

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01827

研究課題名(和文) 生体関連物質によるoff/on型蛍光プローブの開発とそのガン細胞ターゲティング

研究課題名(英文) Development of cancer cell-targeting off/on type fluorescence probes based on biological molecules.

研究代表者

河合 靖 (Kawai, Yasushi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：20240830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：葉酸受容体は多くの上皮がん細胞表面で過剰に発現し、新たな化学療法剤の標的となっている。本研究課題において、この受容体に認識される簡単な蛍光分子であるジアミノプテリジンを基にして、がん細胞中でのみ蛍光がon状態になる機能性分子の開発を目指した。そして本研究により、葉酸受容体の認識部位であるプテリジンを蛍光色素部位として有し、がん細胞中で特異的に発現しているグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの酵素活性によって蛍光がoff/on制御でき、蛍光on状態で紫外線照射することでGリッチなDNA配列に対して酸化的ダメージを与えることのできる多機能性分子の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Folate receptor is a target for novel chemotherapeutic agents because of its overexpression on the surface of many epithelial cancer cells. In this research, diaminopteridine as a recognized moiety of folate receptor was developed as a multifunctional fluorescent probe. This probe can control off-on switching of fluorescence by enzyme activity such as glutathion-S-transferase specifically expressed in cancer cell, and also can oxidatively damage a G-rich portion of DNA oligomer by irradiating UV light in its fluorescence on state.

研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光プローブ 酵素活性検出 プテリン

## 1. 研究開始当初の背景

葉酸受容体 (FR) は多くの上皮性がん細胞に過剰に発現していることから、がん治療の新たな標的分子として注目されている (*Nature*, **500**, 486-489 (2013)). 近年、これを薬物輸送システム (ドラッグデリバリーシステム、DDS) のターゲットとしたがん治療薬の開発が盛んに行われている (*Onco Targets Therapy*, **7**, 1223-1236 (2014)). 一方で、蛍光プローブを利用したバイオイメージング技術の開発が盛んに研究されているが、その中でも細胞内の特定の酵素活性のみを検出できる off/on 型の蛍光プローブが多数開発されている (*J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12021- 12030 (2011), *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 309-314 (2013)). 研究代表者は一つの分子にこれら二つの機能を持たせ、更に蛍光 on 状態での光照射によりがん細胞の DNA にダメージを与える様な、一分子で三重の機能を有し、がん細胞選択性を付与した化学療法剤の開発を着想し検討した。

## 2. 研究の目的

葉酸は DNA 合成の過程に必須のビタミンであり、葉酸受容体は多くのがん細胞表面で過剰に発現し、新たな化学療法剤の標的となっている。研究代表者は、葉酸は無蛍光であるが、葉酸のプテリン基そのものは蛍光物質である事に着目し、酵素活性による on/off 型蛍光プローブを開発してきた。本研究ではこれを off/on 型蛍光プローブへと展開し、がん細胞を標的とする化学療法剤の開発を目指した。即ち、葉酸受容体に認識されるプテリンに、がん細胞中でのみ特異的に発現している酵素の活性によって蛍光が off から on になる官能基を導入し、on 状態になった蛍光プローブに光照射する事で活性酸素発生と DNA からの電子移動を誘起し DNA にダメージを与えるという、一分子で三重の機能を有する化学療法剤の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究で用いるプテリン型蛍光プローブは酵素の活性により蛍光の on/off 制御が可能で、量子化学計算で分子設計が可能である。本研究ではこれを off/on 型プローブへと展開し、さらに光照射による DNA のダメージを評価した。具体的には以下の4点について検討した。(1) 葉酸誘導体の蛍光発光・消光原理に基づき、がん細胞内に特異的に発現している酵素の活性によるプローブの構造変化で蛍光が off/on 制御可能な基質を量子化学計算により設計した。(2) 理論的に設計された蛍光プローブを実際に化学合成し、その蛍光特性を明らかにした。(3) 合成したプローブを *in vitro* で酵素反応を行い、蛍光の off/on による活性測定が可能か評価した。(4) off/on 型蛍光プローブの off・on 状態それぞれで DNA 存在条件下で光照射し、on 型のみが DNA に酸化的ダメージを与えられるかど

うかを評価した。

(1) off/on 型蛍光プローブの理論設計：酵素反応によって蛍光が off/on 制御できる様なプローブを、がん細胞中で特異的に発現している多くの酵素に対して設計した。プテリン環を励起部位、ベンゼン環を蛍光制御部位及び酵素反応部位として捉え、ここに様々な化学修飾をして基質型と生成物型の化合物を設計した。ターゲットとなる酵素としては、多くのがん細胞中で特異的に発現している  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、ロイシニアミノペプチダーゼ、 $\gamma$ -グルタミン合成酵素などが挙げられる。酵素反応の基質型と生成物型の蛍光が off 状態から on 状態へ変化する組み合わせの候補を多数考え、量子化学計算により密度汎関数法を用いて、それぞれの化合物の最安定構造に関する分子軌道及び励起エネルギーを計算した。計算結果から、これらの化合物の基質型と生成物型で蛍光の off/on 状態が変化する組み合わせを数多く見出し、多くの酵素反応に対応できる蛍光プローブを分子設計した。

(2) 蛍光プローブの合成と蛍光特性の評価：次に、(1)で設計したプローブを実際に化学合成した。合成スキームとしては、蛍光物質であるプテリジンやジアミノプテリジンの6位にプロモメチル基を導入した化合物を合成し、これと各種アニリン誘導体を求核置換反応させる事で、蛍光色素部位 (プテリジン環) と電子移動部位 (ベンゼン環) を連結させた。ベンゼン環部位の置換基 (酵素反応部位) として、各種アミノ酸やペプチドなどを導入する事で、酵素基質としての反応部位を導入する事ができる。合成した化合物は全て吸収スペクトル及び蛍光スペクトルを測定し、蛍光量子収率を算出して、off/on 型蛍光プローブとしての機能を評価した。

(3) 蛍光プローブの *in vitro* での評価：上記の (2) で合成したプローブが、酵素の活性によって off/on スwitching できるかどうかを評価した。まず、がん細胞で特異的に発現している酵素 ( $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、ロイシニアミノペプチダーゼ、 $\gamma$ -グルタミン合成酵素など) の基質に該当するプローブで酵素反応を行い、蛍光の off/on による酵素活性の検出が可能かどうかを評価した。

(4) 光照射による DNA への酸化的ダメージの評価：上記の (3) で評価した off/on 型蛍光プローブにおいて、蛍光 on 状態でのみ DNA に酸化的ダメージを与えられるかどうかを評価した。様々な塩基配列の一重鎖や二重鎖の DNA オリゴマーを設計・購入し、各種蛍光プローブの存在下 *in vitro* で光照射した。DNA への酸化的ダメージの有無は、HPLC を用いて分析した。これまでの研究でグアニンが連続している部位で、蛍光プローブへの光照射で発生した活性酸素により 8-オキソグアニンが生成しやすい事が分かっているので、その

配列特異性や酸化効率などを評価した。

#### 4. 研究成果

(1) off/on 型蛍光プローブの理論設計：酵素反応によって蛍光が off/on 制御できるプローブを、がん細胞中で特異的に発現している多くの酵素に対して設計した。ターゲットとなる酵素として、多くのがん細胞中で特異的に発現している  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ、ロイシニアミノペプチダーゼ、 $\gamma$ -グルタミン合成酵素、カテプシンを検討した。量子化学計算により、それぞれの化合物の最安定構造に関する分子軌道及び励起エネルギーを計算し、基質型と生成物型で蛍光の off/on 状態が変化する組み合わせを多数見出し、酵素反応で off/on 制御できる蛍光プローブの分子設計に成功した。

(2) 蛍光プローブの合成と蛍光特性の評価：上記の(1)で設計されたプローブを実際に合成した。基本骨格としては蛍光色素部位（プテリジン環）と電子移動部位（ベンゼン環）を連結させた化合物である。ベンゼン環部位の置換基（酵素反応部位）として、各種アミノ酸やペプチドなどを導入する事で、酵素基質としての反応部位を導入する事ができた。合成した化合物は全て吸収スペクトル及び蛍光スペクトルを測定し、蛍光量子収率を算出した。そして合成したほとんどの化合物において基質型では蛍光が off で、生成物型では蛍光が on であった。これにより特定の酵素活性によって蛍光の off/on がスイッチング可能な蛍光分子の開発に成功した。

(3) 蛍光プローブの *in vitro* での評価：上記の(1)で設計して(2)で合成した、酵素活性を蛍光の off/on で検出できる種々のプローブを用いて、多くのがん細胞中で特異的に発現している酵素に適用可能かどうかを評価した。合成した数十種類の蛍光プローブに関して、種々の酵素を用いて検討したところ、グルタチオン S トラंसフェラーゼ、カテプシン、カスパーゼおよびロイシニアミノペプチダーゼに関して、蛍光の off/on による酵素活性の検出が可能であることを確認した。特にグルタチオン S トラंसフェラーゼ検出プローブに関しては 20 種類以上の化合物を合成し検討し、何れも酵素活性の検出が可能であることを確認した。これにより特定の酵素活性によって蛍光の off/on がスイッチングできる新規な蛍光プローブの開発に成功した。

(4) 光照射による DNA への酸化的ダメージの評価：光照射による DNA への酸化的ダメージの評価を *in vitro* で行った。まず最初に DNA のモデル化合物として、GGGG および AAAA テトラオリゴマーを用いて、蛍光が off と on 状態のそれぞれのプローブの存在下で 360 nm の紫外線を照射して検討した。DNA の酸化的ダメージの有無は HPLC を用いて分析した結果、蛍光が on 状態のプローブ存在下で、配列が GGGG の DNA オリゴマーの時のみ紫外線

照射による DNA の損傷が確認された。次に、多くのがん細胞中で特異的に発現している酵素の中で、グルタチオン S トラंसフェラーゼ(GST)をターゲットにした新規蛍光プローブを各種合成し、その効果を検証した。ジアミノプテリジンを蛍光部位とし、複数の電子吸引基を様々な置換パターンで導入したフェニルスルホンアミド誘導体を各種合成し、蛍光の off/on によって GST の活性検出が可能かどうかを検討したところ、電子吸引基の置換パターンによって GST の活性が大きく異なることが明らかになった。また、蛍光プローブの疎水性の違いにより、細胞への導入効率が大きく左右されることも明らかになった。さらに、紫外線照射による DNA オリゴマーの損傷評価では、塩基配列の異なる 10 オリゴマーを設計し、蛍光が on 状態のプローブ存在下で 360 nm の紫外線を照射してその損傷を HPLC と LC-MS によって評価した。グアニン(G)が連続した配列の DNA オリゴマーの時のみに紫外線照射による DNA の損傷が確認され、その生成物は LC-MS の解析により酸化体 DNA オリゴマーであることが分かった。これにより、on 型蛍光プローブへの紫外線照射による励起状態への電子移動が、発生した活性酸素による酸化反応によって連続 G 配列を有する DNA オリゴマーが酸化的ダメージを受けていることが明らかになった。

これらの成果から、葉酸受容体の認識部位であるプテリジンを蛍光色素部位として有し、がん細胞中で特異的に発現している酵素の活性によって蛍光が off/on 制御でき、蛍光 on 状態で紫外線照射することで G リッチな DNA 配列に対して酸化的ダメージを与えることのできる多機能性分子の開発に成功した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 加藤寛之、北村優斗、宇高芳美、河合 靖、北山 隆「反応活性アレン型ゼルンボンの酸化反応検討」日本薬学会第 138 年会(金沢)2018 年 3 月 27 日
- (2) 今村彩瑛、田上雄基、北山 隆、河合 靖「ゼルンボンの抗菌活性機構解明のための光親和性ラベル化剤の合成」日本化学会第 98 春季年会(船橋)2018 年 3 月 21 日
- (3) 松本美奈子、河合 靖「グルタチオン S-トラंसフェラーゼ活性検出に関するプテリンを基にした蛍光プローブの開発」日本化学会第 97 春季年会(横浜)2017 年 3 月 17 日
- (4) 松本美奈子、河合 靖「プテリンを基にした新規 off/on 型酵素活性検出蛍光プ

ローブの開発」第 16 回日本蛋白質科学  
会年会(福岡)2016年6月8日

- (5) 松本美奈子、河合 靖「プテリン誘導体  
による新規 off/on 型プロテアーゼ活性  
検出蛍光プローブの開発」日本化学会第  
96 春季年会(京田辺)2016年3月26日
- (6) 松本美奈子、河合 靖「プテリン誘導体  
による新規グルタチオン S-トランスフ  
ェラーゼ活性検出蛍光プローブの開発」  
日本化学会第 96 春季年会(京田辺)2016  
年3月26日
- (7) 松本美奈子、河合 靖「プロテアーゼの  
活性検出が可能なプテリンを基にした  
蛍光プローブ」第 15 回日本蛋白質科学  
会年会(徳島)2015年6月25日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河合 靖 (KAWAI Yasushi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
教授

研究者番号：20240830

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし