

機関番号：14401

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20675004

研究課題名（和文） 化学プローブのデザイン・合成による動物個体イメージング

研究課題名（英文） Design, Synthesis and Biological Application of Chemical Probes for *in vivo* Imaging

研究代表者

菊地 和也 (KIKUCHI KAZUYA)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：70292951

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物無機化学、可視化プローブ

1. 研究計画の概要

本研究では機能性小分子プローブをデザイン・合成し、生きた状態での生体内分子が有する生理機能の直接観測を行う。この目的のため、*in vivo*（動物個体）における可視化解析のための化学原理を精査し、生命科学研究に応用可能なスペックにみあう分子プローブ開発を次の二項目に関して行う。

(1) 酵素活性を *in vivo* で検出する ^{19}F -MRI プローブの開発

新規原理に基づく加水分解酵素の ^{19}F -MRI プローブの開発を行う。これまでに、*in vitro* や細胞レベルの実験において、酵素活性によって、設計したプローブの MRI シグナルが変化することを示した。本研究課題では、このプローブを用いて生物個体内における酵素活性の可視化を行う。さらに、応用展開として、レポーター酵素の活性を捉える MRI プローブの開発を行い、個体内の遺伝子発現を検出する。

(2) *in vivo* における蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発

特定の蛋白質を生きた状態で特異的に修飾する技術を開発する。プローブ分子のデザイン・合成より開始し、試験管レベルでのラベル化実験の後、*in vivo* でのラベル化技術の開発を行う。また、蛋白質のラベル化に伴い蛍光強度が変化するスイッチ機能をもつ新しい原理を開発し、その原理に基づいた分子設計・合成を行い、生物応用へ展開する。

2. 研究の進捗状況

(1) 酵素活性を *in vivo* で検出する ^{19}F -MRI プローブの開発

まず、代表的なレポーター遺伝子産物である β -galactosidase の活性検出を目的とし

て、 β -galactosidase の反応基質に ^{19}F 化合物と Gd^{3+} 錯体を組み込んだ新規プローブ Gd-DFP-gal を設計・合成した。Gd-DFP-gal は、 Gd^{3+} 錯体の常磁性緩和促進効果をスイッチとして酵素反応に伴い ^{19}F -MRI シグナルが上昇するものである。実際に、Gd-DFP-gal の ^{19}F -MRI を測定したところ、酵素反応前は、シグナルが検出されなかったが、 β -galactosidase の添加により、 ^{19}F -MRI のコントラストが増大することが示された。また、固定細胞内及びマウス固定脳に発現させた β -galactosidase の活性の MRI 検出に成功した。

(2) *in vivo* における蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発

あるリガンドと特異的に結合する蛋白質をタグとして、そのリガンドの蛍光性誘導体からなるプローブにより標的蛋白質をラベル化する方法の開発を行った。まず、タグ蛋白質として、 β -lactam 環を有する化合物と特異的に結合する β -lactamase 変異体 (BL-tag) に着目した。この BL-tag の結合基質である β -lactam 環を有する化合物をもとにして、蛍光クエンチャーと蛍光色素をつないだプローブを設計・合成した。また、同様の設計で、蛍光波長の異なる種々の色素を導入した蛍光プローブを作成した。これらのプローブは、BL-tag と結合するまでは、蛍光が消光しており、BL-tag との結合に伴い蛍光クエンチャーが解離し蛍光を発する発蛍光型プローブである。設計したプローブにより、細胞膜上に発現させた BL-tag 融合 EGFR を種々の蛍光波長でライブセルイメージング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。

(理由)

MRI プロジェクトでは、 Gd^{3+} の常磁性緩和促進効果を利用した原理に基づきプローブ設計を行い、MRI の観測核種として生体バックグラウンドシグナルが小さい ^{19}F を選択し、酵素反応によってコントラストが上昇するプローブ合成に成功した。この結果、動物個体内の酵素活性を可視化できる機能性MRI プローブの設計原理を確立した。また、蛋白質ラベル化プロジェクトでは、蛍光蛋白質の問題点(蛍光強度が弱い、発現量制御ができない等)を解決するため、機能を付与しやすい化学プローブの利点と発現場所を制御しやすい遺伝子工学手法の利点を生かした新規蛋白質ラベル化手法を開発し、生物応用に成功した。

以上の結果より、研究開始後3年間で基礎原理の確立を終了し、今後の発展研究の礎を築くことに成功したと考えている。このため、目標通りの成果を順調に挙げることができていると自己評価した。

4. 今後の研究の推進方策

Gd-DFP-gal の膜非透過性と β -galactosidase が細胞内にしか発現できないことから固定操作が必要であった。そこで、レポーター酵素のうち、細胞膜上に提示可能で細胞膜非透過性プローブによっても検出可能な β -lactamase のプローブの開発を行う。現在、予備的な実験として、 β -lactamase 活性を ^{19}F MRI で検出するためのプローブの合成を行っており、これまでに開発してきた ^{19}F MRI 検出原理の応用が可能であることが明らかとなっている。本研究では、このプローブを用いてレポーター酵素である β -lactamase 活性を検出することにより生細胞及び個体内での遺伝子発現を ^{19}F MRI で可視化する。また、この技術と BL-tag を用いた蛋白質ラベル化技術を組み合わせる。すなわち、蛋白質標識のための近赤外蛍光プローブを開発し、標的蛋白質に対して近赤外蛍光プローブおよび ^{19}F プローブを集積化させ、*in vivo* 蛍光イメージング及び ^{19}F MRI によりその挙動を解析する。

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 23 件)

- ① S. Mizukami, M. Hosoda, T. Satake, S. Okada, Y. Hori, T. Furuta, K. Kikuchi "Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide" *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9524-9525 (2010) (査読有)
- ② Y. Hori, H. Ueno, S. Mizukami, K.

Kikuchi "Photoactive Yellow Protein-Based Protein Labeling System with Turn-on Fluorescence Intensity" *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16610-16611 (2009) (査読有)

③ S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi "Covalent Protein Labeling Based on Non-catalytic β -Lactamase and a Designed FRET Substrate" *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5016-5017 (2009) (査読有)

④ S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, K. Kikuchi "Dual Functional Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ^{19}F MRI" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 3641-3643 (2009) (査読有)

⑤ S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Wälchli, M. Shirakawa, K. Kikuchi "Paramagnetic Relaxation-based ^{19}F MRI Probe to Detect Protease Activity" *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 794-795 (2008) (査読有)

[学会発表] (計 102 件)

① K. Kikuchi "Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches" EMBL Conference Series - Chemical Biology 2010. Sep 25, 2010, Heidelberg, Germany

② K. Kikuchi "Chemical Probes for *in Vivo* Molecular Imaging" Pacificchem 2010, Dec 19, 2010, Honolulu, USA

③ K. Kikuchi "Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging" 2nd Asian Conference on Coordination Chemistry, Nov 11, 2009, Nanjing, China

④ K. Kikuchi "Development of Imaging Probes with Tunable Switches for Biological Applications" The 238th ACS National Meeting, Aug 19, 2009, Washington DC, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: タンパク質を蛍光標識する方法

発明者: 菊地和也, 堀雄一郎, 上野秀樹

権利者: 大阪大学

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2010/054024

出願年月日: 2009年3月10日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>