

バイオイメーシングプローブの開発研究

—研究の“きっかけ”から現在の成果まで—

東京大学名誉教授
東京大学創薬機構客員教授

長野 哲雄

1. はじめに —生命科学研究におけるバイオイメーシングの有用性と研究の概略—

現代の生命科学研究において、生細胞あるいは生体組織から酵素や受容体等の生理活性分子を細胞内小器官などの場所を特定して、その活性変化をダイナミックに可視化（イメーシング）により捉える事は生理活性分子の機能解析に不可欠な技術になっている¹。この技術開発および応用に関する生命科学研究はバイオイメーシング研究と呼ばれている。

我々はこのバイオイメーシング研究がまだ揺籃期にあった 20 年以上前に、蛍光強度の ON/OFF 機構に関する重要な発見を行った。その発見の成果はバイオイメーシングを行う際の探索分子（プローブ）の開発に応用でき、それを用いて種々のプローブ創出に成功してきた²。開発したバイオイメーシング蛍光プローブは世界中の研究者に利用され、蛍光タンパク質 GFP とともにこの分野の今日の隆盛をもたらしている。また、この開発原理は、他の研究者にも用いられ、新規プローブの開発が行われている。

また、この原理に基づくイメーシング蛍光プローブは創薬研究にも有用で、特に創薬の初期段階におけるハイスループットスクリーニングに応用でき、一段階で確定ヒット化合物が取得できる優位性を有する。この手法を用いて開発された化合物は新規疾病治療薬候補として大手製薬企業に導出された。

この研究は薬学に属するものであるが、同時に新たな境界領域であるケミカルバイオロジーのバイオニクス的研究で、日本におけるケミカルバイオロジーの基盤構築および発展に貢献している。

2. 研究のきっかけ

一般に、原理の発見は予想外の実験結果から生み出される事が多い。この研究の場合も例外ではない。

一酸化窒素 (NO) は循環器系、免疫系、中枢系の異なる部位で全く異なる作用を示す生理活性種で、ラジカルという非常にユニークな分子である。特に、循環器系における血圧を制御する分子種として注目を集め、その生成機構が解明され、それらがノーベル賞生理学・医学賞の授賞対象研究となった。NO は不安定なラジカルで生体内での寿命が短いため、このラジカルを生体中からの的確に捉えることは難しく、その機能解析にはバイオイメーシングが有用と考えられるが、当時は、それが可能なイメーシングプローブは存在しなかった。我々はこの NO のバイオイメーシングプロ

ープを開発する途上で、図 1 に示すように、後の DAF-2 と命名したフルオレセイン誘導体が NO と反応すると約 230 倍も蛍光強度が増大する現象を見いだした。

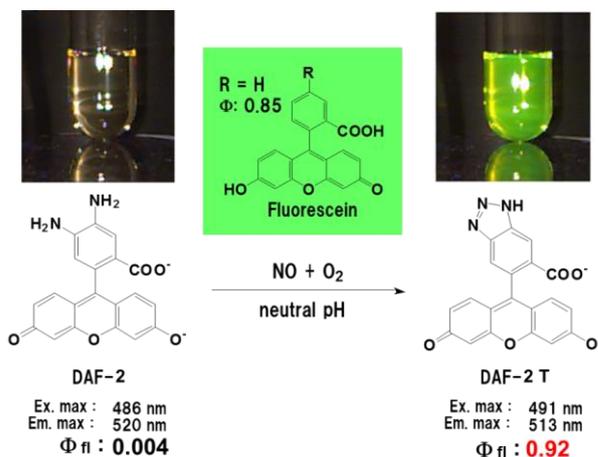


図 1. NO とフルオレセイン誘導体 DAF-2 の反応
(大きな蛍光強度変化が起こる)

まさに“ひょうたんから駒”の格言のように、予想もしなかった現象に驚くとともに、何故このようなことが起こるのだろうかとの疑問に思い、早速その蛍光発光の強度変化の機構解明に取りかかった。

種々検討の結果、この蛍光強度の制御は、光誘起電子移動 (Photoinduced electron Transfer: PeT) により引き起こされていることを明らかにした。次にこの PeT 機構について説明する。

3. 蛍光発光強度を制御できる原理

— 光誘起電子移動 (Photoinduced electron Transfer: PeT) 機構の発見 —

PeT 機構による蛍光強度の制御についてフルオレセインを用いて説明する。フルオレセインは高い蛍光量子収率、可視光励起、水溶性などの優れた特性を有している。フルオレセインは蛍光発光の観点から化学構造を「蛍光団部位」と「ベンゼン部位」に分けて考える事ができる。蛍光は光照射により励起された「蛍光団部位」が基底状態に戻る時 (緩和過程) に生じる発光である (図 2(a))。しかし、フルオレセイン誘導体の中には励起状態の「蛍光団部位」に「ベンゼン部位」から 1 電子移動するものがある (図 2(b))。その誘導体の場合、「蛍光団部位」は通常 (フルオレセインなど) とは異なる緩和過程を経て基底状態に戻るため、ほぼ無蛍光となる。これが PeT 機構である (後に a-PeT と命名)³。

また、逆に「蛍光団部位」から「ベンゼン部位」への 1 電子移動過程もある事を見出した (d-PeT と命名)⁴。

この PeT 機構は代表的蛍光化合物であるフルオレセインのみならず、全ての蛍光化合物に適用できる原理で、これに基づいて多種類のイメージング蛍光プローブが開発できる。我々はこの PeT 機構を分子軌道計算、電気化学、分光光学等から詳細に解析し、蛍光化合物をどのように化学修飾すれば、蛍光の ON/OFF を引き起こす事ができるかについて検討し、その結果、論理的に蛍光強度を制御できる道を切り開き、これにより蛍光プローブの分子設計が論理的にできるようになった⁵。

どのように論理的に設計できるのかについて NO のイメージングプローブ DAF-2 に戻って説明しよう。

DAF-2 は NO と反応し、トリアゾールを生成することで蛍光強度がほぼ OFF 状態から ON 状態に変化している。これは、NO と反応する前は a-PeT が起こることにより蛍

光強度が OFF 状態であったものが、NO がジアミンと反応して、トリアゾール環を形成することで、ベンゼン部位の HOMO エネルギーレベルが大きく下がり、PeT 過程が生じなくなり、蛍光強度が ON 状態になったと説明できる。

これは NO のみならず、Ca²⁺などの他の生理活性分子のイメージングプローブの創成にも適用できる。すなわち、生細胞からバイオイメーキングしたい生理活性分子と特異的に反応する置換基をベンゼン部位に導入して、HOMO レベルを大きく変化させるように分子設計することで、新規プローブが開発できることになる。

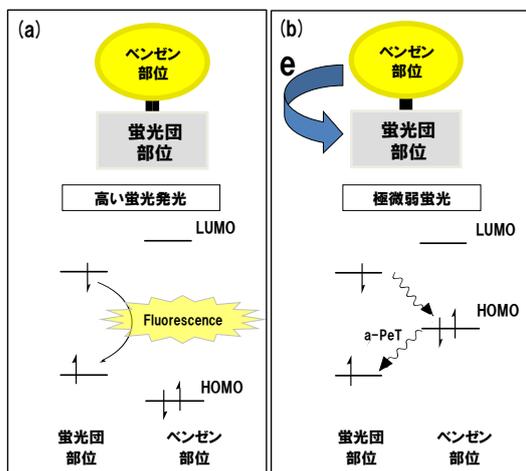
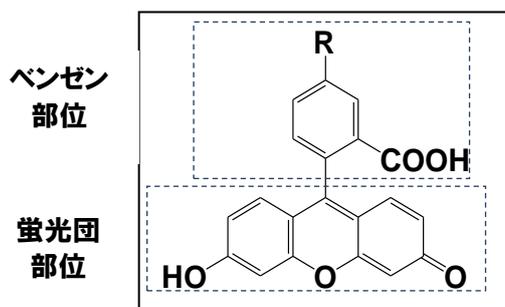


図 2. フルオレセインとその誘導体の蛍光発光および PeT 機構による蛍光発光制御機構

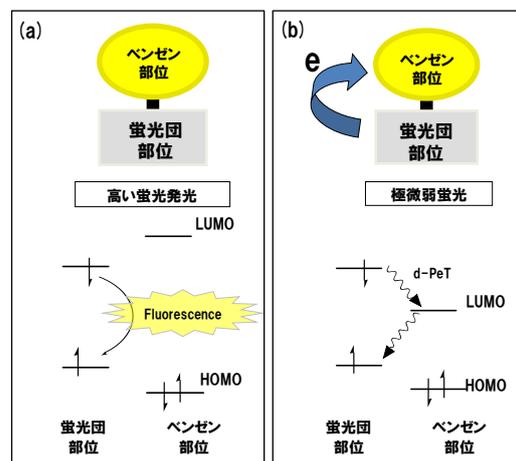


図 3. d-PeT 機構による蛍光発光制御機構

4. PeT 機構に基づいた各種生理活性分子イメージングプローブの開発

■ 一酸化窒素 (NO) プローブ (DAF-2, DAF-FM, DAF-FM DA, DAR-4M, DAR-4M AM, DAMBO, DAMBOO, MAMBO, DAC)	■ Mg ²⁺ プローブ (2'-CFs)
■ Various Esterase プローブ (がん細胞可視化プローブを含む)	■ β-Galactosidase プローブ (TG-βGal)
■ Highly Reactive Oxygen Species プローブ (HPF, APF, MitoHR, MitoAR)	■ β-Glucuronidase プローブ (TG-βGlu)
■ Zn ²⁺ プローブ (ACFs, ZnAF-2, ZnAF-2 DA, ZnAFs, ZnAB, ZnAF-R-2, DIPCY, JICBT-DPA)	■ Leucine aminopeptidase プローブ (臨床検査薬)
■ Peroxynitrite プローブ (NiSPY)	■ Phosphatase プローブ (TG-Phos)
■ 一重項酸素 プローブ (DPAX-1, -2, -3, DMAX)	■ DPP-IV プローブ
■ OCl ⁻ プローブ (HySOx)	■ NPP-6 プローブ
■ 環境感受性 プローブ	■ 蛋白質発現可視化プローブ
■ グルクロン酸転移酵素 プローブ (薬物代謝阻害反応可視化プローブ)	■ キナーゼ活性可視化プローブ
■ Caspase プローブ	■ 低酸素感受性 プローブ
■ Phosphodiesterase プローブ (CPFs)	■ Glutathione S-transferase プローブ (前がん病変可視化プローブ)
■ Protein tyrosine phosphatase プローブ (PTPs)	
■ β-Glucuronidase プローブ (TG-βGlu)	

14種類の蛍光プローブを市販

図 4. 開発に成功した蛍光バイオイメーキングプローブ

蛍光化合物をどのように化学修飾すれば、励起状態の電子移動の有無に基づいて蛍光の ON/OFF を生じさせることができるかについての検討の結果、論理的に蛍光発光を制御できる道を切り開くことができた。

これに基づいて、現在までに NO、Ca²⁺、活性酸素、酸素分子等の生理活性低分子だけではなく、ガラク

トシダーゼ、グルコシダーゼ、キナーゼなどの各種酵素の活性を捉える 40 種以上のプローブの開発に成功している (図 4) ⁶⁻¹⁸。このうち、既に 14 種類のプローブについては市販化しており、世界中の研究者により広く使用され、生命科学研究に大きく寄与している。

最近では、特異的ながん細胞の検出も可能となるプローブ開発も行われており、近い将来、臨床現場で利用が期待されている。

上記の蛍光特性の制御機構に関する研究を行う流れの中で、新たな挑戦として、新規蛍光団の創成にも興味を持たれるようになってきた。しかしながら、従来にない特徴を有する新規蛍光団の創出の難度は高く、試行錯誤の日々が続いた。

種々検討の結果、多色のバイオイメージングに有用な新規蛍光団として TokyoMagenta (SiR) ¹⁹ と命名された長波長領域に発光波長を持つ蛍光団の開発に成功した。イメージング研究においては光透過性に優れた 650 nm 以上の長波長の発光波長を持つ蛍光団は非常に有用である。長波長領域の発光は高い光透過性の長所を有しており、同時に多種類の生理活性分子のイメージングが可能になり、生細胞において生理活性分子の機能を時系列的に捉えることができるようになる。

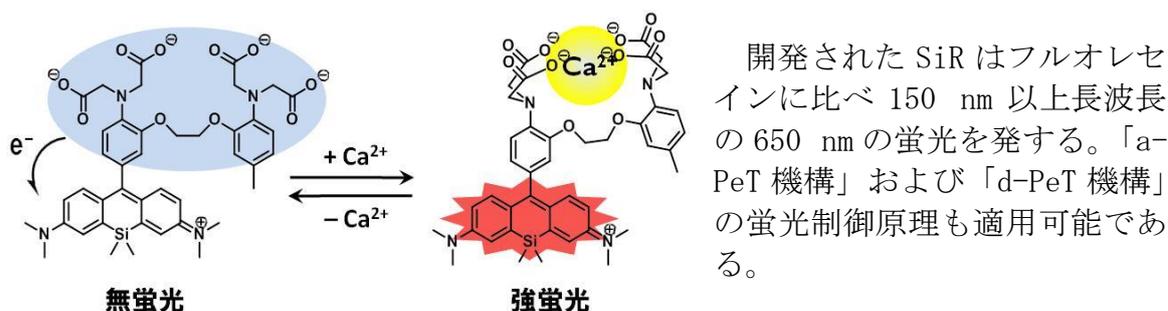


図 5. Ca^{2+} 近赤外蛍光イメージングプローブ (CaSiR-1)

この蛍光団を母核として開発された Ca^{2+} イメージング近赤外蛍光プローブ:CaSiR-1 を図 5 に示す。新規に開発した蛍光プローブ CaSiR-1 を用いて、池谷教授 (東大院薬) らとの共同研究により「脳が精細な興奮性調節に基づいて記憶を再生するメカニズム」を発見した (*Nat. Neurosci.*, 17; 503-506, 2014; p. 15)。これはニューロン (神経細胞) で抑制性シグナルに打ち勝つほどの大きな興奮性シグナルが受け取られる事により、記憶が再生されることを明らかにしたものである。

5. 蛍光プローブの創薬研究への寄与

これらの蛍光プローブは創薬研究にも有用で、標的分子を制御する化合物探索において 1 次スクリーニングの段階から特異的化合物を取得できる優位性を持つ。血管新生、がんの転移/浸潤などの疾患と関係するオートタキシンの阻害剤探索を目的とした大規模スクリーニング (HTS) に利用し、高選択性のヒット化合物の獲得に成功し、大手製薬企業へ腎臓病治療候補薬として導出に成功している ²⁰。独自に分子設計した蛍光プローブは現在までに 20 を超える創薬研究テーマの HTS に用いられ、複数の医薬品候補化合物を取得している。

6. 新研究領域ケミカルバイオロジーの基盤構築とその発展への寄与²¹

ケミカルバイオロジーは、有機化学を基盤として生命現象の解析に取り組む、いわゆる研究分野横断型の新領域研究であるが、バイオイメージング研究はケミカルバイオロジー研究の一翼を担い、日本において世界に先駆けて2005年春に日本ケミカルバイオロジー学会を立ち上げた（国際ケミカルバイオロジー学会は2011年設立）。2010年には文部科学省科学研究費補助金の細目として『ケミカルバイオロジー』が設けられるなど、短期間で研究分野として広く認知されるに至っている。

主要文献

1. Ueno, T, and **Nagano, T**: Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nat. Methods*, 8; 642-645, 2011. 【被引用回数：283】
(バイオイメージングプローブの生命科学研究における有用性について網羅的にまとめた総説)
2. **Nagano, T**: Development of fluorescent probes of bioimaging applications. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 86; 837-847, 2010. 【被引用回数：51】
(日本学士院刊行の学術雑誌 *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* にバイオイメージングプローブの開発原理からプローブ合成、生命科学研究への応用までをまとめた総説)
3. Miura, T, Urano, Y, Tanaka, K, **Nagano, T**, Ohkubo, K, and Fukuzumi, S: Rational design principle for modulating fluorescence properties of fluorescein-based probes by photoinduced electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 125; 8666-8671, 2003. 【被引用回数：200】
(代表的な蛍光化合物フルオレセインを用いて、レーザーフラッシュフォトリシスなどにより、蛍光強度の on/off が引き起こされる光有機電子移動 (Photoinduced electron Transfer) 機構を明らかにし、PeT 機構と命名した)
4. Ueno, T, Urano, Y, Setsukinai, K, Takakusa, H, Kojima, H, Kikuchi, K, Ohkubo, K, Fukuzumi, S, and **Nagano, T**: Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.*, 126; 14079-14085, 2004. 【被引用回数：214】
(論文3で明らかにした PeT 機構には、蛍光団への電子移動および蛍光団からの電子移動の2種類あることを解明し、前者を a-PeT 機構、後者を d-PeT 機構と命名した)
5. Urano, Y, Kamiya, M, Kanda, K, Ueno, T, Hirose, K, and **Nagano, T**: Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 4888-4894, 2005. 【被引用回数：433】
(蛍光化合物の置換基を微細に変化させることで蛍光強度を劇的に変化させることに成功。特にメチル置換基を有する化合物がバイオイメージングプローブ開発に有用で、TokyoGreen と命名。現在世界中でこの用語 TokyoGreen が使用されている)
6. Kojima, H, Nakatsubo, N, Kikuchi, K, Kawahara, S, Kirino, Y, Nagoshi, N, Hirata, Y, and **Nagano, T**: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Anal. Chem.*, 70; 2446-2453, 1998. 【被引用回数：1048】
(血管内皮由来血管弛緩因子である一酸化窒素 (NO) をイメージングとして生細胞中から捉える、世界初のプロトタイプ NO プローブ (DAFs) の開発に関する論文)
7. Kojima, H, Urano, Y, Kikuchi, K, Higuchi, T, Hirata, Y, and **Nagano, T**: Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38; 3209-3212, 1999. 【被引用回数：363】
(前論文で開発した DAF を元に、pH の影響を受けない改良型プローブを開発した)
8. Izumi, S, Urano, Y, Hanaoka, K, Terai, T, and **Nagano, T**: A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 131; 10189-10200, 2009. 【被引用回数：79】
(NO バイオイメージングプローブとして高感度化し、細胞内への透過性を向上させ、さらに細胞からの漏出を押さえるなど、実用的プローブを開発した論文、このプローブは現在市販されている)
9. **Nagano, T**, and Yoshimura, T: Bioimaging of nitric oxide. *Chem. Rev.*, 102; 1235-1269, 2002. 【被引用回数：303】
(NO のバイオイメージングに関する総説)
10. Setsukinai, K, Urano, Y, Kakinuma, K, Majima, HJ, and **Nagano, T**: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.*, 278; 3170-3175, 2003. 【被引用回数：769】
(PeT 機構に基づいて、 $\cdot\text{OH}$ などの活性酸素種をイメージングとして捉えるプローブ HPF, APF を開発した論文。これらのプローブは市販されている)

11. Gabe, Y, Urano, Y, Kikuchi, K, Kojima, H, and **Nagano, T**: Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore - Rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.*, 126; 3357- 3367, 2004. 【被引用回数 : 513】
(PeT 機構は蛍光化合物フルオレセインだけに適用される原理ではなく、全ての蛍光化合物の蛍光強度を変化させることができる原理である。この論文では Boron dipyrromethene (BODIPY)に適用して、イメージングプローブを開発した)
12. Sasaki, E, Kojima, H, Nishimatsu, H, Urano, Y, Kikuchi, K, Hirata, Y, and **Nagano, T**: Highly sensitive near-infrared fluorescence probes for nitric oxide and their application to isolated organs. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 3684-3685, 2005. 【被引用回数 : 310】
(本論文では PeT 機構を近赤外領域に発光波長を有する蛍光化合物 tricarboyanine に適用し、NO イメージングプローブを開発した。近赤外領域は組織透過性に優れており、生体組織の深部からのイメージングも可能になる。このプローブにより、ラット摘出腎から NO の検出に成功している)
13. Komatsu, K, Kikuchi, K, Kojima, H, Urano, Y, and **Nagano, T**: Selective Zinc sensor molecules with various affinities for Zn²⁺, revealing dynamics and regional distribution of synaptically released Zn²⁺ in hippocampal slices. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 10197-10204, 2005. 【被引用回数 : 303】
(PeT 機構に基づいて亜鉛イオン Zn²⁺のイメージングプローブを開発した。このプローブを用いて、ラット海馬切片から刺激に対応して Zn²⁺のイメージングに成功している。本プローブも市販している)
14. Kiyose, K, Kojima, H, Urano, Y, and **Nagano, T**: Development of a ratiometric fluorescent Zinc ion probe in near-infrared region, based on tricarboyanine chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 128; 6548-6549, 2006. 【被引用回数 : 269】
(近赤外領域の発光波長を有する tricarboyanine を蛍光団とする Zn²⁺イメージングプローブの開発に関する論文で、特にレシオ型の特徴を有する)
15. Sunahara, H, Urano, Y, Kojima, H, and **Nagano, T**: Design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching. *J. Am. Chem. Soc.*, 129; 5597-5604, 2007. 【被引用回数 : 289】
(BODIPY を蛍光団として細胞内の疎水性/親水性などの環境に応答するプローブの開発に成功した)
16. Kenmoku, S, Urano, Y, Kojima, H, and **Nagano, T**: 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. 【被引用回数 : 299】
(Rhodamine を蛍光団として、次亜塩素酸 HOCl イメージングとして捉えるプローブ HySOx を開発した論文。ブタ好中球から産生する HOCl を検出)
17. Komatsu, K, Urano, Y, Kojima, H, and **Nagano, T**: Development of an iminocoumarin-based Zinc sensor suitable for ratiometric fluorescence imaging of neuronal Zinc. *J. Am. Chem. Soc.*, 129; 13447-13454, 2007. 【被引用回数 : 424】
(蛍光団として iminocoumarin を基盤としてレシオ型の Zn²⁺プローブを開発。海馬切片から Zn²⁺を検出)
18. Urano, Y, Asanuma, D, Hama, Y, Koyama, Y, Barrett, T, Kamiya, M, **Nagano, T**: Watanabe, T, Hasegawa, A, Choyke, PL, and Kobayashi, H: Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.*, 15; 104-109, 2009. 【被引用回数 : 477】
(pH 感受性のプローブを開発し、これを用いて肺がんの ex vivo イメージングに成功した論文)
19. Koide, Y, Urano, Y, Hanaoka, K, Terai, T, and **Nagano, T**: Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and its applications for biological imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 133; 5680-5682, 2011. 【被引用回数 : 307】
(新規の蛍光団 Si-Rhodamine を開発。この蛍光団は近赤外領域に発光波長を有し、従来の近赤外領域の蛍光団に比べ、化学修飾の容易さ、光対象に対する抵抗性等、数多くの利点を有する。これを基盤として HOCl プローブを開発)
20. Kawaguchi, M, Okabe, T, Okudaira, S, Nishimatsu, H, Ishitani, R, Kojima, H, Nureki, O, Aoki, J, and **Nagano, T**: Screening and X-Ray crystal structure-based optimization of autotaxin (ENPP2) inhibitors, using a newly developed fluorescence probe. *ACS Chem. Biol.*, 8; 1713-1721, 2013. 【被引用回数 : 24】
(開発したイメージングプローブを創薬のスクリーニングに応用した論文。具体的にはオートタキシン阻害剤の開発に応用。得られた薬理活性化合物は製薬企業への導出に成功)
21. **長野 哲雄**他編集、“ケミカルバイオロジー”、共立出版 2008 年刊行
(長野はイメージングプローブ開発研究を基盤に、新たな研究領域としてケミカルバイオロジーの基盤を構築し、世界に先駆けて日本ケミカルバイオロジー学会を設立した。本書はこの分野の優れた研究を取りまとめ、分野の発展に大きく寄与している)

<被引用件数は 2019 年 2 月現在>