

# 動的な分子イメージングプローブによる生理活性評価の新展開



金 誠 培

## 1 分子イメージングプローブ

### 1.1 背景

分析化学の広い研究対象の中でも、特に分子量が400~1000ダルトン (Da) 台の低分子化合物は、生体内の生理活性物質類 (内分泌ホルモンやビタミンなど) と同等な分子量であり、物性や化学構造的にも類似点が多い。この分子量台の物質を対象とする分析化学研究は、直ちに基礎医学・薬学・環境科学分野に応用できる境界領域であり、革新的な学際研究が期待できる領域である<sup>1)2)</sup>。

一方、上述の低分子化合物の定量・定性分析は、最先端の分析化学技術を駆使しても挑戦的な側面がある。最新の機器分析法やイムノアッセイなどを用いても、「化学物質の生理活性」までは評価が困難であり、この限界から生理活性評価の新展開が求められている。

### 1.2 静的な分子イメージングシステムの展開

この従来法の限界を打開するために、先駆者らは、生体の応答を模倣した「化学物質の生理活性評価技術」を開発・発展させてきた。1990年代から急速に発展した遺伝子組み換え技術によるレポータータンパク質 (蛍光タンパク質や発光酵素など) のクローニングがある。この遺伝子クローニングにより生体内の標的タンパク質に蛍光タンパク質や発光酵素を繋げ、関連した生命現象を低侵襲的に“スパイ”することができるようになった。

例えば、男性ホルモン受容体 (AR) や女性ホルモン受容体 (ER) に蛍光タンパク質を繋げ、動物細胞に発現させると AR や ER が細胞質に局在することが蛍光イメージで観察できる。この細胞に内分泌ホルモンや化学物質の刺激を加えると AR や ER が活性化され核内移行が観察されるため、刺激物質の性ホルモン様活性が定量的に評価できる (図1)<sup>3)</sup>。

また、同時代にレポータージーンアッセイという手法も開発され、近年でも広く活用されている<sup>4)</sup>。この手法は、生体内におけるタンパク質の発現機構を模倣した特殊なプラスミドを動物細胞に導入する。このプラスミドは、活性化された AR や ER (転写因子となる) が結合するプロモーター領域とその下流に位置するレポーター (前述の蛍光タンパク質や発光酵素など) をコードする遺伝子で構成されている。もし内分泌ホルモンや低分子化合物の刺激により動物細胞内の AR や ER が活性化された場合、下流のレポーターが発現されるため、当初の刺激物の生理活性が定量評価できる。このような手法

は、次項の動的な分子イメージングと対比して、静的な分子イメージング (Static) と称された。

しかし、これらの手法は、分析化学的な観点から幾つか致命的な欠点がある：(1) レポーター発現を制御する細胞内 On-Off スイッチシステムが緩いため、細胞本来の基底代謝によっても擬陽性の発現が起こる。(2) レポーター発現が十分蓄積されるまで、長い刺激時間 (一般的に計測開始から結果解析までに1日程度) を要する。そのため、生体内における一過性の生理活性評価には不向きである。また (3) 生体の多様な生理活性評価にすべて対応できる訳ではなく、タンパク質発現に繋がる生理活性の評価のみに用途が制限される<sup>5)</sup>。

このような致命的な欠点に対処し、ホルモンや化学物質などによる生理活性を普遍的に評価する分析ツールの開発が必要であった。

### 1.3 動的な分子イメージングシステムの展開

90年代の蛍光タンパク質や発光酵素の遺伝子クローニングの成功以来、我々はその用途を単なるレポーター (光標識) に限定していたことに気付き、その反省から、遺伝子組み換え技術により蛍光タンパク質や発光酵素に何らかの「On-Off スイッチ」を付加することで、単なるレポーターを動的な分子イメージングシステムに変化させる努力をした。このようなプローブは、化学物質などにより引き起こされる多様な分子イベント (タンパク質-タンパク質間の相互作用 (PPI), リン酸化, 構造変化, 核内移行など) を標的とし、特異的に蛍光や発光信号を放つようにデザインされている。そのため、当該プローブは発生した分子イベントに対し即時に応答するため、上述の従来法の致命的な欠点を解消できる。これまでの類の分子イメージングプローブは多く開発されているが、紙面上の制約より代表的な三つの例を以下で紹介する (図1)：(1) 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) 法、(2) タンパク質断片相補アッセイ (PCA) 法、(3) 分子歪みセンサー法。

BRET系の分子イメージングプローブは、蛍光タンパク質と発光酵素との間に「動きを知りたいタンパク質 (ER など)」を挿入した分子デザインを持つ。このプローブをコードするプラスミドを動物細胞に導入すると細胞内に前述のプローブが発現され、女性ホルモンに感

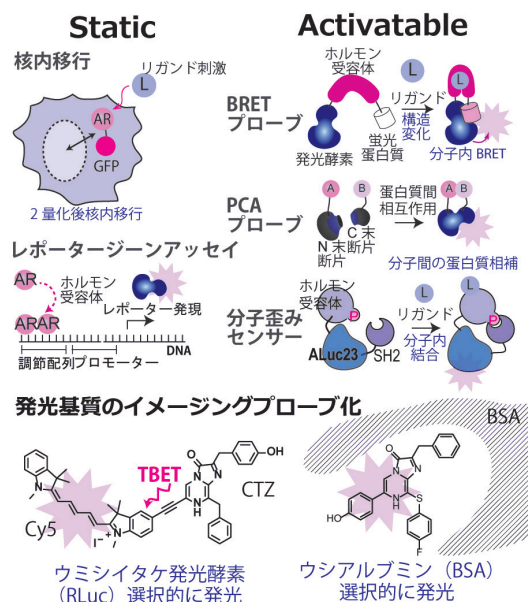


図1 静的・動的分子イメージングプローブと発光基質に基づいたイメージングプローブの例

受性を持つセンサー細胞になる。この細胞を女性ホルモンや女性ホルモン様化学物質で刺激すると、プローブ中のERの立体構造が折りたたまれ、その両端に繋げた蛍光タンパク質と発光酵素間の距離が連動して縮むため、両分子間のBRET効率が増加し特異的な長波長発光信号が現れる。この発光信号の輝度は、刺激した化学物質などに依存するため、従来分析が困難だった「化学物質などの女性ホルモン様活性」が評価できるようになる。

PCA法では、前述のレポーター（蛍光タンパク質や発光酵素など）の遺伝子を遺伝子工学的に2分割し、更にそれぞれの断片に、例えば、モデルPPIタンパク質であるFKBP-rapamycin binding protein (FRB) とFK506-binding protein (FKBP) をそれぞれ繋げた形態のDNAプラスミドを作成して動物細胞に導入する<sup>6)</sup>。このようなプローブ形態では2分割したレポーターは一時的に蛍光輝度や発光活性を失う。導入した動物細胞に免疫抑制物質のラパマイシン刺激を加えるとFRB-FKBP間の結合が起こり、それに連動して2分割した蛍光タンパク質断片や発光酵素断片の再結合が生じて、蛍光輝度や発光活性が復活する。したがって復活した蛍光輝度や発光活性を指標に、ラパマイシンやその類似体の生理活性を定量分析できる。

前述した二つの方法は、細胞内における多様な分子イベントを分析対象とし、短時間でホルモンや化学物質の生理活性が評価できる点において、従来法より進歩した手法ではあるが、依然として改善すべき点が残っている。例えば、BRET法では、一般的に分子デザインを最適化しても組み合わせによってはBRET信号が現れない場合も多く、シグナル対バックグラウンド(S/B)比が一般的に悪い。また、PCA法では、刺激後取り戻された蛍光輝度や発光活性が本来の0.5~5%程度にしかならない問題点がある。

一方、分子歪みセンサーは、前述した二つの手法の欠点を一定部分解消する分子イメージングプローブであり、二つのタンパク質の間に全長の発光酵素を挿入するだけの簡単な構造をとる。この分子デザインは、両端にある二つのタンパク質間の分子内PPIが起こった場合、その間に挿入した発光酵素が分子歪みを受け、発光輝度が上がる現象を利用している。これまでこの原理を利用して様々なタンパク質間のPPIの定量評価ができた。例えば、ERのリガンド結合ドメイン(ER LBD)とその共役因子v-SrcのSH2ドメイン(Src SH2)間のPPIを発光可視化した研究例が知られている<sup>7)</sup>。このような手法は、前項の静的な分子イメージングと対比して、動的な分子イメージング(activatable)と称された。

## 2 発光団に基づいた分子イメージング

### 2.1 背景

分析化学の展開において、分光学的持ち分は大きい。分析信号を光信号の形で読み取ることにより得られる利便性が大きいことから、冒頭で記述したように、本来蛍光性や発光性を持たない標的タンパク質にわざわざレポーター（蛍光タンパク質など）を繋げ、その挙動を光信号で読み取る手法が開発されたのである。一方、この分光学的手法が可能な背景には、蛍光タンパク質の中にある蛍光団や発光酵素の基質（発光団）の活躍がある。吸光度測定には、例えばアゾ基の発色団が代表的に用いられており、蛍光タンパク質の内部に蛍光団があり、発光酵素の発光には特異的な基質が発光団の役割を果たす。

### 2.2 発光基質に基づいたイメージングプローブ

前述した蛍光タンパク質や発光酵素における蛍光団や発光団の光信号発信能力に注目し、これらに何らかの分

子認識能を持たせることにより「蛍光や発光インジケーター」として活用する試みが行われてきた。本来、蛍光タンパク質の蛍光団や発光酵素の発光団は、三つのアミノ酸からなる生合成産物である（分子量：400~1000 Da台）。この分子量の蛍光団や発光団は、生体内では様々なホルモン受容体のホルモン結合ポケットやアルブミンのようなキャリアタンパク質の薬剤結合サイト(DBS)、各種酵素の酵素活性部位にちょうど当てはまるサイズである。したがってこの分子量の蛍光団や発光団が本来持つ発光特性に加え、特定重要タンパク質に特異的に当てはまる分子デザインに変えることができれば、新概念の蛍光あるいは発光インジケーターとして用いることができる。その一例として、血清アルブミンに一部のセレンテラジン骨格の発光基質が特異的に当てはまり発光する点を活用して、ヒト由来やウシ由来の血清アルブミンを定量イメージングした研究例があった（図1）<sup>8)</sup>。また、コロナウィルスのスパイクタンパク質に特異的に発光するウミホタル発光基質を用いて、コロナウィルスを定量イメージングした研究例もあった<sup>9)</sup>。

## 3 まとめ

分析化学は多様な検体を分析対象としているが、とりわけ400~1000 Da台の低分子化合物の生理活性評価は極めて重要である。この研究分野の展開は、分析化学と基礎医学・薬学・環境科学分野との境界領域に該当し、関連した学際研究は今後大きなインパクトを生み出す可能性を秘めている。

本「話題」では、このような低分子化合物の生理活性を評価する独特な分子イメージングプローブの開発と応用に関する研究例を紹介した。他に、蛍光団や発光団そのものの「光信号の発信能」と「分子認識能」に着目した発光インジケーターの開発と生体内重要タンパク質の定量イメージング例は今後更なる技術展開が期待できる。

## 文献

- 1) X. T. Liu, Q. Q. Lv, X. Song, Y. K. Chen, L. Zhao, M. L. Yan, B. Hu, D. Chen : *Anal Chem*, **95**, 6227 (2023).
- 2) S. Hallgren, T. Sinjari, H. Håkansson, P. O. Darnerud : *Arch Toxicol*, **75**, 200 (2001).
- 3) D. L. Stenoien, M. G. Mancini, K. Patel, E. A. Allegretto, C. L. Smith, M. A. Mancini : *Mol Endocrinol*, **14**, 518 (2000).
- 4) R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, M. W. Bevan : *EMBO J*, **6**, 3901 (1987).
- 5) S.-B. Kim, T. Furuta : *Front. Chem. Biol.*, **3**, 1459397 (2024).
- 6) K. E. Luker, M. C. Smith, G. D. Luker, S. T. Gammon, H. Piwnica-Worms, D. Piwnica-Worms : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101** (33), 12288 (2004).
- 7) S. B. Kim, R. Nishihara, D. Citterio, K. Suzuki : *Bioconjugate Chem.*, **27**, 354 (2016).
- 8) S. B. Kim, G. Kamiya, T. Furuta, N. Kitada, S. A. Maki : *Sensors-Basel*, **23** (13), (2023).
- 9) R. Nishihara, H. M. Dokainish, Y. Kihara, H. Ashiba, Y. Sugita, R. Kurita : *Acs Central Sci*, **10**, 283 (2024).

金 誠培 (Kim Sung Bae)

産業技術総合研究所・環境創生研究部門(〒305-0024 茨城県つくば市小野川16-1)。東京大学理学系研究科博士課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》新規分子イメージングプローブの開発と生体イメージングへの応用。《主な著書》*Bioluminescence*, (Springer Nature社)。《趣味》散歩。

E-mail : Kimu-sb@aist.go.jp