

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 ◆田中 順子
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。

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方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。

また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るが、実際の薬物濃度とプローブ蛍光強度との局所における詳細な相関を明らかにしておくことが定量的な評価と数理モデル構築には必須である。そこで本研究では、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。

<研究開始時の研究計画>

研究目的に従って、以下のように複数のテーマを設定し、順にそれぞれの解析を進めることとした。

テーマ1) Kaedeを応用した定量的解析手法の開発

以前の研究から、DsRed タンパク質が分子集合依存的な分解制御を受けることを見だし、タンパク質間相互作用を赤い蛍光として検出できる RUBY システムを構築していた。さらに Kaede も同様な分解制御を受けることを見出したので、光照射による波長特性が変化する Photoconversion の性質と組み合わせることで、時間軸に沿って定量的に解析する新しい手法を確立することを目指す (2006～2007年度)。

テーマ2) より厳密に薬物定量可能なデグラトンプローブ開発

抗生物質ドキシサイクリンの有無によって分解調節を受ける性質を獲得させた変異 TetR を EGFP と融合させることで、緑の蛍光として薬物検出を可能にしてきたが、EGFP は非常に安定で分解を受けにくい蛍光タンパク質であることから、必ずしも EGFP が最適であるとは限らない。そこで、他の多数の蛍光タンパク質に改変したプローブを作成し、ドキシサイクリン濃度と蛍光強度との相関を解析することによって、指摘な蛍光タンパク質を探索し、高い定量性をもつプローブを開発する。(2007～2008年度)

テーマ3) 薬物・プローブ同時検出系の構築と数理モデル開発

ドキシサイクリンの局所濃度が検出できれば、プローブの蛍光強度との相関を明らかにし、定量的な数理モデル構築が可能になると期待される。しかしドキシサイクリンそのものを検出することは容易ではない。そこで同じテトラサイクリン系の誘導体であり、しかもそれ自体が蛍光体である AHTet を用いて、これに適した新たなデグラトンプローブを開発し、薬物・プローブ同時検出の可能な実験系開発を試みる。

テーマ4) デグラトンプローブ分解制御機構の解明

本研究で開発を進めるデグラトンプローブが、そもそもなぜ分解制御を受けるのか、その細胞内分子機構はまったく不明である。その仕組みを解明することができれば、プローブの性能をより定量的に評価し、正確な数理モデルを構築するために有益である。そこでなぜ状況に応じた分解調節を受けるのか、関与するいんしを探索する。(2006～2009年度)

<研究期間の成果>

天然の Kaede タンパク質を用いてタンパク質間相互作用を検出するには、S/N 比などに問題が多く、困難であることが明らかとなった。そこでこの問題を克服することができる新たな Kaede 変異体の開発を試みた。その結果より相互作用依存的に蛍光を検出することが可能な Kaede2 を開発することができた。開発した新規 Kaede 変異体をユビキチン様タンパク質の網羅的な修飾依存的イメージングに応用した。その結果 SUMO において、核内と核膜上では異なる時間経過での相互作用が起こっていることを発見した。また他にも、特に NEDD8 および HUB1 において、これまで報告のない特殊なイメージが得られた。

ドキシサイクリン検出プローブに用いていた EGFP を他の 12 種類の蛍光タンパク質に改変した一連のプローブを構築し、ドキシサイクリン濃度依存的な定量性、添加後の蛍光強度の上昇、除去後の蛍光強度の低下の時間経過などを詳細に解析した。その結果、それ自体が 2 量体化依存的な分解制御を受ける蛍光タンパク質に変更した場合には、EGFP およびその variants と比べて、バックグラウンドの蛍光が非常に低くなり、定量的な検出が容易であることが確認された。さらに、薬剤除去後の蛍光の消失速度も非常に早いこともわかった。一方で、薬剤添加後の蛍光の上昇に関しては、EGFP などと比較してタイムラグが生じることが明らかとなった。

蛍光分子の細胞内局在を、フローサイトメーターを用いて定量的に解析できる実験法を確立し、特許出願した。とくに、流路の進行方向に補足レーザーが絞込まれている種を用いることによって、細胞質に蛍光が局在する細胞と、核に局在するものとを明確に分離することが可能であることが確認できた。

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いくつも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「分解制御候補因子」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。次に、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。

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。

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の蛍光タンパク質か、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いうために、定量的な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>

新たな生きた細胞内でのタンパク質分解を利用する発現調節系が開発されたことがアメリカのグループから報告され、低分子との相互作用によって、特殊な変異タンパク質が分解制御を受けるという知見が、一般化されつつある。本年度にはじゅうぶん達成できなかったが、細胞に備わった、こうした分解制御の仕組みを明らかにすることは、定量的な検出のためにはもちろん、生物学的な意義としても非常に重要であり、今後、この研究を最も急ぐ必要があると予想される。

フローサイトメーターによる局在検出法は、以外に簡単な方法でありながら、調べてみるとこれまで明確な報告例がなかった。その容易さから、今後普及すると共に、更なる応用法の開発につながることを期待される。

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>

最終的な目的の一つとして、詳細な定量的データを取得し、それに基づいて数理モデルを構築することを目指していたが、実験系の構築だけでもかなりの時間と費用が必要であったために、新規なプローブ類は多数開発できたものの数理解析は十分ではなかった。この原因としては、分解制御の細胞内分子機構が完全に解明できなかったことがあげられる。どういったしくみで分解されているのかが不明なままでは、蛍光の時定数に関するパラメーターが詳細にわからない。したがってその積分として検出される蛍光強度の評価も困難なままであった。しかし本研究において、実験的な技術は大幅に工場することができたため、今後同じ方向性の研究を根気よく継続することによって、定量解析にたどり着けるだけの見通しは得ることができた。

<今後の課題、展望>

この領域における研究を通じて、行きた動物体内の低分子を検出するための技術基盤を固めることができた。今後は創薬における動物実験の大幅な改革に向けて、実用化を進めることが必要だと考えている。特に、目的とする低分子を検出できるプローブを比較的簡単な手間で誰でもが開発できるようにし、検出のための装置類も並行して開発することで、検出感度の向上と実験の簡便化を図る。

これとあわせて、細胞内でタンパク質の状態をモニターして分解すべきかどうかを判定しているしくみを引き続き解明する。こ

れはあらゆる細胞に基本的に備わっていると考えられる分子機構であるので、イメージング技術だけでなく様々な細胞活性の制御にも幅広く展開できる可能性がある。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文 (査読付きのもの)

1. 912041440
Kawakami Y, Kubota N, Ekuni N, Suzuki-Yamamoto T, Kimoto M, Yamashita H, Tsuji H, Yoshimoto T, Jisaka M, Tanaka J. et al., Tumor-suppressive lipoxigenases inhibit the expression of c-myc mRNA coding region determinant-binding protein/insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1 in human prostate carcinoma PC-3 cells., *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(8):1811-7. Epub 2009
2. 912041415
Tomura, M., Tanaka, J., Kanagawa, O., and Miwa, Y., 蛍光タンパク質を用いた分子スイッチ機能を応用したイメージング法の開発, *分析化学*, 58, 447-460 (2009)
3. 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)
4. 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)
5. 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
6. 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)
7. 0702141457
Yoshimi R, Yamaji S, Suzuki A, Mishima W, Okamura M, Obana T, Matsuda C, Miwa Y, Otsuki Y, Ishigatsubo, Y. The γ -Parvin-Integrin-linked kinase complex is critically involved in Leukocyte-substrate interaction, *J. Immunology.* 176, 3611-3624, (2006)

2) 学会発表

1. 三輪佳宏 “蛍光寿命フローサイトメトリー：蛍光タンパク質の特徴”、第1回光塾イメージング若手の会、招待講演、10月21日2009年(神戸 生化学会)
2. 三輪佳宏 “蛍光寿命フローサイトメトリー：蛍光タンパク質の特徴”、第1回光塾イメージング若手の会、招待講演、8月15日2009年(金沢 金沢大学)

3. 三輪佳宏 “蛍光寿命フローサイトメトリー：蛍光タンパク質の特徴”、第1回光塾イメージング若手の会、招待講演、8月15日2009年(神戸 未来ICT研究センター)
4. 三輪佳宏 “プロジェクト概要と in vivo イメージング”、筑波大学 TARA 若手シンポジウム、招待講演、7月6日2009年(筑波大学 TARA センター)
5. 三輪佳宏、田中順子 “蛍光寿命測定フローサイトメトリー”、日本蛋白質科学会第9回年会、ワークショップ、招待講演、5月20日2009年(熊本全日空ホテル)
6. 三輪佳宏、田中順子 “マウス蛍光イメージングのためのプローブ開発”、日本実験動物学会第56回年会、シンポジウム、招待講演、5月15日2009年(大宮ソニック)
7. 三輪佳宏、田中順子 “蛍光タンパク質を応用した分子スイッチ機能プローブの開発”、日本分子イメージング学会第4回年会、シンポジウム、招待講演、5月14日2009年(東京)
8. 三輪佳宏 “生きた動物体内の低分子化合物を検出するデグラトンプローブ”、徳島大学、シンポジウム、招待講演、5月1日2009年(徳島大学)
9. 三輪佳宏 “生きた動物体内の低分子化合物を検出するデグラトンプローブ”、日本薬学会第129年会、シンポジウム、招待講演、3月28日2009年(京都国際会議場)
10. 三輪佳宏 “蛍光を用いたマウス in vivo イメージング”、第1回学際物質戦略イニシアチブバイオグループシンポジウム、招待講演、1月5日2009年(つくば)
11. 三輪佳宏 “GFP の発見とその開発”、東京工業大学 第3回理学特別講演会 12月22日2008年(東京工業大学) 招待講演
12. 田中順子、三輪佳宏 “蛍光寿命測定 FCM(Flicyme) を用いた簡単 FRET システムの開発とよびその応用”、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、口頭発表、12月11日2008年(神戸ポートアイランド)
13. 千田直子、三輪佳宏、百武篤也、新井達郎 “7-ヒドロキシキノリン誘導体を用いたバイオイメージング蛍光色素の開発”、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、口頭発表、12月11日2008年(神戸ポートアイランド)
14. 吉田友里、藤村浩史、田中順子、三輪佳宏 “Tet 制御系による conditional gene targeting 技術の開発”、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、ポスター、12月10日2008年(神戸ポートアイランド)
15. 三輪佳宏 “in vivo イメージングによる体内薬物の定量的解析にむけて”、フロンティア生命化学研究会、第11回生命化学研究会、ポスター、11月28日2008年(水上)
16. 三輪佳宏 “次世代のバイオ蛍光計測”、シンポジウム 視る生物学 3 - イメージングの挑戦 - 招待講演、11月20日2008年(奈良先端技術大学)
17. 三輪佳宏、田中順子 “生きたマウスでの蛍光分子イメージング”、日本化学会第2回関東支部会、依頼講演、9月19日2008年(群馬大学)
18. 吉田直樹、三輪佳宏、田中順子 “in vivo イメージング技術を応用した血液脳関門の可視化”、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、ミニシンポジウム、12月14日2007年(パシフィコ横浜)
19. 吉田友里、藤村浩史、田中順子、三輪佳宏 “Tet 二重制御系による conditional gene targeting 技術の開発”、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、ポスター、12月14日2007年(パシフィコ横浜)
20. 早坂勇樹、田中順子、三輪佳宏 “ユビキチン様タンパク質の

- イメージングによる解析”、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、ポスター、12月14日 2007年 (パシフィコ横浜)
21. 三輪佳宏 “デグラトンプローブを用いたイメージング技術の開発”、招待講演、生理学研究所所長招聘セミナー、7月11日 2007年 (岡崎、生理学研究所)
22. 田中順子、三輪佳宏 “フローサイトメーターを用いた細胞内局在の定量的解析法”、招待講演、第17回 サイトメトリー学会年会、シンポジウム、7月6日 2007年 (舞浜サンルートプラザ東京)
23. 三輪佳宏、吉田直樹、田中順子 “Visualizing molecules in living mammalian animals using degraton probes”、招待講演、第59回 日本細胞生物学会・第40回 日本発生生物学会 合同大会、ミニシンポジウム、5月29日 2007年 (福岡国際会議場)
24. 三輪佳宏、“バイオイメージングにおける異分野融合”、招待講演、第15回 農芸化学 frontiers シンポジウム、3月27日 2007年 (箱根湯本)
25. 三輪佳宏、“動物個体での蛍光イメージングによる薬物動態解析”、招待講演、企業と大学の創薬研究シンポジウム、2月2日 2007年 (筑波大学総合研究棟B)
26. 三輪佳宏、“生きたマウス体内の蛍光分子イメージング”、招待講演、第3回 電気学会バイオマイクロシステム研究会、1月30日 2007年 (名古屋大学VBL)
27. 三輪佳宏、田中順子、藤村浩史、吉田直樹、早坂勇樹、“蛍光を用いたバイオイメージングおよび生体観測技術の開発”、招待講演、第13回バイオメディカル光科学研究会、12月22日 2006年 (静岡県立大学)
28. Yoshihiro Miwa “蛍光タンパク質を目的に合わせて使いこなそう!”、バイオテクノロジーセミナー (クラブ招待)、日本分子生物学会 2006 フォーラム、12月6日 2006年 (名古屋国際会議場)
29. 三輪佳宏 “in vivo 蛍光イメージングによる薬物動態解析”、招待講演、筑波実験動物研究会、第32回講演会、12月4日 2006年 (文部科学省 研究交流センター、つくば)
30. 三輪佳宏 “Visualizing molecules in living mammalian cells using Degraton probes”、ランチョンセミナー (オリンパス招待)、第20回国際生化学・分子生物学会、6月21日 2006年 (京都国際会議場)
31. 三輪佳宏 “ここまでできる! マウス in vivo イメージング” 臨床応用を目指した産学連携セミナー3-分子細胞イメージングと疾患・創薬研究-、ワークショップ招待、5月12日 2006年 (コクヨホール)
32. 三輪佳宏、田中順子、吉田直樹、後藤勝年 “生細胞内分子を見るデグラトンプローブの開発” 第6回日本蛋白質科学会年会、ワークショップ招待、4月25日 2006年 (京都国際会議場)
- 3) 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)
2. 0606191137
田中 順子、三輪 佳宏、蛍光イメージング活用術 フローサイトメトリーのすすめ?、バイオテクノロジージャーナル 6, 377-382 (2006), , 2006/04/20
- 4) データベース/ソフトウェア
なし
- 5) 特許
1.0903130353
細胞透過型新規蛍光色素
特願 2009-058645
2.0901161537
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
3.0705081517
抗生物質によるタンパク質の転写・分解二重制御法
特願 2007-065415
4.0702141404
テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク質分解制御法
PCT/JP2006/318673
5.0606191032
蛍光資料の蛍光の局在態様を調べる方法、
特願 2006-116227
6.0602221943
細胞培養容器
特願 2005-281916
7.0602221935
テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク質分解制御法
特願 2005-269070
- 6) 記事
1.0708091625
Miwa, Y, ルボ先端人, バイオニクス,
2006/06/01