

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「新機能創出を目指した分子技術の構築」
研究課題「超高感度化分子技術により実現する
巨視的ケミカルバイオロジー」

研究終了報告書

研究期間 2013年10月～2019年3月

研究代表者 山東信介
(東京大学大学院工学系研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では体の中の分子の構造変化、化学反応、ダイナミズムなどの活動を、体を傷つけずに計測できる生体計測系の確立に向け、NMR 分子プローブの感度を理論上数千～数万倍程度も高感度化できる核偏極法を用いた高感度—核磁気共鳴分子技術(核偏極 NMR)の構築を目的としている。特に、「高感度化寿命の短さ」の克服に向け、核偏極緩和と分子構造の相関を明確化するとともに、長寿命核偏極を実現する分子構造を探索し、生体計測への応用を目指している。

具体的には、目標の実現に向けて、下記の4つのサブテーマ(1-3:核偏極を用いた超高感度分子センシング、4:核偏極以外の技術も含めた発展的課題)を設定し、研究を実施した。それぞれについて得られた結果の概略は下記の通りである

サブテーマ1:長寿命核偏極を実現する分子構造の探索

- ✓ 核スピン緩和を5成分に分解して解析し、分子構造における核スピン緩和を定量的に評価。分子プローブの構造と核スピン偏極緩和相関を明確化。
- ✓ 上記の相関をもとに分子の(再)設計を行ない、¹³C核、¹⁵N核それぞれにおいて、既報の水溶性小分子として最も長い縦緩和時間(T_1 、核偏極寿命に相関)を達成する分子骨格の開発を実現。
 - ¹³C: *p*-sulfo-¹³C,¹³D₁₃-*t*Bu-benzene, $T_1 = 175 \pm 3$ s (50 mM, 9.4 T, 25 °C, D₂O)
 - ¹⁵N: ¹⁵N,¹⁴D₁₄-TMPA, $T_1 = 1177 \pm 52$ s (400 mM, 9.4 T, 30 °C, D₂O)

サブテーマ2:超高感度磁気共鳴分子プローブの開発

- ✓ ¹⁵N,¹⁴D₁₄-TMPA分子骨格をもとにエステラーゼ分子プローブを設計し、従来の核偏極NMR計測時間と比して極めて長い時間(~30分)での高感度酵素反応追跡が可能であることを実証(In Vitro)。
- ✓ 重要な生体酵素γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ、アミノペプチダーゼNを標的とする核偏極分子プローブを開発。

サブテーマ3:個体応用に向けた機器開発と個体イメージング応用

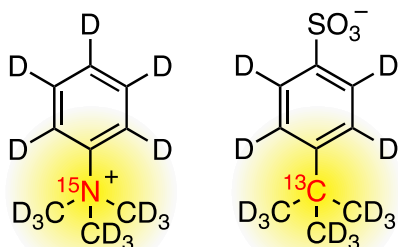
- ✓ 生物個体に応用可能な低毒性¹⁵N-TMPA誘導体を開発。動物個体において長寿命核偏極シグナルが計測できることを示した。
- ✓ 国際共同研究を中心に、サブテーマ2で開発した生体酵素を標的とする核偏極分子プローブの生体応用を実施。生体酵素GGTを標的とする核偏極MRI分子プローブを用い、*In Vivo*におけるGGT活性計測を実現。

サブテーマ4:[発展]最先端計測技術、分子動態制御技術

- ✓ 室温核偏極の実現に向け、フロー式パラ水素核偏極システムの構築に取り組んだ。
- ✓ 重要な生体代謝酵素であるセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを検出する高感度分子プローブの設計を実現。
- ✓ 分子動態制御技術として検討してきた「特定の細胞膜受容体を認識する核酸アプタマー」をもとに、増殖因子受容体アゴニストを設計できることを見出した。

(2) 顕著な成果

1.

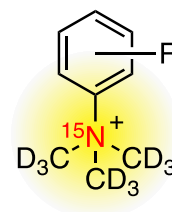


概要:核偏極 NMR 分子プローブは、高感度生体分子解析を可能にする手法として期待されるが、「高感度化時間が短い」という課題があった。核スピン緩和の詳細な論理的、実験的解釈をもとに、分子を再設計し、既報の水溶性有機小分子として世界最長の縦緩和時間(高感度化時間に相関)を達成する¹⁵Nおよび¹³C分子骨格を実現した。本分子骨格をもとに開発した高感度酵素センサーは、核偏極による高感度化が可能であり、高感度化計測時間を大幅に伸ばすことに成功した。緩和プロセスの理解から、分子プローブ開発を実現したもので

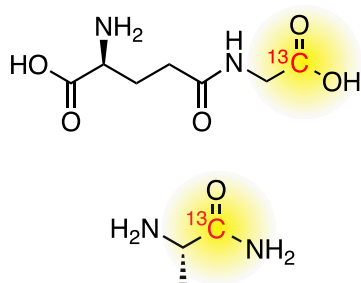
あり、学術・応用両面においてブレイクスルーとなる分子である。

2.

概要:上記1で実現された核偏極¹⁵N NMR分子プローブは、最大の課題であった生理条件における核偏極状態(高感度化状態)の短さを克服する画期的分子プラットフォームであったものの、毒性の問題から生体応用は困難であった。そこで構造多様化を図り、生体応用可能な長寿命核偏極¹⁵N NMR分子プローブの開発に成功した。実際に、生物個体において高感度化された核偏極¹⁵N NMRシグナルの長時間計測に成功した。長寿命-超高感度生体分子イメージングプローブ開発への道を拓く基盤分子骨格と期待できる。(未発表のため詳細な構造は割愛)



3.



概要:生体で重要な役割を担う酵素γ-グルタミルトランスぺプチダーゼに着目し、高感度リアルタイム活性計測を可能にする高感度一核偏極分子プローブの開発に世界で初めて成功した。また、設計した核偏極分子プローブが、生物個体内で機能することを実証し、種々の疾病診断への展開が可能であることを示した。加えて、腫瘍増殖に関与する重要な生体酵素アミノペプチダーゼNを標的とする核偏極分子プローブの開発も実現した。基礎生物学、医学診断応用への展開が期待できる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:核偏極法は、NMR分子プローブの感度を理論上数千~数万倍程度も高感度化できる画期的な手法であり、高感度生体イメージングへの応用が期待されている。一方、様々な制約のため分子プローブの設計が困難であった。生物個体への応用が実証された核偏極分子プローブは極めて限定されており、実応用の大きな障害であった。本研究では、核偏極緩和理論から長寿命核偏極分子プローブを精密設計する方法論の開拓を実現しており、種々の核偏極分子プローブの合理的設計を可能とした。動的な生体分子イメージングを中心に、新たな科学技術イノベーションにつながる端緒となる基盤的研究成果であると考えられる。

2.

概要: 上記 1 で開拓した分子設計法をもとに、恒常的生体機能、疾患状態に関与する重要生体酵素 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ N を標的とする核偏極分子プローブの開発を実現した。生物個体内での高感度酵素活性計測への応用可能であることを実証している。現在、医学応用（疾病状態診断）に向けて、国際共同研究を進めている。実用化に向けて越えるべきハードルは多いが、生体代謝分子イメージングに向けて新産業の創出につながる可能性を持つ次世代分子プローブである。

3.

概要: セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT) は、セリン-グリシン代謝を担う酵素である。SHMT は抗がん剤や抗マalaria剤の創薬標的として、注目を集めている。また、生物学的にも 1 炭素代謝経路の起点となる酵素であり、SHMT により転移される 1 炭素が、その後の代謝を経て、重要な役割を果たしていることが示唆されている。SHMT 活性を簡便に高感度検出・解析できる手法が望まれていた。しかし、SHMT の標準的な酵素反応機構では、酵素の基質ポケットに空間的な隙間がなく、分子プローブを実現するのが難しかった。SHMT の非標準的な酵素反応機構に着目し、分子設計を行うことで、蛍光による高感度検出が可能な、SHMT 分子プローブの開発に成功した。新たな阻害剤・薬剤探索への応用が可能である。

<代表的な論文>

1. Hiroshi Nonaka, Yuki Nakanishi, Satoshi Kuno, Tomoki Ota, Kentaro Mochidome, Yutaro Saito, Fuminori Sugihara, Yoichi Takakusagi, Ichio Aoki, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Shinsuke Sando
"Design Strategy for Serine Hydroxymethyltransferase Probes Based on Retro-Aldol-Type Reaction"
Nat. Commun. **2019**, *10*, 876.
2. Hiroshi Nonaka, Masashi Hirano, Yuki Imakura, Yoichi Takakusagi, Kazuhiro Ichikawa, and Shinsuke Sando
"Design of a ^{15}N Molecular Unit to Achieve Long Retention of Hyperpolarized Spin State"
Sci. Rep. **2017**, *7*, 40104.
3. Tatsuya Nishihara, Hikari A. I. Yoshihara, Hiroshi Nonaka, Yoichi Takakusagi, Fuminori Hyodo, Kazuhiro Ichikawa, Emine Can, Jessica A. M. Bastiaansen, Yuhei Takado, Arnaud Comment, and Shinsuke Sando
"Direct Monitoring of γ -Glutamyl Transpeptidase Activity In Vivo Using a Hyperpolarized ^{13}C -Labeled Molecular Probe"
Angew. Chem. Int. Ed. **2016**, *55*, 10626-10629.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 山東グループ

- ・ 研究代表者: 山東信介 (東京大学大学院工学系研究科、教授)
- ・ 研究項目
 - 長寿命核偏極を実現する分子構造の探索
 - 長高感度磁気共鳴分子プローブの開発
 - 個体応用に向けた機器開発と個体イメージング応用 (平成 27 年度以降)
 - [発展]最先端計測技術、分子動態制御技術

② 市川グループ (平成 26 年度まで)

- ・ 主たる共同研究者: 市川和洋 (九州大学先端融合医療創成センター、教授)
- ・ 研究項目
 - 個体応用に向けた機器開発と個体イメージング応用
 - [発展]最先端計測技術、分子動態制御技術

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

[国外研究者との共同研究、及びネットワーク形成]

本 CREST 研究チームでは「超高感度化分子技術」の実現、特に、高感度生体分子計測を可能とする核偏極—核磁気共鳴分子プローブの設計指針の確立を目指している。一方、開発した超高感度分子プローブの生物個体展開・医学応用・正確な評価においては、生体分子イメージングを専門とする医学・生物学研究者との共同研究が必要である。核偏極—生物個体イメージングを実施している医学・生物学研究者との共同研究を積極的に進めており、結果として海外研究者との共同研究ネットワークの構築につながっている。

Prof. Arnaud Comment and Dr. Hikari Yoshihara of École polytechnique fédérale de Lausanne & General Electronics

核偏極 ^{13}C 分子プローブの生物個体応用に関する共同研究。

[既発表の共同研究] GGT 活性—生体内リアルタイムイメージング
Angew. Chem. Int. Ed. **2016**, *55*, 10626-10629.

Prof. Charlie Khemtong of University of Texas Southwestern Medical Center

長寿命核偏極分子プローブの評価、及び生物個体応用に関する共同研究。

[既発表の共同研究] 長寿命核偏極 ^{13}C 分子プローブの開発研究
Chem. Asian. J. **2018**, *13*, 280-283.

Dr. Murali Krishna Cherukuri of National Cancer Institute, NIH

核偏極 ^{13}C 分子プローブ、長寿命核偏極分子プローブの生物個体応用に関する共同研究。

Prof. Sabrina Ronen of University of California San Francisco

核偏極 ^{13}C 分子プローブの医学応用検討に関する共同研究。

Prof. Myriam Chaumeli of University of California San Francisco

核偏極 ^{13}C 分子プローブの医学応用検討に関する共同研究。

[国内研究者とのネットワーク形成]

- ・核偏極に関して、理研仁科加速器研究センターの上坂スピン・アイソスピン研究室（上坂友洋主任研究員）と連携している。
- ・生体分子イメージング応用に関して、量子科学技術研究開発機構の青木伊知男博士と協働している。