

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19710196

研究課題名 (和文) 生物発光を活用した細胞や組織の可視化技術に関する基盤研究

研究課題名 (英文) Development of a non-destructive imaging probe for cell and tissue using bioluminescence

研究代表者

呉 純 (WU CHUN)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：90415646

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、生体中の病気に関わる細胞表面のバイオマーカーの可視化法を確立するため、近赤外線発光プローブの開発を行った。ビオチンウミホタルルシフェラーゼの糖鎖に蛍光色素を導入した結果、ルシフェラーゼの本来の青い発光ピククのほかに、生物発光共鳴エネルギー移動機構 (BRET) による新たな近赤外線の発光ピククが観測された。次に、発光タンパク質と医療抗体の候補の一つであるモノクローナル抗 Dlk-1 抗体とビオチン・アビジン結合で連結させ、Dlk-1 抗原を発現しているヒト肝癌細胞株の可視化を試みた。抗原を発現する HuH7 細胞は抗原・抗体反応によってラベルされ、細胞表面から発光活性が細胞用の発光イメージング装置によって観測された。また、Dlk-1 抗原を発現するヒト肝癌細胞を移植したヌードマウスから腫瘍特異な発光シグナルが観測された。一方、体外のバイオマーカーの定量法を開発するため、ウミホタルルシフェラーゼの高い発光活性を着目した免疫アッセイ技術の開発を合わせて検討した。

研究成果の概要 (英文) : We aimed to develop a new far-red luminescence imaging technology for visualization of disease specific antigens on cell surfaces in a living body. First, we conjugated a far-red fluorescent indocyanine derivative to biotinylated Cypridina luciferase. This conjugate produced a bimodal spectrum having long-wavelength bioluminescence emission in the far-red region as a result of bioluminescence resonance energy transfer. To generate a new far-red luminescent probe with targeting and imaging capabilities of tumors, we then linked this conjugate to an anti-human Dlk-1 monoclonal antibody via the biotin-avidin interaction. This far-red luminescent probe enabled us to obtain high-resolution microscopic images of Dlk-1-expressing Huh-7 live cells without an external light source, and to monitor the accumulation of this probe in tumor-bearing mice. Furthermore, we developed an ELISA system using Cypridina luciferase to detect bio-marker in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ウミホタルルシフェラーゼ、ルシフェリン、光イメージング、個体イメージング、生物発光

1. 研究開始当初の背景

近年、ルシフェラーゼを用いた発光イメージングの研究開発が注目されている。生物発光を可視化プローブとして活用されている主な生物発光系として、ホタル、ウミシイタケ、及び発光クラゲ由来 **aequorin** 発光タンパクなどがよく知られていた。これら発光系はすべて非分泌型である。一方、ウミホタルルシフェラーゼはこれらの発光系と違って分泌酵素である。このため、細胞を破碎することなく、ルシフェラーゼの発光活性の測定が可能である。ウミホタルルシフェラーゼの遺伝子が 1989 年に最初にクローニングされ、その非破壊分析ツールとしての有用性が示されたにもかかわらず、当時発光基質であるウミホタルルシフェリンが市販されていなかったため、普及しなかった。ウミホタルルシフェリンの最初の全合成は 1966 年に岸らによって達成されたが、収率が低かった。2000 年に、鈴木反応を活用したルシフェリンの前駆体エチオルシフェリンの改良合成法が中村らにより報告された。2005 年に我々のグループは、光学活性ウミホタルルシフェリンの合成ルートを再検討し、高収率で光学性ルシフェリンの合成法を確立した。また、2006 年に、ウミホタルルシフェラーゼの大量調製法を開発し、イムノアッセイシステムを開発した。それと同時に、分泌ウミホタルルシフェラーゼと分泌 **Gaussia** ルシフェラーゼによるデュアルレポーターアッセイ系を開発した。このアッセイ系は、培養細胞を破碎することなく、標的遺伝子の転写活性をより正確に測ることができた。また、この方法を応用すれば、生きたマウスにおいても、細胞から血液中に分泌されるルシフェラーゼの活性をモニターすることで、遺伝子転写活性を測ることは可能である。一方、生きた状態の動物の中の病気に関わる細胞表面のバイオマーカータンパク質の可視化法は殆ど開発されていなかったため、本研究では、ウミホタルルシフェラーゼを活用した近赤外線発光プローブを開発し、バイオマーカータンパク質の生体イメージング法の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、生体中の病気に関わる細胞表面のバイオマーカーの可視化法を確立するため、近赤外線発光プローブの開発を行っ

た。また、体外のバイオマーカーの定量法を開発するため、ウミホタルルシフェラーゼの高い発光活性をに着目したイムノアッセイ技術の開発を合わせて検討した。

3. 研究の方法

本研究では、ウミホタルルシフェラーゼを活用した生体イメージングプローブの開発を行った。ウミホタルルシフェラーゼは青い光を放出するため、生体内のヘモグロビンの吸収による青い発光量の低減が予想される。そこで、ウミホタルルシフェラーゼの糖鎖に近赤外線蛍光色素を導入し、人工的な生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) プローブの作成を試みた。

4. 研究成果

(1) ウミホタルルシフェラーゼの糖鎖に近赤外線蛍光色素を導入した生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) プローブは、ルシフェラーゼの本来の青い発光ピクスのほかに、新たな近赤外線の発光ピクが観測された。

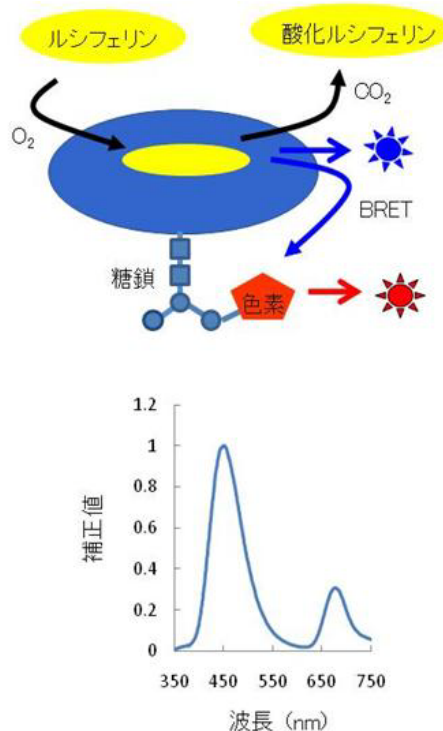


図1、ウミホタルルシフェラーゼと蛍光色素によるBRETとその発光スペクトル

次に、発光タンパク質と医療抗体の候補の一つであるモノクローナル抗 Dlk-1 抗体とビオチン・アビジン結合で連結させ、Dlk-1 抗原を発現しているヒト肝癌細胞株の可視化を試みた。抗原を発現する HuH7 細胞は抗原・抗体反応によってラベルされ、細胞表面から発光活性が細胞用の発光イメージング装置によって観測された。さらに、Dlk-1 抗原を発現するヒト肝癌細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍が 5mm 程度の大きさに成長した段階で発光タンパク質と抗体との複合体を注入した。24 時間後にマウスに再びウミホタルルシフェリン光学活性体を注射し、生体発光イメージング装置で観察した。その結果、マウスの腫瘍から高い発光シグナルが観測された。観測された発光シグナルはロングパスフィルターによる短波長の光の成分の除去操作を経て、BRET による発光であることが判明した。一方、発光タンパク質の上にある蛍光色素を利用した蛍光イメージングでは、マウスの自家蛍光の影響で同じ腫瘍から特異的な蛍光シグナルは観測されなかった。

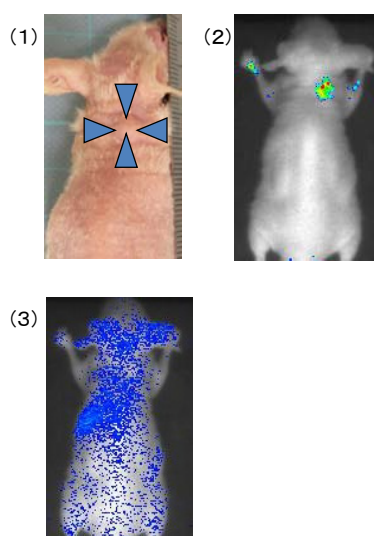


図2、ウミホタルルシフェラーゼと蛍光色素による光イメージング(1)、腫瘍マウス、(2)発光イメージング、(3)蛍光イメージング

このように、本発光タンパク質は生きたマウス動物個体で癌細胞を可視化できることが明らかになった。

(2) ウミホタルルシフェラーゼの高い発光活性という特徴に着目したイムノアッセイ技術の開発を合わせて検討した。

プロスタグランジン E₂ の定量法を開発するため、ウミホタルルシフェラーゼのリジン残基にプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を導入し、低分子生理活性物質である PGE₂ を検出する競合法を開発した。その結果、ウミホタルルシ

フェラーゼをもちいたことにより、PGE₂ の定量の高感度化と短時間化の可能性が示された。

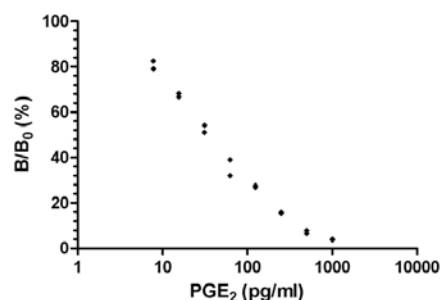


図3、ウミホタルルシフェラーゼを用いたPGE₂ のイムノアッセイ

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 2 件)

- ① 呉純、三野和宏、秋元秀俊、川端真紀子、中村康司、尾崎倫孝、近江谷克裕 In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from Cypridina bioluminescence to an organic dye、PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA、106-37、2009、pp. 15599-15603、査読あり
- ② 呉純、入江早紀、山本尚三、近江谷克裕、A bioluminescent enzyme immunoassay for prostaglandin E₂ using Cypridina luciferase、LUMINESCENCE、24-2、2009、pp. 131-133、査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① 呉純、ウミホタル発光系を利用した個体イメージングプローブの開発、第 26 回日本生物発光化学発光研究会、2009/06/06、東京、
- ② 呉純、Application of the sea-firefly Cypridina bioluminescent system for bioassays 15 回国際生物化学発光学会大会、2008/05/14、上海

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ルシフェラーゼを含む発光系及びそれを用いたイメージング方法

発明者：呉純、近江谷克裕、尾崎倫孝、

権利者：産総研

種類：特許

番号：特願 2008-249109

出願年月日：20 年 9 月 26 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/rice/research/ce11dyna/wu.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 純 (WU CHUN)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエ
ンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：90415646

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：