

# 生細胞内分子を見るデグラトンプローブの開発

三輪 佳宏

筑波大学大学院人間総合科学研究科

## 1. 研究のねらい

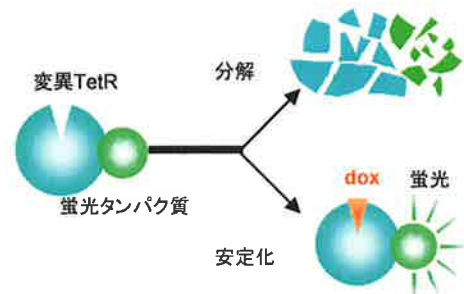
近年、急速に発展しているバイオイメージング研究。現在の技術では、取り出して培養している細胞の中の様子は非常に詳しくイメージングすることができますが、まだまだ生きたままの動物での観察、とくに私たち人間のモデル動物として病気の治療や薬の開発に使われているマウスでのイメージングは容易ではありません。今後、たくさんの細胞からなる動物個体の中で、一つ一つの細胞がどのように全体として統合されているのかを明らかにしていくためには、実験動物を殺すことなく体内での分子挙動を見る技術を開発させることが必要になります。

私たちは、大腸菌が持っている Tet リプレッサー（以下 TetR）タンパク質の遺伝子をヒトの細胞に導入して発現させたときの、細胞中での安定性について調べている中で、とても面白いことに気がつきました。正しいアミノ酸配列の TetR タンパク質は、ヒトの細胞中でもとても安定なのですが、これにいくつかの変異を導入して、アミノ酸の種類を置き換えたものでは、非常に不安定になって分解されてしまいます。それ以前にも正常なタンパク質は細胞中でもとても安定なのに、ほんの数カ所のアミノ酸が入れ替わった突然変異が入ったタンパク質では、とても不安定になってしまい、細胞中ですぐに分解されて、せっかく作られているにもかかわらず検出できなくなる例は知られていました。ところがそれだけではなく、この TetR タンパク質が結合する、感染症の治療に使われる抗生物質のドキシサイクリン（以下 dox）を加えておくと、不安定な変異タンパク質であっても安定化して分解されなくなるを見いだしました。つまり「抗生物質があるか、ないかで、分解されるかどうかを制御される」という新たな性質を獲得した変異体をつくりだすことができる訳です。そこで、この変異タンパク質を応用することで、生きたままの動物の中で、いまどこに dox という薬が存在しているかを見ることができるようになるのではないかと考えて、研究を開始しました。

## 2. 研究成果

まず変異 TetR タンパク質を、それ自体が蛍光を発することができる GFP という蛍光タンパク質と結合した融合タンパク質として、細胞中に発現させました。すると、普段の細胞中では変異 TetR と融合している GFP も道連れになって分解されてしまうため、細胞からほとんど蛍光が検出されませんでした。ところがここに dox を加えると、変異 TetR に結合して分解を止めるので、融合タンパク質全体が安定化して細胞中に蓄積し、非常に明るい緑の蛍光が観察されることがわかりました。すなわち、今、細胞の中に dox という薬があるかどうかを、緑の蛍光が光っているかどうかで判定できるということです。

そこで次に、この「変異 TetR-GFP」融合タンパク質が全身の細胞で作られているような遺伝子導入マウスを作成しました。このマウスは普段は光っていない普通のマウスですが、ここに dox を投与すると、dox が存在する間だけしかも dox が存在する場所だけが緑に光ることが予想されるので、生きたままのマウスの体内の薬を光として検出できると期待されます。これまで投与後の薬の挙動を調べるには、もっぱら血中濃度の経時変化が調べられています。実験動物を用いた場合でも、解剖してどの臓器に薬が達しているかを調べることは可能ですが、その場合には数百匹という大量の動物を殺しながら実験をすることが必要になってしまいます。また解剖すると言っても、1つ1つの細胞の種類を分けて集めることは大変なので、どんな種類の細胞に薬がよく



取り込まれているのかを判定する確かな方法はありませんでした。ところが私たちが作ったマウスで観察してみると、薬が取り込まれている細胞だけが光るので、どういう種類の細胞に薬が取り込まれやすいかを簡単に判断できました。



しかも薬を投与してから、体から排出されてなくなって行くまでの時間経過を、たった1匹の動物で連続して観察することが可能になりました。そのため、遺伝的な背景がよくそろったマウスであっても1匹ごとにかかなりの個体差があることもわかってきました。マウスの成長に合わせて体内の薬の動態が変化することなども同じ個体で連続して観察できます。また、母親マウスにだけ薬を投与しても母乳の中に薬が混じってしまうため、その母乳を飲んでいる生まれたばかりの新生仔にも薬が移行してしまい、仔マウスが緑に光ることも観察されました。

このように、生きたままの実験動物で薬の動きを観察できるということは、少ない動物しか飼育していなくてもこれまでよりはるかに正確なデータをとることが可能になり、優れた薬の開発の上で、非常に有用であることが期待されます。また犠牲にする動物も少なくでき、動物愛護の点からも望ましいことです。現在、2種類の薬を合わせて飲むとどのように薬の動きに影響してしまうのか、という薬物相互作用や、病気になったときに薬の体内動態がどのように変化するか、といった詳しい研究を進めています。

### 3. 主な発表

#### 論文

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

#### 招待講演

- ・ 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、2007年3月
- ・ 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、2007年2月

### 4. その他

#### 特許

- ・ 三輪 佳宏、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 2005-269074、PCT/JP2006/318673、出願人：科学技術振興機構
- ・ 三輪 佳宏、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、出願人：科学技術振興機構

#### 受賞

- ・ 第37回倉田記念日立科学技術財団研究助成受賞、「生細胞内分子動態を可視化する蛍光技術の開発」(2005年3月)