

博士論文

**Development of peptide-type hyperpolarized molecular probes
based on the understanding of spin-lattice relaxation mechanism**

(縦緩和機構の理解に基づくペプチド型超偏極分子プローブの開発)

近藤 洋平

第1章. 緒言

生体内を非侵襲的に観測し、対象標的分子の構造や周辺環境情報を取得できる核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance/Imaging: NMR/MRI) の検出感度を劇的に向上させる超偏極技術を用いた生体分子イメージングが近年注目されている¹。特に、最も確立された超偏極技術の一つである dissolution-Dynamic Nuclear Polarization (d-DNP)² を用いて、これまで取得が難しかった水以外の生体分子情報が生物個体レベルで得られている。そのなかでも、解糖系最終産生物であるピルビン酸を用いた DNP MRI が最も成功している例の一つである。¹³C 同位体標識されたピルビン酸を用いることで、その代謝情報が取得され、がん診断等の臨床研究が実施されている³。このように生物学・医学的観点から DNP MRI は有用である。しかしながら、生体応用研究に用いられる分子は多くの場合ピルビン酸に限られているのが現状であり、DNP MRI で取得できる生体情報の拡充、すなわち、生体内で機能する DNP 分子プローブの幅を広げることが望まれている。

このような背景から天然生体分子の安定同位体標識や *de novo* 設計による分子プローブ開発が進められているが、*in vivo* で機能する DNP NMR 分子プローブを創出することは容易ではない⁴。それは、DNP 分子プローブが *in vivo* で機能するためには、毒性や水溶性をはじめとする複数の分子物性が一定以上の基準を満たす必要があるからである。そのなかでも、超偏極技術特有かつ最も重大な制約は、人工的に作り出された高感度化シグナルが縦緩和時間 (T_1) を時定数として、指数関数的に減衰し、熱平衡状態へと戻ってしまうことである (Figure 1A)。したがって、生体応用を実現する DNP 分子プローブは、生体投与後に観測可能な生成物を与えるまで、高感度化シグナルを維持できる T_1 を示す必要がある。一般に、分子サイズが大きい分子は緩和源となる ¹H 核を分子内に多く有する傾向がある。また、分子サイズが大きい分子は分子運動が遅いため大きな回転相関時間 τ_2 を示す傾向がある。さらに、大きな回転相関時間 τ_2 は短い T_1 につながる。これらの理由から、分子量が大きい分子は短い T_1 を示し、生体応用に向かないと考えられてきた (Figure 1B)⁵。特に ¹³C 同位体標識分子に関していえば、調査の限り、これまでに生体応用を実現した最大の有機低分子は γ -Glu-[1-¹³C]Gly (分子量 205) であった⁶。

ペプチドは配列特異的な代謝を受け、タンパク質との相互作用を通じて生命現象に関与する重要な生体分子である⁷。したがって DNP MRI の有望なターゲット分子である。しかしながら、アミノ酸モノマーの平均分子量は 110 であり、ジペプチドでさえもその分子量は 200 を超えてしまう。上述の分子サイズと T_1 の負の関係によって、ペプチドは一般に短い T_1 を示すと考えられ、DNP MRI による *in vivo* 代謝解析には不向きとされてきた。実際に、*in vivo* 代謝解析を達成したペプチド型 DNP 分子プローブはアミノ酸モノマーもしくはごく少数のジペプチドに限られていた^{6,8-10}。

本研究では、分子構造に着目した縦緩和機構解析を実施することで、一般的に考えられている分子量の制約を超えたペプチド型 DNP NMR 分子プローブを創出することを目指した。第2章では、調査の限り、これまでに生体応用を実現した最大の ¹³C 標識有機低分子である γ -Glu-[1-¹³C]Gly の酵素反応・磁気特性を調べ、 γ -Glu-[1-¹³C]Gly-*d*₂ を長寿命型分子プローブとして提案した。第3章では、ペプチド主鎖長・¹³C 標識位置の T_1 への影響ならびに、ペプチド側鎖の大きさとその位置が T_1 に与える影響を調べた。縦緩和機構に基づいて、

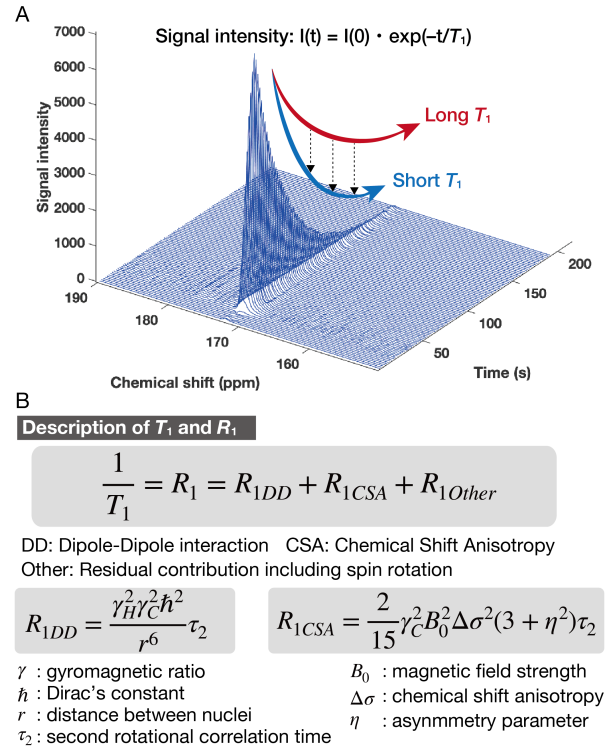


Figure 1. Spin-lattice relaxation mechanism. (A) Schematic illustration of hyperpolarized signal decay. (B) Equations describing T_1 and R_1 .

C 末端[1-¹³C]Gly-*d*₂が大きなペプチド中でも長い *T*₁を実現する可能性を見出した。第4章では、第3章で得られた ¹³C 標識指針に基づいて、ペントペプチド型分子プローブ ¹³C-β-casomorphin-5 (¹³C-BCM-5, Tyr-Pro-Phe-Pro-[1-¹³C]Gly-*d*₂, 分子量 583) ならびにトリペプチド型分子プローブ ¹³C-glutathione (¹³C-GSH, γ-Glu-Cys*-[1-¹³C]Gly-*d*₂, 分子量 310, *はラセミ体残基を表す) を開発した。それら分子プローブを用いた超偏極実験を実施し、本研究で得られた ¹³C 標識指針の有用性を実証した。

第2章. GGT 検出 DNP NMR 分子プローブγ-Glu-[1-¹³C]Gly の分子特性の評価

これまでに生体内で DNP NMR による代謝検出に成功した ¹³C 標識有機低分子のなかで、最大分子量を持つ分子はγ-Glutamyl Transpeptidase (GGT) 検出 DNP NMR 分子プローブγ-Glu-[1-¹³C]Gly (分子量 205) である。本章では、γ-Glu-[1-¹³C]Gly の *T*₁・ケミカルシフトなどの磁気パラメータを精査した。γ-Glu-[1-¹³C]Gly の縦緩和機構を解析し、γ-Glu-[1-¹³C]Gly-*d*₂ を長寿命型分子プローブとして提案した。

【γ-Glu-[1-¹³C]Gly の磁気特性の評価】 まずγ-Glu-[1-¹³C]Gly の ¹³C 標識位置の妥当性を評価した。γ-Glu-Gly には直接 ¹H 核が結合しないために長い *T*₁ が期待されるカルボニル炭素が3箇所あるが、GGT との酵素反応前後でケミカルシフト変化が期待されるのは Glu 残基5位と Gly 残基1位の二つである (Figure 2A)。そこで、γ-[5-¹³C]Glu-Gly と γ-Glu-[1-¹³C]Gly を合成し、各 probe/product の *T*₁ ならびにケミカルシフトを重水中において測定した (Figure 2B)。γ-Glu-[1-¹³C]Gly とその生成物である[1-¹³C]Gly のケミカルシフト変化は 4.4 ppm、γ-[5-¹³C]Glu-Gly とその生成物である[5-¹³C]Glu は 6.8 ppm であった。γ-Glu-[1-¹³C]Gly/[1-¹³C]Gly のペアが示す 4.4 ppm のケミカルシフト変化は *in vivo* で probe/product を分離できたため、γ-[5-¹³C]Glu-Gly/[5-¹³C]Glu も *in vivo* で分離できると考えられる。γ-[5-¹³C]Glu-Gly の *T*₁ は 13 ± 1 s であり、[5-¹³C]Glu の *T*₁ は 35 ± 1 s であった。

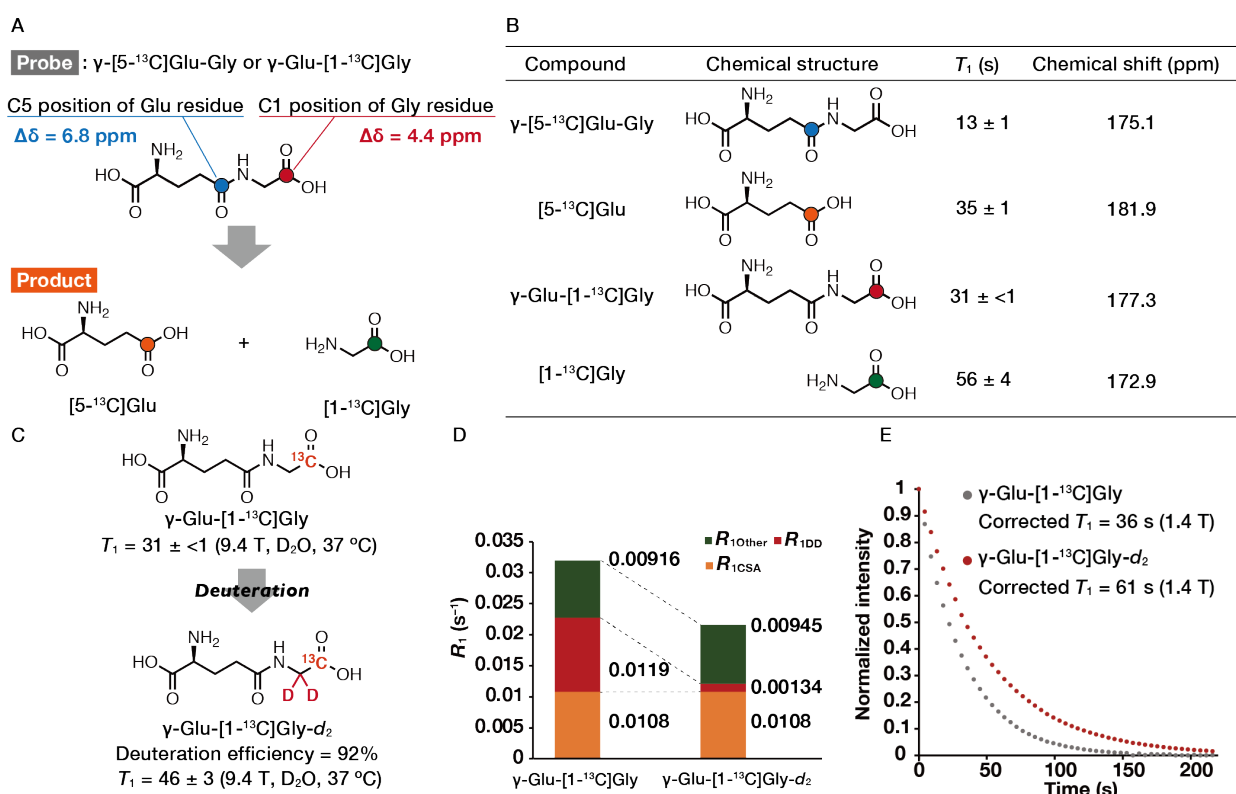


Figure 2. Evaluation of magnetic parameters of γ-Glu-[1-¹³C]Gly and γ-[5-¹³C]Glu-Gly, and deuteration for further elongation of *T*₁. (A) Potential ¹³C-enriched positions of γ-Glu-Gly and its hydrolytic products, [5-¹³C]Glu and [1-¹³C]Gly. Colored atoms indicate isotope-enriched ¹³C. $\Delta\delta$ is ¹³C chemical shift difference between the probe and the product. (B) Chemical structures, *T*₁ values, and ¹³C chemical shifts of probes and products. *T*₁ values were measured by inversion recovery (9.4 T, 10 mM, D₂O, 37 °C, pD = 7.4 ± 0.1). Error bars represent standard deviation (n = 3). ¹³C chemical shift was determined using 1,4-dioxane (67.19 ppm) as an internal standard (9.4 T, 5 mM, D₂O, 37 °C, pD = 7.4 ± 0.1). (C) Chemical structures of γ-Glu-[1-¹³C]Gly and γ-Glu-[1-¹³C]Gly-*d*₂ at 9.4 T. (E) Hyperpolarized signal decay and corrected *T*₁ values of γ-Glu-[1-¹³C]Gly and γ-Glu-[1-¹³C]Gly-*d*₂ at 1.4 T. Reproduced with permission from the Royal Society of Chemistry.

また γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の T_1 は $31 \pm <1$ s であり、[1- ^{13}C]Gly の T_1 は 56 ± 4 s であった。同一分子のカルボニル炭素であっても周辺分子構造によってその T_1 が 2 倍以上異なることが確認された (13 ± 1 s vs. $31 \pm <1$ s)。以上の結果より、 γ -[5- ^{13}C]Glu-Gly、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly どちらの probe/product も GGT との酵素反応に伴うケミカルシフト変化は十分だが、プローブがより長い T_1 を示すという観点で、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly のほうが *in vivo* 応用に適していることが確認された。

【 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の縦緩和機構解析と γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 の提案】 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の T_1 を支配する縦緩和機構を理解し、さらに T_1 を延長するために、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly ならびに γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 の縦緩和全体の大きさ (R_1) に占める Dipole-Dipole (DD) 相互作用に起因する緩和の大きさ (R_{1DD}) と Chemical Shift Anisotropy (CSA) に起因する緩和の大きさ (R_{1CSA}) を算出した。重水素化により DD 緩和の寄与を減少させた γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 の T_1 を 9.4 T において測定すると 46 ± 3 s であった (Figure 2C)。Gly 残基の α 位重水素化が γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の T_1 を約 1.5 倍長くできることが確かめられた ($31 \pm <1$ s vs. 46 ± 3 s)。高磁場において有機小分子の ^{13}C 核の縦緩和機構は、主に近傍 ^1H 核に起因する DD 相互作用と CSA に由来する緩和がその大部分を占めると考えられている。そこで、核オーバーハウザー効果を利用した手法によって R_{1DD} を、外部磁場強度を変化させ T_1 を測定することによって R_{1CSA} を、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 のそれぞれに関して算出した (Figure 2D)。 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly においては R_{1DD} が全体の R_1 の 37% を占めているのに対して、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 では 6% にまで減少していることから、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の ^1H - ^{13}C DD 緩和の大部分が Gly 残基 α - ^1H 由来であることが示唆された。また、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の R_{1CSA} は全体の約 33% を占めており、 R_{1DD} と R_{1CSA} の二つ縦緩和機構が全体の約 71% を占めることが確認された。最後に、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 を超偏極状態にし、その高感度化シグナルを 1.4 T において計測した。高感度化シグナル減衰から算出した γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly- d_2 の T_1 は 61 s (1.4 T) であり、 γ -Glu-[1- ^{13}C]Gly の T_1 (36 s [1.4 T]) より長く、長寿命型 DNP プローブとして有用性が実証された (Figure 2E)。

第 3 章. 縦緩和機構解析によるペプチド主鎖・側鎖の T_1 への影響の解明

本章では、ペプチドにおいて *in vivo* 応用可能な長い T_1 を実現する指針を得るために、ペプチド主鎖と側鎖のそれぞれに着目した縦緩和機構解析を実施した。その結果、ペプチドの C 末端[1- ^{13}C]Gly- d_2 が *in vivo* 応用可能な T_1 を実現できる可能性を見出した。

【ペプチド主鎖長・ ^{13}C 標識位置の T_1 への影響の解明】 まず、ペプチド主鎖長・ ^{13}C 標識位置と T_1 との関係

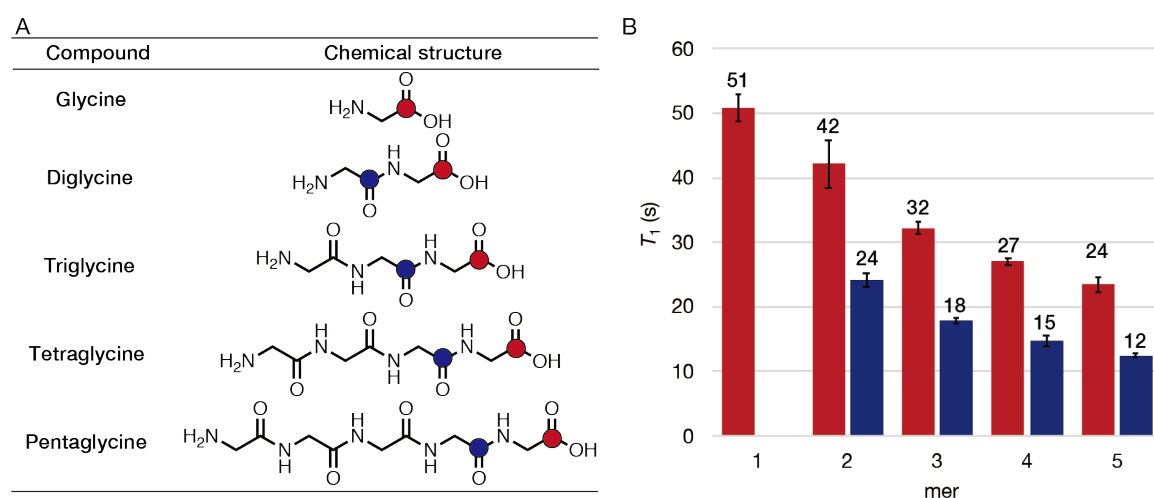


Figure 3. T_1 values of Gly oligomers. (A) Chemical structures of Gly oligomers. Red or blue-colored atoms are ^{13}C (B) T_1 values of Gly oligomers. T_1 values were measured using saturation recovery (9.4 T, 5 mM, D_2O , 37°C , $\text{pD} = 7.4 \pm 0.1$). The color of bars corresponds to the color of ^{13}C nuclei in the chemical structures shown in (A). Error bars represent standard deviation ($n = 3$).

を調べた。C 末端カルボン酸を ^{13}C 標識した Gly oligomer ($n = 1-5$) と C 末端から 2 残基目のアミドカルボニルを ^{13}C 標識した Gly oligomer ($n = 2-5$) を固相合成法によって合成した (Figure 3A)。9.4 T、重水中において各 Gly oligomer の T_1 を測定した (Figure 3B)。結果として、主鎖長が長くなり分子量が大きくなるにつれて、 T_1 が短くなるという通説通りの傾向がみられた。C 末端から 2 残基目のアミドカルボニル ^{13}C 核の T_1 の推移をみると、5 mer に至っては 12 s と $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ の約 4 分の 1 の値にまで減少してしまう。一方で、C 末端カルボン酸 ^{13}C 核の T_1 も主鎖長が長くなるにつれて減少するが、その減少は徐々に緩やかになり、5 mer においても 24 s の長さを示した。この理由を考察するために分子動力学計算と量子化学計算を用いて T_1 を予測し、実験値と比較し考察した。分子動力学計算から算出される C 末端カルボン酸 ^{13}C 標識 Gly oligomer 3-5 mer (Figure 3A) の回転相関時間 τ_2 は 13.2-15.7 ps と主鎖長によらずほぼ同じ値であった。主鎖が伸びても回転相関時間 τ_2 が維持されることが、 T_1 減少が抑えられた原因だと考えられた。また、Gly 5 mer の C 末端カルボン酸 ^{13}C 核と 2 残基目アミドカルボニル ^{13}C 核の τ_2 はそれぞれ 15.7 ps と 27.8 ps と算出され、この τ_2 の差が各 ^{13}C 標識 Gly 5 mer の T_1 の差を引き起こす一因だと考えられた (24 s vs. 12 s)。この τ_2 の差は分子内アミドよりも末端カルボン酸のほうが分子回転が速いことに起因していると示唆される。以上の結果から、C 末端カルボン酸を ^{13}C 標識することで主鎖の長いペプチドにおいても、長い T_1 が実現できる可能性が示された。

【ペプチド側鎖の大きさ・位置の T_1 への影響の解明】 ペプチド側鎖の T_1 への影響を調べるために、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Xaa}$ (Xaa = Gly, Ala, and Leu) の T_1 を測定した (Figure 4A)。結果として、側鎖が大きくなるにつれて T_1 が短くなる傾向がみられた (31 s, 24 s, and 16 s)。次に、ペプチド側鎖の大きさとその位置が C 末端カルボン酸 ^{13}C 核の T_1 に与える影響を調べた。側鎖位置の縦緩和への影響を調べるために、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ と Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ の T_1 測定ならびに縦緩和機構解析を実施した。9.4 T における Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ と Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ の重水中における T_1 はそれぞれ 31 s と 21 s であり、側鎖位置を変えるだけで、同一分子量を持つ分子でも約 1.5 倍異なる T_1 を示すことが分かった。この理由を縦緩和機構に基づいて考察するために、 R_{IDD} と R_{ICSA} の実測ならびに分子動力学・量子化学計算を用いて予測した。 R_{IDD} ならびに R_{ICSA} の実測の結果、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ は R_{IDD} と R_{ICSA} 、どちらの緩和機構も Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ より小さい値を示した (R_{IDD} : 0.0150 s^{-1} vs. 0.0171 s^{-1} , R_{ICSA} : 0.00975 s^{-1} vs. 0.0145 s^{-1})。この結果を分子構造に基づいて解釈するために、まず R_{IDD} 予測結果から各 ^1H の DD 緩和の寄与の大きさを推定した。Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ の R_{IDD} のうち 76% が Leu 残基 α - ^1H 由来であり、残りの 24% が Leu 側鎖由来であった。一方で、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ は R_{IDD} の 99% 以上が Gly 残基 α - ^1H 由来であり、隣接残基側鎖の寄与はほぼないことが示唆された。これは R_{IDD} は ^1H と ^{13}C 核間距離の 6 乗に反比例するという事実 (Figure 1B) を反映しており、隣接残基側鎖の ^1H は DD 緩和への寄与が小さいことが確認された。

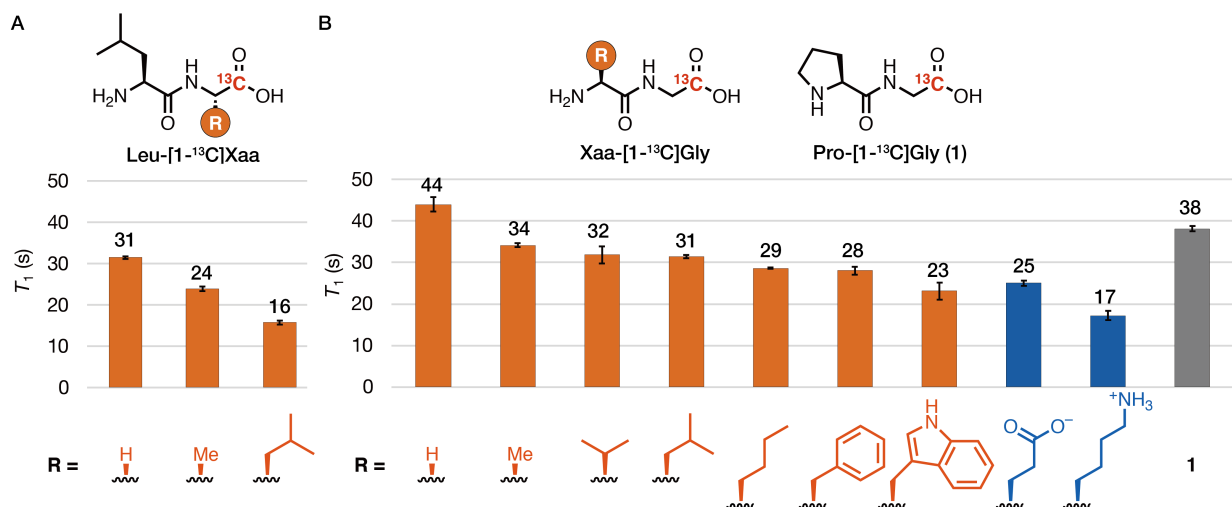


Figure 4. T_1 analysis of dipeptides. (A) T_1 values of Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Xaa}$. Xaa = Gly, Ala, Leu. (B) T_1 values of Xaa- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$. Xaa = Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Glu, Lys, Pro. All T_1 values were measured using saturation recovery method (9.4 T, 10 mM, D_2O , 37 °C, $\text{pD} = 7.4 \pm 0.1$). Error bars represent standard deviation ($n = 3$).

次に、Leu-[1-¹³C]Gly と Gly-[1-¹³C]Leu の R_{1CSA} の差を生む分子構造的な要因を調べた。Leu-[1-¹³C]Gly と Gly-[1-¹³C]Leu の τ_2 の差が R_{1CSA} の差を引き起こしていると考えられた (Figure 1B)。そこで、分子動力学計算を用いて C 末端アミノ酸残基の二面角 ϕ , ψ を算出し、Leu-[1-¹³C]Gly と Gly-[1-¹³C]Leu の C 末端カルボン酸周辺の分子運動に関して検討を行った。その結果、Leu-[1-¹³C]Gly よりも Gly-[1-¹³C]Leu のほうがより多い安定配座を与えること、そして時間依存的にみても Gly-[1-¹³C]Leu の ψ が Leu-[1-¹³C]Gly よりも制限されていることから、Gly-[1-¹³C]Leu の C 末端カルボン酸 ¹³C 周辺の運動は Leu-[1-¹³C]Gly より制限されていることが示唆された。すなわち、¹³C 核近傍に側鎖を持たない Leu-[1-¹³C]Gly は Gly-[1-¹³C]Leu より ¹³C 核周辺の運動が制限されていないために小さい回転相関時間 τ_2 を与え、小さい R_{1CSA} を実現していると考えられる。ここまでの検討で C 末端 Gly 残基カルボン酸は隣接残基側鎖の DD 緩和の影響を受けにくいだけでなく、CSA 緩和を減らす面でも有用であることが示された。

上記の知見を実証するために Xaa-[1-¹³C]Gly (Xaa = Gly, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Trp, Glu, Lys, Pro) の T_1 を 9.4 T、重水中で測定した (Figure 4B)。その結果、その多くは側鎖の大きさによらず 30 s 程度の T_1 を示すことが確かめられた。本章の縦緩和機構解析の結果から、C 末端の [1-¹³C]Gly- d_2 を用いることで ¹³C 核の緩和機構の大部分を占める R_{1DD} と R_{1CSA} を減らし、大きなペプチドにおいても長い T_1 が実現できる可能性が示唆された。

第 4 章. C 末端 [1-¹³C]Gly- d_2 を利用したオリゴペプチド型 DNP NMR 分子プローブの開発

本章では、第 3 章で見出した「大きなペプチド中でも C 末端 [1-¹³C]Gly- d_2 残基が *in vivo* 応用可能な長い T_1 を実現できる」という示唆に基づいたペプチド型 DNP NMR 分子プローブを開発した。それら分子プローブを用いた超偏極実験を実施することで、本研究で提案する ¹³C 標識戦略の有用性を実証した。

【ペンタペプチド型 DNP 分子プローブ ¹³C-BCM-5 の開発と超偏極実験】 乳タンパク質代謝ペプチドフラグメントであるペンタペプチド β -casomorphin-5 (BCM-5, Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly) に着目した。BCM-5 は μ -opioid receptor agonist であるとともに Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) によって生体内で代謝される生体関連ペプチドである。そこで、DNP 分子プローブとして ¹³C-BCM-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-[1-¹³C]Gly- d_2 , 分子量 583) を設計した (Figure 5A)。¹³C-BCM-5 は Fmoc-[1-¹³C]Gly- d_2 を出発物質とし、固相合成によって得た。まず、9.4 T、重水中における ¹³C-BCM-5 の T_1 を測定した。

¹³C-BCM-5 (分子量 583) の T_1 は 20 s (9.4 T, D₂O, 37 °C) であり、ジペプチド Gly-[1-¹³C]Leu (T_1 = 21 s, 分子量 189) に匹敵する T_1 を示した。次に、偏極機 HyperSense を用いて ¹³C-BCM-5 を高感度化し、3 T MRI を用いて高感度化シグナルを観測した。結果として ¹³C-BCM-5 に対応すると考えられる高感度化 ¹³C MR シグナルが観測でき、減衰から算出した T_1 は 29 s (3 T, H₂O) であった。さらに、健常マウスに対して超偏極状態の ¹³C-BCM-5 を尾静脈投与し、胴体領域から ¹³C-BCM-5 ならびに [1-¹³C]Gly- d_2 のケミカルシフトに対応する高感度化シグナルを検出することに成功した (Figure 5B)。以上の結果から、C 末端 [1-¹³C]Gly- d_2 を利用した ¹³C-BCM-5 は分子量が大きなペンタペプチドながら、*in vivo* でその偏極シグナルを検出できるだけ長い T_1 を示すことが実証された。

【トリペプチド型分子プローブ ¹³C-GSH の開発

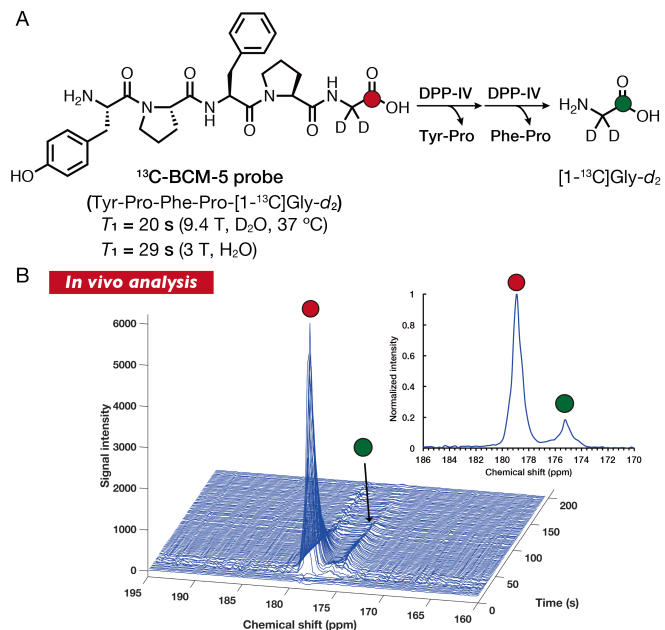


Figure 5. ¹³C-BCM-5 as a pentapeptide DNP NMR probe. (A) The enzymatic reaction pathway of ¹³C-BCM-5. (B) Dynamic ¹³C MRS of hyperpolarized ¹³C-BCM-5 obtained from a body region of a healthy mouse. The spectra were acquired using a 3 T MRI scanner. The inset is the summed spectrum. Repetition time = 1 s, flip angle = 10°

と超偏極実験】本研究で取得した ^{13}C 標識戦略を適用するさらなるペプチドとして、生体内抗酸化トリペプチドである glutathione (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) を選択した (**Figure 6A**)。GSH は非タンパク質チオールとして細胞内の還元状態維持に関わる生体関連ペプチドである。これまでに取得した知見を適用して DNP NMR 分子プローブ ^{13}C -GSH (γ -Glu-Cys*- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly-}d_2$, *はラセミ体残基を示す) を設計・合成した。まず、 ^{13}C -GSH の重水中、9.4 T における T_1 を測定した。その T_1 は 34 s (9.4 T, D_2O , 37 °C) であった。次に、 ^{13}C -GSH の高感度化シグナルを計測した。 ^{13}C -GSH は偏極機 HyperSense を用いて実際に高感度化可能であり、3 T MRI を用いて ^{13}C MRS を計測することで高感度化された ^{13}C MR シグナルを観測することができた ($T_1 = 51$ s at 3 T)。最後に超偏極状態の ^{13}C -GSH を健常マウスに投与し、脳領域を計測した。その結果、プローブに対応する高感度化シグナルを検出できた。加えて、生成物である $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ に対応すると考えられる高感度化シグナルも検出できた (**Figure 6B**)。本 ^{13}C 標識指針に基づいて開発した ^{13}C -GSH は *in vivo* 応用可能な長い T_1 を示し、実際に生体内で高感度シグナル計測できることが示された。

第5章. 結言

本研究では、分子構造に着目した縦緩和機構解析を実施することで、一般に考えられていた分子量の制約を超えたペプチド型 DNP NMR 分子プローブを開発した。これまでに *in vivo* で機能した最大分子量を持つ ^{13}C 標識有機低分子 γ -Glu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ の磁気パラメータを精査し、ペプチドの主鎖および側鎖に着目した縦緩和機構解析を実施することで、分子量の大きなペプチド中でも C 末端 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly-}d_2$ が *in vivo* 応用可能な長い T_1 を実現できることを見出した。本 ^{13}C 標識戦略に基づいたペプチド型 DNP 分子プローブを開発し、 ^{13}C -BCM-5 ならびに ^{13}C -GSH が *in vivo* で機能することを実証した。今後、縦緩和機構の分子メカニズムを理解することで、生体応用できないと考えられていた分子骨格を持つ DNP 分子プローブが開発され、DNP MRI で取得できる生体情報の幅が拡張されることが期待される。

参考文献

(1) Kovtunov, K. V. *et al.*, *Chem. Asian J.* **2018**, *13*, 1857–1871. (2) Ardenkjær-Larsen, J. H. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10158–10163. (3) Wang, Z. J. *et al.* *Radiology* **2019**, *291*, 273–284. (4) Kondo, Y. *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 14779–14799. (5) Keshari, K. R. and Wilson, D. M. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1627–1659. (6) Nishihara, T. *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10626–10629. (7) Petsalaki, E. and Russell, R. B. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 344–350. (8) Yamamoto, K. *et al.* *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12155. (9) Jensen, P. R. *et al.* *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10010–10012. (10) Gallagher, F. A. *et al.* *Magn. Reson. Med.* **2008**, *60*, 253–257.

発表論文

Publication related to the doctoral dissertation

(1) Kondo, Y., Saito, Y., Elhelaly, A. E., Hyodo, F., Nishihara, T., Itoda, M., Nonaka, H., Matsuo, M., Sando, S. *RSC Adv.*, **2021**, *11*, 37011–37018. (2) Kondo, Y., Saito, Y., Yamamoto, K., Seki, T., Takakusagi, Y., Nonaka, H., Miyanishi, K., Mizukami, W., Negoro, M., Elhelaly A. E., Hyodo, F., Matsuo, M., Raju, N., Swerson, R., Krishna, M. C., Sando, S. *Manuscript in preparation*.

Publication not related to the doctoral dissertation:

(3) [Review] Kondo, Y., Nonaka, H., Takakusagi, Y., Sando, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, 2–23.

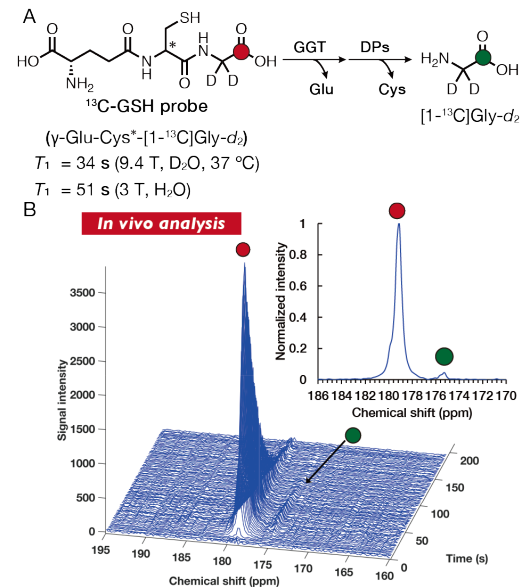


Figure 6. ^{13}C -GSH as a tripeptide DNP NMR probe. (A) The enzymatic reaction pathway of ^{13}C -GSH *in vivo*. * represents an epimerized residue. DP; Dipeptidase. (B) Dynamic ^{13}C MRS of hyperpolarized ^{13}C -GSH obtained from a brain region of a healthy mouse. The spectra were acquired using a 3 T MRI scanner. The inset is the summed spectrum. Repetition time = 1 s, flip angle = 10°