

平成13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

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の開発研究

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

長野哲雄	東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室
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
今泉祐治	名古屋私立大学薬学部薬品作用学教室
成田 寛	田辺製薬株式会社創薬研究所
中村 竜	カールツアイス株式会社顕微鏡部

要 旨 創薬のためのハイスループットスクリーニング (HTS) 系開発の基盤技術となる以下の開発研究を行った：(1) 蛍光制御理論の研究を通じた新規有機合成蛍光プローブのデザイン法の開発；(2) タンパク質チロシンリン酸化蛍光プローブの開発；(3) 多光子励起に適した蛍光プローブの検討；(4) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル (Kca チャネル) 作用薬の検索のための HTS 系の開発；(5) カルシウムイオン蛍光プローブ Yellow cameleon の解析条件の最適化研究

1. 研究目的

ポストゲノムを迎えて、これからの生物・医学研究の焦点は遺伝子の機能解析、およびタンパク質を中心とした遺伝子生成物の機能解析にうつることが予想される。医薬品開発においても、ゲノム解析によって明らかとなった遺伝子あるいは遺伝子生成物、およびその発現や機能を調節する物質をターゲットとして展開してゆくものと考えられる。これら新しい医薬品の研究開発をスピードアップさせるためには、効率的に細胞機能変化をスクリーニングできる解析系が必要となる。このような時代背景のもとに、本研究ではハイスループットスクリーニング (HTS) への応用を指向した細胞機能解析技術の開発をめざす。

HTS をめざす上で必要な要件としては、(1) 原理は複雑でも実験操作が簡便であること；(2) 大量のサンプルについて解析が可能なこと；(3) 操作の自動化が可能なこと、があげられる。しかしゲノムの構造解析と違って細胞機能は極めて多岐にわたり、解析手法もそれに応じて様々な特殊技術が使われているため、多くの細胞機能の解析に共通し HTS 化に直結する解析手法は少ない。そのような視点からみて、細胞機能の変化を光学的プローブを用いて光の強さあるいは色の変化として捕らえる解析法は、プレートリーダー等の測定機器を用いることにより、上記の要件を満たす極めて高効率の解析法になりうる。しかし、目的とする細胞機能を選択的に捕らえるためには、(1) 選択性の高いプローブの開発；(2) HTS に利用できる細胞の作製；(3) プローブの特性を考慮した測定及び解析機器類の考案、の3つの視点からの解析手法の開発が必要不可欠となる。研究班では以上の3つの視点について各研究者が機能的にリンクして研究を進める予定である。本研究では (1) 蛍光制御理論の研究を通じた新規有機合成蛍光プローブのデザイン、およびタンパク質チロシンリン酸化蛍光プローブの開発；(2) 細胞内カルシウムイオン濃度制御系および Kca チャネルスクリーニング細胞系の開発；(3) 測定機器としての FRET 解析用光学システムおよびマルチカラー遺伝子発現解析システム等の開発、をめざす。本研究により、ポストゲノム時代の医薬品開発にとっての技術的なネックである各種細胞機能の HTS のための基盤技術が生まれる。

2. 研究方法

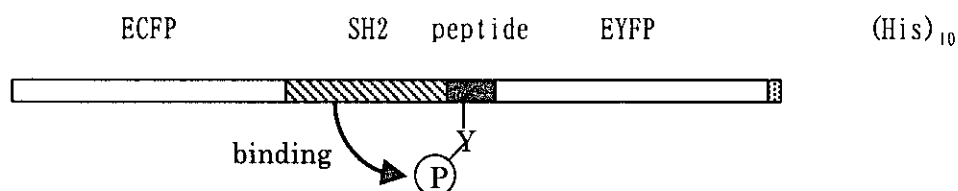
(1) 新規有機合成プローブ創製のための蛍光発光原理の解析

pH による蛍光の変化をなくすため、carboxyl 基、phenol 性水酸基ともに methyl 基で保護した fluorescein

誘導体 10 化合物を合成し、蛍光量子収率 (ϕ_{fl}) を調べた。さらに化合物によっては laser flash photolysis による過渡吸収スペクトルから、ラジカルを検出した。

(2) タンパク質リン酸化測定用組換えタンパク質蛍光プローブの作製

(2-1) プローブの設計：リン酸化チロシンと結合する部位 (src homology (SH) 2 ドメイン) とリン酸化チロシンとの特異的結合を利用して、Fig. 1 のような蛍光共鳴エネルギー遷移 (fluorescence resonance energy transfer : FRET) を利用した検出プローブをデザインした。ペプチド部分のチロシンがリン酸化されると分子内の SH2 と結合してコンフォメーションが変化することにより、両端についた 2 種の GFP 誘導体：Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) と Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) の相対的な距離、角度



	SH2-peptide	peptide-EYFP
<u>1</u>	AG	DPPVAT
<u>2</u>	AG	A
<u>3</u>	EFSGSGSG	DPPVAT
<u>4</u>	EFSGSGSG	A
<u>5</u>	EFGSGSGSGSG	DPPVAT
<u>6</u>	EFGSGSGSGSG	A
<u>7</u>	EFCRRYRGPGISSSSPAG	DPPVAT
<u>8</u>	EFCRRYRGPGISSSSPAG	A

Fig. 1 Design of fluorescence proteins for the detection of tyrosine-phosphorylation

が変化し、FRET 効率が変化する。ECFP の励起波長 (433nm) で励起した時の ECFP と EYFP の蛍光波長 (475, 527nm) を測定して、その比から FRET 効率の変化 (=チロシンリン酸化) を検出できると考えられる。ECFP および EYFP は pECFP-C1, pEYFP-C1 ベクター (Clonotech) を使い、SH2 ドメインとして Grb2/Ash (55-150)、リン酸化ペプチド部分として Shc タンパク質中のリン酸化されるチロシンを中心とした 21 アミノ酸 (307-327) を用いた。また、融合タンパク質を精製するため、C 末端に (His)₁₀ タグを導入した (Fig. 1)。SH2 とペプチド部分の間のリンカーは合成オリゴヌクレオチドを用い、EcoRI、BspEI サイトに挿入した。ECFP-SH2 間の長さを変えたプラスミドは PCR を利用して作製した。

(2-2) 細胞への遺伝子の導入、蛍光の測定：細胞は HeLa, COS-7 等を用い、プラスミドを Effectene (Quiagen) を用いて導入、24-48 時間後に細胞を 1% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.9) 溶液で可溶化し、上清を 0.45 μ m のフィルターに通した後、His Bind Resin (Novagen) を用いて精製した。得られた溶液の蛍光を励起波長 433nm にて測定した。リン酸化刺激群のディッシュには 1mM Na₃VO₄ を添加し 10-20 分反応させた後、同様の方法でタンパク質の回収、抽出を行ない測定した。

(2-3) その他：融合タンパク質の発現の有無、チロシンリン酸化の有無は、抗 GFP 抗体、抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) を用いたウェスタンブロットにより確認した。

(3) 多光子励起の応用の検討

蛍光顕微鏡 BioRad RTS2000MP システムを用いて蛍光プローブの励起スペクトルの検討を行った。Fluo-3 と

fluo-4 には高 Ca^{2+} 溶液 ($[\text{Ca}^{2+}]_f = 36.1 \mu\text{M}$) を、indo-1 には同溶液及び Ca^{2+} Free 溶液 ($[\text{Ca}^{2+}]_f = \text{数 nM}$) を用いた。これらの溶液に fluo-3, fluo-4, 及び indo-1 をそれぞれ $100 \mu\text{M}$ となるように加え、この溶液 $4 \mu\text{L}$ をカバーガラス ($24 \times 60 \text{ mm}$) 上に添加し、カバーガラス (直径 13 mm) をのせて、多光子励起 (MP) 波長 $700\text{-}840 \text{ nm}$ (波長が可変のチタンサファイアレーザーを用いた) の範囲で fluo-3, fluo-4, 及び indo-1 の蛍光強度($450\text{-}600 \text{ nm}$)の測定を行なった。対物レンズは 40 倍油浸レンズを用いた。

(4) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル(Kca チャンネル)作用薬の効率的探索実験系の開発

(4-1) BK チャンネル遺伝子のベクターへの組み込みと HEK293 細胞へのトランスフェクション：ラット子宮平滑筋由来 BK α (U55995) および $\beta 1$ サブユニット(AF020712)の遺伝子を pcDNA3.1(+)と pcDNA/Zeo(+) (Invitrogen)にそれぞれ組み込み、Human embryonic cell lines (HEK293 細胞)にリン酸カルシウム法を用いて導入した。G418/Zeocin 耐性細胞を選択することにより定常的にこれらのサブユニットを単独あるいは共発現させた HEK293 細胞(HEK BK α 及び HEK BK $\alpha \beta 1$)を作製した。

(4-2)電位感受性色素による膜電位変化測定と細胞内 Ca^{2+} 濃度測定：100 nM の DiBAC₄(3)(bis-(1,2-dibutyl barbituric acid)-trimethine oxonol:Molecular Probe)を含む外液に HEK293 細胞を 20 分間浸して色素を取り込ませた後、色素の存在下で実験を行った。490 nm の励起光を用いて、505 nm のダイクロイックミラーとフィルターで選択した 520 nm 以上の蛍光画像をイメージングシステム(ARGUS-HiSCA, 浜松ホトニクス)により取得した。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は $10 \mu\text{M}$ の fura2/AM を含む外液に 20 分間した細胞を用いて、色素非存在下で励起は 340 および 380 nm の紫外光により行い、480 nm での蛍光画像を ARGUS-HiSCA により取得した。

(4-3)電気生理学的検討：HEK BK α , HEK BK $\alpha \beta 1$ および native HEK293 細胞からホールセルパッチクランプ法およびインサイドアウト法により電流記録を行った。

(5) カリウムチャンネル活性の分光学的測定と制御物質の探索のための HTS 系の作製

(5-1) 細胞：ヒト Ca activated small conductance K (hSK3) チャンネルのクローニング、安定発現 HEK 細胞の作製は田辺製薬にて行った。マイクロプレートで培養 2-4 日目に培地を除き、標準細胞外液 NES (mM: NaCl 145, KCl 5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, glucose 10, HEPES 10 pH 7.4)に溶解した DiBAC₄(3) ($1\text{-}4 \mu\text{M}$)を各ウェル $100 \mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 30 分放置した。特にことわらない場合、0.08% trypan blue/NES $100 \mu\text{l}$ 添加、室温 12 分放置後、蛍光を測定した。

(5-2) 装置：測定装置は浜松ホトニクス社 FDSS6000 を用いた。この装置は 96 または 384 ウェルプレートの各ウェルへの一斉溶液注入、一斉蛍光値モニター(480nm 励起, 540nm 蛍光) が可能である。

(6) カルシウムイオン蛍光プローブ *cameleon* の顕微鏡測定の最適化

アデノウィルスベクターを用いて Yellow *cameleon* を初代培養肝細胞に発現させるとともに、超音波処理で細胞外に遊離させた yellow *cameleon* の蛍光特性を解析した。そのデータをもとに共焦点レーザー顕微鏡の最適化を行った。

3. 研究成果

(1) 新規有機合成蛍光プローブのデザイン

Fluorescein は、①高い水溶性 ②長波長励起が可能 ③蛍光量子収率が高い、といった利点を持つ優れた蛍光プローブの基本骨格であるが、その誘導体の蛍光特性、特に蛍光量子収率がどのような機構により制御されているかについては定性的な議論しかなされてこなかった。そこで、fluorescein 誘導体における蛍光制御機構の物理化学的解明とそれに基づいた合理的な蛍光プローブデザイン法の確立を目指した。Fluorescein 誘導体のうち、benzene 環部分に置換基を有するものでは、励起・蛍光

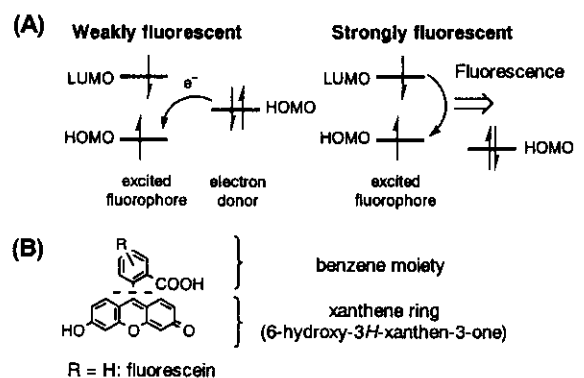


Fig. 2. (A) Illustration of the thermodynamic situation of the fluorescence OFF/ON switching including the PET process. (B) Fluorescein structure divided into two parts, the benzene moiety and the xanthene ring.

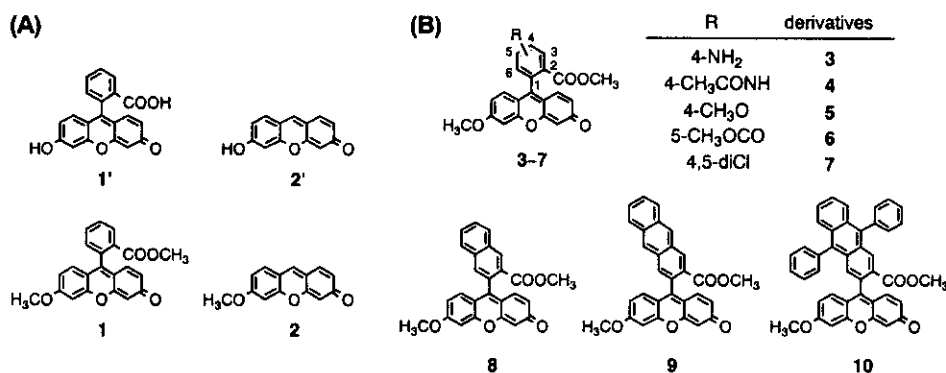


Fig. 3. Structures of compounds employed in this study, (A) fluorescein (1'), 6-hydroxy-3H-xanthen-3-one (2'), and their methylated forms (1 and 2). (B) Substituted methylated fluorescein derivatives (3–10).

波長はほぼ同じで蛍光量子収率のみが大きく異なる。また fluorescein の benzene 環が anthracene 環に置換された一重項酸素検出蛍光プローブ DPAX は蛍光を持たず、一重項酸素と反応して endoperoxide 体となることで蛍光性となる。これらの知見から、fluorescein 誘導体の蛍光 OFF/ON が benzene 環部位から xanthen 環への光誘起電子移動 (photoinduced electron transfer, PET) により制御されているとの仮説を立て (Fig. 2)、その検証を行った。

はじめに 10 個の fluorescence 誘導体 (Fig. 3) の蛍光量子収率 (ϕ_{flu}) を調べた。その結果、amino 基を持つ 3 ($\phi_{\text{flu}} = 0.009$) と anthracene 環を持つ 9 ($\phi_{\text{flu}} \approx 0.01$) と 10 ($\phi_{\text{flu}} = 0.008$) は非常に蛍光が弱く、その他は蛍光性 ($\phi_{\text{flu}} = 0.20\text{--}0.26$) であることがわかった。次に蛍光の弱い化合物のうち、diphenylanthracene (DPA) 骨格を持つ化合物 10 で laser flash photolysis による過渡吸収スペクトルの測定をおこなったところ、分子内電子移動により生じた DPA^+ と xanthen 環部位のラジカルアニオン (X^-) の存在が確認された。この電荷分離状態は、ラジカル種が直結しているにも関わらず約 60 μs という長寿命であった。また化合物 10 で光照射下 ESR スペクトルの測定を行ない、2 種のラジカル種の存在を確認したが、Ru 錯体による DPA の酸化時に見られる ESR スペクトルとの比較から、これらが DPA^+ と X^- 由来であることが示唆された。以上の結果は fluorescein 誘導体のうち蛍光の弱い化合物では電子移動過程が存在することを始めて実験的に明らかにしたものであり、上記の仮説を強く支持するものである。

さらに、fluorescein 誘導体の蛍光消光から見積もった電子移動速度 (k_{et}) と 10 の過渡吸収スペクトルの減衰から見積もった逆電子移動速度と、電子移動の driving force ($-\Delta G^0_{\text{et}}$) の間には、電子移動の基本理論である Marcus 則から予想される放物線関係が成り立った (Fig. 4A)。電子移動速度を規定する自由エネルギー変化 (ΔG^0_{et}) は、電子供与体である benzene 環部分の酸化電位により決まることが Rehm-Weller の式から予想される。実際、酸化電位と HOMO エネルギーの相関を利用し、benzene 環部分の HOMO エネルギーを適切な量子化学計算により求め、蛍光量子収率との関係をプロットしてみると、HOMO エネルギーが

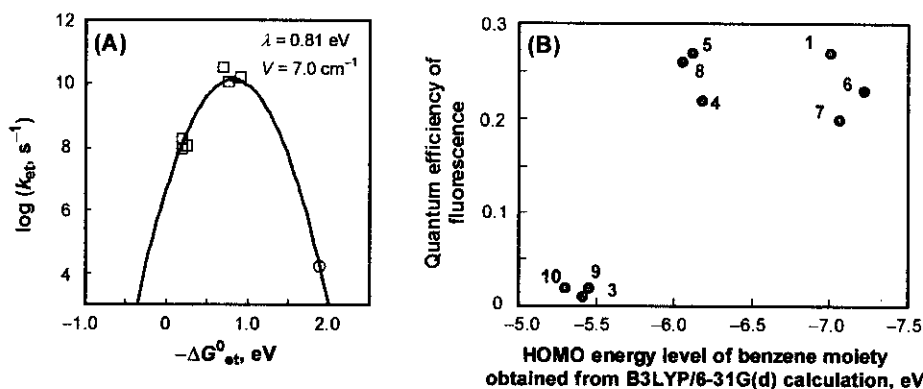


Fig. 4. (A) Parabolic dependence of the rate constants of electron transfer (k_{et}) (square) and that of back electron transfer for 10 (circle) on the driving force of electron transfer as predicted from the Marcus theory. (B) Correlation between quantum efficiency of fluorescence and the HOMO energy level of the benzene moiety of fluorescein derivatives.

蛍光の OFF/ON の閾値 (~ -5.8 eV) を越えると、蛍光量子収率は大きく変化することが明らかとなった(Fig. 4B)。この結果は、検出しようとするパラメーター (例えば NO) の有無によって MOHO エネルギーがこの閾値をまたいで変化するような反応部位(電子供与体)を組み込めば、当該パラメータの検出用蛍光プローブとして機能しうることを示唆するものである。

(2) タンパク質チロシンリン酸化測定用組換えタンパク質蛍光プローブの開発

(2-1) プローブの発現、蛍光特性

はじめに 1(Fig. 1) を HeLa 細胞に発現させ、回収、精製して 433nm 励起による蛍光スペクトルを測定したところ、475, 527 nm 付近にそれぞれ ECFP, EYFP 由来の蛍光ピークが現れており、FRET が生じていることが示された。しかしながら、リン酸化刺激による蛍光の変化は認められなかった。ECFP と EYFP 間の FRET を利用した蛍光プローブでは GFP 誘導体間の長さが蛍光特性、反応性に影響することが知られている。そこで、以下 SH2-ペプチド、CFP-SH2、ペプチド-EYFP 間の長さを変えたプラスミドを用いて蛍光特性を検討した。

(2-2) SH2-ペプチド間

リンカーを EFGSGSGSG に変えたところ(5)、Fig. 5 に示すような蛍光が得られた。即ちリン酸化刺激により蛍光強度比 (475nm /527 nm) が 10%程度変化した。一方、ウェスタンブロットによる分析では、融合タンパク質のリン酸化はリン酸化刺激時のみ生じていた。これらの結果から、この融合タンパク質はチロシンリン酸化によって蛍光スペクトル変化が生じていることが明らかとなった。

そこでリンカー長を変化させた数種のプラスミドを作製して比較検討したところ、リンカー長の長さに応じて蛍光変化が異なることが観察された (Fig. 6)。さらにチロシンリン酸化を蛍光変化として捉えるにはある程度の長さ (EFGSGSGS) 以上のリンカーを挿入する必要があることが示された。

この結果から、SH2 ドメイン中のリン酸化チロシン認識部位がドメインの C 末端から離れているため、安定に結合するためにはある程度フレキシブルなリンカーが必要であると推測される。

(2-3) ECFP-SH2 間

GFP 誘導体については C 末端の 11 残基を除いても蛍光特性が変わらないことが知られている。試みに上記融合タンパク質の ECFP の C 末端を削ったプラスミドを作製し、蛍光特性を検討した。即ち、11 残基のうち N 側からそれぞれ 0, 1, 2, 3 個アミノ酸を残したプラスミドで検討したところ、それぞれ蛍光特性 (FRET 効率) は変化したものの、チロシンリン酸化刺激に応じた FRET 効率の変化に差はなかった。

(2-4) ペプチド-EYFP 間

ペプチド-EYFP 間を DPPVAT, A に変換した 2 種類の融合タンパク質について検討した。その結果、一部でチロシンリン酸化刺激に対する応答の向上 (FRET 効率の変化の増加) が認められた。一方で、融合タンパク質が発現しない (もしくは、発現しても微量である) 場合もあった (Fig. 6)。

ECFP-SH2 間、ペプチド-EYFP 間が長くなると ECFP, EYFP がより自由に動くことになる。FRET は 2 つの蛍光タンパク質の距離、角度に依存して生じるので、ECFP, EYFP が自由に動くことは FRET 効率減少の原因となり得る。従って、作製した融合タンパク質が FRET 効率の大きな変化を起こすためには、

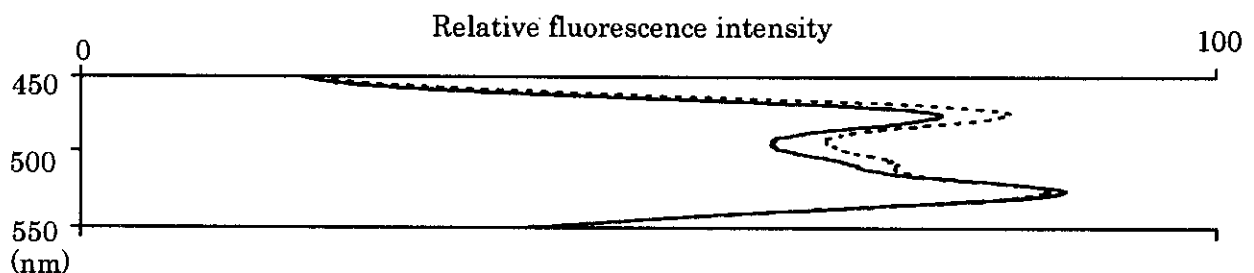
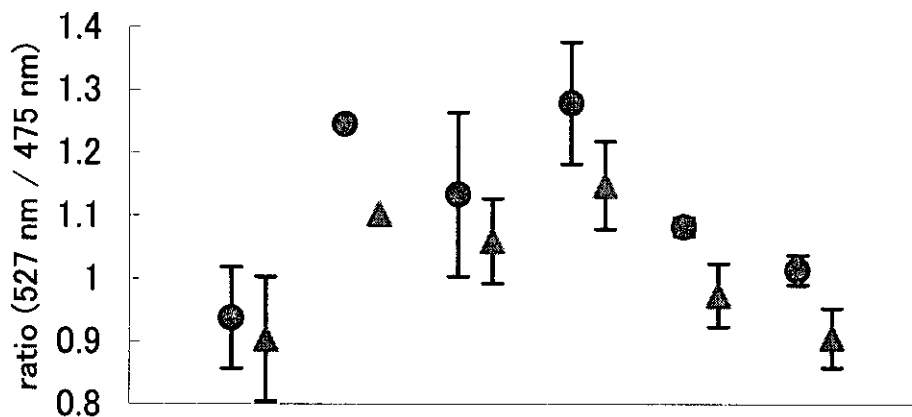


Fig. 5 Fluorescence spectra of 5. Solid line, Na_3VO_4 ; dotted line, $\text{Na}_3\text{VO}_4 +$
Ex.Wavelength: 433 nm; Ex. Bandpass: 5 nm; Em. Bandpass: 5 nm;
Scan speed: 120 nm/min; Response: 2 sec.



Fusion protein

Fig. 6 Phosphorylation-induced changes of fluorescence ratio of the fusion proteins shown in Fig. 1

ECFP-SH2 間、ペプチド-EYFP 間はなるべく固定されている方が有利であると考えられる。ペプチド-EYFP 間が 6 残基より 1 残基の方が大きな変化を起こしたのはこの為であると考えられる。

(3) 多光子励起のハイスループットスクリーニングへの応用の可能性の検討

通常の蛍光現象は一つの光子による励起によって一つの光子が発光する。しかし、二つ（あるいは三つ）の光子が非常に短時間（数フェムト秒あるいは数ピコ秒以内）に蛍光物質にあたると、エネルギーが合わさり 1/2（あるいは 1/3）波長の一つの光子を発光させることがある。このような現象を多光子励起(MP)というが、この現象を生じさせるには時間あたり非常に多くの光子を照射する必要があり、蛍光顕微鏡では励起光源としてパルスレーザー光を照射した場合に高解像度レンズの焦点部位に限られて生じる。したがって多光子励起を用いると、共焦点光学系を用いなくとも、焦点部位のみの蛍光の計測が可能である。現状では多光子励起の応用は蛍光顕微鏡のみに限られているが、将来的にはプレートリーダー等の光学系に適用することにより、フィーダー細胞の上に培養した細胞を用いたハイスループット測定に利用することも可能と考えられる。しかしながら、多光子励起の使用に適したプローブについては情報はほとんどない。そこで、カルシウムイオン蛍光プローブを例にとり、多光子励起の測定条件の検討を行った。

細胞内イオン環境に近いイオン組成の溶液中で、Ca²⁺感受性蛍光プローブである fluo-3 及び fluo-4 の MP での励起スペクトルを検討した (Fig. 7)。一光子励起(SP)において、488 nm で励起されることが知られている fluo-3 と fluo-4（至適励起波長は、fluo-3 では 506 nm、fluo-4 では 494 nm）は、二光子励起により 700 nm から 800 nm の範囲では励起が可能であったが、最大励起効率はいずれも 770 nm で得られた。Indo-1 は、通常 351 nm の紫外光により励起され、405 nm 及び 485 nm をピークとする蛍光を発し、細胞内 Ca²⁺と結合すると短波長側（355-425 nm）の蛍光は上昇し、長波長側（450-600 nm）の蛍光は低下する蛍光プローブである。短波長側及び長波長側での、高 Ca²⁺溶液及び Ca²⁺ Free 溶液の励起スペクトルを求め、高 Ca²⁺溶液と Ca²⁺ Free 溶液のレシオ値 (CH1/CH2)、及び R max/R min を求めることで、indo-1 の至適励起波長を評価した。その結果、indo-1 はこのシステムの MP で使用可能な最短波長である 700 nm で最良の励起効率と Ca²⁺感受性を示した。しかし、indo-1 を MP 700 nm で励起した場合の蛍光特性は、SP 351 nm で励起した場合と異なり、短波長側の励起効率が長波長側に比べて著しく低く、Ca²⁺の上昇に伴う蛍光の上昇は低値を示した。以上の結果から、MP では至適励起波長は必ずしも SP の 1/2 ではなく、また indo-1 のように SP で有用なプローブでも MP での使用に適していないプローブがあることが明らかにされた。

(4) Kca チャネル作用薬の効率的探索実験系の開発

Kca チャネルは単一チャネル電流のコンダクタンスから電気生理学的に BK, IK, SK (大、中、小コンダクタンス) の 3 グループに分類されるが、構造的には α と β の二つのサブユニットからなる。 α サブユニットの遺伝子は KCNMA(BK) と KCNN(IK および SK) に分類されている。 β サブユニットは現在までに 4 種 ($\beta 1 \sim \beta 4$) がクローニングされている。

(4-1) BK チャネルを高発現した HEK293 細胞系の確立

α サブユニットは 90% 以上、 $\alpha + \beta 1$ サブユニットは 80% 以上の細胞で発現していることを単一チャネル電流記録によりそれぞれ BK チャネル電流の発現と Ca^{2+} 感受性の増大で確認した。

(4-2) DiBAC₄(3) を用いた膜電位測定の定量性の検討と既知の BK チャネル開口薬の作用

DiBAC₄(3) は陰イオンであるが静止電位においても細胞内に取り込まれ、細胞質蛋白と結合する。励起光 (490 nm) 照射により発する蛍光 (520 nm 以上) は蛋白との結合により寿命が著しく増大する。細胞が脱分極すると細胞内への DiBAC₄(3) の分布が増すため蛍光が増大する。HEKBK $\alpha \beta 1$ を用い、膜電位固定下、保持電位を段階的に変化させた時の DiBAC₄(3) による蛍光強度変化を画像解析により検討した。さらに、実験プロトコルの最後に外液 K^+ 濃度を 140 mM に上昇させ、電位固定を外すと膜電位はほぼ 0 mV になる。この時の蛍光強度を F_K とし、各保持電位での蛍光強度 F との比 (F/F_K) の関係を求めたところ、ボルツマン式に適合する定量化に成功した (Fig. 8)。さらにこのキャリブレーションが妥当か (実用可能か) を検討するため、電極法を用いて実測した膜電位とその時の F/F_K 値をプロットしたところ、キャリブレーションと良く適合し、定量的関係が見出された。すなわち HEKBK $\alpha \beta 1$ では静止膜電位が native HEK より深く、BK チャネル抑制薬の 1 mM tetraethylammonium により脱分極した。

(4-3) 高効率探索システムを用いた BK チャネル開口薬シード化合物の探索

HEKBK $\alpha \beta 1$ と DiBAC₄(3) を用いた探索システムにより、天然物及びその誘導体化合物数十種類の BK チャネルへの作用を検討し、ピマル酸および関連ピマラン化合物に開口作用を見出した。またインサイドアウトパッチクランプ法での BK チャネル開口作用の効力は、DiBAC₄(3) を用いた結果と良く一致した。

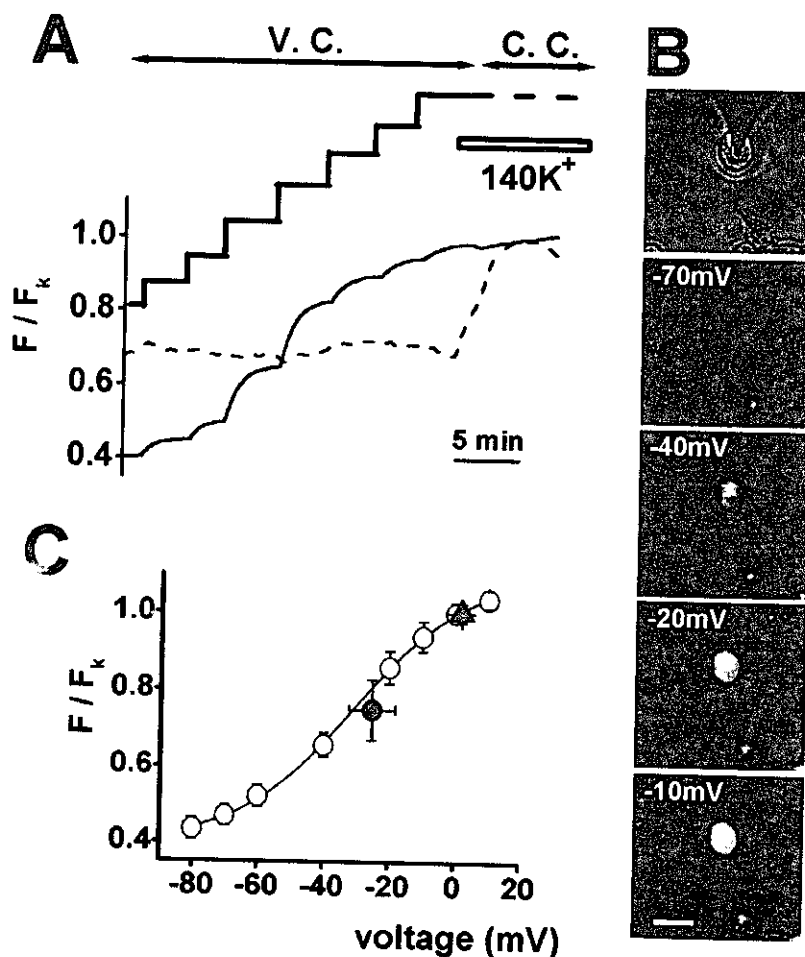


Fig. 7

(5) Kca チャネル活性の分光学的測定と制御物質探索の HTS 系の作製

(5-1)細胞は懸濁状態と付着状態のいずれが適当か？

DiBAC₄(3)の場合、単波長励起、単波長測光であり、2波長蛍光比をモニターできないため、生の蛍光値が指標となる。この値は膜電位以外の外部要因で変化しやすい。懸濁状態では、刺激液注入直後に蛍光値の大きな減少が起き正確な計測は困難であった。

(5-2)Trypan blue の使用

Trypan blue は過剰の細胞外色素由来の蛍光を消光することが知られている。今回用いた装置のように培養器の底面から測光する場合細胞が比較的カメラに近い底面により多く存在するので、trypan blue 使用は、上層部の溶液由来蛍光を消光し下層部の細胞内色素由来の蛍光変化を強調することが期待された。この効果は、細胞とカメラの間に色素が入らない方が大きくなると思われるため、細胞付着状態での反応を検討した結果、測定前に 0.04%trypan blue を添加すると、K 脱分極による変化が大きく見られ、また、ionomycin による変化が観察された。

(5-3)素負荷条件 (DiBAC₄(3)濃度, 時間) および刺激条件

DiBAC₄(3)濃度は、2 μ M が最適であった。10 μ M まで増やすと蛍光値は増加するが変化率は減少した。負荷時間は 30 分が最適と思われた。Ionomycin は 0.1 μ M から作用を示し、1 μ M で最大の過分極反応を示した (Fig. 8)。hSK3 を発現しない native の HEK 細胞ではこの過分極反応は見られなかった。これに対し、ionomycin 10 μ M では過分極反応が減少した。一方、native HEK 細胞 では蛍光値の増大が見られることから、高濃度の ionomycin は、hSK3 活性化作用のほかに脱分極作用も持つことがわかった。以上の結果からスクリーニング時の刺激には、ionomycin 1 μ M が適当であると考えられた。また ionomycin による反応は、hSK3 阻害薬である apamin により、1nM 以上で濃度依存的に抑制された。Apamin は blank で見られる蛍光値減少も抑制したことから、溶媒添加でも SK チャネルの活性化が起きていることが示唆された。

(5-4)スクリーニング系としての妥当性

1枚のマイクロプレートを半分に分け、ionomycin とブランクの蛍光変化を 48 ウェルずつ測定した。変化値を検討したところ、両群の平均の差が小さいわりに個々値のバラツキが大きかった。HTS 試験系の安定性を示す Z 値は負の値になり、試験の自動化には問題が残された。

$$Z = 1 - (3 * SD[\text{blank}] + 3 * SD[\text{stimulation}]) / \text{Abs}(\text{mean}[\text{blank}] - \text{mean}[\text{stimulation}]).$$

すなわち、このバラツキで Kca チャネル阻害薬をスクリーニングすることを考えた場合、ブランクの値を 100%阻害とすれば 50%阻害値は蛍光値 0.934 付近である。Ionomycin 群 48 ウェルのうち、変化が小さく、この値に達しなかったものは 2 ウェルあった。つまり、ここをヒット検体の取捨ラインとすれば、作用のない 48 検体のうち 2 検体は作用があるとみなされるから、再現性試験を行うことが必要となる。一方 70%阻害値をラインとすれば、作用のない化合物を拾うことは防げるが、作用のある化合物を見逃す恐れがある。一方、マイクロプレートの半分 48 ウェルで ionomycin 反応を apamin で阻害した場合は、100%阻害を apamin 使用時の測定値に取ると、ブランクによる反応も apamin で阻害されるため、Z 値はかなり改善される。10%阻害の検体はコントロール(阻害なし)と区別できないが、50%阻害値をスクリーニングの取捨選択ラインにすると全く問題はないと考えられた。

(6) カルシウム蛍光プローブ *cameleon* 計測にむけた共焦点レーザー顕微鏡の最適化

カルシウムイオン蛍光プローブ *Yellow cameleon* の至適励起波長は 430nm-440nm にあり、レーザー光源を使う場合、通常特別な励起用レーザーが必要である。そこでカルシウムイオン濃度測定の HTS 化の準備のため、汎用アルゴンレーザーでも発振が可能な 458nm の励起光を用いて、カルシウムイオン濃度の変動が捉えられるかの検討を行った。初代培養肝細胞で細胞質に発現させた *Yellow cameleon 2.1* を細胞外に遊離させ、440nm および 458nm 励起による蛍光スペクトルを測定し、さらにカルシウム濃度を変動させタイトレーションを行った。その結果を利用してフィルターの最適化を図った結果、汎用アルゴンレーザーの発振する 458nm の励起光を用いても、467.5-497.5 nm および 515-545nm バンドパスフィルターを用いて二つの波長域の蛍光を測定し、その比を求めれば、カルシウムイオン濃度の変動に伴う蛍光強度比の

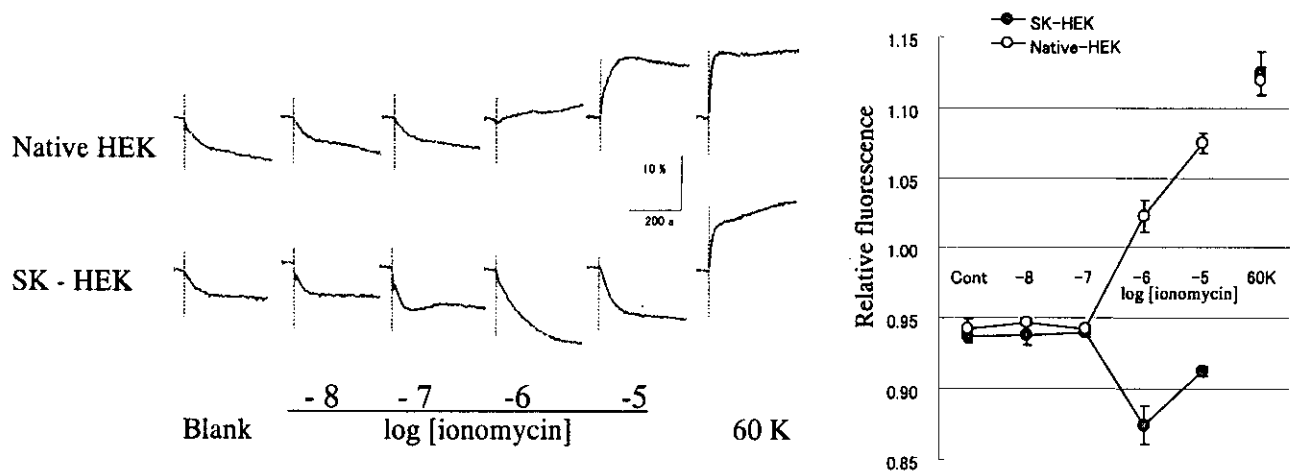


Fig. 8 Ionomycin-induced fluorescence changes in HEK cells where SK channel is expressed. The changes induced by vehicle and high K⁺ were also shown. Mean ±SE (n=4)

変化率は、440nm 励起の場合に近い値が得られることを明らかにした。

4. 考察

蛍光技術を用いた HTS 系の開発をめざすには、まず第一に選択性の高い優れた蛍光プローブが必要とされる。本研究では、従来定性的な面からの検討がほとんどであった有機合成蛍光プローブの蛍光制御機構を物理化学的に解明し、合理的に蛍光プローブをデザインする理論構築のため、標準的蛍光プローブ Fluorescence 誘導体をモデルに検討した。その結果、光誘起電子移動による蛍光制御によって Fluorescence 誘導体の蛍光現象を説明することに成功した。この理論をもとに有機合成プローブをデザインすることにより各種 HTS 系への応用が可能な新規蛍光プローブの開発が加速されるものと思われる。また、細胞内情報伝達機構の中で、極めて重要な役割を有しているタンパク質チロシンリン酸化を検出する融合蛍光タンパク質蛍光プローブの開発を行い、インビトロでシグナルを捉えることに成功した。今回開発した蛍光タンパク質蛍光プローブで得られるシグナルの大きさはまだ十分なものではないが、このタンパク質を基本形として最適化を行い、今後 HTS に応用可能なプローブ開発を目指す予定である。

蛍光技術を用いた HTS 系の開発の第二の基盤技術として、細胞系の開発が挙げられる。本研究では、細胞内に Kca チャンネルタンパク質を発現させ、膜電位色素の蛍光変化を指標に、Kca チャンネル作用薬の HTS 系の開発を行っている。現在までに大コンダクタンスチャンネルおよび小コンダクタンスチャンネルを発現させた細胞による HTS 系の構築にほぼ成功し、K⁺チャンネル作用物質のスクリーニングにも応用した。今後、さらに中コンダクタンスチャンネルの検討も進めながら、HTS 系を完成させる予定である。

蛍光技術を用いた HTS 系の開発のための第三の基盤技術は、機器の開発改良である。今年度はそのための基礎的な検討として、カルシウムイオン蛍光プローブ Yellow cameleon の蛍光測定の最適化、および多光子励起に適した蛍光プローブの検討を行った。Yellow cameleon については本年度確定させた測定条件を参考としながら、来年度には細胞局所のカルシウム変動の解析のハイスループット化をめざす予定である。また多光子励起に適した蛍光プローブは、一光子励起による蛍光特性からは必ずしも予測できないことが明らかとなった。今後検討するプローブの幅を広げて多光子励起に適した蛍光プローブの整理を行う予定である。

5. まとめ

- (1) HTS 系構築の基盤技術である有機合成蛍光プローブの蛍光制御機構の検討を行い、光誘起電子移動による制御によって Fluorescence 誘導体の蛍光現象を説明することに成功した。この理論を用いてプローブをデザインすることにより、優れた新規蛍光プローブの開発が加速されるものと思

われる。

- (2) タンパク質チロシンのリン酸化を検出する組換えタンパク質蛍光プローブの開発を行い、インビトロでチロシンリン酸化を蛍光変化として捉えることに成功した。今後最適化を行い HTS 系への応用をめざす予定である。
- (3) 多光子励起による蛍光測定 of HTS 系への応用をめざして多光子励起に適した蛍光プローブを検討し、一光子励起による蛍光特性からは予測困難がある場合があることを、明らかにした。
- (4) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル作用薬の探索のための HTS 系として、これらチャネルタンパク質を発現させた細胞の確立、およびこの細胞と膜電位色素を組み合わせた測定系の確立、さらにはハイスループット化の検討を行い、これらチャネル作用薬のスクリーニングに応用した。
- (5) 細胞局所のカルシウム変動の解析のハイスループット化を行うために、カルシウムイオンプローブ Yellow cameleon の蛍光測定条件の最適化を行った。

6. 研究発表

- 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) H. 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 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) Noriyuki Suzuki, Hirotsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano : Orthogonality of Calcium Concentration and Ability of 4,5-Diaminofluorescein (DAF2) to Detect NO, *J. Biol. Chem.*, **272**, 47-49 (2002).
- 7) Kumi Tanaka, Tetsuo Miura, Naoki Umezawa, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano: Rational Design of Fluorescein-based Fluorescence Probes. -Mechanism-based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen- *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2530-2536 (2001).
- 8) Hirotsu Kojima, Miki Hirotsu, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano: Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore, *Analytical Chemistry*, **73**, 1967-1973 (2001).
- 9) Nishimaru, K., Tanaka, Y., Tanaka, H. & Shigenobu, K. α -adrenoceptor stimulation-mediated negative inotropism and enhancement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in mouse ventricle. *Am. J. Physiol.* **280**, H132-H141 (2001)
- 10) Matsuda, T., Masumiya, H., Tanaka, N., Tanaka, Y., Yamashita, T., Tanaka, H. & Shigenobu, K. Inhibition of cloned human cardiac Kv1.5 potassium channel current by a novel antiarrhythmic agent, NIP-142. *Life Sci.* **68**, 2017-2024 (2001).
- 11) Miyazaki, M., H. Ohata, M. Yamamoto and K. Momose: Spontaneous and flow-induced Ca^{2+} transients in retracted regions in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 172-179 (2001)
- 12) Ohata, H., K. Tanaka, N. Maeyama, M. Yamamoto and K. Momose: Visualization of elementary mechanosensitive Ca^{2+} -influx events, Ca^{2+} spots, in bovine lens epithelial cells. *J. Physiol.* **532**, 31-42 (2001)
- 13) Ohata, H., T. Ikeuchi, A. Kamada, M. Yamamoto and K. Momose: Lysophosphatidic acid positively regulated the fluid flow-induced local Ca^{2+} influx in bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.* **88**, 925-932 (2001)
- 14) Yamada A, Gaja N, Ohya S, Muraki K, Narita H, Ohwada T, Imaizumi Y: Usefulness and limitation of DiBAC₄(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurements of membrane potentials regulated by recombinant BK channels in HEK293 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 342-350.(2001)

平成13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14年9月10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