

生理活性物質を特異的に認識するハイブリッド型蛍光プローブ作製技術の開発と応用

チームリーダー 廣瀬謙造（東京大学大学院医学系研究科・教授）

Keyword ハイブリッド型蛍光プローブ、ハイスループット技術、分子イメージング

タイプ 要素技術タイプ

開発課題名 多分子ライブイメージングを可能とする蛍光プローブの開発

■ 参画機関：なし

■ 開発期間：平成21～24年度（予定）

課題概要

蛍光プローブを用いて分子を可視化する蛍光イメージング技術が近年注目されている。本開発では、観測対象分子に結合するタンパク質と蛍光色素の複合体からなるハイブリッド型蛍光プローブをハイスループットに作製する系を構築し、さまざまな色（蛍光波長）の蛍光プローブを迅速・簡便に作製する技術を開発する。この技術開発により、生きた細胞で複数の分子を同時にイメージングする技術が確立し、新薬開発や生命科学研究への貢献が期待できる。

得られた開発成果の概要

■ 開発の背景／経緯

分子イメージングとは、生体内での標的分子のダイナミクスを可視化する技術であり、生命科学・医学研究において重要な役割を果たしている。特に、蛍光顕微鏡を用いたイメージング技術は、色もなく目には見えないサイズの分子を優れた時空間分解能で描出することが可能である。その際に、標的分子と結合もしくは反応することにより蛍光特性を変化させる蛍光プローブが重要なツールとして大きく注目されている。

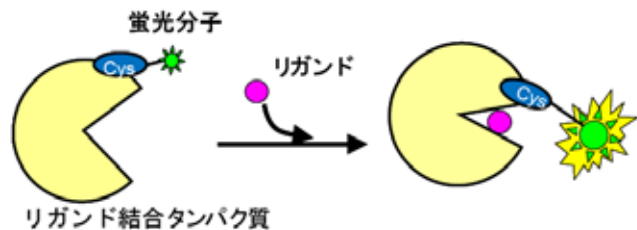
蛍光プローブは、フルオレセインなどを基にした有機小分子型とGFPなどを基にした蛍光タンパク質型に分類される。有機小分子型蛍光プローブは、精密設計により大きな蛍光特性変化をもたらすことが可能であるが、光学活性を持つアミノ酸や糖などの標的分子を特異的に認識させることが難しい。一方、蛍光タンパク質型蛍光プローブは、GFPやその変異体とリガンド結合ドメインから構成され、標的分子を特異的に認識することが可能であるが、大きな蛍光特性変化を得ることは難しい。このように両者の特性は相反するものであるが、本開発では、独自のハイスループット作製技術の開発により、両者の特長を活かしたハイブリッド型蛍光プローブの開発を行った。

■ 開発の成果

ハイブリッド型蛍光プローブは、リガンド結合タンパク質に有機小分子蛍光色素を標識することによって作製し、リガンドの結合時にリガンド結合タンパク質に生じる構造変化を蛍光色素が鋭敏に捉えることで蛍光特性が変化する（図1）。高性能なハイブリッド型蛍光プローブの作製において、蛍光色素の導入位置が重要となるが、リガンド結合時の構造変化を捉えるのに最適な位置を予測することは困難である。本開発では、蛍光色素の導入位置を網羅的に変えたハイブリッド型蛍光プローブのハイスループット作製技術（図2）を確立し、一例として神経伝達物質であるグルタミン酸に対する高性能な蛍光プローブを開発した。開発した蛍光プローブを用いることにより、小脳スライス標本において神経線維への刺激に応じてシナプス外に漏れ出したグルタミン酸のイメージングに世界で初めて成功した（図3）。

本技術を用いて、グルタミン酸の他、ATPやグルコースなどに対する高性能なハイブリッド型蛍光プローブの開発にも同様に成功している。さらに、蛍光プローブ作製の際に蛍光波長の異なった色素を用いることにより、蛍光プローブのマルチカラー化を行い、神経細胞におけるグルタミ

ン酸とATPの二分子同時イメージングにも成功している。これらの成果は、従来技術では成し得なかった分子イメージングを可能とし、生命科学において新たな知見を得ることに貢献すると十分に期待できる。



タンパク質内の最適な個所に蛍光色素を標識することでリガンドの結合を検出できる。

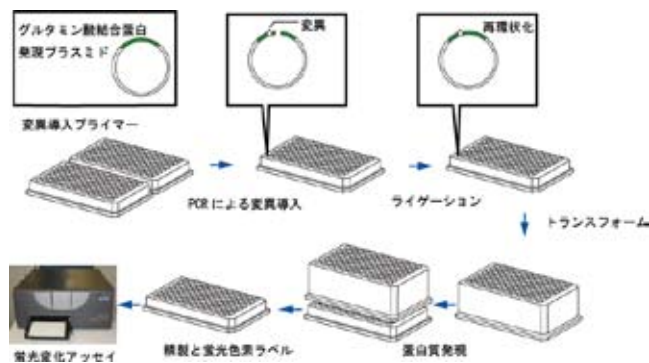


図2 ハイブリッド型蛍光プローブのハイスループットスクリーニングによる開発のスキーム

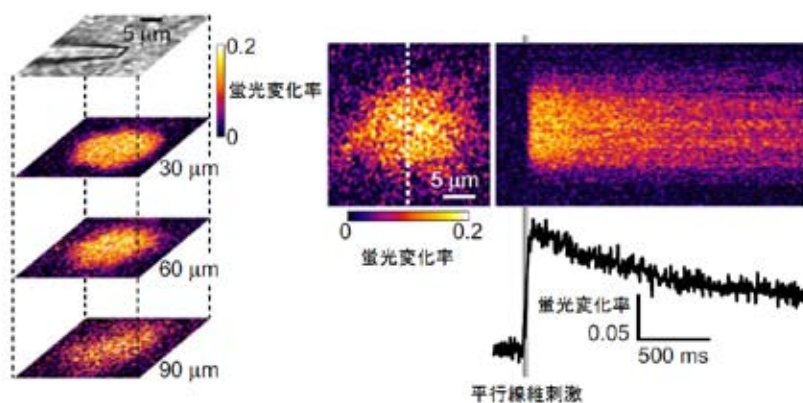


図3 小脳スライス標本におけるグルタミン酸イメージング (左図) 小脳スライス標本の深部におけるグルタミン酸動態。(右図) 平行線維刺激時にシナプスから漏洩したグルタミン酸の空間的広がりや経時変化。

多分子ライブイメージングによる生命現象の解明に貢献

本開発で確立したハイスループット作製技術は、自動液体分注機を導入したシステムを構築することで、ハイブリッド型蛍光プローブを高効率かつ簡便に作製し、それらの性能評価を迅速に行うことが可能である。本システムでは、蛍光プローブ候補を700種類作製する一連の工程を5日で完了することができ、これまで半年以上は掛かると考えられていた蛍光プローブの作製期間を1か月以内へと大幅に短縮することができた。また、ハイブリッド型蛍光プローブの開発により、従来リアルタイムに可視化することが困難であった種々の生理活性分子の検出が可能となり、さらには、導入

する蛍光色素の蛍光波長を選択することで蛍光プローブのマルチカラー化も実現できる。

本開発の成果によって、生体において複数の生理活性分子の時空間情報を可視化する多分子ライブイメージングが実現可能となる。これまで1種類の蛍光プローブにより1種類の標的分子のダイナミクスを可視化するイメージングがほとんどであったが、多分子ライブイメージングにより、生命現象の複雑な本質を詳細かつ簡便に解析することが可能となり、多くの細胞機能や病態の分子基盤を解明することに役立つと期待できる。

上記成果の科学技術的根拠

【発表論文等】

1. S. Namiki, H. Sakamoto, S. Iinuma, M. Iino & K. Hirose. "Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission", *Eur. J. Neurosci.* 25, 2249-2259, 2007.
2. Y. Okubo, H. Sekiya, S. Namiki, H. Sakamoto, S. Iinuma, M. Yamasaki, M. Watanabe, K. Hirose & M. Iino. "Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 6526-6531, 2010.