

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（平成13年度）
古田寿昭	東邦大学理学部生物分子科有機化学教室（平成14年度～）
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	名古屋市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	カールツァ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)新規有機合成蛍光プローブのデザイン法の開発；(2)細胞内情報伝達制御ケージド化合物の合成、(3)タンパク質チロシンリン酸化蛍光プローブの開発；(4)カスパーゼ活性測定用蛍光プローブの開発；(5)多光子励起に適した蛍光プローブの検討；(6)Ca²⁺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；(7)水チャネル活性制御物質の探索のための HTS 系の開発；(8)ECFP と EYFP の FRET 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、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 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) 実験操作が簡便；(2) 大量のサンプルについて解析が可能；(3) 操作の自動化が可能、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。本研究では(1) 有機合成プローブのデザインおよびタンパク質蛍光プローブの開発、改良；(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、を各研究者が機能的にリンクして研究を進める。

2. 研究方法、研究結果、考察

(1) Fluorescein 誘導体の蛍光理論の研究

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研究を行った。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_{flu}) を調べ、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。その結果、(1) 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明らかにし、さらに (2) 検出しようとするパラメーター (例えば NO) の有無によって最高被占分子軌道(HOMO) エネルギーが蛍光の OFF/ON の閾値 (-5.8 eV)をまたいで変化するような反応部位(電子供与体)を蛍光発色団に組み込めば、当該パラメータの検出用蛍光プローブとして機能することを示した。

(2) 細胞内情報伝達の制御のためのプローブ開発

光を照射することで、瞬時に元の分子を「活性型」として出現させることが出来るケージド化合物の設計、およびハイスループットスクリーニングへの応用を目的とした研究を行った。はじめにセカンドメッセンジャーのケージド化合物として、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロールおよびアラキドン酸のケージド化合物を合成した。それぞれ合成法の最適化、光反応性の検討および酵素反応の光制御能の検討を行い、さらに、cAMP に関しては、様々な細胞内への導入法に対応できるように、膜透過性のものと水溶性が高いものを合成した。膜透過性誘導体はメダカの色素胞へ導入し、cAMP が関わるシグナル伝達系を光照射によって繰り返し制御できることを確認し、またウニ精子に効率良く導入して、精子の運動性に関わるシグナル伝達系を光制御することもできた。さらに、水溶性誘導体をパッチピペットによって単離嗅細胞に導入し、匂い感知後のシグナル伝達を光照射によって再現できることも確認した。

(3) 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

GFP 誘導体: Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP)に Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)が近接すると ECFP の光励起による励起エネルギーは EYFP に遷移され、EYFP の蛍光が発することが知られている (蛍光共鳴エネルギー遷移 (fluorescence resonance energy transfer : FRET))。この FRET 現象を利用したタンパク質チロシンリン酸化プローブの設計を試みた。即ち、2 種の GFP 誘導体: Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP)と Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)の間に 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) を挿入した融合タンパク質発現プラスミドを作製した。このタンパク質を HeLa、COS-7 細胞で発現させ精製した。FRET 効率の変化 (=チロシンリン酸化) は ECFP の励起波長 (433nm) で励起し、ECFP と EYFP の蛍光 (それぞれ 475, 527nm) を測定し、その比を指標とした。その結果、SH2-ペプチド間にある程度の長さ (EFGSGSGS) 以上のリンカーを挿入し、さらにペプチド-EYFP 間では DPPVAT、A に変換するとリン酸化に伴う FRET の変化 (最大 15%程度) が得られることが明らかとなった。現段階では、これら融合タンパク質を発現させた細胞の蛍光変化から、リン酸化を測定するには蛍光変化は十分ではなく、さらなる最適化をはかっているところである。

(4) カスパーゼ活性検出用蛍光プローブの開発

細胞死における細胞内シグナル伝達に重要な役割をはたしている各種カスパーゼ活性を測定するために、FRET を利用した蛍光プローブの開発を試みた。蛍光特性の異なる 2 つの GFP 変異体: ECFP 及び EYFP の間にカスパーゼ 8/9 あるいはカスパーゼ 3/6/7 の基質となるペプチド配列を挿入した融合タンパク質発現用プラスミドを作製した。この融合タンパク質を HeLa 細胞に発現させ、TNF- α (200 ng/ml) もしくは staurosporine (3 μ M) を添加して細胞死を誘発し、細胞より融合タンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット、および蛍光スペクトル測定等により、融合タンパク質が意図した通り機能していることを確認した。次に FRET 変化を捉えるために最適化した共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Zeiss, LSM510)

((8) 参照) を用い画像化したところ、TNF- α 、staurosporine 添加 1-2 時間後からカスパーゼ活性の上昇及びミトコンドリア膜電位 (tetramethylrhodamine methyl ester (TMRME) の取り込みで測定) の低下を示す細胞が現れ始めた。変化を示すまでの時間は細胞個々で異なるが、TNF- α 刺激時は、カスパーゼ活性上昇とほぼ同時かそれより遅れてミトコンドリア膜電位の低下が観察され、カスパーゼプローブ間で大きな違いは認められなかった。一方 staurosporine 刺激時では、多くの細胞でカスパーゼ 8/9 活性の上昇、ミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ 3/6/7 活性の上昇の順で観察された。以上の結果、細胞死を誘発する薬物の種類によってカスパーゼ活性化、ミトコンドリア膜電位低下の動態が異なることが明らかとなった。現在カスパーゼプローブの最適化、複数のプローブの同時測定、プレートリーダーでの測定条件の検討を行っている。

(5) 多光子励起の応用の検討

各種蛍光プローブについて蛍光顕微鏡 BioRad RTS2000MP システムを用いて蛍光プローブの光励起条件および蛍光測定条件の検討を行った。その結果 (1) 蛍光プローブ calcein 及び tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) の消光の程度は多光子励起を用いることで大きく軽減されること、(2) fluo-3 と fluo-4 の励起多光子励起による励起スペクトルを検討した結果、至適励起波長は 770 nm であること、(3) indo-1 は 700 nm 多光子励起では励起効率及び Ca^{2+} の上昇に伴う短波長側の蛍光の上昇が小さく、可能な限り短波長側で励起することが望ましい、(4) 多光子励起では組織構築を維持した血管組織標本で内皮細胞と平滑筋細胞の Ca^{2+} 動態と同時に血管平滑筋の収縮弛緩反応を視覚化することが可能、ということが明らかとなった。

(6) Kca チャンネル作用薬の効率的探索実験系の開発

膜電位依存性蛍光プローブ DiBAC4(3)を用いた HTS へ応用可能なカリウムチャンネル作用薬探索系の開発を行った。ラット子宮平滑筋由来大コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル(BK チャンネル) α サブユニットと $\beta 1$ サブユニットを単独あるいは共発現させた HEK293 細胞(HEKKB α 及び HEKKB $\alpha \beta 1$)において、膜電位依存性蛍光プローブ DiBAC4(3)を用いた光学的膜電位測定 (測定装置は浜松ホトニクス社 FDSS6000) のための最適条件を確立させ、さらにパッチ電極を用いた膜電位・電流固定法を併用して DiBAC4(3)による膜電位測定結果と比較して、光学的膜電位測定法の妥当性を確認した。次に天然物及びその誘導体化合物数十種類の作用を検討し、BK チャンネル開口作用を有する化合物を探索した。それらのうち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。一方、ピマル酸と極めて効力の近いアビエチン酸には作用が認められなかった。パッチクランプ法を用いて検討したこれら化合物の BK チャン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。ピマル酸は α サブユニットに作用すると推測される。本探索システムを利用して、実際に BK チャンネル開口作用を持つピマル酸が天然物テルペノイドから発見された。ピマル酸が有用な BK チャンネル開口薬のリード化合物となることが期待される。

(7) 水チャンネル活性の分光学的測定と制御物質探索の HTS 系の作製

利尿薬、脳傷害時の脳浮腫抑制、肝硬変患者の浮腫抑制などが期待される水チャンネル aquaporin (AQP) 制御物質の効率的探索系の開発をめざした。方法として Cl イオン蛍光プローブ MQAE を Jurkat 細胞に導入して、その蛍光変化を指標として AQP チャンネル活性の指標として用いた。Jurkat 細胞懸濁液をマイクロプレートに分注し、同容量の水を注入すると、蛍光の増大が観察され、同容量の等張液では不変、高張シヨ糖液添加では、逆に色素消光の増大によると思われる蛍光減少が観測されたことから、水透過性のモニターに応用可能なことが確認された。この方法では 96 穴マイクロプレート 1 枚の測定時間は 80 秒程度で十分であり、HTS が十分可能と考えられた。

(8) ECFP と EYFP 間の FRET 検出のための共焦点レーザー顕微鏡の最適化

ECFP 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 ECFP と EYFP の FRET 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、タンパク質系プローブ Yellow Cameleon をモデルプローブとして ERET の変化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。

3. まとめ (今後の展開)

- (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) cAMP、cGMP、ジアシルグリセロールおよびアラキドン酸の光励起により瞬時に活性体に変換される各種ケージド化合物を合成し、機能することを確認した。これら化合物は HTS 系においても

効果的に応用可能と考えられる

- (3) 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。
- (4) カスパーゼ活性測定用組換えタンパク質系蛍光プローブを複数種作製した。今後種類を増やし、細胞死メカニズムにかかわる因子の同時検索システムの構築をめざす予定である。
- (5) 光子励起による蛍光測定の HTS 系への応用をめざして多光子励起に適した測定条件の検討を行った。内皮細胞と平滑筋細胞が混在した血管壁試料においても、細胞を選別して Ca^{2+} 濃度の計測が可能であることを明らかにした。
- (6) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル作用薬の探索のための HTS 系として、これらチャン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、チャンネル作用薬のスクリーニングに応用した。
- (7) 水チャンネル活性制御物質の探索のための HTS 系を開発した。
- (8) ECFP と EFYP との FRET 変動について測定条件の最適化を行った。
- (9) 上記の研究成果を有機的に組み合わせて、HTS への応用法を考案する予定である。

4. 研究発表 (合計 59 の研究発表の中から主要なものを示す)

- 1) T. Kawanishi, T. Kiuchi, H. Asoh, R. Shibayama, H. Kawai, H. Ohata, K. Momose, and T. 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) H. Masumiya, J. Kase, T. Kawanishi, T. Hayakawa, S. Miyata, Y. Sato, R. Nakamura, H. Tanaka and K. 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) H. Tanaka, H. Masumiya, T. Sekine, J. Kase, T. Kawanishi, T. Hayakawa, S. Miyata, Y. Sato, R. Nanamura, and K. Shigenobu: Involvement of Ca waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes, *Life Sci.*, **70**, 715-726 (2001)
- 5) H. Tanaka, E. Ishii, R. Fujisaki, Y. Miyamoto, Y. Tanaka, T. Aikawa, T. Kawanishi, and K. Shigenobu: Effect of manganese on guinea pig ventricle. Initial depression and late augmentation of contractile force, *Biol. Pharm. Bulletin*, **25**, 323-326 (2002)
- 6) S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **300**, 770-774 (2003)
- 7) 柴山理恵、河合洋、水口裕之、川西徹、田中光、田中直子、重信弘毅、中村竜、早川堯夫: 汎用アルゴンレーザーを励起光源として用いた Yellow Cameleon による細胞内カルシウムイオンの共焦点画像化、第10回日本バイオイメージング学会学術集会 (東京)、バイオイメージング 34:138-139 (2001)
- 8) 川西 徹、河合 洋、鈴木琢雄、柴山理恵、早川堯夫、大幡久之、百瀬和享: 心筋細胞・肝細胞等のマルチカラーイメージングと分子機能解析—カスパーゼ活性化の画像化—、公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」平成15年2月21日
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Hirayama, T. Iwamura, M. and Furuta, T., Design, synthesis and photochemical properties of caged bile acids,

- Bioorg. Med. Chem Lett.* **13**, 905-908 (2003).
- 13) Mizuta, H., Watanabe, S., Sakauchi, H., Nishiyama, K., Furuta, T., Kobayashi, Y., and Iwamura, M., : Design, Synthesis, photochemical properties and cytotoxic activities of water-soluble caged leucyl-leucine methyl esters that control apoptosis of immune cells, *Bioorg. Med. Chem*, **10**, 675-683 (2002).
 - 14) 古田寿昭、光で生理活性を制御するケージド化合物の設計と合成、第5回生命化学研究会シンポジウム(平成15年1月)招待講演
 - 15) Nishimaru, K., Tanaka, Y., Tanaka, H. & Shigenobu, K. α -adrenoceptor stimulation-mediated negative inotropism and enhancement of Na^+ - Ca^{2+} exchange in mouse ventricle. *Am. J. Physiol.* **280**, H132-H141 (2001)
 - 16) 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).
 - 17) Tanaka H., Nishimaru K., Aikawa T., Hirayama W., Tanaka Y., Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of myocardial sodium-calcium exchanger, on myocardial membrane currents. *Brit. J. Pharmacol.* **135**: 1096-1100 (2002)
 - 18) Tanaka Y., kamibayashi M., Yamashita Y., Imai T., Tanaka H., Ishii K., Shigenobu K.: Evidence for the possible involvement of Ca entry blockade in the relaxation by class I antiarrhythmic drugs in the isolated pig coronary smooth muscle. *Naunyn-Schmeid. Arch. Pharmacol.* **365**: 56-66 (2002)
 - 19) 田中光、重信弘毅 「共焦点レーザー顕微鏡を用いた心筋細胞のカルシウムイメージング」--- シンポジウム「光技術を利用したバイオイメージングとその創薬への応用」--- 第75回日本薬理学会年会(熊本) 2002-03-13 - 03-15
 - 20) 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)
 - 21) 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. (London)* **532** (1) 31-42 (2001)
 - 22) 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)
 - 23) Ohata H., K. Tanaka, N. Maeyama, T. Ikeuchi, A. Kamada, M. Yamamoto and K. Momose: Physiological and pharmacological role of lysophosphatidic acid as modulator in mechanotransduction *Jpn. J. Pharmacol.* **87**, 171-176 (2001)
 - 24) Hashimoto, T., Y. Nakano, M. Yamashita, H. Ohata and K. Momose: Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol.*, **88**, 256-261(2002)
 - 25) Hashimoto, T., M. Yamashita, H. Ohata and K. Momose: Lysohosphatidic acid enhances *in vivo* infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/ROCK-mediated pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **91**: 8-14 (2003)
 - 26) 大幡久之、山田英之、新岡丈治、山本雅幸、百瀬和享: 2光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージング、日本顕微鏡学会第47回シンポジウム(2002年11月)
 - 27) Aki Yamada, Norikazu Gaja, Susumu Ohya, Katsuhiko Muraki, Hiroshi Narita, Tomohiko Ohwada & Yuji Imaizumi: Usefulness and limitation of DiBAC₄(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in HEK293 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 342-350 (2001).
 - 28) Hisao Yamamura, Yoshiaki Ohi, Katsuhiko Muraki, Minoru Watanabe & Yuji Imaizumi: BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of porcine coronary artery., *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 828-834 (2001).
 - 29) Hisao Yamamura, Kazuho Sakamoto, Susumu Ohya, Katsuhiko Muraki & Yuji Imaizumi: Mechanism underlying the activation of large conductance Ca^{2+} activated K^+ channels by nordihydroguaiaretic acid, *Jpn. J. Pharmacol.*, **89**, 53-63 (2002).
 - 30) Yuji Imaizumi, Kazuho Sakamoto, Aki Yamada, Aya Hotta, Susumu Ohya, Katsuhiko Muraki, Masanobu Uchiyama & Tomohiko Ohwada, Molecular basis of pimaran compounds as novel activators of large conductance Ca^{2+} activated K^+ channel α -subunit, *Mol. Pharmacol.*, **62**, 836-846 (2002).
 - 31) 尾崎 博、今泉祐治, 大石一彦, 小濱一弘: ハイスループット薬理学: 創薬における研究手法の効率化と大規模化, *日本薬理学雑誌*, **118**, 187-196 (2001).