

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用
したバイオ素子・システムの創製」

研究課題「金属錯体プローブを用いる
遅延蛍光バイオイメージング」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成18年10月

研究代表者: 松本和子
(早稲田大学・教授)

1 研究実施の概要

希土類蛍光錯体は、紫外領域の光で励起すると可視領域に蛍光を発することが知られている。励起および蛍光の最大波長の差であるストークスシフトが大きく、励起光がバックグラウンドノイズとならない有利性を持つ。また、数百マイクロ秒から1ミリ秒と蛍光寿命が長いこと、遅延蛍光測定によって、パルス励起直後の100～200マイクロ秒の蛍光を除去すると、夾雑物や容器部材から発生するバックグラウンド蛍光を効率よく除去でき、極めて微弱で従来の方法では検出が困難であったシグナルを検出することが可能となる。本法を、従来の各種分析やライフサイエンス分野の分析に応用するためには、それぞれの分析に適した希土類蛍光標識剤を開発する必要がある。

細胞や組織標本では、細胞や組織からの蛍光（自家蛍光）が強く発生する場合もあり、従来の有機系の標識剤を用いた場合に、高感度検出の妨げとなっている。遅延蛍光測定を採用できる希土類蛍光標識は、原理的に、この問題を解消する有効な手段であることが期待された。

本研究課題の開始当初、すでに研究代表者の松本らは、希土類蛍光錯体を蛍光標識として用い、遅延蛍光測定によって、免疫アッセイ、HPLC、DNA ハイブリダイゼーションなどの検出系において、従来の検出方法に比べ2桁以上の高感度を達成していた。

また、蛍光標識は、細胞や組織標本の免疫学的染色法にも広く用いられている従来の有機系の標識剤は光ブリーチングのために観測時間が制限されるという問題点があるが、希土類蛍光錯体は、配位子によっては、有機系の蛍光標識剤に比べてブリーチングが起こりにくいという特徴を有している。

本研究課題の目的は、従来から指摘されていた有機系蛍光標識剤の問題点を、希土類蛍光標識剤と遅延蛍光観測を組み合わせたシステムを開発することによって解決しようとするものである。つまり、希土類錯体が現行の有機系蛍光標識剤に比べて光ブリーチングを起こしにくいという特徴に注目し、現在広く用いられている蛍光顕微鏡の“有機系蛍光標識剤の光ブリーチングにより観測時間が数分に限られる”という限界を大幅に改善した世界初の時間分解蛍光顕微鏡システムを完成し、細胞の生命活動を数十分以上の長時間にわたって観察することを目的とした。

この目的を達成するために、本研究課題は、①新規希土類蛍光錯体標識剤の開発と②遅延蛍光観察装置の開発、③これらの標識剤と装置を合わせた希土類蛍光観察システムの評価という3つの骨子からなる。そして、これらの骨子に従って研究を進めるため、本研究課題は、研究代表者らのグループ（主に標識剤と装置の開発を担当）に共同研究の2グループ（主に評価系の開発と評価を担当）を加えた計3グループで構成し、互いに連携をとりながら進めていくこととした。

研究代表者らのグループ（松本グループ）では、先ず安定な錯体の開発を行なった。希土類蛍光錯体の最も安定な錯体には、配位子は8から9の配位座を有する必要があると考えられている。研究代表者の松本らは、これまでに BPTA という9つの配位座を持つ希土類蛍光錯体を開発したが、生体分子に標識する際に1つのカルボニル基を結合基として利用するために希土類イオンへの結合能が低下し、十分な安定性を示せなかった。この経験を踏まえ、新規希土類蛍光錯体は、配位部位とは別の位置に結合基を導入することとし、かつ蛍光発光の効率を損なわない分子の開発を目指した。検討の結果、テルビリジン骨格に配位数を9とするためのポリカルボン酸をもち、発色団でもあるテルビリジン部位と共役していないジクロロトリアジルアミノビフェニル基を結合基として導入した 2,2',2'',2'''-{4'-[(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino-biphenyl]-4-yl]-2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diyl}bis(methylenenitrilo)tetraacetic acid (DTBTA)-Eu³⁺の開発に成功した。

この DTBTA-Eu³⁺を用いて、検出系の構築を行なった。細胞や組織の免疫学的染色という用途を踏まえ、ビオチン・アビジン系への適用を検討した。検討は、ストレプトアビジンを DTBTA-Eu³⁺で標識し、secondary probe としての性能を評価した。性能は、細胞や組織の免疫学的染色、ELISA、ハイブリダイゼーションアッセイ等で確認され、ビオチン・アビジン系のアッセイツールが完成した。本系は、共同研究グループのひとつ、吉田グループでのアッセイ系へ適用し、蛍光標識剤の評価が行なわれた。一方、DTBTA-Eu³⁺は、もうひとつの共同研究グループである船津グループでの評

価に備え、核酸プローブへの直接標識条件を検討し、標識方法を確立した。

遅延蛍光観察装置の開発では、本課題開始当初、基本的な作動原理の確認ができる試作機が完成しつつあった。この装置を用いて、細胞標本の免疫学的染色において、シグナル検出に関わる問題のあぶり出し、遅延蛍光観察のパラメーターの検討などを実施し、染色シグナルの取得に成功した。

船津グループでは、共同研究者の船津は、本課題の構想当時、水溶液中の蛍光色素の一分子イメージングに世界で初めて成功し、酵素1分子が ATP を加水分解している様子や、蛍光標識した分子モーター1分子の運動を画像化することなどに成功していた。また、生きた細胞内で蛍光標識した1分子の生体分子をイメージングできる蛍光顕微鏡の開発を行い、生きた細胞の任意の高さで光学的断層像をビデオレートで撮影できる共焦点蛍光顕微鏡観察法を開発していた。これらの基盤技術を上述の遅延蛍光観察法と組み合わせることで、細胞からの自家蛍光などの影響を抑え、更に、長時間観察が可能なイメージングシステム創製が可能であると期待された。本グループは金属錯体プローブを用いる細胞内生命現象の観察と応用を目指して、課題に取り組むこととした。以下に述べるように、mRNAとDNAを観察対象として、それらに適した観察の要素技術の開発を行った。

生きた細胞内で、特定の mRNA の発現量を定量し、さらに動態を1分子レベルでイメージングすることは、遺伝子発現の時空間制御を理解する上で極めて重要である。研究課題のひとつとして、細胞内の mRNA の発現と動態を高感度に定量イメージングする方法を開発することを目指した。生きた組織の細胞に、特定の mRNA と相補的な塩基配列をもつ蛍光色素または金属錯体を結合させたオリゴ DNA、2'-O-methyl RNA などを導入し、個々の標的 mRNA 分子を標識する手法を検討した。まず、*in vitro* において mRNA と結合するオリゴ DNA、2'-O-methyl RNA の量を定量し、mRNA の2次構造が結合に及ぼす効果を評価した。次に、細胞内での評価を行うために、生きた細胞中で FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy; 蛍光相関分光法) を可能とし、これにより蛍光標識した分子の個数と拡散定数を測定した。蛍光標識したオリゴ DNA、2'-O-methyl RNA は、mRNA と結合すると拡散が遅くなるため、結合の有無を FCS で高感度に検出することが可能である。特定の RNA と結合したオリゴ DNA は生きた細胞内で容易に解離や分解を起こしたが、2'-O-methyl RNA は安定な結合を保っていた。

以上の成果を踏まえて、mRNA の核外輸送の可視化、mRNA の核内運動など mRNA の細胞内での動態の観察を検討した。成果の概略を以下に述べる。1つは、人工核酸プローブのハイブリダイゼーションによって、生細胞内における特定の mRNA のイメージングができたというものである。人工核酸である 2'-O-methyl RNA を使用して FRET イメージングを行い、Cos7 細胞に内在する c-fos mRNA の局在をイメージングすることに成功した。これは、生細胞内で、内在する特定の mRNA をイメージングした初めての例である。これにより、特定の mRNA の動態をリアルタイムにイメージングすることが可能になった。次に、人工核酸のハイブリダイゼーションにより、生細胞内における特定の mRNA をリアルタイムに定量するものである。まず、細胞にアンチセンス 2'-O-methyl RNA をインジェクションし、標的 mRNA との解離定数 (Kd) を FCS を用いて求めた。この成果は、生きた細胞内でアンチセンス 2'-O-methyl RNA と標的 mRNA の Kd を求めた最初の報告である。この Kd を基にして、各細胞におけるフリーなアンチセンス 2'-O-methyl RNA と c-fos mRNA に結合したアンチセンス 2'-O-methyl RNA を測定することにより、細胞内における c-fos mRNA の濃度を求めることが可能になった。このように生きた細胞内で特定の mRNA の濃度をリアルタイムに定量した例は他にない。

次に、蛍光色素または金属錯体で標識したテスト DNA (DNA 切断活性を定量するために用意したプロモーターを持たずタンパク質もコードしていない DNA) を組織に導入し、個々のテスト DNA の切断を高感度に検出することを検討した。検出方法として、フォトンカウンティングヒストグラム法を利用した。フォトンカウンティングヒストグラム法とは、集光させたレーザー光の領域内を通過する蛍光分子の平均個数と蛍光強度を計測する方法である。まず、2つのヌクレオソームの DNA に、それぞれ1個の蛍光色素を結合させ

た試料を調製した。DNA の切断により 2 つのヌクレオソームが分離したことを蛍光色素の個数を数えることにより検出した。この方法で、細胞のアポトーシスの指標としてのヌクレオソーム DNA の切断をリアルタイムに溶液中で検出することに成功した。

吉田グループでは、先に述べたように、組織標本の免疫学的染色系での評価を目指して研究を行なった。その概略を以下に述べる。

種々の疾病に酸化ストレスが寄与していると信じられてきたが、有効な測定法がないため、具体的な証拠が少なかった。それを研究するために、酸化ストレスマーカーを高感度・高信頼性で、多数の検体を少量の試料から測定する方法が求められてきた。High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) は感度が高いが、試料の調整に労力を要し、多数検体の同時測定が不可能であった。また、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) では、実用的な感度を得ることができなかった。また、蛍光標識剤を用いた顕微鏡的観察をする場合、蛍光の特異性が問題となることが多かった。そこで、吉田グループでは、木村を中心として、金属錯体プローブを用いた時間分解蛍光免疫測定法、及び時間分解蛍光顕微鏡を用いた疾病機構の解明を目標として、研究をスタートした。

一般に、組織・血球内で活性酸素が生成すると、細胞膜の脂質と反応して過酸化脂質を生成し、これが細胞機能を傷害する。過酸化脂質 4-hydroxynonenal (HNE) を酸化ストレスマーカーとして選んだ理由は、HNE は反応性が高くタンパクに結合して、その機能を傷害することが多く、western blotting や proteome 法を用いて、標的蛋白質を同定できる点にあった。また、HNE は免疫組織化学上、動脈硬化巣で泡沫化したマクロファージを強く染めることより、病変の局在、関与する細胞を同定するマーカーともなりうる。

木村は、既に関連されていた金属錯体 BHHCT-Eu³⁺ を標識剤とし、polyclonal、monoclonal の 2 種類の抗 HNE 抗体を用いたサンドイッチタイプのイムノアッセイに時間分解蛍光測定を組み合わせ、通常の ELISA の約 100 倍の感度を得ることができる免疫学的測定法の開発に成功した。この方法を用いることによって、感染症モデルであるリポ多糖 (LPS) 投与ラットの血中・臓器中に生成される微量 HNE の検出が可能になった。炎症や酸化ストレスの寄与の程度を測定する方法として有用と思われる。また、HNE の生成源である細胞、小器官、酵素を生化学的に同定し、標的であるタンパク質を同定し、病態生理機能を明らかにした。

従来からある蛍光標識剤は細胞や組織のもつ自家蛍光と目的とする物質由来の蛍光を分離できない。本研究で開発された DTBTA-Eu³⁺ を蛍光標識剤として用い、HNE や、同じように酸化ストレス下で生成されるニトロチロシン (NT) の生成源・標的である細胞・小器官を形態学的に同定するため、時間分解蛍光顕微鏡装置を開発した。その結果、DTBTA-Eu³⁺ 染色し、時間分解蛍光顕微鏡で観察した組織の画像は従来型の Alexa Fluor 488 を標識剤として用いた蛍光顕微鏡像と比べて、目的とする抗原特異的蛍光を検出する点で非常に優れていることが確認出来た。

人の病態の理解のために、臨床医学研究者との共同研究により、時間分解蛍光イムノアッセイによって血中 HNE を測定した。その結果、HNE 上昇と病態との関連性を示すことができた。

これまでの研究の結果、安定な新規希土類蛍光標識剤 DTBTA-Eu³⁺ を開発し、その性能を種々の測定系で評価し、非常に有用であることを示すことができた。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究課題の目的は、従来から指摘されていた有機系蛍光標識の問題点を、希土類蛍光標識と遅延蛍光観測を組み合わせたシステムを開発することによって解決しようとするものである。本研究課題は、前項目で述べたように、①新規希土類蛍光錯体標識剤の開発と②遅延蛍光観察装置の開発、③これらの標識剤と装置を合わせた希土類蛍光観察システムの評価という要素からなる。また、研究実施グループとして、研究代表者の松本グループ、共同研究者の船津グループ、吉田グループ、より構成された。①および②については松本グループが担当した。③については、標識剤と装置の基本的性能の評価を松本グループが、応用(実践)的な用途における評価を吉田グループと船津グループで分担することとした。

具体的には、項目①の目的は、生化学的分析に汎用されるキレート能を有する緩衝液(TE、SSC、PBS など)中でも配位した金属が抜けず安定に蛍光を発する標識剤を開発することであった。希土類蛍光錯体の最も安定な錯体には、配位子は8から9の配位座を有する必要があると考えられている。これまでに開発されていた BPTA は9つの配位座を持ちこの条件を満たしているが、生体分子に標識する際に1つのカルボニル基を結合基として利用するために希土類イオンへの結合能が低下し、十分な安定性を示せなかった。このため、新規希土類蛍光錯体の開発に当たっては、配位部位とは別の位置に結合基を導入し、かつ蛍光発光の効率を損なわない分子の開発を目指した。より具体的にはテルピリジン骨格に配位数を9とするためのポリカルボン酸と結合基をもち発色団でもあるテルピリジン部位と共役していないジクロロトリアジルアミノビフェニル基を導入した DTBTA の開発に成功した。さらに、開発した DTBTA が実際の分析系へと応用できるかどうかの性能評価や標識反応の反応性など生体物質の検出系構築の基礎となるデータを収集することができた。さらに、研究の進展に伴いより長波長で励起できる錯体や標識剤の多色化を目指した錯体の開発も行った。

項目②の目的は、開発された標識剤の蛍光シグナルをスライドガラス等の基板上で検出するための遅延蛍光観察装置を試作し、評価実験に供することである。当初、Nd:YAG レーザーを光源として使用し、レーザー発振によるパルス光を励起に用い、CCD カメラを同期させ遅延蛍光を検出するというアプローチと連続光をオプティカルチョッパーによってパルス化して励起に用いるものを検討するという計画で本課題を開始した。本課題の初期の研究において検討した結果、オプティカルチョッパーの方が励起光の消えがシャープであることが確認された。このためオプティカルチョッパーを採用することとした。また、組織標本や細胞標本の観察に加えて、マイクロアレイなどの基板型デバイス上での遅延蛍光観察にも対応ができる感度を得ることを考慮に入れて、励起光の試料への照射は対物レンズなどの光学素子へ励起光を導入する、所謂、落射方式によらず、光ファイバーによって試料へ直接照射する方式を採用した。本課題実施期間途中から、防衛医科大学校・向田政博教授の協力を得て、落射型の励起方式についても評価することができた。

項目③の目的については、先ず松本グループの担当した分担領域では、生体物質の検出系(プローブ)を構築し、種々の性能評価を行なうことである。そして、これに加え、共同研究グループへの標識剤および検出系の供給を行なうことである。船津グループは、検出手法構築の検討という段階から実践的な測定系への応用を目指すこととした。吉田グループは、既に研究代表者の松本との共同研究で得られていた TR-FIA(時間分解免疫アッセイ)などの成果を更に発展させ、虚血の病態、細胞死、その保護などの機構に関連する分子を標的として、組織標本の免疫学的染色系での評価を実施することとした。

船津グループでは、既に水溶液中の蛍光色素の一分子イメージングに世界で初めて成功し、酵素1分子がATPを加水分解している様子や、蛍光標識した分子モーター1分子の運動を画像化することなどに成功していた。また、生きた細胞内で蛍光標識した1分子の生体分子をイメージングできる蛍光顕微鏡の開発を行い、生きた細胞の任意の高さで光学的断層像をビデオレートで撮影できる共焦点蛍光顕微鏡観察法を開発していた。希土類蛍光標識/遅延蛍光観察のシステムは、

これらのイメージングシステムにおいても、細胞からの自家蛍光などの影響を抑え、高感度、高精度な計測を提供できる可能性が考えられた。そこで、船津グループでは、これら両システムの融合を目指して、観察の要素技術の開発を担当することとした。

吉田グループでは、既に本研究代表者の松本らと共同研究で、希土類蛍光標識剤を用いた高感度検出系を開発し、実際のアッセイに使用してきた。この実績を踏まえて、本研究課題で開発される希土類蛍光標識剤をこれらのアッセイや組織標本の蛍光免疫染色へ適用し評価するという実践的な観点からの連携を行なうこととした。

吉田グループは、本研究の中で金属錯体プローブを用いた時間分解蛍光イムノアッセイ、及び時間分解蛍光顕微鏡を用いた疾病機構の解明を分担した。種々の疾病に酸化ストレスが寄与していると信じられてきたが、有効な測定法がないため、具体的な証拠が少なかった。そこで、多数の検体の少量の試料から、酸化ストレスマーカーを高感度・高信頼性で測定する方法の開発を目指した。

木村（順天堂大学法医学研究室）は、過酸化脂質 4-hydroxynonenal (HNE) を酸化ストレスマーカーとして選び、松本グループが開発した金属錯体 BHHCT-Eu³⁺ を用いた高感度な時間分解蛍光イムノアッセイの開発を目指した。その結果、従来型の ELISA の約 100 倍の感度を持つ測定法の開発に成功した。これを用いて、動物の感染症モデルにおいて血液・臓器の HNE を測定し、他の生化学的手法、免疫組織化学的方法と組み合わせて、軽度・一過性の変化を捉えうることを示した。これらの研究で、病態モデルにおいて酸化ストレスの発生する細胞、細胞内小器官、酵素などを HNE を指標として、同定できることを示した。

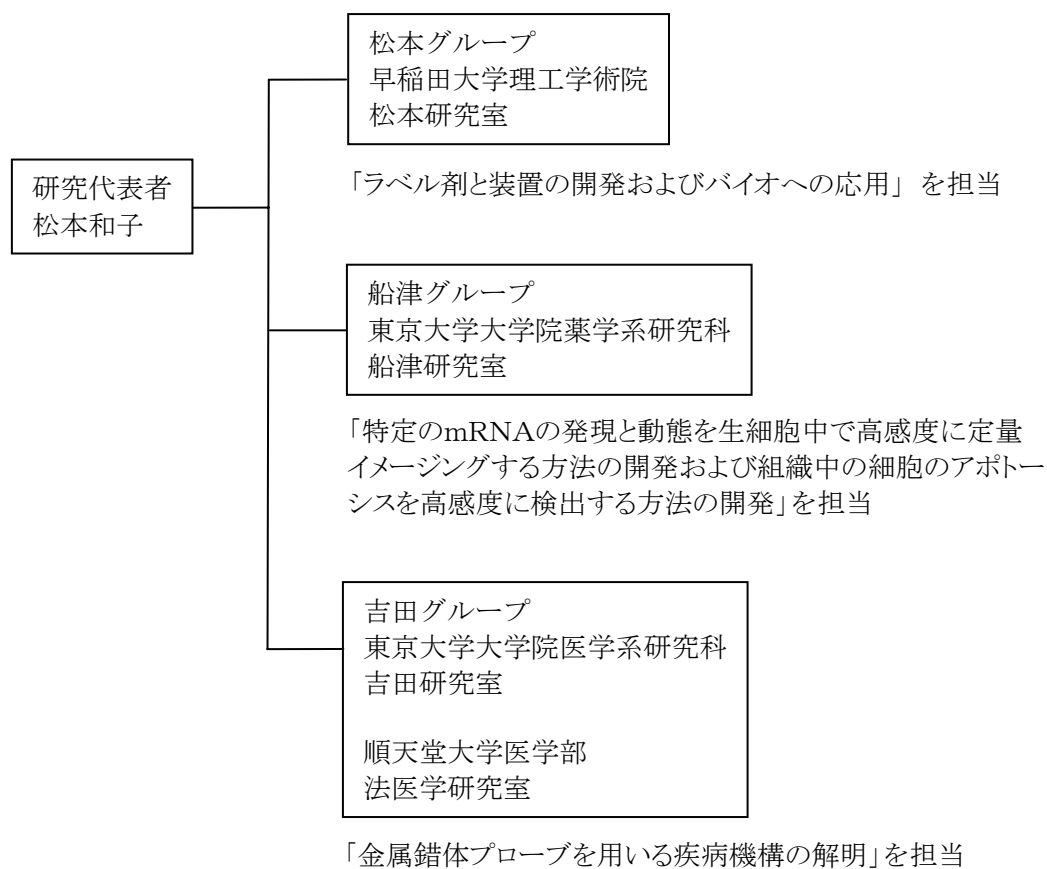
研究の過程で、HNE を発生する細胞、細胞内小器官を同定し、病変との関連性を知る必要が生じた。従来からある蛍光顕微鏡法では、特異性が問題となることが多いので、DTBTA-Eu³⁺ を蛍光標識として用いた方法の優位性を検討した。まず、向田政博（共同研究者、防衛医大法医学）が時間分解蛍光顕微鏡を開発し、これを用いて DTBTA-Eu³⁺ 免疫蛍光染色組織の観察をし、橋野仁一（早稲田大学理工学部松本グループ）らと画像のデジタル解析を行い、通常型の有機蛍光剤と蛍光顕微鏡に比べて極めて特異性が高い（バックグラウンドが低い）優れた標識剤であることが示された。

動物の病態モデルにおいて、時間分解蛍光イムノアッセイによる HNE の測定が有用な方法であることがわかったので、人の病態解析への応用を試みた。東京女子医大循環器内科、国立循環器病センター等との予備的研究により、血 HNE 高値と虚血性心疾患、心不全などとの関連性が示されたので、規模を拡大して臨床研究として進行しつつある。

閉経女性の心血管リスクが増加することと関連して、森本恵子（共同研究者、奈良女子大生活環境学部）と共同研究を開始した。閉経女性では、心理ストレス負荷後の血圧上昇と血中 HNE 上昇の間に関連性があることを見出した。卵巣摘出ラットでも同様の現象を確認し、内臓肥満、耐糖能異常との関連性を明らかにしつつある。

なお、以下の記述では、各グループの担当課題名として、松本グループが「ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用」、船津グループは「特定の mRNA の発現と動態を生細胞中で高感度に定量イメージングする方法の開発および組織中の細胞アポトーシスを高感度に検出する方法の開発」、吉田グループは「金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明」を使用する。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用(早稲田大学 松本グループ)

(1)研究実施内容及び成果

<希土類蛍光錯体の開発>

本研究グループの松本らによって、これまでに開発されてきた希土類蛍光錯体は、生化学、分子生物学の分野において使用される緩衝液のうち、EDTA を含むものやキレート能を有するものの中では、配位している金属が抜け、蛍光が消失してしまうため、標識剤として応用するためには、蛍光測定時に金属の再添加や用いる緩衝液の制限が必要となり、これらの標識剤本来の性能を高感度化へ十分活かすことができなかった。この欠点を改善した希土類蛍光錯体 DTBTA-Eu³⁺ ($\lambda_{\text{ex. max.}}=335 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em. max.}}=616 \text{ nm}$) の開発に成功した(その構造を図1に示す。)。DTBTA-Eu³⁺は、上述の緩衝液中におい

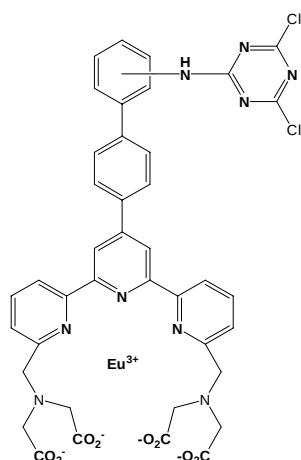


図1 DTBTA-Eu³⁺の構造

表1 DTBTA-Eu³⁺の安定性

Buffer	Our previous complex (BPTA-Tb ³⁺)	DTBTA-Eu ³⁺
	Relative Intensity (%)	
15 mM Tris-HCl (pH7.4)	100	100
15 mM Tris-HCl (pH7.4)- 150 mM NaCl	119	90
TE (pH8.0)	0.122	102
1XSSC (pH7.4)	30.5	87.8
PBS (pH7.4)	3.78	77.4

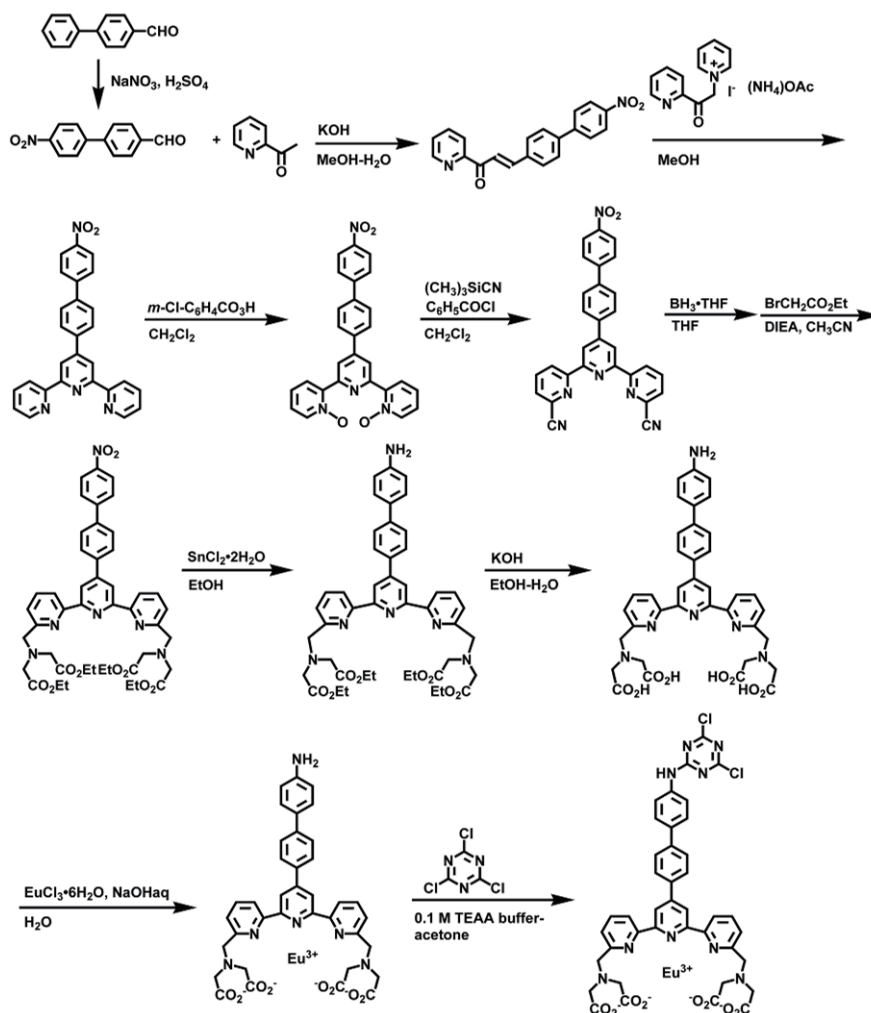
ても蛍光が消失せず(表1)、期待された性質を有する希土類蛍光錯体であった。本研究課題では、DTBTA-Eu³⁺を基本化合物として採用し、標識・検出システムの開発研究に使用することとした。さらに当初開発されたDTBTAは構造異性体を含む混合物として得られたため特に核酸等の小分子を標識する際、HPLC精製において複数の留分として得られるなどの問

題を生じたため、合成手順を改良しパラ異性体のみの合成に成功するとともに、合成収率の向上にも成功した(スキーム1)。

一方で、研究の進展に伴い、染色において DTBTA の疎水性相互作用による非特異的相互作用の影響の可能性が指摘されたため、検証を行うための DTBTA 類縁体の開発の必要性が生じた。そこで、フェニル基の一つ少ない DPTTA、さらに、反応活性基をジクロロトリアジルアミノ基からより疎水性の低いと考えられるイソチオシアネート基へと変更した IPTTA を合成した(これらの構造を図2に示す)。

さらに、DTBTA-Eu³⁺を含めてこれまでの希土類蛍光標識剤は比較的波長の短い紫外光で励起する必要があり、励起光源等の装置構成上の制約を受け、観察対象を生細胞とする場合にも問題となると考えられるため、より長波長で励起できる錯体の開発が必要となった。さらに、標識剤の多色化も多様な検出系に応用するためには必須となる。そこでより長波長で励起できる錯体や標識剤の多色化を目指し、ビフェニルテルピリジン部位とビスピラゾリル

スキーム 1 DTBTA-Eu³⁺の合成



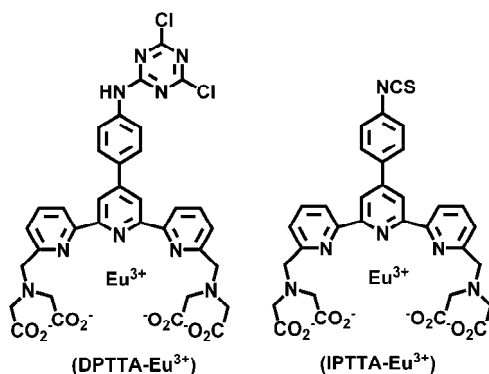


図2 DPTTA-Eu³⁺および IPTTA-Eu³⁺の構造

ピラジン部位を持つ環状配位子 BTPDA を合成し、その希土類イオンとの錯体の蛍光特性を評価した。当初目的としていたテルビウム錯体での発光強度はあまり強くなかったが、ユウロピウム錯体では比較的強い蛍光を発し、両者の錯体ともこれまでの BPTA-Tb³⁺や DTBTA-Eu³⁺よりも長波長側(360 nm)に励起極大波長をもつことがわかった(図3)。

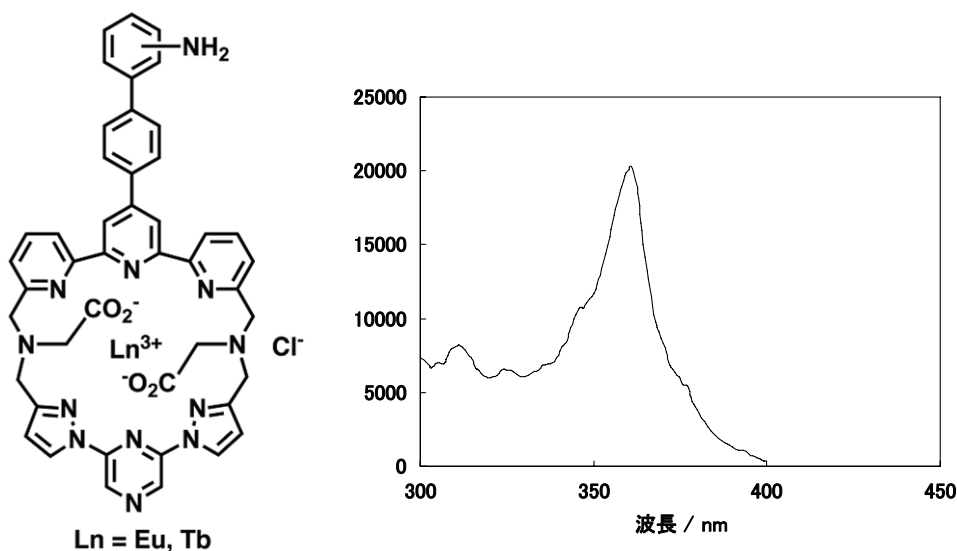


図3 BTPDA-Ln³⁺の構造および BTPDA-Eu³⁺の励起スペクトル

< 希土類蛍光錯体の反応性 >

希土類蛍光標識剤 DTBTA-Eu³⁺は、タンパク質の標識においては、これまでの標識剤と同様な条件で容易に標識することが可能であった。一方で、船津 G との連携を考えると核酸への標識が必要となってくるが、核酸など比較的小分子への標識は容易ではなく、反応条件の最適化が必要となってきた。タンパク質への修飾はタンパク質の疎水的反応場が高い反応性に寄与していると考えられたため、反応系に DMSO を加えることにより一定程度の反応に成功した。この際、DTBTA-Eu³⁺の保存法に関する知見も得られ、不活性雰囲気下で零下40度という条件下で長期保管できることが明らかになった。さらに、DNA の受託合成において、これまでのアミノリンカー(C₆ リンカー)のみならず高い反応性のエチルカルバメイトリンカー(EC リンカー)が容易に利用できるようになったため、これらの末端基の違いによる反応性についても検討した。表2に種々の反応条件下での核酸を基準とした標識率を示す。EC リンカーについては、水系の反応

条件において従来の C₆ リンカーより高い標識率を示し、最もよい条件で90%以上の DTBTA-Eu³⁺標識 DNA が得られた。一方DMSO添加系においては、ECリンカーは従来の C₆ リンカーより高い反応性を得ることはできなかった。得られた DTBTA-Eu³⁺標識 DNA の性能は、96-ウェルプレートで固定化プローブに対するハイブリダイゼーションアッセイに用いることで評価した。検討の結果、DTBTA-Eu³⁺標識 DNA を用いて、ハイブリダイゼーションシグナルを検出することができた。

表2 種々の反応条件^{a)}における DNA 標識率

C ₆ -oligo DNA	EC-oligo DNA	DTBTA-Eu ³⁺	反応時 間	標識率 ^{b)}
50 μM		2 mM	30 分	4.5 %
50 μM		4 mM	終夜	58 %
50 μM		8 mM	終夜	62 %
	50 μM	2 mM	30 分	21 %
	50 μM	2 mM	終夜	78 %
	50 μM	4 mM	終夜	90 %

a) 反応溶液:125 mM 炭酸バッファー (pH 9)、反応温度:40℃、b) HPLC 分析による
(標識率)/%=(標識化DNA)/[(標識化DNA)+(未標識DNA)]×100

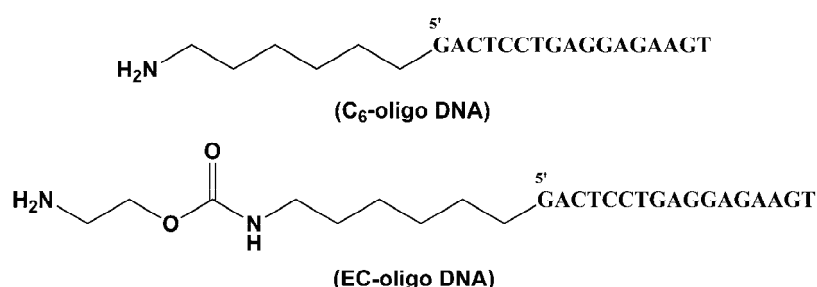


図4 オリゴマーの構造

<希土類蛍光錯体の評価>

先に述べたように DTBTA-Eu³⁺は、組織や細胞のイメージングといった用途に適した性質を有している。そこで、共同研究チームでのイメージングの応用に先立ち、DTBTA-Eu³⁺を用いた検出系を構築し、基礎的な評価を行なうことが、当該項目の目的である。検出系は、これまでの実績を踏まえ、まず、ビオチン・アビジン系と組み合わせることによって構築することとした。ストレプトアビジンを DTBTA-Eu³⁺と炭酸緩衝液中で反応させた後、ゲル濾過により未反応の DTBTA-Eu³⁺を除去することにより、DTBTA-Eu³⁺で標識したストレプトアビジン（以下、DTBTA-Eu³⁺-SA と略する。）を得た。得られた DTBTA-Eu³⁺-SA の性能は、96-ウェルプレートで固定化プローブに対するビオチン化 DNA のハイブリダイゼーションアッセイに用いることで評価した。検討の結果、DTBTA-Eu³⁺-SA を用いて、ハイブリダイゼーションシグナルを検出することができた（図5）。この結果を踏まえ、ペプチド核酸（PNA）プローブを用いたハイブリダ

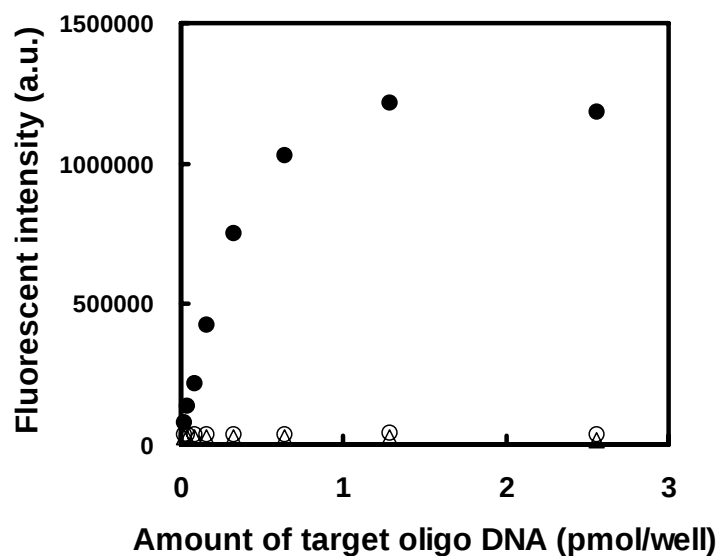


図5 DTBTA-Eu³⁺標識を用いたハイブリダイゼーションシグナルの検出
 ●：プローブ DNA に相補的な標的 DNA
 △：プローブ DNA に非相補的な標的 DNA
 ○：標的 DNA (－)

イゼーションアッセイを試みたところ、DNA の 1 塩基の違いを識別することができた (K. Hashino et al., 2006)。以上のことから、DTBTA-Eu³⁺-SA を用いた標識システムが確立できたと判断し、以下の種々の評価に使用することとした。

<時間分解蛍光検出装置の試作と評価>

希土類蛍光錯体を組織や細胞のイメージングの標識剤として用いるという本課題の目標を達成するためには、標識剤だけでなく、その蛍光シグナルを検出するための装置が必要である。本課題の開始時においては、時間分解蛍光検出できる画像検出装置は市販されていなかったため、図 6 に示す検出原理の検出装置が設計され、初期の基本的な装置構成の装置が組み立てられつつあった。本課題では、これらの成果を

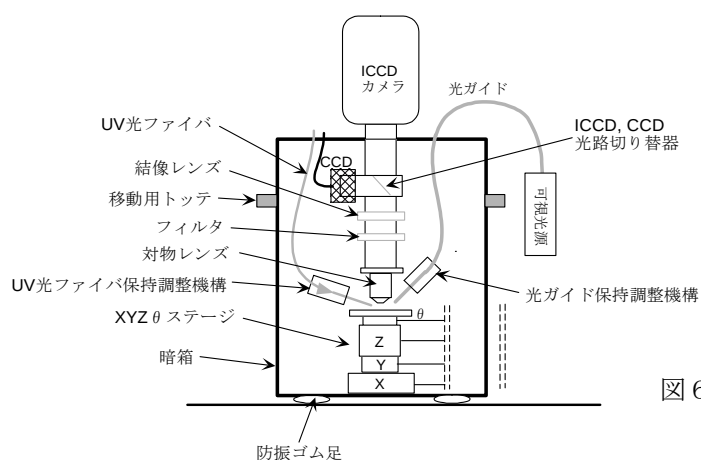


図6 遅延蛍光観察装置

継承し、遅延蛍光観察に関わる部分の改良を行い、試作機を完成させた。本機の装置構成の概略は、次のとおりである。(1) キセノンランプやレーザー光源からの励起光(連続光)を、チョッパーを用いることでパルス化する。得られるパルス光の周期や幅はチョッパーの回転数や窓の幅によって設定することができる。(2) 励起光は、観察する試料に対して斜め入射する。入射する角度を調整することにより、励起光の直接および試料や基板での反射による間接的な進入を原理的に排除する(実用的に問題とならないレベルまで下げる。)ことができる。このことは、レンズやフィルターなどの光学素子を通る励起光が微少であるため光学部材から発生する蛍光や励起光そのものの検出器への漏れ込みを低く押さえることができる。また、検出したい蛍光シグナルを分離するためのフィルターも実用レベルにおいては必要がないため、シグナルの損失を抑えることができる。(3) 検出器として、インテンシファイヤーの組み込まれた CCD カメラを用いることで、シグナルの増幅と励起パルスとの同調(同期)による遅延蛍光観察を行なう。

本装置で DTBTA-Eu³⁺そのものの検出とスライドガラス型の基板上での核酸検出によって、基本性能を評価した。DTBTA-Eu³⁺を基板上にスポットして蛍光を検出したところ、10⁻¹¹ M オーダーまで検出ができた。また、前項の成果を踏まえ、基板上での塩基配列の識別(ハイブリダイゼーションアッセイ、ligation-based assay など)を題材として、評価を行なったところ、標的 DNA の配列特異的なシグナルが検出できた(図 7、図 8)。

本装置を DNA マイクロアレイといったデバイスの検出システムとしてみた場合、希土類蛍光標識は、遅延蛍光観察のため、励起光照射中の最も明るい蛍光シグナルを検出せずに捨ててしまうので、感度的には、既存の有機系標識剤とマイクロアレイスキャナーの組み合わせに比べて不利である。本課題においても、既存の標識剤でマイクロアレイ実験に汎用されている有機系蛍光標識剤 Cy5 と比較を行なった。評価を重ねてゆく過程で、Cy5 は実験環境に影響を受ける(オゾンなどの大気汚染物により消光することなどが一般に認められることとなり、本課題においても講じる対策を実施したこと、ハイブリダイゼーションの条件などを整えることで S/N 比が向上し装置の高感度設定が可能となったことなどから、Cy5 がかなり高感度で検出できるようになった。この結果、本試作機と DTBTA-Eu³⁺の組み合わせでは、DNA マイクロアレイ検出システムとしては、既存のシステムには感度的には及ばないという評価結果となった。

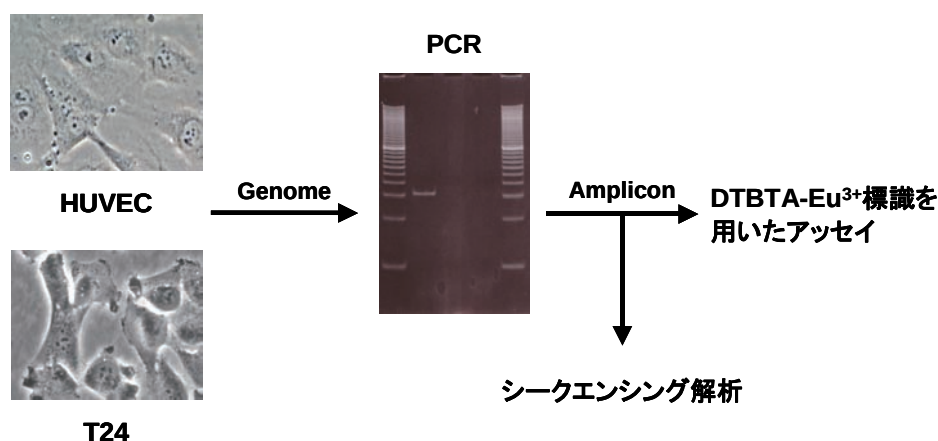


図 7 一塩基変異検出を題材とした DTBTA-Eu³⁺標識評価の概略

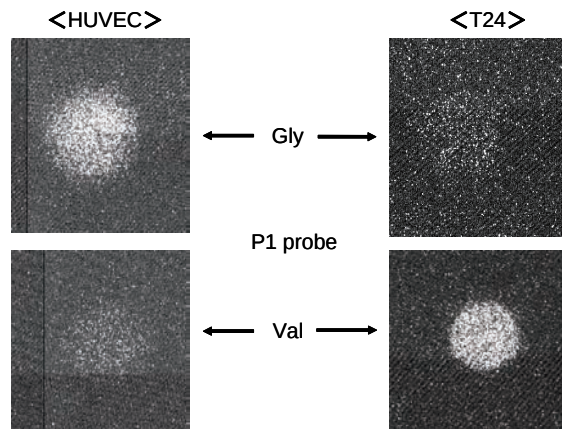


図8 アレイ上での c-Ha-ras 遺伝子
codon12 の変異検出

ligase-based assay による変異の検出例。シグナルは遅延蛍光観察装置により検出した。

HUVEC：正常ヒト臍帯静脈内皮細胞

T24：ヒト膀胱上皮癌細胞

しかしながら、DTBTA-Eu³⁺は、アレイ基板上のような乾燥した環境であっても安定した蛍光を発生すること、オゾンに対しても安定であることなど、蛍光標識剤としては優れた性能を有する。マイクロアレイ検出システムの開発という点においては、検出デバイスなどの技術的進歩に期待したい。

一方、本課題の主目的である組織や細胞の観察という観点から評価すると、汎用の蛍光顕微鏡での蛍光観察に比べると、十分な高感度化は達成できており、自家蛍光の強い組織切片標本などでは、遅延蛍光観察の特性を充分発揮できるものと判断された。

そこで、装置のパラメーター（励起光出力、観察倍率、画像積算回数など）を検討し、細胞染色に適するように観察条件を再設定した。

<DTBTA-Eu³⁺の細胞染色での評価①>

先に記したように、DTBTA-Eu³⁺-SA を用いた検出系が構築できたので、これを用いて細胞染色を試みた。DTBTA-Eu³⁺は、その蛍光寿命が長いという特性を有するが、既存の有機系蛍光標識剤と同様に、励起光照射下でも蛍光観察が可能である。評価作業として、先ず通常の蛍光顕微鏡を用いた染色像の観察を試みた。染色する標的として細胞内のアクチンを選んだ。ファロイジンをプローブとしてアクチンを染色するとアクチンが繊維状に重合した構造物（アクチンフィラメント）が染色された。アクチンを選択した理由は、多くの細胞である程度の量が存在することから、染色像におけるシグナル強度、解像度などの指標として利用しやすいと考えたためである。図9はビオチン化ファロイジンをプローブとして、DTBTA-Eu³⁺-SA、AlexaFluor488-SA の染色像を比較したもので、どちらもアクチンフィラメントの典型的な染色像が観察され、このレベルでは、DTBTA-Eu³⁺を用いたことによる非特異的な染色は特に観察されなかった。

次に、図10と同様の染色を行なった細胞標本上の蛍光シグナルを遅延蛍光観察装置で観察したところ、図11に示すように標的特異的なイメージの取得に成功した。この成果をふまえ、吉田グループと連携し、組織染色においてDTBTA-Eu³⁺-SAの性能評価を実施した（結果は、3.3項に記載）。

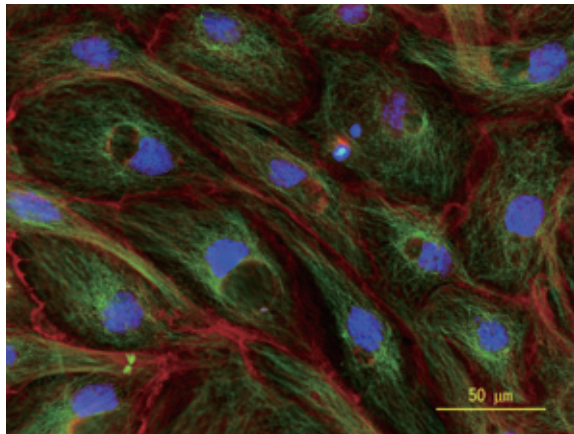


図 9 DTBTA-Eu³⁺を用いた細胞の染色例 I
 染色ターゲットとプローブは以下のとおり。
 Actin (biotin 化ファロイジン、DTBTA-Eu³⁺-SA)
 Tubulin (抗tubulin抗体、Alexa 488-抗IgG抗体)
 核 (DAPI)

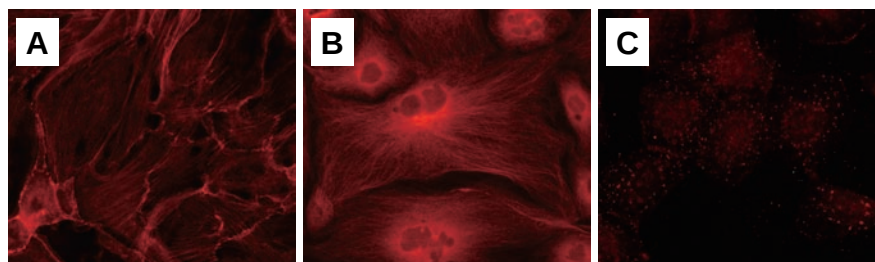


図 10 DTBTA-Eu³⁺-SA を用いた細胞の染色例 II
 染色ターゲットとプローブは以下のとおり。
 A:Actin (biotin化ファロイジン、DTBTA-Eu³⁺-SA)
 B:Tubulin (抗tubulin抗体、ビオチン化抗IgG抗体、DTBTA-Eu³⁺-SA)
 C:Integrin α₅ subunit (抗Integrin α₅ subunit抗体、ビオチン化抗IgG抗体、DTBTA-Eu³⁺-SA)

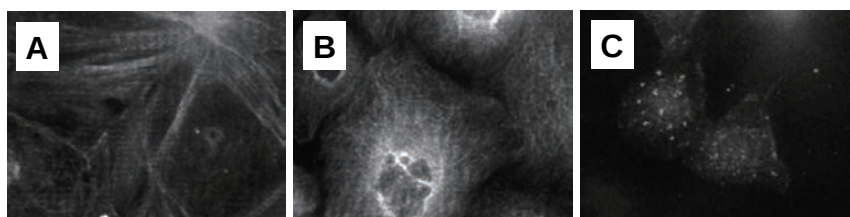


図 11 DTBTA-Eu³⁺-SA を用いた細胞染色の遅延蛍光観察
 染色ターゲットとプローブは以下のとおり。
 A:Actin (biotin化ファロイジン、DTBTA-Eu³⁺-SA)
 B:Tubulin (抗tubulin抗体、ビオチン化抗IgG抗体、DTBTA-Eu³⁺-SA)
 C:Integrin α₅ subunit (抗Integrin α₅ subunit抗体、ビオチン化抗IgG抗体、DTBTA-Eu³⁺-SA)

<DTBTA-Eu³⁺-SA 調製方法の検討>

上記の成果を踏まえて更に発色量の少ない物質を染色するべく検討を始めたところ、CCD カメラの感度を上げると、核などへの非特異的な染色（吸着）が観察された。この染色は、BSA などによるブロッキング条件の強化、内在性ビオチンをブロックするといった対策では本質的な解決はできなかった。先に述べたように、DTBTA-Eu³⁺-SA はストレプトアビジンと DTBTA-Eu³⁺の反応後、ゲル濾過によって得られた高分子画分であることから、DTBTA-Eu³⁺-SA 標品を更に精製することを試みた。ストレプトアビジンは pI が pH5~6 であること、1 分子の DTBTA-Eu³⁺が反応するとストレプトアビジンはそのアミノ基を 1 つ失い、錯体由来で負電荷が 1 つ増える。このことから、陰イオン交換体を用いたイオン交換クロマトグラフィーを検討した。図 1 2 に典型的な分離パターンを示す。このクロマトグラフィーによって分離したピークのうち蛍光強度

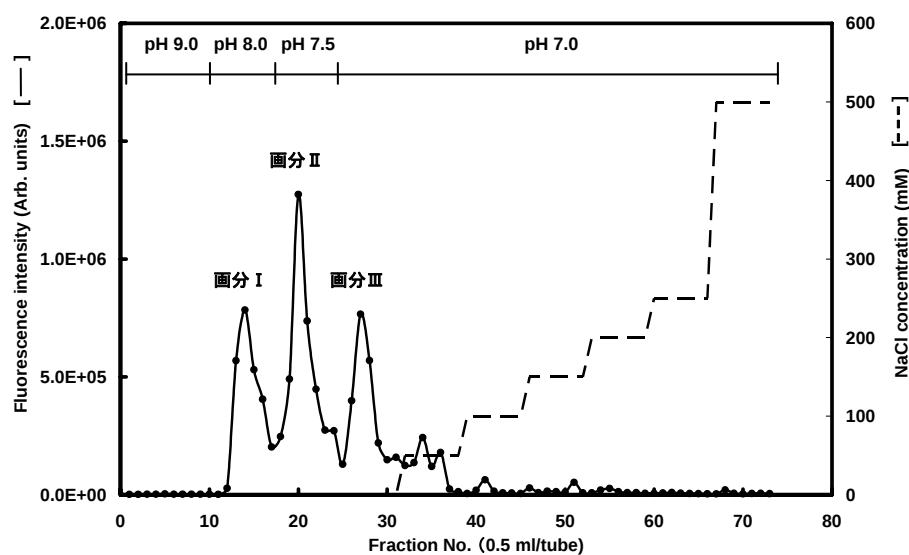


図 1 2 DTBTA-Eu³⁺-SA の DEAE-Toyopearl イオン交換クロマトグラフィー

が比較的大きい 3 つの画分（画分 I ~ III）を用いて、非特異的な染色の有無を調べたところ、画分 I で、顕著な改善が認められた（図 1 3）。イオン交換クロマトグラフィーによる効果は、遅延蛍光観察によっても確認された（図 1 4）。本課題では、時間的な制約がありこれ以上の詳細な評価検討は実施できなかったが、より発現量の少ない標的物質の染色に有効であると思われる。

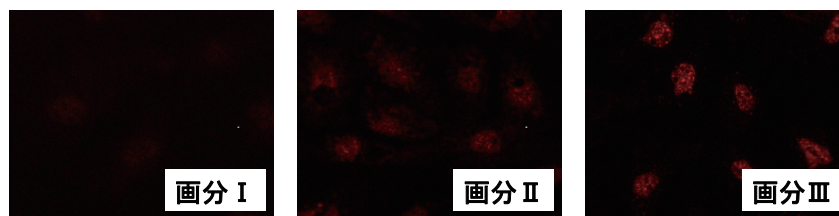


図 1 3 イオン交換クロマトグラフィーによって分離された DTBTA-Eu³⁺-SA 画分の非特異的な染色

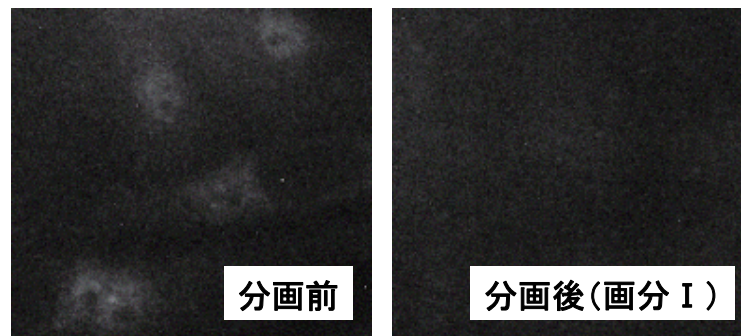


図 1 4 遅延蛍光観察における DTBTA-Eu³⁺-SA 画分の非特異的な染色に対するイン交換クロマトグラフィー精製の効果

(2)研究成果の今後期待される効果

本課題で開発した希土類蛍光標識剤は、様々な緩衝液中で安定であり、励起波長と発光波長の差が大きい、発光寿命が長い、光ブリーチングを受けにくい等の希土類蛍光錯体特有の性質を持っている。このような特長を生かした、より広範な応用研究への利用が期待される。さらに、より長波長に励起極大波長を有する BTPDA については、実際の分析系への応用例を示すことができなかったが、長波長励起の標識剤は、光源の小型化による装置自体の小型化、利用可能な部材の範囲が広がり、さらには観察対象の範囲も広がることが期待される。

本分担で開発された希土類蛍光標識 DTBTA-Eu³⁺は、蛋白質への標識が容易に行なえること、EDTA などのキレート剤を含む緩衝液中でも安定に蛍光を発することなどから、ストレプトアビジンや種特異的抗 IgG 抗体、プロテイン A などを標識すれば、遅延蛍光観察用の蛍光標識2次プローブが容易に提供される。近年、FRET などの技術に希土類蛍光錯体を蛍光標識剤として採用し、レセプターアッセイや蛋白質・蛋白質相互作用の解析などの報告例が増えつつある。DTBTA-Eu³⁺は、このような用途にも高性能な分析ツールを提供するポテンシャルを有している。

遅延蛍光観察装置は、細胞染色などの用途には十分な検出感度を有している。本課題で蓄積された技術要素は、イメージング装置としての実用機開発といった分野においても生かされるものであると考えられる。

3. 2 特定の mRNA の発現と動態を生細胞中で高感度に定量イメージングする方法の開発および組織中の細胞のアポトーシスを高感度に検出する方法の開発 (東京大学 船津グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1. 特定の mRNA の発現と動態を生細胞中で高感度に定量イメージングする方法の開発

生きた細胞内で、特定の mRNA の発現量を定量し、さらに動態を 1 分子レベルでイメージングすることは、遺伝子発現の時空間制御を理解する上で極めて重要である。これを実現するため、細胞内の mRNA の発現と動態を高感度に定量イメージングする方法を開発した。以下にその詳細を記す。

1-1 生細胞に蛍光標識した mRNA をマイクロインジェクションし、その動態をイメージングする手法の開発 「mRNA 核内運動の 1 分子イメージングへの応用」

1-1-1 はじめに

真核生物では、遺伝情報を蓄えている DNA と、その遺伝情報を基に蛋白質を作るリボソームが存在する細胞質が核膜により区画されている。そのため、真核生物の遺伝情報の発現では、遺伝情報が核から細胞質へと伝えられる必要がある。この伝達を担う物質が mRNA である。mRNA は核で作られたあと、核膜を通して細胞質へと輸送されたのち、細胞質において輸送され、あるものは更に局在化する。mRNA はこれらの過程で様々な制御を受けており、それらが積み重なって細胞による遺伝子発現の制御へとつながっている。しかし、mRNA の一生に関しては、よくわかっていないことが多い。本研究では、蛍光標識した mRNA を核内にインジェクションし、核から細胞質への輸送機構を解析し、さらに個々の mRNA 分子の核内運動をビデオ蛍光顕微鏡で観察した。

1-1-2 mRNA の核外輸送の可視化

mRNA は核内で DNA から転写されて作られるが、作られた直後は未成熟な状態である。その後、5'末端にキャップ構造が形成され、3'末端にポリ A 配列と呼ばれる 100~200 個のアデニンヌクレオチドが付加される。さらに、スプライシング反応などのプロセッシングを経て成熟し、蛋白質翻訳の際の鋳型として機能できる状態になる。成熟した mRNA は核膜上にある核膜孔複合体(NPC: Nuclear Pore Complex)を通して細胞質へと核外輸送される。核膜孔はただの小さな穴ではなく、エネルギーを使って通過させるものを選別・輸送している。これまでの研究から mRNA が核膜孔を通過する際には通行書を持っていることが明らかにされている。この mRNA 核外輸送の通行書の分子の実態は最近の研究により明らかになりつつある(Reed et al., 2002; Dreyfuss et al., 2002)。エキソンとイントロンの境界のエキソン側上流約 20 塩基付近にエキソン境界部複合体(Exon Junction Complex; EJC)と呼ばれる蛋白質群が結合することがわかってきた。これらの蛋白質群は細胞質に輸送されたあと一部入れ替わって cEJC と呼ばれる複合体を維持し、RNA の細胞質における機能のために重要な役割を果たしている。これまで、mRNA の核から細胞質への輸送の研究は、放射性ラベルした mRNA を *Xenopus* の Oocyte にマイクロインジェクションする実験が一般的であった。これは、1 つの細胞に多量に mRNA をマイクロインジェクションすることが可能で、かつ核と細胞質画分をそれぞれ分離回収できるため、核外輸送の研究には理想的な材料だからである。しかし、mRNA の核外輸送はいくつものステップからなり、関与する分子の種類も非常に多種である。また、転写、スプライシング、核外輸送といったそれぞれのステップが非常に密接に関連していることが明らかになってきた。そのため、生きた細胞の内部で mRNA の動態をイメージングする必要がある。本研究では、生きた培養細胞における mRNA の核外輸送を蛍光顕微鏡を用いて観察した。2 つエキソン配列と 1 つのイントロン配列を含み、さらに 5'末端の cap、3'末端の poly A 配列を持つ Fushitarazu (以下、Ftz と表す) の pre-mRNA を in vitro 合成系で

合成し、蛍光色素した。これを Cos7 または HeLa 細胞の核にマイクロインジェクションし、蛍光顕微鏡で観察すると、pre-mRNA は核スペckル(nuclear speckles)、またはスプライシング因子区画 SFC (splicing factor compartments) と呼ばれるスプライシング因子が多量に存在する斑点状の核ドメインに分布した。さらに、蛍光標識 mRNA が時間経過につれて核から細胞質へと移行することが観察された。また、蛍光標識 mRNA は内在性 mRNA と同様にスプライシング反応を受けることが示された。スプライシングと核外輸送の時定数は約 7 分だった。蛍光標識 mRNA をマイクロインジェクションした細胞を、アジ化ナトリウムで細胞を処理してエネルギーの産生を停止させると、蛍光標識 mRNA の細胞質への移行は阻害された。また、核膜孔因子に結合するコムギ胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin) で処理すると、蛍光標識 mRNA の細胞質への移行が停止した。これらのことから、蛍光標識 mRNA の核から細胞質への移行は、通常の細胞内 mRNA と同じく、核膜孔を介した能動的輸送によって行われていると結論された。この蛍光標識 mRNA を用いた核外輸送解析系では、生きた細胞内で系時的に mRNA の核外輸送プロセスを視覚化して解析することが可能となる。本実験系を用いて、mRNA の構造的な特徴であるキャップ構造やポリ A 配列が、動物細胞においても mRNA の核外輸送を促進する作用をもつことが示された。また、mRNA を核にマイクロインジェクションした細胞を、アクチノマイシ

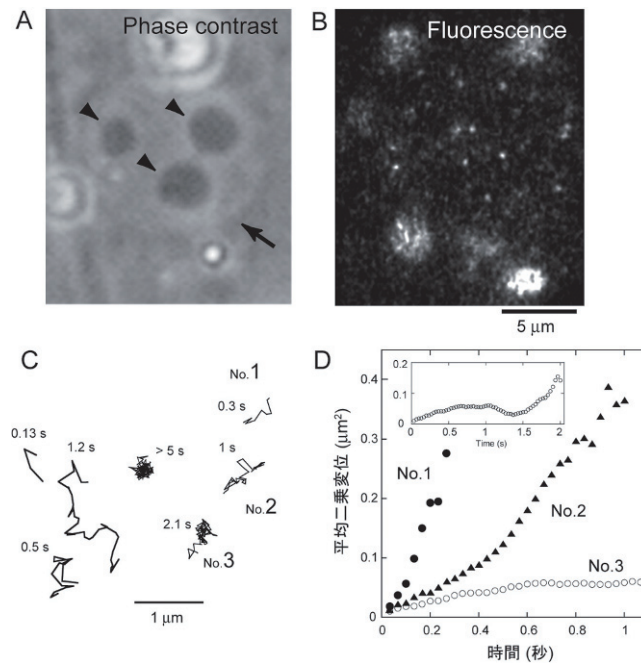


図15 mRNAの核内運動の軌跡 A6細胞の核内に β -globinのmRNAをマイクロインジェクションし、運動を観察した。(A)位相差像。矢印は核、矢じりは核小体を示す。(B)蛍光顕微鏡ビデオ像。小さい輝点が1分子のmRNAである。周囲の大きな明るい塊は細胞の自家蛍光である。(C)代表的なmRNA分子の軌跡。観察時間を左上に示した。(D)CのNo.1、No.2、No.3分子の平均二乗変位を時間に対してプロットした図。挿入図はNo.3の分子を2秒間観察したもの。

ンDや α -アミニチンなどの転写阻害剤で処理して、遺伝子の転写活性を抑制すると、導入した蛍光標識 mRNA の核から細胞質への移行が阻害されることが見いだされた。in vitro 転写した mRNA を核に注入しているので、遺伝子の転写活性は解析系に無関係なはずであり、その結果は全く予想外であった。蛋白質への翻訳を阻害するシクロヘキシミド処理は、蛍光標識 mRNA の核外輸送に全く影響を与えないので、核外輸送阻害が単

に輸送に関わる遺伝子の転写活性が低下したことによる二次的影響とは考えにくい。さらに、転写阻害剤の添加によって核外輸送を阻害した場合、細胞質に移行しなかった蛍光標識 mRNA は、核内の数カ所に顆粒状に蓄積していくことが示された。興味深いことに、蛍光標識 mRNA がより強く蓄積する部位は、SC35 などのスプライシング因子が存在する SFC に隣接していることが明らかとなった。これらの結果は、mRNA の核外輸送が遺伝子の転写と密接な機能的関連を持っている可能性を示唆しており大変興味深い (Tokunaga et al., 2006)。

1-1-3. mRNA の核内運動

mRNA は前述のように核で作られた後に細胞質へと輸送されるが、転写・プロセッシング部位から遊離した mRNA がどのような機構で核膜孔まで移動するかについて、従来 2 つの説が提唱されてきた。1 つはエネルギーを消費する能動的な輸送による"能動説"、他方はクロマチンの隙間を自由拡散によって移動する"拡散説"である。近年、蛍光標識した mRNA の核内の運動を、蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy; FCS) や蛍光退色回復法 (fluorescence recovery after photobleaching) を用いて解析した結果、拡散説が有力となっている (Politz et al., 1998)。また、核内の微小領域に紫外線を照射して caged fluorescein (紫外線照射により分解して蛍光を発する物質) で標識した mRNA が蛍光を発するようにし、この蛍光の広がりから mRNA が拡散で移動していることが示された (Politz et al., 1999)。これらの結果は、mRNA は多数分子の平均をとると拡散で移動していることを示唆するが、では、個々の分子はどのように運動しているのだろうか？一時的な能動輸送や、核内構造物との結合・解離がないのだろうか？といった疑問が残る。そこで本研究では 1 分子蛍光イメージング法を用いて mRNA の核内での運動を解析した (Tadakuma et al., 2006)。運動を観察するためのモデルとして Cy3 で標識した GFP の mRNA と、ヒト β -globin 遺伝子の部分配列からなる mRNA を使用した。この蛍光標識した mRNA を細胞の核にマイクロインジェクションし、蛍光 1 分子をイメージング可能な共焦点顕微鏡システム (Tadakuma et al., 2001) で観察した。細胞内の 1 分子の蛍光標識 mRNA を 2 ms~33 ms の時間分解能で測定できる共焦点蛍光顕微鏡システムは他に類を見ないものである。観察対象の細胞として、Xenopus A6 細胞を用いた。この細胞は上皮細胞で扁平なため 1 分子観察が容易であるほか、室温で CO₂ インキュベーターを使わなくても培養

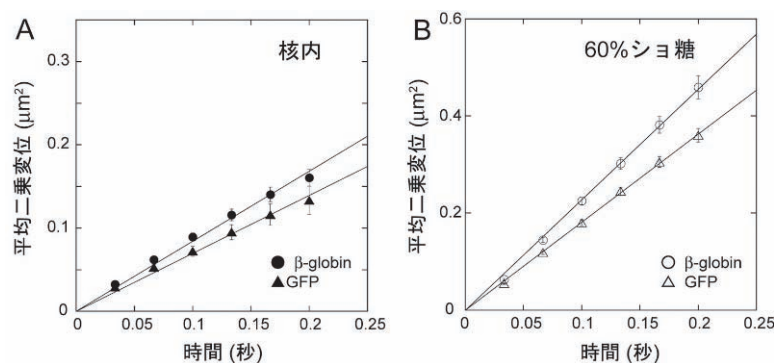


図 16 mRNA 分子の運動の平均二乗変位と時間の関係
(A) 核内の場合、(B) 60%ショ糖中の場合。

できるという利点を有する。核内で個々の蛍光標識分子を観察するためには、濃度を数 nM 以下にする必要がある。本研究では、体積 ~ 1 pL の核に、10 nM の mRNA 分子を ~ 25 fL マイクロインジェクションした。この条件では、共焦点蛍光顕微鏡の光断層像に ~ 0.2 個/ μm^2 の密度で蛍光分子が観察された。核内に蛍光標識した mRNA をインジェクションすると、mRNA の輝点が核小体を除く核質の領域に現れた (図 15 B)。個々の蛍

光 mRNA の軌跡を観察すると、動いている mRNA と止まっている mRNA がいることが明らかになった (図 1 5 C)。この動いている mRNA と止まっている mRNA の個数の割合を求めたところ、両者はほぼ同じになった。この割合は、mRNA をインジェクションした 5 分後から 1 時間後まで変らなかった。mRNA は運動と静止の状態を交互に変換していることが示唆された。例えば、図 1 5 C の No.3 の分子は最初の 1.5 秒間は静止しているが、その後運動を開始している。mRNA の運動を統計的に解析するため、水平方向(x, y 方向)の変位の 2 乗(平均二乗変位: $\Delta x^2 + \Delta y^2$)を時間に対してプロットした(図 1 6)。すると、平均二乗変位は時間に比例することがわかった。このことから mRNA の運動はブラウン運動であることが示唆された。図 1 6 A の傾きから拡散定数を算出すると $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。一方、mRNA のブラウン運動を 60% ショ糖中で計測し、純水中の拡散定数に換算すると $30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ だった。よって、核内の mRNA は水溶液中の約 1/150 の拡散定数でブラウン運動していることになる。mRNA の長さを 2 倍(β -globin mRNA 405 nt, GFP mRNA 800 nt)に変えても同様の結果が得られた。一方、核内の粘性は純水の 4 倍しかないので (Terada et al., 2006)、核内の mRNA の拡散が遅いことは、単純な粘性では説明できない。mRNA に結合する多数の結合タンパク質が知られているので、mRNA が mRNA 結合タンパク質と巨大な複合体を形成したり、非常に速い結合・解離を繰り返しながら拡散している可能性が考えられる。

mRNA の運動がブラウン運動であることは次の 2 つの実験からも支持された。まず、アジ化ナトリウムとデオキシグルコースを培地に加えて ATP を欠乏させても mRNA の運動に変化はなかった。また、 23°C と 30°C で mRNA の運動を測定したところ、温度による粘性係数の分だけ拡散定数が変化した。次に、止まっていた mRNA が動き出すまでの時間を解析した。蛍光の退色を防ぐため、15 秒おきに 1 秒間の露光時間で核内の蛍光 mRNA を顕微鏡撮影した (図 1 7 A)。

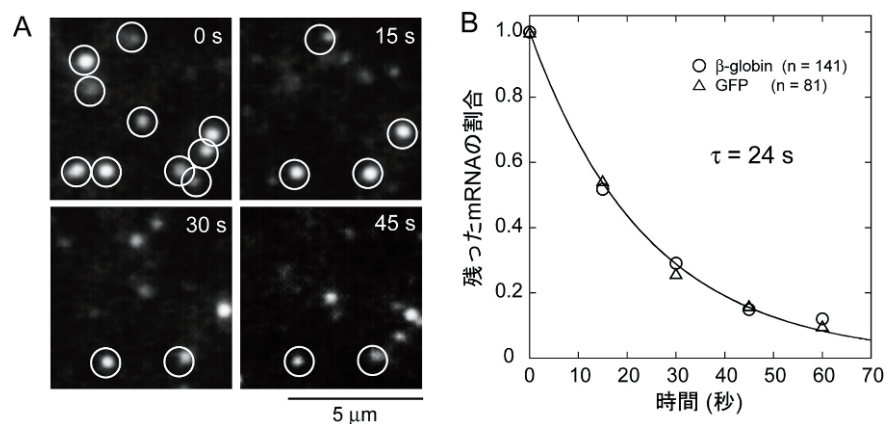


図 1 7 静止している mRNA の滞在時間 (A) 核内にインジェクションした GFP mRNA の代表的な蛍光顕微鏡ビデオ写真。静止している mRNA の滞在時間を調べるため 15 秒おきに撮影し、残った分子を円で囲った。(B) 静止したまま残った mRNA の割合を時間に対してプロットした図。○は β -globin mRNA、△は GFP mRNA。時定数 24 秒の指数関数でフィッティングした。

任意の時刻 0 s で静止している mRNA をマークし、時間とともに減少する様子を解析した (図 1 7 B)。その結果、静止した mRNA は時定数、約 30 秒で運動を開始して視野から離れることが明らかになった。静止していた mRNA は何らかの核内構造物に結合していたと考えられるが、その構造は不明である。

以上の結果をまとめると、mRNA は核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返

しながらブラウン運動していた。1分子を直接観察することで、mRNAは単純に拡散しつづけるのではなく、途中で核内構造物に結合・解離をしながら、核膜孔へと移動していくことが明らかになった。また、A6細胞の核の直径は10～15 μm なので、mRNAは測定された拡散運動では数分で核膜孔に到達できると予想される。一方、前述のようにmRNAの核外輸送にはより長い時間を要している。このことから核外輸送因子の結合や核膜孔複合体への結合が核外輸送の律速過程になっている可能性が示唆される。今後、多色に染め分けた様々な種類の生体分子(mRNAや蛋白質など)を同時に観察できるという蛍光の特性を生かせば、mRNAの核外輸送機構の詳細な理解につながると期待される。

1-1-4 スペックル構造の機能

前述したように、イントロンを含む未成熟 mRNA をインジェクションすると、核スペックルと呼ばれる核内構造物に速やかに集積した。核スペックルは、従来スプライシング反応に関わる因子の貯蔵庫でありスプライシング反応には受動的な役割しか果たしていないと考えられていた。しかし、我々の解析により核スペックルが転写後のスプライシング反応に積極的に関与していることが示唆された。イントロンを含む未成熟型 Ftz mRNA、および、点突然変異を導入してスプライシング反応が途中までしか進行しないようにした変異型 mRNA をインジェクションしたところ、両者ともに時定数2分で解離した。これらの結果は、未成熟型 mRNA は成熟型になるまで核スペックルと何度も結合、解離を繰り返していることを示唆している。これをさらに確かめるため、核スペックルに集積した蛍光標識 mRNA の一部を残して他

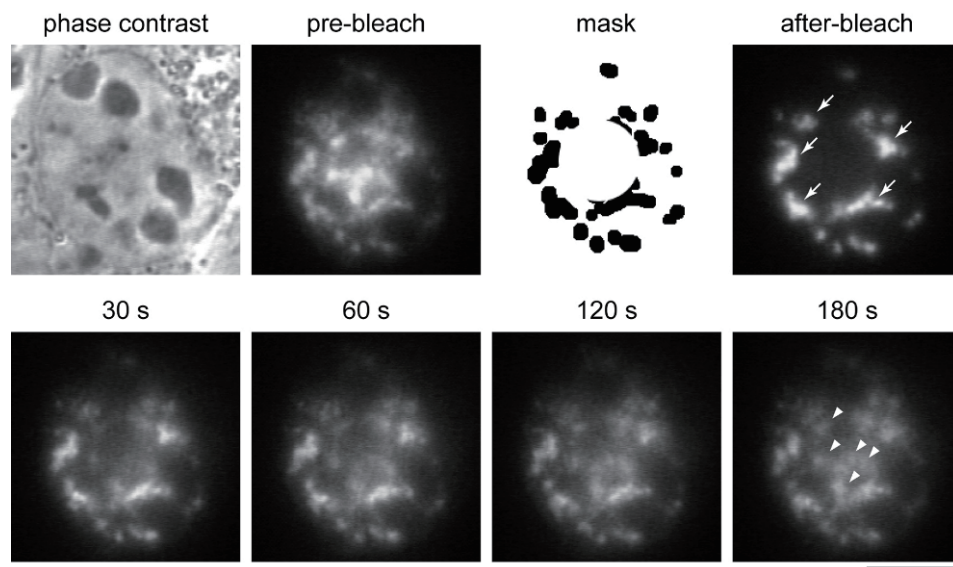


図18 未成熟 mRNA はスペックル間をシャトルする一部のスペックル(矢印)を残して退色させると、退色したスペックルへの mRNA の再結合が見られた。スケールは5 μm

の領域を強いレーザー光で退色させ、退色した領域での蛍光の回復を見たところ、mRNAが退色したスペックルに再結合する様子が観察された(図18)。最近、酵母の mRNA が転写後にスプライシングされることが示された(Tardiff et al., 2006)。本研究は、動物細胞においてもイントロンが転写後にスペックル構造でスプライシングされることを示唆している。

1-2 人工核酸のハイブリダイゼーションによる生細胞内における特定の mRNA のイメージングとリアルタイム定量 生細胞内における c-fos mRNA のイメージングと定量

1-2-1 はじめに

特定の mRNA を検出するために、アンチセンスオリゴ DNA (asODN) がプローブとして用いられている。例えば、ノザンプロットにおいては RNA を電気泳動で分離した後、検出したい RNA と相補的な配列の asODN をハイブリダイズさせることで検出する。また、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法においては、細胞を化学固定し、asODN によって検出される。しかし、生きた細胞内の特定の mRNA を検出することは困難であった。Tsuji ら(2000)は、c-fos mRNA に相補的な 2 種類の asODN を異なる蛍光色素で標識し、2 つの asODN が c-fos mRNA に同時に結合した際に起こる FRET を利用することにより強制発現させた c-fos mRNA の顕微鏡観察を報告している。しかし、mRNA と asODN の結合が不安定であり再現性を得ることが困難だった。これを克服するため、本研究では人工核酸である 2'-O-methyl RNA を使用して FRET イメージングを行った。ドナーとして Cy3、アクセプターとして Cy5 を用いて asODN の末端を標識した。さらにインジェクションした asODN が核内に移行しないようにするため別の端をビオチン化してストレプトアビジンを結合させた。その結果、Cos7 細胞内に存在する c-fos mRNA の局在をイメージングすることに成功した (図 1 9)。これは、生細胞内で、存在する特定の mRNA をイメージングした初めての例である。これにより、特定の mRNA の動態をリアルタイムにイメージングすることが可能になった。

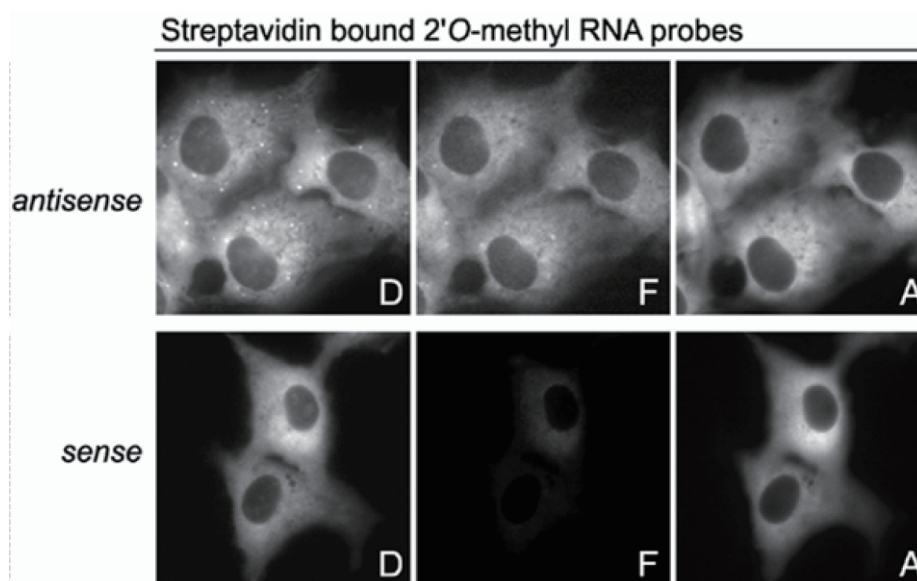


図 1 9 c-fos mRNA のイメージング
(D) ドナー、(F) FRET 像、(A) アクセプター像。アンチセンスを用いた場合にのみ FRET が観察された。

この手法では、mRNA に強く結合する asODN プローブの配列を決定することが重要である。本研究において、半経験的なルール (TC 含量と asODN の最少自由エネルギーによる評価) に基づく 40mer の有効な asODN の配列決定法を開発した (Yanagihara et al., 2007)。

残された問題点は、FRET 像にドナー由来の蛍光が 8 % 程度混入することである。これは、希土類錯体プローブをドナー、Cy5 をアクセプターとして用いることにより解決できると期待される。

次に、c-fos mRNA の細胞内の濃度をリアルタイムに定量することに挑戦した。プローブとして、前述の Cy3 とストレプトアビジンの結合した asODN を用い、蛍光相関分光法 (FCS) を用いて定量、解析した。FCS は、レーザー光を対物レンズで回折限界まで集光させ、その領域内を通過する蛍光分子が発する蛍光を、共焦点光学系を用いて計測する方法である。この手法により領域内の平均分子数と拡散時間を得ることができる。asODN の拡散時間は mRNA と結合していない場合は 1.38 ± 0.42 ms であるが、c-fos mRNA と結合すると 55.5 ± 26.1 ms と大きく変化する。この拡散時間の違いを利用して細胞内における両者の割合を求めることが可能となった。多数の細胞において測定を行いデータを解析することにより、細胞内における asODN と c-fos mRNA の解離定数 (Kd) 169.9 ± 29.6 nM を求めることができた。一方、溶液中で測定した Kd は 44.4 ± 6.8 nM であり、細胞内では RNA 結合タンパク質などの影響を受けて Kd が増大していることが示された。これは生きた細胞内で asODN と標的 mRNA の Kd を求めた最初の報告である。この Kd を基にして、各細胞におけるフリーな asODN と c-fos mRNA に結合した asODN を測定することにより、細胞内における c-fos mRNA の濃度を求めることが可能になった。c-fos mRNA の濃度は平均約 300nM であり、広く分布していた (図 2 0)。このように生きた細胞内で特定の mRNA の濃度をリアルタイムに定量した例は他にない。

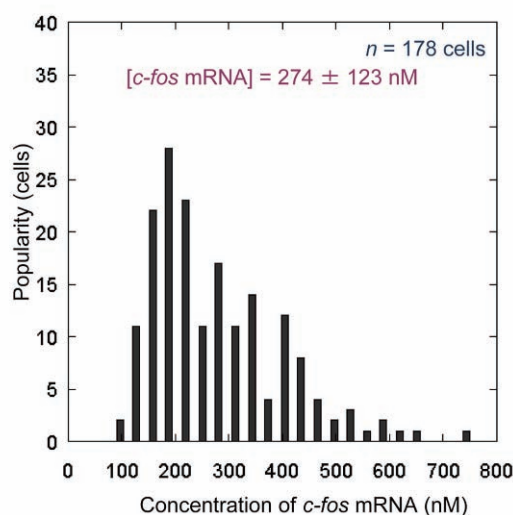


図 2 0 Cos7 細胞中の内在性 c-fos mRNA の濃度

asODN を用いないで RNA をイメージングする方法として、Singer のグループが開発した RNA 結合タンパク質を利用した外来性 mRNA の標識法がある (Bertrand et al., 1998)。この方法では、RNA 結合タンパク質 MS2 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質を細胞に強制発現させ、さらに標的となる MS2 結合配列を持った mRNA も同時に発現させ、GFP の蛍光によってイメージングが行われている。しかし、この方法によって検出できる RNA は外来性のものであり、MS2 認識配列が 1 kb と長く、内在性 mRNA の性質を必ずしも反映していない欠点がある。実際、MS2 を結合した外来性 mRNA はタグ配列のために分解されにくいという制約があることが報告されている (Golding et al. 2005)。

2. 組織中の細胞のアポトーシスを高感度に検出する方法の開発

アポトーシスの際に、どのような時系列で caspase の活性化、CAD の活性化、DNA 切断がおこるのかを実際にイメージングした研究例は無い。本研究では、DNA の切断を高感度に検出する要素技術の開発を行った。まず、テスター DNA (DNA 切断活性を定量す

るために用意したプロモーターを持たずタンパク質もコードしていない DNA) をヒストンに巻きつける条件検討を行った。GUB 配列の内部に Cy3 と Cy5 を導入しヌクレオソームが形成されたことを FRET で確認した(Tomschik et al., 2005)。次に、2つの GUB 配列をリンカーで結んだ塩基長 360 の DNA を調製し、特定の部位に同種の蛍光色素を 2 個導入した。2つのヌクレオソームが繋がっているか、分断されてバラバラになってしまったかを蛍光色素の個数で分別することにした。このために、フォトンカウンティングヒストグラム (PCH) 法を利用した。PCH とは、レーザー光を対物レンズで回折限界まで集光させ、その領域内を通過する蛍光分子の平均個数と蛍光強度を、共焦点光学系を用いて計測する方法である。このシステムを自作し、所定の性能を発揮していることを確認するため、蛍光標識アクチンオリゴマーの数密度分布を計測した (Terada et al. 2007)。本研究の主題とは離れるが、この計測により、アクチンフィラメントは 5 量体まではそれ以上長いフィラメントと構造的に異なる (モノマーの結合定数が異なる) ことを初めて示すことができた。

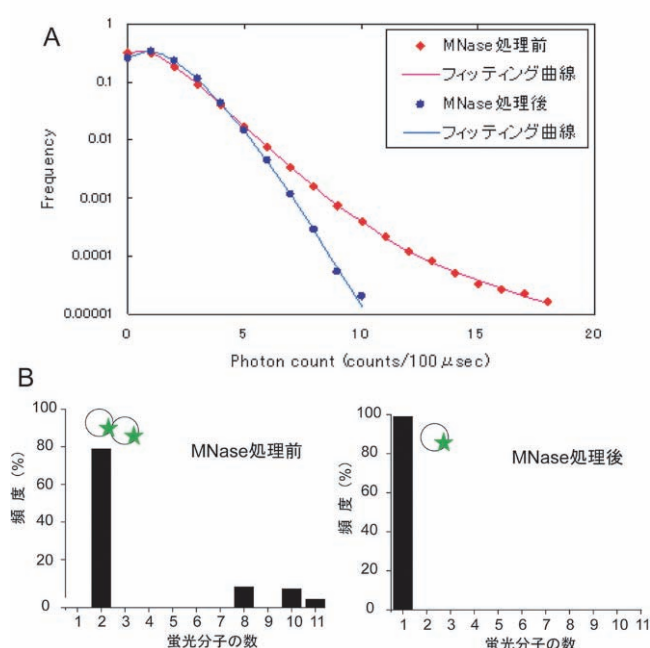


図 2 1 蛍光標識ヌクレオソームのフォトンカウンティングヒストグラム (A) とヌクレオソームの個数の分布 (B)。MNase 処理の前後を比較した。

この装置を用いて、溶液中において 2つのヌクレオソームの切断を検出できるか検討した。ヌクレオソームを PCH で計測したところ、2つの蛍光分子をもつヌクレオソームが約 80%、凝集体が約 20%共存しており、1つの蛍光分子を持つヌクレオソームは観察されなかった。次に、この溶液に MNase を加えて DNA を切断したところ 1つの蛍光分子のみが検出されるようになった。このように、ヌクレオソームの DNA の切断をリアルタイムに溶液中で検出することに成功した (図 2 1)。今後の課題は、蛍光色素で標識した DNA を用いて調製した 2つの連結ヌクレオソームを細胞の核にマイクロインジェクションし、アポトーシスによる切断活性を生細胞中で検出することである。

【文 献】

- Bertrand E. *et al.*, *Mol. Cell*, **2**, 437 (1998)
Dreyfuss G. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 195 (2002)
Politz J. C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6043 (1998)
Politz J. C. *et al.*, *Curr. Biol.*, **9**, 285 (1999).
Reed R., Hurt E. *Cell*, **108**, 523 (2002)
Tadakuma H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **344**, 772 (2006)
Tadakuma H. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 323 (2001)
Tardiff D. F. *et al.*, *Mol. Cell*, **24**, 917 (2006)
Terada N. *et al.*, *Bioimages*, **13**: 1 (2006)
Tokunaga K. *et al.*, *Genes Cells*, **11**, 305 (2006)
Tomschik M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3278 (2005)
Tsuji A. *et al.*, *Biophys. J.* **78**, 3260 (2000)
Yanagihara N. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **133**, in press (2007)

(2)研究成果の今後期待される効果

遺伝情報の発現は、多くの因子によって複雑に制御され、生命機能の維持を実現している。DNA の遺伝情報は RNA ポリメラーゼによって、まず mRNA に転写される。転写直後の mRNA はイントロンを含む未成熟な mRNA であるが、スプライシング、キャップ付加、ポリ A 付加などのプロセッシングを受けて成熟 mRNA となり細胞質に輸送され、リボソームによってタンパク質が合成される。細胞質に存在する mRNA は翻訳に供される一方、RNA 分解酵素によって分解される。このように、遺伝子発現のほとんどの反応には mRNA が関与しており、中心的な役割を果たしている。RNA の一生において、転写、スプライシング、細胞内局在、分解反応は遺伝子発現に大きな影響を与えており、mRNA の動態をイメージングしたり、リアルタイムに定量することは生命現象の理解に不可欠である。

さらに、近年、小分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA(miRNA)などの小分子 RNA や非翻訳 RNA が発見され、これらが、遺伝情報の発現制御に大きく関与していることが報告されている。しかし、従来の細胞生物学研究のほとんどは、タンパク質の解析により進められてきた。タンパク質間相互作用やタンパク質の局在を細胞内でイメージングすることにより細胞内の生命現象が調べられてきたのである。RNA を可視化して細胞内の現象を解析した報告は、その重要性にもかかわらず、ごくわずかである。その理由は、生細胞内で RNA を選択的に可視化する技術が未熟だったからである。

本研究は、このような現状を打開するため、生細胞内において特定の内在性 mRNA のリアルタイムイメージング法を開発し、確立した蛍光ラベル法を用いて生きた細胞内において特定の内在性 mRNA をリアルタイムに定量することに成功した。特に、siRNA、miRNA や非翻訳 RNA の機能を明らかにするためには、本研究で開発した技術は必須である。生命科学における RNA 研究の重要性と、そのイメージング解析のニーズとを考慮すると、生きた細胞内における RNA の定量の重要性は明らかである。mRNA の関与する細胞内のイベントは多岐に渡るが、特に遺伝子発現のゆらぎのメカニズムに関する研究や mRNA の分解反応に関する研究は mRNA の定量が重要な知見を与えられ、本研究で開発した手法が強力なツールとなると期待される。本研究で開発した手法は単なる基礎研究で終ることなく、RNA が関係する様々な疾患の原因を明らかにし医療や医薬品の開発に貢献すると期待される。

3.3 金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明(東京大学 吉田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

①酸化ストレスマーカーの高感度測定法の開発と敗血症動物モデルにおける検証
木村は、希土類錯体を用いた時間分解蛍光免疫アッセイを用いて、脂質過酸化物質 4-hydroxynonenal (HNE) の高感度測定法を開発した。この方法は、特異性が高く、ヒト、動物の正常状態における HNE が、通常の免疫学的測定法 ELISA の 100 倍程度高感度で、多数同時に測定可能となった。これを用いてラットの感染症モデルにおける HNE (酸化ストレス) の役割を明らかにした。ラットにリポ多糖類 (LPS) を注射し、経時的に血液・臓器を採取して HNE を測定した。まず、血中 HNE が一過性に上昇し、これを動脈硬化の担い手である単球の NADPH oxidase が産生する活性酸素に由来する点を明らかにし、感染と動脈硬化の関連の証拠を示した (図 2 2、2 3 Kimura et al, Free Rad Res, 39,845, 2005)。

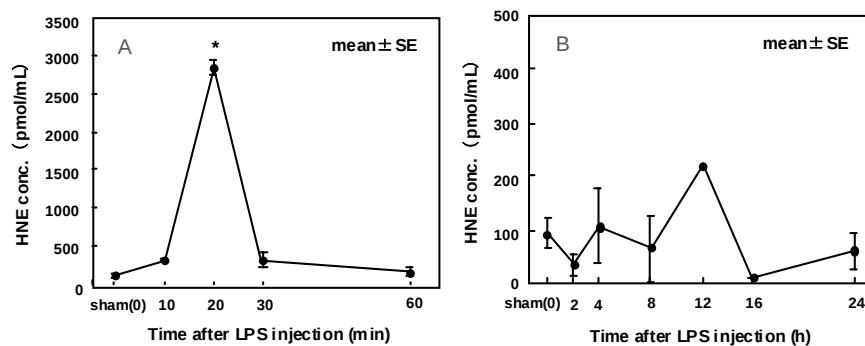


図 2 2 LPS 投与ラットの血中 HNE の経時的変化

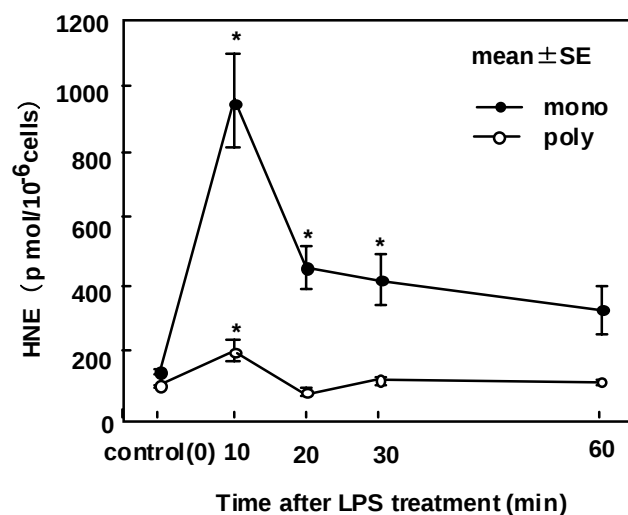


図 2 3 LPS 添加後、単球(mono)・多型核白血球(poly)より生成した HNE の経時的変化

つぎに、LPS 投与後、腸管壁において形質細胞が HNE を産生し、これが IgA を修飾しつつ腸管粘膜下に拡散すること、IgA が多量体化し、殺菌能が低下することを見出した（図 2 4、2 5 Kimura, et al, Free Rad Biol Med, 41, 973,2006）

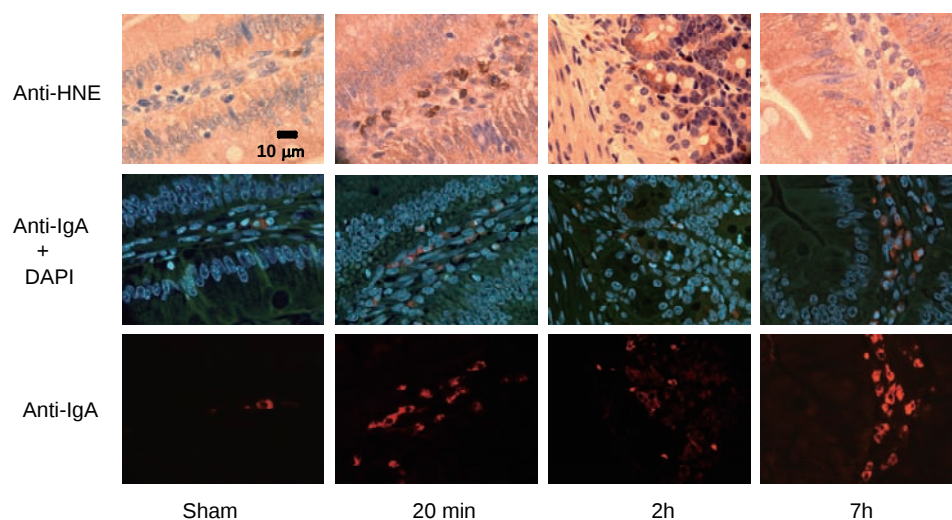


図 2 4 LPS 投与ラットの腸管 HNE, • IgA の経時的変化

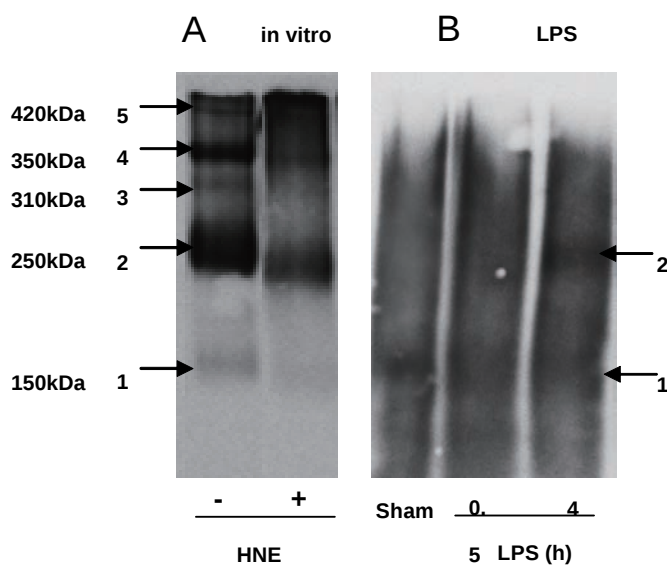


図 2 5 免疫沈降による、IgA の HNE 修飾に関する western blot 像

さらに、LPS 投与後、ラットの肝臓の小胞体で、NADPH oxidase などの酵素より活性酸素が増生、HNE が生成されて小胞体シャペロンである GRP78 を修飾することを見出した（投稿準備中）。このように、私達が開発した HNE 測定法が、病態の解析に有用であることがわかった。

② 酸化ストレスマーカー高感度測定法のヒト心理ストレスモデル、疾患モデルへの応用
木村は、HNE を測定し、下記の病態との関連性を明らかにした。

女性は閉経後、心血管疾患のリスクが急増する。若年女性では、心理ストレス負荷後、血圧が上昇するが、回復期にはすぐに正常化し、HNE は上昇しない。しかし、閉経女性では、心理ストレス負荷後の回復期に特に拡張期血圧上昇が持続し、かつ HNE は回復期に高値を示した(図26)。

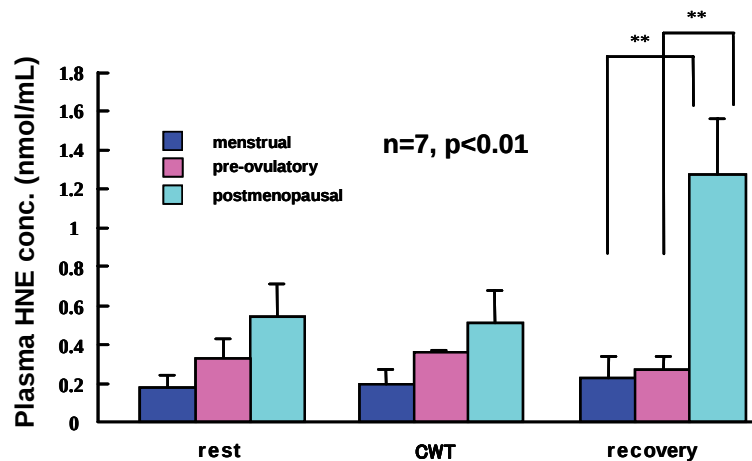


図 2 6 若年女性と閉経女性の心理ストレス負荷後の血圧変化と血中 HNE 値

このように、血圧上昇と血中 HNE 上昇に相関関係を認めたことより、HNE が閉経女性の心血管リスクに対する酸化ストレスの関与を示すよい指標であることが示された。

また、予備的研究において、不安定狭心症の患者の血中 HNE は、安定狭心症患者のそれに比べて高く、心筋梗塞発症後、HNE が高値を示したが、症状回復とともに急速に正常化した。従来、心血管疾患の臨床検体の病態解明に有効な指標、測定法がなかったため、本法は、この点において、今後、臨床応用が期待される。

③ラットの心筋梗塞モデルにおける TNF α と GRP78 の関与に関する研究

ラットの心筋梗塞初期に TNF α が上昇すること(時間分解蛍光イムノアッセイを使用)、これがミトコンドリア障害に寄与していること、短時間虚血再灌流(Ischemic Preconditioning: IP)により、この TNF α 増加が抑制される現象を見出し、そのメカニズムを明らかにした(Kimura et al, Life Sci, 78, 1901, 2006)。

吉田グループでは、ラットの虚血再灌流時、活性酸素が一酸化窒素(NO)による血管拡張を抑制することを見出した(Hoshino et al. Free Rad Res 2005;39: 481)。また、心筋虚血と IP における小胞体ストレス蛋白 GRP78 の誘導現象とメカニズム

(Shintani-Ishida K et al., BBRC 2006; 345: 1600)、一酸化炭素(CO)の虚血心筋障害抑制現象とメカニズムを明らかにした(Uemura K et al. BBRC 2005; 334, 661)。さらに、心筋を虚血に暴露すると一過性に Hemichannel の Connexin 43 (Cx 43)の発現が上昇し再灌流後の心筋障害に寄与することを見出した(投稿中)。また、ラットに心理ストレ

スを負荷すると心筋の Cx43 発現が上昇し、これが α アドレナリン受容体を介することを見出した。

④時間分解蛍光顕微鏡の作製と新規希土類錯体 DTBTA-Eu³⁺の免疫蛍光染色への応用
ストレプトアビジン結合 DTBTA-Eu³⁺を用いて、ラット腎臓尿細管中のニトロチロシンの局在を明らかにした。さらに、頻用されている蛍光標識剤 Alexa Fluor 488 を用いた通常型蛍光顕微鏡と比較すると、DTBTA-Eu³⁺を用いた時間分解蛍光顕微鏡は、蛍光波長の特性より、組織像から自家蛍光を除去でき、かつ蛍光が消褪しにくいために、極めてバックグラウンドが低く、特異性の高い抗原の検出を可能にした（投稿準備中）。

(2)研究成果の今後期待される効果

①酸化ストレスマーカーの高感度測定法のモデル動物における病態解明への応用

例えば、心血管疾患のリスクが高いメタボリック症候群（肥満、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常）の病態解明への寄与が期待される。森本・木村らは、卵巣摘出ラットで、ストレス負荷後の昇圧反応異常（Morimoto K et al. Am J Physiol 2004; 287:H1950）に加えて、肥満、耐糖能異常（インスリン感受性低下）が起こり、血 HNE が高値を示すことを見出した（投稿準備中）。本測定法により、このモデルを利用して、酸化ストレスがメタボリック症候群、心血管リスクにつながるメカニズムを解明できると期待される。

②酸化ストレスマーカーの高感度測定法のヒト疾患病態解明への応用

上記のように、酸化ストレスが虚血性心疾患の病態に寄与する証拠があり、その機序の解明が待たれていた。従来、多数の臨床検体につき酸化ストレスマーカーを同時に測定できなかったため、木村によって開発された本法が、研究推進の突破口になりうると期待される。また、抗酸化作用をもつ薬剤が注目されているが、その評価に使用できる。さらに、メタボリック症候群は、食事、運動、喫煙等の生活習慣の影響を受けやすく、生活習慣の改善によって治療・予防できる。その病態の評価・生活指導に利用できると期待される上、健康診断でも、酸化ストレスマーカーとして期待される。今後、臨床医学研究者との共同研究の成果が期待される。

③心筋虚血の分子病態の解明

一酸化炭素、及び Connexin 43 について先駆的な知見を得つつあり、虚血性心疾患の病態解明に貢献するとともに、法医学実務上、重要な心臓性突然死の診断法の開発への貢献が期待される。今後、酸化ストレスの病態への寄与についても、突破口を開くことが期待される。

4 研究参加者

①松本グループ(ラベル剤と装置の開発およびバイオへの応用)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
松本和子	早稲田大学 理工学術院	教授	研究の統括	平成14年11月～ 平成18年10月
西岡琢哉	早稲田大学 (松本研究室)	CREST 研究員	希土類蛍光標識剤の開 発	平成14年11月～ 平成19年3月
橋野仁一	早稲田大学 (松本研究室)	CREST 研究員	希土類蛍光標識剤の評 価	平成14年11月～ 平成19年3月
常盤繁史	早稲田大学 (松本研究室)	M2 大学院生	希土類蛍光標識剤の評 価	平成17年4月～ 平成19年3月
山本雄司	早稲田大学 (松本研究室)	M2 大学院生	希土類蛍光標識剤の開 発	平成17年4月～ 平成19年3月
山田陽子	早稲田大学 (松本研究室)	CREST 研 究補助員	チーム事務	平成17年4月～ 平成19年3月

②船津グループ(特定のmRNAの発現と動態を生細胞中で高感度に定量イメージングする方法の開発および組織中の細胞のアポトーシスを高感度に検出する方法の開発)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
船津 高志	東京大学大学院薬学系研究科	教授	特定の mRNA の発現と動態を生細胞中で高感度に定量イメージングする方法の開発および組織中の細胞のアポトーシスを高感度に検出する方法の開発	平成14年11月～ 平成19年3月
上野 太郎	東京大学大学院薬学系研究科	助手	核酸に結合した蛍光色素数のフォトンカウンティングヒストグラム法による解析	平成14年11月～ 平成19年3月
岡部 弘基	東京大学大学院薬学系研究科	大学院生	mRNA に結合した蛍光標識オリゴヌクレオチドの FCS による解析	平成16年4月～ 平成19年3月
多田隈 尚史	早稲田大学理工学部	助手	mRNA の生細胞中の動態観察	平成14年11月～ 平成15年10月
座古 保	早稲田大学理工学総合研究センター	客員研究員	mRNA の生細胞中の動態観察	平成14年11月～ 平成15年10月

山岸 舞	早稲田大学理工学総合研究センター	嘱託研究員	内在性 mRNA のイメージング	平成15年9月～平成19年3月
鞍馬 秀輝	早稲田大学大学院理工学研究科	大学院生	mRNA の生細胞中の動態観察	平成14年11月～平成16年3月
白崎 善隆	早稲田大学大学院理工学研究科	大学院生	mRNAの蛍光標識法の開発	平成14年11月～平成18年3月
石浜 陽	早稲田大学大学院理工学研究科	大学院生	スペックルに結合した mRNA のダイナミクスの解析	平成14年11月～平成19年3月
寺田 尚史	早稲田大学大学院理工学研究科	大学院生	核酸に結合した蛍光色素数のフォトンカウンティングヒストグラム法による解析	平成15年4月～平成18年9月

② 吉田グループ(金属錯体プローブを用いる疾病機構の解明)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
吉田謙一	東京大学大学院医学系研究科	教授	全体統括 HNE, ROS, NT 微量測定系の確立と病態解析	平成 14 年 11 月～平成 19 年 3 月
上村公一	東京大学大学院医学系研究科	講師	血管内皮細胞の虚血再灌流及び CO 暴露による一酸化窒素・活性酸素生成と細胞障害機構	平成 14 年 11 月～平成 19 年 3 月
新谷香	東京大学大学院医学系研究科	助手	ROS による細胞内情報伝達系・GRP78・cytochrome c oxidase (COX) 誘導の分子機構と保護作用	平成 14 年 11 月～平成 19 年 3 月
池谷博	東京大学大学院医学系研究科	助手	CO による虚血心筋 (由来) 細胞保護作用	平成 14 年 11 月～平成 17 年 3 月
高橋香	東京大学大学院医学系研究科	助手	Ischemic preconditioning による GRP78 誘導と細胞死抑制の機序に関する研究。	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月
Deng Fu-Rong	東京大学大学院医学系研究科	JST 研究補助員	CO による虚血心筋 (由来) 細胞保護作用	平成 15 年 4 月～平成 16 年 1 月
木村博子	順天堂大学医学部	講師	酸化ストレスマーカーの測定法の開発および LPS 投与ラットにおける血清脂質過酸化の役割に関する研究	平成 14 年 11 月～平成 19 年 3 月
鈴木洋子	順天堂大学医学部	JST 研究補助員	LPS 投与ラットにおける血清脂質過酸化の役割に関する研究	平成 14 年 11 月～平成 15 年 9 月

劉 爽	東京大学医学部	JST 研究 補助員	LPS 投与ラットにおける血 清脂質過酸化の役割に関する研究	(平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 2 月)
峠谷百合子	順天堂大学医学部	JST 研究 補助員	LPS 投与ラットの腸管免疫 に対する脂質過酸化の役割 に関する研究。	平成 16 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
今信子	順天堂大学医学部	JST 研究 補助員	酸化ストレスマーカーの 臨床応用に関する研究	平成 18 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
向田政博	防衛医大法医学講座	教授	時間分解蛍光顕微鏡装置の 開発	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
森本恵子	奈良女子大生活環境学 部	教授	ヒト及びラットの閉経・生 活習慣病モデルにおける生 理・病態解析	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月

5 成果発表等

(1)論文発表 (国内 件、海外 件)

(松本グループ)

(国内 0件、海外 3件)

Nishioka, T., J. Yuan, Y. Yamamoto, K. Sumitomo, Z. Wang, K. Hashino, C. Hosoya, K. Ikawa, G. Wang, and K. Matsumoto. New luminescent europium(III) chelates for DNA labeling. *Inorg. Chem.* **45**: 4088-4096 (2006)

Hashino, K., M. Ito, K. Ikawa, C. Hosoya, T. Nishioka, and K. Matsumoto. Application of a lanthanide fluorescent chelate label for detection of single-nucleotide mutations with peptide nucleic acid probes. *Anal. Biochem.* **335**: 278-284 (2006)

Hashino, K., K. Ikawa, M. Ito, C. Hosoya, T. Nishioka, M. Makiuchi, and K. Matsumoto. Application of a fluorescent lanthanide chelate label on a solid support device for detecting DNA variation with ligation-based assay. *Anal. Biochem.* in press

(船津グループ)

(国内 9 件、海外 17 件)

多田隈尚史、船津高志、谷時雄 「mRNA 核外輸送の可視化」蛋白質核酸酵素 vol. 48 pp. 421-429 (2003) (共立出版)

Zhang, G., T. Tani, T. Zako, T. Funatsu, and I. Ohdomari. The immobilization of DNA on microstructured patterns fabricated by maskless lithography. *Sensors and Actuators B.* **97**: 243-248 (2004)

Zhang, G.-J., T. Tani, T. Funatsu, and I. Ohdomari. Patterning of DNA nanostructures on silicon

surface by electron beam lithography of self-assembled monolayer. *Chem Comm.* 786-787 (2004)

Okochi, M., T. Nomura, T. Zako, R. Iizuka, H. Ueda, T. Funatsu, M. Leroux, and M. Yohda. Kinetics and binding sites for interaction of prefoldin with group II chaperonin: contiguous non-native substrate and chaperonin binding sites in archaeal prefoldin. *J. Biol. Chem.* **279**: 31788-31795 (2004)

Zako T., T. Funatsu, and M. Yohda. Kinetic analysis of interactions between archaeal prefoldin and chaperonin. *Recent Res. Develop. Biophys.* **3**: 475-483 (2004)

Nonaka, S., M. Tsunoda, K. Imai, and T. Funatsu. High-performance liquid chromatographic assay of N^G -monomethyl-L-arginine, N^G, N^G -dimethyl-L-arginine, and $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J. Chromatogr. A*, **1066**: 41-45 (2005)

Hirano, Y., M. Tsunoda, T. Funatsu, and K. Imai. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **819**: 41-46 (2005)

Zhang, G., H. Umezawa, H. Hata, T. Zako, T. Funatsu, I. Ohdomari, and H. Kawarada. Micropatterning oligonucleotides on single crystal diamond surface by photolithography. *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**: L295-298 (2005)

Tanii, T., T. Hosaka, T. Miyake, Y. Kanari, G.-J. Zhang, T. Funatsu, and I. Ohdomari. Hybridization of deoxyribonucleic acid immobilization of green fluorescent protein on nanostructured organosilane templates. *Jpn. J. App. Phys.* **44**: 5851-5855 (2005)

Zhang, G.-J., T. Tanii, T. Zako, T. Hosaka, T. Miyake, Y. Kanari, T. Funatsu, and I. Ohdomari. Nanoscale patterning of protein using electron beam lithography of organosilane self-assembled monolayers. *Small*, **1**: 833-837 (2005)

Zako T., R. Iizuka, M. Okochi, T. Nomura, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yohda and T. Funatsu. Facilitated release of substrate protein from prefoldin by chaperonin. *FEBS Lett.* **579**: 3718-3724 (2005)

船津高志 「1 分子イメージングの考え方と実際」 バイオイメージングがわかる (羊土社 高松哲郎 編) pp. 34-42 (2005)

船津高志、上野太郎 「エバネッセント場蛍光顕微鏡による生体分子の 1 分子機能解析」 光学 34 (10): 500-505 (2005)

Shirasaki, Y., J. Tanaka, H. Makazu, K. Tashiro, S. Shoji, S. Tsukita, and T. Funatsu. On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermo-reversible gelation polymer to control flow. *Anal. Chem.* **78**: 695-701 (2006)

Tokunaga, K., T. Shibuya, Y. Ishihama, H. Tadakuma, M. Ide, M. Yoshida, T. Funatsu, Y. Ohshima, and T. Tani. Nucleocytoplasmic transport of fluorescent mRNA in living mammalian cells: Nuclear mRNA export is coupled to ongoing gene transcription *Genes to Cells*. **11**: 305-317 (2006).

Tadakuma, H., Y. Ishihama, T. Shibuya, T. Tani, and T. Funatsu. Imaging of single mRNA molecules moving within a living cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* **344**: 772-779 (2006)

Terada, N., H. Tadakuma, Y. Ishihama, M. Yamagishi, T. Zako, and T. Funatsu. Analysis of

Nuclear Microenvironments by Translational Diffusion of GFP Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *bioimages. Bioimages*. **13**:1-10 (2006)

Zako, T., Y. Murase, R. Iizuka, T. Yoshida, T. Kanzaki, N. Ide, M. Maeda, T. Funatsu, and M. Yohda. Localization of Prefoldin Interaction Sites in the Hyperthermophilic Group II Chaperonin and Correlations between Binding Rate and Protein Transfer Rate. *J. Mol. Biol.* **364**: 110-120 (2006)

Arakawa, T., Y. Shirasaki, T. Izumi, T. Aoki, H. Sugino, T. Funatsu, and S. Shoji. High-speed particles and biomolecules sorting microsystem using thermosensitive hydrogel. *Meas. Sci. Techn.* **17**: 3141-3146 (2006)

船津高志 「1 分子蛍光イメージング法による生体分子の機能と相互作用の解析」化学と生物 **44** (1): 34-38 (2006)

船津高志 「生体分子の 1 分子蛍光イメージング」 レーザー研究 (The Review of Laser Engineering) ,Vol.34, No.3 March 2006、pp.241-245 (2006)

船津高志 「1 分子イメージングでタンパク質の機能を探る」 日本レーザー医学会誌 Vol.26, No.4:327-332 (2006)

船津高志、谷時雄 2006「mRNA 核内運動の 1 分子イメージング」 ファルマシア vol.42 No.8 803-806 (2006)

Arakawa, T. Y. Shirasaki, T. Aoki, T. Funatsu, and S. Shoji. Three-dimensional sheath flow sorting microsystem using thermosensitive hydrogel.. *Sensors and Actuators A: Physical*, in press.

Terada, T., T. Shimozaawa, S. Ishiwata, and T. Funatsu, Size distribution of linear and helical polymers in actin solution analyzed by photon counting histogram. *Biophys. J.* in press (2007)

Yanagihara, N. H. Tadakuma, Y. Ishihama, K. Okabe, T. Funatsu. Determination of potent antisense oligonucleotides in vitro by semi-empirical rules. *J. Biosci. Bioeng.* in press

(吉田グループ)

(国内 0 件、海外 28 件)

Shiraishi K, K. Yoshida, T. Fujimiya, K. Naito. Activation of mitogen activated protein kinases and apoptosis of germ cells after vasectomy in the rat. *J. Urol.* **168**:1273-1278 (2002)

Harada K, T. Maekawa, R. Tsuruta, T. Kaneko, D. Sadamitsu, T. Yamashima, K. Yoshida. Hypothermia inhibits translocation of CaM kinase II and PKC- α , β , γ -isoforms and fodrin proteolysis in rat brain synaptosome during ischemia-reperfusion. *J. Neurosci. Res.* **67**:664-669 (2002)

Shiraishi K, K. Yoshida, K. Naito. Activation of endothelial nitric oxide synthase in contralateral testis during unilateral testicular torsion in rats. *Arch. Androl.* **49**:179-190 (2003)

Shiraishi K, K. Yoshida, T. Fujimiya, K. Naito. Angiotensin II dependent testicular fibrosis and effects on spermatogenesis after vasectomy in the rat. *J. Urol.* **170**:2104-2108 (2003)

- Aki T, K. Yoshida, Y. Mizukami. The mechanism of alphaB-crystallin gene expression by proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**:162-167 (2003)
- Uemura K, T. Aki, K. Yamaguchi, K. Yoshida. Protein kinase C- ϵ protects PC12 cells against methamphetamine-induced death: possible involvement of suppression of glutamate receptor. *Life Sci.* **72**:1595-607 (2003)
- Uemura K, S. Hoshino, K. Uchida, R. Tsuruta, T. Maekawa, K. Yoshida. Hypothermia attenuates delayed cortical cell death and ROS generation following CO inhalation. *Toxicol. Lett.* **145**:101-106 (2003)
- Kobayashi M, H. Kimura, J. Liao, M. Abe, S. Hirose, Y. Tomino. Measurement of Mouse Urinary Type IV Collagen Using Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Anal. Sci.* **19**:205-210 (2003)
- Mukaida M, Y. Takada-Matuzaki, T. Masuda, H. Kimura. The identification of a victim using the DGGE method for trace deposits collected on adhesive film. *Forensic Sci. Int.* **132**:157-160 (2003)
- Hatanaka K, H. Kawata, T. Toyofuku, K. Yoshida. Down-regulation of Connexin43 in Early Myocardial Ischemia and Protective Effect by Ischemic Preconditioning in Rat Hearts In Vivo. *Jpn. Heart J.* **45**:1007-1019 (2004)
- Mizukami Y, A. Iwamatsu, T. Aki, M. Kimura, K. Nakamura, T. Nao, T. Okusa, M. Matsuzaki, K. Yoshida, S. Kobayashi. ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **279**:50120-50131 (2004)
- Morimoto K, Y. Kurahashi, K. Shintani-Ishida, N. Kawamura, M. Miyashita, M. Uji, N. Tan, K. Yoshida. Estrogen replacement suppresses stress-induced cardiovascular responses in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**:H1950-1956 (2004)
- Kuzumoto N, Y. Kitagawa, K. Uemura, T. Ueyama, K. Yoshida, H. Furuya, M. Takaki. A brief regional ischemic-reperfusion enhances propofol-induced depression in left ventricular function of in situ rat hearts. *Anesthesiology* **101**:879-887 (2004)
- Fujimoto H, M. Ohno, S. Ayabe, H. Kobayashi, N. Ishizaka, H. Kimura, K. Yoshida, R. Nagai. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia--reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt-eNOS pathways. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **24**:1848-1853 (2004)
- Sato K, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori. Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection. *Lab. Chip.* **4**:570-575 (2004)
- Suzui M, T. Kawai, H. Kimura, K. Takeda, H. Yagita, K. Okumura, PN. Shek, RJ. Shephard. Natural killer cell lytic activity and CD56^{dim} and CD56^{bright} cell distributions during and after intensive training. *J. Appl. Physiol.* **96**:2167-2173 (2004)
- Yoshioka N, J. Adachi, Y. Ueno, K. Yoshida. Oxysterols increase in diabetic rats. *Free Radic. Res.* **39**:299-304 (2005)
- Hoshino S, Y. Kikuchi, M. Nakajima, H. Kimura, S. Takenaka, K. Uemura, K. Yoshida. Endothelial NO synthase (eNOS) phosphorylation regulates coronary diameter during ischemia-reperfusion in association with oxidative stress. *Free Radic. Res.* **39**: 481-489 (2005)

Kimura H, K. Matsumoto, M. Mukaida. Rapid and Simple Quantitation of Methamphetamine by Using a Homogeneous Time-resolved Fluoroimmunoassay Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer from Europium to Cy5. *J Anal. Toxicol.* **29**: 799-804 (2005)

Kimura H, F. Nagao, Y. Tanaka, S. Sakai, T. Ohnishi, K. Okumura. Beneficial Effects of the Nishino Breathing Method on the Immune Activity and Stress Level. *J. Altern. Complement Med.* **11**: 285-291 (2005)

Kimura H, S. Liu, S. Yamada, U. Uchida, K. Matsumoto, K. Yoshida. Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynoneal (HNE) in early endo-toxemia. *Free Radic. Res.* **39**: 845-851 (2005)

Yoshioka N, J. Adachi, Y. Ueno, K. Yoshida. Oxysterols increase in diabetic rats. *Free Radic. Res.* **39**: 299-304 (2005)

Ohnishi ST, T. Ohnishi, S. Muranaka, H. Fujita, H. Kimura, K. Uemura, K. Yoshida, K. Utsumi. A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* **37**: 1-15 (2005)

Uemura K, S. Adachi-Akahane, K. Shintani-Ishida, K. Yoshida. Carbon monoxide protects cardiomyogenic cells against ischemic death through L-type Ca^{2+} channel inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**: 661-668 (2005)

Yoshida K, K. Uemura, K. Shintani-Ishida. Calpain in myocardial ischemia-reperfusion and related diseases. *Molecular Mechanism of Heart Diseases* 149-165 (2005)

Kimura H, K. Shintani-Ishida, M. Nakajima, S. Liu, K. Matsumoto, K. Yoshida. Ischemic preconditioning or p38 MAP kinase inhibition attenuates myocardial TNF a production and mitochondria damage in brief myocardial ischemia. *Life Science* **78**: 1901-1910 (2006)

Kimura H, M. Mukaida, K. Kuwabara, T. Ito, K. Hashino, K. Uchida, K. Matsumoto, K. Yoshida. 4-Hydroxynonenal modifies IgA in rat intestine after lipopolysaccharide injection. *Free Radic. Biol. Med.* **41**: 973-978 (2006)

Shintani-Ishida K, M. Nakajima, K. Uemura, K. Yoshida. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**: 1600-1605 (2006)

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

≪発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等≫

①招待、口頭講演 (国内 36件、海外 18件)

②ポスター発表 (国内 78件、海外 23件)

(松本グループ)

①招待、口頭講演 (国内 14件、海外 8件)

②ポスター発表 (国内 16件、海外 0件)

①招待、口頭講演

Matsumoto, K. “Time-resolved Fluorometry Using Lanthanide Labels for Diagnostics and Biotechnology” International Symposium “Emerging Research Fields and New Industry of

BT-IT-NT by Integrating Biotechnology, Information Technology and Nanotechnology” 2002 年 3 月 13 日 東京（東京大学）（招待講演）

松本和子 「生体分子プローブとしての希土類蛍光錯体」 日本化学会第 82 回秋季年会 2002 年 9 月 26 日 大阪（招待講演）

松本和子 「新規蛍光性希土類錯体の超高感度バイオアッセイへの応用」 第 75 回日本生化学会大会 2002 年 10 月 17 日 京都（招待講演）

Matsumoto, K. “Synthesis and Bio-Application of Fluorescent Lanthanide Chelate Labels” International Symposium on Bio-Trace Elements, 2002 年 10 月 28～31 日 和光（理化学研究所）（招待講演）

松本和子 「希土類錯体を用いる生体成分の時間分解蛍光検出」 名古屋コンファレンス 2002ー化学の新展開を支える計測科学の最前線 2003 年 2 月 3 日～4 日 名古屋（名古屋大学シンポジオンホール）（招待講演）

袁景利、王桂蘭、松本和子 「希土類蛍光ラベル剤の開発とバイオテクノロジーへの応用」 第 20 回希土類討論会 2003 年 5 月 22 日～23 日 東京（学術総合センター）

松本和子「希土類蛍光錯体を用いるバイオテクノロジー」 平成 14 年度生物ラジカル研究所研究発表会 2003 年 山形（生物ラジカル研究所）（招待講演）

Wei Xu, Jingli Yuan, Fukui, T., Matsumoto, K. “DNA Analysis by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection by Using Lanthanide Complexes as Labels” ” PITTCON 2003 年 3 月 11 日 Orland (USA)

松本和子、袁景利 「希土類蛍光錯体をプローブとするバイオアッセイ」 電気化学会創立 70 周年記念大会 2003 年 4 月 1 日 大岡山（東京工業大学）（招待講演）

松本和子 「蛍光性希土類錯体をプローブとするバイオテクノロジー」 大阪大学大学院工学研究科講演会 2003 年 5 月 9 日 豊中（大阪大学）（招待講演）

松本和子「希土類蛍光ラベル剤を用いるバイオ分析」 日本学術振興会代 116 委員会 創造機能化学講演会 2003 年 6 月 10 日 東京（招待講演）

Matsumoto, K. “Time-resolved Fluorometry Using Lanthanide Labels for Diagnostics and Biotechnology” 11th International Conference on Bioinorganic Chemistry, Cairns, Australia, July 19-23, 2003

松本和子 「希土類錯体を用いた時間分解蛍光測定法のバイオ分析への応用」 近畿化学協会機能性色素部会「バイオと色素」講演会 2003 年 大阪（招待講演）

Matsumoto, K. “Fluorescent Lanthanide Chelates for Diagnostics and Biotechnology” US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis, 2003 年 10 月 9-11 日 横浜（招待講演）

Matsumoto, K., Makiuchi, M., Hosoya, C., Ito, M., Ikawa, K., and Hashino, K. “Nucleic Acid Detection by Using Fluorescent Lanthanide Chelate Labels” THE FORTH

INTERNATIONAL FORUM ON CHEMISTRY OF FUNCTIONAL ORGANIC CHEMICALS (IFOC-4), Tokyo, November 16-17, 2003.

Matsumoto, K., Hashino, K., Nishioka T. "Time-resolved Fluorometry Using Lanthanide Chelates for DNA Diagnostics" 2004 Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON), Chicago, March 7-12, 2004.

松本和子 「ナノバイオ計測用の蛍光プローブの開発」 日本化学会春季年会 2004年 兵庫 (関西学院大学) (招待講演)

Matsumoto, K. "Modification and tuning of fluorescent lanthanide complexes for specific detection of bio-molecules" The 8th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Hong Kong, April 4, 2004.

松本 和子 「希土類蛍光錯体を用いる時間分解遺伝子検出システム」 第65回分析化学討論会 シンポジウム「バイオ分析の新潮流」 2004年5月15日 沖縄 那覇 (招待講演)

松本和子、橋野仁一、牧内正男、西岡琢哉、井川恵介 「希土類蛍光錯体をプローブとする高感度バイオ計測 -免疫分析からマイクロアレイまで-」 日本学術振興会 光電相互変換第125委員会 2004年 東京 (東京理科大) (招待講演)

Matsumoto K. "Modification of Fluorescent Lanthanide Complexes for Specific Detection of Bio-Molecules" 3rd International Conference on Metals and Genetics: Metals and Biochemistry, Disease, Environment, Toronto, May 28, 2004.

山口佳則、伊藤雅浩、橋野仁一、目賀章正、松本和子 「希土類蛍光錯体を利用したタンパク質のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 時間分解キャピラリーゲル電気泳動」 日本分析化学会第53年会 2004年9月1日~3日 千葉 (千葉工業大学)

Matsumoto, K. "Modification of Fluorescent Lanthanide Complexes for Specific Detection of Bio-Molecules" The XIth International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection Techniques in Biomedical and Environmental Analysis, 2004年9月19-22日 Beijing, China (招待講演)

Matsumoto, K. "A time-resolved microarray system using fluorescent lanthanide labels" 5th International symposium on electrochemical micro & nano system technologies, 2004年9月29, 30日 東京 (早稲田大学) (招待講演)

K. Matsumoto, K. Hashino, T. Nishioka. "Lanthanide fluorescence labels for DNA detection." Rare Earths '04 in Nara 2004年11月7~12日 奈良 (奈良県新公会堂) (招待講演)

Matsumoto, K., Yamaguchi, Y., Nishioka, T., Hashino, K. "Highly sensitive protein detection by SDS-capillary gel electrophoresis using a lanthanide fluorescence dye" 2005 Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON), Orland, February 28, 2005.

山口佳則、橋野仁一、松本和子 「希土類蛍光錯体で標識した抗体を用いる時間分解イ

ムノアッセイ・キャピラリー電気泳動」 日本分析化学会第54年会 2005年9月14日～16日 名古屋 (名古屋大学)

松本和子 「希土類錯体ラベル剤を用いる超高感度時間分解蛍光検出法の開発」 日本分析化学会第54年会 2005年9月14日～16日 名古屋 (名古屋大学) (学会賞受賞講演)

山口佳則、松本和子 「希土類蛍光ラベル剤を用いた時間分解キャピラリー電気泳動」 第25回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2005年 姫路

Matsumoto, K. "Fluorescent Lanthanide Compounds as Labels for Time-Resolved Bioanalysis" Invited talk at Chinese Academia Sinica in Taipei 2005年11月23日 (招待講演)

Matsumoto, K. "Bionano Application of Lanthanide Probes in Time-Resolved Fluorometry" PACIFICHEM 2005 Congress (2005環太平洋国際化学会議) 2005年12月14日～21日 ハワイ (招待講演)

Matsumoto, K. "Modification and Tuning of Fluorescent Lanthanide Labels for Biotechnology" PACIFICHEM 2005 Congress (2005環太平洋国際化学会議) 2005年12月14日～21日 ハワイ (招待講演)

松本和子「蛍光性希土類錯体が開くバイオテクノロジー」 第1回ナノメデイシン討論会 岡崎コンファレンスセンター 2006年2月12日～13日 (招待講演)

Matsumoto, K. "Fluorescent Lanthanide Compounds as Labels for Time-Resolved Bioanalysis" Invited lecture at Royal Melbourne Institute of Technology (RMIT) 2006年5月4日 (招待講演)

松本和子 「希土類蛍光錯体を用いるバイオテクノロジー」 大阪市立大学理学研究科談話会 2006年5月16日 (招待講演)

松本和子「希土類蛍光錯体を用いるバイオテクノロジー」 奈良女子大学大学院人間文化研究科学術研究交流センターシンポジウム 2006年 (招待講演)

橋野仁一、井川恵介、牧内正男、松本和子「希土類蛍光錯体のミニシーケンス法によるDNA一塩基変異検出への応用」 第67回分析化学討論会 2006年5月13日～14日 秋田 (秋田大学)

西岡琢哉、宮部正仁、松本和子 2006年 「新規希土類蛍光錯体の合成と蛍光特性」 第23回希土類討論会 2006年5月30日～31日 東京 (学術総合センター)

Matsumoto, K. "Fluorescent Lanthanide Chelates for Biotechnology" The 7th International Symposium on Functional pi-Electron Systems, Osaka International Convention Center 2006年 (Plenary Lecture)

②ポスター発表

袁景利、王桂蘭、松本和子、王震「新規ユウロピウム蛍光ラベル剤の合成と時間分解蛍光免疫アッセイへの応用」第64回分析化学討論会 高知（高知大学）、2003年5月24日～25日

橋野仁一、福井崇、松本和子「Invader 法による DNA の1塩基多型検出への新規希土類蛍光性錯体の応用の試み」第64回分析化学討論会 高知（高知大学）、2003年5月24日～25日

西岡琢哉、袁景利、中井謙、橋野仁一、伊藤雅浩、松本和子「希土類蛍光錯体を含むナノパーティクルの合成と生体分子分析への応用」日本分析化学会第52年会 仙台（宮城教育大学）2003年9月23日～25日

橋野仁一、高野俊幸、松本和子「Molecular Beacon による PCR 産物検出への新規希土類蛍光錯体の応用の試み」日本分析化学会第52年会 仙台（宮城教育大学）2003年9月23日～25日

Nishioka, T. “DNA Analysis Using Nanoparticles Containing Lanthanide Fluorescence Complexes” US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis, Tokyo, October 9-11, 2003.

伊藤雅浩、細谷千尋、橋野仁一、松本和子 「希土類蛍光錯体標識を用いたPNAプローブによる一塩基変異検出系の検討」 第65回分析化学討論会 2004年5月15日～16日 沖縄（琉球大学）

西岡琢哉、谷田泰常、橋野仁一、伊藤雅浩、袁景利、松本和子 「インターカレーターを表面に有する蛍光性ナノパーティクルを用いたDNA分析」 第65回分析化学討論会 2004年5月15日～16日 沖縄（琉球大学）

井川恵介、牧内正男、橋野仁一、松本和子 「希土類蛍光標識のDNAマイクロアレイへの応用」第65回分析化学討論会 2004年5月1日～16日 沖縄（琉球大学）

K. Hashino, T. Nishioka, K. Matsumoto. ” Cell staining by using a fluorescent lanthanide chelate complex.” Rare Earths ’ 04 in Nara 2004年11月7～12日 奈良（奈良県新公会堂）

T. Nishioka, Y. Tanida, K. Hashino, M. Ito, K. Matsumoto. ” DNA analysis using nanoparticles containing lanthanide fluorescence complex.” Rare Earths ’ 04 in Nara 2004年11月7～12日 奈良（奈良県新公会堂）

井川恵介、牧内正男、橋野仁一、松本和子 「希土類蛍光標識を用いたアレイ上での ligation-based SNP assay」 第27回日本分子生物学会年会 2004年12月8日～11日 神戸（神戸国際展示場）

伊藤雅浩、橋野仁一、松本和子 「希土類蛍光標識を用いたPNAプローブによる一塩基変異検出」 第27回日本分子生物学会年会 2004年12月8日～11日 神戸（神戸国際展示場）

谷田泰常、西岡琢哉、松本和子 「希土類蛍光錯体を含有するシリカナノ粒子を用いた

核酸検出」 日本分析化学会第54年会 2005年9月14日～16日 名古屋 (名古屋大学)

伊藤雅浩、橋野仁一、松本和子 「希土類蛍光錯体 DTBTA-Eu³⁺標識タンパク質の SDS-PAGE による分析」 日本分析化学会第54年会 2005年9月14日～16日 名古屋 (名古屋大学)

常盤繁史、橋野仁一、西岡琢哉、松本和子 「希土類蛍光錯体に細胞染色性について」 日本分析化学会第54年会 2005年9月14日～16日 名古屋 (名古屋大学)

橋野仁一、伊藤雅浩、松本和子 「希土類蛍光錯体 DTBTA-Eu³⁺標識蛋白質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と遅延蛍光観察」 日本分析化学会第54年会 2005年9月14日～16日 名古屋 (名古屋大学)

(船津グループ)

- ①招待、口頭講演 (国内 15 件、海外 3 件)
- ②ポスター発表 (国内 37 件、海外 11 件)

①招待、口頭講演

船津高志 「1 分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」 第 227 回 CBI 学会研究講演会「タンパク質研究の最前線」 (2003)

船津高志 「レーザー顕微鏡による生体分子イメージングと操作」 レーザー学会学術講演会第23回年次大会 (2003)

Funatsu, T. 2003. "Single Molecule Imaging of Biological Functions and Handling of Biomolecules in Micro Channels"(1 分子蛍光イメージングによる生体分子機能解析と微小流路による生体分子ハンドリング) 第2回 NSF-文部科学省合同シンポジウム US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis 2003年10月10日(金)ー11日(土) 横浜プリンスホテル (招待講演)

Takashi Funatsu "Single-Molecule Imaging of Biological Functions" The 53rd Annual convention of the Pharmaceutical Society of Korea April22(Thu)-23(Fri), 2004. Chungnam National University, Taejon, Korea(韓国大田市) (招待講演)

船津高志 「1分子イメージングでタンパク質の機能を探る」 第25回日本レーザー医学会総会 2004年11月11日(木)～12日(金) 東京 ホテルオークラ (招待講演)

船津高志 「生体分子の1分子検出の研究動向」 未踏・ナノデバイステクノロジー第151回委員会第70回研究会 第4回「ナノバイオフィジオン分科会」 2004年11月24日(水)早稲田大学 (招待講演)

船津高志 「単一分子計測とバイオフォトンクス」 第146回 有機エレクトロニクス材料研究会 2005年1月18日 東京市ケ谷 自動車会館 (招待講演)

船津高志 「1分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」 日本化学会 第85春季年

会 2005年3月26日 神奈川県 神奈川大学横浜キャンパス (招待講演)

船津高志 「1分子蛍光イメージング法による生体分子の機能と相互作用の解析」 第125年会
日本薬学会 2005年3月29日～31日 東京有明・台場 (招待講演)

船津高志 「1分子蛍光イメージング法による蛋白質間相互作用解析」 日本顕微鏡学会第61
回学術講演会 つくば国際会議場 2005年6月1日～3日 (招待講演)

T. Funatsu “Analysis of Biomolecular Function and Interaction Using Single-Molecule
Fluorescence Imaging” International Symposium on Soft-Nanotechnology 2005 (ISSN2005),
Hokkaido University, 2005年6月20日～21日 (招待講演)

船津高志 「 1分子蛍光イメージング法による生体分子機能解析」バイオウィーク in
Sapporo2005 シンポジウム—脂質機能研究・バイオセンサ研究の最先端— ホテルモントレエ
ーデル札幌 2005年7月6日 (招待講演)

T. Funatsu “Single-molecule Imaging of Biological Functions” US-Japan Conference on Drug
Development & Rational Drug Design, Los Angeles, USA 2005年7月31日～8月5日 (招待
講演)

船津高志 「1分子蛍光イメージング法による生体分子の機能と相互作用の解析」 第18回バ
イオメディカル分析科学シンポジウム グランシップ・静岡県コンベンションセンター 2005年8
月5日～7日 (招待講演)

船津高志 「生体分子機能の1分子蛍光イメージング」 シンポジウム「バイオイメージングをナノ
との融合によるブレークスルー」 化学工学会 第37回秋季大会 岡山大学 2005年9月16
日 (招待講演)

船津高志 「生体分子機能の1分子蛍光イメージング」 第83回日本生理学会大会 群馬
県民会館・前橋商工会議所 2006年3月28日～30日 (招待講演)

Takashi Funatsu “Analyses of Function and Interactions of Protein Molecules by Single
Fluorescent Molecular Imaging” International Conference on Optical MEMS and Their
Applications, Big Sky Resort, Big Sky, Montana, USA, 21-25 August 2006 (招待講演)

Takashi Funatsu “Analyses of Functions and Interactions of Protein Molecules by Single
Molecular Imaging” The International Symposia for Bioimaging, Ikenobo Junior College, Kyoto,
Japan, October 28-30, 2006 (招待講演)

②ポスター発表

座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志 「古細菌由来プレフォ
ルディンと、基質タンパク質、シャペロニンとの相互作用について」 日本生物物理学会
第40回年会 (2002)

上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志 「GroEL の ATP 加水分解サイク
ルにおけるヌクレオチド状態」 日本生物物理学会第40回年会 (2002)

細野和彦、上野太郎、田口英樹、元島史尋、座古保、吉田賢右、船津高志 「チロシンの
蛍光郷土変化を指標とした GroEL の構造変化検出」 日本生物物理学会第40回年会
(2002)

東條正、青木大輔、木脇圭一、シルヴィア・イスカンダル、多田隈尚史、石渡信一、船津高志 「G タンパク質共役型受容体・FPR1 は GFP の有無に関わらず多量体形成する：蛍光一分子観察による解析」 日本生物物理学会第 40 回年会 (2002)

鞍馬秀輝、貴家康尋、多田隈尚史、永川豊広、船津高志、原田慶恵 「蛍光標識 β -actin mRNA の細胞内輸送と局在のイメージング」 日本生物物理学会第 40 回年会 (2002)

白崎善隆、真一弘士、田代浩一、池田晋吾、関口哲史、庄子習一、月田承一郎、船津高志 「熱感受性ハイドロゲルを用いた生体分子ソーターの開発」 日本生物物理学会第 40 回年会 (2002)

刈間理介、東條正、灰野誠、船津高志、松島綱治 「全反射レーザー顕微鏡 (エバネッセント顕微鏡) による LPS の細胞膜における分子挙動の観察」 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会 (2002)

東條正、青木大輔、木脇圭一、シルヴィア・イスカンダル、多田隈尚史、石渡信一、船津高志 「G 蛋白質共役型受容体・FPR1 は GFP の有無に関わらず多量体形成する：蛍光一分子観察による解析」 第 25 回日本分子生物学会年会 Annual Meeting of MBSJ (2002)

T. Tojo, D. Aoki, K. Kinowaki, S. Iskandar, H. Tadakuma, S. Ishiwata, T. Funatsu. Oligomerization of FPR1, a G-protein-coupled receptor, is independent of ligand binding in living cells; An analysis using single molecule imaging techniques. Biophysical Society 47th Annual Meeting in San Antonio, Texas, USA (2003)

T. Zako, R. Iizuka, M. Okochi, T. Ueno, M. Yohda, T. Funatsu. Fluorescence detection and kinetic analysis of interaction between Pyrococcus prefoldin and substrate protein. Biophysical Society 47th Annual Meeting in USA (2003)

H. Tadakuma, T. Shibuya, Y. Ishihama, T. Tani, T. Funatsu. Imaging of Single mRNA Molecules Moving within a Nucleus of Living Cells Biophysical Society 47th Annual Meeting in USA (2003)

T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu. Nucleotide state in ATP hydrolysis cycle of GroEL. Biophysical Society 47th Annual Meeting in USA (2003)

木脇圭一、東條正、シルヴィア・イスカンダル、青木大輔、多田隈尚史、船津高志 多量体形成は走化性因子受容体に共通する特性である～1 分子蛍光イメージングによる研究～ 第 56 回日本細胞生物学会大会 2003 年 5 月 14 日～16 日 滋賀県大津市ピアザ 淡海滋賀県立県民交流センター

座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志 「蛍光顕微鏡を用いた古細菌由来プレフォルディンと、基質タンパク質、シャペロニンとの相互作用について」 日本蛋白質科学会第 3 回年会 2003 年 6 月 23 日～25 日 北海道札幌市札幌コンベンションセンター

上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志 「FRET による GroEL 内部での基質タンパク質の運動解析」 日本生物物理学会第 41 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

開田奈津来、座古保、船津高志 「プロリン変異体を用いた GFP フォールディングの解析」 日本生物物理学会第 41 回年会 2003 年 9 月 23 日 (火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

細野和彦、上野太郎、座古保、田口英樹、吉田賢右、船津高志「GroEL 変異体 AEX のキャラクター化」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志「蛍光顕微鏡を用いた、高熱菌由来プレフォルディンと基質タンパク質の相互作用解析」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

IskanderSilvia、木脇圭一、青木大輔、東條正、多田隈尚史、船津高志「ケモカイン受容体 CXCR4 はリガンド非依存的に多量体を形成する」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

亀井保博、渡邊建二郎、船津高志、田口隆久、弓場俊輔「遺伝子発現用赤外レーザ顕微鏡の開発」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

石浜陽、多田隈尚史、谷時雄、船津高志「多波長蛍光同時計測による mRNA スプライシング反応の可視化」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

鞍馬秀輝、貴家康尋、多田隈尚史、永川豊広、船津高志、原田慶恵「 β -actin mRNA の細胞内輸送と局在のイメージング」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

奥村政章、多田隈尚史、石浜陽、船津高志「量子ドットを用いた mRNA 核外輸送の分子蛍光リアルタイムイメージング」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

寺田尚史、奥村政章、河内康明、山口淳一、花木賢一、山本健二、船津高志「半導体ナノ粒子のブリッキングを制御する」日本生物物理学会第41回年会 2003年9月23日(火) 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

Hosono, K., T.Ueno, H. Taguchi, F. Motojima, T. Zako, M. Yoshida, and T. Funatsu 2003 "Conformational Change of GroEL studied by Tyrosine Fluorescence" The Fourth East Asian Biophysics Symposium (EABS) November 3-6, 2003. Grand Hotel, Taipei, Taiwan

Kinowaki, K., S. Iskandar, T. Tojo, D. Aoki, H. Tadakuma, and T. Funatsu 2003 "Single molecule imaging reveals oligomerization of chemoattractant receptors PI01" The Fourth East Asian Biophysics Symposium (EABS) November 3-6, 2003. Grand Hotel, Taipei, Taiwan

柳原 直紀、多田隈 尚史、石浜 陽、船津 高志「アンチセンス oligoDNA の結合を指標とした GFPmRNA の2次構造解析」第6回日本 RNA 学会年会 2004年8月4日～6日 熊本テルサ

柳原直紀、多田隈尚史、石浜陽、船津高志「アンチセンス oligoDNA の結合を指標とした GF-PmRNA の2次構造解析」日本生物物理学会第42回年回 2004年12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館

永川豊広、鞍馬秀輝、貴家康尋、原田慶恵、船津高志「 β -actin mRNA と zipcode-binding protein 1 の結合・解離のキネティクス」日本生物物理学会第42回年回 2004年

12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館

石浜陽、多田隈尚史、谷時雄、船津高志 「mRNA スプライシング反応の1分子蛍光顕微分光観察」 日本生物物理学会第42回年回 2004年12月13日(月)～15日(水) 京都 国立京都国際会館

斉藤智、岸元愛子、上野太郎、船津高志、田口英樹 「全反射顕微鏡による酵母ブリオン線維の1分子イメージング」 第5回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場、2005年6月30日～7月2日

三浦貴宏、鈴木深保子、上野太郎、座古 保、船津高志「シャペロニン GroEL のC末端部位の機能解析」 第18回バイオメディカル分析科学シンポジウム グランシップ・静岡県コンベンションセンター 2005年8月5日～7日

Y. Ishihama, H. Tadakuma, T. Tani, and T. Funatsu “Single Molecule Imaging of mRNA Splicing” 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (32nd Symposium on Nucleic Acids Chemistry in Japan) 九州大学 2005年9月20日～22日

K. Okabe, H. Ikeda, Y. Harada, and T. Funatsu “Development of Real time Imaging of Specific Messenger RNA in a Living Cell Using Artificial Antisense nucleic Acids” 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (32nd Symposium on Nucleic Acids Chemistry in Japan) 九州大学 2005年9月20日～22日

山岸舞、貴家康尋、寺田佳代子、原田慶恵、船津高志「mRNAの細胞内ラベリングと運動解析」日本生物物理学会第43回年会 札幌コンベンションセンター 2005年11月23～25日

岡部弘基、池田壽文、原田慶恵、船津高志「人口核酸を用いた生きた細胞内における特定のmRNAのリアルタイムイメージング」日本生物物理学会第43回年会 札幌コンベンションセンター 2005年11月23～25日

岡谷実季、山岸舞、上野太郎、船津高志「完全無細胞翻訳系を用いたアクチンフィラメントの作成」日本生物物理学会第43回年会 札幌コンベンションセンター 2005年11月23～25日

坂本明彦、渡辺隆文、山岸舞、会沢洋一、加藤尚志、船津高志「ピューロマイシン類似体を用いたトロンボポエチンのC末端蛍光標識と1分子イメージングへの応用」日本生物物理学会第43回年会 札幌コンベンションセンター 2005年11月23～25日

Y. Ishihama, H. Tadakuma, T. Tani, T. Funatsu “Single Molecule Imaging of mRNA Splicing” Biophysical Society Annual Meeting 2006, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA, February 18-22

K. Okabe, Y. Harada, T. Funatsu “Real Time Imaging of Specific Messenger RNA in a Living Cell Using Artificial Nucleic Acids” Biophysical Society Annual Meeting 2006, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA, February 18-22

Takashi Funatsu “GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism” 2006 Gordon Research Conference on Single Molecule Approaches to Biology, Colby-Sawyer college, New London, NH, USA, 18-23 June 2006

坂本明彦、船津高志 “In Vitro Translation of Thrombopoietin Labeled with Fluorescent Puromycin at the C-terminus” 第20回国際生化学・分子生物学会議兼第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議 京都市国立京都国際会館 2006年6月18日～23日

T. Samesima, Y. Sato, T. Ueno, T. Arakawa, Y. Shirasaki, S. Shoji, T. Funatsu. "Development of a single molecule fluorescence microscope with rapid solution switching system using microfabrication technique" Fifth East Asia Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. November 12-16, 2006, Okinawa Convention Center

N. Terada, T. Shimozaawa, S. Ishiwata, T. Funatsu. "Size distribution of actin oligomers in physiological actin solutions analyzed by photon counting histogram" Fifth East Asia Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. November 12-16, 2006, Okinawa Convention Center

Y. Ishihama, H. Tadakuma, T. Tani, T. Funatsu. "Dissociation of pre-mRNA from nuclear speckle domain is ATP dependent process" Fifth East Asia Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. November 12-16, 2006, Okinawa Convention Center

K. Okabe, Y. Harada, T. Funatsu. "Real time imaging of specific messenger RNA in a living cell using artificial nucleic acids" Fifth East Asia Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. November 12-16, 2006, Okinawa Convention Center

Y. Ishihama, H. Tadakuma, T. Tani, T. Funatsu. "The dynamics of pre-mRNAs at the speckles in living cells revealed by iFRAP studies" 51st Annual Meeting of Biophysical Society. March 3-7, 2007, Baltimore, MD, USA

K. Okabe, Y. Harada, T. Funatsu. "Real time imaging of specific messenger RNA in a living cell using artificial nucleic acids" 51st Annual Meeting of Biophysical Society, March 3-7, 2007, Baltimore, MD, USA

(吉田グループ)

①招待、口頭講演 (国内 7 件、海外 7 件)

②ポスター発表 (国内 25 件、海外 12 件)

①招待、口頭講演

Yoshida K. Forensic aspects and molecular pathology of ischemic heart disease. 第3回台湾法医学会, 2002; 特別講演. 台北.

Yoshida K. Forensic aspects and molecular pathology of ischemic heart disease. Fifth International Symposium on Advance in Legal Medicine (ISALM) Program and abstracts of the 5th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM), 2002; p.49. Takayama.

Uemura K, Yoshida K, Kimura H. The protective effect of carbon monoxide on the ischemia-induced cell death. Fifth International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM). Program and abstracts of the 5th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM), 2002; p.73. Takayama.

Kimura H, Nakajima M, Hatanaka K, Yoshida K. Tumor necrosis factor (TNF)- α up-regulation in infarcted myocardium. Fifth International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM). Program and abstracts of the 5th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM), 2002; p.73. Takayama.

上村公一、水垣真帆、坂 幹樹、吉田謙一. 一酸化炭素の虚血細胞死に対する抑制効果について. 第86次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2002; 56, p.66. 岡山.

上村公一、吉田謙一. 一酸化炭素は虚血細胞死を抑制する. 第2回心血管再生・アポトーシスフォーラム 研究発表資料 2002; p.9. 東京.

星野純尚、中嶋 信、石田 香、上村公一、吉田謙一. ラット心筋梗塞モデルにおける虚血再灌流時の心筋・血管内皮障害に対する一酸化窒素と活性酸素種の関与について. 第71回日本法医学会関東地方会 要旨集, 2002; p.13. 東京.

新谷(石田)香、中嶋信、上村公一、星野純尚、木村博子、吉田謙一. コネキシン43は早期虚血でup-regulateされる. 第87次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2003; 57, p.60 富山.

Yoshida K. A pilot study on investigation of potentially therapeutic deaths in Japan. 18th Annual meeting World Society of Cardio-Thoracic Surgeons-Japan. 2005; Karuizawa

Uemura K, Yoshida K. CO alleviates cyanide-induced mitochondria dysfunction. 第78回日本生化学会大会, 生化学, vol.77, p1077, 神戸

吉田謙一.希土類錯体を用いた時間分析傾向測定法等による脂質過酸化分析法の病態生化学的応用 科学技術振興財団公開シンポジウム「ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ・Nano-Micro Bioanalysis. 2005;東京.

Morimoto K, Uji M, Kimura H, Ohshima T, Matsui T, Kohno T, Takamata A, Yoshida K. Effects of estrogen on insulin resistance in ovariectomized rats. 第83回日本生理学会年次集会, 2006; 前橋.

Uji M, Nagamura R, Kimura H, Yoshida K, Takamata A, Morimoto K. Effects of estrogen on vascular nitric oxide and oxidative stress ovariectomized rats during psychological stress. 第83回日本生理学会年次集会, 2006; 前橋.

木村博子, 吉田謙一, 向田政博, 内田浩二, 松本和子. リポ多糖類(LPS)投与後のラットにおける4-ヒドロキシノネナール(HNE)の検出とその変化. 第15回 内毒素・LPS研究会2006; p.2, 東京.

②ポスター発表

Kimura H, Takagi K, Mukaida M, Matsumoto K. Rapid and simple quantiation of methamphetamine using homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay based on luminescence resonance energy transfer europium to cyanine dye(Cy5). Annales de Toxicologie Analytique, 2002; 14, p.290. Paris.

Sato K, Yamanaka M, Takahashi H, Uchiyama K, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T. "Microchip-Based Immunoassay System for Simultaneous Multianalyte Assay" . HPCE 2002 (15th International Symposium on Microscale Separations and Analysis) Abstracts 2002; p.85. Stockholm.

Kimura H, Murayama T, Mukaida M, Matsumoto K. Rapid and simple quantitation of methamphetamine using homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay by europium and cyanine dye energy. 16th Meeting of the International Association of Forensic Sciences IAFS 2002; p.196. Montpellier.

Uemura K, Yoshida K, Kimura H. The protective effect of carbon monoxide on the ischemia-induced cell death. Fifth International Symposium on Advances in Legal Medicine. Oct. 2002; p.73. Takayama.

Kimura H, Nakajima M, Hatanaka K, Yoshida K. Tumor necrosis factor(TNF)- α up-regulation in infarcted myocardium. Fifth International Symposium on Advances in Legal Medicine. Oct. 2002; p.73. Takayama.

Mukaida M, Kimura H, Murayama T, Matsuzaki Y, Masuda T, Matsumoto K. Simple and sensitive measurement of vincristine concentration in blood by a time-resolved fluoroimmunoassay. Fifth International Symposium on Advances in Legal Medicine. Oct. 2002; p.86. Takayama.

上村公一、木村博子、吉田謙一. 一酸化炭素の虚血細胞死抑制効果について. 第75回日本生化学会大会 生化学, 2002; 74, p.926. 京都.

山中麻帆, 佐藤記一, 森島圭祐, 渡慶次 学, 木村博子, 北森武彦. 「マイクロELISAシステムの開発とマルチチャンネル化」. 第6回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 2002; 福岡.

木村博子, 小林達昌, 高木和子, 向田政博, 松本和子. 時間分解蛍光イムノアッセイによるマウス尿中IV型コラーゲンの微量測定. 日本分析化学会第 51 年会 要旨集, 2002; p.264. 札幌.

Kobayashi M, Kimura H, Liao J, Abe M, Hirose S, Tomino Y. Measurement of mouse urinary type IV collagen using time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA). The 9th Asian Pacific Congress of Nephrology. 2003; Pattaya.

Kimura H, Yoshida K. Ischemic preconditioning attenuates tumor necrosis factor (TNF)- α up-regulation in infarcted myocardium. The 67th Annual Scientific meeting of the Japanese Circulation Society. Circ J, 2003; 67 suppl 1: p.403, Fukuoka.

Yoshida K, Kimura H. Nitric oxide and reactive oxygen species regulates vascular dilatation in ischemia-reperfused rat heart. The 67th Annual Scientific meeting of the Japanese Circulation Society. Circ J, 2003; 67 suppl 1: p.190, Fukuoka.

Uemura K, Yoshida K. Carbon monoxide (CO) protects cardiogenic cells against ischemic death. 第76回日本生化学会大会 生化学, 2003; 75(8), p.807 横浜.

Shintani-Ishida K, Yoshida K. Rapid up-regulation of connexin43 in myocardial ischemia. 第76回日本生化学会大会 生化学, 2003; 75(8), p.880 横浜.

新谷香, 鄧芙蓉, 吉田謙一. 虚血心筋細胞内におけるコネキシン43の代謝動態の解析. 第1回公開シンポジウム CREST 医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製 予稿集, 2003; p.32. 東京.

木村博子, 新谷香, 中嶋信, 吉田謙一, 松本和子. 時間分解蛍光イムノアッセイによるサイトカインの測定—心筋梗塞モデルラットの心筋におけるTNF α のup-regulation. 日本希土類学会 2003; 42: p.178-79, 東京.

木村博子, 新谷香, 中嶋信, 劉爽, 松本和子, 吉田謙一. 早期梗塞心筋におけるTNF α 産生機構と局在について. ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 第1回公開シンポジウム,

2003; 東京.

Uji M, Morimoto K, Nakagawa Y, Hasegawa N, Kimura H, Shintani K, Yoshida K. The effect of estrogen mediated by NO on cardiovascular responses to cage-switch stress in ovariectomized rats. *Jpn J Physiol*, 2004; 54(suppl): S243, Sapporo.

新谷香, 上村公一, 菊地洋介, 吉田謙一. 虚血心筋細胞におけるHemichannelの開口. 第88次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2004; 58: p.58, 旭川.

中嶋信, 池谷博, 坂幹樹, 上村公一, 新谷香, 菊池洋介, 河合格爾, 吉田 謙一. 嬰兒胃内容からの牛乳及び母乳成分の検出. 第88次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2004; 58: p.88, 旭川.

木村博子, 劉爽, 中嶋信, 吉田謙一. リポ多糖投与ラット血中4-Hydroxynonenalの時間分解蛍光イムノアッセイによる測定. 第88次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2004; 58: p.83, 旭川.

野上誠, 星戸智昭, 犬塚紀子, 木村博子, 吉田謙一. ラットミオグロビン静注腎障害におけるニトロチロシンの免疫組織化学及び免疫測定による検討. 第88次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2004; 58: p.56, 旭川.

向田政博, 木村博子, 村山学子, 松崎雄三, 益田倫夫. Euキレート含有ナノ粒子の時間分解蛍光顕微鏡への応用. 日法医誌, 2004; 58: p.88, 旭川.

上村公一, 吉田謙一. Carbon monoxide protects ischemia-induced cell death in H9c2 cells. 第77回日本生化学会大会 生化学, 2004; 76: p.922, 横浜.

新谷香, 吉田謙一. Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. 第77回日本生化学会大会 生化学, 2004; 76: p.1105, 横浜.

木村博子, 新谷香, 劉爽, 松本和子, 吉田謙一. ラット短時間虚血心筋におけるTNF α 生成とミトコンドリア障害. 平成16年度領域会議(研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」)2004; 東京.

劉爽, 木村博子, 中嶋信, 向田政博, 吉田謙一. リポ多糖類(LPS)投与後のラット肝臓における4-ヒドロキシノネナール(HNE)の変化. 第73回日本法医学会関東地方会 講演要旨集, 2004; p.17, 東京

Kimura H, Mukaida M, Matsumoto K. Development of Homogeneous Drug immunoassay using Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET) and its Application to Urine Samples. The International Association of Forensic Toxicology (TIAFT) 2005; p.118, Seoul.

Kimura H, Liu S, Mukaida M, Uchida K, Matsumoto K, Yoshida K. Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynonenal (HNE) through monocyte NADPH oxidase in early endotoxemia. Sixth International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM) 2005; Rechtsmedizin Band15, Heft4: p.331-2, Hamburg.

木村博子, 劉爽, 向田政博, 吉田謙一. リポ多糖類投与後のラット腸管における4-ヒドロキシノネナールの検出とその変化. 日法医誌, 2005; 59: p.62, 高松.

木村博子, 劉爽, 向田政博, 吉田謙一. リポ多糖類投与後のラット腸管における4-ヒドロキシノネナールの検出とその変化. 平成17年度領域会議(研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」)2005; 東京.

吉田謙一, 木村博子, 森本恵子, 内田浩二, 松本和子. 希土類錯体を用いた時間分解蛍光測定法等による脂質過酸化分析法の病態生化学的応用. ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ「Nano-Micro Bioanalysis」第3回公開シンポジウム, 2005; 要旨集: p.17-21, 東京.

Uemura K, Adachi-Akahane S, Yoshida K. Carbon monoxide protects cardiomyogenic H9c2 cells against ischemic death by inhibiting L-type Ca^{2+} channel. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006; Kyoto.

Shintani-Ishida K, Liu S, Yoshida K. Ischemic preconditioning induces GRP78 by generating reactive oxygen species. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006; Kyoto.

Kimura H, Mukaida M, Hashino K, Matsumoto K, Yoshida K. 4-hydroxynonenal(HNE) modifies IgA in rat intestine lipopoly saccharide(LPS) injection. XXth Congress of International Academy of Legal Medicine. 2006; p.354, Budapest.

中村美穂子, 上村公一, 大野博, 劉爽, 吉田謙一. 一酸化炭素による心筋虚血再灌流障害の抑制. 第90次日本法医学会総会 日本法医学雑誌, 2006; 60, p.43, 福岡

木村博子, 向田政博, 野上誠, 吉田謙一. スレプトゾトシン投与初期のラットにおけるニトロチロシンの測定と検出. 第90次日本法医学学会総会 日法医誌, 2006; 60: p.54, 福岡.

(3)特許出願

①国内出願 (5 件)

1. 発明の名称: 希土類蛍光錯体を用いた標識方法と分析検出法
発明者: 松本和子、山口佳則、橋野仁一
出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構
出願日: 平成 16 年 8 月 17 日
出願番号: 2004-237767
2. 発明の名称: 過酸化脂質の測定方法
発明者: 吉田謙一、木村博子、内田浩二、松本和子
出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構
出願日: 平成 16 年 9 月 16 日
出願番号: 2004-269186
3. 発明の名称: 生化学分析用分離媒体
発明者: 増田光俊、岩浦里愛、清水敏美、山口佳則、松本和子
出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構
独立行政法人 産業技術総合研究所
出願日: 平成 17 年 2 月 25 日
出願番号: 2005-52058
4. 発明の名称: 新規な蛍光標識化合物

発明者：松本和子、西岡琢哉、宮部正仁
出願人：独立行政法人 科学技術振興機構
出願日：平成 17 年 8 月 31 日
出願番号：2005-251834

5. 発明の名称：新規な蛍光標識化合物
発明者：西岡琢哉、松本和子、宮部正仁
出願人：独立行政法人 科学技術振興機構
出願日：平成 17 年 8 月 31 日
出願番号：PCT/JP2006/3171

その他 0件

②海外出願 (3 件)

1. 発明の名称：希土類蛍光錯体を用いた標識方法と分析検出法
発明者：松本和子、山口佳則、橋野仁一
出願人：独立行政法人 科学技術振興機構
出願日：
出願番号：PCT/JP2005/015307
2. 発明の名称：過酸化脂質の測定方法
発明者：吉田謙一、木村博子、内田浩二、松本和子
出願人：独立行政法人 科学技術振興機構
出願日：
出願番号：PCT/JP2005/017558
3. 発明の名称：新規な蛍光標識化合物
発明者：西岡琢哉、松本和子、宮部正仁
出願人：独立行政法人 科学技術振興機構
出願日：
出願番号：PCT/JP2006/217189

(4)受賞等

①受賞

平成 15 年日本分析化学会学会賞「希土類錯体ラベル剤を用いる超高感度時間分解蛍光検出法の開発」松本和子

日本分析化学会第 54 年会ポスター賞「希土類錯体を含有するシリカナノ粒子を用いた核酸検出」谷田泰常、西岡琢哉、松本和子

②新聞報道

③その他

(5)その他特記事項

特記すべき事項なし。

6 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成15年 4月2日	研究経過報告会	早稲田大学	8	各研究チームより研究の進捗状況が報告され、結果および今後の研究の進め方について議論を行なった。また、研究代表者より事務連絡も行なわれた。
17年2月17 日	チーム内打ち合わせ	早稲田大学	4	順天堂大学木村博士および共同研究者との研究打ち合わせを行なった。
17年4月1 日	研究経過報告会	早稲田大学	7	進捗状況報告および平成16年度研究成果のまとめのための会議。
17年9月27 日	研究経過報告会	早稲田大学	7	進捗状況報告および中間評価のための成果まとめ
18年3月22 日	研究経過報告会	早稲田大学	7	進捗状況報告およびH17年度成果まとめ

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			