

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

目 次

課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用

所 属 田辺製薬株式会社 創薬研究所
研究者 嶋 秀明

分担研究者

- (1) 京都工芸繊維大学 繊維学部 村上 章
(2) 国立小児病院 小児医療研究センター 辻本 豪三

要 旨

2種類の長寿命蛍光剤を開発し、これらはいずれも容易に核酸やタンパク質を標識することができ、また標識による蛍光特性の変化も認められないことが明らかとなった。さらに、時間分解蛍光偏光解消法への応用の結果は、当初意図した均一系・夾雑物存在下の微量生体成分検出システムの開発が可能であることを示唆した。

1. 研究目的

ヒトゲノムシーケンスが終了し、それらの成果を創薬等へ応用することが企図されるようになり、遺伝子あるいは遺伝子産物（タンパク質）の機能解析が次世代のバイオサイエンスの大きな課題となっている。本研究では、遺伝子機能解析法としてのタンパク質相互作用あるいは生体分子挙動観察を容易にし、更には新規遺伝子産物に対して蛍光偏光法を用いるハイスループットスクリーニング（HTS）系の設定を可能にするような、新規長寿命蛍光標識剤を開発・応用することを目的としている。

新規薬効評価系確立のための基礎的な検討の一つとして、蛍光顕微鏡などを用いた生体分子の挙動観察が行なわれている。しかし、通常の蛍光標識剤では蛍光寿命が短いため夾雑蛍光の影響を受けやすく、また、蛍光偏光法をタンパク質などの大きな分子の挙動観察に応用し難いという問題があり、これらを解決する必要がある。また、蛍光偏光法を用いた薬効評価系においても夾雑蛍光が測定を妨害することがありこれを解決することが従来からの課題であった。

本研究において生体分子挙動観察及び蛍光偏光法に適した長寿命蛍光標識剤が得られれば、蛍光偏光法による生体分子挙動観察においては巨大分子の直接挙動観察が容易になるとともに夾雑蛍光の影響を低減でき高感度な観察が可能になる。このことによりユニークな新規薬効評価系の確立が行なえる可能性が出てくる。また、蛍光偏光法を用いた薬効評価系においては検体化合物由来の夾雑蛍光の影響を大幅に低減できるため効率よく薬効評価を行なうことができる。

これらを具体化するために田辺製薬においては、既存のピレン系蛍光剤の蛍光特性評価を行ない、望ましい蛍光特性を有するピレン系化合物を見出した。さらのこのピレン系化合物にアミノ基反応性官能基を導入した新規蛍光標識剤を合成した。得られた新規蛍光標識剤を用いてラット IgG を蛍光標識し、その蛍光特性を評価した。

京都工繊大においては、これまでに *in situ* でかつ *real time* で生体成分の検出を行うことの重要性と実現の可能性を明らかにしている。問題点としては、時間分解蛍光偏光解消装置として市販の蛍光時間分解測定装置に手を加えて代用しているため、1サンプル4時間以上を要していることである。少なくとも1サンプルが10分間以内に測定される性能が求められる。また、定常光蛍光偏光解消装置も極微量のサンプルの連続検査に用いるには不向きであり、新たな装置の開発を行う必要があるため、以上の要求に応えるようなプロトタイプの測定装置を設計することを目標とした。本プロジェクト終了後にも研究は継続し、新たな装置の開発を行う。

国立小児病院においては、特定蛋白質の生理機能の解明のために、GFP 融合蛋白質を作成して蛍光での可視化を行うことは非常に有効な方法であると考え、蛍光での可視化技術の検討を行なっている。この技術を更に進めて、特定蛋白質近傍の環境を可視化することが出来れば細胞生理機能の解明に向けて極めて有益なツールとなることが期待される。現在蛋白質の蛍光標識に広く用いられている GFP は、既に様々な変異が導入され様々な特性を持つものが入手可能な状況にある。その中の幾つかは pH に依存して蛍光強度が変化することが、また幾つかは比較的 pH に対する感受性が低いことが知られている。昨年度より、東

京女子医大の淡路博士により作成されたこれらの GFP を組み合わせた GFpH-1 と GFpH-2 の供与を受け、共同研究を開始している。この GFpH が、細胞内の特異的な蛋白質の周辺での pH を測定するプローブとなりうるかを検討し、受容体を介する細胞内のシグナルを可視化する手法にまで発展させることを目的とした。

2. 研究方法

(1) [田辺製薬] アミノ基反応性ピレン誘導体(PD-NHS)の合成

ピレン誘導体 PD (図 1) にカルボン酸を導入したピレン誘導体 PD-COOH を DMF に溶解し、これに過剰量の N-hydroxy-succinimide (NHS) を加え、さらに過剰量の dicyclohexyl carbodiimide (DCC) を添加し室温にて 2 時間反応させ、逆相 HPLC にて生成物のピークを分取・精製を行ない、マスマスペクトルにより目的物 PD-NHS であることを確認した。

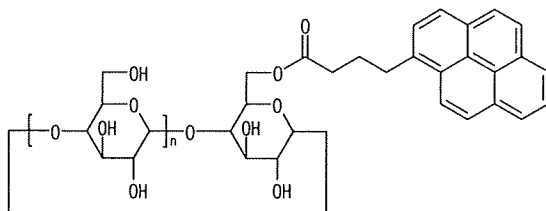


図 1. ピレン誘導体 PD の構造

(2) [田辺製薬] ピレン誘導体(PD)標識 IgG の調製

抗マウス IgG ラット IgG をセントリコン 100 にてバッファ交換し、50mM 炭酸ナトリウムバッファ (pH9.3) 溶液とし、これに PD-NHS を加え、4°C にて 16 時間攪拌した。反応後、反応液に 50mM Tris-HCl (pH8.0) を加え、これを 50mM Tris-HCl (pH8.0) によりバッファ置換した HiTrap Desalting カラム (アマシャムファルマシア社製) にアプライし、50mM Tris-HCl (pH8.0) により溶出した。各フラクションの UV スペクトルを測定してタンパク質およびピレンの吸収の認められたフラクションをピレン誘導体 (PD) 標識 IgG 溶液として用いた。この溶液に含まれるタンパク質量は BioRad 社製のタンパク質量キットを用いて定量し、ピレン含量は 345nm の吸光度から求めた。

(3) [京都工繊大] 長寿命蛍光性金属錯体 (Metal Ligand Complex; MLC) -修飾 DNA プローブの調製

5-Nitro-1,10-phenanthroline を出発物質とする 3 ステップの反応により合成した Ru(II)錯体誘導体(収率 50%)を、CDI 法によりオリゴ DNA の 5'末端に導入し MLC-プローブを得た(導入収率:80%; 図 2(A))。精製は逆相 HPLC で行い、Ru(II)錯体由来の鏡像異性体(Δ , Λ isomer)を分離した。プローブの配列は大腸菌由来 16S-rRNA の報告されている二次構造において、一本鎖領域 (L1-L5) および二重鎖領域 (S1) と相補的なものを用いた。16S-, 23S-rRNA に各 MLC-プローブを添加した系において時間分解蛍光異方性測定を行い、異方性の時間変化から各配列の MLC-プローブの回転相関時間 (θ)、すなわちプローブの運動性を評価した。

(4) [京都工繊大] ピレン誘導体(PD)標識 IgG の調製

ピレン系蛍光剤として、ピレンがリンカーを介して β -シクロデキストリンに結合した分子(PD)を合成し、さらに PD にリンカーとしてアミノ基反応性の NHS 基を導入した(PD-NHS)。ついで、抗マウス IgG と PD-NHS を反応させ、ピレン誘導体標識 IgG(PD-IgG; 図 2(B))を調製した。さらに、PD-IgG と抗原蛋白質との相互作用を定常光による蛍光異方性から評価した。

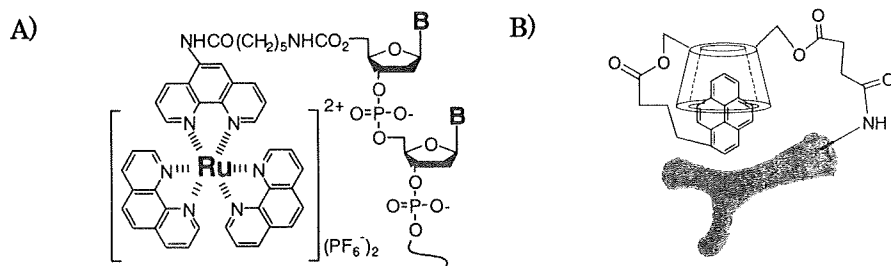


図2. 長寿命蛍光剤標識プローブの構造 A) MLC-プローブ B) PD-NHS

(5) [京都工繊大] 蛍光測定

蛍光スペクトルは蛍光光度分光計 (RF-5300PC、島津製作所; 循環型温度コントローラー付) を用いて測定した。蛍光スペクトルの測定用試料には 0.75 μM の MLC-プローブ溶液 (100mM NaCl、1mM MgCl₂ を含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)) を用いた。定常光蛍光偏光解消の測定は蛍光光度分光計 (RF-5300PC、島津製作所; 循環型温度コントローラー付) を用いて測定した。蛍光寿命ならびに時間分解蛍光偏光解消の測定は蛍光寿命測定装置 (NAES-550、堀場製作所; 循環型温度コントローラー付) を用いて測定した。励起側に B-390 (320-490nm を透過) カットフィルターを、また発光測定側に Y-52 (520nm より長波長側を透過) カットフィルターを装着した。

(6) [京都工繊大] 解析

蛍光異方性は (1) 式に従って算出した。

$$r = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}} \dots \dots \dots (1)$$

$$= \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \dots \dots \dots (2)$$

ここで I_{vv} : 発光の垂直偏光成分、 I_{vh} : 発光の水平偏光成分、 G : 装置補正係数、 r_0 : 分子運動が無い場合の蛍光異方性、 θ : 回転相関時間である。蛍光寿命は堀場製作所 NAES-550 に付属のプログラム (最小二乗デコンボリューション法) により算出し、回転相関時間 θ は (3) 式に従って算出した。

$$r(t) = \frac{[I_{vv}(t) - G \cdot I_{vh}(t)]}{[I_{vv}(t) + 2 \cdot G \cdot I_{vh}(t)]}$$

$$= \sum a_i \cdot \exp(-t/\theta) \dots \dots \dots (3)$$

ここで $I_{vv}(t)$: 発光の垂直偏光成分の時間変化関数、 $I_{vh}(t)$: 発光の水平偏光成分の時間変化関数、 G : 装置補正係数、 θ : 回転相関時間である。

(7) [国立小児病院] プラスミドの作成

東京女子医大の淡路博士らの作成した GFpH-1、GFpH-2 をもちいて、これらを α1 アドレナリン受容体 C 末端に融合させた発現用コンストラクト、および、GST の C 末端側に融合させた大腸菌発現用コンストラクトを作成した。さらに、ミトコンドリア、ER、Golgi へ特異的に輸送されるシグナル配列を付加した GFpH-1、GFpH-2 の発現用コンストラクトを作製した。

(8) [国立小児病院] 組み替え蛋白の発現と精製

大腸菌 BL21 株に導入した、GST-GFpH-1、GST-GFpH-2 を IPTG により誘導発現した。大腸菌を超音波により破碎後、遠心上清を回収し、グルタチオンセファロース 4B に GST 融合蛋白を吸着させ、グルタチオンにより溶出することで精製を行った。精製産物は Centricon により濃縮及び緩衝液の交換を行い、保存した。

(9) [国立小児病院] 蛍光スペクトルの測定

精製した GST-GFpH-1 および GFpH-2 を、各 pH 条件下での 520nm での励起スペクトルと、380nm、400nm、480nm の励起による蛍光スペクトルを測定した。測定には、日本分光製 FP-750 蛍光分光光度計をもちいた。

(10) [国立小児病院] 細胞の作成と培養

PeakS 細胞または CHO 細胞に、GFpH-1 または GFpH-2 を含むコンストラクトを CMV のプロモーター下流に挿入した発現ベクターを電穿孔により導入し薬物によりセレクションをした。1 週間のセレクションの後、GFP の蛍光を指標にフローサイトメトリーによりソーティングを行い、クローンを単離し培養した。

(11) [国立小児病院] 蛍光顕微鏡測光

ガラスボトムチャンバー上に培養した生細胞を観察した。通常の蛍光顕微鏡で、蛍光波長のフィルターは 520nm に固定し、励起波長のフィルターを切り替えながら、1 分ごとに両波長のイメージを ICCD カメラに取り込み画像解析を行った。画像解析は NIH-Image に独自に作製した script を組み合わせて行った。

3. 研究成果

(1) [田辺製薬]

反応容器にカルボキシル基を導入した PD-COOH を量り取り、攪拌しながら過剰量の N-hydroxy-succinimide (NHS) の DMF 溶液を添加した。これに過剰量の dicyclohexyl carbodiimide (DCC) の DMF 溶液を攪拌しながらさらに添加し室温にて攪拌した。反応開始後、1.5 時間後から逆相 HPLC にて生成物ピークの分取・精製を行ない、移動相を留去後、白色結晶を得た。マススペクトルにて確認したところ目的物の PD-NHS 以外に DCC の分解物である dicyclohexyl urea (DCU) が含まれることが示唆されたが、これは UV 領域において吸収を持たず、また、得られた PD-NHS が少量であること、DCU がこの後の PD-NHS とタンパク質との反応を妨害しないことが予想されるため、この白色結晶をそのままタンパク質の標識に用いることとした。

0.8mg の抗マウス IgG 抗体 (ラット IgG) と過剰量の PD-NHS の粗結晶を反応させた反応液を HiTrap Desalting カラム (5ml) にアプライし、50mM Tris-HCl (pH8.0) により溶出した。各フラクションは 5 滴ずつ分画し、UV スペクトルを測定してタンパク質及びピレンの吸収の認められた 6~8 番目のフラクションを合わせた (600 μ l)。この溶液についてタンパク質濃度を求めたところ 7.4 μ M となった。また 345nm の吸光度からピレンの濃度は 20 μ M と求められた。このことからラット IgG には 1 分子当たり平均 3.6 個のピレン誘導体 (PD) が結合したことが確認された。

PD-NHS およびピレン誘導体 (PD) 標識 IgG の蛍光寿命及び蛍光偏光特性を測定した。

その結果、蛍光寿命は、PD-NHS ; 125 ナノ秒、PD 標識 IgG (free) ; 130 ナノ秒 (図 3)、PD 標識 IgG (bound) ; 139 ナノ秒という結果が得られた。これまでピレンを直接タンパク質に標識した場合は、蛍光寿命が 70 ナノ秒にまで短くなるのがわかっており、今回、新たに得た PD-NHS はタンパク質を蛍光標識してもピレンの蛍光特性 (蛍光寿命) を変化させないという長所を持つことが明らかとなった。

また、定常光励起による蛍光偏光度は PD-NHS の場合、0.3mP であった。これに対し PD 標識ラット IgG は、抗原であるマウス IgG が共存しない場合は 16.5mP、10 倍量のマウス IgG が共存する場合は 24.3mP となり、PD 標識ラット IgG の見かけの分子量増加に従って蛍光偏光度が増加することが確かめられた。時間分解蛍光偏光度については、観測時間全体の積算値により計算すると PD 標識 IgG (free) で 4.3mP、PD 標識 IgG (bound) で 23.9mP という値を示し、見かけの分子量の増加に伴って蛍光偏光度も増加したことが確かめられた。

しかし、図 3 に示すように PD 標識 IgG (bound) の時間分解蛍光偏光度においては、パルス励起後 25 ナノ秒以降のゆっくりとした蛍光偏光度の低下だけでなく、パルス励起直後の急速な偏光度の低下が認められた。このことは、蛍光基が異なった速さの 2 種類の運動を行なっていることを示している。すなわち蛍光基のタンパク質全体のブラウン運動を反映したゆっくりとした運動だけでなく蛍光基のタンパク質に対する速い相対運動 (プロベラ効果) であると考えられる。標的とするタンパク質の挙動の変化を蛍光偏光度の変化で検出しようとする場合、このプロベラ効果の寄与が小さいほどタンパク質の挙動変化による蛍光偏光度の変化が大きくなり、より明確にタンパク質の挙動変化を検出できると考えられ、今後、プロベラ効果の寄与を小さくするリンカーを持つ蛍光標識剤を設計・合成することにより、蛍光標識剤の更なる最適化が図れるものと考えられた。

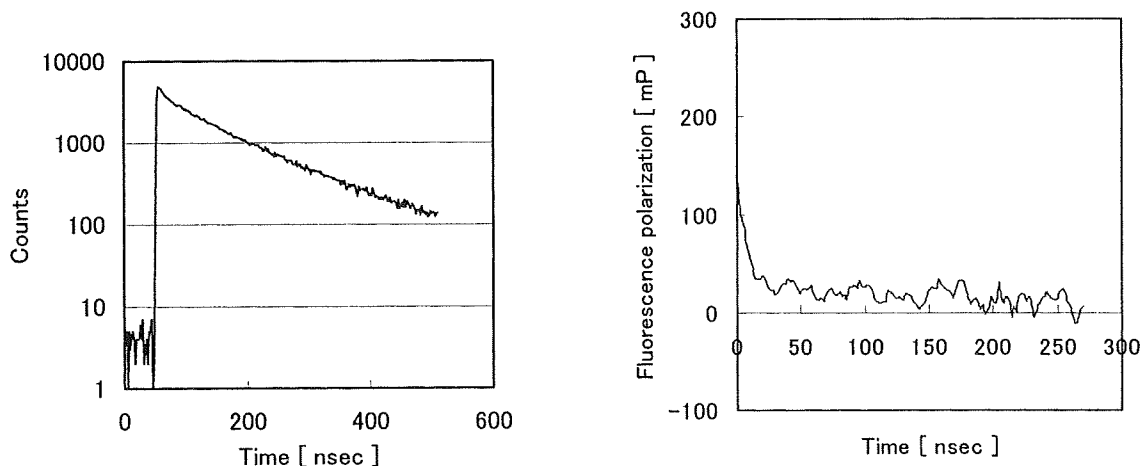


図3. PD 標識 IgG (free) の時間分解蛍光と PD 標識 IgG (bound) の時間分解蛍光偏光度

(2) [京都工繊大]

16S-rRNA はその分子量から概算して数 μsec の回転相関時間 (θ) を持つと考えられる。L1-L3 および S1 を 16S-,23S-rRNA に添加した場合の時間分解蛍光異方性測定結果を表1に示した。二重鎖領域を標的とした S1 では約 20nsec の θ 値のみ算出され、16S-rRNA と結合していないことが示唆された。また一本鎖領域を標的とした L1-L3 のうち、L1、L2 は 10-20nsec 以外にも 0.1-1 μsec の θ 値が算出されたことから、16S-rRNA と結合していることが示唆された。しかし L3 では約 10nsec の θ 値のみしか算出されなかったことから、L3 は 16S-rRNA に結合していないことが示唆された。これは一本鎖領域であっても三次元的な障害によりプローブが結合し得ない領域があることを示唆している。また 16S-rRNA に結合した L1、L2 では θ 値が互いに大きく異なっていた。これは各プローブの結合領域の運動性が反映された結果と考えられる。すなわち、L1 の結合領域は三次元的自由度が低く、L2 の結合領域は自由度が高いことが示唆された。以上より、MLC-プローブを用いることで RNA の三次構造に関する知見が得られたものと考えている。また、この結果は原理的に均一溶液中での高分子量物質の迅速かつ高感度な検出が可能であるのみならず、その運動性評価が可能であることを示している。

表1 Rotational Correlation Times of Ru-probes in the Presence of 16S-,23S-rRNA

	$\theta_1(\text{ns})$	a_1	$\theta_2(\text{ns})$	a_2	χ^2
L1- Λ	6	0.09	1200	0.05	1.05
L2- Λ	18	0.03	150	0.04	1.27
L3- Λ	9	0.14	—	—	1.75
L4- Λ	8	0.07	590	0.05	1.39
L5- Λ	29	0.08	380	0.01	1.10
S1- Λ	22	0.11	—	—	0.88

[Ru-probe] = [16S-,23S-rRNA] = 0.75 μM in 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5), 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 11°C. Filter : B390(ex), Y52(em). Rotational correlation times (θ) were estimated from anisotropy decay curves by least square deconvolution method.

PD 標識 IgG について蛍光寿命及び蛍光偏光特性を測定した。その結果、蛍光寿命は 130 ナノ秒となり、PD-NHS と同程度であった。また、蛍光偏光度は PD 標識ラット IgG の見かけの分子量増加に従って増加することが確かめられた。さらに PD-NHS は量子収率 (0.5) が高く、微細環境の影響を受けにくいとい

う特徴を有することが明らかになった。これらの知見は PD-NHS がタンパクの長寿命蛍光標識剤として有効であり、それらタンパク質の機能解析（相互作用性、安定性、運動性等）の評価に有効であることが示唆された。

(3) [国立小児病院]

GST-GFpH を大腸菌で発現したところ、十分な発現が認められ、1L の培養で 1mg 以上の精製蛋白質を得ることが出来た。得られた蛋白質の蛍光スペクトルを測定したところ、期待通りの二種の GFP の励起波長で蛍光の極大が認められている。380nm および 480nm での励起波長に固定し、pH を変えながら蛍光スペクトルの測定を行った結果、二つの波長での蛍光強度の比を用いることで、pH 計測が可能であることが明らかになった。GFpH-1 と GFpH-2 で Kd が 1 程度の差があるため、それぞれが異なる pH レンジで測定を行うことが出来ることも示された。詳細なスペクトルの解析の結果、GFpH-2 では FRET が起こり、予想されるよりもより大きな蛍光強度比の変化が観察されていることが明らかになった。さらに、この GFpH を動物細胞に発現し、蛍光顕微鏡により単一細胞レベルで蛍光の測定を行った。単純に GFpH-1 を発現させた動物細胞をもちいて、細胞膜を透過性に処理し外液の pH を変えた測定し、実際にキャリブレーションが可能なることを GFpH-1 と GFpH-2 についてまとめた結果を図 4 に示す。受容体に GFpH を融合させたコンストラクトをもちいて同様の計測装置を用いて行ったところ、受容体を刺激することにより、pH が上昇していることが、画像レベルで観察できた。GFpH にミトコンドリアへの移行シグナルを付加したコンストラクトを導入した CHO 細胞を同様の計測手法で観察したところ、ミトコンドリアに特異的に蛍光が分布すること、電子伝達系の阻害薬により、ミトコンドリア pH の低下が蛍光強度比の変化として検出できることを示すことが出来た。同様に、Golgi、ER のそれぞれの細胞内小器官への輸送シグナルを付加した GFpH コンストラクトでも、各小器官への特異的な蛍光の蓄積および、pH の計測が可能であった。

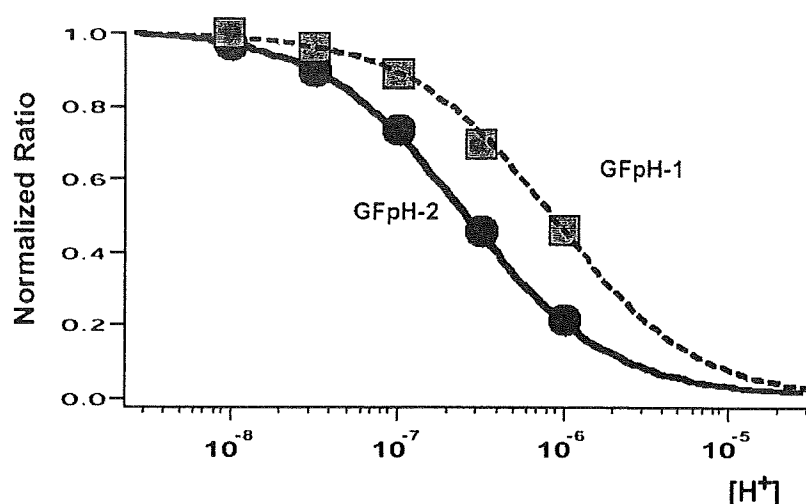


図 4. GFpH-1 および GFpH-2 発現細胞における pH キャリブレーション

4. 考 察

今回田辺製薬において得られた新規長寿命蛍光標識剤 PD-NHS は、IgG などのタンパク質に標識した場合でも外部環境の影響を受けにくく、ピレン特有の長寿命蛍光（蛍光寿命；130 ナノ秒）を保持している。このため、パルス励起直後の寿命の短い夾雑蛍光を除くための時間分解蛍光法に適していると考えられる。また、蛍光寿命の長くない FITC などの通常の蛍光標識剤では、巨大分子（IgG など）の挙動変化を検出することは困難であったが、本長寿命蛍光標識剤を用いることにより容易に挙動変化を検出出来ることから、蛍光偏光法を広い方面に応用することができると考えられた。さらに、今回得られた新規長寿命蛍光

標識剤 PD-NHS は、ピレン誘導体以外で唯一の金属錯体系蛍光標識剤に比しても量子収率が高く、蛍光標識を導入する標的分子の濃度を低くして種々の蛍光測定を行なうことができる。このことから多数の検体化合物について薬効評価を行なう際には、標的分子のタンパク質などのコストを低く抑えることができ、非常に実用的であると考えられる。

また、今回得られた新規長寿命蛍光標識剤 PD-NHS については、結合した蛍光基がタンパク質分子に対して速い相対運動（プロベラ効果）をしていることにより、蛍光偏光度変化がタンパク質自身の運動だけを反映した結果になっていないという問題も生じている。しかし、今回得られた新規長寿命蛍光標識剤 PD-NHS は、多様な修飾が可能な構造を有していることから、今後、反応活性基の導入方法等の改良を進めることにより、さらに優れた蛍光特性を有する長寿命蛍光標識剤が得られるものと考えられた。

京都工繊大においては、MLC-プローブを用いることで RNA の三次構造に関する知見が得られたものと考えている。また、この結果は原理的に均一溶液中での高分子量物質の迅速かつ高感度な検出が可能であるのみならず、その運動性評価が可能であることを示している。

さらに、PD-NHS がタンパク質の長寿命蛍光標識剤として有効であり、それらタンパク質の機能解析（相互作用性、安定性、運動性等）の評価に有効であることが示唆した。

また、問題点としては、時間分解蛍光偏光解消装置として市販の蛍光時間分解測定装置に手を加えて代用しているため、1 サンプル 4 時間以上を要していることである。少なくとも 1 サンプルが 10 分間以内に測定される性能が求められる。また、定常光蛍光偏光解消装置も極微量のサンプルの連続検査に用いるには不向きであり、新たな装置の開発を行う必要がある。以上の要求に応えるべく図 5 のようなプロトタイプを設計した。本プロジェクト終了後にも研究は継続し、新たな装置の開発を行う。

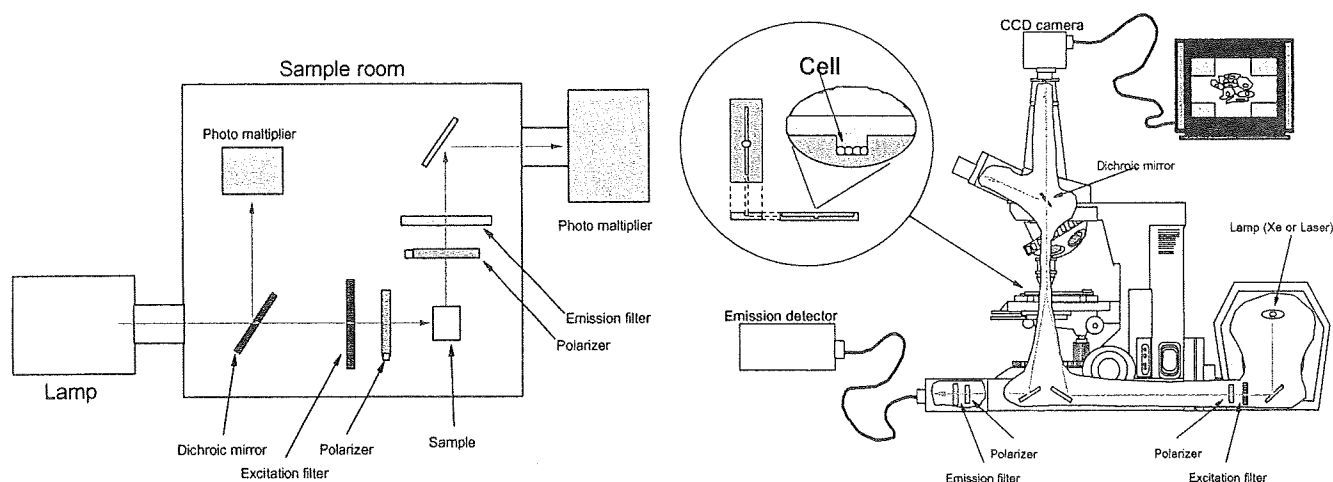


図 5 極微量試料用蛍光偏光解消測定装置（プロトタイプ）

国立小児病院において検討した GFpH-1、GFpH-2 ともに、異なる励起波長による蛍光強度の比を測定することで、pH を正確に測定することが可能であった。この結果は、異なる性質を持つ 2 つの GFP を繋いだコンストラクトを用いて蛍光計測を行うことで、今回の水素イオン濃度に限らず微細な周辺環境を計測出来るプローブを作成できる可能性を示した。計測系にも特別な装置を必要とせず、従来細胞内 Ca などの測定に用いられている 2 波長励起の蛍光分光光度計などでも原理的に十分可能であり、低コストかつ汎用性のある細胞内 pH の測定ツールとなりうることを示唆された。さらには、蛍光プレートリーダーなども用いることが出来るため、ハイスループット化が可能である。この GFpH に、細胞内小器官への移行シグナルを付加して、細胞内の部位に特異的なプローブとして用いることで、任意の部位に対して局所的な pH の変化をリアルタイムでモニターすることが可能になった。ゲノムシーケンス後の重要な課題となる遺伝子機能解析に置いて、今回作製したような蛍光プローブは、ハイスループット化、システム化した解析を行う上で有効であろう。

5. 結 論

田辺製薬においては、100 ナノ秒の蛍光寿命を持つ蛍光剤で標識し、gate off time を 50 ナノ秒に設定して蛍光偏光測定を行なった場合、夾雑蛍光の影響をほとんど受けず、かつ、分子量が 5k~200kD の領域において良好な蛍光偏光度の変化が得られるとのシミュレーション結果に基づき、種々のピレン誘導体の蛍光特性を測定したところ、ピレンの蛍光特性をよく保持したピレン誘導体 (PD) を見出すことができた。すなわち、このピレン誘導体 PD はピレン特有の長寿命蛍光 (蛍光寿命; 125 ナノ秒) を示しただけでなく、パルス励起直後には十分に大きな蛍光偏光度を示し、時間分解蛍光偏光法に使用する長寿命蛍光剤として適した蛍光特性を持つことが明らかになった。そこでこのピレン誘導体 PD をタンパク質等のアミノ基に導入するために、PD にアミノ基反応性の NHS エステルを導入した新規長寿命蛍光標識剤 PD-NHS を合成した。さらにこれを用いて IgG を蛍光標識し、蛍光特性の評価を行なった。その結果、IgG を PD-NHS によって蛍光標識しても蛍光寿命は 130 ナノ秒を示し、ピレン特有の長寿命蛍光が保持されただけでなく、PD-NHS 標識 IgG の蛍光偏光度は抗原であるマウス IgG と結合することによって増加し、分子量依存性を示した。これらのことから今回得られた新規蛍光標識剤 PD-NHS は時間分解蛍光偏光法に有用な蛍光標識剤であると考えられた。

京都工繊大においては、今回開発した 2 種類の長寿命蛍光剤はいずれも容易に核酸やタンパク質を標識でき、標識による蛍光特性の変化も見られなかった。さらに、時間分解蛍光偏光解消法への応用の結果は当初意図した、均一系・夾雑物存在下の微量生体成分検出システムの開発が可能であることを示している。今後、この概念に基づく生体分子間相互作用解析装置開発を手がける予定である。

国立小児病院においては、細胞内の特定の部位での pH をリアルタイムで画像化し測定できる蛍光プローブを作成し、実際に測定を行った。

6. 研究発表

第 46 回 高分子研究発表会 (神戸) 2000.7.7

長寿命蛍光剤を持つ DNA プローブによる核酸の構造解析

(京工繊大繊維) 村上章・坂本隆・岩瀬礼子・山岡哲二

(田辺製薬) 山形浩一

第 79 回 日本化学会 春季年会 2001.3.28~3.31

長寿命金属錯体蛍光剤を持つ遺伝子構造検索用 DNA プローブの開発

(京工繊大繊維) 坂本隆・馬原淳・岩瀬礼子・山岡哲二・村上章

第 50 回 高分子学会年次大会 2001.5.23~5.25

発表予定演題

長寿命発光能を有する Ru(II)錯体を用いた RNA 高次構造解析

(京工繊大繊維) 坂本隆・馬原淳・岩瀬礼子・山岡哲二・村上章

第 48 回 日本生化学会近畿支部例会 2001.5.26

発表予定演題

長寿命金属錯体修飾遺伝子構造検索用 DNA プローブによる RNA 構造の運動性評価

(京工繊大繊維) 坂本隆・馬原淳・岩瀬礼子・山岡哲二・村上章

辻本豪三、柴田克志、平澤明 $\alpha 1$ アドレナリン受容体安定発現細胞を用いた薬物相互作用の薬力学的検討 臨床薬理の進歩 2000: 46-59 [2000] 財団法人臨床薬理研究振興財団

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

