

Title	効率的結合形成反応を起点とする『合成化学生物学』の提起高速6 $\pi$ -アザ電子環状反応の設計による生体高分子の非侵襲的イメージング
Author(s)	田中, 克典
Citation	大阪大学低温センターだより. 156 p.16-p.23
Issue Date	2011-10
oaire:version	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/10567">https://hdl.handle.net/11094/10567</a>
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

# 効率的結合形成反応を起点とする 『合成化学生物学』の提起 高速6 -アザ電子環状反応の設計による 生体高分子の非侵襲的イメージング

理学研究科 田中 克典 (内線5391)

E-mail: ktzenori@chem.sci.osaka-u.ac.jp

## 1. はじめに

ペプチドやタンパク質、または核酸や糖鎖を代表とする“生体高分子”が携わる様々な生命現象を理解するために、これまでに生物学および臨床学的な知見を基にして、精製された生体分子や培養した細胞、あるいは切片にした組織を用いて種々検討がなされてきた。次なる我々の興味は、これらの生体分子が、実際に生体内（インビボ）でどのようなダイナミックなプロセスを経て機能を発現するのかを明らかにし、さらには診断や臨床への展開を意図して、生体高分子を特定の臓器や癌組織、炎症部位に集積（ターゲティング）させることである。これを実現する1つの手段として、“生きている動物内で非侵襲的に可視化する”方法が挙げられるが、最近ではGFPのような蛍光タンパク質の発現系や生体分子の標識体を用いることによって、マウスなどの小動物ではインビボイメージングが比較的容易に実施できるようになってきた<sup>[1,2]</sup>。蛍光イメージングに加えて、常磁性元素や陽電子放出放射性原子を標識基とするMagnetic Resonance (MR) イメージングやPositron Emission Tomography (PET) イメージングも、高感度測定装置の開発・発展と共に盛んに検討されている。これらの最新インビボイメージング機器を活用し、既にその標的レセプターや相互作用する器官が明らかにされている生体分子のイメージングを実施することによって、生体内でのダイナミクスを直接可視化することが可能である。また、機能が未知である生体高分子を生体内で可視化することにより、逆に個々の分子が持つ生物学的意義を明らかにできる可能性を有する。さらにこれらの知見を基盤にして、生体内で炎症部位や癌を特異的に認識する分子、神経系やリンパ節、あるいは脾臓などの臓器に選択的取り込まれる機能分子を創製することも可能であろう。著者らは、ペプチドや糖タンパク質、または生細胞丸ごとの動物内でのダイナミクスを解明すると共に、炎症や癌組織の診断薬の開発に結びつけることを目的として、PETや蛍光観察を基盤とした非侵襲的インビボイメージング研究を実施してきた<sup>[1,2,4-9]</sup>。本稿では、著者らがアミノ基との効率的結合形成反応を設計することによって開発した、生体高分子に対する放射線や蛍光基の革新的標

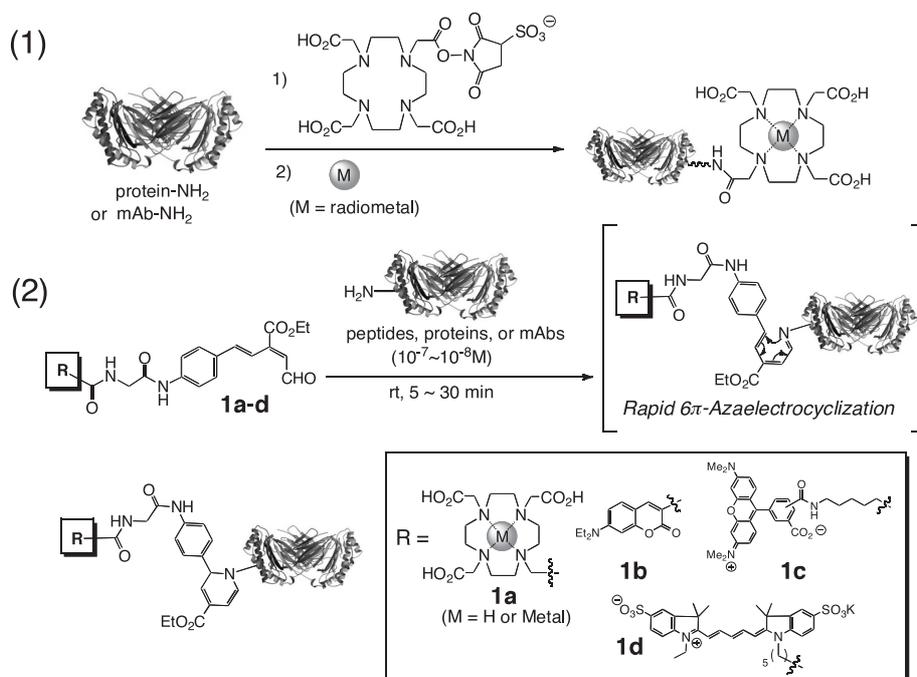
---

\*この印の付いている語は、後に「用語説明」があります。

識分子プローブを紹介するとともに、糖タンパク質や細胞丸ごとの非侵襲的インビボイメージングについて概説する。さらに、同反応を経た細胞表層上への糖鎖導入法（細胞表層糖鎖エンジニアリング）およびこの人工細胞をトレーサーとする癌組織ターゲティングの新規ストラテジーについても併せて紹介し、著者が『合成化学生物学』と名付けた、効率的結合形成反応を起点とする新しい学際複合領域分野を提起したい。

## 2. 革新的リジン残基標識プローブの開発に基づく可溶性糖タンパク質のPETイメージング：シアル酸含有糖鎖によるタンパク質の血中内安定性への影響

一般的に、ペプチドやタンパク質（抗体）のPETやSPECT\*実験を実施する場合には、まず金属の配位子で標識した後、各種放射性金属を導入する（スキーム 1(1)）<sup>[1,2]</sup>。金属配位子としては、DOTA（1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid）やDTPA（diethylenetriaminepentaacetic acid）などが汎用されているが、多くの金属に対する配位速度定数が大きく、また金属錯体の安定性が抜群に高いDOTAがよく用いられる。実際に<sup>68</sup>Ga-DOTA-octreotideは、髄膜炎患者で検討されており、<sup>18</sup>F-FDGをトレーサーとしたPETやMRIよりも高感度で直径7 mmの癌を追跡できることが報告されている。癌細胞をターゲットとしたペプチドトレーサーとしては、他にも V3-インテグリンのアゴニストであるcyclic RGD誘導体、GRPR（Human Gastrin-releasing Peptide Receptor）に対するBombesin、 $\alpha$ -MSH（ $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone）誘導体やhEGF、またはEGFRリガンドなどが小動物レベルで検討されている<sup>[1,2]</sup>。一方、Anti-HER2 protein抗体であるherceptinやCEA（carcinoembryonic antigen）またはCAM（cell adhesion molecule）に対するモノクローナル抗体や対応する抗原認識フラグメント（minibody）も盛んに検討されており、最近で



スキーム 1 生体高分子の標識。(1) スクシンイミジルエステル法。(2) 高速 6 $\pi$ -アザ電子環状反応を経た新規標識法。

は、mRNAやPNAを用いた研究も報告されるようになってきた<sup>[1]</sup>。

さて、従来、ペプチドやタンパク質（抗体）をDOTAで標識する場合には、*N*-末端アミノ基やリジンの  $\epsilon$ -アミノ基に対して、スクシンイミジルエステル試薬を作用させることにより実施されてきた（スキーム 1(1)）<sup>[1,2]</sup>。しかし、スクシンイミジルエステル試薬の反応性があまり良くないため、標識するサンプルの反応濃度を高濃度に保たなければならず（ $10^{-3}$  ~  $10^{-4}$  M程度のタンパク質濃度、 $10^{-1}$ の試薬濃度）、さらに長い反応時間（室温で24時間程度）が必要とされる。標識効率も大抵の場合は良くない（20 - 30%程度）。このため、多くの例では、効率的にDOTA標識サンプルを調製するために、4 ~ 20 mg程度の大量の生体高分子サンプルが用いられている。さらに高濃度反応条件下では、無差別に多くのアミノ基が標識されることに起因して、標識サンプルの活性が著しく低下することが大きな問題であった。

筆者らは、スクシンイミジルエステルに代わる革新的なペプチド・タンパク質の標識プローブとして、独自の高速アザ電子環状反応<sup>\* [10-18]</sup>を用いる新規分子ツールを開発した（スキーム 1(2)）<sup>[3,4]</sup>。 $10^{-7}$  ~  $10^{-8}$  M濃度の不飽和エステルアルデヒドプローブ1aをペプチドやタンパク質などのリジン残基と作用させると、様々な水素イオン濃度指数の緩衝溶液中（pH = 6 ~ 9）、30分以内の短い反応時間で、定量的に標識体を与える。本反応は、アミノ基周辺の立体障害に著しく影響を受けるため、リジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基が*N*-末端アミノ基に優先して速やかに標識化を受ける。さらに、このような極低濃度条件下では、タンパク質表面の最も接近し易いリジン残基のみが優先して標識を受けるため、ほとんどの場合、生体高分子サンプルの活性を低下させることがない。リジンアミノ基との標識付加体が生体高分子と同様に正電荷を保持することも、標識サンプルの生物活性を損なわない今一つの理由である。例えば、 $10^{-7}$  M程度の抗GFP抗体や抗EGFR抗体に対して、プローブ1aを室温で10 ~ 30分作用させると、抗原認識能にほとんど影響を与えずFc部位の1 ~ 2個のリジン残基を効率的に標識することができる<sup>[3,4]</sup>。同様に、蛍光色素を持つプローブ1b-dを用いると蛍光標識も可能である。

そこで本プローブを用いて、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖（*N*-結合型糖鎖）<sup>\*</sup>の非還元末端<sup>\*</sup>のシアル酸がタンパク質の血中内滞留性に及ぼす影響をPETによって可視化することを試みた（図1）<sup>[1-4]</sup>。血中内糖タンパク質であるオロソムコイドとアシアロオロソムコイドを各数十マイクログラムのみを用いてDOTAプローブ1aで標識した。次いで、<sup>68</sup>Gaを単寿命放射線金属としてDOTAに導入した後、両糖タンパク質トレーサーをウサギに尾静脈注射して、ダイナミックPET画像を得た（図1）。糖鎖構造にシアル酸を有するオロソムコイドと比較して、シアル酸の無いアシアロオロソムコイド、またはその分解物は、30分後に腎臓に素早く移行し、その後80分後には徐々に消失した。シアル酸の無いアシアロオロソムコイドは胆嚢にも素早く移行しているため、胆嚢 - 腸管経路を経た体外排出ルートも示唆された。以上の結果は、アシアロオロソムコイドが素早く体外排出されることを示しており、これは糖鎖構造における非還元末端に存在するシアル酸が、タンパク質の血中内安定性に寄与することを意味する。シアル酸含有糖鎖の導入により、糖タンパク質の生体内での半減期が長くなることは古くから報告されてきた<sup>[19]</sup>。特に、エリスロポエチンやインシュリンのように、シアル酸含有*N*-結合型糖鎖がタンパク質やペプチドの血中内安定性に大きく

寄与することが有名であるが、著者らの知る限り、図1の結果はこれをPETイメージングにより可視化した初めての例である。さらに、シアル酸の無いアシアロオロソムコイドは、脾臓および肺へより強く集積することが図1のイメージ図より初めて明らかとなった。このように著者らの分子ツールを用いることによって、糖タンパク質の血中内滞留性をPETイメージングによって簡便に可視化することができることから、将来タンパク質を生物製剤として利用する上で大変意義深い結果である。さらに最近著者らは、生体内でのN-結合型糖鎖を疑似した世界最大の糖鎖クラスターの調製とイメージングにも成功し、上記の結果と同様にシアル酸が生体内での安定性に寄与すること、またシアル酸の糖鎖構造に対する結合様式も安定性や臓器選択的な集積に重要であることを始めて見出した<sup>[8]</sup>。

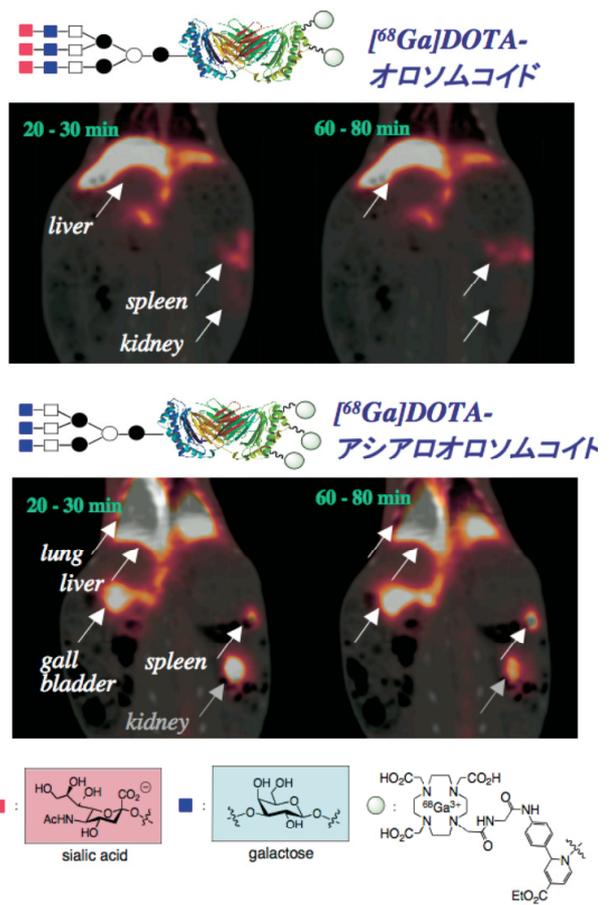
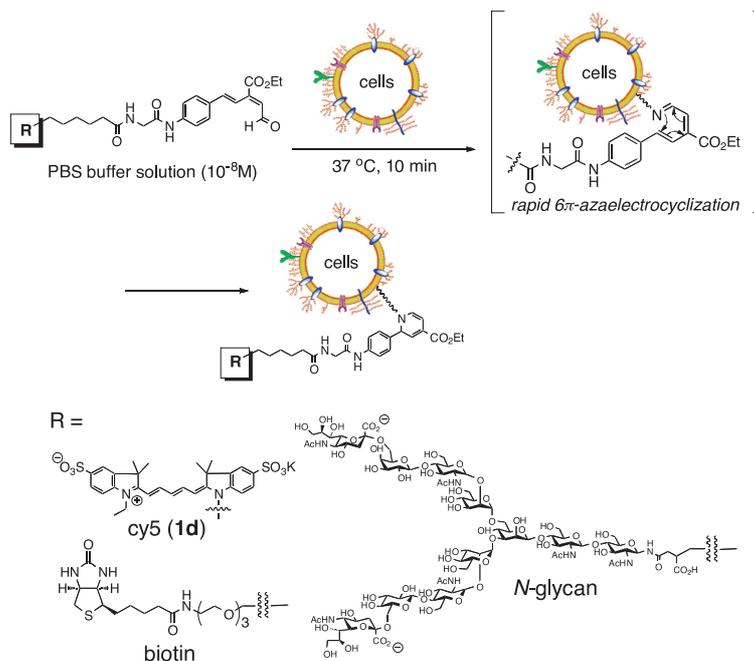


図1 ウサギにおける<sup>68</sup>Ga-DOTA-標識糖タンパク質のダイナミックPETイメージング。

### 3. 細胞表層の標識、および化学的エンジニアリングによる生きた動物内での細胞ホーミングの可視化と癌組織のターゲティング

著者らの高速電子環状反応を用いると、丸ごとの細胞を標識することも可能である(スキーム2)<sup>[6]</sup>。例えば、Glioma C6細胞に対して、 $10^{-8}$  Mという極低濃度のcy5蛍光プローブ(1d)リン酸緩衝溶液を37℃で2分間作用させるだけで、細胞表層のみ選択的に標識することができる。細胞表層のリジン残基やホスファチジルエタノールアミン等の一級アミンが過剰に存在する部分のみで選択的に反応が進行するため、標識試薬は細胞内に浸透せず、その結果細胞機能を阻害することはない。現在既存する化学的、または生物学的標識化法の中で、細胞表層をこのような温和な条件下、数分という短時間で標識基を共有結合できる唯一の方法である。一方、同様に高速アザ電子環状反応を用いることにより、細胞表層に対してビオチンや複合型N-結合型糖タンパク質糖鎖を簡便に導入することも可能となった(化学的な細胞表層エンジニアリング)(スキーム2)<sup>[7]</sup>。

これらの結果を基にして、野生型マウスから抽出したリンパ球に対して、近赤外線領域付近の吸収を持つcy5蛍光基で標識し(プローブ1d、スキーム2)、ヌードマウスに対する非侵襲的なインビボ蛍光イメージングを実施した(図2)。その結果、これまでに報告されている細胞のホーミングイメージング結果\*と比較して、格段に高いコントラストで二次リンパ器官である脾臓や腸管膜リンパ節に集積することを可視化することに成功した(図2)<sup>[6]</sup>。



スキーム 2 アザ電子環状反応による細胞表面の標識と化学的糖鎖エンジニアリング。

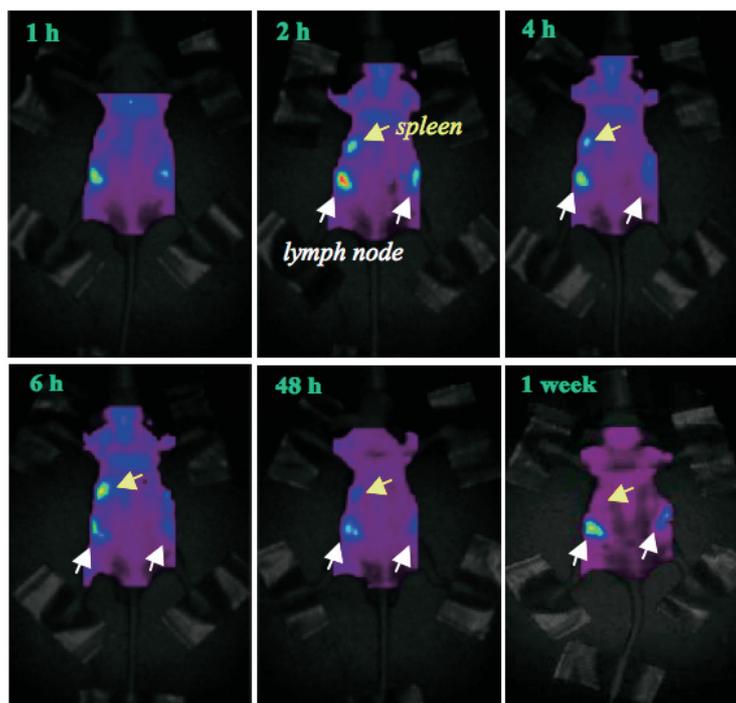


図2 リンパ球ホーミングの非侵襲的蛍光イメージング。

一方、DLD-1\*を移植した癌モデルマウスに対して、蛍光標識リンパ球のイメージングを行ったところ、二次リンパ器官へのホーミングは認められたものの、癌組織への移行は認められなかった<sup>[7]</sup>。しかし、リンパ球に対してプローブ1dで蛍光標識化すると同時にN-結合型糖鎖で化学的にエンジニアリングしたところ、この人工細胞が二次リンパ器官へのホーミングに加えて、癌組織にも集積することが判明した(図3)<sup>[7]</sup>。別実験においてN-結合型糖鎖やそのクラスターは癌組織に集積しない結果を得ており<sup>[8]</sup>、図3の結果は、N-結合型糖鎖とリンパ球表面の両者の機能が細胞

表層上で協調的に働いた可能性がある。あるいはN-結合型糖鎖を多量に細胞表層に導入したことにより、リンパ球表層のシアル酸結合タンパク質Siglecに作用して、リンパ球の活性化が起こった可能性もある。いずれにしても、癌組織をターゲットとする新しい細胞を有機合成反応のみによって人工的に創り上げたことを意味する。細胞上へのN-結合型糖鎖の導入量とそのターゲティングの効率、N-結合型糖鎖の種類による癌細胞選択性、N-結合型糖鎖の導入位置の同定と生体内での導入糖鎖のプロセッシング等について、今後更に検討を加えなければならないが、著者らが独自に開発した生体分子アミノ基との効率的な結合形成反応を駆使して、有機合成化学分野と糖鎖生物分野から、癌組織ターゲティングの新しいストラテジーを提起できたものと考えている。

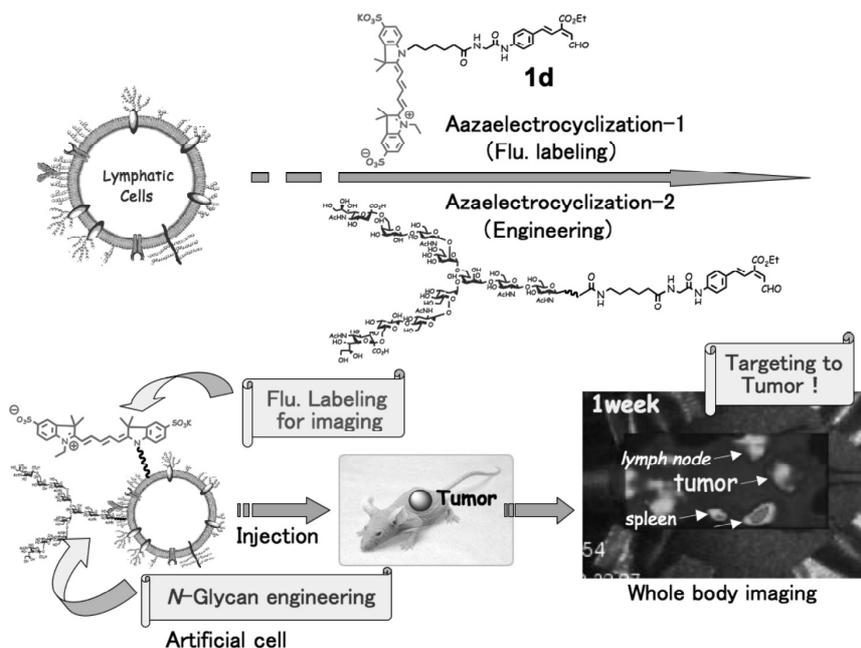


図3 リンパ球の糖鎖エンジニアリングと癌組織のターゲティング。

#### 4. おわりに

以上、生体アミノ基に対する高速電子環状反応の設計・開発を基盤とした可溶性糖タンパク質や生細胞の非侵襲的イメージング、および化学的な細胞表層エンジニアリングによる癌組織のターゲティングの新戦略を概説した。最新の有機合成化学がインビボダイナミックイメージングにかかわらず、生物学的、または化学生物学的研究の発展において重要な役割を果たす可能性にお気付き頂ければ、大きな喜びである。現在、有機合成化学の分野では、新しい遷移金属触媒の開発による水中での革新的な反応や、グリーンケミストリーを意図した触媒を必要とせず、副生成物を生じさせない“エコ”な反応が日々多数報告されている。また、マイクロリアクターの開発など、反応デバイスを検討することによって、微量サンプルの反応や多層系の反応を効率的に実現しようとする試みがなされている。視点を変えてみると、どれをとってもこれらはバイオコンジュゲーションの有効な方法論となりうる。有機合成化学を志す研究者が開発する“新規な効率的結合形成反応”を以て、多くの分子生物学者や医療診断分野の研究者が頭を抱える多くの課題に協力して挑んでいけば、それらの解決はそれほど難しくもないのかもしれない。著者らのような有機合成化学を中心として研

究を展開する研究者が、真に効率的で、力強い有機合成反応の開発を経て、新しい視点で生物学や医学分野における懸案に挑まれることを、そしてこの分野の発展に大きな飛躍となることを期待する。“生命現象を理解する次世代の分子ツール”、それを創り出す“鍵”の一つは有機合成反応にある。著者が提起する『合成化学生物学』が意味する神髄である。著者らの高速電子環状反応は、様々な生体高分子や細胞表面のアミノ基に対して $10^{-8}$  Mという低濃度でも進行するので、診断法への応用に限らず、生物学や基礎医学、さらには臨床医学に対しても幅広い適応範囲が見込める革新的な有機合成反応である。スキーム 1 に示したアミノ基標識プローブは、(株)キシダ化学と共同で標識キットSTELLA<sup>+</sup>として開発し、既に国内外で市販化した<sup>[20]</sup>。将来、著者らの高速電子環状反応が大いに活用され、様々な生体高分子の簡便なイメージング実験を誰もが簡便に実施できる日が来ることを期待する。

本研究は理学研究科 / 深瀬浩一教授のもとで実施されたものであり、終始ご指導いただいた深瀬教授に感謝申し上げます。また、本研究は理研分子イメージング科学研究センター / 渡辺恭良教授、および(株)キシダ化学 / 小山幸一氏との共同研究によって得られた成果であり、文献に記載されている共同研究者の皆様方にこの場をお借りして感謝申し上げます。

## 参考文献

- [ 1 ] K. Tanaka, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 815-828.
- [ 2 ] K. Tanaka, K. Fukase, *Mini-Rev. Org. Chem.* 2008 5, 153-162.
- [ 3 ] K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 102-105.
- [ 4 ] K. Tanaka, T. Masuyama, K. Minami, Y. Fujii, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Peptide Science* 2007, 91-94.
- [ 5 ] K. Tanaka, Y. Fujii, K. Fukase, *ChemBioChem* 2008, 9, 2392-2397.
- [ 6 ] K. Tanaka, K. Minami, T. Tahara, Y. Fujii, E. R. O. Siwu, S. Nozaki, H. Onoe, S. Yokoi, K. Koyama, Y. Watanabe, K. Fukase, *ChemMedChem* 2010, 5, 841-845.
- [ 7 ] K. Tanaka, K. Minami, T. Tahara, E. R. O. Siwu, K. Koyama, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, *J. Carbohydr. Chem.* 2010, 29, 118-132.
- [ 8 ] K. Tanaka, E. R. O. Siwu, K. Minami, K. Hasegawa, S. Nozaki, Y. Kanayama, K. Koyama, C. W. Chen, J. C. Paulson, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 8195-8200.
- [ 9 ] K. Tanaka, M. Kitadani, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 5346-5349.
- [ 10 ] K. Tanaka, M. Kamatani, H. Mori, S. Fujii, K. Ikeda, M. Hisada, Y. Itagaki, S. Katsumura, *Tetrahedron* 1999, 55, 1657-1686.
- [ 11 ] 田中克典, 勝村成雄, *有機合成化学協会誌* 1999, 57, 876-887.
- [ 12 ] K. Tanaka, H. Mori, M. Yamamoto, S. Katsumura, *J. Org. Chem.* 2001, 66, 3099-3110.
- [ 13 ] K. Tanaka, S. Katsumura, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 9660-9661.
- [ 14 ] K. Tanaka, T. Kobayashi, H. Mori, S. Katsumura, *J. Org. Chem.* 2004, 69, 5906-5925.

- [ 15 ] 田中克典, 勝村成雄, 有機合成化学協会誌 2005, 63, 696-708.
- [ 16 ] K. Tanaka, K. Fukase, S. Katsumura, *Chem. Rec.* 2010, 10, 119-139.
- [ 17 ] K. Tanaka, K. Fukase, S. Katsumura, *Synlett* 2115-2139.
- [ 18 ] 田中克典, 有機合成化学協会誌 2011, 69, 12月号.
- [ 19 ] A. G. Morell, R. A. Irvine, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 155-159.
- [ 20 ] Labeling kit “STELLA+” is available from Kishida Chemical Co., Ltd., <http://www.kishida.co.jp/>.

## 用語説明

### SPECT実験

Single Photon Emission Computed Tomographyの略。微量の 線を放出する放射線元素を含むトレーザーを体内投与し、その体内放射線放出分布を画像化する。陽電子（ $+$ ）放出崩壊を利用した断層撮影技術であるPETとは異なり、SPECTでは検出器の前にコリメーターを置き、体の周りを回転させて断層画面を作成する。

### 高速アザ電子環状反応

アザトリエンの末端原子同士が結合してジヒドロピリジン誘導体を与える協奏的反応は6-アザ電子環状反応と呼ばれる。適当な位置に置換基を導入することによって反応が著しく促進されることが分かっており、天然物の合成に限らず、生体分子や細胞の標識、あるいはエンジニアリングのための次世代分子連結反応として注目を集めている。

### アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖（N-結合型糖鎖）

アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖。糖タンパク質の糖鎖のうち、タンパク質のアスパラギン側鎖のアミド窒素に結合している糖鎖を示す。これに対し、タンパク質のセリンまたはスレオニン側鎖の水酸基に結合している糖鎖はO-型糖鎖とよばれる。

### 非還元末端

糖鎖構造において、グリコシド性ヒドロキシル基の存在する末端を還元末端、その反対側を非還元末端という。

### 細胞ホーミング

例えば、リンパ球は、胸腺、骨髄などの一次リンパ組織で産生され、血管系を経てリンパ節、パイエル板、脾臓などの二次リンパ組織の間を繰り返して循環する。このようなリンパ球に代表される細胞の体内移動現象は一般に細胞のホーミングと呼ばれる。

### DLD-1

ヒト由来の大腸癌細胞株。比較的培養し易く、ヌードマウスに移植して癌のターゲティングや分子イメージングに良く利用される。転移能が比較的高い。