

令和元年6月2日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06580

研究課題名(和文) 脂質過酸化物質アクロレインを標的とした機能性蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of fluorescent probes for acrolein, a product of lipid peroxidation

研究代表者

佐々木 栄太 (Sasaki, Eita)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：00803157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生体内で生成するアクロレインとの反応によって蛍光特性に変化が生じる機能性小分子の設計と合成を行った。まず、アジド基を蛍光色素の共役系炭素原子に直接結合した化合物を合成し、ニトロベンゾオキサジアゾール骨格を用いた場合において、アクロレインとの反応生成物のみが蛍光を発するような蛍光検出条件を設定可能であることを見出した。しかし、これらのアジド基には安定性などの面で問題も見られた。そこでさらに、スルファニル基によるアクロレインへのマイケル付加反応を利用した蛍光プローブについても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生細胞内でのアクロレインのイメージングを可能とする分子プローブの開発を行うものである。生体内で生じるアクロレインは、生活習慣病や癌、そして老化とも密接に関わる危険因子として注目されている。したがって、アクロレインの生成を高感度に検出・イメージングすることができれば、これらの疾病や加齢のメカニズム研究、予防、診断などの役に立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized functional fluorescence probes whose spectroscopic properties are altered upon reaction with acrolein, a reactive aldehyde species produced in vivo. One of the designed probes possessing a 7-nitrobenzoxadiazole scaffold with aryl azide substituent reacted with acrolein. Since the reaction product showed substantially red-shifted absorbance spectrum, it is possible to excite only the product in the measurement of fluorescence to detect acrolein. However, these azide-based fluorescence probes were not very stable and converted to the corresponding amino compounds over time. Thus, we also investigated and designed another type of fluorescence probes by using Michael addition of a sulfhydryl group to acrolein.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ アクロレイン 脂質過酸化物質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体を構成する必須分子である脂質が酸化ストレスを受けることによって生じる $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド構造を持つ分子種は、生活習慣病や癌、そして老化とも密接に関わる危険因子として注目されている。近年では、これら高反応性脂質アルデヒド分子種がタンパク質の特定アミノ酸残基を化学修飾することによって、様々な生理現象に影響を与えることが示唆されている。また、C3の炭素鎖長をもつ $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド分子であるアクロレインによって化学修飾を受けたタンパク質は、各種疾患のマーカーとしても利用されている。通常アクロレイン-タンパク質複合体の検出には、これを特異的に認識する抗体が用いられる。また、アクロレインの従来の検出法・定量法としては、フェニルヒドラジンとの反応で誘導体化した後に高速液体クロマトグラフィーで検出する方法や、アニリン、フェニレンジアミン誘導体などを用いた蛍光検出法等が報告されている。しかしながらこれらの検出方法は、アクロレインを含む $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド分子種の生体内での詳細な動態は明らかにするには不十分であり、生理的条件下、高感度かつ高時空間分解能で当該物質を検出・可視化する方法の開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド構造を持つアクロレインの化学反応性に着目し、アクロレインと反応して蛍光性を獲得する機能性小分子プローブを開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究を達成するためには、アクロレインと速やかに反応し、反応後に蛍光特性が変化するような機能性小分子の設計が求められる。近年、フェニルアジドがアクロレインと選択的に反応するということが見出され(図 1A)、生細胞系におけるアクロレイン生成の蛍光観察へと応用された(Pradipta, A. R. *et al.* *ACS Sens.*, **2016**, *1*, 623-632)。同様の反応を利用して、アジド基を蛍光色素の共役系炭素原子に直接結合すれば、アクロレインとの反応前後で蛍光特性が変化する分子を創り出すことができるのではないかと考えた。そこでまず、小分子蛍光プローブの基本構造として

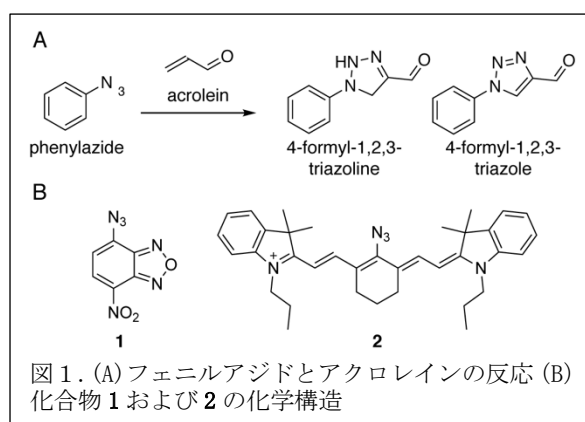


図 1. (A) フェニルアジドとアクロレインの反応 (B) 化合物 1 および 2 の化学構造

よく利用されているニトロベンゾオキサジアゾールやシアニン色素にアジド基を導入した化合物 1 および 2 (図 1B) を合成し、アクロレインとの反応前後での光学的特性を検討した。具体的には、市販の 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンおよび IR-780 ヨウ化物をアセトンまたはメタノールに溶解し、アジ化ナトリウムを加えることで、1 および 2 を合成した。精製した化合物を核磁気共鳴(NMR)装置や質量分析器で確認した後に、アクロレインとの反応物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。また、アクロレインとの反応前後での光学特性を分光光度計、蛍光光度計を用いて分析した。

(2) アジド基とアクロレインとの反応性を検討するために、フェニルアジドおよび 7 種のフェニルアジド置換体 (3-9) を合成した。具体的には、アニリンおよび対応するアニリン置換体を原料として、塩酸を含む水溶液中で冷却下亜硝酸ナトリウム水溶液を滴下し、続いてアジ化ナトリウムを加えることで目的物を合成し、NMR による確認を行なった。これらのフェニルアジド置換体とアクロレインをジメチルスルホキシド中で混合し、反応容器内をアルゴンガスで置換した後に室温で 2 時間反応させた。反応溶液を HPLC によって分析し、原料および生成物 (対応するトリアゾリン体、トリアゾール体) のピーク面積を算出した。

(3) 蛍光プローブに汎用されている色素であるフルオレセインやローダミンに含まれるキサンテン骨格 9 位への求核攻撃は、分子内共役系の切断とそれに伴う吸収波長の変化及び蛍光の消失をもたらすことが知られている。例えばこれを利用した蛍光プローブとして、次亜塩素酸検出蛍光プローブ (HySox) が報告されている (Kenmoku, S. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7313-7318)。HySox は分子内のスルファニル基がキサンテン骨格 9 位と結合したスピロ環化合物である。一般に、チオール類はその高い求核性により、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド構造と速やかに反応し、マイケル付加体を生じる。したがって、スピロ環構造を形成しているスルファニル基が $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和アルデヒド (アクロレイン) と反応することで環構造が解放されれば、キサンテン骨格の共役が回復し、蛍光を発することを予想された。これを確かめるために、市販の HySox を 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) に終濃度 5  $\mu$ M となるように溶解し、アクロレインを終濃度 5, 25, 50, 75, 150, 200, 300, 500, 1000 mM となるように加えた時の蛍光強度 (励起波長: 553 nm, 蛍光波長: 574 nm) の時間変化を蛍光光度計を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 合成・精製した化合物 **1** をテトラヒドロフラン中アクロレインと混合したところ、HPLC で反応が確認された。ここでの生成物は後述するアジド基の光による分解物とは異なることを確認しており、化合物 **1** のトリアゾール誘導体であると考えられる。生成物の溶出面分を分取精製し、その光学特性を化合物 **1** と比較した。それぞれの吸収スペクトルを測定したところ、アクロレインとの反応によって極大吸収波長が 385 nm から 465 nm へと大きく長波長側へシフトしていた (図 2A)。また、蛍光スペクトルの測定によって、アクロレインとの反応物は極大蛍光波長 536 nm の蛍光を発することを観測した (図 2B)。以上の結果により、450 nm 以上の適切な励起波長を選択することによって、アクロレインとの反応生成物のみが蛍光を発するような蛍光検出条件を設定可能であることがわかった (図 2B)。

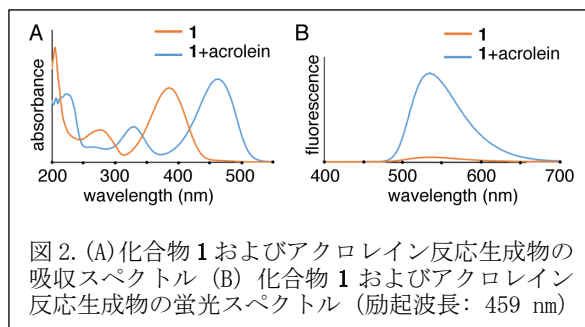


図 2. (A) 化合物 **1** およびアクロレイン反応生成物の吸収スペクトル (B) 化合物 **1** およびアクロレイン反応生成物の蛍光スペクトル (励起波長: 459 nm)

化合物 **2** についても合成・精製後、メタノール中でアクロレインを加えたが、その光学特性に大きな変化は観察されなかった。したがって、当化合物においては、アジド基とアクロレインとの反応効率をさまざまな反応条件で試した。その過程で、N,N-ジメチルホルムアミド、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリルなど、多くの溶媒下で化合物 **2** のスペクトルに継時的な変化 (極大吸収波長 774 nm の減少と極大吸収波長 642 nm の増大) を観測した。当スペクトル変化はアクロレイン無添加であっても引き起こされたことから、化合物 **2** の分解反応が起こっていることが予想された。実際にスペクトルの変化は光により加速され、各種測定によって化合物 **2** のアジド基がアミノ基へと変換されていることが確認された。

上記結果に基づき、化合物 **1** についてもアジド基の安定性を試験した。化合物 **1** については、メタノール溶液中でも室内灯下で吸収スペクトルの変化 (極大吸収波長 385 nm の減少と極大吸収波長 455 nm の増大) が観測された (図 3A)。各種測定によって、化合物 **1** においてもそのアジド基がアミノ基へと変換されていることが確認された。また、同様のスペクトル変化 (極大吸収波長 385 nm の減少) を水中、テトラヒドロフラン中でも観測した (図 3B)。以上の結果により、アジド基を用いたアクロレイン検出蛍光プローブをより実用化に近づけるためには、アジド基の安定性の改良が必要であることが示唆された。

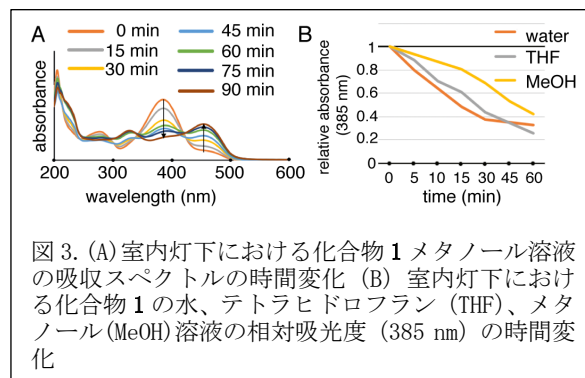


図 3. (A) 室内灯下における化合物 **1** メタノール溶液の吸収スペクトルの時間変化 (B) 室内灯下における化合物 **1** の水、テトラヒドロフラン (THF)、メタノール (MeOH) 溶液の相対吸光度 (385 nm) の時間変化

(2) 化合物 **2** を用いた実験の結果から、アジド基とアクロレインとの反応性についてもより詳細な事前検討を行う必要があると考え、フェニルアジドの他、ベンゼン環上に電子供与基や電子吸引基を有する各種フェニルアジド置換体 (**3-9**, 図 4) を合成した。一定条件下でアクロレインと反応させ、反応後の原料に対する生成物 (対応するトリアゾリン体、トリアゾール体) の比を HPLC のピーク面積から算出することで反応性を比較した。その結果、得られた生成物の比はフェニルアジド 19% に対して、化合物 **3**: 0%, **4**: 2%, **5**: 14%, **6**: 8%, **7**: 7%, **8**: 4%, **9**: 9% という結果であり、今回検討した条件下において化合物 **3-9** はいずれもアクロレインとの反応性がフェニルアジドよりも低下していた。電子供与基、電子吸引基のいずれの置換基においても反応性の向上が見られなかったことから、アジド基とアクロレインの反応性の知見を蛍光プローブに応用するためには、さらなる検討が必要であると考えられる。

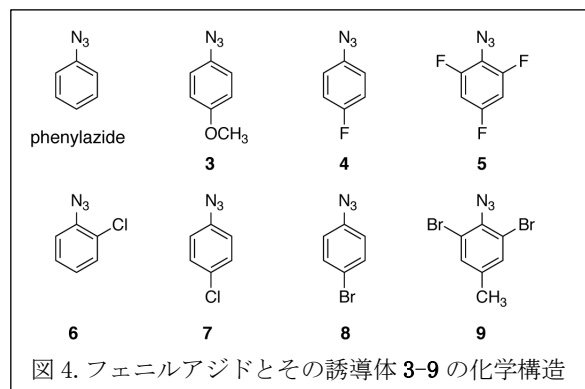


図 4. フェニルアジドとその誘導体 **3-9** の化学構造

(3) アジド基の安定性やアクロレインとの反応性に関する上記の結果を受けて、アジド基を反応部位とする当初の分子設計とは異なるアクロレイン蛍光検出プローブの創出も試みた。まずは、分子内のスルファニル基がキサントゲン骨格 9 位と結合したスピロ環化合物に注目し、次亜塩素酸検出蛍光プローブとして報告されていた HySox とアクロレインとの反応を検討した。リン酸緩衝液に溶解した HySox にアクロレインを加えると、予想通り 574 nm を極大とする蛍光強度の上昇が観測された (図 5)。しかし、その反応速度は遅く、反応が十分に進行するためには高

濃度のアクロレインが必要であった。試験的実験として、過酸化水素を細胞に加えた時のアクロレイン生成の検出を試みたが、蛍光強度の上昇は観察されなかった。以上の結果より、生細胞から産生されるアクロレインをイメージングするためには、より高いアクロレインとの反応効率が要求されることは明らかである。そこで、HySO<sub>x</sub>の基本骨格テトラメチルローダミンよりもキサンテン骨格9位の求電子性を低下させた構造を新たに考案した。当化合物は分子内のスルファニル基によるキサンテン骨格9位へのスピロ環化反応がHySoxの場合よりも起こりにくくなるため、スルファニル基とアクロレインとの反応速度の向上が期待できる。現在は、当分子を含む複数の高反応性脂質アルデヒド分子種を標的とした蛍光プローブの合成を進行中である。

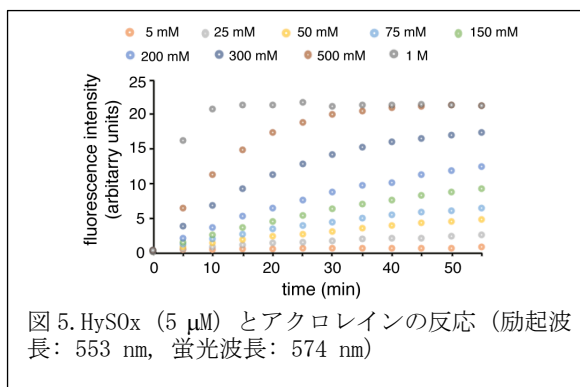


図 5. HySO<sub>x</sub> (5 μM) とアクロレインの反応 (励起波長: 553 nm, 蛍光波長: 574 nm)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/foodchem/>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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。