

化学プローブのデザイン・合成による 動物個体イメージング

Design, Synthesis and Biological Application of
Chemical Probes for *in vivo* Imaging

菊地 和也 (KAZUYA KIKUCHI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

本研究では機能性小分子プローブをデザイン・合成し、生きた状態での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行う。この目的のため、*in vivo* (動物個体) における可視化解析のための化学原理を精査し、生命科学研究に応用可能なスペックにみあう分子プローブ開発を行う。

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物無機化学、可視化プローブ

1. 研究開始当初の背景

本研究は、有機化学、物理化学及び生化学の境界領域に属し、それぞれの知識を用いることで機能性分子を創製する。このため、オリジナルの研究道具を作成することができ、従来の研究方法とは違う独創的なアプローチをとることができる。特に、酵素活性の可視化や蛋白質のラベル化の *in vivo* 応用で、既存の技術において、実用化レベルのものは極めて少ない。従って、これらの技術の開発には、新しい原理に基づいた方法論の確立が必要であり、本研究の学際的な知識の融合が鍵となる。この結果、作製した機能性分子を用いた新規の解析法により、*in vivo* における遺伝子発現の可視化や生体内機能分子の機能解析が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では機能性小分子プローブをデザイン・合成し、生きた状態での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行う。この目的のため、*in vivo* (動物個体) における可視化解析のための化学原理を精査し、生命科学研究に応用可能なスペックにみあう分子プローブ開発を行う。

3. 研究の方法

具体的には、横緩和時間変化型 MRI プローブの開発、細胞内蛋白質の特異的修飾法の開発を行い、生物個体における分子挙動を観

察できる化学ツールの設計法を確立する。この展開を行うことで、有機合成が得意とする多様な標的への分子設計と、分子生物学技術を融合させることができ、これまででない機能性小分子デザイン法が確立される。この結果、生物個体内の分子動態解析への応用や蛋白質の生体内ラベル化法が可能となり、化学を用いた新時代の生命科学研究を展開する。

4. これまでの成果

(I) 酵素活性を *in vivo* で検出する ^{19}F -MRI プローブの開発

これまでに、常磁性緩和促進 (PRE) を利用して、加水分解酵素活性を ^{19}F MRI によって検出する手法を開発してきた。この原理に基づいて、新たに Gd-FC-lac を開発した。Gd-FC-lac は細菌酵素 β -ラクタマーゼ (Bla) によって加水分解を受けると、Gd $^{3+}$ 錯体と ^{19}F の距離が離れ、Gd $^{3+}$ からの常磁性効果によって消失していた ^{19}F MRI シグナルが増大する。合成した Gd-FC-lac を含む中性緩衝液にリコンビナント Bla を添加したところ、反応が進行するにつれて ^{19}F MRI シグナルの増大が見られた。さらに、このシステムにより、細胞膜表面付近に存在する Bla 活性のみを ^{19}F MRI で検出することを可能とした。

(II) *in vivo* における蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発

本テーマでは、特定の蛋白質を選択的に機

能性分子でラベル化することにより、動物個体内の蛋白質の可視化を試みる。細胞標識として標的蛋白質を用いれば、局在・挙動などの *in vivo* イメージングが可能となる。さらに、合成プローブの添加時間の調整によって、パルスチェースラベル化や、pH 等をセンシングする機能プローブの導入によって免疫担当細胞の機能変化追跡が可能となる。標的蛋白質を可視化するには、蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現させる手法が一般的となっている。一般的には、タグと呼ばれるペプチドあるいはタンパク質を目的蛋白質に融合させ、そのタグに特異的に蛍光色素などを結合させる方法が行なわれている。そこで、既存の蛋白質ラベル化法の弱点を克服するために、①内在性でないこと、②融合させた目的蛋白質の機能を阻害しないこと、の二つのポイントを考慮し、蛍光ラベル化法の開発に取り組んだ。上記の条件を考慮して、タグ蛋白質として Bla を選んだ。脱アシル化過程に関与する Glu を Asn に変異させた変異型酵素 E166NTEM では、脱アシル化が起こらない。すなわち、基質が変異型酵素に共有結合した反応中間体が安定に存在する。そこで、この E166NTEM をラベル化タグとして利用し、図に示す分子プローブをデザイン・合成し発光型の蛋白質ラベル化に成功した。

5. 今後の計画

1) 個体及び組織レベルにおける酵素活性及び遺伝子発現のMRI用いた可視化

本研究テーマでは、遺伝子発現の指標となるレポーター酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブを作製し、生細胞および個体内における遺伝子発現を ^{19}F MRI によって可視化する。この目的のため既に、Gd-DFTP-gal をデザイン・合成した。このプローブは β -ガラクトシダーゼ (β -gal) によって加水分解を受けると、自動的に分解する。既にマウス胎児脳において、片側第4層に発現させた β -gal 活性を検出できることを明らかにした。本研究では、このプローブを用いてレポーター酵素である β -gal 活性を検出することにより生細胞及び個体内での遺伝子発現を ^{19}F MRI で可視化する。さらにマイクロ MRI (MRI 顕微鏡) 技術により、組織における細胞レベル(10 μm オーダー)の高分解能イメージングを可能とする予定である。

2) 計測対象分子プローブの標的蛋白質へのラベル化によるMRI及び *in vivo* 蛍光イメージング

申請者は最近、哺乳動物細胞が有していない細菌由来酵素(β -lactamase, TEM)を遺伝

子工学的に改変し、BL-tag と名付けた新規蛋白質集積化法を開発した。この集積化法は、集積化によって蛍光等のシグナルを制御する機能を備えている。このため、多種の集積化機能分子に対応してプローブをデザインできる、哺乳動物が有していない酵素を用いるため、特異性が非常に高い。本研究では、この集積化技術を *in vivo* 蛍光イメージング研究および ^{19}F MRI と融合させる。すなわち、標的蛋白質に対して近赤外蛍光プローブおよび ^{19}F プローブを集積化させ、*in vivo* イメージング及び ^{19}F MRI によりその挙動を解析する研究展開を企画している。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(1) S. Mizukami, M. Hosoda, T. Satake, S. Okada, Y. Hori, T. Furuta & *K. Kikuchi, "Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide", *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9524-9525 (2010).

(2) Y. Hori, H. Ueno, S. Mizukami & *K. Kikuchi, "Photoactive Yellow Protein-Based Protein Labeling System with Turn-on Fluorescence Intensity", *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16610-16611 (2009).

(3) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori & *K. Kikuchi, "Covalent Protein Labeling Based on Non-catalytic β -Lactamase and a Designed FRET Substrate", *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5016-5017 (2009).

(4) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa & *K. Kikuchi, "Dual Functional Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ^{19}F MRI", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 3641-3643 (2009).

(5) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Wälchli, M. Shirakawa & *K. Kikuchi, "Paramagnetic Relaxation-based ^{19}F MRI Probe to Detect Protease Activity", *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 794-795 (2008)

その他計 23 報

受賞

(6) 第 6 回 (平成 21 年度) 日本学術振興会賞 受賞 2010 年 3 月

(7) Royal Society of Chemistry (英国王立化学会) Emerging Investigator Award 受賞 2008 年 12 月

(8) 第 22 回日本 IBM 科学賞受賞 2008 年 11 月

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>