2012
No.142
ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

有機-無機ハイブリッド人工細胞膜「セラソーム」の開発と遺伝子キャリアーとしての応用
奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科
田原　圭志朗・菊池　純一

「蛍光生物学」の最前線5-1
FRET バイオセンサーの最近の進歩
京都大学大学院生命科学研究科
青木　一洋・松田　道行

「蛍光生物学」の最前線5-2
免疫応答におけるリンパ球分化と細胞移動の関係をイメージングで探る
理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
森山　彩野・北野　正寛・岡田　峰陽

●Topics on Chemistry

新規近赤外蛍光プローブを用いた細胞内カルシウムイオンのマルチカラーイメージング
株式会社同仁化学研究所　田中　智也

DOJIN NEWS
2012 No.142 ドージンニュース

CONTENTS

Review

有機–無機ハイブリッド人工細胞膜「セラソーム」の開発と遺伝子キャリアーとしての応用 ●[1]
奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科
田原　圭志朗・菊池　純一

「蛍光生物学」の最前線 5-1
FRETバイオセンサーの最近の進歩 ●[7]
京都大学大学院生命科学研究科
青木　一洋・松田　道行

「蛍光生物学」の最前線 5-2
免疫応答におけるリンパ球分化と細胞移動の関係をイメージングで探る ●[12]
理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
森山　彩野・北野　正寛・岡田　峰陽

Topics on Chemistry

新規近赤外蛍光プローブを用いた細胞内カルシウムイオンのマルチカラーイメージング ●[16]
株式会社同仁化学研究所　田中　智也

Commercial

新製品
　JIS K 9512 適合品　ヒ素分析用試薬
　　N,N- ジエチルジチオカルバミド酸銀 ●[11]
試作品
　近赤外蛍光色素標識試薬
　　ICG-maleimide ●[15]
開発中
　細胞内カルシウムイオン測定用試薬キット
　　Calcium Kit Ⅱ - iCellux ●[18]

お知らせ
第 28 版総合カタログ発行 ●[6]

新製品案内

品名	容量	希望納入価格(¥)	コード	メーカーコード
N,N- ジエチルジチオカルバミド酸銀	1 g	2,600	340-09073	JS01
	5 g	5,800	344-09071	JS01

有機–無機ハイブリッド人工細胞膜「セラソーム」の開発と遺伝子キャリアーとしての応用
Development of Organic-Inorganic Hybrid Vesicle "Cerasome" as a Gene Carrier

田原　圭志朗（Keishiro Tahara）

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

菊池　純一（Jun-ichi Kikuchi）

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

要約

Since the discovery of lipofection, cationic lipids have been widely used as transfecting agents in gene delivery. However, the cationic lipid-forming liposomes easily undergo DNA-induced fusion to produce larger particles that are not suitable for transfection. Because gene delivery methods using cationic lipids are considered as a valuable alternative to viral transfection, the transfection efficiency has to be improved to benefit fully from their advantages. We have recently developed a ceramic-coated liposome, cerasome, to overcome fusibility of liposome. Cerasome is a viral size-particle with liposomal bilayer and silicate surface. This review describes the concept, characterization and function of the cerasome. Furthermore, we described its remarkable transfection performance as a gene carrier.

キーワード：
有機－無機ハイブリッド、セラソーム、遺伝子導入、非ウイルスベクター

1. はじめに

細胞への遺伝子導入は、生命科学における基幹技術であり、遺伝子治療や再生医療など様々な応用が期待されている[1)]。細胞への遺伝子導入では、一般にベクターと呼ばれる遺伝子キャリアーが用いられており、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの二つに大別される。ウイルスベクターは、ウイルスの高い感染能力を利用するため、非ウイルスベクターと比較して極めて高い導入効率を達成できる。しかしながら、DNA サイズの限界に加え、ウイルスの潜在的な危険性を排除できないという問題がある[2)]。このため、高い発現効率と安全性を兼ね備えた遺伝子導入の実現を目指し、リポソーム、カチオン性ポリマー、デンドリマー、ポリマーミセルなど様々な材料をベースとした非ウイルスベクターの開発が盛んに行われてきた[3-6)]。細胞への遺伝子導入には、細胞への取り込み、エンドソームから細胞質への脱出、核への移行、ベクターからの解離と転写因子による認識など多くの過程を経る必要があるため、非ウイルスベクターにはこれらの障壁を乗り越えるための高次な機能性が要求される。高機能ベクターを開発する際、複数の機能物質あるいはそれらの構成要素を組み合わせて複合機能を発揮させる、いわゆるハイブリッド化の手法が有効であると考えられる。ハイブリッド型ベクターの設計指針として、大きく分けて二つの選択肢が挙げられる。一つは、ベースとなる材料ベクターに様々な機能素子を組み込む手法であり、もう一つは、ベクター自体を他の素材とハイブリッド化させることで新材料を創製する手法である。前者の手法により、pH、温度、酸化還元、酵素、カルシウムイオン濃度などの細胞内環境や、光や熱などの外部刺激に対する応答性を付与したベクターが開発されており、幾重にも及ぶ細胞障壁をクリアするための機能設計の研究が進められている[7-9)]。一方、後者の手法は、汎用のベクター材料の欠点を克服し、既存の材料にはない新たなバイオ機能を創成する上で重要なアプローチである。カチオン性脂質から調製されるリポソームは最も代表的な非ウイルスベクターの一つであるが[6)]、われわれは後者の立場から、従来のリポソームが抱える脆弱性の問題を克服するために、有機- 無機ハイブリッドの概念を取り入れて人工細胞膜「セラソーム」を開発した[10)]。本稿では、セラソームの設計コンセプト、構造、物性および遺伝子ベクターとしての応用について紹介したい。

2. 有機–無機ハイブリッド人工細胞膜「セラソーム」

細胞膜の主要構成成分であるリン脂質などの生体脂質を水中に分散して形成される脂質小胞体はリポソームと呼ばれ、ドラッグキャリアーあるいは細胞膜モデルとして、医学・薬学・生物学・工学などの分野で幅広く研究がなされてきている[11-13)]。リポソームは、脂質分子間の非共有結合的な自己集合に基づいて形成されるために、膜構造の安定性はそれほど高くない。一方、有機物と無機物の構造特性と機能を融合した有機- 無機ハイブリッドの開発が近年盛んに行われている[14-16)]。このような背景のもと、リポソームに広範な材料化学分野で利用できる構造安定性と機能性を付与するため、リポソーム表面をセラミックス様の無機酸化物骨格で覆った有機–無機ハイブリッド人工細胞膜「セラソーム」を開発した。

2.1　セラソームの設計と作製法

有機物の分子集合体のナノ構造特性をより精密に制御するには、単位構造の緻密な分子設計が有効となる。リポソーム表面に無機酸化物骨格を導入するにあたり、サブナノレベルで無機層の厚みを制御するため、頭部にアルコキシシリル基をもつ二本鎖型脂質を設計した。また、われわれが以前開発したペプチド脂質が他の二分子膜形成脂質に比べて会合安定性に優れていることを鑑み[17-19)]、脂質頭部と疎水性二本鎖の間に膜内水素結合帯を形成しうるアミド結合や尿素結合を導入した[20-22)]。セラソーム形成脂質の一

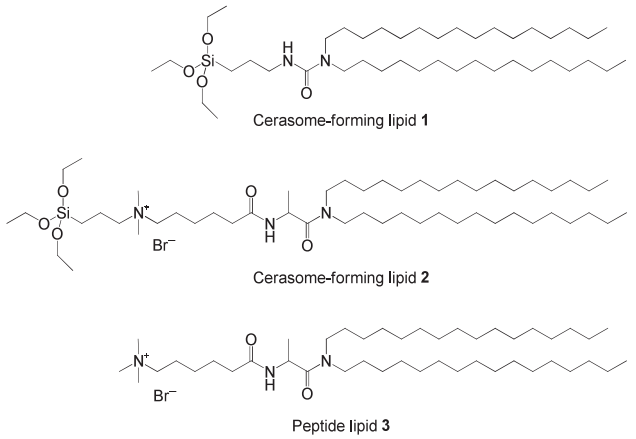


Fig. 1　Structures of cerasome-forming lipid and peptide lipid.

例を Fig. 1 に示す。これらのセラソーム形成脂質を水に分散することで自己組織的にセラソームが形成される。まず脂質頭部のアルコキシシリル基の加水分解が進行し、その結果生成する両親媒性分子が自己集合して二分子膜ベシクル構造が形成される。その後、脂質頭部のシラノール基同士が自己縮合を行い、Si-O-Si 結合からなるシロキサンネットワークが膜表面に発達することでセラソームの形成が完了する（Fig. 2a）。

脂質 **1** の場合、脂質頭部をエタノール中で加水分解した後に水中に注入するエタノールインジェクション法によりセラソームが得られる（Fig. 2b）。脂質 **2** の場合、ボルテックスミキサーによる機械的振とうで水中に分散させると直径 200 nm 程度の多重層セラソームが得られるのに対し、ひきつづき超音波処理を行うことによって直径が 50 nm 程度の一枚膜ベシクル構造に変換される[21]。さらに作製法を工夫することで、数 μm 細胞サイズのジャイアントベシクルも作製することも可能である。このようにセラソームは従来のベシクルと同様に、分散方法によりその粒径を制御することもできる。

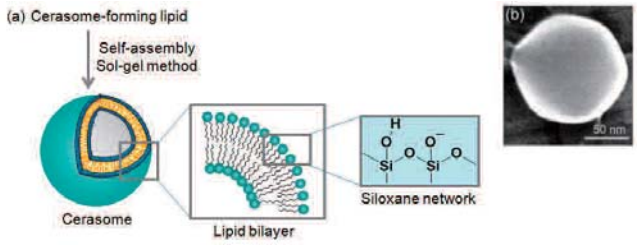


Fig. 2（a）Schematic representation of organic-inorganic hybrid vesicle “cerasome”.
（b）SEM image of a cerasome formed with lipid **1**.

2.2　セラソームの物性と機能化

セラソームの最大の特徴は、従来型のリポソームに比べて驚異的な構造安定性を有する点にある。セラソームは水中で少なくとも数ヶ月以上にわたり安定な分散状態を保つことができる。また、セラソームは緩衝剤の添加や生理食塩水中でも安定に存在し、オートクレーブ処理によってもその粒径は変化しない。さらに、セラソームの構造安定性は、界面活性剤に対する耐性実験から定量的に評価できる。ミセル形成能をもつ非イオン性の界面活性剤である TritonX-100（TX-100）の添加は、リポソームの膜構造を崩壊することが知られている。例えば、代表的なリン脂質であるジミリストイルホスファチジルコリンのリポソームは、脂質に対して数等量の TX-100 を添加するだけでベシクル構造が完全に崩壊する。これに対して、脂質 **1** が形成するセラソームは 30 等量以上の TX-100 存在下でもその構造は保持される[20]。

セラソームは、優れた構造安定性を示す一方で、リポソームと同様に細胞膜モデルとしての特性を保持しており、それは相転移挙動に顕著に反映される。一般に、脂質二分子膜は、脂質の炭化水素の運動が凍結されたいわゆるゲル状態から、炭化水素が融解した液晶状態への相転移を示し、相転移温度は脂質の分子構造に大きく依存する。水素結合帯形成部位を導入したセラソーム形成脂質では、以前われわれが開発したペプチド脂質[17-19]と同様に転移温度は主にアルキル鎖長のみに依存するため、所望の相転移温度を示すセラソームの設計が容易である。例えば、脂質 **1** が形成するセラソームの相転移温度は 29℃であり、脂質 **1** の頭部のトリエトキシシリル基をトリメチルアンモニウム基に置換した脂質二分子膜の相転移温度と等しい値が示差走査熱量分析（DSC）から得られている[20]。さらに、大過剰の界面活性剤存在下においても、セラソームのゲル- 液晶相転移挙動は保持されることも明らかになっている。すなわち、セラソームは極めて高い構造安定性を保ちながら、その内部は生体膜としての特徴を示す従来にない機能性粒子であると言える。

セラソームの水中での荷電状態はゼータ電位の pH 依存性から見積もることができる[20, 23]。例えば、脂質 **2** から形成されるセラソームの等電点は 12 付近であり、中性領域ではカチオン性コロイド粒子として振舞うことがわかった。脂質の分子設計によってセラソームの表面電荷を自在に制御することが可能である。

セラソームの高い構造安定性と表面電荷を利用することで、基板上への三次元組織化、いわゆる人工多細胞組織体の構築が可能となる[24]。例えば、アニオン性セラソームとカチオン性高分子電解質との交互積層により、基板上にセラソームを敷き詰めながら三次元的に積み上げることができる。一方、従来型のリポソームを用いて同様な交互積層を行った場合には、ベシクル構造を保ったまま積層することはできず、リポソームは平面二分子膜に形態変化を起こしてしまう。また、アニオン性セラソームとカチオン性セラソームとの交互積層により、多種類のセラソームから様々な階層構造体を任意に作製することもできる。

セラソームのもう一つの特徴として、表面に多数のシラノール基が存在しているため、様々な官能基や無機酸化物で修飾できることが挙げられる。セラソームを作製する際に、3- アミノプロピルエトキシシランを共存させると、表面にアミノ基を提示したセラソームが調製できる[25]。また、類似の手法を用いれば、セラソーム表面に光触媒機能をもつ二酸化チタン層を導入できる[26]。

従来のリポソームに比べ構造安定性が著しく向上したセラソームは、リポソームの材料設計上の制約を乗り越え、これまでにない生体機能材料としての応用が期待される。セラソームの利用法の一つとして、セラソームのカプセル化能を利用したドラッグキャリアーとしての応用が考えられる。脂質 **2** から形成されるセラソームは界面活性剤の臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）あるいは血清存在下においても、水溶性高分子の薬剤モデルを安定に封入することができる[27]。このような構造安定性に加え、セラソームのサイズを厳密に制御することで、がん治療

のためのドラッグデリバリーシステムに展開できよう。セラソームの表面修飾を利用すれば、標的指向性を付与することも可能である。また、セラソーム表面のシラノール基は、骨や歯の主成分であるヒドロキシアパタイトとの親和性が高いので、生体の有機-無機複合体の損傷部位を治療するためのナノインターフェース型ドラッグキャリアーとしての応用も考えられる。さらに、酵素をセラソームの内水相に封入あるいは、セラソームの表面に固定化することで、ナノサイズのバイオリアクターが作製でき、これを交互積層で基板上に組織化することで多段階の物質変換を連続的に行えるナノリアクターの構成も可能である。

2.3 金属被覆人工細胞膜「メタロソーム」の開発

近年、磁性金属微粒子をバイオ・医療分野へ応用する研究が盛んに行われている。薬物を固定化した磁性ナノ粒子を磁場誘導して腫瘍部位に集積させるドラッグデリバリー、がんの磁気温熱療法（ハイパーサーミア）、磁気共鳴イメージング法（MRI）用造影剤など、磁性ナノ粒子の優れた磁気特性を生かした技術開発が進められているが、脂質二分子膜ベシクルと磁性金属材料の性質を融合することで新たなバイオ機能が創成できると期待される。われわれは、両者のインターフェースとしてセラミックス層を導入することでハイブリッド化が容易になり、リポソームが抱える脆弱性の問題も克服できると考えた。このような考えをもとに、セラソームの表面をナノメーターレベルの金属薄膜でコーティングした人工細胞膜「メタロソーム」を開発した（Fig. 3a）[28, 29]。

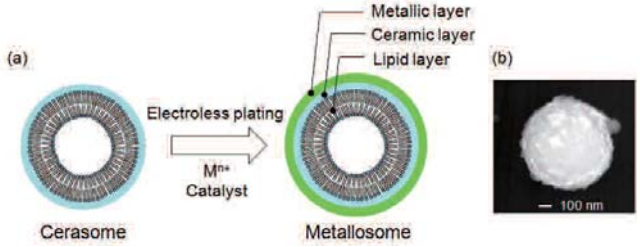


Fig. 3 (a) Schematic representation of “metallosome”.
(b) SEM image of a magnetic cerasome

ここでは、セラソームに無電解めっき法[30]を適用してメタロソームを作製した。無電解めっき法とは、その名のとおり電気を用いず、化学的な酸化還元剤を利用することで金属薄膜を形成する手法であり、導電体に限らず様々な物質を金属で被覆できる。脂質 **1** あるいは **2** から形成されるセラソームに塩化パラジウム溶液を添加すると、セラソーム表面にパラジウムイオンが結合し、これが触媒となってセラソーム表面にニッケル、銅、金など様々な金属薄膜を形成することができる。また、金属イオンと配位できる長鎖イミダゾール配位子を組み込んだセラソームを用いることで、無電解めっきのプロセスを促進できる。さらに、配位子濃度やめっき時間、温度などを調整することで、クラスターサイズの金属粒子から数十 nm の金属ナノ粒子、数十から数百 nm 厚みの金属シェルまで様々なメタロソームの表面構造が形成されており、セラソーム表面の金属被覆率や金属薄膜層の厚みを制御することもできる。リポソームを用いてメタロソーム作製を検討したところ、めっき操作によりカプセル構造が壊れてしまったことから、シロキサン骨格に起因する高い構造安定性をもつセラソームを用いることで、メタロソームの作製が有効に行えることがわかる[28]。

さらに、鉄、コバルト、ニッケルの磁性合金で無電解めっきを行うことで、磁性金属薄膜で被覆されたマグネティックセラソームを開発している（Fig. 3b）[29]。作製したメタロソームはセラソーム由来のカプセル構造を保持しており、また、生体膜の特徴である相転移挙動も示した。マグネチックセラソームは外部磁場によりその凝集・分散をマニュピレーションすることができた。このような磁性金属材料の特性と人工細胞膜カプセルとしての特性を兼ね備えたマグネティックセラソームは、磁場誘導によって腫瘍部位に薬物を集積させるドラッグデリバリーや標的細胞に DNA を集積させる遺伝子導入（マグネットフェクション）など、様々な応用展開が期待される。

3. セラソームの遺伝子導入キャリアーとしての応用

遺伝子輸送においてベクターのサイズ制御は重要な課題である[31]。カチオン性リポソームは非ウイルスベクターとして頻繁に利用されているが、リポソーム自体は数十 nm 程度の適切なサイズを保持できるものの、核酸との相互作用によって融合や架橋を起こし、サイズが増大してしまうという問題がある。サイズの巨大化は、細胞内への取り込みの基本過程であるエンドサイトーシスの効果を下げ、*in vivo* の系では抹消血管の透過性を妨げる。一方、サイズが適切であると、EPR（Enhanced Permeability and Retention）効果によりがん組織に遺伝子や薬物を選択的に送達できるという利点がある。従来のリポソームのサイズ制御の問題を克服し、細胞への高効率な遺伝子導入を実現するため、セラソームを遺伝子ベクターとして応用した[21, 22, 32]。

3.1 セラソーム-DNA 複合体形成

脂質 **2** から形成されるセラソームは中性領域でカチオン性コロイド粒子として振舞うため、プラスミド DNA と静電相互作用により複合体（リポプレックス）を形成する。セラソーム形成脂質と DNA リン酸基のモル比を N/P としたとき、N/P 比の増大とともにリポプレックス形成量が増大することが、アガロースゲル電気泳動法により確認できる。

セラソームの構造に及ぼす DNA の影響を電子顕微鏡観察および動的光散乱法（DLS）によって評価したところ、脂質 **2** から形

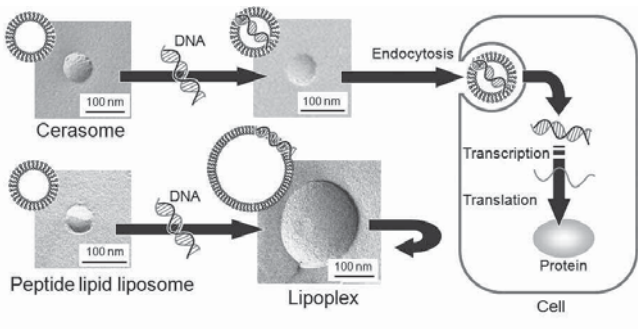


Fig. 4 Schematic representation of the transfection mediated by cationic vesicles: freeze fracture TEM images of cerasome formed with lipid **2** and liposome formed with lipid **3** in the absence and presence of plasmid DNA.

成されるセラソームは、プラスミド DNA の添加後も約 70 nm の粒径を保持していた（Fig. 4）。一方、ペプチド脂質 **3** から形成されるリポソームは、プラスミド DNA の添加後、粒径の増大が見られた。カチオン性セラソームは表面にシロキサン骨格を有するため、プラスミド DNA 添加に伴う構造変化が抑制されるのに対し、カチオン性リポソームは膜融合に伴いサイズが増大したものと考えられる。このように構造安定性に優れたセラソームは、リポプレックス形成後も膜融合せず、ウイルスサイズのベシクル形態を保持できるというベクターのサイズ制御における利点が見出された [21, 22]。

3.2　セラソームによる遺伝子導入

セラソームによる遺伝子キャリアーとしての機能を評価するため、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞株やヒト肝癌由来の HepG2 細胞株に対する遺伝子導入を行った。ルシフェラーゼ活性から遺伝子導入効率を算出したところ、脂質 **2** から形成されるカチオン性セラソームは、N/P 比の増大とともに導入効率は増大し、N/P 比 2 で飽和した。興味深いことに、セラソームはペプチド脂質 **3** から形成されるカチオン性リポソームに比べて、遺伝子導入効率が 100 ～ 1000 倍に増大した [21, 22]。カチオン性のペプチド脂質が形成するリポソームは、COS-7 細胞等への遺伝子導入において有効性が既に認められているが [33]、それに比べて格段の遺伝子導入効率が得られたことは特筆すべき点である。このような遺伝子導入効率の差異は、第一に DNA 複合体のサイズに起因すると考えられる。実際に、これらの DNA 複合体サイズと遺伝子導入効率の相関は、以前報告された人工グリコウイルス系における相関とよく合致している [34]。

実際の遺伝子導入においてはしばしば血清培地中でのリポプレックス調製が必要になるが、一般に、カチオン性リポソームによる遺伝子導入を血清存在下で行った場合、その遺伝子導入効率は著しく低下する。実際に、10%の血清存在下でペプチド脂質 **3** から形成されるリポソームを用いた場合、無血清系と比較して 10 分の 1 程度まで遺伝子導入効率が低下した。しかしながら、セラソームを用いた場合、10%の血清存在下においても、無血清系と同等の遺伝子導入効率を示した（Fig. 5a）。実際に、セラソームは血清存在下においてもセラソーム-DNA 複合体が形成することがアガロースゲル電気泳動法により確認されており（Fig. 5b）、プラスミド DNA 存在下においても膜融合することなく、セラソーム本来の粒子サイズが保持されていた（Fig. 5c）。

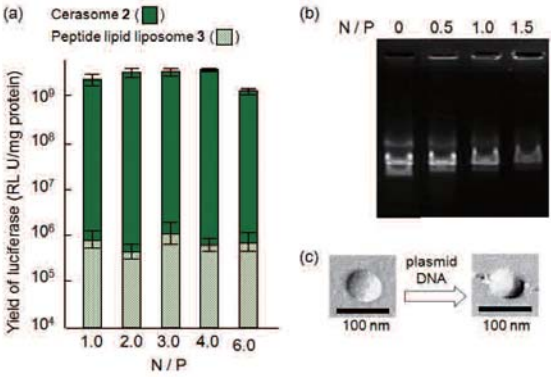


Fig. 5　(a) Yields of luciferase in the transfection of HepG2 cells in the presence of serum (10% FCS) using plasmid DNA (pGL3) and variable amounts of lipid **1** and **2**.
(b) Electrophoretic gel shifts for plasmid DNA in the absence and presence of increasing amonts of lipid **2** in water containing serum (10% FCS).
(c) Freeze fracture TEM images of cerasome formed with lipid **2** in the absence and presence of plasmid DNA in water containing serum (10% FCS).

さらに、MTT アッセイにより細胞毒性を評価したところ、セラソーム-DNA 複合体の添加によっても、HeLa および HepG2 細胞は 100%近い細胞生存率を保持した。一方、カチオン性リポソーム-DNA 複合体の添加によって、HeLa および HepG2 細胞の生存率はそれぞれ 63%、54%に低下した。このようなセラソームの低い細胞毒性の要因として、生体膜との融合の抑制や DNA 複合体の凝集抑制などが推察され、セラソームは高効率かつ細胞にやさしい遺伝子キャリアーとして利用できることが見出された。

3.3　セラソームによる siRNA 導入

RNA が遺伝子発現を制御する RNA 干渉（RNAi）が発見されて以来、遺伝子の特異的なサイレンシング技術を用いた細胞の機能解析や病気の治療法など新たな展開が期待されており、効果的な small interfering RNA（siRNA）の導入技術の開発の重要性が高まっている。ここではセラソームの優れた構造安定性を生かして siRNA 導入を検討した。

セラソームはプラスミド DNA 存在下において膜融合を起こさないが、高濃度条件においては、プラスミド DNA をテンプレートとしてセラソームが架橋した集積体が形成される。しかし、プラスミドの代わりに siRNA を用いるとこのような集積体は形成されない。高濃度条件においても siRNA との複合体サイズが増大しないというセラソームの特徴は、細胞への siRNA 導入において非常に有効である。実際に、蛍光タンパク質 DsRed2 を恒常的に発現する HeLa 細胞に対して、脂質 **2** から形成されるセラソームを用いて siRNA を導入したところ、幅広い濃度条件で DsRed2 の発現が特異的に阻害された [32]。一方、ペプチド脂質 **3** から形成されるリポソームは、siRNA 存在下で膜融合によりサイズが増大し、siRNA 導入実験においても DsRed2 発現の阻害も見られなかった。また、セラソームは 10%の血清存在下においても、無血清系と同等の RNAi サイレンシングが達成され、細胞毒性も低いことから、*in vivo* での応用が期待される。

3.4　セラソームによる神経細胞への遺伝子導入

様々な非ウイルスベクターが開発され、樹立された培養細胞株への高い遺伝子導入効率が達成される一方で、一般に、浮遊系の培養細胞株、初代培養細胞、幹細胞などへの遺伝子導入は困難であると言われている。中でも神経細胞は微小環境の変化に非常に敏感であるため、遺伝子導入後すぐに死滅しやすいという問題がある [35-37]。神経細胞への遺伝子導入は、神経科学分野での遺伝子の機能解析に必要不可欠な手段であり、医療分野においては神経性疾患や脊髄損傷に対する遺伝子治療への応用が期待されていることから、高効率かつ細胞にやさしい遺伝子導入法の開発が求められている。ここでは遺伝子導入が最も困難な細胞の一つとされる初代培養神経細胞 [38, 39] をターゲットとして、セラソームの遺伝子ベクターとしての機能を評価した。

神経細胞は胎生 18 日目のラットから海馬を摘出して培養した。脂質 **2** から形成されるカチオン性セラソームの水分散液に、緑色蛍光タンパク質（GFP : green fluorescent protein）をコードするプラスミド DNA を加え、セラソーム-DNA 複合体を調製した。こ

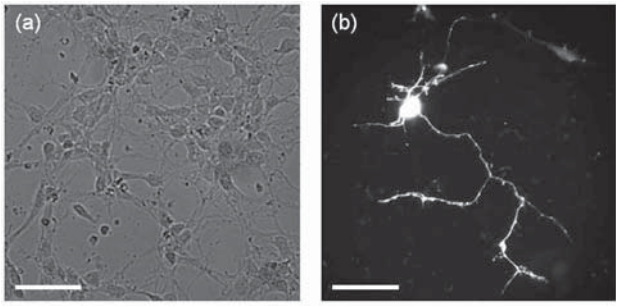


Fig. 6　Creasome-mediated transfection of the hippocampal neurons: (a) optical and (b) fluorescent images of the hippocampal neurons treated with the lipoplex composed of lipid **2** and plasmid DNA encoding GFP (scale bar = 50 μm).

れを用いて神経細胞への遺伝子導入を検討したところ、48時間後、GFPの発現を蛍光顕微鏡観察で確認した（Fig. 6）[40]。一方、ペプチド脂質 **3** から形成されるカチオン性リポソームを用いたところ、GFPの発現は確認されなかった。上述の細胞株に対する結果と同様に、適切なDNA複合体のサイズを維持できるセラソームは、神経細胞への遺伝子導入においても有効であることが示された。さらに、セラソームは神経細胞への毒性が低く、神経突起の伸長を阻害しないという興味深い結果が見出されている。神経突起の伸長は、神経ネットワーク形成における重要な過程であり、様々な生体分子が関与することが近年明らかになっている[41-43]。セラソームは、神経細胞の本来の性質・機能を損なわない遺伝子解析ツールとしての応用展開できると期待され、脊髄損傷や脳卒中後の神経再生のための遺伝子治療への応用も期待される。

4. おわりに

本稿では、われわれが開発した有機–無機ハイブリッドベシクル「セラソーム」の設計コンセプト、構造、物性および遺伝子キャリアーとしての応用について紹介してきた。セラソームは高い構造安定性を有しながら、その内部は生体膜モデルとしての特性を持ち合わせており、有機成分と無機成分がそれぞれ理想的な役割を担う有機–無機ナノハイブリッドである。セラソームはそのサイズや膜中の有機層と無機層の厚みをナノレベルで制御できる。有機–無機ハイブリッドの概念を踏まえ、両成分をSi-C結合で連結した単位脂質構造を設計することで、このような分子集合体のナノ構造特性の厳密な制御が可能となり、従来のリポソームを凌駕する構造安定性を付与することができた。リポソームの構造不安定性を克服したセラソームは、核酸との相互作用による膜融合と複合体サイズの増大を抑制し、細胞にやさしい高効率な遺伝子キャリアーとして応用できることが明らかになった。これまでに数多くの非ウイルスベクターが合成･開発され、化学構造–機能の相関やベクターの設計指針に関する知見が蓄積されつつある。将来の遺伝子デリバリーシステムの確立のために、ベクターに機能性素子を組み込む多機能化に加え、本稿で紹介したハイブリッド化による新材料開発のアプローチを組み合わせることで、高い発現効率と安全性を具備した非ウイルスベクターが開発されることを期待したい。

謝辞

本稿で紹介したセラソームによる遺伝子導入は、京都大学大学院工学研究科の青山安宏教授（現　同志社大学大学院工学研究院教授）、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の稲垣直之准教授との共同研究である。また、メタロソームの開発は日鉱金属株式会社の伊森徹博士との共同研究である。これらの方々に深く感謝申し上げる次第である。

［参考文献］

1）R. C. Mulligan, *Science*, **1993**, *260*, 926-932.
2）E. Marshall, *Science*, **1999**, *286*, 2244-2245.
3）M. A. Mintzer and E. E. Simanek, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 259-302.
4）D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun and P. S. Stayton, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2005**, *4*, 581-593.
5）K. Kataoka, A. Harada and Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *47*, 113-131.
6）S. Bhattacharya and A. Bajaj, *Chem. Commun.*, **2009**, 4632-4656.
7）H. Kamiya, H. Akita and H. Harashima, *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*, 990-996.
8）N. Nishiyama, A. Iriyama, W. D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama and K. Kataoka, *Nat. Mater.*, **2005**, *4*, 934-941.
9）S. Zhang, Y. Zhao, B. Zhao and B. Wang, *Bioconjug. Chem.*, **2010**, *21*, 1003-1009.
10）J. Kikuchi and K. Yasuhara, in "Advances in Biomimetics", A. George, ed., InTech, Rijeka, **2011**, 231-250.
11）Liposomes: A Practical Approach, V. P. Torchilin and V. Weissig, ed., Oxford University Press, New York, **2003**.
12）野島庄七, 砂本順三, 井上圭三編, リポソーム, 南江堂, **1988**.
13）秋吉一成, 辻井薫監修, リポソーム応用の新展開, NTS, **2005**.
14）H. Schmidt, *J. So-Gel Sci. Technol.*, **1994**, *1*, 217.
15）C. Sanchez, G. J. D. A. Soler-Illia, F. Ribot, T. Lalot, C. R. Mayer and V. Cabuil, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3061-3083.
16）G. Schottner, *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3422-3435.
17）Y. Murakami and J. Kikuchi, in "Bioorganic Chemistry Frontiers", H. Dugas ed., Vol.2, Springer-Verlag, Berlin, **1991**, 73-113.
18）Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda and O. Hayashida, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 721-758.
19）村上幸人監修，超分子化学の基礎と応用，NTS, **1996**.
20）M. Hashizume, S. Kawanami, S. Iwamoto, T. Isomoto and J. Kikuchi, *Thin Solid Films*, **2003**, *438*, 20-26.
21）K. Matsui, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama, Y. Sasaki, T. Komatsu, T. Terashima and J. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 3114-3115.
22）Y. Sasaki, K. Matsui, Y. Aoyama and J. Kikuchi, *Nat. Protoc.*, **2006**, *1*, 1227-1234.
23）K. Katagiri, M. Hashizume, K. Ariga, T. Terashima and J. Kikuchi, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 5272-5281.
24）K. Katagiri, R. Hamasaki, K. Ariga and J. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 7892-7893.
25）K. Katagiri, R. Hamasaki, K. Ariga and J. I. Kikuchi, *J. Sol Gel Sci. Technol.*, **2003**, *26*, 393-396.
26）M. Hashizume, M. Yamada, K. Katagiri, M. Tsuji and J. Kikuchi, *Bioconjug. Chem.*, **2006**, *17*, 1099-1104.
27）T. Kawataki, K. Yasuhara and J. Kikuchi, *Chem. Lett.*, **2011**, *40*, 461-463.
28）F. Gu, M. Hashizume, S. Okada, Y. Sasaki, J. Kikuchi and T. Imori, *J. Cera. Soc. Jpn.*, **2008,** *116*, 400-405.
29）D. Minamida, S. Okada, M. Hashizume, Y. Sasaki, J. Kikuchi, N. Hosoito and T. Imori, *J. Sol Gel Sci. Technol.*, **2008**, *48*, 95-101.
30）G. O. Mallory and J. B. Hajdu, Electroless Plating: Fundamentals and Applications, American Electroplaters and Surface Finisher Society, Orkando, **1990**.

31）F. Osaki, T. Kanamori, S. Sando, T. Sera and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6520-6521.
32）K. Matsui, Y. Sasaki, T. Komatsu, M. Mukai, J. Kikuchi and Y. Aoyama, Bioorg. Med. *Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 3935-3938.
33）T. Kato, K. Iwamoto, H. Ando, N. Asakawa, I. Tanaka, J. Kikuchi and Y. Murakami, *Biol. Pharm. Bull.*, **1996**, *19*, 860-863.
34）T. Nakai, T. Kanamori, S. Sando and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8465-8475.
35）J. M. Bergen, I. Park, P. J. Horner and S. H. Pun, *Pharm. Res.*, **2008**, *25*, 983-998.
36）F. C. Perez-Martinez, J. Guerra, I. Posadas and V. Cena, *Pharm. Res.*, **2011**, *28*, 1843-1858.
37）D. R. Cooper and J. L. Nadeau, *Nanoscale*, **2009**, *1*, 183-200.
38）E. C. Ohki, M. L. Tilkins, V. C. Ciccarone and P. J. Price, *J. Neurosci. Methods*, **2001**, *112*, 95-99.
39）M. Jiang and G. Chen, *Nat. Protoc.*, **2006**, *1*, 695-700.
40）K. Tahara, T. Moriuchi, A. Hirota, K. Yasuhara, T. Maeno, M. Toriyama, N. Inagaki and J. Kikuchi, Gene Delivery to Cultured Hippocampal Neurons Using Cerasome as Nonviral Vector, The 5th Symposium on Biorelevant Chemistry CSJ, **2011**.
41）N. Inagaki, K. Chihara, N. Arimura, C. Menager, Y. Kawano, N. Matsuo, T. Nishimura, M. Amano and K. Kaibuchi, *Nat. Neurosci.*, **2001**, *4*, 781-782.
42）S. H. Shin, L. Y. Jan and Y. N. Jan, *Cell*, **2003**, *112*, 881-884.
43）T. Shimada, M. Toriyama, K. Uemura, H. Kamiguchi, T. Sugiura, N. Watanabe and N. Inagami, *J. Cell. Biol.*, **2008**, *181*, 817-829.

［著者プロフィール］

氏名：田原　圭志朗（Keishiro Tahara）
所属：奈良先端科学技術大学院大学　物質創成科学研究科　助教
連絡先：〒 630-0192　奈良県生駒市高山町 8916-5
TEL：0743-72-6099
E-mail：taharak@ms.naist.jp
出身学校：九州大学大学院工学府物質創造工学専攻
学位：博士（工学）

氏名：菊池　純一（Jun-ichi Kikuchi）
所属：奈良先端科学技術大学院大学　物質創成科学研究科　教授
連絡先：〒 630-0192　奈良県生駒市高山町 8916-5
TEL：0743-72-6090
E-mail：jkikuchi@ms.naist.jp
出身学校：九州大学大学院工学研究科合成化学専攻
学位：工学博士

第 28 版総合カタログ（2012/2013）　発行

2012 年 2 月 1 日に第 28 版総合カタログを発行いたしました。
カタログ発行と併せて、ホームページの商品カタログ、プロトコルの内容も更新しております。
これからも、引き続き皆様のご研究に役立つ情報をご提供して参ります。

カタログのご請求は小社マーケティング部までご依頼ください。
その他パンフレット類のご請求も承っております。

Free dial：0120-489548　　Free fax：0120-021557
http://www.dojindo.co.jp/technical/catalog.html

・分子生物学関連試薬
・プロテオミクス関連試薬
・Reagents for Cell Biology
・自己組織化単分子膜作製用試薬
・タンパク質標識用キット
・酸化ストレス研究用試薬
・細胞増殖測定細胞染色プロトコル

「蛍光生物学」の最前線
5-1
FRET バイオセンサーの最近の進歩

青木　一洋、松田　道行
京都大学大学院
生命科学研究科　生体制御学分野

1. はじめに

GFP 蛍光タンパク質の生物学への応用は、単に分子や細胞のマーカーとしての利用に留まらず、分子活性や細胞機能をモニターするバイオセンサー群の開発へと発展している。なかでもフェルスター（又は蛍光）共鳴エネルギー移動（Förster/fluorescence resonance energy transfer、FRET）の原理に基づくバイオセンサーは、イオン濃度、情報伝達分子群の活性、さらには脂質や糖の濃度を測定することができ、生物の様々な状態をリアルタイムに観測するツールとして幅広く使われるに至っている。最近のFRETバイオセンサーの注目すべき進歩としては、その種類が格段に増加したこと、FRET バイオセンサーに至適な蛍光タンパク質が開発されたこと、高感度化のためのプラットフォームができたこと、安定発現培養細胞株が容易に作製できるようになったこと等が挙げられる。本稿では、FRET バイオセンサーの原理および種類を俯瞰したのちに、最近の進歩について解説する。

2. FRET バイオセンサー

A）FRET の原理

フェルスター共鳴エネルギー移動（Förster resonance energy transfer、FRET）とは、励起状態のドナー分子から、近傍のアクセプター分子にエネルギーが無放射遷移する現象を指す[1)]。生物学研究においては、蛍光分子をドナー分子として用いることが多いために、蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer）が訳語として用いられることが多い。ちなみに、ルシフェラーゼなどの生物発光分子をドナーとして用いる場合は、生物発光共鳴エネルギー移動（Bioluminescence resonance energy transfer, BRET）と呼ばれる。本稿では、GFP 蛍光タンパク質を用いた FRET バイオセンサーについて主に解説するので、ドナー分子もアクセプター分子も蛍光タンパク質の場合について記載し、それ以外の FRET については説明を割愛する。1 ドナー分子あたりに FRET が生じる確率、つまり FRET 効率は、①ドナーとアクセプター蛍光タンパク質間の距離、②ドナーとアクセプター蛍光タンパク質の蛍光発色団の相対的向き、③ドナー蛍光タンパク質の発光スペクトラムとアクセプター蛍光タンパク質の吸収スペクトラムのオーバーラップ、これらの 3 つの因子によって主として決定される。前二者の違いを図 1a，b に概念的に示す。

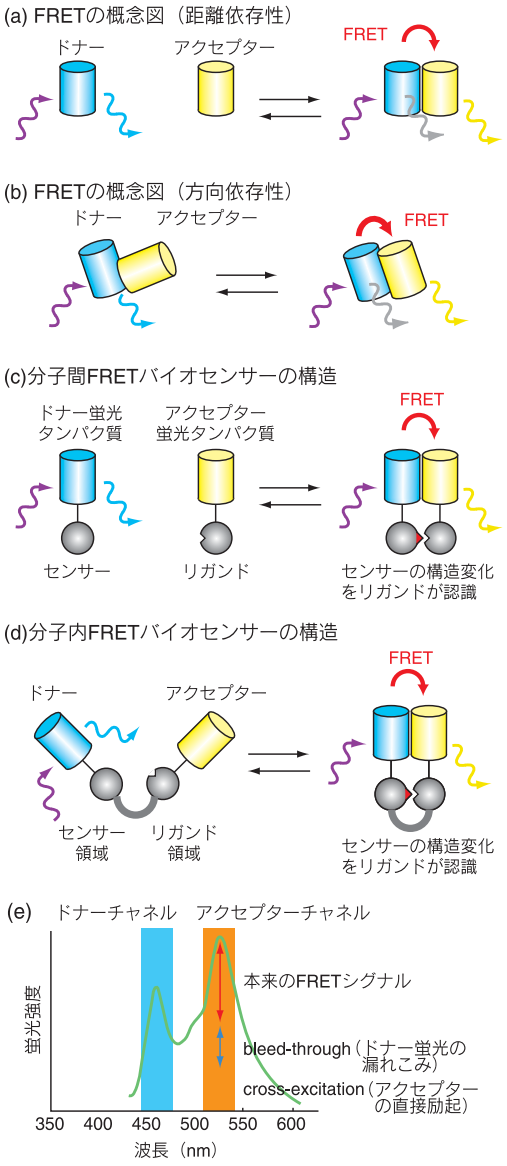


図 1　FRET バイオセンサーの原理
FRET 効率の変化はドナー蛍光タンパク質とアクセプター蛍光タンパク質と間の距離(a)および方向(b)の違いにより変化する。このことを利用して、分子間 FRET バイオセンサー(c)および分子内 FRET バイオセンサー（d）が作製できる。FRET はドナー蛍光タンパク質を励起し、ドナーチャネルとアクセプターチャネルの蛍光量比を取ることにより効率が測定できる。(e) には、アクセプターチャネルの蛍光には、補正が必要であることを示している。

B）FRET バイオセンサーの構造

蛍光タンパク質からなる FRET バイオセンサーは一般的にアクセプター蛍光タンパク質、ドナー蛍光タンパク質、リガンド領域、センサー領域、そしてこれらを結合するリンカー領域から構成される。センサー領域は、外部環境変化により構造が変化する部位である。たとえば、リン酸化、GTP 結合、あるいはイオンやリン脂質の結合などが、このセンサー領域の構造変化をもたらす環境変化として代表的なものである。生体内には、このようなタンパ

ク質の構造変化を識別して特異的に結合できる多くのタンパク質ドメインが存在しており、これらがリガンド領域として用いられる。リン酸化チロシンを認識するSH2ドメイン、リン酸化セリン／スレオニンを認識するFHA1ドメインやWWドメインなどが代表例である。外部環境変化に対応したセンサー領域の構造変化がリガンド領域への結合をもたらす際に、アクセプター蛍光タンパク質からドナー蛍光タンパク質へのFRET効率が変化することを利用してFRETバイオセンサーは作製される。リンカー領域はこれらの構成因子をつなぐ部分である。

C）分子間型FRETバイオセンサー

FRETバイオセンサーは、大きく分子間型（二分子型）と分子内型（一分子型）に分けられる[2]（図1c, d）。分子間型FRETバイオセンサーは、アクセプター蛍光分子を含むバイオセンサーと、ドナー蛍光タンパク質を含むバイオセンサーの1セットから成る（図1c）。それぞれに、リガンドあるいはセンサー領域が含まれており、この二者の結合がドナー蛍光タンパク質とアクセプター蛍光タンパク質との近接化をもたらし、結果としてFRET効率が上昇する。この分子間型FRETバイオセンサーは、細胞内でタンパク質間相互作用を可視化するのに有用である。しかし、分子間型FRETバイオセンサーを用いたタンパク質相互作用の検出にはFRET効率の変化を定量的に決定する必要がある。これには、ドナー蛍光のアクセプター蛍光タンパク質検出チャネルへの漏れこみや、アクセプター蛍光タンパク質のFRETによらない直接励起に伴う蛍光の補正が必要であり、ノイズが大きくなりがちである（図1e）。このため、蛍光寿命を測定することでFRET効率を測定するタイプの顕微鏡（FLIM, Fluorescence lifetime microscope）がこの用途には使用されることが多い。詳細はFLIMの総説を参照されたい[3]。

D）分子内型FRETバイオセンサー

分子内型FRETバイオセンサーは、すべてのパーツを一つの分子に取り込んだものである（図1d）。ドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子の量が常に同じになることから、アクセプター蛍光タンパク質検出チャネルへの漏れこみや、アクセプター蛍光タンパク質のFRETによらない直接励起は一定になる。したがって、FRET効率の増減はドナーチャネルとアクセプターチャネルの蛍光量比をとるだけで十分評価することができる。欠点は、FRETバイオセンサーの性能を決定する四つのパーツ（アクセプター蛍光タンパク質、ドナー蛍光タンパク質、リガンド領域、センサー領域）の配置をどうするのが良いかを試行錯誤して決めなければいけないという点にある。しかし、GFPをベースにしたFRETバイオセンサーが作られるようになってすでに15年経ち、多くのFRETバイオセンサーが手に入るようになった（ホームページを参照のこと：http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/e-phogemon/unifret.htm）。現在、研究の多くはこの分子内型FRETバイオセンサーを使ったものであるので、本稿ではこれに限定して話を進めたい。

E）細胞のFRET画像の代表例

以下にいくつかの代表例を紹介する（図2）。Raichu-Rasは、低分子量GTP結合タンパク質であるRasの活性を測定するものである。このバイオセンサーを使うことにより細胞増殖因子がRasを細胞辺縁部の葉状突起で活性化することを初めて見出した（図2a）[4]。また、セリンスレオニンリン酸化酵素Rafのバイオセンサーを使い、Rafが細胞増殖刺激により細胞膜上で活性化される様子が可視化されている（図2b）[5]。

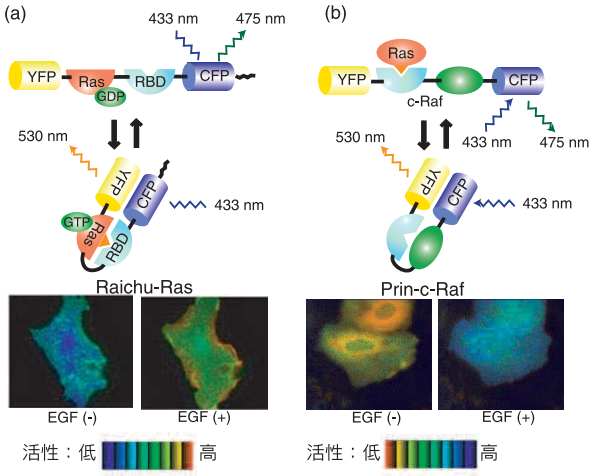


図2　FRETバイオセンサーを用いた情報伝達分子活性の可視化
代表的なFRETバイオセンサーRaichu-RasとPrin-cRafの構造とFRETイメージを示す。Rasのバイオセンサー RaichuはRasがGTP型になるとFRET効率が上昇し、Rasの活性が高いことを検知する。一方、Prin-cRafは、Rafが開いた活性化型構造をとるとFRET効率が低下するので、これを利用してRafの活性化を検知することができる。(a)では、上皮細胞増殖因子の刺激により、COS1細胞の辺縁部で強いRasの活性化が起きていることを示している。同様に、(b)では、細胞膜でRafの活性化が起きていることを示している。

3. FRETバイオセンサーの高感度化

A）蛍光タンパク質の最適化

既述の通り、分子内型FRETバイオセンサーはその作製に労力を有する。筆者らは、高感度分子内型FRETバイオセンサーを容易に作製するために、その骨格の最適化を行った[6]。FRET効率を決める主たる3因子のうち、まず、ドナーとアクセプター蛍光タンパク質の組み合わせの最適化を行った。これまでのFRETバイオセンサーの大部分は、シアン蛍光タンパク質（CFP）をドナー蛍光タンパク質に、黄色蛍光タンパク質（YFP）をアクセプター蛍光タンパク質としているので、CFPおよびYFPと蛍光特性の近い蛍光タンパク質をスクリーニングした[7-10]。その結果、ドナー蛍光タンパク質にECFPもしくはnTurquoise-GLを、アクセプター蛍光タンパク質にYPetを用いた場合に最も高いFRET効率が得られることが分かった。

B）リンカーの最適化

ついで、残る二つの因子、すなわちアクセプター蛍光タンパク質とドナー蛍光タンパク質の間の距離と方向性の最適化である。これまで報告されているFRETバイオセンサーを見ると、リガンド領域とセンサー領域が結合した際にFRET効率が上昇するものと下降するものに二分される。これらは、図3a, bに示すように、距離が主たる影響を与えているものと、方向性が主たる影響を与えているものがあるからだと解釈されている。論文中に記載されていることはほとんどないが、実際のところは、作ってみないとこのどちらのタイプになるかはわからない。より正直に言えば、試作されたバイオセンサーの大部分はどちらでもない。すなわち、

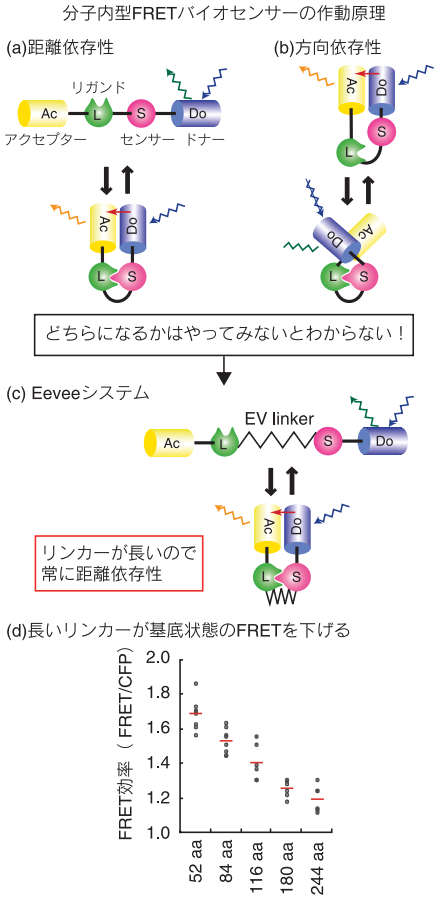


図 3　Eevee リンカーシステム
（a, b）分子内 FRET バイオセンサーの場合、リガンドとセンサーの結合により、FRET 効率が上昇する場合（距離依存性）と逆に下がる場合（方向依存性）の二つがある。しかし、これはバイオセンサー作製前に予測することはほぼ不可能である。（c）そこで、非常に長いリンカー（Eevee リンカー）を使うことで、基底状態の FRET 効率を低下させると、必ず方向依存性となる FRET バイオセンサーを作製することができる。（d）リンカーの長さを長くすると、基底状態の FRET 効率が低減する。これは、ドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子の距離が長くなったためと考えられる。

リガンド領域とセンサー領域が結合しても FRET 効率が変化しないものが大部分であり、幸いにして FRET 効率が変化したものについて、後付けで a ないし b のモデルを書いているのが実態である。その最大の理由は、リガンド領域とセンサー領域が結合した状態の立体構造はほとんど手にいれることができず、方向性因子の寄与が全く予想できないからである。そこで筆者らは、方向性因子の寄与を無くするために、リガンド領域とセンサー領域が結合していない状況では FRET がほとんど起こらなくするシステム、すなわち Eevee（extension for enhanced visualization by evading extra FRET）システムを考えた。具体的にはリンカーを非常に長くしたのである（図 3c）。その結果、予想通り、リガンド領域とセンサー領域が結合していない状況での FRET 効率が低減し、リガンド領域とセンサー領域が結合した際の FRET 効率の上昇を大きくすることに成功した（図 3d）。筆者らはこのリンカーを EV リンカーと命名し、様々な FRET バイオセンサーに応用している。

4. 安定発現培養細胞株の樹立

A）FRET バイオセンサーの弱点

論文にはほとんど書かれていない FRET バイオセンサーの大きな欠点がある。それは安定発現培養細胞株を作るのが非常に難しいということである。実際、論文となっている佐藤らの論文以外はほとんど報告がない[11]。レトロウイルスやレンチウイルスを使った場合は、おそらく逆転写反応の際に CFP 遺伝子と YFP 遺伝子との間の組換えが起きて、CFP もしくは YFP のみしか光らなくなるものが大部分である。また、直鎖状にした DNA をトランスフェクションでゲノムに導入する場合は、継代を重ねるにつれ、蛍光が減少していくのが普通である。

B）TFP を使った FRET バイオセンサー

筆者らは、これらの問題がともに GFP 変異体である CFP と YFP の遺伝子配列がほとんど同じであることに起因していると考え、CFP をサンゴ由来の蛍光タンパク質 TFP[12] に替えた FRET バイオセンサーを作製した。その結果、予想通り、TFP をドナー蛍光タンパク質、YFP をアクセプター蛍光タンパク質にした FRET バイオセンサーはレトロウイルスを用いて容易に安定発現細胞株を樹立できることがわかった[13]。

C）レトロトランスポゾンを用いた遺伝子導入

蛍光タンパク質の最適化の際に検討した結果、TFP をドナー蛍光タンパク質に用いた FRET バイオセンサーの感度は CFP をドナー蛍光タンパク質とした FRET バイオセンサーと比較して必ずしも高くはないことが明らかになった[6]。CFP と YFP との組み合わせのまま安定発現細胞株ができないか考えていたところ、理化学研究所の丹羽博士に piggyBac トランスポゾンを使う方法をご教示いただいた。実際、この方法を試してみると、きわめて容易に FRET バイオセンサーを安定発現する細胞株が樹立できることが分かった[6]。最近、Tol2 トランスポゾンを用いた系でも同様に安定発現細胞株が樹立できることを見出しており、トランスポゾンの種類は限定されないようである。

D）安定発現培養細胞株の樹立

一過性の発現では、細胞ごとによる FRET バイオセンサーの発現量の差が大きい。FRET バイオセンサーの発現量はしばしばその FRET 効率に影響を与えるので、薬剤の効果等を測定するためには、一過性発現系は不向きである。従って FRET バイオセンサーを安定発現する細胞株の樹立法の確立は、薬剤スクリーニング系への道を拓くと考えられた。図 4a には、がん遺伝子情報伝達系の中の重要な分子である ERK の FRET バイオセンサーを発現する培養細胞株を一例として示している。さまざまな阻害剤が ERK 活性を抑制することが定量的に容易に調べられる。このような細胞を用いた薬剤効果の測定は、目的とする分子に直接作用する薬剤のみならず、広く情報伝達上流の制御分子やフィードバックを制御する分子の活性制御を司る分子に対する効果も容易に調べることができ、薬剤開発において重要な情報を与えてくれる。

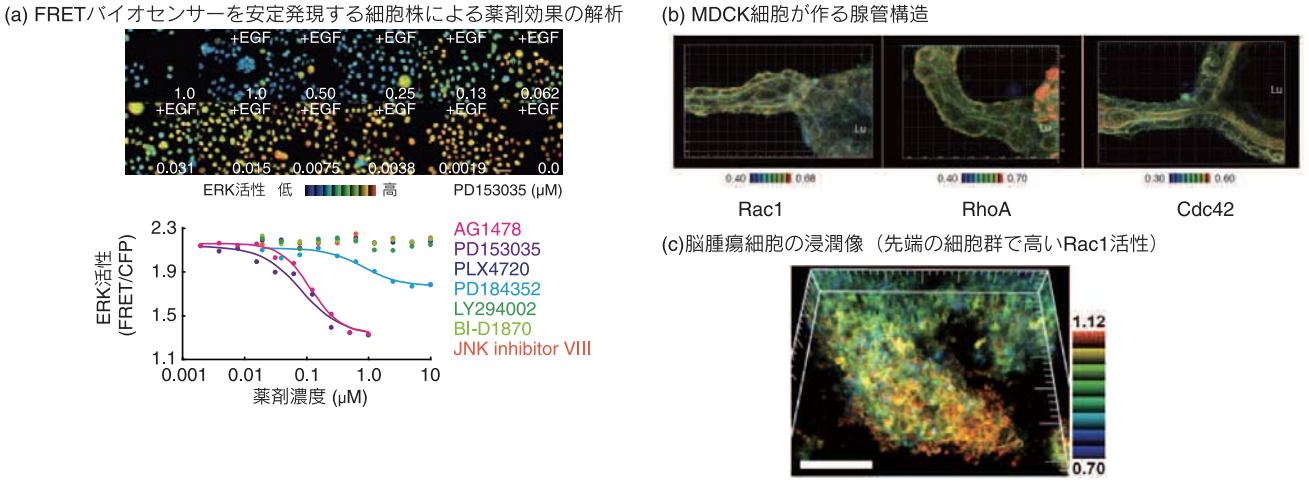


図 4　FRET バイオセンサーを安定発現する細胞株を用いた組織空間での低分子量 G タンパク質の空間分布
（a）（上）ERK MAP キナーゼの FRET バイオセンサーを核に安定的に発現する HeLa 細胞を上皮細胞増殖因子 EGF と EGF 受容体の阻害薬 PD153035 を異なる濃度で処理したときの FRET 画像。（下）種々の阻害薬の ERK 活性に対する濃度依存性を定量化しプロットした。生細胞を用いて阻害薬の IC50 値を測定することができる。（b）MDCK 細胞をマトリゲル内で培養すると 3 次元の腺管構造を構築することができる。Rho ファミリー G タンパク質の FRET バイオセンサーを安定発現する培養細胞株を用いることで、3 次元における Rho ファミリー G タンパク質の活性分布を可視化することができる。Rac1 および RhoA は、細胞の底側面で高く、Cdc42 は腺管内腔側で活性が高い。（c）同様に、脳腫瘍細胞 C6 に FRET バイオセンサーを安定発現させて、脳内に接種すると、浸潤部の細胞が中心部の細胞よりも Rac1 活性が高いことがわかる。

5. 生体組織での FRET イメージング

A）三次元培養での活性分布の可視化

安定発現細胞株樹立の成功は、3 次元培養系や生組織内での FRET イメージングを可能とした。ここでは一例として、MDCK 細胞が腺管構造を作る過程における Rho ファミリー GTP 結合タンパク質の活性の空間分布について示す（図 4b）[14]。Rho ファミリー GTP 結合タンパク質はアクチン骨格系を制御する GTP 結合タンパク質で、RhoA は緊張線維を、Rac1 は葉状突起を、Cdc42 は糸状突起を誘導することが知られていた。これに呼応して、付着細胞では RhoA は、細胞の尾部と先端部で、Rac1 と Cdc42 は葉状突起や糸状突起で活性が高いことが知られていた。しかし、3 次元構造における Rho ファミリー GTP 結合タンパク質の活性制御は不明であった。筆者らは、Rho ファミリー GTP 結合タンパク質の FRET バイオセンサーを安定発現するイヌ尿管上皮由来 MDCK 細胞を樹立し、これらの細胞が 3 次元ゲル内で腺管を形成したときの GTP 結合タンパク質の活性分を調べた。腺管を形成した MDCK 細胞では、腺管内腔面では Cdc42 の活性が高く、側底面では Rac1 の活性が高いことが分かった。二次元培養においては、Rac1 と Cdc42 の活性は同じ部位で高いことが多いが、三次元においては厳密にその活性が空間的に制御されていることが明らかとなった。

B）組織内での活性分布の可視化

FRET バイオセンサーを安定発現する脳腫瘍細胞をラット脳に接種すると、脳腫瘍組織における Rho ファミリー GTP 結合タンパク質の組織内での活性分布をも可視化することができる[15]。脳腫瘍は通常、血管周囲に浸潤しやがて脳実質内に浸潤していく。図 4c に示すように、脳腫瘍細胞が脳内実質に浸潤する先端部では Rac1 活性が高く、中心に近い部位では Rac1 活性が低いことが明らかとなった。この Rac1 活性が高い細胞を単離することで、もともとは均一であった脳腫瘍細胞のなかで実質組織に浸潤しやすい性質を有する細胞がどのような遺伝子発現パターンをとっているのかも調べることができる。

6. 今後の発展

現在の医学・生物学研究のトレンドは幹細胞研究に代表されるように、細胞集団の中の多様性の研究である。これは、細胞を集団として扱う生化学的研究手法がなかなか通じない研究領域であり、まさしく FRET バイオセンサーの出番といえる研究領域である。最近、FRET バイオセンサーを発現するトランスジェニックマウスも作出されるに至り[16]、細胞を抽出して解析するこれまでの研究手法から、FRET バイオセンサーに代表されるイメージングツールを使った研究手法が発展していくことが予感される。

［参考文献］

1) E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin, "FRET imaging", *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 1387-1395.
2) K. Kurokawa, A. Takaya, K. Terai, A. Fujioka and M. Matsuda, "Visualizing the signal transduction pathways in living cells with GFP-based FRET probes", *Acta Histochemica et Cytochemica*, **2004**, *34*, 347-355.
3) P. I. Bastiaens and A. Squire, "Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell", *Trends Cell Biol.*, **1999**, *9*, 48-52.
4) N. Mochizuki, S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki and M. Matsuda, "Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1", *Nature*, **2001**, *411*, 1065-1068.
5) K. Terai and M. Matsuda, "Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for MEK", *EMBO Rep.*, **2005**, *6*, 251-255.
6) N. Komatsu, K. Aoki, M. Yamada, H. Yukinaga, Y. Fujita, Y. Kamioka and M. Matsuda, "Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases", *Mol. Biol. Cell*, **2011**, *22*, 4647-4656.
7) A. W. Nguyen and P. S. Daugherty, "Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET", *Nat. Biotechnol.*, **2005**, *23*, 355-360.
8) T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa and A. Miyawaki, "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **2004**, *101*, 10554-10559.
9) J. Goedhart, L. van Weeren, M. A. Hink, N. O. Vischer, K. Jalink and T. W. Gadella, Jr., "Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening", *Nat. Methods*, **2010**, *7*, 137-139.
10) R. N. Day, C. F. Booker and A. Periasamy, "Characterization of an improved donor fluorescent protein for Forster resonance energy transfer

microscopy", *J. Biomed. Opt.*, **2008**, *13*, 031203.
11）M. Sato, T. Nakajima, M. Goto and Y. Umezawa, "Cell-based indicator to visualize picomolar dynamics of nitric oxide release from living cells", *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 8175-8182.
12）H. W. Ai, J. N. Henderson, S. J. Remington and R. E. Campbell, "Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging", *Biochem. J.*, **2006**, *400*, 531-540.
13）S. Yoshiki, R. Matsunaga-Udagawa, K. Aoki, Y. Kamioka, E. Kiyokawa and M. Matsuda, "Ras and calcium signaling pathwaysconverge at Raf1 via the Shoc2 scaffold protein", *Mol. Biol. Cell*, **2010**, *21*, 1088-1096.
14）Yagi, S., M. Matsuda and E. Kiyokawa, "Suppression of Rac1 activity at the apical membrane of MDCK cells is essential for cyst structure maintenance", *EMBO Rep.*, **2012**, *in press.*
15）E. Hirata, H. Yukinaga, Y. Kamioka, Y. Arakawa, S. Miyamoto, T. Okada, E. Sahai and M. Matsuda, "*In vivo* fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion", *JCS*, **2011**, *in press.*
16）Y. Yamaguchi, N. Shinotsuka, K. Nonomura, K. Takemoto, K. Kuida, H. Yosida and M. Miura, "Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure", *J. Cell Biol.*, **2011**, *195*, 1047-1060.

［著者プロフィール］

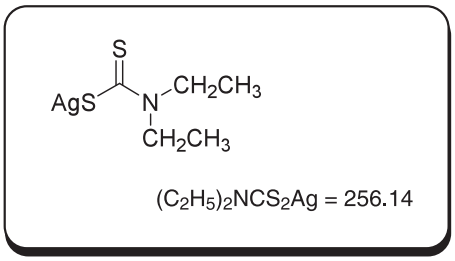
氏名：青木一洋
所属：京都大学生命科学研究科
住所：京都市左京区吉田近衛町
E-mail：k-aoki@lif.kyoto-u.ac.jp
細胞内シグナル伝達の動作原理を硬派に理解したいと考えていますが、日々苦戦中です。

氏名：松田道行
所属：京都大学生命科学研究科
住所：京都市左京区吉田近衛町
E-mail：matsudam@lif.kyoto-u.ac.jp
東京大学―ロックフェラー大学―国立感染症研究所―国立国際医療センター―大阪大学―京都大学と、いろんなところで「細胞のがん化を理解する」というテーマで研究してきました。現在は、がん化シグナルの生細胞での可視化をやっています。「死後の医学」のイメージが強い病理学を、Vivid Science にするべくがんばってます。

新製品

JIS K 9512 適合品　ヒ素分析用試薬

N,N - ジエチルジチオカルバミド酸銀



$(C_2H_5)_2NCS_2Ag$ = 256.14

N,N- ジエチルジチオカルバミド酸銀（AgDDTC）は AsH_3 と反応して、生成するコロイド状の銀が赤紫色を呈することより、微量ヒ素の定量試薬として使用されています。一般にはジエチルジチオカルバミン酸銀法（AgDDTC 法、AgDDC 法）と呼ばれています。

AgDDTC を溶かしたピリジン溶液に AsH_3 を含むガスを吹き込むと、溶液は AsH_3 と鋭敏に反応して赤紫色（λ_{max} = 520 ～ 540 nm）となります。AgDDTC は、ピリジン溶液でしか発色しませんでしたが、ブルシンを含むクロロホルムでも同様に発色することが分かり、ピリジンの悪臭を避けるため代替として普及しています（ただし、ブルシンは毒性が非常に強いため、取扱に十分注意が必要です）。

AgDDTC による As の比色定量法の原理は、硫酸酸性中で還元されて試料から発生する AsH_3 と *N,N*- ジエチルジチオカルバミド酸銀との反応にもとづいています。試料中の As をいかにして完全に AsH_3 とし、AgDDTC 溶液に吸収させるかが重要となります。なお、AgDDTC による比色定量には必ず AsH_3 ガスの発生装置とその捕集装置が必要です。

AgDDTC を使用したヒ素の測定は、JIS や日本薬局法、食品衛生法で採用されていますが、JIS 規格に適合した試薬はなく、各方面から規格化試薬が求められていました。そこで、小社では JIS K 9512 適合品として新たに規格化を行い、発売を開始いたしました。

※本製品は、JIS K 9512 適合品です。

応用可能な金属　比色試薬として As, Sb
比色条件　As（ピリジン中 540 nm, 4 ～ 12 ppm）

品名	容量	希望納入価格(¥)	コード	メーカーコード
N,N- ジエチルジチオカルバミド酸銀				
	1 g	2,600	340-09073	JS01
	5 g	5,800	344-09071	JS01

「蛍光生物学」の最前線
5-2
免疫応答におけるリンパ球分化と細胞移動の関係をイメージングで探る

森山　彩野[1,2]、北野　正寛[1]、岡田　峰陽[1]
[1] 理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫細胞動態研究ユニット
[2] 大阪大学大学院生命機能研究科

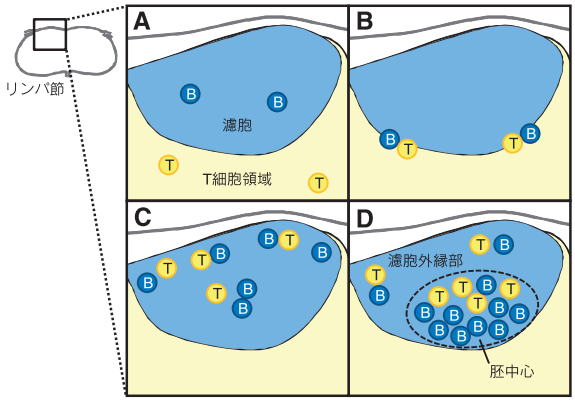


図 1　免疫応答初期の B 細胞とヘルパー T 細胞の動態の模式図
胚中心形成に至るまでのリンパ節内での B 細胞とヘルパー T 細胞の動態を表した。抗原投与前、B 細胞とヘルパー T 細胞は別々に局在しているが（A）、抗原で活性化されると濾胞と T 細胞領域の境界に集まり（B）、そののち濾胞外縁部に局在し（C）、最終的に胚中心が形成される（D）。

はじめに

病原体などに感染すると我々の体内では免疫システムが活性化し、抗体が産生されて抗原が体内から排除される。また、一度目の免疫反応中に活性化したリンパ球の一部が長寿命性を獲得して次の感染に備えているため、二度目以降の抗原侵入時には以前よりも速やかに免疫反応が起きる。これは「免疫記憶」と呼ばれワクチン療法などに応用されているが、その形成メカニズムは未だ不明な点が多い。筆者らの研究グループでは、B 細胞とその反応を補助する濾胞ヘルパー T 細胞に注目し、抗体産生や免疫記憶形成メカニズムの解明を目指して研究を行ってきた。蛍光レポーターマウスの作製とイメージング、その他の免疫学的手法を組み合わせた解析を行うことで、免疫応答中の B 細胞分化制御因子の発現により B 細胞の移動が制御されその後の B 細胞応答に至ることが明らかになったため[1]、これらを実験手法と共に解説する。

1. 免疫反応初期のリンパ球の動き

抗原が侵入すると、二次リンパ組織であるリンパ節や脾臓で B 細胞やヘルパー T 細胞などが活性化し胚中心と呼ばれる微小構造が形成される。この中では胚中心反応が進行し、高性能な抗体の産生や免疫記憶の形成が行われる。まず、免疫反応が開始されてから胚中心が形成されるまでの B 細胞とヘルパー T 細胞の動きについて概説する。抗原侵入前、未感作の状態ではナイーブ B 細胞とナイーブ T 細胞はそれぞれ濾胞と T 細胞領域に分かれて存在している（図 1A）。抗原が侵入すると、抗原特異的受容体を持つ細胞がそれぞれの領域内で活性化して濾胞・T 細胞領域の境界に移動し、B 細胞と T 細胞の相互作用が観察される[2,3]（図 1B）。この後、それぞれの細胞はさらに活性化され、濾胞外縁部や濾胞間領域で観察されるようになる[4-7]（図 1C）。この際、一部の細胞は濾胞の中心部分にも観察される。最終的には濾胞内に胚中心が形成され、この中には胚中心 B 細胞と濾胞ヘルパー T 細胞が見られる（図 1D）。また、濾胞ヘルパー T 細胞は胚中心だけではなくその周りの濾胞外縁部にも観察される。胚中心 B 細胞と濾胞ヘルパー T 細胞の分化には転写因子である B cell lymphoma 6（Bcl6）が必要であるが、この胚中心形成過程のいつどこで Bcl6 が発現するのか、また Bcl6 発現により B 細胞の動きが制御されるかどうかは不明であった。

2. Bcl6 タンパク質レポーターマウスの作製

Bcl6 は転写後も発現制御を受けるため、mRNA 発現とタンパク質発現がしばしば一致しない。さらに Bcl6 を検出するための良い抗体も最近まで存在しなかったことから、その詳細な発現動態は不明であった。これを解決するために筆者らは Bcl6 タンパク質のレポーターマウス（*Bcl6*^{yfp} マウス）を作製した。このマウスは、野生型 Bcl6 の代わりに Bcl6 の N 末端に黄色蛍光タンパク質（YFP）を融合させた YFP-Bcl6 を発現するため、Bcl6 タンパク質の発現を YFP シグナルにより追跡することが可能である（図 2A）。また、*Yfp-Bcl6* アリルをホモで持つ *Bcl6*$^{yfp/yfp}$ マウスを解析したところ Bcl6 欠損マウスよりマイルドではあるが B 細胞応答に異常がみられた。これは YFP-Bcl6 の機能が野生型 Bcl6 と比べて減弱しているためであると考えられる。このため、*Bcl6*$^{yfp/+}$ マウスを Bcl6 レポーターマウスとして使用し、*Bcl6*$^{yfp/yfp}$ マウスを Bcl6 機能減弱マウスとしてその後の解析に使用した。*Bcl6*$^{yfp/+}$ マウスにおける YFP-Bcl6 の発現量は野生型 Bcl6 タンパク質の発現量とほぼ同じであり、顕微鏡での観察に適した蛍光強度が得られなかったため、顕微鏡で YFP-Bcl6 を検出する際は抗 GFP 抗体を用いてシグナルの増幅を行っている。

Bcl6 タンパク質検出のツールとして、レポーターマウスに加えて Bcl6 に対する新たな抗体の販売も最近開始された。抗体は入手のしやすさや蛍光強度の点で利便性の高いツールであるが、抗体ではなくレポーターマウスを用いる利点としていくつかの点を挙げることができる。まず、生細胞の単離が可能であることである。転写因子である Bcl6 を抗体で検出するためには細胞の固定・膜浸透化が必要であるが、*Bcl6*^{yfp} マウスではこれらの操作が必要無いため、生細胞を Bcl6 発現で区別して単離し実験を行うことができる。また、抗体を用いた検出では細胞の活性化などにより抗体の非特異的結合が増加して正確な検出ができない場合があるが、このレポーターマウスは野生型 Bcl6 を持つマウスをコントロールとして使用することで、より正確な Bcl6 検出が可能であると考えられる。

3. Bcl6 タンパク質レポーターマウスによる Bcl6 発現の追跡

免疫反応中の B 細胞、ヘルパー T 細胞における Bcl6 発現を解析するため、このマウスと抗原特異的 BCR あるいは抗原特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウスを交配させ、*Bcl6*$^{yfp/+}$ 抗原特異的 B 細胞あるいは *Bcl6*$^{yfp/+}$ 抗原特異的ヘルパー T 細胞を得た。これらを B6 マウスに移植・皮下免疫してリンパ節内での反応をフローサイトメーターと組織染色により解析したところ、B 細胞での Bcl6 発現は胚中心が形成される前のプレ胚中心 B 細胞の段階（図 1C にあたる）で始まっており、この高い Bcl6 発現は胚中心 B 細胞でも維持されていた。ヘルパー T 細胞での発現はそれよりも早く、T 細胞領域にいる段階で Bcl6 発現が始まり、B 細胞との相互作用を経て発現の増強が見られた。意外なことに、分化後の濾胞ヘルパー T 細胞では胚中心の成熟に伴って Bcl6 発現の低下がみられた。この Bcl6 低発現濾胞ヘルパー T 細胞では長寿命性の獲得を強く示唆する変化が起きており、メモリー T 細胞への分化過程にある可能性が考えられる。

4. プレ胚中心 B 細胞での Bcl6 発現は胚中心への局在を制御する

組織学的な解析を行ったところ、Bcl6 機能減弱マウスである *Bcl6*$^{yfp/yfp}$ マウス由来の B 細胞は免疫後に活性化して濾胞外縁部へ局在するものの、胚中心 B 細胞へほとんど分化せず胚中心の形成が著しく阻害されていた。そこで、B 細胞における Bcl6 発現が細胞移動に与える影響を明らかにするために、野生型 B 細胞と *Bcl6*$^{yfp/yfp}$ B 細胞の免疫後の濾胞内での挙動を二光子ライブイメージングにより比較した。

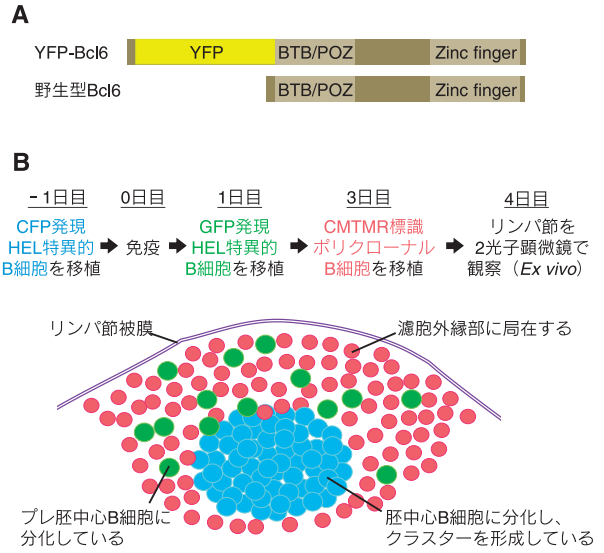


図 2　YFP-Bcl6 とプレ胚中心 B 細胞のライブイメージングの模式図
(A) YFP-Bcl6 と野生型 Bcl6 の模式図。
(B) ライブイメージング実験のタイムコースおよび観察時のリンパ節の模式図。このタイムコースで実験することで、胚中心クラスターとプレ胚中心 B 細胞の動きを観察することができる。

4.1　胚中心とプレ胚中心 B 細胞のイメージング

胚中心とその周りの濾胞外縁部の間には膜など物理的な障壁は存在しておらず、胚中心 B 細胞や濾胞 T 細胞などが誘引物質により濾胞中心へ引き寄せられて（あるいは外縁部からはじき出されて）できた集合体であると考えられている。この為、胚中心は胚中心 B 細胞とその周りの濾胞 B 細胞を観察することで区別できる[8]。実験方法の概略図を図 2B に示した。まず、シアン蛍光タンパク質（CFP）を恒常的に発現する β-actin-CFP マウスと、モデル抗原であるニワトリ卵白リゾチーム（HEL）に対する特異的 BCR を発現する MD4 マウスを交配させて、CFP を発現する MD4 マウスを作出した。このマウスから単離した CFP 発現 HEL 特異的 B 細胞を B6 マウスに移植、免疫すると、免疫後 4 日目には CFP 発現 B 細胞の多くが胚中心 B 細胞となりリンパ節濾胞内に胚中心クラスターが観察される。なお、反応の過程で B 細胞が活発に増殖するため、CFSE の様な生細胞蛍光染色色素の取り込みではなく、蛍光遺伝子を B 細胞に組み込むことで細胞を蛍光標識している。また、観察前日に B6 マウス由来の B 細胞をローダミン系生細胞蛍光色素である CMTMR で標識して移植した。こちらは HEL 抗原特異的 B 細胞がほとんど含まれないため活発な増殖や胚中心 B 細胞への分化は見られず、大部分が CMTMR 標識濾胞 B 細胞として胚中心の周りである濾胞外縁部に観察される。

さらに、プレ胚中心 B 細胞を同時に観察するため、別の蛍光色素を発現する抗原特異的 B 細胞を免疫の翌日に移植した。Bcl6 機能減弱型マウス（*Bcl6*$^{yfp/yfp}$ マウス）を MD4 マウス、恒常的に緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する Ubiquitin-GFP マウスと交配させたマウスから得た GFP 発現 HEL 特異的 Bcl6 機能減弱型

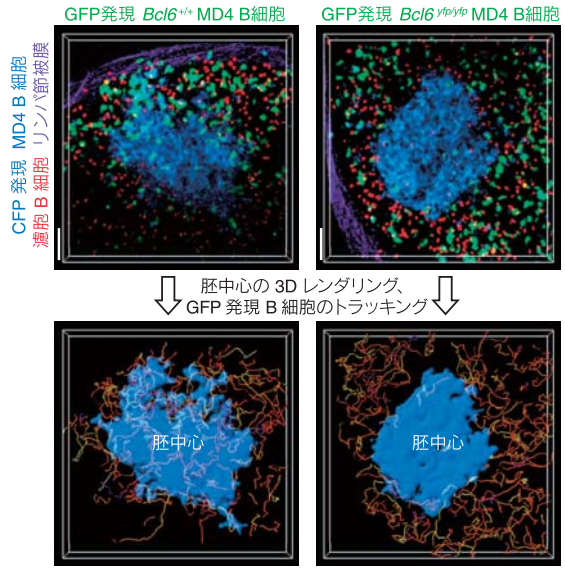


図 3　イメージング静止画像および 3D レンダリング、トラッキング後の画像
上部は図 2B で示したタイムコースで実験した時のイメージング静止画像、下部はその画像を基に胚中心と濾胞外縁部の境界を 3D レンダリングし、GFP 発現 B 細胞のトラッキングを行った画像である。レンダリングされた胚中心と濾胞外縁部の境界は半透明の青で、B 細胞のトラッキングはカラーバーで示した。*Bcl6*$^{+/+}$ B 細胞は濾胞外縁部から胚中心に入るものが多く観察されたが、*Bcl6*$^{yfp/yfp}$ B 細胞は胚中心に入るものは少なく、多くが濾胞外縁部に戻っていた。上部静止画像のスケールバーは 50 μm を表す。
［Kitano *et al. Immunity*, 2011 より改変[1]］

B 細胞と、コントロールとして GFP 発現 HEL 特異的 Bcl6 野生型 B 細胞をプレ胚中心 B 細胞のソースとして使用している。なお、GFP 発現 HEL 特異的 Bcl6 機能減弱型 B 細胞では GFP と YFP の両方が発現しているが、蛍光シグナルを二光子顕微鏡で検出するためには、バックグラウンドとの蛍光強度の差が十分にあることが必要であるため（フローサイトメトリー解析において、およそ 100 倍以上の差が必要である）、YFP-Bcl6 由来のシグナルは二光子顕微鏡では検出されず GFP 由来のシグナルのみ検出される。このように移植と免疫のタイミングを調整することで、分化段階の異なる細胞（今回は胚中心 B 細胞とプレ胚中心 B 細胞）を同時に観察することが可能となる（図 2B）[9]。

4.2　プレ胚中心 B 細胞のトラッキング

この実験系を用いて 1 時間のライブイメージングを *Ex vivo* で行い、プレ胚中心 B 細胞の濾胞内での挙動を観察した。さらに、観察画像データを基に解析ソフト Imaris の Surface 作成機能とトラッキング機能を組み合わせて胚中心表面の 3D レンダリングとプレ胚中心 B 細胞のトラッキングを行い、濾胞外縁部にいたプレ胚中心 B 細胞が胚中心に侵入するかを解析した[9]。図 3 に例を示すように、胚中心 B 細胞クラスターの CFP シグナルを基に胚中心と濾胞外縁部の境界面を経時的に 3D レンダリングし境界面に接触した GFP 発現プレ胚中心 B 細胞の行方を追跡したところ、Bcl6 機能減弱型の方が濾胞外縁部から胚中心内に移動する確率が低く、胚中心への侵入が抑制されていることが明らかになった。これらのことから、Bcl6 発現により分化だけでなく B 細胞の移動様式も制御され、胚中心形成に至ることが明らかになった（図 4）。

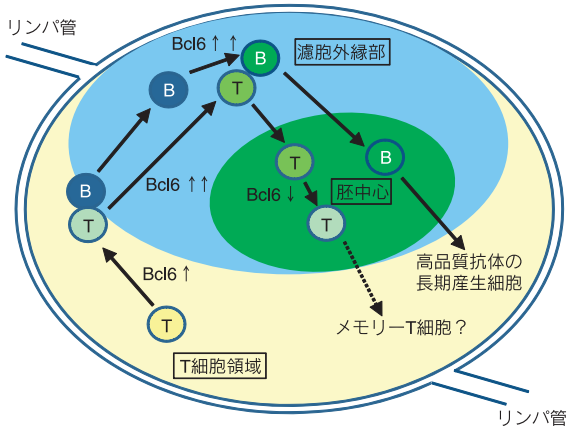


図 4　明らかになった、リンパ節の中における Bcl6 発現と B 細胞と T 細胞の動態の概要

5. おわりに

Bcl6 の新規レポーターマウスをフローサイトメトリー法や組織染色、二光子顕微鏡でのライブイメージングを組み合わせて解析することで、胚中心形成時の B 細胞分化と細胞移動の関係が明らかになった。同様のことは他のリンパ球分化でも起きている可能性が考えられる。例えば、濾胞ヘルパー T 細胞では分化後に Bcl6 発現低下が起きていたが、この Bcl6 低発現濾胞ヘルパー T 細胞では複数の局在制御因子の発現変化がみられており、局在を濾胞から T 細胞領域や血中へと変えてメモリー T 細胞として二度目以降の反応に備えている可能性が考えられる。今後、これらのイメージングを行うことで、免疫記憶形成メカニズムのさらなる解明に貢献していきたい。

［参考文献］

1）M. Kitano, et al.,“Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity”, *Immunity*, **2011**, *34* (6), 961-72.
2）K. Reif, et al., “Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position”, *Nature*, **2002**, *416* (6876), 94-9.
3）T. Okada, et al.,“Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells”, *PLoS Biol.*, **2005**. *3* (6), e150.
4）N. M. Haynes, et al., “Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1 high germinal center-associated subpopulation”, *J. Immunol.*, **2007**, *179* (8), 5099-108.
5）D. Gatto, et al.,“Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses”, *Immunity*, **2009**, *31* (2), 259-69.
6）J. P. Pereira, et al.,“EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle”, *Nature*, **2009**, *460* (7259), 1122-6.
7）L. M. Kelly, et al.,“EBI2 guides serial movements of activated B cells and ligand activity is detectable in lymphoid and nonlymphoid tissues”, *J. Immunol.*, **2011**, *187* (6), 3026-32.
8）C. D. Allen, et al., “Imaging of germinal center selection events during affinity maturation”, *Science*, **2007**, *315* (5811), 528-31.
9）M. Kitano and T. Okada, “Four-dimensional Tracking of Lymphocyte Migration and Interactions in Lymph Nodes by Two-photon Microscopy”, *Methods Enzymol.*, *in press*.

筆者プロフィール

氏　名：森山　彩野（Saya Moriyama）
連絡先：理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
　　免疫細胞動態ユニット　研修生
　　〒 230-0045　神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
電話：045-503-7073
Fax：045-503-7018
E-mail：moriyama@rcai.riken.jp

略　歴：
2007 年　　東京大学薬学部卒業
2009 年　　東京大学大学院薬学系研究科統合薬学専攻修士課程修了
2009 年～　大阪大学大学院生命機能研究科博士後期課程在学中
2009 年～ 2011 年　理化学研究所ジュニアリサーチアソシエイト
2011 年～　日本学術振興会特別研究員
研究テーマ：濾胞ヘルパー T 細胞による免疫制御、長期免疫記憶形成機構の解明

氏　名：北野　正寛（Masahiro Kitano）
連絡先：理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
免疫細胞動態ユニット　研究員
〒 230-0045　神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
電話：045-503-7073
F a x：045-503-7018
E-mail：kitano@rcai.riken.jp
略　歴：
2003 年　京都大学薬学部卒業
2005 年　京都大学大学院薬学研究科修士課程修了
2008 年　大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了
2008 年～ 2011 年　理化学研究所　基礎科学特別研究員
2011 年～ 理化学研究所　研究員

氏　名：岡田　峰陽（Takaharu Okada）
連絡先：理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター
免疫細胞動態ユニット　ユニットリーダー
〒 230-0045　神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
電話：045-503-7026
F a x：045-503-7018
E-mail：tokada@rcai.riken.jp
略　歴：
1994 年　京都大学工学部高分子化学科卒業
1996 年　京都大学工学研究科合成・生物化学専攻修士課程修了
1999 年　総合研究大学院大学生命科学研究科博士後期課程修了（学術博士）
1999 年～ 2002 年　日本学術振興会特別研究員 PD（生理学研究所および関西医科大学）
2001 年～ 2007 年　カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員
2002 年～ 2004 年　日本学術振興会海外特別研究員
2007 年～ 2008 年　京都大学工学研究科科学技術振興准教授
2008 年～　理化学研究所　免疫細胞動態研究ユニット　ユニットリーダー
2011 年～　科学技術振興機構さきがけ研究者（兼任）

試作品

近赤外蛍光色素標識試薬

ICG-maleimide

ICG（Indocyanine Green）は肝機能検査のための色素負荷試験にも用いられているシアニン色素で、近赤外領域に蛍光を持ちます。励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、生体内で用いた場合でも、ヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性を有しています。小社では、抗体やタンパク質のアミノ基を介して ICG を標識する ICG Labeling Kit - NH_2（同仁コード：LK31）を販売しておりますが、この度、基標識用として ICG のマレイミドタイプを開発いたしました。本試薬は、その構造内にマレイミド基を有しているため、SH 基を介して部位特異的に ICG を標識することができます。

本試薬は、近赤外蛍光を用いた *in vivo* イメージングへの応用が期待できます。

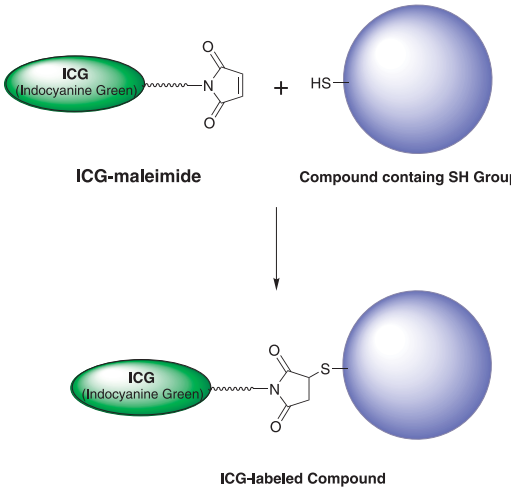


Fig. 1　ICG-maleimide の構造

［参考文献］
1）M. Ogawa, C. A. S. Regino, J. Seidel, M. V. Green, W. Xi, M. Williams, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, "Dual-Modality Molecular Imaging Using Antibodies Labeled with Activatable Fluorescence and a Radionuclide for Specific and Quantitative Targeted Cancer Detection", *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20* (11), 2177.
2）M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, "*In vivo* Molecular Imaging of Cancer with a Quenching Near-Infrared Fluorescent Probe Using Conjuates of Monoclonal Antibodies and Indocyanine Green", *Cancer Res.*, **2009**, *69* (4), 1268.
3）N. Kosaka, M. Ogawa, P. L. Choyke and H. Kobayashi, "Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer", *Future Oncology*, **2009**, *5* (9), 1501.

Topics on Chemistry

新規近赤外蛍光プローブを用いた細胞内カルシウムイオンのマルチカラーイメージング

株式会社同仁化学研究所　田中　智也

カルシウムイオン（Ca^{2+}）は細胞内で情報伝達物質として働き、生命活動を維持する重要なイオンの一つである。細胞内の Ca^{2+} 濃度は細胞外から様々な刺激を受けることで上昇し、これが引き金となり、次の標的分子に作用する。その結果、神経伝達、筋収縮、内／外分泌系、免疫応答、アポトーシスなど多くの生理作用に関与することが分かっている。このように細胞内 Ca^{2+} の挙動を知ることは生理現象解明につながることから、細胞内の Ca^{2+} の分布・挙動は研究の対象として注目され続けている。しかし、その一方で長い間、細胞内での Ca^{2+} の挙動には不明な点が多く残されていた。これを打破するきっかけとなったのが、1980 年代に Tsien らによって開発された Ca^{2+} 選択的蛍光プローブ Quin 2（Fig. 1）である[1]。この蛍光色素の登場により、細胞内の Ca^{2+} の動態や情報伝達物質としての役割の解明に関する研究は大きく進歩したといえる。

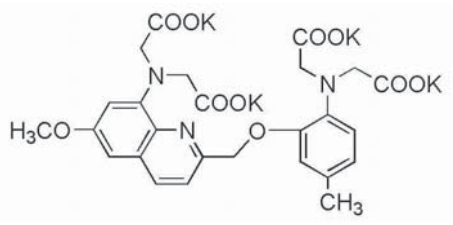


Fig. 1　Quin 2 の構造

Quin 2 のような Ca^{2+} 選択的蛍光プローブは、Ca^{2+} を選択的に認識する Ca^{2+} キレート部位と蛍光性色素部位の 2 つから構成されており、Ca^{2+} 非存在下では PET（photoinduced electron transfer）効果により蛍光は消光状態にある。しかし、Ca^{2+} プローブは一度細胞内に取り込まれると、キレート部位が Ca^{2+} と錯体を形成し、PET 効果の遮断により、強い蛍光を発する（Fig. 2）。この蛍光強度の変化はカルシウム濃度依存的に起こるため、細胞内の蛍光強度を観察することで細胞内の Ca^{2+} の動態を視覚的に知ることができる。現在までに Ca^{2+} 蛍光プローブは蛍光特性、カルシウムイオン解離定数、蛍光安定性等、様々な改良が加えられ、Quin 2 の他に、キレート部位として BAPTA 構造を有する Fura 2、Indo 1、Fluo 3、Fluo 4 などが開発されてきた。

しかしながら、現在までに開発された Ca^{2+} プローブの多くは可視蛍光色素を利用したものであり、近赤外（near-infrared: NIR: 650 ～ 900 nm）蛍光色素を利用した Ca^{2+} プローブについてはほとんど報告されていない。可視光線領域は血液中のヘモグロビンやその他の生体分子の吸収を大きく受け、生体透過性が低いという欠点がある。一方、近赤外線はそれらの吸収を受けず、生体透過性に優れていることから、生体組織の観察に有用とされている。さらに、近赤外蛍光色素は従来の可視蛍光色素と励起波長が異なるため、それらを併用することで細胞内の複数の因子を測定標的とした、細胞内の多重染色への応用が期待されている。これにより、Ca^{2+} 濃度の変化とそれに伴う他のイオンや分子の濃度変化を同一細胞内で同時にかつ経時的に観察することが可能になり、細胞内の分子やイオンの挙動をより詳細に知ることができる。

これまでに、Heptamethine cyanine-BAPTA[2] や Squaraine-BAPTA[3]（Fig. 3）のような近赤外色素を基本骨格とした Ca^{2+} プローブが報告されているが、それらの色素は量子収率が低く、蛍光 ON/OFF シグナル比が小さいという欠点がある。そのため、これらの NIR Ca^{2+} プローブを細胞内 Ca^{2+} イメージングに用いた例は報告されていない。

本稿では Suzuki らが開発した新規の NIR Ca^{2+} プローブ KFCA[4]（λ_{ex} = 655 nm、λ_{em} = 670 nm）を紹介する（Fig. 4）。KFCA はこれまで報告されている NIR Ca^{2+} プローブと同様に長波長であるだけでなく、1）量子収率が高い、2）蛍光 ON/OFF シグナル比も一般的に使用されている Fluo 4 などと同等、という利点がある。構造に関しては従来の可視蛍光色素と同様、蛍光色素部位とカルシウム結合部位（BAPTA）の 2 つの部位からなる。蛍光色素部位には BODIPY 骨格を持つ KFL-5 を用いている。KFL-5 は Suzuki らが開発を進めていた KFL ライブラリーの一つで[5, 6]、Cy5 とほとんど同じ吸収・蛍光スペクトルを持つことから、基本的な光学装置の使用が可能であり、汎用性に優れている。

BAPTA と KFL-5 との組み合わせにより、電子密度の高いキレート部位から蛍光色素部位への PET 効果も期待できる。つまり、KFCA は Ca^{2+} 非存在下では PET 効果により蛍光色素は消光した状態となっているが、Ca^{2+} と結合することで BAPTA 部位の電子ドナーとしての能力が弱くなり、Ca^{2+} 非存在下に比べて 120 倍の強い蛍光を発する。この蛍光 ON/OFF シグナル比は Fluo 4 のそれと

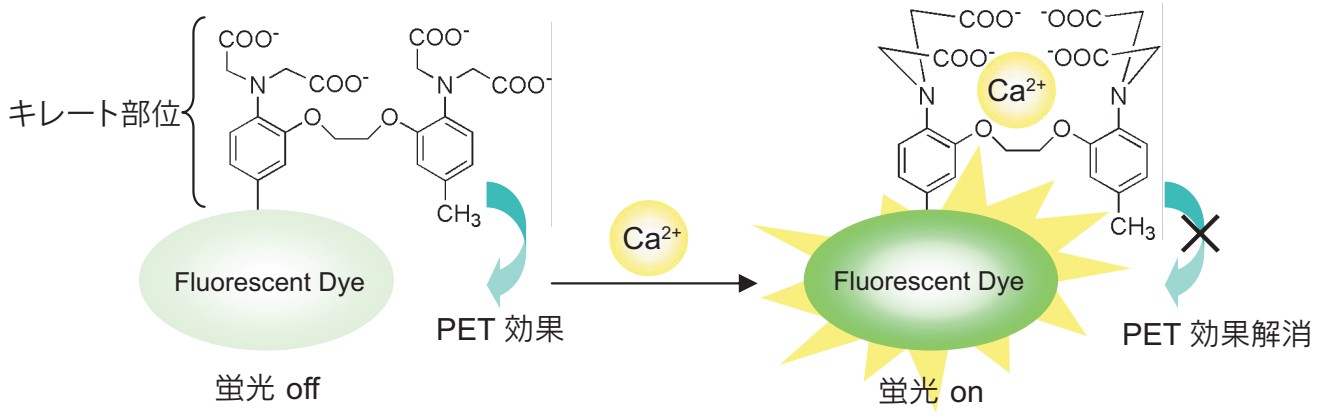


Fig. 2　Ca^{2+} 選択的蛍光プローブの蛍光メカニズム

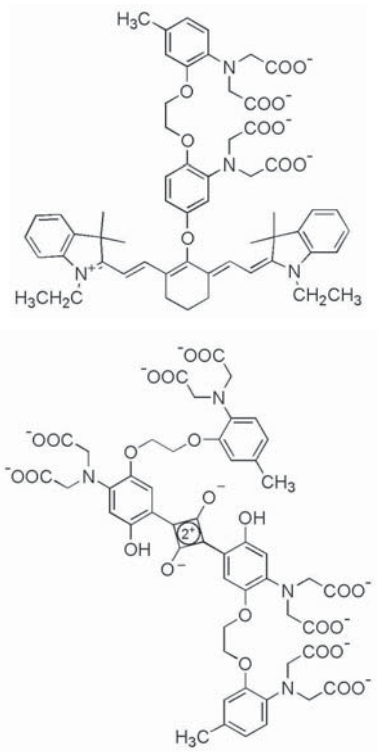


Fig. 3　Heptamethine cyanine-BAPTA（上）と Squaraine-BAPTA（下）の構造

同等であり、Cyanine プローブ（4 倍以下）、Squaranine プローブ（3 倍）と比べて非常に高い。Ca^{2+} との親和性を示す K_d 値も 0.50 μM と Fluo 4（K_d = 0.35 μM）とほぼ同等であることから、KFCA は Ca^{2+} プローブとしての蛍光特性を十分に持っている。

次に、Suzuki らは KFCA の Ca^{2+} プローブとしての性能を評価する為に、HeLa 細胞を用いて Ca^{2+} のイメージングを行った。その際、細胞内の多重染色の可能性を確認するために、Ca^{2+} プローブとして一般的に使用されている緑色系の Fluo 4（λ_{ex} = 495 nm、λ_{em} = 518 nm）と蛍光タンパク質である赤色系の DsRed2（λ_{ex} = 558 nm、λ_{em} = 583 nm）を KFCA と一緒にそれぞれ同一の細胞内に取り込ませた（DsRed2 は形質転換の際のレポーター遺伝子として使用されている蛍光タンパク質）。その結果、Fluo 4 と KFCA を同時に取り込ませた細胞内において、励起波長と蛍光測定チャネルを変えることでそれぞれに由来する色を単独で観察することができた。蛍光タンパク質である DsRed2 との組み合わせにおいても、Fluo 4 と同様に、励起波長や蛍光測定チャネルを変えることで、同一細胞内でそれぞれの色を観察することができた。これらの結果は KFCA が従来の Ca^{2+} プローブである Fluo 4 と同様に細胞

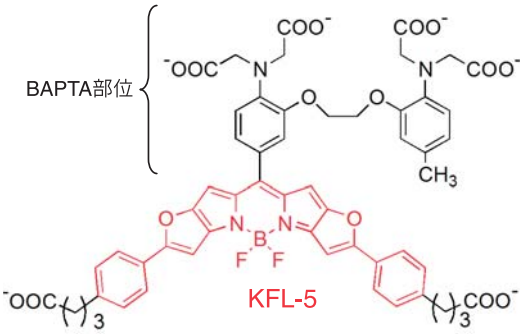


Fig. 4　KFCA の構造

内でも、その性能を十分に発揮していることを示しているだけでなく、励起・蛍光波長が Fluo 4、DsRed2 の様な可視蛍光プローブと異なるため、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化とそれに伴うその他の生体因子の濃度分布を同時にイメージングすることが可能であることを示している。

さらに、Suzuki らは KFCA と Fluo 4 を同一 HeLa 細胞内に取り込ませた際に ATP 添加による Ca^{2+} 濃度の経時的変化の観察も行った。その結果、細胞内において KFCA の時間変化に対する蛍光強度の変化は Fluo 4 と同等の挙動を示したことから、Ca^{2+} 濃度の経時的変化の観察にも使用できると考えられる。

以上の結果より、KFCA は従来の Ca^{2+} プローブと同等の性能を持つだけでなく、Ca^{2+} 以外の可視領域蛍光プローブ等と併用することで、複数のイオンまたは分子を標的とした Ca^{2+} の経時的変化の観察への利用が期待される。さらに、KFCA 自体の認識部位を変えることでその他のイオンや活性酸素（reactive oxygen species: ROS）などの生体分子の多重染色にも応用可能であると考える。

細胞内の応答制御機構を解明するには、複数のイオンまたは分子の挙動を全体的に捉えることが不可欠であり、今後はこのようなコンセプトに基づく蛍光色素の開発が重要になってくるのではないだろうか。

［参考文献］

1）R. Y. Tsien, *Biochemistry*, **1980**, *19*, 2396.
2）B. Ozmen and E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 9185.
3）E. U. Akkaya and S. Turkyilmaz, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 4513.
4）A. Matsui, K. Umezawa, Y. Shindo, T. Fujii, D. Citterio, K. Oka and K. Suzuki, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 10407.
5）K. Umezawa, Y. Nakamura, H. Makino, D. Citterio, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1550.
6）K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio, K. Suzuki, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 1096.

開発中

細胞内カルシウムイオン測定用試薬キット

Calcium Kit Ⅱ - iCellux

＜特長＞
- 薬剤低濃度領域のシグナル応答が向上（弊社 Calcium Kit Ⅱ - Fluo 4 比較）。
- プローブを添加した後の細胞洗浄は不要。
- Fluo 3 や Fluo 4 と同様の蛍光特性を有するプローブを使用。
- 96 well, 384 well の両方のマイクロプレートに対応。

＜キット内容＞
- Calcium Probe
- Dimethylsulfoxide
- Hanks' HEPES Buffer
- Quenching Buffer
- Probenecid Solution

本製品は、細胞内カルシウムイオン測定蛍光試薬と測定に必要なバッファー等を組み込んだキットです。溶液中のバックグラウンド蛍光を消光するクエンチャーを用いることで、カルシウムプローブを細胞へ負荷した後の洗浄操作を行うことなく、細胞内カルシウム濃度変化を測定できます。洗浄操作が不要となるため、HEK293 細胞などの剥離しやすい細胞を使用する場合や、薬剤スクリーニングを行う場合に適しています。また、細胞種や添加する薬剤などに応じて、製品に付属した Probenecid（陰イオントランスポーター阻害剤）溶液を添加することが可能です。

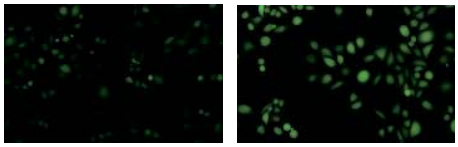
操作方法

1）クリアボトムの蛍光測定用マイクロプレートに細胞を播種する。
2）添付の Dimethylsulfoxide を用いて、Calcium Probe を溶解する。
3）Quenching Buffer に Hanks' HEPES Buffer、Probenecid、及び、Calcium Probe 溶液を加えて、Loading Buffer を調製する。
4）1）のプレートに培地と等量の Loading Buffer をそれぞれのウェルに加える。
5）37℃で 1 時間インキュベートする。
6）そのまま薬剤添加による蛍光強度変化を各種蛍光プレートリーダーで測定する。

注意事項

＊測定には、クリアボトムの蛍光測定用マイクロプレートと下方励起／下方蛍光測定が可能なマイクロプレートリーダーが必要になります。
＊製品仕様は一部変更になる可能性があります。ご了承ください。

＜測定例＞



CHO 細胞を ATP で刺激したときの蛍光画像
ATP 終濃度 : 31 nmol/L
左） Calcium Kit Ⅱ - Fluo 4
右） Calcium Kit Ⅱ - iCellux

ホームページアドレス
URL：http://www.dojindo.co.jp/
E-mail：info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548

DOJIN News No.142

ドージンニュース No.142　平成 24 年 4 月 5 日発行
株式会社同仁化学研究所　DOJINDO LABORATORIES
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒861-2202
発行責任者 吉田睦男　編集責任者　尾方亮子　年 4 回発行
許可なくコピーを禁ず