

細胞内活性酸素種および関連する高活性化学種 捕捉蛍光プローブ

塩路 幸生¹⁾

(平成 22 年 5 月 31 日受理)

Fluorescence Probe for Detection of Reactive Oxygen Species and Related Compounds in Living Cells

Kosei SHIOJI¹⁾

(Received May 31, 2010)

Abstract

Mitochondria are functionally important subcellular organelles for our life. Reactive oxygen species (ROS) are produced without interruption in mitochondria. Some enzyme can be quenching of ROS in normal cells. Once the redox balance has broken down, ROS produced in mitochondria turn into intrinsic weapons. Thus, mitochondria are major source of ROS in mammalian cells and are major target of oxidative damage. Types of damages caused by ROS to mitochondrial components include lipid peroxidation, protein oxidation, and mitochondrial DNA mutation. In order to detect oxidative damage in living cells, some fluorescence probes have been developed. Recently, ROS and related compounds specific probes were developed. Those probes, herein, are introduced.

はじめに

活性酸素種 (ROS) とは、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$), ヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot}), 一重項酸素 (1O_2) および過酸化水素 H_2O_2 の総称で生物の生存に必須のエネルギー獲得機能そのものに含まれる酸化化学因子 (ラジカル) あるいは加齢, 紫外線・放射線, 大気汚染, 薬物の長期服用, 煙草の有害成分の吸入などにより生じる。

それらは, 高反応活性で脂質過酸化, 遺伝子の損傷やタンパク質の酸化等を引き起こし, 動脈硬化, アル

ツハイマー病などの疾病の引き金になる。高齢化が加速するわが国において活性酸素やそれらの化学種により引き起こされる生体内での酸化を分析する手段を構築し, それらの分子病態解析を深化することが急務である。今回, 活性酸素種を捕捉する蛍光プローブについていくつか紹介する。

生体内での活性酸素種発生機構

生体内でのエネルギー生成機構に重要な役割を果たしているのがミトコンドリア内の電子伝達系と呼ばれ

¹⁾ 福岡大学理学部化学科, 〒 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180, Japan

る部分であり、それらはミトコンドリア内膜に存在するたんぱく質複合体で構成されている。その複合体をとおして、ミトコンドリア膜間スペースにプロトンを放出し、そのプロトンを駆動力としてATPを合成している。細胞内に取り込まれた酸素分子の多くはミトコンドリア内に運ばれ、そこで電子を受け渡しされることで活性酸素種へと変換される(図1)。¹ すなわちミトコンドリアは、このエネルギー生成過程(電子伝達系)で、様々な活性酸素種を生成し続ける、生体内の活性酸素種発生源となっている。生成した活性酸素種は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなど、様々な酵素がそれらを除去することで細胞の営みは正常に保たれている。² しかしながら、この発生と除去機構のバランスが崩れると、ミトコンドリアで発生した活性酸素種は、更なる強力な酸化力をもつ化学種を生み出す。³⁻⁵ この過程で発生するOH \cdot は、タンパク質、脂質、DNAなどを酸化し、生体に酸化的損傷(酸化ストレス)を与え、ガン、脳卒中、アルツハイマー病などの引き金となる。⁶ 多くの活性酸素種はミトコンドリアで発生することから、ミトコンドリアは生体内で最も酸化ストレスを受けやすい細胞内微小器官であるといえる。⁷⁻⁹

ミトコンドリア内での酸化ストレスは主に膜中に存在する不飽和脂質の連鎖的脂質過酸化反応として現れる(図2)。この反応は、ミトコンドリア膜を構成する不飽和脂肪酸が、OH \cdot により酸化を受け脂質ラジカ

ルを形成し、更に酸化を受け脂質ペルオキシドラジカルを経て、脂質過酸化物を与える反応である。ひとたび不飽和脂肪酸が酸化を受けると、連鎖的に反応が進行し、脂質過酸化物を蓄積させる。この脂質過酸化物の蓄積もまた、老化、動脈硬化やガンなどの病気を引き起こすことから、重要な酸化ストレスマーカーとなる。¹⁰

この脂質過酸化を検出には、ヨウ素滴定法やチオバルビツール酸(TBARS)法が従来から用いられていたが、これらの測定法は破壊的分析であり生細胞中での観測ではない。またTBARS法は、試料中のマロンジアルデヒドを検出する測定法で、これは脂質過酸化物の二次的物質であるため、選択的に脂質過酸化物を検出しているわけではない。¹¹

トリアリールホスフィンを用いた過酸化物捕捉剤

近年、3価リン化合物であるトリアリールホスフィン(3-アリールホスフィン)を蛍光プローブとして利用した報告例がいくつかある(図3)。^{12,13} 蛍光発光する原子団であるピレンやペリレンを置換基として持つジフェニルピレンホスフィン(DPPP)や3-ペリレンジフェニルホスフィン(3-PeDPP)は還元状態であるホスフィンではリン原子上の孤立電子対を介した光電子移動反応により蛍光団を消光する。ひとたび酸化を受けホスフィンオ

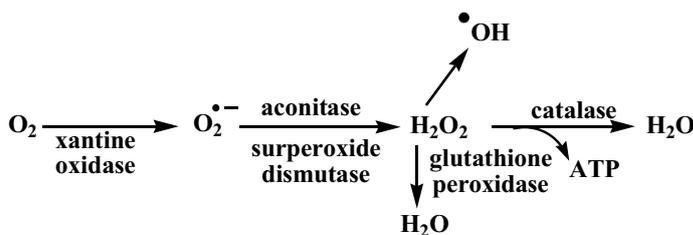


図1. ミトコンドリア呼吸鎖より産生される活性酸素種

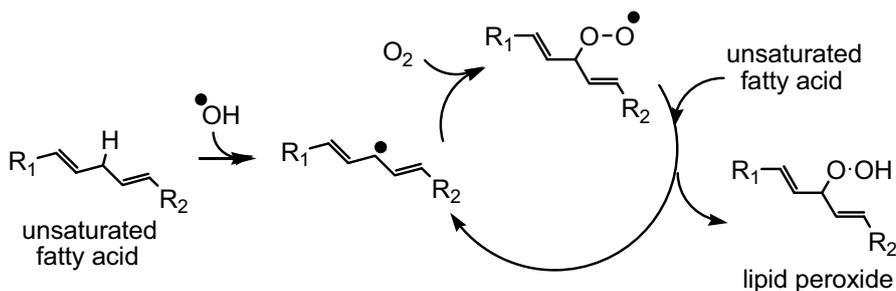


図2. 連鎖的脂質過酸化反応

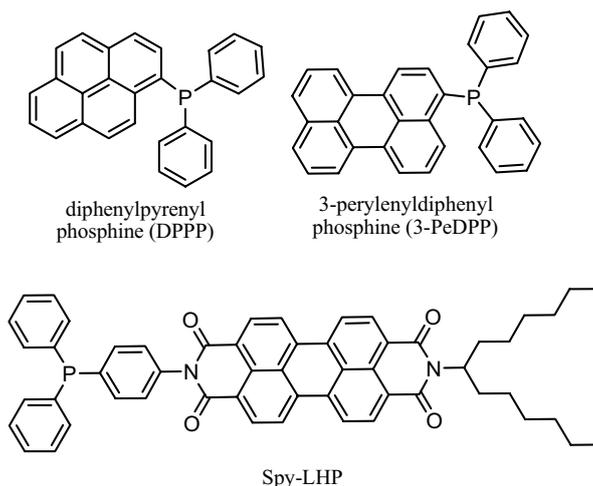


図3. トリアリールホスフィンをもつ過酸化捕捉蛍光プローブ

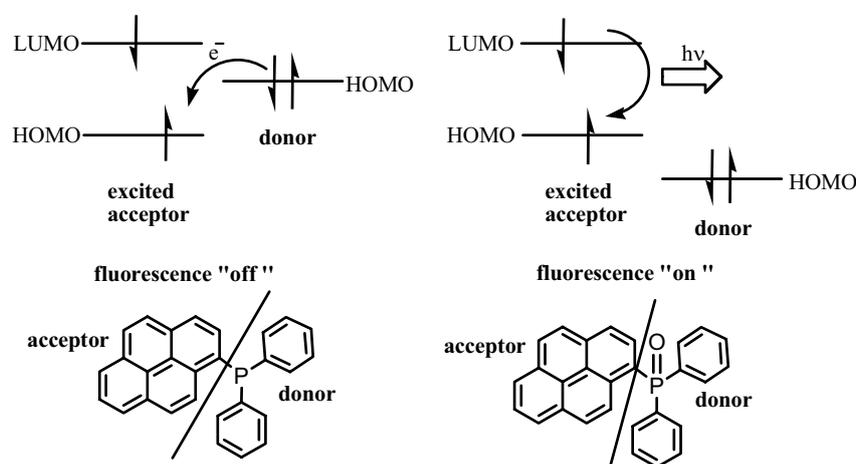


図4. 蛍光性置換基をもつトリアリールホスフィンの消光現象

キシドになるとその消光は解消され蛍光団の強い蛍光発光が見られるようになる。すなわち、過酸化物により酸化されることで、相当するホスフィンオキシドとなり、蛍光強度が増大する特徴を DPPP や 3-PeDPP はもつ (図 4)。このようなトリアリールホスフィン誘導体は、脂溶性が高く、細胞内導入が困難である。近年、宗らにより報告された Spy-LHP は脂溶性の高さを利用し、さらにアルキル鎖を導入することで細胞形質膜に局在化する過酸化捕捉蛍光プローブに特化した優れた蛍光プローブであるといえる。¹⁴

細胞膜透過性蛍光プローブ

細胞膜を透過し細胞内に導入することができる蛍光プローブがいくつか報告されている。ジクロロフルオ

レセインジアセテート (DCF-DA) や Peroxyfluor-1 (PF1) は細胞膜を比較的容易に透過し細胞質に集積される (図 5)。特に DCF-DA は、アセチル基が細胞内の加水分解酵素により加水分解を受け、細胞内滞留性が高くなる。しかし、この蛍光プローブは生細胞中で細胞質に産生される活性酸素種や高活性ラジカル種を捕捉するが、化学種への選択性を持たない。PF1 は、プローブ自身に立体的かさ高さを持たせることで小さな化学種にのみ反応するように選択性を持たせている。しかしながら、脂質過酸化物のように立体的にかさ高い化学種とは反応せず、その産生を細胞中で検出することは困難である。このようにかさ高い化学種にのみ反応するような選択性を持たせることは蛍光プローブの分子設計、「笈の目を大きくする」、だけでは踏破することのできない障壁となる。また、どちらの

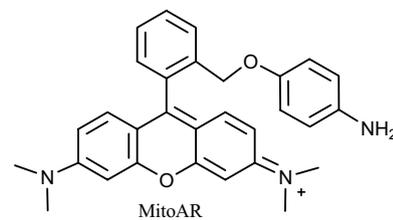
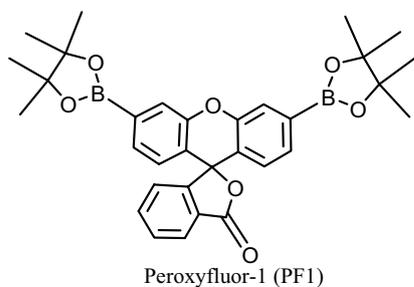
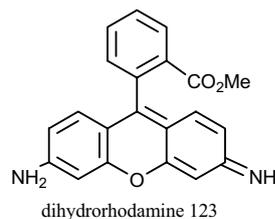
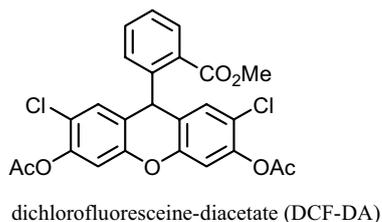


図5. フルオレッセインを骨格として
活性酸素捕捉蛍光プローブ

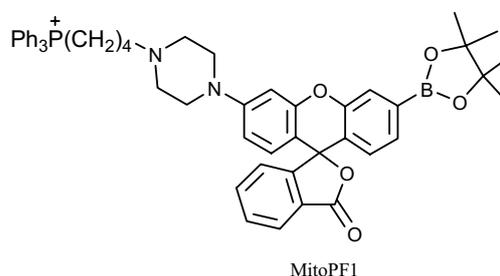


図6. ミトコンドリアに局在化する活性酸素種
捕捉蛍光プローブ

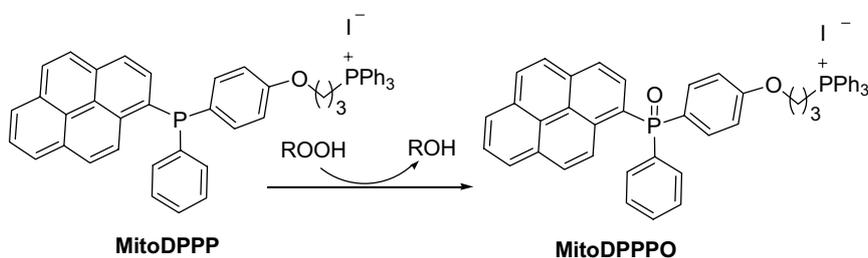


図7. Mito DPPPの過酸化物による酸化反応

蛍光プローブにも共通することは、細胞質全体に分散し、空間分解能良く酸化ストレスの場所を特定することはできないことである。¹⁵

細胞内微小器官局在化蛍光プローブ

先にも記したように、ミトコンドリアは、活性酸素種産生と密接な関係をもつことから、ミトコンドリアに特異的に局在化する蛍光プローブの開発も進んでいる。図6に示すジヒドロローダミン123やMitoARはローダミンを基本骨格にもつ活性酸素種感受性蛍光プローブである。ミトコンドリアは、ATP合成の際

に膜間スペースにプロトンを蓄積させるため、内膜と外膜との間に電位差が生じ、その電位差は細胞形質膜よりも高い。その特質にตอบสนองしてローダミンはミトコンドリアに局在化する。ジヒドロローダミン123やMitoARは細胞内微小器官に局在化する特性は持つものの脂質過酸化物に対する選択性がない。¹⁶ トリフェニルホスホニウム塩のような脂溶性カチオンは細胞内へ取り込まれると、電位差が高いミトコンドリアへ局在化することが近年Murphy等により報告されている。¹⁷⁻²⁰ そのトリフェニルホスホニウム塩をPF1に結合させたMitoPF1が過酸化水素特異的な感受性をもつ蛍光プローブとして開発された。MitoPF1は、PF1

の形質をそのまま受け継いだミトコンドリアに局在化する蛍光プローブで、立体的にかさ高い活性種との反応性に乏しい。このように細胞内で OH^\cdot 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 など、多くの活性酸素種が存在する中、ミトコンドリア内脂質過酸化物を選択的に識別し可視化するような蛍光プローブはミトコンドリア内での酸化ストレスの度合いを推し量るために必要となる。

細胞内シグナル選択性をもつ蛍光プローブ

ミトコンドリアに局在化し過酸化物を捕捉する蛍光プローブとして、我々はトリフェニルホスホニウム塩を DPPP に結合させた MitoDPPP を開発した。この蛍光プローブは、351 nm の光で励起すると 380 nm に蛍光発光を示し、酸化されて MitoDPPP O になると光誘起電子移動反応による消光が解消され、その蛍光強度は約 35 倍増大する (図 7)。均一溶媒中では、種々の脂質過酸化物および過酸化水素との反応性は若干の違いは見られるが、どの過酸化物によっても酸化を受ける。一方、リポソーム中、および細胞中で種々の過酸化物との反応性を比較すると、脂溶性の過酸化物によって速やかに酸化を受けるが、過酸化水素での酸化は極めて遅い。また、MitoDPPP は、容易に細胞内導入され、ミトコンドリアに局在化する。すなわち、MitoDPPP はミトコンドリアに局在化し、脂質過酸化物のみを捕捉する新しい蛍光プローブであるといえる。²¹

活性酸素種感受性蛍光プローブを用いた細胞内抗酸化活性測定

近年、ミトコンドリア DNA の病原性突然変異が癌細胞の転移を誘発していることが明らかになった。これは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の突然変異がミトコンドリア呼吸活性を低下させ活性酸素種を大量に漏出することで転移に係る核遺伝子の発現を上昇させるためである。また、抗酸化剤で処理することで癌転移を抑制できることも明らかにされている。²² このように、ROS の過剰生産が転移の原因である場合は、抗酸化剤がヒトの癌転移の治療に有効である。抗酸化剤の能力を計測する方法は数多く知られているが、抗酸化剤の細胞膜透過性の差まで考慮する方法として、生細胞中に ROS 感受性蛍光プローブとラジカル開始剤を導入し ROS を発生させ、抗酸化剤の細胞内抗酸化活性 (CAA) の測定法が報告されている。生細胞内で用いることのできる活性酸素感受性蛍光プローブのひとつであるジクロロフルオレセイン誘導体 (DCFH-DA) をプローブとし、マウス肝癌由来 HepG2 細胞を用い

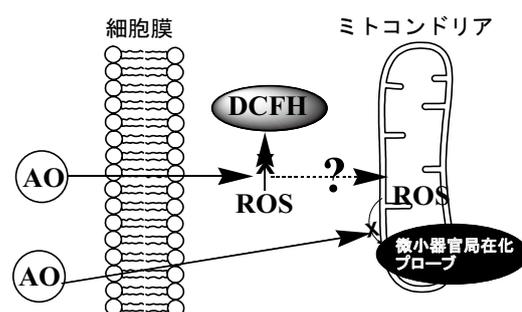


図8. 細胞内抗酸化活性測定

た CAA 測定がある。²³ DCFH-DA は、細胞内加水分解酵素により分解され、細胞質に留まる ROS 感受性蛍光プローブであるが、それらは少しずつ細胞外に漏れ出ることが知られている。また、Wolfe らの手法では DCFH とラジカルが細胞質中に分散することとラジカル開始剤がどこに存在するかが明らかでないことにより、ROS の発生と捕捉する場所が不確かなため、抗酸化剤 (AO) がミトコンドリアで過剰に産生された ROS を他の細胞内微小器官に漏出させることなく消去する能力をもつのかどうかを知ることはできない。すなわち、既存の方法では、生細胞中で ROS の本来の発生源であるミトコンドリアへの抗酸化剤の移行する能力を観測できていない。(図 8 の上部)。MitoDPPP は、細胞内微小器官であるミトコンドリア局在化するため、ミトコンドリア自体が ROS を過剰産生する系 (グルタミン酸添加) を組み合わせることで抗酸化剤のもつ細胞膜透過性と ROS の産生場所であるミトコンドリア近傍まで移行する能力とを含めた生細胞内抗酸化活性が測定できると考えられる (図 8 の下部)。

おわりに

ミトコンドリアに局在化する蛍光プローブ MitoDPPP は過酸化物感受性部位であるトリアリールホスフィン部分の脂溶性が高くミトコンドリア膜内に存在する。そのため、過酸化水素との反応性が低下し、脂溶性の高い脂質過酸化物とのみ反応すると考えられる。これは MitoPF1 とは対照的であり、生細胞中に導入されることで獲得する選択性である。すなわち「筈の目の大きさ」だけでなく、筈を置く位置が重要になる。そのためには、蛍光プローブの生細胞中での分子動態等を精査することが今後の課題として残されている。

参考文献

1. M. Saraste, *Science*, **1999**, *283*, 1488.
2. H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *215*, 213.
3. *Oxidative stress, Disease and Cancer*; Singh, K. K., Ed.; Imperial College Press: London, **2006**.
4. Douglas, C. W., Lott, M. T. In Stevnsner, T., Ed., *Molecular Biology of Aging*, **1999**, pp 125-147.
5. C. Giulivi, A. Boveris, E. Cadenas, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *316*, 909.
6. M. T. Lin, M. F. Beal, *Nature*, **2006**, *443*, 787.
7. A. Boveris, N. Oshino, B. Chance, *Biochem. J.* **1972**, *128*, 617.
8. J. St-Pierre, J. A. Buckingham, S. J. Rocbuck, M. D. Brand, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44784.
9. P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders, S. S. Sheu, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *287*, C817.
10. E. Niki, Y. Yoshida, Y. Sato, N. Noguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *338*, 668.
11. I. Matot, Y. Nanevich, A. Al-Mehdi, C. Song, A. B. Fisher, *Free Radic. Med.*, **2003**, *34*, 785.
12. K. Akasaka, S. Ijichi, K. Watanabe, H. Ohru, H. Meguro, *J. Chromatogr.* **1992**, *596*, 197.
13. Y. Okimoto, A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita, N. Noguchi, *FEBS Lett.* **2000**, *474*, 137. 220.
14. N. Soh, T. Ariyoshi, T. Fukaminato, H. Nakajima, K. Nakano, T. Imato, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 3762.
15. M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15392.
16. Y. Koide, Y. Urano, S. Kenmoku, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 10324.
17. M. P. Murthy, R. A. J. Smith, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2000**, *41*, 235.
18. R. J. Burns, M. P. Murphy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *339*, 33.
19. G. F. Kelso, C. M. Porteous, G. Hughes, E. C. Ledgerwood, A. M. Gane, R. A. J. Smith, M. P. Murphy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2002**, *959*, 263.
20. M. L. Jauslin, T. Meier, R. A. Smith, M. P. Murphy, *FASEB J.* **2003**, *17*, 1972.
21. K. Shioji, Y. Oyama, K. Okuma, H. Nakagawa *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010** *in press*.
22. K. Ishikawa, K. Takenaga, M. Akimoto, N. Koshikawa, A. Y., H. Imanishi, K. Nakada, Y. Honma, and J. Hayashi Science, **2008**, 661.
23. K. L. Wolfe, R. H. Liu. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8896.