

2,6位置換蛍光ニトロキシドプローブによる生体内還元物質・脂質ラジカル種の高選択的蛍光検出・構造推定手法

松岡, 悠太

<https://hdl.handle.net/2324/1654816>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

2,6 位置換蛍光ニトロキシドプローブによる生体内還元物質・脂質ラジカル種の 高選択的蛍光検出・構造推定手法

機能分子解析学分野 3PS13010N 松岡 悠太

[序論]

生体内では高い酸化作用を示すフリーラジカル種と、それらラジカル種を除去する還元物質が一定のバランスを保ち存在している。しかしながら、様々な内因性・外因性ストレスにより、ラジカル種が過剰に発現、もしくは還元物質が欠乏するとこれらのレドックスバランスが崩壊し、生体内組織障害が生じることで癌や生活習慣病などの疾患が発症する^[1]。そのため、これら疾患の発症機序を理解するには、生体内フリーラジカル種・還元物質双方を区別し、随時モニタリングすることが重要である。

フリーラジカル種・還元物質評価法の一つとして、蛍光ニトロキシドプローブによる評価法が挙げられる。本プローブは、蛍光発光制御部位としてニトロキシドを有したTurn-On型蛍光プローブであり、ニトロキシドが測定対象となる生体内酸化還元物質と反応し常磁性を失うことにより蛍光発光を示す^[2](Fig. 1)。しかしながら、ニトロキシドは広範な分子種に対して反応性を示すことから、プローブが実際に何を捉え蛍光応答性を示しているかが不明確であり、その反応選択性に問題を抱えていた。一方で当研究室では近年、新たなニトロキシド2,6位置換修飾合成法を確立し、様々な反応性を有した2,6位置換ニトロキシドを合成してきた^[3]。そこで、これら反応特異性を有したニトロキシド誘導体を蛍光ニトロキシド蛍光制御部位として用いれば、フリーラジカル・還元物質に対して高い選択性を有した蛍光プローブの開発が可能になるのではないかと考えた。

以上の着眼点より本研究では、特に生体内還元物質、フリーラジカル種の中でも様々な疾患への関与が議論されているアスコルビン酸 (Ascorbic acid: AsA)、多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA)由来ラジカル種に対して反応特異性を有したピペリジン環2,6位置換ニトロキシドを蛍光制御部位として用いた、高感度・高選択性蛍光ニトロキシドプローブの開発を行った。

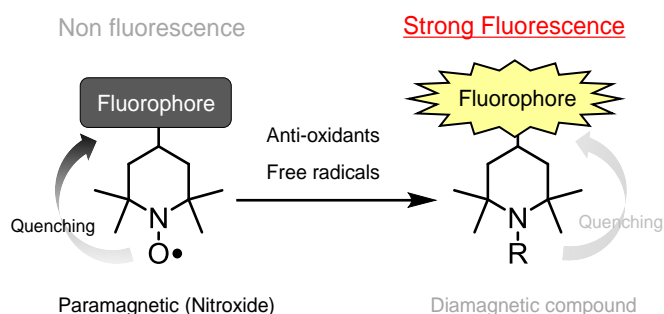


Fig. 1 Profluorescent nitroxide probe.

[実験]

AsA 検出に向けた蛍光ニトロキシドプローブの開発とニトロキシド蛍光消光機序の解析

ニトロキシド部位として AsA に対して高い反応選択性を有する 4'-スピロテトラヒドロピラニル基置換ニトロキシドに長波長蛍光原子団 Nile-Blue を導入させた AsA 高反応性長波長蛍光ニトロキシドプローブ、Nile-DiPy を合成した (Fig. 2a)。さらに、光学物性評価に加え、電気化学的測定法、時間分解分光法を用い、本プローブニトロキシド部位による蛍光消光機構について精査した。続い

て、本プローブと AsA との反応性について蛍光分析器を用い、速度論的解析を行った。最終的に、健常ラット、Streptozotocin (STZ)誘発糖尿病モデルラットの血漿中アスコルビン酸濃度を定量し、従来の高感度な測定手法である HPLC-ECD 法を用いた際の結果と比較した。

PUFA 由来ラジカル種の蛍光検出・構造推定手法の開発

本研究では、PUFA ラジカル種への反応選択性を向上させるため蛍光制御部位として還元抵抗性を有し、ラジカル種に対して特異的に

反応するニトロキシド、2,2,6,6-tetraethyl-1-piperidinyloxy (TEEPO)を用いた。蛍光原子団としては、PUFA ラジカル種が脂質膜のような疎水的環境にて生成する点に着目し、環境応答性蛍光原子団、Dansyl 基を用いることとし、脂質ラジカル検出蛍光ニトロキシドプローブ、Dansyl-TEEPO を合成した (Fig. 2b)。さらに、その光学物性、各種酸化還元物質・脂質ラジカル種に対する反応性について紫外・可視光吸光測定器・蛍光分析器を用いて評価した。脂質ラジカルは生体内に豊富に存在するアラキドン酸 (Arachidonic acid: AA)にリポキシゲナーゼを添加することによって発生させた。さらに、LC-MS 装置に蛍光分析器を導入した LC-FL-MS 装置による反応生成物の解析を行い、系中において生成しているラジカル種の構造推定を行った。

[結果・考察]

AsA 検出に向けた蛍光ニトロキシドの開発とニトロキシド蛍光消光機序の解析

今回合成した Nile-DiPy は長波長領域に吸収蛍光極大を有していた。また、ニトロキシドの消光作用により、弱蛍光性を示した。さらに、種々の電気化学的測定・時間分解分光法を用いてその蛍光消光機序の解析を行った結果、その消光作用が光誘起電子移動によるものであることが示唆された (Fig. 3)。

また、本蛍光プローブは AsA と反応することでその蛍光強度は約 10 倍回復した (Fig. 4a)。さらに従来の TEMPO 系ニトロキシドに比べ、AsA に対して極めて高い反応性を有しており、その検出限界はこれまでに報告された蛍光ニトロキシドの中で最も低い値であった (LOD: 9.72 nM)。続いて、本プローブの反応選択性

について評価したところ、生体内酸化還元物質であるグルタチオンや NADH、尿酸などとはほとんど反応せず、AsA を選択的かつ高感度に検出可能であった (Fig. 4b)。そこで本蛍光プローブを用い、ラット血漿中のアスコルビン酸濃度の定量分析を行ったところ、従来の HPLC を用いた測定結果と

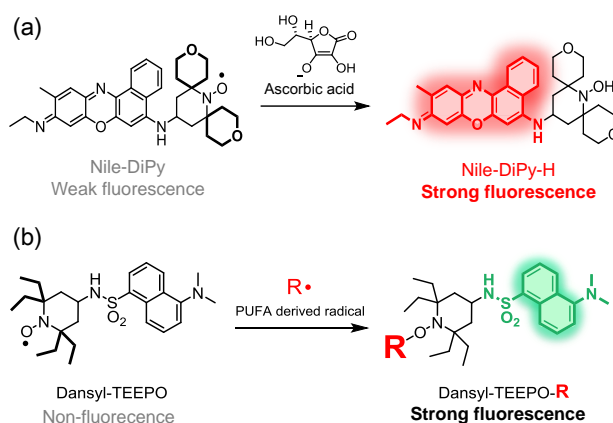


Fig. 2 Profluorescent nitroxide probe for the detection of (a) AsA and (b) PUFA derived radical.

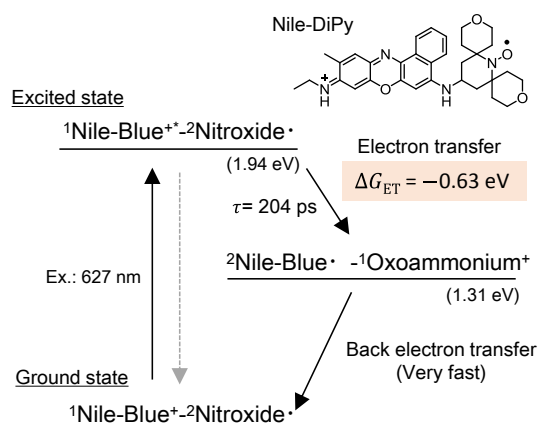


Fig. 3 Quenching mechanism of Nile-DiPy.

も非常に良好な相関性が得られた (Fig. 4c)。また本手法は測定に必要な反応時間が 10 分と短く、マイクロプレートを用いることにより同時に多検体の測定が可能であった。したがって本化合物を用いた分析手法は、迅速かつ高感度に AsA を測定できる有用な手法であると考えている。

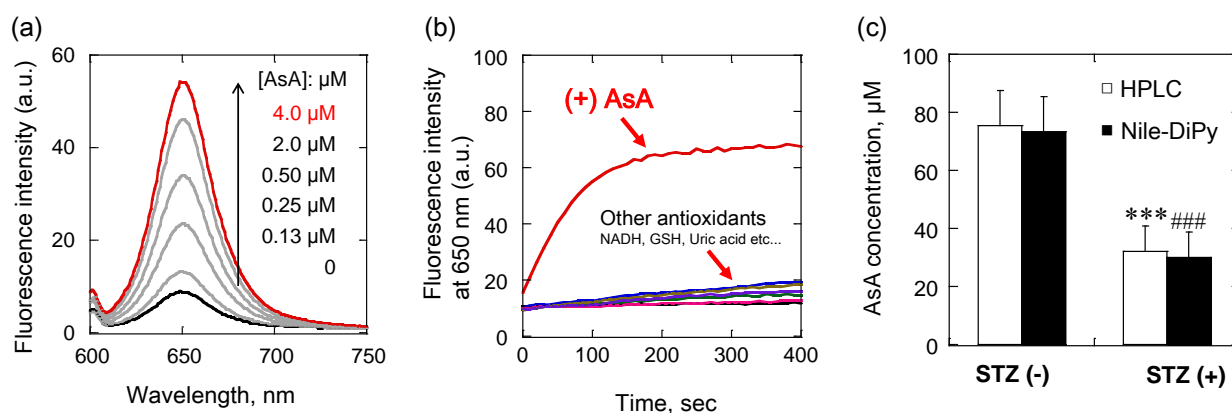


Fig. 4 (a) Emission spectrums of 2 μM Nile-DiPy in 0.1 M PBS buffer at pH 7.4 after adding 0, 0.13, 0.25, 0.50, 2.0, 4.0 μM AsA (DMSO 1 % solution), (b) Fluorescence response of Nile-DiPy to various redox substances (AsA, glutathione (GSH), catechin, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol (HPMC) and uric acid: 50 μM), Time courses of emission intensities at 650 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 600$ nm) of 2 μM Nile-DiPy with 50 μM redox substances, (c) Measurement of AsA in plasma of normal and STZ-induced diabetic rats using Nile-DiPy or HPLC-ECD method.

PUFA 由来ラジカル種の蛍光検出・構造推定手法の開発

今回、脂質ラジカル検出蛍光ニトロキシドプローブとして合成したDansyl-TEEPOは、AsAなどの生体内還元物質に対して優れた還元反応抵抗性を有しており、炭素中心PUFA由来ラジカル種とのみ選択的に反応することで自身の蛍光を回復させることが分かった (Fig. 5)。

さらに、反応後に安定な蛍光標識化生成物へと変化されることからのLC-FL-MS装置を用いた付加体の簡便な選定並びに質量分析が可能となった (Fig. 6a)。今回の検討では、様々なAA由来ラジカル種とプローブとの付加体に由来する分子量ピークが検出された (Fig. 6b)。中でも最も高い蛍光強度を示したピークのMS、MSMS解析を行ったところDansyl-TEEPO-AA-O ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 780.5)に相当する化学種であることを特定し、その構造推定を行った。

これらの付加体の他にも様々なAA酸化物の付加体 (Dansyl-TEEPO-AA ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 764.5)、Dansyl-TEEPO-AA-O₂ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 796.5)、Dansyl-TEEPO-AA-(OH)₂ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 798.5)、Dansyl-TEEPO-AA-O₃ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 812.5)、Dansyl-TEEPO-AA-(OH)₃-H₂O ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 850.5))やAA由来アルコキシルラジカルβ開裂時に生成するフラグメントラジカルとの付加体 [Dansyl-TEEPO-C₅H₁₁ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 532.3)、Dansyl-TEEPO-C₄H₇O₂ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 548.3)、Dansyl-TEEPO-C₈H₁₅ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 572.3)、Dansyl-TEEPO-C₇H₁₁O₂ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 588.3)、Dansyl-TEEPO-C₁₀H₁₅O₂ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 627.4)、Dansyl-TEEPO-C₁₁H₁₉O₂ ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 643.4)]が多数観測された。

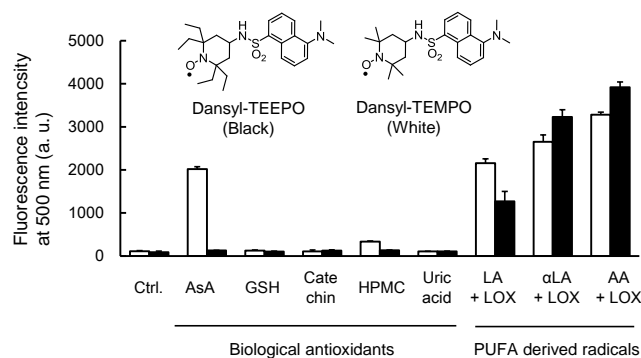


Fig. 5 Fluorescence response of Dansyl-TEMPO and Dansyl-TEEPO to various biological reductants (AsA, GSH, catechin, HPMC and uric acid: 1 mM) and PUFA derived radicals generated by lipoxygenase (0.025 mg/ml) in PUFA suspension (linoleic acid (LA), α -linolenic acid (aLA) and AA: 500 μM) ($\lambda_{\text{ex/em}} = 320 / 500$ nm).

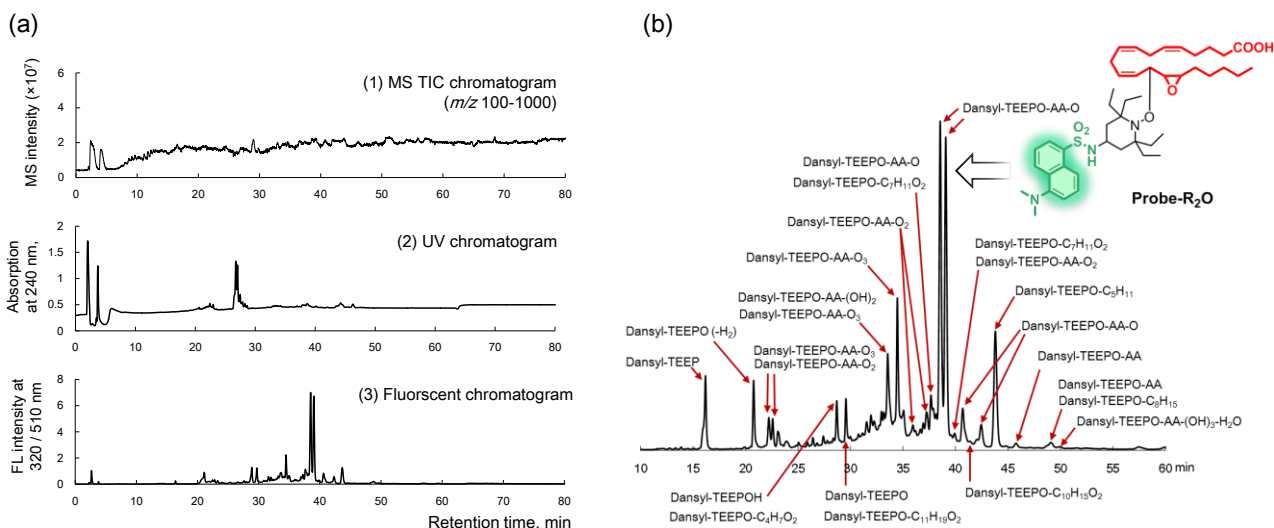


Fig. 6 (a) MS TIC (m/z 100-1000) (1), UV-absorption ($\lambda_{\text{abs}} = 240$ nm) (2) and fluorescence chromatogram ($\lambda_{\text{ex/em}} = 320 / 500$ nm) (3) of Dansyl-TEEPO-AA derived radical adducts measured by LC-FL-MS. (b) Assignment of the fluorescent peaks of Dansyl-TEEPO-AA derived radical. AA derived radicals were generated by lipoxygenase (0.050 mg/ml) and AA (10 mM).

これらの結果より、本解析手法は従来のフリーラジカル解析手法と比べても、より高感度にラジカル種を検出・解析可能であることが示唆された。本蛍光プローブを用いた蛍光・構造推定法は、新たな脂質化過酸化反応の検出手法のみならず、今疾患とラジカル分子の関与をより明確にしていく上で極めて有用な手法となることを今後期待している。

[結論]

ピペリジン環 2,6 位置換ニトロキシドはニトロキシド特有の蛍光消光能に加え、その優れた反応特異性から、種々の酸化還元物質を検出する蛍光プローブの設計にあたり、非常に有能な蛍光制御部位として機能することが示された。今後、今回得られた知見を基に蛍光ニトロキシドプローブの開発を進め、その更なる有用性を示すことで、生体内還元物質・フリーラジカル種を基盤とした新たな疾患診断手法の提案、疾患発症・増悪メカニズムの解明につながるものと期待する。

[参考文献]

- (1). Dröge, W. *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 47
- (2). Bottle, S. E. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4721
- (3). Yamasaki, T. *et al. J. Org. Chem.* **2011**, 76, 435

[発表論文]

- (1). **Matsuoka, Y.** *et al. Free Radic. Biol. Med.* **2012**, 53, 2112
- (2). **Matsuoka, Y.** *et al. J. Clin. Biochem. Nutr.* **2016**, 58, 16