

バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、 測る、解析する技術の開発

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

研究要旨 細胞機能解析用のバイオフィotonicsプローブを開発・利用し、疾患に伴って生じる細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法の開発研究を行った：
(1) FRET を利用した各種バイオフィotonicsプローブを設計、作製し、ダブルカラー FRET 測定を実現した；(2) 細胞組織障害を解析するための各種ケージド化合物を開発した；(3) 二光子励起観察による血管組織の内皮細胞、平滑筋同時解析系を作製した；(4) K⁺チャンネル関連細胞機能障害解析細胞系を開発した；(5) 薬物の酸化ストレス誘発性を解析するプロファイリング・スクリーニング系を作製した；(6) タンパク質生産用アポトーシス耐性株の馴化を行った。

分担研究者

- (1) 田辺製薬株式会社 藤村久子
- (2) 三菱ウェルファーマ株式会社 小林 薫
- (3) 東邦大学理学部 古田寿昭
- (4) 昭和大学薬学部 大幡久之
- (5) 名古屋市立大学薬学部 今泉祐治
- (6) 東邦大学薬学部 重信弘毅

1. 研究目的

治療用医薬品の多くは疾病に伴う細胞組織障害の進行を防ぐ、あるいは細胞組織障害からの回復を促す作用によって効果を現す。したがって疾病による細胞組織障害の解析技術は疾病治療用医薬品の創薬において、最も重要な基盤技術の一つといえる。しかしながら細胞組織障害を細胞機能の障害（異常）という面から客観的に定量性をもって解析する手法は必ずしも十分にはない。

近年、細胞機能に係る生体内パラメーターに対する感受性蛍光プローブ（バイオフィotonicsプローブ）を用いて、その変動を測定する手法が開発され、生物学・医学領域の研究に広く用いられている。この方法は、様々な細胞機能に関係するパラメーターを光の色あるいは強さに変換し、光計測によって解析するという手法である。使用するバイオフィotonicsプローブは通常生体内の多種多様な共存物の中で機能しなければならぬため、高い特異性が要求される。したがってプローブ開発にあたっては生体

反応の特異性を巧みに利用した分子設計が必要であり、生体内での使用方法を確立させるまでには十分な検討が必要である。しかし、光という共通の物理的シグナルの計測によって種々の細胞機能の測定が可能であるため、光計測機器（分光器、蛍光光度計、顕微鏡測光、顕微鏡画像解析、プレートリーダー等）を用いた解析系を一度確立することができれば、ルーチン試験にも応用可能な簡便な細胞組織障害の客観的、定量的解析系となる。この特徴は、とりわけバイオゲノム時代の創薬においては、様々な局面で活用可能な特性である。

そこで、本研究では、細胞機能解析用のバイオフィotonicsプローブを開発・利用することにより、疾患に伴って生じる細胞組織障害を簡便かつ定量的に解析する方法を確立し、創薬シーズ探索のためのハイスループットスクリーニング、医薬品候補化合物のセレクション、医薬品候補化合物の安全性評価、タンパク質性医薬品の品質（生物活性）評価等への応用を図る。

2. 研究方法

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブの開発

カスパーゼカスケードに係る複数のパラメーターの変動を同時解析するために、マルチカラーカスパーゼ活性化解析蛍光プローブの設計及び機器の最適化の研究を行った。

CFP, GFP, YFP, DsRed2 の 4 種の蛍光タンパク質より 2 種を選択し、カスパーゼによって切断され

る特異的ペプチド鎖である LDCGIETDSGVD および KRKGDEVDGVDE により連結した。これらはそれぞれカスパーゼ8/9, カスパーゼ3で主に切断されるカスパーゼ活性化解析蛍光プローブとして機能する。使用する蛍光タンパク質の種類を変えることにより、蛍光特性の異なる6種のカラーバリエーション, CFP-GFP (CG), CFP-YFP (CY), GFP-YFP (GY), CFP-DsRed2 (CR), GFP-DsRed2 (GR), YFP-DsRed2 (YR) を作製した。

上記プラスミドを Effectene (Qiagen) により HeLa 細胞に導入し、遺伝子導入後2-5日に各種測定を行なった。測定には共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 および LSM510META (Carl Zeiss) を用いた。LSM510META による測定では、λモードを用いた。蛍光はグレーティングにより分離し、462.6-719.4 nm の蛍光を24本の photomultiplier tube (PMT) により検出した。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

(6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl) methyl 基 (Bhc 基) を用いてケージドアミノ酸を合成しているが、タンパク質やペプチドへの応用も理論的に可能であると考えられる。そこで、タンパク質の機能制御を、次の2つの方法で達成することを目指した。まず、タンパク質の機能を直接制御する方法として、細胞外転写翻訳系を利用したケージドタンパク質の合成を試みた。また、間接的に制御する方法として、タンパク質機能を調節する小分子、ここでは PKC の機能を阻害するペプチドのケージド化合物合成を試みた。これらの手法が実現できれば、光を照射する場所および時間によってタンパク質の機能を自在に操作でき、さまざまな生命現象解明の強力な手法となることが期待される。また、遺伝子の機能制御法としては RNA interference (RNAi, RNA 干渉) に注目した。RNAi は、21-23 塩基の短い2本鎖 RNA, small interfering RNAs (siRNA) を介して起こる、配列特異的遺伝子発現サイレンシングの強力な手法である。本研究では、ケージド化合物の化学と RNAi を組み合わせ、標的遺伝子の発現をコンディショナルに抑制する手法の開発を目指した。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害測定法の構築

多光子励起レーザーは、共焦点顕微鏡の光源として用いられている通常のレーザーと異なり、焦点面のみを励起することが可能であることから、励起光による細胞障害や蛍光プローブの消光を軽

減でき、特に厚みのある標本の三次元蛍光観察に優れている。流れ刺激下にあるマウス大動脈組織中の内皮細胞及び平滑筋細胞の細胞内カルシウム動態と血管機能及び細胞障害性を多光子励起顕微鏡を用いて評価する実験系を構築した。

ddY 系雄性マウス (6-10 週齢) の頸動脈をハサミで切断し、速やかに瀉血後開胸し、胸部大動脈を摘出した。摘出した血管を洗浄した後、10 μM fluo-4/AM と 0.06% Cremophor EL 1 μL を含む栄養液に浸し、35°C に設定した恒温層内で約60分間インキュベートした。

マウス大動脈の流れ刺激受容応答の可視化のために組織片を自作の平行平板型チャンバーに固定し、シリンジポンプから任意の流速で Krebs-Henselite-HEPES 溶液を灌流することによりシェアストレスを負荷した状態で、血管組織片の蛍光画像を取得した。顕微鏡には、多光子励起レーザー走査型顕微鏡システム (Bio-Rad, RTS2000-MP) を用いて、780 nm の多光子励起により生じる蛍光の 450 nm~600 nm をフォトマルチプライヤーで検出し蛍光画像として記録した。蛍光画像を用いた血管応答の評価方法として収縮・弛緩反応に伴う内皮細胞の移動距離を測定した。

(4) K⁺チャネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発

リン酸カルシウム法による遺伝子導入により、3型リアノジン受容体 (RyR3) をヒト胎児腎臓由来細胞 (HEK293) に一過性に発現させた。PCR により native HEK293 細胞にはリアノジン受容体 (RyR1, 2, or 3) は殆ど検出されなかった。RyR3 遺伝子導入による RyR3 機能発現は 1 mM caffeine により細胞内 Ca²⁺濃度上昇が生じることで確認した。Ca²⁺活性化 K⁺チャネルのうち小コンダクタンスの SK2 タイプの遺伝子を HEK293 細胞へリン酸カルシウム法により発現させたうえ、抗生物質 G418 耐性によりクローニングし、定常発現細胞を得た。SK2 チャネル機能発現はホールセルパッチクランプ法により細胞内 Ca²⁺濃度を pCa6.5 または 6.0 に保った上で、SK チャネル特異的拮抗薬である 100 nM apamin で抑制される電流成分が観察されることで確認した。RyR3 と SK2 の共発現細胞は、SK2 定常発現細胞に RyR3 を一過性に発現させることで得た。

光学的手法による細胞内 Ca²⁺濃度の画像解析は画像解析装置 ARGUS/HiSCA (浜松ホトニクス社) あるいは共焦点レーザー顕微鏡システム RCM8000 (ニコン社) と Ca²⁺蛍光指示薬 fluo-4 を用いておこなった。

(5) ラット初代培養肝細胞における Cyclosporine A の酸化ストレス誘発性の解析

6週齢のCrj:CD(SD) IGS雄ラットからコラーゲンゼラ流法でラット肝細胞を単離し、コラーゲンコートした24 wellプレートに 4×10^5 cells/mLの濃度で0.5 mLずつ播種した。37°CのCO₂インキュベータ中で2時間培養して接着させた肝細胞をDMSO (終濃度1%) に溶解したCyclosporine A(CsA)の50あるいは100 μ Mに20時間暴露した。培養終了後培養上清を用いてLDH assay法によって細胞生存率を測定し、細胞を用いて細胞内の総グルタチオン量 (tGSH) あるいはrGSHを測定した。一部のサンプルについてTaqMan RT-PCR測定をおこなった。また、コラーゲンコートした96well plateにラット肝細胞を 4×10^5 cells/mLの濃度で0.125 mLずつ播種し18時間培養したのちROSおよびMit Δ Ψ の変動を測定した。

(6) バイオフィトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

フェッドバッチ培養法は組換え蛋白質の生産においてよく用いられる培養方法のひとつであるが、生産プロセスをより効率化するためには、高い生存率を長期間維持することが望まれる。組換え細胞の生存率低下はアポトーシスによるものであることが報告されている。貧弱な合成培地に馴化した細胞は、Fed-Batch 培養の後半に培地環境が悪化した際 (増殖因子の不足、老廃物の蓄積など) にも耐えられることが期待される。そこで、アポトーシス耐性の組換えタンパク質産生株を得ることを目的として、CD CHO 培地に浮遊馴化した細胞である CHO K1 SV 細胞を poor な既知組成の合成培地へ馴化することを試みた。培地の組成を以下に示す。DMEM/F12(1:1)培地に、市販のアミノ酸濃縮液、グルタチオン、セレン、プルロニック F68、炭酸水素ナトリウム、エタノールアミンを添加した DMEM/F12(1:1)改変培地 (以下 DF(A)培地とする) を用いた。IGF-I などの増殖因子や抗酸化物質を含まない (または濃度が低い) 合成培地に馴化した細胞はアポトーシス耐性になると考えられるため、LongR³ IGF-I (JRH 製) を添加した培地と添加しない培地を用いた。この他、DF(A)培地の鉄濃度を約 43 倍にした DF(B)培地、DMEM/F12(1:1)培地にアミノ酸とアスコルビン酸、鉄、エタノールアミン、プトレッシン、ピルピン酸、Aurintricarboxylic acid(ATA)、ビタミン K₃(メナジオン)を添加 (一部は強化) した DF(C)培地、DF(C)培地からメナジオンを抜いた DF(D)培地、DF(A)培地からグルタチオンを抜いた DF(E)培地や CD CHO 培地 (Invitrogen

製) を用いた。DF(A)培地から DF(E)培地までと CD CHO 培地には L-グルタミンを終濃度 6mM となるように添加した。DF(A)培地以外の培地への馴化は、DF(A)培地で馴化中の細胞を各培地に播種し、継代する方法を取った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各研究機関の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施するものであり、倫理審査の承認を得ている。

3. 研究結果

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブによるアポトーシスの測定

CFP, GFP, YFP, DsRed の4種の蛍光タンパク質を用いて作製した6種のプローブを HeLa 細胞に発現させ、TNF- α 刺激により細胞死を誘発した。6時間後、LSM510META により蛍光スペクトルを測定した結果、CFP, YFP, DsRed 蛍光はよく分離しており、これらの蛍光は LSM510 システムにおいても同時測定が可能であると考えられた。上記の結果より CR エフェクターカスパーゼプローブ (CRec), YR イニシエーターカスパーゼプローブ (YRic) を細胞に同時適用し、458nm の励起光による CRec の測定 (1st track), 488nm の励起光による YRic の測定 (2nd track) という2つの測定トラックを作成し (マルチトラックモード)、イニシエーターおよびエフェクターカスパーゼ活性化の LSM510 システムによる同一細胞内同時検出に成功した。Fig. 1(a) に蛍光顕微鏡における観察像、(b) に蛍光変化のグラフを示す。この細胞においては、TNF- α 刺激後 170 分頃に Cyan, Yellow 蛍光の急激な上昇が認められており、イニシエーターカスパーゼからエフェクターカスパーゼへのシグナル伝達は速やかに行なわれることを示している。

さらに、LSM510META システムを用い、より微細な変化を検出することに成功した。FRET 型蛍光プローブでは蛍光強度比 (アクセプター/ドナー) を変化の指標として利用することにより、より微細な真の変化を検出することができる。しかしながら、CFP, GFP, YFP 3者の蛍光は重なりが大きく、蛍光フィルターを用いた従来の方法では蛍光を分離することは困難である。そこで、LSM510META を用いたスペクトラルイメージング法を利用し CY と GR の同時測定 (ダブルカラー-FRET) を行った。核移行型 CY および細胞質 (核排出) 型 GR を用いた。

両者を発現させた HeLa 細胞像を Fig. 2 に示す。核、細胞質部分の蛍光スペクトルより、核に CY、細胞質に GR が発現していることが分かる。細胞に TNF- α 刺激を与えると、核移行型 CY、細胞質型 GR の蛍光変化（蛍光強度比 YFP/CFP, DsRed/GFP の低下）が認められ、核内および細胞質におけるカスパーゼの活性化が検出された (Fig. 3)。核内カスパーゼ活性化と細胞質カスパーゼ活性化はほぼ同時に観察された。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

(2-1) 細胞外転写翻訳系を利用したケージドタンパク質の合成

タンパク質の活性部位のアミノ酸側鎖に光分解性保護基を導入することで、ケージドタンパク質の合成を行うことにした。ターゲットとするアミノ酸は、修飾が容易な Lys を選択した。Bhc 基の 7-methoxy 誘導体である Bmc 基を導入した Lys(Bmcmoc) を合成し、アミノ酸レベルでの光化学特性を調べた結果、高い光分解性（光分解効率 $\Phi_e = 104$ ）を示すことが明らかとなった。しかしながら、タンパク質への非天然アミノ酸の導入法として開発された 4 塩基コドン法を用いて、Lys(Bmcmoc) のストレプトアビジンへの導入を試みたが、その導入効率は 3% 未満と低く、4 塩基コドン法において修飾 Lys をターゲットにするのは好ましくないことがわかった。そこで、高い導入効率が報告されている Tyr をターゲットにすることにした。それにあたって、まず Tyr(Bhc) の合成を行い (Fig. 4)、光分解性を調べた。その結果、 $\Phi_e = 970$ と非常に高い光分解効率を有することが判明した。続いて、tRNA 導入の前駆体である Boc-Tyr(mBhc)-OCH₂CN の合成を行った (Fig. 4)。

(2-2) PKC の機能を阻害するペプチドのケージド化合物合成

PKC は増殖や分化など、さまざまなシグナル伝達に関わっている。PKC の特定の部位へのトランスロケーションを制御するために、rat・PKC の VI-2 領域と相同で、PKC のトランスロケーションを阻害するオクタペプチドのケージド化合物 EAVSLK(Bmcmoc)PT の合成を試みた。前駆体 (Fig. 5-1) は Fmoc-Lys とクロロホルメート (Fig. 5-2) との反応で合成し、目的のケージドオクタペプチド (Fig. 5-3) を Fmoc 法で固相合成することに成功した。

(2-3) 哺乳動物細胞における RNAi の光制御法の開発

細胞内に導入された siRNA は細胞質で 1 本鎖に

解離してターゲット配列を持つ mRNA と相補鎖を形成し、これを選択的に破壊すると考えられている。よって、リン酸と反応して光解離性のエステルを形成する Bhc-diazo (Fig. 6 (2-4)) 部位を 2 つ持つ 3 種類の光解離性クロスリンカー (Fig. 6 (2-4)) を設計した。クロスリンカーと siRNA と混合することにより、ジアゾ基とリン酸が添加物や触媒なしで反応し、一本鎖への解離が阻害されること、および光照射によって再び元の siRNA が生成することを電気泳動等により確認した。HeLa 細胞に一過的に発現した GFP の蛍光強度を指標にして、GFP を標的にした siRNA による RNAi の効果を定量した。その結果、Cross-linker3 と siRNA の反応時間は 8 時間以上必要であることと、Cross-linker3 は siRNA に対しモル比で 20 倍量 (溶媒組成 H₂O/DMSO=1/19) 反応させるのが最適条件であることが明らかとなった。また、ジアゾ基を持たない bisBhc-CH₃ および Bhc-diazo 単体では効果がないこと、Cross-linker1 は他に比べ、siRNA の機能抑制の程度が小さいのでリンカーの長さを適切に選ぶことが重要であることも明らかとなった。siRNA を加えた細胞では GFP の発現が約 90% 抑制されたのに対し、クロスリンカーと反応させた siRNA を細胞に導入することにより RNAi 誘導能が 20% 程度に低下すること、また、導入後の細胞に UV 光を照射することにより siRNA がほぼ完全にもとの機能を取り戻し、GFP の発現を効果的に抑制することを確認した。さらに、内因性遺伝子である LaminB1 をターゲットとする siRNA の抑制にも成功しており、これも UV 光を照射することにより siRNA がほぼ完全にもとの機能を取り戻すということも確認できた。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害の解析

自作の平行平板型チャンバーを用いて、細胞個々の Ca²⁺ 応答と、血管組織片の局所的な収縮・弛緩反応を同時に評価可能であるかどうかについて検討を行った。血管組織片に 30 nM フェニレフリンおよび、100 nM アセチルコリンを適用した結果、組織片の収縮に伴った内皮細胞の移動及び Ca²⁺ 応答が認められた。よって流れ刺激下にあるマウス大動脈組織中の内皮細胞及び平滑筋細胞の細胞内カルシウム動態と血管機能及び細胞障害性を多光子励起顕微鏡を用いて評価可能であると判断した。生体活性リン脂質として注目される LPA の作用を検討した結果、高濃度の LPA は高レベルのシェアストレスが共存する病態生理的な条件で、内皮細胞の Ca²⁺ 応答を誘発し、それに伴ったトロンボキサ

ン A_2 の産生・遊離を亢進する。その後、平滑筋細胞では、トロンボキサン A_2 受容体を介して、 Ca^{2+} オシレーションに伴う収縮反応が誘発されることが明らかとなった。

(4) K^+ チャネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発

本研究は細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と細胞機能の関連を仲介する K^+ チャネルの役割と病態でのその役割の変化を光学的に解析するモデル細胞系と解析手法の確立を行なうことを目的としている。本年度はリアノジン受容体遺伝子を HEK293 細胞に導入後、カルシウムイオン感受性プローブ等を取り込ませ、細胞障害によるペースメーカー機能障害を画像解析によって解析する系を作製した。RyR3 を高発現させた HEK293 細胞において Ca^{2+} 振動が観察された。 Ca^{2+} 振動は RyR3 が高発現した小胞体からの局所的 Ca^{2+} 遊離 (Ca^{2+} スパーク) で始まり、細胞全体に Ca^{2+} 波として広がることが明らかとなった。本 RyR3 再構築系での Ca^{2+} 振動の性質は、生体から小腸筋層を摘出し、これを細断した細胞群を培養することによりえた Cajal 介在細胞を含む細胞塊でのそれと薬理的に極めて近いものであることが明らかとなった。

現在、さらに Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルを共発現させることにより上記発現系ペースメーカーモデルを進化させ、 Ca^{2+} 振動を細胞間の信号伝播が可能なペースメーカー電位へと変換するモデルの構築を試みている。

(5) ハイコンテンツスクリーニングシステムを用いた毒性プロファイリング・スクリーニング系の開発

一般的に酸化ストレスは薬物誘発性肝毒性の重要な因子であると考えられる。Cyclosporine A (CsA) は真菌類の *trichoderma polysporum* から単離され免疫抑制剤として古くから使われているが、臓器移植等で有用な反面、血中胆汁酸の上昇、高ビリルビン血症、血中 AST、ALP の上昇、胆汁うっ滞など肝毒性関連の副作用が報告され、これらの副作用の原因として酸化ストレスがあげられている。今回、還元型グルタチオン (rGSH)、活性酸素 (ROS) およびミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi$) の各々の蛍光プローブである ThioGlo™ 1、DCFH-DA および Rh123 の蛍光度と遺伝子発現変動を指標としてラット初代培養肝細胞における CsA の酸化ストレス誘発性を検出することを試みた。接着後 (培養 2 時間) の肝細胞に CsA を 20 時間暴露した結果、細胞内 rGSH の減少が認められ、これは total GSH の

変動と相関していた (Fig. 7)。同時に TaqMan RT-PCR 法により遺伝子発現変動を調べた結果、酸化ストレス応答系の転写因子である Nrf2 とその応答遺伝子である HO-1、TXNR1、GCLM などが上昇し ROS の除去やグルタチオン合成が活性化されていることが示唆された。培養 18 時間の肝細胞に CsA を 2 時間暴露した結果、ROS の上昇、ミトコンドリア $\Delta\Psi$ の減少が認められ酸化ストレス状態にあることが示唆された。以上のように、今回の検討を通じて薬剤処置によって培養肝細胞に誘発される酸化ストレス状況を種々の蛍光プローブで検出可能であることが確認された。これらの手法は薬剤性肝障害のメカニズム検討や肝毒性化合物のスクリーニングに応用可能である。

(6) バイオフォトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

DF (A) 培地では LongR³ IGF-I の有無に関わらずグルコース以外の因子が制限因子になっていると考えられた。LongR³ IGF-I 無添加の DF (A) 培地で 3 継代目の 3 日目から 4 日にかけて生細胞密度が 0.64×10^6 cells/mL から 0.62×10^6 cells/mL になって増殖が止まっていた時のアミノ酸分析を実施したが、4 日目に枯渇しているアミノ酸はなく、アミノ酸は増殖の制限因子ではないと考えられた。馴化開始当初、CHO K1 SV 細胞は、増殖に関して LongR³ IGF-I に部分的に依存していると考えられたが、継代を重ねるごとに LongR³ IGF-I 無添加の DF (A) 培地に馴化され、もはや増殖因子としての LongR³ IGF-I を必要としなくなった。

DF (B) 培地で 8 継代実施したが比増殖速度は、DF (A) 培地と同等であった。生存率は、LongR³ IGF-I 無添加、添加ともに 90% 以上を維持していた。到達生細胞密度も DF (A) 培地と変わらず、鉄が制限因子である可能性は低くなった。

DF (C) 培地では、3 日間の培養で全ての細胞が死滅した。LongR³ IGF-I $50 \mu\text{g/L}$ 添加した DF (C) 培地でも生存率 10% であった。一方 DF (D) 培地では増殖したものの、比増殖速度、生細胞密度、生存率は DF (A) 培地と同等以下であった。DF (C) 培地での増殖阻害はビタミン K_3 (メナジオン) が原因と考えられた。

DF (A) 培地への馴化が完了した細胞を、グルタチオンを抜いた DF (E) 培地に播種し、馴化を行った。1 継代目から生細胞密度、生存率、比増殖速度が DF (A) 培地と同程度であった。DF (A) 培地からグルタチオンを抜くことにより生細胞密度、生存率、比増殖速度が低下することを予想していたが、そ

これらの低下はなかった。DF(E)培地で5継代して馴化を完了し凍結保存した。

この細胞を今後蛍光プローブを用いて解析する予定である。

D. 考察

(1) Death receptor 関連細胞内情報伝達系解析用プローブによるアポトーシスの測定

シグナル伝達過程の時間経過を正確に解析するには同一細胞内での測定が必要であり、今回検討を行った2種類のFRETの同時測定技術(ダブルカラーFRET)は細胞内情報伝達系の解析に有効な技術となりうる。

本研究ではまずCRとYRの組み合わせを利用するとダイクロミックミラーと蛍光フィルターにより蛍光を分離する従来のレーザー顕微鏡(LSM510)でも同時に検出・測定できることを示した。イニシエーターカスパーゼ、エフェクターカスパーゼの活性を同一細胞内で同時に測定・解析したのは本研究が初めてである。また、LSM510METAを用いてスペクトラルイメージング法によりCYとGRの組み合わせで2つの蛍光強度比の同時画像化(ダブルカラーFRET法)を検討し、良好な結果を得た。本法は極大蛍光波長が近接した蛍光物質を分離する能力に優れており、従来法ではほぼ不可能であったCFP, GFP, YFP, DsRed 4者の分離を行なうことが可能である。原理的にはいかなる蛍光体の組み合わせでも蛍光分離、測定は可能であり、細胞、プローブ、反応条件に合わせて適当な組み合わせを選択して利用することが可能であろう。しかしながら、良好な解析結果を得るには用いる蛍光物質の蛍光強度に大きな差がないことが必要であり、必ずしも全ての場合において可能なわけではない。有用な測定を行なうためには、アッセイの条件に応じて適切な測定法、蛍光プローブを選択することが必要である。

(2) ケージド化合物を用いた、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発

ケージド化合物を活用して、タンパク質および遺伝子の機能を光制御する方法の開発を試みた。このような手法を用いて、医薬品の標的分子となるタンパク質が生理的条件下で持つ本来の機能を明らかにすることは、医薬品の作用機序を解析する上でも重要である。タンパク質の機能を、高い時空間分解能で光制御する手法を確立することで、これらの解析法への展開も期待できる。また、本研究によりケージド化合物の化学とRNAiを組み合

わせて、標的遺伝子の発現を光制御することが可能となってきた。この手法により時間空間特異的にRNAiを起すことが可能であるため、多方面の応用が可能である。

(3) 二光子励起観察による細胞組織障害の解析

本研究で確立した実験系は、血管組織をサンプルに、単一細胞レベルの詳細なCa²⁺応答と収縮および弛緩反応を同時に観察することが可能である。内皮細胞と平滑筋細胞の相互作用を生体内に近い条件で解析できるという点で、極めてユニークであり、医薬品の開発においても有用なツールとなろう。また、血管動態の解明においても有力なツールとなることも期待できる。

また、本研究の結果は「流れ刺激存在下でLPAにより誘発される内皮細胞のCa²⁺応答」に引き続いて起こる血管組織応答が収縮反応であることを初めて明らかにしたものである。これは、「LPAが内皮細胞のメカノセンシタイザーとして機能し、なんらかの生体反応の制御に関与している」という仮説を裏付ける重要な結果である。

(4) K⁺チャネル関連細胞機能障害解析細胞系等の開発

RyR3発現HEK293細胞でのCa²⁺振動は消化管ペースメーカーの基盤となるCa²⁺振動のモデル細胞系として使用できる可能性が高い。今後細胞傷害とペースメーカーとの関係を解析する上でも有用なインビトロ試験系にもなると考えられる。また、この系を用いて消化管運動調整薬のスクリーニング系を確立することも可能かもしれない。

(5) ハイコンテックススクリーニングシステムを用いた毒性プロファイリング・スクリーニング系の開発

薬剤処置によって培養肝細胞に誘発される酸化ストレス状況を種々の蛍光プローブで検出可能であることが確認された。特にグルタチオンの酸化還元状態の計測が簡便に行える可能性があるため、薬剤性肝障害のメカニズムの解明に汎用される方法になりうるかもしれない。また肝毒性化合物のハイスルット・スクリーニングにも応用可能である。

(6) バイオフィトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法の開発

宿主をアポトーシス耐性化し、将来的にはアポトーシス耐性宿主を発現ベクターでトランスフェクションすることによって、アポトーシス耐性の生産株を得ることが可能である。さらに既知組成の合成培地に馴化した宿主から生産株が得られ

ば, Batch 培地および Feed 培地の自社開発が容易になる上, 増殖因子が不要になる, あるいは増殖因子の必要濃度が低下するなどして培地コストの低下が見込まれる. また, 高い生存率を長期間維持できれば, 生産濃度向上のみならず, プロテアーゼの細胞外への漏出抑制などが期待される. 今後, タンパク質生産に有効なアポトーシス耐性株について各種バイオフォトニクスプローブを用いて特性を解析する予定である.

E. 結論

(1) FRET を利用したカスパーゼ活性化バイオフォトニクスプローブを設計, 作製し, 同一細胞で2つの反応を同時に画像化, 解析することが可能な条件を確立した. このダブルカラー-FRET 法により, 細胞内で生じる2つの反応の相互効果を解析することが可能であり, 医薬品開発の各段階において広く利用できる技術である.

(2) タンパク質の機能制御を行うケージド化合物を合成した. また, ケージド化合物の化学と RNAi を組み合わせて, 標的遺伝子の発現をコンディショナルに抑制する手法の開発に成功した.

(3) カルシウム感受性蛍光プローブ, pH 感受性蛍光プローブ, NO 感受性プローブ等を用い, 多光子励起顕微鏡を利用して細胞内カルシウムイオン動態と血管機能および細胞障害性を解析するシステムを構築し, 流れ刺激下にあるマウス大動脈組織中の内皮細胞及び平滑筋細胞への LPA の作用を検討した.

(4) 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と細胞機能の関連を仲介する因子としての K^+ チャネルの役割と病態での役割変化を解析するため, 遺伝子工学的手法を用いて自発性 Ca^{2+} 濃度変化を生じる実験細胞系を作製し, 加えて Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルを共発現させることにより解析用モデル細胞を作製した.

(5) ラット初代培養肝細胞と蛍光プローブを用い, 薬物の酸化ストレス誘発性のプロファイリング/スクリーニング系を開発し, Cyclosporine A の酸化ストレス誘発性を解析した.

(6) バイオフォトニクスプローブを用いたタンパク質生産用細胞基材のモニタリング法開発の第一段階として, タンパク質性医薬品の製造に有用なアポトーシス耐性宿主細胞を得るため, CD CHO 培地に馴化された CHO KI SV 細胞を, 増殖因子不含あるいはグルタチオン不含で組成が明らかな培地に馴化, 細胞を得た.

F. 研究発表

- 1) H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, H. Sakurai, H. Ohata, K. Honda, K. Momose, I. Namekata, H. Tanaka, K. Shigenobu, R. Nakamura, T. Hayakawa, and T. Kawanishi; Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* (in press)
- 2) T. Suzuki, T. Nishimaki-Mogami, H. Kawai, T. Kobayashi, Y. Shinozaki, Y. Sato, T. Hashimoto, Y. Asakawa, K. Inoue, Y. Ohno, T. Hayakawa, and T. Kawanishi, Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives, *Phytomedicine* (in press)
- 3) H. Tanaka, C. Komikado, H. Shimada, K. Takeda, I. Namekata, T. Kawanishi, K. Shigenobu; The R(-)-Enantiomer of Efonidipine Blocks T-type but Not L-type Calcium Current in Guinea-Pig Ventricular Myocardium, *J Pharmacol. Sci.*, **96**, 499-501 (2004)
- 4) H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Kawanishi. Simultaneous imaging of initiator / effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1693**, 101-110 (2004)
- 5) 川西 徹, 河合 洋: 細胞傷害機構のイメージング, *実験医学* **22**, 428-429 (2004)
- 6) T. Nishigaki, C. D. Wood, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Furuta, D. Ellias, K. Shiba, S. A. Baba, A. Darszon, A sea urchin jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase. *Dev. Biol.* **272**, 376-388 (2004).
- 7) T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Sugimoto, M. Kanehara, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, M. Iwamura, R. Y. Tsien, Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photo-releasable cyclic nucleotides for both one and two-photon excitation. *ChemBioChem*, **5**, 1119-1128 (2004)
- 8) H. Ando, T. Furuta, H. Okamoto, Photo-mediated Gene Activation using Caged mRNA in Zebrafish Embryos. *Methods in Cell Biology*, **77**, 159-171 (2004)

- 9) T. Furuta, K. Noguchi, Controlling cellular systems with Bhc-caged compounds. *Trends Anal. Chem.* **23**, 511-519 (2004)
- 10) 古田寿昭, ケージド化合物, 生化学, **76**, 2004
- 11) 古田寿昭 (分担), ケージド化合物, 先端の分析法-理工学からナノ・バイオまで「エヌ・ティー・エス」, pp 332-339 (2004年12月)
- 12) T. Furuta, Chapter 1.2: Coumarin-4-ylmethyl Phototriggers, in "Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules," M. Goeldner and R. S. Givens Eds, WILEY-VCH, Weinheim, pp 29-55 (2005)
- 13) T. Hashimoto, H. Ohata, and K. Momose. Itch-scratch response induced by lysophosphatidic acid in mice. *Paracology* **72**, 51-56 (2004)
- 14) 大幡久之, 新岡丈治, 金明淑, 安藤さなえ, 山本雅幸, 百瀬和享メカノセンシタイザーとしてのリゾホスファチジン酸の役割, 日本薬理学雑誌, **124**, 329-335 (2004)
- 15) 中山晋介, 大矢 進, 今泉祐治, Cell cluster 標本を用いた腸管自動性メカニズムの研究 日本薬理学雑誌, **123**, 149-154 (2004)
- 16) Masahiro Aoyama, Aki Yamada, Jing Wang, Susumu Ohya, Shinji Furuzono, Takayo Goto, Yasushi Ito, Tatsu-aki Matsubara, Kaoru Shimokata, Shingo Hotta, Wayne Chen, Yuji Imaizumi & Shinsuke Nakayama. Requirement of ryanodine receptor for pacemaker Ca^{2+} activity in ICC and HEK293 cells transfected with RyR3. *J. Cell Sci.* **171**, 2813-25 (2004)
- 17) Masumiya H., Saito M., Ito M., Matsuda T., Noguchi K., Iida-Tanaka N., Tanaka H., Shigenobu K.: Lack of action potential-prolonging effect of terfenadine on rabbit myocardial preparations. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 131-135 (2004)
- 18) Takeda K., Yamagishi R., Masumiya H., Tanaka H., Shigenobu K. Effect of cilnidipine on L- and T-type calcium currents in guinea-pig ventricle and action potential in rabbit sinoatrial node. *J. Pharmacol. Sci.* **95**: 398-401 (2004)
- 19) Tanaka H., Masumiya H., Shigenobu K. Dihydropyridines with dual blocking activity on L-type and T-type Ca^{2+} channels. *Recent Res. Devel. Life Sci.* **2**:121-128 (2004)
- 20) Nouchi H., Tanaka H., Shigenobu K. Pharmacological properties of the developing chick myocardium. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* (in press)
- 21) Nakahara T, Mitani A, Kubota Y, Maruko T, Sakamoto K, Tanaka Y, Koike K, Shigenobu K, Ishii K. MaxiK channel-triggered negative feedback system is preserved in the urinary bladder smooth muscle from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Smooth Muscle Res.* **40**:97-109 (2004)
- 22) Tanaka Y, Koike K, Alioua A, Shigenobu K, Stefani E, Toro L. Beta1-subunit of MaxiK channel in smooth muscle: a key molecule which tunes muscle mechanical activity. *J Pharmacol Sci.* **94**:339-47 (2004)

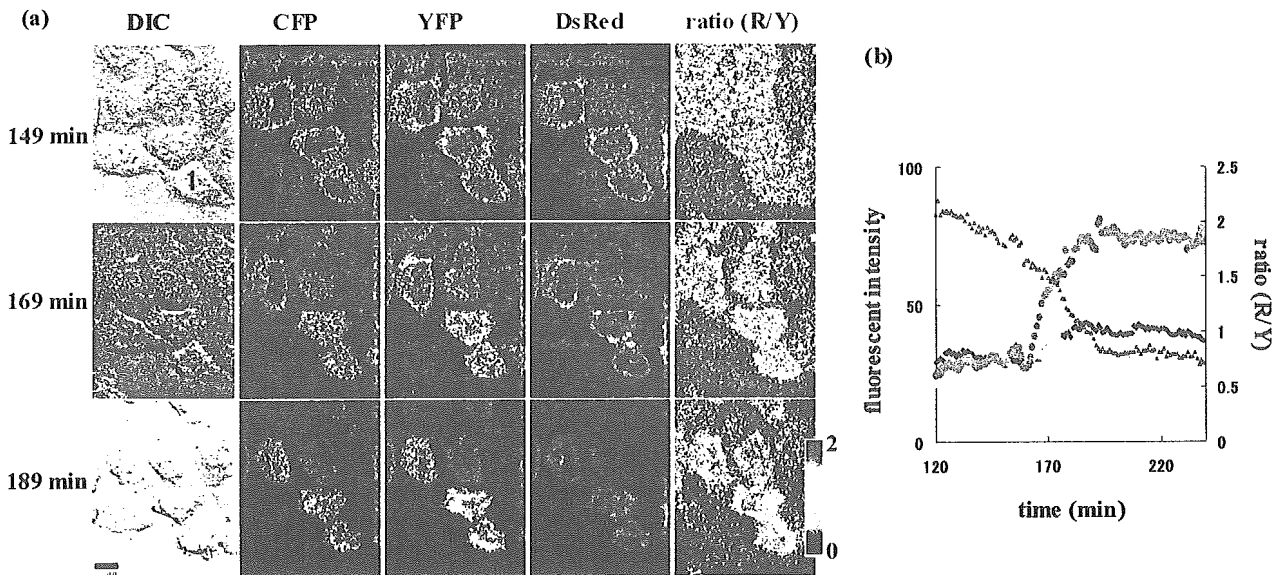


Fig.1 Time lapse images of double FRET. HeLa cells co-expressing YRic and CRec were incubated with $TNF-\alpha$. The cells were then observed by LSM510. (a) DIC images (left panels), fluorescent images of CFP, YFP, DsRed, and the emission ratio of DsRed/YFP (right panels) at the indicated time are shown in pseudo colors. (b) Fluorescent changes of cell-1 indicated in (a).

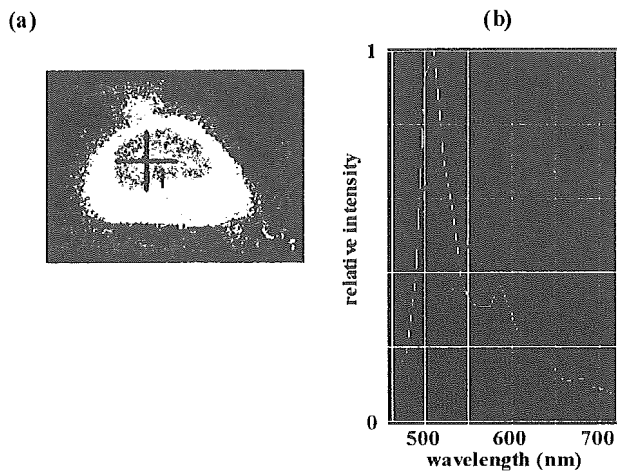


Fig. 2 (a) Fluorescent image of HeLa cell expressing nuclear-localized CY probe and cytosol-localized GR probe. (b) Fluorescent spectra of the point 1 (nuclear) and 2 (cytosol) indicated in (a).

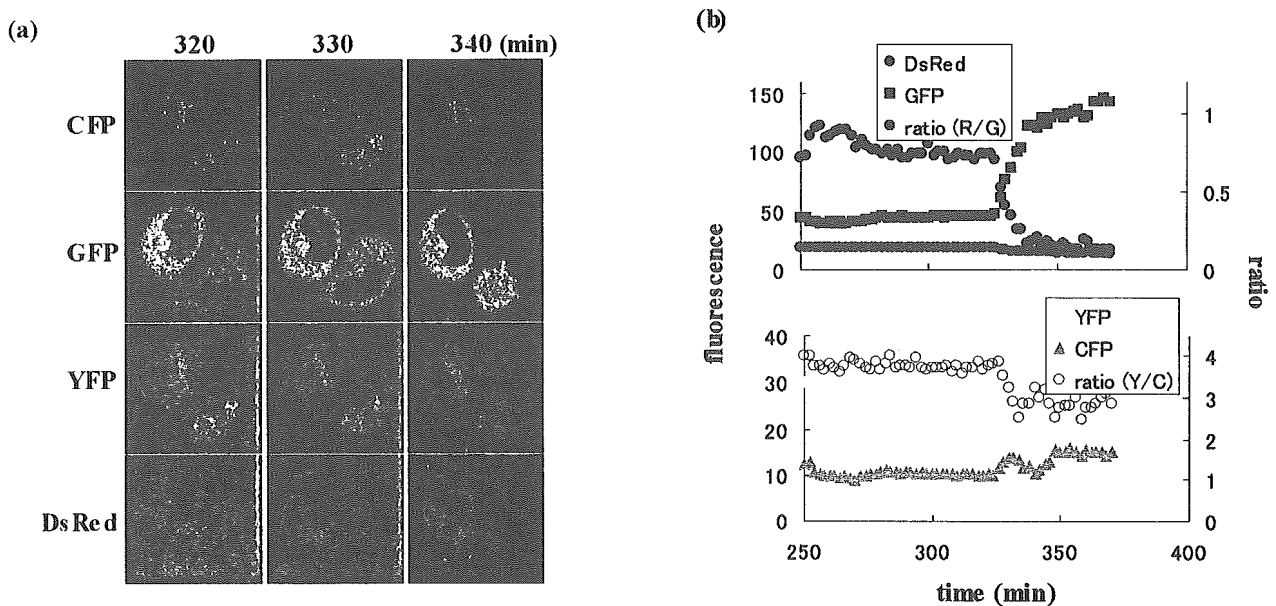


Fig. 3 Fluorescent changes during cell dath. HeLa cells expressing nuclear-localized CY probe and cytosol-localized GR probe were treated by $TNF-\alpha$. The images at the indicated time were captured by LSM510META (a). Fluorescent changes of the lower right cell were shown in (b).

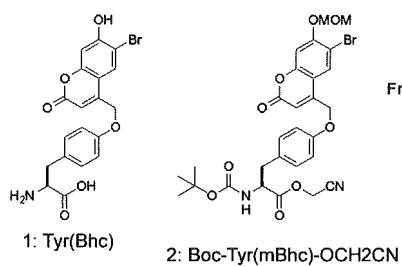


Fig. 4 Bhc-caged Tyr derivatives.

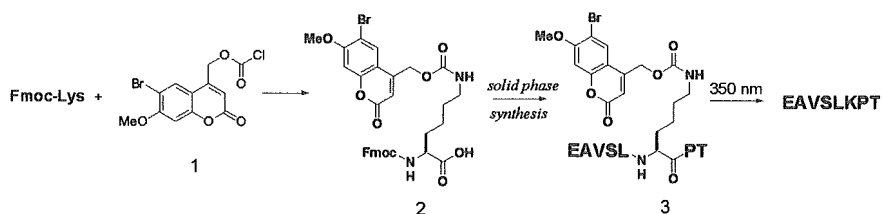


Fig. 5 Gaged ePKC inhibitor peptide, EAVSLK(Bmcmoc)PT

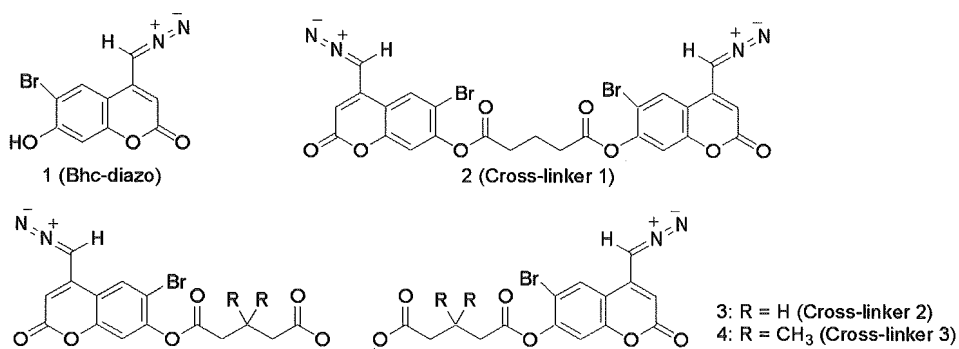


Fig. 6 Chemical structures of photochemically removable dsRNA cross-linkers

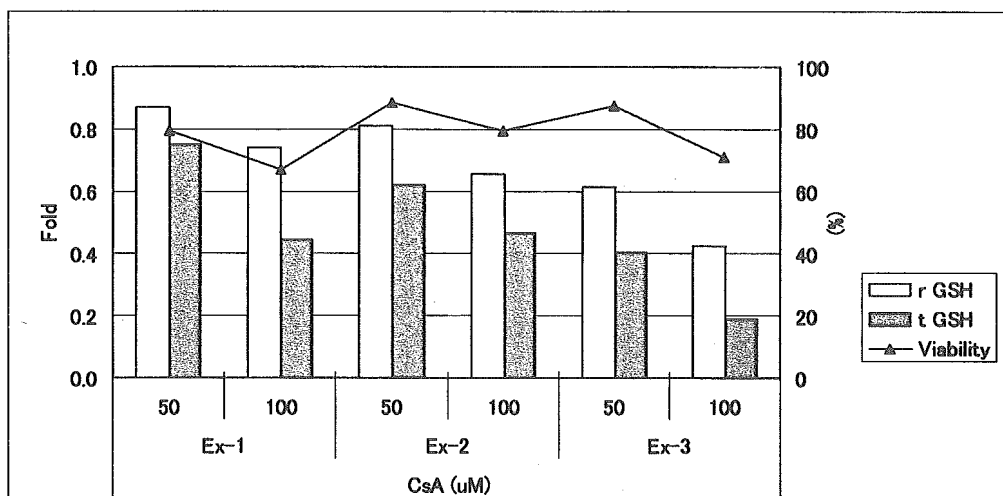


Fig. 7 Monitoring of reduced glutathione (rGSH) and total glutathione (tGSH) in rat primary hepatocytes using fluorescent probes. The hepatocytes were treated with 50 or 100 μM of CsA for 20 h. Viability was calculated by the amount of LDH in the supernatant of culture. n=3.