

「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 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

本研究課題では、①「ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用」、②「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」、③「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」という3つの研究項目に分けて研究を進めている。

まず、①では、生体成分の分析に使用される緩衝液や熱に安定な希土類蛍光錯体の開発に成功しており、本年度はこの錯体を標識剤として使用し、マイクロアレイ上のDNAハイブリダイゼーションシグナルの検出に成功した。また、細胞染色への応用検討も開始しており、種々のアプローチからバイオイメージングを目指す。

次に、②では、細胞内のmRNAの発現と動態を高感度に定量イメージングする方法や組織中のアポトーシスを高感度で検出する方法を開発し医療に役立てることを目指しており、本年度は、細胞内のmRNAの挙動の観察に適したプローブの検討を行なった。また、エバネッセント型1分子蛍光顕微鏡システムを改良し、複数波長の蛍光を1分子レベルで同時に観察することができるようになった。

③では、虚血心筋細胞死・細胞障害・保護の分子機構につき、金属錯体プローブ蛍光を用いたTNF- $\alpha$ や酸化ストレス指標 (nitrotyrosine, hydroxynonenal) の微量測定法、生化学・分子生物学的検索、及び、組織化学的検索より解明するべく検討を進めた。

### 2. 研究実施内容

本年度は、研究計画の2年度目にあたり、前年度の成果を踏まえ、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)前年度、新規標識剤として開発した希土類蛍光錯体DTBTA-Eu<sup>3+</sup>を遺伝子の検出に応用するべく、ラベリング条件やハイブリダイゼーション条件の検討をIn vitroの系で行なった。検討した系は、予めビオチンで標識したDNAを本蛍光錯体で標識したストレプトアビジンを用いることで検出しようとするもので、96-ウエルプレートでの測定が出来るよう構築した。構築した系を用いて配列特異的なハイブリダイゼーションシグナルを検出することが出来た。特に、

PNA型のプローブを用いた場合、1塩基の変異も精度良く検出することが出来た。(2)装置の開発として、既に作製した時間分解蛍光顕微鏡の性能評価を行なった。評価は、本装置でDNAマイクロアレイ上のハイブリダイゼーションシグナルの検出が可能かどうかという観点から実施した。アレイ基板の材質、蛍光測定が遅延時間、積算回数等のパラメーターを検討することで、マイクロアレイ上のDNAハイブリダイゼーションシグナルの検出に成功した。市販のアレイスキャナーでCy5を検出する場合に比べ、本装置とDTBTA-Eu<sup>3+</sup>では約1桁高感度な検出ができた。また、検量線の定量領域は約2桁広がった。

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)の検鏡観察への応用を目指し、細胞染色の検討を開始した。

「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、以下の2項目に大別して研究を行なった。(1)2002年度までに、in vitro合成した蛍光標識mRNAをインジェクションにより細胞内に導入し、一分子のmRNAの動態を高感度に検出することに成功した。2003年度は、細胞内で内在性mRNAの蛍光標識を行うために、2つの手法を検討した。一つはmolecular beacon (MB)である。MBは、標的とするmRNAに相補的なループ部位と内部2本鎖を形成するステム部位からなる合成核酸であり、その末端には蛍光分子と消光分子(quencher)が結合している。MBは標的mRNAに結合することによって初めて蛍光を発することから、S/Nの優れた核酸標識手法であると期待されている。しかし、細胞内では内在性ヌクレアーゼによる分解が障害となり、その利用は試験管内に限定されていた。そこで我々はヌクレアーゼ耐性をもつ2'-O-Methyl修飾したMBを用いることにより内在性mRNAの標識を試みた。2'-O-Methyl MBは標的mRNAに結合することで蛍光強度が約10倍に増大し、解離時間も観察に十分であることが確かめられた。ただし、標的mRNAへの結合速度が遅くリアルタイム検出には適していなかった。今後は、PNA(peptide nucleic acid)を用いたMBによりこの問題点を克服したいと考えている。もう一つの内在性mRNAの蛍光標識法として、特定のRNA配列(tagged mRNA)に対して結合能をもつRNA結合タンパク質と緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合させたものを細胞内に発現させる方法も検討した。その結果、in vitroにおけるアッセイでは、このGFP融合RNA結合タンパク質がtagged mRNAに結合することがわかった。現在、細胞内でのラベリングの成否を検討中である。(2)DNAの断片化を蛍光色素で検出する試みのひとつとして、一本の核酸内の3つの部位をそれぞれ異なる3色の蛍光色素で染め分け、これが分解されたことを観察できる系を開発した。3色を同時観察するために、エバネッセント型1分子蛍光顕微鏡システムの結像部分に分光のためのプリズムを組み込んだ。これにより複数波長の蛍光を1分子レベルで同時に観察することができるようになった。

「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」では、金属錯体プローブを用いた生命現象観察の対象として以下の現象を見い出した。

①一酸化炭素(CO)プロジェクト：虚血心筋で、細胞内CaがL型Caチャンネルを介して上

昇しCa依存性プロテアーゼを活性化し、ミトコンドリアの膜電位を変化させてネクローシスによる細胞死を促進していることを明らかにした。

②TNF- $\alpha$ プロジェクト：金属錯体プローブ蛍光を用いた時間分解蛍光測定法を用いて、TNF- $\alpha$ の測定法を確立し、ラットの短時間虚血心筋のTNF- $\alpha$ が上昇すること、ミトコンドリアが膨化し傷害されること、このTNF- $\alpha$ 上昇とミトコンドリア傷害を、短時間虚血再灌流によるIschemic Preconditioning (IP)やp38MAP kinase阻害剤が、転写後の段階で抑制することを見出した。

③eNOSプロジェクト：短時間虚血後再灌流時、内皮型一酸化窒素(NO)産生酵素酵素(eNOS)のSer1177残基のリン酸化によるNO産生が亢進し血管が拡張すること、長時間虚血再灌流時にeNOSのリン酸化が活性酸素・Protein Kinase C (PKC)・エンドセリン-1を介して阻害され欠陥が閉じることを明らかにした。

④コネクシン・プロジェクト：心筋間のGap Junction (GJ)や細胞膜のhemichannel (HC)を構成し、不整脈の発生等に関与するConnexin-43 (Cx43)が短時間虚血後、培養心筋細胞で増加し、GJやHCのチャンネル機能が上昇することを見出した。

### 3. 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

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

- Zhang, G., T. Tanii, T. Zako, T. Funatsu, and I. Ohdomari. 2004. The immobilization of DNA on microstructured patterns fabricated by maskless lithography. *Sensors and Actuators B*. 97: 243-248.
- Zhang, G.-J., T. Tanii, T. Funatsu, and I. Ohdomari. 2004. Patterning of DNA nanostructures on silicon surface by electron beam lithography of self-

assembled monolayer. Chem Comm. in press.

- Yoshida K, Uemura K, Takeichi H, Kawai K, Kikuch Y. Investigation of deaths in prison in Japan. The Lancet 2003; 362(9387): 921-922.
- Uemura K, Aki T, Yamaguchi K, Yoshida K. Protein kinase C-  $\epsilon$  protects PC12 cells against methamphetamine-induced death: possible involvement of suppression of glutamate receptor. Life Sci 2003; 72: 1595-1607.
- Uemura K, Hoshino S, Uchida K, Tsuruta R, Maekawa T, Yoshida K. Hypothermia attenuates delayed cortical cell death and ROS generation following CO inhalation. Toxicol Lett 2003; 145(2): 101-106.
- Uemura K, Sorimachi Y, Yashiki M, Yoshida K. Two fatal cases involving concurrent use of methamphetamine and morphine. J Forensic Sci 2003; 48: 1179-1181.
- Ueyama T, Senba E, Kasamatsu K, Hano T, Yamamoto K, Nishio I, Tsuruo Y, and Yoshida, K. Molecular mechanism of emotional stress-induced and catecholamine-induced heart attack. J Cardiovasc Pharmacol 2003; 41, S115-S118.
- Shiraishi K, Yoshida K, Fujimiya T, Naito K. Angiotensin II dependent testicular fibrosis and effects on spermatogenesis after vasectomy in the rat. J Urol. 2003; 170: 2104-2108.
- Aki T, Yoshida K, Mizukami Y. The mechanism of alphaB-crystallin gene expression by proteasome inhibition. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 311: 162-167.
- M. Kobayashi, H. Kimura, J. Liao, M. Abe, S. Hirose, Y. Tomino: Measurement of Mouse Urinary Type IV Collagen Using Time-Resolved Fluoroimmunoassay. Anal Sci, 19, 205-210, 2003.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）