

細胞の損傷や老化により生成する脂質過酸化物のバイオイメーjing

東京大学大学院農学生命科学研究科

佐々木 栄太

Oxidative stress due to cell damage or aging results in lipid peroxidation, which produces various lipid radicals and α , β -unsaturated aldehydes. The highly reactive aldehyde species readily modify specific or unspecific protein sites and maybe involved in many diseases such as atherosclerosis and cancer. Although many analytical methods have been developed for lipid peroxidation, imaging of the aldehydes in living cells is still challenging due to lack of appropriate chemical probes. Here, I designed, synthesized and investigated two aryl azide-based fluorescence probes to detect acrolein, the shortest α , β -unsaturated aldehydes with a three carbon unit, and an alkoxyamine-based probe targeting the reactive aldehydes. One of the aryl azide-based probes with a 7-nitrobenzoxadiazole scaffold yielded the corresponding formyl triazole product upon reaction with acrolein. The reaction product showed substantially red-shifted absorbance compared to the unreacted probe, however, instability of the azide group in the probes may limit their use for the imaging of acrolein in living cells. The other probe containing a rhodamine scaffold with an alkoxyamine substituent showed pH-dependent absorbance and fluorescence spectra, which are characteristic for many rhodamine derivatives due to the open and closed spirocyclic forms in equilibrium. When it was mixed with α , β -unsaturated aldehydes at pH 7, significant increase of absorbance and fluorescence was observed likely because the open form was stabilized for the reaction product. Thus, the probe was applied to HeLa cells. Confocal microscopy images showed fluorescence increase in some cellular compartments. Co-labeling the cells with a lysosome-targeted dye revealed that the probe turned to fluorescence in lysosome, where the local pH is known to be 4.5-5.0. Accumulation of the probe in lysosome may hamper the desired imaging of the reactive aldehyde species. Further investigation is in progress to determine where the probe distributes in the cells and if it can detect endogenous aldehydes under oxidative stress.

1. 緒 言

生体組織の酸化還元状態は、酸化物質と還元物質の巧みなバランスによって適切な状態に保たれている。しかし、癌や生活習慣病をはじめとする疾患や、加齢などによって酸化ストレスが亢進すると、生体内で日常的に発生している反応性の高い活性酸素種が、DNA、タンパク質、脂質といった主要な生体構成分子を酸化し、細胞障害を引き起こす。したがって、これらの活性酸素種、またはそれによって酸化修飾を受けた生体分子を感度良く検出することができれば、細胞の健康状態や老化の度合いを判定する上で有効である。

リン脂質やコレステロールエステルなどの生体膜を構成する多価不飽和脂肪酸は、特に活性酸素による酸化修飾を受けやすい性質をもつ。したがって、これらの脂質が酸化的に分解して生じる不飽和アルデヒド化合物（加齢臭の原因として知られる2-ノネナールや毒性の高いアクロレインなど）は酸化ストレスの良いマーカーとなりうる。近年、これらの高反応性脂質過酸化物が、タンパク質の特定アミ

ノ酸残基を化学修飾しうることがわかってきて注目を集めている。それによって生成するさまざまなタンパク質修飾体の詳細な働きは未だ明らかとなっていないが、疾病や老化に関わる新たな危険因子の可能性がある¹⁾。

本研究では、細胞内に生成する脂質過酸化物を高感度・高時空間分解能で検出する方法の開発を目指し、生理的条件下これらの分子種と反応して蛍光性を獲得する機能性小分子プローブを創成することを目的とした。具体的には、1) 近年アクロレインとの反応性が報告されたアリルアジド基を反応部位として含む蛍光プローブ、2) さまざまな炭素鎖長を有するアルデヒド基をターゲットとしたアルコキシアミノ基を反応部位とする蛍光プローブの開発を行った。目的とする脂質過酸化物感受性蛍光プローブによって、さまざまな酸化ストレス条件下での生細胞イメージングデータを蓄積することができれば、疾病や老化による細胞障害の診断や、新たな病態または加齢メカニズムの解明につながると期待できる。

2. 方 法

2.1. プローブの合成

アリルアジド基を反応部位として含む蛍光プローブ **1** および **2** (図1A) は、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンおよびIR-780 ヨウ化物をアセトンまたはメタノールに溶解し、アジ化ナトリウムを加えることで合成した。アルコキシアミノ基を反応部位とする蛍光プローブ **3** (図1B) は、ローダミンBをベンジルアルコール誘導体 (**4**)、ベン



Bioimaging of lipid peroxidation induced by cell damage or aging

Eita Sasaki

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

ジエチルアミン誘導体へと変換した後に²⁾、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中に溶解し、ジアザビシクロウンデセン存在下 *N*-Boc-ヒドロキシルアミンと反応させ、酸による Boc 基の脱保護を行うことによって合成した。それぞれのプローブまたはその中間体は、シリカゲルクロマトグラフィーまたは逆相カラム (C18) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (JASCO) によって精製した。また、得られた化合物の構造は、NMR (JNM-ECA500II, JEOL) および質量分析 (JMS-T100LC, JEOL) によって同定した。

2. 2. プローブとアクロレインやその他の α, β -不飽和アルデヒドとの反応

プローブ 1 をテトラヒドロフラン (THF) 中でアクロレインと混合した後、HPLC を用いてその反応物を分析、分取した。プローブ 1 およびそのアクロレインとの反応物の光学特性は、分光光度計 (U-3900, Hitachi)、蛍光光度計 (F-7100, Hitachi) を用いて分析した。プローブ 2 は、メタノール、DMF、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル中でアクロレインと混合し、またはプローブのみで、その吸収スペクトル、蛍光スペクトルを継続的に測定した。プローブ 3 は、リン酸緩衝液 (pH7 または 8) 中でアクロレインを加えた時の吸収スペクトル、蛍光スペクトルを継続的に測定した。さらに、プローブ 3 をさまざまな炭素鎖長をもつ α, β -不飽和アルデヒド分子 (C3-C10: acroleine, crotonaldehyde, trans-2-pentanal, trans-2-hexenal, trans-2-heptenal, trans-2-

octenal, trans-2-nonenal, trans-2-decenal) とリン酸緩衝液 (pH7) 中またはメタノール中で反応させ、波長 560nm の吸光度をプレートリーダー (ARVO X3, PerkinElmer) によって測定し、それぞれの溶液を HPLC および質量分析装置によって解析した。

2. 3. プローブ 3 のリン酸緩衝液中での光学特性

プローブ 3 のジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液をさまざまな pH に調製した 0.1M のリン酸緩衝液 (pH3-11) に終濃度が 10 μ M (1% DMSO) となるように溶解し、分光光度計、蛍光光度計を用いてその吸収・蛍光スペクトルを分析した。また、対象実験として、ローダミン B とそのベンジルアルコール誘導体 (4) の光学特性についても同様に分析した。

2. 4. プローブ 3 による培養細胞 (HeLa 細胞) のイメージング

直径 35mm のガラスボトムシャーレ (CELLview, Greiner Bio-One) 上に培養した HeLa 細胞をカルシウムとマグネシウムを含むリン酸緩衝食塩水 (PBS (+)) で洗浄後、1mL の PBS (+) を加えた。プローブ 3 の DMSO 溶液を 1mL の PBS (+) と混合し、これを共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200, Olympus) 下、シャーレに加え、経時的な蛍光観察を行った (プローブ 3 の終濃度 100nM, DMSO の終濃度 0.1%)。また、市販のリソソーム染色蛍光試薬 (LysoTracker Green DND-26, ThermoFisher Scientific) による細胞染色は、販売元の取扱い説明書の指示に従っ

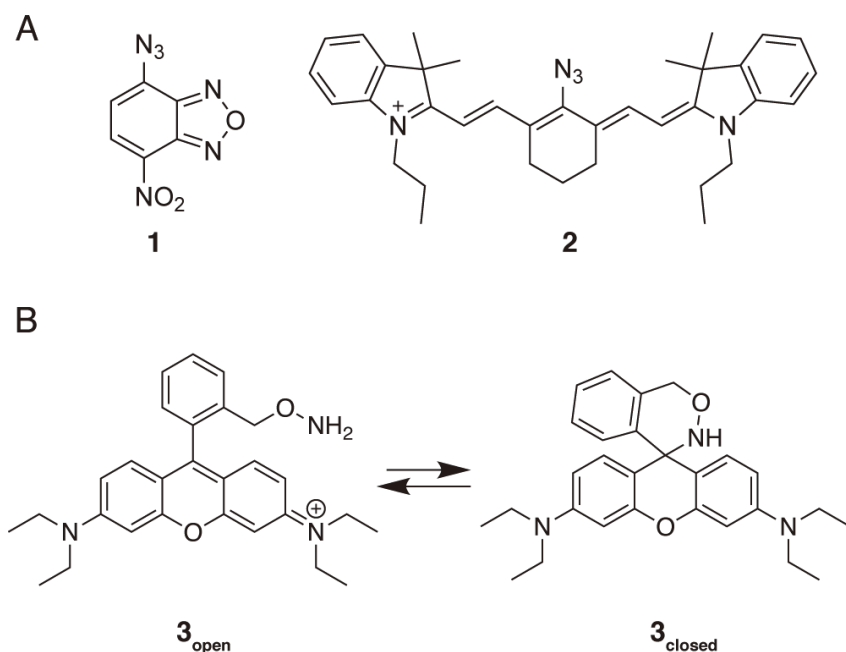


図1 (A) アジド基を反応部位とする蛍光プローブ1, 2 の構造式 (B) アルコキシアミノ基を反応部位とする蛍光プローブ3の構造式

て行った。具体的には、HeLa細胞の培養液に試薬を終濃度75nMに加え、37℃で30分インキュベートした後に、PBS (+)で洗浄した。

3. 結果

3.1. プロープ1

フェニルアジドをニトロベンゾオキサゾール骨格へ導入したプロープ1をTHF中アクロレインと混合すると、プロープ1のホルミルトリアゾール誘導体であると推定される生成物がHPLCおよび質量分析によって検出された。これを分取精製し、プロープ1およびアクロレインとの反応物の吸収スペクトルを測定したところ、アクロレインとの反応によって吸収極大波長が385nmから465nmへと大きく長波長側へシフトしていた(図2A)。そこで、459nmの励起波長を用いて蛍光スペクトルを測定したところ、アクロレインと反応することによって、蛍光極大波長536nmの蛍光を発することを観測した(図2B)。以上の結果より、波長459nm付近の光で励起することによって、ホルミルトリアゾール体のみが蛍光を発するようなアクロレイン検出条件を設定可能であることがわかった(図2B)。

次に、プロープ1の光安定性を検討するため、1を水、メタノール、またはTHFに溶解し、室内灯下で吸収スペクトルを測定したところ、時間依存的なスペクトルの変化(吸収極大波長~385nmの減少と吸収極大波長~455nmの増大)が観測された。質量分析の結果、その原因はプロープ1のアジド基がアミノ基へと変換されたことに由来すると推察された。

3.2. プロープ2

フェニルアジドをトリカルボシアニン骨格へ導入したプロープ2をメタノールに溶解し、アクロレインを加えたが、その光学特性に大きな変化は観測されなかった。そこで、プロープ2とアクロレインとの反応をさまざまな溶媒を用いて検討したところ、DMF、クロロホルム、ジクロロメ

タン、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリルなど、多くの溶媒下で化合物2のスペクトルに経時的な変化(吸収極大波長774nmの減少と吸収極大波長642nmの増大)を観測した。しかしながら、当スペクトル変化はアクロレイン無添加でも引き起こされ、光の照射によって加速された。質量分析などの測定の結果、プロープ2とアクロレインとの期待された反応物は検出されず、プロープ1と同様にそのアジド基がアミノ基へと変換されていることが確認された。

3.3. プロープ3

アルコキシアミノ基を有するローダミンB誘導体であるプロープ3をさまざまなpHに調製したリン酸緩衝液(pH3-11)に加え、光学特性を分析したところ、pH依存的な吸収スペクトル、蛍光スペクトルの変化が観測された(図3A, B)。すなわち、溶液を酸性から塩基性にするこで、吸光度(吸収極大波長560nm)は減少し、それに合わせて580nm付近の蛍光強度も減少した。吸収極大波長の吸光度をpHに対してプロットしたところ、吸光度の最大値の50%を与えるpH (pKcycl)³⁾は6.2付近であると見積もられた。対象実験として、ローダミンBとプロープ3の合成中間体であるローダミンBのベンジルアルコール誘導体(4)についても同様の測定を行った。ローダミンBの吸収スペクトルはpH3-11の範囲でほとんど変化しなかった。4の吸光度はプロープ3と同様に酸性から塩基性になるこで減少し、そのpKcyclは8.3付近と見積もられた(図3C)。以上の結果により、プロープ3は中性のpH7付近(あるいはそれ以上のpH)では、吸光度、蛍光強度ともに低く抑えられており、酸性条件下ではそれらが上昇するということがわかった。

次にプロープ3をpH7または8に調製したリン酸緩衝液に溶解し、アクロレインを加えると、いずれの場合でも吸光度と蛍光強度の経時的な上昇が観測された(図3D)。さらに、プロープ3をさまざまな炭素鎖長をもつ α, β -不

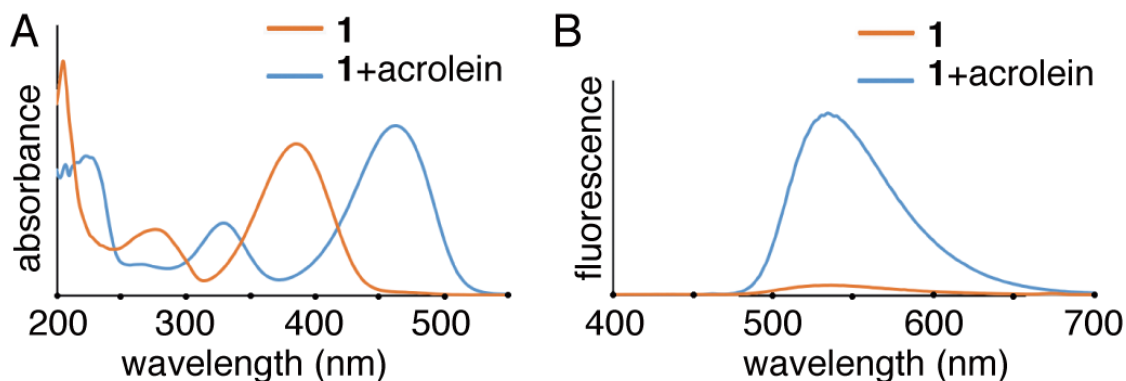


図2 (A) プロープ1およびアクロレイン反応生成物の吸収スペクトル (B) プロープ1およびアクロレイン反応生成物の蛍光スペクトル (励起波長: 459 nm)

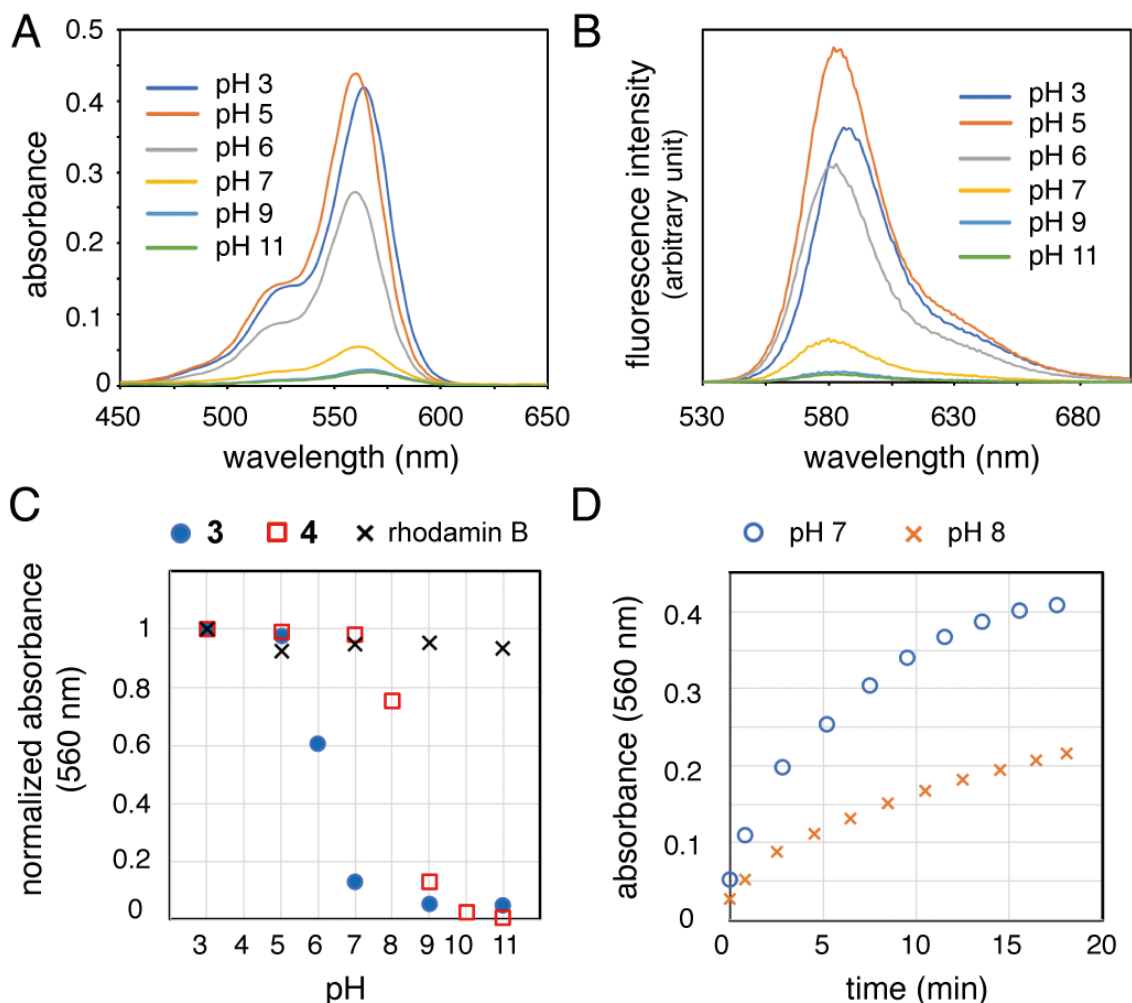


図3 (A)プローブ3 (10 μ M) の0.1 Mリン酸緩衝液 (pH3–11) 中の吸収スペクトル (B)プローブ3 (10 μ M) の0.1Mリン酸緩衝液 (pH3–11) 中の蛍光スペクトル (励起波長: 520nm) (C) プローブ3、ローダミンBのベンジルアルコール誘導体(4)、ローダミンBの0.1Mリン酸緩衝液中のpH 依存的な吸光度 (560nm) 変化 (D) 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7 または8) に溶解したプローブ3 (10 μ M) にアクロレイン (1mM) を加えた時の吸光度 (560nm) の時間変化

飽和アルデヒド分子 (C3–C10) とリン酸緩衝液 (pH7) またはメタノール中で反応させたところ、いずれの条件下でも吸光度の上昇が観察された。さらに、それぞれの反応溶液を質量分析に供することで、対応するオキシム体へと変換されていることを確認した。

最後にプローブ3を共焦点レーザー顕微鏡下、HeLa細胞に加えると、経時的な細胞内蛍光強度の上昇を観察した (図4A)。細胞内の蛍光分布の様子から、プローブ3がリソソームに局在している可能性が推測されたため、市販のリソソーム染色試薬 (LysoTracker Green DND-26) で予め染色したHeLa細胞にプローブ3を加えたところ、リソソーム染色試薬で染色していない場合と比較して、細胞内でのプローブ3の蛍光強度の上昇の仕方が大幅に遅延したが、その蛍光分布には良い重なりが観察された (図4B)。リソソーム内はpH4.5–5程度の酸性条件であるために、プローブ3はリソソームに局在することで、その蛍光強度が上昇したと推察される。

4. 考察とまとめ

生理的条件下での脂質過酸化物のバイオイメーキングを可能とする蛍光プローブの基本設計としては、(i) α, β -不飽和アルデヒド構造をもつ脂質過酸化物と特異的かつ効率的に反応する「反応部位」、(ii) 細胞毒性の少ない可視光から近赤外光を吸収して蛍光を発する「蛍光部位」、(iii) 標的物質と反応することで蛍光強度が増強するようなメカニズム、の3点を満たすことが理想である。標的とする α, β -不飽和アルデヒド構造を有する分子種の中で、もっとも短い炭素鎖 (C3) をもつ分子は、アクロレインである。アクロレインの従来の検出・定量法としては、フェニルヒドラジンとの反応で誘導体化した後に、高速液体クロマトグラフィーで検出する方法がよく知られている他、アニリンまたはフェニレンジアミンを反応基とする蛍光プローブが報告されている^{4, 5)}。しかし、これらの蛍光プローブを用いた検出には、強酸あるいは有機溶媒存在下 80–100℃の

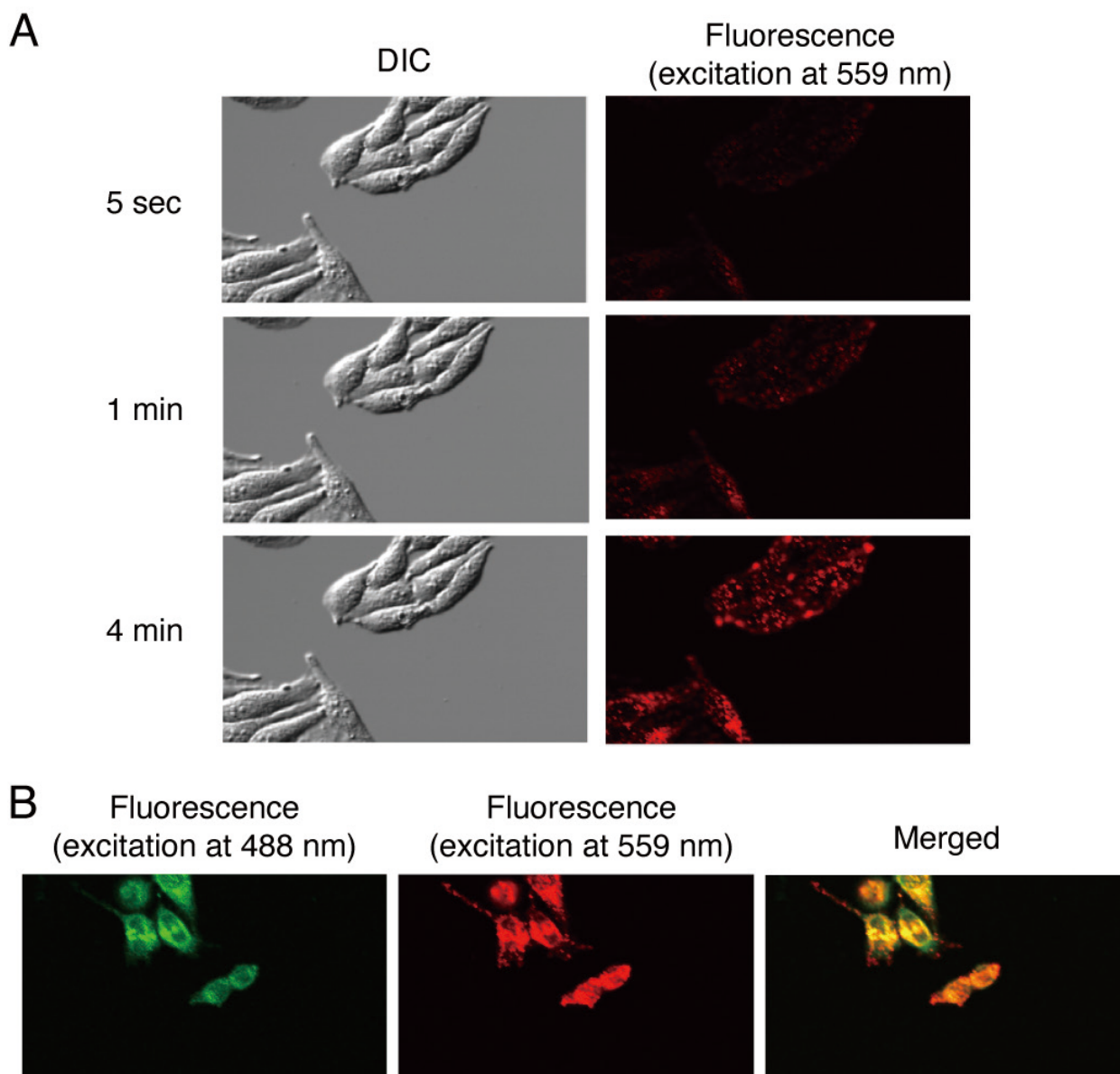


図4 (A)プローブ3(終濃度100nM)をHeLa細胞に添加した直後(5秒)、1分後、4分後の微分緩衝像(DIC)および蛍光像(559nmレーザー励起)(B) HeLa細胞をLysoTracker Greenとプローブ3で共染色した後の蛍光像(左から488nmレーザー励起、559nmレーザー励起、それらの重ね合わせ)

加熱が必要なため、生細胞へ直接応用することは非現実的であった。ところが近年、アクロレインが生理的条件下アリルアジドと反応することが新たに見出され、これを利用した生細胞内でのアクロレインの蛍光観察が報告された⁶⁾。そこで本研究では、上記反応によって、アジド基がホルミルトリアゾールへと変換されることに着目し、その反応前後での電子状態の変化が、吸収・蛍光スペクトルの変化に連動するようなプローブを創出することが可能であると考え、アクロレインとの「反応部位」であるフェニルアジドと、生細胞に応用可能な「蛍光部位」であるニトロベンゾオキサゾールまたはシアニン色素を結合した分子(1, 2)を設計し、アクロレインとの反応前後での吸収・蛍光スペクトルの変化を測定した。

プローブ1はアクロレインと反応することで、吸収スペクトルが約80nm長波長シフトした蛍光性のホルミルトリアゾール体を生成することが確認できた一方、プローブ2については、アクロレインとの反応生成物を検出することができなかった。現在のところ、アリルアジド基を反応部位とするプローブの設計とその細胞応用には2点の問題点が挙げられる。1点目は、そのアクロレインとの反応性が不十分である点である。詳細は省略するが、さまざまなフェニルアジド置換体を用いて、アジド基とアクロレインの反応性を検討したところ、電子供与基、電子吸引基のいずれの置換基においても反応性の向上が見られなかった。したがって、アクロレインを高感度で検出できるプローブを設計するためには、さらなる検討が必要である。2点目は、

プローブ **1**、**2** のアジド基が、溶媒、光、熱などの影響を受け、特定の条件下において容易にアミノ基へと変換されうるとい点である。同様の反応はこれまでも報告されており、光によってアジド基から窒素が放出され、反応性の高いニトレン中間体が生じると考えられており、これを利用した生体分子の光親和性標識法への応用も示唆されている^{7,8)}。プローブ **1** においては、アクロレイン反応体(ホルミルトリアゾール体)とアミン誘導体の吸収スペクトルが類似しているため、アクロレイン選択的なイメージングプローブとしての利用を妨げる要因になりうる。したがって、アジド基を用いたアクロレイン検出蛍光プローブをより実用化に近づけるためには、アジド基の安定性についてさらなる検討と改良が必要である。

そこで次に、アリルアジドとは異なる「反応部位」によって、脂質過酸化反応で生じるさまざまな炭素鎖長を有するアルデヒド基を標的とした蛍光プローブの設計を試みた。アルデヒド基に対する「反応部位」としては、アルコキシアミンとヒドラジンがよく知られており、それぞれ対応するオキシムとヒドラゾンを生成する⁹⁾。これらの「反応部位」を利用したアルデヒド検出試薬は数多く報告されているが、生細胞の脂質過酸化反応に由来するアルデヒドをイメージングした例はほとんどない¹⁰⁾。そこで、アルコキシアミノ基を「反応部位」とし、細胞イメージングに汎用される蛍光色素であるローダミンを「蛍光部位」とする分子(**3**)を新たに設計した。一般的に、ローダミン分子内のキサンテン骨格9位への求核攻撃は、分子内共役系の切断に伴う吸光スペクトルの変化及び蛍光の消失をもたらすことが知られている。アルコキシアミノ基の求核性は溶液中のpHによって大きく影響を受けるが、これまでに報告されているさまざまなローダミン系の蛍光プローブの蛍光特性から³⁾、**3** は中性条件下においては、スピロ環化合物(**3**_{closed})としてほぼ無蛍光となることを推測した。平衡状態として一部存在するフリーのアルコキシアミン(**3**_{open})が標的とするアルデヒド分子と反応してオキシムを形成すると、上記の分子内環化反応が抑制されるために、蛍光が増強することを期待した。

実際に、プローブ **3** をさまざまなpHに調製したリン酸緩衝液中に溶解し、吸収・蛍光スペクトルを測定したところ、予想通り中性・塩基性条件下では吸光度、蛍光強度ともに低く抑えられていることが確認できた。また、pH5以下の酸性条件下では吸光度、蛍光強度がほぼ一様になることが観察された。したがって、プローブ **3** はpH7、8の条件下では、その大部分がスピロ環化合物(**3**_{closed})として存在していることが推測された。ここにアクロレインなどの α,β -不飽和アルデヒド分子を加えると、期待通りアルデヒド分子と反応したオキシム体(開環構造)の形成に伴う吸光度・蛍光強度の増強が確認できた。また、その反

応速度は、pH7においてpH8よりも速いことが観察された。一般的に、アルコキシアミンとアルデヒドからオキシムが生成する反応速度は、pH4.5付近で最も速くなることが知られている⁹⁾。最後にプローブ **3** をHeLa細胞に応用し、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察を行った。ローダミンBは細胞内のミトコンドリアに局在することがよく知られている色素だが、共染色の結果、プローブ **3** は極めて効率良くリソソームを染めることが観察された。しかし、pHが4.5-5程度であることが知られているリソソーム内では、プローブ **3** はほぼ全てが開環構造(**3**_{open})を形成していると考えられるため、当初計画していたようなアルデヒド分子との反応による蛍光強度の増強を期待することは難しい。一方で、プローブ **3** の細胞内分布は明確にはわかっておらず、細胞質やその他の細胞小器官などの中性環境下にも分布する場合は、酸化ストレス由来のアルデヒド分子と反応することで蛍光強度が増強することが期待できる。逆に、プローブ **3** がリソソームに局在している場合は、上述したようにオキシム形成に適したpHであるため、酸化ストレスを加えた後の細胞溶解液を質量分析することで、リソソーム選択的な脂質過酸化物の同定が可能になるかもしれない。これらの実験については、今後の課題である。

以上、本研究課題では、生細胞に応用可能な脂質過酸化物感受性蛍光プローブの開発を目的とした研究を行った。本研究で得られた知見をさらに発展させ、生細胞内に生成する脂質過酸化物をイメージングすることができれば、さまざまな酸化ストレスに伴う肌機能の低下を直接または間接的に推測することが可能になると期待されるとともに、疾患や老化の新たなメカニズムの解明にも役立つはずである。

(引用文献)

- 1) Parvez, S., Long, M. J. C., Poganik, J. R. & Aye, Y. *Chem. Rev.* **118**, 8798-8888 (2018).
- 2) Luo A. L., Gong, Y. J., Zhang, J., Zhang, C. C., Zhang, X. B. & Tan, W. *Talanta*, **117**, 326-332 (2013).
- 3) Uno, S. *et al. Nat. Chem.*, **6**, 681-689 (2014).
- 4) Togashi, M. *et al. Org. Lett.*, **12**, 1704-1707 (2010).
- 5) Imazato, T. *et al. Biomed. Chrom.*, **29**, 1304-1308 (2015).
- 6) Pradipta, A. R. *et al. ACS Sensors* **1**, 623-632 (2016).
- 7) Lord, S. J. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9204-9205 (2008).
- 8) Lord, S. J. *et al. J. Phys. Chem. B* **114**, 14157-14167 (2010).
- 9) Kölmel, D. K. & Kook, E. T. *Chem. Rev.* **117**, 10358-10376 (2017).
- 10) Suchy, M., Lazurko, C., Kirby, A., Dang, T., Liu, G. & Shuhendler, A. J. *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 1843-1853 (2019).