・H<sub>2</sub>Sの光制御投与法の開発と疾患モデルへの応用研究課題名(英文) Photocontrol of NO and H<sub>2</sub>S treatment as signaling molecules and biological applications

研究代表者

中川 秀彦 (Nakagawa, Hidehiko)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80281674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ケージドNO化合物Flu-DNB-DBを合成し、培養細胞HCT116に投与し、近赤外フェムト秒パルスレーザーを照射によりNO放出することを示した。可視光ケージドNO化合物であるRol-DNBを合成し、細胞内に投与して530-590 nmの光を照射した場合に照射位置特異的にNO放出を起こすことを示し、培養細胞内でミトコンドリアに集積することを示した。さらに、黄緑色光照射によりRol-DNBからNOが放出されDrp-1に作用してミトコンドリア分裂が促進された可能性を示唆した。NOとは異なるガス状情報伝達分子であるH<sub>2</sub>Sについて、培養細胞に適用可能なケージドH<sub>2</sub>S化合物を開発した。

研究成果の概要(英文)：A caged NO molecule, Flu-DNB-DB, was developed and applied for cultured cells. When the cells loaded with Flu-DNB-DB was irradiated with near infrared femto-second pulse laser, NO release within the irradiated cells was observed. Another caged NO molecule, Rol-DNB, was developed. Rol-DNB was found to release NO upon photo irradiation at the range of 530-590 nm, yellow-green light, with spatiotemporal resolution. Rol-DNB was also found to be localized to mitochondria within the cells. It was demonstrated that NO release from Rol-DNB upon yellow-green light resulted in the enhancement of mitochondrial fragmentation depending on Drp-1 activation.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー ケージド化合物 薬学 有機化学 光スイッチ

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素(NO)は重要な生体因子であるが、反応性が比較的高く且つ常温常圧でガス状という扱いにくい性質を有する。近年、このような短寿命ガス状低分子化合物のいくつかが生体内で重要な生理・薬理作用を有することが報告され、「ガス状情報伝達分子」という新たな分子群として注目を集めている。NOの他、H<sub>2</sub>S、COなどが現在知られ、そこから派生する短寿命のONOO<sup>-</sup>やHNOも注目されている。これらは安定性・安全性から試薬として保管したり直接投与したりすることが難しい。そのため系中で目的の活性種を発生する「ドナー化合物」が開発され、現在ガス状情報伝達分子の研究ではドナー化合物が不可欠となっている。

一方、ケージド化合物は、生物活性化合物の活性部位を光解除性保護基で保護することでプロドラッグ化した化合物である。光照射によって脱保護され生物活性を発現する。このような性質からケージド化合物は生理活性物質を精密に制御する場合に有効である。ケージドグルタミン酸により神経伝達を精査したり、ケージド核酸を含むプラスミドにより遺伝子発現を光制御するなど、生物学研究で重要な手法になりつつある。

ガス状情報伝達分子のドナー化合物もケージド化合物の様に光制御できれば、生体内での活性種の挙動を再現したり、標的細胞でのみ作用させて生理活性を詳しく調べたりでき有用と考えられるが、わずかな実例しかなく(JBC 1994, 269,6282-6285, JACS 1997, 119, 3840-3841, JACS 2006, 128, 3831-3137)開発が進んでいない。

このような中、研究代表者はケージドガス状情報伝達分子の有用性に着目し、ケージドONOO<sup>-</sup>化合物(JACS 2012, 134, 2563-2568)、ケージドHNO化合物、ケージドNO化合物(JACS 2009, 131,7488-7489)等を開発し、成果を挙げた(Fig. 1)。

2. 研究の目的

本研究では、この成果に基づき、生体応用に適した長波長光で制御可能なNO、H<sub>2</sub>Sのケージド化合物を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに開発したケージドNO化合物、ケージドH<sub>2</sub>S化合物をもとに、長波長光で脱保護可能な化合物を開発した。具体的には次のように進めた。

既に開発したケージドNO化合物であるFlu-DNBを基に、長波長吸収が可能な構造変換を行った。特に、アミド結合をより剛直な二重結合に変換し、吸収極大の変化と光照射によるNO放出の相関を検証し、長波長作動型ケージドNO化合物を開発した(Fig. 2)。また、これまでの検討からニトロ基の転移・解裂によりNO放出がおこなることがわかって

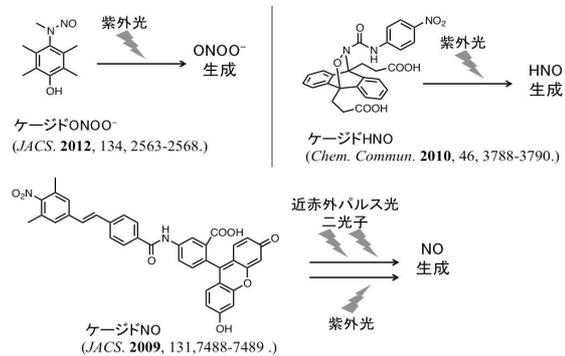


Fig. 1 申請者の開発した短寿命生物活性分子のケージド化合物あり、色素部とニトロ基部をより近づけた分子も検討した。さらに、フルオレセイン部(青色吸収)をローダミン構造(緑色吸収)に変換した化合物も検討した(Fig. 2)。一方、既に合成した光解除可能なケージドH<sub>2</sub>S化合物を基に保護基の変換等を行い、より効率の良いケージドH<sub>2</sub>S化合物を開発した。(Fig. 3)

4. 研究成果

(1) ケージドNO化合物

既に開発したケージドNO化合物であるFlu-DNBのアミド結合を単純な二重結合に変換し、電子の共役をより広くすることを狙った化合物Flu-DNB-DBを合成し、吸収スペクトルを測定するとともにNO放出能をESRスピントラップ法および、蛍光プローブ法を用いて検証した。その結果、二重結合に変換した化合物Flu-DNB-DBは、Flu-DNBと同様にUVA領域の光照射でNOを放出することに加えて、青色光照射でもわずかにNOを放出することが、ESRスピントラッピング法により確認された。

さらに、培養細胞HCT116に投与し、近赤外フェムト秒パルスレーザー(950nm)を照射すると、二光子励起に由来すると思われるNO

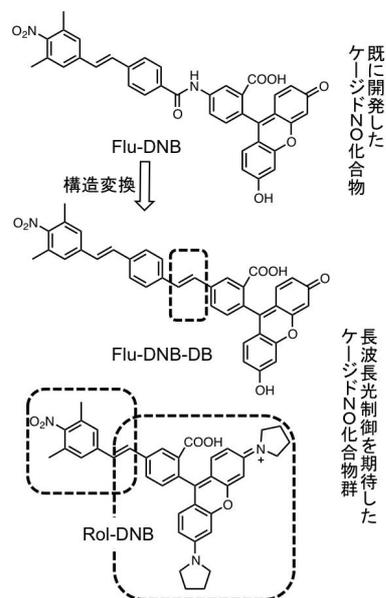


Fig. 2 ケージドNO化合物の長波長制御化合物への展開(分子設計)

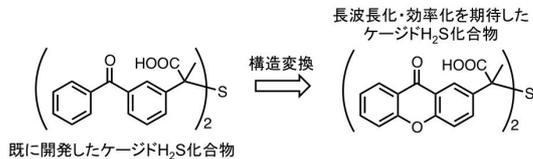


Fig. 3 ケージドH<sub>2</sub>Sの新規光制御化合物(分子設計)

放出が観測された (NO 蛍光プローブである DAR 4MAM を用いて計測した)。

一方、化合物の NO 放出部と光吸収部を短縮したケージド NO 化合物である RoI-DNB を合成し、吸収スペクトルを測定するとともに NO 放出能を ESR スピントラップ法および蛍光プローブ法で検証したところ、UVA 領域の光照射による NO 放出に加え、分子内色素構造である、ローダミン骨格が吸収する光波長域 (530-590 nm) の光を照射した場合にも NO 放出が観測された (ESR スピントラッピング法により確認した)。

さらに、RoI-DNB はローダミン骨格を分子内に有することから、細胞内での局在性に特徴を有する可能性を予測し、培養細胞 HCT116 に投与した後、共焦点蛍光顕微鏡でローダミン骨格に由来する蛍光を基に RoI-DNB の細胞内局在を観測したところ、予想通り、ミトコンドリアに集積することが示された。ミトコンドリアマーカー色素として知られる、MitoTracker Green FM(R)との共染色を行ったところ、共局在性を示す指標である Mander 係数は 0.956 であることが分かった。Mander 係数は、値が 1 に近いほど、良好な共局在を示すことから、RoI-DNB は非常に良好にミトコンドリアに集積していることが示された。次に、RoI-DNB を投与した培養細胞群について、蛍光顕微鏡を利用し、1細胞のみ光照射を行うと、照射した細胞でのみ NO の放出が確認された (NO 蛍光プローブである DAF-FM DA をもちいて観測した)。

RoI-DNB がミトコンドリアに集積することから、ミトコンドリアの分裂制御に関わる蛋白紙である Drp-1 の活性を NO 放出により制御できるか検証した。Drp-1 は活性中心に存在するシステイン残基が NO 等によりニトロシル化されるとミトコンドリア分断活性が上昇することが知られており、RoI-DNB によりミトコンドリアで NO 放出を行い、ミトコンドリア近傍の NO 濃度を一時的に上昇させることで、Drp-1 が活性化するのではないかと考えた。培養細胞 HEK293 にミトコンドリアでのみ GFP を発現するプラスミドを導入して一時的に形質転換し、ミトコンドリアのみ緑色の蛍光を発する培養細胞を用意した。この細胞に RoI-DNB を投与し、一部の細胞にのみ 530-590 nm の黄緑色光を照射すると、照射した細胞でミトコンドリアの分裂の促進が観測された。この分裂促進は、Drp-1 活性阻害剤である MIDI-1 によって有為に阻害されたことから、黄緑色光照射により、RoI-DNB から NO が放出され、Drp-1 に作用してミトコンドリア分裂が促進された可能性が示唆され

た。

## (2) ケージド H<sub>2</sub>S 化合物

NO とは異なるガス状態伝達分子である H<sub>2</sub>S について、開発したケージド化合物の効率化を行った。

既に開発したケージド H<sub>2</sub>S 化合物では、ベンゾフェノン骨格を有するケトプロフェン構造が、光脱保護反応の反応速度が速い光解除性保護基であることを利用し、ケージド H<sub>2</sub>S 化合物を開発したが、ベンゾフェノン部の吸収が 300 nm 付近であり、培養細胞系には適用が難しい化合物であった。そこで、ケトプロフェン誘導体と共に同様の早い光脱保護反応が報告されたキサントン誘導体を光解除性保護基として用い、培養細胞に適用例の多い 330-380 nm の紫外光 (UVA) によって、高効率のよい H<sub>2</sub>S 生成を起こすことが期待できる化合物を設計・合成した。

その結果、キサントン誘導体を用いた新たなケージド H<sub>2</sub>S 化合物は、330-380 nm 程度の光照射で効率よく H<sub>2</sub>S を放出することが判明した。培養細胞 HEK293 に、ケージド H<sub>2</sub>S 化合物とともに H<sub>2</sub>S 蛍光検出プローブである HSip-1 を投与し、1細胞のみを狙って 330-380 nm の光照射を行ったところ、予想通り、光照射した細胞でのみ H<sub>2</sub>S 放出を示す蛍光増大が観測された。これにより、キサントン誘導体を用いたケージド H<sub>2</sub>S 化合物が、培養細胞系で位置・タイミングを制御しながら H<sub>2</sub>S 投与を行える化合物として利用可能であ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15件)

1. Miriam M. Cortese-Krott, Gunter G. C. Kuhnle, Alex Dyson, Bernadette O. Fernandez, Marian Grman, Jenna F. DuMond, Mark P. Barrow, George McLeod, Hidehiko Nakagawa, Karol Ondrias, Peter Nagy, S. Bruce King, Joseph E. Saavedra, Larry K. Keefer, Mervyn Singer, Malte Kelm, Anthony R. Butler, and Martin Feelisch, Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, E4651-E4660 (2015) 査読あり DOI: 10.1073/pnas.1509277112
2. Naoya Ieda, Kazuhiro Hishikawa, Kei Eto, Kai Kitamura, Mitsuyasu Kawaguchi, Takayoshi Suzuki, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, Toshiaki Furuta, Jun-ichi Nabekura, and Hidehiko Nakagawa, A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section, Bioorg. Med. Chem. Lett., 25, 3172-3175, (2015) 査読あり DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.05.095

3. Naoki Fukushima, Naoya Ieda, Mitsuyasu Kawaguchi, Kiyoshi Sasakura, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, Naoki Miyata, and Hidehiko Nakagawa, Development of Photo-controllable Hydrogen Sulfide Donor Applicable in Live Cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, 175-178, (2015) 査読あり DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.11.084
4. Naoya Ieda, Yuji Hotta, Naoki Miyata, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa, Photomanipulation of Vasodilation with a Blue-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser, *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 7085-7091, (2014) 査読あり DOI: 10.1021/ja5020053
5. Naoki Fukushima, Naoya Ieda, Kiyoshi Sasakura, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, and Hidehiko Nakagawa, Synthesis of a photocontrollable hydrogen sulfide donor using ketoprofenate photocages, *Chem. Commun.*, 50, 587-589, (2014) 査読あり DOI: 10.1039/c3cc47421f
6. Hidehiko Nakagawa, Kazuhiro Hishikawa, Kei Eto, Naoya Ieda, Tomotaka Namikawa, Kenji Kamada, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, and Junichi Nabekura, Fine spatiotemporal control of nitric oxide release by infrared pulse-laser irradiation of a photo-labile donor, *ACS Chem. Biol.*, 8, 2493-2500, (2013) 査読あり DOI: 10.1021/cb400361m
7. Kodai Kawai, Naoya Ieda, Kazuyuki Aizawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata and Hidehiko Nakagawa, A Reductant-Resistant and Metal-Free Fluorescent Probe for Nitroxyl Applicable to Living Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12690-12696, (2013) 査読あり DOI: 10.1021/ja404757s
8. Hidehiko Nakagawa, Controlled Release of HNO from Chemical Donors for Biological Applications, *J. Inorg. Biochem.*, 118, 187-190, (2013) 査読あり DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2012.10.004

〔学会発表〕(計47件)

1. Hidehiko Nakagawa, Caged compounds for gaseous mediators, nitric oxide and hydrogen sulfide, and their biological applications, 3rd Bioscience and Biotechnology International Symposium, January 14, 2015, Tokyo Institute of Technology (Yokohama).
2. Hidehiko Nakagawa, Naoki Fukushima, Naoya Ieda, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Photo-inducible hydrogen sulfide releaser using ketoprofenate photocages, Third International Conference on H<sub>2</sub>S Biology and Medicine, June 4-6, 2014, Kyoto University Shiran Kaikan (Kyoto)
3. Kai Kitamura, Kazuhiro Hishikawa, Naoya Ieda, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa, A novel photocontrollable nitric oxide donor bearing 6-bromo-7-hydroxycoumarin structure as a photo absorbing group, The 6th

Joint Meeting of SFRRRA+J, 12 Sep.-14 Sept. 2013, The University of Sydney (Sydney)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: N-ニトロソアニリン誘導体、並びに、それを用いたNO発生剤及びNOの発生方法  
 発明者: 家田直弥、中川秀彦  
 権利者: 同上  
 種類: 特願  
 番号: 2013-234477  
 出願年月日: 2013年11月12日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/i-yaku/yakka.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 秀彦 (Nakagawa, Hidehiko)  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
 研究者番号: 80281674

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

家田 直弥 (Ieda, Naoya)  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号: 00642026

宮田 直樹 (Miyata, Naoki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・特任教授  
 研究者番号: 50114674