

バイオイメージングプローブの開発と生体への応用に関する研究

長野 哲雄

Development and Biological Applications of Various Bioimaging Probes

Tetsuo NAGANO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

(Received July 10, 2006)

Fluorescence imaging is the most powerful technique currently available for continuous observation of dynamic intracellular processes in living cells. However, only a very limited range of biomolecules can be visualized because of the lack of flexible design strategies for fluorescence probes. In our laboratory, it was elucidated that fluorescein which has been widely employed as a core of fluorescence probes could be understood as a directly linked electron donor/fluorophore acceptor system. Fluorescence properties of fluorescein derivatives could be easily anticipated and modulated by controlling the rate of photoinduced electron transfer (PeT) from the donor moiety to the xanthene fluorophore. Further, we found that the opposite direction of PeT from the singlet excited fluorophore to the electron acceptor moiety could be occurred. More than twenty probes for imaging of nitric oxide, β -galactosidase, highly reactive oxygen species, zinc ion et al. have been developed according to precise and rational design strategies based on PeT mechanism.

Key words—fluorescence; photoinduced electron transfer; imaging; probe; nitric oxide

1. はじめに

生命科学研究の究極の目的は“生命の仕組み”を明らかにすることであり、そのための手段として分子イメージング技術の重要性が指摘されている。生きている状態の細胞、生体組織あるいは *in vivo* において生理活性分子（酵素、受容体、DNA、糖、NO 等の生理活性小分子など）を直接捉え、それらの活性や変化量を時間と場所を特定して（時空間的に）検出することが求められており、この検出を可能にするために、細胞や生体組織を直接観測するバイオイメージング技術の進展が待ち望まれている。

イメージング法として PET, SPCET, MRI, 蛍光が知られているが、それぞれに長所と短所がある。例えば、空間分解能に関しては MRI が優れている。蛍光は表層であれば、MRI とほぼ同等の高い分解能が得られる。一方、時間分解能に関しては、PET 及び蛍光が優れており、MRI では 1 mm の分

解能であれば 0.1 sec でよいが、30 μ m の分解能を得るためには約 1 hr を必要とする。検出感度の観点からは、PET と SPECT では 10^{-9} — 10^{-12} mol/kg, 蛍光では 10^{-9} M である。MRI はそれほど高くない。これらの特徴と同時に、使用上の簡便性や価格などが加味され、目的に応じてそれぞれのモダリティが使用されることになる。PET, SPECT, MRI は主に臨床で使用され、基礎生命科学研究においてはそれほど用いられていない。一方、蛍光は高感度かつ高い分解能という特徴に基づいて、細胞レベルや生体組織などを用いた基礎生命科学の分野で汎用されている。

本研究は、蛍光に基づいたイメージング技術、特にイメージングのための新規プローブの開発を行ったものである。蛍光イメージング技術には蛍光顕微鏡に代表される測定機器のハード面と化学物質であるプローブのソフト面があり、ハード面の開発の進展は極めて著しいが、その一方でソフト面の実用的な蛍光イメージングプローブの開発研究は、われわれの研究がスタートするまで Ca^{2+} 蛍光プローブなどでわずかに知られているのみで、ほとんど手つかずの状態であった。

東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

e-mail: tlong@mol.f.u-tokyo.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会賞の受賞を記念して記述したものである。

本研究は蛍光バイオイメージングプローブを20数種類開発したものである。プローブは、「物理光化学に基づいた蛍光発光の制御原理の解明」→「原理に基づいて有機化学によるバイオイメージングプローブの分子設計・開発」→「薬理学・生物学によるバイオイメージングプローブの評価及び生体機能解析」→「バイオイメージングプローブの実用化・市販化」の一連の研究を大学の一研究室において行った。12種類のバイオイメージングプローブについては既に市販している。これらのプローブは生理活性分子の機能解析を目的として世界中の生命科学研究者に汎用されており、生命科学及び薬学の進展に大きく寄与している。

2. プローブの分子設計原理

蛍光イメージングプローブは、Photoinduced electron Transfer (PeT: 光誘起電子移動) 機構,¹⁻⁷⁾ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET: 蛍光共鳴エネルギー移動) 機構, Intramolecular Charge Transfer (ICT: 分子内電荷移動) 機構^{8,9)}を原理として開発された。特に、PeT現象がフルオレセインを始めとする通常の蛍光化合物で生じること、この機構に基づいてプローブが分子設計できることを示した意義は極めて大きい。この原理は励起状態の化学全般に適用できるものであり、励起状態からの消光過程を論理的に制御できることを示したものである。

細胞内のイベント、すなわち目的とする生理活性分子の濃度変化や活性変化などを捉える蛍光プローブは以下の2つに分けられる。すなわち、(a) 目的分子との反応により新たに蛍光を発するようになる(蛍光のOFF/ON)プローブ、又はその逆(蛍光のON/OFF)のプローブ、(b) 目的分子との反応により吸収波長や蛍光波長がシフトする(波長シフト)プローブの2つである。PeT機構は(a)の蛍光OFF/OFF(あるいはON/OFF)型であり、FRET機構とICT機構は(b)の波長シフト型である。

2-1. 蛍光OFF/OFF型プローブ

光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer: PeT) 金属イオンの濃度の上昇などをプローブの蛍光OFF/OFFに変換する機構はいくつか報告されている。例えば(1) 蛍光団同士の会合が目的物との反応又は錯形成などにより解消することで蛍光がOFFからONへと変化する、(2) ある環境

下(例えば、cyclodextrinでの包接など)でexcimer蛍光を発していた蛍光団が、目的物による環境の変化(cyclodextrinからの追い出し)などでexcimer蛍光を発しなくなる、などである。しかしながらこれらは有機溶媒中でしか機能しないものが多く、細胞内解析試薬としては一般には使えない。感度や選択性の面でも十分でない場合がほとんどである。

ここでPeT機構について、われわれが開発に成功した一酸化窒素(NO)検出蛍光プローブ(DAF-2)¹⁰⁻¹⁸⁾を用いて簡単に説明しよう(Fig. 1)。NOは循環器系における血圧調節、中枢神経系における神経伝達、免疫系における異物排除など、生体において多種多様な生理機能を有しており、1998年にノーベル賞の受賞対象になった活性種で、最も重要な生理活性分子の一種である。NOは二原子分子であり、酸素分子や活性酸素種と反応し多くの活性種を生成するが、NOは主に生体内で酸素による酸化を受け、 N_2O_3 を中間体として生成する。 N_2O_3 は NO^+ を供与できる強力なニトロソ化試薬であり、S-ニトロソ化など様々な生体反応に係わっているが、詳細な機能解明までには至っていない。

さて、PeT機構であるが、蛍光は光により励起された電子が元の状態に戻るときに生じる発光である(Fig. 1右図)。しかし、Fig. 1の左図に示すように光励起により不対電子となった蛍光団に電子供与性化合物(以後、donorと呼ぶ)からの一電子が入り、励起された蛍光団の電子は元に戻ることができなくなる。電子は空いたdonorのHOMOに入ることになり、結果として蛍光を生じない。この光誘起による電子移動をPeTと呼ぶ。DAFの場合、donor部位はdiaminobenzene環であり、蛍光団はxanthene骨格(6-hydroxy-3H-xanthen-3-one)と考えられ、励起されたxanthene骨格にdonorであるdiaminobenzeneから一電子が入り、蛍光を生じなくなったものである(Fig. 1左図)。しかし、DAFがNOと反応することによりbenzotriazole環が生成すると、そのHOMOエネルギーレベルはdiaminobenzeneに比べ、低くなり安定化する。その結果励起状態にある蛍光団に電子移動することができず、通常の蛍光物質のようにDAF-2 Tは強い蛍光を生じることになる(Fig. 1右図)。

DAFの基本骨格であるfluoresceinを2つのcom-

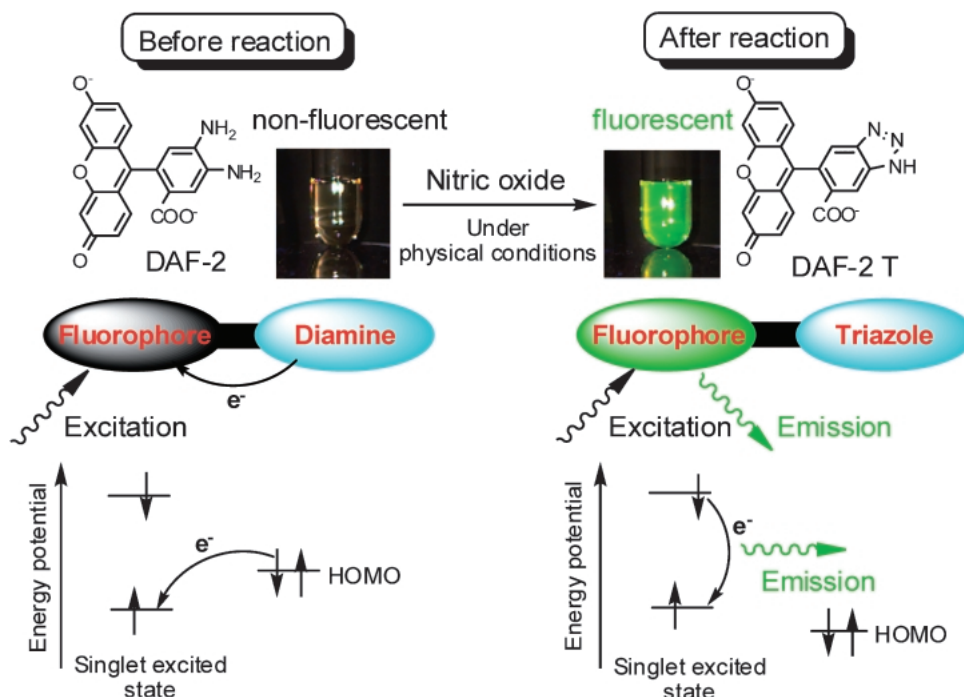


Fig. 1. Off/On Switching of Fluorescence based on PeT Mechanism

ponentに分け得る根拠は、(1) benzene 環部分に十分な置換基を導入しても、誘導体の吸収（励起）波長・蛍光波長はともにほとんど変化しない、(2) xanthene 環のみでも fluorescein とほぼ同じ波長に蛍光を持ち、その量子収率も fluorescein のそれとほぼ等しい、(3) X 線結晶構造解析から結晶状態で benzene 環と xanthene 環とはほぼ直交していることが明らかになっている、などである。これらを総合すると、溶液中においても benzene 環/xanthene 環はほぼ直交していてこれら 2 部位間の電子的な相互作用は小さいと考えられる。DAF における diaminobenzene 環のように電子供与性の強い置換基を持つ場合に蛍光が弱いことから、これら benzene 環部分を電子供与体とし xanthene 環を電子受容体とする電子移動が蛍光消光の機構であると考えられる。この機構は過渡吸収スペクトル、ESR を用いて、電荷分離状態（charge separation state）を検出し、標品ラジカル種と比較することで確立された。¹⁾

ここでは、fluorescein を蛍光団として用いていた例を紹介した。Fluorescein は古くから知られた蛍光性化合物で、今までに pH に依存した構造変化とそれに伴う蛍光強度の変化を利用した pH 指示薬として、またペプチドやタンパク質、核酸の蛍光標識

試薬として広く用いられてきた。医学の面では眼底検査用の試薬としても使われた。その理由は主に、(a) 高い蛍光量子収率 (ϕ_f) を持つ ($\phi_f=0.85$)、(b) 長波長励起が可能である ($\lambda_{\text{abs}}=492 \text{ nm}$)、(c) 高い水溶性を有する、などの利点による。

しかしながら、PeT 原理は蛍光団として fluorescein だけではなく、広く他の蛍光物質にも適用できる。すなわち、この原理を他の蛍光プローブ開発に応用するためには、donor に観測対象の生体分子と反応する官能基 (NO の場合は diamine) を付加し、反応生成物の HOMO を低く安定化させるように設計することで、極微弱な蛍光性化合物を強蛍光性物質に変化させることができる。われわれは fluorescein を BODIPY に変換した NO 蛍光プローブ (DAMBO,^{19,20} MAMBO) の開発にも成功し、NO の検出に対して DAF に比べ数倍の感度向上が達成されている。

ウシ大動脈血管内皮細胞より産生される生理的 NO を捉えるために高感度プローブである MAMBO を用いてイメージングを試みたところ、bradykinin 刺激により素早い蛍光の上昇がみられた。NO 合成酵素阻害剤である L-NAME で蛍光上昇がみられなかったことと光学異性体の D-NAME で阻害が係らなかったことから、確かに内因性の NO

を捉えていることが示唆された。細胞質局在性の DAF 類でも細胞内での蛍光上昇がみられたが、細胞外の蛍光も同時に上昇した。このように MAMBO は細胞内を高い S/N 比でイメージできるとともに、漏れ難い性質から細胞内外を区別して NO の挙動を観察できる利点を有している。また、MAMBO に目立った細胞毒性のないことも確認されている。

BODIPY を蛍光団とした実用的蛍光プローブの報告はほとんどなく、MAMBO は疎水性部位に局在する実用的な蛍光プローブであることが示された。MAMBO は様々な細胞系に应用可能であり、親水性プローブと組み合わせて用いることで、局在という概念を含んだ NO⁺ の新たな知見を得ることができると期待される。

これまでに NO 蛍光バイオイメージングプローブとして、6 つの製品を世に送りだしている (DAF-2, DAF-2 DA, DAF-FM, DAF-FM DA, DAR-4M, DAR-4M AM)。蛍光プローブを用いることにより高感度かつ簡便に細胞内で生成する NO をリアルタイムで画像として捉え、NO のダイナミックな生理機序の解明を行うことができるような

った。NO 蛍光プローブが開発されるまでは、特異性の低い NO 合成酵素阻害剤によるデータだけで、確かな証拠に基づいた議論が行われておらず、特に神経系における機能は混沌としていた。このような状況下、培養細胞から NO を捉えることに初めて成功したことは世界に大きなインパクトを与えている。

また、この PeT 機構を原理とする蛍光 OFF/ON 原理は NO プローブの開発に限ったものではない。実際、同様の原理で一重項酸素検出蛍光プローブ^{3,4)} Zn 検出蛍光プローブ²¹⁻²⁹⁾ 活性酸素検出蛍光プローブ^{30,31)} の開発にも成功している (Fig. 2)。これらのプローブは diaminobenzene 部位のところに上記の生理活性分子と反応する官能基あるいは原子団を組み込み、NO の場合と同様に反応の前後で HOMO エネルギーレベルを変化させて、これにより無蛍光のプローブを強蛍光に変換することができたものである。特に活性酸素は SOD の発見以来多くの研究がなされてきており³²⁻⁵¹⁾ この点から活性酸素検出蛍光プローブは多分野の生命科学研究者に汎用されている。

さらに、最近では従来の電子移動とは逆向きの、

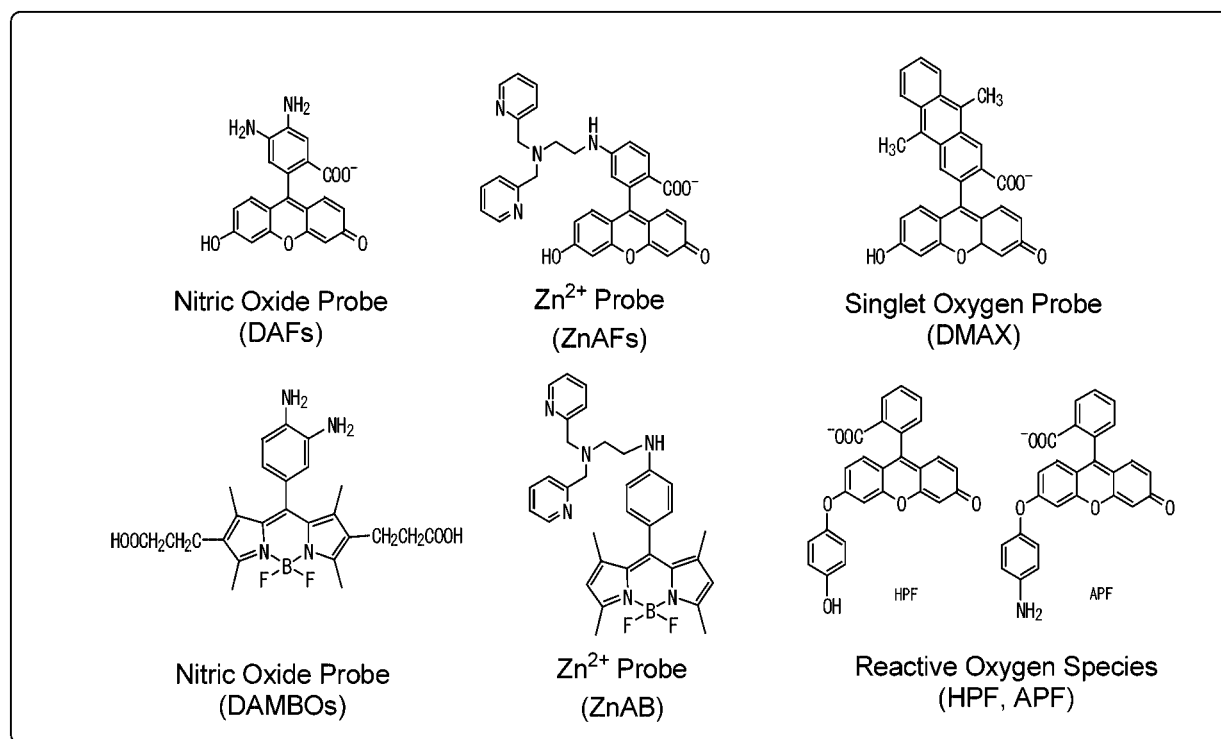


Fig. 2. Various Probes based on PeT Mechanism

蛍光団が donor となり benzene 環部位が acceptor となる PeT 機構があることも明らかになった。⁵²⁾ この PeT を d-PeT, 従来の電子移動機構を a-PeT と名付けた (Fig. 3). この発見は分子設計をする上から価値が高い。それは、反応部位でもある benzene 環部位の電子密度が従来であれば、下げる方向でのみしか蛍光を生じさせることができなかったが、d-PeT 機構により電子密度を上る方向でも蛍光を生じることが明らかになった訳で、自由自在にプローブが分子設計できることを意味している。

この a-PeT 機構及び d-PeT 機構を用いて実用的蛍光バイオイメージングプローブを開発したのは、われわれの研究グループが世界で初めてであり、この機構に基づいて新たなプローブ創製が可能になった意義は極めて大きい。

2-2. 波長シフト型蛍光プローブ

波長シフト型蛍光プローブの重要性 蛍光プローブは目的とする生理活性物質に対してのみ蛍光に変化が生じることが望ましいが、それ以外の要因によって影響を受けることも多い。特に細胞や生体組織に蛍光プローブを適用するときには、細胞によって導入された蛍光プローブの濃度にばらつきが生じることや、細胞膜の厚さの違いによって測定部位

での励起光強度に差が生じること、膜などの疎水性の高い部分に蛍光プローブ自身が局在する可能性がある。

これらの要因による測定誤差を減少し、より定量的な解析が行える測定法として、波長シフト型 (レシオ) 測定がある。レシオ測定とは、蛍光スペクトルまたは励起スペクトルにおいて、異なる 2 波長での蛍光強度を測定し、その比 (レシオ) を検出する方法である。レシオ測定は、1 つの波長で観測を行うのと比較して蛍光プローブ自身の局在や濃度変化による測定誤差を小さくすることができる。レシオ測定を行うためには、目的とする生理活性物質との相互作用で励起波長ないし蛍光波長がシフトする特性を持つ蛍光プローブが必要となる。レシオ型プローブ創製原理の 1 つに FRET がある。

蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET)⁵³⁻⁵⁶⁾ FRET とは donor 化合物 (fluorophore A) と acceptor 化合物 (fluorophore B) が近い位置 (通常 10-100 Å) にある場合、donor を励起したにもかかわらず acceptor からの蛍光が観測される現象で、donor から acceptor へのエネルギー移動によって引き起こされる (Fig. 4). エネルギー移動が起こる効率 (FRET 効

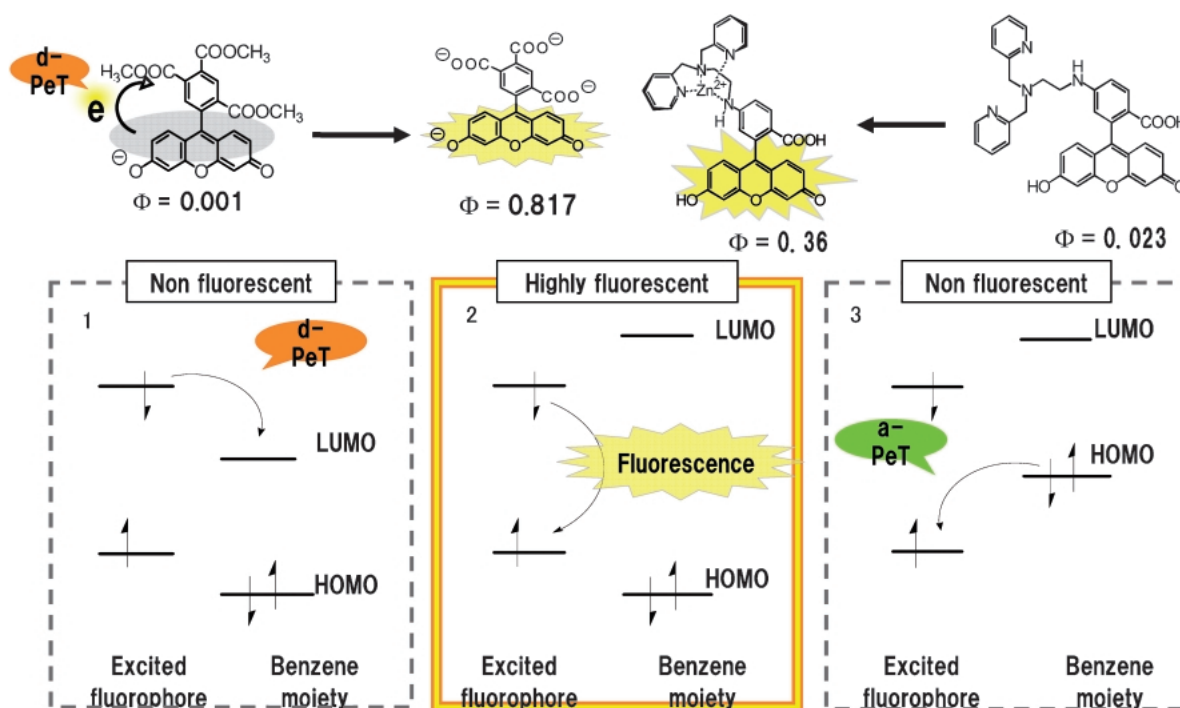


Fig. 3. a-PeT Mechanism and d-PeT Mechanism

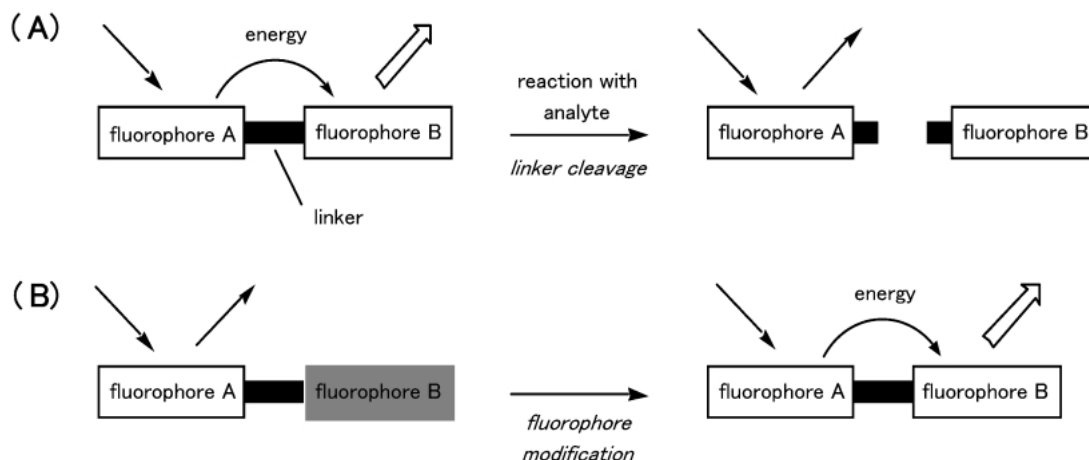


Fig. 4. Schematic of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

(A) System by changing distance between donor and acceptor, (B) System by changing overlap integral.

率)は donor と acceptor の相対的位置関係を反映する。これに基づいて、FRET はこれまでタンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質の構造変化などの解明に利用されてきた。FRET を原理とした蛍光プローブは、GFP などの蛍光タンパク質を用いた発現タンパク質によるものと、合成小分子によるものに大別することができる。

励起エネルギー移動速度が蛍光遷移速度、無放射遷移速度よりも速ければ、FRET 効率も大きくなる。励起エネルギー移動速度定数 k_T は下記の Förster の関係式によって規定されている。

$$k_T = \{9000 (\ln 10) \kappa^2 J / 128 \pi^5 n^4 N_A r^6\} k_f$$

(n は溶媒の屈折率, N_A はアボガドロ数)

FRET の起こり易さは k_T の大きさに依存するので、次の 3 つのパラメーターによって決まることになる。a) κ^2 : 配向因子と呼ばれ、donor と acceptor の双極子モーメントの相対的な向きを表す。 $0 \leq \kappa^2 \leq 4$ であり、両モーメントが直交している場合に 0 の値をとる。両モーメントが自由回転している場合には 2/3 に近似できる。b) J : 重なり積分と呼ばれ、donor の蛍光スペクトルと acceptor の吸収スペクトルの重なり程度を表す。c) r : donor と acceptor の間の距離。実用的蛍光プローブを開発するためには、標的生理活性物質に対応して 3 つのパラメーターのいずれかが変化するような分子設計が必要となる。しかしながら a) の配向因子を溶液中で論理的に制御することは非常に難しく、分子設計としては b) と c) に基づくプローブ開発になる。すなわち、(A) 2 種の蛍光団をエネルギー

ギー移動が起こり得る空間的配置に固定していた linker 部分が目的分子との反応により切断されエネルギー移動が起こらなくなることで蛍光波長のシフトが起こるもの (donor-acceptor 間の距離を変化させる方法)^{57,58} (B) 蛍光を持たない構造であった片方の蛍光団が目的分子との反応により蛍光性になることでエネルギー移動が起こるようになり波長がシフトするもの (重なり積分を変化させる方法)⁵⁹ である。

(A) の例として、phosphodiesterase を標的酵素とした CPF (Coumarin-Phosphate-Fluorescein) 類がある (Fig. 5)^{57,58} リン酸ジエステル構造の両端に linker を介して donor と acceptor が導入された構造で、水溶液中で強い蛍光を有することから、donor と acceptor には coumarin と fluorescein がそれぞれ選択された。Coumarin と fluorescein の Förster 半径 R_0 は 48 Å と算出され、donor と acceptor が分子内の近傍に存在するときは (CPF 類の場合、coumarin・fluorescein 間距離は 30 Å 以下) 高い効率で FRET が起こり、アクセプター蛍光が得られると考えられる。

しかしながら、実際の分子設計ではエネルギー移動が効率的に起こることが予想されながら、蛍光団同士が水溶液中で会合を起こし、蛍光を生じないことが多い。この会合を起こさないように空間的配置を実現することが最も難しく、このため現在までに実際に生細胞で応用可能な実用性のある合成小分子の蛍光プローブは数少なかった。CPF では cyclohexane 環あるいは benzene 環を linker に導入する

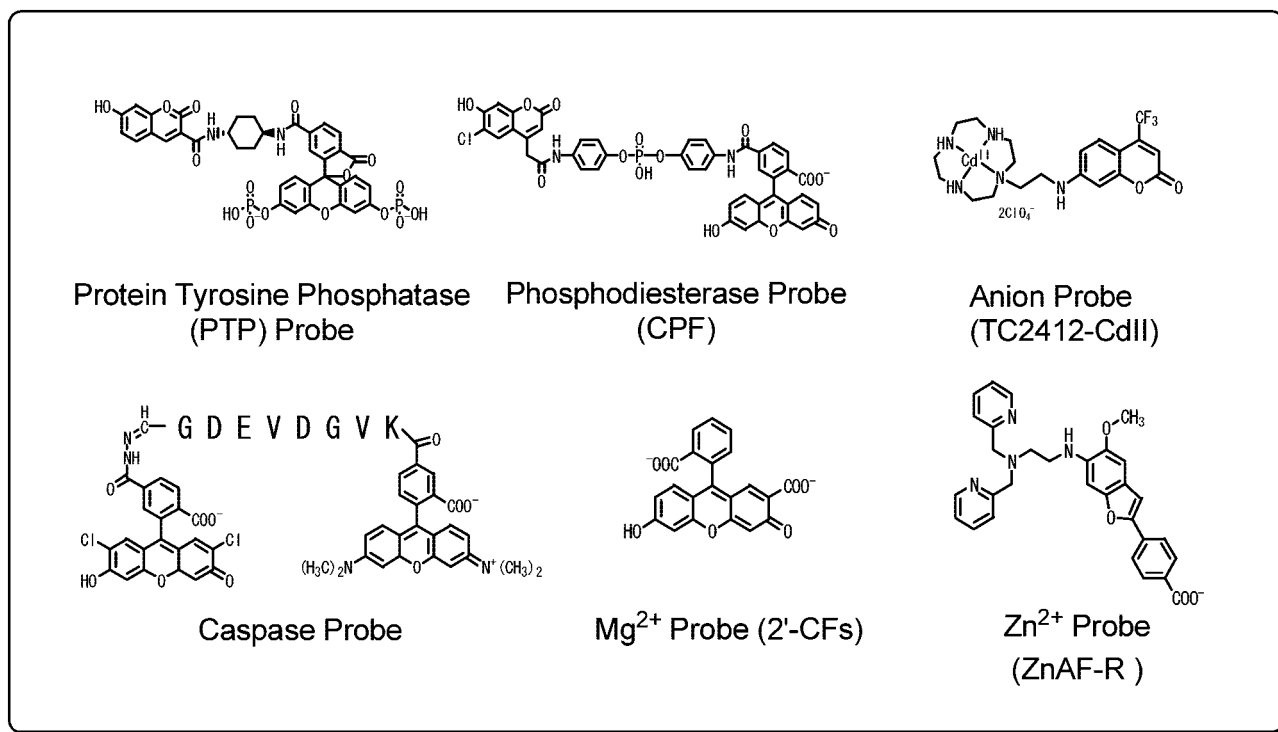


Fig. 5. Various Probes based on FRET Mechanism and ICT Mechanism

ことでこの問題を克服した。CPF類は有用な phosphodiesterase プローブとなっている。

(B) の例として、タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) がある (Fig. 5).⁵⁹⁾ PTP プローブの fluorescein 部位は diester でラクトン型構造を取っている。Fluorescein のラクトン型とキノイド型では吸収スペクトルが大きく異なる。つまり coumarin を donor とした場合、キノイド型 ($\lambda_{\max} = 492$ nm) は大きな重なり積分を持つのに対して、ラクトン型の吸収は紫外線領域 (400 nm 以下) のため、スペクトルの重なりが存在しない。すなわち実質的に FRET が起こらず、coumarin からの蛍光を生じる。このプローブが PTP により加水分解を受けることにより、蛍光は fluorescein 由来のものとなる。PTP はチロシンの脱リン酸化を行う酵素であり、インスリンシグナル伝達、細胞の分化・成長、免疫系、神経系など、様々な生理過程において重要な役割を果たしている。

これを原理として caspase 等の加水分解酵素やキナーゼ酵素を始めとして、種々の酵素活性を生細胞や生体組織中からイメージングとして捉えることができるようになる。

分子内電荷移動 (Internal Charge Transfer: ICT)

分子内電荷移動 (ICT) を原理とした波長シフト型プローブは数多く開発されている。Figure 5 にわれわれの研究室で開発された ICT 型プローブを示した。Figure 6 にその原理を模式的に示した。ZnAF-R や fura-2 における benzofuran 環や BTC における coumarin 環などは、ICT 機構による波長シフトが可能な蛍光団として知られている。Figure 2 に挙げた亜鉛イオンプローブは亜鉛イオンをキレートする TPEN 構造を持つプローブであるが、この TPEN 構造が蛍光団の一部に組み込まれた構造になっている。このため、亜鉛イオンが TPEN 構造に配位すると、Fig. 6 に模式的に示した機構により、吸収波長を規定する Franck-Condon 遷移のバンドギャップと蛍光波長を規定する緩和後の一重項励起状態のエネルギーレベルがともに変化する。一部の ICT 型プローブでは蛍光波長には波長シフトがみられないこともあるが、これは緩和後の励起状態で金属の配位が解消している、と考えられる。

ICT 機構を基にした波長シフト型プローブを用いたイメージングでは、FRET 機構と同様に、励起波長又は蛍光波長を 2 波長で測定しそのレシオを取ることができる。レシオ測定は、前述のようにバックグラウンド蛍光の影響やプローブの局在による影

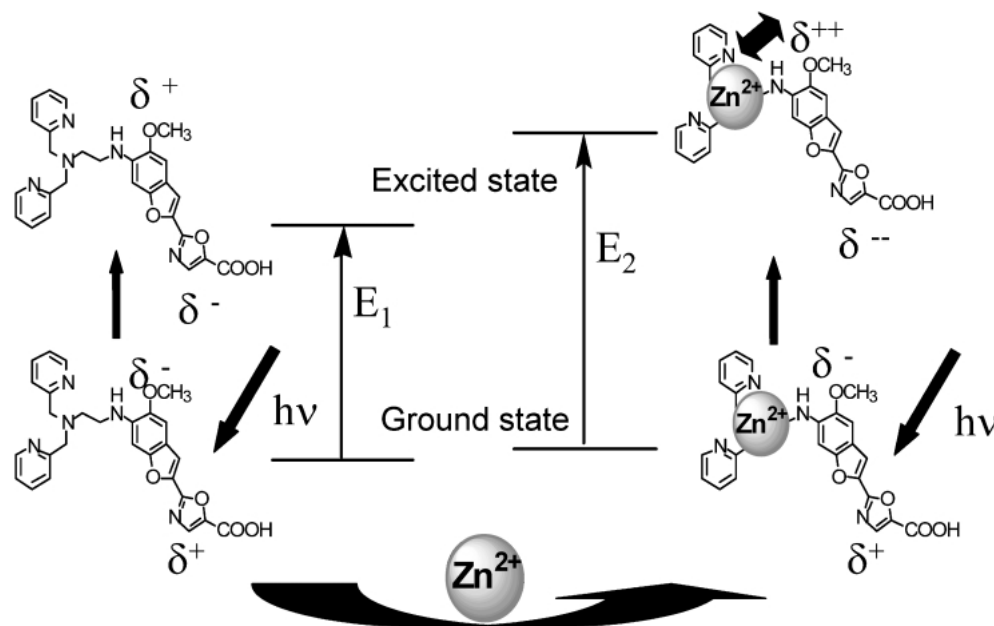


Fig. 6. Schematic of ICT Mechanism

響を除くことができる点で有用である。

現在までにわれわれは6種類の亜鉛プローブ (ACFs, ZnAF-2, ZnAF-2 DA, ZnAFs, ZnAB, ZnAF-R) を開発してきた。さらに、1 nM から 100 μ M の幅広い亜鉛イオン濃度に対応するため亜鉛イオンに対する親和性が異なるプローブを開発した。⁶⁰⁻⁶² ZnAF-2 同様に亜鉛イオンに対して高い特異性と高感度を有しており、実際に用いることができる。最近、特に亜鉛イオンの生理機能が注目されている。亜鉛イオンはヒトの体内に鉄イオンについて多く存在し、生物の生存に必須な金属イオンであり、生体内にはカーボニックアンヒドラーゼなど300種以上の亜鉛含有酵素があり、さらに亜鉛フィンガーなどの転写制御因子にも亜鉛イオンが含まれている。しかしながら近年、タンパクに強く結合した状態ではなく遊離あるいは弱くタンパクに配位した亜鉛イオンの存在が注目されている。このような亜鉛イオンは脳などの器官に多く存在し、グルタミン酸性シナプスに含まれる小胞内に高濃度に局在していることが報告されている。小胞内の亜鉛イオンは脱分極等によって細胞外に放出され、イオンチャネルやレセプターの機能を修飾することから神経伝達を制御すると考えられているが、確かなことはいまだ明らかではない。それ以外に細胞死への関与やアルツハイマー病、てんかん、脳虚血等の疾患への関与も示唆されているが、これも詳細は定かではな

い。このような状況下、亜鉛イオン特異的なイメージングプローブが開発された訳で、これらは生体における亜鉛イオンの機能解析において強力な武器となり、他の生理活性種とのネットワーク解析を行うことにより、脳の高次機能解析が可能となるであろう。

3. 開発したプローブ類

現在までに開発したプローブ類は以下の通りである。

1) 一酸化窒素プローブ (DAF-2, DAF-2 DA, DAF-FM, DAF-FM DA, DAR-4M, DAR-4M AM, DAMBO, DAC), 2) 活性酸素プローブ (HPF, APF), 3) 種々のエステラーゼ, 4) 亜鉛プローブ (ACFs, ZnAF-2, ZnAF-2 DA, ZnAFs, ZnAB, ZnAF-R), 5) マグネシウムプローブ (2'-CFs), 6) 一重項酸素プローブ (DPAX, DMAX), 7) カスパーゼプローブ, 8) アニオンプローブ, 9) ホスホジエステラーゼプローブ, 10) プロテインチロシンホスファターゼプローブ, 11) β -ガラクトシダーゼプローブ, 12) グルコシダーゼプローブ, 13) アルカリホスファターゼプローブ, 14) 機能性蛍光ラントノイド錯体。

これらのプローブの開発過程を β -ガラクトシダーゼプローブを代表例として説明する。

β -ガラクトシダーゼプローブ⁶³ *E. coli* 由来の *lacZ* 遺伝子は外部遺伝子導入時のクローン選択

的マーカーとして最も汎用されている遺伝子である。*lacZ* の遺伝子産物である β -ガラクトシダーゼの活性測定には、古くから比色法の X-Gal や ONPG が用いられてきたが、感度面での問題から固定した細胞や破碎した細胞に適用されることが多く、利用に制限が伴う。また、今までに感度の高い蛍光プローブも開発されているが、一般に細胞膜透過性が低く細胞が生きた状態での *lacZ* 発現をイメージングするのは難しい。特に、フルオレセインを母核に持つ fluorescein di- β -galactopyranoside (FDG) は、フルオレセインのラクトン型とキサントゲン型の互変異性の特徴を利用した高感度プローブとして知られているが、一分子内に β -ガラクトシド基を 2 つ持ち水溶性が高いため、生理的条件下では生細胞に導入され難い。浸透圧ショックを利用した細胞内導入法も考案されているが、この手法は生理的条件下を大幅に崩すことになり細胞に与える障害も大きい。このような観点から高感度で、かつ細胞内のガラクトシダーゼ活性をイメージングできるプローブの開発が望まれていた。

この開発において、始めにわれわれはフルオレセイン骨格を見直した。蛍光を発する部位の蛍光団と

してキサントゲン骨格は重要であるが、電子供与性部位はかならずしも蛍光発光とは関係していない。キサントゲン部位と電子供与性部位が直交していることが高い量子収率を得るために必要であるが、カルボキシル基である必要はなく、他の官能基に変換することが可能である。

そこでまず、カルボキシル基のメチル基、メトキシ基への変換を試みた。その結果、メチル基、メトキシ基であっても、フルオレセインと全く同等の高い蛍光強度を保つことが明らかとなった（カルボキシル基以外の置換基を有するフルオレセイン型蛍光化合物を TokyoGreens と名付けた。以下 TG 類と略）。この知見は、フルオレセイン骨格に基づくプローブの分子設計を行うに際して、その自由度が大きく広がったことを示しており、事実、電子供与性部位の電子密度を少しずつ変化させた誘導体群の合成に成功した。これらの蛍光特性を精査したところ、キサントゲン環に由来する蛍光はベンゼン環部位の電子密度に依存して変化することが明らかになった (Fig. 7)。PeT 機構を動作原理とする蛍光 off/on の境界を初めて正確に決定することができた。さらに興味あることに、この境界がキサントゲン環の

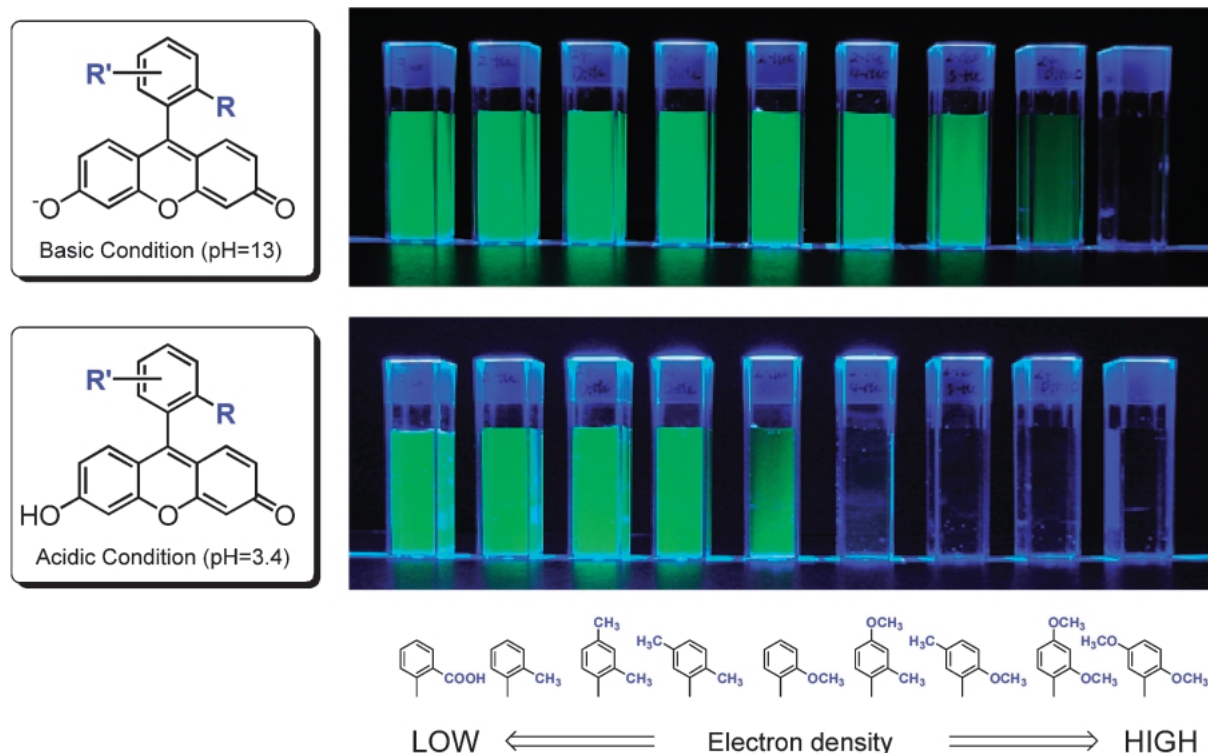


Fig. 7. Effect of Electron Densities of Donor Moiety and Acceptor Moiety on Fluorescence Intensity

存在状態としてアニオン型である場合と、ニュートラル型である場合で大きく異なることも明らかとなった。

これらの知見はイメージングプローブの分子設計に極めて有効である。DAF-2 の場合とは全く異なる発想，すなわち電子供与性部位ではなく電子受容性部位である蛍光団の還元電位の変化に基づいてフルオレセイン系蛍光プローブを設計できることを示している。

この設計法に基づいて， β -ガラクトシダーゼプローブ TG- β Gal (Fig. 8) の開発に成功した。以下に分子設計法を説明する。TG 誘導体のヒドロキシル基がアニオン型とニュートラル型とで蛍光発光の境界が異なることに着目し，a) これがキサンテン環部位の電子受容能の変化に起因すること，b) キサンテン環のヒドロキシル基を特定の官能基で保護

した誘導体はニュートラル型に近い電子受容能を持つこと，を明らかにした。そこでニュートラル型では PeT による蛍光消光が起こるのに対しアニオン型では起こらないような TG 誘導体を探索した。その結果，ベンゼン環部位に *m*-OMe-toluene を持つ誘導体 (2-Me-4-OMe TG) がアニオン型とニュートラル型とで最も大きな蛍光強度変化を示したことから，*m*-OMe-toluene が，キサンテン環部位の電子受容能の変化を最大限に蛍光強度変化に変換するために最適な電子供与部であることが明らかになった。

そこで， β -ガラクトシダーゼ活性に対するイメージングプローブを開発するために，2-Me-4-OMe TG のヒドロキシル基を β -ガラクトピラノシル基で保護した TG- β Gal を合成した。この分子の蛍光特性を調べたところ，予想通り β -ガラクトシ

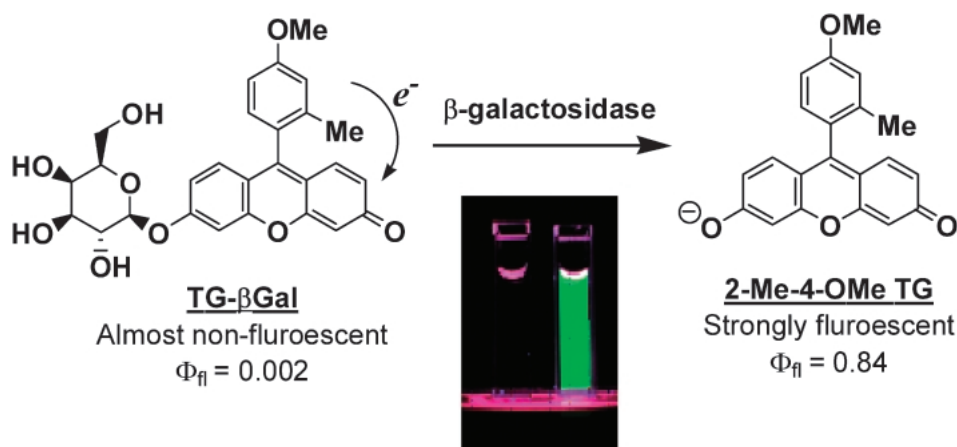


Fig. 8. Novel β -Galactosidase Probe (TG- β Gal) based on PeT Mechanism

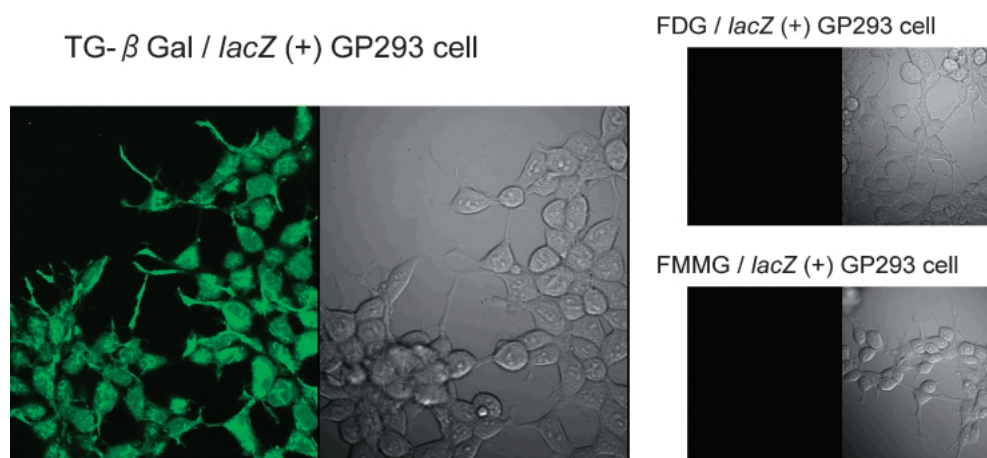


Fig. 9. Bioimaging of β -Galactosidase Activity Using TG- β Gal in Living Cells

ダーゼとの反応前後で大きな蛍光強度変化を示した (Fig. 8). 次に, *in vitro* 系での検討から, TG- β Gal は, フルオレセインを母核とする既存のプロープ FDG よりも速くかつ直線的な蛍光上昇を示した. さらに, 生細胞での β -ガラクトシダーゼ活性イメージングを試みたところ, TG- β Gal を用いた場合にのみ β -ガラクトシダーゼを発現した細胞で速やかな蛍光上昇が観測された (Fig. 9). これらの結果から, 開発したプロープ TG- β Gal は, 水溶性基である β -ガラクトシド基を1つしか持たず脂溶性が高いために, 生理的条件下で生細胞に導入可能であり, 生きている状態での *lacZ* 発現を高感度にイメージングできるプロープであることが示された. 本プロープの開発により生細胞での β -ガラクトシダーゼ活性のバイオイメージングが初めて可能となった. 蛍光発光の制御に関する基本原理を基盤とすることで, 有用なイメージングプロープが種々開発できることが明らかになった. 新規蛍光化合物 (TG 類) を用いてグルコシダーゼ活性プロープあるいはアルカリフォスファターゼプロープ⁶⁴⁾などの創製も可能である.

今回紹介したプロープ以外に, 時間分解可能な蛍光長寿命型機能性プロープ⁶⁵⁻⁶⁸⁾も開発した. また, 高感度化が期待できる化学発光を原理とするプロープも開発した.^{69,70)} さらに全く異なるモダリティーである MRI に適用可能な機能性 MRI プロープの開発も行っている.^{71,72)} このようなイメージングプロープの創製研究は有機化学を基盤として生命現象の解明に寄与する点から, 新たな学問領域である Chemical Biology の一分野である. 有機化学と生物学が融合した本研究は, 特に薬学において大いに推進されるべき領域であると思われる.

4. おわりに

われわれは細胞内における蛍光イメージングプロープの開発を行ってきたが, 研究成果は専門の学術誌での公表と同時に, 現在までに 42 件の特許を取得した.

このような分子イメージング研究は世界的に注目されており, アメリカ化学会会員誌 *Chem&Eng News* (March 20, 2000), *Anal Chem* (Feb 1, 2001), *Nature Reviews Neuroscience* (2002), *Science* (2005), *Nature Methods* (2005) などの外国雑誌で亜鉛プロープや TokyoGreen などがトピックスとして紹介

された. また日経産業新聞などマスコミにも記事として 27 回掲載されている. これらの例にみられるように, バイオイメージングを目的としたプロープの開発はこれからの生命科学研究において欠くことのできない研究手段となってきた. 有機化学者, 分析化学者, 細胞生物学者及び臨床医など専門分野の異なる研究者が一堂に会して議論することが必要であると考えられる. このような機運の高まりに伴って, 2006 年日本分子イメージング学会が設立された. これによりさらにこの分野は発展していくことであろう.

謝辞 本研究に関してご支援を頂いた先生方に感謝申し上げますとともに, 上記の成果は薬品代謝化学教室の現・旧スタッフ, 卒業生, 教室員の努力の結晶であり, この場を借りて心から御礼申し上げます. また, 本研究は文部科学省科学研究費助成金 RR2002 プロジェクトをはじめ三菱財団などの民間の研究助成金を頂いて行われたものである. 厚く感謝申し上げます.

REFERENCES

- 1) Miura T., Urano Y., Tanaka K., Nagano T., Ohkubo K., Fukuzumi S., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8666-8671 (2003).
- 2) Nagano T., Yoshimura T., *Chemical Reviews*, **102**, 1235-1270 (2002).
- 3) Tanaka K., Miura T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2530-2536 (2001).
- 4) Umezawa N., Tanaka K., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2899-2901 (1999).
- 5) Kenmoku S., Urano Y., Kanda K., Kojima H., Kikuchi K., Nagano T., *Tetrahedron*, **60**, 11067-11073 (2004).
- 6) Hattori S., Hasobe T., Okubo K., Urano Y., Umezawa N., Nagano T., Wada Y., Yanagida S., Fukuzumi S., *J. Phys. Chem. B*, **108**, 15200-15205 (2004).
- 7) Hasobe T., Hattori S., Kamat P. V., Urano Y., Umezawa N., Nagano T., Fukuzumi S., *Chemical Physics*, **319**, 243-252 (2005).
- 8) Maruyama S., Kikuchi K., Hirano T., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10650-10651 (2002).

- 9) Mizukami S., Nagano T., Urano Y., Odani A., Kikuchi K., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3920–3925 (2002).
- 10) Kojima H., Hirotsu M., Nakatsubo N., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T., *Anal. Chem.*, **73**, 1967–1973 (2001).
- 11) Kojima H., Hirata M., Kudo Y., Kikuchi K., Nagano T., *J. Neurochem.*, **76**, 1404–1410 (2001).
- 12) Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3209–3212 (1999).
- 13) Kakoki M., Hirata Y., Hayakawa H., Nishimatsu H., Suzuki Y., Nagata D., Suzuki E., Kikuchi K., Nagano T., Omata M., *Hypertension*, **33**, 467–471 (1999).
- 14) Suzuki N., Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Hirata Y., Nagano T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 47–49 (2002).
- 15) Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T., *Anal. Chem.*, **70**, 2446–2453 (1998).
- 16) Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., Nagano T., *FEBS Lett.*, **427**, 263–266 (1998).
- 17) Okada D., Yap C.-C., Kojima H., Kikuchi K., Nagano T., *Neuroscience*, **125**, 461–472 (2004).
- 18) Sasaki E., Kojima H., Nishimatsu H., Urano Y., Kikuchi K., Hirata Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3684–3685 (2005).
- 19) Gabe Y., Urano Y., Kikuchi K., Kojima H., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3357–3367 (2004).
- 20) Gabe Y., Ueno T., Urano Y., Kojima H., Nagano T., *Anal. Bioanal. Chem.*, (in press).
- 21) Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12399–12400 (2000).
- 22) Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1052–1054 (2000).
- 23) Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6555–6562 (2002).
- 24) Ueno S., Tsukamoto M., Hirano T., Kikuchi K., Yamada M. K., Nishiyama N., Nagano T., Matsuki N., Ikegaya Y., *J. Cell Biol.*, **158**, 215–220 (2002).
- 25) Koutaka H., Kosuge J., Fukasaku N., Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Kojima H., Nagano T., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 700–703 (2004).
- 26) Kawabata E., Kikuchi K., Urano Y., Kojima H., Odani A., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 818–819 (2005).
- 27) Takeda A., Yamada K., Minami A., Nagano T., Oku N., *Epilepsy Research*, **63**, 77–84 (2005).
- 28) Colvin R. A., Fontaine C. P., Thomas D., Hirano T., Nagano T., Kikuchi K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **442**, 222–228 (2005).
- 29) Kiyose K., Kojima H., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6548–6549 (2006).
- 30) Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3170–3175 (2003).
- 31) Kadowaki H., Nishitoh H., Urano F., Sadamitsu C., Matsuzawa A., Takeda K., Masutani H., Yodoi J., Urano Y., Nagano T., Ichijo H., *Cell Death and Differentiation*, **12**, 19–24 (2005).
- 32) Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., Arakane K., Miyata N., Goda Y., Masumizu T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12803–12809 (2003).
- 33) Inoue T., Kikuchi K., Hirose K., Iino M., Nagano T., *Chem. Biol.*, **10**, 503–509 (2003).
- 34) Suzuki N., Higuchi T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9622–9628 (2002).
- 35) Nishida M., Schey K. L., Takagahara S., Kontani K., Katada T., Urano Y., Nagano T., Nagao T., Kurose H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 9036–9042 (2002).
- 36) Inoue T., Kikuchi K., Hirose K., Iino M., Nagano T., *Chem. Biol.*, **8**, 9–15 (2001).
- 37) Suzuki N., Higuchi T., Urano Y., Kikuchi K., Uchida T., Mukai M., Kitagawa T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12059–12062 (2000).
- 38) Suzuki N., Higuchi T., Urano Y., Kikuchi K., Uekusa H., Ohashi Y., Uchida T., Kitagawa T., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11571–11572 (1999).
- 39) Nagano T., Fridovich I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 596–601 (1985).
- 40) Yamamoto H., Mashino T., Nagano T.,

- Hirobe M., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 539–541 (1986).
- 41) Yamamoto H., Nagano T., Hirobe M., *J. Biol. Chem.*, **263**, 12224–12227 (1988).
- 42) Takahashi M., Nagano T., Hirobe M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **268**, 137–143 (1989).
- 43) Nagano T., Hirano T., Hirobe M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 9243–9249 (1989).
- 44) Nagano T., Yamamoto H., Hirobe M., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3529–3535 (1990).
- 45) Kim J. I., Nagano T., Higuchi T., Hirobe M., Shimada I., Arata Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9392–9394 (1991).
- 46) Takabatake T., Hasegawa M., Nagano T., Hirobe M., *J. Biol. Chem.*, **267**, 4613–4618 (1992).
- 47) Kitajima N., Osawa M., Tamura N., Moro-oka Y., Hirano T., Hirobe M., Nagano T., *Inorganic Chemistry*, **32**, 1879–1880 (1993).
- 48) Umezawa N., Arakane K., Ryu A., Mashiko S., Hirobe M., Nagano T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 275–281 (1997).
- 49) Urano Y., Higuchi T., Hirobe M., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12008–12009 (1997).
- 50) Yogo T., Kikuchi K., Inoue T., Hirose K., Iino M., Nagano T., *Chem. Biol.*, **11**, 1053–1058 (2004).
- 51) Yogo T., Urano Y., Ishitsuka Y., Maniwa F., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12162–12163 (2005).
- 52) Ueno T., Urano Y., Setsukinai K., Takakusa H., Kojima H., Kikuchi K., Ohkubo K., Fukuzumi S., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14079–14085 (2004).
- 53) Takakusa H., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *Anal. Chem.*, **73**, 939–942 (2001).
- 54) Kawanishi Y., Kikuchi K., Takakusa H., Mizukami S., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3438–3440 (2000).
- 55) Mizukami S., Kikuchi K., Higuchi T., Urano Y., Mashima T., Tsuruo T., Nagano T., *FEBS Lett.*, **453**, 356–360 (1999).
- 56) Kikuchi K., Takakusa H., Nagano T., *Trends Anal. Chem.*, **23**, 407–415 (2004).
- 57) Takakusa H., Kikuchi K., Urano Y., Kojima H., Nagano T., *Chem.-A Eur. J.*, **9**, 1479–1485 (2003).
- 58) van Meeteren L. A., Ruurs P., Christodoulou E., Goding J. W., Takakusa H., Kikuchi K., Perrakis A., Nagano T., Moolenaar W. H., *J. Biol. Chem.*, **280**, 21155–21161 (2005).
- 59) Takakusa H., Kikuchi K., Urano Y., Sakamoto S., Yamaguchi K., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1653–1657 (2002).
- 60) Komatsu K., Kikuchi K., Kojima H., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10197–10204 (2005).
- 61) Kikuchi K., Komatsu K., Nagano T., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 182–191 (2004).
- 62) Hirano T., Kikuchi K., Nagano T., “Reviews in Fluorescence, 2004,” eds. by Geddes C. D., Lakowicz J. R., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, ISBN: 0–306–48460–9, 2004, pp. 55–73.
- 63) Urano Y., Kamiya M., Kanda K., Ueno T., Hirose K., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4888–4894 (2005).
- 64) Kamiya M., Urano Y., Ebata N., Yamamoto M., Kosuge J., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 5439–5441 (2005).
- 65) Hanaoka K., Kikuchi K., Kojima H., Urano Y., Nagano T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2996–2999 (2003).
- 66) Koresawa M., Kikuchi K., Mizukami S., Kojima H., Urano Y., Higuchi T., Nagano T., *Anal. Chem.*, **72**, 4904–4907 (2000).
- 67) Hanaoka K., Kikuchi K., Kojima H., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470–12476 (2004).
- 68) Terai T., Kikuchi K., Iwasawa S., Kawabe T., Hirata Y., Urano Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6938–6946 (2006).
- 69) Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H., Hirata Y., Hirobe M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 23106–23110 (1993).
- 70) Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H., Hirata Y., Hirobe M., *Anal. Chem.*, **65**, 1794–1799 (1993).
- 71) Hanaoka K., Kikuchi K., Urano Y., Narazaki M., Yokawa T., Sakamoto S., Yamaguchi K., Nagano T., *Chem. Biol.*, **9**, 1027–1032 (2002).
- 72) Hanaoka K., Kikuchi K., Urano Y., Nagano T., *J. Chem. Soc., Perkin 2*, 1840–1843 (2001).