

# 論文の内容の要旨

論文題目 希土類金属錯体のデザイン・合成による新規機能性 MRI  
プローブおよび長寿命蛍光プローブの開発

氏名 花岡 健二郎

## 【序論】

希土類元素のLa (ランタン) からLu (ルテチウム) までの1つの桁に入っているランタノイドは、その3価イオンの外側電子配置はすべて  $5s^2 5p^6$  で全く同じであり、その内側に4f軌道がある。この4f軌道の不完全な電子配置が、希土類元素の特徴的な性質の根元と考えられる。今回、このような希土類金属錯体が有する優れた特性を医療や生命科学研究へ応用することを目的に(1)新規機能性MRI造影剤と(2)新規長寿命蛍光プローブの開発を行った。

## 【本論】

### 1. $\beta$ -galactosidase 応答性 MRI プローブ

光 (電磁波) 技術の個体内可視化技術への応用の1つであるMRI (Magnetic Resonance Imaging) は、磁場中の原子核や電子が特定の周波数の電波のエネルギーを吸収するNMR (Nuclear Magnetic Resonance) 現象を用いて生体の断層画像を得る方法である。

$\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) はレポーター遺伝子として汎用されており、このレポーター遺伝子の発現を個体レベルで可視化することは、医学や生化学の分野で大きく貢献できる。そこで、今回 $\beta$ -galの酵素活性を認識して水溶液の縦緩和時間( $T_1$ )を短縮し、それによってMR信号を高める新たな機能性MRIプローブのデザイン・合成を試みた。この $T_1$ の短縮は、MRIにより $T_1$ 強調画像として撮影することでMR信号強度の増大として可視化できる。このような個体での生体内可視化を可能とする機能性MRIプローブの開発研

究は世界において端緒についたばかりであり、実際に生体内可視化に成功した機能性MRIプローブは殆ど報告されていない。

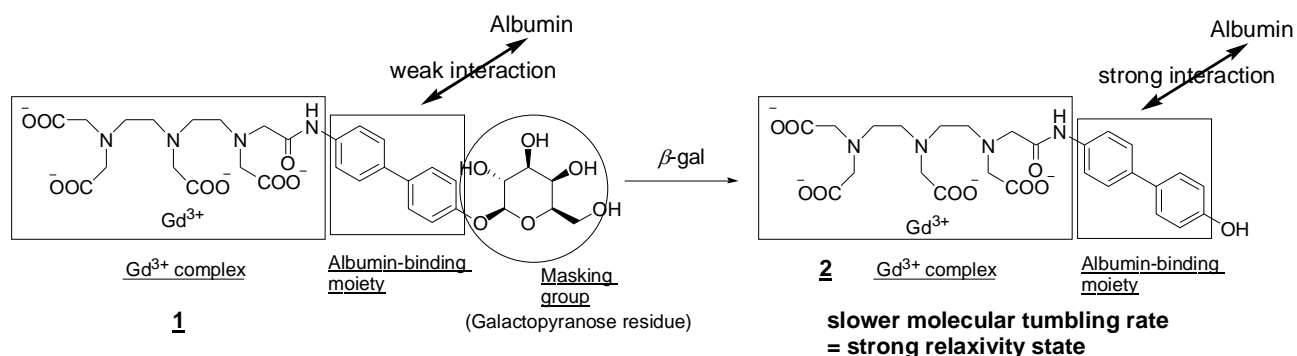


Figure 1. RIME mechanism of action for  $\beta$ -gal-activated compound **1**. A  $Gd^{3+}$  complex is coupled to an albumin binding moiety that is masked by the galactopyranose residue. Enzyme activation releases the galactopyranose residue and promotes albumin binding.

ガドリニウムイオン( $Gd^{3+}$ )は7個の対電子を持つため、非常に大きなスピン磁気モーメントを示す。そのため、プロトンに与える磁気的効果が大きく、プロトンの $T_1$ を大きく短縮する。それにより、 $Gd^{3+}$ 錯体はMRI造影剤として汎用されている。今回、 $\beta$ -gal活性を検出する新たなMRIプローブのデザインとしてRIME (Receptor Induced Magnetization Enhancement)現象に着目した。RIME現象とは、 $Gd^{3+}$ 錯体がalbuminなどの巨大分子と結合することで分子回転が非常に遅くなり、その結果として周囲の水分子に対し大きなプロトンの $T_1$ の短縮を引き起こす現象である。この $T_1$ の短縮がMR信号強度の増大へとつながる。実際に、デザイン・合成した化合物をFigure 1に示す。化合物**1**は極性基である $\beta$ -galactopyranosyl基の存在によりbiphenyl構造部位とalbuminとの結合性は弱い、 $\beta$ -gal活性によって $\beta$ -galactopyranosyl基が脱離し化合物**2**になることで、albuminと強い結合性を示し、RIME現象でプロトンの $T_1$ が大きく短縮することを期待した。化合物**1**、**2**を合成し、これを水溶液として $T_1$ を測定し、その $T_1$ の値から緩和能 $R_1$ を算出した。その結果、緩和能 $R_1$ 値が、albumin (4.5% w/v)存在下で化合物**2**は化合物**1**の約1.5倍と高いことが確認された (Table 1)。緩和能 $R_1$ の値が大きいほど、 $T_1$ 短縮効果が大きいことを表す。さらに、実際に $\beta$ -galによる酵素反応を行った。化合物**1**の水溶液に $\beta$ -galまたは熱失活させた $\beta$ -gal (80 °C, 10分加熱)を添加した結果、熱失活していない正常な $\beta$ -galでのみ、 $T_1$ の短縮が観察された (Figure 2)。

今回galactopyranosyl基の高い極性に着目し、 $\beta$ -galの酵素活性により $T_1$ が短縮しMR信号が変化する機能性MRIプローブの開発に成功した。このプローブは更なる改良によって、生物学研究などにおいて有用な新たな機能性MRIプローブの開発につながると考えられる。

Table 1.  $R_1$  relaxivity (20 MHz) in PBS or PBS with 4.5% HSA.

Compound	$R_1$ (PBS) (25 °C) [ $mM^{-1}s^{-1}$ ] <sup>a</sup>	$R_1$ (HSA)(25 °C) [ $mM^{-1}s^{-1}$ ] <sup>b</sup>	$R_1$ (PBS) (37 °C) [ $mM^{-1}s^{-1}$ ] <sup>a</sup>	$R_1$ (HSA)(37 °C) [ $mM^{-1}s^{-1}$ ] <sup>b</sup>
<b>1</b>	5.80	6.34	5.35	6.06
<b>2</b>	4.11	8.76	3.87	9.51

[a] PBS (137mM NaCl, 8.10mM  $Na_2HPO_4$ , 2.68mM KCl, 1.47mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.4). [b] Human serum albumin (4.5% w/v) in PBS.

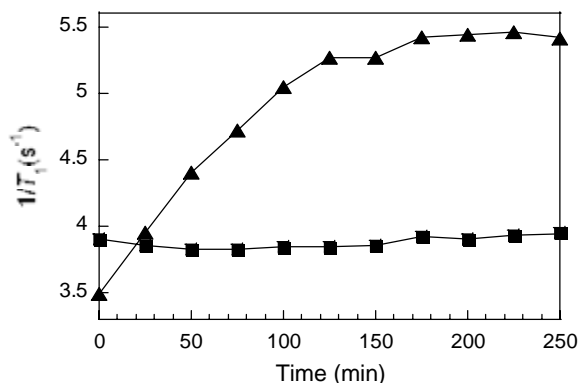
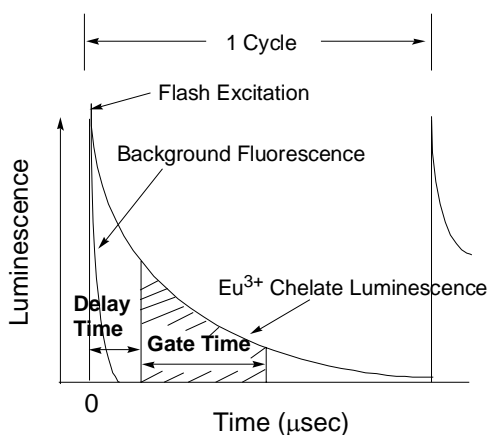


Figure 2. Time course of the  $\beta$ -gal-induced (closed triangle) and heat-inactivated  $\beta$ -gal-induced (closed square) changes in the relaxation rate of 0.5 mM **1** at 20 MHz in the presence of 4.5% (w/v) human serum albumin (37 °C).

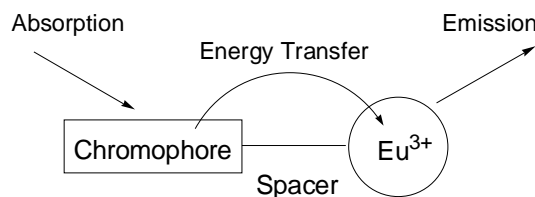
## 2. 長寿命 $Zn^{2+}$ 蛍光プローブ

蛍光コウロピウムイオン( $Eu^{3+}$ )錯体の特徴として、通常の生体成分の蛍光寿命はナノ秒オーダーであるのに対し、蛍光寿命が長い (sub ms) 特徴があげられる。そのため、 $Eu^{3+}$ 錯体を利用した時間分解蛍光イムノアッセイ (Time-Resolved Fluoroimmunoassay: TRFIA) 法は、他の蛍光性化合物の蛍光を高効率で分離し高いS/N比を得ることを可能とする (Scheme 1)。TRFIA法とは、パルス励起光から蛍光測定を行うまでの蛍光を測定しない時間 (Delay time, 数 10  $\mu$ sec)と、そのDelay timeの後に数 100  $\mu$ sec蛍光を測定する時間(Gate time)とを合わせることで、バックグラウンド蛍光を取り除き $Eu^{3+}$ の蛍光のみを検出する方法である。この測定法は、測定感度はラジオイムノアッセイの検出感度と同程度にまでに達する。本研究では、生体分子との反応で蛍光強度が大きく変化する機能性蛍光 $Eu^{3+}$ 錯体の開発を行い、これを用いて生物サンプルで時間分解蛍光イメージングを行うことを目的とする。このような研究は未だ報告例がなく、蛍光顕微鏡に応用することで、TRFIA法と同様な高いS/N比が得られると期待される。

$Eu^{3+}$ はそれ自身だけでは蛍光が弱く、適切なchromophore (Scheme 2) をもつ配位子と錯体化させることで、その蛍光強度を強めることができる (Scheme 2)。時間分解蛍光顕微鏡への応用を目指した蛍光 $Eu^{3+}$ 錯体の開発にあたり、chromophoreとしてquinoline構造に着目した。Quinoline構造の利点としては、(1)  $Eu^{3+}$ に効率良くエネルギー移動を起こし、(2) 比較的長波長励起が可能であり、(3)合成的に多種の置換基の導入が可能であることなどがあげられる。そこでまず、quinoline構造をchromophoreの基本骨格とした $Eu^{3+}$ 錯体群をデザイン・合成し、それら分光学的性質を調べた。さらにこれまでの知見を基に、Figure 3 に示す $Zn^{2+}$ 長寿命蛍光プローブをデザイン・合成した。遊離の $Zn^{2+}$ は細胞内や組織内での動態、作用機序が近年注目されている生体内分子である。また、化合物**3**の水溶液は $Zn^{2+}$ の添加により $Eu^{3+}$ 蛍光の大き



Scheme 1. Time-resolved luminescent measurement of a europium chelate label.



Scheme 2. Schematic view of a chromophore incorporated into a europium emitter, showing the emission from  $Eu^{3+}$  after excitation of the chromophore.

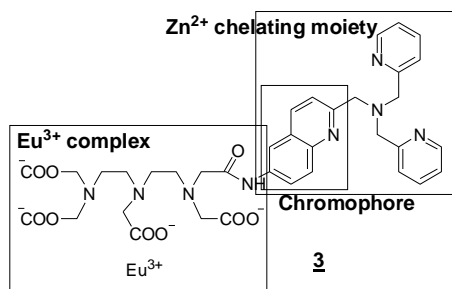


Figure 3. Structure of a novel sensitive europium luminescent probe for  $Zn^{2+}$ , **3**.

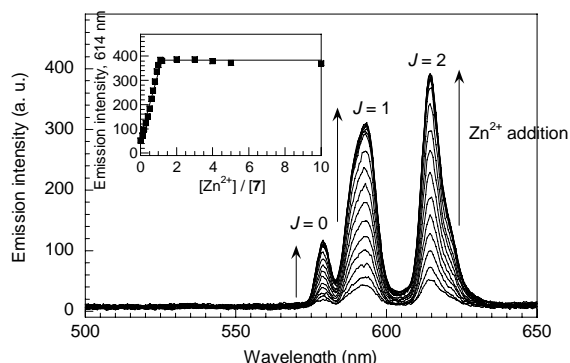


Figure 4. Time-resolved emission spectra (excitation at 320 nm) of **3** (50  $\mu M$ ) in the presence of various concentrations of  $Zn^{2+}$ . These spectra were measured at pH 7.4 (100 mM HEPES buffer) using a delay time of 0.05 ms and a gate time of 1.00 ms. The inset shows the changes of the luminescence intensity at 614 nm.

な上昇を示した (Figure 4)。

さらに、独自に時間分解顕微鏡を立ち上げ、まず時間分解蛍光イメージングが可能であることを確かめた。新規蛍光 $Eu^{3+}$ 錯体 (Figure 5)をHeLa細胞にマイクロインジェクションし、時間分解 (Delay time: 52  $\mu sec$ , Gate time: 808  $\mu sec$ )して蛍光イメージングを行ったところ、細胞由来の自家蛍光を取り除くことができた (Figure 6)。

また、有機小分子の蛍光色素である rhodamine 6Gで細胞を染色した場合でも、Delay timeとGate timeを調節することで長寿命の蛍光である $Eu^{3+}$ の蛍光のみを検出することができた。さらに、化合物**3**を同様にHeLa細胞に応用し、この時間分解蛍光顕微鏡を用いて細胞内 $Zn^{2+}$ 濃度の時間分解蛍光イメージングを行った。その結果、時間分解蛍光イメージング (Delay time: 70  $\mu sec$ , Gate time: 808  $\mu sec$ )することで、バックグラウンド蛍光を低く抑え、高い精度で細胞内 $Zn^{2+}$ 濃度変化を検出することに成功した (Figure 7)。

本研究により、 $Eu^{3+}$ 錯体を用いた時間分解蛍光イメージングを行うことで低いノイズレベルで可視化解析が可能であることを示した。

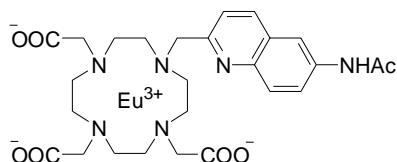


Figure 5. Structure of a novel luminescent europium complex, NHAc- $Eu^{3+}$ .

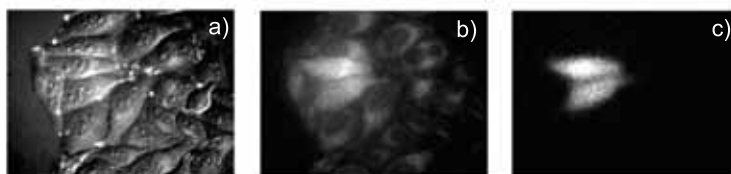


Figure 6. a) Bright-field and fluorescence images of HeLa cells injected with NHAc- $Eu^{3+}$  solution b) without or c) with a time-resolution process.

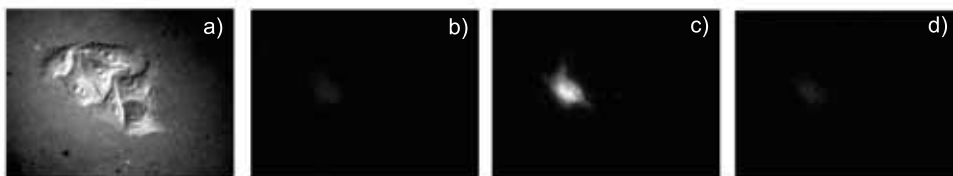


Figure 7. a) Bright-field and b) c) d) fluorescence images of HeLa cells injected with **3**. b) Before and c) after addition of 50  $\mu M$  pyrithione and 150  $\mu M$   $Zn^{2+}$ . Further, d) after addition of 150  $\mu M$  TPEN.

## 【結論】

希土類金属イオンである $Gd^{3+}$ の磁氣的性質と $Eu^{3+}$ の分光学的性質に着目し、それぞれ金属イオンの配位子のデザインにより、生物応用を目指した機能性希土類金属錯体の開発を試みた。

$Gd^{3+}$ 錯体はRIME現象を利用して $\beta$ -gal活性を認識できる機能性MRIプローブの新しい設計法を提案した。この分子設計法は、 $\beta$ -gal活性により基質となる $\beta$ -galactopyranosyl基が $Gd^{3+}$ の配位子部位から脱離す

ることalbuminとの結合性が上がり、 $T_1$ の短縮を起こす。この $\beta$ -gal活性の認識法はシンプルなスイッチ機構であり、分子構造の修飾も容易であるため、更なる分子の改良によって生物学研究などにおいて有用な新たな機能性MRIプローブにつながると考えられる。

$\text{Eu}^{3+}$ 錯体では、生細胞に応用可能な $\text{Zn}^{2+}$ を認識して蛍光が増大する $\text{Eu}^{3+}$ 錯体3の開発を行った。さらに、この化合物を独自の手法で立ち上げた時間分解蛍光顕微鏡に応用することで、自家蛍光や有機小分子の蛍光色素の蛍光などのバックグラウンド蛍光を取り除き $\text{Eu}^{3+}$ の蛍光のみを検出して、生細胞内の $\text{Zn}^{2+}$ 濃度変化を蛍光イメージングすることに成功した。

このように本研究において、希土類金属錯体の配位子をデザインすることで、生理活性分子を認識する機能性MRIプローブおよび長寿命蛍光プローブの開発が可能であることを示した。これらの化合物は生体や生細胞への応用の可能性を持ち、今後、臨床の分野においては画像診断薬として、生化学の分野においては高感度イメージング試薬としての可能性を持っている。