

研究課題別評価書

1. 研究課題名

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

2. 氏名

浦野 泰照

3. 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光機能性分子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等しか出来ないのが現状である。ここで私は、自身のこれまでの研究成果による「蛍光プローブの精密設計法」をさらに拡充し、そ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を可能とする、高次光機能性分子を創製することを柱とする本さきがけ研究を開始した。すなわち本研究では、励起状態にあるプローブ分子の緩和過程を、論理的かつ精密に制御することで、革新的な生体機能解析システムを多数構築することを狙いとした。

4. 研究成果

(1) 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、蛍光プローブに代表される光機能性分子の論理的精密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難しく、従来の蛍光プローブ開発は、試行錯誤に頼る以外方法がなかった。ここで私は、光誘起電子移動 (Photoinduced electron transfer; PeT) 過程による消光は、実用性の高い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 エネルギーレベルを制御することで、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)、この骨格の蛍光特性を活用することで、全く新たな蛍光プローブ群の創製を可能とする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。

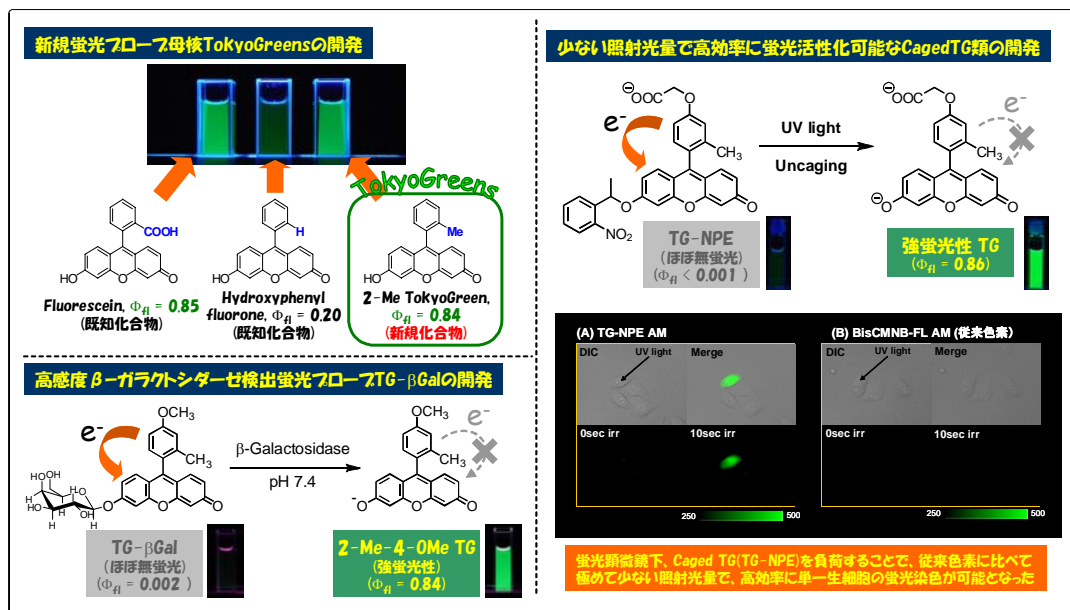


図1 左上：光誘起電子移動の観点からフルオレセイン骨格を改変することで誕生した新規蛍光団TokyoGreen(TG)類 左下：TG類の蛍光特性を活用することで全く新しい蛍光プローブの論理的設計法を確立し、生細胞系への適用が可能な世界初のβ-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブTG-βGalの開発に成功した。右：同設計法を活用し、極めて少ない紫外線照射光量によって、最大限の蛍光活性化を実現する新規Caged蛍光色素(Caged TG類)の開発に成功した。TG-NPEを負荷した細胞では、市販されている同目的のCaged蛍光色素に比べて少ない照射光量で、高効率に単一生細胞の蛍光染色が可能であった。

(2) 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 PeT、分子内環化に基づく設計法に則り、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。以下具体的にいくつか紹介する。フルオレセインは、そのキサント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わるため、適切な電子ドナー部位を有する TG を開発することで、加水分解酵素に対する蛍光プローブの設計が可能となる。この原理を活用し、図 1 左下に示した β-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ TG-β Gal の開発に成功した。β-ガラクトシダーゼ(遺伝子名 lacZ)は、生物学研究領域で最も汎用されているレポーター酵素の1つであるが、従来この活性を生細胞系で検出するプローブは開発されておらず、専ら細胞を固定した後比色性試薬による染色によってその検出が行われてきた。私が開発することに成功した TG-β Gal プローブは生細胞での検出が可能であり、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など優れた特長を有することから、今後の lacZ 解析のスタンダードとなることが大いに期待される。実際本プローブは 2006 年から市販され、現在では多くの研究者に使用されるようになっている。

上記の設計原理の適用範囲は極めて広く、例えば TG-β Gal のガラクトース部位を光感受性保護基であるニトロベンジル基に変換することで、高感度 Caged 蛍光色素として機能する TG-NPE が開発された(図 1 右上)。本プローブ自身はほぼ無蛍光であるが、350 nm の光を照射することで光解除性保護基が外れ、高蛍光性の TG が生成し、劇的な蛍光強度の上昇が起こることが明らかとなった。また TG-NPE は生細胞へ容易に導入可能であり、ここに 10 秒程度の短い解除光を、照射部位を局限して照射することで、単一細胞の明確な追跡が可能であることも確かめられた(図 1 右下)。従来の Caged 蛍光色素は光感受性保護基を1分子内に 2 つ有していたため、蛍光上昇を実現するためには高い照射光量が必要であり、生細胞に対する傷害が問題となっていたが、TG-NPE はこの問題を解決し、高効率に細胞、タンパク質などのラベル化が可能であり、極め

て実用性の高い Caged 蛍光色素である。

次にニトロ化ストレス検出蛍光プローブの開発事例を紹介する。パーオキシナイトライトによるグアニンのニトロ化などを引き起こす生体ニトロ化ストレスは、最近新たな病態要因として注目されており、またごく最近では、新しい生体分子修飾モードの初発反応としての重要性が指摘されるなど、生物・医学領域で大きな注目を集めているが、このニトロ化ストレスを特異的に検知するプローブはこれまで開発例がなかった。ここで私は、従来特殊な消光団として考えられてきたニトロ基であるが、実はその消光は強い電子吸引性に由来する PeT によるものであることを物理化学的に明らかにし、さらにその知見に基づきニトロ化されることで初めて蛍光を発する蛍光プローブ NiSPY 類の開発に成功した(図2)。本プローブは私がこれまでに確立してきた Pe T に基づく蛍光特性制御技術を駆使することで初めて誕生したものであり、極めて高選択的に生細胞内のニトロ化ストレスを検知することが可能である。本プローブもまもなく市販されることになっている。

最後に図3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の開発例を示した。本プローブ(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いう特長を有するプローブであることも明らかとなった。

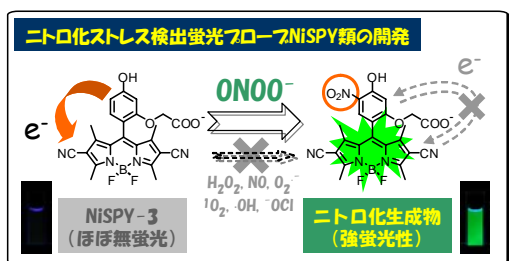


図2 分子内光誘起電子移動過程を精密に制御することで、全く新しいニトロ化ストレス検出蛍光プローブNiSPY類の開発に成功した。本プローブはニトロ化されることで飛躍的に蛍光強度が増大するため、パーオキシナイトライトの極めて高感度な検出が可能となった。

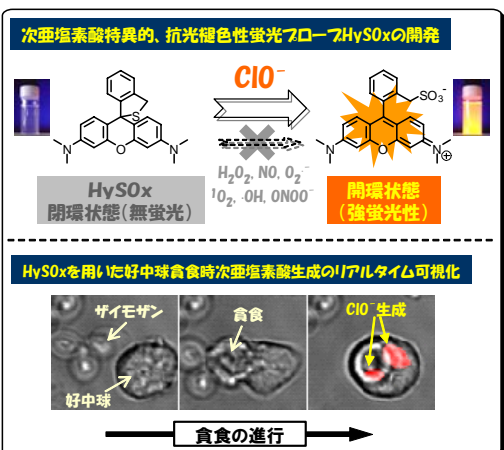


図3 全く新たな分子内開環・閉環による蛍光制御が可能とな新規ローダミン骨格の構築に成功し、これを活用して極めて選択性の高い次亜塩素酸検出蛍光プローブHySOxの開発に成功した。またHySOxを用いることで、好中球貪食時に貪食胞内で生成する次亜塩素酸をリアルタイムに可視化することに初めて成功した。

蛍光プローブの精密設計による微小がんの高選択的可視化

- レクチン
- がん細胞 (SHIN3)
- アビジン
- β-ガラクトシダーゼ複合体
- 蛍光プローブ (ほぼ無蛍光)
- β-ガラクトシダーゼによる生成物 (強蛍光性)

蛍光プローブ (AM-TG-βGal) (ほぼ無蛍光, Φ_{fl} = 0.002) + β-ガラクトシダーゼ & エステラーゼ → 蛍光性生成物 2-Me-4-O(CH₂)₄COOH TG (強蛍光性, Φ_{fl} = 0.84)

毎日新聞2007年4月30日朝刊

図4 がん部位を認識して初めて蛍光を発するプローブを開発し、これを用いて高感度・高選択的ながんイメージングの実現に成功した。具体的には、がん細胞特異的な酵素活性ターゲティング手法と、新たに開発した細胞内滞留性の高いβ-ガラクトシダーゼ活性検出プローブを組み合わせることで、がんモデルマウス腹腔内のmm以下の微小がん部位を高選択的、高感度に検出・可視化することに成功した。

(3) 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超早期がんのイメージングに成功した。まず上述の HySOx プローブを用い、ブタ好中球の貪食時における次亜塩素酸生成のリアルタイム可視化に成功した(図3下)。すなわち好中球は、異物を貪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。

次に、上述した TG- β Gal の細胞内滞留性を向上させた新規 β -ガラクトシダーゼ蛍光プローブを開発し、これを活用した微小がんイメージングを試みた。がん細胞表面レクチンを活用して、がん細胞にのみ β -ガラクトシダーゼ活性をまず付与し、その後蛍光プローブを投与するという2ステップ法を用い、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4)。本手法に用いたプローブ自身はほぼ無蛍光であり、かつがん細胞膜上でのみ強蛍光性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。

5. 自己評価

光励起エネルギーを吸収して生成する一重項・三重項励起状態の分子の緩和過程を、光誘起電子移動(PeT)を活用して精密に制御することで、様々な生命現象を可視化し、生命機能要因解析などを画期的に進展させる分子ツールを開発することが、私のさきがけ研究のテーマである。3年半の研究期間で、PeT に基づく励起状態寿命、経路の制御法を数多く確立し、これに基づき TokyoGreen 骨格など新規蛍光骨格を見いだすことにも成功し、その結果、極めて広範な検出対象に対する蛍光プローブを数多く開発することに成功した。開発したプローブは全て、生きている生物試料に直接適用可能なものばかりであり、生物学領域研究にすぐに活用できる実用性を持っている。実際4種類のプローブについては既に市販され、多くの研究者が使うところとなっている。さらに研究開始当初は予定していなかったが、蛍光シグナルの劇的な ON/OFF を活用し、動物個体の微小がん部位を高選択的に検出可能なプローブ・技法を複数開発することにも成功した。本成果はがん研究領域に大きなインパクトを与えており、最近、がん関連の多くの学会で招待講演を依頼されるようになった。三重項励起状態の制御についての成果については紙面の都合で省略したが、これについても多くの画期的な成果を上げることが出来、全く新たな光増感ツール、蛍光ツールの開発に成功した。以上の成果は、私が研究開始当初考えていた3年半後の到達点をはるかに超えるものであり、高い自己評価を与えて良いと考えているが、これらの成果は、本さきがけ領域のアドバイザーの先生方、さきがけ研究者仲間との数多くの共同研究、議論によるところが大きく、この様な研究機会を与えていただいた寺部総括をはじめとするアドバイザーの先生方に深く感謝いたします。

6. 研究総括の見解

生体内反応を可視化するために目的に応じて発光する蛍光プローブの精密設計法を確立した。

その方法に基づいて各種優れた蛍光プローブを開発し、その有用性を多くの例で実証している。主たる成果は次の3点である。

- ①光誘起電子移動過程による消光に基づいて、広い応用範囲を有する蛍光プローブ母核となる蛍光団 TokyoGreen(TG)類の開発に成功した。
- ②この手法を用いて 15 種類を超える有用な蛍光プローブを開発し、設計理論の汎用性を実証した。
- ③さらに、この蛍光プローブ設計法を早期がんのイメージングに展開し、がん細胞のみで強い蛍光性を示すプローブを実現した。

オリジナルな発想に基づく極めて優れた成果である。学術的に独立性が高く、しかも波及効果が大きいという点で高く評価したい。蛍光プローブの幾つかが実際に市販されるに到っていることも特筆に値する。

研究成果は27篇の原著論文、30件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許4件を出願している。また平成17年には、「第16回加藤記念バイオサイエンス研究助成」、平成18年度には、「文部科学大臣表彰若手科学者賞」、「Invitrogen-Nature Biotechnology Award 2006」を受賞している。

今後、フルオレセイン以外の色素分子への一般化など、様々な化学的・物理的性質のプローブとして発展することを強く期待する。本研究で確立した方法論のさらなる発展は、将来バイオ・医療応用分野に大きな革新をもたらすと考えられる。

7. 主な論文等

(A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Yasuteru Urano, Mako Kamiya, Kojiro Kanda, Tasuku Ueno, Kenzo Hirose and Tetsuo Nagano, “Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes”, J. Am. Chem. Soc., 127, 4888–4894 (2005).
- ・ Tasuku Ueno, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, “Mechanism-Based Molecular Design of Highly Selective Fluorescence Probes for Nitritative Stress”, J. Am. Chem. Soc., 128, 10640–10641 (2006).
- ・ Mako Kamiya, Hisataka Kobayashi, Yukihiro Hama, Yoshinori Koyama, Marcelino Bernardo, Tetsuo Nagano, Peter Choyke, Yasuteru Urano, “An Enzymatically Activated Fluorescence Probe for Targeted Tumor Imaging”, J. Am. Chem. Soc., 129, 3918–3929 (2007).
- ・ Suguru Kenmoku, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, “Development of a Highly Specific, Rhodamine-Based Fluorescence Probe for Hypochlorous Acid and Its Application to Real-Time Imaging of Phagocytosis”, J. Am. Chem. Soc., 129, 7313–7318 (2007).
- ・ Takatoshi Yogo, Yasuteru Urano, Akiko Mizushima, Hisato Sunahara, Takanari Inoue, Kenzo

Hirose, Masamitsu Iino, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, “Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment-sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer”, Proc. Natl. Acad. Sci., 105, 28-32 (2008).

(2)特許出願

発明者:長野哲雄、浦野泰照、上野匡

発明の名称:蛍光プローブ

出願人:東京大学

出願日:2005.11.14

出願番号:US60/735,815

発明者:長野哲雄、浦野泰照、高倉栄男

発明の名称:生物発光プローブ

出願人:東京大学

出願日:2006.03.29

出願番号:特願 2006-089936

発明者:長野哲雄、浦野泰照、高倉栄男

発明の名称:生物発光プローブ

出願人:東京大学

出願日:2005.09.30

出願番号:特願 2005-286948

発明者:長野哲雄、浦野泰照、見目勝

発明の名称:蛍光プローブ

出願人:東京大学

出願日:2006.03.03

出願番号:特願 2006-057792

(3)受賞

平成 17 年 3 月 第 16 回加藤記念バイオサイエンス研究助成

平成 18 年 4 月 平成 18 年度 文部科学大臣表彰若手科学者賞

平成 18 年 6 月 Invitrogen-Nature Biotechnology Award 2006

(4)学会発表

口頭発表(国際)

・ Yasuteru Urano, Tasuku Ueno, Mako Kamiya, Yoko Wada, Tetsuo Nagano, “Rational and

Flexible Design Strategies of Novel Fluorescence Probes Based on the Evolution of Fluorescein Molecule”、Pacifichem2005、2005

・ Yasuteru Urano, Mako Kamiya, Kojiro Kanda, Tetsuo Nagano、“Rational design of novel fluorescence probes for pH, hydrolase and reactive oxygen species based on photoinduced electron transfer”、Gordon Research Conference 2005 on Bioanalytical Sensors、2006

・ Yasuteru Urano、“Sensitive and Selective Tumor Imaging with Novel and Highly Activatable Fluorescence Strategies”、BIOS 2008, SPIE Photonic West、2008

口頭発表(国内)

・ 浦野泰照、上野匡、長野哲雄、“光誘起電子移動に基づくパーオキシナイトライト高選択蛍光プローブの開発”、日本ケミカルバイオロジー研究会 第1回年会、2006

・ 浦野泰照、神谷真子、長野哲雄、“論理的設計法に基づく高感度 β -ガラクトシダーゼ蛍光プローブの開発”、第1回日本分子イメージング学会学術集会、2006

(5) 招待講演

招待講演(国際)

・ Yasuteru Urano、“Highly sensitive and selective fluorescence imaging of tumors using novel activatable strategies”、高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム 2006、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、2007

・ Yasuteru Urano、“Sensitive and Highly Selective Tumor Imaging with Novel “Smart” Fluorescence Probes”、The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences “On the Frontiers of Chemical Biology”、2007

招待講演(国内)

・ 浦野泰照、“蛍光、発光、増感能を制御して、新しい生物研究ツールを創り出す”、第19回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2006

・ 浦野泰照、“スマートプローブの精密設計に基づく高S/Nがん蛍光イメージング”、第66回日本癌学会学術集会、2007

(B) その他の主な成果

なし