

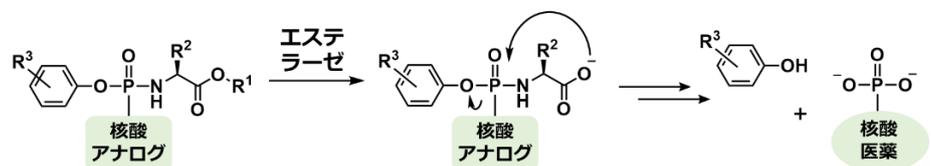
# 酵素活性の多重検出に基づくがん診断・解析技術の開発

東京科学大学 生命理工学院  
神谷 真子

カルボキシペプチダーゼ (Carboxypeptidase: CP) は、ペプチド鎖 C 末端のアミノ酸を加水分解する酵素の総称であり、様々な生理機能、がんや神経性疾患をはじめとした疾患との関連性が報告されている。従って、これらの CP の活性を迅速かつ高感度に検出可能な蛍光プローブを開発することができれば、強力な病態解析ツール、臨床現場における診断ツールとなりうる。しかしながら、CP が触媒する加水分解反応は、アミドからカルボキシレートへの変換という比較的小さな電子密度の変化しか伴わない反応であるため、その変化を十分な蛍光強度変化に繋げることが難しく、それ故に、生きた細胞における CP 活性を検出する **Activatable** 型蛍光プローブの報告例は限定的であった。このような背景の中、我々は、1) ヒプリルアミノ酸構造を蛍光団近傍に組み込むことで、分子内スピロ環化平衡を蛍光制御原理とした CP 活性検出蛍光プローブ (J. Am. Chem. Soc. 140, 1767-1773 (2018))、2) 自己分解性のアゾホルミルリンカーを用いることで、光誘起電子移動を原理とする CP 活性検出蛍光プローブ (J. Am. Chem. Soc. 141, 10409- 10416 (2019)) の開発に成功してきた。特に、後者の分子設計を用いて、臨床的に重要な前立腺がんバイオマーカーである前立腺特異的膜抗原 (Prostate Specific Membrane Antigen : PSMA) に対する **Activatable** 型蛍光プローブを開発し、培養がん細胞における PSMA 活性のライブ検出、前立腺がん患者から摘出した新鮮臨床検体における前立腺がんの蛍光検出を達成した。しかしながら、これらの分子設計では、酵素との反応性・検出波長に制限があり、また、1 種類の CP 酵素活性の検出のみでは検出できるがん種が限定され、得られる感度・特異度も限界があった。複数の CP 酵素活性を同時検出することができれば、検出できるがん種を拡張できるとともに、がんのヘテロ性を克服したがん検出、さらには、疾患との関連が報告されている複数の CP 酵素活性の相関を解析することで病態の包括的理解にもつながると考えられる。

そこで本研究では、プロドドラッグ技術として知られる ProTide の特徴的な活性化機構を取り入れることで、特性を柔軟に調節可能な汎用性の高い CP 活性検出蛍光プローブの分子設計法を考案した。ProTide 化学とは、核酸モノリン酸化体を細胞内に導入するためのプロドドラッグ技術であり、その活性化の過程において細胞

## A) ProTide化学に基づく核酸医薬プロドラッグ



## B) ProTide化学を応用した新規CP活性検出蛍光プローブ

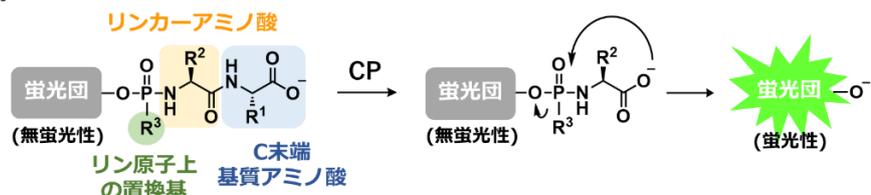


図 1. ProTide 化学を活用した新規 CP 活性検出蛍光プローブの設計

内のエステラーゼによりカルボン酸が生成し、それがリン原子に分子内求核攻撃をすることで、フェノールが脱離し核酸モノリン酸化体が放出される (図 1A)。ここで我々は、この反応におけるカルボン酸生成のトリガーとして CP を用い、脱離するフェノールを蛍光団とすることで、CP 活性を検出可能な新たな **Activatable** 型蛍光プローブを開発できると考えた (図 1B)。本分子設計は、プローブ分子を 4 つのモジュールに分割して考えることが可能なデザインであり、① 蛍光波長、② 酵素に対する反応性、③ 標的酵素といったパラメータを自在に調整することができ、所望の特性を有するプローブを効率的に開発できる点が特長である。本研究においては、このモジュール性を生かし、部分構造の置換・最適化により、標的酵素の拡充と多重検出に資する CP 活性検出蛍光プローブの開発に取り組んだ。

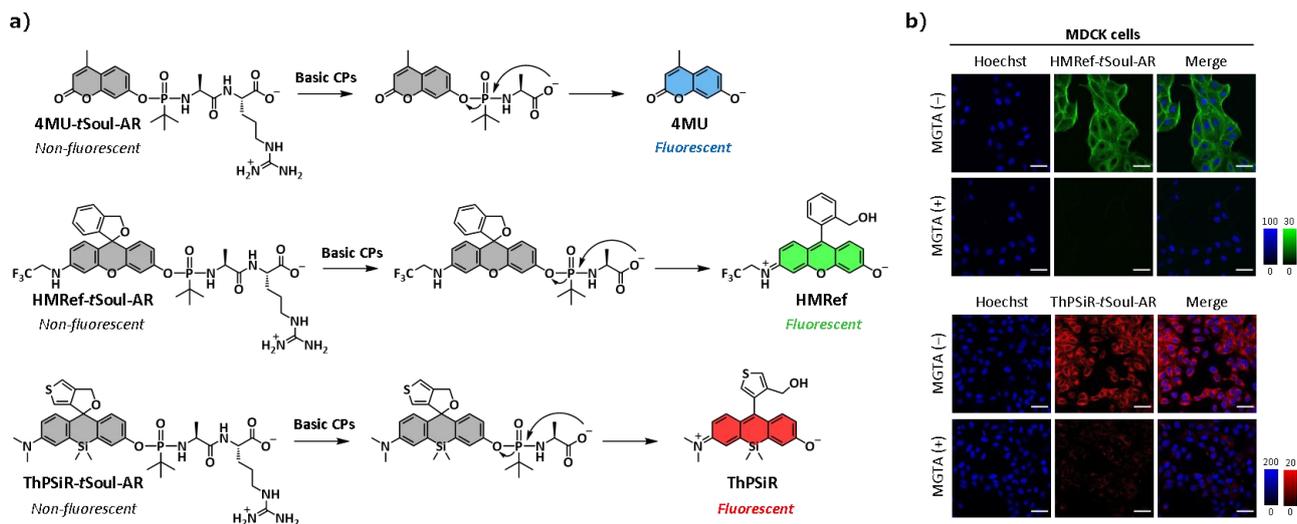


図 2. ProTide 化学に基づく、塩基性 CP 活性検出蛍光プローブの開発

まず初めに、蛍光団として様々な波長の蛍光団 (4-MU/青色蛍光団, HMRef/緑色蛍光団, ThPSiR/赤色蛍光団など)、P1 位の基質アミノ酸として、塩基性カルボキシペプチダーゼ (CPB, CPM) の基質となる塩基性アミノ酸 (アルギニン)、リンカーアミノ酸としてアラニン、リン原子上の置換基として嵩高い *tert*-butyl 基を導入したパイロットプローブを開発した (図 2)。これらのプローブの安定性と酵素との反応性を評価したところ、いずれのプローブも生理的 pH で安定で、標的 CP との反応によって蛍光上昇を示すこと、CPM を高発現する培養細胞

(MDCK 細胞) における CPM 活性を検出できることが明らかになった。一方で、酵素との反応速度が遅く、CPM を中程度に発現量するがん培養細胞における CPM 活性の検出が難しいことが明らかになった。この原因と

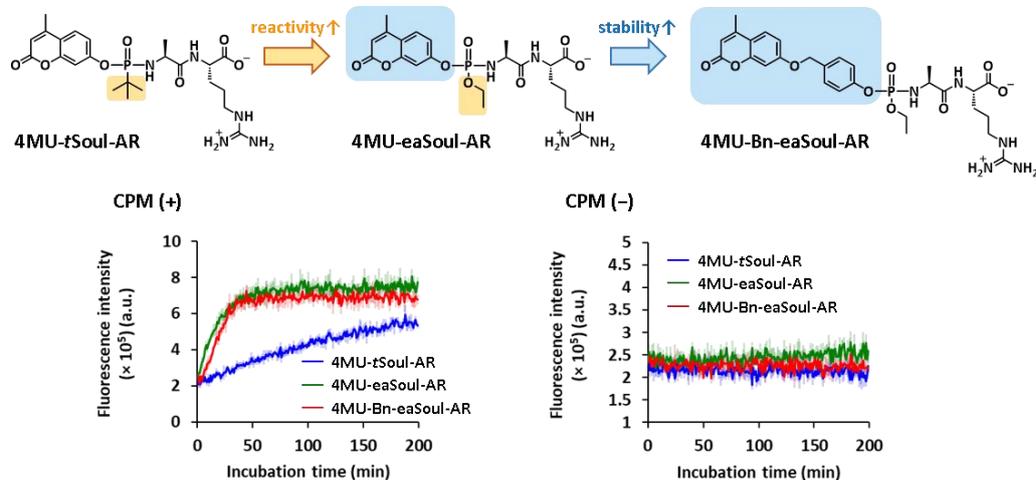


図 3. 高い酵素反応性と安定性を示すプローブへの構造展開

して、*tert*-butyl 基の嵩高さが原因ではないかと考え、プロドラッグでも採用されているエトキシ基を導入した誘導体を開発・評価した (図 3)。その結果、酵素との反応速度が改善した一方で、生理的 pH において非特異的な加水分解が起こり安定性に課題があることが明らかとなった。そこで、脱離基の  $pK_a$  を上昇させることで分子の安定性が向上する知見に基づき、リン原子上の置換基をエトキシ基とし、蛍光団との間に自己分解性ベンジルリンカーを挿入した結果、酵素との反応速度は維持したまま、安定性を向上できることが明らかとなった (図 3)。さらに、蛍光団を赤色の ThPSiR に置換した誘導体を開発したところ、培養がん細胞における CPM 活性をライブかつ高感度に検出できることを示した。また、P1 位の基質アミノ酸として、PSMA の基質アミノ酸 (グルタミン酸) を導入したプローブを開発し評価したところ、本プローブは PSMA と反応しないことが明らかとなった。PSMA は酵素認識が厳しいことから、リンカーアミノ酸をさらにコンパクトなグリシンに変更したプローブを開発したところ、PSMA と反応して顕著な蛍光増大を示し、さらに、PSMA 高発現細胞・低発現細胞に適用した結果、PSMA 活性をライブ検出できるプローブであることが示された。これらの結果は本分子設計の柔軟性を端的に示すものである。また、開発したプローブの組織適用性を検討するべく、塩基性 CP 活性を検出可能な赤色蛍光プローブを乳がん患者の外科的切除検体に添加したところ、がん組織における塩基性 CP の活性を蛍光検出できることも明らかとなった (図 4)。今後は、本研究で確立したモジュール型の分子設計法に則り更なるプローブ開発を進め、複数の CP 活性を同時に検出することができるようになれば、高い感度/特異度でのがん検出や病態の包括的理解が可能となり、新たな診断技術、病態解析技術の開発につながると期待している。

本成果は、東京大学大学院薬学系研究科・医学系研究科の浦野泰照教授との共同研究成果であり、*J. Am. Chem. Soc.* 誌に掲載された (Kuriki Y. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 146, 521–531 (2024))。

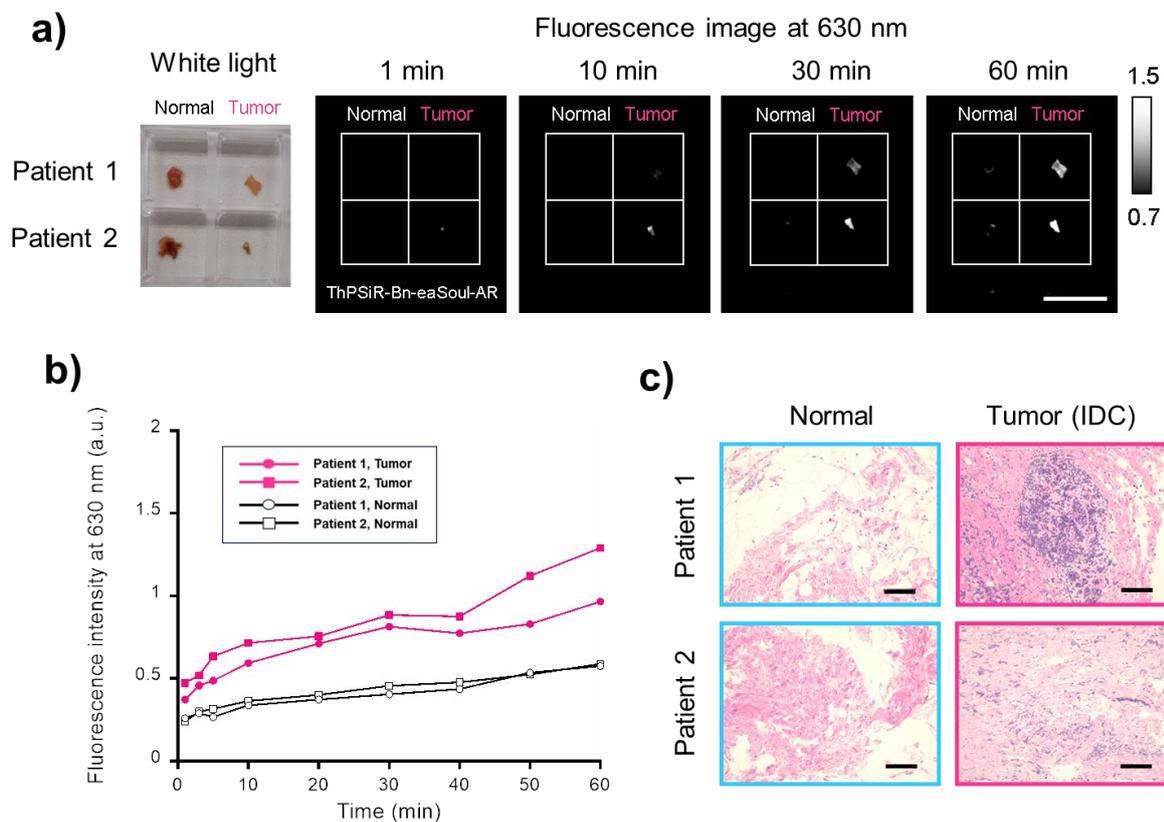


図 4. 塩基性 CP 活性検出蛍光プローブの臨床検体への応用