

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 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。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) 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。例えば、 ^{13}C 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。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。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。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こと、すなわち十分に長い T_1 を示すことが必要である。生体内で機能する DNP 分子プローブの幅を広げるという観点からは、分子構造の多様化が求められ、それに従って対象とする分子群の分子量は大きくなる。しかしながら、一般的に分子量が大きい分子は、いくつかの理由から短い T_1 を示し、生体応用に向かないと考えられてきた。

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。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、上述の分子量と T_1 の負の関係によって、アミノ酸が連なって構成される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。

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 ^{13}C 標識有機低分子である $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ の酵素反応・磁気特性を調べ、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly-}d_2$ 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・ ^{13}C 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、C 末端 $^{13}\text{C]Gly-}d_2$ 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 章で得られた分子設計指針に基づいて、ペプチド型分子プローブ $^{13}\text{C-}\beta\text{-casomorphin-5}$ ($^{13}\text{C-BCM-5}$, 分子量 583) ならびにトリペプチド型分子プローブ $^{13}\text{C-glutathione}$ ($^{13}\text{C-GSH}$, 分子量 310) を開発した。また、これらの分子プローブを用いた超偏極実験を実施し、本研究で得られた分子設計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 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ 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 ^{13}C 標識分子のなかで、最大分子量を持つ分子は、調査の限り、 $\gamma\text{-Glutamyl Transpeptidase (GGT)}$ 検出 DNP NMR 分子プローブ $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ (分子量 205) である。本章では、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ 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。 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ の縦緩和機構を解析し、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly-}d_2$ を長寿命型分子プローブとして提案した。

まず $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ の ^{13}C 標識位置の妥当性を評価した。DNP 分子プローブ候補である $\gamma\text{-[5-}^{13}\text{C]Glu-Gly}$ と $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ を合成し、各 probe/product のケミカルシフトならびに T_1 を重水中において測定した。結果として $\gamma\text{-[5-}^{13}\text{C]Glu-Gly}$ 、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ 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な値であったが、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ のほうが長い T_1 を示した。したがって、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ のほうが *in vivo* 応用に適していることが分かった。

次に、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ 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、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ ならびに $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly-}d_2$ 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 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly-}d_2$ は $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ よりも大幅に長い T_1 を示した。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} の占める割合を実験的に算出した。結果として、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ の $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ DD 緩和の大部分が Gly 残基 $\alpha\text{-}^1\text{H}$ 由来であることが示唆された。また R_{1DD} と R_{1CSA} が 9.4 T における $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ の縦緩和の大部分を占めることが分かった。最後に、 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly-}d_2$ 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 $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly-}d_2$ の T_1 は $\gamma\text{-Glu-[1-}^{13}\text{C]Gly}$ の T_1 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。

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 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}-d_2$ が *in vivo* 応用可能な T_1 を実現できる可能性を見出した。

まず、ペプチド主鎖長と T_1 との関係調べた。 ^{13}C 標識した Gly oligomer を固相合成法によって合成し、その T_1 を測定した。C 末端カルボン酸 ^{13}C 核の T_1 は主鎖長が長くなり分子量が大きくなるにつれて減少したが、その減少は徐々に緩やかになった。分子動力学計算を実施し、その分子メカニズムを考察したところ、C 末端カルボン酸 ^{13}C 標識 Gly oligomer の主鎖が伸びても回転相関時間 τ_2 が維持されたことが、 T_1 減少が抑えられた原因の一つだと示唆された。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。

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。Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ が同一分子量の Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ よりも約 1.5 倍長い T_1 を示したことから、側鎖位置が T_1 に大きな影響を与えることが示唆された。この理由を考察するために、 R_{IDD} と R_{ICSA} の実測ならびに分子動力学・量子化学計算による緩和機構計算を実施した。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} 計算結果から各 ^1H の DD 緩和の寄与の大きさを推定したところ、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ は、隣接残基側鎖由来の R_{IDD} の寄与はほぼないことが示唆された。次に、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ と Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ の R_{ICSA} の差を生む分子構造的な要因を調べた。分子動力学計算を用い、Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ と Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ 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、 ^{13}C 核近傍に側鎖を持たない Leu- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ は Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ より ^{13}C 核周辺の運動が制限されていないために小さい R_{ICSA} を実現していると考えられた。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複数の Xaa- $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ の T_1 を測定した。その結果、その多くは側鎖の大きさによらずほぼ同じ 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 末端に $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}-d_2$ を用いることで、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 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}-d_2$ 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「C 末端 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}-d_2$ 残基が大きなペプチド中でも *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。さらに、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 ^{13}C 標識戦略の有用性を実証した。

生体関連ペプチド BCM-5 に着目し、DNP 分子プローブ ^{13}C -BCM-5 を設計・合成した。 ^{13}C -BCM-5 の T_1 を測定したところ、その T_1 はジペプチド Gly- $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ に匹敵する値であった。次に、偏極機を用いて高感度化した ^{13}C -BCM-5 を健常マウスに対して投与したところ、胴体領域からプローブに対応する高感度化シグナルを観測することができた。

本研究で見出した ^{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 GSH を選択し、DNP 分子プローブ ^{13}C -GSH を設計・合成した。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。以上の結果から、C末端[1-¹³C]Gly-*d*₂を用いる戦略に基づいて開発した ¹³C-BCM-5 ならびに ¹³C-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を検出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 (分子量 ~200) 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¹³C有機低分子γ-Glu-[1-¹³C]Gly (分子量 205) 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[1-¹³C]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。本分子設計指針に基づいたペプチド型DNP分子プローブを開発し、¹³C-BCM-5 (分子量 583) ならびに¹³C-GSH (分子量 310) 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。