

令和元年6月24日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19207

研究課題名（和文）ヘムのケミカルバイオロジー研究推進を指向した基盤技術の創出

研究課題名（英文）Basic study for chemical biology of heme

研究代表者

平山 祐（Hirayama, Tasuku）

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10600207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、動植物から菌類にいたるあらゆる生命体において重要な役割を持つヘムの生体内挙動・生命機能の解明を目指し、生体内のヘムおよび関連分子を非侵襲的かつ選択的に検出するための蛍光プローブ分子を開発し、これまで詳細な解析が困難であったヘムの細胞内輸送、取り込み、動植物個体における挙動や機能について、その全容解明を目的とした研究に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで解析が困難であったヘムの生体内動態を簡便に検出できる新しい化合物を開発し、ヘムの生命科学研究を推進しようとするものである。本研究期間においては、新しいヘム選択的蛍光応答を得るための化学構造要件を見出し、これを使った蛍光プローブの開発を達成した。まだ改善の余地はあるものの、世界で初めてのヘム鉄選択的蛍光プローブであり、本化合物が、今後のヘム研究に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research is to reveal the biological behavior and functions of heme, which plays a variety of essential roles in biological systems ranging from plants and animals to bacteria, on the basis of newly developed fluorescent probes to detect heme non-invasively and selectively. In this research project, we tried to study the heme biology, which has been hard to investigate in detail.

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 ヘム鉄 イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘムは地球上に存在するほぼ全ての動植物・細菌類に含まれ、光合成、エネルギー産生、酸素運搬、酵素活性等、鉄補欠因子族として様々な機能を示す。また、ヘム結合により活性が制御される Bach1 や FBXL5、IRP2 等に見られるように、ヘム自体が細胞シグナル因子として機能することも知られている (*Cell Signal.*, 2012, 24, 981)。生体内のヘムを検出するには、生体組織や細胞を破碎し、そこからヘムを抽出して比色定量を行なう、という手法が従来の主流であった。しかしながら、この方法では生細胞内のヘムをリアルタイムで検出することは不可能であり、実際、ヘム自身の細胞内動態・局在については現在もほとんどが不明なままである (図1)。最近、蛍光タンパク質とヘム結合性タンパク質を融合したヘムセンサー分子が開発されたが (*ACS Chem. Biol.*, 2015, 10, 1610)、50 kDa を超える分子量と遺伝子操作の必要性からネイティブ細胞では使えない等、使用範囲が限られており、生きた細胞中で簡便にヘムを検出できるヘム蛍光プローブの開発が強く望まれていた。

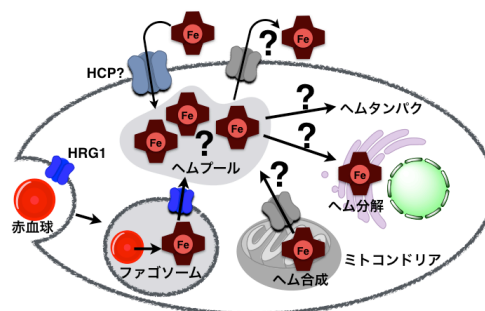


図1. ヘムの細胞内代謝経路の概略図。HRG: Heme permease 1. HCP: Heme carrier protein.

2. 研究の目的

本研究では、あらゆる生命体に必須であり、非常にユニークな構造、化学反応性を示す生体内化学種であるヘムの生体内挙動の解明を目指し、生体内のヘムおよび関連分子を非侵襲的かつ選択的に検出するための多様な蛍光プローブ分子を開発することを目的とした。また、これまで詳細な解析が困難であったヘムの細胞内輸送、取り込みをはじめとする生体内挙動あるいは機能について、その全容を解明することを最終目的とし、研究を実施した。

3. 研究の方法

■ヘム選択的蛍光プローブの開発

本研究では、遊離の鉄(II)イオンとヘムを区別して検出可能な化学構造を確立する。研究代表者ははこれまでに鉄(II)イオンによる三級アミンN-オキシドの脱酸素化反応を利用し、様々な鉄(II)イオン蛍光プローブを設計・開発してきた。その中には、鉄(II)イオンに対して不活性あるいは低活性なものも含まれる。そこで、これまでに合成したN-オキシド化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、ヘム鉄に選択的に蛍光応答を示す化合物を見出すこととした。さらに、得られた化合物を使った細胞イメージング実験により、生細胞内でのヘムイメージングを試みた。

4. 研究成果

■ヘム選択的蛍光プローブの開発

これまで当研究室では、様々なN-オキシド型鉄(II)イオン蛍光プローブ分子を開発してきた。その一連の化合物について、ヘム鉄と鉄(II)イオンに対する応答性をスクリーニングしたところ、RhoNox-1を含む既報の鉄(II)イオン検出プローブ (*Chem. Sci.*, 2013, 4, 1250; *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12, 6590; *Chem. Sci.* 2017, 8, 4858) は鉄(II)イオンに対して応答したのに対し、いくつかの化合物については、鉄(II)イオンに対して全く応答しないにもかかわらず、ヘム鉄にのみ応答するものが見つかってきた (図

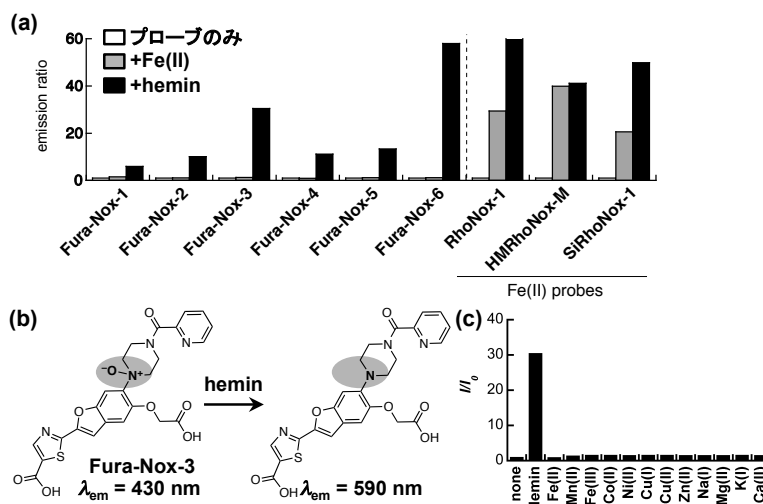


図2. (a) これまでに開発した蛍光プローブと新規Fura-Noxシリーズの鉄(II)イオンとヘム(hemin)に対する蛍光応答性の比較。RhoNox-1、HMRhoNox-M、SiRhoNox-1はこれまでに開発した鉄(II)イオン蛍光プローブ。白色: プローブのみ、灰色: 鉄(II)イオン(20 μM)添加時の蛍光応答、黒色: ヘム(hemin, 5 μM)添加時の蛍光応答。(b) 今回開発したFura-Noxシリーズのうち、最も物性・ヘム選択性の高かったFura-Nox-3の構造と応答機構。ヘムとの反応に伴って蛍光波長が変化する。(c) Fura-Nox-3の金属選択性試験。ヘムに対してのみ応答することが見て取れる。

2a)。中でも、Fura-Nox と命名したベンゾフラン骨格を有する化合物群については、ヘム鉄への選択的な応答性が共通して観察された (図 2a 黒色バー)。また、Fura-Nox-3 は水溶性、ヘムへの蛍光応答性、金属イオン選択性ともに良好なデータを示し、小分子化合物としては初めてのヘム選択的蛍光プローブとしての機能を達成した。そこで、Fura-Nox-3 をもとにして、細胞イメージング試験へと展開した。まず、Fura-Nox-3 自体はカルボン酸基を 2 つ、さらにピリジン環を一つ有するため、水溶性が高く、細胞への取り込みは期待できなかったことから、カルボン酸のエステル化とピリジル基を持たない化合物への変換について、ヘムへの応答性を指標とした構造活性相関を実施した。その結果、ピペラジン環をモルホリンに変換しても機能することを見出し、カルボン酸部位については細胞内で切断されるエステルへとプロドラッグ化した化合物 Fura-Nox-7-AM (構造非公表) を得ること成功した。そこで、本化合物を用いて細胞イメージングを実施した。Fura-Nox シリーズはヘムとの応答前においても蛍光が検出されることから、細胞への取り込みは蛍光顕微鏡にて確認可能なはずであるが、細胞からの蛍光は全く観測されず、プローブ自体の細胞膜透過性が低く、細胞内でのヘム検出への応用は困難であることがわかった。現在、細胞内でのヘム検出には至っていないが、本研究成果は、初めての小分子型ヘム蛍光プローブの開発を達成したものであり、今後、細胞内のヘム検出に向け、さらに研究を継続させ、世界初のヘム蛍光イメージングを達成したいと考えている。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Tasuku Hirayama
[review] Fluorescent probes for the detection of catalytic Fe(II) ion
Free Radical and Biology and Medicine, **2019**, *133*, 38–45.
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.004
2. Tasuku Hirayama, Ayaji Miki, Hideko Nagasawa
“Organelle-specific analysis of labile Fe(II) during ferroptosis by using a cocktail of various colour organelle-targeted fluorescent probes”
Metallomics, **2019**, *11*, 111–117, doi: 10.1039/C8MT00212F.
3. Tasuku Hirayama, Satoki Kadota, Masato Niwa, Hideko Nagasawa
“A mitochondria-targeted fluorescent probe for selective detection of mitochondrial labile Fe(II)”
Metallomics, **2018**, *10*, 794–801, doi: 10.1039/C8MT00049B.
4. Kenji Sakamoto, Taishi Suzuki, Kosuke Takahashi, Takumi Koguchi, Tasuku Hirayama, Asami Mori, Tsutomu Nakahara, Hideko Nagasawa, Kunio Ishii
“Iron-chelating agents attenuate NMDA-Induced neuronal injury via reduction of oxidative stress in the rat retina”
Exp. Eye Res. **2018**, *171*, 30–36. doi: 10.1016/j.exer.2018.03.008
5. Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Hirofumi Hamano, Tasuku Hirayama, Seiji Kishi, Yuki Izawa-Ishizawa, Masaki Imanishi, Yoshito Zamami, Kenshi Takechi, Licht Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Ken-ichi Aihara, Hideko Nagasawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
“Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice”
Sci. Rep. **2017**, *7*, 10621. doi: 10.1038/s41598-017-11089-0
【他 6 件】

[学会発表] (計 49 件)

1. 早船 花奈、平山 祐、辻 美恵子、永澤 秀子、「核局在型二価鉄検出プローブの開発研究」、日本薬学会 139 年会、2019
2. Tasuku Hirayama, “Development of Fluorescent probes for monitoring labile Fe(II) ion in living cells”, Asian International Symposium、日本化学会第 99 春季年会 (招待講演)、2019
3. 平山 祐、「生体内鉄イオンとの化学反応に基づく蛍光プローブの開発と応用」、日本薬学会 139 年会、シンポジウム生命指向型化学、2019
4. 平山 祐、「鉄と病態の関連を探る新たな二価鉄蛍光プローブの開発と応用」、日本化学会第 99 春季年会、シンポジウム：革新的医工連携による次世代の疾病診断・治療技術の創製、2019
5. 平山 祐、「鉄イオンを検出する蛍光プローブ分子の開発と応用」、第 92 回日本薬理学会年会 (招待講演)、2019
6. 平山 祐、「新規蛍光プローブを用いた鉄イオンの検出法の開発」、第 47 回日本新脈管作動物質学会 (招待講演)、2019
7. Tasuku Hirayama, “Development of fluorescent probes for the detection of Fe(II) ion in living cells”, The International Symposium on Bioinorganic Chemistry 2018 (招待講演)、2018
8. 平山 祐、「オルガネラレベルでの二価鉄検出蛍光試薬の開発と応用」、メタルバイオサイ

- エンス学会 2018 (招待講演)、2018
9. 平山 祐、「鉄イオンの生細胞イメージングを可能にする蛍光プローブの開発と応用」、第 91 回日本生化学大会 (招待講演)、2018
 10. 平山 祐、「蛍光プローブによる酸素濃度依存的な鉄変動イメージング」、第 22 回酸素ダイナミクス研究会 (招待講演)、2018
 11. Tasuku Hirayama, “Development of fluorescent probes for Fe(II) based on N-oxide chemistry and their application to live cell imaging”, International Conference on Coordination Chemistry, 2018 (招待講演)、2018
 12. 平山 祐、「蛍光 turn-on 触媒性二価鉄プローブの開発と応用」、第 29 回微量元素学会学術集会 (招待講演)、2018
 13. 深谷 忠徳、平山 祐、永澤 秀子、「フェノキシラジカルの反応性に基づく鉄関連タンパク質修飾剤の開発」、日本薬学会第 138 年会、2017
 14. 鈴木 萌恵、平山 祐、柳澤 大治郎、遠山 育夫、永澤 秀子、「生体内の鉄(II)イオン検出を目指した ¹⁹F-MRI プローブの開発」、日本薬学会第 138 年会、2017
 15. 丹羽 正人、平山 祐、永澤 秀子、「遊離ヘムを選択的に検出可能なレシオ型蛍光プローブの開発」日本薬学会第 138 年会、2017
 16. Tasuku Hirayama, “A color series of Fe(II)-selective fluorescent sensor based on N-oxide chemistry”, International Symposium on Bio-relevant Chemistry 2017 (招待講演), 2017
 17. 平山 祐、「生細胞内の二価鉄イオンを検出する蛍光プローブの開発と応用」、第 5 回目メタロミクスフォーラム (招待講演)、2017
 18. 平山 祐、「二価鉄イオンのライブイメージングを可能にするケミカルツールの開発」、第 58 回日本組織細胞学会学術集会 (招待講演)、2017
 19. 平山 祐、丹羽 正人、廣澤 舟作、永澤 秀子、「二価鉄イオン蛍光プローブの構造最適化とハイスループットアッセイへの展開」、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017
 20. 平山 祐、「触媒性 2 価鉄プローブの開発と応用」、第 14 回日本病理学会カンファレンス (招待講演)、2017
 21. Tasuku Hirayama, “N-oxide chemistry as universal fluorogenic molecular switch for labile Fe(II)”, Royal Australian Chemistry Institute National Centenary Conference, 2017
 22. 平山 祐、丹羽 正人、坪井 ひとみ、三木 彩路、永澤 秀子、「二価鉄イオン選択的蛍光スイッチとしての N-オキシド化学の確立と細胞内鉄イオンレドックス平衡の解析」、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、2017
- 【他 27 件】

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：蛍光プローブ

発明者：永澤 秀子、平山 祐、丹羽 正人

権利者：岐阜市

種類：特許

番号：特願 2018-034775

出願年：2018

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：https://researchmap.jp/hirayama_tasuku/

<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/yakka/>

※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。