

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620135

研究課題名(和文) 生体内レドックス解析に向けた革新的超偏極プローブ分子の創製

研究課題名(英文) Development of hyperpolarized molecular probes toward in vivo redox analysis

## 研究代表者

野中 洋 (Nonaka, Hiroshi)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80579269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体において酸化還元(レドックス)バランスは、エネルギー産生、情報伝達、生活習慣病、癌、老化などに関わっており非常に重要である。本研究では、生体におけるレドックス解析を目指し、生体深部での優れた解析能をもつ核磁気共鳴法と、その感度を劇的に向上させる核偏極技術を用いる核偏極分子プローブの開発を行った。核偏極技術を用いる上で一般的に問題となっていた、高感度化維持時間の短さの問題を多様な分子構造を検討する事で、打開できる可能性を見いだした。また、核磁気共鳴分子プローブが対象をセンシングする上で重要な、センシングに伴う化学シフト変化を誘起するメカニズムに関しても候補を見つける事が出来た。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have attempted to develop new hyperpolarized chemical probes toward the redox analysis in vivo. To this end, we have utilized the magnetic resonance analysis and the hyperpolarization technique. The hyperpolarization is a highly potential method to enhance magnetic resonance signals dramatically. However, the hyperpolarization method has a shortcoming, which is the short lifetime of the polarized spin state in solution. To resolve this problem, first we have explored the structure having long hyperpolarization lifetime. We have successfully explored the potent structures. Then we have found the mechanisms to induce the large chemical shift change for sensing of redox balance. We expect these findings would be valuable to develop redox-responsible hyperpolarized sensors.

研究分野：化学生物学

キーワード：核磁気共鳴 核偏極 酸化還元 分子プローブ

### 1. 研究開始当初の背景

生体・個体では種々の酸化還元（レドックス）制御に基づく化学反応が複合的に引き起こされ、高次生命機能を発現している。例えば、生体におけるエネルギー産生、情報伝達、生活習慣病、癌、老化にはレドックス反応が関与しているものも多く、生体内の酸化還元状態や関連分子種を解析することができれば、生体レドックスが関与する生体機能の解明へと繋がるのが期待できる。これらの知見は、疾病の原因解明や創薬に有用なものとなる。このような背景から、これまで蛍光プローブ分子を用いた細胞での酸化還元種解析が行われ、優れた成果を上げてきた。しかし、より高次の機能体である個体に対しては、光を用いる解析法では生体透過性が悪く解析が困難であるという問題点も抱えている。こうした生体・個体レベルでのレドックス解析を考慮に入れた場合、生体深部での優れた解析能をもつ核磁気共鳴法(NMR/MRI)が優れている。しかし、核磁気共鳴技術の本質的な問題点である「極端な感度の低さ」が原因となり、核磁気共鳴プローブ分子を用いる個体での実応用は未だ難しい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体における酸化還元（レドックス）制御を分子レベルで明らかにするために、生体深部における酸化還元状態をセンシング可能な核磁気共鳴プローブ分子を開発することである。生体内における酸化還元反応は、発生、分化、健康、疾病、老化などに重要な役割を果たしている。この生体における酸化還元状態を分子レベルで解析することができれば、未知の部分が多い生物個体での酸化還元が関与する疾患・生理機能の解明へと繋がるのが期待できる。本研究では、生体深部におけるレドックス解析を可能にする革新的核磁気共鳴プローブ分子の開発を目指している。

### 3. 研究の方法

個体応用可能なレドックス解析プローブ分子の実現に向け、核超偏極技術（動的核偏極技術）を利用した核磁気共鳴分子プローブの開発を行なうこととした。具体的には、2つの方向性で研究を行なう事とした。1つ目は、核偏極を用いる核磁気共鳴分子プローブを開発する上で重要な『偏極状態の寿命』が長い構造の探索である。この寿命は、一般的に核磁気共鳴の観測核の縦緩和時間  $T_1$  に相関している事が知られている。分子の  $T_1$  を測定する事でどういった構造が偏極状態の寿命が長いと推定する事が可能である。この知見は、実際の酸化還元応答のプローブ分子設計に生かす事が出来る。2つ目は、環境や対象分子種のセンシングに伴い『大きな化学シフト変化』を引き起こす事が可能な分子構造と観測核の組み合わせの探索である。化学シフト変化が大きければ大きいほど、その差の

検出が容易になる事や、センシングの精度があがる事になる。また、生体等の環境下では、磁場環境を常に一定に保つ事は難しく、NMRスペクトルのピークのブロード化の要因となる。そのため、化学シフトの変化幅が大きい事は実用上重要な要素である。最終的には、この二つの要素を集約し同時に達成可能な分子プローブを目指すことにした。

### 4. 研究成果

レドックス解析可能な核磁気共鳴プローブ分子の開発に向けて、核磁気共鳴の感度を劇的に向上可能な核超偏極技術（図1）を用いるプローブ分子の開発を目指した。核を偏極する手法は動的核偏極法、パラ水素誘起偏極法、光ポンピング法など複数存在しているが、分子構造に対する制約が他の偏極法と比べて少なく、生物個体への応用例も豊富な動的核偏極技術（J. H. Ardenkjær-Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **100**, 10158 (2003)) を用いる事にした。

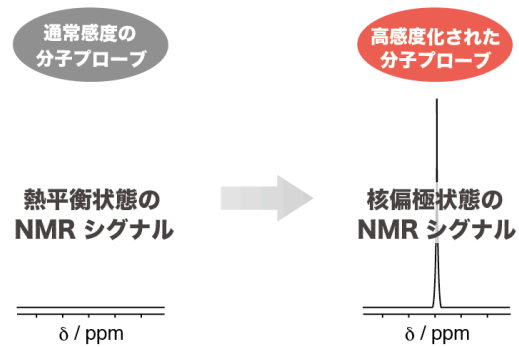


図1、核偏極による核磁気共鳴シグナルの高感度化の概念図。分子プローブに含まれる核磁気共鳴活性な核を高感度化できる。通常では、一回の積算では検出できないような  $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$  といった核のシグナルを、一回の積算で明確に検出する事が可能となる。

一般に核偏極によって得られる高感度化した状態（超偏極状態）は短時間であり、生体解析へ適用された例はピルビン酸などの限られた分子に限定されていた（K. Golman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **103**, 11270 (2006)）。その理由は、超偏極状態は偏極核の緩和されやすさに依存しており、分子構造の影響を強く受ける。そのため、分子構造によって、適用可能なものとそうでないものが存在するからである。そこで、高感度化した時間（核偏極寿命）を長くすることができる構造の探索を行なった。比較的高感度化維持時間の長い  $^{15}\text{N}$  核に着目し、種々の安定同位体化合物を合成後、高感度化時間と相関があるとされる核磁気共鳴のパラメーターの1つである縦緩和時間  $T_1$  を計測した。 $T_1$  データの構造相関や偏極緩和に関する理論と照らし合わせることで、より高感度化維持時間が長く、かつ、導入可能な超偏極核の知見が得られた。

得られた候補構造をもとに、実際に核偏極実験を行なった。極低温下、サンプルと共に溶解させたラジカルの電子スピン共鳴の周波数に該当する電磁波を照射した。その結果、分子プローブの核偏極が可能である事、核偏極状態の長時間の維持 ( $^{15}\text{N}$  トリメチルアミン N オキシドの場合、1,000 秒以上 NMR シグナルを観測) が可能である事が確認できた。

平行して、酸化還元に関与する分子種と反応し、核磁気共鳴シグナルを変化させるプローブ分子の分子設計・合成・評価を行なった。いくつかのプローブ候補分子と反応後の生成物とで化学シフト変化を比較したところ、十分な化学シフト変化が確認された。これより、プローブ分子の酸化還元反応を核磁気共鳴により解析できることが示唆された。例として、アミン化合物をオキシド酸化体とした N オキシド化合物を示す (図 2)。N オキシド化合物は還元状態の場合と比較して極めて大きい化学シフト変化を誘起する事を見いだした。このことは、アミン化合物が N オキシド状態では窒素原子上の電子が強く吸引された状態となっている事に起因すると考えている。分子の水溶性も、核偏極分子プローブ開発において重要な要素であるが、N オキシド化合物は高い水溶性を示した。



図 2、3 級アミン化合物とその酸化体であるオキシド化合物。分子の電子状態が大きく変わるため、大きな化学シフト変化を誘起可能。

また別のアプローチとして、長い偏極寿命を持つ核と、対象をセンシングする核を分ける事で大きな化学シフト変化で酸化還元状態をセンシング可能な分子プローブの設計にも取り組んだ (図 3)。NMR の検出核と偏極を維持する核を分けた設計を考慮する事で、核の性質に応じて使い分ける事が可能になると考えられる。

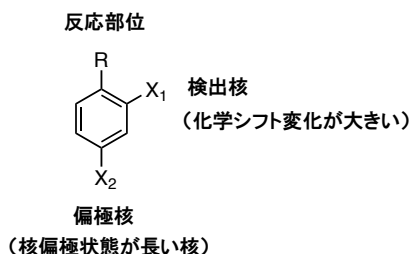


図 3、長い偏極寿命を持つ核と、対象をセンシングする核を分ける分子プローブの概念図。反応部位 (R) で酸化還元状態を検出し、検出核 ( $X_1$ ) で化学シフト変化をセンシングする。この際、検出核 ( $X_1$ ) は大きな化学シフト変化を誘起しやすい核が望ましい。長い偏極寿命を持つ偏極核 ( $X_2$ ) を導入しておき、 $X_1$  検出時に偏極移動を行なう設計。

$^{19}\text{F}$  核は、センシングする核自体の感度が相対的に良く (磁気回転比が  $^1\text{H}$  の 0.83 倍)、生体成分由来のバックグラウンドシグナルがほとんどない事から生体解析に有望な核である。しかし、 $^{19}\text{F}$  核をもってしても、生体の中でシグナルを検出する事は、NMR (核磁気共鳴分光法) /MRI (核磁気共鳴イメージング) 自体の感度の問題から、現実的な選択肢になり得ていない。そこで、 $^{19}\text{F}$  核の感度を核偏極により高感度化することが考えられたが、 $^{19}\text{F}$  核は核偏極状態の寿命が短く、直接  $^{19}\text{F}$  核を偏極させる事は、分子プローブとしては難しかった。そこで、検出核として  $^{19}\text{F}$  核を用いるが、核偏極する核は核偏極状態の寿命が長い別の核 ( $^{15}\text{N}$  核等) を用いることを考えた。こうした設計指針を考慮して、 $^{19}\text{F}$  核で大きく化学シフト変化が誘起される酸化還元分子プローブの探索を行なった。その結果、ボロン酸や N オキシドを含む  $^{19}\text{F}$  化合物で、反応に伴い大きく化学シフト変化を誘起させる化合物が見つかった。そのうちの 1 つは、 $^{19}\text{F}$  核を有するフェニルボロン酸化合物で、過酸化水素と反応し  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルが 30 ppm 以上という大きな化学シフト変化を示した。NMR スペクトルだけではなく、化学シフト選択的イメージングを行なう事により、分子プローブと反応物の選択的イメージングも可能であった (図 4)。我々の知る限り、本成果は過酸化水素を対象とした  $^{19}\text{F}$  核磁気共鳴イメージングの世界で最初の報告例である。

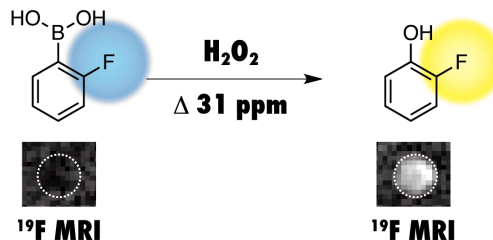


図 4、過酸化水素に対する  $^{19}\text{F}$  NMR 分子プローブ。過酸化水素とフェニルボロン酸との反応により、フェニルボロン酸がフェノールになり  $^{19}\text{F}$  化学シフトが大きくシフトする。生成物の化学シフト選択的  $^{19}\text{F}$  MRI によってイメージングが可能。

過酸化水素は、生体での代謝反応によって生成する活性酸素種であり、生体の酸化還元バランスにおいて重要な標的である。発見した  $^{19}\text{F}$  NMR 分子プローブは、外部から加えた過酸化水素だけでなく、酵素反応によって生成する過酸化水素の検出が可能であることも確認できた (図 5)。具体的には、グルコースオキシダーゼとグルコース、コリンオキシダーゼとコリンのそれぞれの酵素反応によって生成される過酸化水素の  $^{19}\text{F}$  MRI (生成物の化学シフト選択的イメージング) による検出に成功した。この結果は、生体で産生される過酸化水素の検出への可能性を示唆する結果である。

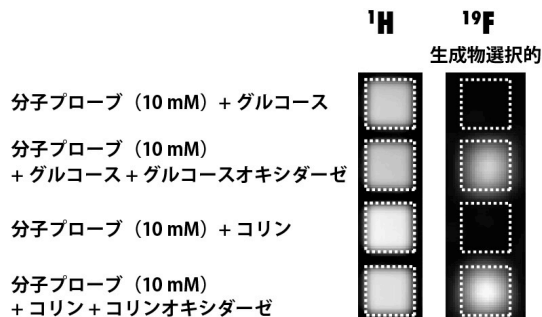
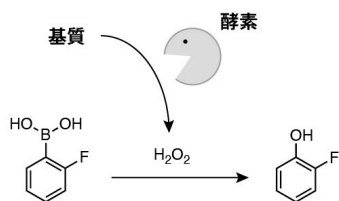


図5、上段：酵素反応により生成した過酸化水素を<sup>19</sup>F NMR分子プローブによって検出する概念図。

下段：基質・酵素の組み合わせとして、グルコース・グルコースオキシダーゼを用いた場合、コリン・コリンオキシダーゼを用いた場合で発生した過酸化水素の<sup>19</sup>F MRIによる検出。

<sup>19</sup>F核自体は、緩和時間が短いためそのまま核偏極分子プローブとして用いる事は難しいと考えているが、偏極を別の核に保持しておき、核磁気共鳴シグナルを検出する際に<sup>19</sup>F核に偏極移動を行えば、<sup>19</sup>F核の化学シフト変化を生かしたプローブデザインになりうると考えている。

以上の結果から、生体における酸化還元状態を解析する核偏極分子プローブの設計において有用な知見を得る事が出来た。

## 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1件)

Hiroshi NONAKA, Qi AN, Fuminori SUGIHARA, Tomohiro DOURA, Akira TSUCHIYA, Yoshichika YOSHIOKA, Shinsuke SANDO

“Phenylboronic Acid-based <sup>19</sup>F MRI Probe for the Detection and Imaging of Hydrogen Peroxide Utilizing Its Large Chemical-Shift Change”

*Anal. Sci.* **2015**, *31*, 331-335.

DOI: 10.2116/analsci.31.331

[学会発表] (計3件)

- (1) 野中洋、秦龍ノ介、西原達哉、山東信介  
“生体解析を指向した超高感度核磁気共鳴プローブ分子の合成とイメージング”  
第39回反応と合成の進歩シンポジウム、  
2013, 11, 5-6  
(福岡県、福岡市東区、九州大学)

- (2) 野中洋、平野雅士、秦龍之介、西原達哉、山東信介  
“長寿命偏極を可能にする超偏極核磁気共鳴分子プローブの開発”  
日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014, 6, 11-13  
(大阪府、豊中市、大阪大学)

- (3) 野中洋、西原達哉、秦龍之介、山東信介  
“疾患イメージングに向けた高感度核磁気共鳴プローブ分子の設計”  
第84回日本生化学会  
2014, 10, 15-18  
(京都府、京都市左京区、京都国際会館)  
招待講演

[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

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sandolab/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 洋 (NONAKA HIROSHI)

東京大学・工学系研究科・講師

研究者番号：80579269

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし