

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20539

研究課題名(和文) 生物発光プローブの開発とin vivoイメージングへの応用

研究課題名(英文) Development and application of bioluminescent probes to in vivo imaging

研究代表者

木山 正啓 (Kiyama, Masahiro)

宮崎大学・研究・産学地域連携推進機構・研究員

研究者番号：10968514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外生物発光システムAkaBLIの発光基質AkaLumineにSARS-CoV-2メインプロテアーゼ(3CL)認識ペプチドを修飾した、3CL Turn-on AkaLumineプローブを合成した。3CLプロテアーゼ存在下では非存在下と比較して20倍程度発光強度が向上した。AkaLuc発現マウスに3CL非存在下当該プローブを投与するとAkaLumine投与と比較し20%程度発光した。3CL非存在下での発光は望ましくないが、血液中のセリンプロテアーゼによりプローブが加水分解を受けAkaLumineが遊離したものと推測された。現在はプローブ加水分解の回避方法の検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AkaBLIはAkalucの局在、増殖過程、遺伝子発現動態を観察できる。さらに複雑な生命現象を観察するため、特定の生体分子に呼応して発光活性を変化させるプローブの開発が必要である。今回の研究では、AkaLumineに生体分子に呼応するペプチドを新しい修飾法で修飾したプローブを合成することができた。AkaLumine以外にも発光波長の異なる人工発光基質に適応可能であり、多色で観察できる技術となり得る。一方、ペプチドのアミド結合様の易生分解性構造を有していると、in vivoでは容易に分解されうするため、その回避方法の検討が必要であることも判明した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a 3CL turn-on AkaLumine probe designed for detecting the SARS-CoV-2 main protease (3CL). This probe consists of a 3CL recognition peptide conjugated with AkaLumine, a luminescent substrate in the near-infrared bioluminescence system AkaBLI. In vitro analysis demonstrated a 20-fold increase in luminescence intensity when exposed to 3CL protease, confirming its high specificity and sensitivity. However, in vivo administration of the probe to AkaLuc-expressing mice in the absence of 3CL protease resulted in an unexpected 20% increase in luminescence compared to control conditions with AkaLumine alone. This unintended luminescence is hypothesized to result from the hydrolysis of the probe by serine proteases in the blood, leading to the premature release of AkaLumine. Our current research is focused on enhancing the stability of the probe to prevent its hydrolysis by serine proteases in vivo.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生物発光 プローブ イメージング 近赤外発光 プロテアーゼ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホタルの発光は生物発光と呼ばれ、発光基質ルシフェリンと酵素ルシフェラーゼによる酵素反応によって生じる。この発光反応は、動物の非侵襲イメージング、レポーターアッセイなど、生命科学研究に使用されている。励起光を必要とする蛍光イメージングでは観察困難な動物個体や特にその深部において、ルシフェラーゼ発現細胞の非侵襲イメージングが可能である。

我々の研究グループでは生体透過性の高い近赤外光を発する人工基質「AkaLumine」およびその基質に最適化した人工酵素「Akaluc」を開発した。AkaLumine と Akaluc からなる人工生物発光反応 AkaBLI は肺や脳などの深部組織の非侵襲イメージングにおいて従来技術の 100-1000 倍検出できることを報告している。

AkaBLI は Akaluc の発現量を指標に、動物個体内にある数個の細胞の局在やその増殖の過程、遺伝子発現動態を超高感度にモニタできる技術である。しかし、複雑な生命現象を読み解くには、特定の分子の存在量に応じて発光活性(強度/波長)を変調させるプローブの開発が必要である。ホタル生物発光においては、これまでにいくつかプローブ技術は開発されているが、動物個体深部で起こる少数細胞の振る舞いを満足に可視化する技術は存在しない。

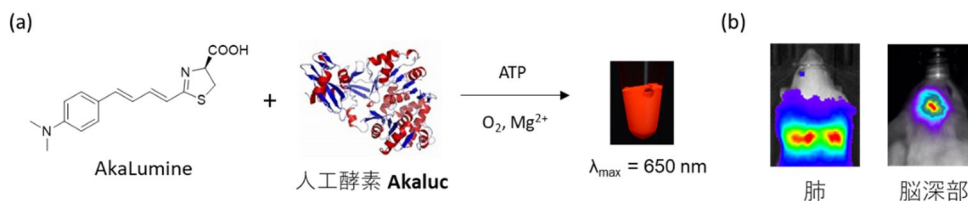


図1 (a) AkaBLI (AkaLumine + Akaluc)反応様式、(b) AkaBLIを用いたイメージング

2. 研究の目的

本研究では、AkaBLIの人工基質AkaLumineの発光活性を分子修飾によりマスクし、プロテアーゼなどの特定分子の存在下で保護基が切断され、発光活性を回復するターンオン型の機能プローブ技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

前段目的を達成するため、概念実証として、SARS-COV2 メインプロテアーゼである 3CL プロテアーゼにより切断されるペプチドを導入した 3CL Turn-On AkaLumine プローブ 1 および 2 (以下 AkaLumine プローブ 1, および 2) を合成することとした。またそれらの AkaLumine プローブ 1 および 2 が 3CL プロテアーゼにより切断され発光能を示すか、また動物個体に投与した場合発光能を有するかを確認した。

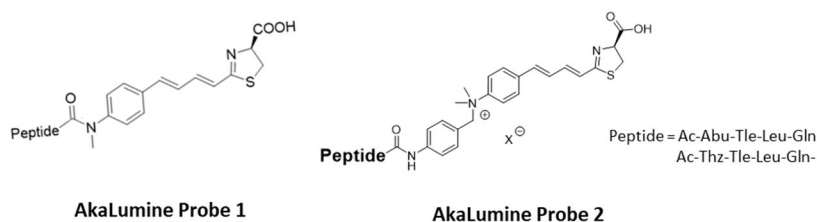


図2 3CL Turn-On AkaLumine プローブ

4. 研究成果

(1) AkaLumine プローブ 1 の合成および発光評価

AkaLumine プローブ 1 は、AkaLumine 類縁体である AkaLumine モノメチル体のジメチルアミノ基に 3CL プロテアーゼ認識ペプチドを縮合した構造をしている (図 3a)。まずモノメチル体の合成を行った (図 3b)。プローブ 1 が機能するためには、Akaluc 存在下 AkaLumine モノメチル体が AkaLumine と同等の発光強度を示す必要がある。発光測定を行ったところ、AkaLumine と比較してモノメチル体は 4%程度の発光強度であった (図 3c)。AkaLumine の化合構造を少し変化させるだけで、大幅に発光活性が低下することが判明した。プローブを合成し 3CL プロテアーゼによりモノメチル体が遊離してもその発光活性は低いため、AkaLumine プローブ 1 の開発は断念した。

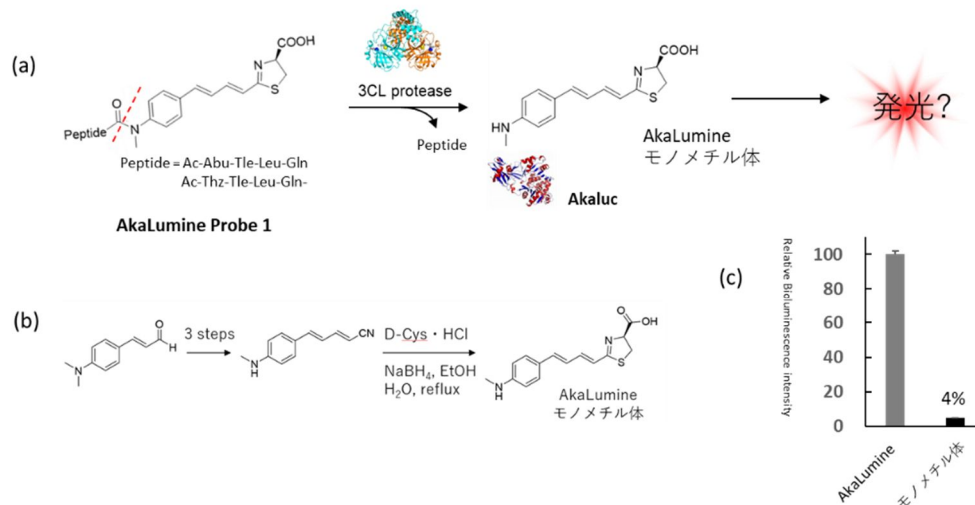


図3 (a) AkaLumineプローブ1と3CLプロテアーゼとの反応様式, (b) AkaLumineモノメチル体の合成, (c) AkaLumineモノメチル体の発光測定

(2) AkaLumine プローブ 2 の合成および発光評価

AkaLumine プローブ 2 は AkaLumine のジメチルアミノ基に自己犠牲リンカーを介して 3CL プロテアーゼ認識ペプチドを修飾した構造をしている (図 4a)。当該ペプチドが 3CL プロテアーゼにより切断を受けると AkaLumine が遊離するため発光強度が低下する心配はない。AkaLumine プローブ 2 はペプチドが修飾された臭化ベンジルと AkaLumine エステルを縮合および脱保護することにより合成した (図 4b)。

得られた AkaLumine プローブ 2 を *in vitro* で 3CL プロテアーゼ存在下、Akaluc と酵素反応させたところ、3CL プロテアーゼ非存在下と比較し 20 倍発光強度が向上した (図 4c)。続いて 3CL 非発現 Akaluc 全身発現マウスへ AkaLumine プローブ 2 を IP 投与したところ、AkaLumine を IP 投与した場合と比較して 20%程度の発光強度を示した (図 4d)。3CL 非発現マウスでは発光が確認されないことが望ましいが、プローブ投与直後から発光を示した。血液によりペプチドが加水分解されたものと考え、*in vitro* でマウスの血液存在下 AkaLumine プローブ 2 と反応させたところ、血液非存在下と比較して 20 倍程度発光強度が増加した (図 4e)。血液中のプロテアーゼ等により AkaLumine プローブ 2 が加水分解され AkaLumine が遊離し発光したものと考えられる。AkaLumine プローブ 2 と同じペプチドを有するクマリンプローブとマウス血液を作用させるとアミノクマリン由来の蛍光が確認されることから、当該ペプチド以外の構造によらず当該ペプチドを加水分解するプロテアーゼであることが判明した (図 4f)。また、いくつかのプロテアーゼ阻害剤を添加したところセリンプロテアーゼ阻害剤 AIBSF 添加時に加水分解が阻害されたことから、血中のプロテアーゼはセリンプロテアーゼであることが示唆された。

現在、当該プロテアーゼの同定および回避策の検討を行っている。また *in vitro* においては AkaLumine プローブ 2 が 3CL プロテアーゼ活性を示すことから、*in vitro* での使用を前提に他のプロテアーゼについても検討を進めている。

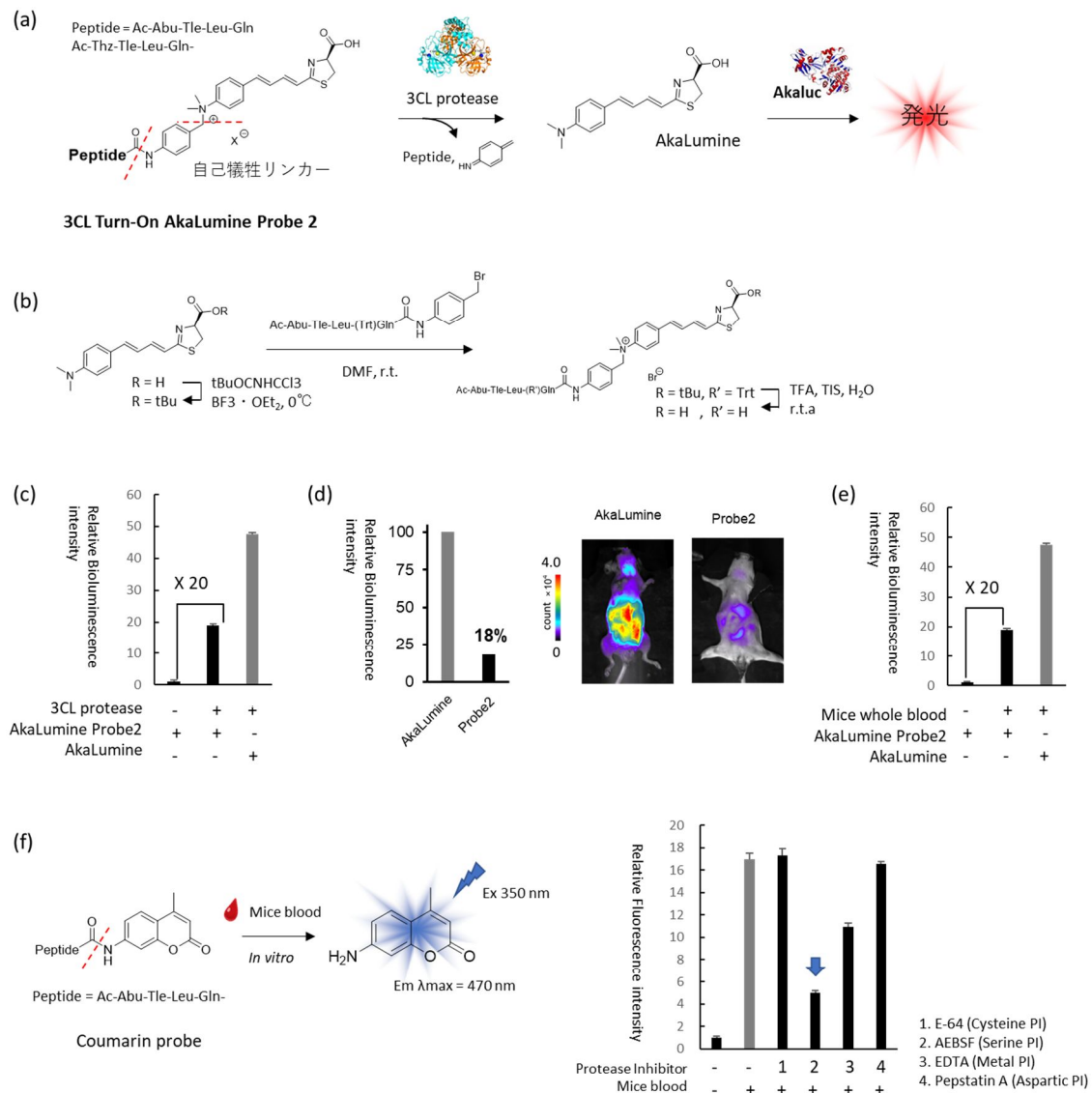


図4 (a) 3CL Turn-ON AkaLumineプローブ2の構造と3CLプロテアーゼとの反応様式, (b) AkaLumine プローブ2の合成, (c) *in vitro*での3CL存在/非存在下におけるAkaLumineプローブ2とAkaLumcの発光反応, (d) AkaLumc全身発現マウスへのAkaLumineプローブ2の投与, (e) *in vitro*でのマウス血液存在下/非存在下におけるAkaLumineプローブ2とAkaLumcの発光反応, (f) AkaLumineプローブ2と同じペプチドを有するクマリンProbeのマウス血液存在下/非存在下および各種プロテアーゼ阻害剤添加時の蛍光性。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木山 正啓
2. 発表標題 特定のプロテアーゼで活性化される生物発光反応の開発は存外前途多難
3. 学会等名 第55回若手ペプチド夏の勉強会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------