

整理番号	2023-J-005	報告者氏名	遠藤瑞己
------	------------	-------	------

研究課題名

発光性金属ナノクラスターを活用した生体分子可視化プローブの開発とトランススケールイメージング法の実践

<代表研究者> 機関名：武蔵大学 職名：専任講師 氏名：遠藤瑞己

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

新規に合成した金属ナノクラスター錯体について発光特性および溶媒分散性を確認し、高い量子収率を維持していた一方で分散性についてはこれまでの錯体に比べて低下しており、新規合成クラスターについては生細胞への細胞内取り込みは困難であることが示された一方、透明化組織でのラベリング、およびトランススケールイメージング法で可視化など、発光モジュールとして使用できる可能性が示された。また、分子認識モジュールとして EGFR に対する一本鎖抗体 Nanobody を大腸菌で発現させて精製し、その機能を評価したところ、Ni カラム、および PD-10 カラムによる処理で、サンプル溶液から imidazole を除去できていることが確認された。次に、精製した一本鎖抗体が抗原結合能を維持していることを生化学的実験により確認した。結果、精製された 7D12 および EgA1 は EGFR 細胞外ドメイン結合能を保持していることが明らかとなった。また、EGFR Nanobody とリン光発光性金(I)イオンクラスターの連結法を確立した。共焦点蛍光顕微鏡による細胞の観察により、EGFR Nanobody は、生体分子可視化プローブの分子認識モジュールとして十分な親和性を有していることが示唆された。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

組織レベルでのイメージングを実施するためには組織の透明化が必須であり、標準的な組織透明化試薬中でリン光を保持している必要がある。そこで $RR-C_2Au_{11}$ について、組織透明化法で発光モジュールとして使用可能かどうかを検証した。具体的には、一般的な CUBIC 法においてイメージング時に屈折率調製用に用いる溶媒 CUBIC-R+ 中でのリン光シグナルを確認したところ、量子収率は 38%と、ジクロロメタン中 (33%) 以上の量子収率が得られた (図 1a)。また、発光波長は一般的なイメージング用溶媒 DMSO/PBS 中と比較してほぼ変化はなかった (図 1b)。

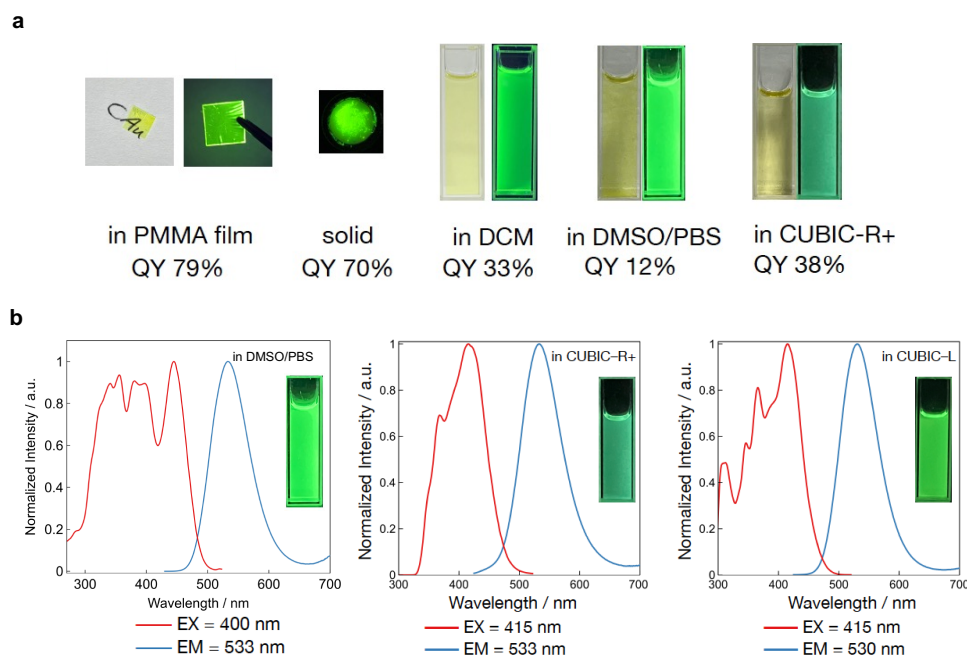


図 1. 組織透明化試薬中での $RR-C_2Au_{11}$ の発光特性 (a) 固相, 各種溶媒中, および組織透明化用溶媒 CUBIC-R+ 中での発光スペクトル (b) $RR-C_2Au_{11}$ の量子収率

次に、溶液中での分散性について、共焦点蛍光顕微鏡を用いて評価した。 $RR-C_2Au_{11}$ を DMSO, PBS, CUBIC-R+ に溶解させ、液滴を共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、DMSO, CUBIC-R+ 中では良い分散性を示した一方で、PBS 中では凝集傾向が確認された (図 2a)。また、対イオンを変更しても凝集傾向は改善されなかった。また、 $RR-C_2Au_{11}$ の PBS 溶液について HeLa S3 細胞への導入を試行したところ、濃度やインキュベーション時間を変更しても細胞外で凝集し、細胞内には取り込まれなかった (図 2b)。以上の結果から、 $RR-C_2Au_{11}$ は生細胞への細胞内取り込みは困難であることが示された一方、透明化組織でのラベリング、およびトランススケールイメージング法で可視化など、発光モジュールとして使用できる可能性が示された。

また、分子認識モジュールとして EGFR に対する一本鎖抗体 Nanobody を大腸菌で発現させて精製し、その機能を評価した。抗 EGFR Nanobody としては生体イメージングへの応用実績のある, 7D12, EgA1 を選択した。まず、His タグを付加した 7D12, EgA1 遺伝子を含むプラスミド DNA で大腸菌 BL21 株を形質転換して 37°C で液体培養し、コールドショックによりタンパク質発現を誘導した。大腸菌破碎溶液を SDS-PAGE で分離し、ゲルを CBB 染色したところ、一本鎖抗体は可溶画分に発現していた (図 3a)。付加した His タグを利用して Ni カラムで精製し、さらに限外ろ過により高分子量の不純物を除去したところ、ともに 98% 以上の純度で目的の一本鎖抗体を精製することに成功した。金属イオンクラスターとの融合反応には EDC 反応を用いる予定だが、Ni カラムからの溶出時に用いた imidazole は EDC 反応時に競合する可能性がある。そこで imidazole を除去するため、精製したサンプル溶液を PD-10 カラムで処理した (図 3b, c)。吸光スペクトル測定を行ったところ、PD-10 カラムによる処理で、サンプル溶液から imidazole を除去できていることが確認された (図 3d, e)。

次に、精製した一本鎖抗体が抗原結合能を維持していることを確認するため、精製した一本鎖抗体と、市販の精製済み EGFR 細胞外ドメインとを混合し、クロスリンカー剤を加えてインキュベーション後、ウェスタンブロットングで相互作用の有無を確認した。結果、7D12, EgA1 のいずれの場合も EGFR 細胞外ドメインを添加したサンプルで、クロスリンカー剤インキュベーション条件下で 170 kDa 付近にバンドが検出された (図 3f)。抗 GFP Nanobody と EGFR 細胞外ドメインを混合したサンプルでは 170 kDa 付近にバンドは検出されなかったことから、精製された 7D12 および EgA1 は EGFR 細胞外ドメイン結合能を保持していることが明らかとなった。

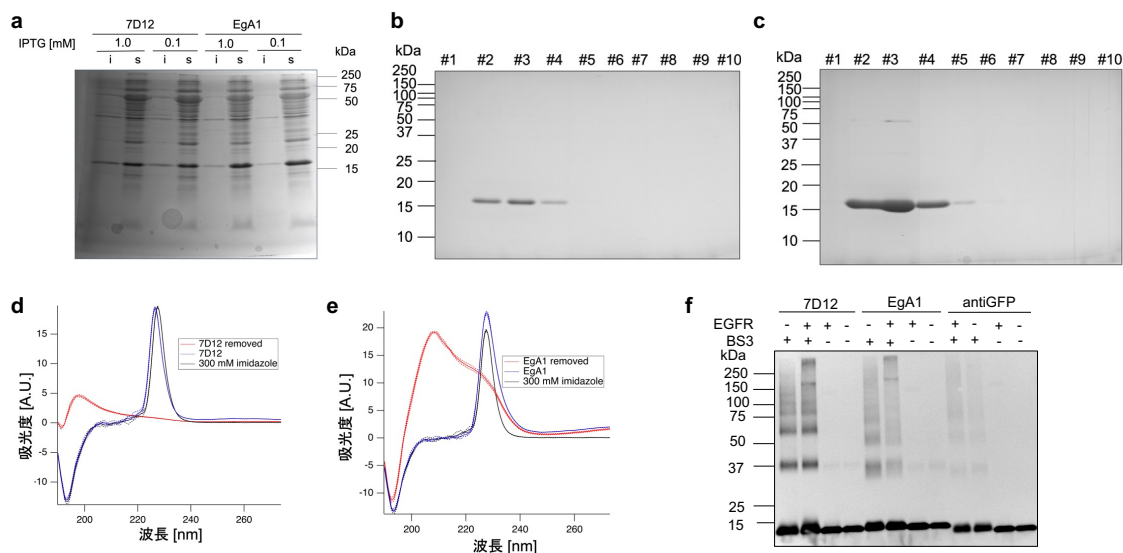


図3. 抗EGFR一本鎖抗体の精製 (a) 大腸菌発現系の条件検討. (b, c) PD-10 カラムによる精製 (b) 7D12 (c) EgA1. (d, e) 吸光スペクトル測定による imidazole 除去の確認. (d) 7D12 (e) EgA1. (f) 精製した一本鎖抗体の EGFR 細胞外ドメイン結合能の評価. BS3: クロスリンカー剤.

また、EGFR Nanobody とリン光発光性金(I)イオンクラスターの連結法を確立した。共焦点蛍光顕微鏡による細胞の観察により、EGFR Nanobody は、生体分子可視化プローブの分子認識モジュールとして十分な親和性を有していることが示唆された。