

同時発表：
筑波研究学園都市記者会（資料配布）
文部科学記者会（資料配布）
科学記者会（資料配布）



生命活動や病気に広く関わる補酵素の可視化に世界で初めて成功 ～ガン・肝機能診断や神経疾患メカニズム解明などの研究に大きな武器～

配布日時：平成26年3月20日14時

独立行政法人 物質・材料研究機構

慶應義塾大学

概要

1. 独立行政法人物質・材料研究機構（理事長：潮田資勝）国際ナノアーキテクトニクス研究拠点（拠点長：青野正和）YAMATO-MANA プログラム¹⁾の小松広和研究员と、同じく国際アーキテクトニクス研究拠点（拠点長：青野 正和）の有賀克彦主任研究者・超分子ユニット長らは、慶應義塾大学（清家篤塾長）理工学部生命情報学科の新藤豊特任助教、岡浩太郎教授と共同で、従来困難だった生命活動や病気に広く関わる補酵素²⁾である、細胞内のニコチンアデニンジヌクレオチド誘導体(NAD(P)H)³⁾を可視化イメージングする方法を世界で初めて開発した。

2. 細胞内の物質に蛍光物質を結合させ、識別、可視化する蛍光イメージング法は、生命現象を探る上で、優れた手法である。しかし、蛍光イメージングはある程度以上に複雑な分子の検出、測定ができず、また、ノーベル賞受賞で有名になった緑色蛍光タンパク質(GFP)をセンサーとして用いる方法では、細胞内に特別な遺伝子を導入させる必要があるため、広く一般の細胞で用いることはできなかった。

そんな中、多くの生命現象や疾患に普遍的に関わる NAD(P)H という物質を可視化できる蛍光イメージングは、生命科学の発展のためとても重要な技術として望まれていたが、NAD(P)H は蛍光物質との反応性が低く、開発が困難だった。

3. 今回、NAD(P)H と特異的に反応する蛍光プローブ⁴⁾を新規に開発すると共に、この反応性を促進することができる「人工プロモータ⁵⁾」を組み合わせるというアイデアにより、世界で初めて NAD(P)H の蛍光イメージングに成功した。

4. NADH のイメージング法の開発により、湿潤がんからの NADH の漏れ出しの検出によるがんの早期発見や治療支援、アルコール性肝障害において NADH が過剰になるような肝機能の診断、アルツハイマー、うつ病、パーキンソン病などの脳、神経に関する疾患における NADH の欠乏の症状の解明などの応用が期待されるばかりか、生命科学分野の研究を進める上で大きな武器となることが見込まれる。

5. 本研究成果は、ドイツ化学会誌「Angewandte Chemie International Edition」に掲載される。

研究の背景

蛍光プローブ（蛍光を発し、目印として使える物質）を用いた蛍光イメージング法は、細胞内の物質の動きを蛍光によって追跡することできる優れた手法であり、高速、簡便、高感度であることから生物学、医学分野で広く用いられている。カルシウムイオンなどの低分子を測定する機能性蛍光プローブは多数知られており、また近年ではノーベル賞受賞で有名になった緑色蛍光たんぱく質（GFP）を用いた機能性センサーたんぱく質が注目を集めている。しかしながら、機能性蛍光プローブはある程度以上の複雑な分子を認識・測定することが難しく、また GFP は特別な遺伝子を細胞に導入することができる場合しか使えないため、広く一般の細胞には簡単に適応できない。

細胞のさまざまな活動に関与する重要な生体内物質に NADH と NADPH（ここでは NAD(P)H と総称する）という物質がある。細胞内において NAD(P)H は電子伝達体として、呼吸や光合成など、細胞内のエネルギー反応に関わっており、呼吸反応の一部である TCA サイクルにおいて1サイクルで3分子産生される。また、NAD(P)H はさまざまな疾患疾病に関連する物質でもあり、湿潤がんからの NADH の漏れ出しや、アルコール性肝障害では NADH の過剰が起こるとされ、また、アルツハイマー、うつ病、パーキンソン病では、その治療に NADH を投与する場合がある。このように、NAD(P)H は生命活動や病気に広く深く関わる普遍的な物質である。

そこで、細胞内の NAD(P)H を可視化できれば、がんや肝障害の診断や治療支援、神経疾患の症状解明などへの応用の他、生命現象や疾患の重要な研究を大きく前進させると期待されてきた。しかしながら、これを可能にする低分子蛍光プローブはこれまでに開発されてこなかった。細胞内の通常の NAD(P)H は蛍光プローブとの反応性が低く、NAD(P)H を十分に検出できるプローブの開発が困難だったことが理由である。

研究の成果

今回、我々は、新しい蛍光プローブを開発したことと、さらに人工プロモータという NAD(P)H の反応を加速させる物質を組み合わせる斬新なアイデアによって、人工的な小分子のみを用いて、普遍物質 NAD(P)H を蛍光で可視化し細胞内でイメージングすることに世界で初めて成功した。

具体的には、蛍光プローブとしては適切なユビキノン誘導体を、また人工プロモータにはイリジウム錯体[®]誘導体を用いる。これらの添加薬を用いると、細胞内の NAD(P)H を活性化することができ、それを蛍光イメージングによって検出できる。ユビキノンをを用いたのは、誘導体蛍光プローブとして、その酸化還元特性が NAD(P)H のものとよく合い、特異的に反応をおこせるからである。さらに、他の発色物質に影響されないような長波長の蛍光団であるロドールを組み合わせることを考案し、新規蛍光プローブ UQ-Rh を設計・合成開発した（図1）。

本研究の原理を簡単に説明すると、次のようになる。NAD(P)H は人工プロモータであるイリジウム錯体と反応してこれを活性化する。人工プロモータが活性化されると、NAD(P)H と蛍光プローブ UQ-Rh の反応を次々に進め、このプローブの蛍光強度を顕著に下げていく。（今回の方法では、蛍光強度の減少分をイメージとして検出する。）この場合、ひとつの NAD(P)H が何倍もの効果を生むことになるので、検出感度が非常に高くなる。結果として、NAD(P)H そのものの蛍光を頼りに分析した従来法に比べて、感度が一桁以上高くなる。さらに、従来法では有害な紫外光を検出に用いていたが、新たに開発された方法ではより安全な可視光を用いて測定できるという利点もある。

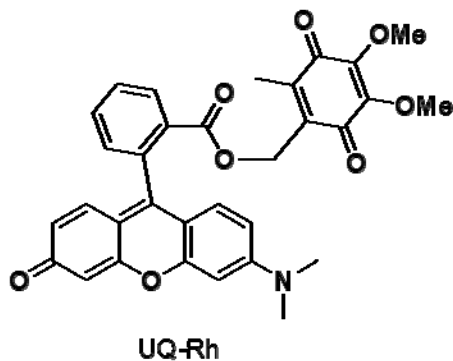


図1 新規蛍光プローブ UQ-Rh の分子構造

まず、今回開発した蛍光プローブ UQ-Rh と人工プロモータのイリジウム錯体の組み合わせにより、生体外の試験管内でも効果的に NAD(P)H を測定することが可能であることを確かめた。これにより、本方法は生体外における NAD(P)H を分析する手法として有用であることが示された。

次に、実際の生体系での有用性を検証するために、ヒト由来の培養がん細胞である HeLa 細胞⁷⁾ に蛍光プローブ UQ-Rh を導入し、人工プロモータであるイリジウム錯体を加えることで、図2に示したように NAD(P)H の蛍光イメージを得ることができた。人工プロモータのイリジウム錯体の添加によって、図3に示すように細胞内の蛍光強度は10分ほどで一桁近くその強度が減少し、鋭敏に NADPH の存在をイメージングできることがわかった。このことから、生体細胞内においても、NAD(P)H の活性化がなされており、蛍光プローブによってそれが検出できていることが確かめられた。これは、低分子蛍光プローブによる NAD(P)H の世界で初めてのイメージングの成功例である。

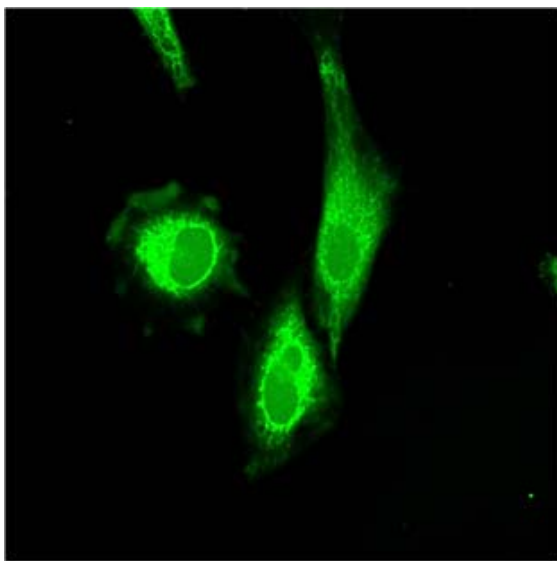


図2 HeLa 細胞の蛍光イメージング

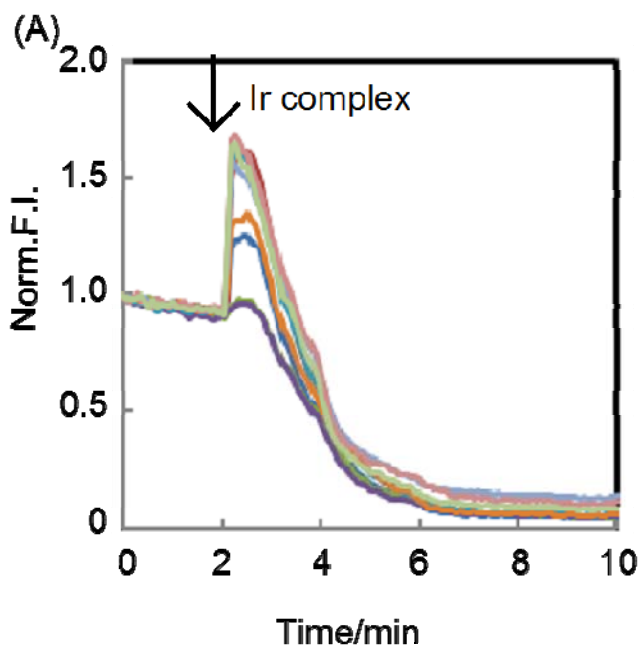


図3 UQ-Rh のイリジウム錯体添加時の細胞内蛍光応答 (時間とともに傾向強度が減少する)

波及効果と今後の展開

本研究でイメージングのターゲットとした NAD(P)H はさまざまな生体プロセスに関与する物質であり、その動態を見ただけで解析できることはさまざまな細胞活動を詳細に検討する糸口を与えることになる。この補酵素分子 NAD(P)H の生体における普遍性を考えると、本研究で開発した蛍光プローブとプロモータを組み合わせる手法は、広い範囲の医学・生理学・生物学分野に波及すると期待できる。具体的な病理の解明に際しても、湿潤がんからの NADH の漏れ出しの検出によるがんの早期発見や治療支援、アルコール性肝障害において NADH が過剰になるような肝機能の診断、アルツハイマー、うつ病、パーキンソン病などの脳、神経に関する疾患における NADH の欠乏の症状の解明などの応用が期待できる。

さらに、今回の成果は、人工プロモータによって細胞内物質を活性化させ検出するという、一般の生化学やその分析分野における新規な方法論ともいえる。そのため、応用分野に限らず、基礎的な研究分野にも有用な手法として用いられるものと期待でき、今後の研究の発展に広く貢献する大きな武器になると考えられる。

備考

本研究は、文部科学省 WPI プログラム、Yamato-MANA プログラムの援助を受けて行われました。

掲載論文

題目：“Ubiquinone-rhodol (UQ-Rh) for Fluorescence Imaging of NAD(P)H through Intracellular Activation”

著者：Hirokazu Komatsu, Yutaka Shindo, Kotaro Oka, Jonathan P. Hill, Katsuhiko Ariga

雑誌：Angewandte Chemie International Edition (巻、号、ページ数未定)

用語解説

1) YAMATO-MANA プログラム

物質・材料研究機構の世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA) が、2013 年度に発足した Young, Aspiring Motherland Academics TO MANA (YAMATO-MANA) プログラム。本プログラムは、優秀な日本人若手研究者をリクルートして国際的で先進的な研究環境下で育成し、日本の将来を担う人材を生み出していくことを目標としている。

2) 補酵素

補酵素は、酵素反応の化学物質の授受に機能する低分子量の有機化合物である。補酵素の多くはビタミンとして知られており、生物の生育に関する必須成分 (栄養素) として良く知られている。

3) NAD(P)H

ニコチンアデニンジヌクレオチド誘導体である NADH, そのリン酸化体である NADPH の総称。それらは生体内で補酵素としてさまざまな反応に関与している。

4) 蛍光プローブ

特定の分子と反応すると分子構造が変化して、傾向強度の変化がおきたり、蛍光の色調が変化したりする、機能性分子の総称。がん細胞のみを選択的に発光させたり、生体分子の状態や機能を生きている状態で可視化したりすることが可能となる。

5) 人工プロモータ

細胞内の分子を触媒様機構によって活性化し、ある細胞内反応の速度を変化させる人工物質の総称。

6) イリジウム錯体

イリジウムを中心金属として有する、配位結合と共有結合からなる錯体。りん光材料として光触媒・生体センサー材料としても期待されている。ここでは人工プロモータとして用いた。

7) HeLa 細胞

HeLa 細胞（ヒーラさいぼう）は、ヒト由来の最初の培養がん細胞株。試験管内で細胞を用いる試験や研究に幅広く用いられている。1951年に子宮頸癌で亡くなった30代黒人女性の腫瘍病変から分離され、株化された。この細胞の名称は、原患者氏名ヘンリエッタ・ラックスにちなんで命名されたものである。

本件に関するお問い合わせ先

（研究内容に関すること）

独立行政法人物質・材料研究機構

国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA)

Yamato プログラム研究員 小松 広和

E-mail: KOMATSU.Hirokazu@nims.go.jp

TEL: 029-860-4832

慶應義塾大学理工学部生命情報学科

特任助教 新藤豊

E-mail: shindoh@bpni.bio.keio.ac.jp

TEL: 045-563-1141 内線 48333

（報道担当）

独立行政法人物質・材料研究機構 企画部門 広報室

〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1

TEL: 029-859-2026

FAX: 029-859-2017

慶應義塾大学 広報室

〒108-8345 東京都港区三田 2-15-45

TEL : 03-5427-1541

FAX : 03-5441-7640