

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13737

研究課題名(和文)メソ空間を検出に用いる超高感度核磁気共鳴センシングシステムの開発

研究課題名(英文)Development of a highly sensitive detection method using hyperpolarized nuclear magnetic resonance and meso-spaces

研究代表者

野中 洋(Nonaka, Hiroshi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・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)：本研究では、核偏極された環境感受性分子を内包できるメソ空間を利用した新しい超偏極センシングシステムの開発を目指した。メソ空間は、環境応答性蛍光色素を利用する蛍光検出システムにおいて広く使用されている。そのようなシステムを実現するために、我々はメソ空間に内包する候補となる環境応答性の超偏極分子の探索を試みた。その結果、<sup>15</sup>Nグリシン由来の有望なシグナル分子を見出した。この分子はpH変化に伴い、<sup>15</sup>N化学シフト変化を示した。さらに、超偏極寿命と相関する重要なパラメータである十分なT1値を有していた。この知見が新しい超偏極センシングシステムを開発する上で有益であると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have attempted to develop a new hyperpolarized sensing system utilizing a gated meso-space that can be loaded with a lot of hyperpolarized environmental-sensitive molecules. Meso-space is widely used in various fluorescence sensing systems utilizing environmental-sensitive fluorophores. To realize such sensing system, we have tried to explore environmental-sensitive hyperpolarized molecules for incorporating into a gated meso-space. We have found a promising signal molecule derived from [<sup>15</sup>N]glycine. It showed pH-dependent chemical shift change of its <sup>15</sup>N nuclei. Moreover, it had a sufficient T1 value that was important parameter correlated with hyperpolarized lifetime. We expect that this finding would be valuable to develop a new sensing system in the field of hyperpolarized research.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：核磁気共鳴 核偏極 分子プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

生体は化学分子の集合体でできており、それら生体分子の分子認識や化学反応の結果、生体制御が実現している。そのため生体内の重要分子種(核酸、タンパク質、有機小分子、金属イオンなど)を解析することができれば、生体機能の解明、疾病の診断等へと繋がるのが期待できる。こうした背景から、これまで蛍光プローブ分子を用いた細胞での分子解析が行われ、優れた成果を上げてきた(総説の一例として: T. Nagano *et al.*, *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.*, **465**, 347(2013)。)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った。こうした個体における分子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)は有望なモダリティである。しかし、核磁気共鳴技術は感度が悪いという欠点があり、核磁気共鳴プローブ分子を用いる個体での生体分子解析は十分に実現されておらず、未だチャレンジングなものとなっている。

我々も、これまでに生体分子の挙動や活性を検出する分子プローブの開発に携わってきた。(例えば、蛍光分子プローブ: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 5518 (2006), *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12095 (2008), *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9561 (2012)、核磁気共鳴分子プローブ: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14208 (2011); *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 10114 (2012); *Nat. Commun.*, **4**:2411 doi: 10.1038/ncomms3411 (2013); *Anal. Sci.*, **31**, 331 (2015) など。)

生体分子を解析する研究を進めるにつれて、より高次の機能体である生物個体での生体関連分子の解析には、シグナルの生体透過性の観点から核磁気共鳴技術が望ましいと考えてきた。一方で、前述のように核磁気共鳴は感度が悪いため、その感度の問題を克服する必要があった。そういった背景から、我々は核磁気共鳴の感度を劇的に向上可能な核偏極技術(核偏極法の総説の一例として: S. Cavagnero *et al.*, *J. Magn. Reson.*, **241**, 18 (2014)。)に着目してきた。

一般に、磁場中におかれた核スピンは、2つのエネルギー準位をとり、その2つのエネルギー準位のスピンの差を利用して核磁気共鳴ではシグナルを得ている。通常の熱平衡状態ではその2つの準位の核スピン占有数差は極めて小さいものとなっており、核磁気共鳴法の感度が悪い要因となっている。核偏極では、この核スピンの占有数の差を、大きく偏らせた状態(超偏極状態)にすることで、NMR感度の増強を実現する画期的な技術である(Figure 1)。こうした核偏極技術としては、動的核偏極法(DNP: Dynamic Nuclear Polarization)、パラ水素誘起偏極法(PHIP: Para-Hydrogen Induced Polarization)、などがあり、生体内での分子解析に有望であると注目を集めている。

その一方で、高感度な超偏極状態は、核の

縦緩和時間( $T_1$ )に相關しており、一般に非常に短く、核偏極による生体分子解析へ向けた障害となってしまう。そのため、核偏極状態の寿命が長い分子プローブ・センシングシステムの開発が望まれている。

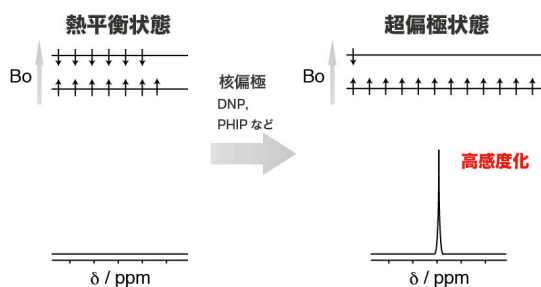


Figure 1. 核偏極法による核スピンの占有数の差の増大(図上部)と、それに伴う NMR ピークの増大(図下部)の模式図。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生物個体における生体分子の機能・活性を分子レベルで明らかにするために、生体における化学反応を解析可能な高感度核磁気共鳴検出システムを開発することである。本研究では、生体深部での解析に優れた核磁気共鳴技術と、その感度を数万倍向上可能な核偏極技術、さらに微小空間を利用した汎用的な分子センシングプラットフォームを用いる事で、生物個体での応用を指向した高感度化核磁気共鳴技術による生体分子解析法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、個体応用可能な生体分子検出システムの実現に向け、生体深部での解析に優れた核磁気共鳴技術と、その感度を数万倍向上可能な核偏極技術、さらに環境の変化(環境の出入りなど)をセンシングメカニズムとした汎用的な分子センシングプラットフォームを用いる核磁気共鳴検出システムの開発を目指した(Figure 2)。

具体的には、①環境応答性の核偏極シグナル分子を探索する。これをメソ空間などの孤立環境の中に内包させ、標的生体分子との反応・認識によって細孔外部に事前に修飾した立体障害(ペプチド基質、タンパク質など)が外れ、②内包したシグナル分子が外部環境に放出・応答するシステムを目指した。

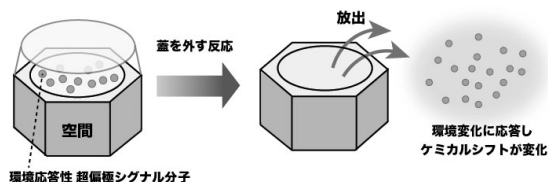


Figure 2. 目指すべきセンシングシステムの概念図。環境応答性の超偏極シグナル分子を孤立環境に閉じ込め、外部と異なる環境におき、外部刺激に反応して超偏極シグナル分子がとびでることで、化学シフト変化を引き起こす。閉じ込める分子の分子量増大を避けられるため、 $T_1$ を長い状態で使用できる。

本研究の最も重要な部分の1つが、外部環境応答性の核偏極シグナル分子の探索である。環境応答型の核偏極シグナル分子に求められる条件としては、下記(i)-(iii)があげられる。

- (i) なんらかの核偏極手法によって核磁気共鳴シグナルが高感度化される必要が有る。
- (ii) また、そのシグナルが、pH や極性などの環境の変化を読み取り、化学シフトの移動や、緩和時間の変化など、核磁気共鳴シグナルに変化を与える必要が有る。
- (iii) さらに、その分子の観測核は十分な縦緩和時間を持つ必要が有る。

そこで、我々は(i)の核偏極手法としては、特別な官能基修飾がいらず、そのものを偏極できる溶解 DNP 法 (J. H. Ardenkjær-Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 10158 (2003).) を当面の候補として研究を進めた。残された(ii)と(iii)の条件(環境の変化によって大きな化学シフト変化を生み出し、十分な  $T_1$  を持つ)を満たす構造の探索を行うことにした。

#### 4. 研究成果

一般に、縦緩和時間  $T_1$  は観測核の核磁気回転比の大きさに反比例するため、観測核としてよく用いられる  $^{13}\text{C}$  核に比べて核磁気回転比の小さい  $^{15}\text{N}$  核を観測核として用いることにした。ここでは、探索の結果得られたシグナル分子 ( $^{15}\text{N}, \text{D}_8$ ]N-アセチル-N-メチルグリシン) に関して述べる。

##### ○大きな化学シフト変化を生む分子構造

$^{15}\text{N}$  核の大きな化学シフト変化を実現するために、既報のグリシルグリシンのアミド  $^{15}\text{N}$  が末端カルボン酸のプロトンの脱着により大きな化学シフト変化を生むことに注目した(A. Lapidot *et al.*, *Chem. Commun.*, **12**, 43-44 (1976).; Figure 3)。本研究では、この化学シフト変化をとりいれるため、 $^{15}\text{N}$  グリシンの N-アミド構造を用いることにした。

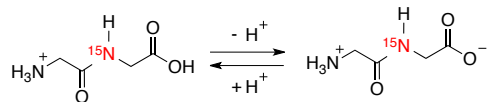


Figure 3. グリシルグリシンの末端カルボン酸のプロトン脱着

##### ○長い縦緩和時間 $T_1$ を持つ分子構造

超偏極状態の維持能に相関する  $T_1$  は下記の式で緩和に及ぼす各項を表すことができる(G. C. Levy, *Acc. Chem. Res.*, **6**, 161(1973).)。ここで、DD: 双極子-双極子相互作用、CSA: 磁気異方性による相互作用、SR: スピン-回転相互作用、SC: スカラー相互作用、Para: 常磁性体との相互作用である。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^{DD}} + \frac{1}{T_1^{CSA}} + \frac{1}{T_1^{SR}} + \frac{1}{T_1^{SC}} + \frac{1}{T_1^{Para}}$$

縦緩和を促す大きな要因が双極子-双極子 (DD) 相互作用であるため、観測核とその近傍にある水素核との DD 相互作用を断つことが長い  $T_1$  を実現するために重要である。そこで、 $^{15}\text{N}$  グリシンの N-アミド構造から近傍の水素原子を除くことを目指した。まず、 $^{15}\text{N}$  核に直接結合する水素原子をメチル基に置換し、かつ、 $^{15}\text{N}$  核へのプロトン化を防ぐために電子求引基のアセチル基を導入した N-アセチル-N-メチルグリシンを設計した。さらに、DD 相互作用の影響を減らすため、グリシンのカルボン酸末端の水素原子を除く全ての水素原子を重水素置換した [ $^{15}\text{N}, \text{D}_8$ ]N-アセチル-N-メチルグリシンを設計した (Figure 4)。

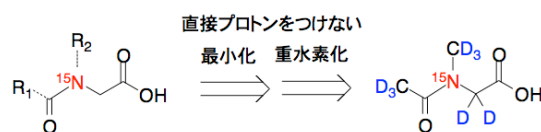
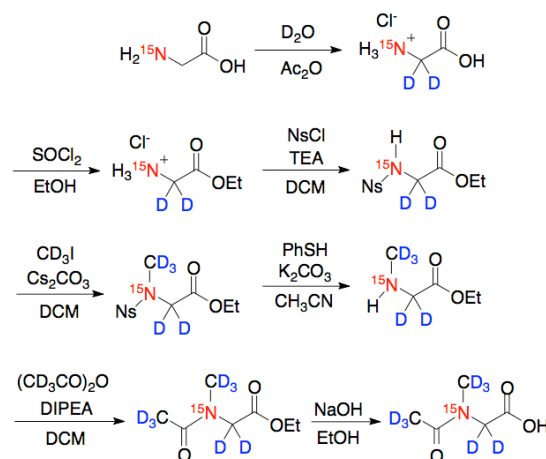


Figure 4. [ $^{15}\text{N}, \text{D}_8$ ]N-アセチル-N-メチルグリシンの設計

合成は、下記に示すスキームで行った (Scheme 1)。同位体原料として  $^{15}\text{N}$  グリシンを原料として、 $\alpha$  位の重水素化、エステル化、ノシル化、メチル化 ( $\text{CD}_3$ -)、脱ノシル、アセチル化 ( $\text{CD}_3\text{CO}$ -)、エステル加水分解の計 7 ステップで合成を行った。最終生成物の同定は、各種 NMR ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) で行った。NMR による分子構造の同定から、室温では [ $^{15}\text{N}, \text{D}_8$ ]N-アセチル-N-メチルグリシンは 2 つの立体配座を持つことがわかった。そのため、2 つに分裂した  $^{15}\text{N}$  の NMR ピークとなることを確認した。VT NMR 実験より、昇温に伴い 1 種に収束する挙動も確認できた。



Scheme 1. [ $^{15}\text{N}, \text{D}_8$ ]N-アセチル-N-メチルグリシンの合成  
Ns: *o*-ニトロベンゼンスルホニル, PhSH: チオフェノール, DIPEA: *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン

合成した [ $^{15}\text{N}, \text{D}_8$ ]N-アセチル-N-メチルグリシンを用いて、pH 変化に伴う化学シフト変化を観測した。アミド結合まわりの立体配座により  $^{15}\text{N}$  の NMR ピークが分裂するため、分裂したピークの化学シフトの中心の値の変化を測定した。酸性から中性に変化することによって、5 ppm を超える化学シフト変化

を観測することができた(Figure 5)。外部環境と内部環境の pH 変化を作り出すことで、環境の変化をセンシングできる可能性がある。

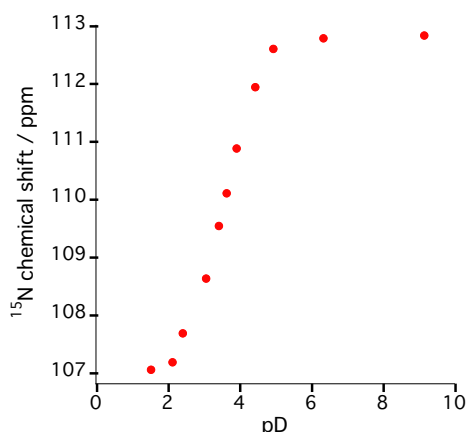


Figure 5. [<sup>15</sup>N,<sup>D</sup><sub>8</sub>]N-アセチル-N-メチルグリシンの pH 変化における <sup>15</sup>N NMR 化学シフトの変化

<sup>15</sup>N 核の  $T_1$  測定を飽和回復法 (9.4T, D<sub>2</sub>O, 37°C) で行った。37°C の測定条件では、<sup>15</sup>N 核のピークが分裂している状態のため、 $T_1$  は  $125 \pm 17$  s (高磁場側) と  $108 \pm 4$  s (低磁場側) となり、生体応用への 1 つの目安と考えている 50 s (DNP で多用されているピルビン酸の  $T_1$  値の概数) を 2 倍近く超える値であった。<sup>[15N,D8]N-アセチル-N-メチルグリシンの  $T_1$  は、ピルビン酸の  $T_1$  を超える一方で、分子内の交換可能な水素原子を重水素原子にすべて置換した分子にしては、想定よりも重水素化の  $T_1$  に与える寄与が少ないように考察された。(比較として、全重水素化した [<sup>15</sup>N,<sup>D</sup><sub>14</sub>]TMPA  $T_1 = 1177 \pm 52$  s, H. Nonaka *et. al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 40104(2017).) そのため、DD 以外の寄与が大きく、DD を抑制しても劇的な緩和時間延長が達成されなかったのかもしれない。想定されるその他の緩和機構としては、アミド結合になっているため、CSA による緩和が効いているのではないかと考えている。</sup>

今回得られた [<sup>15</sup>N,<sup>D</sup><sub>8</sub>]N-アセチル-N-メチルグリシンは、pH 環境の変化によって大きな化学シフト変化を生み出し、十分な  $T_1$  を持つことが確認できた。本分子を用いることで、空間を利用するセンシングシステムへの展開が期待できる。また、この分子は、今回目指した実験系だけでなく、汎用的な分子センサー設計の設計メカニズムにも使用できる可能性がある。<sup>[15N,D8]N-アセチル-N-メチルグリシン構造に含まれるカルボン酸は、生体に存在するアミド結合やエステル結合などのように普遍的に存在しており、この結合切断に関与する重要な酵素も多い。そういった酵素に対する核偏極分子センサーとしても応用できる可能性もあると考えている。</sup>

## 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)

今倉 悠貴、野中 洋、山東 信介, 長時間解析を可能とする核偏極分子プローブの開発, 日本分子イメージング学会機関誌 JSMI Report, 10, 3-7 (2017). (和文総説, 査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

○野中洋、今倉悠貴、山東信介, 長寿命核偏極分子構造の設計と理論的考察, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 8 日 (石川県, 金沢市、石川県立音楽堂)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○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]

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・大学院工学系研究科・講師

研究者番号 : 80579269

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山東信介 (SANDO SHINSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号 : 20346084

今倉悠貴 (IMAKURA YUKI)  
東京大学・大学院工学系研究科化学生命工  
学専攻  
修士課程学生

伊藤慎 (ITO MAKOTO)  
東京大学・工学部化学生命工学科  
学士課程学生