

## 細胞内部位特異的酸化ストレス評価を目指した オルガネラ分布型スピンプローブの開発

名市大院薬 ○池田麻美子、中川秀彦、伴静華、鈴木孝禎、宮田直樹

### 背景

活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)は生体プロセスにおいて多様な機能を果たしており、その細胞生理学的、病理学的な役割への関心の高まりから、近年、生細胞内での ROS の生成を定量する方法が求められるようになった。しかし大部分の ROS は不安定で反応性が高く、定常状態における存在量も少ないことから、その濃度決定は困難なものであった。特に、細胞小器官のような細胞内微小環境における酸化ストレスを生きた細胞を用いて評価することは、ROS の細胞内における役割の解明に重要であるにも関わらず、その成功例は多くない。

本研究では、電子スピン共鳴(Electron Spin Resonance; ESR)法を用いて細胞の機能単位であるオルガネラレベルでの酸化ストレスを調べることを目指し、オルガネラ局在性スピンプローブの開発を行った。ESR 法は、生体内で ROS を検出する有用な方法のひとつである。ラジカルや ROS に高選択的であり、生体に対する毒性が低いことなどから、生体レベルでの酸化ストレス評価に広く用いられている。

### 分子設計

スピンプローブとして TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl)を用い、オルガネラに親和性を有する構造を導入することで局在性を付与し、さらにその細胞内分布の確認を容易にするため fluorescein 構造を導入した分子を設計した。当研究室ではこれまでミトコンドリア、細胞膜に局在するスピンプローブ **F-TriPPT**、**FAT** を報告している。そこで今回、新たに核を標的とした新規スピンプローブ **F-DisT** を設計・合成した。

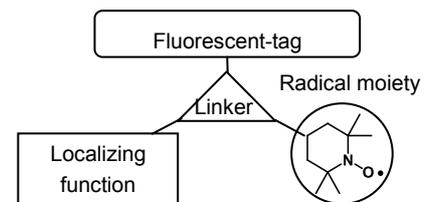


Figure 1. 分子設計

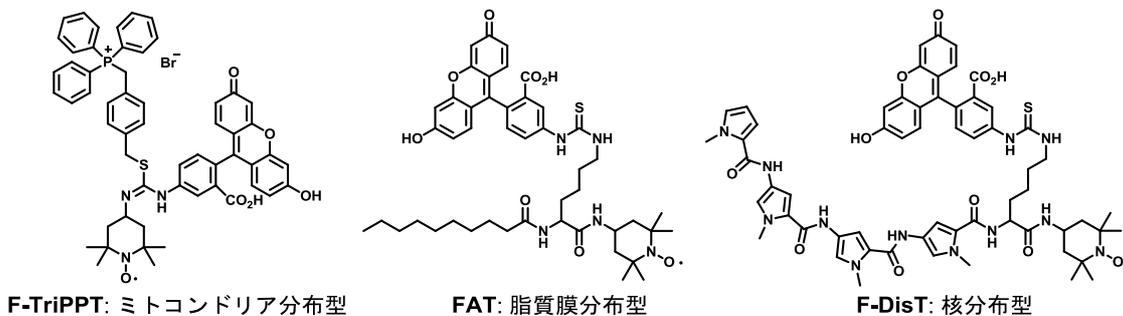


Figure 2. オルガネラ分布型スピンプローブ

### プローブの細胞内分布

共焦点蛍光顕微鏡観察により、これらのプローブが目的のオルガネラに局在していることを確認した。

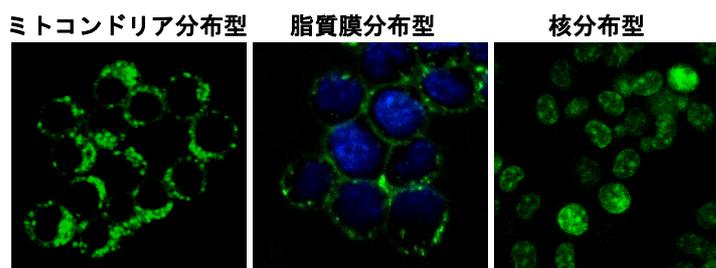


Figure 3. 各プローブの細胞内分布

## 酸化ストレス評価法

酸化ストレス評価には RAW264.7 細胞を用い、炎症性刺激によって惹起される ESR シグナル消失速度の変化を観察した。また、関与する ROS を推定するため、SOD/catalase (スーパーオキシド消去酵素)、L-NNA (一酸化窒素産生阻害剤)、DPI (スーパーオキシド産生阻害剤) といった ROS の阻害剤を添加し、ESR シグナル消失速度の変化を調べた。

### ESR 測定による酸化ストレス評価

**FAT** および **F-TriPPT** では、炎症性刺激によって ESR シグナル減衰速度は遅くなった。この変化は SOD/catalase、DPI の添加によって抑制されたことから、膜およびミトコンドリアではスーパーオキシドが主に関与していることが示唆された。

一方、核分布型である **F-DisT** では炎症性刺激によって ESR シグナル減衰速度は加速した。これは細胞内還元物質による TEMPO の還元と同時に、増加した ROS が TEMPO を直接酸化する反応が進行するためであると考えられた。このことは、核内の酸化還元環境が膜やミトコンドリアとは大きく異なっていることを示唆する結果である。この加速は、SOD/catalase 添加では抑制されなかったが、DPI および L-NNA 添加によって抑制されたことから、核内の酸化ストレスには一酸化窒素が関与しており、さらにスーパーオキシドも何らかの機能を果たしていることが示唆された。

### まとめ

ミトコンドリア、脂質膜、核にそれぞれ局在する ESR スピンプローブ **F-TriPPT**、**FAT**、**F-DisT** を合成し、各オルガネラにおける酸化ストレスを細胞が生きた状態で部位特異的に評価することに成功した。

これらの結果は、同じ刺激であってもオルガネラによって示す応答が異なることを、生細胞を用いて示した重要な知見である。

### 参考文献

1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 1451
2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 2055
3. *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, 49, 1792

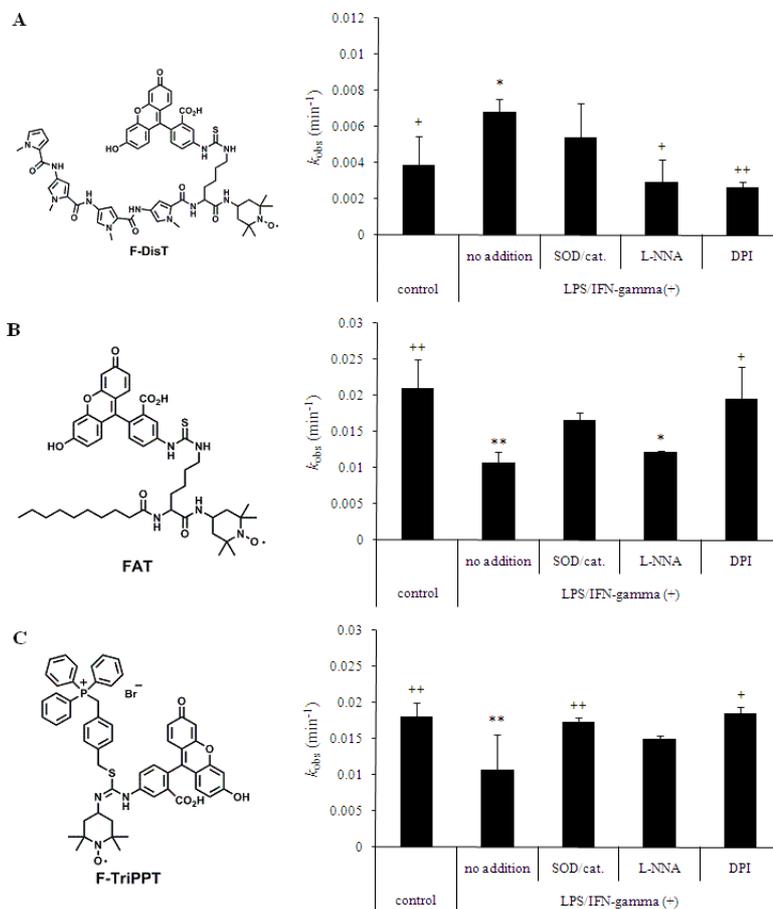


Figure 4. 各プローブの ESR シグナル減衰速度の変化

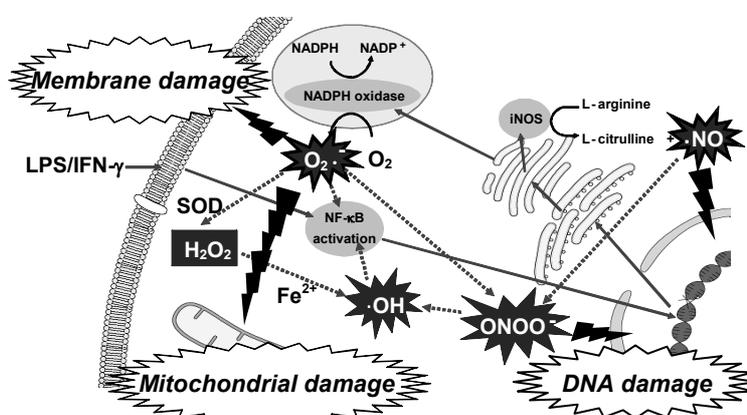


Figure 5. 炎症性刺激に伴う細胞内酸化ストレス障害の推定機構