

平成 22 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19681024

研究課題名 (和文) 高速アザ電子環状反応による PET イメージング法の開発と糖鎖付加機能性高分子の創成

研究課題名 (英文) Development of PET Imaging through Rapid Azaelectrocyclization and Oligosaccharide-Engineered Functional Macromolecules

研究代表者

田中 克典 (TANAKA KATSUNORI)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00403098

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アザ電子環状反応、PET、標識化、イメージング、糖鎖

1. 研究計画の概要

本研究では独自に開発した“超高速アザ電子環状反応”による迅速修飾法を用いて、(i) 水中での生体分子アミノ基選択的な高速放射線標識化法を開発する。次いでこれを用いて (ii) ペプチド、タンパク質、および極微量の貴重なモノクロナール抗体のリジン残基選択的修飾による PET イメージング、さらにはこれまで単糖を除いてほとんど例のない糖鎖の PET イメージングを実施する。このように、オリジナルの迅速修飾反応を活用して、非常に取り扱いにくい短寿命放射線中間体を単離することなく PET イメージングへと導き、生体内現象解明、ならびに診断技術に貢献する新たな一般的方法論を確立する。またこれらの結果を基に、(iii) 申請者らが独自の合成技術により構築する合成糖クラスター分子や天然糖タンパク質または合成糖ペプチドライブラリー (アスパラギン結合型) の中から、PET イメージングを指標にして癌や炎症部位へのターゲティングを実施する。糖タンパク質またはペプチドに関しては、対応するペプチドや糖鎖部分自体の PET 集積挙動と比較することにより、糖鎖部分の新しい機能を見出す。すなわち、糖鎖を付加させることにより、全く新たな機能を有する高分子や人工糖ペプチドの探索・創成技術を開発する。

2. 研究の進捗状況

平成 21 年度までに、以下の成果を挙げた。

(1) 超高速アザ電子環状反応を用いた標識化プローブの開発と PET イメージング：Stille カップリングを鍵反応としたプローブの新規合成法を開発した後、極微量のペプチドやタンパク質に対して、短時間 (10～30 分)、 10^{-8}M のサンプル濃度を用いて DOTA や蛍光色素で標識することに成功した。次いで、抗 EGFR 抗体に対して ^{68}Ga -DOTA で標識した後、マウスに移植した癌細胞を標的とした PET イメージングに成功した。

(2) N-結合型糖鎖の固相合成法の確立：JandaJeTM を担体として順次固相上に効率的なグリコシル化反応を実現することにより、シアル酸を有する初めての複合型 N-結合型糖鎖の固相合成に成功した。次いで、還元末端にアスパラギン誘導体、およびフコースを有する糖鎖の部分合成を達成した。

(3) N-結合型糖鎖クラスタープローブの開発と PET や非侵襲的蛍光イメージング：末端にアセチレン基を有するポリリジン型 dendrimer に対して、報告者らが開発したヒスチジンを活性化基とする自己活性化型 Huisgen 環化反応を実施した結果、16 分子の N-結合型糖鎖を定量的にクラスター化させることに成功した。次いで、PET や蛍光イメージングを実施した結果、2 次リンパ器官として重要な脾臓に選択的に取り込まれるクラスターを初めて見出すとともに、シアル酸糖鎖構造による胆嚢、または腎臓を経た代謝過程の相違を可視化することに成功した。一方、担癌マウスにおける蛍光イメージングを実施すること

によって、その臓器分布が正常マウスとは劇的に変化することを世界で初めて明らかにした。

(4) N結合型糖鎖の生体分子に対する化学的なエンジニアリング法：タンパク質に対して、超高速アザ電子環状反応と Staudinger ライゲーションを併用して用いることにより、ビオチン分子や N結合型糖鎖を効率的に導入することに成功した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

上記、2に示したように、平成21年度までにほぼ研究計画の概要に従って、研究を遂行できた。この間、幾つかの解決すべき点も出てきたが、今後以下の研究を実施することによって問題を回避し、当初提案した計画通りに研究を完成できると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

平成21年度までの成果を踏まえて、以下の3点に焦点を絞り研究を行い、前計画を達成する。

(1) フコースやシアル酸を持つN結合型糖鎖合成の固相ライブラリー合成：平成21年度までに、還元末端にアスパラギン残基、およびフコースやシアル酸を含むN結合型糖鎖合成の方法論を開発しているため、これら知見を基にして、天然から単離することのできない、フコースを有するN結合型糖鎖のライブラリー合成を行う。これらは、既に確立した方法に従って、*JandaJel*TMを担体とする固相合成法に従う。さらに合成によって得られる糖鎖を以下のインビボイメージングに用いる。

(2) N結合型糖鎖クラスターのインビボイメージング：平成21年度までに確立したポリリジン型 dendrimer 調製法、およびPETや蛍光イメージングの結果を参考にして、炎症部位や癌を特異的に認識するクラスター、または正常モデルと癌モデルとのインビボダイナミクスの相違、すなわち癌のマーカーとなる糖鎖クラスターをマウスを用いて探索する。

(3) 糖鎖付加人工タンパク質、および人工細胞の創成とインビボイメージング：平成21年度に、タンパク質や細胞表層上に超高速アザ電子環状反応を用いて、N結合型糖鎖を効率的に導入することに成功した。そこで、これら糖鎖エンジニアリングにより変化するタンパク質動態や細胞のトラフィックをPETや蛍光インビボイメージングにより検証する。また、癌を認識するN結合型糖鎖付加人工タンパク質や人工細胞を探索する。

5. 代表的な研究成果

(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17件)

- ① Tanaka, K.; Masuyama, T.; Hasegawa, K.; Tahara, T.; Mizuma, H.; Wada, Y.; Watanabe, Y.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 102-105. "A Submicrogram-scale protocol for biomolecule-based PET imaging via rapid 6 π -azaelectrocyclization: first visualization of sialic acid-dependent circulatory residence of glycoproteins." 査読有り
- ② Tanaka, K.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 815-828. "PET (Positron Emission Tomography) Imaging of Biomolecules Using Metal/DOTA Complexes: A New Collaborative Challenge by Chemists, Biologists, and Physicians for Future Diagnostics and Exploration of *In vivo* Dynamics." 査読有り
- ③ Tanaka, K.; Fujii, Y.; Tokimoto, H.; Mori, Y.; Tanaka, S.; Bao, G.-m.; Siwu, E. R. O.; Nakayabu, A.; Fukase, K. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 574-580. "Library-directed Synthesis of N-Glycans: Synthesis of Sialic Acid-containing Complex-type N-Glycan on Solid-supports." 査読有り

[学会発表] (計99件)

[図書] (計6件)

- ① Tanaka, K.; Fukase, K. 複合糖質の化学と最新応用技術, シーエムシー出版, **2009**, 235-244. "糖鎖のインビボバイオイメージング"

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ① 名称:新規ヘキサトリエン- β -カルボニル化合物
発明者: 深瀬浩一、田中克典、渡辺恭良、長谷川功紀、田原強
権利者: 国立大学法人大阪大学、独立行政法人理化学研究所
種類: PCT /JP2008
番号: 051871
出願年月日: 2008年2月5日
国内外の別: 国外