

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分  
平成27年3月17日現在

革新的高輝度近赤外発光プローブの創製と生体内癌  
イメージングへの応用  
Creation of Bright Near-Infrared Bioluminescent  
Probes and Their Application to Tumor Imaging

課題番号：24225001

鈴木 孝治 (SUZUKI KOJI)

慶應義塾大学理工学部・教授



研究の概要

研究の概要：本研究では、世界標準となる人工生物発光イメージングプローブ作製を目標に、有機合成手法に基づく高輝度蛍光分子と、遺伝子工学的的手法に基づく生物発光タンパク質の高輝度変異体とを、それぞれ専門分野の研究者が連携して開発したものを機能的に融合し、これまでにはない独創的な近赤外“融合型人工生物発光分子プローブ”開発とその基礎研究を行う。

研究分野：化学・複合化学・分析化学

キーワード：化学センサー

1. 研究開始当初の背景

体内の癌のような生体内から光信号をとる場合、高輝度かつ生体組織透過性の高い近赤外域に発光があるプローブが求められており、現状の蛍光プローブが抱える自家発光のない生物発光型のプローブが高感度イメージングに有利である。現状でのバイオイメージングは、蛍光プローブによるものがほとんどであるが、今後は生物発光イメージングが進展すると考えており、高性能の生物発光プローブ開発が鍵になる

2. 研究の目的

本研究では、世界標準となる人工生物発光イメージングプローブ作製を目標に、有機合成手法に基づく高輝度近赤外蛍光分子と、遺伝子工学的的手法に基づく生物発光タンパク質の高輝度変異体とを、それぞれ専門分野の研究者が連携して開発したものを機能的に融合し、これまでにない独創的な“融合型人工生物発光分子プローブ”開発とその基礎研究を行う。最終目標とするのは高輝度近赤外発光分子プローブであり、研究前半が基礎開発研究で複数の合成基質（分子）と変異酵素または人工酵素（タンパク質）を開発し、研究後半では開発した分子プローブをマウス生体での癌細胞イメージングやトラッキングに応用して性能評価を行う。

3. 研究の方法

本研究では、ルシフェリンに対して今までにない大幅な長波長化と高輝度化のための改善を加えるとともに、これらの合成ルシフェ

リンに最適の人工ルシフェラーゼについても、独自の実験系（大規模な変異導入と変異体のハイスループット評価系）に基づいて作製する。このように、“鍵（基質）”と“鍵穴（ルシフェラーゼ酵素）”をとともに革新するアプローチに基づいて発光の高輝度化と近赤外化を追求する点が独創的であり、本研究で推進する融合型人工生物発光分子プローブの最大の特長である。

4. これまでの成果

CTZの炭素6位置換基にスチリル基を導入し、酵素認識に重要なファクターとされる水酸基OHを保持した誘導体、プロトンH、電子供与性基であるOCH<sub>3</sub>基、立体的に嵩高く電子求引性基であるCF<sub>3</sub>、同じく電子求引性基Cl、平面的に嵩高いPhenyl基を導入した6つ新規誘導体(6-pi-X-CTZ)を設計・合成することで誘導体と既存の酵素間の構造活性相関を調べた。(図.1(b)の化合物を合成)

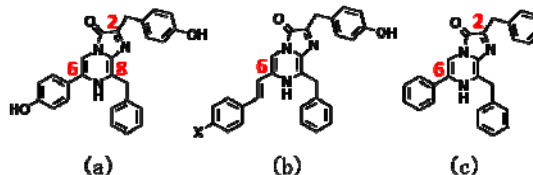


図1 (a)CTZ (b)6-pi-X-CTZ (c)DeepBlueC™

また、図1に示したCTZ並びに6-pi-X-CTZの生物発光強度を図2に示した。

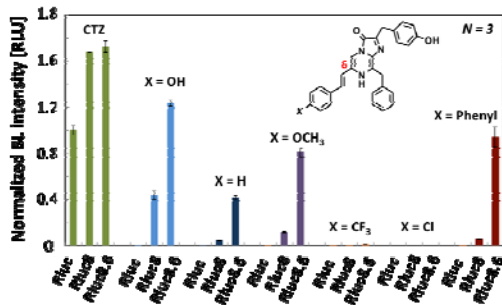


図2 6-pi-X-CTZの生物発光強度

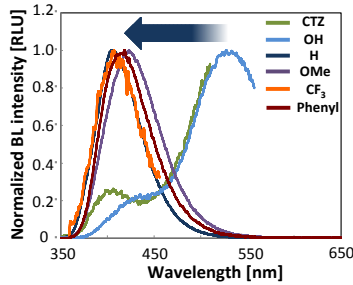


図3 生物発光スペクトル

図2の結果により 6-pi-X-CTZはRlucの誘導体 Rluc8 並びに Rluc8.6 に酵素認識を受ける事が分かった。図2より比較的高い Phenyl基を導入した誘導体(6-pi-Phenyl-CTZ)でも酵素に認識を受け、その発光輝度は天然の Rluc 発光系の 94%と高い輝度を保ち、6位置換基における拡張性を示す事に成功した。更にその生物発光波長は図3に示すように、6位に水酸基を持たない全ての CTZ 誘導体は、400 nmに最大発光波長を持つブルーシフト誘導体である事が分かった。

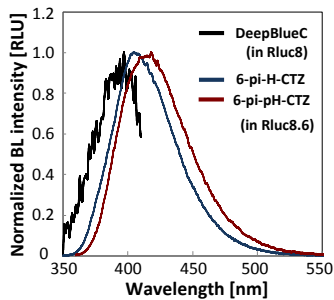


図4 生物発光スペクトル

そこで本研究では、新規誘導体と唯一のブルーシフト基質である DeepBlueC™(図1(c))との生物発光特性を比較検討する事とした(図4および図5)。DeepBlueC™は緑色蛍光タンパク質 GFP との BRET(生物発光共鳴エネルギー移動)研究に応用されている市販の誘導体である。図4および図5より本研究で開発した新規誘導体 6-pi-H-CTZ 並びに 6-pi-Phenyl-CTZ は DeepBlueC™の 11 倍、25 倍の発光輝度を示し、世界で最も高輝度な青

色生物発光システム開発に成功した。また本研究で得られた知見は今後酵素認識メカニズムの解明やより優れた光学特性を持つ新規 CTZ 誘導体開発に繋がると期待される

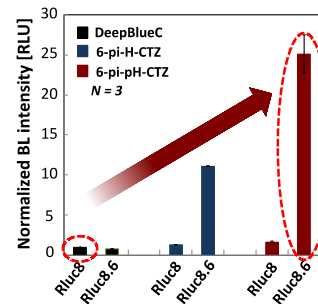


図5 生物発光強度

### 5. 今後の計画

CTZの炭素6位改変体が既存の酵素に認識を受ける事が分かったが、酵素認識に重要となる部位の解明には未だ至っていない。そこでこれまで酵素認識に関与しないとされてきた部位における置換基導入効果も調べる事で網羅的な構造活性相関研究を行う。なお、当初 CTZ の 2 位炭素から伸びた水酸基が酵素外に出ていると考えられたが、最近では CTZ 分子反対側の 6 位炭素側が酵素外に出ていると考えられ、この証拠となる X 線解析と分子軌道シミュレーションを実施する。

完成した発光プローブでは、今後随時マウスイメージングを行い、性能を評価する。

その他の未発表結果は、特許申請後に順次以下のホームページに公表する。

### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- 1) “Bioluminescent coelenterazine derivatives with imidazopyrazinone C-6 extended substitution”, Ryo Nishihara, Hideyuki Suzuki, Emi Hoshino, Sakura Suganuma, Moritoshi Sato, Tsuyoshi Saitoh, Shigeru Nishiyama, Naoko Iwasawa, Daniel Citterio, \*Koji Suzuki, Chemical Communications, 51, 391-394 (2014) (セレンテラジンの6位を誘導化できることを示し、世界で最も高輝度の青色生物発光システムを実現した。)

ホームページ

<http://www.applc.keio.ac.jp/~citterio/index.html>