

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04764

研究課題名（和文）生体分子を高精細にin vivo可視化する基盤技術の構築

研究課題名（英文）Development of a chemical biology tool for in vivo imaging of biomolecules

研究代表者

浅沼 大祐（Asanuma, Daisuke）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：10611204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,700,000円

研究成果の概要（和文）：小分子蛍光プローブは多様な生理活性分子の時空間動態を可視化し、細胞現象の理解に貢献してきた。しかしながら、その応用は培養細胞で多く達成されてきたが、生体での分子動態の解明への貢献は十分に為されていない。本研究では、近年申請者らが開発したケミカルタグ技術を発展させることにより、従来生体応用の際に問題となる非特異的染色を解消して生理活性分子を可視化する近赤外蛍光プローブ技術の開発を行った。本研究で得た知見は、今後の有望なケミカルバイオロジー技術の開発に役立つと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイナミックな生命現象をありのままに理解するには、主要な役割を果たす生理活性分子の生体内での振る舞いを明らかにする必要がある。生理活性分子の時空間動態を可視化する蛍光プローブ技術の開発は、生命現象の分子レベルでのメカニズムの理解に始まり、疾病の理解、さらには創薬への架け橋となる大きな意義を有する。本研究で得られた成果は、ライフサイエンス研究の今後の発展に寄与していくと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Small-molecular fluorescence probes have contributed to the understanding of cellular phenomena by visualizing the spatiotemporal dynamics of various biomolecules. However, their contribution to elucidation of molecular dynamics in living systems has not been sufficiently achieved. This research aimed at developing a near-infrared fluorescence probe technology, based on our recently constructed chemical tag system, for visualization of physiologically active molecules by eliminating the non-specific staining that has caused severe problems in conventional in vivo applications. The findings obtained in this research can be expected to be useful for future development of promising chemical biology tools.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルタグ 分子イメージング 蛍光プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小分子蛍光プローブは、1980年代のFluo-3等を用いたカルシウムシグナル研究を端緒として、細胞内外の多種多様の生体シグナル分子の時空間動態を可視化し、生体機能や病態との関連を明らかにしてきた。しかしながら、これらのプローブの応用は培養細胞で数多く達成されてきたが、理解すべき生体の高次体系である組織や個体全体での分子動態の解明への貢献は十分に為されていない。主な原因として、従来のプローブは生体に投与した際に、目的とする細胞等の観察対象部位に限らず、周囲の細胞内外の構造を非特異的に染色してしまう。このため、蛍光イメージングのシグナル・バックグラウンド比が著しく低下し、生体イメージングへの応用を妨げる。近年、小分子蛍光プローブをケミカルタグ技術と組み合わせることにより、プローブの目的部位への局在化を図る試みが行われている。HaloTagやSNAPタグ等のケミカルタグ技術を利用して、ケミカルタグタンパク質へのリガンド化を施した蛍光プローブを用いることにより、ケミカルタグタンパク質を発現させた目的部位にプローブを局在化させる一定の成果が得られている。しかしながら、依然として、ケミカルタグタンパク質に標識されていないプローブに由来する非特異的染色を簡便に解消する現実的な手段がなく、汎用性のある技術開発は極めて困難である。

本研究では、近年申請者らが開発した抗消光団一本鎖抗体を基にしたケミカルタグ技術を開発させることにより、重要なセカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンを対象としてこれまで実現が困難であった小分子蛍光プローブによる高度な生体イメージング技術の開発を目指した。提案技術では、蛍光プローブは蛍光団およびリガンド認識構造、消光団から構成され、単独では消光団の作用によりリガンドの有無に関わらず光らないが、抗消光団一本鎖抗体に結合することにより消光団の作用が解消されてリガンドに依存して光る。この原理により、観察対象とする細胞に抗消光団一本鎖抗体を発現させて本提案の蛍光プローブを応用することで、目的部位以外における非特異的染色の問題を回避してカルシウムシグナルの時空間動態を高精細に可視化する。さらに、組織透過性に優れ、夾雑する自家蛍光が少ない生体の窓(700-900 nm)にあたる近赤外光を発する蛍光色素を蛍光プローブに導入する分子設計として、生体イメージングに適した蛍光プローブの開発を実現する。

2. 研究の目的

小分子蛍光プローブは細胞内外の多様な分子の時空間動態を可視化し、動的な細胞現象の理解に大きく貢献してきた。しかしながら、その応用は培養細胞で多く達成されてきたが、生体の高次体系である組織や個体全体での分子動態の解明への貢献は十分に為されていない。本研究では、従来生体応用の際に問題となるプローブの非特異的染色を解消し、なおかつ、生体イメージングに適した近赤外光による分子可視化を実現する革新的な蛍光プローブ技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

提案する生体イメージング技術の開発にあたり、近年申請者らが開発した抗消光団一本鎖抗体を基にしたケミカルタグ技術を利用する。従来の非特異的染色の問題を解消するため、ケミカルタグタンパク質に結合したときのみに蛍光プローブがカルシウムイオンに反応して近赤外波長域で明るく光るように分子設計を行い、合成開発を行う。次に、ケミカルタグタンパク質を発現させた初代培養神経細胞等に蛍光プローブを応用して蛍光イメージングを行い、ケミカルタグ発現細胞におけるカルシウムシグナルを近赤外蛍光により検出できることを原理実証する。問題点の洗い出しを行いながら段階的に検証を進めていき、ケミカルタグタンパク質を発現させたマウスに蛍光プローブを応用し、本技術の生体イメージング応用のポテンシャルを検証する。

4. 研究成果

・蛍光プローブの分子設計および合成開発

ケミカルタグとして抗消光団一本鎖抗体を発現させた細胞におけるカルシウムシグナルを可視化するため、提案する蛍光プローブは近赤外蛍光色素およびリガンド認識構造、消光団から構成される分子設計として合成開発した。具体的には、近赤外蛍光色素として生体イメージングへの利用実績のあるケイ素置換ローダミンを、リガンド認識構造としてカルシウムイオンキレーターを採用し、計26ステップで有機合成を完了した。また、幅広い範囲でのカルシウムイオン濃度変化を計測できるように、親和性の異なるカルシウムイオンキレーターを導入した蛍光プローブの誘導体も併せて開発した。

・抗消光団一本鎖抗体を発現する培養細胞におけるカルシウムイメージング応用

開発した蛍光プローブによる蛍光イメージングの特性を検証する評価系の作製のため、レンチウイルスを用いた遺伝子導入およびシングルセルクローニングにより、抗消光団一本鎖抗体と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質を安定的に発現する細胞株を樹立した。ケミカルタグ

タンパク質を安定発現する細胞と非発現の細胞を併せて作製した共培養系を蛍光イメージング応用に供し、開発した蛍光プローブを共培養系に負荷した後に ATP 等を用いて培養細胞に薬剤刺激を行った。緑色蛍光タンパク質の蛍光をマーカーとして各々の細胞のケミカルタグ発現の有無を識別してプローブの蛍光の解析を行ったところ、ケミカルタグタンパク質を発現する細胞で高い選択性を持ってカルシウムシグナルを近赤外蛍光により検出できることを確認した。

・初代培養神経細胞を対象にしたカルシウムイメージング応用

神経活動に伴って細胞内カルシウムイオン濃度が変化するため、神経細胞の機能の計測にカルシウムイメージング手法が広く利用されている。提案技術の *in vivo* 近赤外蛍光イメージングへの応用に向けた検証として、培養神経細胞を対象として開発技術を用いた蛍光イメージング応用を行った。ラット海馬由来の初代培養神経細胞にアデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子導入を行い、先と同様にケミカルタグタンパク質と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させた。開発した蛍光プローブの神経細胞への導入条件を検討した後、神経細胞 - グリア細胞の共培養系に蛍光プローブを負荷して蛍光イメージングに供した。緑色蛍光タンパク質の蛍光画像と開発プローブの蛍光画像はよく一致し、プローブは初代培養神経細胞を選択的に染色することを確認した。また、共培養系に対して電気刺激を行ったところ、電気刺激に応じた神経細胞内のカルシウムシグナルを近赤外蛍光により可視化することができた。

・マウス大脳皮質を対象とした *in vivo* 近赤外蛍光イメージングの応用検証

開発した蛍光プローブ技術を用いて近赤外蛍光による生体イメージング応用を図った。マウスにアデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子導入を行い、大脳皮質の神経細胞にケミカルタグタンパク質を発現させた。Konnerth らのマルチセルポラスローディング法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7319, 2003) を参考にして、非イオン性ブロック共重合体等を利用した蛍光プローブ製剤を調製し、バルクローディング法により微小ニードルを介して頭部手術を施したケミカルタグ発現マウスの大脳実質内に投与した。その後、クラニアルウィンドウを作製し、麻酔下のマウスを共焦点顕微鏡による *in vivo* 蛍光イメージングに供したところ、蛍光プローブによる神経細胞の染色が観察された。しかしながら、脳スライス標本の観察から、ケミカルタグタンパク質の発現マーカーとして利用した緑色蛍光タンパク質が陽性である細胞だけでなく陰性の細胞でも染色が見られることを明らかとなった。今回得られた結果から、蛍光プローブのローディング法等の改良が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 磯野有希、浅沼大祐、大久保洋平、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 近赤外領域におけるカルシウム蛍光イメージングのための新規タグツールの開発
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Asanuma, Shigeyuki Namiki, and Kenzo Hirose
2. 発表標題 Fluorophore-quencher based chemical tag technology for biological imaging
3. 学会等名 2019 International Conference for Leading and Young Medical Scientists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅沼大祐
2. 発表標題 高精細なバイオイメージングのためのケミカルタグ技術の開発
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅沼大祐、小島佑介、岡本紘幸、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 近赤外蛍光 in vivo イメージングのためのケミカルタグツールの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Okamoto, Daisuke Asanuma, Shigeyuki Namiki, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development of a tag-probe based cell labeling technique for in vivo fluorescence imaging
3. 学会等名 WCP2018 (日本、京都) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeyuki Namiki, Daisuke Asanuma, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development live cell superresolution microscopy based on a novel fluorescence switching technology
3. 学会等名 WCP2018 (日本、京都) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sin Ying Yip, Shigeyuki Namiki, Daisuke Asanuma, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development of turn-on fluorescent tag system for live-cell imaging
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 (日本、大阪)
4. 発表年 2019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
研究協力者	廣瀬 謙造 (Hirose Kenzo)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	並木 繁行 (Namiki Shigeyuki)		
研究協力者	大久保 洋平 (Okubo Yohei)		
研究協力者	田中 理恵子 (Tanaka Rieko)		
研究協力者	磯野 有希 (Isono Yuki)		