

脂肪酸ベータ酸化を可視化する蛍光プローブの開発

○内之宮 祥平¹・箱崎 花子²・王子田 彰夫¹ (¹九大院薬、²九大院工)

Development of a fluorescent probe for live-cell imaging of fatty acid beta oxidation. (¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University² Graduate School of Engineering, Kyusyu University)

UCHINOMOYA, Shohei¹; HAKOZAKI, Hanako²; OJIDA, Akio

代謝経路の活性はガンなどの疾病細胞で通常細胞と比較して大きく変化しているため、代謝経路の活性を検出する手法の開発は、疾病メカニズムの解明や創薬に重要である。これまで代謝経路活性の測定には安定同位体標識化合物の代謝を質量分析などで追跡する手法などが用いられてきたが、細胞集団の平均値しか得られないという問題がある。最近では細胞ごとの代謝変化(代謝不均一性)の重要性が指摘されており、PET や MRI、質量イメージングなどによって *in vivo* や組織での代謝不均一性が解明され始めた。しかし、これらの手法は分解能が低いため個々の細胞の代謝不均一性を見分けることは困難であり、プローブの半減期が短いなどの問題もある。一方、蛍光プローブは酵素活性を一細胞レベルで高感度かつ簡便に検出可能であり、代謝経路活性を測定する新しい手法として期待される。それにも関わらず、代謝経路を標的とした蛍光プローブはほとんど開発されていない。これは代謝経路を構成する酵素の基質選択性が高いため、代謝経路の基質となるプローブ構造を設計するのが困難なためである。さらに、従来の蛍光プローブはある単一の酵素を検出するための分子設計に基づき開発されていたため、複数の酵素からなる代謝経路全体の活性を検出することはできない。そこで我々は、代謝経路を検出する新しい蛍光プローブの開発を目指している。

本発表では重要なエネルギー生産経路である脂肪酸β酸化(β酸化)を検出する蛍光プローブの開発に関して報告する。β酸化とは脂肪酸がミトコンドリアなどで酸化・水和・開裂の反応を経て2炭素ずつ分解される代謝経路であり、その過程でATP合成に用いられるアセチルCoAなどを生産する。本経路を検出するため、蛍光色素のヒドロキシ基に基質部位として脂肪酸を導入した蛍光プローブを設計した。初期状態では蛍光がOffであるが、脂肪酸がβ酸化を複数回受けて炭素数が3の脂肪酸となった後、水和反応を受けヘミアセタール構造が生じることで蛍光色素が自発的に脱離し、蛍光が回復するという戦略である。重要なことに、蛍光色素が放出されるためにはβ酸化に関与する全ての酵素反応を受ける必要があるため、プローブの蛍光回復はβ酸化経路全体の活性を反映していると言える。

蛍光色素に基質部位としてノナン酸を導入したプローブ合成し、HepG2細胞での挙動をHPLCで解析することで、β酸化の基質となるプローブ骨格を探索した。その結果、小さな蛍光団であるクマリンを有するプローブの場合にβ酸化を受けたプローブと放出されたクマリンのピークが検出された。続いて、クマリンを有するプローブを

HepG2細胞に添加し共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、クマリン蛍光が検出された。この蛍光はβ酸化の阻害剤である *etomoxir* 存在下では検出されなかったことから、β酸化の生細胞イメージングに成功した。さらに、マウスから単離した肝臓細胞でのβ酸化イメージングや、薬剤刺激に伴うβ酸化活性変化の検出にも成功した。

