

個体深部における特定分子の活性を非侵襲検出する生物発光技術の開発

国立大学法人 宮崎大学テニユアトラック推進室 講師 岩野 智

1. 研究目的

本研究グループでは、生物発光反応に基づくバイオイメーjing技術の開発と実践的な応用研究を行っている。

これまでに動物個体で起こる生命現象を従来技術の 100-1000 倍高感度に可視化できる高感度近赤外生物発光反応 AkaBLI(人工基質 AkaLumine と人工酵素 Akaluc で構成)を開発した(Fig. 1A)^[1]。AkaBLI は NIH の Somatic Cell Genome Editing Program で動物個体での検出システムに第一候補としてリストされており、技術的優位性は依然高い^[2]。

AkaBLI は Akaluc の発現量(=発光強度)を基に、動物個体内に数個細胞の局在、増殖の過程や遺伝子発現動態を高感度にモニタできる技術である。しかし、複雑な生命現象を読み解くには、特定の分子に呼応して発光活性(強度/波長)を変調させるプローブの開発が不可欠である。

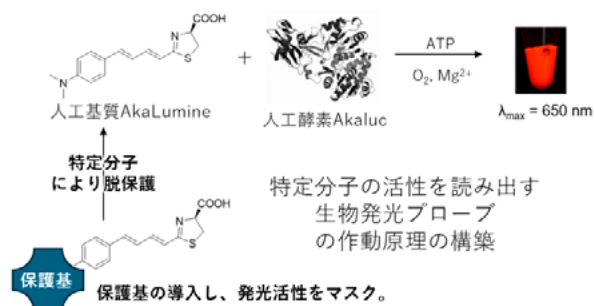


Fig. 1 AkaBLI に基づく生物発光プローブの模式図

そこで本研究では、AkaBLI を基盤にした基質構造の改変により、特定の生理機能を非侵襲に可視化できるターンオン型の機能プローブの作動原理の構築を目指す。具体的には、人工基質の AkaLumine に化学修飾を施し発光活性をマスク

し、特定分子(例:プロテアーゼ)により修飾が取り除かれる事で発光活性を回復する機能プローブである。概念実証のため、創薬ターゲットとして有力視されている SARS-CoV-2 メインプロテアーゼ(3CL)の標的ペプチドを発光基質に修飾し、3CL の存在の有無により発光が Off→On するかを調べた。

2. 研究実施状況・研究成果

2.1. 3CL 検出用発光プローブ 1 の前駆体である

AkaLumine モノメチル体の合成と評価

3CL 検出用発光プローブ 1 での発光基質は AkaLumine モノメチル体である。そこでまず、AkaLumine モノメチル体の合成を合成した(Fig. 2A)。AkaLumine モノメチル体は天然の Fluc(Akaluc の祖先)と反応し良好な発光活性を示す予備的知見を持って、本研究を企画したが、Akaluc との反応性は調べられていなかった。そこで、AkaLumine モノメチル体と精製タンパク質である Akaluc を利用した in vitro での発光活性評価を実施した。AkaLumine と比較してモノメチル体は 4%程度の発光強度を示した (Fig. 2B)。

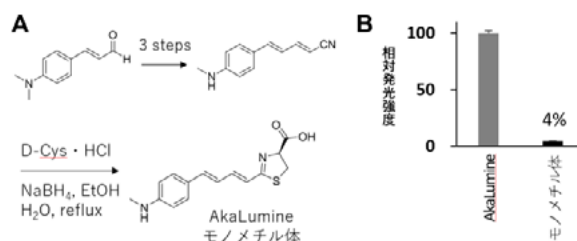


Fig. 2 AkaLumine モノメチル体の合成(A)と in vitro での Akaluc との発光活性評価(B)

AkaLumine の化合構造を少し変化させるだけで、Akaluc の基質認識に影響を与え、大幅に発光活性が低下することが判明した。

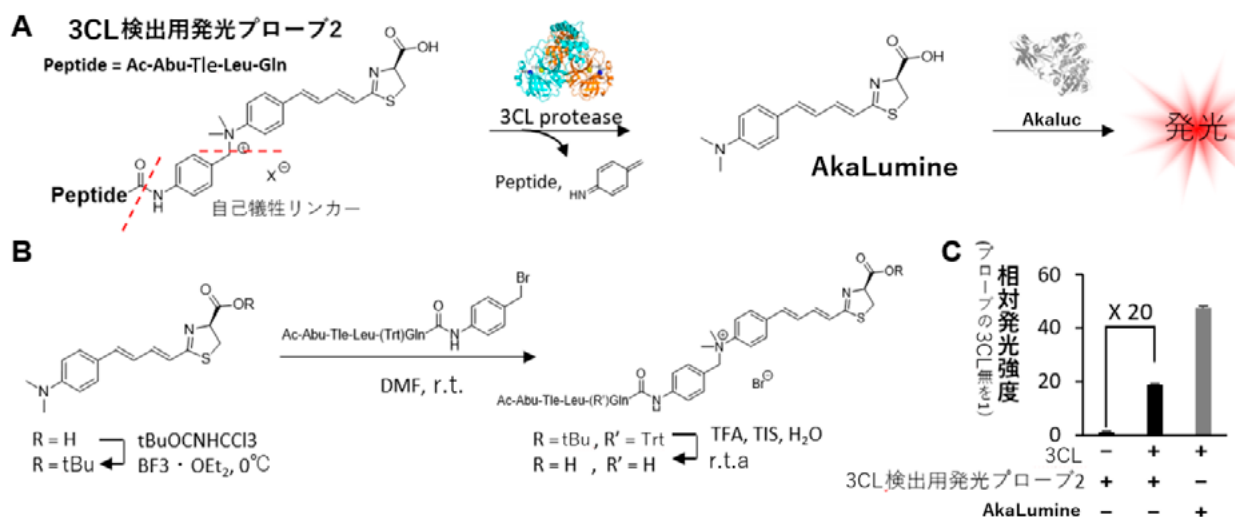


Fig. 3 3CL 検出用プローブ 2 の動作原理(A)と合成(B)、in vitro での機能評価

機能プローブが良好な機能を示すためには、Akaluc 存在下 AkaLumine モノメチル体が AkaLumine と同等の発光強度を示す必要がある。3CL により AkaLumine モノメチル体が遊離するプローブでは、プローブが極めて良好に動作しても、AkaBLI の 4%程度の性能しか出ないことが明らかとなった。このため、研究開始当初想定していた 3CL 検出用発光プローブ 1 の合成は、取りやめ、Fig. 3 に示す分子デザインでのプローブの開発、目的達成を目指し、研究を進めた。

2.2. 自己犠牲リンカーを利用した 3CL 検出用発光プローブ 2 の合成と評価

2.1 章の結果を受け、3CL による修飾ペプチドの切断により、AkaLumine そのものが遊離するプローブをデザインした(Fig.3A)。3CL 検出用発光プローブ 2 はペプチドが修飾された臭化ベンジルと AkaLumine エステルの縮合、続くメチルエステルの脱保護により合成した (Fig.3B)。得られた 3CL 検出用発光プローブ 2 を in vitro で機能の評価した。リコンビナント 3CL で処理 (1 時間、37 度) した後、リコンビナント Akaluc との発光活性により、3CL 非存在下に比べ 20 倍発光強度が向

上した (Fig. 3C)。in vitro では良好に機能することが明らかになった。

この結果を受け、個体レベルでのプローブの評価を行った。3CL 非発現の Akaluc 全身発現マウスで評価を行った。このマウスに 3CL 検出用発光プローブ 2 を投与したところ、AkaLumine を投与した場合と比較して 20%程度の発光強度を示した (Fig.4A)。in vitro の結果を踏まえ、3CL を発現しない当該マウスでは発光が確認されない（されても 1%程度の微弱である）と想定していた。

マウスに投与後、何かしらの分子によって修飾ペプチドが非特異的切断を受けていると考え、原因究明を進めた。まず血液中にある成分に注目した。野生型マウスから採血を行い、in vitro でマウスの血液存在下、3CL 検出用発光プローブ 2 の評価を行ったところ、血液非存在下と比較して 20 倍程度発光強度が増加した (Fig.4B)。血清を利用しても結果は再現した。血液成分中のプロテアーゼなどにより 3CL 検出用発光プローブ 2 の修飾ペプチドが加水分解され AkaLumine が遊離したと考えられる。非特異的切断のより精微な検討のため、合成の容易なクマリンにペプチドを修飾した

蛍光プローブを合成した(Fig.4C)。このプローブではペプチドの脱離により、蛍光波長が変化する。このプローブにマウス血液を作用させるとアミノクマリン由来の蛍光が確認されることから、当該ペプチド以外の構造によらず当該ペプチドを加水分解するプロテアーゼであることが示唆された (Fig. 4D)。また、いくつかのプロテアーゼ阻害剤を利用した検討を実施した。これにより、セリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF により非特異的切断が抑制されることから、セリンプロテアーゼがかかわっていることが示唆された。

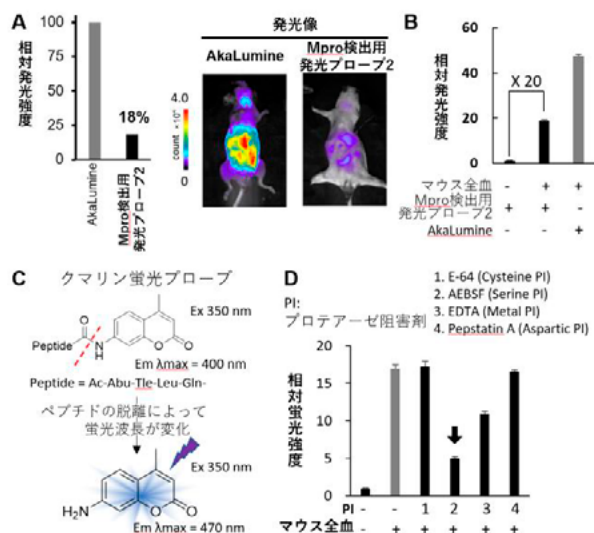


Fig. 4 3CL 検出用蛍光プローブ 2 の個体での評価 (A)、マウス血液を利用した非特異的切断の検討(B)、クマリン蛍光プローブ(C)、プロテアーゼ阻害剤による検討(D)

3. まとめ

発光基質の修飾による機能プローブ開発は、in vitro、または培養細胞レベルでは成功した。この技術は、3CL の阻害剤のハイスループットスクリーニングや、新型コロナウイルスの感染成立を培養細胞レベルで検出する有用な発光プローブとなりうる。しかし、当初の目的としていた個体レ

ベルで利用できるプローブ開発には、本研究期間中には至らなかった。しかしながら得られた知見から、酵素 Akaluc の改変によるプロテアーゼプローブの開発に着手しており、良好に機能する分子を見出している。またこの Akaluc 改変プローブを基に、異なるウイルスに由来するプロテアーゼに対応するプローブ技術を進めているところである。

4. 参考文献

- [1] Satoshi Iwano, et al; Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals, *Science*, **359**-6378, (2018), 935-939
- [2] Krishanu Saha, Erik J. Sontheimer, et al; The NIH Somatic Cell Genome Editing program, *Nature*, **592**, (2021), 195-204.

5. その他成果発表等

木山 正啓、岩野 智、特定のプロテアーゼで活性化される生物発光反応の開発は存外前途多難, P13, 第 55 回若手ペプチド夏の勉強会, 京都大学・宇治おうばくプラザ, 2023/8/8-10, ベストフェイルドアワード受賞.

6. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金を活用して実施しました。大変感謝申し上げます。本研究の実施に当たって、プローブの非特異的切断について相談させていただきました山本瑞樹博士、門之園哲也博士、高倉栄男博士、松本武久博士、築地真也博士に感謝申し上げます。また、非特異的切断の責任因子の同定の検討についてご助力いただきました小松徹博士に感謝申し上げます。