

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750096

研究課題名（和文） 心臓組織におけるストレスホルモン様化学物質評価系の構築

研究課題名（英文） An advanced assay system for stress hormone-like chemicals in cardiac tissues

研究代表者

金 誠培 (Kim Sung-Bae)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：60470043

研究成果の概要（和文）：

本研究では「ストレスホルモンプローブの開発と高輝度化、及び生体・心筋組織への応用」を目標にしたものであり、新たな人工生物発光酵素の樹立、高性能ストレスホルモンプローブの開発、生体・心筋イメージングに至るまで多彩な研究を遂行できた。このように材料から応用まで研究開発の連鎖反応を起こしたことによって、当初の目標を上回る爆発的な成果を得ることができた（業績欄参考：論文10報（筆頭， 交信著者）、研究発表15件（筆頭）、英語単行本2冊（分担執筆）等）。

本研究期間中、①従来の最高輝度発光酵素（深海フランクトン由来）より10倍程度明るくて、発光安定性の優れた生物発光酵素に成功した（例：Kim et al. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 8732）。また、②全く新しい人工発光酵素を樹立しartificial luciferase (ALuc)と名付けた（例：特願2012-237043）。この特許は、産総研の中で「特許1類（上位3%以内）」として分類され外国出願も決定されている。③また新規ストレスホルモン可視化プローブの開発と分子設計改良により以前より約10倍程度検出感度が向上した。更に約15人の健常人の唾液からストレスホルモンを計測することに成功した（例、Kim et al. *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, 1835）。④更に発光性の心筋組織の樹立に成功しており（参考図右段の真ん中）、他の生体イメージングや専用のスライド式発光計測装置の開発にも成功した。⑤これらの一連の研究成果を踏まえ、本技術の普及のために多数の原著論文、レビューや進歩総説を発表した。

これらの研究成果は、大局的には、人への生体影響の作用機序の解明、個人の感受性の差に基づく評価、動物個体に苦痛を与えない化学物質評価法の構築などに貢献する。また、波及効果としては、化学物質の安全性評価だけでなく、創薬分野への応用も強く期待できる

研究成果の概要（英文）：

The present study was purposed to construct an advanced assay system for stress hormone-like chemicals in mammalian cells and cardiac tissues. In respect to the purpose, I conducted a variety of studies ranging from creation of new artificial luciferases emitting superluminescence (basic study), development of efficient stress hormone probes, and imaging of stress-hormonal events in cardiac tissues (applications). These diverse studies enabled us to conduct publication of 10 scientific papers (as the first and corresponding author) and two research reviews in book chapters, and 15 presentations in the academic societies.

In specific, I created superluminescent variants of a copepod luciferase as a new bioluminescent material (Kim et al. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 8732). Further, I generated a series of artificial luciferases that exert an excellent optical intensity, prolonged bioluminescence, and heat stability. The corresponding patent was selected as a patent of Category 1 in AIST (meaning rating within-top-3% among AIST patents). I also genetically synthesized diverse single-chain probes that sense stress hormones in saliva with high selectivity and sensitivity. The excellent sensitivity to stress hormones was achieved by an optimization of the molecular designs. I demonstrated the fidelity of the probes through examination of stress levels in the saliva of 15 volunteers (Kim et al. *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, 1835). This research infrastructure was further utilized to develop an efficient slide-equipped optical device for many hormone samples. I also created a light-emitting cardiac tissue that are beating and emits light in response to stress hormones and chemicals.

All the present research activities contribute to investigation of the molecular events related to life phenomenon and creation of new methodology evaluating hormone effects in the made cardiac tissues instead of scarifying model animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード: 生物発光酵素, 一分子型生物発光プローブ, ストレスホルモン, イメージング, 超高輝度, バイオ診断, 心筋組織分化, 高輝度化

1. 研究開始当初の背景

従来における化学物質の生体影響を評価する手法では、(1)人への生体影響の作用機序の解明、(2)個人の感受性の差に基づく評価、(3)動物個体に苦痛を与えない低侵襲的評価が困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、従来法の限界を克服し、優れた化学物質評価法を確立する鍵として下記の点を目指して定めた。

(1)新規高輝度発光酵素の開発とそれに基づくストレスホルモンプローブの開発・性能向上。

(2)未分化細胞 (ES 細胞など) に生物発光プローブ遺伝子を導入した後、分化誘導後の臓器組織で、プローブの性能 (応答性、発光強度、相関性等) 評価。

(3)細胞特異的なプラスミドを利用した、選択的プローブ導入方法の確立。

3. 研究の方法

・上記研究目標を達成するために、まず、高

輝度で高性能の分子認識プローブを開発し、このプローブを導入した各種哺乳動物由来の培養細胞や未分化細胞 (ES 細胞) を用いてストレスホルモンや化学物質の活性評価を試験管の中で行う。

・心筋組織で好適に作動する生物発光プローブを合成する際、既開発の高輝度生物発光酵素を基盤とした分子設計を行う。

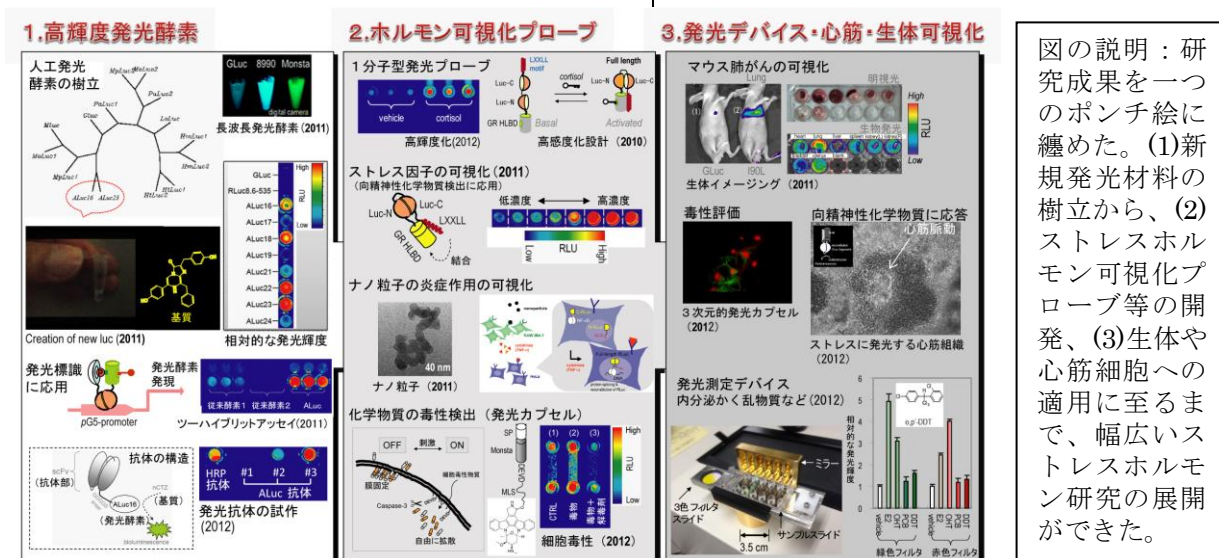
・前記プローブ遺伝子を心臓内各細胞種に特異的に導入するためのプラスミドや試薬を検討する。

・心臓発生の危険因子とされてきた各種化学物質のホルモン活性を、当該系で評価する。具体的には、ストレスホルモン様化学物質、喫煙によって発生する発ガン性物質、薬剤候補物質等による影響を評価する。

4. 研究成果 (下記図・業績欄参考)

当該研究計画書で定めた目的として「ストレスホルモンプローブの高性能化と高輝度化」を掲げたことから、まず新規高輝度生物発光酵素を樹立した (特許②; 論文⑧⑤)。

また、前記高性能発光酵素の開発と共に、ストレスホルモンプローブの分子構造を最適



図の説明：研究成果を一つのポンチ絵に纏めた。(1)新規発光材料の樹立から、(2)ストレスホルモン可視化プローブ等の開発、(3)生体や心筋細胞への適用に至るまで、幅広いストレスホルモン研究の展開ができた。

化する研究も同時に進行させ、プローブの高輝度化・高感度化を達成した(特許④;論文②④)。

具体的には、深海発光プランクトン由来の生物発光酵素にポイント変異を導入することにより、従来酵素より約10倍程度明るくて、発光安定性の優れた生物発光酵素を樹立できた(論文⑧)。更に研究を重ね、発光酵素の輝度を従来最高輝度より2桁明るい人工発光酵素の樹立にも成功した(特許②)。この輝度は、従来もっとも汎用されているHRPよりも明るい発光抗体の開発にも成功した。これらの発光技術を従来ストレスホルモンプローブ円滑に適用するためにその周辺技術(測定デバイスや反応溶液)を開発した(特許①③)。

この努力により従来のストレスホルモンプローブに比べて約10倍程度検出感度と輝度の向上を達成できた。この高感度性を用いて約15人の健常人の唾液からストレスホルモンを計測することに成功した。この結果をアメリカ化学会(ACS)のBioconjugate Chem等に報告した(論文⑨⑩)。

また、前記ストレスホルモンプローブの分子設計に関する当該研究から得た新しい知見を元に、スマートなホルモン可視化に適した分子設計手法に関する論文を発表した(論文⑦)。このホルモン可視化技術を応用して化学物質の毒性評価系を確立した(論文①⑥)。

この一連の研究から、ストレスホルモンを高感度で検出する材料、プローブ設計、手法に関する新たな研究成果を対外に発信できた(20件の学会発表参考)。

この先進ストレスホルモン評価技術を基に、当該可視化プローブをES細胞に適用し発光性心筋組織に分化させることに成功した。この際、ホルモンや各種化学物質の活性を輝度と脈動で同時計測することに成功した。

このような発光技術の進展に関する総説を権威ある国際ジャーナルに多数報告した(例:論文③)。

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 10 件)

① [国際誌 査読有り 筆頭]

“A Bioluminescent Assay System for Whole-Cell Determination of Hormones”
Sung Bae Kim, Toshiyuki Suzuki b, and Akira Kimura
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2013 in press

② [国際誌 査読有り 筆頭]

“Molecular Imaging Probes Based on

Bioluminescence and Fluorescence”
Sung Bae Kim and Ryuichi Naganawa
Bunseki Kagaku 2013, 62(5), in press.

③ [国際誌 査読有り]

“Advances in Fluorescence and Bioluminescence Imaging”
Takeaki Ozawa, Hideaki Yoshimura, Sung Bae Kim
Analytical Chemistry, 2013, 85, 590-609.

④ [国際誌 筆頭・交信著者]

“Intelligent Design of Nano-Scale Molecular Imaging Agents”
Sung Bae Kim, Mitsuru Hattori, and Takeaki Ozawa
International Journal of Molecular Science, 2012, 13, 16986-17005.

⑤ [国際誌 筆頭・交信著者]

“Correction to Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays”
Sung Bae Kim, Hideyuki Suzuki, Moritoshi Sato, Hiroaki Tao
Analytical Chemistry, 2012, 84, 4244-4244.

⑥ [国際誌 筆頭・交信著者]

“Bioluminescent Capsules for Live-Cell Imaging”
Sung Bae Kim, Yuzuru Ito, Masaki Torimura
Bioconjugate Chemistry, 2012, 23, 2221-2228.

⑦ [国際誌 査読有り 筆頭・交信著者]

“Labor-effective manipulation of marine and beetle luciferases for bioassays”
Sung Bae Kim
Protein Engineering, Design, & Selection, 2012, 25(6), 261-269.

⑧ [国際誌 査読有り 筆頭・交信著者]

“Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays”
Sung Bae Kim, Hideyuki Suzuki, Moritoshi Sato, Hiroaki Tao
Analytical Chemistry, 2011, 83, 8732-8740.

⑨ [国際誌 査読有り 筆頭・交信著者]

“A bioluminescent probe for salivary cortisol”
Sung Bae Kim, Y Takenaka, M Torimura
Bioconjugate Chemistry, 2011, 22, 1835-1841.

⑩ [国内誌 査読有り 筆頭・交信著者]

“分子イメージング用生物発光プローブの

開発”（出版社：分析化学会、ISSN: 0386-2178）

金 誠培, 博明 田尾
進歩総説「ぶんせき」誌、2011年3月号、
p150-158.

〔学会発表〕（計15件）

①〔国内 登壇者〕

“生物発光計測デバイスの開発と応用”

金 誠培

日本化学会第93回年会、立命館大学びわこ
キャンパス、ATPポスター発表（2013年3月
23日）2PD-060

②〔国内 登壇者〕

“生物発光カプセルの開発と応用”

金 誠培

日本化学会第93回年会、立命館大学びわこ
キャンパス、口頭発表（2013年3月23日）
2G1-44

③〔国内 登壇者〕

“生物発光を用いたホルモンセンシング”

金 誠培

センサ見本市、産総研共用講堂、口頭発表
（2013年1月21日）

④〔国内 登壇者〕

“科学が拓く産業技術にふれてみる - 生物
発光の不思議発見”

金 誠培

サイエンスキャンプ（JST主催）、産総研さく
ら館（2013年1月9-11日）

⑤〔国内 登壇者〕

“ホルモン様化学物質診断技術の開発と応
用”

金 誠培

E&E フォラム、産総研共用講堂、ポスター発
表（2013年1月18日）

⑥〔国内 登壇者〕

“生物発光カプセルの開発と細胞死イメー
ジングへの展開”

金 誠培

日本生物発光化学発光研究会第29回学術講
演会、産総研臨海副都心センター、ポスター
発表（2012年11月17日）

⑦〔国内 登壇者〕

“Labor-effective manipulation of marine
and beetle luciferases for bioassays”

金 誠培

日本分析化学会第61回年会、金沢大学、口
頭発表 C2009（2012年09月20日）

⑧〔国内 登壇者〕

“A Bioluminescent Assay Device for Whole
Cell Assays”

金 誠培

日本分析化学会第61回年会、金沢大学、口
頭発表 C2008（2012年09月20日）

⑨〔国内 登壇者〕

“高輝度生物発光プローブの開発とホルモ
ンアッセイへの展開”

Sung-Bae Kim

平成23年産総研 環境・エネルギーシンポ
ジウム「環境・ヘルスケアを支える将来の
診断技術開発」機械振興会館、東京
（2012.08.30）

⑩〔国内 登壇者〕

“高輝度生物発光プローブの開発とバイオ
アッセイへの展開”

金 誠培

平成23年度産総研本格研究ワークショップ
in 東北、仙台ガーデンパレス、ポスター発
表（2012年3月7日）

⑪〔国内 登壇者〕

“生物発光カプセルの開発と細胞死イメー
ジングへの展開”

金 誠培

日本生物発光化学発光研究会第29回学術講
演会、産総研臨海副都心センター、ポスター
発表（2012年11月17日）

⑫〔国内 登壇者〕

“Bioluminescent indicators for
illuminating steroid hormones”

Sung-Bae Kim, Hiroaki Tao

JAIMA Conference 2011, The Japan Society
for Analytical Science, Makuhari Messe,
A048, Poster（2011.09.08）

⑬〔国際 登壇者〕

“Genetically encoded bioluminescent
indicators for stress hormones”

Sung Bae Kim

IUPAC International Congress on
Analytical Sciences (ICAS) 2011, Kyoto
Intl Conference Center, 24pD08
(ICAS11-P0211) (2011.05.24)

⑭〔国際 登壇者〕

“Integrated-molecule-format multicolor
probes for illuminating intracellular
molecular events”

Sung Bae Kim

IUPAC International Congress on
Analytical Sciences (ICAS) 2011, Kyoto
Intl Conference Center, ICAS11-P0212

(2011. 05. 25)

⑮産総研 2011 年度オープンラボ参加 (出品)
“分子発光プローブの設計とホルモン様化学物質計測への展開”
展示番号: E-43 (2011 年 10 月 13-14 日)
発表者: 金 誠培

[図書] (計 2 件)

① [英文本 分担執筆 筆頭 交信著者]
“Fabrication of Bioluminescent Capsules and Live-Cell Imaging”
(出版社: Springer - Humana Press)
Sung Bae Kim, in Press
Method in Molecular Biology (2013)

② [英文本 分担執筆 筆頭 交信著者]
“Optical Assays for Determining Hormone Actions - Spying cell-to-cell communications”
(出版社 Studium Press LLC)
Sung Bae Kim, p315-341
Nanotechnology vol 12 Bioimaging (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

①名称: バイオアッセイに最適な反応溶液の決定
発明者: 金 誠培 (80%)、中里 哲也 (10%)、
鳥村 政基 (10%)
権利者: 独) 産業技術総合研究所
種類: 単独出願
番号: 特願 2012-236872
出願年月日: (2012/10/26)
国内外の別: 国内

②名称: 人工生物発光酵素 (Artificial Luciferase; ALuc)
発明者: 金 誠培 (80%)、鳥村 政基 (10%)、
田尾 博明 (10%)
権利者: 独) 産業技術総合研究所
種類: 単独出願
番号: 特願 2012-237043
出願年月日: (2012/10/26)
国内外の別: 国内

③名称: 発光測定デバイス
発明者: 金 誠培 (80%)、鈴木 俊幸 (10%)
木村 明 (10%)
権利者: 独) 産業技術総合研究所
種類: 単独出願
番号: 特願 2012-179597
出願年月日: 2012/8/13

国内外の別: 国内

④名称: 多重認識型生物発光プローブシステム
発明者: 金 誠培 (80%)、竹中 康浩 (10%)、
鳥村 政基 (10%)
権利者: 独) 産業技術総合研究所
種類: PCT 出願
番号: PCT/JP2011/080419
出願年月日: 2011/12/28
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 誠培 (Kim Sung-Bae)
独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員
研究者番号: 60470043