

蛍光プローブ —ランタノイド金属の蛍光を用いた高感度臨床診断薬の開発—

長野 哲雄 寺井 琢也

要 旨：蛍光プローブは、雑多な系内に存在する標的分子を特異的に、かつリアルタイムで検出できる点で非常に有用な分析ツールである。その設計法はいくつか知られているが、中でも光誘起電子移動 (PeT) は有用と考えられる。最近では、ランタノイド金属を用いた蛍光プローブが開発されるようになった。これらは既存の蛍光プローブにはない優れた特徴を持っており、臨床検査薬等への応用にも適していると考えられる。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 743–748)

Key words: fluorescence probe, lanthanide luminescence, clinical diagnosis

はじめに

細胞や生体試料(血液、尿など)、あるいは個体全体において生体分子を直接捉え、それらの活性や変化量を高感度に定量する技術の開発は、基礎生命科学研究や創薬研究のみならず臨床的にも非常に重要な意味を持っている。例えば、疾患の診断や治療方針の決定において臨床検査が果たす役割は近年ますます大きくなってきており、MRIやPETを用いた画像診断も盛んになる一方である。このような分析・計測技術の進展には、ハード面である測定機器とソフト面である可視化プローブの両者の開発が不可欠である。筆者らの研究室ではこの可視化プローブ、特に蛍光プローブの開発研究を専門に行ってきた。そこで本報では、まず蛍光プローブとその開発戦略について概観し、続いて当研究室で得られた最近の結果である金属蛍光を利用した高感度臨床診断薬について説明する。

蛍光プローブとその設計法

ある種の分子に光を当てる(励起: excitation)と、吸収された光が別の光となって再び出てくる(発光: emission)ことがある。この現象は蛍光(fluorescence)と呼ばれ、詳しくいえば、基底状態の電子が光によってエネルギーの高い励起状態へ遷移し、そこから再び基

底状態へ戻る際に余分なエネルギーを光として放出する過程である(Fig. 1)。

蛍光プローブとは、蛍光を利用して標的となる分子がどこにどれだけ存在しているのかを検出する機能を持った化合物のことを指す。Fig. 2に模式図を示したが、ここでは標的分子と蛍光プローブが反応して蛍光性の化合物となるようすを示している。標的に特異的な蛍光プローブを用いることで、細胞のようなヘテロな系内にある標的分子を高感度かつリアルタイムで検出することが可能となるため、蛍光プローブを用いた実験は分子細胞生物学分野において、現在必須のものとなっている。

では、蛍光プローブを作るにはどうすればよいだろうか。必要な条件は大きく2つある。一つは、標的分子との特異的な反応をみつけることである。ある分子に対する蛍光プローブが別の分子とも反応して蛍光が変化するようでは、何を調べているのか分からない。もう一つは、蛍光を制御する仕組みをプローブ内に導入することである。標的分子との反応前後で蛍光の変化がなければ、蛍光プローブとしては当然機能しない。この蛍光制御機構としては、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: fluorescence resonance energy transfer)や分子内電荷移動(ICT: intramolecular charge transfer)、光誘起電子移動(PeT: photoinduced electron transfer)といったも

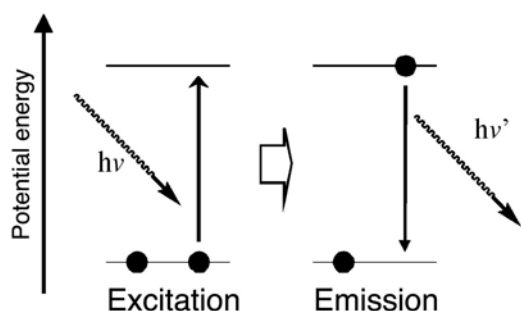


Figure 1 Schematic representation of the mechanism of fluorescence. Horizontal bars represent energy levels of the molecular orbitals of the fluorophore. Black circles represent electrons.

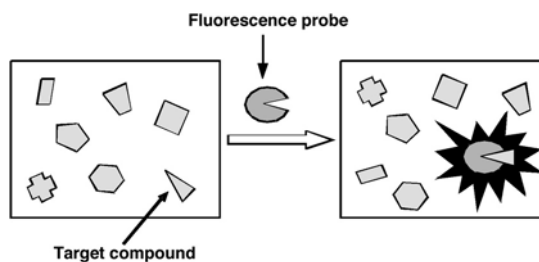


Figure 2 Conceptual function of a fluorescence probe, which binds specifically to the target compound to be fluorescent.

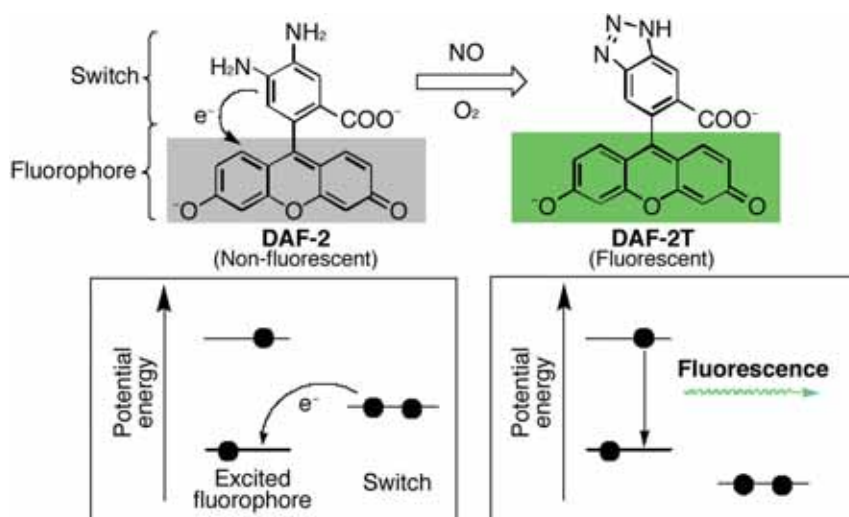


Figure 3 Rational design of a fluorescence probe using photoinduced electron transfer (PeT).

In the absence of the target compound (NO in this case), the probe, DAF-2, is non-fluorescent because the switch moiety is electron-rich enough for electron transfer (PeT) to take place. After the reaction with NO, the probe becomes fully fluorescent because PeT cannot occur due to the low energy level of the switch moiety.

のが知られているが、ここでは筆者らが汎用している PeT機構について、初期に開発したNOプローブである diaminofluorescein- α (DAF-2) を例に説明する^{2,3)}。

NOは循環器系・免疫系・神経系などで多様な機能を示す生理活性種である。DAF-2はNOと反応する前はほぼ無蛍光であるが、反応後はDAF-2Tとなり強い蛍光を発するようになる(Fig. 3)。DAF-2は構造的に蛍光団 (fluorophore) とスイッチ部分の 2 つの部分に分けられる。ここで反応前のスイッチ部分(ジアミノベンゼン) は非常に電子が豊富である(電子密度が高い) ため、蛍

光団を励起するとスイッチ部分から蛍光団への電子の移動(この現象をPeTと呼ぶ) が起こる。すると励起された蛍光団の電子はもはや基底状態へ戻れなくなり、蛍光は観察されなくなる。一方、NOとの反応後に生じるDAF-2Tでは、スイッチ部分(ベンゾトリアゾール) の電子はそれほど豊富ではないため、PeTは起こらない。したがって励起された蛍光団は通常通り蛍光を発する。

この原理は他のプローブ開発にも応用可能である。すなわち、スイッチ部分に標的分子との特異的な反応

部位を付加し、かつ反応の前後で電子密度が変化するような分子設計を行えばよい。ここで重要なことは、化合物の電子密度はコンピュータを用いた量子化学計算により高い精度で予測可能⁴⁾ということである。つまりこの手法を用いれば、多くの時間と資源を投入して多数の化合物を合成しなくとも、論理的に有用な蛍光プローブが開発できるのである。実際筆者らは、これまでに亜鉛イオン⁵⁾や活性酸素⁶⁾等を標的としたさまざまな蛍光プローブを開発しており、いくつかはすでに市販されている。

ランタノイド錯体の蛍光

PeTを用いた蛍光プローブは非常に有用であるものの、従来のプローブは共通して一つの問題点を抱えていた。それは、夾雑物の多い系(血清や尿など)においてはバックグラウンドシグナルの影響が大きくなり、正確な定量が行えないということである。血液にはアルブミン等のタンパク質やポルフィリン等の小分子が高濃度に含まれている。これらの分子の出す蛍光は単独では弱いものの、蛍光プローブと比較して圧倒的大量に系内に存在する場合にはその影響を無視できない。この問題を解決するのが、ランタノイド錯体の出す長寿命蛍光の利用^{7,8)}である。

ランタノイド(Ln)とは、周期表で第6周期第3族に位置する15個の金属元素の総称である。その中で、テルビウム(Tb)やユウロピウム(Eu)元素は可視光領域に特有の蛍光を持っている。これらの金属は他の分子との複合体(錯体)を作った時に強い蛍光を発するが、その蛍光は、通常の有機化合物の蛍光に比べて水中で約1万倍から10万倍という長い蛍光寿命(励起光を当ててから蛍光が消光するまでの時間)を持っている。そのため、ランタノイド錯体を用いた蛍光プローブを開発すれば、励起光を当てた後に一定の時間を置いて測定を開始することにより(この間に余分な蛍光はすべて減衰する)、プローブの出す蛍光のみを高いS/N比で測定できることになる(Fig. 4)。これを、時間分解蛍光測定という。

長寿命蛍光の生命科学への応用

ランタノイド錯体の蛍光については古くから知られていたものの、蛍光on/off機能を持ったプローブとしての応用はほとんど研究されてこなかった。蛍光性ラン

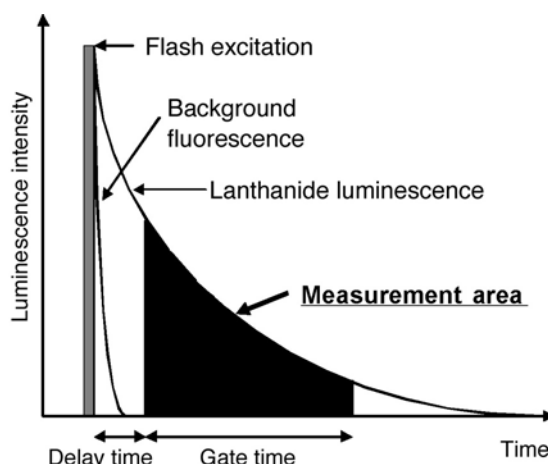


Figure 4 Schematic representation of time-resolved fluorescence measurement. Measurement is performed after a certain time (delay time). Short-lived background fluorescence totally decays during that time.

タノイド錯体の応用例として最も広く行われてきたのは、蛍光標識物質として抗体へ結合させることである。このような方法は現在ではDELIA[®]等の名前で市販もされており、BSEの診断⁹⁾や心筋梗塞マーカーの検出¹⁰⁾等に応用されているほか、創薬研究における候補化合物のスクリーニングにも広く用いられている。抗体を用いたアッセイは汎用性に優れている反面、洗浄等の操作が煩雑になりがちであるという欠点を持つ。

ランタノイド錯体を用いた蛍光プローブについては近年研究が始まりつつあるが^{11,12)}、その標的は限られているうえにプローブの設計手法に必ずしも一般性がなかった。そこで筆者らは、蛍光制御原理として普遍的と考えられるPeT機構に基づいて、実用的な長寿命蛍光プローブを開発することを目的として以下の研究を行った。

LAPプローブの開発¹³⁾

一般にランタノイド錯体の構造は、光を吸収するアンテナ部位と金属のキレーター部位の2つに分けられる。ここに筆者らは、アンテナからは独立したスイッチ部分を導入した錯体を合成した。スイッチ部分の構造をさまざまに変化させたところ、スイッチ部分からアンテナ部位へのPeTの有無により蛍光強度が大きく変化することが明らかとなった。

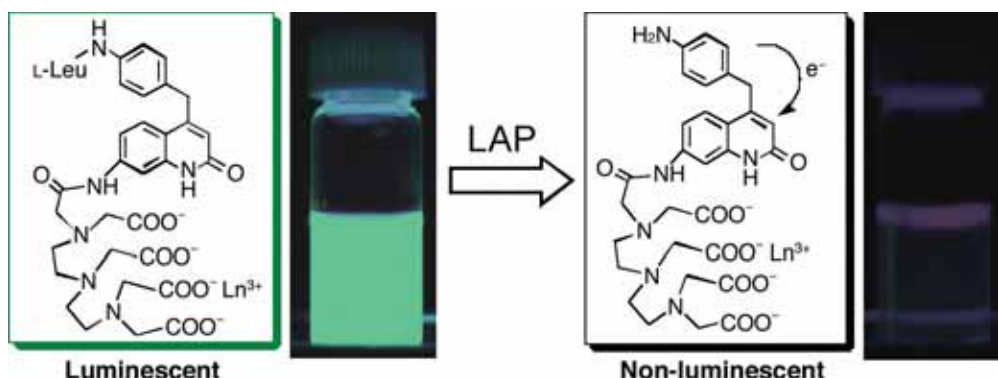


Figure 5 Reaction scheme of a lanthanide-based long-lived luminescence probe for LAP (Ln = Tb, Eu). Photographs of the Tb³⁺ complexes in water were taken under illumination with a UV lamp (365 nm) and are shown alongside the chemical structures.

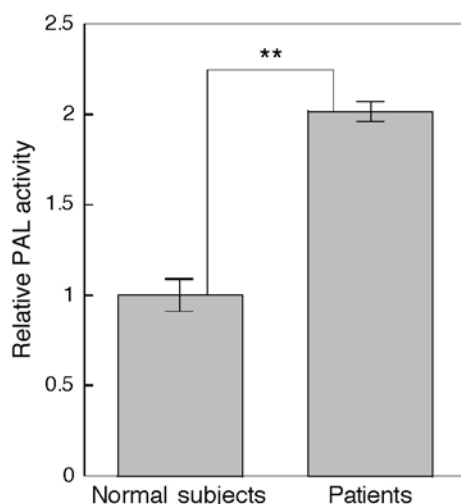


Figure 6 Comparison of serum LAP activity measured by the Tb³⁺ complex. Error bars represent standard error (n = 5). **: significant change (p < 0.01).

次にこの知見を基にして、プロテアーゼの一種であるロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) の活性を定量するプローブ (Fig. 5) の開発を行った。このプローブは、酵素との反応前はTb³⁺に由来する緑色の強い長寿命蛍光を持っているが、反応後はスイッチ部分からアンテナへのPeTが起こるため蛍光が消光する (Fig. 5, 写真)。LAPはタンパク質やペプチドのN末端からLeu等の疎水性アミノ酸残基を切断する酵素であり、ヒトにおいてもさまざまな臓器で発現がみられる。臨床検査的には

ALPやγ-GTPなどとともに胆道系酵素と呼ばれ、胆汁うっ滞や肝炎、肝癌等の疾患で血清中の酵素活性が上昇する。また最近では、癌の転移や自己免疫疾患等との関連も指摘されている。

開発したプローブは、LAP特異的に大きな蛍光強度変化を引き起こした。さらに96穴プレートを用いた系では、本プローブを用いることで、既存の蛍光性基質であるL-MCAでは検出できないわずかな量の酵素活性も検出可能になることが示された。

前述の通り、肝胆道系の癌患者においてはLAP活性の亢進が知られている。そこで開発したプローブを用いてこの変化が観察されるかどうかを検討した。その結果Fig. 6に示すように、患者サンプルにおいては健康人の約2倍という高い活性が観察された。現在、主に用いられている定量法である吸光法とこの方法とを比較したところ、2つの方法で得られた値の間には高い相関が確認された。筆者らが開発した手法は時間分解蛍光測定法を利用するため、既存の方法に比べて少ない量の試薬を用いても感度の良い測定が可能であるという利点を持つ。これらの結果から、このプローブは優れた臨床診断薬となり得る可能性を持っていることが分かる。

前述のように、本研究で用いたプローブのデザイン方法はLAP以外の標的にもそのまま適用可能である。PeT機構によればプローブの蛍光強度はスイッチ部分の電子密度に依存するため、スイッチ部分の構造を変化させることで、他のプロテアーゼはもちろん、さまざまな生理活性分子に対するプローブのデザインが合

理的に可能となると考えられる。

結 語

蛍光プローブの臨床医学への応用はまだ端緒にすぎたばかりであり、今後の発展が期待される。本報で取り上げた長寿命蛍光プローブを用いた臨床診断薬は、その一端を示すものに過ぎない。例えば、腫瘍内のタンパク質分解酵素と反応するプローブを用いた癌のイメージング研究なども近年盛んに行われるようになってきている¹⁴⁾。このような研究の成果が医学の発展に大きく貢献することは間違いない一方で、研究を成功に導くためには、臨床の現場を知る医学系研究者と、化学や工学といった異なるバックグラウンドを持つ研究者との協力が不可欠であろう。医薬工連携の推進によって、有益な医療技術の開発がさらに進むことを期待したい。

文 献

- 1) Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed. Kluwer Academic, New York, 1999.
- 2) 長野哲雄, 浦野泰照, 神谷真子: バイオイメージングとケミカルバイオロジー. 細胞工学, 2005, 24: 1187–1191.
- 3) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K et al: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal Chem, 1998, 70: 2446–2453.
- 4) Urano Y, Kamiya M, Kanda K et al: Evolution of fluorescent as a platform for finely tunable fluorescence probes. J Am Chem Soc, 2005, 127: 4888–4894.
- 5) Komatsu K, Kikuchi K, Kojima H et al: Selective zinc sensor molecules with various affinities for Zn²⁺, revealing dynamics and regional distribution of synaptically released Zn²⁺ in hippocampal slices. J Am Chem Soc, 2005, 127: 10197–10204.
- 6) Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K et al: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. J Biol Chem, 2003, 278: 3170–3175.
- 7) Hemmilä I, Mikkilä V: Time-resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assays. Crit Rev Clin Lab Sci, 2001, 38: 441–519.
- 8) Bünzli JC: Benefiting from the unique properties of lanthanide ions. Acc Chem Res, 2006, 39: 53–61.
- 9) Barnard G, Helmick B, Madden S et al: The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA® as a diagnostic test for BSE. Luminescence, 2000, 15: 357–362.
- 10) Pettersson K, Katajamäki T, Irjala K et al: Time-resolved fluorometry (TRF)-based immunoassay concept for rapid and quantitative determination of biochemical myocardial infarction markers from whole blood, serum and plasma. Luminescence, 2000, 15: 399–407.
- 11) Hanaoka K, Kikuchi K, Kojima H et al: Development of a zinc ion-selective luminescent lanthanide chemosensor for biological applications. J Am Chem Soc, 2004, 126: 12470–12476.
- 12) Parker D, Yu J: A pH-insensitive, ratiometric chemosensor for citrate using europium luminescence. Chem Commun, 2005: 3141–3143.
- 13) Terai T, Kikuchi K, Iwasawa SY et al: Modulation of luminescence intensity of lanthanide complexes by photo-induced electron transfer and its application to a long-lived protease probe. J Am Chem Soc, 2006, 128: 6938–6946.
- 14) Weissleder R, Tung CH, Mahmood U et al: *In vivo* imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. Nat Biotechnol, 1999, 17: 375–378.

Fluorescence Probes —Development of a Sensitive Diagnostic Reagent Based on Lanthanide Luminescence—

Tetsuo Nagano and Takuya Terai

Laboratory of Chemistry and Biology, the Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
the University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words: fluorescence probe, lanthanide luminescence, clinical diagnosis

Fluorescence probes have proven to be a highly practical analytical tool allowing researchers specific and real-time detection of target molecules in complex systems. Dozens of probes for various targets have been developed on several principles including photoinduced electron transfer (PeT). Lately, lanthanide-based luminescence probes have emerged, which have some unique characteristics compared with conventional fluorescence probes. Due to their long luminescence lifetime, the newly developed probes are expected to be useful as sensitive diagnostic reagents.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 743–748)