

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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21685019

研究課題名（和文）

機能性分子設計に基づく技術融合型分子イメージング法の開発

研究課題名（英文）

Development of fusion molecular imaging technique based on functional molecular design

研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI SHIN)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30420433

研究成果の概要（和文）：化学原理に基づいた機能性プローブ開発、遺伝子工学による蛋白質改変、最新の機器測定技術を融合させることにより、次世代分子イメージング技術に有用な要素技術の開発を行った。具体的には、①生細胞内の遺伝子発現の¹⁹F MRI 検出技術、②蛋白質の機能性分子ラベル化技術、③蛋白質の時間分解イメージング技術、の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Several elemental technologies for next-generation molecular imaging methods were developed by integrating chemical principle-based functional probe design, protein engineering, and latest instrumental analyses. Specifically, three technologies, which are ¹⁹F MRI detection system to visualize living cellular gene expression, novel protein labeling technology, and time-resolved photoluminescence imaging technology for proteins, were developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：蛍光プローブ、MRI、ラベル化、イメージング、β-ラクタマーゼ

1. 研究開始当初の背景

生体分子の真の機能を解明するには、生物が生きてきたままその機能を調べる必要がある。それゆえ、生きて細胞・組織中における分子の挙動を調べる「蛍光イメージング技術」は近年爆発的に進展した。しかし、蛍光イメージングには I. 動物個体実験においては光の組織透過性に問題がある、II. 自家蛍光など

のバックグラウンドシグナルが観察の妨げとなる、など課題も多い。そこで、これらの点を克服する生体分子のイメージング手法の開発が強く求められていた。

2. 研究の目的

化学原理に基づいた分子設計により、生きて細胞・動物個体内におけるタンパク質機能

の探索手法を開発する。具体的には、研究代表者がこれまでに遂行してきた¹⁹F MRIプローブ、長寿命蛍光プローブ、およびタンパク質の機能性分子ラベル化法の3つの研究を融合させ、(1) 遺伝子発現の¹⁹F MRI検出、(2) 蛋白質の新規ラベル化技術開発、(3) 蛋白質の時間分解蛍光イメージング、の3つの研究遂行を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の¹⁹F MRI検出

これまでに開発した常磁性緩和促進効果に基づく¹⁹F MRIプローブの原理を用いて、新たにβ-ガラクトシダーゼ活性を検出する¹⁹F MRIプローブを設計し、その遺伝子発現検出を試みた。

さらに、改良型としてクラスA β-ラクタマーゼ活性を検出する¹⁹F MRIプローブ分子を作製した。β-ラクタマーゼがβ-ガラクトシダーゼとは異なり細胞表面に提示可能であることを利用して、生きた細胞における遺伝子発現の¹⁹F MRI検出を試みた。

(2) 蛋白質の新規ラベル化技術開発

細菌酵素β-ラクタマーゼの活性部位のアミノ酸に変異を導入することにより、ペニシリンあるいはセファロsporinなどのβ-ラクタム誘導体は加水分解反応途中で反応が停止し、酵素-基質複合体が安定に形成される。この現象を応用し、β-ラクタマーゼの変異体をタンパク質タグとして利用することで、標的タンパク質に機能性分子を特異的に修飾する新規「タンパク質ラベル化システム」を開発した。ラベルする機能性分子としては、クマリン、フルオレセイン、ローダミンなどの蛍光色素、あるいはビオチンなどの機蛋白質と相互作用するものを選択した。

続いて、SNAP-tagなどの市販されているタンパク質ラベル化システムと同時に用いることができるかを検討した。二種類のタンパク質にそれぞれSNAP-tagおよび変異型β-ラクタマーゼを融合させ、培養細胞中で発現させた。ここに本研究で開発したラベル化プロ

ーブとSNAP-tagプローブを添加しラベル化を行なった。

(3) 蛋白質の時間分解蛍光イメージング

長寿命希土類蛍光を発する蛋白質ラベル化プローブを開発し、蛋白質の時間分解蛍光イメージングに取り組んだ。さらに、蛍光寿命の違いによって蛍光シグナルを分離、異なる擬似カラーで表示する新たなタイプのマルチカラーイメージング方へ応用した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現の¹⁹F MRI検出

開発したβ-ガラクトシダーゼ活性検出プローブはβ-ガラクトシダーゼに高い特異性を示し、類似の加水分解酵素には全く応答しなかった。また、この分子をレポーター蛋白質として用いることで、固定化した細胞内におけるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) の発現を¹⁹F MRIで検出することに成功した。

β-ラクタマーゼ活性検出プローブに関しても、β-ラクタマーゼに高い選択性を有しており、酵素添加によって¹⁹F MRIシグナルの増大が観測された。また、β-ラクタマーゼを上皮成長因子受容体と融合させて、細胞膜表面に提示させた。この融合蛋白質をレポーター蛋白質として用いることで、生細胞内の遺伝子発現の¹⁹F MRI検出に成功した。

(2) 蛋白質の新規ラベル化技術開発

開発した蛍光ラベル化プローブを用いることで、細胞表面あるいは細胞内に発現させた蛋白質タグを選択的に蛍光ラベル化することができた。また、適当な化学修飾を行うことで、細胞内蛋白質の蛍光ラベル化にも成功した。このラベル化技術は、市販のタグ技術と同時に用いることで、異なるタンパク質を異なる蛍光色素で同時にラベル化することが可能であった。

さらに、ビオチンラベル化プローブをアビジン修飾蛍光量子ドットと組み合わせることで、様々な蛍光波長の量子ドットのラベル化に成功した。また、ストレプトアビジン修

飾された超常磁性鉄ナノ粒子 (SPIO) を細胞特異的にラベル化し、タグ蛋白質を発現している細胞のみを¹H MRIの陰性スポットとして検出することに成功した。

蛍光共鳴エネルギー移動の原理を用いることで、タンパク質にラベル化されると瞬時に消光状態から蛍光状態に変化する「発蛍光型ラベル化プローブ」の開発にも成功した。この技術により、細胞膜蛋白質の非洗浄ラベル化を達成した。このプローブを用いることで、上皮成長因子受容体の細胞内から細胞表面への移行をリアルタイムに蛍光発蛍光ラベルすることで可視化することができた。また、会合消光の原理を利用した発蛍光型ラベル化プローブも開発した。

(3) 蛋白質の時間分解蛍光イメージング

発光性のEu³⁺錯体とアンピシリンを結合させた発光性希土類錯体ラベル化プローブを開発した。このプローブを用いて標的蛋白質のラベル化を行い、時間分解蛍光測定を行うことで、自家蛍光に影響されない蛍光イメージングが可能であった。さらに、希土類プローブと低分子蛍光プローブを同時に使用することで、発する蛍光寿命の違いに基づいたマルチカラーイメージングに成功した。

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 21 件)

1. Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Yuri Akimoto, Kazuya Kikuchi “No-Wash Protein Labeling with Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis” *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1623–1629. (査読有り)
2. Satoshi Okada, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Switchable MRI Contrast Agents Based on Morphological Changes of pH-Responsive Polymers” *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 769–774. (査読有り)
3. Kalyan K. Sadhu, Shin Mizukami, Carolyn R. Lanam, and Kazuya Kikuchi “A New Approach for Fluorogenic Protein Labeling via Photoinduced Electron Transfer Based BL-tag Protein Labeling Method” *Chem. Asian J.*, **2012**, *7*, 272–276. (査読有り)
4. 水上進・菊地和也 “生体反応を可視化する¹⁹F MRI プローブ開発” *生物物理*, **2012**, *52*, 24–25. (査読有り)
5. Shin Mizukami “Development of Molecular Imaging Tools to Investigate Protein Functions by Chemical Probe Design” *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1435–1446. (査読有り)
6. Shin Mizukami, Taku Yamamoto, Akimasa Yoshimura, Shuji Watanabe, and Kazuya Kikuchi “Covalent Protein Labeling with a Lanthanide Complex and its Application to Photoluminescence Lifetime-based Multicolor Bioimaging” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8750–8752. (査読有り)
7. Shuji Watanabe, Shin Mizukami, Yuri Akimoto, Yuichiro Hori, and Kazuya Kikuchi “Intracellular Protein Labeling with Prodrug-Like Probes Using a Mutant β -Lactamase Tag” *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8342–8349. (査読有り)
8. Shin Mizukami, Hisashi Matsushita, Rika Takikawa, Fuminori Sugihara, Masahiro Shirakawa, and Kazuya Kikuchi “¹⁹F MRI Detection of β -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression” *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1151–1155. (査読有り)
9. Kalyan K. Sadhu, Shin Mizukami, Shuji Watanabe, and Kazuya Kikuchi “Sequential Ordering among Multicolor Fluorophores for Protein Labeling Facility via Aggregation-Elimination Based β -Lactam Probes” *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 1766–1772. (査読有り)
10. Akimasa Yoshimura, Shin Mizukami, Yuichiro Hori, Shuji Watanabe, and Kazuya Kikuchi “Cell-Surface Protein Labeling with Luminescent Nanoparticles through

- Biotinylation by Using Mutant β -Lactamase-Tag Technology” *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1031–1034. (査読有り)
11. Kalyan K. Sadhu, Shin Mizukami, Yuichiro Hori, and Kazuya Kikuchi “Switching Modulation for Protein Labeling with Activatable Fluorescent Probe” *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1299–1308. (査読有り)
 12. 水上進・渡辺修司・吉村彰真・菊地和也 “ β -ラクタマーゼを用いた蛋白質可視化技術の開発” *JSMI report*, **2011**, *4*, 19–21. (査読有り)
 13. Shuji Watanabe, Shin Mizukami, Yuichiro Hori, and Kazuya Kikuchi “Multicolor Protein Labeling in Living Cells Using Mutant β -lactamase-tag Technology” *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2320–2326. (査読有り)
 14. Kalyan K. Sadhu, Shin Mizukami, Shuji Watanabe, and Kazuya Kikuchi “Turn-on Fluorescent Switch Involving Aggregation and Elimination Processes for β -Lactamase-Tag” *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7403–7405. (査読有り)
 15. Shin Mizukami, Mariko Hosoda, Takafumi Satake, Satoshi Okada, Yuichiro Hori, Toshiaki Furuta, and Kazuya Kikuchi “Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide” *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9524–9525. (査読有り)
 16. Satoshi Okada, Shin Mizukami, and Kazuya Kikuchi “Application of a Stimuli-responsive Polymer to the Development of Novel MRI Probes” *ChemBioChem* **2010**, *11*, 785–787. (査読有り)
 17. 水上進・菊地和也 “化学プローブのデザイン・合成によるタンパク質機能の可視化ツール” *生化学*, **2010**, *82*, 21–29. (査読有り)
 18. Shin Mizukami, Satoshi Okada, Satoshi Kimura, and Kazuya Kikuchi “Design and Synthesis of Coumarin-based Zn^{2+} Probes for Ratiometric Fluorescence Imaging” *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 7630–7638. (査読有り)
 19. Shin Mizukami, Shuji Watanabe, and Kazuya Kikuchi “Development of Ratiometric Fluorescent Probes for Phosphatases by Using a pK_a -Switching Mechanism” *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1465–1468. (査読有り)
 20. Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Yuichiro Hori, and Kazuya Kikuchi “Covalent Protein Labeling Based on Noncatalytic β -Lactamase and a Designed FRET Substrate” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016–5017. (査読有り)
 21. 菊地和也・水上進 “in vivo イメージングを目指した可視化プローブ開発” *ぶんせき*, **2009**, *4*, 200–202. (査読有り)
- [学会発表] (計 22 件)
1. 水上進 「ナノプローブ設計に基づく生体機能解析技術の開発」 日本薬学会第 132 年会, 2012.3.30, 北海道大学 (札幌).
 2. 水上進 「精密プローブ設計に基づくバイオイメージング技術の開発」 理研ものづくりシンポジウム, 2012.3. 8, 理化学研究所 (和光).
 3. 水上進 「ナノとバイオを繋ぐ分子設計」 フロンティア生命化学研究会, 2011.12.3, ラフォーレ南紀白浜 (白浜町).
 4. Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Yuri Akimoto, Kazuya Kikuchi 「Fast Fluorogenic Protein Labeling with Designed FRET Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis」 *Imaging 2020*, 2011.9.18, Jackson Lake Lodge (WY, USA).
 5. 水上進・秋元悠里・菊地 和也 「細胞内蛋白質の蛍光ラベル化法の開発」 バイオ関連化学合同シンポジウム, 2011.9.12, つくば国際会議場 (つくば).

6. Shin Mizukami, Kengo Matsumoto, Kazuya Kikuchi 「Photocontrolled compound release using caged antimicrobial peptide」 Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry, 2011.6.12, Procter Academy (NH, USA).
7. 水上進 「革新的分子イメージングへの応用を目的とした生体機能解析技術の開発」日本薬学会第 131 年会, 2011.3.29, 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡).
8. 水上進, 渡辺修司, 吉村彰真, 山本拓, 秋元悠里, 菊地和也 「機能性分子ラベル化技術を用いた蛋白質・細胞の可視化」日本薬学会第 131 年会, 2011.3.28, 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡).
9. 水上進, 渡辺修司, 秋元悠里, 菊地和也 「変異型 β -ラクタマーゼを用いた細胞内蛋白質ラベル化法の開発」第 1 回 Vivid Workshop, 2011.3.10, アートランドホテル蓼科 (茅野).
10. Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Mariko Hosoda, Kazuya Kikuchi 「Functional Molecule Labeling and Photocontrolled Compound Release Technologies for Bioimaging」JSPS Sweden-Japan Joint Colloquium, 2011.1.18, Lund University (Lund, Sweden).
11. Shin Mizukami, Mariko Hosoda, Kazuya Kikuchi 「UV light-induced Compound Release Using a Caged Antimicrobial Peptide」Pacifichem 2010, 2010.12.15, Hawaii Convention Center (Waikiki, HI).
12. Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Kazuya Kikuchi 「Development of a pH-responsive MRI probe using a functional polymer」2010 World Molecular Imaging Congress, 2010.9.8, 京都国際会館 (京都).
13. Shin Mizukami, Satoshi Okada, Kazuya Kikuchi 「UV light-induced Compound Release Using a Caged Antimicrobial Peptide」第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2010.6.25, 徳島文理大学 (徳島).
14. 水上進, 渡辺修司, 吉村彰真, 松下尚嗣, 菊地和也 「 β -ラクタマーゼを用いた分子イメージング基盤技術の開発」第 5 回日本分子イメージング学会学術集会, 2010.5.22, ピアザ淡海 (大津).
15. 水上進, 渡辺修司, 菊地和也 「変異 β -ラクタマーゼを用いた新規蛋白質ラベル化法の開発」日本ケミカルバイオロジー学会第五回年会, 2010.5.18, 慶應義塾大学日吉キャンパス (横浜).
16. 水上進・細田真梨子・菊地和也 「光感受性抗菌ペプチドを用いた薬物放出システムの開発」日本薬学会第 130 年会, 2010.3.28, 岡山コンベンションセンター (岡山).
17. 水上進・渡辺修司・山本拓・吉村彰真・菊地和也 「多機能性タンパク質ラベル化技術の開発とイメージングへの応用」日本薬学会第 130 年会, 2010.3.28, 岡山コンベンションセンター (岡山).
18. 水上進 「希土類金属錯体を用いた in vivo イメージング用プローブの開発」第 47 回日本生物物理学会年会, 2009.10.30, アステイ徳島 (徳島).
19. Shin Mizukami, Hisashi Matsushita, Kazuya Kikuchi 「Development of MRI Probes for Detecting Biological Signals」Gordon Research Conference - Bioorganic Chemistry, 2009.6.14, Procter Academy, Andover, NH, USA.
20. 水上進 「化学原理に基づくバイオイメージングツール開発」第 2 回稲盛フロンティア研究講演会, 2009.5.19, 九州大学伊都キャンパス (福岡).
21. 水上進・佐竹孝文・菊地和也 「光応答性薬物放出システムの開発」日本薬学会第 130 年会, 2009.5.18, 神戸市産業振興センター (神戸).
22. 水上進・松下尚嗣・滝川利佳・菊地和也 「レポーター酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブ」日本ケミカルバイオロジー学会学術集会, 2010.5.22, ピアザ淡海 (大津).

一学会第4回年会, 2009.5.14, 学術総合センター (東京都千代田区).

[図書] (計3件)

23. 水上進・菊地和也 「機能性分子設計に基づく蛋白質の蛍光ラベル化」 蛍光イメージング/MRIプローブの開発 (シーエムシー出版, 2011年) 第9章, pp. 79-88.
24. 水上進・菊地和也 「酵素活性を検出する¹⁹F MRIプローブの開発」 蛍光イメージング/MRIプローブの開発 (シーエムシー出版, 2011年) 第11章, pp. 97-103.
25. 水上進・松下尚嗣・菊地和也 「金属イオンプローブを用いた生体機能イメージング」 化学フロンティア—生命現象を理解する分子ツール (化学同人, 2010年), pp.15-24.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. 名称: タンパク質を蛍光標識する方法

発明者: Kazuya Kikuchi, Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Yuri Akimoto

権利者: Osaka University

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/052227

出願年月日: 2012年2月1日

国内外の別: 国外

2. 名称: タンパク質を蛍光標識する方法

発明者: 水上進、渡辺修司、秋元悠里、菊地和也

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-20804

出願年月日: 2011年2月2日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI SHIN)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 30420433