

令和元年6月12日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04124

研究課題名(和文) 金属錯体の反応性を駆使する小分子蛍光プローブの開発と生物応用

研究課題名(英文) Development of Small-molecule Fluorescent Probes Based on the Reactivity of Metal Complexes

研究代表者

人見 穰 (Hitomi, Yutaka)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：20335186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞がシグナルとして放出する過酸化水素を秒単位で可視化することのできる蛍光プローブを開発している。この蛍光プローブは錯体とプロ蛍光団とこれらを結ぶリンカーから成り立っている。本研究では錯体構造、プロ蛍光団、リンカーのそれぞれに改良を加えた。最も感度の良い過酸化水素蛍光プローブを用いた場合、EGF受容体を過剰発現していないHeLa細胞においても過酸化水素を検出できた。また、本錯体を利用し、細胞塊の低酸素領域において一酸化窒素の光放出が達成できることを証明した。また、錯体が還元的酸素活性化によってDNAを切断するメカニズムも解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体で酸化反応をつかさどる酵素の機能を人工的な小分子で再現することに成功している。本研究ではその機能を大幅に向上させることに成功した。これらの成果は、微量な過酸化水素を検出することが必要なあらゆる場所で役立つ。

研究成果の概要(英文)：We have developed a fluorescent probe that can rapidly visualize hydrogen peroxide released from cells as a signal. Fluorescent probes comprise complexes, profluorophores, and linkers linking them. In this study, the complex structure, profluorophore, and linker were improved. Hydrogen peroxide could be detected even in HeLa cells which do not overexpress the EGF receptor, when the most sensitive hydrogen peroxide fluorescent probe was used. In addition, it was shown that the emission of nitrogen monoxide could be achieved in the hypoxia region of cell spheroids by using MnNO complex. The mechanism by which the complex cleaves DNA by reductive oxygen activation was also elucidated.

研究分野：生物無機化学

キーワード：過酸化水素 細胞 蛍光プローブ 鉄錯体 反応 酸化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過酸化水素は生体に害を与える活性酸素の1つとして長く認識されてきた。しかし、過酸化水素が細胞の分化や成長、遊走に関わるシグナル分子として生産されることが明らかとなり注目を集めていた (Rhee, Science 2006)。例えば、上皮細胞の場合、上皮成長因子が受容体に結合することをトリガーとして、膜蛋白質である NADH オキシダーゼが活性化され、NADH オキシダーゼによって細胞の外に過酸化水素が生産され、この過酸化水素が水チャネル蛋白質アキュポリンを通り細胞内に流入するとされている。細胞内にはペルオキシレドキシシン等の過酸化水素を消去する抗酸化酵素が存在するにも関わらず、過酸化水素がどのようにして情報伝達物質として働くことができるのか未解明であったが、Woo らは、NADH オキシダーゼの近傍では、ペルオキシレドキシシンをはじめとする過酸化水素消去酵素群が不活性化されることを示し、細胞内で局所的に過酸化水素濃度が上昇するモデルを提案している (Woo ら Cell 2010)。

過酸化水素の生成と減衰過程および拡散過程 (細胞内流入や細胞外拡散) を可視化する過酸化水素プローブは、シグナル分子として生成する過酸化水素の動態を明らかにし、生命現象の解明と未知現象の発見に貢献すると期待される。しかし、既存の過酸化水素蛍光プローブは、過酸化水素に対する蛍光増強の応答時間が分オーダーと遅く ( $t_{1/2} = \text{ca. } 25 \text{ min}$ )、観測される蛍光強度の増大が過酸化水素の濃度増加によるものなのか、過酸化水素とプローブ分子との律速反応を観測しているのか判別することが困難である (Chang ら JACS 2004)。我々は、科研費 (基盤 C: H24-H26) の支援を受け、鉄錯体を過酸化水素との反応点とする高感度な過酸化水素蛍光プローブ MBFh (MBFh = Metal-based fluorescent probe for hydrogen peroxide) を開発していた。MBFh1 は過酸化水素と反応し、赤色蛍光物質レゾルフィンを生産する。その応答速度は秒オーダーであり、グルコースオキシダーゼが生産する過酸化水素の追跡が可能であった (Anal. Chem. 2012, 特願 2010-183083, PCT/JP2011/068360)。

更に、我々は水中でペルオキシダーゼ活性を示す鉄錯体を見出し (Dalton Trans. 2013)、この錯体をもとに、水中での安定性、過酸化水素特異性および反応速度を向上させた MBFh2 を開発していた。MBFh2 を用いた場合、上皮成長因子の刺激によって A431 細胞内に発生する過酸化水素の濃度上昇を捉えることができる (Chem. Commun. 2013, 特願 2012-186647, PCT/JP2013/070479)。しかし、MBFh2 と過酸化水素との反応に由来する赤色蛍光の上昇には数十分を要した。この結果は、過酸化水素が細胞内へ流入する速度が比較的遅いことを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では MBFh の機能向上とそれを基にした科学を推進するために次の課題に取り組んだ。

- (1) MBFh の応答速度は、過酸化水素を利用する酵素よりも 1,000 倍程度低いために、鉄錯体の配位子部分およびリンカー部位に改良を加え過酸化水素感度の向上を図った。
- (2) MBFh には様々な蛍光団を導入可能である。MBFh2 は赤色蛍光物質であるレゾルフィンを放出することができるが、レゾルフィンは細胞内を拡散、さらに細胞膜を透過し細胞外へ流出することが判明した。そのためレゾルフィン構造に改良を加え、細胞内滞在性の向上を図った。
- (3) MBFh の錯体部位に一酸化窒素を配位させると、暗所では安定であるが、近赤外光照射により一酸化窒素を放出することが判明していた。本錯体を用いて腫瘍モデル (細胞塊) の低酸素領域に特異的に光照射によって細胞毒性を有する一酸化窒素を放出することを目指した。
- (4) MBFh の錯体の存在下、酸素の還元的活性化あるいは過酸化水素の添加により DNA を酸化的に切断することが判明していた。酸化活性種とそのメカニズムの解明、さらに DNA 切断活性の向上を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) MBFh の鉄錯体と過酸化水素との反応性は錯体の電子状態によって決定される。電子状態に摂動を与える目的から、一連の置換基を導入した配位子を新たに合成し、その過酸化水素との反応効率と反応速度を蛍光強度とその時間変化により定量した。

錯体と過酸化水素との反応により生成する酸化活性種は、鉄錯体とプロ蛍光団とをつなぐリンカーの酸化によって達成される。その酸化位置が効果的でない場合は、プロ蛍光団から目的とする蛍光団が生成しない。最適なリンカー構造を求め、一連のリンカーを有する MBFh を新たに合成した。

(2) レゾルフィンが細胞外に流出することを確かめるために、アセチルメチルエーテル化したレゾルフィンを合成した。さらに、細胞外に流出する構造因子を明らかにするために pKa を決定した。これらのデータを基に塩素化レゾルフィンを複数、新たに合成し、その pKa と細胞外流出を評価した。

(3) 一酸化窒素錯体対イオン交換により疎水化し、生分解性ポリマー粒子の内部に取り込ませ、さらに IgG を修飾した。これをマクロファージに取り込ませ、マクロファージの走行性を利用して細胞塊の低酸素領域に移行させた。移行の割合は生分解性ポリマーに NO 錯体とともに取り込ませた希土類粒子の発光強度を利用し定量した。低酸素領域に移行したことを確認した後、赤外光を照射し生成する一酸化窒素を分析定量した。

(4) MBFh の鉄錯体部位が酸素活性化により DNA を酸化的に切断するメカニズムを解明するために、一連の置換基を有する鉄錯体を新たに合成し、その酸化還元電位と DNA 切断活性の相関を

明らかとした。また、過酸化水素と鉄錯体との反応混合物のイオンスプレー分子量測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ニトロ基を導入した場合に過酸化水素による蛍光強度と反応速度が最大となることが判明した。また、あらかじめ鉄錯体を形成させていなくとも、鉄イオンと配位子を水中で混合するだけで酸化活性を発現することを見出した。この時、鉄に対して配位子の割合を多くすることでさらに反応効率が向上することも見出している。錯体部位とプロ蛍光団をつなぐリンカー部位の構造に関しては、C2の長さを有するエチレン鎖がもっともよく、既報のものよりも数十倍反応効率と反応速度が向上することが判明した。これらの結果は、高感度なMBFhを設計する重要な指針となる。

(2) 決定したレゾルフィンのpKaは7付近であり、細胞内では電荷持たないプロトン化体として存在することが判明した。pKaを低下させることができれば、細胞内の形態をすべてアニオン型とすることで細胞内の滞在性が向上すると考え、モノクロレゾルフィン、および、ジクロレゾルフィンを合成した。これらをアセチルメチルエーテル化し、HeLa細胞を用いて細胞内の滞在時間を定量評価した結果、ジクロレゾルフィンでは細胞外への流出が認められないことが判明した。しかし、なお細胞内での拡散が問題になるために、新たな分子の探索が必要なものも判明した。

(3) 一酸化窒素錯体と希土類発光粒子とを内包した生分解性ポリマー粒子をマクロファージが貪食により取り込み、細胞塊の内部の低酸素領域に遊走することを突き止めた。さらに、赤外光の照射により低酸素領域特異的に一酸化窒素を放出できることを見出した。今回、一酸化窒素によって細胞死を誘起することはできなかったが、MBFhなどのプローブ分子を細胞塊の内部の低酸素領域に送達する重要な手法を確立したと言える。

(4) MBFhの錯体部位の存在下、酸素の還元的活性化によりプラスミドDNAが切断される。このメカニズムを解明するために、酸化還元電位の異なる4つの錯体を調製し、DNA切断速度を比較した結果、還元されやすくなるほどDNA切断速度が向上することが判明した。また、過酸化水素との反応により鉄3価ヒドロペルオキシド錯体を生成することも分子量測定および電子スピン共鳴測定により明らかとなった。過酸化水素を用いてもDNAの切断活性が認められ、酸素の還元的活性化の場合と同じく、還元されやすくなるほどDNA切断速度が向上した。これらの結果から、本錯体は抗腫瘍薬として知られるプレオマイシンと同じ反応機構でDNAを切断すると結論付けた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Michael A. Evans, Po-Ju Huang, Yuji Iwamoto, Kelly N. Ibsen, Emory M. Chan, [Yutaka Hitomi](#), Peter C. Ford, and Samir Mitragotri  
Macrophage-Mediated Delivery of Light Activated Nitric Oxide Prodrugs with Spatial, Temporal and Concentration Control  
Chemical Science, 2018, 9, 3729-3741  
DOI: 10.1039/C8SC00015H  
査読有

Asami Muraishi, Emi Haneta, Yoshiro Saito, [Yutaka Hitomi](#), Mamoru Sano, and Noriko Noguchi  
Hydrogen peroxide-reducing factor released by PC12D cells increases cell tolerance against oxidative stress  
Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2018, 41(5) 777-785.  
DOI:10.1248/bpb.b18-00016  
査読有

Akiko Nomura, Masahito Kodera, and [Yutaka Hitomi](#)  
Development of Artificial Bleomycin: Pentadentate Monocarboxylamide Ligand Having a Spermine Tail for DNA Binding  
Peptide Science 2017, 2018, 154-155.  
査読有

Natsumi Ohashi, Akiko Nomura, Masahito Kodera, and [Yutaka Hitomi](#)  
Structurally Simple Cell-permeable Porphyrins: Efficient Cellular Uptake and Photo-toxicity of Porphyrins with Four Peripheral Primary-amine-terminated Oligo(ethylene oxide) Chains  
Chemistry Letters, 2017, 46(12), 1754-1756.  
DOI: 10.1246/cl.170821

査読有

Akiko Nomura, Yuji Iwamoto, Kengo Arakawa, Akihiro Kashida, Masahito Kodera, and Yutaka Hitomi

DNA Cleavage through Reductive Dioxygen Activation by Iron-Bleomycin Mimics with Carboxamido Ligation: Correlation between DNA Cleavage Efficacy and Redox Potential  
Chemistry Letters, 2017, 46(8), 1109-1111.

DOI:10.1246/cl.170354

査読有

人見 穰

"鉄オキソ種により選択的に不活性 C-H 結合を酸化する触媒の設計"  
ファルマシア, 日本薬学会, 2017, 53(9), 870-874.

DOI: 10.14894/faruawpsj.53.9\_870

査読無

[学会発表](計 33 件)

人見 穰、生体酵素のストラテジーから学ぶ選択酸化触媒のデザイン、先端化学・材料技術部会高選択性反応分科会講演会、2016 年

Yuji Iwamoto, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Generation of Reactive Oxygen Species by Iron- and Manganese-based SOD Mimics, 42th International Conference on Coordination Chemistry, 2016 年

Yutaka Hitomi, Bioinspired Mononuclear Nonheme Iron Complexes for Detection of Hydrogen Peroxide inside Living Cells, 42th International Conference on Coordination Chemistry, 2016 年

Yutaka Hitomi, Bioinspired Iron Catalysts for Selective Alkane Hydroxylation  
1st Japan-Australia Joint Symposium on Coordination Chemistry, 2016 年

岩本勇次, 小寺政人, 人見 穰, 水溶性コバルトポルフィリンを触媒とする光水素発生  
第 118 回触媒討論会、2016 年

松井美咲, 湯村尚史, 若杉隆, 人見 穰, 塩田淑仁, 吉澤一成、窒素含有鉄オキソ錯体を触媒とするメタン C-H 結合活性化に関する速度論的同位体効果、第 10 回分子科学討論会、2016 年

Yutaka Hitomi, Novel Iron-based Superoxide Dismutase Mimics, Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium, 2016 年

Akiko Nomura, Akihiro Kashida, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Cellular applications of cell-membrane permeable fluorescent zinc ion probes having a cationic peptide tail, 53rd Japanese Peptide Symposium, 2016 年

Yutaka Hitomi, Synthetically and Biologically Useful Molecules Based on Bioinspired Complexes, 1st Nano/Bioscience International Symposium, 2016 年

大橋なつみ, 小寺政人, 人見 穰, 高い細胞内集積効果を示すポルフィリンの開発 細胞内移行および光毒性と構造との相関研究、CSJ 化学フェスタ 2016、2016 年

Yutaka Hitomi, BIOLOGICALLY USEFUL FUNCTIONAL MODELS OF METALLOENZYMES, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2016 年

Eisuke Masuda, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Acid-Promoted Selective Alkane Oxidation with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Manganese Complexes, The 4th International Symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, 2016 年

Minami Hiramatsu, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Preparation and Reactivity of Nonheme Oxoiron(IV) Species in Aqueous Solution, The 4th International Symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, 2016 年

Ryo Yamamura, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Cation Recognition of Schiff-base Complexes Having a Crown-ether-like Cavity, The 4th International Symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, 2016 年

人見穰, 金属オキソ種を活性種とする選択的アルカン酸化の開発から過酸化水素蛍光プローブまで, 第 500 回東北大学大学院薬学研究科セミナー、2017 年

Koji Yamaoka, Kosuke Kumazaki, Sachi Saito, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Development of Selective Oxidation Catalyst Based on Stimuli-Responsive Mononuclear Nonheme Complex, The 2nd International Symposium on Stimuli-responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, 2017 年

吉澤直志, 山村諒, 小寺政人, 人見穰, 環状オリゴオキシエチレン基を有する Schiff 塩基金属錯体によるカチオン認識, 第 15 回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム、2017 年

奥田夏未, 小池 巧真, 小寺政人, 人見穰, PEG 化マンガンポルフィリンの抗酸化活性, 第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2017 年

岩本勇次, 加藤俊介, 小寺政人, 小野田晃, 林高史, 人見穰, 単核非ヘム鉄錯体の抗酸化活性とアルブミンの添加効果, 第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2017 年

野村章子, 奥田夏未, 岩本勇次, 加藤俊介, 小寺政人, 小野田晃, 林高史, 人見穰, 鉄ブレオマイシン機能モデル錯体を用いた酸素の還元的活性化による酸化的 DNA 切断, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年

⑲ 人見穰, カルボキサミド配位単核非ヘム鉄錯体を用いた選択酸化触媒の開発, 第 120 回触媒討論会、2017 年

⑳ Akiko Nomura, Ryosuke Sakai, Yuji Iwamoto, Masahito Kodera, Yutaka Hitomi, Development of artificial bleomycin analogue: Pentadentate carboxamide ligand having spermine moiety for DNA binding, 54th Japanese Peptide Symposium, 2017 年

㉑ Yutaka Hitomi, Site-Selective C-H Bond Oxidation Catalyzed by Mononuclear Nonheme Iron Complexes: Additive Effects of Carboxylic Acids, 2017 DGIST Global Innovation Festival, 2017 年

㉒ Yutaka Hitomi, Generation of Hydrogen Peroxide by Functional Model Complexes for Superoxide Dismutase, EWHA Bioinorganic Chemistry Symposium 2017, 2017 年

㉓ Yutaka Hitomi, Development of Selective Oxidation Catalyst Based on Stimuli-Responsive Mononuclear Nonheme Complex, International Congress on Pure & Applied Chemistry 2018, 2018 年

㉔ 野村章子, 坂井僚介, 岩本勇次, 小寺政人, 人見穰, DNA 二重鎖を切断する人工ブレオマイシンの合成, 日本薬学会 第 138 年会, 2018 年

㉕ Yutaka Hitomi, Selective Alkane Oxidation Catalyzed by Mononuclear Nonheme Iron Complex, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, 2018 年

㉖ 野村章子, 坂井僚介, 小寺政人, 人見穰, ブレオマイシン機能モデル系における鉄(III)ヒドロペルオキシド種の解析, 第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年

㉗ 山岡功二, 森川直人, 吉澤直志, 竹林大貴, 上田純平, 和村聡士, 小寺政人, 人見穰, アニオン性カルボキサミド配位金属錯体を触媒とする選択酸化反応, 第 122 回触媒討論会、2018 年

㉘ Yutaka Hitomi, Development of Oxidation Catalysts Based on Bio-inspired Iron Complexes The 25th International SPACC Symposium, 2018 年

㉙ Yutaka Hitomi, DEVELOPMENT OF USEFUL FUNCTIONAL MOLECULES BASED ON BIOINSPIRED COMPLEXES, 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2018 年

③② Yutaka Hitomi, Detection and Generation of Hydrogen Peroxide by Functional Model Complexes, Nanyang Technological University, CBC SEMINAR, 2018 年

③③ 重松肇, 宮地亮介, 小寺政人, 人見穰, 鉄錯体を反応サイトとする過酸化水素蛍光プローブの開発, 日本化学会第 99 春季年会、2018 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。