

[研究区分： 学際的・先端的研究 (A)]

研究テーマ： 生細胞内のアスコルビン酸濃度分布のイメージング化に関する研究	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 教授・田井章博	連絡先： atai@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 ビタミン C として知られるアスコルビン酸 (AA) には抗酸化作用、免疫賦活作用など様々な生理作用が報告されているが、その多くの生理作用メカニズムについては未解明である。本研究では、AA の生理作用メカニズム解明の一助と成り得る細胞内の AA 濃度分布のイメージング法の可能性を提案することを目的とした。AA の生理条件下での状態や AA トランスポーターの立体認識性を考慮して蛍光プローブを導入した AA 誘導体を合成した。AA 誘導体は、AA トランスポーターを介して取り込まれていると考えられ、細胞内で特異的な分布を示した。	

【研究内容・成果】

ビタミン C として知られるアスコルビン酸 (AA) には抗酸化作用、抗壊血病作用、抗がん作用、免疫賦活作用など様々な生理作用が報告されているが、意外にもその多くの生理作用メカニズムについては未解明である。本研究では、AA の生理作用メカニズム解明の一助と成り得る細胞内の AA 濃度分布のイメージング法の可能性を提案することを目的とした。

1) 蛍光プローブを導入したアスコルビン酸誘導体の分子設計と合成

AA の抗酸化性は、2 位と 3 位の水酸基に起因しており、これを標的としたタンパク質やこれに基づいた細胞内分布が考えられるため 6 位の水酸基の位置で蛍光プローブを結合させれば良いと考えられる。しかし、2 と 3 位の水酸基がフリーであると AA は不安定であるため、実験で用いる際に酸化されてしまう。また、AA トランスポーターを介して AA が細胞内に入る時、5 位の水酸基の立体が重要である。AA は生理条件下で 3 位水酸基を解離させているので、AA を安定化させ、5 位水酸基の立体を認識させるために、2 位の水酸基に蛍光プローブを導入すれば良いと考えた。2 位に蛍光プローブを導入するに当たり、水酸基を多く持つ AA に選択的に蛍光プローブを導入するため、Kurata らの方法に従い AA の 2 位を水酸基よりも反応性の高いアミノ基に変換した (図 1)。

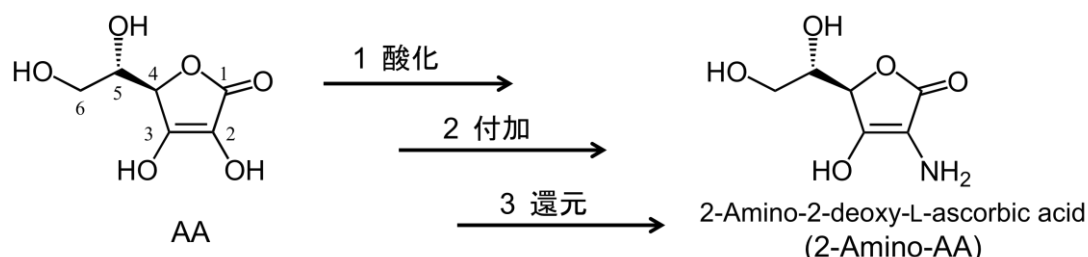


図 1. 2-Amino-AA の合成法 (Kurata *et.al*)

蛍光プローブは現在までに数多く開発されてきたが、AA に蛍光プローブを導入するに当たり、注意しなければならない点がある。それは、一般的に開発されている蛍光プローブは、タンパク質などの高分子をターゲットとした蛍光プローブであるため、蛍光プローブの分子量が大きい場合が多い。AA は低分子であり、分子量の大きい蛍光プローブを導入すると、立体障害や極性の違いにより細胞内での分布が異なる可能性がある。そのため、蛍光プローブを導入しても AA と同じ局在を示すような蛍光プローブを選択する必要がある。この点を考慮して、NBD-COCl を選択して 2-NBD-CO-AA の合成を行った (図 2)。

[研究区分： 学際的・先端的研究 (A)]

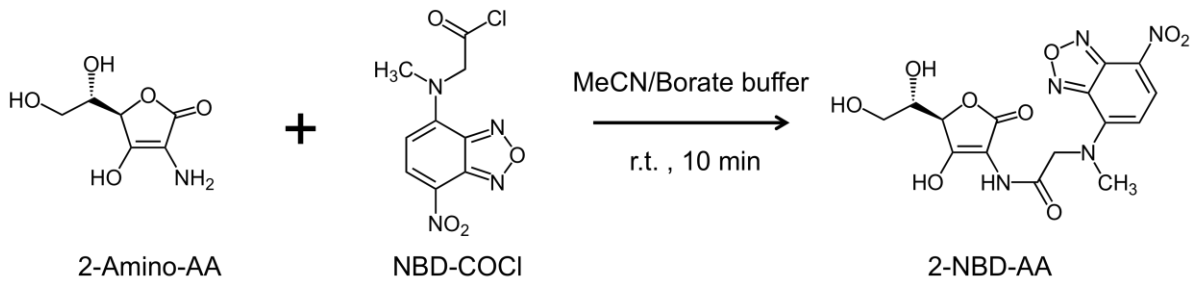


図 2. 2-NBD-CO-AA の合成法

2) 蛍光プローブを導入したアスコルビン酸誘導体の細胞内取り込み

蛍光プローブを導入したアスコルビン酸誘導体である 2-NBD-CO-AA を用いてラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) への取り込みを検討した。また、2-NBD-CO-AA が、AA トランスポーター (SVCT) を介して細胞内に入るかを明らかにするために SVCT 阻害剤 (DIDS) を用いて 2-NBD-CO-AA の取り込みの検討も行った。その結果、2-NBD-CO-AA は RBL-2H3 細胞へ取り込まれ、蛍光を

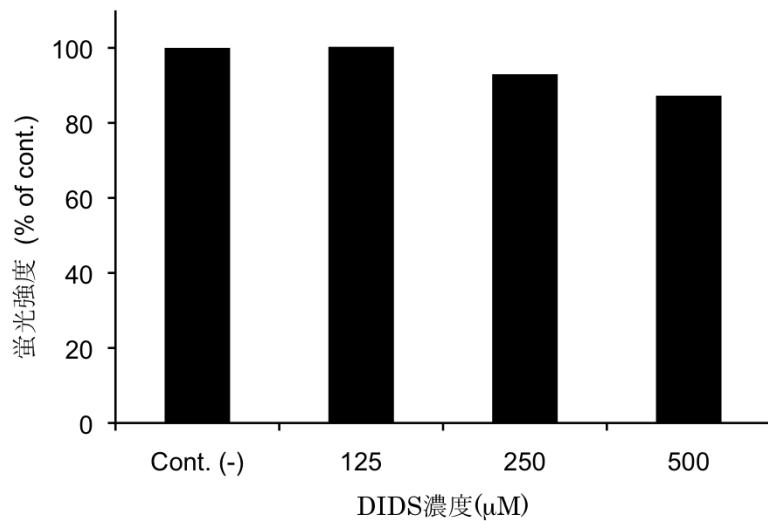


図 3. RBL-2H3 細胞による 2-NBD-CO-AA の取り込み量

発した。さらに、DIDS によって 2-NBD-CO-AA の取り込み阻害が見られたことから、2-NBD-CO-AA は SVCT を介して取り込まれていると考えられる (図 3)。さらに、2-NBD-CO-AA は細胞内に取り込まれ、細胞質の一部に局在することが共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかとなった (図 4)。以上の結果より、蛍光プローブを導入した AA 誘導体は、経時的な生細胞内の AA 濃度分布のイメージング法への利用が可能であることを示す。

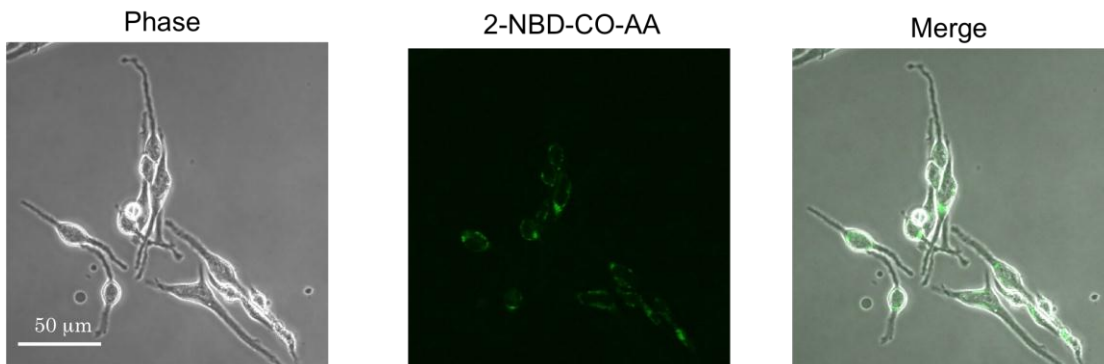


図 4. 2-NBD-CO-AA の細胞内分布