

平成 21 年 3 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005-2008
 課題番号：17500299
 研究課題名（和文） 蛍光相関分光法を用いたミトコンドリア DNA 異常検出システムの開発
 研究課題名（英文） Monitoring of mitochondrial DNA mutations using fluorescence correlation spectroscopy
 研究代表者
 野村保友（NOMURA YASUTOMO）
 山形大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80237883

研究成果の概要：過酸化水素処理した細胞からミトコンドリア DNA を精製して、その PCR 産物の拡散係数から酸化的ストレスによる損傷の程度を推定できることを指摘した。さらにミトコンドリア遺伝子変異のホットスポットに注目して、制限酵素処理による断片長分布を蛍光相関分光の多成分解析によって簡便に推定できるようにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	1,600,000	0	1,600,000
2006 年度	700,000	0	700,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,600,000	390,000	3,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学

キーワード：(1)ミトコンドリア DNA、(2)蛍光相関分光法、(3)ブラウン運動、(4)拡散定数、(5)共焦点光学系、(6)レーザー

1. 研究開始当初の背景

わが国は未曾有の高齢化社会に突入しつつあり、高齢者の急増は、糖尿病を始めとする疾病罹患患者数の増加による社会的コストの増大を伴う。最近、加齢によるミトコンドリアの機能低下と糖尿病の関連が注目されている。ミトコンドリア機能異常は内因性として核 DNA やミトコンドリア DNA (mtDNA) の遺伝子変異に起因することが知られている。特に mtDNA は核 DNA より一桁以上変異が速いことから mtDNA 異常を検出することは重要である。mtDNA 異常には欠失や点変異など質的評価とともに、細胞や組織ごとにとどの程度の量で変異 mtDNA が存在している

かという量的な評価が必要である。さらに組織や臓器の多様な機能低下との相関を検討できるほどの高感度で信頼性がある計測手段が求められている。

2. 研究の目的

このように検査・診断の機会が今後増加するミトコンドリア DNA 異常に対して、その検出システムの早急な開発が望まれているが、従来のゲル電気泳動・サザンブロットでは操作が煩雑すぎる。蛍光相関分光法 (FCS, Fluorescence correlation spectroscopy) はそのような作業をせずに特異的な配列を持つ DNA の数と鎖長を評価することに適している。こ

のような特徴を持つ蛍光相関分光法を用いて、多サンプルを対象とするミトコンドリア DNA 異常検出システムの開発をめざして、二つの異なるアプローチを検討した。

3. 研究の方法

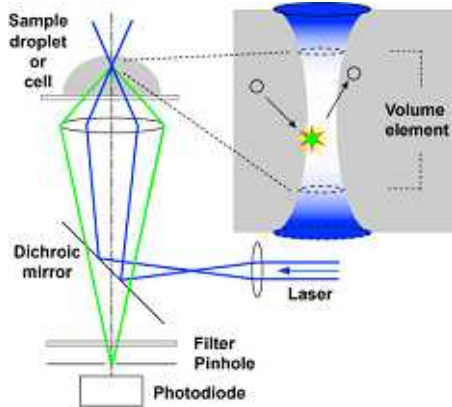


図1 蛍光相関分光法の光学系

蛍光相関分光法は図1に示すようなレーザーを光源とした共焦点光学系を用いて観察できる微小な領域を、蛍光分子がブラウン運動により出入りすることで生じる蛍光強度揺らぎから自己相関分析して、分子量と分子数を評価できる方法である。

(1) 分子量からのミトコンドリア DNA 異常の検出

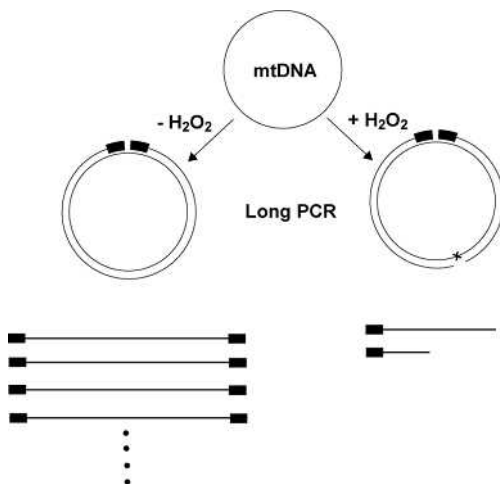


図2 濃度からの評価

過酸化水素処理によるミトコンドリア DNA への影響を検査するために、17000塩基対の全長のミトコンドリア DNA を PCR で増幅後、蛍光相関分析した。過酸化水素により損傷されたミトコンドリア DNA は PCR の鋳型にはなれない (図2の×印)。

(2) 制限酵素処理後の断片数からのミトコンドリア DNA 変異の検出

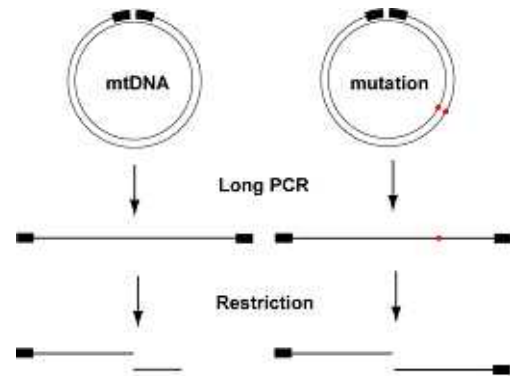


図3 分子数からの評価

前項の方法は非特異的な DNA 損傷の検出には適しているが、配列に生じた変異の場所を特定することはできない。そこでホットスポットに DNA 変異が生じると制限酵素で断片化されないことに着目した (図3の赤丸)。

4. 研究成果

(1) 過酸化水素処理濃度に依存して、相関が早く減衰した (図4)。これは全長の PCR

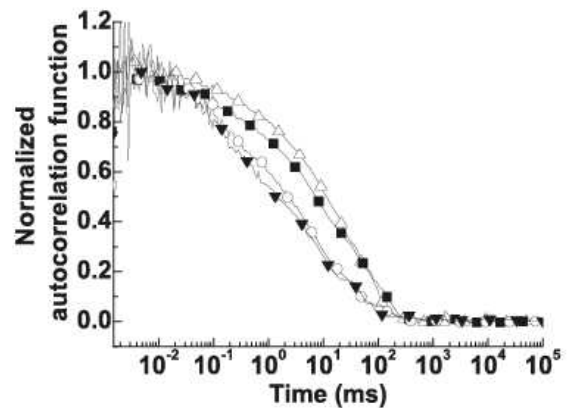


図4 過酸化水素処理が自己相関関数に及ぼす影響。白三角: 0, 黒四角: 0.1, 白丸: 0.2, 黒三角: 0.4 mM H₂O₂

産物が減り、プライマのすばやいブラウン運動の寄与が大きくなったことを示唆していた。

(2) 変異がないときは制限酵素処理によるフラグメントの数は遺伝子配列からあらかじめわかる。自己相関関数の y 切片は分子数を示すので (図5)、この値がデータベースからの推定値と異なるときには変異が疑われる。そのサンプルについてはシーケンスなどを行って、詳細に検討することを提案した。

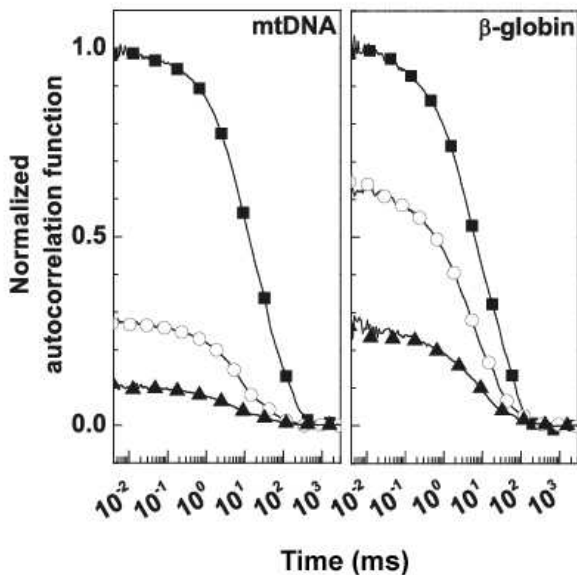


図5 ミトコンドリア DNA の制限酵素処理が自己相関関数へ与える影響。黒四角:制限酵素処理なし, 白丸: Hga I, 黒三角: Hae III。

これらの抽出されたミトコンドリア DNA の結果を踏まえ、次の段階の研究として、生細胞内での計測進めていく予定である。そのためにミトコンドリアそのものを緑色蛍光タンパクでラベルして観察すると、酸化ストレスはミトコンドリア DNA だけでなく、ミトコンドリアの形態に影響を与えているように見えた。しかしミトコンドリアは大変複雑な形態であり、その変化を客観的に評価することは困難であった。そこで画像処理によるミトコンドリアの形態の定量解析法を現在提案している。さらにミトコンドリア病の新たな診断法を確立するために、ミトコンドリア自身の複雑な形態変化とミトコンドリア DNA のダイナミックな挙動を蛍光波長の異なる色素でラベルして同時に観察し、画像相関分光解析を進めている。

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 45 件)

(1) Nomura Y Takayama T, Sato M, Takahash E, Feng Z, Nakamura T
Mitochondria-targeted green fluorescent protein for quantitative monitoring of mitochondrial morphology in living cells
Lett. Drug Design Discov, 6(4): 2009 in press(査読有)

(2) Muto H, Kinjo M, Yamamoto KT.
Fluorescence cross-correlation spectroscopy of

plant proteins.

Methods Mol Biol. 479:203-15, 2009 (査読有)

(3) Nakamura T, Feng Z, Honda T, Nomura Y, Kitajima T, Umezumi M

Comparison of mRNA expression of transcriptional factors and intercalated disk constituent proteins between in vivo and cultured cardiomyocytes

J Artif Organs 11: 134-140, 2008 (査読有)

(4) Shimi T, Pflieger K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, Adam SA, Shumaker DK, Kinjo M, Cremer T, Goldman RD.

The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription.

Genes Dev. 22(24):3409-21, 2008. (査読有)

(5) Takahashi Y, Nishimura J, Suzuki A, Ishibashi K, Kinjo M, Miyawaki A.

Cross-talk-free fluorescence cross-correlation spectroscopy by the switching method.

Cell Struct Funct. 33(1):143-50, 2008 (査読有)

(6) Noda Y, Horikawa S, Kanda E, Yamashita M, Meng H, Eto K, Li Y, Kuwahara M, Hirai K, Pack C, Kinjo M, Okabe S, Sasaki S.

Reciprocal interaction with G-actin and tropomyosin is essential for aquaporin-2 trafficking.

J Cell Biol. 182(3):587-601, 2008 (査読有)

(7) Park H, Pack C, Kinjo M, Kaang BK.

In vivo quantitative analysis of PKA subunit interaction and cAMP level by dual color fluorescence cross correlation spectroscopy.

Mol Cells. 26(1):87-92, 2008 (査読有)

(8) Nakabayashi T, Nagao I, Kinjo M, Aoki Y, Tanaka M, Ohta N.

Stress-induced environmental changes in a single cell as revealed by fluorescence lifetime imaging.

Photochem Photobiol Sci. 7(6):671-4, 2008(査読有)

(9) Nakabayashi T, Wang HP, Kinjo M, Ohta N.

Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements.

Photochem Photobiol Sci. 7(6):668-70, 2008 (査読有)

(10) Nagaya H, Tamura T, Higa-Nishiyama A, Ohashi K, Takeuchi M, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Kinjo M, Okada T, Wada I.

Regulated motion of glycoproteins revealed by direct visualization of a single cargo in the

- endoplasmic reticulum.
J Cell Biol. 180(1):129-43. 2008 (査読有)
- (11) Nagao I, Aoki Y, Tanaka M, Kinjo M.
Analysis of the molecular dynamics of medaka nuage proteins by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching.
FEBS J. 275(2):341-9. 2008 (査読有)
- (12) Nomura Y, Nakamura T, Feng Z, Kinjo M.
Direct quantification of gene expression using fluorescence correlation spectroscopy.
Curr Pharm Biotech 8: 286-290, 2007 (査読有)
- (13) Fujii F, Kinjo M.
Detection of antigen protein by using fluorescence cross-correlation spectroscopy and quantum-dot-labeled antibodies.
Chembiochem. 8(18):2199-203. 2007 (査読有)
- (14) Pieper T, Markova S, Kinjo M, Suter D.
Effect of cholesterol on diffusion in surfactant bilayers.
J Chem Phys. 127(16):165102. 2007 (査読有)
- (15) Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y, Kinjo M.
Preparation and characterization of thiacalix[4]arene coated water-soluble CdSe/ZnS quantum dots as a fluorescent probe for Cu²⁺ ions.
Comb Chem High Throughput Screen. 10(6): 473-9. 2007 (査読有)
- (16) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M.
Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy.
Anal Biochem. 370(2):131-41. 2007 (査読有)
- (17) Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J.
Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance.
Proc Natl Acad Sci U S A. 104(34):13678-83. 2007 (査読有)
- (18) Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M, Nagai Y.
Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy.
J Biol Chem. 282(33):24039-48. 2007. (査読有)
- (19) Shimizu M, Sasaki S, Kinjo M.
Triplet fraction buildup effect of the DNA-YOYO complex studied with fluorescence correlation spectroscopy.
Anal Biochem. 366(1):87-92. 2007 (査読有)
- (20) Kii H, Takagi T, Sasaki A, Okajima T, Kinjo M.
DNA microstructure based on self-assembly of 4-sticky-end Holliday junctions in aqueous solution.
J Nanosci Nanotechnol. 7(3):726-9. 2007 (査読有)
- (21) Matsuyama H, Oba K, Matsuda K, Yoshihiro S, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Takei M, Yamaguchi A, Sasaki K, Naito K.
Haploinsufficiency of 8p22 may influence cancer-specific survival in prostate cancer.
Cancer Genet Cytogenet. 174(1):24-34. 2007 (査読有)
- (22) Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, Matsuno K, Kinjo M, Suzuki T.
The novel cargo Alcadin induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport.
EMBO J. 26(6):1475-86. 2007 (査読有)
- (23) Mikuni S, Tamura M, Kinjo M.
Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy.
FEBS Lett. 581(3):389-93. 2007 (査読有)
- (24) Nomura Y, Fuchigami H, Kii H, Feng Z, Nakamura T, Kinjo M.
Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy.
Anal Biochem 350(2):196-201, 2006 (査読有)
- (25) Nomura Y, Fuchigami H, Kii H, Feng Z, Nakamura T, Kinjo M.
Quantification of size distribution of restriction fragments in mitochondrial genome using fluorescence correlation spectroscopy.
Exp Mol Pathol 80: 275-278, 2006 (査読有)

- (26) Nomura Y, Fujiwara H, Ito K, Fuchigami H, Sato M, Takahashi M, Hozumi Y, Goto K, Fuchigami H, Feng Z, Nakamura T. HIF-1 α as a target for drug design in ischemic injury: effect of cobalt treatment on mitochondrial DNA damage in cells exposed to H₂O₂. *Lett Drug Design Discov* 3(3): 172-174, 2006(査読有)
- (27) Takahashi E, Takano T, Nomura Y, Okano S, Nakajima O, Sato M. In vivo oxygen imaging using green fluorescent protein *Am J Physiol - Cell Physiol* 291: 781-787, 2006 (査読有)
- (28) Feng Z, Ishibashi M, Nomura Y, Kitajima T, Nakamura T: Constraint stress, microstructural characteristics and enhanced mechanical properties of a special fibroblast-embedded collagen construct. *Artif Organs*30: 870-877, 2006 (査読有)
- (29) Feng Z, Tateishi Y, Nomura Y, Kitajima T, Nakamura T. Construction of fibroblast-collagen gels with orientated fibrils induced by static or dynamic stress: toward the fabrication of small tendon grafts. *J Artif Organs* 9(4):220-225, 2006 (査読有)
- (30) Kitamura A, Kubota H, Pack CG, Matsumoto G, Hirayama S, Takahashi Y, Kimura H, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat Cell Biol.* 8(10):1163-70. 2006 (査読有)
- (31) Kawai-Noma S, Ayano S, Pack CG, Kinjo M, Yoshida M, Yasuda K, Taguchi H. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes Cells.* 11(9):1085-96, 2006. (査読有)
- (32) Oyama R, Takashima H, Yonezawa M, Doi N, Miyamoto-Sato E, Kinjo M, Yanagawa H. Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 34(14):e102. 2006 (査読有)
- (33) Ohsugi Y, Saito K, Tamura M, Kinjo M. Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J.* 91(9):3456-64. 2006 (査読有)
- (34) Muto H, Nagao I, Demura T, Fukuda H, Kinjo M, Yamamoto KT. Fluorescence cross-correlation analyses of the molecular interaction between an Aux/IAA protein, MSG2/IAA19, and protein-protein interaction domains of auxin response factors of arabidopsis expressed in HeLa cells. *Plant Cell Physiol.* 47(8):1095-101. 2006 (査読有)
- (35) Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy.* *Nat Biotechnol.* 24(5):577-81. 2006 (査読有)
- (36) Nomura Y, Okamoto S, Sakamoto M, Feng Z, Nakamura T. Effect of cobalt on the liver glycogen content in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 277(1-2): 127-130, 2005 (査読有)
- (37) Nomura Y, Aragane A, Feng Z, Nakamura T. Vanadate-induced exp-ression of hypoxia inducible factor-1 α via oxygen-dependent and -independent pathways. *Biomed Res Trace Elem* 16(4): 314-316, 2005 (査読有)
- (38) Takahashi E, Takano T, Nomura Y, Okano S, Nakajima O, Sato M. Genetic oxygen sensor: GFP as an indicator of intracellular oxygenation. *Adv Exp Med Biol* 566: 39-44, 2005 (査読有)
- (39) Feng Z, Matsumoto T, Nomura Y, Kitajima T, Nakamura T. An electro-tensile bioreactor for 3-D culturing of Cardiomyocytes. *IEEE Eng Med Biol* 24(4): 73-79, 2005(査読有)
- (40) Jin T, Fujii F, Sakata H, Tamura M, Kinjo M. Amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene-coated CdSe/ZnS quantum dots for the optical detection of the neurotransmitter acetylcholine. *Chem Commun (Camb).* 14;(34):4300-2. 2005 (査読有)
- (41) Hirose M, Tohda H, Giga-Hama Y, Tsushima R, Zako T, Iizuka R, Pack C, Kinjo M, Ishii N, Yohda M. Interaction of a small heat shock protein of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, with a denatured protein at elevated temperature. *J Biol Chem.* 280(38):32586-93. 2005 (査読有)

(42) Nishimura G, Kinjo M.
Dead-time distortion in fluorescence correlation measurements.
Appl Opt.44(17):3458-67. 2005 (査読有)

(43) Jin T, Fujii F, Sakata H, Tamura M, Kinjo M.
Calixarene-coated water-soluble CdSe-ZnS semiconductor-coated quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution.
Chem Commun (Camb). 14;(22):2829-31.
2005 (査読有)

(44) Földes-Papp Z, Kinjo M., Tamura M, Birch-Hirschfeld E, Demel U, Tilz GP.
A new ultrasensitive way to circumvent PCR-based allele distinction: direct probing of unamplified genomic DNA by solution-phase hybridization using two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy.
Exp Mol Pathol. 78(3):177-89. 2005 (査読有)

(45) Takahashi Y, Sawada R, Ishibashi K, Mikuni S, Kinjo M.
Analysis of cellular functions by multipoint fluorescence correlation spectroscopy.
Curr Pharm Biotechnol. 2005 Apr;6(2):159-65.
(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Nomura Y., Takayama T, Sato M, Takahashi E, Feng Z, Nakamura T.
Matrix-targeted green fluorescent protein for quantitative monitoring of mitochondrial morphology in living cells.
Experimental Biology 2008 Apr 5 (San Diego)

(2) Nomura Y., Fujiwara H, Ito K, Sato M, Takahashi E, Hozumi Y, Feng Z, Nakamura T.
Effect of cobalt treatment on cell growth and mitochondrial DNA damage in HEK293 acutely exposed to hydrogen peroxide.
Experimental Biology 2006 Apr 1-5 (San Francisco)

(3) Nomura Y., Okamoto S, Sakamoto M, Feng Z, Nakamura T.
Effect of cobalt on the liver glycogen content in the streptozotocin-induced diabetic rats.
Experimental Biology 2005 Apr 2-6 (San Diego)

[図書] (計 4 件)

(1) 野村保友、Zhonggang Feng、中村孝夫。
ミトコンドリアレベルの酸素代謝測定。
朝倉書店。からだと酸素の事典。2009 印刷中

(2) Nomura Y., Feng Z, Nakamura T.
Cobalt treatment suppressing mitochondrial DNA damage caused by acute exposure of H₂O₂.
DNA Damage Research (Nova Science Pub). 1-8, 2008

(3) 三國新太郎・金城政孝
細胞生物学における蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法
『蛋白質 核酸 酵素』増刊号 51(14).
1998-2005, 2006

(4) 中村孝夫、小野寿樹、野村保友、Zhonggang Feng
磁界の生体に及ぼす影響
山形医学 24: 25-34, 2006
〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
野村保友 (NOMURA YASUTOMO)
山形大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 80237883

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者
金城政孝 (KINJO MASATAKA)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授
研究者番号 : 70177971

(4) 研究協力者
中村孝夫 (NAKAMURA TAKAO)
山形大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 00142654

馮 忠剛 (ZHONGGANG FENG)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号 : 10332545

坂本 満 (SAKAMOTO MITSURU)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

岡本慎一郎 (OKAMOTO SIN-ICHIRO)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

淵上弥史 (FUCHIGAMI HIROBUMI)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

荒金篤央 (ARAGANE ATSUO)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

藤原宏之 (FUJIWARA HIROYUKI)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

伊藤浩平 (ITOU KOHEI)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

松本 智 (MATSUMOTO SATORU)
山形大学・大学院理工学研究科・学生

高山稔文 (TAKAYAMA TOSHIYUKI)
山形大学・大学院医学系研究科・学生

後藤猛仁 (GOTO TAKEHITO)
山形大学・大学院医学系研究科・学生