

生体イメージング新手法開発—混雑系の有機化学に向けて—

同志社大学 青山 安宏

1. 隔離系の化学から混雑系の化学へ

物質の性質や変化を追及する化学は、その性格上、純粋物質の単一環境下での物性や反応を対象としてきた。いわば隔離された世界である。ところが、現実の“化学系”はそれほど理想的な世界ではなく、種々の物質が混ざり合い、種々の反応が同時に進行する。典型的な例は生体であろう。細胞という小さな（化学的には巨大だが）不均一世界に様々な物質が存在し、移動し、反応し、その情報はネットワーク化され、全体は熱力学的に非平衡の状態である。ここから特定の物質なり反応なり現象なりを取り出し、それを化学の手法で調べるのが生化学なり生物化学なり生体関連化学なり、生物“化学”の立場である。しかし、これは生命ではない。特定の物質なり反応なり現象なりをネットワーク化された生命の場に置き、その挙動を調べるのが化学“生物学”の立場であろうと私は思っている。このような混雑系で特定の反応なりを追跡するにはどうすればよいだろう。これは、化学が今後担うべき重要な課題であろうと思う。

2. 生体イメージングのための新手法

わかり易い例は生体イメージングである。血液検査は生体から血液サンプルをとりだし、従来の（分析化学の）手法で特定物質を分析し、体のどこかで異常があるかないか判断する。これは、言ってみれば生物“化学”の立場である。これに対し、生体イメージングは根本的に異なる。生命活動という混雑系の異常を“その場報告”でき、かつ、混雑系の秩序そのものを乱してはならない。これはまさに化学“生物学”の立場であろう。我々は細胞内化学の観点から生体イメージングにむけた新たな取り組みを開始している。現在、主な対象としているのは核酸の消長のその場観察と代謝反応のその場観察である。

3. 光る RNA を用いる転写過程の観察

近年、細胞内・細胞間における時間的・空間的挙動の不均一性に着目した研究が盛んに行われている。しかし、従来の核酸検出・配列診断は主にすり潰した細胞を用いて行うことを前提としており、得られた結果は同一とみなした細胞群の平均値として取り扱われてきた。我々は生細胞における核酸発現解析・配列診断を非侵襲的に行うことを目標として研究を行っている。^{1,2)}

一方、蛋白質発現の非侵襲的計測は、目的蛋白質に蛍光蛋白質 (Fluorescent Protein) を連結した融合蛋白質として発現させることで容易に実施可能である。近年、核酸に対しても同様に光る配列 (Fluorescent DNA (FD) / Fluorescent RNA (FR)) を創製し、局所化解析・発現検出に応用しようとする試みが注目を集めている。³⁾ その実現には、ある特定の核酸配列構造 (タグ配列) に結合した場合にのみ蛍光を発する機能性蛍光色素が必要となる。Malachite green/RNA aptamer 等、結合に伴い蛍光量子収率を増大させるペアは幾つか報告されているが、その細胞内応用は未知数である。⁴⁾ 我々は実応用可能な FD・FR 創製を目指し、

環境応答性蛍光色素の改変と核酸試験管進化法 (SELEX) を組み合わせた、Light-Up 蛍光色素/核酸タグ配列ペア探索法を構築、新たなペアの創製を試みた。

細胞内核酸染色に使用されている環境応答性蛍光色素群は、結合に伴う蛍光発光のみでなく、膜透過性や生体直交性といった細胞内応用に必要な条件を併せ持つ。我々は、既存の優れた蛍光色素を改変し、特定核酸配列構造に結合した場合にのみ蛍光を発する機能性蛍光色素へと進化させる戦略を用いた。まず、1) 蛍光色素に修飾を施した改変色素ライブラリを作成、本来の結合標的との親和性が抑制された色素を探索、続いて、2) 得られた改変蛍光色素に結合する核酸配列を *in vitro* selection 法によって再び選択することで、目的とする Light-Up 蛍光色素/核酸タグ配列ペアの創製を目指した (Figure 1)。

具体的には、生細胞核染色分子 Hoechst33258 を候補化合物とし、新たな FD・FR の開発を試みた。まず、Hoechst 誘導体ライブラリを作成、分光学的、熱力学的評価によって、蛍光特性を維持しながらも本来の標的である B 型 DNA には結合しない Hoechst 6 の探索に成功した (Figure 2a)。

次に、*in vitro* selection 法を用い、Hoechst 6 選択的に結合して蛍光発光を誘起する DNA-aptamer を選出、最適化を行い、最終的に 25-mer のステムループ型構造を有する aptamer class 1-1-mini (Apt1-1-mini) を得た。Apt1-1-mini 存在下、及び非存在下での Hoechst 6 誘導体の蛍光スペクトルを観測したところ、Apt1-1-mini 存在下において顕著な蛍光強度の増加が見られた。Apt1-1-mini による I_{on}/I_{off} (ex. 345 nm, em. 460 nm) は 190 倍程度であったのに対し、Hoechst 本来の標的である AT-rich-dsDNA 存在下では蛍光が抑えられ、標的特異性を有する新たな蛍光色素/DNA-aptamer ペアの作成に成功したことが示された (Figure 2b)。

続いて、得られたステムループ型 DNA-aptamer を分割し、標的配列認識部位を持たせた binary probe⁵⁾ を作成した。binary probe と Hoechst 6 誘導体を系中に含ませ、標的配列存在下、及び非存在下において蛍光発光を観測すると 135 倍程度の I_{on}/I_{off} で標的核酸の検出に成功し、さらに、本系が 1 塩基識別可能であることも確認された²⁾。今回、FD の開発と同様にして FR の開発も行っており、良好な結果を得たので併せて報告する予定である。

細胞内核酸染色に使用される環境応答性蛍光色素を改変し、特定の核酸配列/構造に結合した場合にのみ蛍光を発する機能性蛍光色素へと進化させる手法

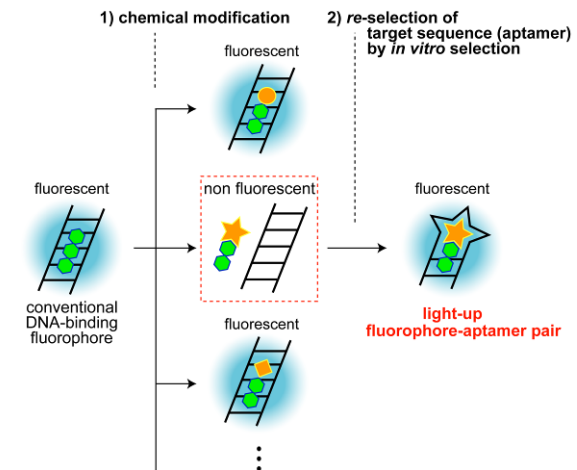


Figure 1. A strategy for converting a conventional DNA-binding fluorophore

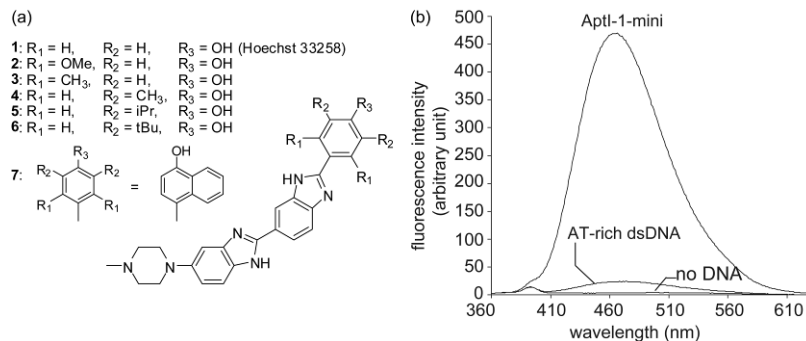


Figure 2 (a) Chemical structures of Hoechst derivatives 1-7. (b) Fluorescence spectra of Hoechst derivative 6 in the

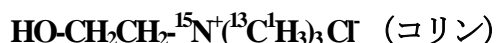
を構築した。現在、本手法を応用し、生細胞内で実用可能な多色核酸ラベル化システムを

調整することを目標にしている。このようなシステムの実現により、複数 RNA の発現頻度・局所化を同時に観測することも可能になると期待される。

4. 生体プロセスの多重共鳴NMR追跡

NMRは有機物質の解析手段として極めて有効である。何よりも、炭素や水素を核とする全ての有機化合物はNMR活性(^{13}C の天然存在割合は1%)でありNMRの対象となるからであるが、これがNMRの最大の欠点にもなる。複雑な混合物に適用すると、あらゆる化合物から妨害シグナルが発せられ、標的シグナルを選択的に取得することができないからである。典型的な例は生体イメージングへの応用であろう。この分野においてNMRはもっぱら水の緩和過程を測定するMRI(Magnetic Resonance Imaging)として用いられてきた。プローブの ^1H 核や ^{13}C 核を対象とするスペクトロスコピー(MRS)は修飾を施す必要が無い点で魅力的であるが、感度が低いことはともかく、プローブ以外の多くの生体物質の ^1H 核や ^{13}C 核の妨害(雑音)のため、実用価値は殆どないものとされてきた。一方、多重共鳴という手法がある。これは、例えば ^1H - ^{13}C - ^{15}N のような配列において、磁化コヒーレンスを $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ のように移動させ、それによりこのような結合状態にある ^1H 核のシグナルを選択的に得る(単なる ^1H や ^1H - ^{12}C - ^{15}N 、 ^1H - ^{12}C - ^{14}N 、 ^1H - ^{13}C - ^{14}N などの ^1H 核は不活性で測定にかからない)手法である。我々はこれを細胞膜成分であるコリンやエネルギー代謝の中心に位置するグルコースに応用し、その細胞取り込みや代謝過程を選択的にモニターすることに成功した。

(1) 二重ラベル化コリンの細胞取り込みの多重共鳴追跡



コリン(choline; *N*-hydroxyethyl-*N,N,N*-trimethylammonium chloride)はcholine transporterによって細胞に取り込まれ、細胞膜脂質 phosphatidylcholine に変換される。癌細胞においては特に取り込み活性が高い。そこで、メチルの炭素と窒素をそれぞれ ^{13}C 、 ^{15}N で置換した二重ラベル化コリンを合成した。多重共鳴の条件では ^{15}N - ^{13}C - ^1H の ^1H 核のシグナルのみを与える。癌細胞であるHeLa細胞を二重ラベル化コリンを含む培地で培養し、得られた細胞をホモジェナイズしたサンプルの ^1H NMRを測定した。通常の場合では細胞中のあらゆる ^1H 核のシグナルが観測されるが、多重共鳴の条件下ではラベル化されたコリン、すなわち細胞に取り込まれたコリンのメチルプロトン(^1H - ^{13}C - ^{15}N)のみが選択的に観測された。また、担がんマウスにラベル化コリンを投与すると、がん部位においてコリンが検出できる。

(2) 二重ラベル化グルコースの代謝過程の多重共鳴追跡

グルコースはエネルギー源と全ての細胞に活発に取り込まれる。特に活発に増殖するがん細胞ではそうである。取り込まれたグルコースは解糖系により2分子のピルビン酸となり、呼吸系による酸素酸化に続くが、低酸素状態のがん細胞では呼吸系が効率よく機能せ

ず、ピルビン酸は乳酸に還元される。全ての炭素と炭素に結合した水素をそれぞれ ^{13}C 、 ^2H (D) に置換したグルコースおよびピルビン酸 ($\text{D}_3\text{C}^*\text{C}(=\text{O})\text{CO}_2\text{H}$; $\text{C}^* = ^{13}\text{C}$) は多重共鳴 NMR 不活性であるが、ピルビン酸の還元 (乳酸脱水素酵素) により生成する乳酸 ($\text{D}_3\text{C}^*\text{C}(\text{H})(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$) は多重共鳴 NMR 活性 (^1H - ^{13}C - ^{13}C) である (Figure 3)。この手法を利用して、担がんマウスにおける代謝産物としての乳酸を選択的に検出することができた。

生体イメージングに限らず、特定の物質をモニターする場合、適当なラベル化 (例えば蛍光ラベル化) を利用することが多い。この場合、ラベル化により本来の物質ではなくなったことに常に留意する必要がある。上記のプローブは安定同位体 (^{13}C や ^{15}N) で置換されている点を除けば天然物そのものである。多重共鳴 NMR 法はこのような天然物そのものをプローブとして代謝過程を追跡する道を開いたのみならず、“混合系”有機化学への応用も大きいと思われる。

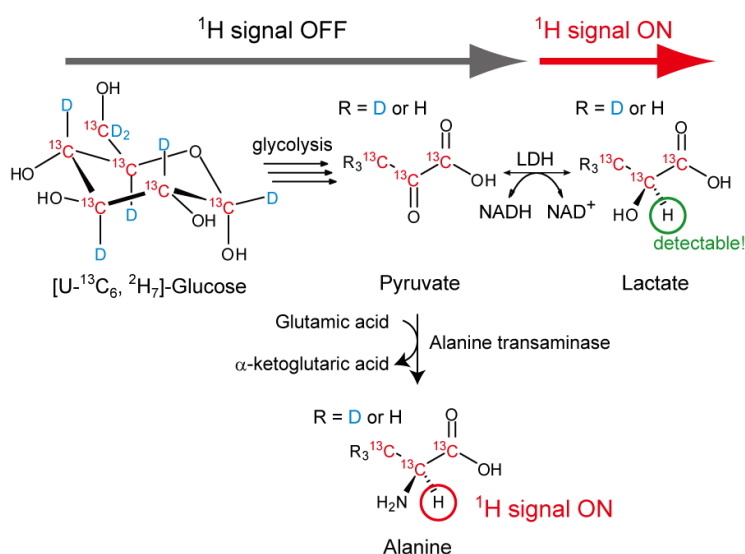


Figure 3. Glycolysis of Doubly (^{13}C - and D-) labeled glucose in relevance to the on/off regulation of triple-resonance NMR.

謝辞

多重共鳴NMRの研究は京都大学における科学技術振興調整費プログラム「高次生体イメージング先端テクノハブ」の支援のもとに行われた。記して謝するものである。

参考文献

- (1) (a) Sando, S.; Narita, A.; Abe, K.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5300. (b) Narita, A.; Ogawa, K.; Sando, S.; Aoyama, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2879. (c) Narita, A.; Ogawa, K.; Sando, S.; Aoyama, Y. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1105.
- (2) Sando, S.; Narita, A.; Aoyama, Y. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1795.
- (3) Famulok, M. *Nature* **2004**, *430*, 976.
- (4) (a) Badendure, J. R.; Adama, S. R.; Tsien, R. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14716. (b) Sparano, B. A.; Koide, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14954.
- (5) Kolpashchikov, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12442.