

論文の内容の要旨

論文題目 メチレンブルー型 $A\beta$ 選択的光酸素化触媒の開発：
触媒の光細胞毒性低減に向けた構造改変

氏名 大井（梶野） 未来

【研究背景・目的】

アミロイド β ペプチド ($A\beta$) は凝集により神経細胞毒性を示し、アルツハイマー病を発現させる原因物質の一つである。当研究室では、 $A\beta$ が疎水性相互作用により凝集する特徴に着目し、これに親水性酸素原子を選択的に付与することで凝集性・毒性を抑制する光触媒を開発した^{1,2}。しかし、これらの光触媒を実際の疾患治療へ応用するためには、近赤外光照射下での酸素化活性、水溶性、脳移行性を含む薬物動態、の三点に改善の余地がある。また、従来の触媒はクロス β シート構造を形成する凝集 $A\beta$ との相互作用によって酸素化活性を発現するために、オリゴマーなどのより毒性の強い低凝集状態の $A\beta$ (Figure 1A, Low Aggregated $A\beta$ に相当) を効率的に酸素化することは困難であった (Figure 1A, path (I))。

当研究室の城野はメチレンブルー (MB) を母骨格として、 $A\beta$ 選択的な光酸素化触媒 **1** を報告した (Figure 1B)³。**1** は、アニリン部位から MB 部位への PeT (Photo-induced electron Transfer) および分子内スタッキングによる静的な消光の双方により触媒活性が OFF となっており、凝集 $A\beta$ が存在するときには **1** が凝集 $A\beta$ に結合してこれらの作動原理が解除され触媒活性が選択的に ON になる。**1** は低凝集状態にある $A\beta$ の酸素化が可能であった一方で (Figure 1A, path (II))、光照射下にて強い細胞毒性を示す欠点を持っていた。低凝集状態 $A\beta$ の酸素化は強力な $A\beta$ 凝集抑制・毒性抑制効果に繋がると考え、光細胞毒性の低減により生体環境においても実用的な光触媒の開発を目指し **1** の構造最適化を進めた。

【方法・結果】

触媒 **1** の光照射条件下における細胞毒性の原因を追求すべく、 $A\beta$ 非存在下、触媒 **1** が生成す

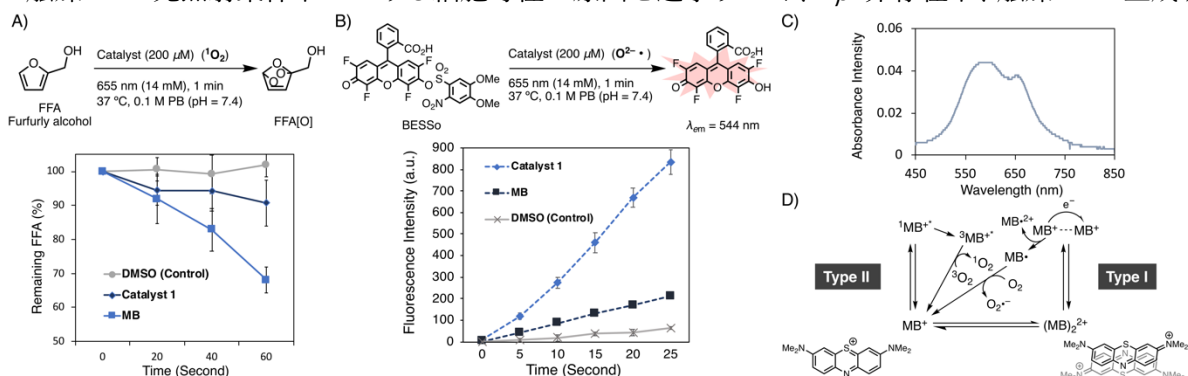


Figure 2. (A) The quantity of remaining furfuryl alcohol (FFA) as a 1O_2 scavenger after photo-irradiation. (B) Fluorescence intensity of specific fluorescence probe for super oxide anion radical (BESSo) with oxygenation reaction of each catalyst. (C) Absorbance spectra of catalyst **1**. (D) Photo-oxygenation mechanism by MB.

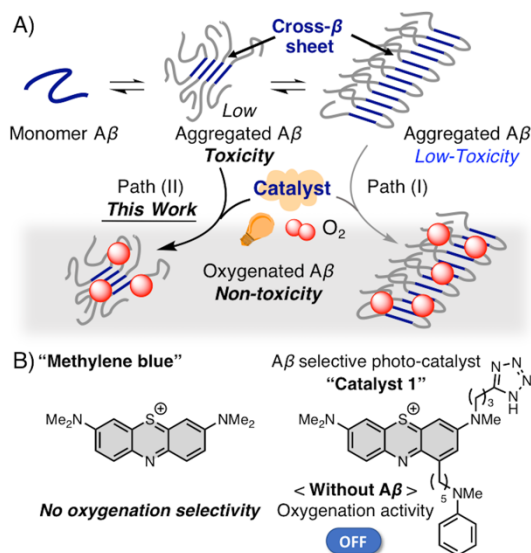


Figure 1. (A) Target $A\beta$ of photo-oxygenation reaction. Previous work: path (I), aggregated $A\beta$, this work: path (II), low-aggregated $A\beta$ (ex. oligomer). (B) Structure of MB and $A\beta$ selective photo-oxygenation catalyst, catalyst **1**.

る一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、およびスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の発生量を検討した (Figure 2A, 2B)。その結果、MB と比較して **1** では一重項酸素の発生量が有意に低下していた一方で、スーパーオキシドアニオンが多量に発生していることが明らかになった。また、触媒 **1** のリン酸バッファー中における UV-vis 吸収スペクトルを測定したところ、610 nm (ダイマーに起因) と 651 nm (モノマーに起因) にピークを有するブロードした波形が観測された (Figure 2C)。すなわち、触媒 **1** は MB 骨格への 5 炭素リンカーおよびアニリン部位の導入に伴う疎水性の増大により、触媒分子同士が会合していると示唆された。低濃度の MB による光化学過程は一般に、高い三重項量子収率 ($\Phi_T=0.52$) に起因する励起三重項状態の MB 分子から酸素分子へのエネルギー移動により、一重項酸素を発生させる type II で進行する (Figure 2D)⁴。これに対し触媒 **1** では、基底状態において触媒分子同士のスタッキングが生じ、一電子移動を伴う type I 機構が進行したために生細胞への毒性が高いスーパーオキシドアニオンが生成していると考察した。

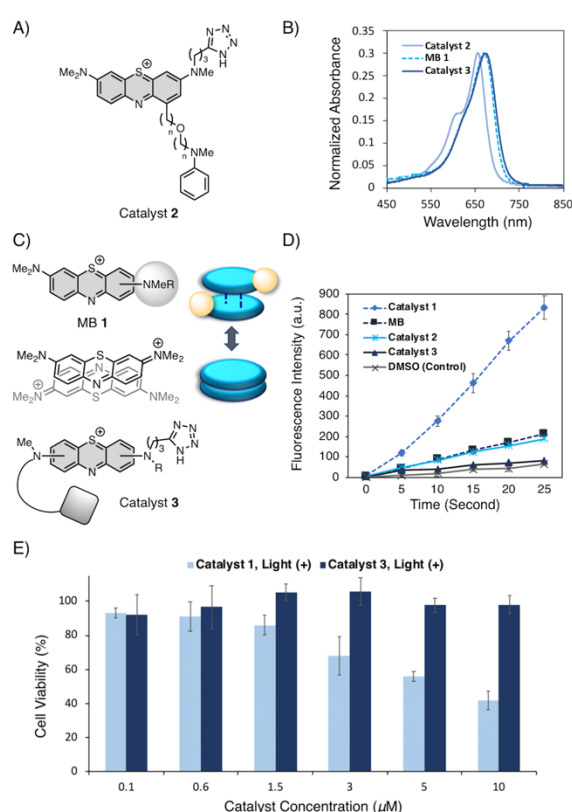


Figure 3. (A) Structure of catalyst **2**, MB **1** and **3**. (B) Absorbance spectrum of catalyst **2**, MB **1** and **3**. (C) Design of catalyst based on MB derivative (MB **1**) to prevent molecule stacking and structure of catalyst **3**. (D) Fluorescence intensity of specific fluorescence probe for super oxide anion radical (BESSO) with oxygenation reaction of each catalyst. (E) Photo-cytotoxicity assay of catalyst **1** and **3**. A cell-culture medium that contains each catalyst was photo-irradiated (655 nm LED, 14 mW) for 1 minute at 37 °C in PC12 cell seeded-wells incubated at 37 °C under 5% CO_2 for 48 hours and analysed for the cell viability.

そこで、光細胞毒性の低い新たな触媒の開発に取り組むこととした。まずリンカー部位の検討として、疎水性の高い 5 炭素リンカーに代わりエーテルリンカーを導入した触媒 **2** を設計・合成した。**2** のリン酸バッファー中における UV-vis 吸収スペクトルは、**1** と比較してダイマーに相当する 610 nm の吸収ピークが減少し、スーパーオキシドアニオンの生成量は MB と同程度まで減少した (Figure 3A, 3B, 3D)。これらの結果から、触媒分子同士のスタッキングを抑制することによりスーパーオキシドアニオンの発生量の低減に繋がることが示唆された。また母骨格については、平面性の高い MB に対して嵩高い置換基を導入することにより、触媒分子同士のスタッキングの抑制を志向した MB **1** を設計・合成した (Figure 3C)。MB **1** はリン酸バッファー中において会合体に相当する吸収ピークを持たず単一の吸収ピークを与えた (Figure 3B, 3C)。すなわち、母骨格となる MB 分子への嵩高い置換基の導入によって、触媒分子同士のスタッキングを抑制することが可能となった。以上の結果から、MB **1** にエーテルリンカーおよび *N*-メチルアニリンを導入した触媒 **3** が $\text{A}\beta$ 選択的光酸素化触媒に最適な構造であると考え、その合成を行った。触媒 **3** は、リン酸バッファー中において 675 nm (モノマーに起因) に単独の吸収ピークを有する波形を示した (Figure 3B)。また、触媒 **3** の一重項酸素およびスーパーオキシドアニオンの発生量を確認したところ、触媒 **3** は **1** 及び **2** と比較してスーパーオキシドアニオンの発生量が大幅に減少していることが明らかになった (Figure 3D)。さらに、生細胞存在下、触媒を添加し光照射による細

入した触媒 **3** が $\text{A}\beta$ 選択的光酸素化触媒に最適な構造であると考え、その合成を行った。触媒 **3** は、リン酸バッファー中において 675 nm (モノマーに起因) に単独の吸収ピークを有する波形を示した (Figure 3B)。また、触媒 **3** の一重項酸素およびスーパーオキシドアニオンの発生量を確認したところ、触媒 **3** は **1** 及び **2** と比較してスーパーオキシドアニオンの発生量が大幅に減少していることが明らかになった (Figure 3D)。さらに、生細胞存在下、触媒を添加し光照射による細

胞毒性を評価したところ、触媒 **3** は **1** と比べて高い細胞生存率を維持した (Figure 3E)。以上の結果から、MB 分子の誘導体化による触媒分子同士のスタッキングの抑制により、細胞毒性の要因となるスーパーオキシドアニオンの発生を大幅に低減することに成功した。

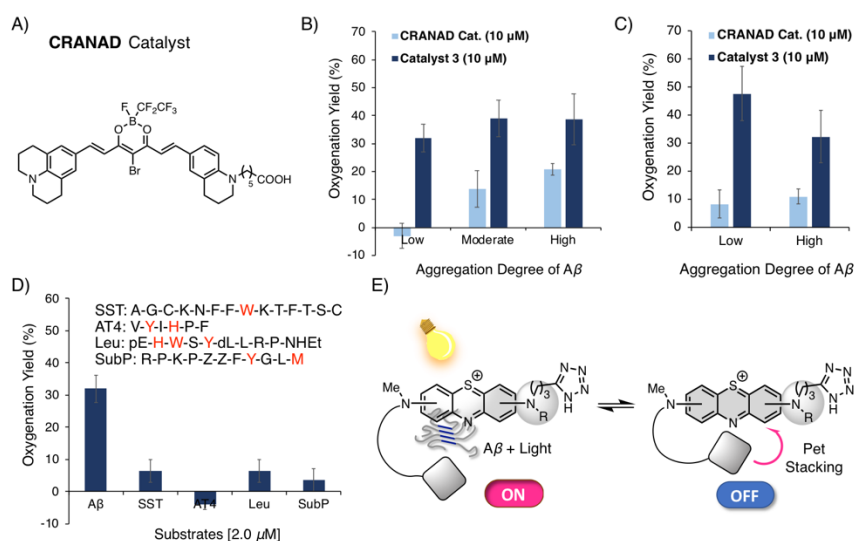


Figure 4. (A) Structure of CRANAD catalyst. (B) Oxygenation of Aβ using CRANAD cat. and catalyst 3. 'Low' 'Moderate', and 'High' mean aggregation degree of Aβ that were prepared via pre-incubation at 37 °C for zero, two and six hours respectively. Conditions: Aβ 20 μM, 780 nm LED (CRANAD catalyst), 655 nm LED (catalyst 3), 37 °C, 5 minutes. (C) Oxygenation of low concentration of Aβ (2 μM) using CRANAD cat. and catalyst 3 under same conditions of (C). (D) Peptide selectivity of catalyst 3. (E) Mechanism of Aβ oxygenation reaction using catalyst 3.

(Figure 4C)。すなわち、触媒 **3** はクロス β シート量の少ない Aβ へも高い親和性および強力な酸素化活性を発現するために、従来の触媒では酸素化収率の低下が確認された低凝集状態の Aβ に対しても高い酸素化収率を示した。一方で、オフターゲットとしてトリプトファンやチロシン、ヒスチジン、メチオニンなどを含む他のペプチドを基質とした場合には、いずれも低い酸化収率に留まった (Figure 4D)。以上の結果から、触媒 **3** は Aβ と相互作用をした場合にのみ、PeT 機構ならびに基底状態における分子内スタッキングが解除されることにより酸素化活性を発現し、選択性が生じたと考えられる (Figure 4E)。本研究により、触媒の光細胞毒性を抑制し、従来法とは異なり低凝集状態・低濃度の Aβ に対し酸素化を実現する触媒の開発を成し遂げたと言える。

【総括】

メチレンブルー骨格を基盤とした新規光酸素化触媒の開発を行った。リンカー部位・母骨格となる MB の構造改変により触媒分子同士のスタッキングを抑制し、触媒の光毒性の低減を実現した。さらに、触媒 **3** は、従来法では困難であった低凝集状態・低濃度の Aβ の酸素化を可能とした。現在、生細胞共存下における触媒の酸素化反応や、脳血液関門透過性など *in vivo* 試験に向けたさらなる検討を行っている。

【参考文献】

(1) Taniguchi, A.; Shimizu, Y.; Oisaki, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Nat. Chem.* **2016**, 8, 972. (2) Ni, J.; Taniguchi, A.; Ozawa, S.; Hori, Y.; Kuninobu Y.; Saito, T.; Saido, T. C.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Chem* **2018**, 4, 807. (3) 城野柳人, 東京大学博士論文, **2018**. (4) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2005**, 2, 175.

続いて触媒 **3** を Aβ に添加し、光照射による酸素化活性の評価を行った。触媒 **3** は、クロス β シートへの結合を介して活性を発現する従来の触媒 (CRANAD 触媒, Figure 4A) では酸素化が困難であった低凝集状態の Aβ と相互作用を示し、酸素化が可能であった (Figure 4B)。また、生理条件に近い低濃度 (2 μM) の Aβ に対しても収率高く酸素化が進行した