

「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。

本年度は昨年度までに築いた東京大学医学部附属病院平田チーム、第一化学薬品株式会社深作チームとの連携に基づいて、2 プローブの実用化(市販)に成功した。さらに、活性酸素研究分野において注目されている分子であるパーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)の蛍光プローブの創製に成功し、実用化の準備を行っている。

## 2. 研究実施内容

### 新たな蛍光 off/on 制御機構原理の解明

蛍光プローブ開発の基盤となる蛍光 off/on の制御機構原理を詳細に解明することを昨年度から継続して行った。適用範囲の広い蛍光 off/on 制御機構の新たな原理を見出す事は、新規蛍光プローブを分子設計する上から極めて重要である。従来の蛍光強度の制御原理は蛍光団が electron acceptor として機能するものであった(光誘起電子移動 a-PeT: aceptor excited Photoinduced electron Transfer)。しかし、これとは逆に、蛍光団が electron donor として機能

し、蛍光が off 状態になる現象を見出し、d-PeT (donor excited Photoinduced electron Transfer) と名付けたが、a-PeT 機構では electron donor 部位の電子密度を下げる反応を起こすことにより蛍光の off 状態を解除したが、d-PeT 機構では逆に electron donor 部位の電子密度を増加させる反応により蛍光が off 状態から on 状態に変化することになる (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蛍光性化合物に変換できる。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、本知見は今後の蛍光プローブの開発において、重要な指針となるものである。本成果は従来のプローブ分子設計の幅を大きく広げるもので、この知見により電子密度を上げる方向あるいは下げる方向のいずれでもプローブとすることができ、これは自由自在にプローブを分子設計できることを意味している。

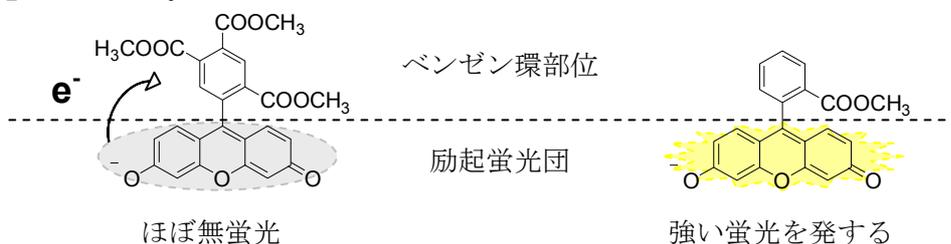


図1 解明に成功したd-PeTのメカニズム

電子受容性の高いベンゼン環部位へのPeTにより、fluoresceinの蛍光は消光される。

これをPeroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) 蛍光プローブ開発に応用した。 $\text{ONOO}^-$  は生体内においてsuperoxide ( $\text{O}_2^-$ ) とnitric oxide (NO) との反応によって形成される分子で、DNAや生体膜、タンパク質等の生体成分の酸化・ニトロ化による損傷を引き起こす活性種であり、炎症性疾患等、様々な病態への関連が示唆されている分子である。 $\text{ONOO}^-$  のニトロ化剤としての性質に着目し、プローブ

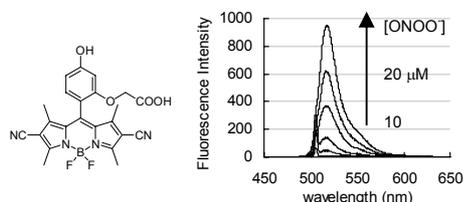


図2 Peroxynitrite プローブ NiSPY-3

がニトロ化されることで高蛍光性となるように分子設計を行った。BODIPY を母核とし、分子構造の最適化を行うことで開発した図2のプローブは、中性のリン酸緩衝液中において蛍光を有さず、 $\text{ONOO}^-$  の添加により高選択的に蛍光強度が劇的に増大し、世界初の優れた  $\text{ONOO}^-$  プローブであることが分かった。

### 長寿命型蛍光プローブの開発

生体測定においてしばしば問題となるバックグラウンドノイズを低減し、特異的に生体分子の活性や濃度を検出することを目的に、ランタノイド金属を用いた蛍光プローブを開発してきた。既に我々は、アンテナに対する PeT を原理として希土類錯体の蛍光強度制御が可能であることを示している。この知見に基づき、代表的な蛍光性希土類錯体である

cs124-DTPA-Ln 錯体に蛍光制御部位として aniline 誘導体を導入した一連の化合物を設計・合成し、その蛍光特性の pH 依存性について検討した。

いずれの錯体も中性条件ではほぼ無蛍光であったが、pH の低下に伴い蛍光強度が  $10^2$  程度上昇し、弱酸性領域では強い蛍光を示した。現在、これらのプローブを用いて細胞内 pH の測定や endocytosis の可視化等を試みている段階である。また、中心金属を Tb にした場合にのみ、aniline 部位の  $pK_a$  と長寿命蛍光の  $pK_a$  に明確な差が観察された。

また、近年注目を集めている酸化ストレスマーカーのアクロレインに対する蛍光プローブの開発にも応用した。アクロレインとアニリン誘導体との反応により高収率で生成するキノリン類を  $Eu^{3+}$  錯体のアンテナとして活用できると考え、 $Eu^{3+}$  錯体構造にアニリン部位を導入した分子を設計し、合成を行った。開発したプローブとアクロレインを反応させたところ、 $Eu^{3+}$  錯体の蛍光強度に顕著な増加がみられた。

### 臨床応用可能な蛍光プローブの開発

蛍光プローブによる臨床レベルでの診断を可能にするためには、組織透過性の良い近赤外領域での発光が求められている。今年度はトリカルボシアニン骨格を有し、亜鉛イオンと pH をターゲットとした近赤外領域でレシオ測定が可能な波長変化型蛍光プローブの開発を行った。pH プローブに関しては異なる  $pK_a$  を有するものや、FRET 機構を用いるものなど、6 種類合成し、酸性条件認識能の検討を行った。

### 開発される蛍光可視化プローブの臨床応用を目指した基礎検討

培養血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージ、標識タンパク (GFP, LacZ) のトランスジェニックマウスあるいは動脈硬化発症遺伝子改変マウス (Apo E KO マウス) において NO や活性酸素種の検出法について検討した。特にアルドステロンの NO や活性酸素種に及ぼす影響を初めて報告した。

### 蛍光可視化プローブ分子の大量合成法・安定性・実用化検討

長野グループで発明されたフルオレセイン類縁体の蛍光色素 TokyoGreen® (TG) を蛍光母核とする酵素蛍光基質 (グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、酸化酵素基質) の実用化検討を行い、グルコシダーゼ蛍光基質 TG-Glu、グルクロニダーゼ蛍光基質 TG-GlcU を 2006 年 12 月に上市して実用化を達成した。

また、活性酸素種を可視化するための蛍光プローブとして、同じく長野グループで開発された Boron dipyrromethene 骨格を有するパーオキシナイトライト蛍光プローブ NiSPY-3 及び NO 蛍光プローブ MAMBO の実用化のための工業的製造法検討を検討した。NiSPY-3 については、工業的製造法検討、保管安定性試験、性能確認試験を完了した。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「長野哲雄」グループ

①研究分担グループ長：長野 哲雄(東京大学大学院薬学系研究科 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

#### (2)「平田恭信」グループ

①研究分担グループ長：平田 恭信(東京大学医学部附属病院 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

#### (3)「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) 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

### 4. 研究成果の発表等

#### (1)論文発表(原著論文)

- Takuya Terai, Kazuya Kikuchi, Shin-ya Iwasawa, Takao Kawabe, Yasunobu Hirata, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano : Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its Application to a Long-Lived Protease Probe, J. Am. Chem. Soc., 128, 6938-6946 (2006)
- Akira Minami, Naomi Sakurada, Sayuri Fuke, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Naoto Oku, and Atsushi Takeda : Inhibition of Presynaptic Activity by Zinc Released From Mossy Terminals During Tetanic Stimulation, Journal of Neuroscience Research, 83, 167-176 (2006)
- Kazuki Kiyose, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano : Development of a Ratiometric Fluorescent Zinc Ion Probe in Near-Infrared Region, Based on Tricarbocyanine Chromophore, J. Am. Chem. Soc., 128, 6548-6549 (2006)
- Yu Gabe, Tasuku Ueno, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : Tunable Design Strategy for Fluorescence Probes Based on 4-Substituted BODIPY Chromophore ; Improvement of Highly Sensitive Fluorescence Probe for Nitric Oxide, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386, 621-626 (2006)
- Tasuku Ueno, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano : Mechanism-Based Molecular Design of Highly Selective Fluorescence Probes for Nitritative Stress, J. Am. Chem. Soc., 128, 10640-10641 (2006)
- Toru Komatsu, Kazuya Kikuchi, Hideo Takakusa, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Mako Kamiya,

- Yasuteru Urano, and Tetsuo Nagano : Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 15946-15947 (2006)
- Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, Hirata Y, Naruse M : Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension*, 48, 165-171 (2006)
- Abe M, Sata M, Suzuki E, Takeda R, Takahashi M, Nishimatsu H, Nagata D, Kangawa K, Matsuo H, Nagai R, Hirata Y : Effects of adrenomedullin on acute ischemia-induced collateral development and mobilization of bone marrow-derived cells. *Clin Sci (Lond)*, 111, 381-387 (2006)
- Sahara M, Takahashi T, Imai Y, Nakajima T, Yao A, Morita T, Hirata Y, Nagai R : New insights in the treatment strategy for pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20, 377-86 (2006)
- Mako Kamiya, Hisataka Kobayashi, Yukihiro Hama, Yoshinori Koyama, Marcelino Bernardo, Tetsuo Nagano, Peter L. Choyke and Yasuteru Urano : An Enzymatically Activated Fluorescence Probe for Targeted Tumor Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 3918-3929 (2007)
- Sahara M, Sata M, Morita T, Nakamura K, Hirata Y, Nagai R : Diverse Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Vascular Remodeling Associated With Pulmonary Arterial Hypertension and Arterial Neointimal Formation. *Circulation*, 115, 509-17 (2007)
- Suguru Kenmoku, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : Development of a Highly Specific, Rhodamine-based Fluorescence Probe for Hypochlorous Acid and its Application to Real-time Imaging of Phagocytosis, *J. Am. Chem. Soc.*, in press
- Hisato Sunahara, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, and Tetsuo Nagano : Design and Synthesis of a Library of BODIPY-based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron Transfer-controlled Fluorescence ON/OFF Switching, *J. Am. Chem. Soc.*, in press
- Shirakawa I, Sata M, Saiura A, Kaneda Y, Yashiro H, Hirata Y, Makuuchi M, Nagai R : Atorvastatin attenuates transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation. *Biomed Pharmacother*, in press
- Nakamura K, Sata M, Iwata H, Sakai Y, Hirata Y, Kugiyama K, Nagai R : A synthetic small molecule, ONO-1301, enhances endogenous growth factor expression and augments angiogenesis in ischemic heart. *Clin Sci (Lond)*, in press

## (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 2 件 (CREST 研究期間累積件数: 2 件)