



## 薬学博士長野哲雄氏の「蛍光特性制御

### 原理の解明およびバイオイメージング

#### への応用に関する研究」に対する授賞

#### 審査要旨

現代の生命科学研究において、生細胞あるいは生体組織からそのままの状態で酵素や受容体等の生理活性分子を細胞内小器官などの場所を特定して時々刻々の活性変化を捉える事は生理活性分子の機能解析に不可欠な技術（バイオイメージング技術）になっている。長野哲雄氏の業績は、このバイオイメージング分野がまだ揺籃期にあった一五年前に非常に重要な発見を行い、この分野の発展に大きく寄与した事である。具体的には、蛍光の発光強度を制御できる新たな原理を発見し、その原理をバイオイメージングプローブに応用し、種々のプローブ開発に成功した。これらのイメージングプローブは世界中の研究者に利用され、蛍光タンパク質 GFP とともにバイオイメージング研究の隆盛につながっている。

#### 1. 蛍光発光強度を制御できる新原理：光誘起電子移動

##### (Photoinduced electron Transfer: PeT) 機構の発見

光誘起電子移動 (Photoinduced electron Transfer: PeT) 機構は代表的蛍光化合物であるフルオレセインのみならず、全ての蛍光化合物に適用できる原理で、これに基づいて多種類のイメージングプローブを開発した。

PeT 機構による蛍光強度の制御についてフルオレセインを用いて説明する。フルオレセインは高い蛍光量子収率（蛍光強度）、可視光励起、高い水溶性などの優れた特性を有している。長野氏はこのフルオレセインとその誘導体の間で蛍光強度に大きな違いがあり、これが PeT 機構に基づく事を明らかにした。フルオレセインは蛍光発光の観点から化学構造を「蛍光団部位」と「ベンゼン部位」に分けて考える事ができる。蛍光は照射により励起された「蛍光団部位」が基底状態に戻る時（緩和過程）に生じる発光である。しかし、フルオレセイン誘導体の中には励起状態の「蛍光団部位」に「ベンゼン部位」から一電子移動するものがある。その誘導体の場合、「蛍光団部位」は通常（フルオレセイン）とは異なる緩和過程を経て基底状態に戻り無蛍光となる。これが PeT 機構である (a-PeT と命名)。また、逆に「ベンゼン部位」に「蛍光団部位」から一電子移動する過程もある事を見出した (d-PeT と命名)。

長野氏はこのPet機構を分子軌道計算、電気化学、分光学等から詳細に解析し、蛍光化合物をどのように化学修飾すれば、蛍光の有／無を起す事ができるかについて検討し、その結果論理的に蛍光強度を制御できる道を切り開き、これにより蛍光プローブの分子設計ができるようになった。

## 2. 蛍光特性制御原理の生命科学への応用

二〇年以上前に、血管内皮血管弛緩因子 (EDRF) の本体がNOあるいは窒素酸化種かで議論があった。このEDRFの本体を見極める事と同時にその不安定ラジカル種NOを生体からイメージングとして捉える事を目的にプローブの開発研究を開始した。その研究途上で前述のPet機構が発見されたものである。

長野氏は緻密な研究を展開した結果、世界で初めて高感度・特異的NOバイオイメージングプローブ (DAF-2<sup>+</sup> DCl-DA Cal) の開発に成功した。同時にEDRFの本体がNOである事を化学的に実証した。このNOプローブ (DAF-2) はほぼ無蛍光で、NOと反応することです約二二三〇倍の大きな蛍光強度の増大を引き起こす (この蛍光強度変化はPet機構に基づく)。血管内皮細胞などの生細胞中でブラジニンなどの刺激に対応して生成するNOを捉える事ができる。世界中でこのNOプローブは汎用され、ウニ受精時のNOのイ

メージング、NOとCa<sup>2+</sup>との関連、神経系でのNOの作用解析などで興味ある報告を可能にし、Nature Methods (二〇〇九年) で Research Highlights として取り上げられた。

その後、長野氏は、現在までにNOだけではなく、各種活性酸素、虚血による低酸素状態、ガラクトシダーゼ・グルコシダーゼ・キナーゼなどの各種酵素活性等を捉える四〇種以上のプローブの開発に成功し、一四種類のプローブについては市販している。

## 3. 蛍光プローブの創薬研究への応用

蛍光の有／無の変換を原理とした蛍光プローブは創薬研究にも有用で、標的分子を制御する化合物探索において一次スクリーニングの段階から特異的化合物を取得できる優位性を持つ。血管新生、がんの転移／浸潤などの疾患と関係するオートタキシンの阻害剤の探索を目的とした大規模スクリーニング (HTS) に利用し、高選択性のヒット化合物の獲得に成功し、大手製薬企業へ腎臓病治療候補薬として導出に成功している。独自に分子設計した蛍光プローブは現在までに二〇を超える創薬研究テーマのHTSに用いられ、複数の医薬品候補化合物を取得している。

長野氏は現在までに四五〇報を超える学術論文を発表している。

高被引用論文も多く、論文の総被引用回数は二〇、〇〇〇回を超え、開発したプローブが生命科学分野で重要な役割を果たしていることを示している。

長野氏はバイオイメージング研究を通じて新研究領域である「ケミカルバイオロジー」の発展にも貢献し、その業績は高く評価されており、紫綬褒章、上原賞、島津賞など数多くの賞を受賞している。

### 主要な著書・論文の目録

#### 総説：

1. **Nagano, T** and Yoshimura, T. Bioimaging of nitric oxide. *Chem. Rev.*, 102; 1235–1269, 2002.
2. Ueno, T and **Nagano, T**: Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nat. Methods*, 8; 642–645, 2011.

#### 原著論文：

1. Kojima, H, Nakatsubo, N, Kikuchi, K, Kawahara, S, Kirino, Y, Nagoshi, H, Hirata, Y, and **Nagano, T**: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.*, 70; 2446–2453, 1998.
2. Kojima, H, Urano, Y, Kikuchi, K, Higuchi, T, Hirata, Y, and **Nagano, T**: Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38; 3209–3212, 1999.
3. Setsukinai, K, Urano, Y, Kakinuma, K, Majima, H, and **Nagano, T**: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.*, 278; 3170–3175, 2003.

4. Miura, T, Urano, Y, Tamaka, K, **Nagano, T**, Ohkubo, K, and Fukuzumi, S: Rational design principle for modulating fluorescence properties of fluoroscein-based probes by photoinduced electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 125; 8666–8671, 2003.
5. Gabe, Y, Urano, Y, Kikuchi, K, Kojima, H, and **Nagano, T**: Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore—Rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.*, 126; 3357–3367, 2004.
6. Ueno, T, Urano, Y, Setsukinai, K, Takakusa, H, Kojima, H, Kikuchi, K, Ohkubo, K, Fukuzumi, S, and **Nagano, T**: Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.*, 126; 14079–14085, 2004.
7. Sasaki, E, Kojima, H, Nishimatsu, H, Urano, Y, Kikuchi, K, Hirata, Y, and **Nagano, T**: Highly sensitive near-infrared fluorescent probes for nitric oxide and their application to isolated organs. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 3684–3685, 2005.
8. Urano, Y, Kamiya, M, Kanda, K, Ueno, T, Hirose, K, and **Nagano, T**: Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 4888–4894, 2005.
9. Komatsu, K, Kikuchi, K, Kojima, H, Urano, Y, and **Nagano, T**: Selective Zinc sensor molecules with various affinities for Zn<sup>2+</sup>, revealing dynamics and regional distribution of synaptically released Zn<sup>2+</sup> in hippocampal slices. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 10197–10204, 2005.
10. Yogo, T, Urano, Y, Ishitsuka, Y, Maniwa, F, and **Nagano, T**: Highly efficient and photoswitchable photosensitizer based on BODIPY chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 127; 12162–12163, 2005.
11. Kiyose, K, Kojima, H, Urano, Y, and **Nagano, T**: Development of a ratiometric fluorescent Zinc ion probe in near-infrared region, based on tricarboyanine chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 128; 6548–6549, 2006.

12. Kenmoku, S, Urano, Y, Kojima, H, and Nagano, T: Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 7313–7318, 2007.
13. Sunahara, H, Urano, Y, Kojima, H, and Nagano, T: Design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron-transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 5597–5604, 2007.
14. Komatsu, K, Urano, Y, Kojima, H, and Nagano, T: Development of an imino-coumarin-based Zinc sensor suitable for ratiometric fluorescence imaging of neuronal Zinc. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13447–13454, 2007.
15. Urano, Y, Asamura, D, Hama, Y, Koyama, Y, Barrett, T, Kamiya, M, Nagano, T, Watanabe, T, Hasegawa, A, Choyke, PL, and Kobayashi, H: Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.*, 15, 104–109, 2009.
16. Izumi, S, Urano, Y, Hanaoka, K, Terai, T, and Nagano, T: A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 10189–10200, 2009.
17. Koide, Y, Urano, Y, Hanaoka, K, Terai, T, and Nagano, T: Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and its applications for biological imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 5680–5682, 2011.
18. Kawaguchi, M, Okabe, T, Okudaira, S, Nishimasu, H, Ishitani, R, Kojima, H, Nureki, O, Aoki, J, and Nagano, T: Screening and X-ray crystal structure-based optimization of autotaxin (ENPP2) inhibitors, using a newly developed fluorescence probe. *ACS Chem. Biol.*, 8, 1713–1721, 2013.