

研究課題別評価書

1. 研究課題名

生細胞内分子を見るデグラトンプローブの開発

2. 氏名

三輪 佳宏

3. 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るが、まだ生きたままの動物での観察、とくにヒト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ない。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である。

我々は、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て解析している中で、正しいアミノ酸配列の野生型 TetR タンパク質はヒト細胞中でも非常に安定だが、いくつかの変異を導入した変異体では、非常に不安定になって分解されてしまうことを見いだした。以前にも正常なタンパク質は細胞中で安定だが、変異型タンパク質はとて不安定になってしまい、細胞中ですぐに分解されてしまう例は知られていた。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ことも見いだした。このことは「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ことを意味している。そこで、こうした分子間相互作用依存性に分解制御がかかるタンパク質を「デグラトンプローブ」（申請時はデグロンプローブ）と名付け、本研究ではその実際の応用を進めることと、新たなプローブを効率よく開発するための分子基盤を明らかにすることを目標に研究を行った。

4. 研究成果

1) デグラトンプローブの生きた動物個体イメージングへの応用

この変異 TetR 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、研究を開始した。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蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質として細胞中に発現させると、

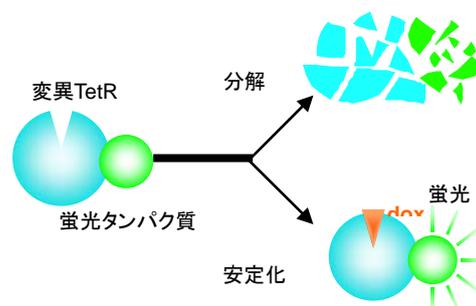


図1 デグラトンプローブの概念図

普段の細胞中では GFP も変異 TetR と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なかった。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を見いだした。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実験系を構築することができた。

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た。このマウスは普段は光っていない普通のマウスだが、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、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る。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る。しかし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だが、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であった。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ことは困難であった。ところが今回作成し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、高い解像度でイメージングすることが可能になり、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った。

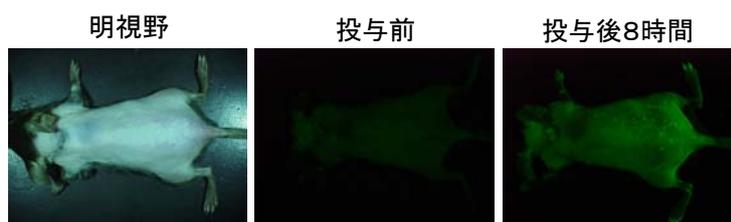


図2 Tet デグラトンプローブ発現マウス

そこで多数のマウスで比較してみると、遺伝的な背景がよくそろったマウスであっても1匹ごとにかなりの個体差があることも明らかになってきた。さらに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た。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る。また犠牲にする動物も少なくでき、動物愛護の点からも非常に望ましい。

2) デグラトンプローブの開発基盤の確立

2-1) 分解制御プローブに至適な蛍光タンパク質の探索

こうして、タンパク質分解制御プローブは、哺乳動物はもちろん様々な生物種に幅広く応用できる優れた技術であることを示すことができた。そこでもう一つの重要なテーマとして、こうしたプロ

ープを次々と開発できるような技術基盤を確立することを目指して、研究を行った。

まず初めに、今回用いた蛍光タンパク質である GFP が、本当にこうしたプローブに適しているかどうかについて検証した。というのも、GFP は細胞内で非常に安定で分解を受けにくいタンパク質であることが知られているからであり、もしも他の蛍光タンパク質を用いることで、薬を除去した際の蛍光の消失が早くなるのであれば、時間分解能の高いより実体に即した計測が可能になると期待される。そこで、GFP を 13 種類の他の蛍光タンパク質に置き換えたプローブを作成し、培養細胞を用いて、1) プローブそのものの明るさ(感度)、2) dox の有無による蛍光強度の違い(バックグラウンド)、3) 薬物の濃度変化に応じた蛍光強度の時間変化(時間分解能)について解析した。その結果、dox 添加時には GFP よりも強い蛍光が得られるのに、dox 非添加時にはほとんど蛍光が検出されないプローブや、dox の変化に合わせた蛍光強度の時間変化も早いプローブを開発することができた。今後、他のプローブを開発する際には、この知見に基づいて目的に合った蛍光タンパク質を用いることにより、より幅広い解析に対応できることが明らかとなった。

2-2) 様々な生物種での共通性について

新規プローブの開発を容易にするためのもう一つの考え方として、今回見いだしたような、タンパク質の状態を見分けながら分解制御するシステムの分子実態を明らかにできれば、今後のデグラトンプローブ開発を効率よく進めることが可能になると期待される。そこで、この分解制御システムは哺乳動物に特徴的なものか、それとも広く様々な生物種に共有されているのかについて解析した。まず同じ脊椎動物のゼブラフィッシュの受精卵を用いて、Tet デグラトンプローブを強制発現させて、dox の有無による蛍光強度の変化を観察した。その結果、dox の濃度依存的に蛍光強度が増強されることが明らかとなり、魚類にも同じような分解制御システムが存在することが示された。次に節足動物のショウジョウバエにおいても受精卵に発現ベクターの DNA をインジェクションし、dox の有無による蛍光強度の違いを解析したところ、やはり dox の濃度依存的に蛍光増強が起こることを見いだした。このことから、不安定な変異タンパク質が他の分子と相互作用することで分解制御を受けるシステムは、広く普遍的に様々な生物に備わっていることが明らかとなった。

2-3) タンパク質の状態を見分ける分子実体の解明

次にいよいよその分子実体を明らかにすることを試みた。Tet デグラトンプローブの状態を見分けて分解している以上は、分解制御因子はなんらかの形でこのプローブに結合していると予想される。そこで、FLAG タグを結合させたプローブを細胞に過剰発現させた後、抗 FLAG 抗体で沈殿させ、一緒に沈殿してくるタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。21 種類のタンパク質が同定された中で、通常の状態では結合が見られないのに、プロテアソーム阻害剤の MG132 を添加してタンパク質分解を強制的に止めた場合にのみ結合が見られる、因子 F と名付けたタンパク質に注目し、さらに解析を行った。この因子 F の遺伝子発現をノックダウンできる shRNA の実験系を構築し、細胞内での量を減らしてみたところ、その減り方に依存して dox を添加していないにもかかわらず Tet デグラトンプローブの蛍光強度が増強されることを見いだした。このことは因子 F

がプローブタンパク質の状態を見分けて分解系に引き渡す、一種の細胞内の警察官のような役割をしているタンパク質であることを示唆している。

5. 自己評価

研究の前半において、予定していたトランスジェニックマウスを作成するとともに、前例の少ない生きたままのマウス *in vivo* イメージングについて、新しい装置の導入、撮影条件の検討、定量的な解析手段の確立など、様々な技術開発を実施できた。特に、この方法を使うことで初めて、各臓器の細胞の中に実際に薬物が到達しているかどうかをイメージングできるなど、当初予想していた以上に発展することができ、「何がどこまで見えるのか」ということを先駆けて解析できたことは非常に意義があったと考えている。その応用の一つとして、実験動物個体における薬物動態に関して、たとえ遺伝的な背景がよくそろっていてもかなりの個体差が出ることも突き止めることができたことも、有意義な成果であったと考えている。

研究の後半は、分解制御を応用する本研究のプローブに適した蛍光タンパク質の幅広い探索など、プローブ開発の基盤となる基礎技術に関しても情報を蓄積することができた。蛍光タンパク質を使っている研究者は世界的にも非常に多いが、成熟や分解といった細胞内での基本的な動態に関して網羅的に解析している例は少ない。

一方で、デグラトンプローブの分解制御の仕組みが生物種を超えて様々な動物に保存されているかどうかを明らかにすることや、このシステムの分子実体を解明することを目標に解析をすすめたが、思った以上に手こずってしまい本研究期間中に十分に論文として公開することが間に合わなかったことは、大きな反省材料である。最後の最後に間に合いはしたものの、今後早急に検証を進めて発表することが必要である。

6. 研究総括の見解

生きたままの動物個体中の薬物等の分布を可視化するプローブの開発を目指し、これをデグラトンプローブと命名して、特徴あるプローブ作製概念を展開している。主たる成果は次の2点である。

- ①デグラトンプローブを全身に発現したマウスを作り、それを用いた薬物の *in vivo* イメージングに成功した。本手法が哺乳動物だけでなく動物全般に幅広く応用できる可能性を実証した。
- ②各種蛍光タンパク質をタンパク質分解制御タンパク質に結合したプローブを作製し、感度、バックグラウンド、時間分解能の改善を図り、蛍光イメージングに最適なプローブの開発に成功した。

実用に直結する生体内薬物動態を可視化するデグラトンプローブを開発し、その信頼性と一般性を高めた努力は高く評価される。また、トランスジェニックマウスであっても一匹ごとに薬物動態に個体差があることを確認するなど、このプローブによる生命現象研究に応用面でも興味深い進展を見せている。また、本プローブの作用機構に関する研究も進め、興味ある手がかりを得て、更なる解明を進めている。

研究成果は1篇の原著論文、15件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許3件を出願している。また平成17年度に「第37回倉田記念日立科学技術財団研究助成」、

平成 20 年度に、「財団法人島津科学技術振興財団研究開発助成」を受賞している。

このプローブ概念の一般化は、本さきがけ領域として大いに期待したいところであり、理論的裏付けとなる研究の更なる進展に期待したい。基礎的な生命科学研究はもちろん、創薬や環境問題などへの多大な貢献が期待できる。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表 なし

(2)特許出願

発明者:三輪 佳宏

発明の名称: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

出願人:科学技術振興機構

出願日:2005.09.15

出願番号:特願 2005-269074

発明者:三輪 佳宏

発明の名称: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

出願人:科学技術振興機構

出願日:2006.08.31

出願番号:PCT/JP2006/318673

発明者:三輪 佳宏

発明の名称:抗生物質によるタンパク質の転写・分解二重制御法

出願人:科学技術振興機構

出願日:2007.03.15(未公開)

出願番号:特願 2007-065415

発明者:三輪 佳宏

発明の名称:抗生物質によるタンパク質の転写・分解二重制御法

出願人:科学技術振興機構

出願日:2008.03.14(未公開)

出願番号:PCT/JP2006/未通知

(3)受賞

- ・平成 17 年 3 月 第37回倉田記念日立科学技術財団研究助成(平成16年度)
- ・平成 20 年 2 月 財団法人 島津科学技術振興財団 研究開発助成(平成19年度)

(4) 著書

- ・ 田中順子、三輪佳宏、“デグラトン・プローブタンパク質分解を応用した分子イメージング法”、高分子(高分子学会刊行)、2005
- ・ 田中順子、三輪佳宏、“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(羊土社)
- ・ 吉田直樹、田中順子、三輪佳宏、“デグラトン・プローブを用いた生きたマウス体内での蛍光分子イメージング”、細胞工学(秀潤社刊行)、2006
- ・ 三輪佳宏、田中順子、吉田直樹、“デグラトン・プローブを用いた蛍光イメージング”、蛋白質 核酸 酵素(共立出版刊行)、2007
- ・ 三輪佳宏 編集 「―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 10 月 2007 年

(5) 学会発表

口頭発表(国内)

- ・ 藤村 浩史、田中 順子、後藤 勝年、三輪 佳宏、“Tet system における Tet オペレーター繰り返し配列の影響”、第27回 日本分子生物学会年会、2004
- ・ 吉田 直樹、田中 順子、三輪 佳宏、“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 日本分子生物学会年会、2007

ポスター発表(国内)

- ・ 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 日本分子生物学会年会、2007

(6) 招待講演

招待講演(国際)

- ・ Miwa Y. and Tanaka J. “A novel method to visualize protein interactions in living cells using fluorescent protein.” –Cancer and Hypoxia 2005–、2005

招待講演(国内)

- ・ 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回日本蛋白質化学会年会、2006
- ・ 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―、2006
- ・ 三輪佳宏、田中順子、吉田直樹、“バイオイメージングにおける異分野融合”、第15回農芸化学 Frontiers シンポジウム、2007
- ・ 三輪佳宏、吉田直樹、田中順子、“Visualizing molecules in living mammalian animals using degraton probes” 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、2007

(B) その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ 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)特許出願 なし