

論文の内容の要旨

論文題目 活性酸素種を種選択的に検出可能な蛍光プローブの開発とその生物応用

氏名 瀬月内 健一

< 序論 >

活性酸素種 (ROS) は炎症、老化、動脈硬化といった各種疾患や情報伝達系への関与が示唆されており注目を集めている小分子群である。ROS の生体内での役割を明らかにするために ESR 法、吸光法、蛍光法、化学発光法等種々の検出法が開発されてきた。この中でも蛍光法は感度良く検出できる、蛍光顕微鏡の普及により実験が簡便に行えるといった理由によりよく用いられる優れた検出法である。そのため、2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) をはじめとする ROS 蛍光プローブがこれまでに数種開発されてきた。しかしながら、これら既存の ROS 蛍光プローブは ROS 間での選択性がない、光による自動酸化に対して極めて弱いという致命的な問題点を抱えており実用性に乏しかった。そのため、これらの問題点を克服した新規 ROS 蛍光プローブの開発が待ち望まれていた。

私は上記問題点を克服した蛍光プローブの開発を目指した研究を行い、二種の新規 ROS 蛍光プローブ HPF、APF の開発に成功した。また、これらを用いて抗酸化酵素 catalase(CAT)が O_2^- の酸化力を強くすることにより酸化ストレスを増悪させることを初めて見出した。以下順にこれらを述べていく。

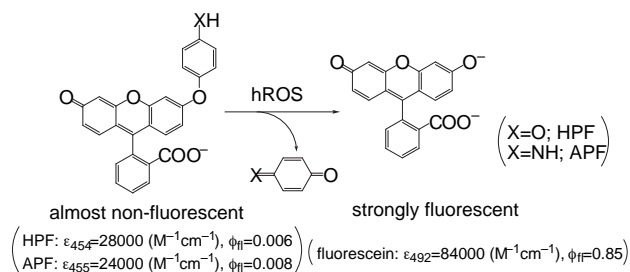


Figure 1. Scheme of *O*-dearylation reaction of HPF and APF with hROS. ϵ means the molar absorptivity, and ϕ_f means the relative quantum efficiency of fluorescence.

<新規 ROS 蛍光プローブ HPF、APF の開発>

ある分子を選択的に検出する蛍光プローブを開発するためには、その分子と選択的に起こる化学反応の前後で蛍光特性が大きく変わるようにデザインする必要がある。私は、蛍光物質 fluorescein の 6'-位の phenol 性水酸基を電子密度の高い phenyl 基で保護することにより蛍光量子収率を大きく下げることができることを見出した。そこで、この 6'-*O*-arylfluorescein の蛍光特性と ROS の中でも $\cdot\text{OH}$ や peroxidase 酸化活性種等の酸化力の強い ROS (hROS) でのみ進行し、 O_2^- 、 H_2O_2 のようなその他の ROS では進行しない aryloxyphenol 類の *ipso* 置換反応の二点を組み合わせる新規 ROS 蛍光プローブ HPF、APF をデザイン、合成した (Figure 1)。HPF、APF は fluorescein の 6'-位の水酸基が電子密度の高い hydroxyphenyl 基、aminophenyl 基で保護されているのでほぼ無蛍光であるが、hROS 選択的に置換 phenyl 基が脱保護され、強い蛍光を有する fluorescein を生成することを検出原理としている。HPF、APF はそれぞれ 4-iodophenol、4-fluoronitrobenzene を出発物質として 3 steps、2steps で合成した。

<HPF、APF の ROS との反応性及び光による自動酸化のされやすさに関する検討>

最初に HPF、APF の ROS との反応性を最も広く用いられている既存の ROS 蛍光プローブ DCFH と比較した (Table 1)。その結果、DCFH は全ての ROS に対して反応性を有するのに対して、HPF

では $\cdot\text{OH}$ 、 ONOO^- と、APF では $\cdot\text{OH}$ 、 ONOO^- 、 $-\text{OCl}$ と反応して蛍光強度が増大したが、その他の ROS では蛍光強度が変わらなかった。従って、HPF、APF は ROS 間での選択性に欠けるという既存の ROS 蛍光プローブの問題点を克服していた。さらに、HPF と APF を併用することにより $-\text{OCl}$ を選択的に検出可能であることがわかった。

Table 1. Fluorescence increase of HPF, APF and DCFH in various ROS-generating systems.^a

ROS	HPF	APF	DCFH
$\cdot\text{OH}^b$	730	1200	7400
ONOO^{-c}	120	560	6600
$-\text{OCl}^d$	6	3600	86
$^1\text{O}_2^e$	5	9	26
O_2^{-f}	8	6	67
H_2O_2^g	2	<1	190
NO^h	6	<1	150
ROO^i	17	2	710
Autoxidation ^j	<1	<1	2000

^a Dyes (final 10 μM ; 0.1 % DMF as a cosolvent) were added to sodium phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4). The fluorescence intensities of HPF, APF and DCFH were measured at 515, 515, 520 nm with excitation at 490, 490 and 500 nm, respectively. DCFH was obtained by the hydrolysis of DCFH-DA with base.^b Ferrous perchlorate (100 μM) and H_2O_2 (1 mM) were added at room temperature. ^c ONOO^- (final 3 μM) was added at 37 °C. ^d NaOCl (final 3 μM) was added at 37 °C. ^e EP-1 (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. ^f KO_2 (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. ^g H_2O_2 (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. ^h NOCl_3 (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. ⁱ AAPH (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min. ^j Dye solutions were placed under a fluorescent lamp for 2.5 hr.

また、DCFH では光により容易に自動酸化され顕著な蛍光増大が起こったが、HPF、APF では全く蛍光増大が起こらなかった (Table 1)。さらに、HPF もしくは DCFH-DA を load した HLE 細胞に励起光を 10 秒間照射したところ、DCFH-DA を load した細胞では顕著な蛍光増大が起こったが、HPF を load した細胞では蛍光強度は変わらなかった。従って、HPF、APF は光による自動酸化に対して弱いという既存の ROS 蛍光プローブの問題点を克服しており、高い信頼性をもって hROS を検出できる ROS 蛍光プローブであることが示された。

< HPF、APF の好中球への適用 >

好中球は体内に侵入した細菌を殺菌する際に重要な役割を果たしている。好中球内には myeloperoxidase(MPO)を大量に含むアズール顆粒が存在し、好中球は種々の刺激を受けると NADPH oxidase の活性化を初発として H_2O_2 を生成し、MPO/ H_2O_2 /Cl⁻系により産生された⁻OCI を用いて殺菌する。そこで、HPF、APF をブタ好中球に load し、NADPH oxidase を活性化する PMA で好中球を刺激した時の細胞内蛍光変化を共焦点顕微鏡で観察した (Figure 2)。その結果、HPF を load した好中球に比べ、APF を load した好中球では顕著な蛍光増大が見られ、かつその蛍光増大は顆粒状であった。HPF、APF の化学反応性からこの蛍光増大は⁻OCI によると考えられ、世界で初めて⁻OCI の生成を時空間的に可視化することに成功した。

次に、殺菌が行われる場であるファゴリソーム内は細胞外と実質的に同一な空間であるため、好中球が細胞外に誘起する酸化ストレス系に関して HPF、APF を用いて検討した。その結果、HPF、APF を用いた系で蛍光増大の様式が異なること、HPF の蛍光増大は $O_2^{\cdot-}$ の生成の time profile と一致することが分かった。さらに、この蛍光増大に及ぼす種々の物質の効果を調べたところ、superoxide dismutase(SOD)により蛍光増大が完全に抑制されること、CAT により APF を用いた系の蛍光増大は抑制されるが、HPF を用いた系の蛍光増大は増強されることが明らかとなった。

< CAT、SOD の生理学的重要性の証明 >

上記の結果は抗酸化酵素 CAT が酸化ストレスを増悪させることを示唆しているが、この「CAT による酸化ストレスの増悪」も SOD により抑制されることが SOD と CAT を共に添加する実験から明らかとなった (Figure 3)。 $O_2^{\cdot-}$ と CAT が協調して酸化ストレスを増悪させる可能性が示唆されたので、 $O_2^{\cdot-}$ を生成する xanthine/xanthine oxidase(x/x.o.)系に HPF を適用し、この系における

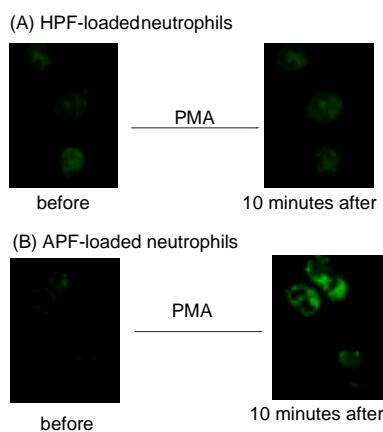


Figure 2. Fluorescence images of the HPF- or APF-loaded neutrophils. HPF or APF (final 10 μ M; 0.1 % DMF as a cosolvent) is loaded into neutrophils.

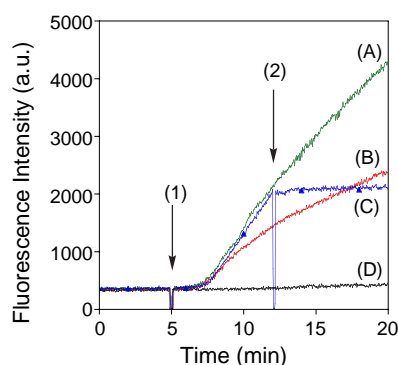


Figure 3. We applied HPF to PMA-activated neutrophils. Time course of the fluorescence intensity of HPF upon stimulation of neutrophils with PMA. PMA (final 2 ng / mL; 0.1 % DMF as a cosolvent) was added at (1) to Krebs-Ringer phosphate buffer containing porcine neutrophils (final 1.0×10^6 cells / mL) and HPF (final 10 μ M; 0.1 % DMF as a cosolvent). The fluorescence intensity was determined at 515 nm with excitation at 490 nm. These reactions were performed at 37 °C. Experiments were performed under the following four conditions; containing CAT (from bovine liver; final 800 U / mL; A), containing nothing else (B), containing CAT (from bovine liver; final 800 U / mL) and addition of SOD (from bovine erythrocyte; final 62.5 U / mL) at (2) (C), and addition of DMF (0.1 %) instead of PMA (D).

CAT、SOD の効果を調べた。その結果、x/x.o.系において HPF の蛍光は増大するが、CAT を添加することにより蛍光増大が増強され、さらに CAT 添加の有無に関わらず SOD が蛍光増大を完全に抑制することがわかった。ここで、x/x.o.系から生じる O_2^- 、 H_2O_2 は HPF とは反応しない活性酸素種であり、x/x.o.系において HPF の蛍光が増大する原因は不明であった。そこで、 O_2^- 生成源として KO_2 を用い、CAT もしくは xanthine oxidase を含む溶液中で O_2^- を生成させ、HPF の蛍光強度の変化を調べた。その結果、HPF は O_2^- とは反応しないが、CAT もしくは xanthine oxidase が存在すると蛍光増大が起こることを見出した。吸収スペクトルを測定した結果から、この酸化ストレスの増悪は CAT の compound III により引き起こされることが示唆された。この O_2^- と CAT が協調して酸化ストレスを増悪させるという現象は、脂質過酸化実験においても確認された。上記の結果から、 O_2^- が H_2O_2 生成のための単なる前駆体ではなく、CAT や xanthine oxidase 等の酵素により酸化力の強い活性種に変換されることにより生体内で重要な役割を果たしていること、SOD が抗酸化酵素 CAT による O_2^- の毒性を抑える重要な役割を担っていることが強く示唆され、SOD と CAT の両者が協力して活性酸素種消去系に働くことが生理学的に重要であることが示された。

<まとめ>

本研究で開発された HPF、APF は、ROS を区別して高い信頼性を持って検出でき、また化学系、酵素系、細胞系へ幅広く応用可能であることが明らかとなった。また、従来考えられてきた概念とは異なる酸化ストレス生成・消去系としての O_2^- 、SOD、CAT の新しい役割を発見した。今後、HPF、APF が生体内の ROS の真の役割を時空間的に解明していくことが期待される。

<発表論文>

(1)Setsukinai, K., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., and Nagano, T. (2000) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2453-2457.(2)Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., and Nagano, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3170-3175. (3)長野哲雄、瀬月内健一、浦野泰照 (2003) *実験医学* **21**、2144-2146.