

「化学プローブのデザイン・合成による 分子イメージング」



大阪大学大学院工学研究科 教授 ^{きくち}菊地 ^{かずや}和也 氏

本日は「化学プローブのデザイン・合成による分子イメージング」というタイトルで話をさせていただきます。

私の行っている研究は、簡単に言いますと化学プローブを用いまして体の中の見えないものが見えるようにするものです。この研究を進めることで、動物や細胞をばらばらにしないで、そのまま分子の動態を分子が機能しているその場で明らかにしてきました。この目的の実施例として本日は、動物個体の応用例としましては MRI に化学技術をどのように使うか、そして、後半では、細胞内の分子動態を調べる蛍光イメージングのためにどのように分子をデザインできるかという話をしたいと思います。

まず、蛍光とは何かという話を簡単にしますが、蛍光とは、励起光を分子あるいは組織に当てまして、そこから光を測定するものです。この蛍光分子を生体内分子にさまざまに導入することによりまして、見えないものが見えるようにすることができます。

さて大阪大学に来てから行ってきた研究なのですが、最初にはフッ素の MRI プローブ、次にはたんぱく質のラベル化の話をしていきたいと思っています。

まずは MRI プローブですが、特に常磁性緩和促進というものをを用いまして、フッ素をもとに緩和時間をどのように変化させることができるかという話をしたいと思います。

MRI は核磁気共鳴を使った可視化でして、

これはラジオ波を使います。ラジオ波は非常にエネルギー状態が弱い電磁波を使うので、我々の体への影響が比較的少なく、装置が簡単です。しかし、非常に感度が悪いという問題点があります。蛍光に比べても 1,000 倍ぐらい感度が悪いですので、外から化学プローブを入れて可視化をするときは、蛍光プローブと比べ 1,000 倍ぐらい高濃度の分子を使わなければいけない。これはあまり現実的ではないです。その現実的ではないところをどのように工夫して可視化することができるかという話、試みについて説明します。

先ほどからスイッチ機能と言っているのですが、MRI プローブでは Tom Meade という人がガドリニウムの造影剤にスイッチを入れるということに成功しました。ただ、この場合の問題点は、このプローブは水を検出していますので、その水のシグナルが高いバックグラウンドになりまして、そのバックグラウンドの上にこの酵素反応によって切れてガドリニウムにくっつくようになった水のシグナルというのが上昇するわけです。つまり、ほとんどのシグナルが生体内に存在する水のシグナルに隠れてしまいます。

そこで、どのようにバックグラウンドを下げるかを考えると、水ではなくてフッ素を測定対象にすれば、我々の体の中には骨と歯に少ししか沈着していませんので、バックグラウンドのシグナルが低く測定できると考えました。

Eric Ahrens らが報告した例では、このフッ素をネズミの足に注射しますと、外から入れたこのフッ素化合物のシグナルだけが見えるということを示されています。そこで、私はこのフッ素プローブというものにスイッチ機能を組み込もうと考えました。

スイッチ機能で変化させる分光ファクターというのは横緩和時間、 T_2 です。この横緩和時間、 T_2 を横軸にとりまして、縦軸には MRI のシグナルの強さをとりますと、特に T_2 は短くなりますとシグナルは暗くなります。そこで、あらかじめ T_2 を短くしておきまして、これを酵素反応で長くしてやりますと、酵素反応をもとに遺伝子発現などで出てきた酵素があるところが白く見える、コントラストが上がるようなプローブができるに違いないと考えました。

それでは、この T_2 の制御をどのように行うかということですが、測定したい核種はフッ素ですので、フッ素のそばにガドリニウム錯体を結合させたプローブを作ります、これは磁石を2つ近くに置くような状態をつくることになります。そうしますと常磁性緩和促進 (PRE) という2つの磁石の相互作用によりまして、近い状態では T_2 は短くなりますし、この距離が長くなると T_2 は長くなります。このとき MRI のピークを測定すると、近い状態ではブロード化しますし、遠くの状態ではシャープになります。そして、コントラストは近いと暗いですし、遠いと白くなります。

そこで、このガドリニウムとフッ素の間を酵素で切ることができるリンカーで結びまして、この間を酵素で切ってやると酵素のあるところだけ白く見える、こういうプローブができるに違いないと考えました。

まず、ガドリニウムをくっつけない分子をつくり NMR のピークを測定しますと、シャープ

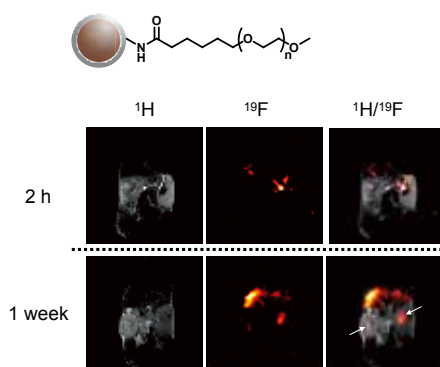
なピークが観測されます。次に、ガドリニウムをプローブに配位させますとピークはブロード化します。さらに、このプローブを標的酵素である Caspase-3 で切ってやりますと、NMR のピークが長くなりまして、 T_2 も長くなります。この分子の活性を測定してやりますと、このように Caspase-3 があるところでは MRI によってコントラストが白く上がるということが示されました。

Caspase-3 はアポトーシスに関係する酵素ですので、アポトーシスを検出しようとしたのですが、さらに遺伝子発現を検出するために、遺伝子発現の指標となります酵素、 β -ガラクトシダーゼや β -ラクタマーゼで切ることができる基質をつくりました。このプローブをつくりまして、生細胞に発現した β -ラクタマーゼ活性を検出することで細胞における遺伝子発現を MRI で可視化できることを示しました。

さらにこれをネズミの脳に利用しまして、マウスの胎児における遺伝子発現を計測しようとトライしましたが、感度を上げなければ短い時間で遺伝子発現の場所を正確に測定できないということがわかってきました。

そこで、フッ素プローブを高感度化する手法を考えることにしました。高感度化を単純に考えると測定元素の数を増やせば良いのですが、MRI プローブの場合は単純に数を増やしますと分子の運動性が悪くなりまして、シグナルが消えてしまうということがわかりました。そこで、分子の運動性を確保しながら数を増やす方法としまして、シリカのナノ粒子の中にフッ素化合物を内包することにしました。これは PFCE という磁性的に単一のフッ素を数多くした分子を多数ナノ粒子の中にくるみまして、これを安定で存在化させる手法です。この手法を使いますと、ナノ粒子の中ではフッ素の元素

の運動性はほとんど阻害されず、長い T_2 とシャープなピークが確保できるということが示されました。



フッ素含有ナノシリカ粒子を用いたがん組織のMRI画像

そこで次に、担がんマウスを用いまして、がん組織への集積性を調べました。これは、生体適合性を有しますペグ化をしたナノ粒子を用いることでオプソニン化を逃れまして、生体内を循環することでこのようにがん組織が検出できました。

現在では、例えば樹状細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞をMRIで追跡する。あるいは酵素反応を追いかけるといった試みを行っているのですが、中に含まれるフッ素化合物の構造を変えますと多色で染め分けをすることができます。あるいは、これはメソ多孔のシリカを用いることで、薬物放出系にもこのナノ粒子を用いることができます。これは薬物を放出するナノ粒子の動態をMRIで追いかけて調べるという手法です。

このように、特に私は現在、免疫学フロンティア研究センターで免疫学の先生たちとこれらの共同研究を推進しているところであります。

ここまですりMRIの話で、最後に蛍光プローブ、特にたんぱく質のラベル化プローブについてどのような試みを行っているかという話をしたいと思います。

うちの研究室では、発現したたんぱく質に有

機合成した化合物を結合させまして、特異的にラベル化を行うことで調べたい分子のみを可視化するという試みを行っています。

通常の標識技術は常に光っている蛍光プローブを入れますが、私どもの研究室では、たんぱく質に貼りついた後だけ光るような蛍光プローブをつくるのができれば、簡単な実験で標的分子だけを光らせることができるだろうと考えました。その試みとしましてPYPと β -ラクタマーゼという2つのたんぱく質を使って研究を行っているのですが、今日は時間の関係上、PYPの紹介だけしたいと思います。

PYPは何かといいますと、これはPhotoactive Yellow Proteinというたんぱく質の省略形として、小さいというのが利点です。それから、我々などの哺乳類の細胞にはPYPが結合する基質は存在しないので、非常に特異性が高いと考えました。

このようなたんぱく質を用いまして幾つかプローブを作製してきたのですが、これから素早く標的たんぱく質をラベル化する手法について話したいと思います。

PYPはクマリンの類縁体を取り込みます。クマリンという分子は強く蛍光性がある分子なのですが、通常はヒドロキシ基を有しています。このヒドロキシ基をアミノ基に置きかえますと環境依存的な色素に変わります。この色素は有機溶媒の中では強く光るのですが、水の中では全然光らない分子です。たんぱく質の結合サイトは有機溶媒のように非常に脂溶性が高い環境ですので、このアミノ基がついたクマリン類縁体を水に溶かしておく、つまり細胞培養液に入れた状態では全然蛍光が出ないのですが、たんぱく質に結合すると脂溶性の環境になり光るようになると思われました。

貼りつける分子は、負電荷を持ったカルボン酸を持った脱離基、あるいは正電荷を持ったア

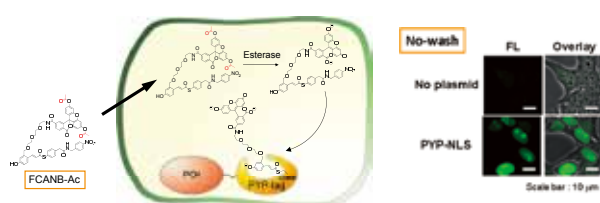
ミノ基を持った脱離基を有した分子、の2つをつくりました。そして、この反応速度を調べてみますと、正電荷があったものではほとんど20秒ぐらいで反応が終わってしまうのですが、負電荷のものは非常に遅いということがわかりました。

ならば、この正電荷を持ったものを使えばいいんじゃないかと考えられるかもしれませんが、正電荷を持った化合物はミトコンドリアなどの特定の細胞内オルガネラに局在しやすいという問題があります。そこで、負電荷を持った基質を速く反応させる必要があります。

ここで、たんぱく質の結合サイトにも負電荷を持ったアミノ酸があることが問題点となります。つまり、基質とたんぱく質のマイナスとマイナス同士が反発するので速く結合しないと考えました。

この問題点を解決するため、まずたんぱく質側の3つの負電荷を持ったアミノ酸を、アルギニンに置きかえてやると反応が速くなる、つまりマイナスをプラスにすると反応が速くなるということがわかりました。基質結合時に放出される部分の pK_a 値を少し小さくしますと、脱離する速度が速くなり、早く結合する基質ができることがわかりました。

そうしますと、無洗浄のラベル化は、細胞培養液にこの蛍光分子を入れてやるとほぼ2分で核内に発現したたんぱく質をきれいに染める、しかも強く光らせることができることがわかりました。



PYPと細胞膜透過性基質を用いた細胞内たんぱく質タグ化

このようにケミカルにトリックを入れた分子を使うことによりまして、ほかの技術では見えないものを見えるようにしようという試みを幾つも行っております。

最後ですが、我々ケミストは、試験管の中で機能する分子を出すだけでなく、実際に使うことができる分子をつくる必要があると考えています。まだまだ発展途上ですが、これから先、もっともっと自分の道を切り開いていきたいと考えています。

どうもありがとうございました。(拍手)

【講師紹介】 菊地 和也 氏

大阪大学大学院工学研究科 教授

昭和63年 3月 東京大学薬学部卒業

平成 6年 3月 東京大学大学院薬学系研究科修了

平成 6年 4月～平成6年7月

日本学術振興会特別研究員PD

平成 6年 7月～平成7年6月

カリフォルニア大学サンディエゴ

校化学科及び薬理学科

R.Y.Tsien教授研究室ポストドク

トラルフェロー

平成 7年 7月～平成8年12月

スクリプス研究所化学科

D. Hilvert教授研究室ポストドク

トラルフェロー

平成 9年 1月～平成12年11月

東京大学大学院薬学系研究科助手

平成12年12月～平成17年6月

東京大学大学院薬学系研究科助教授

平成17年 7月～現在

大阪大学大学院工学研究科教授

平成21年 8月～現在

大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授(兼任)