

## 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）

氏名	松岡 悠太
論文名	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
論文調査委員	主査 九州大学大学院 薬学府 准教授 山田 健一 副査 九州大学大学院 薬学府 教授 佐々木 茂貴 副査 九州大学大学院 薬学府 教授 王子田 彰夫 副査 九州大学大学院 薬学府 准教授 唐澤 悟

## 論文審査の結果の要旨

生体内に存在する様々なラジカル種・抗酸化物質はある一定のバランスを保つことで生命体の恒常性維持に寄与している。しかしながら、なんらかのストレス因子によりこれら酸化還元（レドックス）バランスが崩れると、生体内組織傷害並びに癌や生活習慣病などの酸化ストレス性疾患が生じる。そのため、これらレドックスに関与する生体内のラジカル種・抗酸化物質を、それぞれ区別して検出・解析することは種々の疾患の診断、並びに発症・増悪メカニズムの解明に大きく貢献することが予想される。生体内ラジカル種・抗酸化物質の検出手法の一つである蛍光ニトロキシドプローブを用いた手法はその感度・選択性、測定機器の汎用性の高さより極めて有用な手法の一つである。しかしながら、本プローブはその蛍光制御部位にあたるニトロキシドが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。

そこで本研究では、これら蛍光ニトロキシドの反応選択性を向上することで、より高感度かつ選択的な検出手法の開発に取り組んだ。これまでに我々は TEMPO 系ニトロキシドの反応部位周辺、ピペリジン環 2,6 位に置換基を導入する合成法を確立しており、脂質由来のラジカル種や生体内抗酸化物質であるアスコルビン酸に対して高い反応選択性を有したニトロキシド誘導体の合成に成功している。そこで本研究では、これら反応特異性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、その新たな検出・解析手法の開発を行うべく、以下の検討を行った。

- (1). AsA 高反応性蛍光ニトロキシドの開発と血漿中アスコルビン酸定量法への応用
- (2). 長波長蛍光ニトロキシドプローブの開発とその消光メカニズムの解析
- (3). 多価不飽和脂肪酸由来ラジカル種に対して選択性を有した蛍光ニトロキシドの開発

(1) では、ニトロキシド部位として AsA 高反応性ニトロキシド誘導体を蛍光原子団ナフタレン基に導入した蛍光ニトロキシド Naph-DiPy の合成し本プローブが系中のアスコルビン酸を迅速かつ高選択的に検出可能であることを見出した。さらに本プローブを用いた実験動物血漿中 AsA 濃度定量法の開発にも成功した。本手法は、従来の高感度な測定手法である HPLC-ECD 法とほぼ同程度の感度にてラット血漿中の AsA を定量可能であり、煩雑な前処理の必要がないことから、より簡便かつ迅速な測定手法であると言える。

(2) では、前章にて開発した AsA 高反応性蛍光ニトロキシドプローブ Naph-DiPy の臨床応用を見据え、長波長蛍光ニトロキシドプローブ Nile-DiPy の開発並びにその蛍光消光機構解析を行った。酸化還元電位測定・過渡吸収スペクトル測定結果より、本プローブの蛍光消光現象がそのニトロキシド部位から Nile Blue 部位への光誘起電子移動により生じていることを見出した。さらにニトロキシド部位と種々

の抗酸化物質との反応性が抗酸化物質反応部位水素原子の結合解離エネルギーに依存することを見出し、その AsA 検出時における詳細な蛍光 OFF-ON スwitching 機構を明らかとした。

(3) では様々な疾患の発症・増悪に関与することが報告されている多価不飽和脂肪酸由来ラジカル種に対して高い反応特異性を有した蛍光ニトロキシド Dansyl-TEEPO の合成、並びに多価不飽和脂肪酸由来ラジカル種蛍光検出・同定手法の開発を行った。本プローブはアスコルビン酸などの抗酸化物質とはほとんど反応せず、炭素中心脂肪酸由来ラジカル種とのみ選択的に反応することを見出した。さらに、反応後に安定な蛍光性反応生成物へと変換されることから、LC-FL-MS システムを用いることにより付加体の簡便な選定、並びに質量分析が可能となった。

以上の結果より、本研究では、ピペリジン環 2,6 位置換ニトロキシドが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を有することから、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。またこれらのニトロキシド誘導体は置換基変化によりその電気化学的性質が大きく変化することから、(2) にて明らかとしたニトロキシド蛍光抑制機構と組み合わせることにより、蛍光 ON-OFF 比の高い高感度な検出プローブの開発が可能となる。今後、上記の理論をもとに設計した蛍光ニトロキシドプローブの開発、またそれらを応用する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できる。ゆえに、申請者は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。