

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05561

研究課題名（和文）カテコール蛍光誘導体化反応を利用したNADP+の直接測定法の開発

研究課題名（英文）Development of a direct quantification method for NADP+ using fluorescence derivatization reaction of catechol

研究代表者

柴田 孝之（Shibata, Takayuki）

群馬大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：10448491

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、NADP+の直接定量法の開発を目的として、NADP+によるアドレナリン酸化反応を介した蛍光性生成物の蛍光定量法の開発を試みた。その結果、本反応はpH 8.0のホウ酸緩衝液中で速やかに進行すること、カテコール4位側鎖のベンジル位のヒドロキシ基が必須であること、このヒドロキシ基の脱離を促進させることが速やかな蛍光体の生成に繋がること、等を見出した。これら最適化した条件を用いることで、高感度にNADP+を検出可能であることが分かった。本反応はNADPHでは反応しないことから、十分な特異性を有していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内酸化還元反応は、細胞の生命活動を司る重要な代謝反応である。中でもNADPHとNADP+の相互変換は多くの反応において補酵素を担っていることから、生体試料に含まれるNADPHとNADP+の分析は生命科学研究や疾病診断において必須の技術である。NADPH検出系は、特徴的な340 nmの最大吸収波長を利用した吸光度法が協力であり、臨床検査にも応用されている。一方、NADP+検出系は、分離技術を使用しない特異的測定法の開発例がない。本研究成果は、高速液体クロマトグラフィー等の分離技術を必要とせず、簡便な吸光度法でNADP+を直接定量できる技術を提供することから、社会的意義が大きいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a method for the direct quantification of NADP+ via fluorometric quantification of the fluorescent products by oxidation of adrenaline by NADP+. As a result, we found that this reaction proceeded rapidly in boric acid buffer solution at pH 8.0. We also found that the hydroxy group at the benzyl position of a side chain, which is attached at 4-position of catechol, is essential, and accelerating the elimination of this hydroxy group leads to the rapid formation of the fluorescent product. Under the optimized reaction conditions, NADP+ could be sensitively detected with high selectivity over NADPH.

研究分野：分析化学

キーワード：NADP+ 蛍光 アドレナリン ペプチド蛍光反応

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸は、還元型 (**NADPH**) と酸化型 (**NADP⁺**) の相互変換を介して電子を授受する電子伝達体であり、解糖系におけるエネルギー産生や核酸の異性化など、細胞の生命活動を司る重要な代謝に参与する補酵素である。従って、生体試料に含まれる **NADPH** と **NADP⁺** の分析法は、生命科学研究や疾病診断などにおいて必須の技術である。**NADPH** の検出系は、**NADPH** に特徴的な **340 nm** における吸光度測定やテトラゾリウム塩誘導体を使用したホルマゼン色素法など、これまでに多く開発されている。一方、**NADP⁺** の検出系は、分離技術を使用しない特異的測定法の開発例がない。事実、一般的な血液生化学検査における **NADPH** を補酵素として **NADP⁺** を産生する酵素の活性測定では、**NADP⁺** の増加を追跡できないため **NADPH** の減少を追跡することで活性値を算出している。しかし、この手法は、律速酵素の活性測定など **NADP⁺** の変化量が小さい場合、反応前後の **NADPH** 変化量が誤差範囲に埋もれてしまうという、致命的な欠点を有する。このような背景から、**NADP⁺** 量を簡便かつ迅速に直接測定する技術の開発は、以前より強く望まれている。

2. 研究の目的

過去の研究例として、**NADP⁺** が 2 価の銅イオン存在下でカテコール類化合物を対応する **o**-ベンゾキノンに酸化することが報告されている。弱酸性水溶液中で試薬を混和するだけで進行する点、**NADPH** では進行しない点から、この反応は簡便かつ特異性の高い **NADP⁺** の化学変換法であると言える。一方、研究代表者は以前より、カテコール類化合物を発蛍光試薬として用いる、アミノ酸/ペプチド選択的な蛍光誘導体化反応の開発研究を行っている。この反応は、過ヨウ素酸によるカテコールの酸化を起点とし、生成した **o**-ベンゾキノンがアミノ酸と反応して蛍光を発するが、アミノ酸や短鎖ペプチド以外の化合物では全く蛍光を発しないという、稀有な特異性を示す。本研究では、「**NADP⁺** 特異的なカテコールの酸化反応」と、研究代表者が独自に開発した「アミノ酸特異的なカテコールの蛍光誘導体化反応」を組み合わせることで、簡便かつ特異的な **NADP⁺** の直接検出法を開発する。

3. 研究の方法

(1) **NADP⁺** 水溶液とカテコール水溶液を混和してもカテコールの酸化は起こらず、カテコールの酸化を進行させるには硫酸銅をはじめとする 2 価の銅を添加する必要がある。また、カテコール酸化反応は、反応液の **pH** に影響を受けることも分かっている。研究初期は、反応収率・反応時間・副生成物の有無などを指標として、銅試薬の選別、反応に使用する緩衝剤の種類、反応液の **pH** や反応温度など、酸化反応におけるパラメータを網羅的に探索し、効率よくカテコールを酸化するための反応条件を明確にする。

(2) 研究代表者はこれまでに、発蛍光試薬と成り得る多くのカテコール類化合物を発見している。**NADP⁺** による酸化効率は、カテコールの置換基の種類や位置により大きく異なると予想される。そこで、効率よく酸化されるカテコール類化合物の選別を行う。

(3) **o**-ベンゾキノンは非常に不安定な化合物であり単離できないため、カテコール酸化反応と蛍光反応は連続して行わなければならない。具体的には、**1)** カテコール酸化反応液にアミノ酸を予め添加しておく、**2)** カテコール酸化反応後にアミノ酸を添加する、という 2 種類の方法が考えられる。これらの反応条件を同時並行で最適化し、本技術によって **NADP⁺** の酸化能力を定量的かつ正確に蛍光シグナルに変換できることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) **NADP⁺** 変化量とアドレナリン変化量の相関解明

まず、情報に従いアドレナリン **3 mM**、**NADP⁺** **2 mM**、硫酸銅 **0.2 mM** を混和・加温したところ、オルトキノンに由来する **490 nm** の吸収が確認された。本反応は、特に硫酸銅の濃度に敏感であり、硫酸銅を増加すると **490 nm** の吸収が減少し **410 nm** 付近に新たな吸収が出現した。これは、生成した不安定なオルトキノンは過剰な硫酸銅によって更なる構造変化を受けたためと考えられる。一方、アドレナリン：**NADP⁺**：硫酸銅の比率が一定であれば、アドレナリン酸化が進行することが明らかとなった。また、本反応は、アドレナリンを **2 mM** にしても反応速度が同じであること、反応速度解析により単純な 2 次反応の速度式に従って進行すること、を見出した。以上の結果から、本酸化反応を用いることで、**mM** オーダー以下の **NADP⁺** の検出に応用できること、カテコールの変化量を **NADP⁺** の変化量に換算できること、等の可能性が示唆された。

(2) カテコール類化合物の選別

本酸化反応における被酸化物質の構造上の要求を調べるために、カテコール、**3,4**-ジヒドロ

キシ安息香酸、**3,4**-ジヒドロキシフェニル酢酸、ドーパミン、**3,4**-ジヒドロキシベンジルアルコール、アドレナリンの**6**種類のカテコール類縁体を使用して反応を行った。しかし、どの化合物においてもオルトキノンの生成は確認できなかった。すなわち、被酸化物質は、アドレナリンおよびノルアドレナリンに限定されることが分かった。

(3) 蛍光反応に用いるアミノ酸の選別と反応機構の予測

本研究段階では、アドレナリンの酸化反応をオルトキノン選択的蛍光誘導体化反応に応用する研究を行った。プロリンアミド、グリシン-グリシン、グリシン-プロリン、グルタミン酸-グルタミン酸、メチオニン-メチオニン、ヒスチジン-ロイシンの**6**種類のアミノ酸誘導体をオルトキノン蛍光反応の基質として選択した。まず、カテコール誘導体として**3,4**-ジヒドロキシフェニル酢酸を、酸化剤として過ヨウ素酸ナトリウムを採用し、これらの水溶液を混合したところ、大部分のアミノ酸において蛍光が確認された。そこで、次に**3,4**-ジヒドロキシフェニル酢酸をアドレナリンに変更して反応を行ったところ、どのアミノ酸誘導体を用いても蛍光が観察されなかった。アドレナリン-**NADP**⁺酸化反応液にアミノ酸誘導体を添加しても、同様に蛍光は得られなかった。そこで、アドレナリン-**NADP**⁺酸化反応液中のアドレナリンがオルトキノン型でなくなっている可能性を考え、アドレナリン酸化体の構造決定を行ったところ、アドレナリンキノンがさらに酸化されて閉環し、アドレノクロムへと変化している可能性が示唆された。また、本反応は反応液のpHに敏感であり、pH**8.0**前後のホウ酸緩衝液では強い蛍光を発するが、pH**7.0**や**9.0**では蛍光強度は低かった。これらの結果より、本反応を効率的に進行させるには、反応機構の解明が重要であると考えられた。

(4) 反応機構の解明

アドレナリンの代わりにノルアドレナリンおよびドーパミンを使用して、過ヨウ素酸酸化に伴う蛍光物質の生成を評価した。その結果、ノルアドレナリンでは蛍光が生じたが、ドーパミンでは蛍光は観察されなかった。(ノル)アドレナリンとドーパミンとの構造上の違いは、側鎖**1**位のヒドロキシ基の有無である。すなわち、(ノル)アドレナリンの酸化による蛍光性の獲得は、側鎖アミノ基の分子内環化反応だけでなく、ヒドロキシ基の脱離反応による共役系の延長が必要であることが示唆された。pH**7.0**で蛍光強度が低かった理由は、ヒドロキシ基の脱離反応が中性付近で非常に遅いことが原因であり、pH**9.0**で蛍光強度が低かった理由は、**NADP**⁺が塩基性条件下で不安定であり酸化反応の前に分解したことが原因である、と予想される。そのため、**NADP**⁺の定量を環化アドレナリンの蛍光で行うには、弱塩基性条件下でヒドロキシ基の脱離反応を加速する必要があると考えられる。

(5) 蛍光反応を加速させる添加物の探索

反応温度を**37**に固定し、反応液のpHを**7.0~9.0**の範囲で変化させながら、ヒドロキシ基の脱離を促進する添加物を探索した。具体的には、アドレナリンおよび**NADP**⁺のホウ酸緩衝液溶液に種々の金属イオンを添加して、時間経過に伴う蛍光強度の変遷を追跡した。その結果、銅(II)イオンによって蛍光体の生成が加速されることを見出した。従って、反応液に銅(II)イオンを添加し、生成する環化アドレナリンの蛍光強度を測定することで、簡便かつ短時間で**NADP**⁺の定量が可能になると期待される。

以上、本研究では、**NADP**⁺の直接定量法の開発を目的として、**NADP**⁺によるアドレナリン酸化反応を介した蛍光性生成物の蛍光定量法の開発を試みた。その結果、本反応はpH**8.0**のホウ酸緩衝液中で速やかに進行すること、カテコール**4**位側鎖のベンジル位のヒドロキシ基が必須であること、このヒドロキシ基の脱離を促進させることが速やかな蛍光体の生成に繋がること、等を見出した。これら最適化した条件を用いることで、最終的に**2**桁μM程度の**NADP**⁺まで検出可能であることが分かった。本反応は**NADPH**では反応しないことから、十分な特異性を有していることも明らかにした。本研究成果は、高速液体クロマトグラフィー等の分離技術を必要とせず、簡便な吸光度法で**NADP**⁺を直接定量できる技術に成り得ると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mikame Yu, Sakai Yui, Tahara Ryo, Doi Kinuka, Yamamoto Tsuyoshi, Dohno Chikara, Shibata Takayuki, Yamayoshi Asako	4. 巻 70
2. 論文標題 Synthesis and Evaluation of Oligonucleotide-Containing 2'-[4,5,8-Trimethylpsoralen]-4'-ylmethoxy]ethylaminocarbonyl adenosine as Photo-crosslinkable Gene Targeting Tools	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 726 ~ 730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c22-00333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kabashima Tsutomu, Hamasaki Nana, Tonooka Keiko, Shibata Takayuki	4. 巻 71
2. 論文標題 A Facile Method to Determine Prolidase Activity Using a Peptide-Specific Fluorometric Reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 15 ~ 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c22-00467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shibata Takayuki, Narita Tomohiro, Suto Yutaka, Yasmin Hasina, Kabashima Tsutomu	4. 巻 23
2. 論文標題 A Facile Fluorometric Assay of Orotate Phosphoribosyltransferase Activity Using a Selective Fluorogenic Reaction for Orotic Acid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 2507 ~ 2507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s23052507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shibata Takayuki, Shimamura Ryosuke, Yamamoto Yuji, Sakurai Hiroki, Fujita Junya, Yamayoshi Asako, Nemoto Toshimitsu, Kabashima Tsutomu	4. 巻 69
2. 論文標題 A Facile Method for the Quantification of Urinary Uracil Concentration by a Uracil-Specific Fluorescence Derivatization Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 768 ~ 772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-00221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamayoshi A, Higuchi M, Sakai Y, Kobori A, Yamamoto T, Shibata T, Murakami A	4. 巻 39
2. 論文標題 Selective cross-linking behavior of oligodeoxyribonucleotides containing 2'-O-[N-(4,5',8-trimethylpsoralen-4'-ylmethylcarbonyl)]adenosine to mutant H-ras DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 119-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1677912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木里彩, 須藤豊, 奥石一郎, 柴田孝之
2. 発表標題 ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの活性測定を可能にする基質の合成
3. 学会等名 第69回北関東医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤よしの, 直井美徳, 須藤豊, 柴田孝之
2. 発表標題 中性選択的蛍光色素における蛍光波長の長波長化とpH範囲選択性の向上
3. 学会等名 第68回北関東医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田孝之
2. 発表標題 特定のpH領域で発光する新規蛍光物質
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 直井美徳、須藤豊、柴田孝之
2. 発表標題 中性領域でのみ発光する新規蛍光色素の合成と蛍光特性の評価
3. 学会等名 第67回北関東医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山浦裕紀、柴田孝之
2. 発表標題 置換基を有する弱酸特異的蛍光ラベル化剤の骨格の探索
3. 学会等名 第67回北関東医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本裕二、輿石一郎、時田佳治、柴田孝之
2. 発表標題 ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの逆反応追跡による活性測定
3. 学会等名 第67回北関東医学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 NADPHを補酵素とする酵素の高感度活性測定法	発明者 柴田 孝之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-046883	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<https://www.health.gunma-u.ac.jp/unit/4007.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------