

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19560784

研究課題名（和文） 機能性近赤外蛍光分子プローブの創製と医療診断への展開

研究課題名（英文） Development of Functional Near-infrared Fluorescent Molecular Probes and Their Application to Medical Diagnostics

研究代表者

鈴木 祥夫（SUZUKI YOSHIO）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオニクス研究センター・研究員

研究者番号：60321907

研究成果の概要：これまでに当研究グループで開発したタンパク質分析用蛍光試薬の開発において得られた知見を基に、ターゲットとなるタンパク質を標識化するための蛍光ラベル化試薬の設計・合成、性能評価を行った。その結果、二次元電気泳動によって分離されたマウスの脳由来のタンパク質混合物と、開発した分析試薬を反応させたところ、既存方法よりも簡易的かつ高感度に明瞭なタンパク質スポットを確認することが出来た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学/生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

近年の情報機器の急速な発展とともに、撮像技術及び画像処理技術が目覚ましく進歩し、細胞・組織の構造や生体分子の機能などに関わる種々の生命現象可視化イメージングすることが可能となってきた。より詳細な

生体機能の可視化解析のために期待されるものは、高感度画像技術などのハードウェアの開発もさることながら、新たなる発想に基づく新規可視化プローブ分子の設計、および測定法の確立が必要となってくる。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに特定の化学物質や化学環境に対応したセンシング機能を有する新規機能性材料の設計・合成とそれらを利用した高性能ケミカルセンサーまたはバイオケミカルセンサーの創製に関する研究を推進している。

そこで本研究では、これまでに得られた知見を基に、次のターゲットとして、タンパク質を高感度かつ簡易的に計測するための新規分子プローブの設計・合成およびその性能評価を行い、タンパク質の網羅的かつハイスループット解析を達成することを目標とする。

3. 研究の方法

(1)タンパク質標識用プローブの設計・合成

従来のタンパク質標識用プローブの場合、タンパク質中の1級アミノ基またはチオール基と、プローブ中のスクシンイミド基またはマレイミド基との間の共有結合を介して、タンパク質中にプローブを標識する方法が採られている。この方法の問題点として、1)プローブとタンパク質との反応時間が長い(通常24時間)、2)プローブの標識化の効率がタンパク質の構造に大きく依存する、3)プローブ単独でも蛍光を発するため、プローブとタンパク質の反応後、未反応のプローブを取り除かなければならない、といったことが挙げられる。

分子設計を行うにあたり、上記3つの問題点は、これまでに我々が開発した化合物の利点①タンパク質との疎水性相互作用(非共有結合)によって、室温下で瞬時に安定な複合体を形成する、②それに伴い無蛍光の状態から強い蛍光を発する、③プローブの応答特性はタンパク質の構造に依存しない)を採用することによって解決した。さらに、上記利点を

損なうことなく、共役系を伸長させることによって、タンパク質存在下における励起波長と蛍光波長を長波長化に促した。

(2)タンパク質標識用プローブの性能評価

合成した分子の評価方法として、まず緩衝液中で、プローブとBSAを混合し、吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定することによって、BSAにプローブがラベル化されたこと、および極大励起波長と極大蛍光波長を確認した。また、プローブとBSAの反応溶液を、SDS-PAGEにかけることによって、BSAに色素がラベル化されていることを確認した。

次に、BSA-プローブ標識化合物の蛍光強度が、タンパク質以外の妨害物質にどの程度影響を受けるかを確認した。妨害物質として、無機塩、還元剤、界面活性剤、核酸、糖、有機溶媒を用いた。これらの妨害物質を、BSA-色素標識化合物に過剰量添加し、蛍光強度がどの程度変化するかを確認した。

次に、BSA以外のタンパク質にラベル化した場合にも、BSAと同様のラベル化率があること、およびラベル化することによって強い蛍光を発することを確認し、タンパク質の構造の違いに依存することなく、性能を発揮しているかどうかを検討した。

4. 研究成果

非共有結合を介してタンパク質と相互作用する蛍光試薬の開発の概念の基に、スチリル基とシアノピラニル基を併せ持つ新規蛍光分

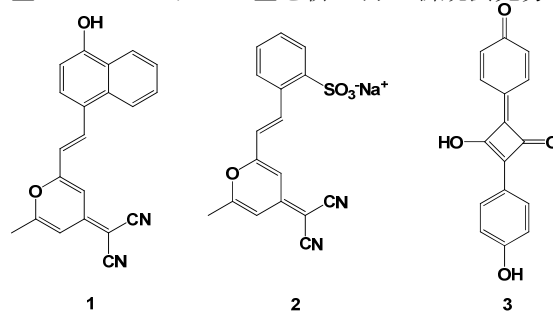


図1 合成した化合物の構造

析試薬(化合物1および化合物2) およびフェノール誘導体からなる新規比色分析試薬(化合物3)を系統的に設計・合成した。化合物1、化合物2および化合物3共に、出発原料から1工程で高い収率で合成することに成功した。

次に化合物1および化合物2の性能評価を行った。合成が終了した分子プローブの特性評価として、まず緩衝液中で、蛍光分子プローブとウシ血清アルブミン(BSA)を混合した後、吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。その結果、蛍光分子プローブ単独では蛍光を発しないが、BSAと複合体を形成することによって近赤外領域近傍に蛍光を発し、蛍光強度の大幅な増加が観察された。次に、BSAと蛍光分子プローブの複合体が、タンパク質以外の妨害物質にどの程度影響を受けるかを確認した。妨害物質として、無機塩、還元剤、界面活性剤、核酸、糖、有機溶媒を使用し、これらの妨害物質を、複合体に過剰量添加した。その結果、蛍光強度はほとんど変化しなかったことから、開発した蛍光分子プローブとBSAとの複合体は非常に安定であることが示唆された。また、BSA以外のタンパク質にラベル化した場合にも、BSAと同様、複合体を形成することによって強い蛍光を発することを確認し、タンパク質の構造の違いに依存することなく、性能を発揮していることを確認した。

さらに、二次元電気泳動によって分離されたマウスの脳由来のタンパク質混

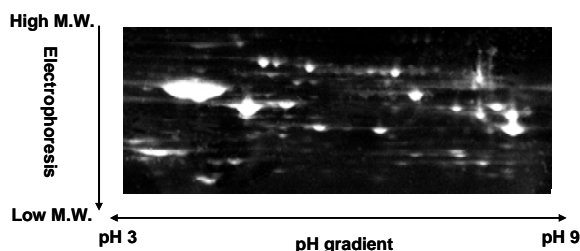


図2 化合物1を用いた時の電気泳動像

合物と、開発した新規蛍光分子プローブをゲル中で反応させたところ、先の結果と同様、複合体を形成することによって蛍光を発し、明瞭なタンパク質スポットを確認することが出来た。しかも、市販品よりも高感度かつ簡易的に扱うことが出来る分子プローブであることが実証された。

以上の結果から、化合物1、化合物2および化合物3を用いることにより、従来よりも簡便かつ短時間でタンパク質の定量分析を行うことが出来ることが明らかになった。

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6件)

① 鈴木祥夫 本田亜希 鈴木孝治, “マスプローブの創製と分析技術” 化学フロンティア「新しい地平をひらく分析手法の最前線」, 査読有, 2009, 83-88.

② Yoshio Suzuki and Kenji Yokoyama, “Design and Synthesis of ICT-based Fluorescent Probe for High-Sensitivity Protein Detection and Application to Rapid Protein Staining for SDS-PAGE”, PROTEOMICS, 査読有, 8, 2008, 2785-2790

③ Aki Honda, Yoshio Suzuki and Koji Suzuki, “Review of Molecular Modification Techniques for Improved Detection of Biomolecules by Mass Spectrometry”, ANALYTICA CHIMICA ACTA, 査読有, 623, 2008, 1-10.

④ Yoshio Suzuki and Kenji Yokoyama, “A

Protein-Responsive Chromophore Based on Squaraine and Its Application to Visual Protein Detection on a Gel for SDS-PAGE”, ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION, 査読有, 46, 2007, 4097-4099.

⑤Aki Honda, Satoshi Hayashi, Hiroki Hifumi, Yuya Honma, Noriyuki Tanji, Naoko Iwasawa, Yoshio Suzuki and Koji Suzuki, “MPAI (Mass Probes Aided Ionization) Method for Total Analysis of Biomolecules by Mass Spectrometry”, Analytical Sciences, 査読有, 23, 2007, 11-15.

⑥鈴木祥夫 鈴木孝治, “化学センサーを利用した環境計測機器の進歩と課題”, 化学物質と環境, 査読有, 2007, 10-12.

[学会発表] (計 8 件)

①鈴木祥夫 横山憲二, “蛍光分子プローブの設計・合成と高感度タンパク質検出への応用”, 総合科学技術会議 科学技術連携施策群 ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会, 2009年1月28日, 東京

②鈴木祥夫 横山憲二, “Development of Functional Dye for the Detection of Protein-bound Acrolein as Oxidative Stress Marker”, Pittcon 2008, 2008年3月4日, アメリカ・ニューオーリンズ

③鈴木祥夫 横山憲二, “タンパク質分析用機能性分子プローブの創製”, 第十回バイオテクノロジー部会シンポジウム, 2007年9月5日, 東京

④鈴木祥夫 横山憲二, “Development of New

Fluorescent and Colorimetric Reagents for High-throughput Analysis of Proteins”, American Chemical Society 234th National Meeting & Exposition, 2007年8月19日, アメリカ・ボストン

⑤鈴木祥夫 横山憲二, “タンパク質検出用分子プローブの創製”, 第2回ナノバイオデバイス・ワークショップ, 2007年8月1日, 東京

⑥鈴木祥夫 横山憲二, “酸化ストレスマーカー (タンパク質酸化物) を検出するための機能性色素の開発”, 日本ヒトプロテオーム機構 第五回大会, 2007年7月30日, 東京

⑦鈴木祥夫 横山憲二, “タンパク質検出用機能性分子プローブの創製”, 第1回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ, 2007年7月13日, 横浜

⑧鈴木祥夫 横山憲二, “分子内電荷移動 (ICT)を用いた新規タンパク質分子プローブの創製”, 第7回日本蛋白質科学会年会, 2007年5月25日, 仙台

[図書] (計 2 件)

①鈴木祥夫 (分担執筆), (株) テクノシステム, バイオセンサ・ケミカルセンサ事典「機能性蛍光分子プローブを利用したバイオイメージング」, 2007年, 6ページ

②鈴木孝治 鈴木祥夫 (分担執筆), 神奈川新聞社, 「アサガオはいつ、花を開くのか」, 2007年, 2ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①「タンパク質の分析方法および分析試薬」

鈴木祥夫 横山憲二等, (独)産業技術総合研究所, 関東化学(株)

特願2008-177104, 2008年7月7日, 国内出願

②「スクエア酸誘導体化合物、及び該化合物を含むタンパク質検出用試薬、並びに該試薬を用いたタンパク質の検出方法」

鈴木祥夫 横山憲二, (独)産業技術総合研究所, PCT/JP2007/061199(WIPO), 2007年6月1日, 外国出願

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：鈴木 祥夫 (SUZUKI YOSHIO)

所属研究機関：独立行政法人産業技術総合研究所

部局名：バイオニクス研究センター

職名：研究員

研究者番号：60321907

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし