

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18858

研究課題名(和文)ドナー型BioLeTによる生物発光プローブ群の開発とインビボイメージングへの応用

研究課題名(英文)Development of bioluminescence probes based on donor-excited BioLeT and its application to in vivo imaging

研究代表者

高倉 栄男 (TAKAKURA, Hideo)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：40772702

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、ホタルの発光現象を利用して生体分子を可視化する基盤技術の確立とそのイメージングへの応用を目指して研究を行った。具体的には、励起状態における電子移動を制御することで標的の生体分子が存在する時だけ発光を示す性質をもつ発光基質を開発する。その実現のために様々なテスト化合物を合成する中で、当初発光が消光すると考えられた発光基質から想定以上の発光強度が観測された。このような報告は知られておらず、発光反応を高効率化するための知見が得られたと言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a molecular design for visualizing biomolecules utilizing firefly bioluminescence, and to apply the bioluminescence probes to in vivo imaging. Specifically, the bioluminescence of the probes is quenched by electron transfer in the excited state, but when target biomolecules exist, the probes can emit light due to chemical change of the quenching moiety. For investigation of the strategy, various test substrates were synthesized and the properties were evaluated. Among them, the luminescence was observed from substrates that are considered to be quenched, and the intensity was quite high. The result may be applied to new strategy for design of highly luminescent substrates.

研究分野：ケミカルバイオロジー、イメージング、分析化学

キーワード：生物発光 電子移動 分子プローブ

### 1. 研究開始当初の背景

生物発光法は、蛍光法とともに生物学領域で汎用される光検出法のひとつで、luciferin (基質) と luciferase (酵素) による化学反応に基づいている。励起光を必要としないこと、効率の良い発光反応であることから、バックグラウンドノイズのない高感度な検出が特長である。そのため、生物発光法は生きた動物個体内での測定に適している<sup>1</sup>。しかしながら、基質特異性の高さや発光反応の制御が難しいことから、生体分子や生体内イベントを細胞レベルで検出・可視化する「機能化」研究はまだ端緒についたばかりである。特に理論的に機能化を行うための分子技術基盤の確立が必要とされていた。

申請者はこれまでに生体分子の活性を生きた動物個体内で可視化する発光分子プローブの開発を行ってきた。プローブの理論的分子設計のための制御原理として、蛍光プローブで汎用されている光誘起電子移動(PeT)のコンセプトが生物発光プローブの開発に応用できることを示し(BioLeT と呼ぶ)、実際に一酸化窒素(NO)検出プローブや反応性の高い活性酸素種(hROS)を検出するプローブの開発に成功した(図1)<sup>2,3</sup>。すなわち、標的分子がない場合は電子移動により発光を示さないが、標的分子が存在するとプローブの構造が変化し電子移動が起こらなくなり、発光を示すようになる。これらのプローブはラットを用いたイメージングにおいて蛍光プローブよりも極めて高感度に標的分子をイメージングできることを実証してきた。

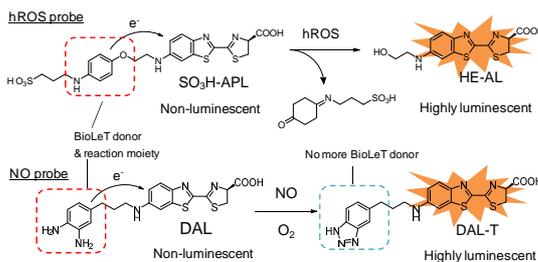


図1. 生物発光プローブの構造と制御メカニズム

### 2. 研究の目的

生物発光プローブの分子設計法は蛍光プローブに比べると選択肢が少なく、現状では標的分子のバリエーションは少ない。そこで、本研究においては申請者がこれまでに提案したコンセプトを拡張し、標的分子の多様化を進め生物発光プローブの汎用性を高めることを目的とする。PeT においては“励起分子への電子移動”(アクセプター型 PeT) とともに“励起分子からの電子移動”(ドナー型 PeT) によるプローブ開発例も少なくない<sup>4</sup>。そこで、これまで開発してきたアクセプター型 BioLeT ではなく、ドナー型 BioLeT が発光の制御原理に適用できないかを検討する(図2)。すなわち、アクセプター型と比べ逆方向の電子移動現象が起こるか検証し、生

物発光プローブの制御メカニズムに応用できないか研究を進める。ドナー型 BioLeT を制御原理に用いた生物発光プローブ群の開発を行い、標的分子の多様化を進める。また、これまでの研究を進展させ、アクセプター型 BioLeT を用いた新規生物発光プローブの開発を進める。

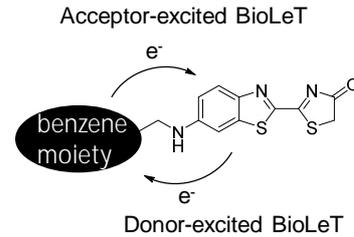


図2. アクセプター型 BioLeT とドナー型 BioLeT の比較

### 3. 研究の方法

#### (1) ドナー型 BioLeT による発光制御の検討と閾値の推定

生物発光において励起分子からの電子移動による消光現象が起こるかどうかを検証する。ドナー型 PeT の研究から、電子移動は LUMO エネルギーの低い構造へ起こることが分かっている。よって、基質近傍に LUMO エネルギーの低いベンゼン環構造(ニトロベンゼンなど)を持った化合物を合成し、その発光特性を調べドナー型 BioLeT の現象を証明する。また、電子移動は一定の LUMO エネルギー以下になると起こることが報告されている。そこで、その閾値を推定するために、様々な LUMO エネルギーレベルを持ったベンゼン環部位を基質の発光特性を精査して、LUMO エネルギーレベルと発光特性の関係性を明らかにしていく。

#### (2) アクセプター型 BioLeT による新規生物発光プローブの開発

申請者がこれまでに提案した制御原理を利用した生物発光プローブの開発を行う。本研究では酸化ストレスマーカーとして知られているマロンジアルデヒド(MDA)を検出する生物発光プローブの開発に着手する。MDA は多価不飽和脂肪酸が活性酸素種やフリーラジカルと反応した後に、更に複数の反応を経て生成され、脂質過酸化を反映していると考えられている。現在用いられている吸光度の変化から測定する手法では、血漿や組織ホモジネートなどの生体サンプルの場合バックグラウンドが高くなるケースがあるが、励起光を必要としない生物発光ならそのような問題を克服できる。

### 4. 研究成果

#### (1) ドナー型 BioLeT による発光制御の検討と閾値の推定

一般的にニトロ基を有する構造は LUMO エネルギーが低く、様々な蛍光色素の発光を電子移動により消光することが知られてい

る<sup>4</sup>。そこで、ドナー型 BioLeT による消光現象を確認するためにニトロベンゼンをもつ発光基質の合成を行った(図3)。合成に成功し、luciferase との酵素反応を行ったところ、強い発光が観測された。非常に LUMO エネルギーの低いジニトロベンゼンでも発光が観測されたことより、基質とニトロベンゼンの間にリンカーとして炭素3つを有している基質では電子移動による消光は認められなかったと言える。

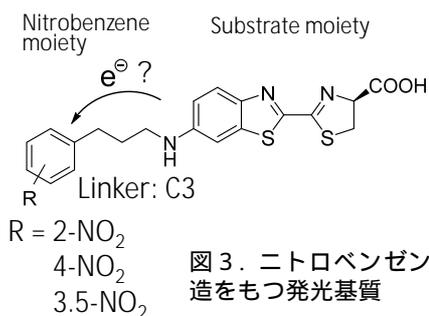


図3. ニトロベンゼン構造をもつ発光基質

電子移動の効率は電子移動が起こる構造間の距離に依存し、近いほど効率が高く、遠いほど効率が低い。そこで、次に、より電子移動が起こりやすくする設計として、ベンゼン環部位と基質の間に炭素1のリンカーをもつ化合物を設計し、合成した(図4)。luciferase との酵素反応を行ったところ、これらの構造においても強い発光が観測され、意外なことにニトロ基をもたないベンゼン環だけをもつ基質よりも発光強度が大きかった。ニトロ基をもつ構造の方が立体障害により発光反応には不利になると考えられたが、ニトロ基のような電子求引性基があることで何らかの光化学的な特性が変化した結果、予想に反した現象が観測された可能性がある。このような報告はこれまで知られておらず、高発光効率の基質を開発する知見となると期待される。ドナー型 BioLeT を生物発光プローブの開発に応用するという観点からはこれ以上の LUMO エネルギーの低い構造は難しく、断念することとした。

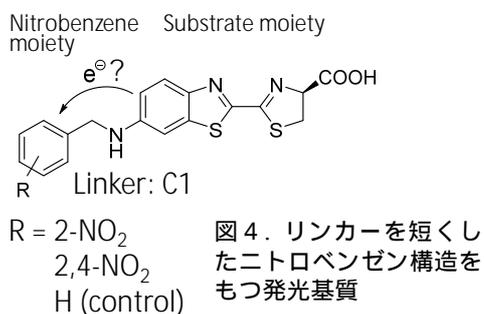


図4. リンカーを短くしたニトロベンゼン構造をもつ発光基質

(2) アクセプター型 BioLeT による新規生物発光プローブの開発

MDA を検出する生物発光プローブを開発するために、ベンゼン環部位にはアクセプター型 BioLeT による消光が生じ、かつ MDA と反応後にはその性質を失うような分子設計をする必要がある。そのような条件を満た

す反応部位としてベンズヒドラジド構造を導入した化合物を考案した(図5)。この構造はアクセプター型 BioLeT の消光が見込め、MDA とも反応することが報告されている<sup>5</sup>。この構造をもつ基質を合成し、MDA との反応を試みたが HPLC 分析にて反応が進行していないことが確認された。よって、この反応部位では MDA の検出プローブとして機能しないと考えられる。

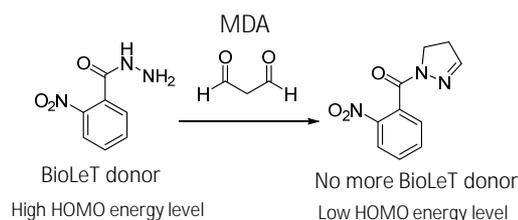


図5. MDA を検出する生物発光プローブの反応部位

次に、フェニルヒドラジンを反応部位として用いることを考えた<sup>6</sup>。分子設計と合成法を考案し、現在最終生成物の手前まで合成が進んでいる。

アクセプター型 BioLeT を利用して、他にも ONOO<sup>-</sup>や一重項酸素などを検出する生物発光プローブの開発が行えると考えられる。今後も新規生物発光プローブの開発が行われると期待される。

#### <引用文献>

1. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 80-89 (2010).
2. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 4010-4013 (2015).
3. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 14768-14771 (2015).
4. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14079-14085 (2004).
5. *Anal. Chem.* **87**, 8052-8056 (2015).
6. *Chem. Commun.* **53**, 4080-4083.

#### 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 2 件)

- (1) K. Nakajima, T. Kimura, H. Takakura, Y. Yoshikawa, A. Kameda, T. Shindo, K. Sato, H. Kobayashi, M. Ogawa “Implantable wireless powered light emitting diode (LED) for near-infrared photoimmunotherapy: device development and experimental assessment *in vitro* and *in vivo*” *Oncotarget*, **9**, 20048-20057, **2018**. 査読有  
DOI: 10.18632/oncotarget.25068.

- (2) H. Takakura<sup>\*</sup>, Y. Zhang<sup>\*</sup>, R. S. Erdmann<sup>\*</sup>, A. D. Thompson<sup>\*</sup>, Y. Lin, B. McNellis, F. Rivera-Molina, S. Uno, M. Kamiya, Y. Urano, J. E. Rothman, J.

Bewersdorf, A. Schepartz, D. Toomre  
"Long time-lapse nanoscopy with  
spontaneously blinking membrane  
probes" *Nature Biotechnology*, **35**,  
773-780, **2017**. 査読有  
\*equally contributed  
DOI: 10.1038/nbt.3876.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 中島孝平、高倉栄男、志水陽一、浅沼大祐、上野匡、浦野泰照、小川美香子、「光線免疫療法によるがん細胞死誘発過程における細胞膜の変化に関する検討」, 第 138 年会日本薬学会、2018 年
- (2) 安藤完太、中島孝平、高倉栄男、小川美香子、「光線免疫療法におけるメカニズム解明に向けた薬剤の光応答性に関する検討」, 第 138 年会日本薬学会、2018 年
- (3) 富田真由、高倉栄男、安井博宣、東川桂、久下裕司、小川美香子、「 $^{18}\text{F}$ FDG PET を用いた PD-1 治療効果の早期予測に関する *in vivo* での検討」, 第 138 年会日本薬学会、2018 年
- (4) 本村新、志水陽一、高倉栄男、安井博宣、東川桂、玉木長良、久下裕司、小川美香子、「マクロファージの極性化が  $^{18}\text{F}$ -FMISO と  $^{125}\text{I}$ -BMIPP の集積に及ぼす影響」, 第 17 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2017 年
- (5) Kohei Nakajima, Hideo Takakura, Yoichi Shimizu, Mikako Ogawa, "Tiny cell membrane damage is important for near infrared photoimmunotherapy", World Molecular Imaging Congress 2017
- (6) 中島孝平、志水陽一、高倉栄男、小川美香子、「近赤外光を用いた光線免疫療法における細胞死誘発機序の検証」, 第 12 回日本分子イメージング学会、2017 年
- (7) 高倉栄男、小嶋良輔、小林英司、長野哲雄、浦野泰照、「電子移動を利用した bioluminescence *in vivo* imaging プロープの論理的設計法の確立」, 第 12 回日本分子イメージング学会、2017 年
- (8) 高倉栄男、浦野泰照、「オキシルシフェリン誘導体の解析によるホタル生物発光の波長変化メカニズムの解明」, 第 137 年会日本薬学会、2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/bunseki/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高倉 栄男 (TAKAKURA, Hideo)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：40772702