

平成22年5月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700376

研究課題名（和文） Deliver-body を用いた抗体導入による細胞イメージング

研究課題名（英文） Construction of cellular imaging system by delivery of antibody into living cells

研究代表者

三重 正和（MIE MASAYASU）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40334528

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞膜透過能を有するペプチド配列と抗体結合タンパク質との融合タンパク質を用いて抗体を細胞内に導入し、生細胞内タンパク質をイメージングすることを目的とした。可視化の方法として、抗原の異なる部位を認識する2種類の抗体を細胞内に導入し、両者が細胞内抗原に結合した際にのみシグナルが得られるシステムの構築を試みた。その結果、細胞外において、このシステムが機能することを示し、今後の更なる研究により生細胞内のタンパク質のイメージングが可能になることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this experiment was construction of imaging system in living cell by delivery of antibody. We have constructed imaging system which shows the signal when antibody bind to a target molecule. It was showed that our imaging system would be applied for living cell imaging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：細胞工学・バイオマテリアル

科研費の分科・細目：人間医工学 ・ 医用生体工学・生体材料学

キーワード：抗体、イメージング

1. 研究開始当初の背景

生細胞内におけるタンパク質の可視化技術は、分子生物学の発展において必要不可欠な技術であり、これまでに蛍光分子を用いた様々な方法が開発されてきた。しかしながら、それらの方法は、汎用性が高く簡便な方法とは言い難いものであった。そこで、生細胞内に抗体を導入することが可能になれば簡便な生細胞内タンパク質の新たなイメージング法になるものと考えた。申請者は、これまでに抗体を簡便に生細胞内に導入する方法として“Deliver-body”システムの開発を行ってきた。“Deliver-body”とは、細胞膜透過能を有するペプチド配列、Protein Transduction Domain (PTD) と抗体結合能を有するプロテイン A との融合タンパク質である TAT-B2C と抗体とを結合させた複合体である (Fig.1)。この方法により、PTD を抗体に化学的に修飾することなく、簡便に抗体を細胞内に導入することに成功した。しかしながら、単純に蛍光標識した抗体を細胞内に導入しただけでは、全ての抗体が蛍光を有するため、バックグラウンドを減少させる何らかの技術が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では抗体導入により細胞イメージングを目的とした。ここでは先に述べた問題を解決する手段として、異なる抗原部位を認識する2つの抗体を細胞内に導入する方法を検討した。2つの抗体が同時に分子を認識した際にシグナルを発するシステムを構築すれば、バックグラウンドの問題は解消される (図1)。そこで、始めにこのシステムの構築を目指した。

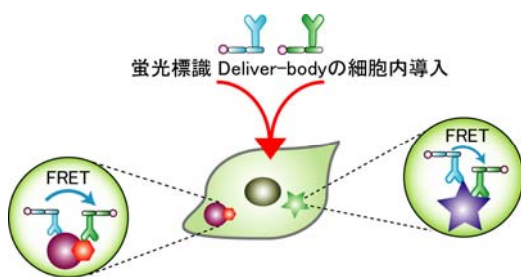


図1. 本研究の概念図

3. 研究の方法

研究開始当初は、2種類の抗体が標的分子を認識した際にシグナルを得る方法として、蛍光分子による Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) の利用を計画したが、

バックグラウンドシグナル、感度などの条件を鑑み、発光酵素である luciferase (Luc) に着目した。しかしながら、Luc 分子も通常は常時活性を有するため、2種類の抗体が分子認識した際に活性を有するように、改変が必要である。ここでは Luc 分子を分割し、分割分子が近接した際に活性が回復するかを検討した。はじめに Luc を適当な位置で切断し、その間に RNA 結合ペプチドを挿入した Luc 融合タンパク質を作製し、RNA との結合により引き起こされる構造変化に伴う Luc 活性の上昇から Luc の分割位置を検討した (図2)。

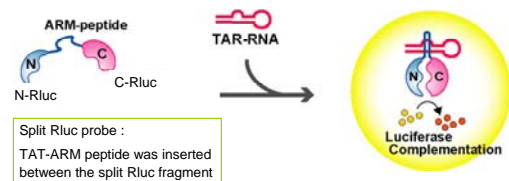


図2. RNA 結合タンパク質を用いた Luc 分割位置の検討

検討後、分割 Luc と抗体結合タンパク質の融合タンパク質を作成し、抗原存在時に Luc 活性が上昇するかを検討した (図3)。

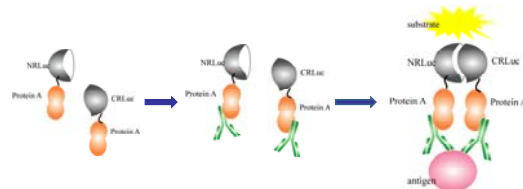


図3. 分割 Luc と抗体を組み合わせた分子検出法

4. 研究成果

始めに Luc の分割位置を検討した。その結果、分割位置 S91-Y92 において分割した Luc が、分割後も良好な活性の回復を示したことから分割位置を決定した。また、図2に示した方法を発展させて、任意の目的 RNA を検出するために図4に示す分割 RNA プローブを構築した。

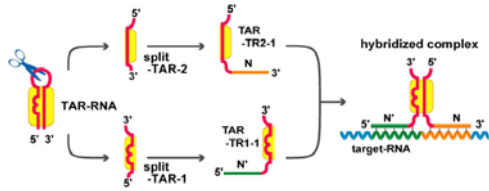


図4. 分割 RNA プローブの構築

この分割 RNA プローブを利用した結果、ホモジニアスな RNA 検出法として利用可能であることが示された (図5)。なお、これらの結果は国際専門誌に投稿・発表した。

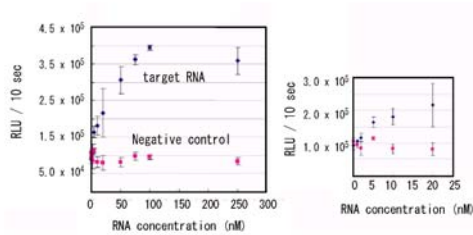


図5. ホモジニアス RNA 検出結果

Luc の分割位置を決定した後、図3に示した分子検出法が可能であるかを検討した。始めに、構築した融合タンパク質が、近接時に酵素活性を回復するかを、融合タンパク質を高濃度で混合することにより確認した。その結果、タンパク質の濃度が増加するに連れて、酵素の活性回復が見られた (図6)。この結果から、作製した融合タンパク質は近接時に活性回復をすることが示された。

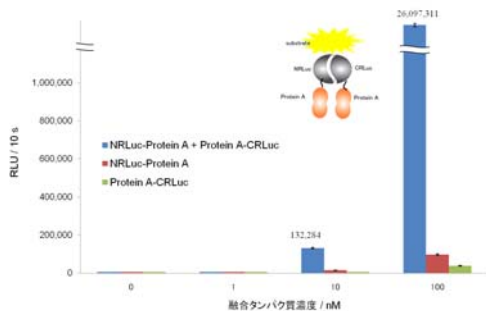


図6. 融合タンパク質混合時の活性回復

次に、溶液中の目的分子の検出が可能であるかをモデルタンパク質であるヒト血漿

アルブミンを用いて行った。しかしながら、溶液中での目的分子の検出には、更なる検討の必要があることが示された。そこで、溶液中の分子に比べ、局所濃度が高いと考えられる大腸菌の表面抗原を標的として、目的分子の検出が可能であるかを検討した。その結果、抗体の結合に伴う Luc の近接により酵素活性が回復しシグナルが得られることが示された (図7)。

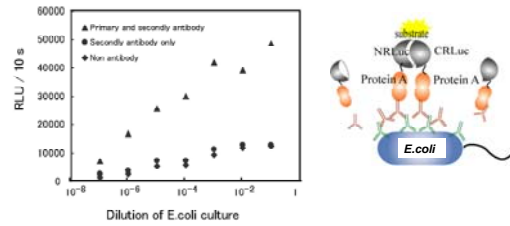


図7. 分割 Luc と抗体の組み合わせによる大腸菌の検出

以上の結果より、目的とする細胞内分子のイメージングにおける、イメージング部のシステムの構築が可能であることが示された。今後更なる検討により、本研究の目的は達成されると強く考えられる。

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4件)

1. Andou T, Endoh T, Mie M, Kobatake E. RNA detection using peptide-inserted Renilla luciferase.

Anal Bioanal Chem., **393**, 661-8 (2009)

2. Noda T, Fujino T, Mie M, Kobatake E. Transduction of MyoD protein into myoblasts induces myogenic differentiation without addition of protein transduction domain.

Biochem Biophys Res Commun., **382**, 473-7 (2009)

3. Seidi A, Mie M, Kobatake E.

Recombination System Based on Cre alpha Complementation and Leucine Zipper Fusions.

Appl Biochem Biotechnol., **158**, 334-42 (2009)

4. Fujita Y, Mie M, Kobatake E.
Construction of nanoscale protein
particle using temperature-sensitive
elastin-like peptide and polyaspartic
acid chain.
Biomaterials, **30**, 3450-7 (2009)

以上、全て査読有り

[学会発表] (計5件)

1. 小林美紀、三重正和、小島英理、細胞膜
透過ドメインを利用した抗体導入法の
開発、第31回日本バイオマテリアル学
会大会、2009年11月17日、京都府民総
合交流プラザ・京都テルサ
2. ゴファン ビッツ トウイ、三重正和、
小島英理、Luciferase の α -
complementation を利用した新規ホモ
ジニアス免疫測定系の開発、第31回日
本バイオマテリアル学会大会、2009年
11月17日、京都府民総合交流プラザ・
京都テルサ
3. 三重正和、野田智秀、藤野尅至、小島英
理、転写因子タンパク質導入による細胞
分化誘導、第24回生体機能関連化学シ
ンポジウム・第12回バイオテクノロジー
一部会シンポジウム、2009年9月14日、
九州大学医系キャンパス・百年記念講堂
4. Masayasu Mie, Hiromi Kobayashi, Eiry
Kobatake, Development of antibody
delivery method for protein sensing in
living cells, PRiME 2008 Meeting,
2008.10.16, Honolulu, Hawaii
5. Takashi Andou, Tamaki Endoh, Masayasu
Mie, Eiry Kobatake, Development of
RNA Detction System Using
Split-Renilla Luciferase, PRiME 2008
Meeting, 2008.10.16, Honolulu, Hawaii

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三重 正和 (MIE MASAYASU)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科
・助教
研究者番号：40334528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし