

論文の内容の要旨

論文題目 活性窒素種測定用蛍光プローブの開発

氏名 我部 有

【序論】

活性窒素種 (RNS) は酸化ストレスを引き起こし種々の疾患、病態に関与する一方、生命活動に必須な情報伝達の役割も担っているとされている。一酸化窒素 (NO) は RNS の中核を担う二原子分子であり、酸素分子や活性酸素種と反応し多くの活性種を生成する。また NO 自身にも 3 つのレドックス種 (NOラジカル、 NO^+ 、 NO^-) が存在しているが、反応性が高く生体内で不安定であることから各々の機能は不透明な部分が多い。蛍光バイオイメージング法は検出対象分子を時空間的に制御した条件で観測できることから RNS 研究において非常に有効な手法の一つであるといえる。そのため、これらの活性種を区別して検出できる実用的な蛍光プローブの開発が待ち望まれている。

【本論】

1. 高感度NO⁺蛍光プローブの分子設計と応用

NOは主に生体内で酸素による酸化を受け、N₂O₃を中間体として生成する。N₂O₃はNO⁺を供与できる強力なニトロソ化試薬であり、S-ニトロソ化など様々な生体反応に関わっているが、詳細な機能解明までには至っていない。当教室ではNO⁺の検出プローブとしてfluoresceinを母核とするDAF類を開発した。DAF類を用いた蛍光バイオイメージング法は広く普及しており、優れた成果を挙げている。しかし、生体内ではチオールなどのNO⁺と反応する分子種が高濃度に存在するため、より高感度で実用的なプローブの開発に着手した。

NO⁺との反応性は反応部位であるo-phenylenediamine部位の電子密度に依存していることから、様々な構造修飾が可能なBODIPYを蛍光骨格とする高感度NO⁺蛍光プローブ、DAMBOを開発した。DAMBOは光誘起電子移動 (PeT) の原理に基づいて蛍光のoff/onが制御され、DAF-2 に比べて約 5 倍感度良くNO⁺と反応する (Figure 2)。

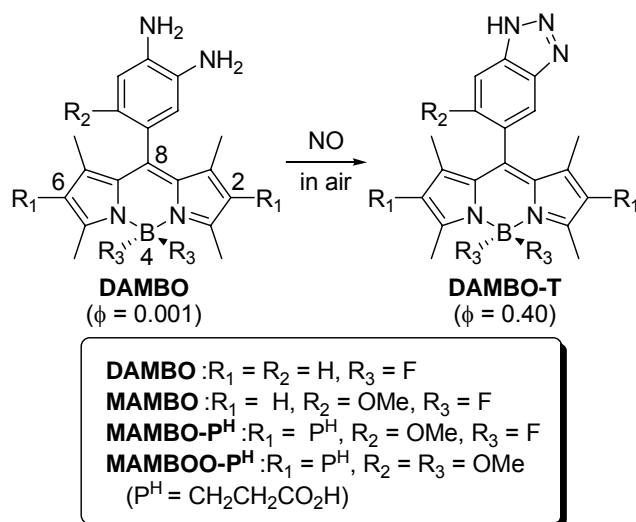


Figure 1 DAMBO、MAMBO誘導体とNO⁺との反応

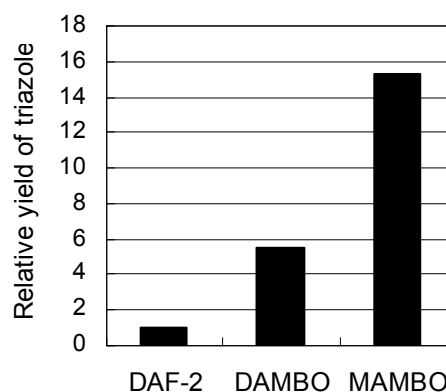


Figure 2 競争反応時における
トリアゾール体の相対生成量

DAMBOを更に高感度化するには、NO⁺との反応性を上昇させる、生成物であるトリアゾール体の蛍光量子収率(ϕ)を上昇させる、という2つの戦略が考えられる。NO⁺との反応性は反応部位の電子密度に依存しており、また8位のベンゼン環の回転を抑制することで蛍光量子収率が高くなることから、この2つを同時に満たすプローブとして反応部位に電子供与性のメトキシ基を導入したMAMBOをデザイン、合成した (Figure 1)。MAMBOはNO⁺と反応するとトリアゾール体 (MAMBO-T) を生成し、蛍光量子収率が劇的に変化した ($\phi < 0.001 \rightarrow 0.47$)。反応性も、DAF-2 に比べ約 15 倍、DAMBOに比べ約 3 倍高いことがわかった (Figure 2)。しかし、MAMBO-TはpH > 9以降でほとんど消光してしまうことも同時に明らかとなった。その原因を検討した結果、ベンゾトリアゾール部の脱プロトン化によって起こったPeTによる消光機構であることが明らかになった。この問題を克服するためには、蛍光団側の電子受容能を低下させPeTを抑制する方法が考えられる。BODIPY骨格の2,6位に電子供与性基を導入しただけでは塩基性側の蛍光強度はほとんど回復しなかった (Figure 3, MAMBO-P^H-T)、BODIPYの新たな構造修飾部位

として4位のフッ素に着目した。フッ素を2つメトキシ基に置換すると、BODIPYの分光学的性質をほとんど変えずに酸化電位、還元電位だけを共に約-0.2 Vシフトさせることがわかった。

そこで、MAMBOを最適化した構造として4位にメトキシ基を、2,6位にカルボキシルエチル基を導入したMAMBOO-P^H ($\phi=0.005$)をデザイン、合成した (Figure 1)。NO⁺と反応するとMAMBOO-P^H-T ($\phi=0.68$)を生成し、pH 4~12の範囲で十分な強度の蛍光を発することがわかった (Figure 3)。このように、BODIPY骨格の4位置換もPeT過程の精密制御に有用であることが示された。

BODIPYは中性分子であるため細胞内では疎水的環境に存在すると予想される。実際、DAMBO類の細胞内局在を調べたところ、ゴルジ体をはじめとする疎水性部位に局在することがわかった。これは細胞質局在性プローブのDAF類と大きく異なる点である。NOや酸素も中性分子のため疎水的環境に高濃度で存在し、その反応生成物であるN₂O₃も高濃度で働いていると予想される。DAMBO類が疎水的環境下で蛍光プローブとして機能するかどうか確かめるため細胞外からNO放出剤を添加したところ、蛍光の上昇が見られた。DAF-2の場合はNO⁺と反応すると細胞外の蛍光も大きく上昇していくのに比べ、DAMBO類では生成したトリアゾール体は細胞外に漏れにくい性質を持つことが明らかとなった。

次に、ウシ大動脈血管内皮細胞より産生される生理的 NO を捉えるために高感度プローブである MAMBO を用いてイメージングを試みたところ、bradykinin 刺激により素早い蛍光の上昇が見られた (Figure 4)。NO 合成酵素阻害剤である L-NAME で蛍光上昇が見られなかったことと光学異性体の D-NAME で阻害がかからなかったことから、確かに内因性の NO を捉えていることが示唆された。細胞質局在性の DAF 類でも細胞内での蛍光上昇が見られたが、細胞外の蛍光も同時に上昇した。また、MAMBO に目立った細胞毒性のないことも確認している。

BODIPYを蛍光団とした実用的蛍光プローブの報告はほとんど無く、MAMBOは疎水性部位に局在する実用的な蛍光プローブであることが示された。MAMBOは様々な細胞系に応用可能であり、親水性プローブと組み合わせて用いることで、局在という概念を含んだNO⁺の新たな知見を得ることができると期待される。

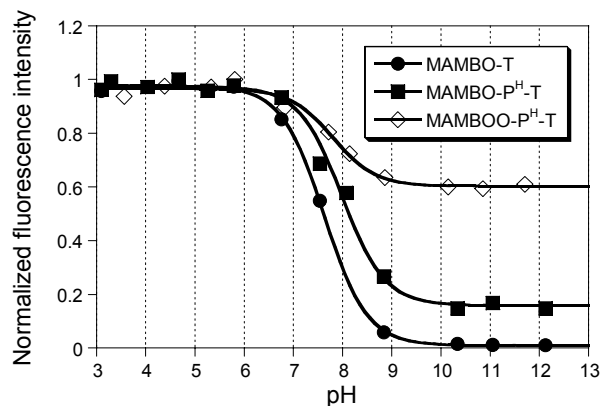


Figure 3 MAMBO 誘導体の pH 特性

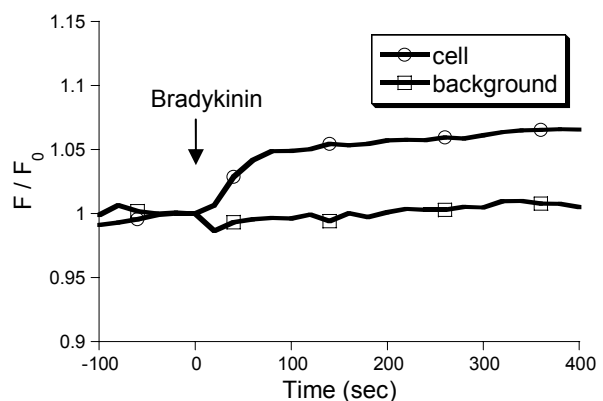


Figure 4 MAMBO を用いたウシ大動脈血管内皮細胞のイメージング

2. 蛍光法による HNO の検出

HNOはNOの1電子還元種であり、反応性が高く生体内では速やかに代謝される。HNOの研究は主に徐放剤であるAngeli's salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$)と生体内での N_2O の検出を根拠に議論されているが、HNOの生体内での作用機序に関してはほとんどわかっていない。そこで、HNOを選択的に検出できる方法を探索した。

化学的にみると、HNOの電子配置は一重項酸素と等しいので、当教室で一重項酸素蛍光プローブとして開発されたDMAX類を適用できないかと考えた。DMAX-2に無酸素下でAngeli's saltを添加すると強い蛍光が見られた。HPLCで生成物を追跡すると、主に2つの化合物が生成していた。これらの化合物を同定したところ、HNOがアントラセンに架橋したepoxyimino(EI)体の2つの異性体であることが確認された(Figure 5)。また、DMAX-2-EIは強い蛍光を発するため、高感度にHNOを検出できることも明らかになった。このように、HPLCでのDMAX-2-EIの検出はHNO生成の直接的証拠であると考えられることから、高感度で信頼性の高いHNO検出法であることがわかった。

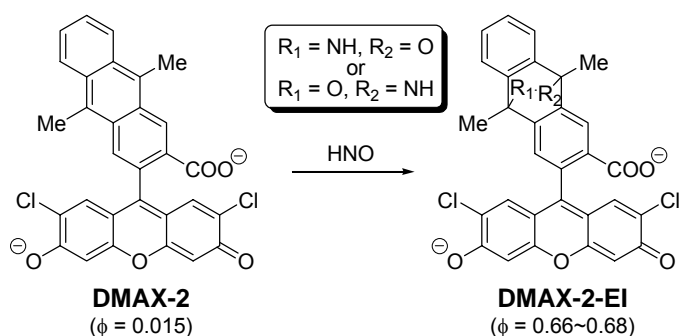


Figure 5 DMAX-2 と HNO との反応

【結論】

本研究における、多種多様な構造修飾によりPeTを精密に制御することができ論理的に高感度 NO^+ 蛍光プローブを開発できた点、バイオイメージングにおいて、疎水的環境下に局在し内因性の NO^+ を可視化することに成功した点から、BODIPYを母核とした実用的な蛍光プローブの設計法を確立できたといえる。

DMAX-2は水溶液中でHNOと特徴的なEI構造を形成し、強い蛍光を発することが明らかとなった。HPLCを用いることで特異的にHNOを検出でき、HNOの代謝分解過程を検証するツールとして有効であることが示唆された。