

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成26年 4月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2008～2013

課題番号：20675004

研究課題名（和文）

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

研究課題名（英文）

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

研究代表者

菊地 和也 (Kazuya Kikuchi)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70292951

研究成果の概要（和文）：

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。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してきた。

研究成果の概要（英文）：

One of the great challenges in the post-genome era is to clarify the biological significance of intracellular molecules directly in living cells. If we can visualize a molecule *in vivo*, it is possible to acquire biological information, which is unavailable if we deal with cell homogenates. One possible approach is to design and synthesize chemical probes that can convert biological information to chemical output. Novel MRI probes with tunable switches and novel methods to label target proteins with functional molecules are developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	20,300,000	6,090,000	26,390,000
2009年度	18,600,000	5,580,000	24,180,000
2010年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2011年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2012年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
総計	81,500,000	24,450,000	105,950,000

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、(1) 横緩和時間変化型 MRI プローブの開発、(2) 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、これまでに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. 研究成果

(1) 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。

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 で可視化した。

マウスを用いた *in vivo* 実験に分子量が小さい ^{19}F MRI プローブを応用する際に必ず問題となる点として分子運動性の抑制が挙げられる。MRI は蛍光や PET などのイメージング法と比較して感度が低い点が問題である。この問題をプローブデザインによって解決する為には、プローブ内の ^{19}F 数を増加させることが一番の近道である。しかし、単純に ^{19}F 数を増加させると、 ^{19}F の疎水性のため血清蛋白質や脂質分子と相互作用しやすくなり、目的部位への送達が阻害されるだけでなく、 ^{19}F の分子運動が抑制される。この分子運動抑制の結果、 T_2 が短縮され ^{19}F MRI 信号は低下し感度はかせげない。高感度を保つためには、 ^{19}F の運動性を確保しつつ、数多くの磁性的に単一の ^{19}F を増やす分子設計が必要不可欠である。

これまでに報告されている、1分子内に多数の ^{19}F 原子を導入可能なナノ粒子型 ^{19}F MRI 造影剤は、大別すると2種類ある。

1つは、 ^{19}F 修飾官能基と親水基から成る ^{19}F 修飾ポリマーである。 ^{19}F 修飾ポリマーは、側鎖に標的指向性の機能を付与したりリガンドや蛍光色素を導入可能である。しかし、分子量の大きいポリマーに ^{19}F 原子を直接結合することで ^{19}F の分子運動が低下し、 T_2 が低下する。したがって、 ^{19}F NMR ピークの線幅のブロード化を引き起こし、 ^{19}F MRI 信号強度も低下するため、高感度な ^{19}F MRI 造影剤とは言い難い。

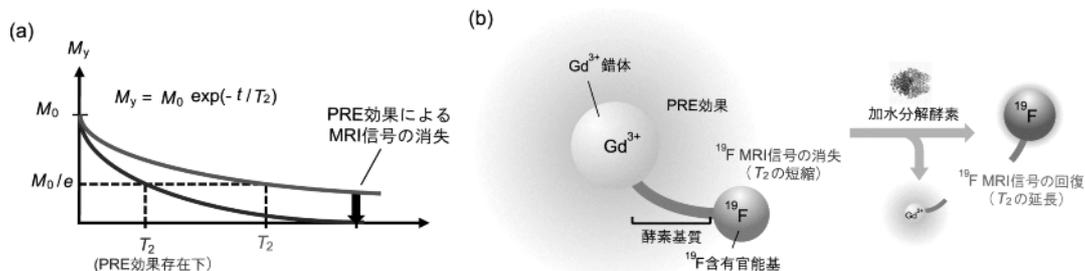


図1. PRE効果の説明

(a) 磁化率と T_2 の関係 (b) PRE を原理とした MRI プローブのデザイン

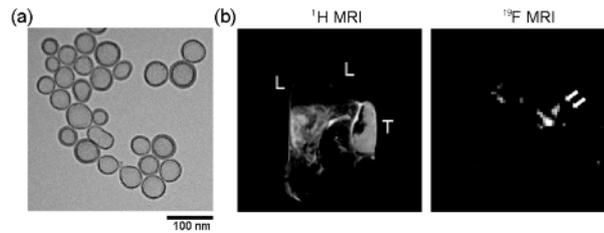


図2. PFC含有シリカナノ粒子
(a) ナノ粒子のTEM像 (b) ナノ粒子を用いたがん組織の¹⁹F MRI像

もう一方のナノ粒子はパーフルオロカーボン (PFC) をミセル化したエマルジョンである。PFCは、炭化水素の水素原子を全てフッ素原子で置換した有機化合物の総称である。PFCは、化学的に非常に安定で、生物学的に不活性な有機化合物であり、分子量に占めるフッ素の割合が高いため、非常に高い¹⁹F MRI感度を持つ。しかしその一方で、非常に疎水性が高いため、そのままでは生体イメージングに適した物質ではないため、分散剤を用いてミセル化させたものが使われる。ミセル内のPFCは液体状態で内包され、フッ素の運動性が確保されているため、 T_2 の減衰はほとんどなく、高感度な¹⁹F MRI造影剤である。この点から、PFC内包ミセルは細胞の動態追跡に応用されている。しかし、PFC内包ミセルはミセル同士が水溶液中で融合し、徐々に大きな粒子が生成するオストワルド熟成が引き起こされるため、生体内での安定性が非常に低い。また表面の機能化の際、有機溶媒を用いることは出来ないため多様な表面修飾が困難である。

上記の問題点を克服し、高感度かつ多様な機能化が可能な¹⁹F MRI造影剤の開発するために、我々はコア-シェル型のパーフルオロクラウンエーテル(PFCE)内包シリカナノ粒子を新たに考案した。コアとなるPFCEはPFCの一種で、化学シフトが等価なフッ素を20個有している。さらにPFCの中でも特に高い¹⁹F MRI感度を有している。また、シェルを構成しているシリカ(SiO₂)は生体適合性が高く、有機溶媒・水溶液中・高温下でも高い分散性を示す。このためPFCE内包シリカナノ粒子は高感度なPFC内包ミセルの問題点を克服した¹⁹F MRI造影剤であると考えた。

PFCE内包シリカナノ粒子は、PFCE内包ミセルを鋳型として表面でシリカ重合を行うことで合成した。作製したPFCE内包シリカナノ粒子を電子顕微鏡によって観察した結果、直径が約50 nmのコア-シェル型ナノ粒子が生成していることが確認された(図2a)。さらに、水溶液中・室温環境下で7日間粒径が変化しないことが動的散乱により確認できた。次に、PFCE内包シリカナノ粒子がin vivoにおいて観測可能か検討を行うために、担癌マウスを用いた実験を行った。

担癌部位では、血管内皮細胞間に100~200 nm程度の大きな間隙が空いており高分子の漏出が起りやすい。またリンパの発達が未熟であるため、漏出した物質がその場に留まるEnhanced Permeation and Retention (EPR)効果が知られている。しかし、表面修飾をせずにシリカナノ粒子を投与しても、オプソニ化が起り体内のマクロファージに捕食され、血中滞留時間が短くなるため、十分なEPR効果を期待できない。そこで血中滞留性を向上させるべく、PFCE内包シリカナノ粒子表面にポリエチレングリコール(PEG)を導入したPEG修飾PFCE内包シリカナノ粒子を作製することとした。続いて、担癌マウスに尾静脈から投与し、¹H/¹⁹F MRI撮像を行った。¹⁹F MRI測定の結果、癌組織から非常に強い¹⁹F MRI信号が観測された(図2b)。一方、PEGを修飾していないPFCE内包シリカナノ粒子においては、癌組織からの信号は観測されなかった。一連の実験によって、PFCE内包シリカナノ粒子は水溶液中で安定かつナノ粒子表面に様々な機能性官能基を導入可能であり、in vivoにおいても十分な感度を有していることが示された。

(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・合成し発蛍光型の蛋白質ラベル化に成功した。

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 48 件)

(1) H. Matsushita, S. Mizukami, F. Sugihara, Y. Nakanishi, Y. Yoshioka & *K. Kikuchi, “Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ^{19}F MRI”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, in press (2013). DOI: 10.1002/anie.201308500

(2) Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, S. Shirakawa & *K. Kikuchi, “Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins”, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12360–12365 (2013). DOI: 10.1021/ja405745v, *JACS* Highlight Paper

(3) S. Mizukami, Y. Hori & *K. Kikuchi, “Small-Molecule-Based Protein-Labeling Technology in Live Cell Studies: Probe-Design Concepts and Applications”, *Acc. Chem. Res.*, 46, in press (2013). DOI: 10.1021/ar400135f

(4) R. Baba, Y. Hori, S. Mizukami & *K. Kikuchi, “Development of Fluorogenic Probe with Transesterification Switch for Detection of Histone Deacetylase Activity”, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 14310–14313 (2012). DOI: 10.1021/ja306045j, *JACS* Highlight Paper

(5) Y. Hori, K. Nakaki, M. Sato, S. Mizukami & *K. Kikuchi, “Development of Protein Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association and No-wash Live-cell Imaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 5611–5614 (2012). DOI: 10.1002/anie.201200867

(6) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Akimoto & *K. Kikuchi, “No-Wash Protein Labeling with Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis”, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1623–1629 (2012). DOI: 10.1021/ja208290f

(7) T. Kowada, J. Kikuta, A. Kubo, M. Ishii, H. Maeda, S. Mizukami & *K. Kikuchi, “*In Vivo* Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclasts”, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17772–17776 (2011). DOI: 10.1021/ja2064582

(8) S. Mizukami, T. Yamamoto, A. Yoshimura, S.

Watanabe & *K. Kikuchi, “Covalent Protein Labeling with a Lanthanide Complex and its Application to Photoluminescence Lifetime-based Multicolor Bioimaging”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 8750–8752 (2011). DOI: 10.1002/anie.201103775

(9) 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). DOI: 10.1021/ja102167m

(10) 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). DOI: 10.1021/ja904800k

(11) 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). DOI: 10.1021/ja8082285

(12) 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). DOI: 10.1002/anie.200806328

(13) 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). DOI: 10.1021/ja077058z

(14) S. Mizukami, K. Tonai, M. Kaneko & *K. Kikuchi, “Lanthanide-based Protease Activity Sensors for Time-resolved Fluorescence Measurements”, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14376–14377 (2008). DOI: 10.1021/ja800322b

[学会発表] (計 17 件 : 全て招待講演)

(1) K. Kikuchi, “Fluorogenic Intracellular Protein Labeling Using Synthetic Chemical Probes for Imaging Quick Responses of target Localization and Degradation”, *The 27th Annual Symposium of the Protein Society*, Boston MA, U.S.A., Jul 20–23, (2013).

(2) K. Kikuchi, “Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches”, *CAS II: Catalysis and Sensing for Health*, Bath, United Kingdom, Jan 31–Feb 2, (2011).

(3) K. Kikuchi, “Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches”, Plenary

Lecture, *ICBIC-15, International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Vancouver, Canada, August 7-12 (2011).

(4) K. Kikuchi, "Fluorescent Sensor Molecules with Tunable Fluorescence Switches for Cellular Imaging", *European Science Foundation Workshop, "Probes for Lipid Systems Biology"*, Menaggio, Italy, October 11-15 (2011).

(5) K. Kikuchi, "Design, Synthesis and Biological Application of in Vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches", *EMBL Conference Series - Chemical Biology 2010*, Heidelberg, Germany, Sep 22-25 (2010).

(6) K. Kikuchi, "Development of Imaging Probes with Tunable Switches for Biological Applications", The 238th ACS National Meeting, American Chemical Society, Washington DC, USA, Aug 26-20, (2009).

(7) K. Kikuchi, "Design, Synthesis of Visualization Probes with Tunable Switches for Bio-imaging", Gordon Research Conference: Metals in Biology, Ventura CA, USA, Jan 25-30, (2009).

〔図書〕(計1件)

(1) 井村久則・菊地和也・平山直紀・森田耕太郎・渡會仁、共立出版社、【機器分析編】3. 吸光・蛍光分析、-, (ISBN978-4-320-04389-3) (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

(1) 名称:「タンパク質を二段階標識する方法」

発明者: 菊地和也, 堀雄一郎, 上野秀樹

権利者: 大阪大学

番号: 特願 2009-056306

出願年月日: 2009年3月10日

国内外の別: 国内

(2) 名称:「希土類発光プローブ」

発明者: 菊地和也, 水上進, 東内一博

権利者: 大阪大学

番号: 特願 2008-61320

出願年月日: 2008年3月11日

国内外の別: 国内

(3) 名称:「ホスホクマリン誘導体およびそれを含む蛍光プローブ」

発明者: 菊地和也, 水上進, 渡辺修司

出願人: 大阪大学, (財)大阪産業振興機構

番号: PCT/JP2008052938

出願年月日: 2008年2月21日

国内外の別: 国外

○取得状況(計1件)

(4) 名称:「タンパク質を蛍光標識する方法」

発明者: 菊地和也, 堀雄一郎, 上野秀樹

権利者: 大阪大学

番号: 特許第 5299932 号

取得年月日: 2013年6月28日

国内外の別: 国内外

〔その他〕

受賞歴

(1) 第31回(2013年度)大阪科学賞受賞
2013年11月

(2) 第29回(2012年度)井上學術賞受賞
2013年2月

(3) 第29回(平成23年度)日本化学会學術
賞受賞 2012年3月

(4) 第6回(平成21年度)日本學術振興会賞
受賞 2010年3月

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

(6) 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/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊地 和也 (Kazuya Kikuchi)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 70292951

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし