新しい光感受性物質 ATX-S10 とアルブミンの相互作用 フーリエ変換赤外分光器を用いた解析

島谷英明¹、會沢勝夫²、勝海東一郎¹、原田匡彦¹、日吉利光¹、山本秀樹¹、奥仲哲弥¹、中島 進³、小中千守¹、加藤治文¹

東京医科大学 ¹外科学教室、²同第二生理学教室、³旭川医科大学 手術部

The Interaction Between A New Photosensitizer ATX - S10 and Albumin Using Fourier Transform Infrared Spectrometer

H. Shimatani¹, K. Aizawa², T. Katsumi¹, M. Harada¹, T. Hiyoshi¹,
H. Yamamoto¹, T. Okunaka¹, S. Nakajima³, C. Konaka¹ and H. Kato¹

Tokyo Medical College ¹Dept. of Surgery, ²Dept. of Physiology.

³Asahikawa Medical College Dept. of Operation

Abstract: Hematoporphyrin derivative has become the most popular agent for photodynamic therapy. However, vigorous studies are under way throughout the world to seek new photosensitizers with greater cancer cell affinity and less side effect. But no ideal photosensitizer has yet been found.

ATX-S10 (molecular weight: 839.85) is a new photosensitizer. It is a chlorin derivative that has two aspartinate side chains at the carbon of the tetrapyrrol rings via peptide linkage. Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) is also a chlorin derivative and has been studied clinically in the U.S.A.. We measured spectra (absorbance and fluorescence) of ATX-S10 with and without the addition of albumin and the result suggested that the albumin binds via an asparaginate residue of ATX-S10.

I. 緒言

近年、治療或いは診断目的に様々な光感受性物質が開発されつつあるが、その体内動態については依然として不明な点も多い。Spikesらは、NPe6がアルブミンと強い親和性を持ち、網内系を介して細胞内に取り込まれLysosomeに集積することを示した。また当教室のTsuchidaらは血清アルブミンがTransfer Proteinとして、トリプトファン残基を介してNpe6と相互作用を営む事を明らかにした。

今回我々は光感受性物質ATX-S10を用い、アルブミンとの相互作用を検討した。

II. 目的

ATX-S10は旭川医科大学で開発された新しい光感受性物質であり、Npe6と同様クロリン環を基本構造とし、アスパラギン酸を側鎖に持っている。このATX-S10とアルブミンの相互作用を従来の可視、紫外の吸収及び蛍光

分光分析の他に、今回 フーリエ変換赤外分光顕微鏡 (Fourier Transform Infrared Spectrometer) を用いて解析した。

III. 対象

実験に用いた ATX-S10 は東洋薄荷より乾燥粉末の形で提供を受けた。アルブミンは岩井化学薬品製 Bovine Serum Albumin Crystallized を用いた。吸収スペクトル、蛍光スペクトルの測定にはそれぞれ HITACHI 社製 U-3200 Spectrophotometer 及び F-4500 Fluorescence Spectrophotometer を用いた。試料は全て磷酸緩衝塩溶液 (Dulbecco's Buffer Solution, pH 7.4) に溶解し、1cm 角の石英セルに試料 2 ml を入れて測定した。

赤外吸収スペクトルの測定には、まず試料を水溶液とし、これをフッ化カルシウムスライド上に 0.5 μ l spotting し遮光下に24時間凍結乾燥した。この乾燥試料を日本電子製フーリエ変換赤外分光顕微鏡を用いて測定した。

IV. 方法、結果

Fig. 1 に ATX - S10 の構造及び光学的特性を示す。テトラピロール環のB環の二重結合が一つ解裂し、2個のアスパラギン酸が、C環とD環に側鎖を介してペプチド結合しているクロリン系光感受性物質である。磷酸緩衝塩溶液中で濃度 1.45×10^{-6} mol/l の時吸収スペクトルは、Soret Band Peak 398nm, Q Band 最長波長帯 Peak 664nm。蛍光スペクトルは Soret Band 398nm で励起した場合、665nm に一峰性のピークが観測された。

Figure 1: Chemical Formula and Optical Properties of ATX-S10

まず最初に ATX - S10 とアルブミンの相互作用の有無を調べた。ATX-S10 の 7.26×10^{-7} mol/l 磷酸緩衝塩溶液を作成し、これにモル濃度比 1:0 ~ 1:16 倍となる様ウシ血清アルブミンを加え吸収スペクトルを測定した。結果を Table 1 に示す。S - 10 のみの場合、即ち Albumin/ATX - S10 モル比が 0 の場合、Soret Band のピークは 393nm に観測されたが、アルブミンを加えるに従って redshift し、モル比 8 の時約 17nm の shift がみられ、アルブミンをそれ以上加えても shift は起こらなかった。

Table 1: Soret Absorbance of ATX-S10 (with Addition of Albumin, ATX-S10 Concentration kept at 7.26×10^{-6} mol/l)

次にアルブミンの 1.16×10^{-5} mol/l 磷酸緩衝塩溶液を作成し、これに ATX-S10 をモル濃度比 1:0~1:8 倍となるよう加え、トリプトファンの吸収帯である 290nm で励起し、蛍光スペクトルの変化を測定した。結果を Table 2 に示す。ATX-S10 濃度の上昇に伴いトリプトファンの蛍光ピークは低下し、S10 モル比 8 倍の時点で蛍光ピークは低値の為測定不能となった。

また同時に 340nm の蛍光ピーク波長は ATX-S10 の増加に伴って Blueshift し、S10 モル比 8 倍の時、約 28nm shift して 312nm となった。

Table 2: Fluorescence Changes of Albumin with Addition of ATX-S10, Excitation at 290nm

以上の結果より ATX-S10 とアルブミンの間に相互作用の存在が示唆された為、フーリエ変換赤外分光顕微鏡を用い更に詳細な検討を加えた。

方法はアルブミンの 5.81×10^{-7} mol/l 水溶液を作成し、これに ATX-S10 をモル濃度 $2.91 \times 10^{-5} \sim 9.30 \times 10^{-4}$ mol/l、即ちモル濃度比 1:50 ~ 1:1600 倍となるよう各々加え、対象の項で述べた如く凍結乾燥した。この試料の赤外吸収スペクトルをフーリエ変換赤外分光顕微鏡を用いて測定した。結果を Table 3 に示す。全てのスペクトルは 1630 ~ 1650 カイザー近辺の最大吸収を基準として正規化し、重ならない様に縦方向にずらしてプロットし

た。今回吸収度測定に当たってはピークの高さではなくピーク成分の面積を求めた。後程問題になってくるが ATX-S10 の側鎖アスパラギン酸の C=O 二重結合伸縮運動由来の吸収ピークが 1710 カイザー近辺に認められる(斜線部)。今回、ATX-S10 の増加に伴って吸収度が変化するピークの由来を同定し、S-10 の濃度変化に伴う吸収度の変化をグラフ化した。結果を Table 4 に示す。一般に、ATX-S10 の濃度増加に伴い、吸収度も上昇する傾向にあるが、1710 カイザー近辺に存在する C=O 伸縮のピークだけはモル比 200 倍で最も高い吸収を示したあと、それ以上 S-10 を増加させても却って吸収が低くなるという結果を示した。即ち、S-10 の側鎖に存在するカルボキシル基の C=O 二重結合がアルブミンと作用し、別の構造に変化している可能性が考えられた。

Table 3: Fourier Transform Infrared Spectrometry for Albumin with Addition of ATX-S10

Table 4: Spectral Changes of ATX-S10 at the Presence of Albumin

V. 結論

ATX - S10とアルブミンの相互作用を分光学的手法を用いて解析した。吸収及び蛍光スペクトルよりATX - S10とアルブミンの間に何らかの相互作用の存在が示唆された為、更にフーリエ変換赤外分光顕微鏡を用い赤外吸収スペクトルを測定した。その結果、アルブミン存在下でATX - S10の側鎖アスパラギン酸のC=O二重結合の吸収が低下が観測され、この部位に新たな存在状況ないし結合状況が発生した可能性が示唆された。相互作用はこの部位を介して行われていると考えられる。現在コンピューターを用いて波型分析し、ATX - S10とアルブミンの相互作用について更に詳細に検討中である。

VI. 文献

1. Tsuchida, T., Aizawa, K., Konaka, C., and Kato, H. : Interaction of Bovine Serum Albumin with Mono-L-Aspartyl chlorin e6 by Spectrophotometry. *Lasers in Life Sciences* 5(3), 155-164, 1993.
2. Aizawa, K. : Analysis of the Effects with a Photodynamic Therapy on Atherosclerotic Lesion Using Fourier-Transform Infrared Spectra. *Reports on Topical Meeting of the Laser Society of Japan (Biological and Medical Application of Laser Spectroscopy No. RTM-92-31, p.p.47-52, July 1992.*
3. Spikes JD: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *J. Photochem Photobiol B* 6:259-274, 1990.