

マウス個体イメージングによる薬物動態の数理モデル解析

●三輪 佳宏

筑波大学大学院人間総合科学研究科

<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。

申請者が開発を進める デグラトンプローブ は、生きた動物個体の細胞内低分子を定量的に計測することが可能であり、時間経過にともなう変化を同一個体でリアルタイムに追跡可能なので、数理モデルによって生命現象を解き明かすための時系列データの取得や、動物の個体差がどういったパラメーターに起因しているかを解析することに応用できる。本研究では、1) 定量解析により適した蛍光タンパク質を応用した新規プローブの開発を行い、2) さらに蛍光性のテトラサイクリン系抗生物質誘導体 AHTet を用いた直接定量と組み合わせることで、厳密に得られたデータを評価し *in vivo* 計測に基づいた数理モデルを構築する。3) さらにこれを、薬物動態が大きく変化する肝障害や糖尿病などの疾患時の薬物動態変動の解析に応用する。

<2008 年度の研究の当初計画>

テーマ1) より厳密な定量性をもつ新規プローブの開発

本研究では、EGFP より至適な蛍光タンパク質を用いて、低バックグラウンドかつ定量性に優れた新規プローブを開発する。

本研究の目的は、蛍光タンパク質性のデグラトンプローブの蛍光変動の時系列データに基づいて、数理モデルの構築を行い、連立微分方程式を解いて個々のパラメーターの関与の程度を明らかにすることにある。その数学的な解析を実施する上では、将来的にはデグラトンプローブの蛍光のみに基づいて様々な解析を行うにしても、一度は、抗生物質の直接定量とプローブの蛍光変動を生きたマウスにおいて同時に解析し、その精度を評価しておくことが重要である。しかしながら、マウスから一部採取した血液中の Tet 系抗生物質は非常に微量であり検出は困難である。そこで本研究では、Tet 系抗生物質の中でもそれ自身が蛍光物質である AHTet を用い、プローブはこれとは異なる波長特性になるように開発することで、の問題を解決し同時測定を実施することを試みる。20 年度中には、まず培養細胞での実験により、上記の条件をすべて満たす新規プローブの開発を行う。

具体的には、AHTet が緑の波長域であるので、これを避けることができる波長特性の蛍光タンパク質を選択することが必要である。本領域に置けるこれまでの解析から、13 種類の蛍光タンパ

ク質に関して、すでにそれらをデグラトンプローブに応用した際の、成熟特性・蛍光強度・分解特性について検討してあるので、そのデータに基づいて適切な蛍光タンパク質を選択するとともに、必要に応じて変異を導入し、より適切な特性の蛍光タンパク質を開発することも視野に置いて、解析を進める。さらにこれと並行して、プローブタンパク質の発現をモニターするための第3の波長域の蛍光タンパク質を探索する。とくに IRES を用いて bicistronic に発現させた場合に、十分な蛍光強度が得られるものを探索する。こちらも必要に応じて独自に開発することも検討する。

テーマ2) トランスジェニックマウス作成と薬物体内動態の定量計測

20 年度の後半には、開発したプローブを全身性に発現する新たなトランスジェニック (Tg) マウスの作成を開始する。これと平行して、従来のマウスでのデータに基づいて、蛍光強度の時系列データをもとに連立微分方程式を解くための解法や、よりよいデータ取得方法について検討する。

<2008 年度の成果>

テーマ1) より厳密な定量性をもつ新規プローブの開発

Tet 系抗生物質の中でもそれ自身が蛍光物質である AHTet を用い、プローブはこれとは異なる波長特性になるように開発することで、薬物量を定量的に解析しつつも同時に性質を解析できるプローブ、および、プローブタンパク質の発現をモニターするための第3の波長域の蛍光タンパク質の探索、とくに IRES を用いて bicistronic に発現させた場合に、十分な蛍光強度が得られるものを探索することを試みた。

まず IRES 下流でも十分な発現強度が得られる蛍光タンパク質を探索するため、AHTet と波長特性において識別が可能な、他の波長域の蛍光を示す8種類の蛍光タンパク質を IRES 下流に組み込みその発現強度を解析した。その結果、従来もっとも高い蛍光強度が得られていた、あらかじめ遺伝子を連結することで二量体化させた tandem dimer DsRed と比較して、十分な蛍光強度が得られる蛍光タンパク質は残念ながら存在しなかった。したがって、発現モニター用には従来通りの tandem dimer DsRed を用いなくてはならないことになり、AHTet によってタンパク質分解制御を受けるプローブ用に用いる蛍光タンパク質には AHTet および DsRed 以外の波長域の蛍光タンパク質を探索しなくてはならないことが明らかとなった。

そこでこの条件を満たす蛍光タンパク質としては、緑よりも短波長側の Cyan や Blue の蛍光タンパク質が、DsRed より長波長の蛍光タンパク質の中から、てきどな分解特性を示しデグラトン

プローブとして用いることができるものを探索することを行った。将来的にマウスでの *in vivo* イメージングを行うことを考えると、短波長の蛍光タンパク質では、生体に障害になりやすいばかりでなく、実際に蛍光を検出できる深度がかなり浅くなってしまったために、定量性の解析に問題がおこる可能性もある。そこで、長波長側の蛍光タンパク質を、より重点的に探索することにした。

現状では、最も長波長の蛍光タンパク質である mPlum が DsRed との波長の分離の上で望ましそうであるが、かならずしも蛍光強度が十分ではない。そのため、さらに明るい蛍光像が非れる蛍光タンパク質の探索、必要によっては自分たち自身での改良が必要になると考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

これまでの解析手法では、そもそも細胞内に入って来た一般的な薬物を細胞外のものとして識別しながら検出することそのものが不可能であった。本研究ではそれにとどまらず、検出用プローブの性状を定量的に解明し、イメージングによる数理解析にまで発展させるために、薬物そのものにも蛍光性のもを利用してマルチカラー解析を試みるため、全く前例のない新規手法の開発であると言える。またこの方法を数理的により詳細に解析できるようになれば、これまでかなり大雑把なモデルに基づいて類推することしかできなかった、生体内局所での薬物濃度やその動態を解析できる可能性もあるため、真の薬効の判定や細胞内外での動態の解析など、これまで不可能だった解析にまで道を開く可能性がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

これまで多くの蛍光タンパク質において、一般的なプロモーターから直接発現させる場合と IRES から発現させる場合とでは、極端に IRES からの発現が低いことが多く、様々な応用を考える上で不都合であるため、この問題を克服しより強く発現できる蛍光タンパク質を見いだすことを目標としていた。しかしながら、これまで最も成績が良かった蛍光タンパク質にくらべて、十分な蛍光強度が得られるものを発見することはできなかった。その原因として、そもそもなぜ IRES からの発現が極端に弱くなってしまふことが多いのか、その分子機構がまったく明らかになっていないことがあげられる。このままでは闇雲に様々な蛍光タンパク質をとりあえず試すことしかできないため、本当に発現させたいものを狙って強く発現する方法にはとうてい到達できないことになる。この問題を解決し来年度により確実な発現系を構築してトランスジェニックマウスを作成するためには、IRES からの発現の分子機構そのものにまで踏み込んだ解析を実施し、その特性を改変する根本的な方法論を気づくことが必要になると考えられる。

これに加えて、プローブも波長域の制限を受けることになったため、これまでに蓄積している蛍光タンパク質の分解特性に関する情報をそのまま利用することはできず、新たに探索する必要があるため、テーマ1) だけで1年間かかってしまい、マウスの構築にまで進むことができなかった。実際、マウスを作り始めてしまうと後戻りはできないため、さらにより高感度に解析できるプローブと発現モニター用 IRES 発現系を構築してからでなければ、せっかくマウスを作っても、十分に数理的なモデルとしての役割を果たせるものができないことが考えられる。したがって、より高感度で切れのよい3カラー系を再構築することに取り

組んでからマウスの作成にとりかかったほうがよいと予想される。

またもう一つの考え方として、AHTet は確かに蛍光の検出が可能ではあるが、かならずしも強い蛍光ではなく、また波長域がかなり広いために、2種類の蛍光タンパク質の探索に対して大きな負荷がかかってしまっているのが現状である。この解決のためには、有機合成を得意とする化学系の研究者との連携によって、薬物そのものも本研究により適したものを開発してしまうという解決方法も考えられる。

<今後の課題>

<達成できなかったこと>にも記載したように

- 1) IRES の分子機構の解明とより強い発現方法の確立
- 2) 波長域でより明るい蛍光タンパク質の開発
- 3) より強い蛍光物質でありながら Tet としての性質も合わせ持つ有機系分子のデザイン
を実施していくが必要になる。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1.0901161530

Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, Karasawa S, Miwa Y, Miyawaki A, Kanagawa O. Monitoring cellular movement *in vivo* with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 10870-10875, (2008)

2) 特許

1.0901161537

変異型蛍光タンパク質およびそれを用いた高効率 FRET 検出
特願 2008-111636