

「生物発光の仕組みを利用した活性酸素種の次世代型解析手法の開発」

神戸大学 大学院農学研究科

久世 雅樹

1 研究の背景と目的

活性酸素種 (ROS) は、細胞内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャー (情報を伝達する分子) として重要な役割を担っている。細胞膜上で受容されたシグナルを、ROS が細胞内へと伝達していく詳細な分子機構 (どのような分子がどのように伝達するのかという仕組み) は未解明である。その理由は、生細胞における ROS の時間的・空間的な変化量を動的に解析する手段がないためだと考えられている [Xia *et al J Exp Bot* 2015:2839]。

研究代表者は、ROS に依存して発光するタンパク質について、その発光機構を解明する研究に従事しており、この発光タンパク質が ROS の動的解析に利用できると考えた。ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質 (フォラシン)、トビイカ由来の発光タンパク質 (シンプレクチン) は、デヒドロセレンテラジン (DCL) (図 1: 数字は置換基の位置番号を示す) を基質として利用している。発光タンパク質の中で、DCL は発光反応を司る化学構造 (クロモフォア) を形成しており、このクロモフォアが ROS の刺激により酸化分解して発光する [Kuse *Biosci Biotechnol Biochem* 2014:731]。フォラシンとシンプレクチンは発光に利用する ROS の種類が異なるため、

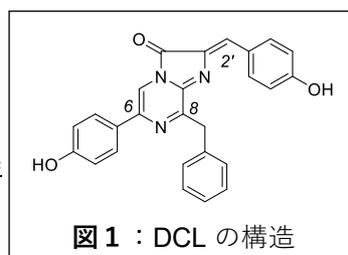


図 1 : DCL の構造

ROS を区別して発光させることが可能である。これらの発光タンパク質は青色の可視光で発光するが、光の透過率が低いため、試験管内でしか利用できないのが現状である。この発光波長を近赤外光へと移動させることができれば、「生体の窓」と呼ばれる光が生体を透過しやすい波長域での発光現象となり、生細胞・生体組織において ROS を選択的に可視化できる。本研究では、フォラシンとシンプレクチンの特徴を最大限利用すべく、クロモフォアを近赤外蛍光分子で修飾して発光波長を移動させ、ROS の刺激によって、近赤外発光するように改変した新規発光系の開発を目指すことにした。

2 研究方法・研究内容

2-1 : DCL 誘導体の合成

ピラジン環という環内に窒素原子を 2 個もつ芳香環に、ベンゼン環で構成される置換基を 3 つ順次導入していく方法によって、DCL を合成するのが一般的である (図 2)。本研究ではこの方法を参考にして、ジブロモピラジンを出発物質として、DCL 誘導体を合成することにした。

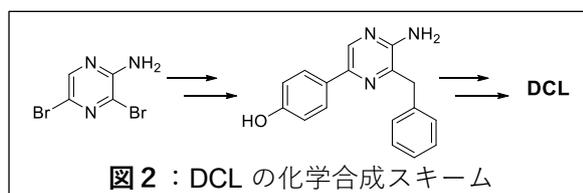


図 2 : DCL の化学合成スキーム

2-2 : DCL 誘導体の構造活性相関

得られた誘導体について、DCL の構造とその発光活性に関する相関研究を実施した。これまでは市販のフォラシンを利用していましたが、最近遺伝子発現したアポフォラシン（基質のないタンパク質）を得る方法を確立し、ペルオキシダーゼと過酸化水素の混合物で発光させることに成功している（図3）。この発光系を用いて、構造活性相関の研究を進めた。

1	11	21	31	41	51
EEVQCAMNWT	QANEYVFNVD	WMTIFIYDYG	AQEQLYEDRA	LGLCRIERAG	PGTTKAVWIN
WSNDTQSCVT	RKTIFFEVGG	EIARLVDYRP	QEDGTEKTFT	RKFSSKMPGT	YMLMDVCATR
DADDKCIEGT	IVVTVRVSly	DEDNNGVMDE	GKVIPSETIE	DDIKDCGLLD	QDVELDYTWT
QNECDLPDTV	DEAEDTPSET	GEFEW			
		201			

図3 : アポフォラシンのアミノ酸配列

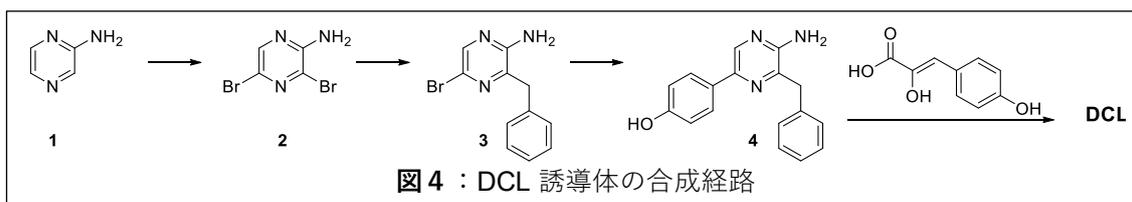
2-3 : アルキン側鎖の導入

新たに DCL にヒドロキシ基を導入し、選択的にアルキン側鎖を導入することにした。これにより、クリック反応という生体中でも利用できる反応を利用して、DCL に近赤外蛍光分子が導入できる。このアルキン側鎖の導入について、反応条件の精査を進めた。

3 研究成果

3-1 : DCL 誘導体の合成

市販のアミノピラジン (1) を臭素化することでジブromoアミノピラジン (2) を合成した。精製方法について検討した結果、昇華法を用いることで報告されている方法よりも純度と収率ともに良好に 2 を得ることができた。次に遷移金属触媒を用いたクロスカップリング反応を 2 回繰り返すことで、重要な合成前駆体であるセレネラミン (4) を合成した。初めに Negishi カップリング反応によりベンジル基を導入し化合物 (3) を得たのち、Suzuki-Miyaura カップリング反応により 4-ヒドロキシフェニル基を導入することで、4 を収率よく得ることができた。最後に化合物 (4) と 4-ヒドロキシフェニル酢酸とを縮合することで DCL を合成することができた。クロスカップリング反応において、利用する芳香族化合物を変えることで、様々な置換基を有する DCL 誘導体を合成することができた。また、フェニル酢酸のベンゼン環上の置換基も色々導入することで、多くの DCL 誘導体が合成できた。



3-2: 構造活性相関

化学合成した種々の DCL 誘導体の構造と、フォラシン発光活性との相関を調べた。その結果、DCL の 2'位と 8 位に位置する 4-ヒドロキシフェニル基は発光に必須の置換基であり (図 1 参照)、その構造を改変すると、フォラシンの発光活性が著しく低下することが判明した。一方、8 位に位置するベンゼン環は発光に必須の官能基ではないことが明らかになり、この部位でさらなる分子の修飾が可能であることが判明した。そこで、DCL の 8 位に近赤外蛍光分子を導入するためのリンカーを導入するべく、以下検討を進めた。

3-3: DCL の 8 位へのアルキン側鎖の導入方法の検討

DCL の 8 位にアルキン側鎖を導入するために、まず合成の初期段階で導入する方法を採用し、図 5 に示す前駆体をデザインした。この前駆体が合成できれば、すでに確立した方法を利用し DCL 骨格が容易に構築できると考えた。

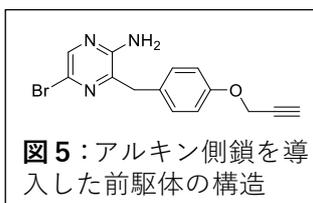


図 5: アルキン側鎖を導入した前駆体の構造

ジブromoアミノピラジンを出発物質として、4-アルコキシベンジル基を導入した。ヒドロキシ基の保護基には、TBS 基 (*t*-ブチルジメチルシリル基) やメトキシ基を用いた。TBS 基は脱保護が容易であるが、その後のアルキン側鎖導入における反応収率が低下する結果となった。そこで、メトキシ基を用いて、合成を検討した。脱メチル化はピリジン塩酸塩で加熱することで完了した。収率は良くなかったものの、生成物が高純度で得られる点がより有利であった。次に、ハロゲン化プロパルギルとの S_N2 反応 (置換反応) により、目的とするアルキン側鎖が導入できた (図 6)。

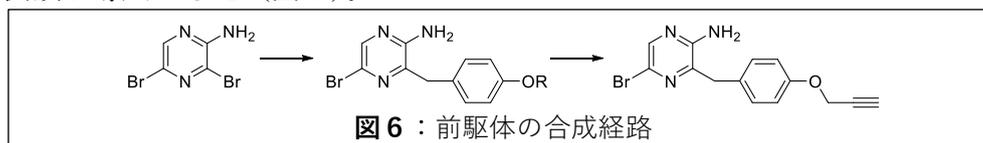


図 6: 前駆体の合成経路

このアルキン側鎖を導入した前駆体から、さらに DCL 骨格の構築をすすめた。しかしながら、次の段階のクロスカップリング反応では、アルキン側鎖のメチレン炭素が影響を受け、複雑な生成物を与える結果となった。このメチレン炭素が、酸素原子の隣であり、かつプロパルギル位という反応性の高い位置にあるためだと考えられた。そこで、メチレン炭素をもう一つ増やしたアルキン側鎖を導入することにした。図 6 で合成した化合物のヒドロキシ基を S_N2 反応でアルキン側鎖を導入した。この化合物はその後のクロスカップリング反応も問題なく進行し、アルキン側鎖を導入した DCL 誘導体の合成を達成できた (図 7)。

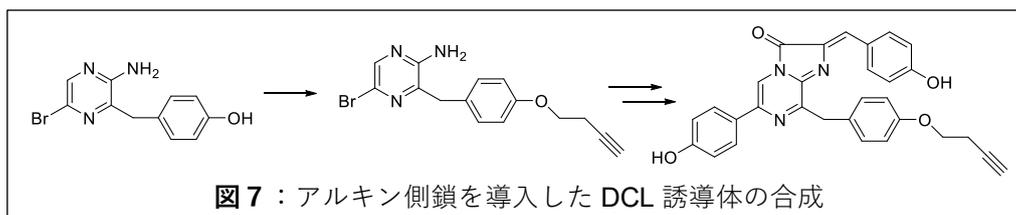


図 7: アルキン側鎖を導入した DCL 誘導体の合成

このアルキン側鎖と反応させるための近赤外蛍光分子の合成を進めており、今後は、クリック反応により DCL 誘導体に近赤外蛍光分子を導入していく予定である。

3-4: アポフォラシン発現のためのバキュロウイルスの作成

アポフォラシンの遺伝子配列 (図3参照) をコードしたバキュロウイルスの作成も行った。その結果、アポフォラシンを発現できるバキュロウイルスが作成でき、昆虫細胞を用いてアポフォラシンを大量に作成する手法を完成させることができた。

4 生活や産業への貢献および波及効果

緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表される蛍光タンパク質は、生命科学分野や医薬分野で幅広く利用されている [Remington *Protein Sci* **2011**:1509]。また、ホタル生物発光系は食中毒を引き起こす微生物の検出といった食品分野等で利用されている [Nakanishi *et al Jpn J Food Microbiol* **1999**:163]。発光生物の種類は多いが、発光機構が解明された生物は少なく、生物発光の分子機構に関する基礎研究を展開する研究者は国内外問わず多くない。ROS 依存型の発光タンパク質に関する研究を展開しているのは研究代表者のみであるが、この発光タンパク質は ROS で発光するため、ROS に関連する細胞内シグナル伝達の解明に取り組む研究者から注目されている。

本研究で開発を目指す ROS 依存型の近赤外発光タンパク質は、ROS を近赤外光として可視化することで時間的・空間的な ROS の変化量を動的に定量解析ができる独創的なものである。ROS を区別できる優れた蛍光色素が浦野ら (東京大医) により開発されているが [Urano *et al Nat Med* **2009**:104]、可視光を利用するため使用条件は制限される。本研究では「生体の窓」を透過できる近赤外光を利用するため、生細胞・生体組織における ROS を非破壊の条件で解析できるので制約が少なく、さらに従来の蛍光色素では問題であったバックグラウンド蛍光も克服できることから、次世代型の ROS イメージング手段となる先端性を特徴としている。

様々な細胞内シグナル伝達経路において、ROS がシグナルを伝達する詳細な仕組みを解明する研究において、本研究成果は簡便に利用できる汎用性を持ち合わせていることから、生命科学研究だけではなく、医薬分野など他分野においても幅広く利用されることが期待される。さらに、発光効率を向上させることで超微量の ROS の生成、消失をリアルタイムで追跡することが可能になるため、本研究成果を利用したイメージング機器の開発研究も進むことが期待され、生体成分の次世代型の高感度検出システムの創出という発展性がある。

また本研究手法を利用することで、病気の迅速診断手法としての利用も期待できることから、人々の健康を維持するための基盤技術として利用されていくことも期待できる。