特別寄稿

生命科学領域におけるラジオアイソトープの有用性 — 現在・過去・未来 —

長崎大学先導生命科学研究支援センター

教授 松田尚樹

ラジオアイソトープ (RI) が生命科学研究の進歩、特に生化学、分子生物学的手法の普及に多大な功績を残してきたことは疑いようもない事実であるが、多くの手法が蛍光プローブ等を用いた non-RI 実験に移行した現在、汎用性の高い実験や入門的実験に RI を使用することはむしろ稀となり、その結果、研究教育用 RI の使用頻度および使用数量は全国的に減少の傾向にある。筆者の所属する長崎大学先導生命科学研究支援センターにおいても、RI を用いた DNA-DNA または DNA-RNA ハイブリダイゼーションは激減し、DNA 塩基配列決定 (シークエンス) に至っては皆無である。センターを管理運営する立場にある筆者自身も、生命科学領域の一研究者としては、実験に RI を使用することがめっきり少なくなった。しかしながら、RI を用いた実験の精度、信頼性、簡便性、実験経費等の総合的な有用性には何ら変化はない。むしろ今は、non-RI 法を含めた多くの選択肢の中から、実験の状況に応じて最も適当な手法を使い分ける、という時代にあるのではないかと考えられる。折しも、「細胞工学」の 2006 年 8 月号から、熊本大学生命資源・支援センターの岡田誠治教授が「RI の逆襲：意外と使えるアイソトープ」と題した魅力的な長期連載を開始されている。具体的なプロトコルはこの連載をご覧ください。本拙稿では、生命科学領域における RI の有用性について、筆者の少ない経験を交えながら、過去から現在までを振り返り、今後も有用と考えられるいくつかの実験について紹介してみたい。

今を遡る 28 年前、1978 年に金沢大学薬学部の 4 年生であった筆者は、放射薬品化学実習において人生で初めて RI を使う機会に恵まれた。場所は、現在の金沢大学学際科学実験センターアイソトープ総合研究施設の遠い祖先となる、宝町地区の平屋のアイソトープ実験施設であった。手元に残っている当時の

実習書によれば、実験課題には、マウス腹腔内に投与された ^{32}P の体内分布、オートラジオグラフィ (チャイニーズハムスター V79 細胞における ^3H -thymidine 取り込みと細胞周期の検討)、体細胞に対する放射線照射の影響 (X 線照射による DNA 合成の抑制、液体シンチレーションカウンタ使用) などが含まれている。生命科学領域における非密封 RI のトレーサー使用は、すでにこの頃には学生実習レベルまで普及していたことになる。液体シンチレーションカウンタを用いた ^3H -thymidine 取り込みによる DNA 合成量の測定は、現在では、簡便な non-RI 法である MTT 法やその発展型である WST-1 法に取って代わられているように思われるが、これらの手法では細胞の生存性に依存して変化する細胞内酵素活性を測定しているものであり、DNA 合成量を測定しているものではない。むしろ細胞数計測の別法ということが出来る。そのため、一定時間内の DNA 合成量を正確に定量するには、 ^3H -thymidine 取り込み法は今なお有効である。フローサイトメーターによる細胞周期解析と組み合わせれば、より確実なデータが得られる。平成 18 年 6 月より、下限数量以下の非密封 RI の管理区域外使用が放射線障害防止法上は可能となったが、 ^3H の下限数量は 1 GBq、それに対して ^3H -thymidine 取り込み法に用いる数量は、96 穴のプレート 1 枚分でせいぜい 370 kBq 程度である。放射線使用施設のない事業所等でも ^3H -thymidine 取り込み法が使えるようになったことは朗報かもしれない。

この学生実習時の鈴木文夫先生 (現広島大原医研教授)、渡邊正己先生 (現京都大原子炉実験所教授)、森俊雄先生 (現奈良医大 RI 施設助教授) の熱血指導を受けた筆者は、そのまま放射薬品化学教室の末席を汚すこととなり、細胞の DNA 損傷修復能を調べるため ^{14}C も日常的に使用することとなった。当時、電離放射線による DNA 鎖切断を調べるには、一本鎖 DNA

のサイズの変化を検出するアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法とDNAアルカリ溶出法しかなく、このときのゲノムDNAの標識に ^3H と ^{14}C は唯一無二のものであった。現在では、パルスフィールドゲル電気泳動や γH2AX の免疫蛍光染色によりDNA二本鎖切断をnon-RIで検出することができる。特に後者は鋭敏であり、また他の分子との局在性も検出できるため、広く普及しつつある。また、断片化したDNAも今ではアガロースゲル電気泳動で簡単に検出することができる。これらの基本的な実験では、今やRIの出番はないようである。その後就職した企業の研究所には、残念ながら放射線使用施設がなかったため、RIの使用は共同研究先の大学で実験を行う時に限られた。当時は主に細菌および宿主由来のコラゲナーゼ活性の比較測定のために、その基質として ^{14}C で標識したアセチルコラーゲンを用いていた。コラゲナーゼ活性は単純に上清中の放射能で感度高く定量し、それに加えて反応後の基質の電気泳動とオートラジオグラフィにより、由来の異なるコラゲナーゼによるコラーゲン分解パターンの違いを同時に知ることができる点が利点であった。この利点は現在でも通用する。

さて、1980年代はMaxam-Gilbert法によるDNAシーケンシングや、ハイブリダイゼーションによる特定の配列を持ったDNA、RNAの検出法(Southern blot, Northern blot)が普及し、それに伴い ^{32}P で標識されたヌクレオシドの使用量が爆発的に増加していた時期であった。使用していた大学のRI実験室はいつも混み合い、活気に溢れていた。このような状況は1990年になって留学する機会を得たアメリカの大学でも同様であり、研究室でRIを使用することが可能であったことから、筆者の机のすぐ後の実験台では ^{32}P を用いたNorthern blotとDNAシーケンシングが日常的に行われていた。ある程度の遮蔽はしていたものの、放射線防護上は好ましいことではないが、現在のように蛍光プローブも定量的RT-PCR法もなく、DNAシーケンサーも需要を満たすほど使えなかった当時は、これが唯一の手段であった。逆に言えば、これらの技術の開発により、今では ^{32}P の使用数量が激減したことになる。もちろん ^{32}P を用いた手法の精度や感度に欠点があるわけではないが、時間をかけて条件さえ決定してしまえば、後は機械にお任せでデータが出てくるという、いわば臨床検査的な簡便さが新技術の優位な点であろう。

Northern blotで遺伝子発現が確認されれば、次にタンパク発現を確認することになる。単純に目的タンパクの総量をWestern blotで検出することが多いが、 ^{35}S -methionineで一定時間代謝標識した培養細胞のタンパクを免疫沈降法により回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)等で分離、分画し、オートラジオグラフィや液体シンチレーションカウンタにより測定すれば、標識時間内に新生された目的タンパクの正確な量を知ることができる。RIによる代謝標識は現在でも、また今後も有効なRI利用法の一つであろう。

筆者は、当時、細胞膜上の受容体型チロシンキナーゼの発現変化を調べていたが、遺伝子レベル、タンパクレベルで変化が確実となると、次にその受容体の生物学的な機能を、リガンドとの結合量および親和性と、結合後の細胞内シグナルの両面から調べることになる。前者で登場するのが ^{125}I 標識リガンドを用いたbinding assayとScatchard解析である。分子間親和性を化学的に分析する最近の手法と比較して今や古典的とも言えるこの方法は、その精度、またリガンド-受容体結合とリガンドの細胞内取り込みを分別して定量できるという点で、現在でも信頼性の高い方法と言えよう。標識リガンドが市販されていれば実験の組み立ては容易であるが、市販されていなくともクロラミンT法による標識は可能である。標識実験の際には、実験作業中の内部被ばく防護には十分留意しなければならないが、これはアイソトープ施設職員の協力と指導に任せれば良い。

一方、細胞内シグナル系は、主としてリン酸化による酵素活性化が連鎖的に連なるものであることから、キナーゼアッセイ、すなわちリン酸化酵素活性の定量が必要となり、そのためのリン供給源として ^{32}P で標識されたATPが使用される。帰国後に所属した新技術事業団の研究室ではまたしてもRIが使用できなかったため、憂慮していたところ、リン酸化されたシグナル伝達分子の抗体がアメリカで市販され始めたことをScience誌の広告で知った。そこで早速抗リン酸化抗体を購入してウエスタンブロットを行い、結果をまとめて同じくアメリカの雑誌に投稿したところ、レフェリーから ^{32}P を使ったキナーゼアッセイで結果を確認せよとのコメントが届いた。1997年頃のことである。幸い、その直後に現在の施設に異動したため、思う存分 ^{32}P を使って追加実験を行ったが、当時はまだRIによるキナーゼアッセイが絶対

の方法として認識されていたのである。今ではシグナル分子活性化をリン酸化分子を指標として検出することに疑義を挟まれることはあまり考えられず、簡便なELISA法やprotein arrayのキットも市販されているが、あくまでキナーゼアッセイの別法であり、活性化そのものを検出しているのではないことは十分認識しておく必要がある。転写因子活性化の実験における、 ^{32}P を使ったゲルシフト法と抗体を使ったELISA法の関係も同様である。なお、最近ではキナーゼ阻害に着目した創薬も盛んに行われており、阻害剤スクリーニングのための多検体アッセイが必要となっている。そのような背景のもとに、non-RIでキナーゼ活性を測定できるスクリーニングアッセイ用キットも市販されているが、その精度とコストパフォーマンスは今後の評価を待たねばならない。

長崎大学先導生命科学研究支援センターのアイソトープ実験施設に移った頃は、年間の施設利用回数、RI使用数量とも最盛期を迎えていた。その後、漸次減少し、ここ数年はRI使用数量は横ばいの状態が続いている。遺伝子レベルの研究に必須であった ^{32}P 標識ヌクレオシドの使用数量減少が、その最大の要因であろう。21世紀に入り、世は網羅的解析、ハイスループットなデータ獲得と、その膨大な情報に基づいたバイオインフォマティクスの時代に突入した。その発端となったDNAチップによる遺伝子発現解析

に、蛍光による検出手法がセットされたことが、RI離れを決定的なものにしたように思われる。Northern blotに替わるTaqMan technology等の定量的RT-PCRも同様である。一方、当センターの遺伝子実験施設におけるDNAシーケンサーの使用は年間3000ランを超え、定量的RT-PCRに用いるリアルタイムDNA増幅装置の使用回数は各年でほぼ倍々に増加している。non-RIを基本とする新たな手法や技術が、機器の開発と同時進行で普及される近年の流れが、今後も大きく変わることはないであろう。それでは、現在ではどのような実験にRIが利用されているのか。Northern blotやゲルシフトアッセイは、ここ一番の決めの実験に使われているようである。すなわち、まず基礎実験的にnon-RIを使い、論文用に ^{32}P という使い分けがされているということであろう。 ^3H や ^{14}C 標識トレーサー実験の頻度には大きな変化はなく、これは生命科学におけるRIの有効利用の基本と言えるであろう。その他、ウエスタンプロットの鋭敏な検出系として ^{125}I 標識protein Aも使われている。蛍光による検出系の感度は十分満足のいくレベルに達しているが、さらにその上の感度を求めるならばRIということになる。細胞障害性T細胞等による標的細胞の障害を感度良く測定するには、 ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞からの放射能遊出の定量が欠かせない。このような実験が、とりもなおさず今後も有用性の高いものではないだろうか。

表 生命科学領域においてRIが有用なインビトロ実験法の例

Category	Nuclide	Application
Cell biology	^3H	DNA synthesis Cell incorporation
	^{51}Cr	Cytotoxicity assay
	^{125}I	Binding assay
Genomics	^{32}P	Southern blot Northern blot In situ hybridization Gel-shift assay
Proteomics	^{32}P	Kinase assay
	^{35}S	Metabolic labeling
	^{125}I	In vitro translation Western blot

以上、過去を振り返りながら non-RI の実験手法と比較しつつ稿を進めてきたが、RI を用いた実験に共通して言える意外な、そして現実的な利点が自分なりに浮かび上がってきた。次のようなものである。

1 簡単である

放射線防護上の作法はあるが、それさえ守れば、特に細かなノウハウを必要とせず、単純に RI を反応系や培養液に入れるだけで済む簡単な実験が多い。しかも、検出は操作の簡単なカウンタや、イメージアナライザーにお任せである。そのためプロトコルさえあれば基本的に誰でもできる。例えば定量的 RT-PCR を新たに始めようとする、まずプライマーの設計から PCR の条件まで事細かに設定する必要がある。誰かに聞くか、専用のソフトウェアを使用することになるが、この使い方もまた誰かに聞かないとできない。

2 安価である

蛍光法の試薬は、総じて高い。特に機器とタイアップしている試薬には特殊なものも多く、自分で一から調製するというものは少ない。ELISA や protein array のキットにしても、1 プレートで 10 万円を超えるものもザラである。それに比べれば、RI は安い。実験に使う試薬類もほとんど自製で調製できる。グローブや紙類などは、RI 施設の消耗品を拝借すれば良い。

3 空いている

いささか自虐的であるが、一時の混雑ぶりから見れば、現在の RI 施設はゆったりとした環境で実験を行うことができる。他人の実験からの不用意な被ばくのおそれもない。汎用機器の予約も、ほぼ不要である。当然、館内の汚染も減少しているはずなので、施設職員にも余裕があり、汚染に目くじらを立てるということもなく、放射線防護上の作法は手取り足取り教えてくれるはずである。

最後になるが、RI そのものの特性を生かした開発研究、すなわち新規 PET/SPECT 化合物の合成や、その体内動態等の解析は筆者の施設でも増加しており、この傾向は、今後も続くものと思われる。また、それぞれの研究に特殊な RI 実験も行われているが、本稿では筆者の知識の及ばぬところもあり、汎用性の高い手法に絞って述べさせていただいた。森厚文先生より、生命科学において有用な RI を用いた実験手法を紹介するようにご依頼いただいたが、雑文調になってしまい、どこまで科学的にご紹介できたか、いささか反省している。ご笑読いただければ幸いである。