

生体分子解析用金属錯体プローブの開発

松本和子

早稲田大学理工学部 教授

蛍光性希土類錯体の持つ長い蛍光寿命、大きなストークシフト、鋭い蛍光ピークという特徴を生かし、これを生体分子へのラベル剤として時間分解蛍光測定を行うと、従来のイムノアッセイの検出限界を2桁から4桁向上させることができることを既に報告している。本年度は、本法を用いて世界で初めて測定可能となったヒト血清中 SDF-1 タンパク濃度と HIV-1 感染の関係についてめざましい展開が見られた。本法は近い将来、AIDS 進行度の診断基準として臨床応用される可能性が高い。また、本ラベル剤を用いる時間分解蛍光顕微鏡システムを立ち上げつつあり、今後細胞観察へと発展させる予定である。また、本法をキャピラリー電気泳動に用いて遺伝子解析システムを構築中である。とりあえず、核酸のラベルと精製の方法を確立した。その他に、覚醒剤の分析、微生物の走性とトランスデューサー、蛍光顕微鏡用亜鉛プローブなどに見るべき成果があった。

1) HIV-1 感染者血中 SDF-1 タンパク濃度と AIDS 発症

京大遺伝子実験施設・田代啓

サイトカイン・SDF-1 は、HIV ウイルス感染補助受容体である CXCR4 に対する天然のリガンドであり、試験管内の実験で HIV-1 感染阻止することが報告されてきた。また、我々の遺伝疫学研究で、SDF1 遺伝子多型が HIV-1 感染症の予後を左右することが示されていた。しかし、技術的困難からこれまでヒトを含む哺乳動物体内における SDF-1 タンパクの CXCR4 に対する働きかけに関する研究は無く、体内の SDF-1 が実際に HIV-1 感染症に関与するか不明であった。また、SDF-1 タンパクの定量的検討も報告されておらず、HIV-1 感染症者体内での量的変化も未解明であった。そこで我々は、時間分解蛍光法(TR-FIA)を応用した高感度 SDF-1 測定法を樹立し、正常健常者及び HIV-1 感染者各 200 例の血清中 SDF-1 濃度を測定した。その結果、4 点に要約される成果を挙げた。1. 正常人血中 SDF-1 濃度を初めて確定した。今後、検査の正常値として使われ続ける重要なデータである。2. HIV-1 感染者血中 SDF-1 タンパク濃度は、正常健常者の平均の約 3 倍で、高い例では 10 数倍で、ほぼ CXCR4 の Kd 値に匹敵することを見出した。3. マウスモデルで SDF-1 タンパク投与実験を行い、HIV 感染者で実際に測定された SDF-1 濃度で CXCR4 が downregulate されることを実験的に確認した。4. 血中 SDF-1 タンパク量と CD4 陽性細胞数は、負の相関、血中 SDF-1 タンパク量と HIV-1 RNA 量とは正の相関を示し、CD4 陽性細胞数 $< 200 / \text{mm}^3$ かつ HIV-1 RNA 量 $> 10000 / \text{ml}$ の最も進行した群で、血中 SDF-1 タンパク量が最も高いことが明かとなった。これは、血中 SDF-1 値が AIDS 進行度の診断基準として臨床応用される可能性を示す重要なデータである。さらに大規模なコホートで同様の解析を加えることにより、血中 SDF-1 量と SDF1 遺伝子多型と AIDS 発症との関連や AIDS 随伴症候群出現やウイルス指向性変化における血中 SDF-1 量の役割について検討中である。

2) 蛍光共鳴エネルギー移動を利用した競合ホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイによる薬剤の定量 順天堂大医・木村博子

薬剤を簡単迅速に定量検出するために、Eu と Cy5 の蛍光共鳴エネルギー移動を利用した競合ホモジニアスイムノアッセイを開発した。Cy5 標識抗 MA 抗体に対して標識抗原 MA-BSA-BHHCT-Eu³⁺ と free-MA を競合反応させると、エネルギードナーである Eu の蛍光波長 615 nm はエネルギーアクセプターである Cy5 の吸収極大波長 643 nm に近いので、これらは互いに近接して結合した時に Eu からエネルギー移動が起こり、Cy5 の増感発光が観察される。MA の最小検出濃度は約 0.1ng/mL で、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで測定できた (8 濃度の平均 CV=1.98%)。次に検体である尿や血清が測定に及ぼす影響を調べるために、覚せい剤を含まないヒト尿および血清に MA を加えた検体で Eu と Cy5 の蛍光強度を測定し、緩衝液で測定した値との比較を行った。Cy5/Eu の蛍光強度比は尿や血清の個体差には影響されず、検体の希釈率によってほぼ一定の値を示し、この値をもとに得られた Eu の蛍光強度の値から補正值を得るか、あるいは同率希釈の MA を含まない尿や血清で検量線をひけば問題はなかった。覚せい剤使用者の尿検体 20 検体を測定したところ、GC の測定値と高い相関が得られた ($r=0.94$)。

3) 三角形平板状の形態を有する好塩性微生物の走性とトランスデューサー

東工大院生命理工 ○八波 利恵・小澤 孝俊・松尾 高稔・中村 聡

大腸菌や高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* などは、外界からの刺激に対して反応する走性を示す。外部刺激がべん毛モーターへと伝わる際のシグナル伝達に関与しているタンパク質がトランスデューサーである。*Haloarcula japonica* は三角形平板状の特徴的な形態を有する高度好

塩性古細菌である。本研究では、*Ha. japonica* の各種アミノ酸に対する走性を調べ、さらにトランスデューサー遺伝子の検索を行った。

べん毛が切断されないように穏やかに培養した *Ha. japonica* を 0.25% アガロースを含む塩溶液に懸濁し、シャーレに分注した。各種アミノ酸を含むプラグ (2% アガロースからなる円柱状のもの) を挿入し、37°C で一晩静置した。その結果、グルタミン酸およびアスパラギン酸含有プラグの周辺に菌体が集まり、本菌はグルタミン酸およびアスパラギン酸に対して正の走性を示すことがわかった。

大腸菌および *Hb. salinarum* トランスデューサーのアミノ酸配列間で高く保存されている領域に対応する 27 mer のオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、*Ha. japonica* トランスデューサー遺伝子の染色体からのクローニングを実施した。陽性クローンに含まれる DNA 断片について塩基配列決定を行ったところ、トランスデューサー遺伝子に特異的な配列が認められ、この DNA 断片は本菌トランスデューサーをコードしていることが強く示唆された。

4) レシオ測定用新規亜鉛プローブの開発

東大院薬 ○丸山智子・平野智也・菊地和也・長野哲雄

[目的] タンパクに結合していない遊離の亜鉛イオン (Zn^{2+}) は脳や臓器に比較的高濃度に存在し生理的に重要な役割を果たすことが示唆されているが、その動態、作用機序に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、蛍光イメージングを用いて Zn^{2+} の生理的役割を解明する事を旨とし、 Zn^{2+} 検出用蛍光プローブの開発を開始した。これまでに亜鉛との配位により蛍光強度が増大する蛍光プローブである ZnAF 類を開発し、虚血刺激を与えたラットの海馬スライス標本における Zn^{2+} 濃度の変化を捉えることに成功した。しかし ZnAF 類は目的とする応答と蛍光団の周りの環境や蛍光プローブ自身の局在、濃度変化、退色などによる蛍光強度の変化との区別がつきにくく、定量性に問題がある。よって、亜鉛との配位により極大励起波長が変化する、より定量性の高い Zn^{2+} 検出用蛍光プローブのデザイン、合成を行った。

[結果、考察] 蛍光団として benzofuran 誘導体を、亜鉛のキレーターとしては *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) 類縁体を用いた新規 Zn^{2+} 検出用蛍光プローブを合成し、その蛍光特性を調べた。その結果、この化合物は Ca^{2+} を含む他の金属イオンに対する選択性が非常に高く、さらに Zn^{2+} との配位により極大励起波長が短波長側に 30 nm シフトした。このため Zn^{2+} の濃度変化を各励起波長における蛍光強度比の変化として検出することで、光源の強さやプローブの濃度による影響を除く事ができ、生理的条件下で正確な Zn^{2+} 濃度変化の定量が可能になることが期待できる。

5) 蛍光性希土類錯体プローブによる多色同時染色法とその特徴について

早稲田大化学科 ○佐野浩樹・松本和子

我々のグループでは生体分子染色用の蛍光性希土類錯体を合成している。これまでに新規ユウロピウム蛍光ラベル剤と時間分解蛍光測定法を組み合わせることで、抗原-抗体反応を利用した血清中の超微量成分を分析するイムノアッセイにおいてラジオイムノアッセイなどの従来法に比べて 10^5 倍もの飛躍的高感度化を実現した。これは(1)一般の蛍光物質の蛍光寿命は数ナノ秒であるのに対し、ユウロピウム錯体は数百マイクロ秒ときわめて長い。(2)ストークスシフトが一般の蛍光物質では ~20nm であるのに対し、ユウロピウム錯体では ~270nm と極めて大きい、といった特徴を生かした測定法の賜である。但し金属錯体が発光体となっている為に複数の蛍光性金属錯体を共存させた際に錯体の金属が交換してしまうといった危険性があった。

本発表では蛍光性金属錯体を観察する溶液系を工夫することによって金属の交換を抑えることに成功し、長時間にわたって上記特徴の蛍光観察が可能となったことを発表する。またバックグラウンド蛍光を抑えて高 S/N で蛍光を測定できる時間分解蛍光顕微鏡についても紹介をする。

6) 蛍光性希土類錯体を標識試薬とした遺伝子情報の解析

早稲田大化学科 ○濱崎啓太・松本和子

Post-Genome / Proteomics の時代を迎え、今後ますます遺伝子ならびに蛋白質等の生体分子の振り舞い、分子間の相互作用に関し詳細な情報を得ることが様々な分野で人類の生活に関わっていくであろう。放射性同位体を標識として用いる生体分子解析法は使用後の放射性廃棄物の処理法が問題となり近年その使用はますます制限される方向にある。一方有機蛍光色素は生体分子の直接標識を可能にするが、すでに開発の進んでいる有機色素ではその開発競争に勝利することは難しい。希土類錯体はこれまでも発光標識試薬として様々な生体分子定量法に応用されてきた。これらをふまえ、蛍光性希土類錯体を標識試薬として遺伝子情報を分光学的に情報変換し、検出、定量、解析法の開発を試みている。