

# 生体内反応モニターバイオプローブの開発と病態診断チップおよびドラッグ

## デリバリーナノデバイスへの応用

### Development of bio-probes monitoring biological reactions and their application for diagnostic protein chip and drug delivery nano-device

プロジェクト代表者：鈴木美穂（理工学研究科・助教）

Miho Suzuki Ph.D ( School of Science and Engineering)

近年盛んに行われている、タンパク質（プロテオミクス）、代謝産物や経路（メタボロミクス）、細胞のダイナミクス（セロミクス）の網羅的解析研究は、生物の理解を進めると同時に医療の発展を目指している。ここでも生体内反応の網羅的解析ツールのひとつであるセンサー分子・バイオプローブを開発し、病態診断や創薬への応用を考えた。センサー分子・バイオプローブの基本構造は異種の蛍光2分子による複合体とし、検知原理は蛍光分子間のエネルギー移動（FRET）、ゆらぎの相関性(FCCS)、蛍光寿命(FRIM)など限定はせず、また測定装置等も顕微鏡（位相差、共焦点、原子間力など）、プレートリーダー、セルソーターとし、さらには測定対象も、細胞抽出液、血液、純粋酵素、細胞内、と汎用性の高さに重点を置いた。

1 量子ドットと蛍光タンパク質、量子ドットと蛍光色素ラベル化核酸、量子ドットと pH 感受性蛍光色素の protease、DNase、DNA polymerase、pH センサー分子（FRET 適用）作製と併用化

Trypsin、caspase-3 による認識部位を遺伝子工学的に組み込んだ緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)を量子ドット上に固定化し、各々の protease センサー分子（FRET）を作製した。さらに蛍光色素でラベルした核酸を量子ドット上に固定化し、DNase、DNA polymerase センサー分子を作製した。フルオレセインマレイミド（慶応大学小松博士より提供）固定化量子ドットにより pH センサー分子を作製した。そのうちより 2 種のセンサー分子を同時併用を試み、trypsin、DNase センサー分子の組み合わせにおいて再現性の良い変化を得た。

2 蛍光タンパク質と蛍光色素によるセンサー分子（FRET 適用）の 2 種同時 *in vivo in vitro* における併用化

これまで開発してきた緑色蛍光タンパク質と蛍光色素による caspase-3 のセンサー分子を赤色蛍光タンパク質と蛍光色素の組み合わせにおいて作製し、緑色蛍光タンパク質と蛍光色素による caspase-9 のセンサー分子との併用化を *in vivo in vitro* で検討した。2 種のセンサー分子併用化においては蛍光色素の選択が（蛍光波長の分解能を最大にする事）大事であり、この組み合わせの解析を中心に行い、概ね成功した。同様に赤色蛍光タンパク質と蛍光色素による caspase-3 のセンサー分子と緑色蛍光タンパク質と蛍光色素による DNase のセンサー分子の併用化も成功した。

3 蛍光タンパク質と蛍光色素によるセンサー分子（FCCS 適用）の測定条件最適化

センサー分子の測定原理を FRET 適用型中心に進めてきたが、蛍光相互相関分光法（FCCS）においても感度良く測定可能になる様、条件検討を行った。蛍光タンパク質と蛍光色素による Trypsin のセンサー分子を蛍光色素の違いと測定感度との関係を検討し、概ね良好な条件を確認した。これにより FRET を観察

しにくいセンサー分子の測定系の確保も行われた (図 1)。

#### 4 蛍光タンパク質と蛍光色素によるセンサー分子のフェムト秒レーザーを用いた多重次元解析

フェムト秒レーザーと、多次元分光による励起光、蛍光、時間の3次元解析を行った。情報量が増加することでセンサー分子の併用化のより多重化の可能性が示された (図 2)。

#### 5 蛍光タンパク質と蛍光色素によるセンサー分子の細胞導入後のセルソーターを用いたハイスループット解析

センサー分子を細胞に導入し (caspase-3、DNase 等) セルソーターによる分布確認を行ったところ、蛍光タンパク質を細胞内で発現させて場合より、平均蛍光強度は高く得られる場合が多かった。また、それらの細胞に apoptosis 誘導を行ったところ、誘導を行わなかった細胞群との間で差異が感知され、センサー分子が細胞内で機能し、それを基に細胞をソーティング出来ることが確認された。今後この系の他のセンサー分子の適用可能性、併用可能性を検討していくことで創薬のハイスループット化が格段に進むと考えられる (図 3)。

図 3

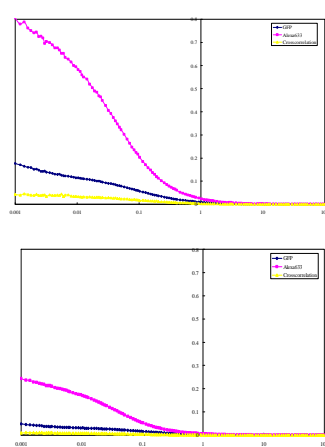
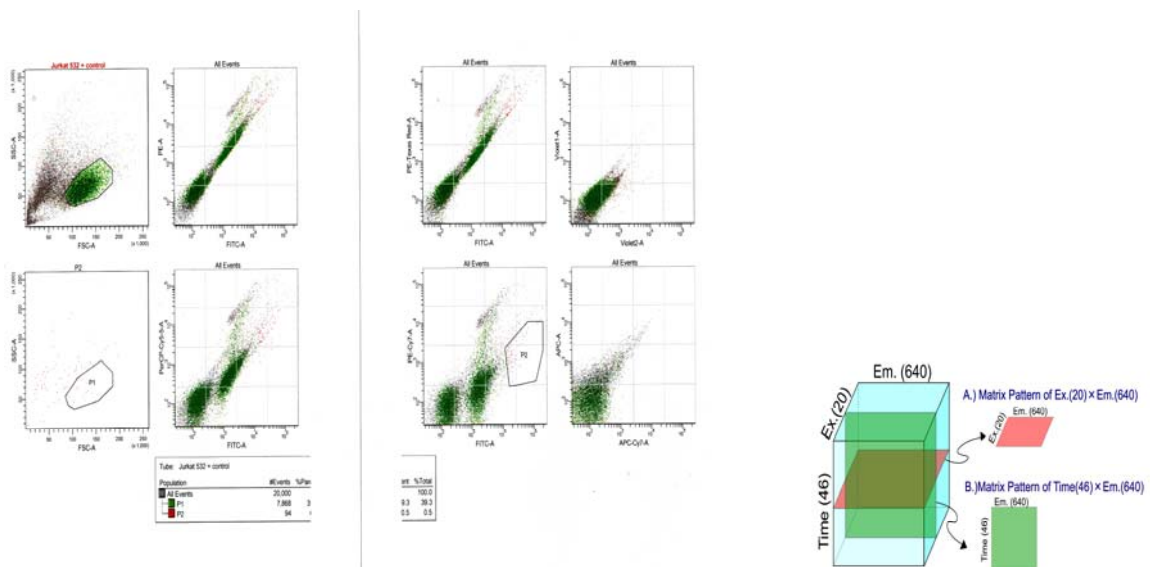


図 1

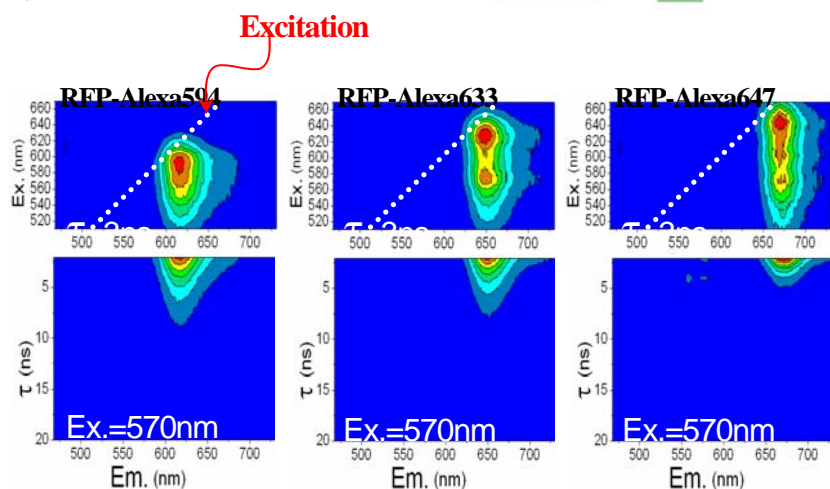


図 2