

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 金属錯体プローブを用いる遅延蛍光バイオイメージング

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

松本 和子 ((元)早稲田大学理工学部化学科 教授)(~平成18年10月)

主たる共同研究者

船津 高志 (東京大学大学院薬学系研究科 教授)

吉田 健一 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

木村 博子 (順天堂大学医学部法医学研究室 准教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体

細胞や組織標本の観測において、蛍光観測は必要不可欠な手法であるが、パルス励起直後には自家蛍光が強く発生するために高感度検出が不可能となっている場合もある。この欠点を補うために、希土類蛍光錯体の蛍光寿命の長さを利用して、パルス励起後 200  $\mu$  sec 程度経過後の本来の蛍光が主体となっている部分の蛍光を測定する手法を開発しようとする研究である。

幾つかの希土類蛍光錯体が合成されているが、その中で、ストークスシフトが大きく、この分野で一般的に用いられているリン酸やクエン酸緩衝液、EDTAなどのキレート化合物を含有する溶液中でも金属が抜けにくいDTBTA-Eu<sup>3+</sup>の創製に成功し、ビオチン - アビジンを介して時間分解蛍光顕微鏡でDNAアレイおよび酸化ストレスマーカーの組織染色像を得ることにより実用性を示すことに成功した。

吉田グループでは、時間分解蛍光測定法を用いた酸化ストレスマーカーとしての4-ヒドロキシノネナールの測定法を確立し、ヒトにおいて酸化ストレスと疾患の発症が関連している可能性を示すことにも成功している。また、ニトロチロシンが疾患における酸化ストレスの指標として利用出来ることも見出している。

船津グループでは、生細胞の核内におけるmRNAの運動の1分子イメージングに成功しているが、この手法を新たに合成された希土類錯体に適用するところまでは進んでいない。

3 - 2. グループ別

1) 松本グループ

ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用を担当。

当グループが過去に合成してきた希土類蛍光錯体の合成技術を応用して、キレート能を有する緩衝溶液中でも安定な蛍光錯体 DTBTA-Eu<sup>3+</sup>の合成に成功した。この化合物は、335nmの波長で励起され、616nmの蛍光を発光する。従来の金属蛍光錯体より、キレート能を有する溶液中で安定であり、広い用途に使うことが可能である。従来の用いられている条件で蛋白質の標識化は可能であるが、核酸の標識化には最適条件の検討が必要であったため、完成までに時間を要した。そのため、船津グループの核酸での評価については時間的に間に合わず、データが整うところまでっていないのが残念である。DTBTA-Eu<sup>3+</sup>の励起波長が紫外部であるため、より長波長での励起が可能である希土類蛍光錯体の合成を試みて、励起波長 360nm のBTPDA-Eu<sup>3+</sup>の合成に成功しているが、詳細を評価出来る段階にまでは到っていない。

時間分解蛍光観察装置を作製してマイクロアレイ基板上で遅延蛍光モードでの蛍光シグナルの観察に成功しており、それを利用して、組織標本の免疫学的染色を行い、通常の蛍光顕微鏡観察と遜色のない

解像度で蛍光イメージを得ることに成功している。AlexaFluor 488-SA を用いた通常の蛍光観察と比較して、陽性シグナルと陰性シグナルの分離に優れていることを確認している。

## 2) 吉田グループ

金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明を担当。

松本グループが合成した金属錯体プローブを用いて、4-ヒドロキシノネナールを時間分解蛍光イムノアッセイ法で測定することに成功している。この方法によれば、従来から用いられているELISA法より 100 倍の感度があり、特異性が高く抽出などの操作性や多数検体の同時処理に適していることを明らかにしている。これを用いてラットにおける酸化ストレスマーカー (HNE) の役割を明らかにして、この測定法が病態の解析に有用であることを示す成果を挙げている。また、女性の血中HNE上昇と血圧上昇に相関関係があることを発見し、狭心症患者において、不安定狭心症の患者の血中HNEは、安定狭心症患者のそれより高いことを見出し、心血管疾患への臨床応用が期待される。

新規に合成されたDTBTA-Eu<sup>3+</sup> については、免疫蛍光染色への応用を試みている。ストレプトアビジン結合DTBTA-Eu<sup>3+</sup> を用いて、HNE化したIgAの局在やラット腎臓尿管中のニトロチロシンの局在を明らかにしている。比較対象として用いた Alexa Fluor 488 に較べると、自家蛍光を除去でき且つ蛍光が消褪し難いため、極めてバックグラウンドが低く、特異性が高い抗原の検出が可能であることを明らかにしている。

これらの成果は、臨床医学研究に応用出来るものであり、今後の応用展開に期待したい。

## 3) 船津グループ

特定のmRNAの発現と動態を生細胞中で高感度にイメージングする方法の開発および組織中の細胞のアポトーシスを高感度に検出する方法の開発を担当。

蛍光標識剤を利用した高感度イメージング法を開発して、松本グループが開発した希土類蛍光錯体の有用性を評価する計画をもっていたが、開発された錯体による核酸の標識化が遅れたため、新規に開発された希土類蛍光錯体の評価には到っていない点が残念である。

蛍光標識したmRNAを核内にマイクロインジェクションし、核から細胞質への輸送機構を解析し、個々のmRNA分子の核内運動を蛍光顕微鏡で観察することに成功している。蛍光標識したmRNA が、核内において通常のmRNAと何ら変わらない作用を受けることを確認した後、その移動の様子を観察して、ブラウン運動と核内物質との結合・解離を繰り返しながら核膜まで移動し、細胞質へ移送される現象を確認した。転写因子の影響などmRNAの核外輸送現象の詳細な理解につながる可能性のある手法であることを示している。

特定のmRNAを検出するためには、アンチセンスオリゴDNAがプローブとして用いられる。しかし、生きた細胞内の特定のmRNAを検出することは困難とされてきた。このグループでは、人工核酸 2'-O-methyl RNAを使用してFRETイメージングを行うことにより、生細胞内で、内在する特定のmRNAをイメージングすることに初めて成功している。また、アポトーシスの高感度検出法の研究も進めており、ヌクレオソームのDNA切断をリアルタイムに溶液中で検出することにも成功している。

この研究で開発された手法は、基礎研究のみでなくRNAが関与する様々な疾患の解析に利用出来るものであり、医療や医薬品の開発に大きく貢献するものと期待される。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
42	0	37	70	10	20	3	7	4	5

このチームの特徴は、希土類蛍光錯体を開発するグループとそれを評価するグループから編成されていることであり、それぞれがその専門分野を異にしている。

松本グループの論文発表がやや低調であるが、共同研究者グループでは十分な成果の発表がなされている。新規な蛍光錯体は合成法を含めて特許化できているが、十分な評価を行う時間が取れていない点が残念である。近年高性能な蛍光標識剤が開発され、自家発光などのノイズの影響が相対的に低くなっている傾向が見られるが、実験で示された成果を見ると、ノイズのない鮮やかな像が取得出来ており、遅延蛍光イメージング法の有効な分野がまだ存在することは明かであり、今後の展開を期待したい。測定装置の開発については、前半の研究でほぼ終わっており、組み立てた装置を応用に使用している。励起光源の波長がUV領域であることもあって、装置の小型化が難しく、商品化への展開は進んでいないように見受けられる。

RNAの研究が隆盛を極めている現在、mRNAの1分子イメージングは非常に重要な技術といえる。細胞核内のmRNAの動態観察や定量などに素晴らしい成果を挙げているが、時間切れとはいえ、本テーマの希土類蛍光錯体と結びつくところまで進めなかった点は、誠に残念である。

酸化ストレスマーカーと疾病の関係の解析は見事であり、蛍光錯体の利用方法を示している点も、本研究にとっては重要な成果といえよう。

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

希土類蛍光錯体の特異な性質を持ち、使用する場面によっては非常に有効であることを示している点は評価したい。しかしながら、現在用いている手法を変更することに慎重な生物学者にこの手法を一般的手法として利用して貰うためには、まだ多くの研究が必要と思われる。また、装置の小型化を達成するためには、更なる励起波長の長波長化が必要であり、引き続いて配位子の改良が行われることによって、この分野に貢献出来るものになるであろう。

mRNAの細胞内挙動については、よく分かっていないことが多い。そのような状況下でmRNAの1分子イメージングの成功がこの分野の研究に与えるインパクトは大きいものといえ、重要な貢献になるであろう。この手法が活用されることによってRNAの多様な働きの解明が進むことに期待を持っている。

疾病の機構解明に蛍光錯体を用いて成果を挙げており、新しい手法の開発と高感度化に成功しているため、この手法の適用範囲を広げていくことができれば、大きな貢献になるであろう。

##### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

松本研究代表者は、不適切な経理処理等の事由から、本研究課題の中止に至ったことは大変遺憾なことであると同時に、プロジェクト終了まであと1年という大事な時期に研究ができず、当初予定していた成果が得られていない点が多いことは誠に残念である。