

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560969

研究課題名(和文)酸化ストレスマーカータンパク質検出用蛍光分子プローブの創製と医療診断への展開

研究課題名(英文)Development of Fluorescent Probes for the Detection of Oxidative Stress Markers and Their Application to Medical Diagnostics

研究代表者

鈴木 祥夫 (Suzuki, Yoshio)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：60321907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに当研究グループで開発したタンパク質分析用蛍光試薬において得られた知見を基に、アルデヒド修飾タンパク質を検出するための蛍光プローブの設計・合成、性能評価を行った。その結果、アルデヒド修飾タンパク質と特異的に結合する部位と蛍光発色団から構成される蛍光プローブを開発し、アルデヒド修飾タンパク質との反応による蛍光強度の増加を確認した。さらに、アルデヒド修飾タンパク質の有無をゲル電気泳動によって分離されたタンパク質の蛍光画像から確認することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Design and synthesis of fluorescent probes for the detection of aldehyde-modified proteins were carried out based on the knowledge obtained by the development of fluorescent reagents for the detection of proteins. As a result, molecular probes for the detection of aldehyde-modified proteins constructed by binding site and fluorescent molecules were developed, and fluorescence enhancement was observed after reaction between fluorescent probes and aldehyde-modified proteins. Moreover, fluorescent gel images after electrophoresis enabled the monitoring of aldehyde-modified proteins.

研究分野：工学

キーワード：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

近年の情報機器の急速な発展とともに、撮像技術及び画像処理技術が目覚ましく進歩し、細胞・組織の構造や生体分子の機能などに関わる種々の生命現象可視化イメージングすることが可能となってきた。より詳細な生体機能の可視化解析のために期待されるものは、高感度画像技術などのハードウェアの開発もさることながら、新たなる発想に基づく新規可視化プローブ分子の設計、および測定法の確立が必要となってくる。

2. 研究の目的

申請者は、特定の化学物質や化学環境に対応したセンシング機能を有する新規機能性材料の設計・合成とそれらを利用した高性能ケミカルセンサーまたはバイオケミカルセンサーの創製に関する研究を推進している。

本研究では、これまでに得られた知見を基に、次のターゲットとしてアルデヒド修飾タンパク質を特異的に認識し、可視化イメージングを行うことが出来る新規蛍光分子プローブの設計・合成およびその性能評価を行う。さらに開発した試薬の応用として、酸化ストレスと疾病との因果関係の解明し、生活習慣病の早期診断技術の確立の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光プローブの設計・合成

これまでの経緯からアルデヒド基に対する有効な結合部位は明らかとなっている。具体的には、チアゾリノン基とヒドラゾン基を併せ持つ認識部位を採用する。上記認識部位に導入する蛍光発色団を選定する上で考慮することは、標的物質(アルデヒド修飾タンパク質)との反応前後において蛍光強度が大きく変化すること、可視光での励起が可能であること、蛍光プローブ自体から発せられるバックグラウンド蛍光が抑えられて

いること、が挙げられる。上記3つの問題点は、タンパク質検出用蛍光分析試薬の利点(タンパク質との反応によって無蛍光の状態から強い蛍光を発する、可視光による励起が可能である)を採用することによって解決した。

(2) 蛍光プローブの性能評価

まず緩衝液中で、リジンまたはアルギニンの酸化体(グルタミルセミアルデヒドまたは α -アミノアジピルセミアルデヒド)を分子プローブと混合し、吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定することによって、反応が進行していること、および蛍光発光が生じることを確認した。次に、タンパク質サンプルとして酸化処理したウシ血清アルブミン(BSA)についても同様に、分子プローブとの反応特性について詳細に検討した。

次に、分子プローブとアルデヒド修飾タンパク質の反応が、タンパク質以外の妨害物質に、どの程度影響を受けるかを確認した。妨害物質として、無機塩、還元剤、界面活性剤、核酸、糖、有機溶媒を用いる。これらの妨害物質を、分子認識材料とカルボニルタンパク質の反応溶液中に過剰量添加し、蛍光強度がどの程度変化するかを確認した。

さらに、本法の優位性を確認するためにELISA法との比較検討等を実施した。

4. 研究成果

本年度は、アルデヒド修飾タンパク質を特異的に検出するための蛍光分子プローブ設計・合成および性能評価を中心に行った。それぞれの蛍光分子プローブの蛍光発色団は、これまでに開発したタンパク質検出用試薬を改良し、標的物質との疎水性相互作用による複合体形成および分子内のICT状態の変化によって強い蛍光発光を誘起する部位として4-(ジシアノメチレン)-2-メチル-4H-ピランを有する化学物質および誘導体とした。さら

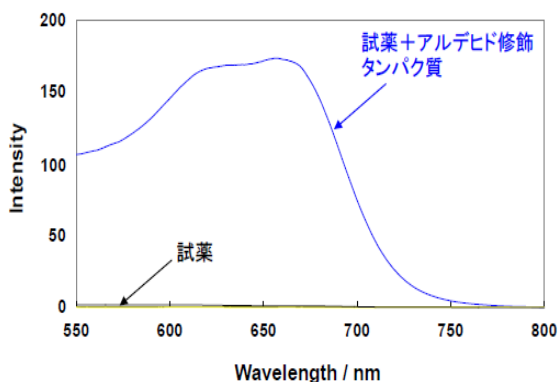


図1 アルデヒド修飾タンパク質添加前後における試薬の蛍光スペクトル

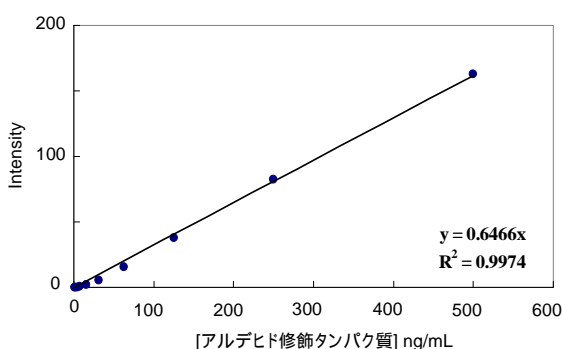


図2 650nmにおける蛍光強度とアルデヒド修飾タンパク質濃度との関係

に、アルデヒド修飾タンパク質への特異性を高めるために、チアゾリノン基とヒドラゾン基を導入した。合成した化合物の確認は、¹H-NMR、質量分析を用いて行った。これらの蛍光分子プローブが、それぞれ目的とするタンパク質を特異的に認識するかどうかを、蛍光光度法を用いて確認した。その結果、アルデヒド修飾タンパク質添加前は、蛍光分子プローブからは微弱な蛍光が観察されたが、室温下、アルデヒド修飾タンパク質を添加すると、目的のタンパク質と相互作用した時のみ、瞬時に蛍光強度の増加が確認された。検量線については、アルデヒド修飾タンパク質濃度と蛍光プローブの蛍光強度との間には良好な直線関係が成立した。蛍光分子プローブと目的とするタンパク質の解離定数を算出したところ、 10^{-9} M オーダーの値が算出さ

れた。また、妨害物質の影響について検討したところ、無機塩、還元剤、有機溶媒などは、蛍光プローブとアルデヒド修飾タンパク質との反応に影響を与えないことが分かった。

また、本法の優位性を確認するためにELISA法との比較検討を行ったところ、測定感度は同等でありながら測定に要する時間を約6分の1に短縮することが出来た。さらに、アルデヒド修飾タンパク質の有無をゲル電気泳動によって分離されたタンパク質の蛍光画像から確認することが出来た。

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)

鈴木祥夫、横山憲二、Design and synthesis of fluorescent probe for high-sensitivity protein detection based on merocyanine structure and application to rapid electrophoretic gel stain、Sensors and Actuators B-Chemical、査読有、Vol. 173、2012、pp. 114-119

DOI: 10.1016/j.snb.2012.06.023

鈴木祥夫、Design and Synthesis of Fluorescent Probe Based on “On-Off” Behavior of Dansyl Group through Controlling Quenching Efficiency of Cyanopyranyl Group by Interaction with Proteins、Analytical Methods、査読有、Vol. 5、2013、pp.2174-2177

DOI: 10.139/C3AY26412B

鈴木祥夫、高木信幸、佐野卓磨、千室智之、Design and Synthesis of a Novel Fluorescent Protein Probe for Easy and Rapid Electrophoretic Gel Staining by using a Commonly Available UV-based Fluorescent Imaging System、Electrophoresis、査読有、Vol.34、2013、pp.2464-2472

DOI: 10.1002/elps.201300089

鈴木祥夫、高木信幸、タンパク質検出用蛍光分子プローブの創製とハイスループット検出法への展開、生物物理化学、査読有、Vol. 58、2014、pp.65-67
DOI: 10.2198/sbk.58.65

〔学会発表〕(計9件)

鈴木祥夫、高木信幸、佐野卓磨、千室智之、タンパク質検出用新規蛍光分子プローブの開発と簡便かつ迅速なSDS-PAGE用タンパク質染色方法の創製、日本分析化学会第61年会、2012年09月19日、金沢大学角間キャンパス(石川・金沢)

鈴木祥夫、高木信幸、佐野卓磨、千室智之、Development of New Fluorescent Reagents for the Detection of Proteins, and Application to One-Step Electrophoretic Gel Stain without fixation and Washing、第35回日本分子生物学学会年会、2012年12月13日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡・福岡)

鈴木祥夫、高木信幸、佐野卓磨、千室智之、Development of New Fluorescent Molecular Probes for the Detection of Proteins, and Application to One-Step Electrophoretic Gel Staining Method、Pittcon2013、2013年03月18日、フィラデルフィア(アメリカ)

鈴木祥夫、Development of Fluorescent Molecular Probes for the Detection of Proteins and Their Application to High-throughput Protein Analysis, Analytix 2014、2014年4月26日、大連(中国)・大連

鈴木祥夫、タンパク質検出用蛍光分子プローブの創製とハイスループット検出法への展開、第65回日本電気泳動学会総会、2014年10月25日、横浜情報文化センター(神奈川・横浜)

〔図書〕(計2件)

鈴木祥夫、日刊工業新聞社、バイオセンサーのはなし、2012、180

鈴木祥夫、小松康雄、Springer、RNA and DNA Diagnostics、2015、印刷中

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 祥夫 (SUZUKI, Yoshio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：60321907

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし