

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」  
平成 14 年度採択研究代表者

松本 和子

(早稲田大学 理工学部化学科 教授)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

本年度は、研究計画上初年度にあたり、以下に記述する点にポイントを絞り実施した。「ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用」では、本年度、(1) ラベル化剤の開発として、細胞中でRNAやDNAとハイブリダイズするDNAプローブの標識剤としては、通常のメンブレン上でのハイブリダイゼーションに比べ、細胞内への導入というステップが必要であり、特に生細胞へ導入をも考慮した場合、強い蛍光を有し使用しても金属イオンが抜け出ない強いキレート力をもつラベル剤が必要である。本年度は、候補となるラベル剤の開発を試み、DTBTA-Eu<sup>3+</sup>というラベル剤を開発した。そして、まず、In vitroでのハイブリダイゼーションを行い、その性能を評価した。並行して、(2) 装置の開発として、生物試料を観察するための遅延蛍光顕微鏡を作製した。今後の課題としては、本実験計画期間の短期的な課題としては、このラベル剤と遅延蛍光顕微鏡システムでの検出感度の検討を行なうことである。また、期間のほぼ全体にわたる長期的な課題としては、希土類蛍光錯体が従来の有機蛍光色素に比べ照射される光に対して安定であるという利点を生かし、組織・細胞の生体物質(蛋白質、核酸、糖鎖など)の検鏡観察への展開である。

「特定のmRNAの発現と動態を生細胞中で高感度に定量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」では、生細胞の特定のmRNAの発現と動態を高感度に定量イメージングする方法を開発するための最初のステップとして、蛍光標識した1分子のmRNAを生細胞中でイメージングする技術を開発した。ヒトβ-globinの一部を*in vitro*で合成し、1分子あたり数塩基のグアニンを蛍光色素Cy3で標識した。これを核にインジェクションしたところブラウン運動が観察された。mRNAの拡散定数は水中の約1/100遅くなっており、核内構造物との結合解離が示唆された。一方、GFPをインジェクションした場合、拡散定数は水中の1/2にしかならず、ブラウン運動の抑制はmRNAに特有な現象であることがわかった。以上の結果は、mRNAの核膜孔への輸送がブラウン運動によることを示唆している。同様に、蛍光標識したβ-actinのmRNAを細胞質にインジェクションして1分子のmRNAが細胞骨格とモータータンパク質によって能動輸送の様子や、細胞内局在を高感度に検出することに成功した。また、組織中のアポトーシスを高感度に検出するために、核酸の分解を高感度に検出する方法を検討した。このた

めに、蛍光標識したmRNAの蛍光強度を個々の分子について定量することを可能にし、mRNAの分解を高感度に検出できるようにした。この手法は、DNAの分解検出にも応用可能と期待される。

「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」では、心筋梗塞による心筋障害や心不全進展に虚血やサイトカインと活性酸素・細胞内情報伝達系が関与する証拠があるが、体系的な検討はない。心筋障害に関与するサイトカインの一種であるTNF $\alpha$  蛋白とその遺伝子は、遷延性心筋梗塞や虚血再灌流時、心筋、内皮、マクロファージで増えるが、早期梗塞心筋におけるTNF $\alpha$  に関しては、ほとんど知られていない。また、狭心症発作の反復は続発する心筋梗塞に対して保護的に働く。この現象は、虚血プレコンディショニング (Ischemic preconditioning : IP) として知られ、動物モデルで再現できる。私たちは早期心筋梗塞におけるTNF $\alpha$  産生と局在を明らかにし、IPの効果について検討し、そのメカニズムをp38MAPキナーゼと転写因子NF $\kappa$ Bの面から検討した。

時間分解蛍光測定で測定したTNF $\alpha$  は膜分画に急激に誘導され、1時間でピークに達した。IPまたはp38MAPK阻害剤のSBまたはFRが、これを抑制した。また、TNF $\alpha$  免疫染色性は心筋内の桿状構造や横紋構造に増加したが、血管内皮やマクロファージには発現していなかった。IPは、心筋梗塞によるTNF $\alpha$  増加を抑制した。リアルタイムPCR法により、30分の梗塞ではTNF $\alpha$  mRNAが増えているが、IPは影響がなかったことが示された。NF $\kappa$ Bの転写活性とI $\kappa$ B分解は、どちらも心筋梗塞で変化しなかったことから、早期心筋梗塞のTNF $\alpha$  増生はNF $\kappa$ Bとは無関係に転写後ステップで調節されていることが示唆された。また、3つのMAPキナーゼファミリー酵素群が心筋梗塞1時間で活性化されたが、p38MAPキナーゼ阻害剤SB・FRで、p38MAPキナーゼ活性化が阻害された。しかし、IPでは阻害傾向は明らかでなかった。これらの結果から、早期心筋梗塞により膜結合型TNF $\alpha$  が転写後のステップで増生し、p38MAPキナーゼにより調節されることがはじめて示された。IPによるTNF $\alpha$  増生抑制効果のメカニズムは未解明である。

## 2. 研究実施体制

### 松本グループ

- ① 研究分担グループ長：松本 和子（早稲田大学理工学部、教授）
- ② 研究項目：ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用

### 船津グループ

- ① 研究分担グループ長：船津 高志（早稲田大学理工学部、教授）
- ② 研究項目：特定のmRNAの発現と動態を生細胞中で高感度に定量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

### 吉田グループ

- ① 研究分担グループ長：吉田 謙一（東京大学 大学院 医学系研究科 教授）
- ② 研究項目：金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明
  - 梗塞心筋におけるTNF $\alpha$ 生成機構と調節機構の検討 -