

オリジナル化学プローブの開発による 新しい生体分子イメージング

東京大学大学院医学系研究科 生体情報学分野
浦野 泰照

2010.11.8 第9回「学際領域における分子イメージングフォーラム」@宇宙航空研究開発機構 講演航空宇宙センター講堂

蛍光プローブの設計

Fluo-3

蛍光プローブとは、
・観測対象分子と「特異的に」反応・結合し
・その前後で蛍光特性が大きく変化する
機能性分子である。(上図は細胞を模式的に表したもの。▽の分子のみを特異的に検出する。)

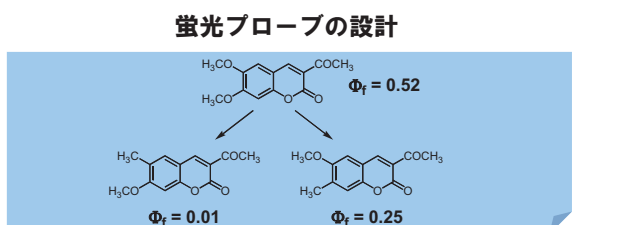
Software
(蛍光プローブ)

GFP, Cameleon
Fura-2, Fluo-3

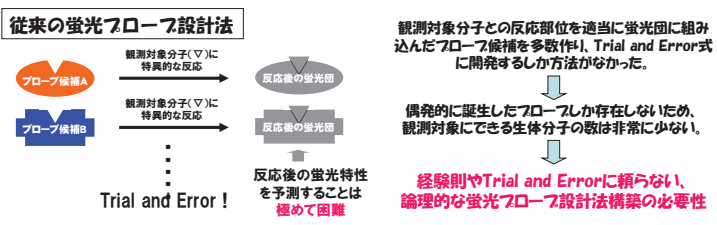
Hardware
(蛍光顕微鏡)

2光子顕微鏡
超光蛍光顕微鏡
エリアベース顕微鏡
共焦点顕微鏡
蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡を用いて、生きている状態で生体応答を観測する技法は、近年の生物学研究になくはならない重要な技法となっている。ところが、各種観察を実現する新たな顕微鏡の開発速度は速い一方で、システムの一翼を担はずの光機能性分子(蛍光プローブなど)の進歩は非常に遅かった。



蛍光団に「直接」付いている置換基を変化させると、色(励起波長、蛍光波長)、明るさ(量子収率)ともに変化し、これらを正確に予想することは極めて難しい。



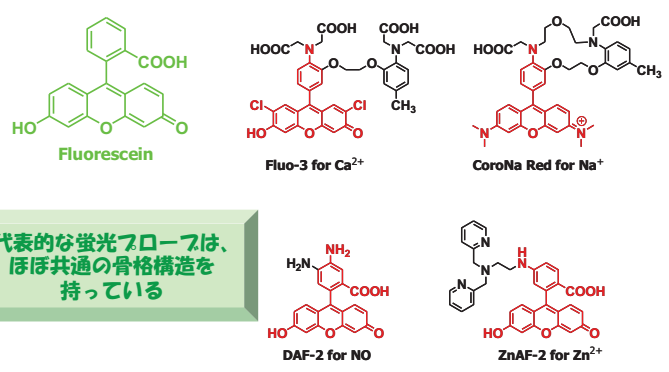
ある化合物の蛍光特性を 正確に予測するには・・・?

<ここからのキーワード>

光誘起電子移動 可視光励起

Fluorescein As a Useful Platform for Fluorescence Probes

- <蛍光プローブ母核としてのFluoresceinの特長>
- ① 長波長光励起が可能(細胞に与えるダメージが少ない)
 - ② 水系溶液中で高い量子収率をもつ



代表的な蛍光プローブは、ほぼ共通の骨格構造を持っている

各種Fluorescein誘導体の蛍光量子収率

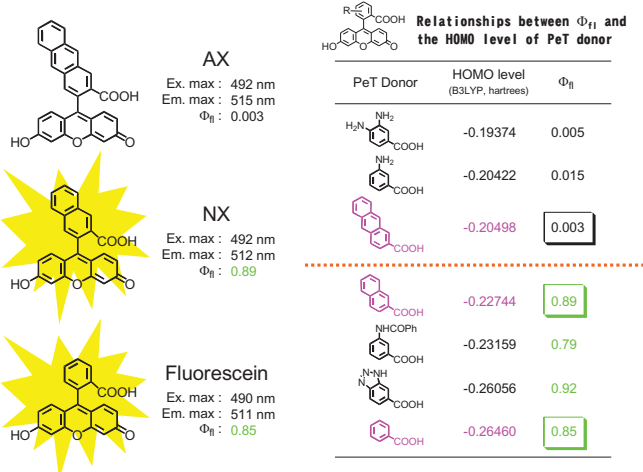
R	λ_{max} (nm)	Φ_{fl}
H	490	0.85
SCN	490	0.76
NH ₂	486	0.015
PhCONH	490	0.79
CH ₂ CHCONH	490	0.76
p-MeOPhCONH	490	0.88
o-NO ₂ PhCONH	492	0.044
m-NO ₂ PhCONH	492	0.224
p-NO ₂ PhCONH	492	0.015

これまでは、数種の誘導体の蛍光特性が知られているのみであった。

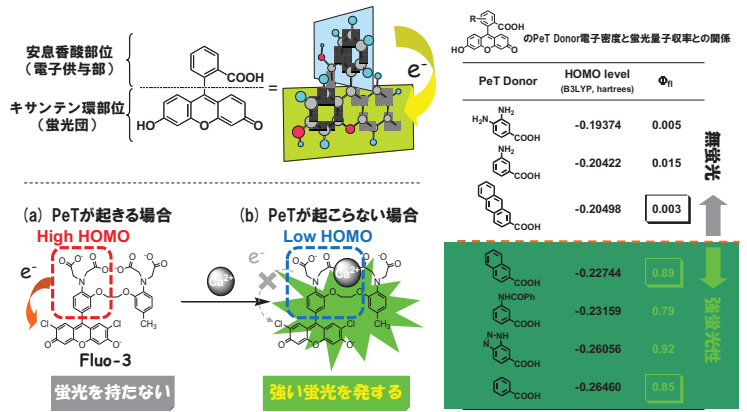
色(励起波長、蛍光波長)は変化せず、明るさ(量子収率)だけが変化する。

作業仮説の検証：

縮合芳香環をElectron donorとするフルオレセイン類の蛍光特性



フルオレセイン類の蛍光特性は分子内光誘起電子移動(PeT)により制御可能である



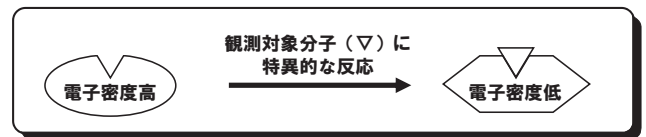
フルオレセインは蛍光団と電子供与部が直接結合した分子を考えてよく、その蛍光特性は安息香酸部位の電子密度に依存したPeTにより制御可能である。

蛍光プローブを狙って作りたい！

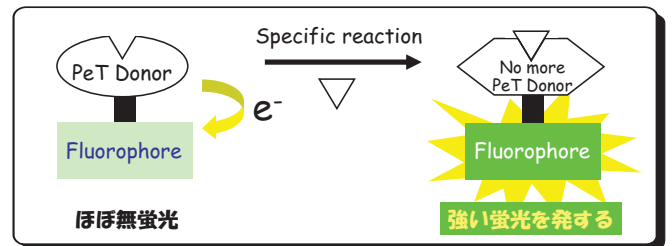
<ここからのキーワード>

電子密度 (酸化電位) の変化を
蛍光強度変化につなげる

蛍光プローブの論理的精密設計 #1

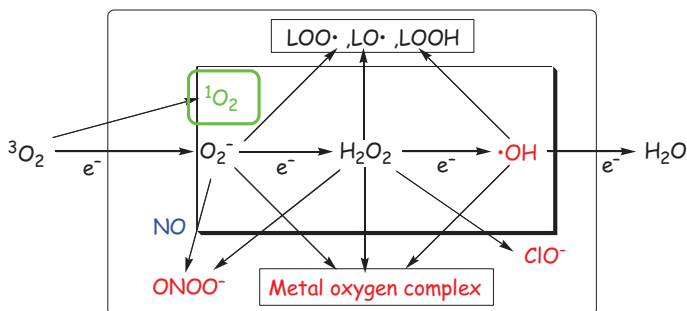


↓ 蛍光フロー化

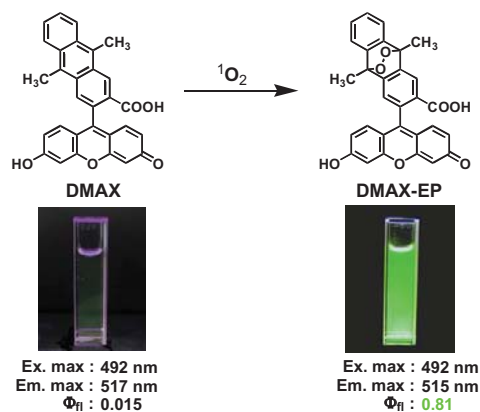


蛍光団とは独立に、観測対象分子と特異的な反応を起こす部位を導入し、この部位の反応前後での電子密度の変化を利用して、**蛍光フロー**を論理的に設計する。

Reactive Oxygen Species (ROS)

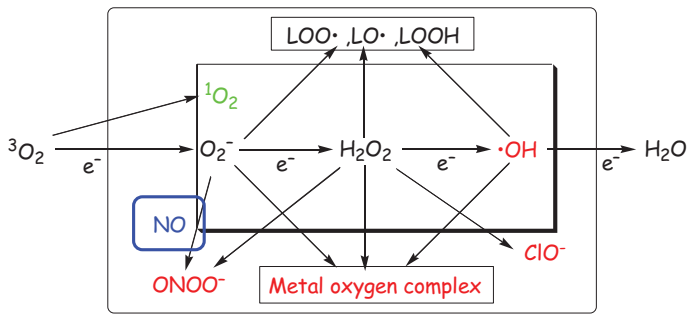


新規一重項酸素蛍光プローブDMAXの開発

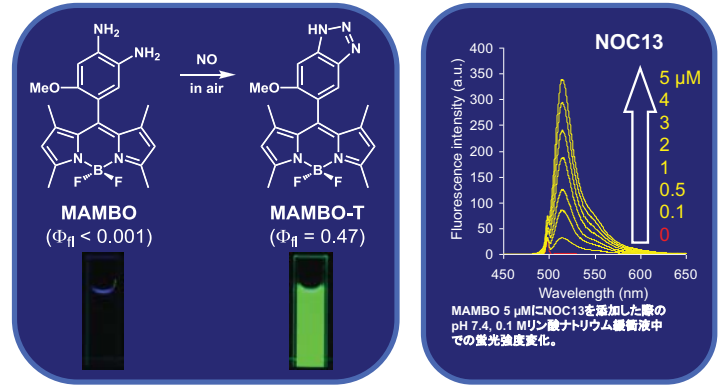


論理的分子設計法を用い、高感度かつ高選択的な¹O₂蛍光プローブの開発に成功した。

Reactive Oxygen Species (ROS)

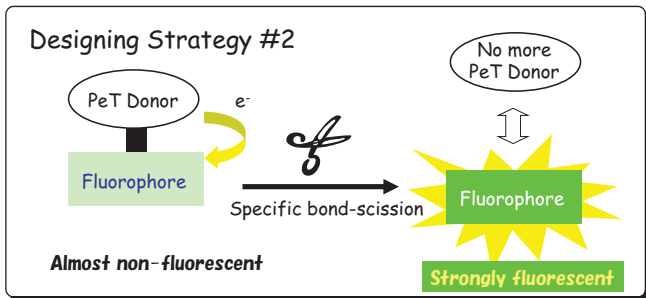
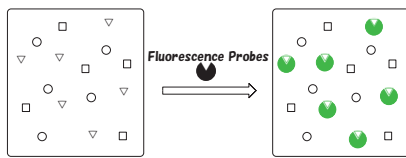


BODIPY-based NO⁺プロブMAMBOの開発

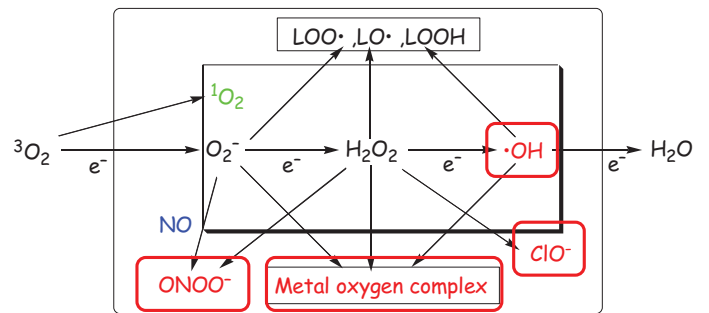


Yu Gabe, Yasuteru Urano, Tetsuo Nagano et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3357-3367 (2004).

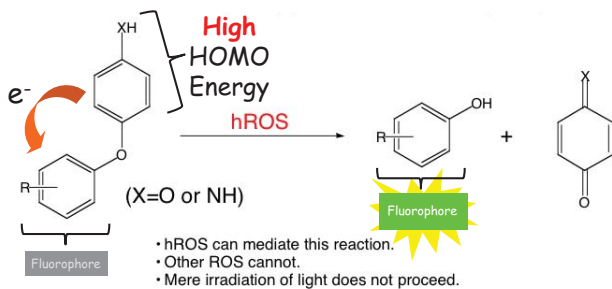
蛍光プローブの論理的精密設計 #2



Reactive Oxygen Species (ROS)



Ipso-Substitution Reaction of Aryloxyphenols and Aryloxyanilines Are Mediated Only by Highly Reactive Oxygen Species (hROS)



By using this reaction as a detection principle, we can distinguish hROS from other ROS (especially H_2O_2), and we can evade light-induced autoxidation.

Reactivity of HPF, APF and DCFH with ROS

ROS	HPF	APF	DCFH
$\cdot OH$	730	1200	7400
$ONOO^-$	120	560	6600
$\cdot OCl$	6	3600	86
O_2^-	8	6	67
1O_2	5	9	26
H_2O_2	2	<1	190
$ROO\cdot$	17	2	710
NO	6	<1	150
Autoxidation	<1	<1	2000

<Reaction Condition>

[dye]=10 μM (0.1 % DMF as a cosolvent)

$\cdot OH$: [Fe²⁺]=100 μM , and [H₂O₂]=1 mM

$ONOO^-$: [ONOO⁻]=3 μM

$\cdot OCl$: [$\cdot OCl$]=3 μM

O_2^- : [KO₂]=100 μM

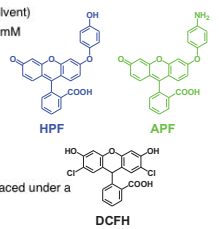
1O_2 : [EP-1]=100 μM

H_2O_2 : [H₂O₂]=100 μM

$ROO\cdot$: [AAPH]=100 μM

NO : [NOC13]=100 μM

Autoxidation: Dye solutions were placed under a fluorescent lamp for 2.5 h.



HPF and APF

can reliably detect hROS and/or $\cdot OCl$ with a distinction from other ROS, can distinguish $ONOO^-$ with NO , are not autoxidized at all.

開発に成功した各種活性酸素種特異的検出蛍光プローブ類

一重項酸素検出蛍光プローブ-DMPAX, DMAX類の開発

DMAX (非蛍光性) → DMAX-EP (強蛍光性)

JACS 2001, 123, 2530-2536

ニトロ化ストレス検出蛍光プローブ-NISPY類の開発

NISPY-3 (非蛍光性) → ニトロ化生成物 (強蛍光性)

JACS 2006, 128, 10640-10641

強い酸化活性種(H2O2)のみを検出するプローブ-HPF, APFの開発

HPF (X=O), APF (X=NH) (非蛍光性) → Fluorescein (強蛍光性)

JBC 2003, 278, 3170-3175

次亜塩素酸特異的 抗光褪色性蛍光プローブ-HySOxの開発

HySOx (暗環状態 無蛍光) → 開環状態 (強蛍光性)

JACS 2007, 129, 7313-7318

ROS	HPF	APF	DCFH
OH	730	7200	7400
ONOO ⁺	120	500	6000
•OH	6	3600	86
O ₂ ^{•-}	8	6	67
¹ O ₂	5	9	26
H ₂ O ₂	2	<1	190
ROO [•]	17	2	710
NO	6	<1	150
Autoxidation	<1	<1	2000

もっともっと色々な現象を可視化する
プローブを作りたい!

<ここからのキーワード>

東京緑って何?
還元電位の変化

Fluorescein Was Firstly Developed in 19th Century



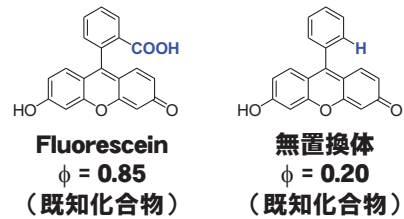
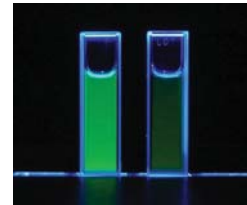
**Johann Friedrich Wilhelm
Adolf von Baeyer
(1835-1917)
Received Nobel Prize in 1905.
Discovered Fluorescein in 1871.**

184. Adolf Baeyer: Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen.
(Vergl. von Vorl.)

Fluorescein und Fluorescin.
Aehnlich wie auf Pyrogallol wirkt Phthalanhydrid auch auf Resorcin. Die beim Erhitzen der beiden Substanzen gewonnene gelbbraune Masse löst sich in Alkohol, Wasser scheidet daraus das Fluorescein in gelben Flocken ab.
Bringt man diese Substanz mit Ammoniak zusammen, so bildet sich eine rothe Lösung, welche die prachtvollste grüne Fluoreszenz zeigt, die auch bei starker Verdünnung noch sichtbar bleibt. Das Fluorescein färbt Seide und Wulle ohne Meckant gelb. Ammoniak und Zinkstaub führen es in das Fluorescin über, welches durch Chromsäure wieder in Fluorescein verwandelt werden kann.
Aus der Bildung des Fluorescins ergibt sich, dass das Phthalanhydrid nicht bloß mit Pyrogallol, sondern auch mit andern Hydroxyderivaten der aromatischen Gruppe Farbstoffe erzeugen kann. Ich bin mit der Fortsetzung der Untersuchung in dieser Richtung beschäftigt.

Ber. 4, 555 (1871)

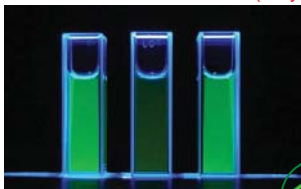
フルオレセインのカルボキシル基は
フルオレセインの蛍光特性に必須な要素か?



The chemical structure of fluorescein has been almost unchanged for over 100 years.

Is the Carboxylic Group of Fluorescein Indispensable for Being Highly Fluorescent?

- Answer is NO!
- Breaking Out the Traditional Fluorescein Structure (TokyoGreens)



TokyoGreens

O=C1C=CC(=O)C=C1C(=O)O

Fluorescein
 $\phi = 0.85$
(Known Compound)

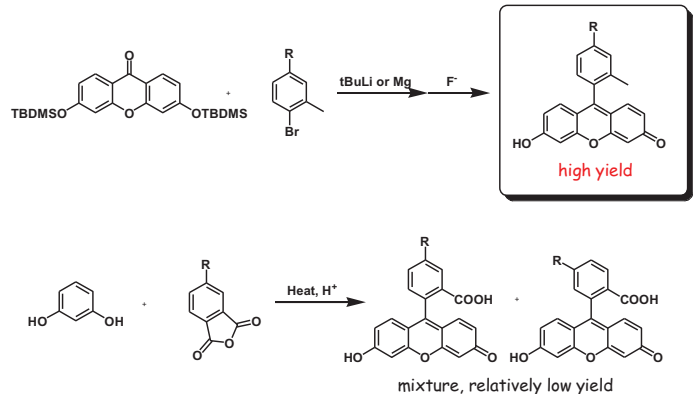
O=C1C=CC(=O)C=C1C

Hydroxyphenylfluorone
 $\phi = 0.20$
(Known Compound)

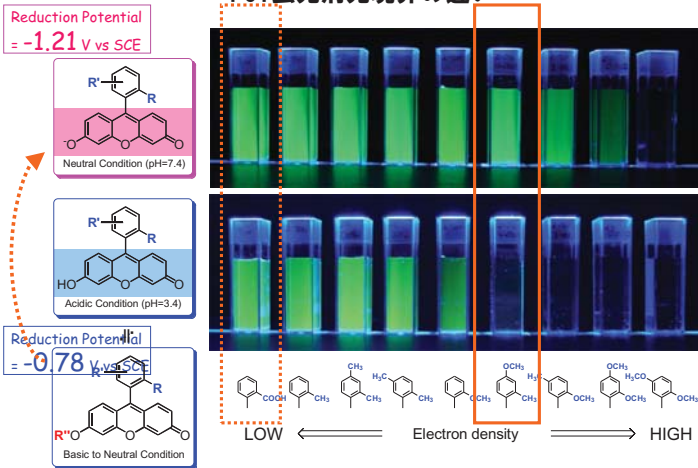
O=C1C=CC(=O)C=C1C(C)C

2-Me Fluorescein Deriv.
 $\phi = 0.84$
(Novel Compound!)

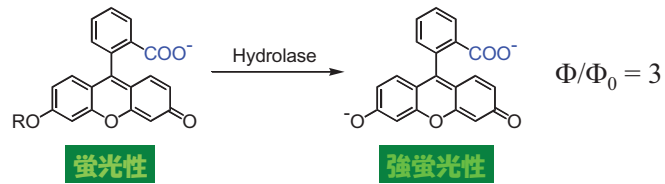
TokyoGreen類は、容易かつ高収率に合成可能である



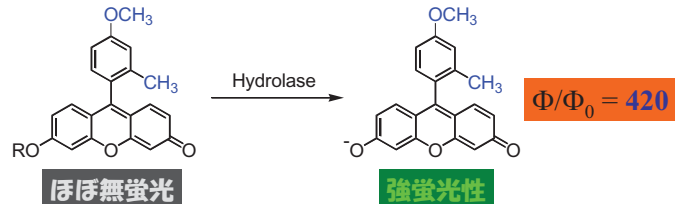
TokyoGreen類のアニオン型・中性型による PeT蛍光消光境界の違い



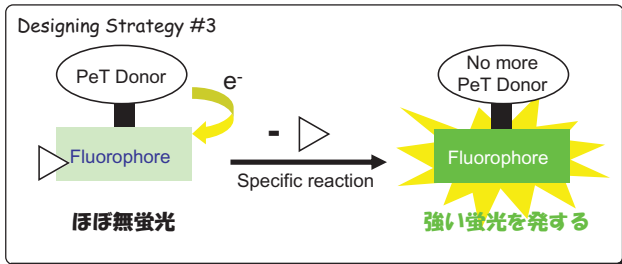
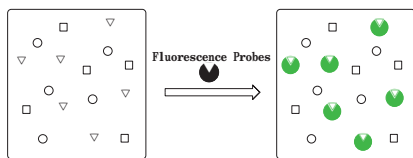
(A) Fluorescein-based probes



(B) 2-Me-4-OMe TokyoGreen-based probes

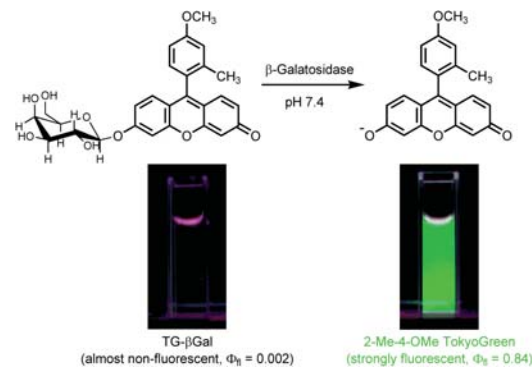


蛍光プローブの論理的精密設計 #3

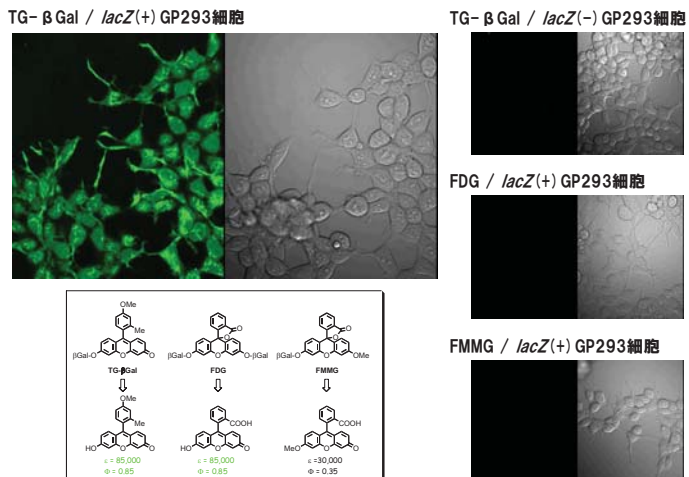


蛍光団であるキサンテン環の還元電位が反応前後で大きく異なることを利用し、各種加水分解酵素などに対する汎用性の高いプローブ設計法を確立した。

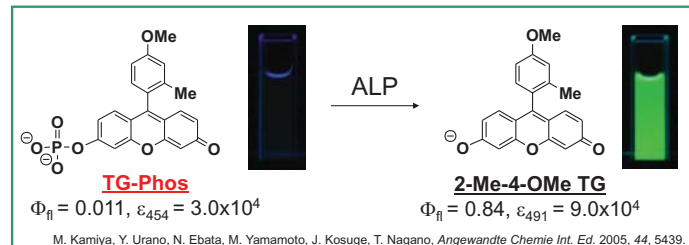
新規β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブ (TG-β Gal)



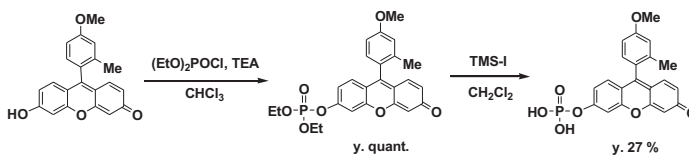
TG-β Galによる生細胞でのβ-ガラクトシダーゼ活性イメージング



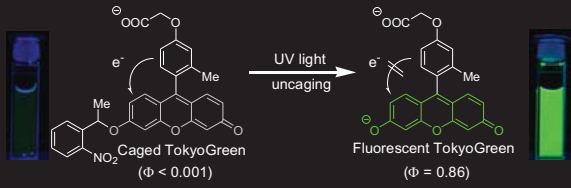
新たなALPプローブ(TG-Phos)の開発



<合成スキーム>

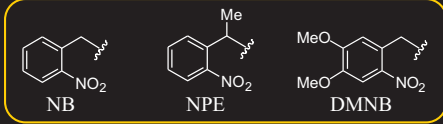


Caged TokyoGreen



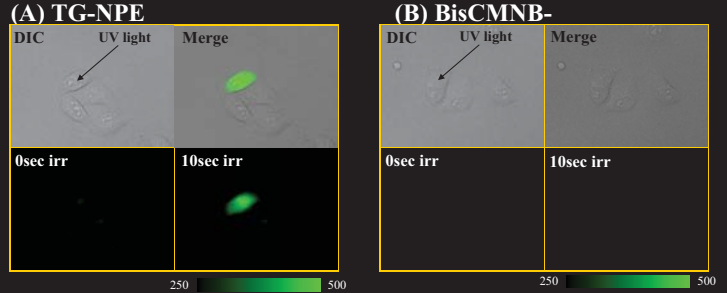
速い活性化と低いバックグラウンド蛍光の両者を実現可能

(PRPG:光分解性保護基)



T. Kobayashi, Y. Urano, T. Nagano et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 6696-6697 (2007).

Caged TokyoGreenの生細胞への適用

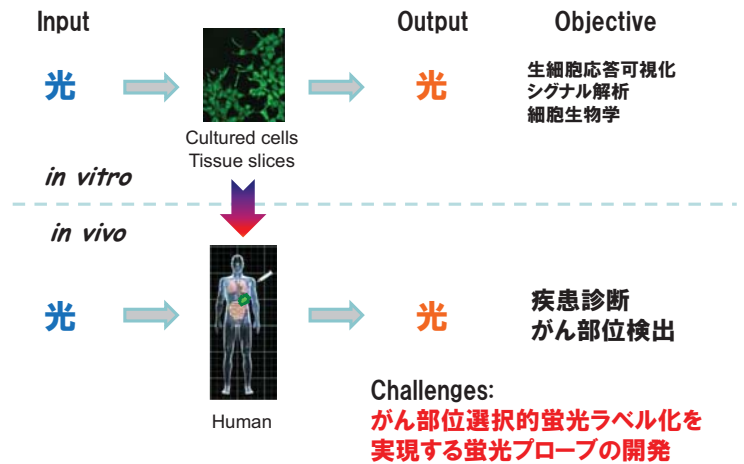


Cell (HeLa) application of (A) TG-NPE AM and (B) BisCMNB-FL AM. Differential interference contrast (DIC), fluorescence images before (0 sec) and after (10 sec) irradiation, and merge. Selected cells were irradiated with a 100 W high-pressure mercury lamp via a 330-385 nm band-pass filter through an objective lens.

培養細胞系においても短い照射時間で速い活性化が達成できた

From Chemical Biology to Chemical Medicine

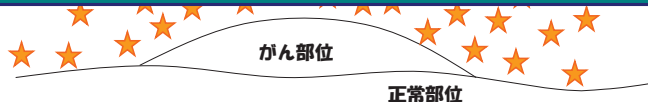
「見る」から「診る」へ



がん選択的イメージング戦略

- (a) プローブの局在化を原理とするイメージング
-> 選択的取り込み、排出、代謝を活用したイメージングプローブの局在化

MRI, PET, non-activatable fluorescence



- (b) プローブシグナルの「活性化」を原理とするイメージング
-> プローブが局在化する必要はない
-> がん部位を認識してプローブシグナルが大きく変化することによる、高S/Nイメージングの実現

Activatable fluorescence



・・・で、がんだけをどうやって光らせるか？

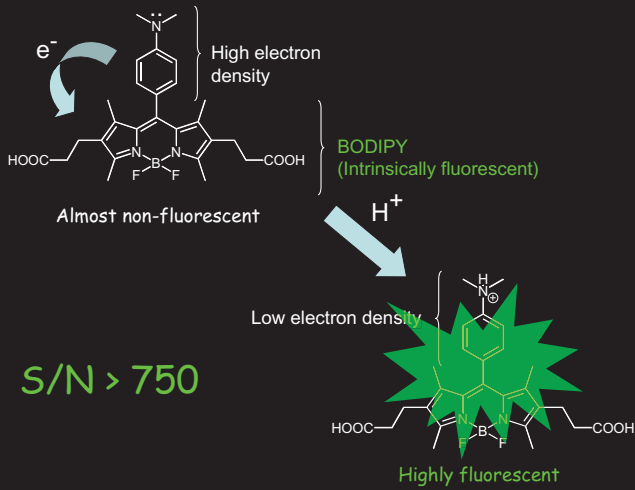
<Strategy>

がん部位へのターゲッティング機能部位
(大分子=抗体・タンパク質リガンド)

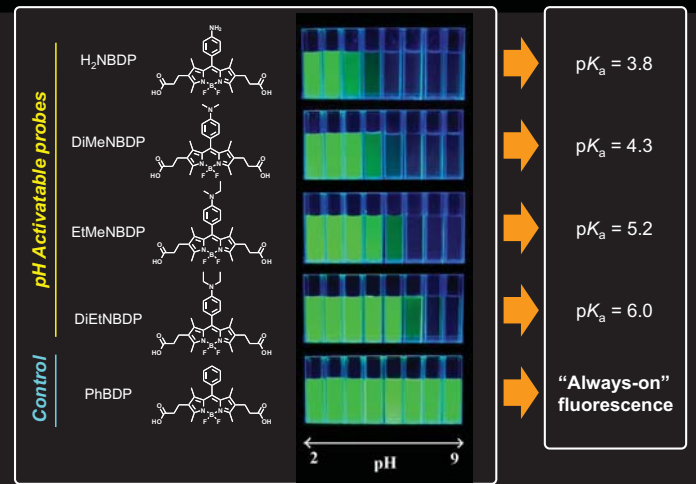
×

ターゲットされたことを認識する部位
(小分子=蛍光プローブ)
(がん細胞特異的な性質を認識する必要はない)

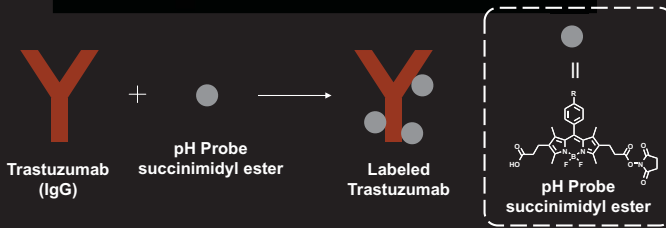
新規弱酸性環境検出pH蛍光プローブの開発



Fluorescence Images for pH Profiles of pH Probes

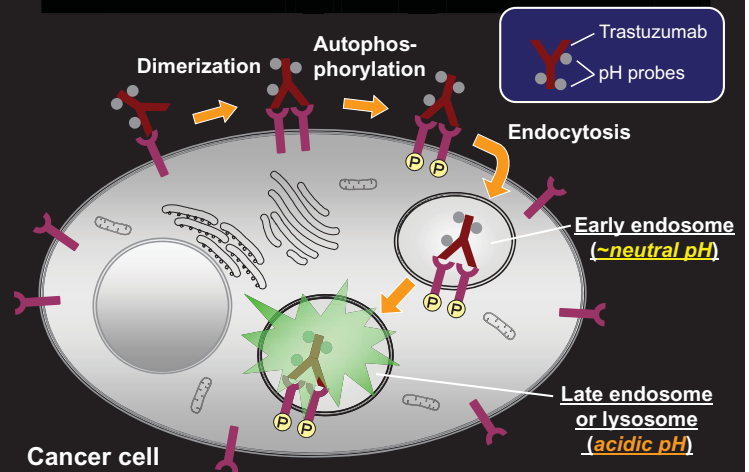


Labeling pH Probes to Trastuzumab

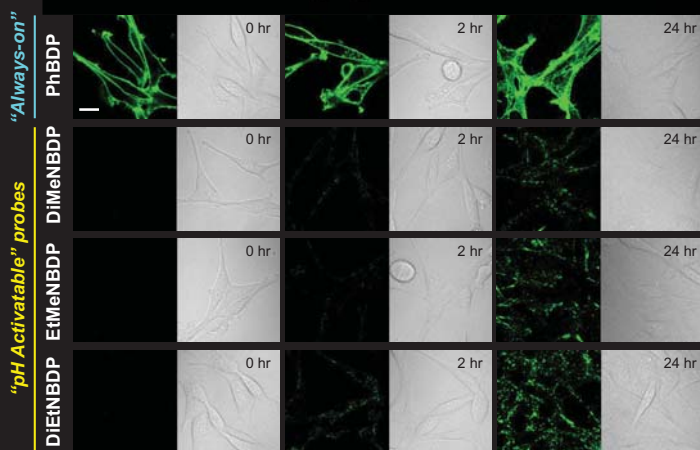


- Labeling site: Lysine residues on proteins at random
- Moderate reaction condition: Labeling in PBS (pH 8.4) at r.t. for 1 hr in the dark
- Easy purification: Labeled Trastuzumab was readily purified by a gel filtration column.

Imaging Strategy - Ligand-Receptor System -



Fluorescence Imaging of NIH3T3/HER2 Cells

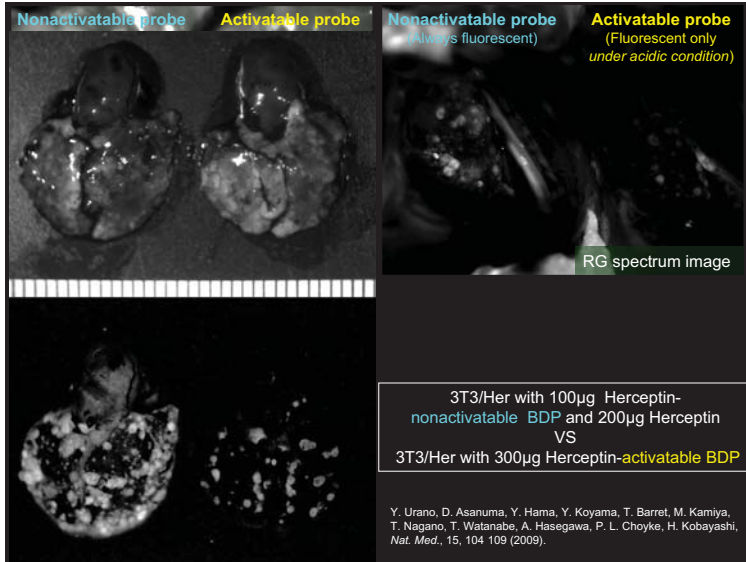


Fluorescence *in vivo* Imaging

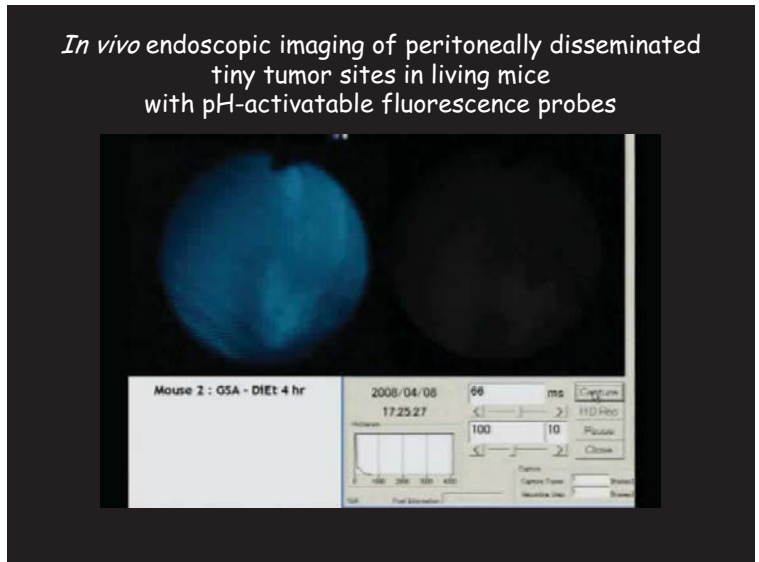
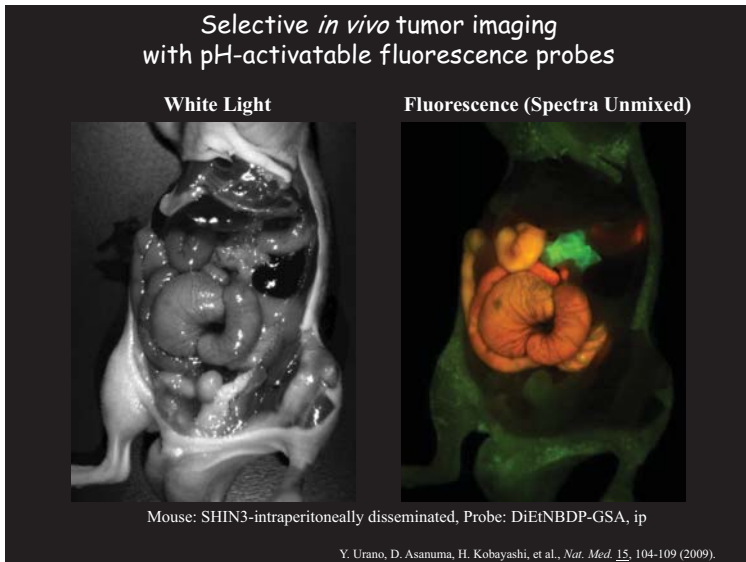
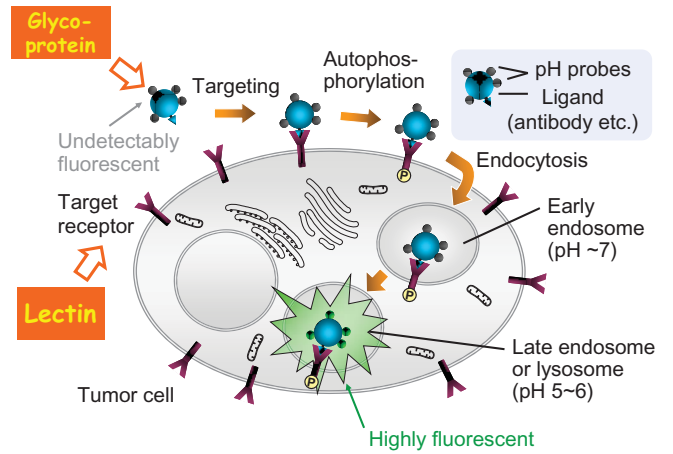
Tail-vein injection



Spectral fluorescence imaging after thoracotomy a day postinjection



"pH-activatable" strategy is versatile and applicable to a wide range of receptor-ligand systems



Take Home Messages

- Rational and flexible design strategies for fluorescence probes could be established based on the concept of PeT and spirocyclization.
- Novel and highly activatable fluorescence probes for ROS, H⁺ and various enzymes could be developed.
- Combination of tumor specific targeting and fluorescence activation enables highly specific cancer imaging.
- Rapid and sensitive detection of tiny tumors *in vivo* could be achieved by using novel small molecule-based probes, which would enable us to diagnose tumor sites intraoperatively with fluorescence endoscopes.