

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：34512

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23816

研究課題名（和文）HYPOXIAを標的とするANDロジックゲート型蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of fluorescent probes with AND-logic gate response for HYPOXIA

研究代表者

高嶋 一平（Takashima, Ippei）

神戸薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：50769742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では酵素の基質分子と低酸素環境を検出する分子を組み合わせたANDロジックゲート型分子を開発して腫瘍選択的な蛍光イメージング法の開発を目指した。腫瘍に蓄積させる予定の酵素が生体環境中で失活することを見出したため、酵素を化学修飾することで酵素活性の安定化に成功した。また基質分子も生理条件下で不安定なために基質の構造検討を行っている。また別に、この基質の構造検討中において偶然にも亜鉛に対して選択的に応答する分子を見出した。そこで本分子構造を最適化して亜鉛に対してシグナル増強型で蛍光応答する分子を開発するに至った。本研究成果は国際学術誌等で公表済みである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究に用いる酵素の安定性を増す化学修飾方法を開発することでケミカルバイオロジー研究での新たなツールとなることが期待される。また本研究では、偶然に亜鉛に対するシグナル増強型の蛍光プローブを創製した。従来のプローブ分子に比べて高感度であり、生体中での微量の亜鉛を蛍光解析するのに優れた機能を持つ。また本研究概念は他の微量元素や生体内分子の検出に拡張可能であると思われ、蛍光プローブの開発における新たな分子設計指針としても有効であることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Our research goal is the development of an AND logic gate targeting tumor-localized enzymes with a conventional hypoxia-sensitive molecule. In this project, we found that the enzyme we had planned to use for this system quickly degrades under physiological conditions, but a chemical modification of the enzyme overcame this issue. In addition, the enzyme substrate was also found to be unstable under physiological conditions, and the structure optimization efforts is underway. Through these optimization studies, we fortuitously found functional molecules that react selectively with zinc. The molecules were further applied as fluorescent probes to give a bright fluorescent response by signal amplification. These studies are also in progress and a part of results has been published in an international journal.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アンドロジック 蛍光プローブ 微量元素 シグナル増強 低酸素環境 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

低酸素環境は一時的な虚血状態(梗塞や創傷)や腫瘍深部で発生し、心筋梗塞や腫瘍の治療における重要な標的イベントとなっている。従来の低酸素環境検出では、侵襲的な電極による検出法が定量的で信頼性の高い検出方法として知られてきた。さらに近年では、低酸素環境での還元的環境を標的としたプローブ分子の開発によって、非侵襲的な蛍光イメージングやドラッグデリバリーへと応用されている。しかし、これら疎水性プローブ分子では肝臓などへの非特異的な吸着が未だに問題として挙げられる[*Bioconj. Chem.* 2012, Okuda; *Pharm. Res.* 2015, Varma]。そこで生体内の複雑な環境下で選択的に低酸素環境を認識して局在する分子設計が、低酸素環境を標的とした疾患治療において求められる。

2. 研究の目的

上記の問題を解決する一つ的手段として、一つの標的分子だけでなく、現象に伴う複数の化学種を認識する AND ロジックゲート型のプローブ分子が考えられる。近年、炎症組織などをターゲットとした AND ロジックゲート型プローブ分子の報告例はあるものの[JACS, 2013, Chang]、低酸素環境を標的とした分子設計では未だ報告例がない。申請者は、細胞内の還元的環境を標的とした従来の分子設計に加えて、低酸素環境で発現増強している細胞表面マーカーを標的とした分子設計を組み合わせ、高い選択性で低酸素環境を検出可能な AND ロジックゲート型のプローブ分子を開発することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では腫瘍の低酸素環境で発現増強されるマーカー分子を標的とした抗体を用いて、抗体-酵素複合体で腫瘍に酵素を局在化する。そして本酵素の基質と低酸素環境に応答する分子を組み合わせ、腫瘍に局在化した酵素と腫瘍内の低酸素環境の二つのインプットがある場合にのみドラッグリリースされる分子設計を検討した。本研究での課題は、生体中での 酵素の失活、 基質の安定性、の2点であった。これら課題に関して、酵素の安定性を増す化学修飾法を開発するとともに、基質の安定性に影響を与える親水性や分解抑制を目指した構造最適化研究を実施してきた。

また基質の構造最適化研究を行っている際に、亜鉛に対して選択的に応答する分子を偶然に見出した。本分子骨格に蛍光色素および亜鉛配位サイトを導入し、亜鉛に対して選択的かつ高感度に検出可能な分子を開発した。さらに本分子の亜鉛検出メカニズムを蛍光解析・HPLC-MSにて詳細に解析した。加えて、過去知見を参考として亜鉛の蛍光プローブを複数合成し、比較評価も実施している。

4. 研究成果

酵素の安定性向上のために化学修飾方法を検討し、酵素上のリジン残基を標的としたラジカル重合型のポリマー形成によって酵素の安定性を増すことに成功した。さらに基質の構造最適化を検討したところ、親水性が増すにつれて分子の分解が加速される結果であった。そこで親水性と分子の分解速度でバランスの良い化合物構造を抽出するとともに、親水性が高いものの分子骨格は安定である構造を探索中である。

一方で、この構造最適化研究の間に偶然に亜鉛に対して選択的に応答する分子構造を見出した。本分子骨格に蛍光色素を連結した分子は、亜鉛と反応したのちに色素を放出して発光するとともに、残された骨格は細かく裁断されながら亜鉛も放出する。放出され

た亜鉛はリサイクルされて他の分子と反応しながらシグナル増強できる。これら分子は、細胞中であっても既存分子(蛍光プローブ)に比べて高い感度を持ち、より低濃度域での亜鉛検出を可能とすることが分かった。これら研究成果は国際学術誌や学会などにて公表済みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ippei Takashima, Kosuke Kusamori, Hayase Hakariya, Megumi Takashima, Thi Hue Vu, Yuya Mizukami, Naotaka Noda, Yukiya Takayama, Yousuke Katsuda, Shin-ichi Sato, Yoshinobu TakakuraMakiya Nishikawa and Motonari Uesugi	4. 巻 14
2. 論文標題 Multifunctionalization of Cells with a Self-Assembling Molecule to Enhance Cell Engraftment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 775-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yunlong Zhang, Zhiyuan Wu, Ippei Takashima, Kathy-Uyen Nguyen, Nobuyuki Matsumoto and Jonathan S. Lindsey	4. 巻 44
2. 論文標題 Engineering of an archaeal phosphodiesterase to trigger aggregation-induced emission (AIE) of synthetic substrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 14266-14277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0NJ03208E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ippei Takashima, Yohei Inoue, Nobuyuki Matsumoto, Akira Takagi and Kensuke Okuda	4. 巻 56
2. 論文標題 A fluorogenic probe using a catalytic reaction for the detection of trace intracellular zinc	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13327-13330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC05315E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayase Hakariya, Ippei Takashima, Misao Takemoto, Naotaka Noda, Shin-ichi Sato and Motonari Uesugi	4. 巻 57
2. 論文標題 Non-genetic cell-surface modification with a self-assembling molecular glue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1470-1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC07171D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shuyu Jin, Hue Thi Vu, Kou Hioki, Naotaka Noda, Hiroki Yoshida, Toru Shimane, Shigenari Ishizuka, Ippei Takashima, Yoshiyuki Mizuhata, Kathleen Beverly Pe, Tetsuya Ogawa, Naoya Nishimura, Daniel Packwood, Prof. Norihiro Tokitoh, Prof. Hiroki Kurata, Prof. Sho Yamasaki, Prof. Ken J. Ishii, Prof. Motonari Uesugi	4. 巻 60
2. 論文標題 Discovery of Self Assembling Small Molecules as Vaccine Adjuvants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 961-969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202011604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akira Takagi, Kazuki Usuguchi, Ippei Takashima and Kensuke Okuda	4. 巻 ASAP
2. 論文標題 Total Synthesis of Antiausterity Agent (±)-Uvaridacol L by Regioselective Axial Diacylation of a myo-Inositol Orthoester	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 ASAP
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c00079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ippei Takashima, Yohei Inoue, Nobuyuki Matsumoto, Akira Takagi, Eiji Nakata, and Kensuke Okuda
2. 発表標題 Signal amplification method for the detection of intracellular zinc
3. 学会等名 第11回エネルギー理工学研究所国際シンポジウム (オンライン) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 陽平, 高嶋 一平, 松本 信之, 奥田 健介
2. 発表標題 亜鉛触媒反応を応用した細胞内亜鉛イオンの 高感度検出プローブの開発
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高嶋 一平, 井上 陽平, 松本 信之, 高木 晃, 奥田 健介
2. 発表標題 細胞内亜鉛イオンの高感度検出プローブの開発
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (Conmetal2020) (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白口 和希, 高木 晃, 高嶋 一平, 奥田 健介
2. 発表標題 位置選択的ジベンゾイル化による(±)-uvaridacol Lの効率的合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会(広島)(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木 晃, 田坂 今日子, 津田 智英美, 高嶋 一平, 奥田 健介
2. 発表標題 がんの栄養飢餓耐性解除に着目したグルコース誘導体の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会(広島)(オンライン)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高嶋一平, 上杉志成	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 7
3. 書名 カレントレビュー-36: 生体分子反応を制御する、14章 (p128-134)	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞移植を効率化する化合物	発明者 上杉志成, 高嶋一平, 西川元也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/011320	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 新規化合物及び該化合物を含有する亜鉛検出用蛍光プローブ	発明者 奥田健介、高嶋一平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-135407	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>1. 神戸薬科大学プレスリリース：シグナル増強システムを用いた亜鉛の高感度検出プローブの創製（薬化学研究室） https://www.kobepharma-u.ac.jp/news/005389.html</p> <p>2. コニカミノルタ画像科学奨励賞(令和2年度) https://www.konicaminolta.jp/about/csr/contribution/corporation/research/foundation/prize.html</p>

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------