

「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。

昨年度までに、東京大学大学院薬学系研究科長野チーム、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(現・積水メディカル(株))深作チームとの連携に基づいて、新たな蛍光 off/on 制御機構原理として、蛍光団が electron donor として機能し蛍光が off 状態になる現象である d-PeT 機構 (donor excited Photoinduced electron Transfer)を明らかにした。さらに市販化試薬として、グルコシダーゼ蛍光基質「TG-Glu」(2006 年 12 月)及びグルクロニダーゼ蛍光基質「TG-GlcU」(2006 年 12 月)、パーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)蛍光プローブ「NiSPY-3」(2007 年 12 月)の実用化に成功している。

本年度は、長野グループは、新たに蛍光団の開環・開環反応に基づく蛍光の off/on 制御機構を明らかにした。すなわち、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、この環形成反応を他の蛍光団にも展開し、その環形成を制御することで蛍光の off/on 制御が可能となる事を明らかにした。その他、新たな蛍光団の開発や疾患を視野に入れた各種可視化プローブの開発に成功している。平田グループは、長野グループにより開発された蛍光可視化プローブの特に動脈硬化巣の診断および治療に関連した臨床応用を目指した基礎検討を行った。深作グループでは、開発される蛍光可視化プローブが生命科学研究に有用

であることを明らかにするため、本研究の最終段階として実用化検討を行った。

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

長野チームは 19 年度までに、「a-PeT (acceptor excited Photoinduced electron Transfer)機構」と「d-PeT (donor excited Photoinduced electron Transfer)機構」という光誘起電子移動機構を利用した 2 つの蛍光 off/on 制御機構原理が存在することを見出した。さらに新たな蛍光 off/on 制御原理として、蛍光団の閉環・開環反応に基づく蛍光の off/on 制御に着目した。平成 19 年度には、本原理を用いて「次亜塩素酸(HOCl) 蛍光プローブ」(Kenmoku, S.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 7313-7318 (2007))の開発に成功した。その原理の概略としては、代表的な蛍光化合物であるフルオレセインやローダミンはラクトン環を形成することで全く蛍光を生じないことを利用している(図 1)。平成 20 年度は、この「閉環・開環機構」を論理的な分子設計法により制御できることを明らかにした。これまでにその応用例として、「ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)活性検出蛍光プローブ」及び「亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ ) 蛍光プローブ」の開発に成功している。

### 新規蛍光団の開発

#### i) イミノクマリン

イミノクマリンは従来のクマリン骨格などに比べ長波長で励起できるため、細胞障害を引き起こさず、かつ生体組織の透過性も高いと考えられる。平成 19 年度には、イミノクマリン骨格が長波長励起の波長変化型蛍光プローブの母核として有用であることを新たに見出し、長波長タイプの波長変化型  $Zn^{2+}$  蛍光プローブを開発することに成功した(Komatsu, K.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13447-13454 (2007))。平成 20 年度では、イミノクマリン骨格の蛍光団母核としての有用性を詳細に検討した結果、「イミノクマリン」が  $Zn^{2+}$  だけでなく様々な蛍光プローブの開発に応用できることが明らかになった。実際にこれまでに、イミノクマリンの 2 位のイミノ基に着目することで、Porcine liver esterase (PLE) 及び Cholinesterase の活性が検出可できる蛍光 off/on 型プローブの開発に成功している(図 2)。

#### ii) 4 位置換 BODIPY 類

これまでに、BODIPY 骨格炭素への修飾を通じて多数の機能性分子が開発されてきたが、4 位ホウ素を修飾した BODIPY 誘導体の報告は殆どない。平成 19 年度までに、BODIPY の 4 位ホウ素に phenoxy 基を導入する蛍光団が可視光照射により光分解されるケージ基として機能することを見出した。しかしながら、開発したケージ化合物はその水溶性やアンケージ効率に改善の余地を残していた。そこで平成 20 年度は、この BODIPY 誘導体をより実用的なケージ基とすべく改良を行った。BODIPY の 2, 6 位(図 3)に水溶性残基を導入した場合に水溶性が大幅に改善さ

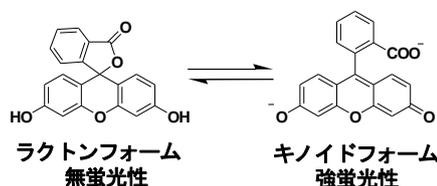


図 1 フルオレセインの「閉環・開環機構」

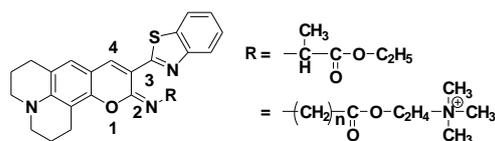


図 2 イミノクマリンを母核とした PLE 及び Cholinesterase 活性検出蛍光プローブ

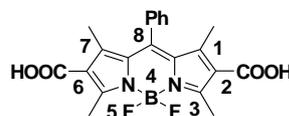


図 3 水溶性 BODIPY の構造

れること、またアンケージ反応に 4 位 phenoxy 基から BODIPY への光誘起電子移動が深く関与していること、4 位 phenoxy 基の脱離能がアンケージ反応効率に影響していることを明らかにした。これらの結果をもとに、より実用性の高いケージド化合物の開発を検討した。

#### 疾患を視野に入れた可視化プローブの開発

i) 近赤外領域発光の蛍光プローブの開発・・・酸化ストレスを誘起する活性酸素種(ROS)は細胞や組織を酸化して生体に損傷を与える一方で、シグナル伝達物質としても作用することが明らかになっている。一方、近赤外領域に吸収、蛍光波長を有する cyanine 色素は酸化電位が低いために ROS の攻撃を受けやすく、色素自体が ROS の感受性部位になりうる。そこで、ROS 反応性の高い色素と低い色素を組み合わせ FRET によって蛍光制御することで、新規近赤外 ROS プローブの開発に成功した(本研究結果は、「第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会 (京都 2008. 6. 19-20)」にて、優秀演題賞を受賞した)。

ii) 疾患の新規バイオマーカー蛍光プローブの開発・・・アクロレインは、酸化ストレスにより脂質から生じる低分子量の過酸化物である。動脈硬化症等、多くの疾患との関連が示唆されており、早期診断のための疾患マーカーとしても盛んに研究が行われている。アクロレインをチオール含有化合物とマイケル付加した後、さらにヒドラジン誘導体とカルボニル基とが反応することで、アクロレインをリンカーとしてチオール含有化合物とヒドラジン誘導体とを高収率に結合させることに成功した。本原理を利用し、microbeads と蛍光団との結合を利用した高感度かつ簡便なアクロレインの検出法の確立に成功した(本研究結果は、「第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会 (京都 2008. 6. 19-20)」にて、優秀演題賞を受賞した)。

iii) 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・・・グルクロン酸転移酵素(UGT)は、薬物代謝、ビリルビンやステロイドなどの内因性物質の代謝を担う代謝酵素であり、P450 とともに薬物代謝の中心的役割を担っている。薬物動態、薬物間相互作用、薬物代謝酵素阻害の正確な予測は、新薬開発を効率化する上で非常に重要であるが、UGT 活性を検出する HTS 系は未だ報告されていない。これまでに、我々はフルオレセインのカルボキシル基を別の置換基に置き換えた一部のフルオレセイン誘導体類がキサンテン環のヒドロキシル基が UGT 基質となることを見出した。そこでキサンテン環のヒドロキシル基はアニオン型と抱合型で電子密度が大きく変化することを利用して、「d-PeT 機構」を制御原理とする発蛍光型 UGT 活性検出プローブの開発に成功した。

iv) 長寿命型蛍光プローブの開発・・・Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)は incretin hormone である glucagon-like peptide (GLP-1)の加水分解に関与するプロテアーゼである。そのため、DPP4 阻害剤は GLP-1 の分解を抑制することによって insulin の増加を促し、2 型糖尿病の治療に有効である。そこで、DPP4 阻害剤の高感度スクリーニング系の構築に取り組んだ。スクリーニング手法としては、false positive を最大限に減らすため蛍光性ランタノイド錯体を用いた時間分解蛍光測定法を選択した。具体的には、「a-PeT 機構」を原理とし、DPP4 活性検出蛍光 Tb<sup>3+</sup>錯体の開発に成功した。実際にスクリーニング系へ応用し 4000 サンプルのスクリーニングを行った結果、阻害剤候補を発見することに成功した。

v) がんの in vivo 可視化プローブの開発・・・薬物代謝酵素として知られる Glutathione-S-transferase (GST)は、多剤耐性機構への関与や大腸癌の前癌病変である 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が示唆されている。そ

ここで、「d-PeT 機構」を原理として、生細胞内 GST 活性を直接検出可能な off/on 型蛍光プローブ「DNAT-Me」の開発を行った<sup>1)</sup>。実際に「DNAT-Me」を用いて大腸癌モデルラットの大腸を染色した結果、大腸癌の前癌病変である ACF を染色することに成功した。

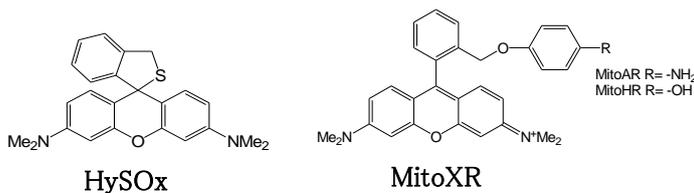
vi) MRI プローブの開発・・・MRI は生体の深部に渡る断層画像を非侵襲的に撮影できることから、臨床医療において画像診断法として汎用されている。一方、 $\beta$ -galactosidase はレポーター遺伝子として用いられており、このレポーター遺伝子の発現を個体内で可視化することは、遺伝子レベルでの病態の原因究明に大きく貢献できる。そこで、RIME(Receptor Induced Magnetization Enhancement)現象として知られる原理をもとに、 $\beta$ -galactosidase 活性検出 MRI プローブの開発を行った<sup>2)</sup>。デザイン・合成した MRI プローブは  $T_1$  緩和時間を測定した結果、 $\beta$ -galactosidase 活性によって MRI 信号が約 1.5 倍の上昇を示した。

#### 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、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。動脈硬化巣の構成細胞の由来を長野グループによって開発された蛍光プローブ等を用いた細胞標識により追跡したところ、骨髄由来でかつ流血中に存在する平滑筋前駆細胞の関与が考えられ、今後、治療のターゲットになる可能性が示唆された<sup>3)</sup>。

#### 蛍光可視化プローブ分子の実用化検討

深作グループでは、長野グループによって開発された蛍光プローブ試薬の実用化検討を実施した。具体的には、長野グループで開発された下記の次亜塩素酸イオン蛍光プローブ (HySOx) およびミトコンドリア局在型 hROS プローブ (MitoXR) の実用化検討を実施した。この結果、HySOx については大量合成法を確立し市販化による実用化に目処を付けることができた。MitoAR については大量合成法を検討中である。両プローブは、これまでに当グループで実用化した活性酸素種を対象とする蛍光プローブと異なる活性酸素種選択性と生体内局在特性を有することから、市販化により生命現象の解明に貢献することが期待される。その他 NO 蛍光プローブ (DAF-2、MAMBO など) の応用の可能性として呼気 NO を検出するシステムについて検討を行っている。本件は医療面での使用の可能性を探るため、平田グループと連携する。



### 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、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 (積水メディカル(株)、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)

##### § 2 で引用した論文

1. Yuuta Fujikawa, Yasuteru Urano, Toru Komatsu, Kenjiro Hanaoka, Hirotatsu Kojima, Takuya Terai, Hideshi Inoue and Tetsuo Nagano, "Design and Synthesis of Highly Sensitive Fluorogenic Substrates for Glutathione S-transferase (GST) and Application for Activity Imaging in Living Cells", *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14533-14543 (2008).
2. Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Takuya Terai, Toru Komatsu and Tetsuo Nagano, "A  $Gd^{3+}$ -Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Sensitive to  $\beta$ -Galactosidase Activity Utilizing a Receptor-Induced Magnetization Enhancement (RIME) Phenomenon", *Chem. Eur. J.*, 14, 987-995 (2008).
3. Tanaka K, Sata M, Natoti T, Kim-Kaneyama J-R, Nose K, Shibamura M, Hirata Y and 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. Mitsuyasu Kawaguchi, Takuya Terai, Rei Utata, Miki Kato, Keiko Tsuganezawa, Akiko Tanaka, Hirotatsu Kojima, Takayosi Okabe and Tetsuo Nagano, "Development of a Novel Fluorescent Probe for Fluorescence Correlation Spectroscopic Detection of Kinase Inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 3752-3755 (2008).
2. Huang PH, Sata M, Nishimatsu H, Sumi M, Hirata Y and Nagai R, "Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice.", *Biomed. Pharmacother.*, 62, 46-52 (2008).
3. Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y and Nagai R., "Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice.", *Atherosclerosis*, 197, 524-533 (2008).

4. Takeda R, Suzuki E, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R and Hirata Y, "Calcineurin is Critical for Sodium-Induced Neointimal Formation in Normotensive And Hypertensive Rats", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 294, H2871-H2878 (2008).
5. Takahashi M, Suzuki E, Takeda R, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R and Hirata Y, "Angiotensin II and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Synergistically Promote Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression: Roles of NF $\kappa$ B, p38 and Reactive Oxygen Species", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 294, H2879-H2888 (2008).
6. Nishimatsu H, Suzuki E, Takeda R, Takahashi M, Oba S, Kimura K, Nagano T and Hirata Y, "Blockade of Endogenous Proinflammatory Cytokines Ameliorates Endothelial Dysfunction in Obese Zucker Rats", *Hypertens. Res.*, 31, 737-743 (2008).
7. 寺西恵、宮下和久、鈴木正志、古寺理恵、斎藤克典、石井策史、後藤淳郎、西山敬介、平田恭信、松岡博昭、"血液透析患者の長期生命予後予測因子としての透析後の血漿 ANP と BNP 濃度の有用性"、*Dokkyo J. Med. Sciences*, 35, 71-78 (2008).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 5 件 (CREST 研究期間累積件数 : 8 件)