

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650092

研究課題名（和文） 蛍光インビボ・ウェスタン手法の確立

研究課題名（英文） Establishment of fluorescent in vivo Western method

研究代表者

三輪 佳宏 (MIWA YOSHIHIRO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70263845

研究成果の概要（和文）：生きたマウス体内における蛍光リアルタイムイメージングによって特定タンパク質や分子の動態を詳細に追跡可能になれば、多細胞動物での分子機能を明らかにする基礎研究はもちろん、疾患モデルでの病態解析や、創薬・再生医療研究にも多大な貢献が可能である。そこでそのための近赤外域での実験を可能にする技術開発を進め、均整外域において無蛍光な飼料の開発と、およそ30倍に強度を増強した近赤外蛍光タンパク質の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent real-time imaging methods enables us to monitor proteins and other molecules in living animals. This technique can make significant contribution to not only basic science but also researches for drug discovery, regenerative medicine and clinical state analyses in model animals. For this purpose, we succeeded to develop a non-fluorescent in near-infrared and nutritionally complete diet and a fluorescent protein derivative which shows 30-fold higher intensity of NIR fluorescence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：実験動物学、実験動物学

キーワード：イメージング、近赤外、蛍光

1. 研究開始当初の背景

生きた動物での3次元検出

これまで哺乳動物体内の分子追跡は放射線を用いた PET などが主流であったが、特殊な施設が必要であるなど、一般に普及することは難しい。哺乳動物の体は不透明であるため可視光は透過しにくい、600 nm を超える波長域であればヘムによる吸収を免れることができ、ある程度の透過は可能である

ことが知られている。本研究ではこうした長波長域でマウスの3次元計測が可能な新規な装置を応用して、リアルタイムな3次元データを取得できる利点を生かし、イメージング技術の開発を進める。

＜申請者の背景＞

マウスでの3次元蛍光検出装置

申請者はこれまでに国内のメーカーとの共同研究により、近赤外領域の蛍光物質を生きたマウス体内で3次元検出できる、まったく新しい計測装置の開発を進めている。さらにX線CT撮影も並行しておこない、2つの情報を簡単に重ね合わせることで、臓器レベルで正確に蛍光の局在部位を画像化することに成功しつつある。しかしながら、真にイメージングシステムとして完成させるには、装置の開発と並行して十分に高機能な蛍光プローブの開発が急務である。そこで本研究において、抗体をプローブとして生体利用する技術を確認する。

タンパク質分解制御系を応用したイメージング

申請者はこれまでに、単独の状態では細胞内で高速に分解されるが、他の分子と結合することで分解を免れる性質を変異導入によって獲得させ、これをイメージングに応用するデグラトンプローブ技術の開発と応用を進めて来た。本研究ではこの技術に応用し、*in vivo* で利用可能な近赤外蛍光タンパク質の応用を試みる。

2. 研究の目的

生きたマウス体内におけるリアルタイムイメージングによって特定タンパク質や分子の動態を詳細に追跡可能になれば、多細胞動物での分子機能を明らかにする基礎研究はもちろん、疾患モデルでの病態解析や、創薬・再生医療研究にも多大な貢献が可能である。

そこで、申請者が開発してきた生体内の蛍光物質の挙動を3次元スキャンおよび高解像度画像化する手法に加えて、本研究では特定の分子を検出する上で最も強力なツールである抗体を、生きたマウス体内において自在に利用可能にするため、1) 非特異吸着を低減した抗体の開発と2) 生細胞内分子の特異的検出を実現し、*in vivo* Western 手法を確認する。

3. 研究の方法

本研究では、1) 抗原認識をになう抗体タンパク質の可変領域、2) 高輝度蛍光タンパク質、3) 長波長蛍光色素ラベル部位、の3つのモジュールからなる「**抗体蛍光プローブ**」の開発を試みる。抗体の中で抗原認識に関与しない部分を極力除くことにより非特異的吸着の軽減を図るとともに、蛍光タンパク質によって特定の局所における侵襲的な高解像度イメージングが可能な蛍光強度を

確保する。さらに長波長の低分子蛍光色素で特異的にラベルするモジュールも付加し、ランダムな共有結合によるラベリングで抗原認識部位にも色素が結合してしまい、抗原特異性が失われてしまったものが常に一定量混在してしまうことになり、非特異シグナルの原因になることを防ぐ。

4. 研究成果

初年度は、そもそもアルギニンペプチドをどの部位に付加させた場合に、最も効率よく細胞外から細胞内への取り込みがおこるかを検証しておくことを試みた。実験の高速化を図るため、抗原タンパク質発現細胞と、抗体分泌細胞の2種類の細胞を混在させ、確実に細胞外を経てから取り込まれる実験系を確認した。2種類の細胞の識別のために、それぞれに異なる波長特性の蛍光タンパク質を発現させておいて、イメージング抗体のモジュール2の蛍光タンパク質も含めてマルチカラー解析系を構築した。

ここで、問題が発生した。最終的に *in vivo* にもちいることが目的だが、現存するマウス飼料では近赤外の蛍光があまりにも強く、また蛍光を低減したとって販売されている飼料は、そもそも栄養学的に問題があって、マウスの健康が維持できず、全身の蛍光イメージングの使用にたえる飼料は現存しないことが明らかとなった。また抗体のラベルに用いる近赤外領域の蛍光タンパク質は十分な蛍光強度が得られないことも明らかとなった。この技術の完成なしには、全身の近赤外蛍光イメージングが実施できないため、抗体が正しく開発できているかどうかの判定ができず、技術開発は進めることが困難である。そこで急遽、以下の2テーマを新たに設定し、技術開発に取り組んだ。

テーマ1) 体内非侵襲解析用特殊飼料すなわちイメージング飼料の開発

テーマ2) 自発的に成熟し十分な蛍光強度が得られる近赤外蛍光タンパク質の開発

飼料中に含まれる近赤外波長域の蛍光物質を除いて無蛍光にすることを試みた。飼料に用いる材料を入手し、それらの蛍光特性をすべて分析した。その結果、本来蛍光性ではないはずの素材の多くに蛍光性の混入物が混在していることが非常に問題であることがあきらかとなった。そこで、その混入を防ぐ手法の開発を試みた。その結果、もっとも近赤外領域において無蛍光で、かつマウスの健康にも問題を起ささない特殊飼料を開発することができた。この飼料を与えたマウスを用いると、より深部まで非侵襲に蛍光観察

できることも確認できた。

蛍光プローブタンパク質が本当に細胞内に移行し、分解制御によるコントロールが可能かどうかをモニターするため、十分な強度の蛍光が必要だが、2009年に報告されたIFP1.4では必要な強度が得られなかった。そこで、これに遺伝子上でさまざまな改変を加え、蛍光を強化することを試みた。その結果、およそ30倍の蛍光強度を実現することができた。これをすでに開発済みの分解制御システムTetデグラトンプローブに応用することを試みた。これならば薬剤の投与により簡単に分解制御を人工的に引き起こせるため、*in vivo*での体内挙動を追跡することが行いやすい。このシステムを構築し、薬剤の有無によるイメージングデータと、解剖後の分布データを用いて、体内動態とそれが性格にイメージングできているのかどうかの判定を実施した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- 1) Shibata ACE, Fujiwara TK, Chen L, Suzuki KGN, Ishikawa Y, Miwa Y, Chadda R, Naruse K, Kusumi A*. Archipelago architecture of focal adhesion: Membrane molecules freely enter and exit from the focal adhesion zone. Cytoskeleton 2012 in press 査読有
- 2) Kudo K, Momotake A, Tanaka JK, Miwa Y*, Arai T*. Environmental polarity estimation in living cells by use of quinoxaline-based full-colored solvatochromic fluorophore PQX and its derivatives. Photochem Photobiol Sci. 11, 674-678. 2012 査読有
- 3) Yoshida H*, Miwa Y, Kaneko M. Elliptic curves and Fibonacci numbers arising from Lindenmayer system with symbolic computation. APPLICABLE ALGEBRA in ENGINEERING, COMMUNICATION and COMPUTING. 22, 147-164, 2011

査読有

- 4) Yoshida H*, Kimura K, Yoshida N, Tanaka J, Miwa Y. Algebraic approaches to underdetermined experiments in biology. IPSJ Transactions on Bioinformatics, 3, 62-69, 2010 査読有
- 5) Senda, N., Miwa, Y., Tanaka, J., Momotake, A. and Arai, T*. Tsukuba-green: A fluorescent dye that emits Green fluorescence useful for live-cell imaging. Chem. Lett., 39, 308-310, 2010 査読有

[学会発表] (計18件)

- 1) 三輪佳宏 “episomal型ベクターを用いたマルチカラーイメージングの新展開” 農芸化学会 2012 ランチョンセミナー和光純薬 招待講演 3月24日2012年(京都大学)
- 2) 三輪佳宏 “近赤外蛍光を用いたマウス非侵襲 whole body イメージング” 日本顕微鏡学会バイオメディカルニューマイクロスコープ分科会 口頭発表 3月6日2012年(帝京大学)
- 3) 三輪佳宏 “蛍光バイオイメージングの実際” つくば学際ワークショップ 招待講演 1月28日2012年(筑波大学)
- 4) 三輪佳宏、田中順子 “Establishment of NIR fluorescent in toto imaging system”、第34回日本分子生物学会年会、ポスター 12月11日2011年(横浜)
- 5) 田中順子、杉山結香、石上進太郎、吉野哲哉、伊藤彰英、中尾洋一、三輪佳宏 “ケミカルスクリーニングに向けたハイスループットEGFシグナル検出プローブの開発”、第34回日本分子生物学会年会、口頭発表 12月11日2011年(横浜)
- 6) 三輪佳宏 “共創研究！化学とバイオイメー

ジング”、日本化学会生体機能関連化学部会若手の会、招待講演、9月11日2011年（つくば）

- 7) 三輪佳宏、田中順子 “蛍光 in toto イメージングの現状と応用と展望”、酸化ストレス研究会、招待講演、8月9日2011年（館山）
- 8) 三輪佳宏、田中順子 “創薬支援の蛍光イメージング”、大阪大学特別講演会、招待講演、7月22日2011年（大阪大学）
- 9) 三輪佳宏 “Development of novel fluorescence imaging systems through integrated research field of various disciplines.”、NAIST Colloquium for Future-Pioneering、招待講演、12月10日2010年（奈良）
- 10) 三輪佳宏、田中順子 “マウス3次元蛍光イメージング”、BMB2010、ポスター、12月9日2010年（神戸）
- 11) 田中順子、三輪佳宏 “蛍光寿命測定 FCM を用いた FRET システムの利用”、BMB2010、ポスター、12月9日2010年（神戸）
- 12) 三輪佳宏 “Episomal 型ベクターを用いたマルチカラーイメージングの新展開”、BMB2010、招待講演、12月7日2010年（神戸）
- 13) 三輪佳宏 “初めての蛍光 3D イメージングを成功させる Tips”、第5回 IVIS Imaging System ユーザー会、招待講演、10月6日2010年（東京）
- 14) 三輪佳宏 “生体イメージング：細胞から動物まで”、RCNP 研究会、招待講演、10月1日2010年（大阪）
- 15) 三輪佳宏 “異分野交流を通じた生体イメージング”、ぶんせき秘帖（日本分析化学会若手の会）、招待講演、大阪府羽衣青少年センター、8月11日（2010年）
- 16) 三輪佳宏 “マウス蛍光ライブイメージングの基礎”、第11回 Wako つくばフォーラム、

招待講演、7月13日2010年（つくば）

- 17) 三輪佳宏 “マウス生体イメージングによる薬物動態解析”、招待講演、5月21日2010年（金沢）

〔図書〕（計1件）

- 1) 田中順子、三輪佳宏 「蛍光タンパク質を利用したデグラトンプローブ」、NTS 酵素利用技術体系、133-136 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 佳宏 (MIWA YOSHIHIRO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70263845

(2) 研究分担者

田中 順子 (TANAKA JUNKO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：30517793

(3) 連携研究者

なし