

「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、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>) の蛍光プローブの実用化(市販)に成功した。さらに、一酸化窒素 (NO) の蛍光プローブ (MAMBO) の実用化の準備を行っている。

また、これまでに構築された蛍光発光原理に基づいて、様々な生体分子を検出可能な蛍光プローブの開発に成功している。例えば、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) および亜鉛イオン (Zn<sup>2+</sup>)、一酸化窒素 (NO)、パーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、次亜塩素酸 (OCl<sup>-</sup>)、グルタミン酸 (Glu) などといった生体分子や、その他、新規のケージド化合物、長寿命蛍光プローブ、光増感剤などの生命現象の解明に有用なプローブの開発にも成功している。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

### 新たな蛍光 off/on 制御機構原理の解明とその応用

平成 17、18 年度を通じて、蛍光プローブ開発の基盤となる蛍光 off/on の制御機構原理の解明を行い、光誘起電子移動 (Photoinduced electron Transfer : PeT) 機構に、蛍光団が acceptor として機能する a-PeT 機構と蛍光団が donor として機能する d-PeT 機構がある事を明らかにした。この両機構により蛍光発光の off/on が制御できる事はプローブを分子設計する観点から極めて重要で、結論的には、ターゲットとの反応部位の電子密度を下げる方向あるいは上げる方向のいずれの分子設計も可能となった。平成 19 年度はこの原理を用いて、以下の蛍光プローブの開発研究において成果が得られた。

- 1) 新規生物発光プローブの開発 : 生物発光法の一つである luciferin-luciferase 反応は、発光基質 (luciferin) と発光酵素 (luciferase) による発光を検出する方法である。発光制御原理として a-または d-PeT を用い、生体中の検出対象分子の存在下ではじめて発光する生物発光プローブの創製原理を明らかにした。この原理に基づいて、highly reactive oxygen species (hROS) を検出できる生物発光プローブの開発に成功した。
- 2) 疾患の新規バイオマーカーの開発 : アクロレインは脂質過酸化物質であり、動脈硬化症、癌などの多くの疾患との関連が示唆されている。a-PeT を原理とし、蛍光プローブの母核としては我々が開発した蛍光化合物 TokyoGreen 類を選択し、可視光励起によるアクロレインの検出蛍光プローブの開発に成功した。
- 3) 薬物代謝に関連する抱合化酵素の活性検出プローブの開発 : 薬物代謝酵素に対する反応性や阻害活性の網羅的な測定は、薬効・副作用の個人差や、薬物間相互作用などを予測する上で非常に重要である。本研究では、d-PeT を原理とし、代表的な抱合反応酵素であるグルクロン酸転移酵素 (UGT) により蛍光強度が大きく上昇する蛍光プローブの開発を行った。
- 4) 新規ケージド化合物の開発 : ケージド化合物とは、光分解性保護基により生理活性物質の活性発現に重要な官能基を保護し、その生理活性を抑制 (ケージ) した化合物のことである。我々は光分解性保護基である nitrobenzyl 基で xanthene 環部分を保護したケージド TokyoGreen を開発した。この化合物は、a-PeT を原理として照射前後で既存のケージドフルオレセインを上回る速やかな蛍光増大を示した。(論文 1)
- 5) 有機反応における新規触媒探索のためのプローブの開発 : 触媒の開発において、機能的な触媒構造の探索や反応条件の最適化は必須である。我々は、化学反応の進行を蛍光で捉えることで、生成物の単離や精製を行うことなく反応収率を求められると考えた。本研究では、d-PeT を原理として maleimide や nitrostyrene を反応点とした Michael 付加反応によって蛍光特性が変化する蛍光プローブを創製し、それを利用した蛍光

High-Throughput Screening (HTS)系の開発に成功した。(論文2)

- 6) 各種活性酸素種・窒素種の蛍光プローブの開発 : Reactive Oxygen Species (ROS)は老化やアポトーシス、癌や動脈硬化等の病変、シグナル伝達など、多様な生物学的、病理学的事象に関わる重要な因子である。ミトコンドリアに蓄積する蛍光団であるローダミンをベースとし、a-PeTによる蛍光制御を原理とする、新規ミトコンドリア局在性hROS蛍光プローブの開発に成功した。(論文3)
- 7) 長寿命型蛍光プローブの開発 : Incretin hormon である glucagon-like peptide 1 (GLP-1)は2型糖尿病に関連している。Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)はGLP-1の加水分解に関与しているプロテアーゼであるため、その阻害剤は2型糖尿病の治療に有効である。今年度、a-PeTを原理としDPP4活性を検出する蛍光性ランタノイド錯体をデザイン・合成し、時間分解蛍光測定法を用いたDPP4阻害剤のスクリーニング系の構築の検討を開始した。
- 8) 癌細胞の in vivo イメージングプローブの開発 : Glutathione-S-transferase (GST)は、大腸癌の前がん病変である Abberant crypt foci (ACF)における発現上昇が報告されており、癌との関連も示唆されている。そこで、今年度は d-PeT を原理として、TokyoGreen 骨格を母核する GST 活性検出蛍光プローブの開発に着手した。

### PeTとは異なる蛍光 off/on 制御機構原理の解明とその応用

他の新たな原理として、蛍光団の開環・閉環反応に基づく蛍光の off/on 制御機構を明らかにした。代表的な蛍光化合物であるフルオレセインはラクトン環を形成することで全く蛍光を生じないが、このラクトン環形成を制御することで、次亜塩素酸 (HOCl) との反応を利用し、HOCl 蛍光プローブを開発した。このプローブを用いて貪食活性化によってHOClを生成することが知られるブタ好中球のファゴサイトーシスを蛍光顕微鏡によって連続的に観察し、ファゴサイトーシスの際にファゴソーム内で産生されるHOClをリアルタイムで捉えることに成功した。(論文4)

更に、PeTとは異なる蛍光発光制御を原理とした近赤外領域発光の蛍光プローブの開発研究と off/on 型 photochromism 分子の開発研究も開始した。

### 新規蛍光団の開発とその応用

我々の研究室では、従来 PeT 機構に基づいて種々の可視化プローブを開発してきたが、この機構に基づいた場合はいずれも蛍光強度変化型となる。一方、波長変化型はレシオ測定を行うことができ、蛍光プローブを生細胞や生体組織に適応した場合に、蛍光プローブの局在や濃度変化、退色の影響を受けにくい点で優れている。今回、新たな蛍光団の開発として、クマリン骨格の誘導体であるイミノクマリン骨格に着目し、その光学特性を精査した結果、長波長タイプの亜鉛イオンのレシオ蛍光プローブの開発に成功した。(論文5)

平成19年度は、4位ホウ素を修飾した boron dipyrromethene (BODIPY) 誘導体の特性の精

査を行った。種々のフェノール類で4位を修飾したBODIPY誘導体の光学特性を調査した結果、4位フェノール基からのPeT機構によってBODIPYの蛍光制御が可能であった。更に、それら4位修飾BODIPYについて、励起光照射時の経時変化を追跡した結果、誘導体4位のフェノール基が励起光照射に伴ってBODIPYから放出されることが明らかになった。この結果、ケージド化合物としてBODIPY誘導体が利用可能であることを示唆した。

### 酵素反応を利用したタンパク質ラベル化技術の開発と応用

蛍光物質を用いて特定なタンパク質を選択的にラベル化する技術は、細胞内におけるタンパク質の挙動や機能を解明する上で有用なツールとなる。本研究では、ラベル化の手法として、生体内で高い特異性を発揮する酵素反応( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)を利用し、特定の酵素反応によって蛍光ラベル化が起こると同時に、プローブ自身の蛍光特性が変化する蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)型のプローブをデザイン・合成した。

### 環境感受性蛍光プローブの開発とその応用

様々な環境変化を蛍光off/onで検出することができる新規環境感受性蛍光プローブの開発を行った。蛍光団としてpHや溶媒に影響されず常に高い蛍光量子収率を有するBODIPY骨格を選択し、蛍光off/onのスイッチとしてはa-PeTを利用した。そこでBODIPYの8位に様々な電子密度の電子供与体(donor部位)を持つ化合物群を合成した。様々な溶媒中で蛍光測定を行った結果、蛍光off/onの境界が溶媒極性に依存して移動する現象が見出された。このプローブライブラリーを、中枢神経系において学習・記憶や神経死などの重要な働きを担っているグルタミン酸受容体に結合させることによって、L-グルタミン酸(Glu)をリアルタイムで検出するプローブの開発に成功した。(論文6)

### 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

GFPトランスジェニックマウスと野生型マウスのパラビオーシスモデルを作成し、野生型マウスの大腿動脈を機械的に傷害して新生内膜を増殖させた。同部の細胞にはGFPならびに平滑筋と内皮マーカーを認めた。新生内膜の形成に流血中の前駆細胞の関与がある。(論文7)

### 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

第一化学薬品株式会社(深作グループ)では、本研究で開発される蛍光プローブ試薬の実用化検討を実施した。具体的には、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室(長野グループ)で発明された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(*J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 10640-10641)及びNO蛍光プローブMAMBO(薬学会第126



年会、2006年3月)の実用化検討を行った。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平成19年12月に製品化して実用化を達成した。NiSPY-3は、従来、生体内で選択的に可視化することが困難であったパーオキシナイトライトをバイオイメージングできる蛍光プローブであり、酸化ストレスなどの生命現象の解明に貢献することが期待される。

MAMBOについては、実用化のための工業的製造法検討を検討し、大量合成法を確立し製造面での実用化を可能とした。MAMBOは、既に実用化されているDAF類よりNOとの反応性が高いことから、バイオイメージング用途としての実用化を含め、広範な用途での使用が期待される。そこで、平成20年度も保管安定性検討、性能確認検討を継続して実用化を目指す計画である。

### 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、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」グループ

- ① 研究分担グループ長: 平田 恭信 (東京大学大学院、准教授)
- 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」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、部長)
- ② 研究項目
  - ・ 蛍光可視化プローブ分子の大量合成法
  - ・ 蛍光可視化プローブ分子の安定性
  - ・ 蛍光可視化プローブ分子の実用化検討

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

<国際>

##### 2. で引用した論文

1. Tomonori Kobayashi, Yasuteru Urano, Mako Kamiya, Tasuku Ueno, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : "Highly Activatable and Rapidly Releasable Caged Fluorescein Derivatives", **J. Am. Chem. Soc.**, 129, 6696-6697 (2007).
2. Takuya Matsumoto, Yasuteru Urano, Takuji Shoda, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : "A Thiol-Reactive Fluorescence Probe Based on Donor-Excited Photoinduced Electron Transfer: Key Role of Ortho Substitution", **Org. Lett.**, 9, 3375-3377 (2007).
3. Yuichiro Koide, Yasuteru Urano, Suguru Kenmoku, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : "Design and Synthesis of Fluorescent Probes for Selective Detection of Highly Reactive Oxygen Species in Mitochondria of Living Cells", **J. Am. Chem. Soc.**, 129, 10324-10325 (2007).
4. 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.**, 129, 7313-7318 (2007).
5. Kensuke Komatsu, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : "Development of an Iminocoumarin-Based Zinc Sensor Suitable for Ratiometric Fluorescence Imaging of Neuronal Zinc", **J. Am. Chem. Soc.**, 129, 13447-13454 (2007).
6. 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.**, 129, 5597-5604 (2007).
7. Tanaka K., Sata M., Natoti T., Kim-Kaneyama J-R., Nose K., Shibamura M., Hirata Y., Nagai R. : "Circulating progenitor cells contribute to neointimal formation in non-irradiated chimeric mice", **FASEB J.**, 22, 428-436 (2008).

##### その他の論文

1. 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.**, 61, 154-159

- (2007).
2. 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, 509-517 (2007).
  3. 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)**, 112, 607-616 (2007).
  4. Huang P. H , Sata M , Nishimatsu H , Sumi M , Hirata Y , Nagai R. : "Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice", **Biomed. Pharmacother.**, 62, 46-52 (2008).
  5. Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Shigeru Kobayashi and Tetsuo Nagano : "Time-Resolved Long-Lived Luminescence Imaging Method Employing Luminescent Lanthanide Probes with a New Microscopy System", **J. Am. Chem. Soc.**, 129, 13502-13509 (2007).
  6. Takatoshi Yogo, Yasuteru Urano, Akiko Mizushima, Hisato Sunahara, Takanari Inoue, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino, Kazuya Kikuchi and Tetsuo Nagano : "Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment-sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer", **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 105, 28-32 (2008).
  7. Kazuki Kiyose, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano : "Functional Near-Infrared Fluorescent Probes", **Chem. Asian J.**, 3, 506-515 (2008).
  8. Matsumoto M., Sata M., Fukuda D., Tanaka K., Soma M., Hirata Y., Nagai R. : "Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice", **Atherosclerosis**, in press
  9. Nishimatsu H., Suzuki E., Takeda R., Takahashi M., Oba S., Kimura K., Nagano T., Hirata Y. : "Blockade of endogenous proinflammatory cytokines ameliorates endothelial dysfunction in obese zucker rats", **Hypertens Res.**, in press.

#### <国内>

1. 上野 匡、浦野泰照、長野哲雄、"分子イメージングプローブの開発"、**日本臨床**、65、247-252 (2007) .
2. 小島宏建、長野哲雄、"一酸化窒素 (NO) プローブ群の開発"、**PNE 蛋白質 核酸 酵素**、52, 1534-1539 (2007) .

**(2) 特許出願**

平成 19 年度 国内特許出願件数:1 件(CREST 研究期間累積件数:3 件)