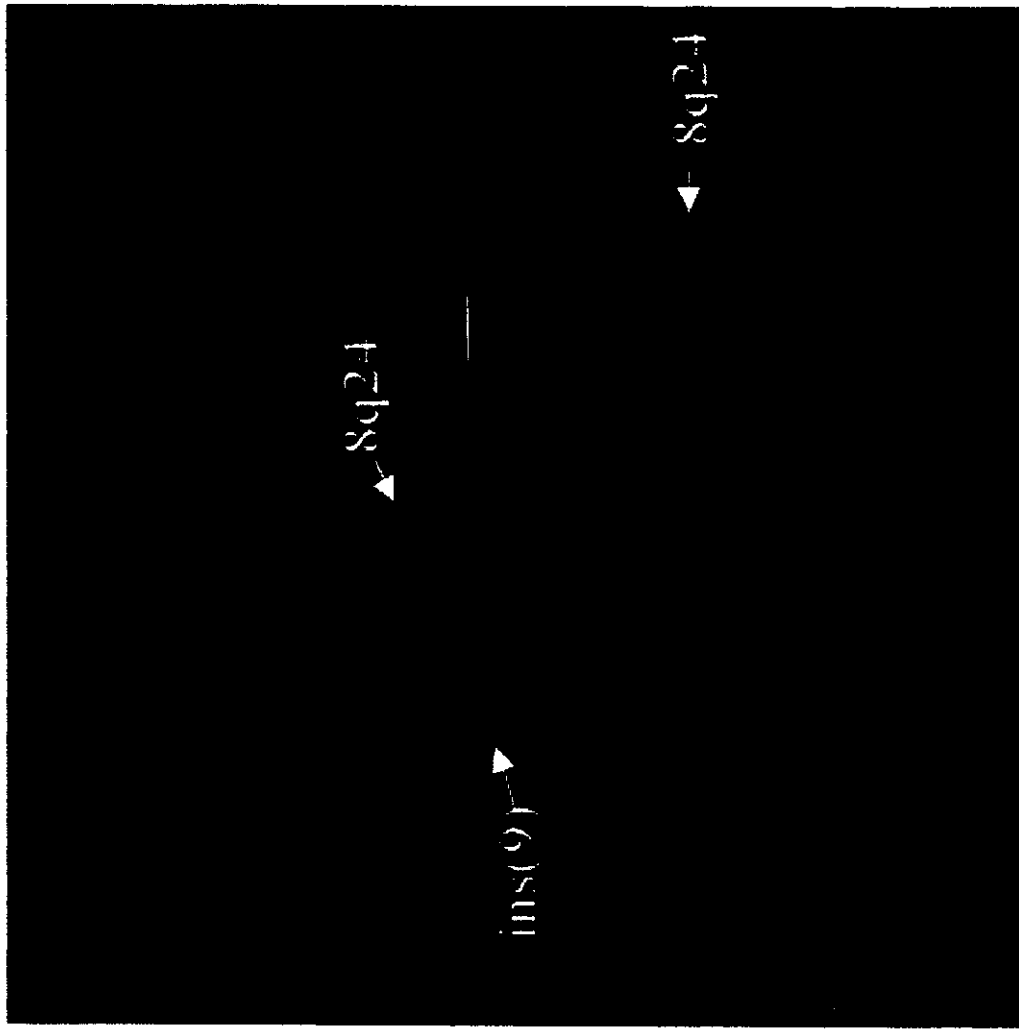


図11. c-mycプローブを用いたFISH解析

HL-60RG細胞



HL-60細胞

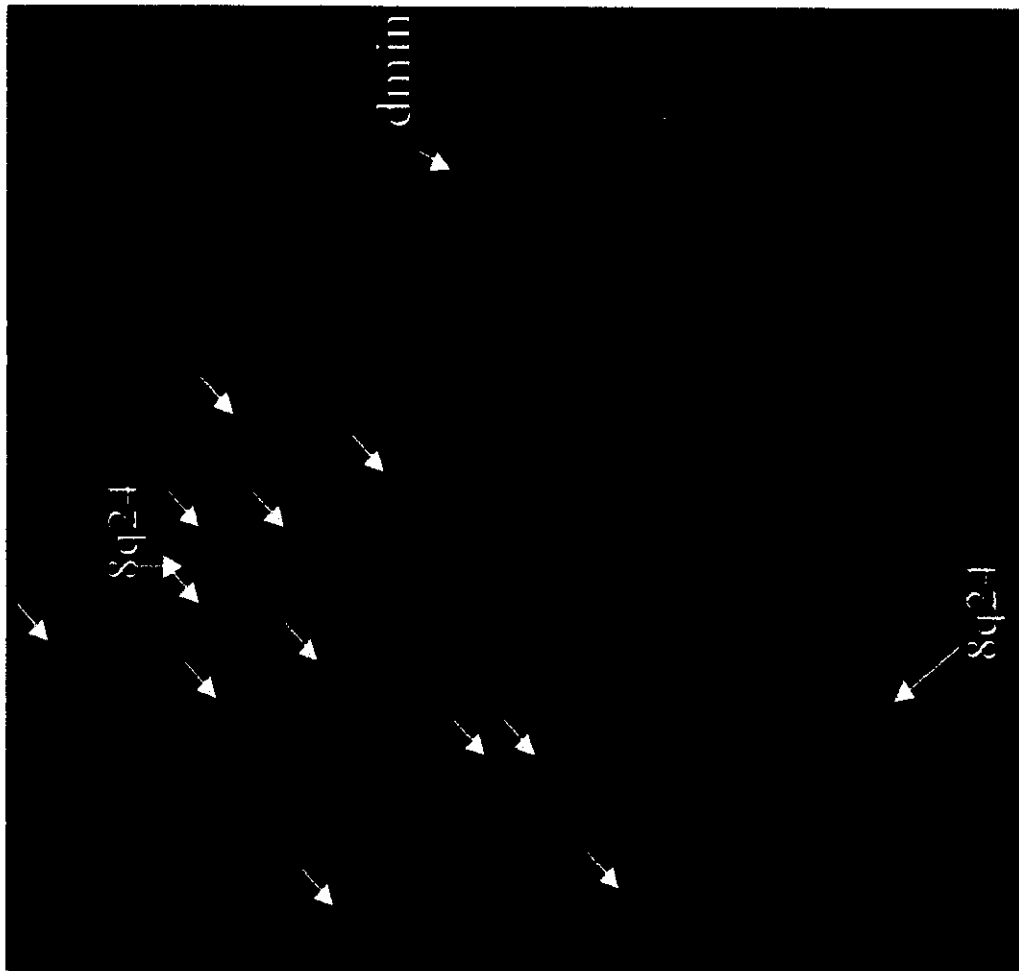
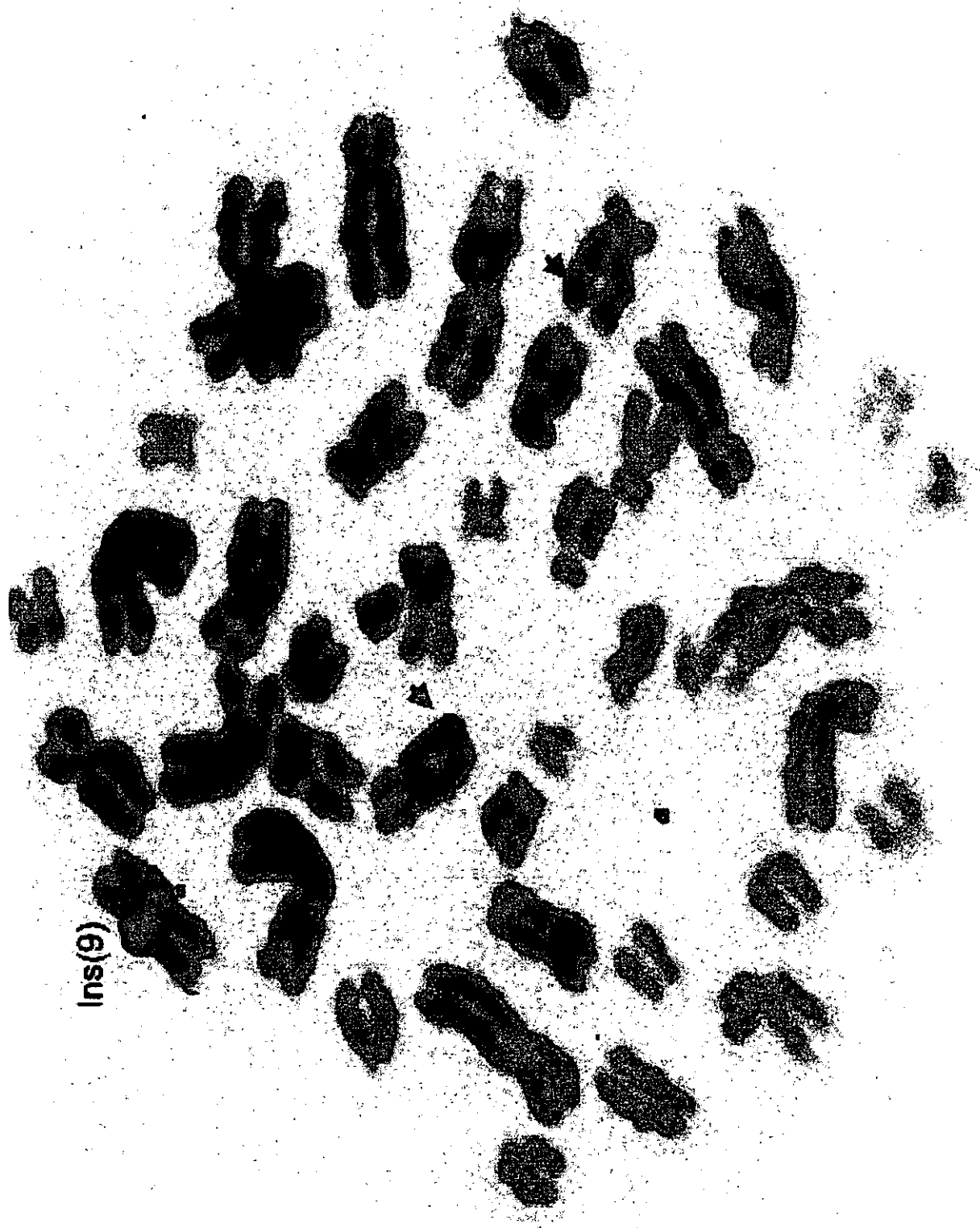


図12. c-mycプローブを用いたFISH解析とG-バンド解析を組み合わせた解析



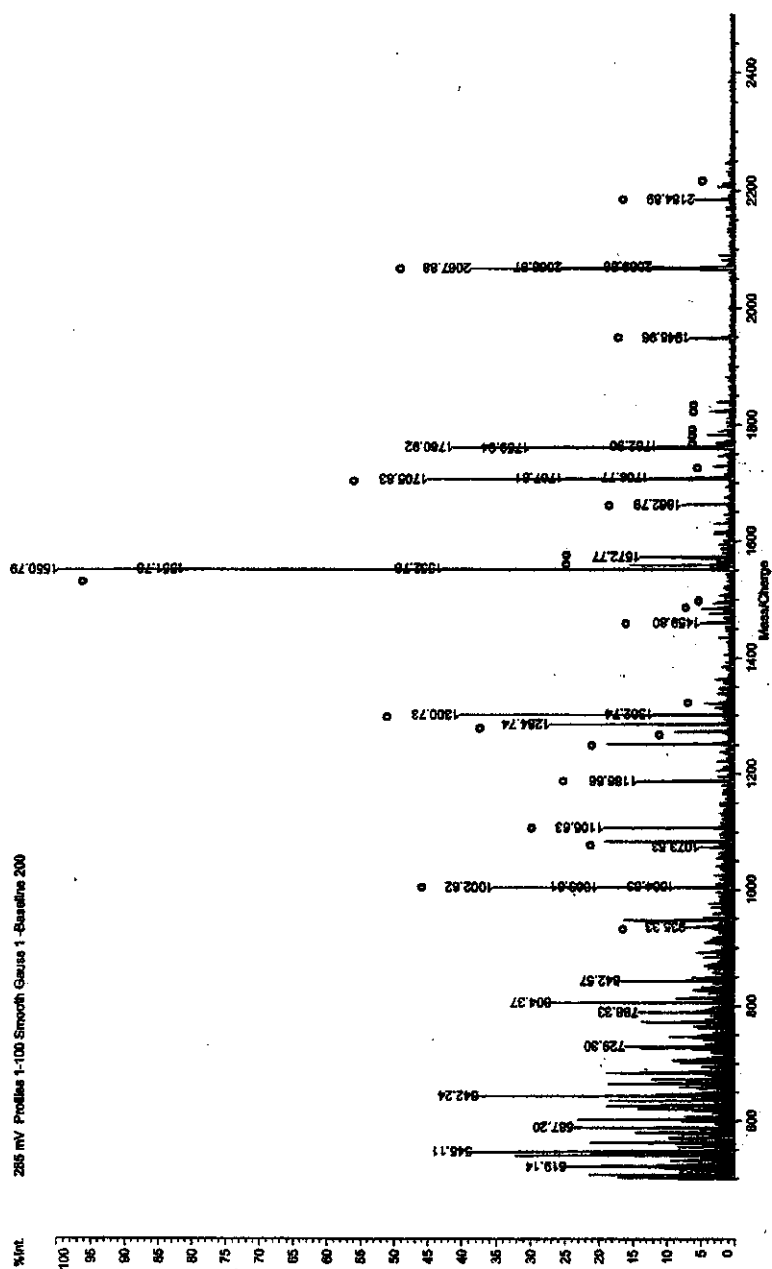


図13. HL-60RGの培養上清の二次元電気泳動のゲルから得たタンパク質をトリプシン消化したペプチドの質量分析スペクトル例
丸印の質量数をMascot検索に用いた。

細胞由来タンパク質プロファイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発

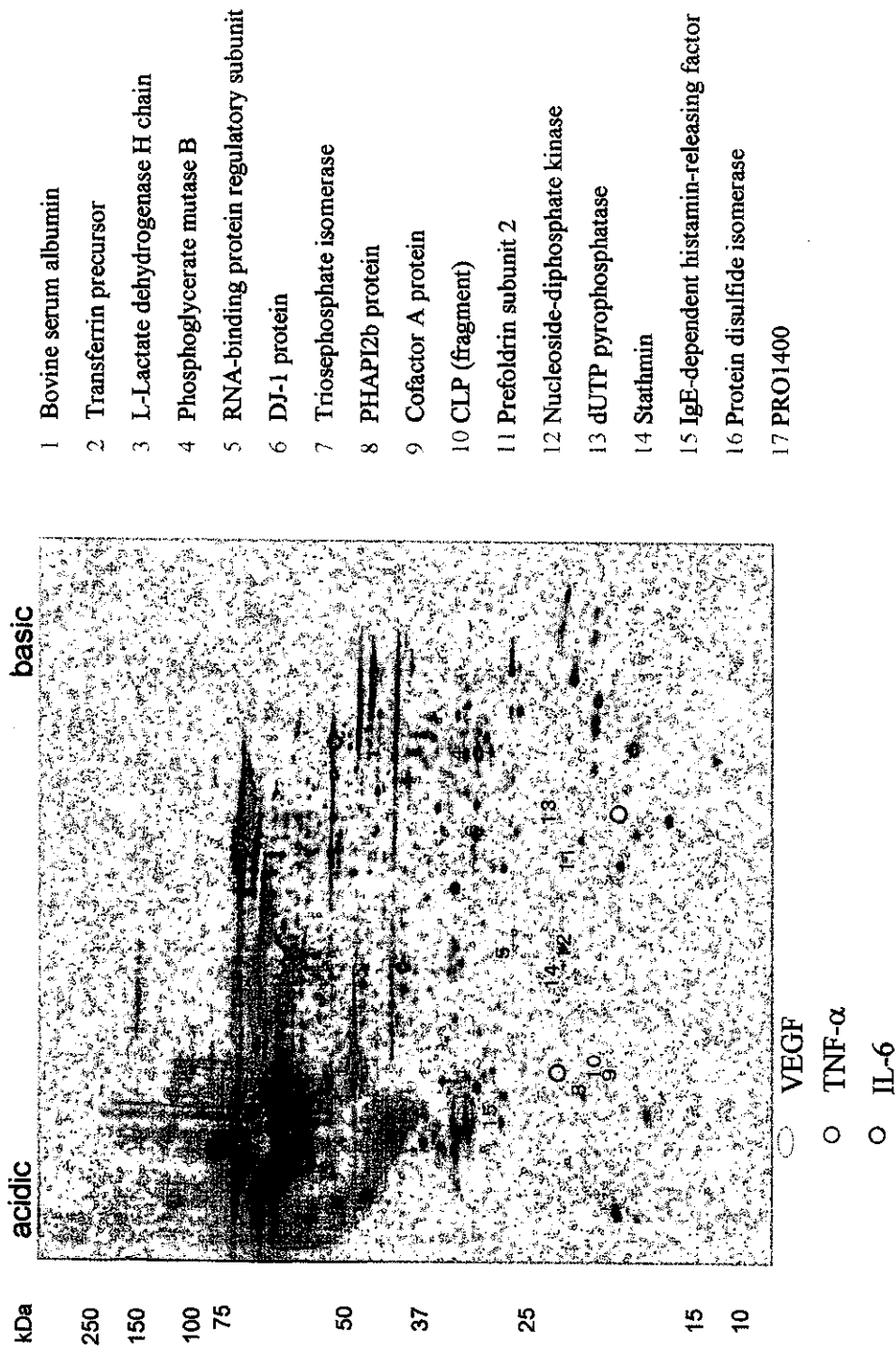
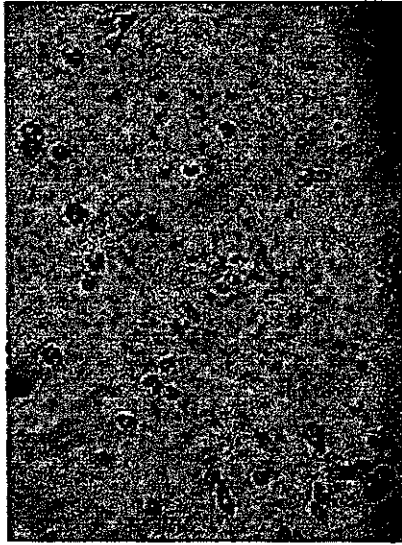


図14.HL-60RG培養上清中のタンパク質プロファイル

図15.. ヒト末梢血AC133陽性細胞とCD34陽性細胞の血管内皮細胞への分化能の比較

AC133 Positive Cells

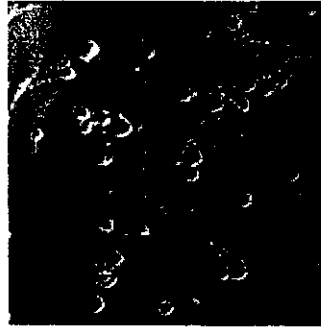


CD34 Positive Cells

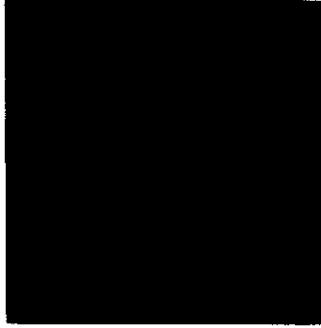


(a)位相差顕
微鏡観察

AC133 Positive Cells



CD34 Positive Cells

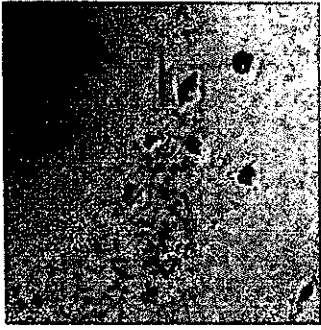
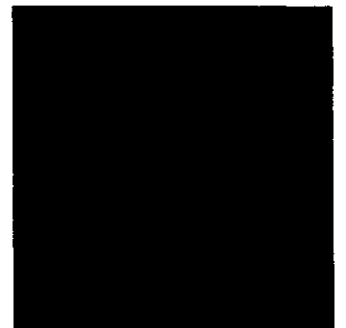
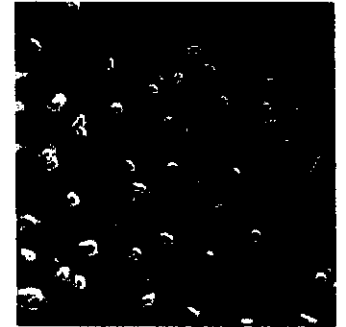


(b)蛍光染色
による分化
指標の観察

Acetyl-LDL



Von
Willebrand
Factor



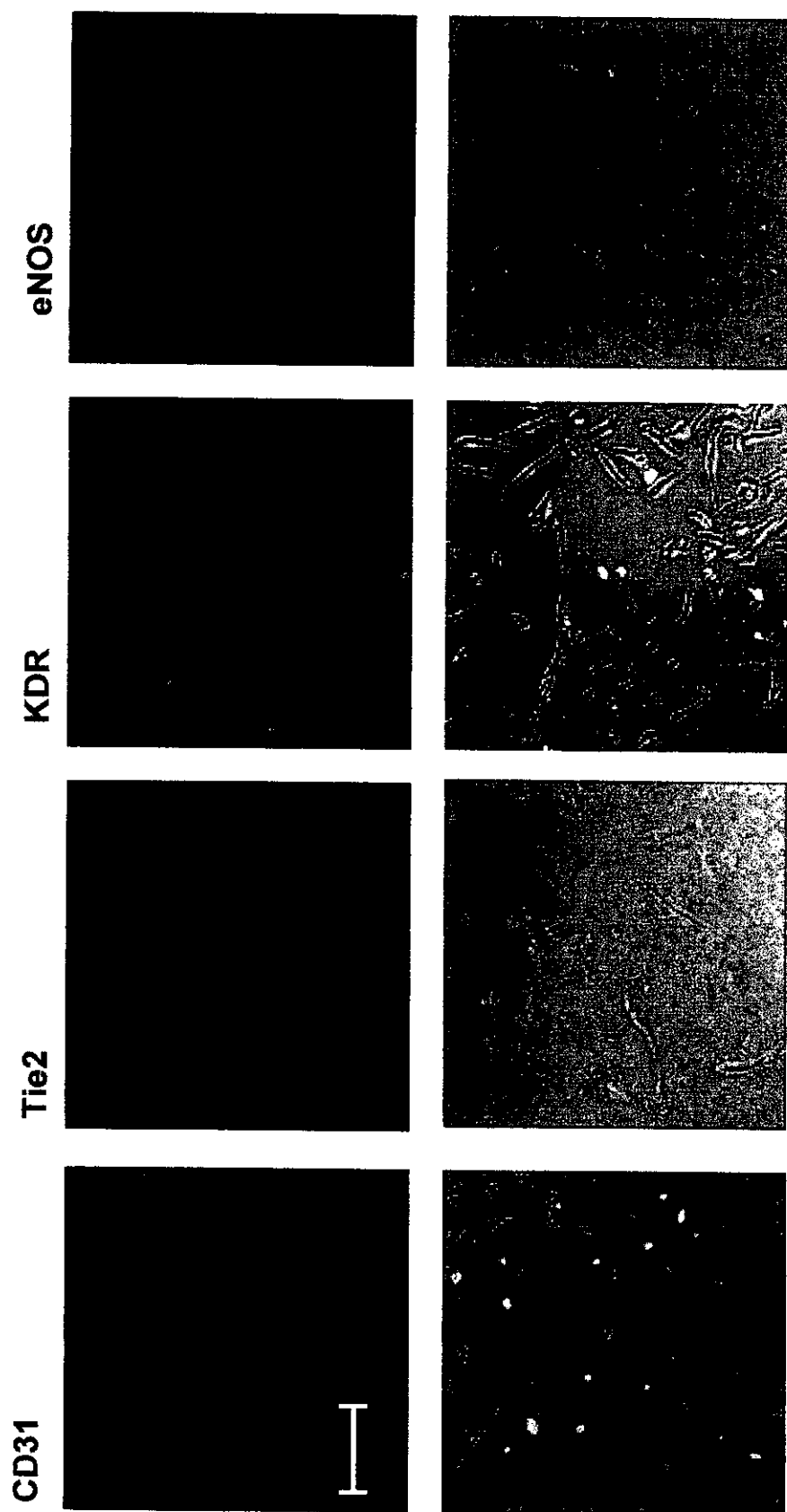


図16. ヒト末梢血AC133陽性細胞の血管内皮細胞への分化能
 ヒトAC133陽性細胞をVEGF存在下に2週間培養した後、各抗体を用いて蛍光染色した。

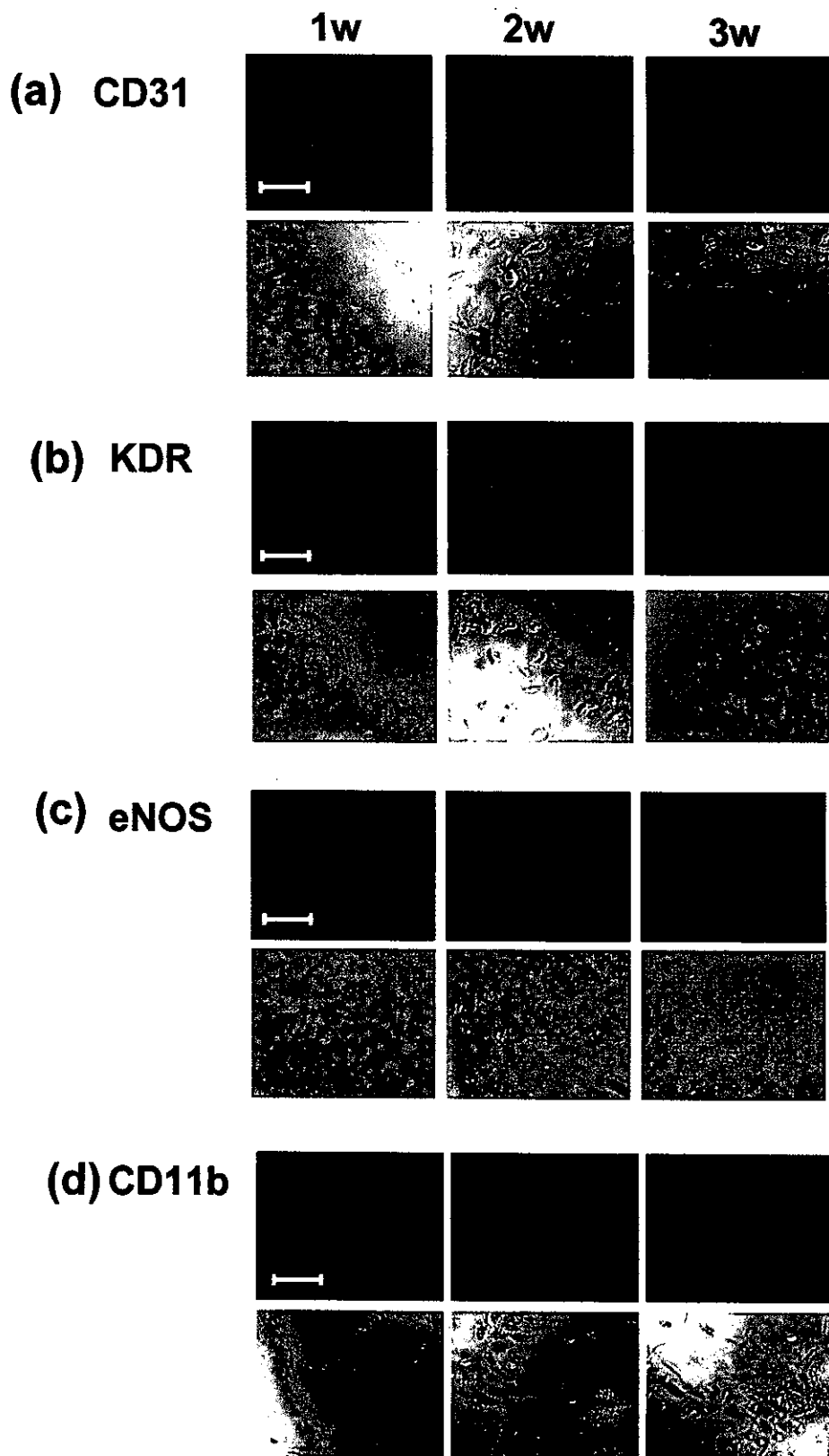


図17. 末梢血AC133陽性細胞から血管内皮細胞への分化過程における各種マーカーの経時的変化

図19-a 臍帯血AC133⁺細胞から血管内皮細胞への分化過程における
CD31発現の経時的変化

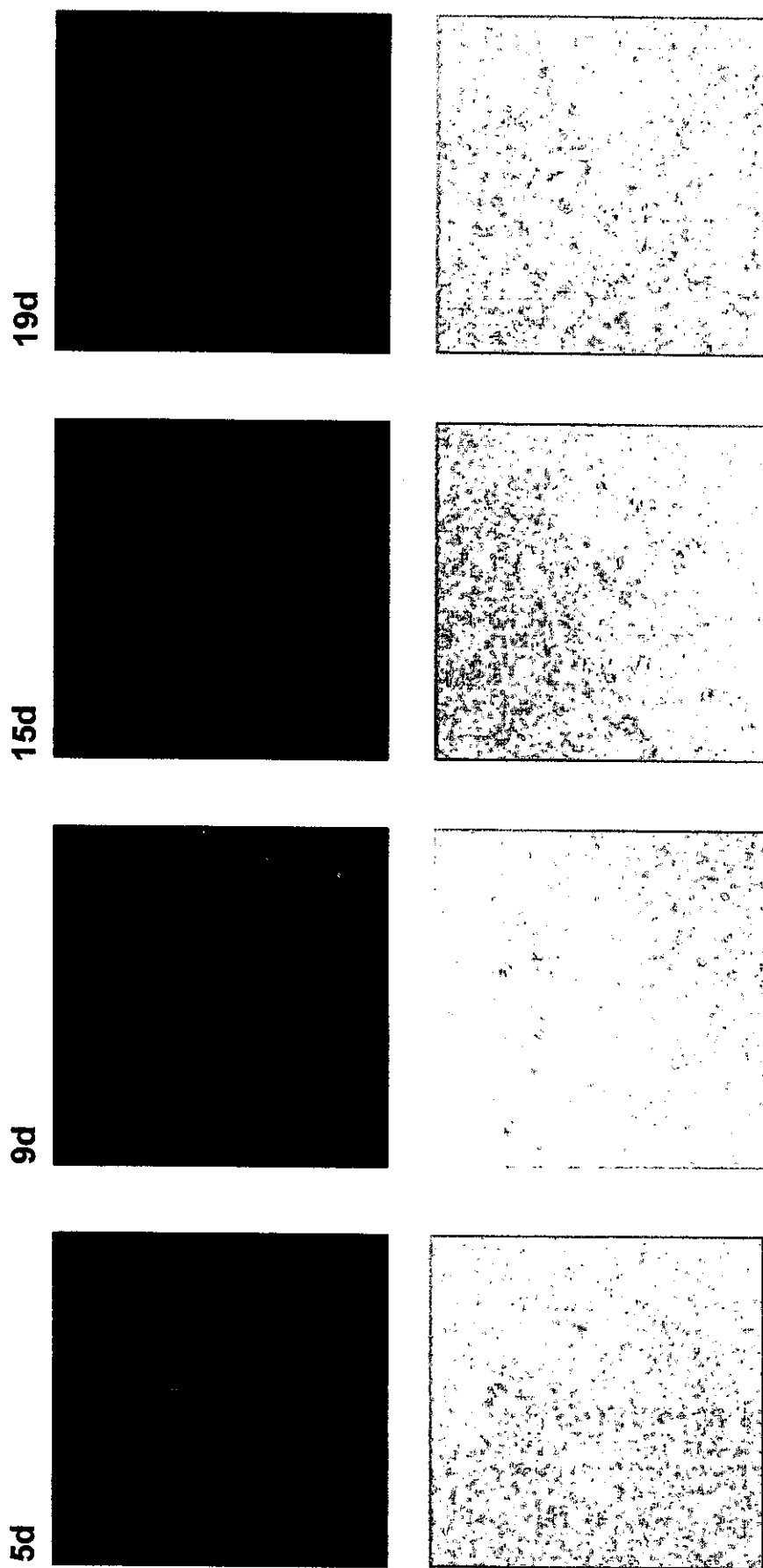


図19-b 臍帯血AC133⁺細胞から血管内皮細胞への分化過程における
KDR発現の経時的変化

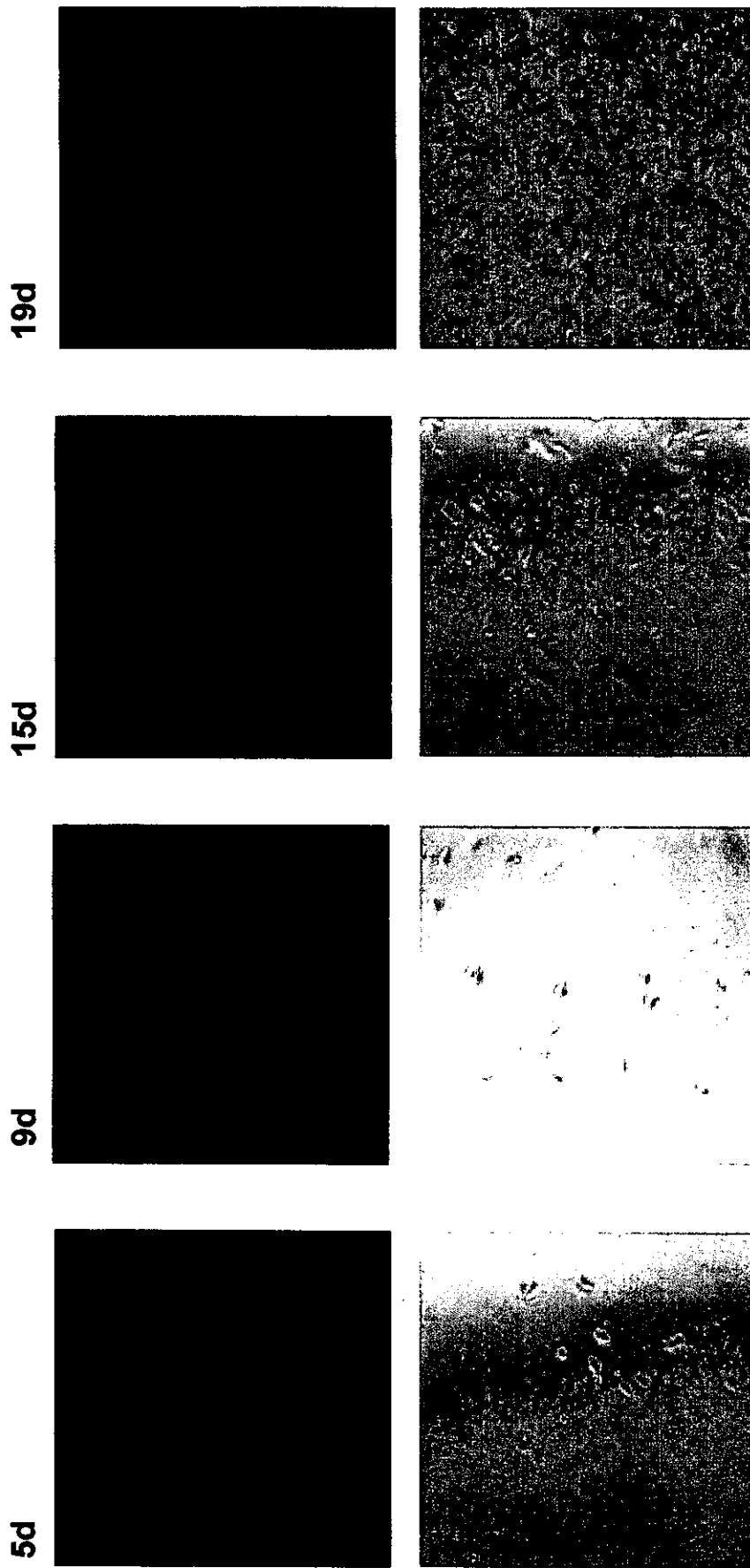
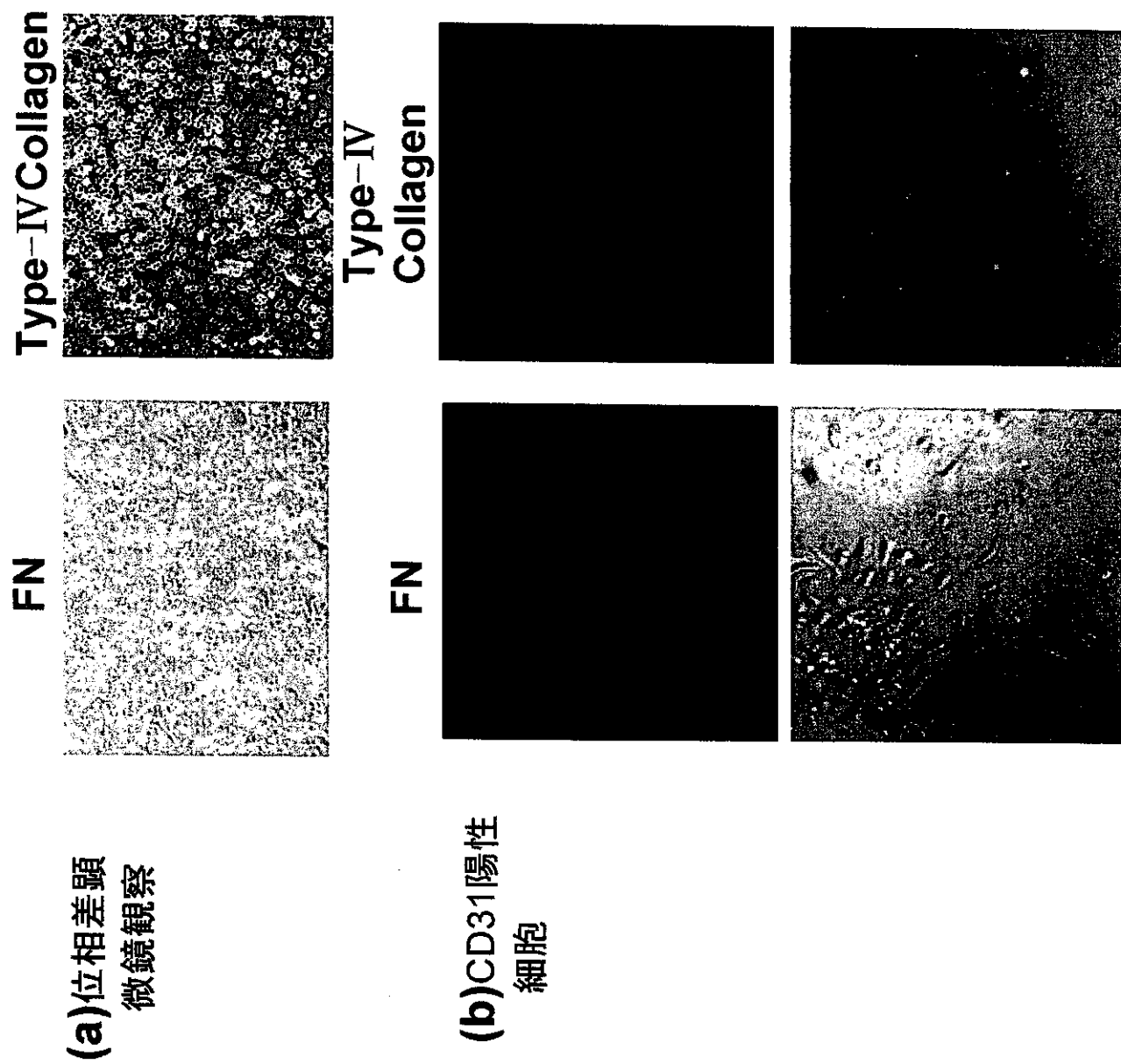
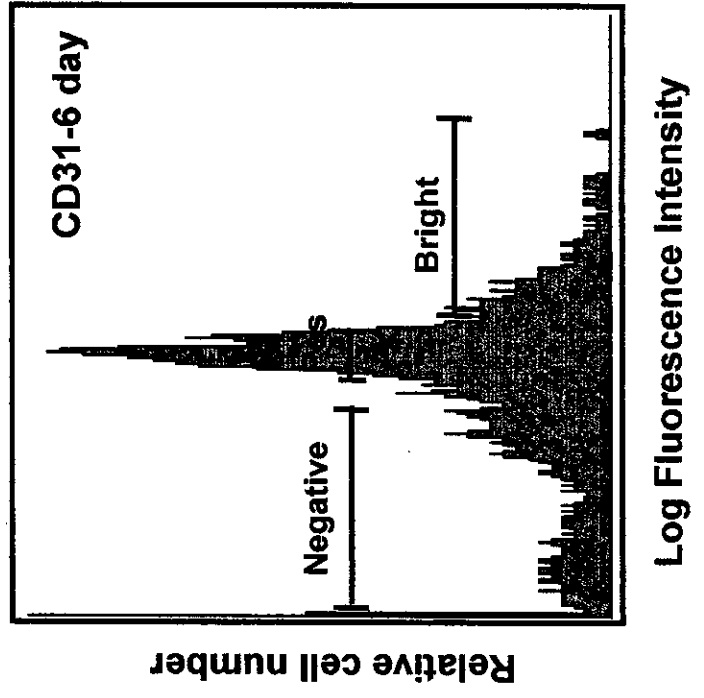
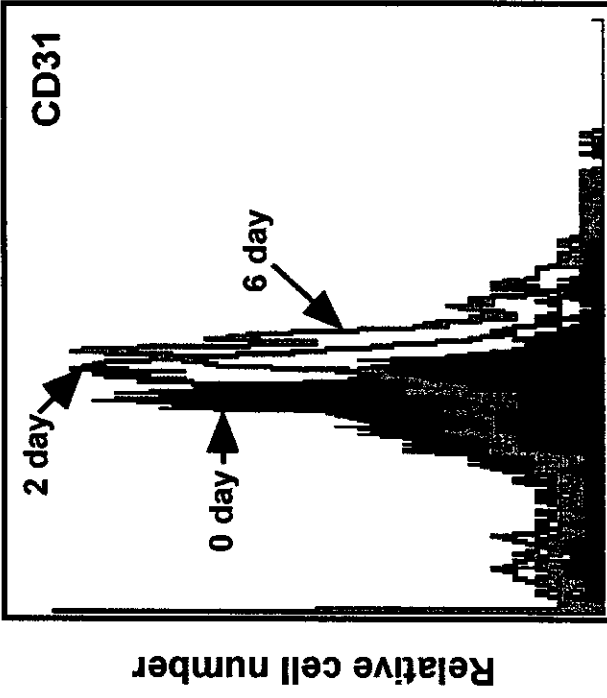


図19. ヒト末梢血AC133陽性細胞をFN及びType-IVコラーゲン上で培養した時のCD31陽生細胞の誘導



(b)



(a)

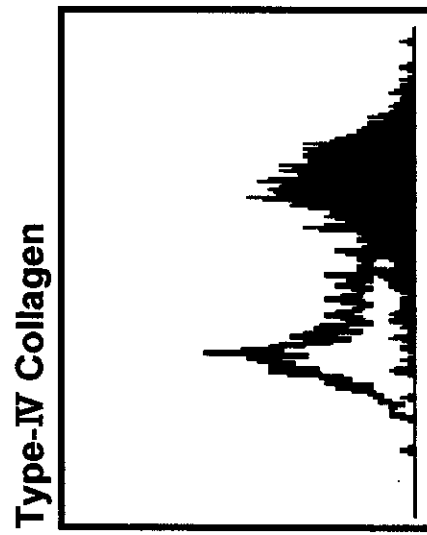
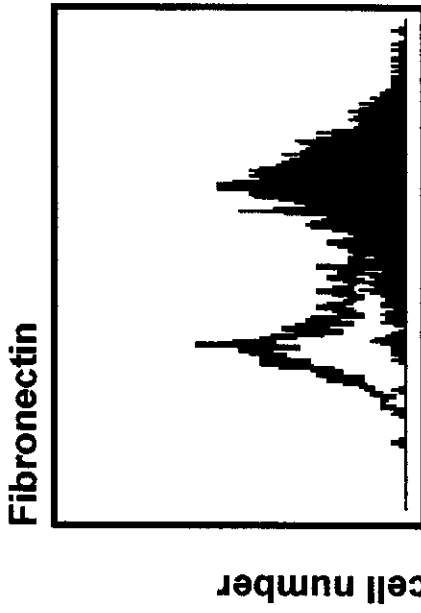


図20. ヒト末梢血AC133陽性細胞をFN及びType-IVコラーゲン上で培養した時のCD31陽性細胞の誘導

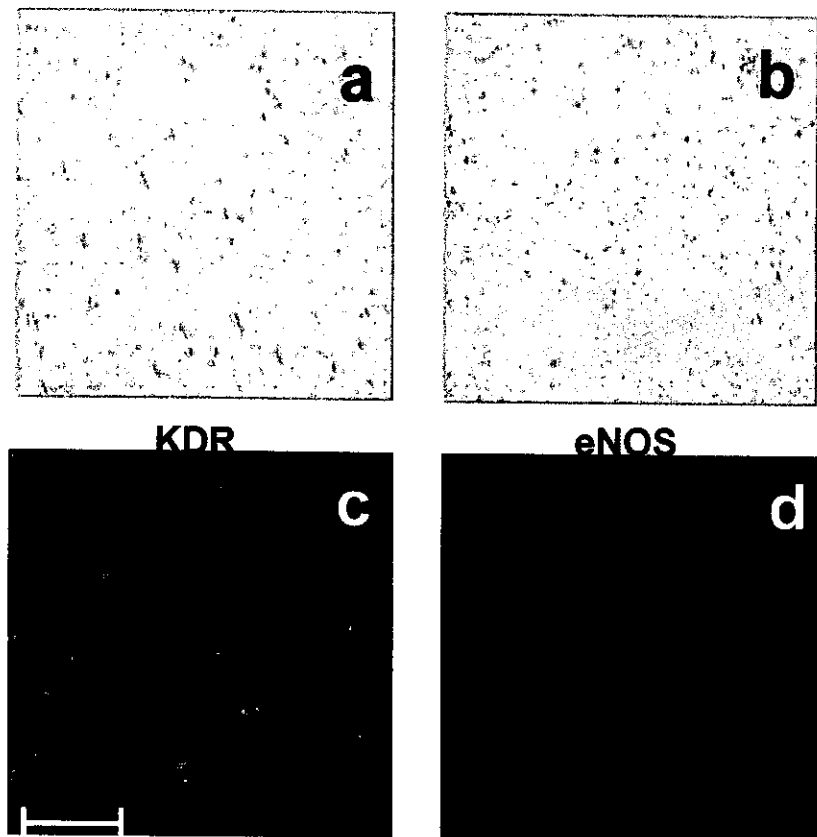
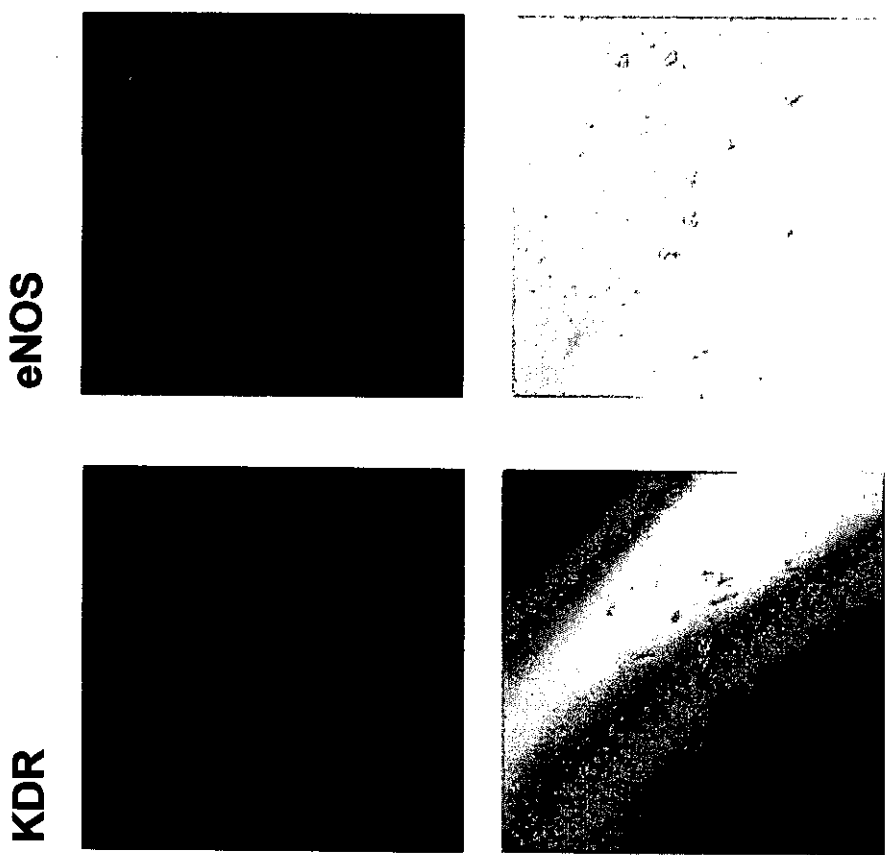


図21. ヒトAC133陽性細胞由来CD31強陽性細胞及び陽性細胞の血管内皮細胞への分化能

AC133陽性細胞を6日間培養した後、CD31強陽性細胞(a)及び陽性細胞(b)をソーティングし、VEGF存在下さらに1週間培養した。接着細胞が観察されたCD31強陽性細胞において、KDR(c)及びeNOS(d)の発現を調べた。

図22 臍帯血AC133⁺細胞由来CD31強陽性細胞の
分画・培養後におけるKDR、eNOS発現



細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第3室長

要旨

組織・細胞加工医薬品等から分泌される目的タンパク質の生体内発現量や体内動態に関する新規評価法の開発を目的とする研究を行なった。TNF- α および心筋ナトリウムカルシウム交換体 NCX についてフルオレッセイン誘導体 FIAsh (4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein) に特異的に結合するタグペプチドを C-末端に導入したタンパク質の発現ベクターを作成し、それぞれ HeLa 細胞および CCL39 細胞に発現させ、その機能の変化を測定した。その結果、タグペプチドを付加された TNF- α はマウス L929 細胞に、TNF- α と同様の細胞壊死作用を示すことが明らかになり、またタグペプチドを付加した NCX は、NCX とほぼ同様のナトリウムカルシウム交換活性を示した。これらの結果はこれらタンパク質の機能に影響することなく FIAsh 反応性タグペプチドの導入が可能であり、この方法が内因性タンパク質の蛍光標識法に利用できる可能性を示したものである。

A. 研究目的

細胞治療においては、細胞本来の機能、あるいは遺伝子組換えによって目的とする機能を付与した細胞を利用することが多いが、この場合通常細胞の機能は細胞によって合成される機能性タンパク質によって担われる。したがって、これら細胞・細胞加工医薬品として用いる細胞を評価する場合、細胞を生体内に適用した場合の機能性タンパク質の発現を含めた体内動態を評価することは極めて重要といえる。しかしこの場合、バイオテクノロジー医薬品の体内動態の評価に用いられるような放射線同位体標識タンパク質の利用は困難である。そこで、通常液体クロマトグラフィーを中心とした測定、あるいは免疫化学的手法を利用した測定法が用いられる。しかしながら、十分な感度が得られない場合、あるいは適切な抗体が得られない場合も少なくない。

そこで、本研究では細胞・細胞加工医薬品の体内動態の解析に応用可能なタンパク質の体内動態解析法の開発を目的とした研究を行なった。方法としては、細胞内で発現する内因性タンパク質の新しい蛍光標識物質として発表された FIAsh (4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein) (*Science*, **281**, 269-272 (1998)) の利用の可能性を検討した。この物質はフルオレッセイン誘導体であり、-CCXXCC- (C はシステイン、X はシステイン以外の任意のアミノ酸) というアミノ酸配列を含む α -ヘリックスに特異的に配位し、強い蛍光を発するという特性を有する。したがって、このアミノ酸配列を含むタグペプチドを目的タンパク質に導入し発現させれば、目的タンパク質の簡便な蛍光標識法としての応用が可能と考えられる。同様の目的で用いられる蛍光標識物質としては、緑色蛍光タンパク質 Green Fluorescence

Protein (GFP)が既にあるが、FIAsH 特異的タグペプチドは GFP に比較してはるかに小さいため (GFP は 238 個のアミノ酸からなるのに対し、20 個弱のアミノ酸で足りるとされている)、目的タンパク質の機能および生体内動態への影響を小さく抑えることができると期待される。

本研究では初年度は FIAsH 標識の定量が容易である GFP 誘導体 ECFP をモデル目的タンパク質として選び、血中のタグペプチド結合 ECFP への FIAsH 標識条件を検討するとともに、血中でも定量的な標識が可能なことを明らかにした。今年度はモデル化合物として TNF- α およびナトリウムカルシウム交換体(NCX)をえらび、タグペプチドを導入させたタンパク質を発現させて、機能への影響を検討した。

B. 研究方法

1. TNF- α に関する実験

1-1. 試薬: FIAsH は FIAsH-EDT₂ (EDT:1,2-ethanedithiol) として Aurora Bioscience Corporation (San Diego, CA, USA)から購入した。pCMV-TNF および pShuttle は水口博士(国立医薬品食品衛生研究所)から供与された。pEGFP-N1 は CLONTECH Laboratories から購入した。

1-2. プラスミドの作製: 制限酵素による切断は約 1 μ g プラスミド溶液, 3 μ l 0.1%BSA, 3 μ l NEBuffer, 2~20unit 制限酵素 を含む全量 30 μ l の溶液をエッペンドルフチューブに入れ、37°C で 2 時間インキュベートすることによって行った。作製した DNA フラグメントは 0.7%アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドを切り出し回収することによって精製した。

1 μ l 0.1%BSA, 1 μ l T₄DNA Ligase Buffer, 1 μ l ベクター, 3 μ l インサート, 0.8 μ l T₄DNA Ligase を加えた全量 10 μ l の超純水溶液中で 17°C で 2 時間以上インキュベートすることにより Ligation を行った。

1-3. 形質転換: Competent Cell high E.coli DH5 α (東洋紡績) 20 μ l と 1-2 で作られたプラスミド

5 μ l を滅菌チューブに取り、水中に 30 分放置した。42 μ lの水浴中で 30 秒間ヒートショックを行った後、2 分間水中で冷却し、SOC medium(2% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl) を 180 μ l 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。次いでカナマイシンの入った LB/K プレートに播種し、37°C インキュベーターで一晩培養した。培養後プレートから数個のコロニーを選択し、2~3 ml の LB/K 液体培地で 37°C, 8 時間以上振盪培養した。

1-4. プラスミドの調製 (アルカリミニプレップ法): 1-3 の大腸菌培養液を 1.5ml とり、10,000 \times g で 1 分間遠心し上清を取り除いた後、100 μ l の solution A (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl, pH8.0) で懸濁させ、水中で 2~3 分冷却した。さらに 200 μ l の solution B (0.2N NaOH, 1%SDS) を加え軽く混ぜた後、150 μ l の solution C (5M potassium acetate, pH4.8) を加えよく攪拌し、水中で 2~3 分冷却した。次に 10,000 \times g で 5 分間遠心し、上清をとり 300 μ l の Phenol/Chloroform を加え、攪拌後 10,000 \times g で 5 分間遠心した。この水層に EtOH を 900 μ l 加え、混和、さらに 10,000 \times g で 5 分間の遠心した後、上清を取り除き、70% EtOH200 μ l を加え、再び 10,000 \times g で 2 分間遠心、上清を取り除いた後乾燥した。これを RNaseA を含む Tris-EDTA 緩衝液 (pH8.0) 20 μ l で均一に懸濁した。

1-5. 調製したプラスミドの確認: 0.7%アガロースゲルで電気泳動し、そのサイズによって確認するとともに、シークエンスし、塩基配列を確認した。解析はパソコンソフト ABI PRISM 310 Collection で行った。

1-6. プラスミドの大量調整: QIAGEN Plasmid Maxi Kit を用いてより純度の高いプラスミドを精製した。操作はマニュアル通りに行った。

1-7. 融合タンパク質の発現: HeLa 細胞をペニシリン 100 units/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、グルコース 1g/l を含んだ 10%FCS-DMEM を培地として 60mm dish で 37°C, 5%CO₂ / 95%

air インキュベータ中で培養した。継代には 0.25% Trypsin-1mM EDTA を用いた。用意したプラスミドを HeLa 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクトは QIAGEN Effectene Transfection Reagent を用いて行った。

1-8. ウェスタンブロット： トリクロロ酢酸沈殿法により培養液を濃縮したものをサンプルとした。15%アクリルアミドゲルを用いて、20mA で約 1 時間泳動を行った。プロットは常法に従って行った。検出は Amersham ECL Western blotting detection reagent を用いて行った。

1-9. 細胞障害活性測定：測定には TNF- α に強く感受性を示す、マウス L929 細胞を用いた。培養のための medium に 10%FCS-MEME を用い、他は 1-7 の HeLa 細胞の培養と同じ方法で培養した。TNF- α を発現させた細胞の培養 medium を 4 段階に希釈し 50 μ l ずつ分注した。これにアクチノマイシン D を 1 μ g/ml となるように加えた。60mm dish でサブコンフルエントに培養したマウス L929 細胞を、Trypsin-EDTA で処理して剥がしたものを、12ml に浮遊させた細胞培養液を 100 μ l ずつ分注し、37°C、5%CO₂/95%Air のインキュベーター中で 12~20 時間培養した。顕微鏡で細胞の状態を確認した後、アラマーブルーを 10w/v% となるように添加し、37°C、5%CO₂/95%Air のインキュベーター中で 3~4 時間培養した後、530nm 励起による 590nm 蛍光を測定した。

1-10. 蛍光スペクトルの測定： HeLa 細胞の培養液をチューブに採り、13,000 \times g で遠心、上清のみ回収した。FlAsH による標識は β -メルカプトエタノール 1 mM、FlAsH-EDT₂ 1 μ M、EDT 10 μ M となるように添加し、水中で約 10 分間反応させることを行った。場合によっては培養液を以下の様な処理をした後、標識した。即ち、緩衝液として 100mM Tris-HCl pH7.4 (at 4°C) を用い分画分子量 12,000~14,000 の半透膜で dialysis を約 24 時間行い、その後分画分子量 5000 の限外濾過メンブレンで濃縮し、0.5M Tris-HCl pH7.2 で 200 μ l とした後、測定した。

2. 心筋ナトリウムカルシウム交換体の実験

2-1. 心筋ナトリウムカルシウム交換体発現用プラスミド pKCRH-NCX1、および昨年度使用した ECFP-TG pcDNA3 から Griffin らの方法 (*Science*, 281, 269-272 (1998)) に準じて、C-末端に FlAsH 反応性ペプチド AEAAAREACCRECCARA 遺伝子を導入した発現用ベクターを作製した。

2-2. 細胞培養：CCL39 細胞は 8% FCS, penicillin 50mg/ml および streptomycin 50mg/ml を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium 中で培養した。細胞への発現用ベクターのトランスフェクションは QIAGEN Effectene Transfection Reagent を用いて行った。

2-3. ウェスタンブロットによるナトリウムカルシウム交換体の検出：細胞を氷冷した PBSCM (0.1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ を含んだリン酸緩衝液 pH7.2) で洗浄した。次に細胞を 0.5mM biotin maleimide を含む PBSCM 中で 30 分、室温でインキュベートした。2%の 2-mercaptoethanol を含む PBSCM で洗浄後、細胞を培養ディッシュからはがし、懸濁させ遠心管に集めた。遠心管の中で細胞を可溶化緩衝液 (10mM HEPES/Tris(pH7.4), 150mM NaCl, 1% Triton X100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM benzamide) 0.8ml で処理した。遠心後、上清を streptavidine-agarose ビーズとインキュベートした。ビーズを可溶化緩衝液で洗浄し、続いてタンパク質を Laemmli's 緩衝液中で煮沸させてタンパク質を遊離させた。このタンパク質を 7.5%ゲルで SDS-PAGE を行い、常法に従ってウェスタンブロット染色した。

2-4. Na⁺依存性 ⁴⁵Ca²⁺取り込みの測定：細胞に Na⁺を負荷するためにコンフルエント細胞を 0.5ml の 1mM ouabain と 10mM monensin を含んだ BSS 溶液中 (10mM HEPES/Tris (pH7.4), 140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 10mM glucose, 0.1% BSA) で 20 分間 37°C でインキュベートした。次に Ca²⁺を除いた溶液で細胞を一度洗浄した。⁴⁵Ca²⁺の取り込みは、0.5mM ⁴⁵Ca²⁺, 1mM

ouabain, 10mM verapamil を含んだ Na^+ -free BSS 溶液から正常 BSS に溶液を代えることで開始した。20 秒インキュベートした後、10mM Hepes/Tris (pH7.4)、120mM NaCl, 10mM LaCl_3 を含む溶液で 4 回洗浄することにより、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みを止めた。細胞を 0.1M NaOH で溶解して放射活性を測定した。 Na^+ 依存性 Ca^{2+} 取り込み活性は、 Na^+ -free BSS 中での取り込み量から正常 BSS 中での取り込み量を引くことによって求めた。

C. 研究結果

1-1. TNF- α へのタグペプチド付加の分子設計

TNF- α (tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) は活性化マクロファージなどが産生するサイトカインであるが、ある種の腫瘍細胞ではポトーシスを誘発し、細胞壊死作用を有する。157 個のアミノ酸からなり、分子量は約 17,000 のタンパク質である。アポトーシス誘導活性以外にも転写因子である NF- κ B の活性化といった多様な生物活性を有する。TNF- α が活性を示すには 3 量体となってレセプターに結合する必要があるが、図 1 中の小さな点で表わされたアミノ酸は 3 量体になる時やレセプターに結合する際に認識される部位であると考えられている (*EMBO Journal*, 10, 827-836 (1991))。そのためタグを付加する際はこれらの認識部位を妨げないようにする必要がある。また N-末端側には分泌シグナルがあるため、N-末端周辺にタグペプチドを付加することによってタンパク質の分泌に異常が生じる可能性が考えられた(図 2)。したがって、活性に影響することなくタグペプチドを付加するサイトとしては、EF-loop への挿入、あるいは C-末端への付加が考えられた。この二つのうち、EF-loop への挿入は TNF- α の立体構造を不安定化する可能性があるため、C-末端にタグペプチドを付加した融合タンパク質を作製することとした。

具体的には TNF- α 配列の 3' 末端近くに BsrDI 部位および KpnI 部位があるので (図 3)、この間

に FIASH の配列 (図 3) を挿入した。図 4 に pTNF-tag 発現プラスミドの作製法をまとめて図示した。

1-2. TNF- α -tag 発現プラスミドの作製

図 4 に従って操作を行い、各段階ごとに 0.7% アガロースゲルでの電気泳動を行いプラスミドやフラグメントのサイズを確認するとともに、合成オリゴヌクレオチドをリンカーとして組み込んだ際にはシークエンスを行ってその結果からも塩基配列を確認した。次に市販キットを用いて、大量の pTNF-tag 発現プラスミドを得た。

1-3. TNF- α -Tag の発現の確認

1-2 で得た発現プラスミドおよびコントロール細胞には pShuttle を HeLa 細胞にトランスフェクトしてその発現を確認した。トランスフェクト後 1 日経過して細胞を観察すると、pTNF-tag をトランスフェクトした細胞では一部の細胞で明らかな細胞死が観察された(図 5)。2 日後では pCMV-TNF においても細胞死が観察され、pTNF-tag では 50% 以上の細胞が死亡していた。そこで 2 日目の培養液について、ウェスタンブロットによって TNF- α の発現を確認した。その結果、pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清には、17kD 付近に TNF- α 抗体によって染色されるタンパク質の発現が確認された。一方、pCMV-TNF をトランスフェクトした細胞の培養液上清にも、同様にタンパク質の発現が観察されたが、その量は少なかった (図 5)。

1-4. pTNF-tag によって発現したタンパク質の細胞壊死作用の確認

1-3 で得た培養液について、マウス L929 細胞への細胞毒性を測定した。pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清は、L929 細胞数に対して明らかな細胞壊死作用を示した。一方 pCMV-TNF を発現させた細胞の培養液上清の効果は弱いものであった (図 6)。そこで次に市販

の組換えヒト TNF- α (和光純薬製) との比較を行った。すなわちウェスタンブロットにおいて、上記 pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清の染色は 5ng/ml の TNF- α とほぼ同様であった。そこでコントロールである pShuttle をトランスフェクトした細胞の培養液上清に 5ng/ml の TNF- α を添加した溶液と pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清を比較してみたところ、ほぼ同等の細胞壊死活性が示された (図 7)。以上の結果から、TNF- α -tag タンパク質は TNF- α と同等な生物活性を有することが推測された。

1-5. 発現した TNF- α -Tag タンパク質の FIAsh による標識

各ベクターをトランスフェクトした HeLa 細胞の培養液上清をとり、昨年度確立したと同様の方法で FIAsh 標識を試みた。図 8 はその結果を示している。図 8-(a) は pTNF-tag をトランスフェクションした細胞の培養液の FIAsh 添加後の蛍光スペクトルである。508nm 励起によって 535nm 付近に蛍光ピークが観察された。一方、図 8-(b) は pShuttle をトランスフェクションした細胞の培養液について同様に FIAsh を添加してみたものであるが、この場合でも 70%程度であるが同様の蛍光スペクトルが観察された。この結果は培養液中に FIAsh 陽性の物質がある可能性を示唆している。FIAsh 陽性の物質としてはポリペプチドが考えられる。そこで培養液を分画分子量 12,000 ~14,000 の半透膜で透析し、さらに分画分子量 5000 の限外ろ過メンブレンで濃縮した後に同様の FIAsh 処理を行ってみたが、このような処理をしない場合とほぼ同様の結果が得られた。

2. ナトリウムカルシウム交換体へのタグペプチド付加の影響

2-1. タグの付加にあたっての戦略

哺乳類のナトリウムカルシウム交換体には 3 種のアイソフォームがあることが知られている。

今回は心筋に多いナトリウムカルシウム交換体 NCX1 を取り上げた。NCX1 は 970 のアミノ酸からなり、形質膜中に存在する 110kDa のタンパク質である (図 9)。N-末端の 32 個のアミノ酸がシグナル配列として機能して形質膜に挿入されるが、この配列はタンパク質が成熟する過程で切断される。このタンパク質は 9 回貫通型のタンパク質と考えられているが、およそ半分は膜内に存在し、残りの半分 (550 アミノ酸残基) は細胞質に局在する。後者は交換体としての機能とは関係がないとされている。N-末端は細胞外にあり C-末端は細胞質側にある (*Circ. Res.*, **88**, 864-876 (2001))。したがって、C-末端へタグペプチドを挿入した。

2-2. タグペプチド付加 NCX1 の発現

図 10 は CCL39 細胞に発現させたタグ付心筋 NCX1 のウェスタンブロットによる染色像である。110kDa 付近の染色像が NCX1 であり、70kDa 付近の染色像はその分解物と考えられている。左の写真の右のレーンはコントロール細胞であるが、CCL39 細胞には、内在性に NCX が発現していることが知られており、それに対応するバンドが観察された。左のレーンは NCX1 遺伝子を導入した細胞における染色像で、明らかにコントロール細胞より強い染色像が得られた。右のウェスタンブロットでは左がタグを付加した NCX1 を発現させた細胞、左が NCX1 を発現させた細胞である。

2-3. タグペプチド付加 NCX1 のナトリウムカルシウム交換活性

図 11 は、図 10 でタグペプチド付加 NCX1 確認した細胞についてナトリウムカルシウム交換活性を測定して、NCX1 との活性を比較した結果である。ナトリウムカルシウム交換活性は、カリウムイオン存在下での Ca^{2+} の取り込み量とナトリウムイオン存在下での Ca^{2+} の取り込み量との差から計算されるが、タグペプチドを付加した

NCX1 細胞においては、NCX1 を発現させた細胞とほぼ同様の活性が観察された。

2-4. タグペプチドを付加した NCX1 の蛍光染色像

図 1 1 は、タグペプチドを付加した NCX1 を発現させた CCL39 細胞について、NCX1 抗体で免疫組織化学的に染色した場合の染色と、FIAsh による染色を比較したものである。NCX1 抗体で染色した細胞では、細胞膜領域が比較的選択的に染色されており、タグペプチド付加 NCX1 が形質膜に発現していることを示していると思われるが、一方 FIAsh 染色では細胞質領域までもが染色されているような蛍光染色像が得られた。

D. 考 察

本研究は 2 つの 2 連のシステイン間に 2 つのアミノ酸があるような一次構造(-CCXXCC-, X はシステイン以外の任意のアミノ酸)を含む α -ヘリックスに特異的に配位して、強い蛍光を生じるフルオレッセイン誘導体 FIAsh を利用して、目的タンパク質の蛍光標識に応用し、その生体内の動態解析法の開発を目指すものである。この方法が成立するには、

- (1) 上記構造を含むタグペプチドを付加した目的タンパク質の FIAsh 標識が定量的であること
- (2) 目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質の機能に影響をおよぼさないこと
- (3) 目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質そのものの動態に影響をおよぼさないこと

という条件をクリアーすることが好ましい。初年度は (1) についての検討を行い、血清中のタンパク質の定量的な標識条件を確立した。

そこで本年度は分泌タンパク質 TNF- α と形質膜のタンパク質 NCX をモデルにして、機能に影響

することなく上記構造を導入する方法を検討した。

TNF- α については C-末端へのタグペプチドの導入を行い発現させた。タグペプチド付きの TNF- α 発現用プラスミドをトランスフェクトさせた HeLa 細胞では、培養直後から細胞の壊死が観察された。さらにウェスタンブロットによって培養液中に TNF- α 抗体によって染色される約 17kD のタンパク質の分泌が確認された。またこの培養液はマウス L-929 細胞に対して細胞壊死作用を示すことも確認された。ウェスタンブロットでの染色を基準にして TNF- α との細胞壊死作用の強さを比較しても、ほぼ同様であることが推察された。今後生成したタンパク質につき大量に発現させ、精製して解析する予定であるが、タグペプチドを付加させることによる細胞壊死作用への影響は小さいものと思われる。

次にナトリウムカルシウム交換体についても、C-末端へのタグペプチドの付加はイオン交換活性に有意な変化を生じさせないことが確認された。現在のところ、イオン濃度等の条件を変化させた比較を行っていないので、交換活性の調節機構にいたるタンパク質の機能の変化の有無までは不明であるが、タグペプチド付加の影響は小さいものと考えられる。

このように、モデルタンパク質として試みた二つの機能性タンパク質において、タグペプチドの導入による機能変化は小さく、この方法はタンパク質の標識法として有望であることが示唆された。しかし一方で、この方法に対する問題点を示唆するようなデータも得られた。即ち、TNF- α の実験においては、培養液上清中のタンパク質を FIAsh 標識によって得られる蛍光スペクトルと、コントロール細胞の培養液上清の FIAsh 標識で得られる蛍光スペクトルとの差は小さく、培養液上清には何らかの FIAsh 反応性の物質が存在することが考えられた。この点については、FIAsh 反応性物質について血液との比較を行いながら、明らかにしなければならない問題と考えている。

さらに、NCX においても、問題が生じた。即ち、タグ付 NCX1 を発現させた細胞について NCX1 抗体によるタンパク質の染色像と FIAsh による染色像を比べてみると、前者では形質膜領域の染色が見られるのに、後者では細胞質領域の一部までも染色された。この結果は、FIAsh が目的タンパク質以外の物質まで反応している可能性を示唆している。このような結果と一致するように、最近 Stroffekova らも FIAsh が CCXXCC モチーフ以外のシステインリッチなタンパク質に結合する可能性を報告した (*Pflugers Arch - Eur J Physiol*, **442**, 859-866 (2001))。このような FIAsh 反応性の物質がある場合、本法の適用範囲が著しく制約されることが予想される。

来年度、研究のステップを進めて、タグペプチドの導入による目的タンパク質の動態への影響の検討を行うとともに、上に記したような FIAsh の結合の選択性の疑義について検討を行う予定である。

E. 研究成果

1. Toru KAWANISHI, Takehito KIUCHI, Hiroki ASOH, Rie SHIBAYAMA, Hiroshi KAWAI, Hisayuki OHATA, Kazutaka MOMOSE, and Takao HAYAKAWA : Effect of Tributyltin Chloride on Release of Calcium Ion from Intracellular Calcium Stores in Rat Hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.* **62**, 863-872 (2001)
2. HISAMITSU, H. OHATA, T. KAWANISHI, T. IWAMOTO, M. SHIGEKAWA, H. AMANO, S. YAMADA, and K. MOMOSE : A mechanism of Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores coupling to the Na^+/Ca^{2+} exchanger in cultured smooth muscle cells, *Life Sci.*, **69**, 2775-2787 (2001)
3. Haruko MASUMIYA, Junya KASE, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Setsuya MIYATA, Yoichi SATO, Ryu NAKAMURA, Hikaru TANAKA and Koki SHIGENOBU, Effect

of T-type and L-type Ca^{2+} channel blockade on early phase Ca^{2+} transients In rat atrial and ventricular cardiomyocytes, *Bioimages*, **9**, 87-93 (2001)

4. Hikaru TANAKA, Haruko MASUMIYA, Toshiyuki SEKINE, Junya KASE, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Setsuya MIYATA, Yoichi SATO, Ryu NAKAMURA, and Koki SHIGENOBU Involvement of Ca waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes, *Life Sci.*, **70**, 715-726 (2001)
5. Hikaru TANAKA, Eichi ISHII, R. FUJISAKI, Y. Miyamoto, Yoshio TANAKA, T. Aikawa, Toru KAWANISHI, and Koki SHIGENOBU, Effect of manganese on guinea pig ventricle. Initial depression and late augmentation of contractile force, *Biol. Pharm. Bulletin*, **25**, (In press)
6. H. TANAKA, K. NISHIMARU, R. MAKUTA, W. HIRAYAMA, T. KAWAMURA, T. MATSUDA, Y. TANAKA, T. KAWANISHI, and K. SHIGENOBU, Possible Involvement of prostaglandins $F_{2\alpha}$ and D_2 In acetylcholine-induced positive Inotropy In Isolated mouse left atria, *Pharmacology* (In press)