

分子創薬アプローチによる生きた状態での可視化と不活性化

—新規蛍光プローブの創製による機能分子の細胞内可視化—

菊地 和也

東京大学大学院薬学系研究科 助教授



1. 私が知りたかったこと

細胞内分子を可視化あるいは不活性化する化学プローブをデザイン・合成することで、細胞がシステムを維持した状態における分子の機能を明らかにしたい。

まず、ラット脳における亜鉛イオン(Zn^{2+})を可視化する蛍光プローブを作製し、海馬苔状繊維において Zn^{2+} が神経興奮によって放出されグルタミン酸受容体に抑制的に機能することを示した。また、この Zn^{2+} 放出濃度が nM から μ M オーダーであることを示した。次に、細胞膜透過性のレーザー分子不活化プローブを作製して、生理条件における IP_3 受容体と容量依存性 Ca^{2+} 流入について調べた。

2. 研究の狙い

生細胞において生体内分子は、その生理機能が発揮される特殊な生体組織や個体発生上の特殊な時間に発現している。本研究では、生体内で機能する分子をリアルタイムに可視化あるいは不活性化することで生きた状態における機能解明を行う。この結果、タイムシグナルについて詳細な解析が可能になる。

上記の目的のため、新たな実験系として生細胞蛍光プローブと名付けた化学プローブをデザイン・合成し、生細胞あるいは生きた個体に直接応用する。具体的には、機能分子可視化プローブとレーザー分子機能不活化(CALI)プローブを用い、細胞系へ応用する。

まず、申請者が開発した亜鉛イオンの蛍光プローブを用い、神経系における作用解析とプローブの化学的改良を行う。また、蛍光共鳴エネルギー移動を原理としたプローブを用い、細胞内蛋白質チロシンフォスファターゼの作用を可視化する。

次に、イノシトール3リン酸(IP_3)受容体の CALI を行う。CALI とは、色素を結合させたりガンドが標的分子を認識し、それにレーザー光を照射することによって活性酸素種を生じ、

標的分子を失活させる方法である。CALIによって生理的条件下、標的分子をその場で不活化できるため、IP₃受容体の働きを時空間的に制御して示すことができる。

この様に生体内分子が時間的・空間的にどのように振る舞って機能するか調べることはポストゲノム時代の重要な研究課題であると考えられる。

3. 結果

3. 1 Zn²⁺蛍光プローブ

遊離のZn²⁺は神経伝達に関与していることが報告され、近年着目されている。そこで、Zn²⁺を可視化するための蛍光プローブの開発を行った。このうち、ZnAF-2は最高感度かつ選択的であり、生きた状態でのZn²⁺濃度変化を初めて可視化することに成功した。まず正常時、Zn²⁺はCA3及び歯状回において高濃度で存在することを示した。さらに、Zn²⁺の存在が示されたCA3領域の苔状繊維に電気刺激を与え、Zn²⁺放出を可視化した。この結果、神経伝達物質放出に遅れて放出されたZn²⁺は近位の放線層へとゆっくりと拡散することが可視化された(図1)。

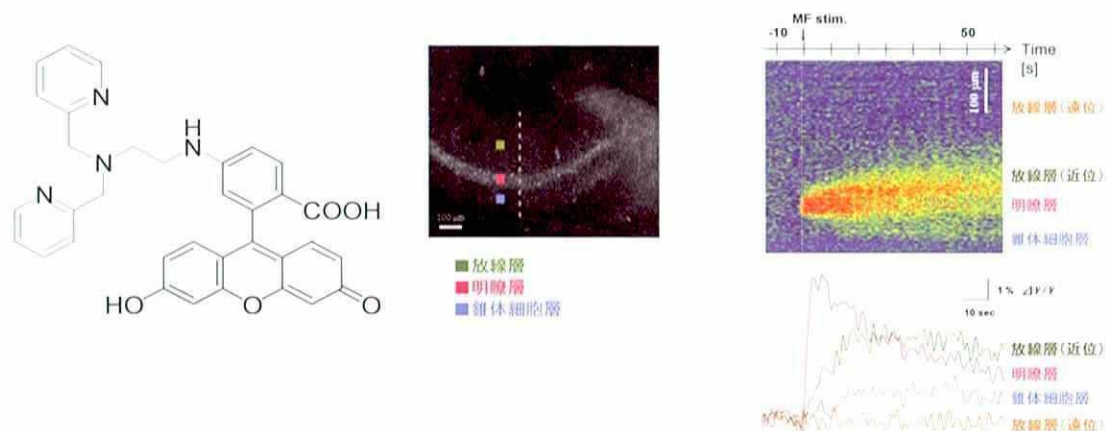


図1. ZnAF-2の構造式と電気刺激によるラット脳海馬からのZn²⁺放出の可視化

放出されたZn²⁺の機能を調べるため、苔状繊維刺激と同時にNMDA受容体及びAMPA受容体の機能を調べ、Zn²⁺がNMDA作動性のグルタミン酸神経系を抑制することが初めて示された。

次に、Zn²⁺放出の濃度を調べるプローブを作製した。ZnAF-2のZn²⁺に対するみかけの解離定数(K_d)はnMオーダーであり、低濃度(0.1 nM~10 nM)のZn²⁺を検出することができる。

しかし、これまでの実験では脳内においてははるかに高いZn²⁺濃度変化が生じることが示唆された。そこで、Zn²⁺に対する選択性を維持したまま親和性を変化させた蛍光プローブを5種類デザイン・合成した。いずれのプローブもZnAF-2より高濃度の領域で蛍光強度が変化し、

この5種類のプローブを用いれば、 10^{-10} ~ 10^{-3} M と広い範囲にわたる Zn^{2+} の濃度変化を捉えられる。これらのプローブを用いて脳内の Zn^{2+} 放出が nM から μ M オーダーまで部位によって変化することを示した (図2)。

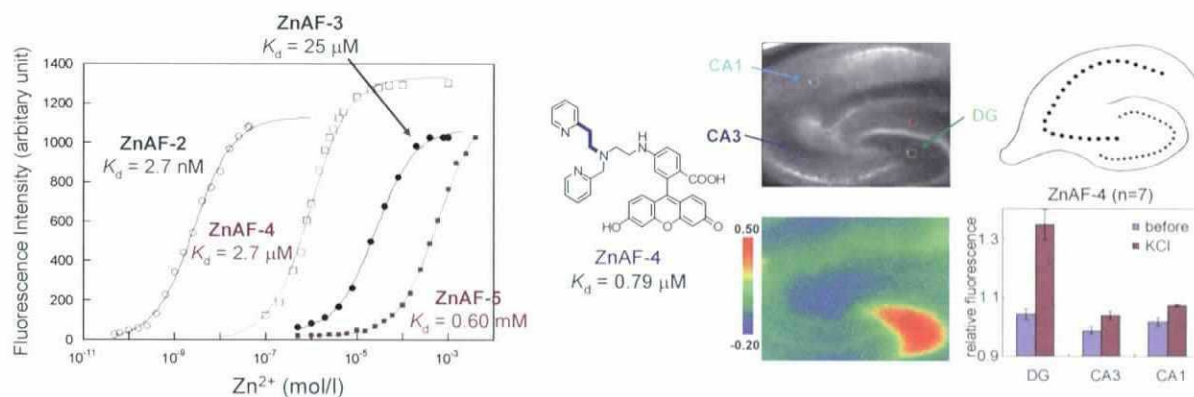


図2. 親和性の違う Zn^{2+} 蛍光プローブの濃度応答性と海馬における μ M オーダーでの Zn^{2+} 放出の可視化

最後に、高精度の測定を行うために長寿命蛍光を発するランタノイド金属錯体を用いた Zn^{2+} 蛍光プローブを作製した。生体試料中には蛍光成分が含まれており、通常の測定ではバックグラウンド蛍光が大きい。時間分解蛍光測定を行いノイズレベルを減じることができる。そこで、ミリ秒オーダーの長寿命蛍光を持つ Eu^{3+} 錯体を用いた Zn^{2+} 蛍光プローブをデザイン・合成した。この蛍光プローブはキノリン環を Zn^{2+} キレーターかつ Eu^{3+} へのエネルギー供与を行うアンテナとして有しており、 Zn^{2+} 配位により蛍光スイッチとなることを期待した。このプローブは Zn^{2+} の添加により大きな蛍光上昇を示し、時間分解蛍光測定を行うことで、ノイズである短寿命蛍光を取り除くことができた (図3)。

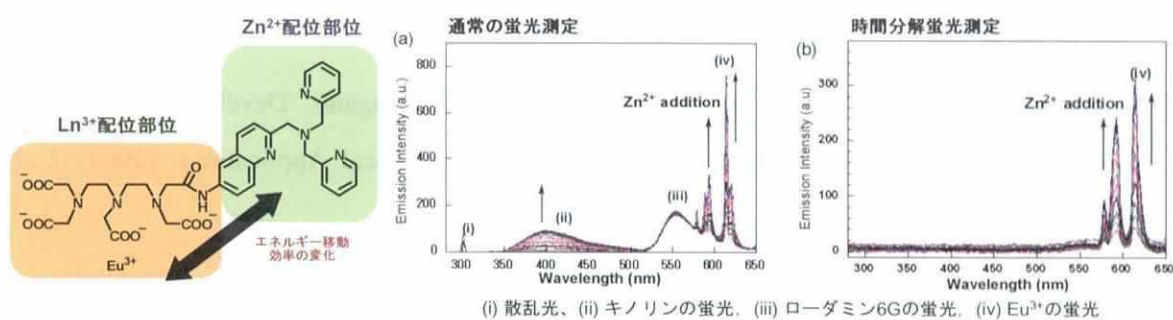


図3. 長寿命蛍光を有する Zn^{2+} 蛍光プローブと時間分解測定によるノイズレベルの軽減

3. 2 IP₃受容体のレーザー分子不活化

CALI は光を当てる場所と時間を制御して標的蛋白質機能を不活化できる有用な手法である。IP₃受容体は、特異的阻害剤がないため効率的に不活性化する手法が存在しない。そこで、細胞膜透過性プローブ(MGIP₃/PM)を新規に合成し、IP₃受容体関与のCa²⁺オシレーションがCALIで影響を受けるか検討した。MGIP₃/PMを負荷した細胞にlaserを照射したところ、laserを照射した細胞においてオシレーションが顕著に阻害された。IP₃受容体の関与が示唆されている現象の一つに容量性Ca²⁺流入(capacitave calcium entry, CCE)がある。CCEは、刺激により小胞体のCa²⁺が枯渇すると、細胞膜上のチャネル(store-operated channel, SOC)を介して、細胞外のCa²⁺が流入する現象である。CCEのメカニズムには諸説提唱されており、その中にIP₃受容体とSOCが直接関連しているという説がある。そこで、膜透過性CALIプローブを用いてIP₃受容体がSOCに関与するか検証した。DT40細胞をMGIP₃/PM-CALIで処理した後に、thapsigarginを用いて小胞体を枯渇させ、その後細胞外にCa²⁺を加えCCEを誘導した。その結果CALIによってSOC活性には影響は見られなかった。以上の結果から、IP₃受容体の不活性化はSOCの活性に影響を及ぼさないことが示唆された(図4)。

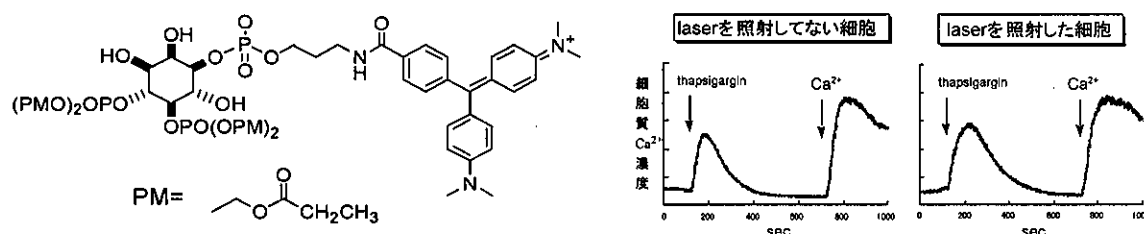


図4. 膜透過性CALIプローブの構造とIP₃受容体のSOCの活性に対する効果

4. 参考論文

- (1) K. Hanaoka, K. Kikuchi*, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano: Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470-12476.
- (2) T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano*: Modification of Intracellular Ca²⁺ Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes. (2004) *Chemistry & Biology*, **11**, 1053-1058.

- (3) S. Mizukami, T. Nagano, Y. Urano, A. Odani & K. Kikuchi*: A Fluorescent Anion Sensor That Works in Neutral Aqueous Solution for Bioanalytical Application. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3920-3925.
- (4) T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano & T. Nagano*: Improved Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, Suitable for Biological Applications. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6555-6562.
- (5) K. Hanaoka, K. Kikuchi*, Y. Urano, M. Narazaki, T. Yokawa, S. Sakamoto, K. Yamaguchi & T. Nagano: Design and Synthesis of a Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent for Selective Sensing of Zinc Ion. (2002) *Chemistry & Biology*, **9**, 1027-1032.