

科学技術振興調整費 「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」
 平成 18～20 年度実施「生体内分子を可視化するナノセンサ分子開発」成果の概要

研究代表者 大阪大学 教授 菊地 和也

1) 研究目的

近年、生命現象を生きたまま解析するバイオイメーキング研究が大きな注目を集めている。特にこれらの研究分野においては測定機器などのハード面における技術革新には目を見張るものがあり、その感度や分解能の向上は日々進歩し続けている。一方、測定したい生体分子を可視化可能なシグナルに変換する可視化センサー、とりわけ分子量の小さい合成センサー（ナノバイオセンサ）の研究例は少なく、観測技術（測定機器）と観測対象（医学・生理学研究）との間の橋渡しをする合成センサー分子の開発は遅れている。そこで本研究では、生体内分子の機能を、機能しているその場で生きたままの状態で調べる化学ツール（センサー分子）をデザイン・合成し、これまで調べることができなかった分子機能を解明する。

研究実施者らはこれまでに、生体内分子の機能を生きたまま可視化するため蛍光センサー分子を開発し実用化してきた。本研究では蛍光を用いた細胞内分子可視化にとどまらず、さらに高次の機能解明を可能にする可視化技術を開発する。その為には、新しい原理に基づいたナノバイオセンサの設計指針の確立が重要である。以上を踏まえて本研究では、以下に述べる3つのサブテーマを設定した（図1）。

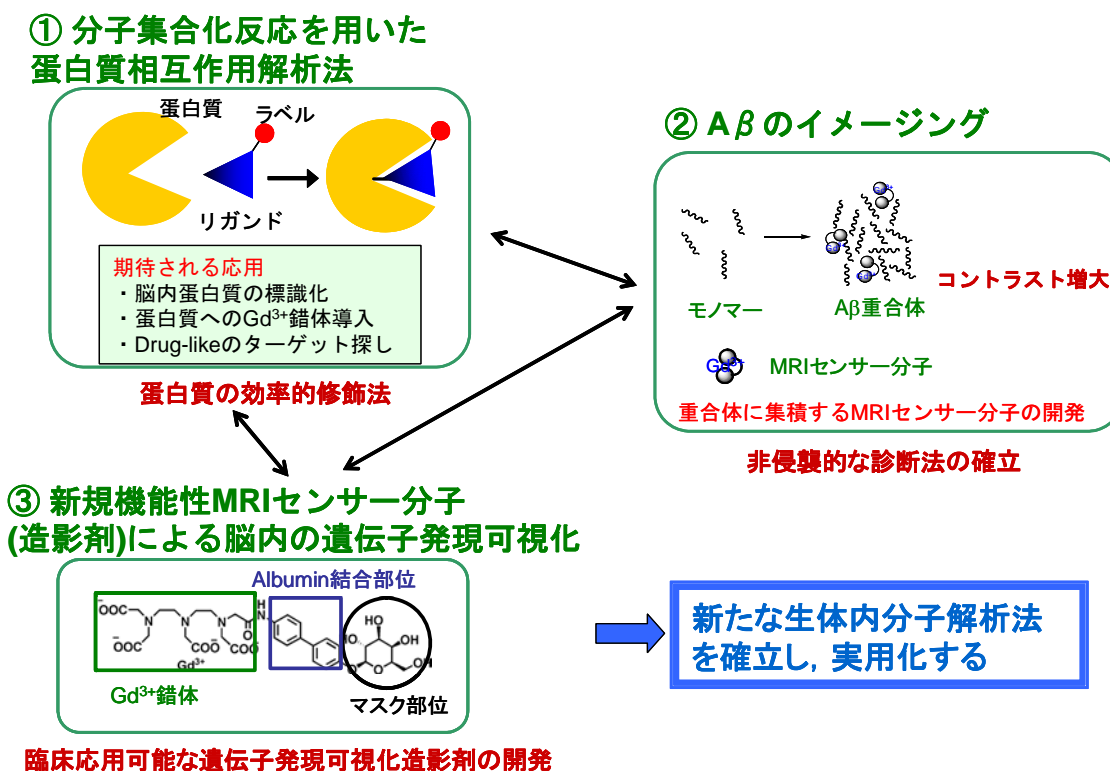


図1. 研究の概要

①分子集合化反応を用いた蛋白質相互作用解析法

蛋白質を可視化する技術は、生体内の蛋白質相互作用を解析する上で極めて有用な手法である。遺伝子工学技術の発展に伴って、蛋白質の局在や動態を観察する際には、標的蛋白質を GFP（緑色蛍光蛋白質）などの蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現させる手法が汎用されている。しかしながら、弱い蛍光強度や動物個体実験における汎用性に問題（組織深部からのシグナル検出が困難）がある。そこで、蛋白質に機能性小分子を標識する技術の開発は近年大きな注目を集めている。本サブテーマでは、生理条件下で選択的に基質と結合する酵素反応を利用し、遺伝子改変した酵素をタグ蛋白質として用いることで、高選択的かつ高効率の機能性分子ラベル化法を開発し、新たな蛋白質相互作用解析法の確立に取り組んだ。

②Aβのイメージング

アミロイドβ（Aβ）は自己集合を引き起こすペプチドであり、その集合体の神経毒性がアルツハイマー病の発症の要因であると考えられている。Aβ集合体は、その集合の程度によって神経毒性が異なることが報告されている。特に、Aβ集合体のうち粒径10～15nmのアミロスフェロイド（ASPD）と呼ばれる集合体は、神経細胞に対する毒性が最も強いとされ、このASPDを特異的に検出する手法の開発が求められている。一方、近年Gd³⁺錯体の分子構造のデザインにより生体内の生理活性分子を捉え、MRIにおける信号強度（MR信号）を変化させる機能性MRI造影剤の開発が注目を集めている。そこで本サブテーマでは、ASPDを始めとするAβ集合体を特異的に認識し、MRIで検出可能な分子プローブの開発に取り組んだ。

③新規機能性MRIセンサー分子（造影剤）による脳内の遺伝子発現可視化

近年、神経変性疾患における遺伝子治療の有効性が注目されている。治療用遺伝子の発現状況を経時的に評価し、脳機能の改善効果との関連を調べることは、このような先端的治療法の発展にきわめて重要である。しかしながら、現在までに治療のために導入した外来遺伝子が実際に機能していることを評価する有効な手法は無い。本サブテーマでは、個体レベルでの遺伝子発現を可視化する手法の確立を目指す。特に脳内における遺伝子発現可視化法の開発を最終目標に置く。現状では、機能性可視化センサー分子といえば蛍光性の機能性分子を指すことが多い。しかしながら、蛍光測定は主に可視光を用いることが多く、その研究対象は培養細胞や組織切片にとどまり、可視光の透過しない個体内部を非侵襲的に観察するプローブとして用いることは困難である。この点を打破すべく、本研究ではMRIに着目し、検出したい遺伝子産物を特異的に認識し、MRI画像のコントラスト変化へと繋げられるような機能性MRIセンサー分子の開発を行う。

これら三つのサブテーマはいずれも、蛍光顕微鏡を用いて解析を行ってきた既存の蛍光性可視化センサーを用いた計測技術の概念を、分子対象の応用性の拡大そして測定生物の応用性の拡大（細胞から個体へ）の両方の面において脱するもので、機能性分子開発のアプローチにより、生体分子機能評価における新たな方法論を供出するものである。

研究体制は、大阪大学を中核責任機関として置き、株式会社三菱化学生命科学研究所、

自治医科大学の三者が連携して基礎研究課題を推進する。また、製薬業界から田辺三菱製薬株式会社が参加し、実用化への検討を行う。本研究課題は、実際の研究現場あるいは医療現場におけるニーズに応えるためのプロジェクト設定を行っており、汎用性ある技術となりうるため周辺分野への波及効果は非常に大きいと考える。また、本研究技術は、生体機能計測分野において広く応用可能な基本技術および試薬を供出するものである。これらの試薬は、生体内の分子を迅速・高感度かつ特異的に捉えるための基礎的な科学技術になる。波及技術の例を挙げるなら、病態の診断、医薬候補化合物のスクリーニング、環境因子の生体への影響評価などが挙げられる。

2) 研究成果の概要

①分子集合化反応を用いた蛋白質相互作用解析法

酵素とその基質が特異的に相互作用する現象を利用して、タグ蛋白質特異的に低分子蛍光色素を修飾するシステムの開発を行なった。機能性分子をラベル化するタグ蛋白質として、 β -ラクタマーゼを選択した。 β -ラクタマーゼは β -ラクタム環を加水分解する酵素で基質特異性が高く、哺乳類細胞では発現は見られない。それゆえ、内在性蛋白質へのラベル化が回避できると考えた。当初は阻害剤と蛍光色素を組み合わせることで β -ラクタマーゼへのラベル化を検討したものの、酵素による阻害剤の分解反応が高効率で起こることが判明した。そこで、基質あるいは阻害剤が酵素に結合した状態で酵素反応が止まるように、酵素の活性中心のアミノ酸を改変した変異蛋白質を作成した(図2)。この変異蛋白質に、別途デザイン・合成した蛍光性ペニシリン誘導体が共有結合ラベル化されることを、SDS-PAGE を用いて確認した。この変異蛋白質をタグとして、他の標的蛋白質に融合し、ラベル化を行なったところ、こちらも効率の良いラベル化が起こることがわかった。

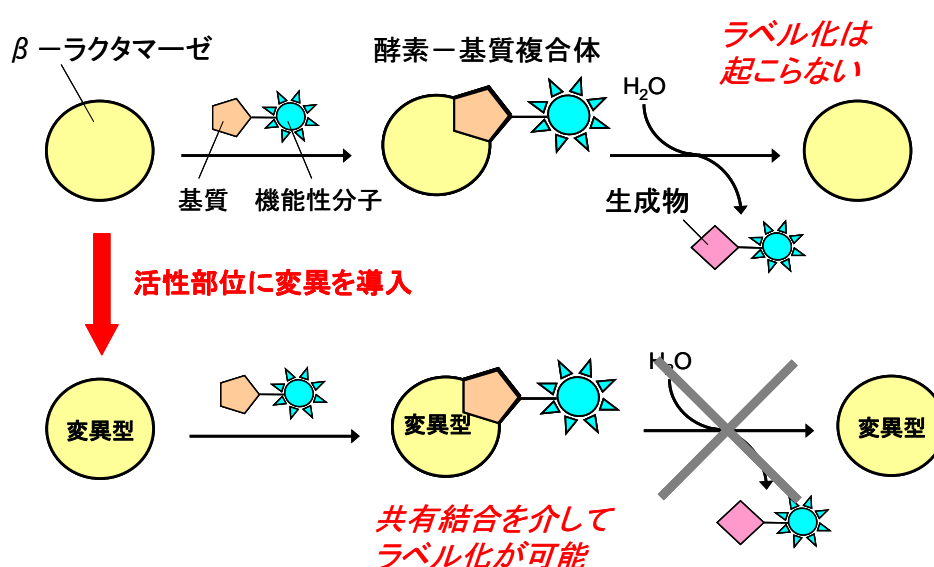


図2. 酵素の活性部位の改変によるタグ蛋白質の作成

続いて、タグ蛋白質に蛍光分子がラベル化されたときに初めて蛍光を発するような発蛍光型ラベル化プローブの作製を行なった。開発したプローブは β ラクタマーゼの基質に蛍光色素と消光基がそれぞれ修飾されており、ラベル化が起きると消光基が脱離するように

デザインした。このプローブを用いてラベル化反応を行なったところ、ラベル化されたときのみプローブに蛍光が見られることを確認した。

次に、細胞膜上に標的蛋白質とタグ蛋白質を融合蛋白質として発現させ、ラベル化プローブ処理を行った後、蛍光顕微鏡で観察を行なったところ、細胞膜上の標的蛋白質が効率的に蛍光ラベル化されることを確認した。以上により、細菌酵素の特異的基質認識特性を利用して、新規機能性分子ラベル化システムの開発を達成した。

②Aβのイメージング

ASPDに特異的に集積するMRIセンサー分子の開発研究を行った。ASPDの特異的認識のために抗ASPD抗体を作製した。続いて、MRI造影剤であるGd³⁺錯体をタンパク質に修飾する為にメルカプト (-SH) 基と選択的に反応する官能基を有するGd³⁺錯体の合成を行った(図3)。抗ASPD抗体のヒンジ領域に存在するジスルフィド結合をジチオスレイトール(DTT)で還元し、生成したメルカプト基に合成したGd³⁺錯体を修飾した。ドットプロットにより、ASPD認識能を確認した後、¹H NMRにおける緩和能を評価した。Gd³⁺標識抗ASPD抗体を含む水溶液の緩和時間は、縦緩和時間T₁、横緩和時間T₂ともに、ASPDを添加することで短縮が観察された。すなわち、ASPDを認識して緩和能を変化させるMRIプローブの開発に成功した。

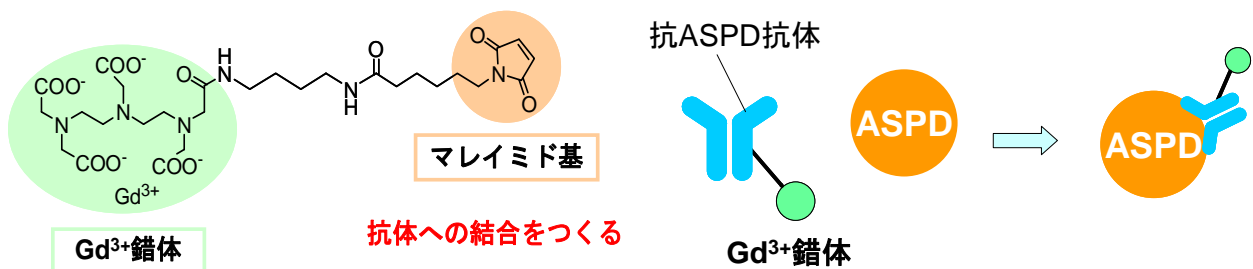


図3. (左) チオール基修飾用マレイミド化 Gd³⁺錯体、および(右) Gd³⁺錯体修飾抗体による ASPD の MRI 検出の機構

続いて、プローブの緩和能を上昇させる目的で、抗体一分子あたりに修飾するGd³⁺錯体量を増やすことを考えた。そこで、樹状構造を有する単分散高分子であり、末端部分に多くの化合物を修飾できる dendrimer に多数のGd³⁺錯体を修飾した。Gd³⁺錯体 dendrimer を修飾した抗ASPD抗体は非常に高い緩和能を示し、プローブの高感度化を達成した。また、ドットプロットによりASPD認識能も確認した。また、老齢サルおよびAPP過剰発現トランスジェニックマウスを用いて、MRIによる脳内ASPDのin vivo検出、ならびにex vivo検出実験を行った。また、線維化したものを含むAβ重合体全般に集積する低分子MRIセンサー分子の合成も行った。

また、アルツハイマー病の初期診断を視野に入れ、ASPD 形成の最も初期に生成する凝集体を観測する手法の確立を行なった。まず、物性の異なる新たな蛍光官能基を導入したAβの合成法を確立した。次にそれらを用いて、凝集過程のどの段階から ASPD 形成が生じているのかを明らかにするため、複数の ASPD 特異的抗体を蛍光標識し、蛍光相互相関分光法 (FCCS) による Aβ 凝集過程のリアルタイム観測を行なった。その結果、今まで十数時間かかると予想していたよりも非常に早い段階で ASPD 形成が起きていることを明ら

かにした。また、ASPD 形成に先行して、より小さい凝集体が出来ていることを溶液中で初めて示した。

続いて、AAP 発現モデル動物の作成に取り組んだ。まず、神経細胞特異的プロモーターの下流にアミロイド前駆体蛋白質 APP の遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを作製した。また、myelin basic protein (MBP) プロモーターにより oligodendrocyte 特異的に遺伝子発現可能な AAV ベクターを開発した。作製した各種の AAV ベクターをラット胎児脳の初代培養細胞に感染させ、神経細胞への遺伝子導入効率を検討した。また、ラット脳へ定位脳手術により注入し遺伝子発現の程度を比較検討した。その結果、8 型 AAV ベクターでは脳の広範な領域で遺伝子発現が見られることを明らかにした。また、MBP プロモーターを使用することにより、oligodendrocyte に特異的に遺伝子導入可能なことを示した。3 頭のカニクイサルの海馬に、AAV ベクターを注入し持続的に APP を発現させるモデルを構築した。老齢カニクイサルの脳組織標本の免疫組織染色では、抗 A β 抗体 6E10 に陽性となる老人斑が大脳皮質、海馬、扁桃体に認められた。さらに、抗 ASPD 抗体で染色される老人斑が認められた。

③新規機能性 MRI センサー分子（造影剤）による脳内の遺伝子発現可視化

遺伝子発現の検出には、レポータータンパク質を介して検出する方法が挙げられる。レポータータンパク質は目的遺伝子が発現したときに一緒に発現するタンパク質で、緑色蛍光蛋白質 (GFP) などが有名である。本研究では、レポーター蛋白質（酵素）として β -ガラクトシダーゼを選択し、 β -ガラクトシダーゼの活性を MRI によって検出する手法の開発に取り組んだ。

最初に、酵素活性を MRI で検出するプローブの設計原理の構築を行なった。 ^1H MRI は、生体の各組織で異なるコントラストを与えるために、臨床で幅広く使われている。しかしながら、標的酵素の活性を MRI シグナルとして検出するには、バックグラウンドシグナルは無い方が望ましい。すなわち、 ^1H MRI は生体内の水や脂肪の水素原子を見ているため、常に大きなバックグラウンドシグナルが存在し、プローブシグナルのみを可視化することは困難である。一方、 ^{19}F は ^1H と同様に天然存在率がほぼ 100%の核種であり、生体内には歯と骨以外にはほとんど存在しないため、標識化合物を体外から投与してその生体内での代謝動態を画像化することが注目されている。そこで、本サブテーマでは酵素活性の ^{19}F MRI 検出に取り組んだ。

常磁性分子は近傍に存在する MRI 核種の緩和時間 T_1 および T_2 を大幅に短縮する。これが常磁性緩和促進効果であり、 Gd^{3+} はその効果が極めて大きいことが知られている。図 4 に示すように、 Gd^{3+} 錯体と ^{19}F を含む官能基を酵素によって切断されるリンカーで繋ぐと、常磁性緩和促進効果により ^{19}F の横緩和時間 T_2 は大幅に短縮し、その結果 MRI シグナルは消失する。リンカーを酵素で加水分解すると常磁性効果が消失し、 T_2 が延長し、MRI シグナルが回復というメカニズムを考案した。実際にリンカー構造をプロテアーゼ caspase-3 によって切断されるペプチド配列にした化合物を合成したところ、その ^{19}F MRI シグナルは常磁性緩和効果により消失していた。そこに、caspase-3 を添加したところ、酵素反応の進行と共に MRI シグナルが回復した。以上より、加水分解酵素を ^{19}F MRI で検出するプローブ設計の基本原理を確立することに成功した。

分子内常磁性緩和効果

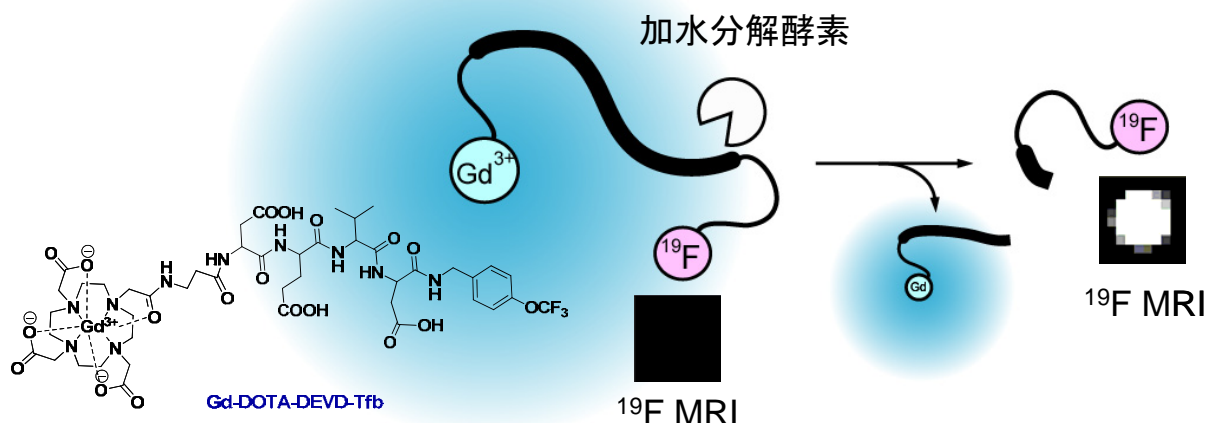


図4. 常磁性緩和効果を利用した加水分解酵素活性の ^{19}F MRI 検出

次に、この原理を応用し、遺伝子発現の可視化プローブ開発に取り組んだ。 β -ガラクトシダーゼは、ラクトースを加水分解する酵素であり、大腸菌や生細胞を用いた実験系において、遺伝子発現の指標となるレポーター酵素として汎用されている。そこで、 β -ガラクトシダーゼによって加水分解されると常磁性緩和効果が消失し、 ^{19}F MRI シグナルが現れるようなプローブ化合物をデザインし、合成を行った。この化合物は、 β -ガラクトシダーゼによって加水分解を受けると、 ^{19}F と Gd^{3+} の距離が増大するようにデザインされている。プローブ化合物を含む緩衝液に、 β -ガラクトシダーゼを加えたところ、ブロード化していた ^{19}F NMR シグナルはシャープになり、消失していた ^{19}F MRI シグナルは増大した(図5)。以上により、常磁性緩和促進効果を利用してレポーター酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブの開発に成功した。

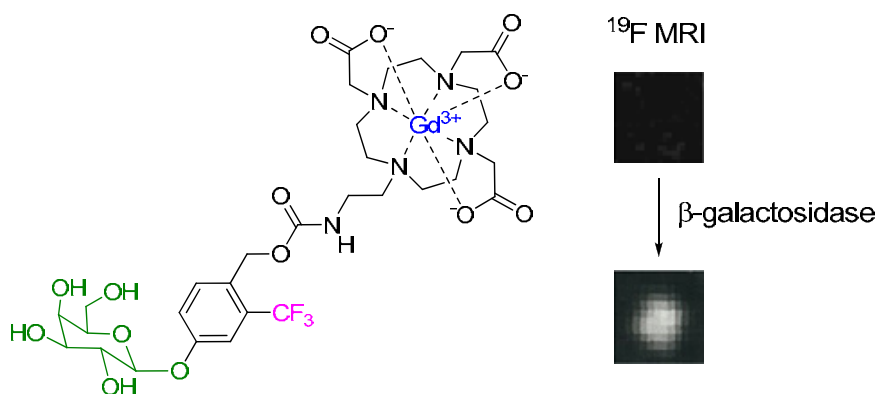


図5. β -ガラクトシダーゼ活性を検出する ^{19}F MRI プローブの構造、および酵素添加による ^{19}F MRI シグナルの変化