

# カルボニル炭素を含有する高感度、高選択的核磁気共鳴分子プローブの設計と機能評価

西原, 達哉

<https://hdl.handle.net/2324/1500684>

---

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 西原 達哉

論 文 名 : カルボニル炭素を含有する高感度、高選択的核磁気共鳴分子プローブの  
設計と機能評価

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

生体内には、タンパク質、有機小分子、核酸、金属イオンなど、多数の生体分子が存在する。これら生体分子が、化学反応、分子認識などを通じて密接に関わりあうことにより、高次生命機能を発現している。そのため、生体内で起こっている生命機能を分子レベルで解析することは、生命現象の本質を紐解く上で、非常に重要な試みである。近年、生命現象の分子レベルでの理解に向けて、数多くの機能性分子 (分子プローブ) が開発されてきた。中でも、生体透過性、及び、感度に優れる動的核偏極-核磁気共鳴 (dynamic nuclear polarization-nuclear magnetic resonance: DNP-NMR) 技術を利用した分子プローブに注目が集まっている。しかしながら、本手法には大きな課題がある。それは、一般に観測核の核偏極寿命が短く、観測核が長い核偏極寿命を示す分子が制限されてしまう点である。そのため、必要な機能を有する DNP-NMR 分子プローブを設計することは非常に困難であり、DNP-NMR 分子プローブの解析対象種は限られている。そこで、本論文では、生物個体解析に資する NMR 分子プローブの開発に向け、特に、DNP-NMR 分子プローブの解析対象種を拡張する方法論の確立を主眼において研究を展開した。

第1章においては、緒言として、現在までの分子プローブ研究について概説し、NMR 分子プローブの利点、及び、課題について述べ、本論文の目標を提示した。

第2章においては、DNP-NMR 分子プローブとして、1位のカルボニル炭素を  $^{13}\text{C}$  標識したピルビン酸誘導体、レポーターとしてマウス精巣由来の乳酸脱水素酵素 (mouse lactate dehydrogenase-X: mLDH-X) を用いるレポーターアッセイを提案した。まず、内因性の LDH とは反応せず、レポーターである mLDH-X と選択的に反応するピルビン酸誘導体を探索し、3位にイソブチル基を有するピルビン酸誘導体が条件を満たすことを明らかにした。また、1位を  $^{13}\text{C}$  標識した本ピルビン酸誘導体が DNP によって高感度化でき、観測核であるカルボニル炭素が長い核偏極寿命を示すことを確認した。さらに、内因性 LDH が多量に含まれる真核細胞破碎液中においても、レポーターである mLDH-X との反応を高感度に検出可能であることを実証した。

第3章においては、第2章で提案したレポーターアッセイが、生物個体解析への適用が期待される多重共鳴 NMR にも応用可能であることを明らかにした。具体的には、1位と2位のカルボニル炭素を  $^{13}\text{C}$  標識したピルビン酸誘導体が1次元3重共鳴 NMR 分子プローブとして機能することを見いだした。実際に、レポーターを発現させた生細胞に対して本分子プローブを添加することで、レポーターに由来する生成物のシグナルを1次元3重共鳴 NMR で高選択的に検出することに成功した。以上により、1次元3重共鳴 NMR 分子プローブを用いたタンパク質発現解析の可能性を示した。

第4章においては、1位にカルボニル炭素を含有する 1- $^{13}\text{C}$ -グリシンを母核構造とした DNP-NMR

分子プローブの汎用的設計指針を提案した。本研究では、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -グリシンにおける  $\alpha$  位窒素原子のプロトン化が、長い核偏極寿命を有する 1 位のカルボニル炭素のケミカルシフトを制御している点に着目し、これを DNP-NMR 分子プローブの設計指針とした。実際に、本設計指針に基づく方法論として、 $pK_a$  の制御、及び酵素反応による制御を提案した。それぞれの方法論を用いることで、重要な解析対象である pH や、ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase: GGT) に対する DNP-NMR 分子プローブの設計に成功した。また、開発した分子プローブが、疑似生体環境下 (血中や組織破砕液) において、想定した機能を発揮することを実証した。

最後に第 5 章では、結言として、本論文の総括を行った。