

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

## チャネルの開口を視る技術の開発研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部  
研究者 川西 徹

### 分担研究者

重信弘毅 東邦大学薬学部薬物学教室  
百瀬和享 昭和大学薬学部薬理学教室  
長尾 拓 東京大学大学院薬学系研究科薬効安全性学教室

**要旨** 細胞内膜系の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口を、高速高分解能画像化技術の利用およびタンパク質系  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光プローブの利用によって解析する方法の検討を行なった。細胞外膜系（血管内皮細胞）の機械刺激受容チャネルによる  $\text{Ca}^{2+}$ 流入現象を四次元画像解析システム等を構築して解析した。膜電位依存性カルシウムチャネルの開口の可視化を検討するとともに、同チャネルの開口の分子機構を明確にした。

### 1. 研究目的

蛍光プローブを細胞内に取り込ませ蛍光顕微鏡画像解析法により生細胞の細胞内生化学現象をリアルタイムで画像化、解析する技術は、生体機能の解析への利用にとどまらず、創薬研究においても基盤技術の一つと位置づけられている。この技術は、1. 画像化機器の開発改良、2. 蛍光プローブの開発、3. 細胞への応用技術の開発、の三つの要素に支えられており、その中で画像化機器については、最近5年余にわたる共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の開発改良により時間的空間的分解能が飛躍的に改善され、従来は電気生理学でしか捉え得なかったチャネルの開口の検出までも可能と考えられるまでに進歩した。例えば心筋細胞におけるカルシウムスパーク現象は、内膜系の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口を反映したものと考えられており、現在のところ解析手段は画像解析法のみである。したがって、機器の進歩に応じた蛍光プローブの考案、あるいは細胞への応用技術の考案によって、チャネルの開口のような限られた領域で極めて短時間に生じる現象についても分子レベルで解析可能な測定が可能になると考えられる。各種チャネルに作用することにより効果を発現する医薬品は極めて多く、本研究を行うことにより、これら医薬品の作用メカニズムの解明だけでなく、今後出現するであろう新薬の開発にも役立つ、基盤的解析技術が生まれるものと考えられる。

そこで今年度もひきつづき、 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光プローブの使用法の検討および高速走査型高分解能蛍光顕微鏡の開発・改良を通じて、細胞内膜系の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口および細胞外膜系の機械刺激受容チャネルの開口を捉える画像解析系を開発するとともに、さらには電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口過程を可視化するための蛍光標識  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開発研究を行った。

### 2. 研究方法

#### (1) 細胞の調製

肝細胞は5～6週齢のSD系雄性ラットからコラゲナーゼ還流法によって単離し、コラーゲン塗布カバーガラス上で培養した。心筋細胞はラットからランゲンドルフ法によって単離して用いた。培養心筋細胞は幼若マウスから単離しカバーガラス上で培養した。血管内皮細胞はウシ胸部大動脈から剥離した細胞を培養して用いた。

#### (2) 有機合成 $\text{Ca}^{2+}$ プローブを用いた $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の測定

細胞を各種  $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光プローブのアセトキシメチル体（5～10  $\mu\text{M}$ ）と室温または37℃でインキュベーションすることにより細胞内に取り込ませた。場合によっては200  $\mu\text{M}$ のプローブを含む内液を充填したパ

ツチ電極を細胞に装着し、拡散により注入した。心筋細胞の実験では蛍光画像は高速走査型共焦点レーザー顕微鏡 Nikon RCM8000 改造型を用いて昨年度同様に画像取得した。一方血管内皮細胞の実験ではディスク回転速度可変型のニポウディスク走査型高速共焦点スキャナーCSU-10Z (横河電機) と高速冷却 CCD カメラ蛍光イメージングシステム ARGUS-HiSCA (浜松ホトニクス) を組み合わせ、高時間分解能で二次元画像 (40x40 pixels) を取得した。実験によっては昨年度構築した高速高分解能四次元画像化システムを用いて画像取得した。

### (3) Yellow Cameleon (YC) 導入用ベクターの調製

Ca<sup>2+</sup>高親和性型YC2.1 およびCa<sup>2+</sup>低親和性型YC3.1 の発現用ベクターYC2.1pcDNA3およびYC3.1pcDNA3 は R. Y. Tsien 教授 (カリフォルニア大学サンジエゴ校) および宮脇敦史博士 (理化学研究所) から供与された。まずミトコンドリア指向性EYFP発現用プラスミドpEYFP-mito (クロンテック) からEYFP遺伝子を切り出し、同様に上記ベクターから切り出した各YC遺伝子を挿入しYC2.1およびYC3.1のミトコンドリア指向性発現用プラスミドを作製した。次に各YC遺伝子をNheI、NotI (もしくはNotIのみ) 処理して切り出し、アデノウィルスベクターに組み込むため、まずシャトルベクターpHCMV5のNheI、NotI部位 (もしくはNotI部位) に挿入した。これをDH5 $\alpha$ にtransformしてpHCMV-YCを得て、さらにpHCMV-YCおよびアデノウィルスベクターpAdHM4をI-CeuI、PI-SceI処理した後、両者をlygateした。ライゲーション産物をSwaI処理した後DH5 $\alpha$ にtransformし、細胞内導入用ベクターpAdHM4-YCを得た。次にこのpAdHM4-YCをPacI処理した後、リポフェクション法により293細胞へ遺伝子導入し、10~14日後に細胞からウイルスを回収した (1次ウイルス液)。1次ウイルス液をさらに293細胞に感染させて2日後に回収、2次ウイルス液を得た。同様に3次ウイルス液を調製し (10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> PFU/ml)、これをYC発現ウイルスベクターとして実験に用いた。このように調製したYC発現用アデノウィルスベクターを初代培養肝細胞、培養心筋細胞、巨核芽球等に処置し、通常2日後にレーザー走査蛍光顕微鏡 Zeiss LSM510を用いて観察した。YCの観察においては、アルゴンレーザーの458nmの励起光を用いた。

### (4) 電位依存性 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル $\alpha_1C$ subunit の実験

改変 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルをラット脳 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル $\alpha_{1C}$ サブユニット (rbCII: #M67515) を用いて作製し、 $\beta_{1a}$ サブユニットおよび $\alpha_2/\delta$ サブユニットを安定発現する BHK6 細胞に発現させた。Ca<sup>2+</sup>チャネル電流およびゲーティング電流はホールセル・パッチクランプ法により記録した。チオール反応性蛍光試薬 (Oregon Green maleimide および Oregon Green iodoacetamide) によるラベルは、蛍光試薬 (最終濃度 5 - 50  $\mu$ M) を含む細胞外液に 30 min インキュベートすることにより行った。蛍光は落射蛍光顕微鏡サイドポートより photomultiplier および A/D converter を介して (Olympus IX70, Hamamatsu photonics R1221, Axon Digidata1200) ホールセル・パッチクランプ法による膜電位及び膜電流記録とともに pCLAMP 6.0 (Axon) によりコンピューターへ取り込んだ。

## 3. 研究成果

### (1) 細胞内膜系のチャネルの開口の画像化

#### (1-1) 超高速共焦点顕微鏡による筋小胞体の Ca<sup>2+</sup> 放出チャネルの開口を惹起する Ca<sup>2+</sup>流入の解析

ラット単離心室筋、心房筋細胞の Ca<sup>2+</sup> transient を昨年度同様に高速走査型共焦点顕微鏡で画像化し、筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>放出チャネルの開口を惹起する細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入にかかわる Ca<sup>2+</sup>チャネルの解析を行った。昨年度報告したように心室筋細胞では電気刺激による Ca<sup>2+</sup> transient は細胞質全体でほぼ同時に発生し、刺激後約 10 ms 以降は細胞質内の Ca<sup>2+</sup> 濃度はほぼ均一になった。一方心房筋細胞では、電気刺激後 5 ms - 10 ms の時点では細胞膜の周辺部でのみ Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇がおり、それがウエーブ状に細胞深部まで伝わっていった。心室筋、心房筋それぞれの細胞膜直下および細胞中心部の蛍光強度のピーク値に対する薬物の作用を検討したところ、T型 Ca<sup>2+</sup>チャネルを抑制する40  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup> および1  $\mu$ M mibefradil はほとんど Ca<sup>2+</sup> transient に影響しなかったが、L型 Ca<sup>2+</sup>チャネルを抑制する0.1  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> はほぼ完全に抑制した。モルモット心室筋細胞にパッチ電極を介して indo-1 を注入し、電気刺激により惹起された Ca<sup>2+</sup> transient に対する薬物の影響を検討した。40  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup> はほとんど Ca<sup>2+</sup> transient に影響しなかったがL型 Ca<sup>2+</sup>チャネルを抑制する1  $\mu$ M nifedipine はほぼ完全に抑制した。モルモット摘出心室筋標本において

40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  および 1  $\mu\text{M}$  mibefradil はほとんど収縮力に影響しなかったが、1  $\mu\text{M}$  nifedipine は著明に抑制した。以上の結果から、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口は L-型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$ 流入によって惹起され、T-型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルはほとんど関係しないことが明らかとなった。

#### (1-2) 各種カメレオンベクターの作製と遺伝子導入の試み

始めに YC2.1 発現用ベクターを用いて初代培養肝細胞、培養心筋細胞へリポフェクション法を用いて YC2.1 の発現を試みたが、細胞内の蛍光強度は低く、実用的に定量が可能なレベルの YC 像の画像化は困難であった。そこで、YC 遺伝子の細胞内導入効率を高めるために、アデノウィルスベクターに各種 YC 遺伝子を組み込んで、YC の発現を試みた。初代培養肝細胞についてベクター処理 1 日後に YC2.1 の細胞質への発現を観察したところ、90%以上の細胞で極めて明瞭な蛍光が観察された。2 日後にはさらに蛍光強度は強まるが、3 日目以降は細胞の生存率が下降するので、観察は通常 2 日目で行なった。また通常のリポフェクション法では発現させることが困難だった単離心筋細胞においても、同様にアデノウィルスベクターを用いることにより、YC 発現が可能となった

そこで、初代培養肝細胞の細胞質に YC2.1 を発現させ、Zeiss LSM510 に装備されているダイクロイックおよびフィルターを組み合わせ、458nm で励起し、475~515nm (F1) および 515nm< (F2) の二つの波長の発光強度を測定した。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し ECFP と EYFP 間で FRET が生じると、ECFP に由来する短波長側の蛍光エネルギーは EYFP の励起に使われ、その結果長波長側の蛍光が増加するので、F1/F2 の蛍光強度比は増加することになる。実際にイオノマイシン 10 $\mu\text{M}$  を添加すると、短波長側の蛍光の下降、長波長側の蛍光の増加によって、蛍光強度比の明瞭な増加が検出できたが、生理的刺激ともいえるフェニレフリン 10 $\mu\text{M}$  では短波長側、長波長側、蛍光強度比とも明瞭な蛍光変化が観察されなかった。そこでその原因を探るために、YC2.1 発現細胞を digitonin 処理し YC2.1 を外液中に漏出させ、その蛍光スペクトルを測定した。その結果、YC2.1 は 458nm の励起光では、低  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度時の短波長側のピークは 470nm 近辺にあり、顕微鏡に標準装備されているフィルターでは短波長側の蛍光変化が捉えられていなかった。そこで、465~495nm のバンドパスフィルターを作り、観察に用いた。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に伴う短波長側の蛍光強度変化が捉えられるようになった。Fig 1 は得られた蛍光画像およびそのノルムスキー微分干渉像である。そこでこの条件で画像化しながら初代培養肝細胞を ATP あるいはフェニレフリンで刺激したところ、蛍光強度比の変化が画像によって捉えられた。Fig 2 の上段は 1 $\mu\text{M}$  ATP 刺激による蛍光強度比変化を擬似カラー表示したものである。さらに Fig 2 の下段は 5 $\mu\text{M}$  のイオノマイシンで刺激した結果であり、Fig 3 は Fig 2 上段右図の図中に示した領域の蛍光強度変化を時間経過でプロットしたものである。

次に YC3.1-mito をアデノウィルスベクターに組み込み初代培養肝細胞で発現させたところ、長時間に渡って定量解析が可能なまでのレベルまで発現している細胞の率は高くはないものの（通常 25%以下）、tetramethylrhodamine-ethyl ester によるミトコンドリアの蛍光染色像と一致する蛍光タンパク質の発現像が得られた (Fig 4)。これらの細胞は、イオノマイシン 5 $\mu\text{M}$  を添加すると、短波長側の蛍光の減少と長波長側の蛍光の増加が観察され、蛍光強度比において明瞭な変化が観察された (Fig 5)。

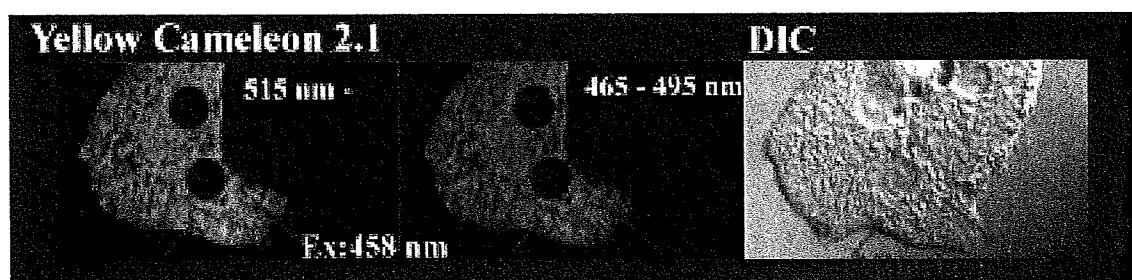
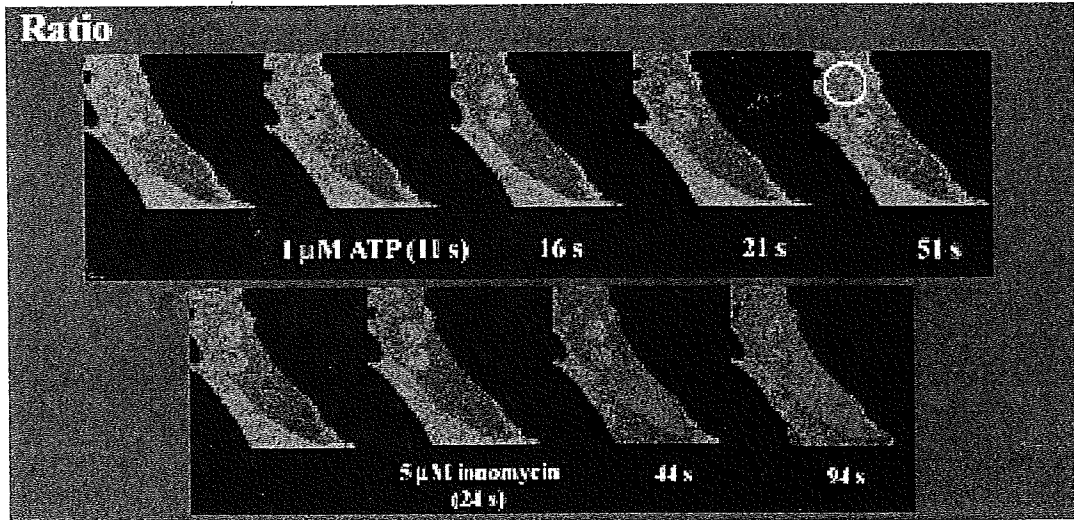
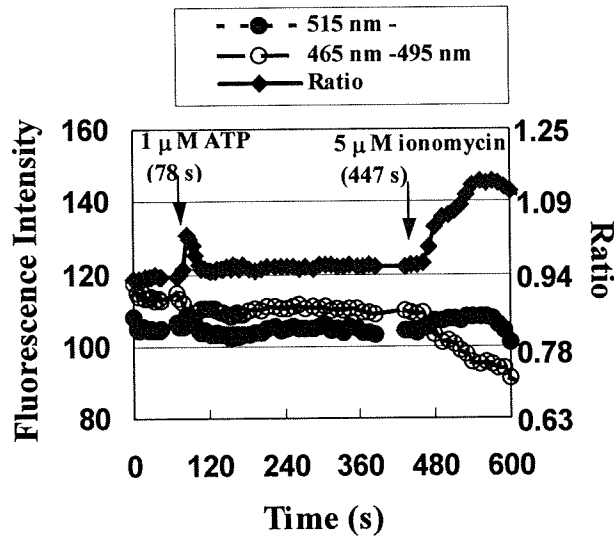


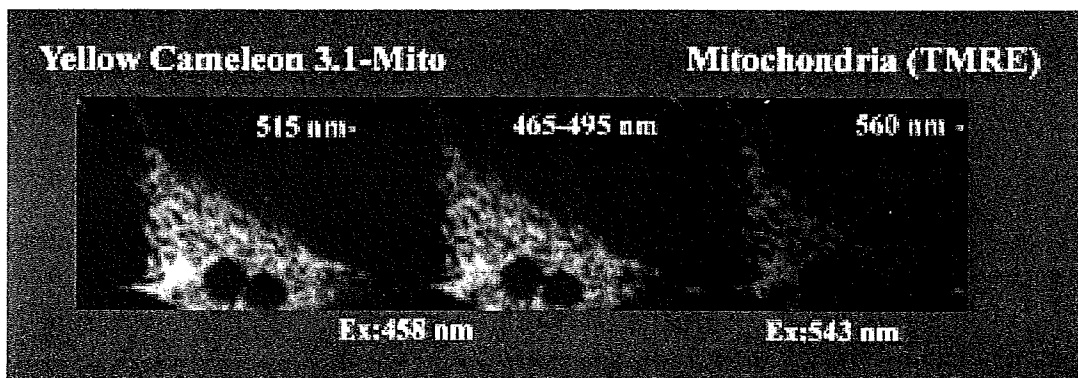
Fig 1 Fluorescence images of Yellow Cameleon 2.1 expressed in primary cultured hepatocytes



**Fig 2** Ratio images of Yellow Cameleon 2.1 expressed in primary cultured hepatocytes



**Fig 3** The increase in Ca<sup>2+</sup> concentration detected with Yellow Cameleon 2.1 in a cultured hepatocyte. The fluorescence intensities were measured in a circle in Fig 2.



**Fig 4** Fluorescence images of Yellow Cameleon 3.1-mito in a cultured hepatocyte

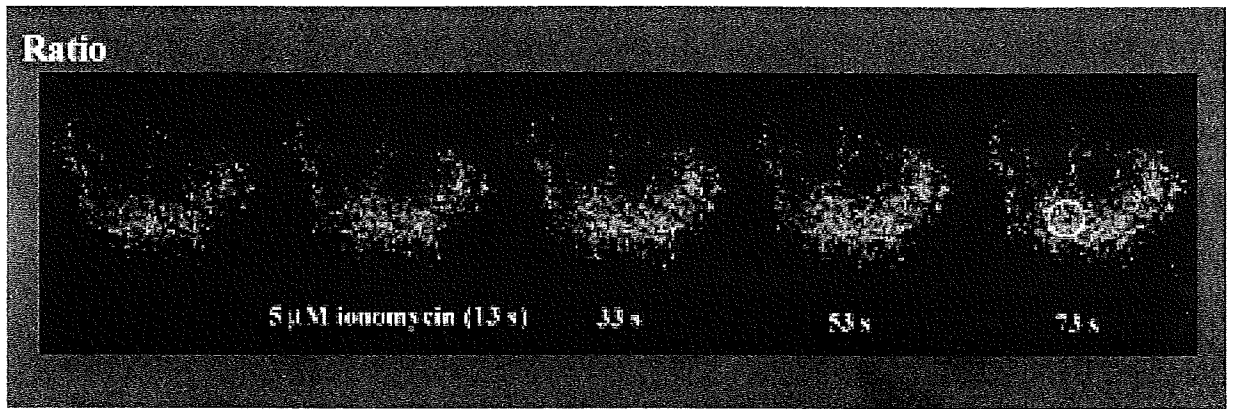


Fig 5 Ratio images of Yellow cameleon 3.1-mito in a cultured hepatocyte

□

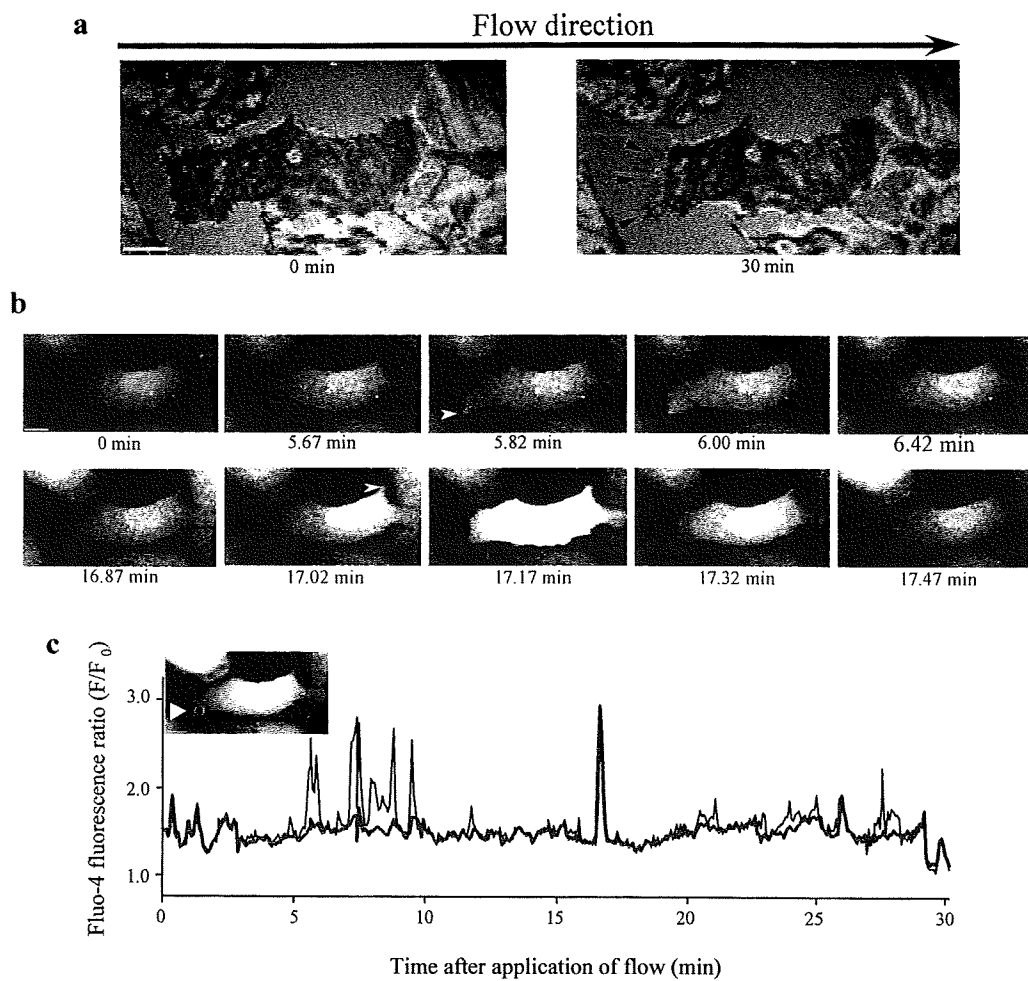


Fig. 6. Typical changes in cell morphology and  $[Ca^{2+}]_i$  under flow conditions. Fluid flow was applied from 0 min at 32.6 cm/sec. Flow direction was left to right. (a) IRM images. The black arrows indicate the retracted areas. Scale bar:10  $\mu$ m. (b) Images of Fluo-4 fluorescent. Fluorescence images were acquired at 0.56-sec intervals. The arrowhead indicates the starting region of  $[Ca^{2+}]_i$  transient. Scale bar:10  $\mu$ m. (c) Time course of flow-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . Measured regions of  $[Ca^{2+}]_i$  are demonstrated in the fluorescence image. The slim line and the bold line represents changes in  $[Ca^{2+}]_i$  at the starting region of  $[Ca^{2+}]_i$  transient and in  $[Ca^{2+}]_i$  of the entire cell, respectively



## (2) 細胞外膜系のチャネルの開口の画像化 —Ca<sup>2+</sup>スポット現象の四次元的解析—

### (2-1) ウシ大動脈内皮細胞の流れ刺激によって誘発される Ca<sup>2+</sup>応答

昨年度見出した血管内皮細胞の Ca<sup>2+</sup>スポット現象を、高時間分解能で二次元画像取得することで、さらに詳細に解析した。持続的な流れ刺激下に血管内皮細胞で認められる反復性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇には、局所から始まり速やかに消失するタイプ (Fig. 6b 上段) とその後ウェーブ状に細胞内を伝播するタイプ (Fig. 6b 下段) が観察された。また、流れ刺激の負荷により、細胞の局所での収縮は流れの上流部分に偏ることが明らかとなった。流れ刺激による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇と収縮の相関について検討を行なったところ、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の頻度と細胞の収縮面積は有意に相関することが明らかとなった。また、細胞基底部の接着斑の空間分布を干渉反射像により画像化し (Fig. 6a)、局所的な Ca<sup>2+</sup> 上昇と接着斑との空間的な対応及びその後の形態変化との相関性について検討した。その結果、接着斑付近から Ca<sup>2+</sup> 上昇が始まり、その後、同部位の収縮による形態変化が観察された。また、この局所的な Ca<sup>2+</sup> 上昇の時空的性質について、平成 10 年度に確立した高速高分解能四次元画像解析システムを用いて検討したところ、明らかに細胞の自由膜面に比べて接着面でより鮮明な Ca<sup>2+</sup> 上昇が観察された (Fig. 7)。

### (2-2) 流れ刺激によって誘発される Ca<sup>2+</sup> 上昇及びその後の局所的な収縮メカニズムの薬理的検討

流れ刺激存在下の血管内皮細胞に機械受容チャネルの阻害剤であるガドリニウム (30 μM) を前処置したところ、流れ刺激による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇と収縮が完全に抑制されたことから、機械受容チャネルを介した [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が流れ刺激による局所的な収縮に関与することが明らかとなった。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアーに存在する Ca<sup>2+</sup>-ATPase の阻害薬であるタブシガルギン (1 μM) の前処置により、非処置時に認められたウェーブ状の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は消失し、局所的な [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇のみが観察されるようになった。タブシガルギンの前処置は流れ刺激による収縮には影響しないことから、流れ刺激存在下で認められるウェーブ状の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は細胞内 Ca<sup>2+</sup> ストアーからの Ca<sup>2+</sup> 遊離によるものであるが、これらは流れ刺激による局所的な収縮には関与しないことが示唆された。また、ガドリニウムを前処置した場合は、タブシガルギン前処置により残存する局所的な [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は観察されなかったことから、局所的な [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は細胞外からの Ca<sup>2+</sup> 流入を可視化したものであることが裏付けられた。

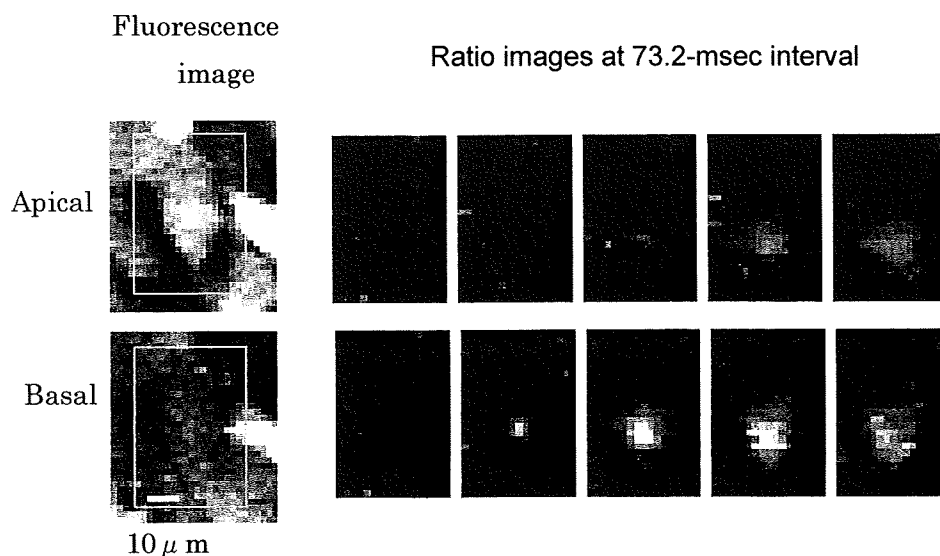


Fig. 7. Simultaneous confocal imaging of fluid flow-induced Ca<sup>2+</sup> response at apical and basal planes of endothelial cells. Cells were stimulated by fluid flow at 32.6 cm/sec. Fluo-4 fluorescence images at apical and basal planes were acquired reciprocally at 73.2-msec interval, respectively, utilizing the high-speed-three-dimensional confocal imaging system.

### (2-3) 流れ刺激によって誘発される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇におけるインテグリンの関与

流れ刺激によって起こる局所的な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が接着斑に一致する部位から始まることから、この  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に接着分子のインテグリンの関与が想定された。そこで、流れ刺激時の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇におけるインテグリンの関与を明らかにする目的で、インテグリンの基質認識部位と同一の配列を持つ RGD ペプチド GRGDSP (50 g/mL) を流れ刺激下の内皮細胞に前処置し、その影響を検討した (Fig. 7)。その結果、流れ刺激に伴う  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の頻度は有意に抑制された。不活性の対照ペプチド GRADSP (50 g/mL) は、全く影響を与えなかった。これらの結果から、流れ刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇において、インテグリンがメカノセンサーとして機能し、機械受容チャネルの開口を引き起こす可能性が示唆された。

## (3) 膜電位依存性カルシウムチャネルの開口過程の光学的解析手法の開発

### (3-1) 電位依存性 L 型 $Ca^{2+}$ チャネル $\alpha_{1C}$ サブユニットの蛍光標識化の検討

電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャネル  $\alpha_{1C}$  サブユニットにシステイン変異を導入しチオール反応性蛍光試薬を結合させた蛍光標識チャネルを作製し、膜電位変化および薬物結合に応じた構造変化に伴う蛍光変化とゲーティング電流のリアルタイム・モニターを試みた。この手法により、膜電位の変化によって  $Ca^{2+}$  チャネル分子内のどの箇所の構造が最初に変化するかという情報を得ることができると考えた。しかしながら、蛍光変化の膜電位依存性とゲーティング電流の膜電位依存性との間の整合性にディスクレパンシーがあり、蛍光シグナルの S/N 比を改善しさらに検討を重ねる必要がある。

### (3-2) 電位依存性 L 型 $Ca^{2+}$ チャネル $\alpha_{1C}$ サブユニットの開口の制御部位の検討

電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャネルの開口を光の情報に変換するためには、開口現象においてキーとなる部位を決定する必要がある。そこで、開口を阻害する DHP (ジヒドロピリジン) が結合する部位について検討した。即ち、最近クローニングされたホヤ L 型  $Ca^{2+}$  チャネルが過去に同定されている DHP (ジヒドロピリジン) 結合に関わるアミノ酸を全て保持しているにも関わらず DHP 感受性を欠くという事に注目し、DHP 感受性のラット脳 L 型  $Ca^{2+}$  チャネルとの塩基配列を比較しホヤ型のポイント・ミューテーションをラット脳 L 型  $Ca^{2+}$  チャネル  $\alpha_{1C}$  サブユニットに導入し、電気生理学的・薬理的検討を行った。Ser<sup>1115</sup> を Ala に置換した  $Ca^{2+}$  チャネルを BHK6 細胞に一過性に発現させて L 型  $Ca^{2+}$  チャネル電流をホールセル・パッチクランプ法とシングルチャネル記録法により解析したところ、イオン選択性や電位感受性、非 DHP 型カルシウム拮抗薬の作用に変化なく、DHP 型カルシウム拮抗薬の結合親和性が 50 倍低下し、 $Ca^{2+}$  チャネル・アゴニスト (S(-) Bay k 8644, FPL-64176) の開口確率増加作用および開口時間延長作用がほぼ完全に消失していた。特に Ser<sup>1115</sup> の水酸基が重要であることを示した。このことは、これまで二つの膜貫通ドメインをつないで  $Ca^{2+}$  透過口へヘアピン状に折れ曲がり  $Ca^{2+}$  選択フィルターを形成すると考えられてきたこのドメインが、 $Ca^{2+}$  チャネルのゲーティング (開閉) の制御に直接関わるという新たな概念を提示した (Yamaguchi, et al., *J. Biol. Chem.* 275: 41504-41511 (2000))。この結果を踏まえ、 $Ca^{2+}$  チャネル・アゴニストと Ser<sup>1115</sup> の相互作用が  $Ca^{2+}$  透過ポアドメインへの  $Ca^{2+}$  の結合によりどのような影響を受けるかを  $Ca^{2+}$  チャネルを透過する荷電担体を置換することにより検討したところ、 $Ca^{2+}$  依存的に  $Ca^{2+}$  チャネル・アゴニストの効力が変わることを見出した。このことは、 $Ca^{2+}$  チャネル・アゴニストと Ser<sup>1115</sup> の相互作用が近傍の  $Ca^{2+}$  選択フィルター (Glu<sup>1118</sup>) と  $Ca^{2+}$  の相互作用に応じた構造変化により影響を受けることを示唆する。現在、このドメインの Cys 改変チャネルについて蛍光 SH-基修飾試薬を用いて  $Ca^{2+}$  チャネルのゲーティング (開閉) と構造変化の関係を明らかにしようとしている。さらに、E-F ハンド蛋白に代表される  $Ca^{2+}$  結合蛋白に  $Ca^{2+}$  と同じ様式で結合することが知られている Tb<sup>3+</sup> がこの  $Ca^{2+}$  チャネルを高親和性にブロックすることから、Tb<sup>3+</sup> luminescence 法を用いて  $Ca^{2+}$  チャネルのゲーティングに伴う  $Ca^{2+}$  選択フィルターおよびポアドメインの構造変化を検討中である。

### (3-3) L 型 $Ca^{2+}$ チャネル $\alpha_{1C}$ サブユニットの細胞質カルボキシル末端ドメインの蛍光標識

前期の結果から、L 型  $Ca^{2+}$  チャネル  $\alpha_{1C}$  サブユニットの細胞質カルボキシル末端ドメインが  $Ca^{2+}$  チャネルのゲーティング制御に関わることが示された。そこで、FRET 法を用いて  $Ca^{2+}$  チャネル  $\alpha_{1C}$  サブユニットの細胞質カルボキシル末端ドメインのゲーティング制御における役割の解明を試みている。この目的のためにはカルボキシル末端ドメインに GFP を導入する必要があるが、カルボキシル末端への GFP の導入は  $Ca^{2+}$  チャネル電流のキネティクスに影響を与えることが知られている。そこで我々は、全長およびカルボキシル

末端が切断された $\alpha_{1c}$ サブユニット (rbCII) の N 末端に GFP を導入し、機能的発現を確認した。N 末端への GFP の導入は  $Ca^{2+}$ チャネル電流のキネティクスに有意な影響を及ぼさないことを確認した。さらに、細胞質カルボキシル末端ドメインに GFP ラベルを導入したペプチド、および各 $\beta$ サブユニットのカルボキシル末端に BFP を導入したものを作製した。現在、これらの改変サブユニットの共発現を試みている。特に、細胞質カルボキシル末端ドメインのペプチドおよびサブユニットについてはアデノウイルス・ベクターを用いてラット心室筋細胞に導入し機能解析をすることに成功した。現在、 $Ca^{2+}$ チャネルのゲーティングに伴うこれらの分子間の相互作用を FRET 法により解析中である。

#### 4. 考 察

本研究では心筋細胞における  $Ca^{2+}$ 動態を、高速走査型共焦点レーザー顕微鏡によって超高速（マイクロ秒レベル）かつ高空間分解能（ミクロン単位）で捉えることにより、ライアノジン受容体チャネルの開口の瞬間を捉えることに成功したが、この技術を用いて今年度は細胞が脱分極時にこれらのチャネルが一斉に開口する時、そのトリガーとなる細胞外からの  $Ca^{2+}$ の流入は、T-型  $Ca^{2+}$ チャネルを介したのではなく、主に L-型  $Ca^{2+}$ チャネルを介したものであることを明らかにした。このような解析では、薬物はチャネルの開口メカニズムを検討する上でのツールとして用いているが、医薬品開発においては、この測定系をライアノジン受容体チャネル作用薬のスクリーニングに応用したり、作用機構未知の薬物のチャネルの開口への影響を調べる実験に応用できることを示している。

昨年度まで、細胞内膜系の  $Ca^{2+}$ チャネルの開口を細胞内  $Ca^{2+}$ 貯蔵部位の  $Ca^{2+}$ 濃度を画像化し、その変動から検出する試みを行ってきた。化学合成低  $Ca^{2+}$ 親和性蛍光プローブを小胞体等に局在させることにより、この試みは一定の成果をあげてきた。しかしながら、膜透過性アセトキシメチル体として細胞内にプローブを取り込ませる方法は、選択性は低く、測定に先立って細胞を界面活性剤処理することにより細胞質のプローブを漏出させるというステップが必要であり、正常細胞での実験は極めて困難であった。一方、タンパク質系  $Ca^{2+}$ 蛍光プローブである Yellow Cameleon は、適切なシグナルペプチドを付加することにより、理論的には細胞内オルガネラ等に選択的に発現することができるので、チャネルの開口の画像化にも有望なプローブと考えられた。そこで今回本格的にこのプローブの導入を検討した。その結果、(1) 開発者から供給されている Cameleon 導入用プラスミドでは、遺伝子導入効率は低く、肝細胞、心筋細胞等ではそのままでは実験に用いることができない、(2) 現在顕微鏡観察に最も適していると思われる Yellow Cameleon でも至適励起波長 440nm に適したレーザーは標準的共焦点レーザー顕微鏡には装備されておらず、共焦点レーザー顕微鏡による高空間分解能の画像化は特別のレーザーを準備しなければ困難であった。そこで、(1)の問題に対する対策としてはアデノウイルスベクターに組み込むことによって、従来 Yellow Cameleon の使用が困難であった肝細胞あるいは心筋細胞で、高率なプローブタンパク質の発現に成功した。さらには Yellow Cameleon の励起スペクトルにおいて 452nm 付近に肩があることに着目して、汎用アルゴンレーザーの発振する 458nm の励起光を用いた画像化を検討して、蛍光フィルターの最適化により、細胞内の  $Ca^{2+}$ 上昇の画像化に成功した。またミトコンドリア指向性のシグナルペプチドを利用してミトコンドリアへの選択的な発現、および  $Ca^{2+}$ 濃度上昇の画像化も可能とした。アデノウイルスベクターの使用は様々な細胞への Cameleon の応用の道を開くものであり、また多くの研究室にある共焦点レーザー顕微鏡での Cameleon 観察を可能としたことにより、Cameleon の有用性は大きく増すものと思われる。また本研究における顕微鏡の最適化は、一つ Cameleon のみに限られる成果ではない。即ち YC において適切な画像化条件を見つけることは、その他 ECFP と EYFP の FRET 現象を利用して測定がなされるその他多くのプローブの場合にも適用できるものである。Cameleon については、本研究の中で小胞体指向性のものについても検討を行なっている。今後小胞体指向性プローブも含めて、チャネルの開口の画像化への応用を試みたい。

細胞外膜系のチャネルとしては、本研究グループによって発見された機械刺激受容チャネルの開口によると考えられる細胞外からの局所的  $Ca^{2+}$ 流入現象 ( $Ca^{2+}$ スポットと命名) について、同グループが構築した高速高分解能四次元画像化顕微鏡等を用いてさらに解析を進めた。この現象は今までは水晶体上皮細胞

においてはじめて見出されたものであるが、その生理的意義あるいは現象の普遍性については不明なままであった。本年度は昨年度発見した血管内皮細胞における同様の現象が、水晶体上皮細胞とほぼ同様なメカニズムであることを確認し、さらにその発生にインテグリンがメカノセンサーとして機能していること可能性を強く示唆した。血流によって絶えずメカニカルなストレスを受けているであろう内皮細胞でのこれらの現象の生理的意義はまだ不明であるが、本研究で確立した四次元画像解析装置はこの解明を強力にサポートする解析機器となろう。

膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口を蛍光変化として捉えるために、本研究では当初チャネルにチオール基を導入して蛍光標識し、その蛍光の変動を捉えることをスタートポイントとした。しかしこの試みは成功せず、チャネルの開口においてキーとなるアミノ酸残基を同定する作業をまず開始した。その過程で、膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口を阻害する DHP が作用するアミノ酸残基を突き止めることに成功した。また同じく、A-キナーゼによってリン酸化され開口に影響するアミノ酸残基の特定にも成功した（結果は示していない）。これらの結果は、今後チャネルの開口を光の変化として捉えるために検討すべき部位を明らかにしただけにとどまらず、同チャネルに作用する作用薬の合理的分子設計に役立つ貴重な情報と思われる。同時に並行して行なっている N-末端の標識の試みとともに、3年間でなしえなかった膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口を光で検出する方法の検討を更に継続する予定でいる。

## 5. まとめ

(1) 超高速高分解能画像化法を用いて、心筋細胞において脱分極時にライアノジンチャネルが一斉に開口する際、そのトリガーとなる細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ の流入は、T-型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介したのではなく、主に L-型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介したものであることを明らかにした。この解析方法は、ライアノジンチャネルへの作用薬のスクリーニング法に応用できるものである。

(2) タンパク質系  $\text{Ca}^{2+}$ プローブである Yellow Cameleon について、局所的  $\text{Ca}^{2+}$ 変動のプローブとしての応用の可能性を検討した。Yellow Cameleon は肝細胞や心筋細胞等では遺伝子導入が困難であったが、アデノウィルスベクターを用いることによって、高率な導入に成功した。また汎用アルゴンレーザーの 458nm の励起光を用いても、フィルターを最適化することにより共焦点レーザー顕微鏡でも高空間分解能画像化に成功した。さらにミトコンドリアへの選択的発現およびミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の画像化に成功した。

(3) 高速高分解能四次元画像化装置等を利用して、血管内皮細胞でも水晶体上皮細胞におけるとほぼ同様の  $\text{Ca}^{2+}$ スポット現象が機械受容体チャネルの開口によって生じることを明らかにするとともに、この開口にインテグリンがメカノセンサーとして機能していることを強く示唆する結果を得た。

(4) 膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口を分子レベルで解析するために、蛍光標識チャネルの作製を行う過程で、同チャネルの開口を阻害する DHP が作用するアミノ酸残基を明らかにすることに成功した。現在この部位等に蛍光標識を試み、チャネルの開口を光の変化として捉える試みを継続している。

## 6. 研究発表

- 1) Kawanishi K, Kiuchi T, Asoh H, Shibayama R, Kawai H, Ohata H, Momose K, and Hayakawa T. : Effect of Tributyltin Chloride on Release of Calcium Ion from Intracellular Calcium Stores in Rat Hepatocytes, *Biochem Pharmacol.* (in press)
- 2) 川西 徹 共焦点顕微鏡、基礎生化学実験法第2巻 日本生化学会編 pp205-218 東京化学同人 (2000)
- 3) Masumiya H., Matsuda T., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K. Possible requirement of phosphonate moiety for efonidipine effects on the sino-atrial node action potential. *Life Sci.* 66: 239-244 (2000).
- 4) Masumiya H., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K. Inhibition of T-type and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents by aranidipine, a novel dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist. *Pharmacology* 61:57-61 (2000).
- 5) Masumiya H., Kase J., Tanaka Y., Tanaka H., Shigenobu K.: Frequency-dependent blockade of T-type Ca current by efonidipine in cardiomyocytes. *Life Sci.* 68: 345-351 (2000)

- 6) Tanaka H., Masumiya H., Sekine T., Kawanishi T., Hayakawa T., Miyata S., Sato Y. Nakamura R., Shigenobu K. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  waves in excitation contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes. *Life Sci.*, (in press)
- 7) Ohata H., Tanaka K., Maeyama N., Yamamoto M. and Momose K. : Visualization of elementary mechanosensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -influx events,  $\text{Ca}^{2+}$  Spots, in bovine lens epithelial cells. *J. Physiol. (London)* **532**, 31-42 (2001)
- 8) M. Miyazaki M., Ohata H., Yamamoto M. and Momose K. Spontaneous and flow-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients in retracted regions in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)
- 9) Yamaguchi, S., Okamura, Y., Nagao, T., and Adachi-Akahane, S.: Serine residue in IIIS5-S6 linker of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_{1C}$  subunit is the critical determinant of the action of dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  channel agonists. *J. Biol. Chem.* **275**: 41504-41511 (2000).
- 10) Naguro, I., Nagao, T., and Adachi-Akahane, S.: Ser<sup>1901</sup> of  $\alpha_{1C}$  subunit is required for the PKA-mediated enhancement of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents but not for the negative shift of activation. *FEBS Letters* (in press).

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

