

in vivo イメージングを目指した可視化プローブ開発

菊地 和也, 水上 進

1 はじめに

生命科学研究の発展とゲノム解読の進行により、細胞内での情報伝達物質やその物質を認識する分子が次々に同定され、試験管内での性質が明らかにされるようになった。現在ではポストゲノムという言葉が汎用されるが、この時代には生命の設計図である遺伝子情報がすべて解読されている。しかし、生きている状態では遺伝情報に書かれた分子が特定の場所で特定の時間に機能している。これらの情報は遺伝情報だけでは調べることはできない。そこで、次の目標である生理的条件での機能の解明が重要視されるようになってきている。この目的のため、細胞内分子と特異的に反応して分光特性が変化する分子プローブをデザイン・合成し直接細胞に応用することを試みてきた。この場合、光化学の原理に基づいて分光特性を変化させることをもくろみ、分子プローブにスイッチ機能を組み込むことが鍵となる技術である。特に物理化学の原理に基づいた分子設計が重要であり、化学原理を精査することによって生物応用の可能性を拓くことができる。重要な点として、生体試料に使用して新たな生命科学現象を引き出してくることができるスペックをみただけが必要が挙げられる。つまり、試験管内で機能するだけでなく、実際の細胞内あるいは個体内での状態で機能する必要がある。すなわち、生物応用のハードルを乗り越えるための高精度な化学機能を見だし、応用しなくてはならない。これまでの研究においては、蛍光プローブの蛍光特性変化を分子スイッチとして機能させた細胞内分子可視化プローブを開発してきた^{1)~3)}が、今回特に生体個体内の分子を可視化できるプローブ類の機能原理開発に成功したので報告する。

2 酵素活性を *in vivo* で検出する ¹⁹F-MRI プローブの開発⁴⁾• *in vivo* イメージング用プローブ開発の意義

2008年のノーベル化学賞に見られるとおり、蛍光イメージングの分野は汎用性高く応用されている。この理由は、プローブとなる蛍光タンパク質や有機分子の開発が進み手に入りやすくなったこと、実験系が比較的簡便であること、実験に使う測定機器（顕微鏡など）やソフトウェアの発達、等の理由が挙げられる。この状況下、細胞あるいは組織表面のイメージング技術は格段に進歩した。しかし、生体深部の情報をリアルタイムに可視化する技術は、これからの発展に期待が集まっている。特に、近年着目されている手法にはPET（positron emission tomography）が存在する。PETは外来性のリガンドの体内動態を可視化するのに向いている。しかし、酵素機能等を可視化する機能性プローブ作製は困難である、設備が大がかりである、放射性同位体を使用する、等の留意点があり、*in vivo* イメージングを万能にカバーすることはできない。また、近赤外光を用いた *in vivo* イメージングは近年着目を集めているが、近赤外蛍光を有する蛍光タンパク質や有機蛍光団の進歩が望まれているところである。さらに、生物発光タンパクを用いた *in vivo* イメージングも着目されているが、生体深部の情報を可視化するには、内視鏡などの光学機器の組み合わせが必要となる。MRI（核磁気共鳴画像化法、magnetic resonance imaging）を用いたプローブは、原理的には上記の問題点を克服できる可能性がある。しかし、これまで報告された機能性MRIプローブは稀である。このため、分子デザインによって機能性スイッチを組み込んだ分子プローブ開発に着手した。

酵素活性を *in vivo* で可視化する方法として、近赤外蛍光プローブを用いて組織表層をターゲットとした手法が存在するが、生体深部の酵素活性の観察はほとんど不可能である。MRIは生体深部の観測においても優れた空間分解能を示す為、酵素活性をMRIで観測でき

れば、極めて有用な情報が得られる。また、PET等の *in vivo* イメージング手法に比べると装置が比較的簡単である利点が挙げられる。しかし、酵素活性を検出する MRI プローブはほとんど存在しない。そこで、本研究では MRI シグナルの on/off を分子設計により制御した新規酵素活性検出プローブを開発した。観測核種としては ^1H に近い感度を持ち高コントラストが期待できる ^{19}F を選択した。

• 原理開発の着想点

Fe^{3+} や Gd^{3+} などの常磁性金属イオンは、NMR測定において緩和時間 T_2 を短縮させ、結果として NMR シグナルを大きく減少させることが知られていた。本研究では、そのシグナル消失現象を逆に利用することで、酵素反応前には MRI シグナルを消失させ、酵素反応後に初めてシグナルが現れるシステムを考案した。このシステムを最大限に生かすために、生体内にほとんど存在しないためにバックグラウンドシグナルが極めて小さい ^{19}F MRI を用いる。これにより、通常の ^1H MRI で見られるようなバックグラウンドでのコントラストが、全く存在しない画像が得られる。本研究においては、生体内分子との化学反応によってコントラストが変化する分子スイッチ機能を有したプローブを開発する。このプローブは、生体内分子の時間と場所あるいは濃度についての変化を可視化できる特徴を有する。このため、分子動態の動的変化を追跡する実験手法となりうるので、変化を追う際にノイズとなりうるバックグラウンドでのコントラストをできるだけ小さく抑えることが、よりコントラストの明確な画像を得るために重要である。この理由もあり、生体内にほとんど存在しない ^{19}F を測定核種に選んだ。

このような *in vivo* イメージングの手法は、全く新しい技術であり、波及効果の大きい研究であると考えている。

• 分子デザインと測定結果

Gd^{3+} や Fe^{3+} などの常磁性金属イオンを含む化合物の NMR スペクトルにおいて、常磁性イオンの近傍に存在する観測核種のピークは大きくブロード化することが知られている。この効果は常磁性緩和促進 (PRE, paramagnetic relaxation enhancement) と呼ばれ、タンパク質の NMR 測定において原子間距離を測定するために常套手段として用いられている。これは、常磁性イオンの不対電子が観測核種の核スピに対して磁気的影響を与え、縦緩和時間 T_1 及び横緩和時間 T_2 を短縮させることに起因している。ブロード化した NMR シグナルは、MRI で測定した際に低いシグナル強度を示すことになる。そこで、酵素反応によって常磁性金属イオンと観測核種の距離を離し、常磁性効果

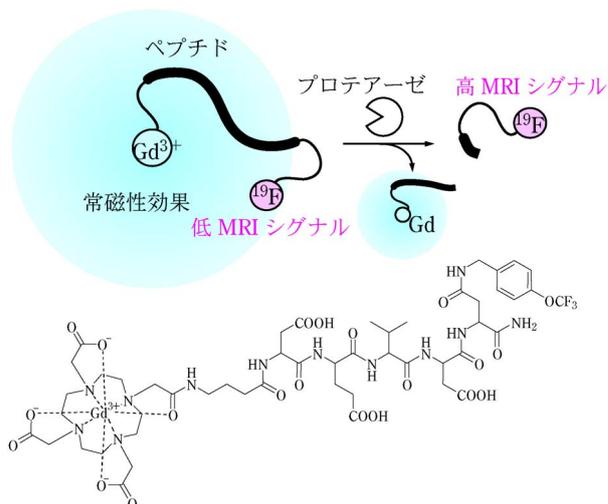


図1 機能性 ^{19}F MRI プローブのデザイン (文献4からの転記)

(PRE) を解消することができれば、MRI シグナル強度の増大を観測できるはずである。この原理に基づき、図1に示すプローブデザインを行った。MRI の観測核種としては生体バックグラウンドシグナルが極めて小さい ^{19}F を選択した。 ^{19}F を含む分子と常磁性の Gd^{3+} 錯体をペプチドリンカーでつないだ分子の ^{19}F MRI スペクトルは、 Gd^{3+} イオンの常磁性効果を受けてシグナル強度が極めて低下する。特に強い常磁性効果を期待するために Gd^{3+} イオンを第一に選択した。ここに、リンカーペプチド配列を切断するプロテアーゼを加えることで、酵素反応によって ^{19}F と Gd^{3+} の距離が変化し、 T_1 及び T_2 が大きく減少することが示された。特に、 T_2 変化は、酵素反応前後によって長くなるため、コントラストとしては酵素反応によって上昇するように変化する。このため、 T_2 強調画像を取得することは今回のイメージングに重要である。この原理に基づくことによって、酵素反応によって基質が切断されることで T_2 が増大し、コントラストは上昇することが予想された。

ターゲット酵素として caspase-3 を選択した。caspase-3 はアポトーシスの実行過程において中心的役割を果たす加水分解酵素であり、アポトーシス細胞内でその酵素活性が大きく上昇することが知られている。また、ある種の抗癌剤は癌細胞にアポトーシスを誘導することが知られており、*in vivo* で caspase-3 の酵素活性を検出できれば癌研究などにおける重要な分析手法になる。本研究では、図1に示したプローブを合成した。分子デザインとしては Gd^{3+} 錯体部位として DOTA の類縁体を用い、この部分と観測核種である ^{19}F の間を Fmoc 法で固相合成した caspase-3 で特異的に切断されるペプチド配列でつないだ。まず、このペプチドプローブに Gd^{3+} を配位させない状態で NMR ピークを測定し、 ^{19}F の強いピークを観測した (図2

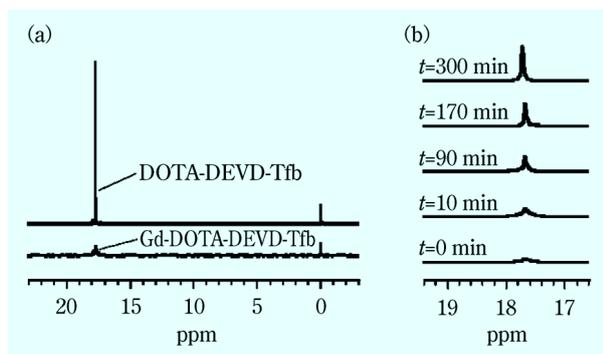


図2 NMRピークの酵素反応による上昇 (文献4からの転記)

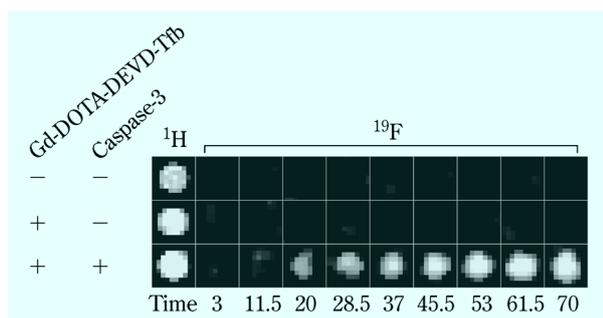


図3 酵素反応によるMRIコントラストの増強 (文献4からの転記)

(a)。このプローブに Gd^{3+} を配位させることにより、分子内に Gd^{3+} 等の常磁性原子が存在するために、観測核種である ^{19}F のNMRシグナルは強い T_2 短縮効果を受け、ピークがブロード化あるいは消失することが示された (図2)。

次に、*in vitro* で酵素反応の前後で ^{19}F -NMRシグナルが変化することを示し、酵素反応によって T_1 及び T_2 が大きく上昇することが示された。この化合物が酵素によって切断を受け、 ^{19}F と Gd^{3+} の間が切り離されると T_2 短縮効果がなくなり、シャープなNMRピークが回復する (図2(b))。特に、 T_2 変化はその減少によってコントラストが上昇するため、イメージングに重要である。この緩和時間変化をもとにMRI画像を T_2 強調画像として得ることにより、上記変化によってコントラストは約1000倍上昇することが示された (図3)。

この結果を発展させ、マウスやラットを用いて caspase-3 の *in vivo* イメージングを行う予定である。このプローブを生物個体に応用することにより、一般

的な酵素活性を生物個体レベルで追跡することが可能となることが予想される。

3 おわりに

動物個体内の酵素活性可視化を目標として、緩和時間変化型の機能性MRIプローブの設計原理を確立した。この原理を用いて、調べたい生体内分子との反応によってコントラストが変化する *in vivo* イメージングプローブ分子を作製できることが期待できる。

前述のとおり、現在ではポストゲノム時代の研究目標に生きた状態の作用解析が挙げられるようになってきている。この目的に化学プローブのデザイン・合成はまさに合致している。つまり、化学に基づくことで初めて展開可能な生命科学研究が存在すると考えている。

文献

- 1) T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, T. Nagano : *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12399 (2000).
- 2) K. Kikuchi, K. Komatsu, T. Nagano : *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 182 (2004).
- 3) K. Komatsu, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10197 (2005).
- 4) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Walchli, M. Shirakawa, K. Kikuchi : *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 794 (2008).
- 5) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, K. Kikuchi : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, in press (2009).



菊地和也 (Kazuya KIKUCHI)

大阪大学大学院工学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)。東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。博士 (薬学)。《現在の研究テーマ》生体分子を可視にする分子プローブ開発。《主な著書》“ケミカルバイオロジー” (共立出版)。《趣味》スポーツ観戦、アメリカ現代文学読書。
E-mail : kkikuchi@mls.eng.osaka-u.ac.jp



水上 進 (Shin MIZUKAMI)

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)。東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。博士 (薬学)。《現在の研究テーマ》有機合成化学および分子生物学技術を用いた生体機能探索分子および機能性光学分子の開発。
E-mail : smizukami@mls.eng.osaka-u.ac.jp