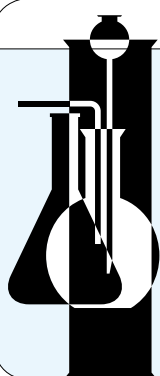


実験講座

組織内の小分子を可視化する *FixEL*

美野 丈晴 野中 洋 浜地 格

Key words : PFA 組織固定, リガンド-タンパク質間相互作用, 三次元イメージング

外因性に投与された小分子の組織内分布を解析する技術は、機能性小分子の活用に不可欠である。しかし、単離組織中に小分子を担持することの困難さから、その分布を高分解能に捉えることは困難であった。最近、筆者らは古くから用いられるホルムアルデヒドによる組織固定の化学を見直すことで、小分子の組織内分布を固定し可視化するための新たな方法論“*FixEL*”を開発した^{1,2)}。本稿では *FixEL* の詳細と、今後の展望について述べる。

I. 小分子イメージングの重要性

様々な小分子が、医療診断における組織イメージングのための機能性プローブとして、また疾患治療における医薬品として使用されている。このような機能性小分子の開発、改良、最適化のためには、組織内での空間分布、標的選択性、拡散、排泄速度を知ることが不可欠である。しかし、複雑な構造を有する組織内でこのようなパラメーターを高い時空間分解能で評価するための手法は限られていた。

蛍光イメージングでは一般にサブ μm スケールで対象を可視化できる。また、近年発達してきた組織透明化技術を利用して、標的とするタンパク質や核酸の生体内における三次元的な分布を可視

化することも可能である。しかしながら、外因性に投与された小分子の生体内分布を同様に捉えることは困難であった。Click-ExM³⁾やCATCH⁴⁾と呼ばれる手法は、組織中で生体高分子と共有結合を形成するか、強い親和性を示す小分子の可視化を可能にしつつある。しかし、医学や生理学の分野で広く使用される低～中程度の親和性で、生体高分子と非共有結合的に相互作用する小分子には適用できない。弱い相互作用に基づく小分子の組織内分布をもイメージング可能な、より一般的な方法が求められていた。

蛍光観察以外で小分子イメージングを行うための選択肢として、ポジトロン断層法(PET)や質量分析(MS)イメージングが挙げられる。PETは放射性同位元素で標識した小分子プローブを用いて、生体内の生理的・病理的变化を非侵襲的に可視化することができる強力な手法である。しかし、空間分解能は原理上mm程度であり、また放射性標識分子の取り扱いが容易でない点も利用の障壁となり得る。MSイメージングは、標識なしに組織切片中の小分子の分布を検出できる有用な手法である。最近の技術的進歩により、サブ μm 分解能での高分解能イメージングや三次元解析が達成されつつあるが、しばしば複雑なサンプル前処理プロトコルを必要とする。

FixEL for visualizing small molecules in tissue

Mino Takeharu : 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻生物有機化学(〒615-8510 京都府京都市西京区京都大学桂)

Nonaka Hiroshi, Hamachi Itaru : 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻生物有機化学, 科学技術振興機構 ERATO

0370-9531/02/¥500/論文/JCOPY

こうした背景から、筆者らは新たな組織内小分子イメージング法として *FixEL* を開発した。*FixEL* は古くから用いられてきたホルムアルデヒド組織固定の化学をその原理から見直し、発展させることで生み出された。以下では、まずホルムアルデヒド組織固定の歴史と化学的側面を概説し、その後 *FixEL* の戦略と実際の検討結果を詳説する。

II. ホルムアルデヒド固定の歴史と化学

1. ホルムアルデヒド固定の歴史

ホルムアルデヒド処理は今日における組織固定のゴールドスタンダードであるが、開発の歴史は古く、19 世紀まで遡ることができる。1859 年にホルムアルデヒドが発見されたおよそ 10 年後に、ドイツ人化学者 August Wilhelm von Hofmann によってその実用的な合成法が確立された⁵⁾。当初は防腐剤としての利用が中心であったが、1890 年代にドイツ人生理学者 Ferdinand Blum が自身の指がホルムアルデヒド溶液の付着によって硬化することに気がつき、その生体組織固定液としての利用を見いだした⁵⁾。ホルムアルデヒドによる組織固定は、タンパク質や核酸のような高分子の空間分布を組織中に維持することができる。免疫染色や蛍光タンパク質融合、タンパク質タグの利用、あるいは合理的に設計された小分子による化学修飾などによって、標的タンパク質の組織内での分布を可視化可能である。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により核酸の組織中での分布を捉えることもできる。更に、近年では組織透明化法とライトシート顕微鏡の利用を組み合わせることで、組織ブロック中の生体高分子の三次元分布を捉えることにも貢献している。しかし、小分子の組織内分布の可視化には不向きであり、実際に一般的な方法はほとんど存在しなかった。

2. ホルムアルデヒドによる組織固定の化学

生体高分子の組織内分布が可視化された例は多数ある一方で、小分子の分布可視化に関する報告例が少ない理由は何であろうか。一般的なホルムアルデヒド組織固定の原理を理解することで、この問いに答えることができる。ホルムアルデヒドと水は直鎖状のポリマーを形成する⁶⁾。このポリ

マーはパラホルムアルデヒド (PFA) と呼ばれる。PFA は様々な重合度で存在するが、その両末端は求電子剤として働いて Lys や Arg などの求核性のアミノ酸側鎖と反応する⁷⁾。PFA の両末端がタンパク質と共有結合を形成できるため、タンパク質は PFA ポリマーによって架橋される。こうしてタンパク質と PFA が網目構造をつくってゲル化し、これが組織の形態を維持する。

このメカニズムを踏まえると、生体高分子は容易に組織中へ固定され、小分子は固定されにくいことがわかる。前述のとおりタンパク質は PFA によって架橋され、網目構造を形成しながらその相対位置が固定される。更に、核酸などの他の高分子も、タンパク質と PFA から成る網目構造に捕捉される。しかし、一般的な小分子はこうした網目構造に捕捉されるほどの分子サイズを有しておらず、また必ずしも PFA と反応する求核性官能基を持っているとは限らない。そのため、従来の組織固定法では小分子の分布を捉えることが難しかった。

III. *FixEL* の戦略と原理実証

1. *FixEL* の戦略

以上を踏まえて筆者らは、標的とする小分子を PFA と反応可能なアミノ基であらかじめ修飾しておく戦略を着想した。図 1 に、タンパク質に親和性のある小分子リガンドを標的として選んだ場合を例に説明する。アミノ基を修飾した標的小分子は生体内でタンパク質親和性に基づいた分布をとっている。ここに PFA を作用させると、タンパク質の組織内分布が固定されると同時に、プローブ上のアミノ基が PFA と反応し、プローブも固定される。この分子は PFA を介して周囲のタンパク質につなぎ止められているため、スライスの調製や組織透明化処理などによっても除かれることはない。これが、新しい小分子イメージング法として筆者らが開発した *FixEL* の原理である。

2. *FixEL* の原理実証

最初の *FixEL* の原理実証のために、筆者らは代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGlu1) の選択的アンタゴニストである小分子リガンドを標的小分子とした。mGlu1 は中枢神経系における興奮

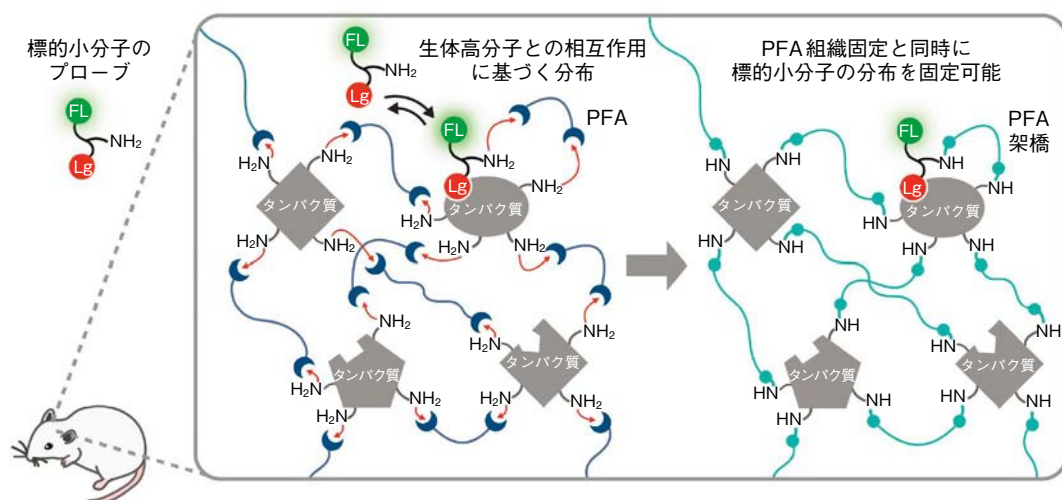


図 1 組織内小分子イメージングを可能にする *FixEL* の概略
Lg: タンパク質と相互作用する標的小分子リガンド, FL: 蛍光色素

性神経伝達を担う重要な膜タンパク質である。具体的なプローブ設計としては、図 2A に示すとおり mGlu1 リガンド CNITM に一級アミノ基と蛍光色素 Alexa Fluor 647 を導入した。

mGlu1 が豊富に発現しているマウス小脳にプローブを注入し、その後灌流法を用いてマウス全身を PFA で処理した。小脳切片を蛍光顕微鏡観察した結果、プローブ由来の蛍光シグナルが mGlu1 の豊富に分布している分子層領域から選択的に検出された(図 2B)。このシグナルは、mGlu1 の免疫染色像とよく一致し、加えて mGlu1 ノックアウトマウスで同様の実験を行った場合にはほとんど検出されなかった。これらの結果から、mGlu1 と相互作用している小分子リガンドの空間分布を可視化できたものと思われる。重要なことに、PFA と結合形成するためのアミノ基のないプローブを用いた場合には、こうしたシグナルはみられなかった。すなわち、灌流固定やスライスの調製で洗い流されてしまうような弱い相互作用に基づくリガンドが、小分子へのアミノ基導入によって組織上で固定化・維持され可視化可能になったと言える。以上から、想定どおりの *FixEL* の原理によって、弱い相互作用に基づく小分子の生体内分布を可視化できたと考えられる。

IV. 様々な小分子の *FixEL* イメージング

FixEL は mGlu1 リガンド以外的小分子にも適用可能であった。同様のプローブ設計指針で、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) リガンドに PFA と反応可能なアミノ基を導入した(図 2A)。この AMPAR リガンドのプローブを側脳室に直接注入したのち PFA 灌流固定し作製された脳切片では、AMPA リガンドプローブ由来の蛍光シグナルが、主に AMPAR が豊富に発現する海馬、小脳、大脳皮質で観察された(図 2C)。

統合失調症治療薬として用いられるスピペロンは、ドーパミン D2 受容体 (DRD2) に結合することが知られている。スピペロンにも同様に *FixEL* を適用しその脳内分布の可視化を試みた結果、DRD2 が豊富に発現している線条体で明瞭な蛍光シグナルが検出された(図 2D)だけでなく、大脳皮質の中央部でもスピペロンプローブ由来の弱い蛍光が検出された。スピペロンは大脳皮質に発現するセロトニン 5-HT2A 受容体 (5-HT2A) にも結合することが知られているため、この分布はスピペロンと 5-HT2A の相互作用に由来するものと思われる⁸⁾。この結果は、*FixEL* が脳内の標的タンパク質だけでなく、オフターゲットタンパク質との相互作用に基づく小分子分布をも捉えることができることを示している。

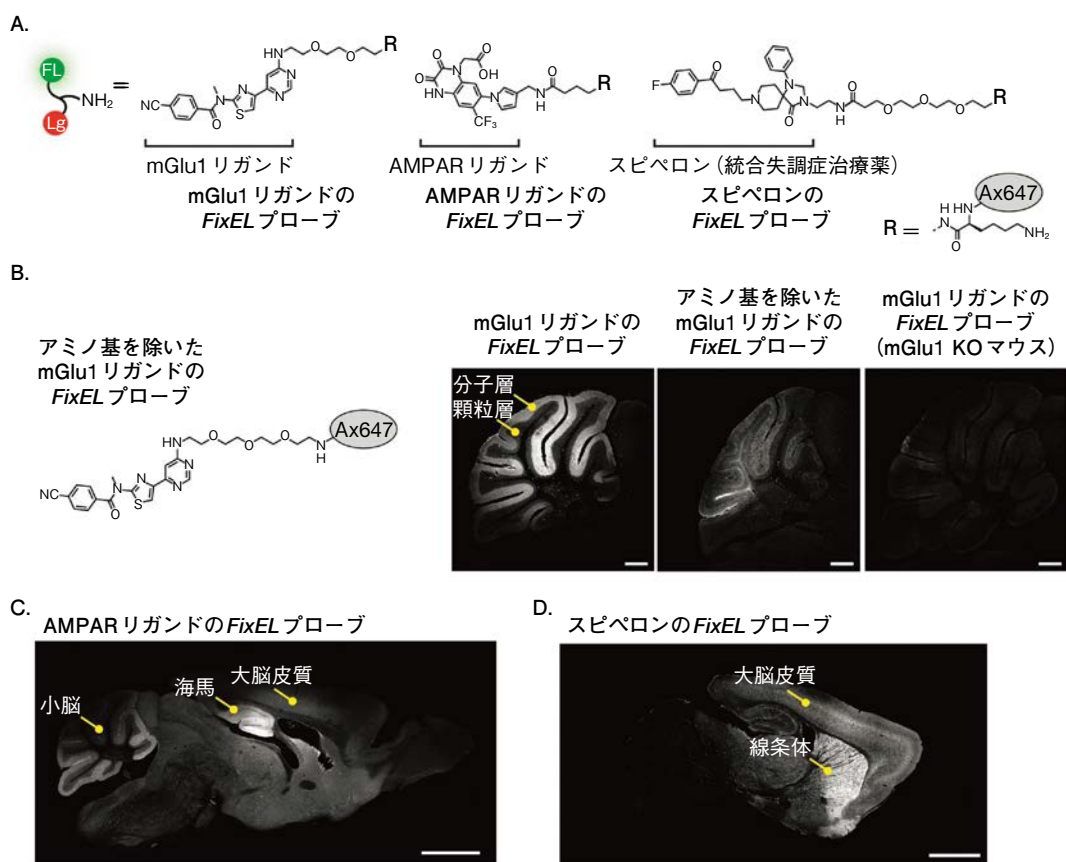


図 2 *FixEL* による小分子リガンドのマウス脳内分布可視化

A. *FixEL* プローブの化学構造

B. mGlu1 リガンドのプローブを用いた *FixEL* 原理実証。スケールバー：1 mm

C, D. AMPAR リガンド (C) および統合失調症治療薬スピペロン (D) のマウス脳内分布イメージング。スケールバー：2 mm

V. *FixEL* 小分子イメージングの応用

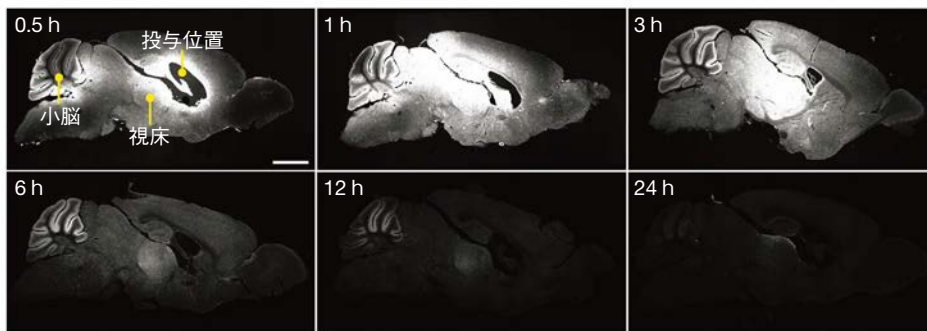
1. 小分子分布の時間変化イメージング

FixEL では標的分子の分布の固定が PFA 処理と同時に開始される。この原理を利用すれば、小分子の空間分布の時間変化を捉えることも可能である。具体的には、以下のような実験を行った。複数のマウスを用意し、プローブ投与から PFA 処理までの時間をマウスごとに変化させた。このプロトコルによって、異なる時間における小分子分布のスナップショットを可視化できると期待した。プローブ投与から 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 時間後に PFA 固定を行った。その結果、固定するタイミングごとに異なるパターンの画像が得られた (図 3)。最も短い時間では、注入部位の周囲に

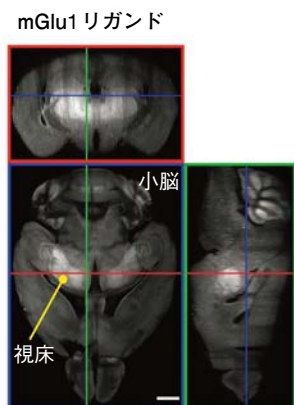
最も強い蛍光シグナルが検出され、リガンドが高濃度に局在する場合の非特異的相互作用が可視化されていると考えられた。特異的な分布だけでなく非特異的な分布も捉えることができることは、機能性プローブの開発において非常に有用であり、この方法の利点であろう。

3-6 時間後、シグナルは主に mGlu1 に富む小脳領域で観察された。このようなシグナルパターンの変化は、mGlu1 リガンドの生体内分布の変化を反映していると考えられる。その後、シグナルは徐々に減少し、24 時間後にはほとんどシグナルがみられなくなった。これは mGlu1 リガンドが脳から排出されたことを反映しているものと思われる。このように、*FixEL* は灌流固定開始時間を変えることによって、小分子の組織内空間

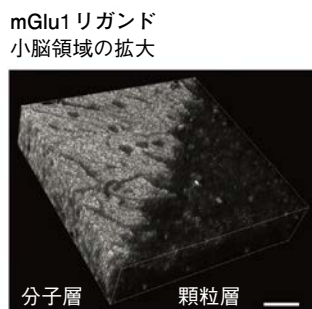
A.



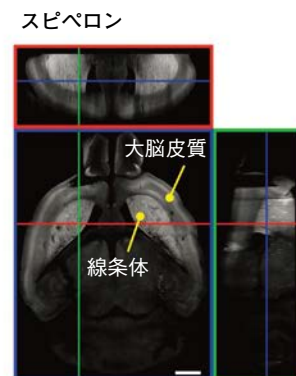
B.



C.



D.

図 3 *FixEL* 小分子イメージングの応用

- A. *FixEL* による mGlu1 リガンドの脳内分布変化のスナップショット。プローブの投与から PFA 固定までの時間を変化させた。スケールバー：2 mm
- B. マウス全脳における mGlu1 リガンドの三次元分布
- C. 小脳領域を拡大した mGlu1 リガンドの三次元分布
- D. マウス全脳におけるスピペロンの三次元分布

分布の時間的変化をスナップショットで可視化することができる。

2. 小分子の組織内三次元分布イメージング

FixEL は既存の組織透明化法と組み合わせることが可能であった。*FixEL* で mGlu1 リガンドを固定したのちのマウス全脳を 3DISCO 法⁹⁾ によって透明化し、蛍光イメージング観察を行った結果、mGlu1 が局在する視床と小脳分子層に明瞭な蛍光が観察された(図 3B)。この透明化サンプルの小脳分子層を高倍率レンズで観察すると、分子層には樹状突起スパインに由来すると思われる 1 μ m 以下の輝点が密集していることが明瞭に示された(図 3C)。スピペロンを固定した全脳の三次元イメージングの場合には、スピペロンプローブは相互作用標的である DRD2 と 5-HT2A が

発現する線条体と大脳皮質にそれぞれ高い選択性で分布していることが明らかになった(図 3D)。AMPA リガンドの三次元分布も同様に蛍光イメージングによって可視化され、対応する天然受容体の発現領域と一致した。*FixEL* と 3DISCO 法のような組織透明化技術を組み合わせることで、脳全体 (cm) スケールから樹状突起スパイン (μ m) スケールまで、脳内の標的小分子の三次元分布を評価することが可能になりつつある。

おわりに

本稿では、生体に外因性に投与された小分子の分布を可視化する方法論として *FixEL* を紹介した。今後は *FixEL* を更に発展させ、内因性の環境変化をスナップショット的に可視化したいと考

えている。最近、生体内における活性酸素種の発生¹⁰⁾、脂肪酸の β 酸化¹¹⁾、低酸素環境¹²⁾といった内因性の代謝や環境変化を組織中において検出できるようなケミカルバイオロジーベースのプロープや戦略が幾つか開発されている。しかし、より対象を拡張するには新たな方法論が必要である。現状では、生細胞実験には用いられるが、固定細胞や組織では洗い流されやすいため利用できない小分子プロープが多い。筆者らはこのようなプロープと *FixEL* を合理的に組み合わせることで、組織で利用可能なセンサー分子を開発し、組織内の微視的環境変化を高空間分解能で可視化することを試みている。例えば、アミノ基が PFA による組織内分布固定に重要であるという *FixEL* の原理を応用した生体内環境センサーのモデルとして、mGlu1 リガンドの *FixEL* プロープを改変して、過酸化水素刺激によってアミノ基が露出するような分子を設計し、今のところ培養細胞系での原理実証には成功している。このアイデアをより発展させることで、組織中での多様な環境変化を幅広い時空間分解能で捉えることができるよう

になれば、医薬科学、生物学にも新しい貢献をもたらすと期待している。

●文 献

- 1) Nonaka H, Mino T, Sakamoto S et al : *Chem.* **9** : 523-540, 2023
- 2) Jain A, Broichhagen J : *Chem.* **9** : 260-262, 2023
- 3) Sun DE, Fan X, Shi Y et al : *Nat Methods.* **18** : 107-113, 2021
- 4) Pang Z, Schafroth MA, Ogasawara D : *Cell.* **185** : 1793-1805.e17, 2022
- 5) Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP : *J Histochem Cytochem.* **33** : 845-853, 1985
- 6) Kiernan JA : *Microscopy Today.* **8** : 8-13, 2000
- 7) Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P et al : *J Biol Chem.* **279** : 6235-6243, 2004
- 8) Metwally KA, Dukat M, Egan CT et al : *J Med Chem.* **41** : 5084-5093, 1998
- 9) Ertürk A, Becker K, Jährling N et al : *Nat Protoc.* **7** : 1983-1995, 2012
- 10) Zhu H, Tamura T, Fujisawa A et al : *J Am Chem Soc.* **142** : 15711-15721, 2020
- 11) Uchinomiya S, Nagaura T, Weber M et al : *J Am Chem Soc.* **145** : 8248-8260, 2023
- 12) Sakamoto DM, Tamura I, Yi B et al : *ChemRxiv.* 10.26434/chemrxiv-2023-brfdm, 2023