

生細胞内分子間相互作用の定量的解析技術の開発

●三輪 佳宏¹⁾²⁾

1) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 2) 科学技術振興機構 さきがけ

<研究の目的と進め方>

『生きたままの細胞中の分子を見る』技術は、固定してしまいたいわけの「死んだ状態」で観察する場合と異なり、時間経過にともなう変化をリアルタイムに追跡可能にし、その分子の真の姿や役割を知る上で重要な情報を得ることを可能にする。さらに生細胞中で、タンパク質間相互作用の動態や強度を定量的に解析したり、様々な生理活性物質の濃度測定を可能にする新技術が開発できれば、細胞内現象をモデル化しシミュレーションシステムを確立していくための、新規なパラメーターを多数得ることが可能になると期待できる。

蛍光タンパク質を用いた生細胞内イメージングは、現在では最も普及した解析方法の一つである。しかし、新規な性質を獲得した蛍光タンパク質やその応用法を開発することにより、これまで以上に、細胞内の動的な変化を追求することが可能になる。例えば、紫光の照射により波長特性が緑から赤に変化する蛍光タンパク質 Kaede を用いると、照射前後での時間変化を定量的に追跡することが可能になると期待される。そこで、代表者が研究を進めるデグラトンプローブと名付けた技術に、Kaede のような動的な状態をとらえることができる新たな蛍光タンパク質を導入することで、時間軸に沿ったマルチカラー解析を可能にし、定量的なデータ取得を実現する。

これと並行して、すでに開発済みのドキシサイクリンを検出できるプローブを全身性に発現するトランスジェニックマウスを用いて、時間経過による薬物体内動態の変動を、蛍光データをもとに解析するモデルを構築する。またより定量的な検出が可能な改変型プローブの開発を試みる。

<2007 年度の研究の当初計画>

1) 蛍光タンパク質 Kaede の RUBY システムへの応用、2) 生細胞内低分子量物質濃度の測定、の新技術開発に加えて、3) 生きたマウスでの薬物投与による蛍光強度の変動を定量化し、コンピュータでシミュレーションすることで薬物体内動態のモデル構築も試みる。

1) については、非常によい Kaede 変異体の作成に成功したので、本年度は実際にこの変異 Kaede タンパク質を用いて、様々なタンパク質間相互作用を検出し、その機能的な性能を確認するとともに、定量性について検討する。特に、この変異体では、相互作用後の分離過程を高感度に検出できると期待されるので、赤色光の消失の時間経過を詳細に解析し、時間分解能に関して性能を検定する。

2) については、昨年度に引き続き改良型プローブの開発を進めるとともに、Tet 濃度の違いと蛍光強度の相関、Tet の添加および除去による蛍光強度変化の時間経過などに関して、定量的な解析を実施する。とくに異なる蛍光タンパク質を用いたプローブ

での定量性の違いについて、検討する。またデグラトンプローブ分解制御機構についてもプローブ結合因子の同定を行い、解析を進める。

3) については、九州大学の吉田博士との共同研究により、同一個体での投与方法を変えた場合の蛍光変動の詳細なデータを多数取得してデータを蓄積し、これをもとにシミュレーションをおこなって、モデルを構築する。

<2007 年度の成果>

1) について、タンパク質間相互作用を瞬間的に停止させて乖離させることが可能な実験系の開発が陸奥か行く、Kaede の定量的な評価を十分に行うことができなかった。

2) について、分子間相互作用によって制御される分解調節にどのような細胞内因子が関わっているかを明らかにすることは、蛍光プローブの定量性を検討する上で非常に重要である。そこで本年度はこの分解調節機構を同定することを目的とした解析に最も力を注いだ。昨年度までに同定した、分解制御性プローブに共通して結合している細胞内タンパク質を RNAi 法により順番にノックダウンして、蛍光プローブの強度変化を解析した。もしも分解制御を担う因子であった場合には、そのノックダウンにより DsRed の分解が抑制されることにより、蛍光強度の増強が起こると予想される。そこで、DsRed の蛍光強度を指標に、ノックダウンによって蛍光増強を起こす因子を探索した。その際、やはり昨年度において予想したとおりの因子が細胞の生存に必須であったため、誘導発現系を用いて時間経過を追跡する方法を用いた。その結果、いくつかの「武運会制御候補因子」を同定することに成功した。次に、この因子がテトラサイクリン系抗生物質検出プローブの分解制御にも関与するかどうかを解析したところ、やはりノックダウンによって、ドキシサイクリン非添加であるにもかかわらず蛍光増強を起こすことが明らかとなった。

本研究においては、単なる分解制御系の同定だけではなく、そのシステムが定量的な測定に与える影響を明らかにすることが本来の目的であるため、まずは同じ蛍光タンパク質の DsRed と Kaede が同じように分解制御を受けているのかどうかに関して、解析を進めた。その結果、分解制御因子と予想されているタンパク質をノックダウンした場合に、DsRed では著しい蛍光増強が見られたのに対して、Kaede ではむしろ逆に蛍光が減弱することが明らかとなった。このことは変性タンパク質を判定し分解系に引き渡す細胞内制御システムはあまり単純なものではなく、蛍光タンパク質同士であっても別経路によって制御されている可能性を示したものである。

3) について、吉田寛博士との領域内共同研究によって、モデル構築を進め、実際に取得した時系列データに基づいて数理的な解を求めることを行った。ドキシサイクリンの投与方法を複数種

類実施することにより、その組み合わせでさらに詳細なパラメーターを解けることが明らかとなった。また実際に測定してみると、1匹1匹に非常に大きな薬物動態の個体差があることも見いだした。

<国内外での成果の位置づけ>

今回見いだした分解制御の候補因子は、実はヒトやモデル動物において変異が報告されており、それらの変異によって神経疾患を起こすことが明らかになっている。しかしその発症機序については不明なままである。今回の発見に基づいて分解制御の詳細が明らかになれば、この疾患の発症機序を明らかにしたり、将来的な治療法の開発に結びつく可能性がある。今回の候補因子の他の役割は文献的にも報告されているが、分解系に引き渡す役割を持つ可能性に関しては、まったく報告がない。

薬物動態に関して、薬物とタンパク質の定量的な相互作用を用いてイメージングすることで、生かしたままでの時系列データを得る手法はこれまで前例がなく、その方法を用いて初めて遺伝的には同じ純系のマウスであっても、非常に大きな個体差が生まれることを見いだすことができた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Kaedeを用いたタンパク質間相互作用の定量的解析のためには、結合を人為的にかつ素早く操作できるタンパク質の組み合わせを用いることが不可欠であるが、今年度はそのためのシステム構築が十分にうまくいかなかった。今後さらによりモデル系を探索して、解析に結びつけることが必要である。

<今後の課題>

今年度の最大の成果である、変性タンパク質を分解制御する因子に関して、さらにより詳細にその分子機構を明らかにすることが必要である。とくにユビキチン-プロテアソーム系への引き渡しに要する時間を定量的に明らかにすることで、分解制御を用いたデグラトンプローブの時間分解能を明らかにすることができることを期待される。この結果はそのまま *in vivo* でのマウスイメージングの評価にも直結するものであり、共同研究で進めている数理モデル構築にも反映させていくことが重要である。

またモデル構築による動物体内薬物動態の解析と評価も、このまま進展させていくことが重要である。実際にモデル構築を行い数式化したことによって、どういった実験方法で得たデータを用いれば、具体的にどのパラメーターを明らかにできるのか、また単独の実験だけではなく同一個体を用いたこと鳴る投与実験を組み合わせることで、どの程度さらに詳細なモデル化とその解を求めることが可能になるかも明らかになりつつある。

こうした基礎的なモデル構築が進めば次の段階として、外的要因によって強制的に薬物動態を変化させた場合にも同じモデルで定量的な評価が可能かどうかを解析することが必要になる。例えば、同じ血中タンパク質の結合サイトを競合する薬物を同時投与して「薬物相互作用」をおこさせた場合に、モデルを用いて薬物動態の変化を予測できるかどうかや、薬物動態の大きな変化をきたす肝臓や腎臓の疾患を発症させたモデルマウスを用いた場合に、その変化を予測したり、逆にどういった部位の変化が寄与率が大きいかを評価することなどが次の重要な課題となる。こうした成果は、実際の臨床の現場で、複数疾患を併発している患者に薬物治療を行うような場合に、医者の経験と勘に頼るだけでな

く、理論的に推測するための情報になることが期待される。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0801291422

Kagoshima H, Nimmo R, Saad N, Tanaka J, Miwa Y, Mitani S, Wooland A. The *C. elegans* CBF β homologue BRO-1 interacts with the Runx factor, RNT-1, to promote stem cell proliferation and self-renewal *Development* 134, 3905-3915 (2007)

2. 0801291450

Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, Begum NM, Miwa Y, Yoshida H, Sato M. Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 5(7), 685-694, 2007

3. 0801291453

Shigematsu Y, Yoshida N, Miwa Y, Mizobuti A, Suzuki Y, Tanimoto Y, Takahashi S, Kunita S, Sugiyama F, Yagami K-I. Novel embryonic stem cells expressing tdKaede protein photoconvertible from green to red fluorescence. *Int. J. Mol. Med.* 20(4), 439-444, 2007

2) 書籍

1. 0801291433

三輪佳宏 (編集および原稿5編) 「実験がうまくいく～蛍光・発光試薬の選び方と使い方」羊土社 (2007)