

ホタルの光で生理活性分子を高感度に捕らえる！
—電子移動による生物発光の ON/OFF 制御法の確立と、イメージングへの応用—

1. 発表者：

浦野 泰照（東京大学大学院薬学系研究科創薬学専攻、同医学系研究科 教授）

高倉 栄男（東京大学大学院薬学系研究科 元大学院生、同医学系研究科 元博士研究員、現 Yale University, School of Medicine 博士研究員）

小嶋 良輔（東京大学大学院薬学系研究科 元大学院生、現 ETH Zurich, Department of Biosystems Science and Engineering 博士研究員）

神谷 真子（東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻 助教）

2. 発表のポイント：

◆生物発光の ON/OFF を、発光基質の精密デザインにより論理的に制御する新しい方法論を確立し、さらにこれを生理活性分子の高感度イメージングへ応用することに成功しました。

◆これまで、生理活性分子を検出できる生物発光基質のバリエーションは限られていましたが、新しい発光の ON/OFF 制御法を確立し、これを大きく拡張し得ることを示しました。

◆生きた動物個体内で、さまざまな生理活性分子を高感度に検出することが可能になり、これまで観測できなかった生命現象の理解に貢献できると期待されます。

3. 発表概要： （※ 研究内容を、非専門家に紹介する文章。300～500 文字程度）

ホタルの光に代表される生物発光を用いたイメージング手法は、非常に高感度なシグナル検出を可能とすることから、動物個体内での様々な生命現象を解明するために利用されています。中でも、特定の生理活性分子を認識することで、その発光が OFF から ON になる生物発光プローブと呼ばれる分子を用いたイメージング手法は、どのような時に、どのような場所でその生理活性分子が発生しているのかを生きた動物個体内で可視化できる強力な手法です。しかし、これまで生物発光プローブの ON/OFF を制御可能な方法は限定されており、検出できる生理活性分子の種類には大きな制限がありました。

東京大学大学院薬学系研究科、同医学系研究科浦野泰照教授らは、ホタルの発光基質の類縁体に、基質が発光するために必要な、基質内の電子の遷移(注1)を制御できる化学スイッチを導入することで、生物発光基質の ON/OFF を論理的にコントロールすることができることを初めて見出し、さらにこれを生理活性分子の一つである、一酸化窒素(注2)の生体内イメージングに応用することに成功しました。

今回確立された手法を用いることで、動物個体内で様々な生理活性分子を生きたままの状態を観察することが可能になり、生命現象の解明に役立つことが期待されます。

4. 発表内容： （※ 詳しい発表内容を 1500～2000 字程度で記載ください）

生物発光イメージング法は、ルシフェリンと呼ばれる発光基質がルシフェラーゼと呼ばれる酵素と出会うことで自ら発する光を用いるため、生体組織による励起光(注1)の吸収・散乱や自家蛍光といった、蛍光イメージング法(注3)においてシグナルの感度を大きく下げたしま

う要因が問題とならないことから、動物個体内において極めて高感度なシグナル検出を可能にする手法として、生命科学研究において汎用されています。さらに、ある特定の生理活性分子が存在する時のみ、その発光が ON になる生物発光プローブと呼ばれる分子を用いれば、その生理活性分子が生体内において、どのような場所で、どのようなタイミングで放出されるのかをイメージングによって詳細に解析することが可能です。しかし、これまで生物発光プローブは、発光基質を何らかの保護基(注 4)でマスクしておき、特定の生理活性分子が反応したときに、この保護基がはずれることで発光性を回復するというデザインによってしか開発できなかったため、検出できる生理活性分子の種類には、大きな制限がありました。

東京大学大学院薬学系研究科、同医学系研究科浦野泰照教授らは、アミノルシフェリンと呼ばれるホタルの発光基質の類縁体に、基質が発光するために必要な基質内の電子の遷移を制御可能な化学スイッチを導入することで、生物発光基質の ON/OFF を論理的にコントロールすることができることを初めて見出しました。さらにこれを用いて、重要な生理活性分子の一つである一酸化窒素の生体内イメージングに応用することに成功しました。

発光分子や蛍光分子は、分子内の電子が励起状態(注 1)と呼ばれる活性化状態から、基底状態(注 1)と呼ばれる非活性化状態に戻るときに光子を放出しますが、同研究グループは、これまでに、蛍光分子の ON/OFF(励起状態から光子を放出するか否か)を、蛍光分子近傍に結合した電子供与体から、励起状態にある発光団(電子受容体)への電子の移動によって論理的にコントロールできることを見出していました(注 5)。生物発光基質も、蛍光分子と同様の励起状態を取るため、発光団の近傍に精密にデザインした化学スイッチを結合することで、このスイッチ部位からの電子移動によって、発光の ON/OFF をコントロールできるのではないかと考え研究を始めました。

同研究グループはまず、異なる電子供与能を持つ分子を発光団の近傍に結合することで、その電子供与能と基質の発光強度の相関を調べました。すると、基質の発光強度と、結合した分子の電子供与能の間には良い相関が見られ、高い電子供与能を持つ分子を結合した場合には、この分子から発光団への電子の移動によって、発光を OFF の状態に抑えることができることを初めて見出しました。研究グループはこの新しく発見した現象を **Bioluminescent enzyme-induced electron transfer (BioLeT)** と名づけました。

この新しい生物発光の ON/OFF の制御原理は、これまで開発が困難であった生物発光プローブの開発を可能にしました。従来の生物発光プローブは一酸化窒素など、発光基質をマスクした保護基を外す活性がない生理活性分子を検出することは不可能でしたが、同研究グループは、一酸化窒素が存在しない時には化学スイッチが発光を OFF にできるだけ電子供与能を持つ一方で、一酸化窒素が化学スイッチと反応すると、電子供与能力が著しく減少し、発光が ON になるよう精密にプローブを設計することで、一酸化窒素を検出する生物発光プローブ **Diaminophenylpropyl-aminoluciferin (DAL)** を初めて開発しました。さらに、全身にルシフェラーゼを発現する“ホタルラット”内でこれを用いることで、これまで困難であった生きた動物個体内での高感度な一酸化窒素の検出に成功しました。(添付資料参照)。

上記の生物発光の ON/OFF 制御原理は、様々な生理活性分子の検出原理へと応用できると考えられることから、動物個体内で様々な生理活性分子を生きたままの状態を観察することが可能になり、生命現象の解明に役立つことが期待されます。

本研究は、自治医科大学先端医療開発部門、小林研究室(教授 小林英司)との共同研究で行われました。

また本研究は、文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「酸素を基軸とする生命の新たな統合的理解(酸素生物学)」の支援を受けて行われました。

5. 発表雑誌:

雑誌名: 「Journal of the American Chemical Society」(2015年3月11日)

論文タイトル: New class of bioluminogenic probe based on bioluminescent enzyme-induced electron transfer: BioLeT

著者: Hideo Takakura*, Ryosuke Kojima*, Mako Kamiya, Eiji Kobayashi, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano (*equal contribution)

DOI 番号: 10.1021/ja5111014w

アブストラクト URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja5111014w>

6. 問い合わせ先:

浦野 泰照 (東京大学大学院薬学系研究科創薬学専攻、同医学系研究科 教授)

TEL: 03-5841-4850, FAX: 03-5841-4855, E-mail: uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説: (※ 解説が必要な用語がございましたら記載ください)

(注1) 電子の遷移、励起状態、基底状態、励起光

電子の遷移とは、原子や分子の中の電子が、光などのエネルギーを吸収または放出し、ある軌道から別の軌道へ飛び移ること。その電子状態が最低エネルギーにある状態を基底状態といい、それより高いエネルギーにある状態を励起状態と言う。生物発光基質がルシフェラーゼと出会って反応したり、蛍光物質が光(励起光)を吸収したりすると、分子内の電子は、基底状態から励起状態へと遷移する。一方、生物発光基質や蛍光物質は、励起状態から基底状態に遷移するときに、その2つの状態のエネルギーの差分を光として放出する。

(注2) 一酸化窒素

化学式 NO で表される無機化合物。動物体内では血管内皮細胞等から産生され、血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、白血球の血管内皮細胞への接着や、内皮細胞下組織への浸潤の防止作用、血管平滑筋細胞の増殖抑制作用などを持つ。

(注3) 生物発光イメージング法と蛍光イメージング法

生物発光イメージング法は、暗闇でわずかなホタルの光を視認できるのと同様に、発光基質が自ら放つ光を検出するため、感度が非常に高い。一方、蛍光イメージング法では、蛍光基質を

励起するために、必ず励起光を当てる必要がある。真っ暗な部屋の中では、蛍光ペンの色を視認できないのと同様。この励起光の生体組織による散乱、吸収が、検出感度を下げる原因となる。

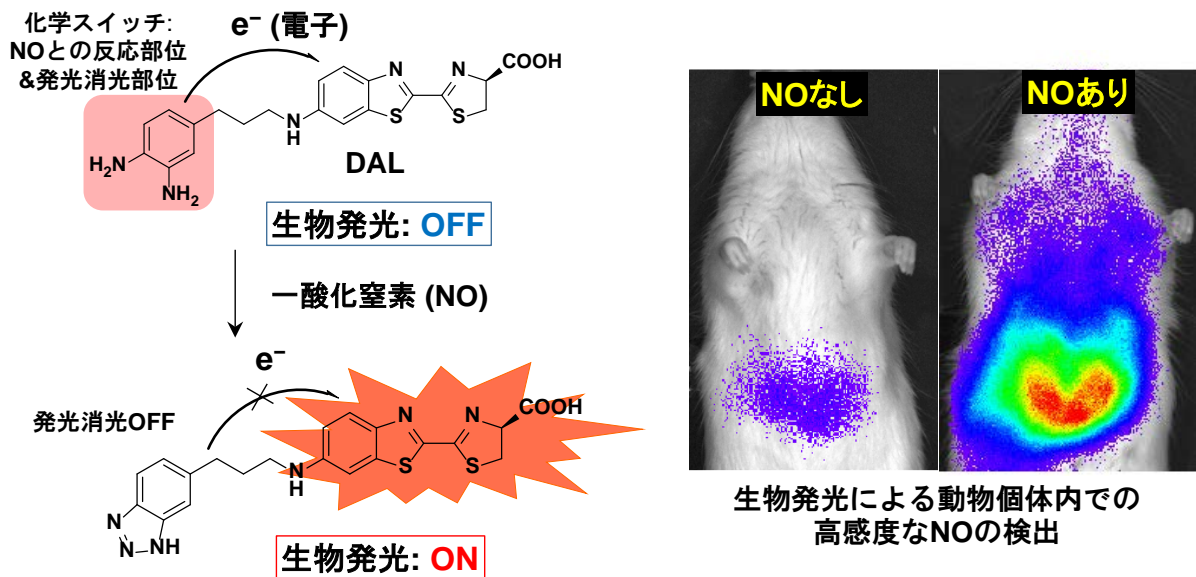
(注 4) 保護基

化合物が反応する場所を不活性な形にマスクして変換しておくことを「保護」と言い、このマスク部位を「保護基」と呼ぶ。

(注 5) 電子移動による蛍光分子の ON/OFF コントロール

励起光照射によって励起された(注 1)蛍光団に、近傍に結合した別の分子から電子移動(光誘起電子移動と呼ばれる)が起きると、励起された電子が元の軌道に戻れなくなり、蛍光が放出されなくなる。結合した別の分子が、蛍光団にどれだけ電子を与えやすいか(電子供与能)をコントロールすることで、蛍光分子の ON/OFF をコントロールできる。

8. 添付資料 :



一酸化窒素(NO)を検出可能な生物発光プローブ、DAL の設計原理と、全身にルシフェラーゼを発現するラット内での NO イメージングの図。DAL が NO と反応する前は、電子移動(BioLeT)により発光が消光されているが、化学スイッチ部位が NO と反応することで BioLeT による消光が解除され、基質は発光する。