

生体内、生体外共用生命現象可視化バイオプローブの開発と病態診断システムへの応用

## Development of bioprobes to visualize cellular events *in vivo/in vitro* and their application to diagnostic system

鈴木美穂（工学部 機能材料工学科 助手）

Miho Suzuki Ph.D. (Department of Functional Materials and Science)

生物を構成する成分である、タンパク質同士や核酸、脂質、糖質、カルシウムイオンなどの小分子が状況・状態に応じてどの様に相互作用しているか、また代謝されるか等を網羅的に解明する事を目的とした生体内、生体外共用生命現象可視化型バイオプローブ（センサー分子）群の開発を行った。生体外での検出を指標とし、感度や特異性に関する知見を充分得、必要ならば改良を行った後プローブの細胞への導入条件の検討（タンパク質デリバリー）、生体内での活性検出を試みる、という手順を踏んでいる。

1、癌の増殖などに緊密に関係し、細胞の運命を決定付けているとも考えらる細胞死のマーカーの一つであるcaspase-3（protease）活性の検出をするバイオプローブを得た。さらにそのファミリーであるcaspase-2及びcaspase-9の活性を検出するバイオプローブをも得た。Caspase-3のバイオプローブは精製酵素による活性検出能ばかりではなく、実際酵素の発現が誘導された培養細胞の細胞抽出液での活性検出にも感度よく成功した。そこで生細胞への導入条件を検討し、酵素の発現誘導を行ったところ、時間的・空間的分解能をもって酵素の活性検出が出来た。<sup>1)</sup>現在はcaspase-2及びcaspase-9においても同様の検出を試みている。

2、酸化還元状態を検出するバイオプローブの作成、生体外での検出に成功した。<sup>2)</sup>細胞において酸化ストレスは様々な信号伝達系を惹起する事が知られており、生細胞内での検出系の確立を目指し、感度の改良等を急いでいる。

3、癌の転移やアトピー性皮膚炎等に関係しているcathepsinE（protease）及びcathepsinD（protease）活性を検出するバイオプローブについても作成、生体外での検出能を確認し、感度の改良を行った。さらに特異性などの検討を行い生体内での2種同時検出への応用等を考えている。

4、核酸分解酵素（DNase）に対するバイオプローブの作成にも成功した。生体外に続き、生体内（核酸分解酵素の強発現を誘導した細胞内）での検出も予備実験において確認されており、さらなる詳細な検討を行っている。<sup>3)</sup> さらに細胞死において観察されるcaspase-2、caspase-3、caspase-9、及びDNaseの活性の上昇がどの様な関連性を持っているのか、これらのバイオプローブを用いて解明を行っていく。

以上の研究はUniversity of Manchester、Prof. Douglas、九州大学、山本健二教授、川崎医科大学大

学、刀祢重信助教授らと共同で進めている。さらに1の研究の発展のためUniversity of Lisbon、Prof. Cecilia MP Rodriguesとの共同研究も開始する事とした。Prof. Cecilia MP Rodriguesはcaspase-2 及びcaspase-9と細胞死との関係の研究においてエキスパートである。また、バイオプローブ種のさらなる拡大を図り細胞内イベントの解明並びに病態診断の多角化を目指すためカルシウム及びマグネシウムイオン濃度検出バイオプローブの作成とそれらを用いた研究に着手するため慶応義塾大学、鈴木孝治教授、小松広和助手との共同研究にも着手した。

また、ここで開発して来たバイオプローブの検出/作用原理は蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescent Resonance Energy Transfer:FRET) に基づいているがこれらの検出/作用原理を蛍光相互相関分光法 (Fluorescent Cross Correlation Spectroscopy:FCCS) に置き換えても高感度な検出が見込まれ状況に応じて原理を使い分けた方が病態診断等への応用の可能性が広がると考え、蛍光相互相関分光法に基づく診断システム開発の為のバイオプローブの検討を、北海道大学、金城政孝助教授らの協力を得て開始している。生体外における検出では良好な結果が得られている。なお、バイオプローブのprotease活性及び Ca<sup>2+</sup>濃度感受性模式図を下記に示す。

1) Caspase-3 sensitive signaling in vivo in apoptotic HeLa cells by chemically engineered intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) mutants of Green Fluorescent Protein

M.Suzuki, Y.Ito, Y. Husimi. And K.T. Douglas *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 454-456

2) A Chemically Modified Green Fluorescent Protein construct that Responds to Cleavage of an Engineered Disulphide Bond by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-based Changes

W. Zhang, M. Suzuki, Y. Ito and K.T. Douglas *Chem Lett* 34 (2005) 766-767

3) Chemically engineered intramolecular FRET mutants of GFP for visualization of versatile cellular events

M.Suzuki., Y.Ito., Y.Oki., Y. Husimi. and K.T. Douglas 2005 FEBS Congress and IUBMB Conference

