

「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、希土類蛍光標識剤 DTBTA-Eu³⁺を用いて細胞染色を試みた。既存の有機系蛍光標識剤と組み合わせ、多重染色が可能であることが確認できた。また、希土類蛍光標識剤 DTBTA-Eu³⁺と被標識物との反応を検討し、タンパク質、アミノ基末端修飾 DNA への標識方法を確立した。さらに、新規の希土類蛍光錯体として、これまでよりも長波長側に励起極大波長をもつ錯体を開発した。

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、in vitro で合成し蛍光標識した fushitarazu 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。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、a)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とb)ウイルス由来の RNA 結合タンパク質(MS2)を利用する方法を検討した。

③では、希土類錯体標識剤を用いた時間分解蛍光イムノアッセイ(TR-FIA)による高感度 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)測定法を確立し、ラットの病態モデルで有効性を検討した。さらに、臨床検体の測定に応用しようとしている。また、時間分解蛍光測定顕微鏡を開発し、その有効性を検討した。TR-FIA では従来型 ELISA に比べて、約 100 倍の感度を得て、感染症モデルラットの血清、肝臓・腸管の細胞分画の HNE を測定し、加えて、時間分解蛍光顕微鏡による免疫組織学的検討により、HNE 発生源(器官、細胞、酵素など)を特定し、その病態機能を一部解明できた。また、HNE 修飾蛋白をプロテオミックス技術を用いて同定できた。既に、心不全等の病態との関連性に関する知見を得つつある。今後、病態モデルでの研究とあわせて、ヒト病態における酸化ストレスの関与を知り、病態を評価・分析するとともに、薬剤・生活指導などの効果判定の指標としての有効性につき検討する。臨床、及び病態研究への大きな貢献が期待される。

2. 研究実施内容

先の項目で述べた本研究課題の3つの研究項目、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」の順に研究実施内容を記載する。

まず、①では、細胞標本の染色を行なった。既に本研究課題では、ビオチン標識したプローブ（抗体や核酸など）を希土類蛍光錯体 DTBTA-Eu³⁺を標識したストレプトアビジン(SA)で検出するシステムを確立しており、染色像の可視化にも本システムを用いた。種々の検討の結果、ビオチン化ファロイジン／DTBTA-Eu³⁺ - SA、マウス抗チューブリン抗体／AlexaFluor488 標識抗マウス抗体および DAPI によって、アクチン、チューブリン、核の三重染色を行なうことができた（図1）。また、予備検討として、時間分解蛍光観察によっても染色像を得ることができた。

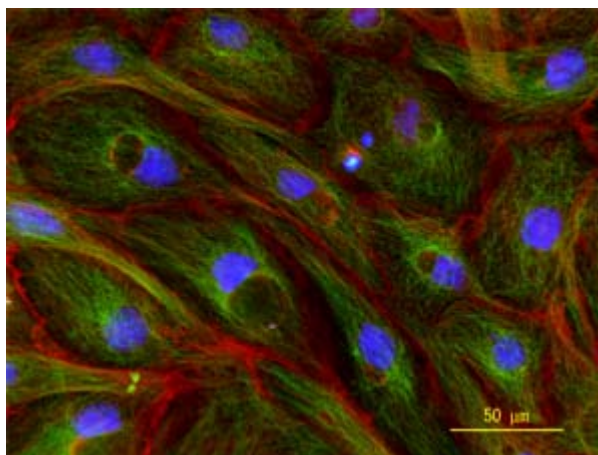


図1 細胞染色

赤色:アクチン染色(DTBTA-Eu³⁺)

緑色:チューブリン染色
(AlexaFluor488)

青色:核染色(DAPI)

次に、希土類蛍光標識剤 DTBTA-Eu³⁺と被標識物との反応を検討した。これまでに、タンパク質であるストレプトアビジンについてはすでに標識方法を確立していたが、アミノ基末端修飾 DNA への標識は、その効率が十分ではなかった。このことは、DTBTA-Eu³⁺の活性が非常に高く、容易に加水分解されるためであると考え、活性化のプロトコル、反応の溶媒組成を検討することで、アミノ基末端修飾 DNA への標識方法を完成させた。

さらに、新規の希土類蛍光錯体として、ビフェニルテルピリジン部位とビスピラゾリルピラジン部位を持つ環状配位子を合成し、その希土類イオンとの錯体の蛍光特性を評価した。当初目的としていたテルビウム錯体での発光強度はあまり強くなかったが、ユウロピウム錯体では比較的強い蛍光を発し、両者の錯体ともこれまでの BPTA-Tb³⁺や DTBTA-Eu³⁺よりも長波長側(360 nm)に励起極大波長をもつことがわかった。

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」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ために、以下の技術開発を行った。まず、in vitro で合成し蛍光標識した fushitarazu 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。予めイントロンを除いて合成した mRNA をインジェクションしたところ核内全体に分布した。一方、イントロンを含む pre-mRNA をインジェクションしたところ、スペckル構造に局在し、スプライシングに伴い10分で核外に輸送された。以上の結果は、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を示している。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。

③「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」では、希土類蛍光標識を 1) 感染症モデルにおける HNE 測定法、免疫組織学的検討による HNE の病態機能の解明と 2) 生活習慣病関連疾患の酸化ストレスマーカーとしての HNE の病態解析への応用という研究課題へ希土類蛍光標識を使用した。

1) 感染症モデルにおける HNE 測定法、免疫組織学的検討による HNE の病態機能の解明

希土類錯体標識剤(BHHCT-Eu)を用いた時間分解蛍光イムノアッセイによる HNE 測定法を確立し、感染症モデルラットの血清、組織の HNE を測定した結果、通常型 ELISA の約 100 倍の感度を有していた。細胞分画の HNE 測定に加えて、免疫組織学的検討により、HNE 発生源である臓器、細胞、小器官、酵素等を特定し、その病態機能を推察できた。

2) 生活習慣病関連疾患の酸化ストレスマーカーとしての HNE の病態解析への応用

女性の心血管病発症リスクが、閉経後に急増し、心理ストレスが心血管病発症の引き金を引く。そこで、若年・閉経女性に心理ストレスを負荷し、血中 HNE を測定した。閉経女性では、心理ストレス負荷により拡張期血圧の上昇が著しく、回復期にも持続し、血中 HNE が回復期に著増していた。また、臨床において、心不全、生活習慣病の患者の血中 HNE を測定し始めており、有効性を示唆するデータを得ている。また、閉経モデルである卵巣摘出ラットにおいて、内臓肥満とインスリン抵抗性を見出した。このモデルにおいて、生活習慣病における酸化ストレスや HNE の関与について検討する。

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（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：
 - 1. 虚血などによる心筋細胞死の分子機構に関する研究
 - 2. 4-Hydroxynonenal (HNE)の時間分解蛍光イムノアッセイ、及び DTBTA-Eu³⁺標識による HNE 等の免疫組織学的検出法を利用した、感染症モデル及び生活習慣病の病態解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Nishioka T., Yuan J., Yamamoto Y., Sumitomo K., Wang Z., Hashino K., Hosoya C., Ikawa K., Wang G., and Matsumoto K. New Luminescent Europium(III) Chelates for DNA analysis. *Inorg. Chem.*, in press.
- Zako T., R. Iizuka, M. Okochi, T. Nomura, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yohda and T. Funatsu. Facilitated release of substrate protein from prefoldin by chaperonin. *FEBS Lett.* **579**: 3718-3724 (2005)
- Shirasaki, Y., J. Tanaka, H. Makazu, K. Tashiro, S. Shoji, S. Tsukita, and T. Funatsu. On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermo-reversible gelation polymer to control flow. *Anal. Chem.* **78**: 695-701 (2006)
- Tokunaga, K., T. Shibuya, Y. Ishihama, H. Tadakuma, M. Ide, M. Yoshida, T. Funatsu, Y. Ohshima, and T. Tani. Nucleocytoplasmic transport of fluorescent mRNA in living mammalian cells: Nuclear mRNA export is coupled to ongoing gene transcription *Genes to Cells.* **11**: 305-317 (2006).
- Terada, N., H. Tadakuma, Y. Ishihama, M. Yamagishi, T. Zako, and T. Funatsu. Analysis of

Nuclear Microenvironments by Translational Diffusion of GFP Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. bioimages. in press.

- Yoshida K, Uemura K, Shintani-Ishida K. Calpain in myocardial ischemia-reperfusion and related diseases. Molecular Mechanism of Heart Diseases. 149-165 (2005)
- Uemura K, Fujimiya T, Ohbora Y, Yasuhara M, Yoshida K. Individual Differences in the Kinetics of Alcohol Absorption and Elimination: A Human Study. Forensic Sci Med Pathol 1: 27-30 (2005)
- Uemura K, Adachi-Akahane S, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Carbon monoxide protects cardiomyogenic cells against ischemic death through L-type Ca²⁺ channel inhibition. Biochem Biophys Res Commun 334: 661-668 (2005)
- Hoshino S, Kikuchi Y, Nakajima M, Kimura H, Takenaka S, Uemura K, Yoshida K. Endothelial NO synthase (eNOS) phosphorylation regulates coronary diameter during ischemia-reperfusion in association with oxidative stress. Free Radic Res. 39: 481-489 (2005)
- Sakurada K, Sakai I, sekiguchi L, Shiraishi T, Ikegaya H, Yoshida K. Usefulness of a latex agglutination assay for FDP D-dimer to demonstrate the presence of postmortem blood. Int J Legal Med.119: 167-171 (2005)
- Ohnishi ST, Ohnishi T, Muranaka S, Fujita H, Kimura H, Uemura K, Yoshida K, Utsumi K. A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. J Bioenerg Biomembr.37: 1-15 (2005)
- Yoshioka N, Adachi J, Ueno Y, Yoshida K. Oxysterols increase in diabetic rats. Free Radic Res.39: 299-304 (2005)
- Kimura H, Liu S, Yamada S, Uchida U, Matsumoto K, Yoshida K. Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynoneal (HNE) in early endo-toxemia. Free Radic Res.39: 845-851 (2005)
- Nishio H, Takai S, Miyazaki M, Horiuchi H, Osawa M, Uemura K, Yoshida K, Mukaida M, Ueno Y, Suzuki K. Usefulness of serum mast cell-specific chymase levels for postmortem diagnosis of anaphylaxis. Int J Legal Med.2005; 119, 331-334.
- Sakurada K. Ikegaya H, Motani H, Iwase H, Sekiguch K, alutsu T, Yoshino M, Takatori T, Sakai I. JC virus genotyping can be used to narrow down the native place of persons from urine stains. Jpn. J. Forensic Sci.Tech. 10: 111-117 (2005)
- Kimura H, Nagao F, Tanaka Y, Sakai S, Ohnishi T, Okumura K. Beneficial Effects of the *Nishino* Breathing Method on the Immune Activity and Stress Level. J Altern Complement Med 11: 285-291 (2005)
- Kimura H, Matsumoto K, Mukaida M. Rapid and Simple Quantitation of Methamphetamine by Using a Homogeneous Time-resolved Fluoroimmunoassay Based on Fluorescence

- Resonance Energy Transfer from Europium to Cy5. J Anal Toxicol 29: 799-804 (2005)
- Yoshida K. Report of unusual death and the postmortem inspection system. Encyclopedia in Forensic Medicine. 123-128 (2005)
 - Kimura H, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Liu S, Matsumoto K, Yoshida K. ischemic preconditioning or p38 MAP kinase inhibition attenuates myocardial TNF a production and mitochondria damage in brief myocardial ischemia. 78: 1901-1910 (2006)
 - 吉田謙一「カルシウムオーバーロード：カルパインを中心に。特集 心臓を守れ！ 麻酔科医。」LISA. 12: 98-102, 2005.
 - 黒木尚長、吉田謙一「日英における異状死体の届出の比較（医療事故関連死を中心に）」安全医学 2 巻 12-16, 2005.
 - 手島豊、吉田謙一「対談・医療関連死—届出・解剖・死因究明 法学教室」（300 号 記念特集 21 世紀の法律学）
 - 吉田謙一「連載医療関連死：厚生労働省のモデル事業が目指す医療関連死調査の近未来とは？」病理と臨床 23:1230-1235, 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：3 件）