

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460036

研究課題名(和文)電気化学センサーを用いた薬物作用のin situモニタリング

研究課題名(英文)In situ monitoring of drug action using electrochemical sensors

研究代表者

勝 孝 (KATSU, Takashi)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：40112156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高感度・高選択性の微小化アセチルコリンセンサーを開発し、覚醒マウスの海馬におけるアセチルコリン濃度の変動をその場で追跡した。また、カリウムセンサーや酸素電極などの電気化学センサーを利用して、ポルフィリンやクロリン系光増感剤がいかに細胞膜を光不活性化するかを解明した。さらに、溶血活性の低い膜作用性抗菌物質(シクロデキストリン誘導体)や細菌膜に存在するメナキノンと相互作用し、細菌膜の透過性を亢進する新規抗菌物質(ライソシン)の作用機構解明にカリウムセンサー法が有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a miniaturized acetylcholine sensor with high sensitivity and high selectivity and applied it to monitor changes in the concentration of acetylcholine in the hippocampus of awake mice in situ. Also, we have applied electrochemical sensors, such as a K<sup>+</sup> sensor and an oxygen electrode, to analyze how porphyrin and chlorin dyes photoinactivate cell membranes. Furthermore, we have applied a K<sup>+</sup> sensor to cell membrane permeability assay to clarify the action mechanism of antimicrobial cyclodextrin derivatives with low hemolytic activity and a new antibiotic, lysocin, that targets menaquinone in the bacterial membrane.

研究分野：物理系薬学

キーワード：センサー アセチルコリン 海馬 覚醒マウス 光増感剤 光不活性化 シクロデキストリン ライソシン

## 1. 研究開始当初の背景

電気化学センサーのなかで、イオンを識別するセンサー（イオンセンサー）の開発はこれまで無機イオンを中心に行われてきており、生体内に存在する生理活性物質（有機イオン）を識別するセンサーの開発及びイオンセンサーの生細胞系への応用については研究例が少ない。センサー法は溶液の濁り・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、私達は特に薬物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。例えば、カリウムイオンセンサーを用いて、マストバランなどのヒスタミン遊離物質の肥満細胞、細菌、赤血球に対するカリウムイオン透過性変化を系統的に測定し、抗菌活性とヒスタミン遊離作用との相関性を詳細に検討した。また、酸素電極では呼吸障害、テトラフェニルホスホニウムセンサーでは膜電位変化を測定できることから、これらの電気化学センサーを利用して細菌に対するカチオン性ポルフィリンなどの光不活性化機構を解明した。そして、これらの研究を通じて、センサー法が薬物作用を解析するために有用なツールになることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、薬物作用解明のツールとなる電気化学センサー、特にイオンセンサーの開発とその応用に焦点をあてている。電気化学センサーを用いれば、細胞懸濁液中で「生きている」状態での反応がその場で測定できることから、様々な薬物作用を視覚的に捉えることができる。このような観点から、本研究では、高感度、微小化した電気化学センサーを細菌から神経細胞に至る様々な生体膜を標的とする薬物の作用機構の解明に応用し、センサー法を生物学領域への新しい研究手法として確立していくことを目的としている。具体的には、アセチルコリンセンサーを開発し、脳内アセチルコリン濃度測定への応用を進めるとともに、電気化学センサーを用いた色素による細胞膜の光不活性化機構の解明及び膜作用性薬物の抗菌作用発現機構の解明などを中心に研究を進めた。

## 3. 研究の方法

センサー開発では、脳内アセチルコリン濃度を計測するためにセンサーの微小化・高感度化を中心に進めた。具体的には、センサー膜は、イオン交換体（テトラキス[3,5-ビス(2-メトキシヘキサフルオロ-2-プロピル)フェニル]ホウ酸ナトリウム）、膜溶媒（2-フルオロ-2'-ニトロジフェニルエーテル）及びポリ塩化ビニルをテトラヒドロフランに溶解させた溶液を、内径0.2 mm、外径0.4 mmのテフロン製のチューブの先端に浸し、チューブ内に溶液を導入させ、その後テトラヒドロフランを蒸発させて作製した。一方、色素による細菌の光不活性化機構の解明には、カリウムイオンセンサー、酸素電極及びテトラフェニルホスホニウムセンサーを用いて、色素が細胞膜機能に及ぼす影響を膜透過性変化、呼吸障害及び膜電位変化の観点から検討した。さらに、カリウムイオンセンサーを膜作用性薬物の作用機構の解明に応用した。

カリウムイオンセンサーはバリノマイシンをイオノフォアとして、またテトラフェニルホスホニウムセンサーは[3,5-ビス(2-メトキシヘキサフルオロ-2-プロピル)フェニル]ホウ酸ナトリウムをイオン交換体として用いて作製した。酸素電極はパイオット社（東京）のポーラロ式のものを用いた。

## 4. 研究成果

(1) アセチルコリンセンサーの開発と応用：「研究の方法」の欄に記したセンサー膜を形成したテフロン製のチューブ内に入れる電解質溶液を検討した結果、低濃度のコリンを含む溶液の使用が最適であった。このセンサーは、生理食塩水中で  $0.3\mu\text{M}$  の検出下限を与えた。また、時間応答性を検討した結果、センサーの応答速度は 50 ミリ秒以内であり、既存の測定法に比較しても良好であった。次に微小化したアセチルコリンセンサーを用いて、脳内アセチルコリン濃度の *in situ* 測定を試みた。記憶・学習に重要な領域であり、てんかん発作の好発部位でもある海馬に着目し、覚醒マウスの海馬にアセチルコリンセンサーを設置した。海馬への投射部位として知られる乳頭体上核を抑制すると、海馬アセチルコリン濃度が上昇することを見出し

た。すなわち、乳頭体上核から海馬へは、アセチルコリン性神経伝達が存在することが明らかとなった。さらに、頭部固定下での自発性のアセチルコリン変動を測定したところ、時間と共にセンサー電位が低下することを見出した。

(2) 色素による細胞膜の光不活性化機構の解明：構造類似の一連のポルフィリン（プロトポルフィリン、メソポルフィリン、デューテロポルフィリン、ヘマトポルフィリン）及びクロリン系色素（クロリンe4、クロリンe6、タラポルフィンナトリウム）の細菌および赤血球膜に対する光不活性化作用を詳細に検討した。まず初めに、細菌に対する光不活性化作用を比較検討するために、カリウムイオンセンサー、酸素電極、テトラフェニルホスホニウムセンサーを用いて、それぞれ膜透過性亢進作用、呼吸阻害、膜電位変化を「その場」で測定した。これらのポルフィリン及びクロリン系色素が引き起こす光不活性化作用の強さは、細胞膜への進入能力の指標となる赤血球の形態をエキノサイト型に変化させる強さと、よい相関関係があることを見出した。一般に、エキノサイト型へ変形は、主に脂質二重層の外層部分に薬物が多く取り込まれることにより引き起こされる。したがって、脂質二重層の外層部分に主に存在するポルフィリン及びクロリン系色素が、この場所で光増感反応により一重項酸素を生成することで、膜機能に大きな損傷を与えると考えられた。細菌膜に対しても赤血球膜と同様の機構で膜機能を光不活性化すると推測された。一方、クロリン系色素のなかで、タラポルフィンナトリウムは、光線力学療法用剤として、レザフィリンの商品名でがん治療に臨床応用されているが、今回の結果から、細菌や赤血球の細胞質膜に対する光不活性化作用は弱いことが明らかとなった。レザフィリンは水溶性の光増感剤であり、細胞膜への移行性が低いため、作用が弱かったものと考えられた。

(3) 膜作用性薬物の抗菌作用発現機構の解明：新たに合成したシクロデキストリン誘導体の細菌に対する作用を直接的に評価するために、カリウムイオンセンサーを用いた膜透過性亢進作用の測定と生存率の評価を同時に行った。その結果、シクロデキストリン誘導

体が細菌膜の透過性を亢進する能力はシクロデキストリンに付加させたアミノ置換基と親水性-疎水性の適切なバランスに大きく依存することが明らかにされ、その解析を通じて細菌膜に選択的に作用する誘導体を見出すことができた。さらに、カイコを用いたアッセイ法から見出された新規抗生物質、ライソシンは細菌膜に存在するメナキノンと相互作用し、細菌膜の透過性を亢進することが示された。メナキノンは、細菌のエネルギー生産に関わる電子伝達の補因子であり、それを標的とする抗生物質の発見は初めてとなった。哺乳動物では、ユビキノンがメナキノンに代わる補因子として利用されており、そのため、ライソシンは哺乳動物には毒性を示さず、細菌に対してのみ効果を発揮することが明らかにされた。

(4) 酵素センサーの開発：その他、酵素センサー（グルコース及び乳酸センサー）の高感度化を過酸化水素の電気分解を促進させる触媒探索の観点から進めた。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者には下線）

〔雑誌論文〕（計3件）

加藤久登、駒越圭子、勝孝、片岡洋行、クロリンによる細菌および赤血球の細胞膜機能の光不活性化、就実大学薬学雑誌、査読有、Vol.3、2016、pp.37-46、<http://repository.shujitsu.ac.jp/metadata/172>

Hiroshi Hamamoto, Makoto Urai, Kenichi Ishii, Jyunichiro Yasukawa, Atmika Paudel, Motoki Murai, Takuya Kaji, Takefumi Kuranaga, Kenji Hamase, Takashi Katsu, Jie Su, Tatsuo Adachi, Ryuji Uchida, Hiroshi Tomoda, Maki Yamada, Manabu Souma, Kiroki Kurihara, Masayuki Inoue, Kazuhisa Sekimizu, Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane, Nature Chemical Biology, 査読有, Vol.11, No.2, 2015, pp.127-133, DOI:10.1038/nchembio.1710

Hatsuo Yamamura, Yuuki Sugiyama, Kensuke Murata, Takanori Yokoi, Ryuji Kurata, Atsushi Miyagawa, Kenji Sakamoto,

Keiko Komagoe, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, Synthesis of antimicrobial cyclodextrins bearing polyarylamino and polyalkylamino groups *via* click chemistry for bacterial membrane disruption, Chemical Communications, 査読有, Vol.50, No.41, 2014, pp.5444-5446, DOI:10.1039/c3cc49543d

〔学会発表〕(計 1 1 件)

藤井佐規子、浦川健太、佐田 渚、若狭綾香、勝 孝、井上 剛、アセチルコリンは海馬硬化症モデルのてんかんを制御する、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 29 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

加藤久登、中西由佳、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、クロリン系光増感剤による細菌の光不活性化、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸サンポーホール(兵庫県神戸市)

加藤久登、中西由佳、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、光線力学療法用剤であるフォトフリンによる抗菌作用、日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 17 日、広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)

浦川健太、若狭綾香、吉田 渚、勝 孝、井上 剛、アセチルコリン選択性電極の開発及び脳への適用、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

加藤久登、中西由佳、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、ポルフィリンオリゴマーによる細菌の光不活性化、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

加藤久登、中西由佳、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、ポルフィリンによる細胞膜機能の光不活性化、第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013 年 11 月 22 日、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)

藤原由貴、駒越圭子、井上 剛、黒田照夫、勝 孝、既存薬からの抗菌活性探索：膜

透過性亢進作用とその構造活性相関、第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013 年 11 月 22 日、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)

兵頭美保、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、細胞膜を標的とする生理活性ペプチドの作用：抗菌活性と膜透過性との関連、第 52 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、2013 年 10 月 27 日、松山大学(愛媛県松山市)

中西由佳、加藤久登、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、ポルフィリンによる細菌の光不活性化作用と赤血球の膜機能障害との相関性、第 52 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、2013 年 10 月 27 日、松山大学(愛媛県松山市)

山村初雄、宮川 淳、杉山祐樹、横井孝紀、村田健介、倉田龍二、坂本憲治、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、クリック反応で合成される膜傷害型抗菌シクロデキストリン、第 30 回シクロデキストリンシンポジウム、2013 年 9 月 12 日、くまもと県民交流館パレア(熊本県熊本市)

加藤久登、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、ポルフィリンによる細菌膜の光不活性化過程の *in situ* モニタリング、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 10 日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

勝 孝 (KATSU Takashi)  
安田女子大学・薬学部・教授  
研究者番号：40112156

### (2) 研究分担者

井上 剛 (INOUE Tsuyoshi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：40370134  
加藤 久登 (KATO Hisato)  
就実大学・薬学部・助手  
研究者番号：70639228