

自己評価報告書

平成23年 4月 1日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20117003

研究課題名（和文） 活性酸素シグナル応答機構の解明を目指した新規蛍光プローブ・イメージング技法の開発

研究課題名（英文） Development of novel fluorescent probes and imaging methods for elucidating ROS signaling mechanisms

研究代表者

浦野 泰照 (URANO YASUTERU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20292956

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：蛍光プローブ、活性酸素種、活性窒素種、カルセイン、過酸化水素、細胞内滞留性、ルシフェラーゼ、生物発光プローブ

1. 研究計画の概要

本新学術領域研究は、細胞内情報伝達機構の制御分子としての活性酸素種(ROS)・活性窒素種(RNS)の役割を徹底的に明らかにすることを旨とするものである。特に ROS はこれまで、主に毒性因子として着目されてきたが、各種細胞内蛋白質、脂質などの構造、物性、機能を制御する修飾因子として重要な役割を持つことが、近年数多く報告されるようになった。しかし従来の研究は、薬物刺激後の細胞を固定して免疫染色するなどの手法による解析がほとんどであり、ROS によるシグナル伝達のダイナミクスに迫ることはできていない。

そこで本計画研究課題では、「生きている状態」の生物試料のどこで、どのタイミングで、どのような活性種が生成し、どのターゲット分子が修飾されたのかを、リアルタイムに観測することを実現する世界初の蛍光プローブ類を設計・開発し、ROS・RNS シグナル分子による全く新たな細胞内情報伝達機構の解明を世界に先駆けて実現することを目指す。具体的には、5年間の研究期間内に、① 細胞内の特定の部位（例：細胞質、ミトコンドリア、小胞体など）で生成する ROS・RNS を、種を区別して検出する蛍光プローブ、② 蛋白質修飾などを引き起こす ROS・RNS 二次シグナル親電子性活性種を検出する蛍光プローブ、③ ②の活性種により修飾された細胞内蛋白質・脂質分子を検出する蛍光プローブを開発する。特に、②の親電子性活性種をリアルタイムに生細胞内で検出することは、本研究領域の進展に極めて重要であるため、種々の親電子性活性種を、その種を区別して特異的に検出可能な蛍光

プローブを鋭意開発する。以上のプローブ群を開発することで、各種 ROS・RNS のシグナルとしての機能解析や、親電子性活性種によるターゲット蛋白質の修飾を、生細胞内で特異的かつ時空間分解能高く観測することを可能とし、本研究領域全体の目標の達成に大いに貢献することを目指す。

2. 研究の進捗状況

まず平成 20、21 年度において、細胞質中で発生する ROS, RNS を超高感度に検出する蛍光プローブの開発に成功した。従来開発してきた蛍光プローブは、細胞内からの漏出が激しいため長時間の観察ができず、また感度の低下も指摘されていた。そこで、より細胞内滞留性の高い分子骨格としてカルセインを採用し、hROS プローブ APC、NO プローブ DACal 類を設計・開発した。これらのプローブの細胞内からの漏出は極めて低く、狙い通り細胞内滞留性の高い蛍光プローブとしての機能を有することが明らかとなった。実際に APC を負荷した HL60 細胞や、DACal 負荷した BAEC 細胞を用いて、薬物刺激による ROS, RNS の検出を試みたところ、従来のプローブでは検出不可能であった低容量刺激でもその発生を検出可能であり、また 1 時間を超える長時間観測を行っても、その感度の低下がほとんど見られないことが明らかとなった。これらの結果は、2009 年に J. Am. Chem. Soc. 誌に掲載された。

平成 22 年度においては、過酸化水素を特異的かつ高感度で検出可能な蛍光プローブの開発に、 α -ジケトン構造を反応部位とすることで成功した。本プローブは、選択性・蛍光上昇の大きさ、反応速度の全ての面におい

て従来プローブを凌駕しており、実際 PMA 刺激による RAW264.7 細胞内での過酸化水素生成の可視化にも成功した。

さらに *in vivo* の hROS 生成観測手段として、近赤外光で機能する次亜塩素酸検出蛍光プローブと生物発光を検出原理とするイメージングプローブの開発にも成功した。前者に関しては Si ロードミンを分子骨格とし、分子内環化平衡を蛍光消光原理とする新たなプローブを開発し、マウス腹腔内の炎症を生きのまま観測することに成功した。本結果は、2011 年に *J. Am. Chem. Soc.* 誌に掲載された。後者に関しては、ホタルルシフェリン類を基本骨格とし、hROS と反応するまではその発光が抑えられているが、hROS と反応後は通常のルシフェリン類と同様に発光するプローブを、分子内光誘起電子移動を活用して開発した。本プローブはルシフェラーゼの基質となるものの、ほとんど生物発光を示さないが、これが hROS と反応すると高い生物発光を示す生成物へと変換されることが確認され、世界初の hROS 検出生物発光プローブとして機能することが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。
理由：従来は不可能であった、長時間にわたる ROS, RNS 観測やオルガネラ選択的な観測、*in vivo* における各種イメージングを可能とする蛍光・生物発光プローブ類の開発など、当初計画していた以上に数多くのイメージングプローブの開発に成功しており、その達成度は十分以上と考えている。また新学術領域研究内外における共同研究も複数開始しており、細胞応答と ROS, RNS との興味ある連関を示唆するデータを得つつある。今後は新たな二次シグナル分子可視化プローブや、より空間分解能の高いイメージング技法を開発し、植物細胞への適用を含め、さらに広範な分野での領域内外の研究者との共同研究を遂行していく予定である。

4. 今後の研究の推進方策

本申請課題では残り 2 年の研究期間で、①選択的蛋白質修飾に関与する新たな二次シグナル分子として大きく注目されている硫化水素 (H_2S) を鋭敏に検出する蛍光プローブの開発、② 選択的蛋白質ニトロ化機構の解明を指向した、SNAP、Halogenase 基質部位を有する washable な NO 検出蛍光プローブの開発を目指す。両プローブとも設計・合成・*in vitro* での機能評価が完了し次第、領域内研究者と共同して各種生細胞系、実験動物系へと適用し、①に関しては生細胞内での H_2S 生成酵素活性の高時空間分解能での評価を、②に関しては血管内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) や神経型 nNOS が生成するごく微量の NO の検

出や、NOS とのインタラクションによる特定 Cys のニトロ化機構の解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

① Komatsu T, Johnsson K, Okuno H, Bito H, Inoue T, Nagano T, Urano Y*. Real-time measurements of protein dynamics using fluorescence activation-coupled protein labeling (FAPL) method. *J. Am. Chem. Soc.*, 掲載決定 (印刷中) . (査読あり)

② Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T*: Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and applications for biological imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 133: 5680-5682, 2011. (査読あり)

③ Izumi S, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T*: A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 10189-10200, 2009. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 38 件)

① 浦野 泰照、蛍光プローブの精密設計に基づく、新たな生細胞応答観測・*in vivo* がんイメージング、第 21 回日本生体防御学会シンポジウム「活性酸素の生体防御シグナルとバイオイメージング」(招待講演)、宮城 (仙台市戦災復興記念館)、2010 年 7 月 24 日

② Yasuteru Urano, Real-time imaging of various ROS, RNS and related enzymatic activities in living cells by using precisely designed novel fluorescence probes, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (Invited), Kyoto (Kyoto International Conference Center), Jun. 15, 2010.

〔図書〕 (計 1 件)

① 浦野泰照: 論理的設計法に基づく種選択的 ROS 蛍光プローブの開発 *実験医学* 27: 2467-2473, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: 活性酸素測定用試薬
発明者: 長野哲雄、和泉沙希、浦野泰照
権利者: 国立大学法人東京大学
種類: 特願
番号: 2010-512019
出願年月日: 2009/05/15
国内外の別: 国内