

「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 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、すでに、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、それを標識剤として用いた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ている。本年度は、細胞のイメージングに使用するプローブの構築へのデータ集積として、マイクロアレイ上、96ウェルプレートでの1塩基変異の判別をモデルとして、引き続き希土類蛍光錯体DTBAT-Eu³⁺の標識剤への評価を行なった。DTBAT-Eu³⁺の細胞染色への応用として、免疫染色のような間接的な染色と配位子の細胞への吸着（直接染色）について検討した。新規希土類蛍光錯体の開発は、EuとTbに配位して蛍光を発する錯体を合成した。それに加え、DTBAT-Eu³⁺の誘導体として、dTUPやオリゴDNAと結合させた化合物を合成した。

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- α 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。感染症や虚血病態に酸化ストレスが寄与することが注目されている。酸化ストレスは、脂質過酸化反応を生じる。一方、一酸化窒素(NO)は、NO酸性酵素(NOS)により産生される。種々の病態に脂質過酸化やNO産生障害が重要な役割を果たしている。過酸化脂質の一つ4-hydroxynonenal(HNE)に対する高感度で多数の検体を測定できる時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)を開発した。このTR-FIA法により、感染症初期のHNEの体内動態などに関する新知見を複数得るこ

とができた。また、この測定法に用いる希土類Europium 錯体を指標として、時間分解蛍光撮影装置を開発し、特異性の高い画像を得ることに成功した。また、虚血後再灌流時、血管の拡張や収縮にNO産生酵素（NOS）の活性調節が大きな役割を担っており、活性酸素がNOS活性に拮抗的に働くことを見出した。

一酸化炭素(CO)は、中毒の最多の原因物質であり、COは虚血病態を増悪すると考えられている。しかし、COが虚血時、L型Ca²⁺チャンネルを介した細胞外Ca²⁺流入を抑制することによって、細胞死を抑制することが明らかとなった。

GRP78は、小胞体ストレスにより誘導される分子シャペロンである。狭心症を模した短時間虚血再灌流反復(Ischemic preconditioning: IP)により、続く虚血中短時間でGRP78が誘導され、細胞死を抑制することを見出した。また、このGRP78が、早期の感染症モデルで脂質過酸化と関連して誘導されることを見出した。

以上の成果を基に、今後、上記希土類蛍光錯体を標識剤として用い、遅延蛍光測定法の細胞・組織のイメージングを検討してゆく。

2. 研究実施内容

「ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用」では、c-Ha-ras codon12の1塩基変異の検出を題材として、PNAプローブを用いた96-ウエルプレートの系とligase-based assayを用いたマイクロアレイ型デバイスの系で、標識剤としての希土類蛍光錯体DTBTA-Eu³⁺と遅延蛍光観察装置の評価を行なった。どちらの系も、正常型(Gly)と変異型(Val)のコドンを持つ細胞由来のゲノムのPCRアンプリコンの分析を行なったところ、それぞれの塩基型に相当するプローブにおいて他の遺伝子型のプローブに比べて優位に高いシグナルが得られた。このことより、DTBTA-Eu³⁺は標識剤として使用できることが確認された。一方、本標識剤を用いて、組織(細胞)染色への応用も並行して検討した(「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」の課題との連携)。本年度は、錯体部分の細胞標本への挙動の把握と免疫学的手法をもちいた組織染色において評価を行なった。本錯体は、単独で細胞標本に対して染色性を示すが、ストレプトアビジンに標識をした場合、ビオチン・アビジン系と抗体を組み合わせた組織染色においては、分析に支障となるような非特異的な染色等は特に観察されなかった。

新規希土類蛍光錯体の開発として、多色化という観点からユウロピウムとテルビウムと錯体を形成し、蛍光を発する新規環状配位子の合成に成功した。また、希土類蛍光錯体DTBTA-Eu³⁺の応用として、末端アミノ基修飾DNAとの反応に成功し、その条件を確立した。さらにDTBTA-Eu³⁺と逆転写酵素やポリメラーゼの基質となるdUTPとの反応に成功した。

「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、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という課題で、以下の成果が得られた。in vitroで合成し蛍光標識したfushitarazu pre-mRNAをマイクロインジェクションによりHeLa細胞の核内に導入し、mRNAの核内の局在と核外輸送の定量を行った。インジェ

クシオン直後のpre-mRNAはスペックル状に局在し、スプライシングに伴って1時間で核外に輸送された。外来性のmRNAであっても、スプライシングのプロセスを経ることにより、内在性のmRNAと同様の輸送経路によって運ばれることが示された。また、転写阻害剤を加えると核外輸送が抑制され、転写と核外輸送が密接に共役している可能性を示した。次に、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。一つはヌクレアーゼ耐性をもつ2'-O-Methyl RNAと2重らせんを形成させる方法である。C-fos mRNAに相補的な配列をもつ近接する2つの2'-O-Methyl RNAを合成し、それぞれに異なる蛍光色素を結合させて蛍光共鳴エネルギー移動を利用して溶液中で高感度に検出した。mRNAを標識するための第二の方法は、ウイルス由来のRNA結合タンパク質 (MS2) を利用する方法である。actin RNAにMS2が結合する配列を入れておき、MS2とGFPの融合タンパク質を細胞内で発現させ、細胞内のactin RNAを蛍光標識することに成功した。さらに、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という課題で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。核酸の分解に伴うスペクトル変化を1分子レベルで検出することに成功した。

「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」では、以下の1) および2) について検討した。

1) 過酸化脂質4-hydroxynonenal (HNE)の高感度時間分解蛍光免疫測定法(TRFIA)の開発と、感染症モデルにおける病態解析 (木村ら)

- ① Lipo-polysaccharide(LPS)投与ラット血中HNEの上昇：脂肪酸は酸化ストレスによりを生じる。LPSは、細菌の内毒素主成分であり、ラットに注射することにより感染症や肺血症のモデルを提供する。このモデルで、従来のELISAより約100倍感度の高いTRFIAを用いて、血中HNE濃度を測定した。HNEは、LPS投与20分後をピークとして一過性に高度に上昇した。その発生源は、単球のNADPH oxidaseであった。
- ② LPS投与ラットの肝臓HNE生成とGRP78の誘導：LPS投与ラットの肝臓でLPS投与1時間以降HNEが増加した。細胞分画法と免疫組織染色により、小胞体でHNEが生成しており、小胞体ストレスで誘導される分子シャペロンであるGRP78が誘導された。NADPH oxidaseやミトコンドリアの阻害剤によりHNE生成やGRP78の誘導が抑制された。したがって、LPS投与によって、肝臓の小胞体で酸化ストレスが増生し、資質過酸化物質HNEを生じ、小胞体ストレスも同時に生じてGRP78を誘導したものと思われる。
- ③ LPS投与ラットの十二指腸におけるHNE発生：形質細胞は腸管粘膜において、IgA抗体を分泌し腸内細菌の侵入を防ぐ。LPS投与後早期に十二指腸血管内と粘膜にある形質細胞や周囲組織のHNE染色性が増加し、分泌されたIgAがHNE化されていることを見出した。また、Eu錯体を用いた、非特異反応が弱く感度が高い免疫学的時間分解蛍光顕微鏡を開発した。

- ④ 卵巣摘出ラットにおけるHNEの増加：閉経後の女性の虚血性心疾患や脳出血の発症率・死亡率が激増することが知られている。そのモデルである卵巣摘出ラットの血中のHNE濃度が非摘出ラットに比べて高く、エストロゲン補充により、低下することを見出した。このことより、卵巣摘出や閉経によって体内の酸化ストレスや脂質過酸化が亢進していること、エストロゲンがこれを抑制することが見出された。若年女性と閉経後の女性の比較においても同様であった。今後、このモデルが、閉経後女性の動脈硬化や虚血性心疾患の発症増加に繋がる病態の検討に使えると思われる。

2) 虚血再灌流モデルにおける内皮型一酸化窒素産生酵素(eNOS)活性と血管径調節機構：

私達は、短時間虚血後再灌流でeNOSのSer1177残基がPI3 kinase/Aktによるリン酸化により活性化され冠細小動脈が拡張すること、長時間虚血後再灌流では、NADPH oxidaseによる活性酸素生成、Protein Kinase C(PKC) 活性化を介してeNOSのSer116、Thr495残基がリン酸化されることにより活性が抑制され、細動脈が収縮することを見出した。この研究では、新たに、酸素限局を組織に挿入して酸素消費量をモニターする装置を導入し、虚血と、再灌流時の血流増加や低下と、免疫組織学的に血管径とeNOSのリン酸化、NO結合型guanylate cyclase活性との相関を確認できた。

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
 1. 装置の開発（本年度は評価を中心に実施）
 2. 希土類蛍光錯体DTBTA-Eu³⁺のイメージングへの応用
 3. 新規希土類蛍光錯体標識剤の開発

船津グループ

- ① 研究分担グループ長：船津 高志（東京大学大学院薬学系研究科、教授）
- ② 研究項目：
 1. 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
 2. 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
感染症や虚血の病態における脂質過酸化や細胞死に関する研究
 - (1) 過酸化脂質4-hydroxynonenal (HNE) の高感度時間分解蛍光免疫測定法の開発と、感染症モデルにおける病態解析（順天堂大学医学部講師 木村博子ら）

- (2) 虚血再灌流モデルにおける内皮型一酸化窒素産生酵素 (eNOS) 活性と血管径調節機構 (東大大学院医学系研究科教授 吉田謙一ら)
- (3) 一酸化炭素 (CO) の虚血心筋保護作用 (東大大学院医学系研究科助手 上村公一ら)
小胞体分子シャペロンGRP78の虚血プレコンディショニングによる誘導と、細胞死抑制効果 (東大大学院医学系研究科助手 新谷香ら)

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

- Okochi, M., T. Nomura, T. Zako, R. Iizuka, H. Ueda, T. Funatsu, M. Leroux, and M. Yohda. 2004. Kinetics and binding sites for interaction of prefoldin with group II chaperonin: contiguous non-native substrate and chaperonin binding sites in archaeal prefoldin. *J. Biol. Chem.* 279: 31788-31795.
- Zako T., T. Funatsu, and M. Yohda. 2004. Kinetic analysis of interactions between archaeal prefoldin and chaperonin. *Recent Res. Develop. Biophys.* 3: 475-483
- Nonaka, S., M. Tsunoda, K. Imai, and T. Funatsu. 2005. High-performance liquid chromatographic assay of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G, N^G -dimethyl-L-arginine, and N^G, N^G -dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J. Chromatogr. A*, 1066: 41-45.
- Hirano, Y., M. Tsunoda, T. Funatsu, and K. Imai. 2005. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 819: 41-46.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数 : 3 件 (CREST研究期間累積件数 : 3 件)