

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 17 年度採択研究代表者

長野 哲雄

(東京大学 大学院薬学系研究科 教授)

「生体分子の動的可視化プローブの開発と応用」

1. 研究実施の概要

本研究は生体分子（生理活性種・酵素・受容体・タンパク質など）の活性あるいは濃度を時々刻々の変化に対応して、ダイナミックに捉える可視化プローブを創製することを目的としている。これにより、生命現象の作用機構の本質に迫る解析が可能になり、分子イメージングに基づく新たな研究領域が拓けると考えられる。本研究が既存の研究と異なるのは以下の2点である。

1. 蛍光発光の原理に基づいて、論理的に可視化蛍光プローブを創製する事
2. 創製したプローブの有用性を示すため、学術論文での発表だけにとどまらず、実用化・市販化の段階まで行う事

上記の研究方針に基づいて、今までに得られている研究結果を背景に、更に高次の生命現象を捉える蛍光プローブの創製を目指す。

本年度は本格始動する平成18年度の準備期間と位置付け、機関相互の打ち合わせを行い、本体である東京大学大学院薬学系研究科においては、CREST 研究の基盤となる研究に力を注いだ。

具体的な項目として、【新たな蛍光 off/on 制御機構原理の解明】と【新たな蛍光団の開発】である。これらの研究項目は次年度以降の新規蛍光プローブ創製の礎となり、本 CREST 研究で得られる成果の土台となる。

2. 研究実施内容

本研究は生体分子（生理活性種・酵素・受容体・タンパク質など）の活性あるいは濃度を時々刻々の変化に対応して、ダイナミックに捉える可視化プローブを創製することを目的としている。これにより、生命現象の作用機構の本質に迫る解析が可能になり、分子イメージングに基づく新たな研究領域が拓けると考えられる。本研究が既存の研究と異なる

のは以下の 2 点である。

1. 蛍光発光の原理に基づいて、論理的に可視化蛍光プローブを創製する事
2. 創製したプローブの有用性を示すため、学術論文での発表だけにとどまらず、
実用化・市販化の段階まで行う事

上記の研究方針に基づいて、今までに得られている研究結果を背景に、更に高次の生命現象を捉える蛍光プローブの創製を目指す。

本年度は本格始動する平成 18 年度の準備期間と位置付け、機関相互の打ち合わせを行い、本体である東京大学大学院薬学系研究科においては、CREST 研究の基盤となる研究に力を注いだ。

具体的な項目として、【新たな蛍光 off/on 制御機構原理の解明】と【新たな蛍光団の開発】である。これらの研究項目は次年度以降の新規蛍光プローブ創製の礎となり、本 CREST 研究で得られる成果の土台となる。

【新たな蛍光 off/on 制御機構原理の解明】

私どもは、蛍光色素として知られる fluorescein のベンゼン環部位の電子密度が高い場合、光誘起電子移動 (PeT) 機構により蛍光強度が弱まること (後述の図 2 参照) を明らかにしてきたが、今回、ベンゼン環部位の電子密度を大きく低下させた場合にも蛍光が弱まることを見出し、この消光が逆向きの電子移動、つまり「励起蛍光団からの電子受容性消光団への電子移動によるものである」との作業仮説を立て、これを証明する実験を行ってきた。具体的には、ベンゼン環部位の LUMO レベルを変化させた fluorescein 誘導体を種々合成し、各誘導体の分光学的特性を精査した。その結果、fluorescein 誘導体の蛍光性は、ベンゼン環部位の電子受容性に強く依存して変化することが明らかとなり、上記の作業仮説が妥当であることが示された。以上の知見を活用し、ベンゼン環部位の LUMO レベルの変化を蛍光性のスイッチとする新たな蛍光プローブ設計法を確立した (図 1)。

本知見を応用することで、標的分子との反応部位の電子密度を反応前後で上昇させるように蛍光分子を設計することで、無蛍光性化合物を強い蛍光性物質に変換できる。このような原理に基づき機能する蛍光プローブはこれまで開発が進んでおらず、本知見は今後蛍光プローブの開発を進める上で、重要な指針となるものである。

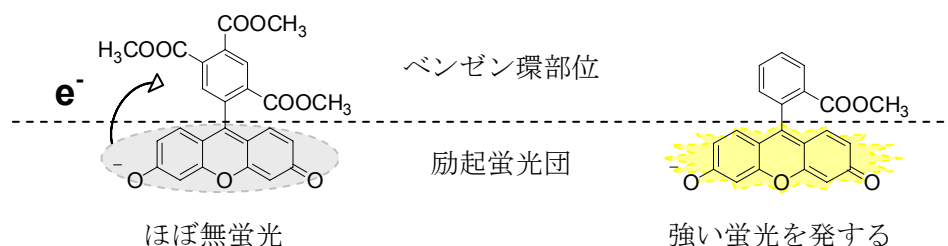


図1 解明に成功したPeTのメカニズム

電子受容性の高い (LUMO レベルの低い) ベンゼン環部位への PeT により、fluorescein の蛍光は消光される。以下、Donor-Excited Photoinduced Electron Transfer: d-PeT と呼ぶ。

【新たな蛍光団の開発】

生体内の生理活性物質を生きたまま観測できる手法として、蛍光プローブ法が近年汎用されている。蛍光プローブとは、標的分子と反応もしくは結合することにより、励起波長、蛍光波長、蛍光強度等の蛍光特性が変化する機能性分子である。その中でも波長変化型蛍光プローブを用いたレシオ測定は、色素の局在や濃度変化、褪色の影響を受けにくい点で優れている。一般に波長変化型蛍光プローブの開発には、置換基の電子供与性によって励起波長や蛍光波長が変化する ICT (Intramolecular charge transfer) 型の蛍光団を基本骨格として用いるのが望ましい。代表的な ICT 型の蛍光団としてクマリンやベンゾフランが知られているが、その多くは紫外光励起であり、また水中での蛍光量子収率も充分でないなどプローブの骨格として満足のいくものではなかった。

私どもは ICT 型の蛍光団であるイミノクマリンが長波長タイプの波長変化型蛍光プローブ母核として有用であることを見出し、様々なイミノクマリン誘導体を合成し、水中 (100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) における蛍光特性を調べた。

合成したイミノクマリン誘導体の吸収極大波長、蛍光極大波長はともに 500 nm を超えていた。また強い蛍光強度を示し、量子収率はほぼ 1 であった。さらにイミノ基に様々な置換基を導入することで、励起・蛍光波長を変えることができる。500 nm を超える長波長励起が可能な波長変化型蛍光プローブはこれまでにほとんど開発されていない。長波長励起によって細胞毒性を減らし、また自家蛍光を抑えることができる。現在、イミノクマリンを母核とした様々な波長変化型蛍光プローブを開発中である。

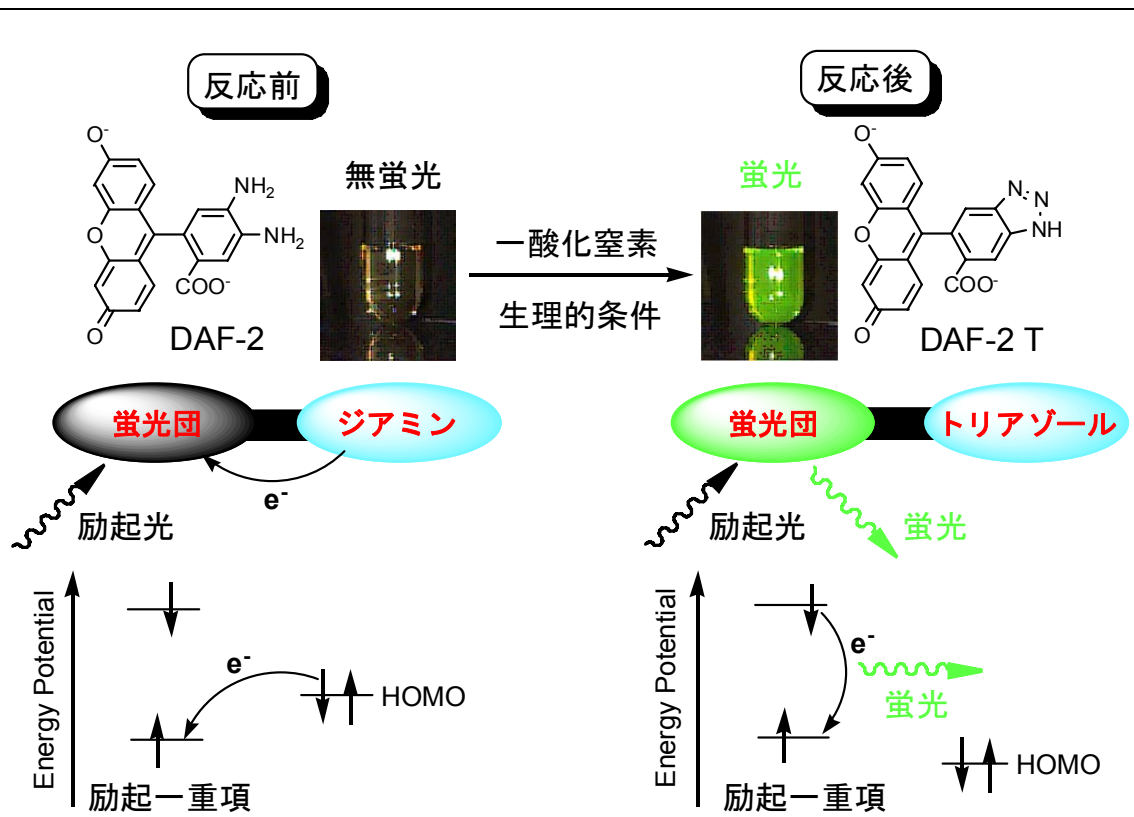


図2 PeTのメカニズム

蛍光は励起一重項状態にある電子が基底状態に戻るときに生じる発光である（右）。つまり励起状態にある高エネルギー順位にある電子が安定化するときのエネルギーが光になったものである。しかし、左に示すように励起蛍光団の二つの不対電子の軌道エネルギー間に電子供与性部位（以後ドナーと呼ぶ）のHOMOがある場合、光励起により不対電子となった蛍光団の低エネルギー側の軌道にドナーからの電子が入り、励起電子は戻ることができなくなる。結果として蛍光を生じない。この現象を光誘起電子移動（Photoinduced electron Transfer、PeT）と呼ぶ。DAF-2の場合、ドナー部位はジアミノベンゼン環であり、蛍光団はキサンテン骨格と考えられ、励起されたキサンテン蛍光団にドナーであるジアミノベンゼンのHOMOから一電子が入り、蛍光を生じなくなったものと考えられる（左）。しかし、DAF-2が一酸化窒素と反応することによりベンゾトリアゾール環となり、そのHOMOレベルはジアミノベンゼンに比べ、低くなり安定化する。その結果、励起状態にある蛍光団へ電子移動することができず、通常の蛍光物質のようにDAF-2 Tは強い蛍光を生じることになる（右）。

この原理を応用すると、ドナーをある特定の生理活性種と反応する化合物に置換し、一酸化窒素と同じように反応生成物のHOMOを低く安定化させるように設計し、無蛍光性化合物を強い蛍光性物質に変換できる。もちろん、fluoresceinだけではなく、広く他の蛍光性化合物にも蛍光on/offの仕組みとして適用できることが期待される。つまり、この原理に基づき種々の有用な生理活性物質に対応した生体物質可視化プローブの開発が可能となる。

3. 研究実施体制

「長野哲雄」グループ

- ① 研究分担グループ長：長野 哲雄（東京大学、教授）
- ② 研究項目：
 - 可視化プローブの論理的設計と合成および生細胞への応用

「平田恭信」グループ

- ① 研究分担グループ長：平田 恭信（東京大学、助教授）
- ② 研究項目：
 - プローブの臨床応用を目指した生体系での評価検討

「深作 昇」グループ

- ① 研究分担グループ長：深作 昇（第一化学薬品株式会社、事業開拓研究所長）
- ② 研究項目：
 - プローブの大量合成法の確立と実用化の検討