

細胞生命現象解明に向けた高次光機能性分子の精密設計

浦野 泰照

東京大学大学院薬学系研究科

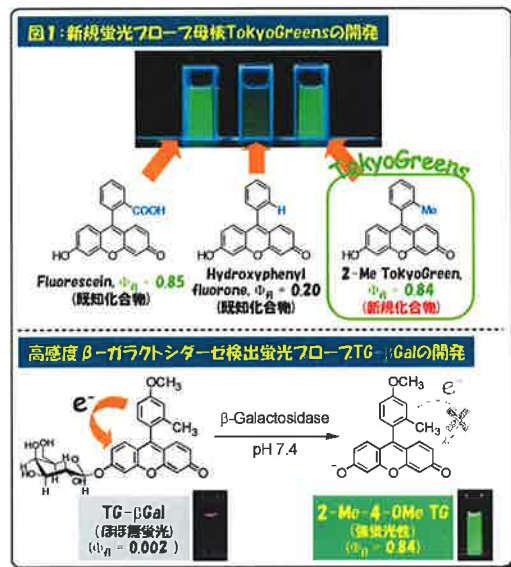
1. 研究のねらい

生命現象の包括的な理解を目指す上で、生きている状態の生物試料で起きている様々な事象を、リアルタイムかつ高感度に観測することは極めて重要である。このような観測を実現する手法として、蛍光プローブ、蛍光顕微鏡を用いる手法が近年汎用され、優れた成果が数多く挙げられている。しかし、生きている生物試料に適用可能な蛍光プローブの種類はまだ極めて少なく、ごく限られた検出対象分子の検出しか出来ないのも現状である。そこで私は、独自の「蛍光プローブの精密設計法」を多数確立し、これらを最大限に駆使することで、これまでは実現不可能であった高度な生命機能解析や疾患イメージングを可能とする、高次光機能性分子を創製できると考え、本さきがけ研究を開始した。

2. 研究成果

(a) 可視光励起で機能する光機能性分子の論理的精密設計法の確立

本さきがけ研究において私はまず、蛍光プローブを論理的に、精密に設計する手法の確立を目指した。蛍光プローブとは、検出対象分子と反応・結合することでその蛍光特性が大きく変化する分子であるが、任意の有機化合物の蛍光特性を予想することは現在でも極めて難しく、従来の蛍光プローブは試行錯誤により開発されることがほとんどであった。ここで私は、光誘起電子移動(PeT)過程による消光は、500 nm を超える波長の可視光励起蛍光団にも十分適用可能であることを見だし、蛍光団とは π 電子的に独立した蛍光制御部位のHOMO、LUMOエネルギーを制御することで、蛍光団の蛍光を論理的に消光させる手法を、複数独自に考案した。このPeTに基づく手法の確立により、経験則に頼ることなく論理的に蛍光プローブを設計することが可能となった。またPeTの観点から古典的なフルオレセイン骨格を大胆に見直すことで、蛍光プローブ母核として極めて有用な新規蛍光団TokyoGreen(TG)類を創製することに成功し(図1上)、この骨格に基づく全く新たな蛍光プローブ設計法の確立にも成功した。さらにごく最近、TG類のある特定の誘導体では、従来知られていなかった分子内環化による吸収波長の大きな変化を引き出すことが可能であることも見だし、さらに幅広い蛍光プローブ設計が可能となった。



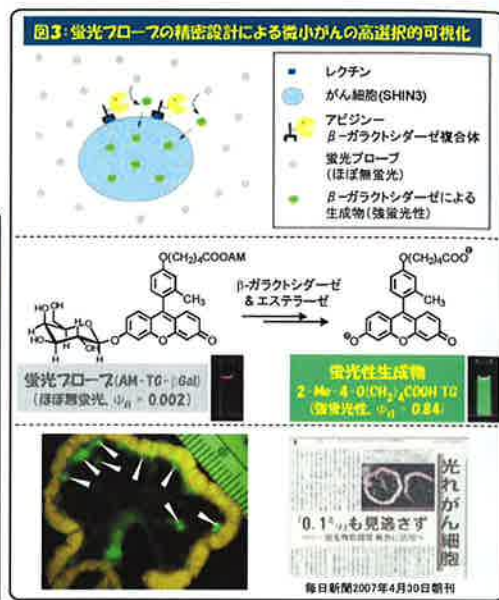
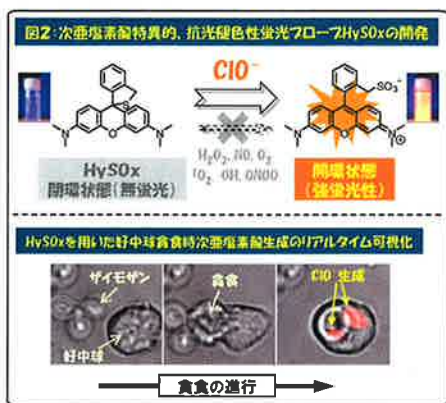
(b) 確立した設計法に基づく、各種新規光機能性分子類の精密設計・開発

上述の新設計法に則り、15種類を超える全く新たな観測を実現する蛍光プローブの開発に成功した。以下、代表的なプローブ2種を紹介する。フルオレセインは、そのキサンテン環部位がアニオンである場合と、電荷がない場合で還元電位が大きく変化することに着目し、PeT過程の精密制御により、加水分解されることで800倍の蛍光増大が期待される新規TG誘導体を開発することに成功した。実際この骨格を活用し、図1下に示した β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブTG- β Galなどの開発に成功した。TG- β Galは、生細胞に適用可能であり、かつ従来のプローブに比べて極めて高感度に β -ガラクトシダーゼ活性を検出可能である特長を有し、現在は市販されるに至っている。次に図2上に、分子内環化による吸光特性の変化を原理とする、次亜塩素酸イオン検出蛍光プローブHySOxの開発例を示した。HySOxは、活性酸素種の中でも次亜塩素酸を高選択的に検出可能であり、またローダミンを蛍光骨格とするため、光褪色に強く連続観測実験

に適用可能であるとの特長を有するプローブであることが明らかとなった。

(c) 開発に成功した蛍光プローブの活用による、全く新たな細胞現象イメージング・超早期微小がんイメージングの実現

開発に成功したプローブを活用することで、従来法では実現できなかった細胞現象の可視化、あるいは従来技術では検出不可能であった微小がんのイメージングを試みた。まず HySOx プローブを用い、ブタ好中球の食食時における次亜塩素酸生成のリアルタイム可視化を試み、これに成功した。すなわち好中球は、異物を食食したファゴソーム内のみ選択的に次亜塩素酸を発生させ、異物消化につなげている様子を可視化することに成功した (図2下)。



次に、細胞内滞留性の高い新規 TG-βGal 蛍光プローブを開発し (図3中)、これを用いた超早期がんイメージングを試みた。具体的にはがん細胞表面レクチンを介してがん細胞にのみβ-ガラクトシダーゼ活性を付与し、その後蛍光プローブを投与するという2ステップ法を考案し、これにより腹腔がんモデルマウス中のがん細胞のみを光らせることに成功した (図3上下)。プローブ自身はほぼ無蛍光であり、がん細胞表面でのみ強蛍光物質を生成するため、極めて高選択的ながん検出が可能であり、実際本手法は、0.1 mm サイズの超早期がんを検出・診断可能な画期的な方法であることが明らかとなった。

3. 主な発表

論文

- Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, "Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes" *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888-4894 (2005).
- M. Kamiya, H. Kobayashi, Y. Hama, Y. Koyama, M. Bernardo, T. Nagano, P. L. Choyke, Y. Urano, "An Enzymatically Activated Fluorescence Probe for Targeted Tumor Imaging" *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3918-3929 (2007).

招待講演

- Yasuteru Urano, "Sensitive and Selective Tumor Imaging with Novel and Highly Activatable Fluorescence Strategies", 第37回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム, Tokyo, Nov. 16, 2006.
- Yasuteru Urano, "Development of Novel Functional Fluorescence Probes Based on Rational and Flexible Design Strategies", Joint German-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry / Frontiers in Medicinal Chemistry, Berlin, Mar. 20, 2007.

4. その他

特許

- 浦野泰照、長野哲雄、上野匡、蛍光プローブ、US60/735,815、出願人：東京大学
- 浦野泰照、長野哲雄、見目勝、蛍光プローブ、特願 2006-057792、出願人：東京大学

受賞

- 平成18年度文部科学大臣・若手科学者賞 (2006年4月)
- 2006年 Invitrogen-Nature バイオテクノロジー賞 (2006年5月)