

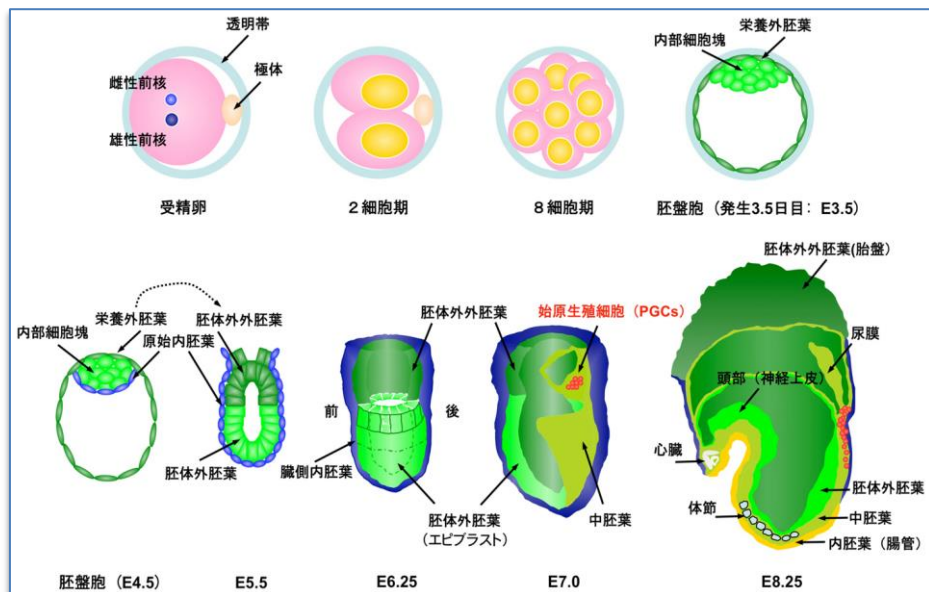
## 生殖細胞の発生機構の解明とその試験管内再構成

京都大学大学院医学研究科 斎藤通紀

【はじめに】 我々ヒトを含む多細胞生物の体を構成する細胞は大きく体細胞と生殖細胞に分けられます。体細胞とは、皮膚や神経、血液、筋肉、骨、腸や肝臓の細胞などのことで、個体の生命活動の維持に必須な細胞のことです。一方生殖細胞とは、精子や卵子など、個体の生命活動には必ずしも必要ではありませんが、次の世代をつくるのに必須な細胞です。体細胞がその世代限りでその使命を終わらせてしまうのに対し、生殖細胞は次の世代を、さらにはその次の世代をと、いわば果てしなく新しい生命を産み出す能力を有しています。実際、地球上には多種多様な生物が生命活動を繰り返していますが、その多くは生殖細胞を介して種の存続を行っていますし、種の進化も生殖細胞を介した遺伝子変異によって起こってきました。私は、どうして生殖細胞だけが新しい個体を産み出せるのか、ということに興味を持って、生殖細胞の研究を行うことにしました。生殖細胞の獲得する特性を理解すれば、細胞の増殖や分化、老化といった現象の制御にもつながると考えました。

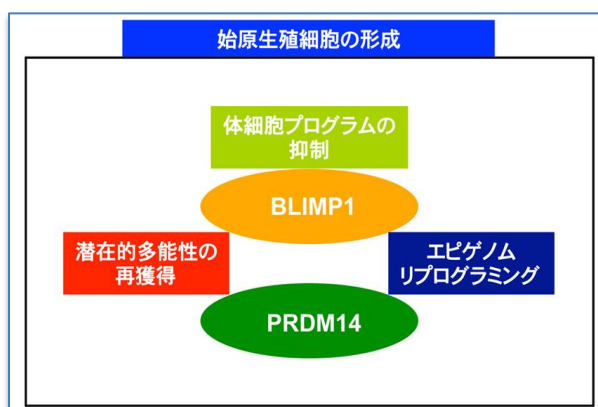
【個体の発生と生殖細胞の発生】 生殖細胞の持つユニークな能力を解明するためには、生殖細胞の発生機構を解明することが重要だと考えられます。私は哺乳類のモデル動物として最もよく使用されているマウスを用いて研究を行ってきました。マウスの発生は、マウスの精子と卵子（精子と卵子は最も高度に分化した生殖細胞です）が受精することによって始まります。精子は父由来の遺伝子を1対、卵子は母由来の遺伝子を1対持っており、それらが合わさって、新しい受精卵（接合子）が形成されます。受精卵は卵割（分裂）を繰り返し、マウスの場合、発生3.5日目には胚盤胞と呼ばれる構造を形成します。その後、複雑な過程を経て、胚盤胞の中の内部細胞塊という構造から、胚体外胚葉（エピブラスト）という一層の上皮構造が形成されます。胚体外胚葉は、原始内胚葉、胚体外外胚葉という細胞層に囲まれます。原始内胚葉と胚体外外胚葉からの誘導シグナルを受けて、胚体外胚葉から全ての体細胞と新しい世代の生殖細胞が形成されます。発生7日目頃、

発生途上の胚の中で形成され、将来精子や卵子に分化する能力を有した細胞のことを始原生殖細胞 (Primordial germ cells: PGCs) と呼びます。始原生殖細胞は、



まだ精巣や卵巣が形成される以前に胚の後部で形成され、その後、1つずつ、発生途上の胚の腸管を通して前方に移動し、発生 10 日目頃に精巣や卵巣のもととなる組織（生殖巣）の中に入っていきます。生殖巣はやがて精巣や卵巣への分化を開始し、その中で始原生殖細胞も精子や卵子への分化を始めます。すなわち精巣や卵巣は、始原生殖細胞が精子や卵子に分化・成熟するのを助ける体細胞が集まった器官だと言えます。精巣や卵巣、精子や卵子の分化・成熟は生後にも続きます。

【始原生殖細胞の形成機構の解明】我々は、始原生殖細胞の形成機構を解明するため、形成直後の始原生殖細胞で機能する遺伝子を探索する研究を行い、その結果、*fragilis*, *stella*, *Blimp1*, *Prdm14* といった遺伝子を同定しました。特に、*Blimp1* と *Prdm14* は始原生殖細胞の運命決定に決定的な役割を果たす転写制御因子であることを証明しました。転写制御因子とは、多くの遺伝子の発現を転写レベル（DNA から RNA を作ること）で制御し、細胞の性質を決定づける役割を果たす遺伝子のことです。この研究の結果、始原生殖細胞が決定される際には、体細胞へと分化するプログラムが抑えられ、潜在的な多能性（あらゆる細胞に分化する能力）を維持する遺伝子発現が回復し、その後、エピゲノムリプログラミングと呼ばれる現象が起こることがわかりました。エピゲノム情報とは、全遺伝子の使われ方を制御する、遺伝情報よりもさらに上 (Epi: エピ) の情報のことで、単一の受精卵に由来する体細胞はほとんどすべて同じ遺伝情報を有していますが、このエピゲノム情報が異なるために、使われる遺伝子が異なり、その結果、異なる機能を発揮します。エピゲノムリプログラミングとは、そのエピゲノム情報が再編されることで、その結果、生殖細胞へと分化する細胞は、次の世代を形成する能力を獲得することが出来ると考えられます。生殖細胞の研究がさらに進めば、細胞のエピゲノム状態を適切に制御し、細胞の増殖や分化をより良く制御する技術の開発につながると期待されます。



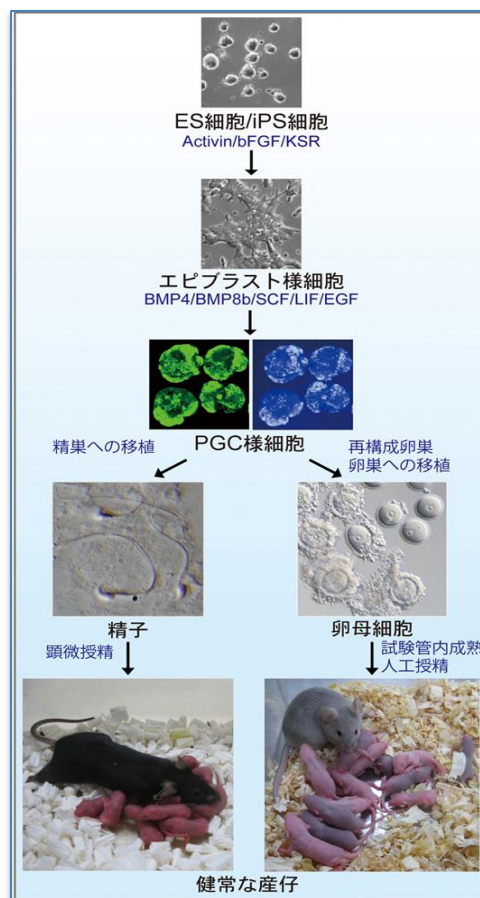
我々は、次に始原生殖細胞がどのようなメカニズムによって胚体外胚葉内に誘導されるのかを解明する研究を行いました。BMP4, WNT3 と呼ばれるサイトカイン（細胞外に分泌され、他の細胞の機能や運命決定を制御する因子）が *Blimp1* や *Prdm14* の発現を胚体外胚葉内に誘導し、その結果、始原生殖細胞が形成されることがわかりました。また、発生 6 日目の胚体外胚葉を培養ディッシュ上に取り出し、BMP4 を含む数種のサイトカインとともに培養すると、そのほとんどが *Blimp1* や *Prdm14* を発現し、それらの細胞はその後数日で始原生殖細胞様細胞に分化することがわかりました。重要なことに、これら始原生殖細胞様細胞を、遺伝子の異常により生殖細胞を欠損するマウス (*W/W<sup>o</sup>* マウス: *Kit* 遺伝子の変異マウス) の新生仔精巣に移植すると、精子形成が誘導され、それら精子は、正常な卵子と顕微授精すると健全な子孫へと発生しました。これらの結果から始原生殖細胞の誘導機構が大筋で明らかになりました。また、これらの結果は、培養ディッシュ上（試験管内）で、胚性幹細胞（embryonic stem cells: ESCs, ES 細胞）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPSCs, iPS 細胞）などの多能性幹細胞から始

原生殖細胞様細胞を誘導するためには、まず胚体外胚葉（エピブラスト）様細胞を誘導し、次にそれらから始原生殖細胞様細胞を誘導すればよいことを示唆しています。

【多能性幹細胞からの生殖細胞の誘導】 こうした結果に基づき、我々は、次に ES 細胞から始原生殖細胞様細胞を誘導する研究を行いました。そのために、我々はまず ES 細胞を胚体外胚葉様細胞（epiblast-like cells: EpiLCs, エピブラスト様細胞）に誘導する条件を検討しました。様々な条件を検討した結果、ES 細胞を、ActA, bFGF と呼ばれるサイトカインなどで 2 日程刺激すると、胚体外胚葉に類似した上皮様の細胞、エピブラスト様細胞に分化することがわかりました。ES 細胞からエピブラスト様細胞が誘導される過程に伴う遺伝子発現を検討した結果、胚体外胚葉分化に伴う遺伝子発現と非常によく類似した遺伝子発現変化を示すことがわかりました。これらの結果は、ES 細胞からエピブラスト様細胞への分化過程が、生体内における胚体外胚葉の分化過程を再現していることを示唆しています。

我々は、エピブラスト様細胞から始原生殖細胞様細胞の誘導を試みました。誘導方法は、マウスの胚から単離した胚体外胚葉を始原生殖細胞様細胞に誘導した方法と同じ方法を用いました。その結果、誘導 2 日目でそのほとんどが *Blimp1* や *Prdm14* を発現し、それらの細胞はその後数日で始原生殖細胞様細胞 (PGC-like cells: PGCLCs, PGC 様細胞) に分化することがわかりました。エピブラスト様細胞から PGC 様細胞の誘導過程に伴う遺伝子発現変化は、胚体外胚葉から始原生殖細胞が誘導される際の遺伝子発現変化とそっくりでした。そこで、PGC 様細胞を、生殖細胞を欠損するマウスの新生仔精巣に移植したところ、精子形成が誘導され、それら精子は、正常な卵子と顕微授精することにより健全な子孫へと発生しました。エピブラスト様細胞を介して PGC 様細胞を誘導する系は異なる ES 細胞株、さらには iPS 細胞株を用いても再現され、iPS 細胞から誘導した PGC 様細胞も健全な精子、さらには子孫へと貢献しました。

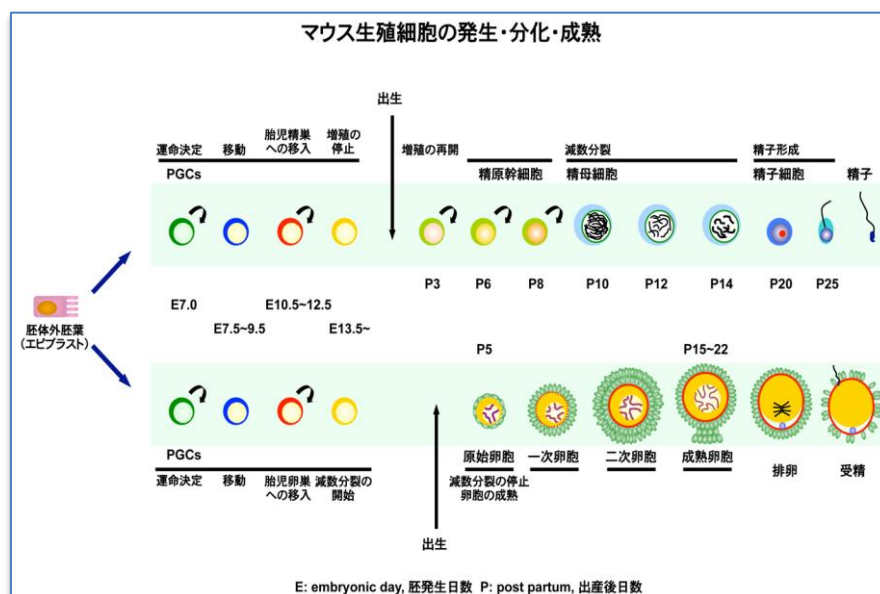
始原生殖細胞は精子に分化する能力とともに卵子に分化する能力も有しています。そこで、我々は、次に、PGC 様細胞から卵子を誘導することが出来るかを検証しました。メスの ES 細胞を PGC 様細胞へと誘導し、それらを胎児卵巣由来の体細胞と凝集培養しました。するとそれらは胎児の卵巣とそっくりの細胞凝集塊（再構成卵巣）を形成し、その中で PGC 様細胞は卵子への分化を開始することがわかりました。再構成卵巣内での卵子様細胞の分化・成熟をさらに促進するために、再構成卵巣をマウス卵巣被膜下に移植すると、再構成卵巣内で PGC 様細胞は成熟卵子に分化し、それら卵子は、培養ディッシュに取り出し、試験管内受精 (In vitro fertilization: IVF) することで健全なマウスに寄与しました。



以上の事実から、我々は、多能性幹細胞を起点として、生殖細胞形成過程を試験管内で再現する系の開発に成功した、と考えられます。これらの成果は、これまで不可能だった始原生殖細胞の大量誘導（ $\sim 10^6$ ）とその過程の詳細な解析を可能とし、また培養ディッシュ上で生殖細胞の全発生過程を再現する基盤を築く成果です。この成果に基づき、最近我々は、*Blimp1* や *Prdm14* などの転写制御因子を用いて PGC 様細胞をさらに高い効率で誘導し、それらから健常な精子や子孫を作製することにも成功しています。また始原生殖細胞の形成機構のさらに詳細な解明や、始原生殖細胞内でのエピゲノムプログラミングの本態の解明も進行中です。

**【今後の展望】** 我々が培養ディッシュ上で再現出来た過程は生殖細胞発生過程のまだまだ一部で、生殖細胞の全発生過程を培養ディッシュ上で再現するには、生殖細胞の発生・分化・成熟機構や精巣や卵巣の発生機構を今後さらに研究する必要があります。始原生殖細胞のエピゲノムプログラミング誘導機構や増殖制御機構の解明が進めば、様々な体細胞の増殖・分化制御法の開発、その医療応用にもつながると期待されます。

また、我々のこれまでの研究はマウスを用いた研究でしたが、ヒト多能性幹細胞を起点としてヒト生殖細胞の発生過程を培養ディッシュ上で再現出来れば、生殖細胞の機能異常に由来する不妊の原因解明やそれに基づく治療法の開発につながります。



しかし一方でそうした研究は培養ディッシュ上で人為的に作成された生殖細胞を用いてヒト産仔を得ることを目的とする再生医療の可能性を開くと考えられます（現在文部科学省の指針により多能性幹細胞由来の生殖細胞を用いたヒト胚の作成は禁じられています）。生殖細胞研究に関わる研究者は、その研究目的・成果を広く社会に周知し議論するとともに、高い研究レベルは当然のこと、高い倫理観を有する必要があると考えています。

## 用語集

### 始原生殖細胞：

全ての卵子もしくは精子の源となる細胞。発生の初期、マウスの場合は胚齢 6.5 日前後に分化する。発生初期は少数の細胞集団であり、その発生様式に性差はないが、胚齢 12 日目前後に体細胞の性によって、卵子もしくは精子へと分化することが決定される。

### 転写因子：

DNA からメッセンジャーRNA への転写を制御するタンパク質。遺伝子が機能するには、DNA の情報がまずメッセンジャーRNA へと転写され、その後タンパク質へと翻訳される必要がある。このうち転写を制御するのが転写因子であり、発生過程においては様々な転写因子によってゲノムのどの情報を利用するかが規定され、様々な細胞が生まれる。細胞内では多数の転写因子が機能しているが、細胞の種類に応じて、特徴的な転写因子は異なる。なお、特徴的な転写因子を人為的に発現させることにより、細胞の状態を変化させることが示されている。例えば iPS 細胞を樹立する際に用いられる遺伝子も、転写因子に含まれる。

### エピゲノムリプログラミング：

体中のすべての細胞（リンパ球などの例外を除く）は、DNA により規定される同じ遺伝情報を持つが、その中でどの情報が使用されるかが細胞ごとに異なる。どの情報を使用するかを決める情報のことをエピゲノム情報と呼ぶ。エピゲノムリプログラミングとは、エピゲノム情報が書き換えられることをいう。

### サイトカイン：

細胞間で情報を伝達する因子で、多数の種類がある。細胞の分化、形態変化、遊走、成長、増殖などに大きな影響を与える。

### ES 細胞：

胚性幹細胞（Embryonic Stem Cells）のこと。マウスの場合は受精後 3~4 日目の胚盤胞の内部細胞塊から、培養により得られる。体外培養により無限に増殖し、生殖細胞を含むほぼ全ての組織の細胞に分化することができる。

### iPS 細胞：

人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cells）のこと。皮膚などの体細胞に特定の因子を導入することにより作製される。ES 細胞のように、無限に増殖し、生殖細胞を含むほぼ全ての組織に分化することができる。ES 細胞と異なり、あらゆる個体の体細胞から作製が可能であり、自家移植により免疫拒絶を起こさない細胞である。

# 化学プローブのデザイン・合成による分子イメージング

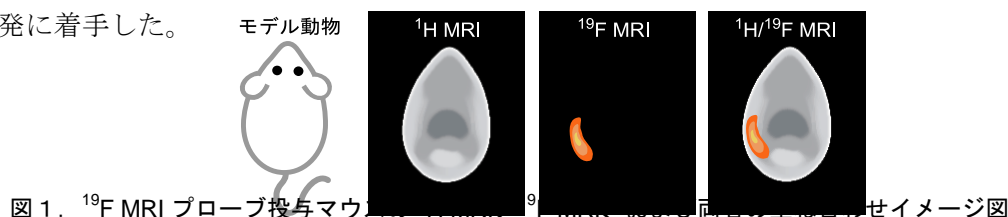
大阪大学大学院工学研究科 菊地和也

【はじめに】 生体分子は、金属イオン、脂質、タンパク質など様々な分子と相互作用しながら機能している。近年、生きた細胞や動物個体内における生体分子の挙動や機能を直接可視化する「分子イメージング」が大きな注目を集めている。小分子蛍光プローブや蛍光タンパク質(FP)などを用いた蛍光イメージングは、医学・生物学の分野で最も広く用いられているイメージング法の一つであり、様々な生命現象の解明に大きく貢献してきた。蛍光タンパク質の発見から応用への功績を称えて、下村、Chalfie、Tsien の三氏に 2008 年度のノーベル化学賞が授与されたのは記憶に新しい。また、蛍光タンパク質の遺伝子を改変し、生理機能を探索する機能性プローブの開発も数多く報告されている。このような機能性蛍光タンパク質プローブは、遺伝子改変により発現の局在制御などが可能であり、大変有用である。その一方で、蛍光タンパク質の発現に関する時間制御は一般的に困難である。また近年、分子イメージングの研究対象は、生細胞のみならず、より真の機能解明が可能な動物個体へも移行しつつあるが、蛍光タンパク質の励起および観測波長領域の光の組織透過性は低く、個体レベルでの解析に適しているとは言えない。

このように、蛍光タンパク質を用いた分子イメージング法にも課題は多く存在し、これらを解決する実験技術の開発が求められている。本日の講演では、演者らの研究室で行っている次世代の分子イメージング法の開発研究について紹介したい。具体的には  $^{19}\text{F}$  MRI を用いた酵素反応の検出とタグ蛋白を用いた蛋白質のラベル化について概説する。

【 $^{19}\text{F}$  MRI を用いた酵素反応の検出】 個体内における酵素機能や遺伝子発現を可視化することを可能とする「MRI による生体シグナル可視化研究」について概説する。蛍光イメージングの短所の一つに、深部への透過性が悪いことが挙げられる。通常の蛍光イメージング実験で用いられる紫外～可視領域の光は、散乱の影響を受けやすく、組織深部までは到達しない。そこで、より組織透過性の高い近赤外蛍光を用いた個体イメージングが注目されている。一方、MRI は、感度や簡便性の面では蛍光イメージングに劣るものの、臨床で利用されているように、生体深部を高解像度で撮像することができる。この理由により、生きた動物個体内における酵素などの生体分子の挙動を MRI で観察する試みが近年注目を集めている。

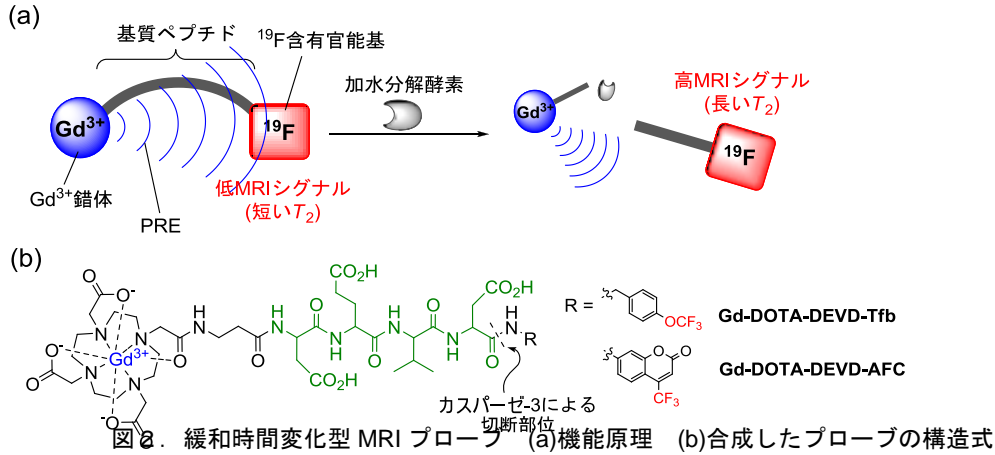
この状況下、演者が注目したのが  $^{19}\text{F}$  MRI である。 $^{19}\text{F}$  は天然存在比率が 100% のフッ素の安定同位体であり、 $^1\text{H}$  に匹敵する高い磁気回転比を持つことから、比較的高感度な NMR 測定が可能な核種である。また、生体内には歯や骨以外にはほとんど存在せず、内在性のバックグラウンドシグナルは全く観察されない。このため、 $^{19}\text{F}$  を含むプローブ化合物を動物に投与し  $^{19}\text{F}$  MRI 測定を行うと、プローブシグナルのみが観察される (図 1)。得られた  $^{19}\text{F}$  MRI 画像を、解剖学的情報を与える  $^1\text{H}$  MRI 断層画像と重ね合わせることで、動物個体内におけるプローブの局在を知ることができる。すなわち、標的酵素の活性を  $^{19}\text{F}$  MRI シグナル変化として検出できれば、生きた動物個体内において、いつ、どこで酵素活性が上昇するかを調べることができる。そこでまず、加水分解酵素活性を  $^{19}\text{F}$  MRI シグナルへと変換する基本原理の開発に着手した。



MRI は、 $x \cdot y \cdot z$  軸のそれぞれに磁場勾配をかけることで NMR シグナルを分離し、三次元画像を構築する撮像法である。NMR シグナル強度に影響を与えるパラメーターに緩和時間がある。緩和時間には、縦緩和時間  $T_1$  および横緩和時間  $T_2$  の 2 種類が存在し、このうち  $T_2$  が短くなると MRI シグナル

は低下する。よって、プローブ化合物の  $T_2$  をあらかじめ短縮させ、それを酵素反応によって延長させることにより、酵素活性を MRI シグナルの増大として検出できることになる。

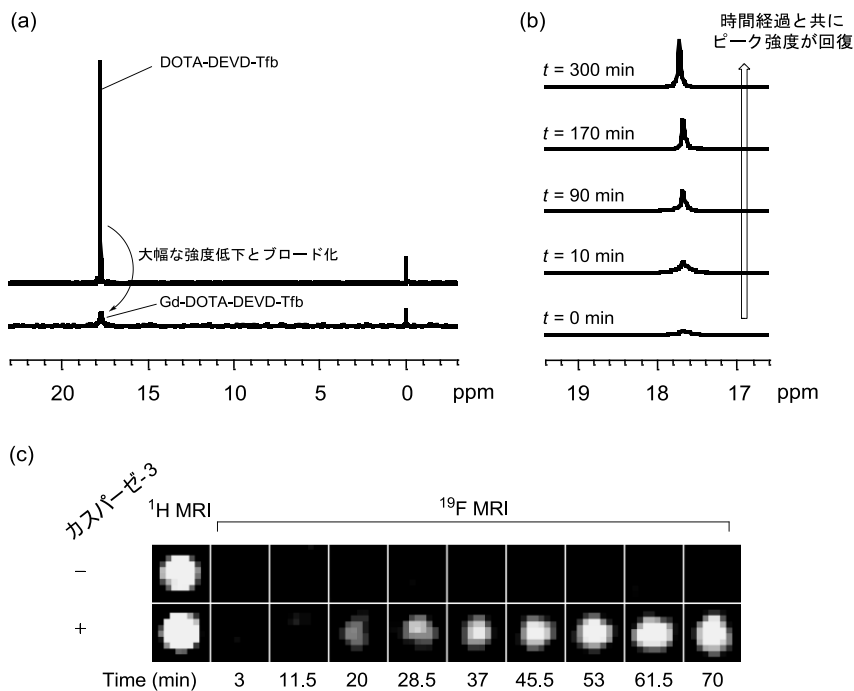
そこで、プローブの  $T_2$  を短縮させるために、常磁性緩和促進 (paramagnetic relaxation enhancement: PRE) に着目した。PRE は常磁性物質が持つ不対電子スピンの影響で、近傍に存在する NMR 観測核の  $T_1$  および  $T_2$  が著しく短縮する現象である。常磁性物質の中でも  $Gd^{3+}$  イオンは 4f 軌道に七つの不対電子を有し、PRE 効果が特に大きい。それゆえ、 $Gd^{3+}$  イオンの近傍にある NMR 観測核の  $T_2$  は大幅に短縮す



ると予想される。そこで、図 2 a に示すプローブの設計原理を考案した。常磁性金属イオンの  $Gd^{3+}$  と NMR 観測核種の  $^{19}F$  を同一分子内に修飾したプローブの  $T_2$  は PRE によって大きく短縮し、MRI シグナルは大きく低下すると予想される。 $Gd^{3+}$  錯体と  $^{19}F$  含有官能基の間のリンカーが、加水分解酵素によって切断されると、短縮していた  $T_2$  が延長し、MRI シグナルが上昇すると考えられる。以上の原理により、加水分解酵素活性を  $^{19}F$  MRI で検出できると考えた。

ターゲット酵素として、アポトーシスに関連するプロテアーゼカスパーゼ-3 を選択した。カスパーゼ-3 は高い基質特異性を有し、ペプチド DEVD の C 末端のペプチド結合を加水分解する。そこで、DEVD を含むペプチドの両端に  $Gd^{3+}$  錯体と  $^{19}F$  含有官能基を修飾した化合物 Gd-DOTA-DEVD-Tfb をデザインし、液相法と固相法を組み合わせることで合成した (図 2 b)。

Gd-DOTA-DEVD-Tfb の  $^{19}F$  NMR スペクトルは、 $Gd^{3+}$  を配位していない DOTA-DEVD-Tfb と比較し

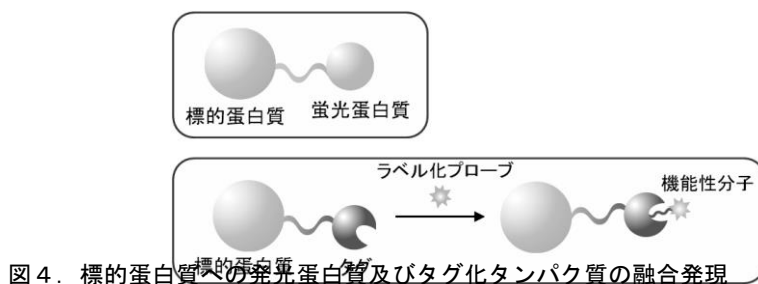


て大幅なブロード化が観測された (図 3 a)。また、横緩和時間  $T_2$  を測定したところ、Gd-DOTA-DEVD-Tfb の  $T_2$  は大幅な短縮のため正確な値の算出はできなかった。次に、Gd-DOTA-DEVD-Tfb を含む緩衝液にカスパーゼ-3 を添加したところ、 $^{19}\text{F}$  NMR ピークは、時間依存的にシャープに変化した (図 3 b)。酵素反応が完了したサンプルでは、 $T_2$  は 32 ms まで延長していた。

続いて、このプローブを用いて、カスパーゼ-3 活性の  $^{19}\text{F}$  MRI 検出を試みた。Gd-DOTA-DEVD-Tfb の  $^{19}\text{F}$  MRI 画像では、シグナルが完全に消失していたが、カスパーゼ-3 の添加後に経時的に増大する結果を得た (図 3 c)。

**【タグ蛋白質と合成基質を用いた、標的蛋白質のラベル化】** ある蛋白質の細胞内局在や挙動を調べるために、蛍光蛋白質(Fluorescent Protein、FP)を標的蛋白質に遺伝子工学的に融合し、蛍光顕微鏡で解析する手法が一般的に用いられている。近年では、蛍光蛋白質の遺伝子を改変し、生理機能を探索する機能性プローブの開発も数多く報告されている。このような機能性 FP プローブは、遺伝子改変により発現の局在制御などが可能であり、大変有用である。このように FP を用いた実験はその幅広い応用性は周知の通りだが、幾つかの課題も存在する。例えば、FP の発現を時間制御することは一般的に困難である。また近年、分子イメージングの研究対象として、生細胞だけでなく動物個体を用いることの重要性が認識されており、組織透過性の高い近赤外領域の蛍光イメージングが注目されているが、そのような近赤外蛍光を発する蛋白質は未だ開発途上にある。

FP の持つ問題点の幾つかを克服する技術として、標的蛋白質を機能性分子で特異的にラベル化する手法が近年注目されている。これまでに様々な手法が報告されており、幾つかの技術は市販されている。その多くはタグと呼ばれるペプチドあるいは蛋白質を標的蛋白質に遺伝子的に融合させ、タグに特異的に結合する機能性分子をラベルする方法である (図 4)。一方、これら既存のラベル化法は、特異性



に問題がある場合や、ラベル化前後でのプローブの蛍光特性が変化しないために未反応のプローブを洗浄で完全に除く必要があるなど、改良の余地はまだ多く残されている。そこで、演者の研究グループでは、より高機能かつ汎用的な蛋白質ラベル化法の開発に取り組んでいるので紹介したい。

汎用性の高い蛋白質ラベル化法において、適切なタグを選ぶ必要がある。タグ分子の選択において重要なポイントは、①内在性でないこと、②内在性基質と反応しないこと、③融合させた標的蛋白質の機能を阻害しないこと、の3つである。まず①、②に関しては、サンプル細胞内にタグと同一あるいは同種の蛋白質が存在する場合、ラベル化プローブがそれらの内在性蛋白質に結合してしまう。また、タグが内在性の基質と反応する場合も、ラベル化プローブの結合が阻害される為、不適當である。③の標的蛋白質の機能に影響を与えるかどうかについては、タグの大きさ、電荷、疎水性など様々な要因が関係している。細胞内環境を考慮した上での確たる根拠は乏しいが、一般的にタグの分子量はできるだけ小さい方が好ましいと考えられている。238 アミノ酸 (分子量 27k) からなる GFP など様々な FP が多くの実験で用いられているが、FP の二量体形成能などに起因して細胞内分子と相互作用する可能性があり、標的蛋白質の機能への影響は個々の事例で異なると考えられる。ちなみに市販タグの分子量は、最小のテトラスチンタグで 575 (6 アミノ酸)、最大の HaloTag でも 33k である。演者は上記3つの条件および分子サイズを考慮して、タグとしてβ-ラクタマーゼに着目した。クラス A β-ラクタマーゼに属する TEM-1 は分子量が 28k 程度の小さな酵素である。β-ラクタマーゼは細菌酵素である為、哺乳類細胞には内在性の相同蛋白質は存在しない。また、抗生物質であるペニシリンやセファロスポリンを加水分解することから、その酵素反応機構について古くから多くの研究がなされてきた。この反応機能では、酵素基質複合体の形成の後、活性化された 70 番目の Ser の水酸基がβ-ラクタムを求核攻撃し、酵素と基質が

エステル結合で連結されたアシル中間体を形成する（アシル化：acylation）。次いで、166番目のGluが近傍の水分子の脱プロトン化を促進し、その水分子がアシル中間体を加水分解する（脱アシル化：deacylation）。この脱アシル化過程に関与するGluをAsnに変異させた変異型酵素E166N TEMでは、酵素反応の脱アシル化速度定数 $k_3$ が極めて遅くなり、実質的に脱アシル化は進行しない。すなわち、基質が変異型酵素に共有結合した酵素-基質複合体が安定に存在する。そこで、このE166N TEMをラベル化タグとして利用することを考えた。

演者らは図5aに示すプローブ化合物CCDをデザインし、合成を行った。CCDは $\beta$ -ラクタム系抗生物質のセファロsporinを基本骨格とし、その両端に7-ヒドロキシクマリンとN,N-ジメチルアミノアゾベンゼンカルボン酸(Dabcyl)が結合している。Dabcylは消光性色素として広く知られている化合物で、他の色素由来の蛍光を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer)により消光させる。すなわちCCDにおいては、クマリンの蛍光はDabcylへの分子内FRETにより、消光するようにデザインされている。ここで、図5aに示すスキームにより、変異型 $\beta$ -lactamaseタグへのラベル化が起こると、Dabcylが脱離して蛍光が回復すると期待した。

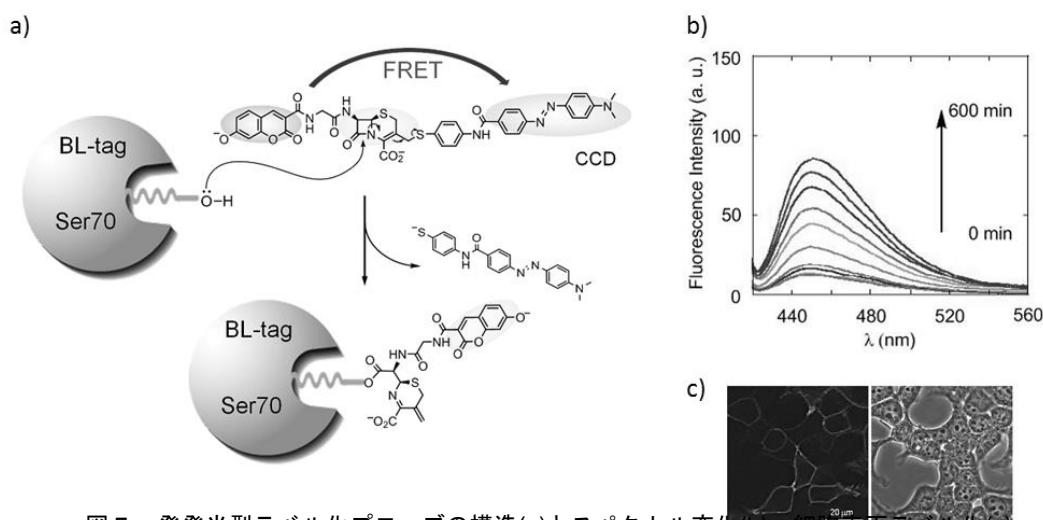


図5. 発蛍光型ラベル化プローブの構造(a)とスペクトル変化(b)、細胞表面ラベル化(c)

合成したCCDをBL-tagとインキュベーションしたところ、遊離のCCDはほとんど蛍光を発しなかったのに対し、タグに結合したCCDは強い蛍光を発した。ラベル化反応の過程を蛍光光度計で経時測定したところ、当初は消光していた蛍光が徐々に上昇する蛍光スペクトル変化が得られた(図5b)。すなわち、FRETの原理に基づいたプローブデザインにより、「発蛍光ラベル化法」の開発に成功した。また、先に示したペニシリン型のラベル化プローブと同様に生きた細胞膜上に発現させた蛋白質のラベル化も可能であった(図5c)。その他に、蛍光色素がフルオレセインである化合物FCDも開発し、同様に発蛍光ラベル化に成功した。一方、これらCCDおよびFCDにおいては、消光基であるDabcylの脱離にやや時間がかかるのが欠点であった(図5b)。この脱離消光基を改良し、数分で発蛍光ラベル化が完了するより高機能な発蛍光型ラベル化プローブの開発に成功している。このプローブをBL-EGFRを発現している細胞のディッシュに添加して共焦点顕微鏡で観察を行ったところ、過剰のプローブを洗浄せずに標的蛋白質の蛍光検出が可能であり、非常に実用的なラベル化法と言える。

## 用語集

### イメージング:

組織、細胞、細部内分子などを画像化あるいは可視化する実験手法の総称。可視化を行うためには、 $\gamma$ 線、X線、紫外光、可視光、ラジオ波などの各波長の電磁波を用いることが多い。生命現象の解明の基礎研究から、臨床診断などの応用研究に至るまでライフサイエンス研究において広く用いられている。

### 分子プローブ:

プローブとは探針の意味で、イメージング研究における鍵となる可視化を行う分子のこと。この場合の可視化は、見えない分子を見えるかたちに置き換えるあるいは見えない分子に標識をつける、ことによるが、この機能を持った分子を分子プローブと呼ぶ。

### in vivo イメージング:

動物個体など、生きた状態におけるイメージング。通常、培養細胞や採取された組織のイメージングは in vivo イメージングとはよばない。

### 蛍光イメージング:

紫外・可視・近赤外光などの蛍光現象を用いたイメージング。現在では蛍光蛋白質を用いて、生体内蛋白質や細胞を標識化して可視化する手法が汎用法になった。簡便な実験手法でイメージングを行うことができるという利点があり、用いる光の透過性に応用限界があり生体深部の断層画像を得ることは困難である場合が多い。

### MRI:

ラジオ波を用いた核磁気共鳴現象を応用したイメージング手法で、生体深部の断層画像を得ることができる in vivo イメージング手法。ラジオ波を用いるため放射線被曝がないという利点があるが、感度が悪いので、臨床診断においては造影剤を用いる場合が多い。

### ケミカルバイオロジー研究:

化学技術を用いて生物学に応用し、生命現象の解明や創薬に関する基礎技術開発に寄与する研究。ケミカルバイオロジーの範疇に入る研究は古くから存在したが、1990年代以降分野が発展し、この名前が用いられるようになった。