

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860009

研究課題名(和文) 生体応用を志向したPeT型光制御パーオキシナイトライト供与化合物の開発

研究課題名(英文) Development of photocontrollable peroxy nitrite donor based on photoinduced electron transfer for biological application

研究代表者

家田 直弥 (Ieda, Naoya)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00642026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光誘起電子移動反応をトリガーとした、光制御パーオキシナイトライト発生剤の開発を行った。その過程で合成した化合物NOBL-1が、可視光で制御可能なNO発生剤になりうることが示唆された。NOBL-1は青色光でNOの発生を制御することが可能であり、培養細胞系においても高い時空間分解能を持って、NOの発生を制御できた。また、ラットの大動脈切片を用いたマグヌス試験において、NOの生理活性である血管弛緩を光制御できることを示した。NOBL-1はNOの作用を調べるためのケミカルツールとして用いられることが期待される。また、今後はこの知見を活かした光制御パーオキシナイトライト発生剤の開発を行う。

研究成果の概要(英文)：We had developed a visible-light-controllable peroxy nitrite generator based on photoinduced electron transfer. We discovered that one of synthesized compounds in the process was worked as a visible light controllable NO donor, named as NOBL-1. NOBL-1 could release NO in response to blue light in cells, confirmed by using fluorogenic NO probe, DAR-4M, and fluorescence microscope. Finally, we successfully controlled vasodilation, one of the main functions of NO, of rat aorta ex vivo with NOBL-1 and blue light. This compound is expected to be a chemical tool for NO research and a candidate as a chemotherapeutic reagent. In the next, we will develop a visible-light-controllable peroxy nitrite generator with knowledge acquired in this research.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：パーオキシナイトライト 一酸化窒素 活性窒素種 光ケージド化合物 ケミカルバイオロジー

### 1. 研究開始当初の背景

パーオキシナイトライト (ONOO-) は、生体内で一酸化窒素 (NO) とスーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) が拡散律速で反応することによって生じる。生体内で様々な生理活性を示すと考えられているが、生理的条件下で半減期が短いためにその生理活性を精査することが困難であった。

### 2. 研究の目的

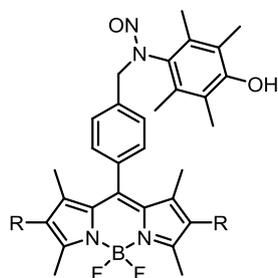
ONOO-の活性を調べるための生物試験において、ONOO-を投与する方法は ONOO-のアルカリ性水溶液や自発分解型供与化合物である SIN-1 を用いるのが一般的であるが、これらの方法では ONOO-が系中に拡散してしまうために ONOO-の発生の時空間制御をすることができなかった。申請者はこれまでに、ONOO-の活性を精査することのできる新たなツールとして、紫外光制御 ONOO-供与化合物の開発を行った。しかし、開発した化合物は制御光の波長が紫外光であり、透過性や毒性が懸念される。そこで、より長波長の光で制御を行うため、可視光制御型 ONOO-供与化合物の開発を行った。

### 3. 研究の方法

申請者が開発した紫外光制御 ONOO-供与化合物の構造を基に、可視光制御型 ONOO-供与化合物の合成を行った。合成した化合物の吸光スペクトル、蛍光スペクトルの測定を行った。また、照射によって ONOO-発生の第一段階である NO の放出が起こるかを、ESR スピントラッピング法で確認した。また、照射によって分解が起こるかを、HPLC で確認した。さらに、本研究課題の遂行中に新たに見出した NO 供与化合物を用いて細胞内で NO の発生を確認できるかを蛍光法を用いて確認し、NO の生理活性の一つである血管弛緩を制御できるかをマグヌス試験で確認した。

### 4. 研究成果

可視光で制御可能な ONOO-供与化合物になりうる化合物をいくつか合成した。

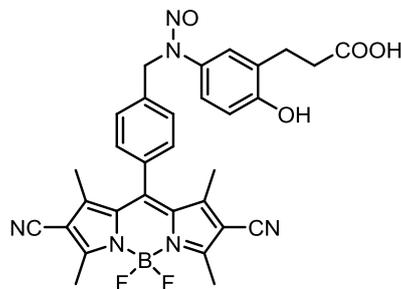


合成した可視光制御 ONOO-供与化合物  
R = Et, H, Br, CN

その光学特性を解析したところ、可視光を吸収することが示された。また、ESR や HPLC による光分解の解析から、ONOO-

放出していることが示唆されたが、ONOO-の特徴的な反応であるチロシンのニトロ化を検出することができなかった。現在はチロシンのニトロ化も起こしうる化合物の開発を行っている。

また、この過程で合成された化合物のうち一つが、可視光で制御できる NO ドナーになりうることを見出した。そして、この化合物を NOBL-1 と名付け、可視光で制御可能な NO ドナーとして開発を行った。

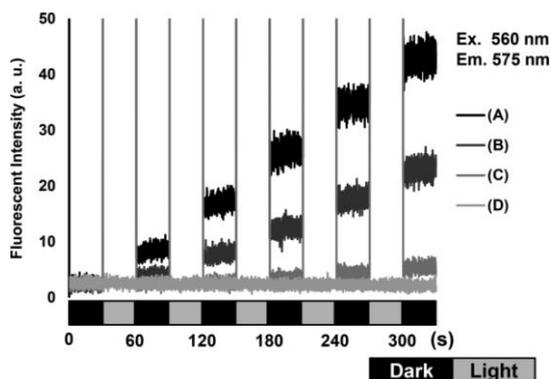


青色光で制御可能な NO ドナー  
NOBL-1

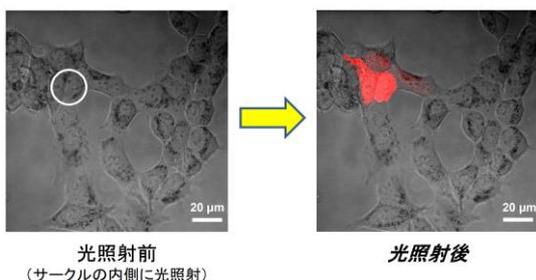
まず、NOBL-1 の吸光度を測定したところ、500 nm 付近に強い吸収が確認されたため、500 nm 付近の光を制御光として用いた。NO の放出の確認は鉄-ジチオカルバマート錯体 (Fe-DTC) を用いた ESR スピントラッピング法で行った。Fe-DTC は NO と反応して NO-Fe-DTC を形成し、これを 1 GHz ESR で測定すると、330 mT 付近に特徴的な 3 本のシグナルが観測される。NOBL-1 と Fe-DTC の水溶液に 470-500 nm の光照射を行い、ESR 測定を行ったところ、NO-Fe-DTC 由来のシグナルが観測された。光照射を行わなかった場合はこのシグナルが観測されなかったことから、NOBL-1 は光に反応して NO を放出したと考えられる。



次に、NO の放出を光によって時間制御できるかを NO の蛍光プローブである DAR-4M を用いて確認した。DAR-4M は無蛍光であるが、NO と素早く反応して DAR-4M T を形成し、強い蛍光を示す。NOBL-1 と DAR-4M の水溶液に断続的に 470-500 nm の光照射を行いながら、DAR-4M T 由来の蛍光を追跡した。すると、光照射を行っている時間のみに蛍光が上昇していることが観測され、NOBL-1 を用いることによって NO の発生を精密に時間制御できることが示唆された。

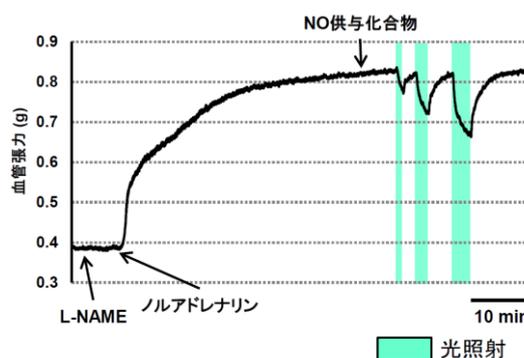


次に、培養細胞中で NO の発生を光制御できるかを調べた。NO の検出には、細胞に適用可能な DAR-4M のアセトキシメチルエステルである DAR-4M AM を用いた。ヒト胎児腎由来細胞 HEK293 に NOBL-1 と DAR-4M AM を投与し、488 nm のアルゴンレーザーで光照射を行った後に共焦点蛍光顕微鏡で蛍光観察を行った。すると、光照射を行った周辺のみで NO の発生を示す蛍光が観測され、NOBL-1 を用いることによって培養細胞系内でも NO の発生を精密に制御できることが示唆された。



NO の主な生理活性の一つとして、血管弛緩作用が知られている。NO は血管内皮細胞で生合成されて可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化し、cGMP の産生を促進することによって血管を弛緩させる。この作用を、NOBL-1 を用いて制御できるかを、マグヌス試験で調べた。ラットの大動脈切片を設置したマグヌス管に、内因性の NO 産生を抑制するために NO 合成酵素阻害剤である L-NAME を加え、ノルアドレナリンを加えて血管を収縮させた。そして NOBL-1 を投与し、断続的に光照射を行ったところ、光照射に依存して血管弛緩が起きることが観測された。

また、この血管弛緩は sGC の阻害剤である ODQ を加えることによってほぼ完全に抑制された。さらに NOBL-1 を加えない状態で光照射を行っても血管弛緩はほとんど起こらなかった。これらの結果から、NOBL-1 から光反応によって生じた NO が sGC を活性化し、cGMP の産生を促進することによって血管弛緩を起こしたということ、また、NOBL-1 と光によって血管弛緩を制御できることが示唆された。



NOBL-1 は可視光で制御可能な NO ドナーとして NO の研究に非常に有用であると同時に、新たな化学療法剤の候補化合物として期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

① 家田直弥、堀田祐志、宮田直樹、木村和哲、中川秀彦、*J. Am. Chem. Soc.*、査読有、136 巻、2014、7085-7091

〔学会発表〕(計 10 件)

① 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、川口充康、宮田直樹、中川秀彦、第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム、2014 年 11 月 10-11 日、仙台、2P-06

② 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、川口充康、宮田直樹、中川秀彦、2014 年光化学討論会、2014 年 10 月 11-13 日、札幌、3P-35

③ 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、川口充康、宮田直樹、中川秀彦、第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会、2014 年 9 月 4-5 日、京都、0-12

④ 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、宮田直樹、中川秀彦、創薬懇話会 2014 in 岐阜、2014 年 7 月 10-11 日、岐阜、P-31

⑤ 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、宮田直樹、中川秀彦、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会、2014 年 6 月 11-13 日、大阪、P-096

⑥ Naoya Ieda, Yuji Hotta, Kazunori Kimura, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa, Third International Conference on H2S Biology and Medicine, June 4-6, 2014, Kyoto, P106

⑦ 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、宮田直樹、中川秀彦、第 12 回次世代を担う有機化学シンポジウム、2014 年 5 月 23-24 日、東京、1-06

⑧ 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、宮田直樹、中川秀彦、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27-30 日、熊本、28L-pm21

⑨ Naoya Ieda, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa, SFRRI2014, 23 Mar. -26 Mar. 2014,

Kyoto, P200

⑩ 家田直弥、鈴木孝禎、宮田直樹、中川秀彦、第 31 回メデイシナルケミストリーシンポジウム、2013 年 11 月 20-22 日、広島、2P-23

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：青緑色光で制御可能な一酸化窒素供与化合物

発明者：家田直弥、中川秀彦

権利者：同上

種類：特許

番号：2013-234477

出願年月日：2013 年 11 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

名古屋市立大学大学院薬学研究科薬化学分野

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

家田 直弥 (IEDA, Naoya)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：2 5 8 6 0 0 0 9

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：