

シナプスモデル細胞の構築と
神経医薬 HTA システムに関する研究

平成 20 年 3 月
九州工業大学大学院生命体工学研究科

右田 聖

第1章 序論	4
1-1 はじめに	5
1-2 定質分析という考え方	6
1-3 創薬におけるハイスループット技術の必要性	8
1-4 バイオアッセイ	13
1-5 イオンチャネル創薬の現状	15
1-6 まとめ	19
参考文献	20
第2章 シナプスモデル細胞の構築と機能評価	23
2-1 はじめに	24
2-2 神経系医薬ターゲットとしての AMPA 受容体	25
2-3 機能評価	28
2-4 実験	29
2-3-1 COS7 細胞の培養	29
2-3-2 iGluR 遺伝子のベクターへの組み込み	29
2-3-3 iGluR 遺伝子の COS7 細胞への導入	32
2-3-4 iGluR の発現確認と表層提示確認	32
2-3-5 ナトリウムイオンの流入イメージングによる機能評価	33
2-5 GluR 発現と表層提示の確認	34
2-6 蛍光性イオン指示薬を用いたシナプスモデル細胞の機能評価	36
2-7 まとめ	39
参考文献	40
第3章 シナプスモデル細胞を用いた神経医薬 HTA システムの構築	43
3-1 はじめに	44

3-2 実験	46
3-2-1 Sf9 細胞の培養	46
3-2-2 昆虫細胞を宿主としたシナプスモデル細胞の構築	46
3-2-3 組み換えバクミドの構築	47
3-2-4 Sf9 細胞への導入	48
3-2-5 GluR の発現と表層提示の確認	48
3-2-7 細胞外電位測定	49
3-3 GluR 発現提示の確認と機能確認	51
3-4 細胞外電位を指標としたレセプター機能評価	55
3-5 まとめ	61
参考文献	62
第4章 細胞活性評価デバイスの構築	64
4-1 はじめに	65
4-2 情報伝達分子としての ATP	66
4-3 従前の細胞放出 ATP 検出法	68
4-4 イオン感受性電界効果トランジスタ (ISFET)	70
4-5 アピラーゼ膜を被覆した ISFET による ATP センサの構築	73
4-5-1 アピラーゼ	73
4-5-2 実験	73
4-5-3 ATP 標準溶液によるアピラーゼ被覆 ISFET の応答	74
4-6 人工酵素膜を被覆した ISFET による ATP センサの構築	80
4-6-1 人工酵素	80
4-6-2 実験	80
4-6-3 結果	81
4-7 まとめ	85

参考文献	86
第 5 章 結論	90
謝辭	94
研究業績一覽	96

第 1 章

序論

1-1 はじめに

生命現象を微視的にみると、その本質は膨大な数からなる生体分子間の相互作用に起因する現象であるということが出来る。例えば、遺伝子発現の調節は遺伝子そのものと調節因子との分子間相互作用によって営まれており、これが、生体内でのタンパク質合成を制御している。また、生体内でのエネルギー生成に関与している解糖系は生化学的に見ると連続的な酵素反応であり、これも基質分子と酵素との分子間の反応である。

生体分子間の相互作用は生体内でのさまざまな情報伝達も担っており、生体分子の放出挙動などを捉えることは「生命情報」を捉えることであるということが出来る。生命情報の獲得は我々の生活に大きく寄与する可能性を秘めている。例えば、疾患の原因や悪化に関する生命情報の獲得は医療・創薬など人々の健康の向上へ直結する。

本研究では化学物質、わけても創薬における薬剤候補物質の「質」を測ることを目的として、定質分析の考え方を基に、中枢系のバイオアッセイモデルであるシナプスモデル細胞の構築を行い、その細胞の中枢医薬 HTA システムへの応用を検討した。

本章では、薬剤開発の現状と創薬におけるハイスループット技術の必要性について論じ、本論文の位置づけを明らかにする。

まず次項で本研究のコンセプトである定質分析について詳しく述べる。

1-2 定質分析という考え方

薬剤の作用を分子レベルで見ると、それは薬剤と作用点との相互作用によって引き起こされる生体反応であると考えることができる。この薬剤の作用による生体反応を情報として外部に出力することができれば創薬における薬剤評価において大きなアドバンテージとなりえる。このような背景から本研究では物理的、化学的刺激が生体に与える影響の「質」を評価するという考え方である定質分析に着目した。定質分析とは、外部刺激が対象物に対して影響を与える場合、対象物は何らかの変化を示す。その対象物の変化を応答信号として捉えることで、外部刺激がどのような影響を与ええるのかを評価することができるというものである¹⁻³⁾。培養細胞、組織を生体モデルとして利用することで、この定質分析の概念に基づいた薬剤評価への応用が可能である。図1-1のように生体モデルが発信する分子信号を応答挙動としてモニタリングすることで、生体影響の質に関する情報を獲得することができる。そこで本論文では、定質分析の考え方に基づく分析技術として培養細胞が薬剤への応答として発信する分子的信号を詳細にセンシングすることで、生体へ与える薬剤の効果の「質」を評価する細胞バイオセンシングに関する研究を行った。

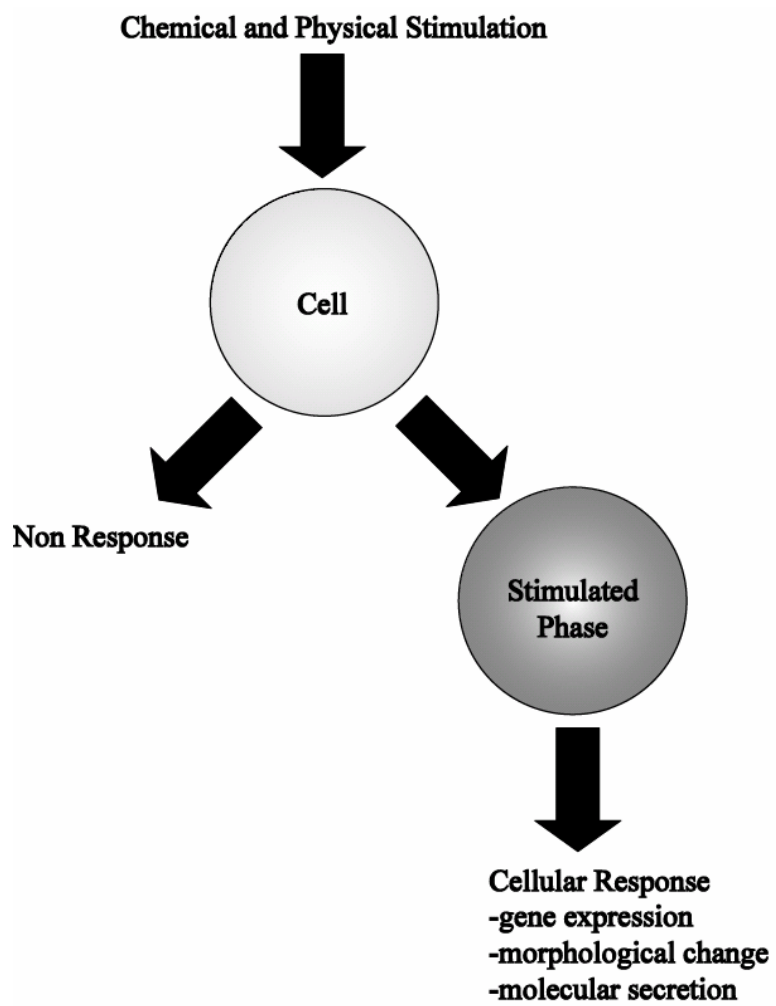


図 1 - 1 定質分析の概念図

1-3 創薬におけるハイスループット技術の必要性

薬剤開発の過程は大まかに、作用機序および毒性を評価する前臨床試験と、薬物動態や治療効果を評価する臨床試験に分けることができる(図1-2)。前臨床試験は、①標的分子の選定、分子デザイン、②候補物質(リード化合物)の発見、③前臨床試験などからなる。最初の方向付けである医薬ターゲットの選定は、疾病の分子メカニズムなどから、何を阻害するか、あるいは活性化するかなど、生体内のどの分子、どの反応に関わる化合物を見出すかという戦略立案であるといえることができる。現在ではゲノム創薬や分子シミュレーションマッチングなどコンピュータデータベースに基づく方法も行われている⁴⁾。リード化合物は「薬理活性のプロファイルが明らかであり、これを化学的に修飾することで活性の向上、毒性の減弱が期待できる新規化合物」と定義されており(日本製薬工業協会 <http://www.jpma.or.jp/>)、リード化合物の発見こそが、製品の成功を最も左右するプロセスとなるが、同時に確実な道筋が無いプロセスでもある。

薬剤の作用点は多くの場合、酵素や受容体といったタンパク質であり、薬剤はそれらのタンパク質との相互作用によりその機能を制御することで効果を示す。細胞は図1-3のようになっており、薬剤の作用点は以下のように分類できる。

- ① 受容体：ホルモンや神経伝達物質などが作用する
- ② 酵素：生体での様々な反応を触媒するタンパク質で細胞の内部に存在する場
合が多い。
- ③ 膜輸送タンパク質：細胞膜の内外で物質の輸送・運搬をしているタンパク質
で、細胞膜表層に存在する。イオンチャネルもここに含まれる
- ④ 核内受容体：細胞核にあって、遺伝子の転写調節などを担っている。

リード化合物として選定を行うには実際の効果、すなわち生化学的な評価が必要である。レセプターとの結合実験⁵⁾や、試験管内反応の阻害・活性化試験⁶⁾、あるいは培養細胞、組織の増殖試験⁷⁾などが多く行われている。これらは求めるターゲットのバイオアッセイモデル化実験ということができ、一次スクリーニングとして位置づけられる。バイオアッセイモデルを構築できない、あるいは十分な結果が得られない場合には一次スクリーニング段階から動物実験に依存することになる。しかし、動物実験によるスクリーニングは多くの手間と費用を要し、一次スクリーニングとしては適さない場合が多い。また、欧州の多くの国では、動物実験を規制する法律が制定されており、EU では化粧品検査において、2009 年までに一部を除く動物実験を全廃することが決定されている⁸⁾。このようなことから動物実験からヒト細胞、組織を用いたアッセイへのシフトが叫ばれている⁹⁻¹³⁾。こうした動物実験反対運動は世界中で展開しており、実験動物を用いた薬剤評価は今後ますます困難になると思われる。加えて、新薬の候補となる物質はコンビナトリアルケミストリーの導入により、さらに増大していくものと思われる。

このような背景から世界中の製薬企業ではリード化合物を見出すための分析やスクリーニングの手法として High throughput analysis (HTA) や High throughput screening (HTS) が実施されている¹⁴⁾。図 1-4 に米国における HTA/HTS の開発費用を薬剤の作用点ごとに分類した¹⁵⁾。これを見ると酵素および GPCR をターゲットとした薬剤の HTA/HTS への投資額が大きいことが見られる。また、開発費は 2000 億円と多額の費用を要しており、HTA/HTS がリード化合物を見出すための重要な手法であることがわかる。

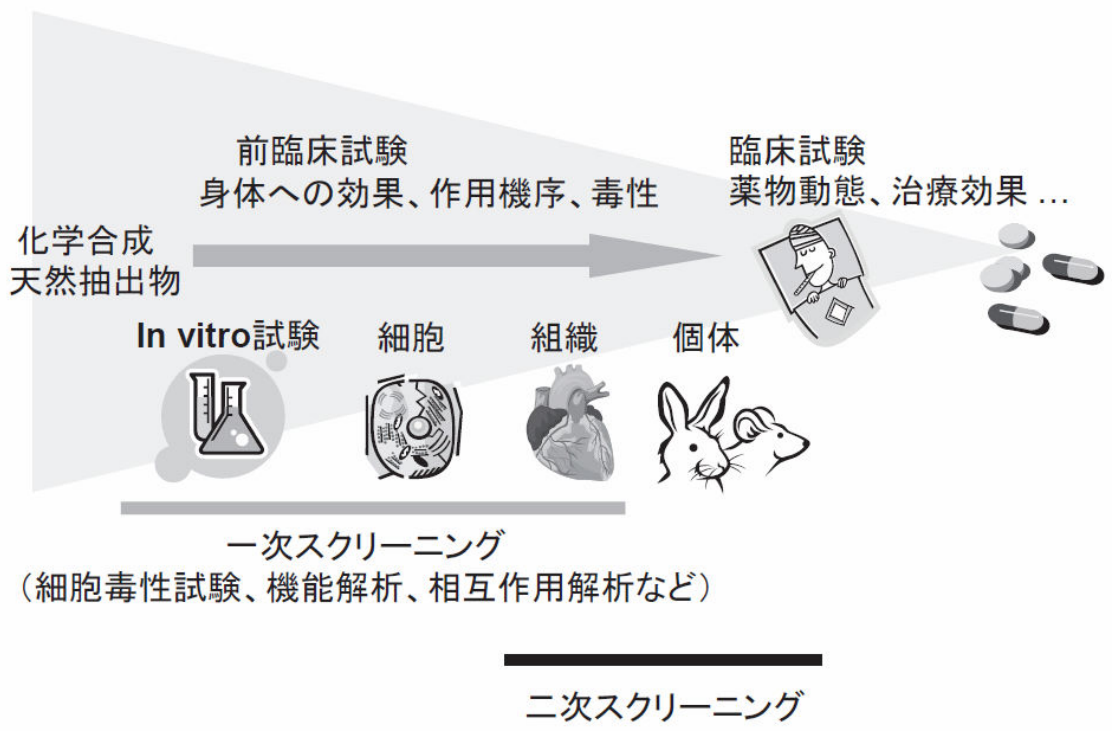


図 1 - 2 薬剤開発の流れ

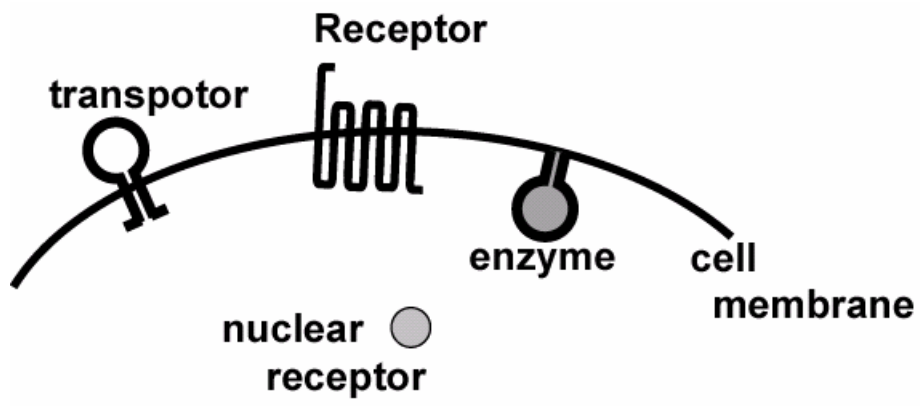


図 1 - 3 薬剤の作用点

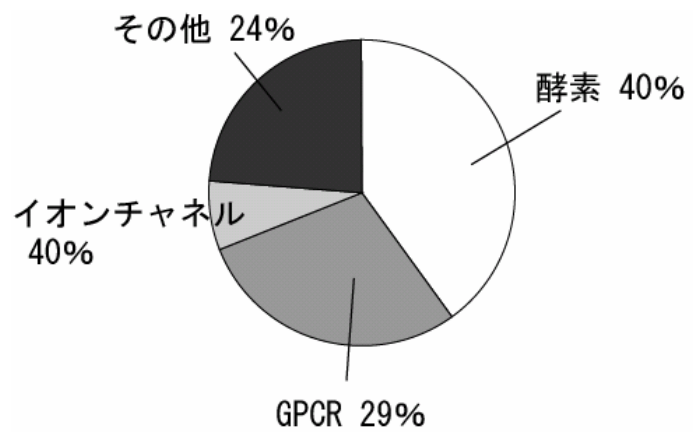


図 1 - 4 HTA/HTS の研究費

1-4 バイオアッセイ

医薬品等の開発における安全性試験や効果を評価するために動物実験や細胞アッセイをはじめとするバイオアッセイが行われている。そのバイオアッセイの中でも動物実験は重要な位置を占めているが、コスト・分析時間などの負担が非常に大きい。また、EU では 2009 年から 2013 年の間に動物実験により安全性評価を行った原料を含む化粧品の販売が禁止されることが決定しており、倫理的観点からも動物実験の全面的廃止という考え方が世界的に広がりつつある。そのような時代の趨勢の中で、生体への影響を評価する技術は *in vivo* から *in vitro* へシフトしつつあるといえる。培養細胞・培養組織を用いて *in vitro* で生体影響の評価を行う細胞バイオアッセイに寄せられる期待は大きい¹⁶⁾。

近年の細胞・組織工学は急速に発展しており、微生物からヒト細胞を含む哺乳類細胞まで種々の動物細胞の培養は非常に容易になってきている。培養細胞を用いた人工組織モデルの構築に関する研究も活発に進められている^{17, 18)}。また、培養細胞を生体モデルとしておこなう生体への影響の評価をハイスループット化するために、培養細胞をアレイ上に集積する細胞アレイ化技術なども報告されつつある^{19, 20)}。

一方で、培養細胞が外部刺激に対して発信する様々な分子的シグナルをモニタリングする計測技術に関する研究も活発に行われている。外部刺激に対して培養細胞が示す代謝、遺伝子発現、形態、バイアビリティの変化やシグナル分子の分泌・漏洩などは、外部刺激の生体影響を評価する上で重要な分子的信号として捕らえることができる。現在、生命情報を担う生体分子を *in vivo* で計測する場合、蛍光標識を用いて対象分子を可視化する蛍光プローブ法が汎用される²¹⁾。例えば、蛍光タンパク質である GFP などを遺伝子工学的に標識し、その動態をイメージングする研究が活発に行われている²²⁾。また近年、分子間の相互作用を解析する方法として FRET という現象を利用した研究が多数報告され

ている²³⁻²⁴⁾。さらに核酸に分類される DNA や RNA は遺伝情報をつかさどる重要な分子であるが、特に RNA が種々の生体機能を担うことが明らかになり、細胞内での RNA 挙動を計測する研究も報告されつつある²⁵⁾。これらの蛍光プローブ法が生命情報の獲得に大きく寄与していることは想像に難くない。

1-5 イオンチャネル創薬の現状

現在開発されている薬剤を作用点ごとにまとめたものが図1-5である²⁶⁾。これより受容体をターゲットとしている薬剤は全体の45%と最も多く、続いて酵素が約3割で、全体の7割超を占めていることがわかる。イオンチャネルを含む膜輸送タンパク質に作用する薬剤は全体の5%である。しかしながら、薬剤市場を見るとイオンチャネル薬に対する需要は大きいことがわかる。図1-6は2000年における薬剤売り上げ上位20品を作用点ごとに分類したものである²⁷⁾。これによるとイオンチャネル薬は22%を占めており、イオンチャネル薬の薬剤開発は消極的でありながらも需要は大きいということが考えられる。これらのことからイオンチャネル薬の開発は非常に手間のかかるプロセスであり新薬が創出されにくいのではないかと考えられる。

イオンチャネルの中でもイオンチャネル型レセプターは中枢系において薬剤開発のターゲット分子となっている。ヒトゲノム解読の結果からイオンチャネル型レセプターを含むイオンチャネルの遺伝子数は300~400種あると想定されており、レセプターやイオンチャネルタンパク質は新薬開発におけるリード化合物探索の標的としてその重要性が増してきている。

中枢医薬のスクリーニングに関する研究は、中枢系のバイオアッセイモデル化が困難であるため、主に膜画分として精製したイオンチャネル型レセプターと候補物質との結合を評価するというコンセプトで行われてきた。しかしながらこの結果から得られる情報はアフィニティの有無に関する情報であり、薬剤の作用に関する情報は得られない。そのため、薬剤に対する細胞応答を捉えるには一次スクリーニングの段階から動物実験に依存することになる。しかし前述したように、動物実験は一次スクリーニングとしては適さない場合が多い。このようなことから、動物実験に依らない中枢系バイオアッセイモデルの重要性は益々大きくなることが明らかである。近年では細胞培養技術や蛍光プロー

ブおよび顕微鏡技術の発達により、レセプター研究として培養細胞を用いて分化後のシナプス機能を評価できる方法はいくつか提示されてきている。しかし中枢系医薬の評価に関する high throughput 化はあまり進んでいないのが現状である。

そこで本研究ではシナプス機能のバイオアッセイモデル細胞としてシナプスモデル細胞を構築し、その機能評価と HTA システムへの応用を企図した。シナプス間情報伝達に関与するイオンチャネル型受容体の中でもイオンチャネル型グルタミン酸レセプターに着目した。グルタミン酸レセプターはイオンチャネル型と代謝共役型に分類され、記憶と学習、及び細胞死などに関与していることが報告されている。イオンチャネル型グルタミン酸レセプターは内因性アゴニストにより NMDA 型レセプター、AMPA 型レセプターおよびカイニン酸型レセプターの 3 種に分類される。この中でも神経伝達の最初期における膜電位の変化に関与している AMPA 型レセプターをモデルケースとして用いることにした。

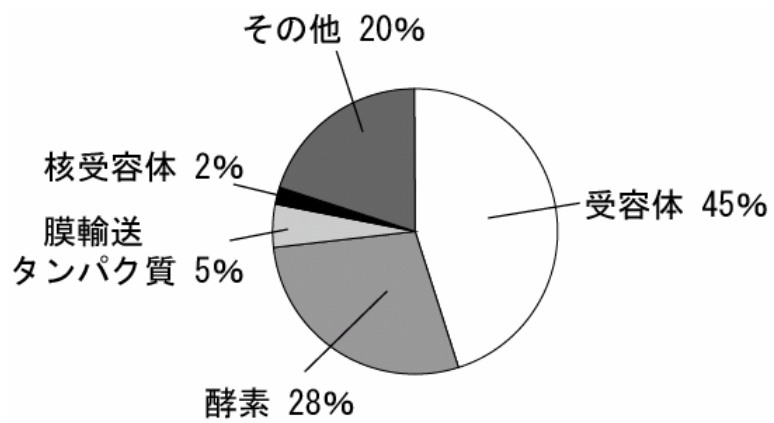


図 1 - 5 現在開発されている薬剤の作用点^{2,6)}

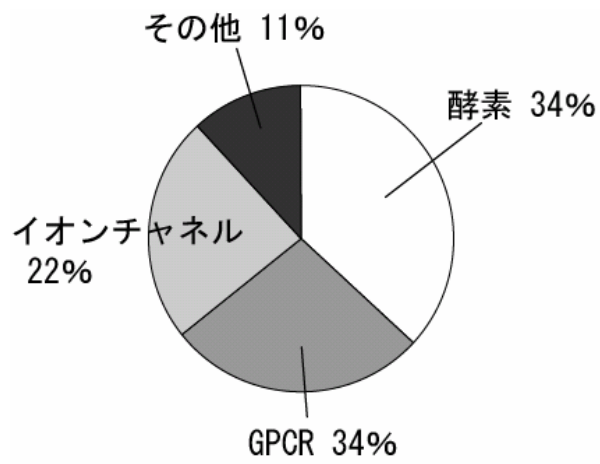


図1-6 2000年における売り上げ上位20品目中の作用点²⁷⁾

1-6 まとめ

これまでに述べてきたことから、イオンチャネル薬は需要が大きいにも関わらず、そのバイオアッセイモデル化が困難であるために HTA 化が進んでおらず新薬の創出が難しいという問題があることが明らかとなった。

そこで本論文では中枢系のバイオアッセイモデルとしてシナプスモデル細胞を構築し、その中枢医薬 HTA システムへの応用を目的とする。

本論文は本章を入れて 5 章より構成される。

第 2 章では、イオンチャネル型レセプター遺伝子を構築し、それを細胞に導入することによりイオンチャネル型レセプターを細胞表層に提示させることができることを示す。また、イオンチャネル型レセプター提示細胞がシナプス機能のモデルとして利用できることを示す。

第 3 章では、第 2 章で構築した細胞をシナプスモデル細胞として用いた薬剤評価 HTA システムの検討を行った。

第 4 章では、薬剤評価に用いる細胞の活性に着目し、細胞活性を評価するためのデバイス構築とその評価を行った。

第 5 章では、以上の研究成果を総括し、今後の展望について述べる。

参考文献

1. Haruyama T., Micro- and nanobiotechnology for biosensing cellular responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 393-401, 2003.
2. 春山哲也, レセプター機能評価技術とその意義, *新薬展望*, **42**, S-1, 249-257, 2006.
3. Haruyama T., Cellular biosensing: Chemical and genetic approaches, *Anal. Chim. Acta*, **568**, 211-216, 2006.
4. Davies, M. N. and Flower, D. R., Harnessing bioinformatics to discover new vaccines, *Drug Discov. Today*, **12**, 389-395, 2007
5. Fattori, D., Molecular recognition: the fragment approach in lead generation, *Drug Discov. Today*, **9**, 229-238 2004.
6. Whitebread, S., Hamon, J., Bojanic, D., and Urban, L., In vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development, *Drug Discov. Today*, **10**, 1421-1433, 2005
7. Luo, C., and Laaja, P., Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs, *Drug Discov. Today*, **9**, 268-275, 2004.
8. Abbot, A., CLOSE ENCOUNTERS, *Nature*, **438**, 144-146, 2005.
9. Bhogal, N., Grindon, C., Combes, R., Balls, M., Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies, *Trends Biotechnol.*, **23** 299-307, 2005
10. Cui, H. F., Ye, J. S., Chen, Y., Chong, S. C., Sheu, F. S., Microelectrode Array Biochip: Tool for In Vitro Drug Screening Based on the Detection of a Drug Effect on Dopamine Release from PC12 Cells, *Anal. Chem.*, **78**, 6347-6355, 2006.
11. Butcher, E. C. , Berg, E. L., Kunkel, E. J., Systems biology in drug discovery, *Nat. Biotechnol.*, **22**., 1253-1259, 2004.
12. Yu, N.C., Atienza, J.M., Bernard, J., Blanc, S., Zhu, J., Wang, X.B., Xu, X., Abassi,

- Y.A., Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors, *Anal. Chem.*, **78**, 35-43, 2006.
13. Wilson, G.S., Gifford, R., Biosensors for real-time in vivo measurements, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2388-2403, 2005.
 14. 三井郁雄, HTS からリード化合物はでるのか?, 日本薬理学雑誌, **129**, 281-285, 2007.
 15. Hopkins, A. L., Groom, C. R., The druggable genome, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **1**, 727-730, 2002.
 16. Michelini, E., Leskinen, P., Virta, M., Karp, M., Roda, A., A new recombinant cell-based bioluminescent assay for sensitive androgen-like compound detection *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2261-2267, 2005.
 17. Yin, L. H., Bien, H., Entcheva, E., Scaffold topography alters intracellular calcium dynamics in cultured cardiomyocyte networks, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, 1276-1285, 2004.
 18. Wu, G., Doberstein, S. K., HTS technologies in biopharmaceutical discovery *Drug Discov. Today*, **11**, 718-724, 2006.
 19. Yamamura, S., Kishi, H., Tokimitsu, Y., Kondo, S., Honda, R., Rao, S. R., Omori, M., Tamiya, E., Muraguchi, A., Single-Cell Microarray for Analyzing Cellular Response, *Anal. Chem.*, **77**, 8050-8056, 2005.
 20. Biran, I., Walt, D. R., Optical Imaging Fiber-Based Single Live Cell Arrays: A High-Density Cell Assay Platform, *Anal. Chem.*, **74**, 3046-3054, 2002.
 21. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y., The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function, *Science*, **312**, 217-224, 2006.
 22. Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., Tsien, R. Y., Creating new fluorescent

- probes for cell biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 906-918, 2002.
23. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, **388**, 882-887, 1997.
24. Gales, C., Rebois, R.V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T.E., Bouvier, M., Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells, *Nat. Method.*, **2**, 177-184, 2005.
25. Bratu, D. P., Cha, B. J., Mhlanga, M. M., Kramer, F. R., Tyagi, S., Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 13308-13313, 2003.
26. Drews, J., Drug discovery: a historical perspective., *Science*, **287**, 1960, 2000.
27. 吉田 卓史, 片山 統裕, 中谷 将也, 小島 正敏, 慈幸 秀保, 森 泰生, 竹谷 誠, ノイズ解析を用いた新しいハイスループット電気生理測定法, 日本薬理学雑誌, **126**, 335-340, 2005.

第 2 章

シナプスモデル細胞の構築と機能評価

2-1 はじめに

本研究の目的は、中枢系のバイオアッセイモデルとしてシナプスモデル細胞を構築し、それを利用した中枢医薬 HTA システムを開発することである。

本研究は、これまでのチャンネルゲートレセプターの研究とは異なり、細胞外電位測定法を用いることで、レセプター機能と同時に、それに起因する細胞単体の応答を **high-through-put** に検出するというものである。現在までのレセプター研究は、薬剤との結合を分子的に解析する方法であり、結合後に細胞で起こる応答反応までを評価することができない。薬剤評価に従来の電気生理学的手法を応用すれば、薬剤の結合後に細胞で起こる応答反応までを評価することは可能である。しかし、実験の再現性、準備・解析が煩雑であり、**high-through-put** が求められる薬剤スクリーニングには適さない。薬剤候補となる化学物質がさらに増大していくと思われる今後、簡便かつ迅速にチャンネルゲートレセプターの評価を行うことのできるシステムの開発が必要である。

次項では本研究でモデルケースとして用いたグルタミン酸レセプターについて詳しく述べる。

2-2 神経系医薬ターゲットとしての AMPA 受容体

グルタミン酸レセプターは中枢神経系に多く局在し、神経伝達以外にもシナプス可塑性¹⁾や記憶・学習²⁾、神経回路形成³⁾、などの脳の高次機能に関わる重要な分子である⁴⁾。チャネルゲートレセプターであるイオンチャネル型 (iGluR) と G タンパク質共役型レセプターである代謝調節型 (mGluR) の 2 種類に分類される⁵⁾。神経伝達初期の膜電位の発生に関わっているのは iGluR である。iGluR には、グルタミン酸以外にも選択的なアゴニストとして NMDA、AMPA、カイニン酸が知られており、それぞれ NMDA レセプター、AMPA レセプター、カイニン酸レセプターに分類される (図 2-1)。また、アンタゴニストとしては CNQX などの化学物質や既知の薬剤としてバルビツール酸などが上げられる。^{6,7)}

iGluR のうち、AMPA レセプターは 4 回膜貫通型のタンパク質で⁸⁾ (図 2-2)、神経の速い伝達を担っており、グルタミン酸の結合によって細胞内にナトリウムおよびカルシウムイオンを流入させる^{9, 10)}。

本研究では、神経伝達において主要な興奮性神経伝達を担っている AMPA 型グルタミン酸レセプターの D サブタイプを導入した細胞を構築し、薬剤評価への応用を検討した。

iGluR については基本的な構造と機能がほぼ解明されており¹¹⁾、前述したようにリガンドのグルタミン酸以外にも GluR に結合するアゴニストとアンタゴニストが発見されている。既知薬剤がいくつか決定されている点は、薬剤評価において重要な指標となり創薬の立場から見ても大きなアドバンテージが大きい。

本章では、クローニングしたイオンチャネル型グルタミン酸レセプター遺伝子 (iGluR) をアフリカミドリザル腎臓由来の COS7 細胞に導入し、GluR を細胞表層に提示した GluR 提示細胞の構築を行った。

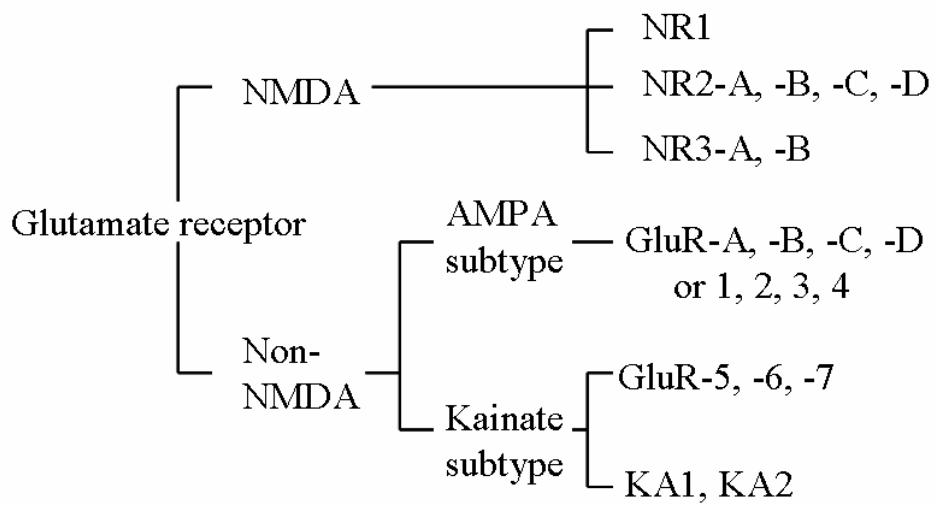


図 2-1 グルタミン酸レセプターの分類

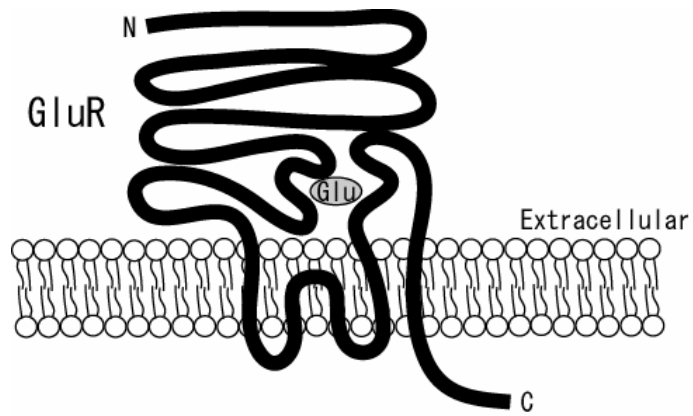


図 2-2 AMPA レセプターの構造

2-3 機能評価

イオン応答性蛍光色素である Quin4 がカルシウムイオンの蛍光指示薬として Tsien, R. Y. らによってはじめて開発された¹²⁾。その後、様々な改良がなされ、Fura-2¹³⁾ や Fluo-3¹⁴⁾ などが開発された。現在では、カルシウムイオン以外にもナトリウムイオン^{15, 16)}、カリウムイオン¹⁷⁾、塩化物イオン¹⁸⁾ など様々な生体内イオンの挙動をモニタリングするための蛍光色素が市販されている。

そこで本項では、前項で構築したシナプスモデル細胞の機能評価を行うためにイオン感受性蛍光指示薬を用いた評価を企図した。iGluR はグルタミン酸の結合により細胞内へのナトリウムイオンの流入を引き起こすことが知られているため、本研究ではナトリウムイオンの蛍光色素である SBFI (Invitrogen, Molecular Probes) を用いて、グルタミン酸刺激による細胞内のナトリウムイオン濃度変化を計測することにした。

SBFI は、その構造上にあるクラウンエーテルにより Na と結合する¹⁵⁾。このとき、外部からの励起光により蛍光現象を起こす（励起光 350-380nm に対し、510nm にピークを持つ蛍光）。使用には細胞に浸透する SBFI/AM を用い、細胞内へしみこませる。SBFI/AM は、SBFI のカルボキシル基をエステル化したもので、細胞膜を容易に透過するので、小さな細胞でも膜を傷つけることなく取り込ませることができる。

2-4 実験

2-3-1 COS7 細胞の培養

COS7 細胞は理研セルバンクから購入し、Dalbacco's Modified Eagle's Medium; DMEM (Invitrogen) に 10%FBS (大日本住友製薬) と 50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) を含む培地を用いて、27°Cで培養し、数日ごとに培地を交換した。

細胞は、0.05%トリプシン/EDTA 溶液 (ニチレイバイオサイエンス) で細胞を剥離させた後、800rpm で 5 分間遠心し、培地を吸引した後、細胞数 5×10^5 個になるように新しい培地を加え懸濁し、75ml のカルチャーフラスコ (BD Falcon) で培養した。

細胞の保存は 10%DMSO (Wako) を含む培地で 1×10^6 cells/ml の細胞懸濁液を作成し、-80°Cのディープフリーザで凍結保存した。凍結の際には、BICELL (日本フリーザ) を用いて温度を徐々に-80°Cまで低下させた。解凍の際には、37°Cの恒温槽で急速解凍し、培地で洗浄することで DMSO の除去を行い、75ml のカルチャーフラスコに播種した。

2-3-2 iGluR 遺伝子のベクターへの組み込み

クローニングした iGluR 遺伝子¹⁹⁻²¹⁾はフィンランド、ヘルシンキ大学の Kari Keinanen 教授より提供いただいた。この iGluR 遺伝子を制限酵素 NdeI と BamHI で処理し、pIRES-GFP ベクター (Clontech) に導入した (図 2-3)。このベクターは目的遺伝子と GFP を internal ribosome entry site (IRES) により繋いでおり、両者が同一プロモーター支配により等価で発現する仕組みになっている²²⁾。このため、iGluR の発現確認は細胞内の GFP 蛍光を観察することにより簡易的に行うことにした。

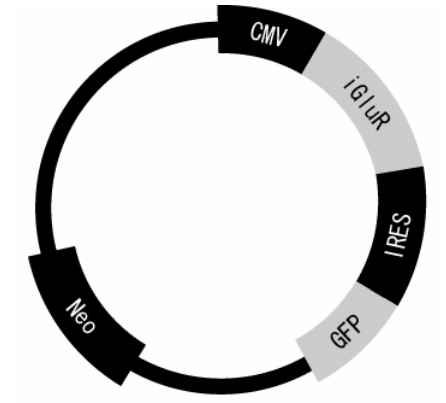


図 2-3 構築したベクター

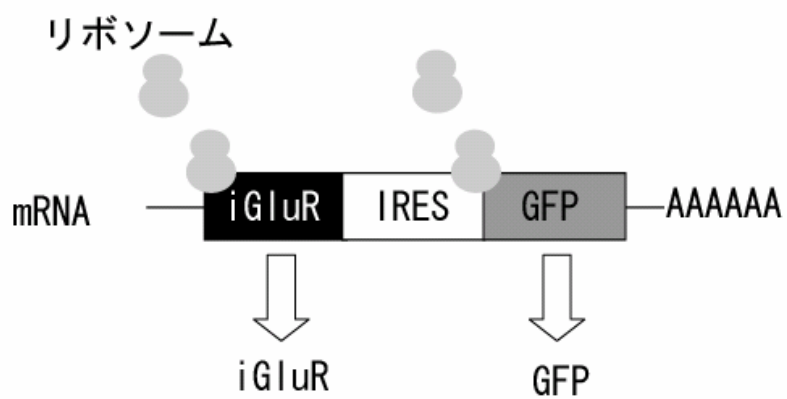


図 2-4 IRES を利用した共発現系

2-3-3 iGluR 遺伝子の COS7 細胞への導入

iGluR 遺伝子の導入はリポフェクション法により COS7 細胞へ導入した。遺伝子導入の前日に 6-well プレートに播種した。細胞がコンフルエントに達したのを確認して遺伝子導入を行った。1 μ g の DNA を 100 μ l の血清なし DMEM 培地に溶解した。次に 10 μ l のリポフェクトアミン (Invitrogen) を 100 μ l の血清なし DMEM 培地に溶解した。溶解した DNA とリポフェクトアミンを混合し、室温に静置した。40 分後、0.8ml の血清なし DMEM 培地を加え、全体を 1ml とした後、細胞に負荷した。細胞は 37°C で 24 時間培養した。その後、培地をジェネティシン (G418, Invitrogen) 血清入り DMEM 培地に変更し、薬剤による細胞のセレクションを行った。

2-3-4 iGluR の発現確認と表層提示確認

(i) GFP 蛍光を指標にした iGluR の発現確認

iGluR の発現確認は遺伝子工学的に共発現させた GFP の蛍光を観察することによって簡易的に行った。培養中の細胞から培地成分を除去し、HBSS 中での観察を行った。観察した B 励起フィルター (NIKON) を用いた。

(ii) 細胞免疫染色法による iGluR の細胞表層提示確認

COS7 細胞表層への GluR の提示を細胞免疫染色法で確認した。一次抗体には Anti FLAG Rabbit IgG (Affinity Bio Regents)、二次抗体には Rhodamine 標識された Anti Rabbit IgG (Affinity Bio Regents) を用いた。

前日に細胞をカバーグラスに播種し 37°C で一晩培養後、HBSS により培地成分を洗浄した。その後、3%ホルムアルデヒド溶液を用い、-20°C で 5 分間処理することにより細胞の固定を行った。ブロッキング剤として Super Block (Bio Rad) を用い、ブロッキング処理を 30 分間行った。HBSS で 3 回洗浄した後、一次抗

体反応を 30 分、洗浄、二次抗体反応 30 分、洗浄の順に行った。その後、蛍光顕微鏡 (Nikon) による観察を行った。

2-3-5 ナトリウムイオンの流入イメージングによる機能評価

構築したシナプスモデル細胞をガラスボトムディッシュに播種した。細胞の接着を確認して、5 μ M の SBFI/AM を加えた HBSS を細胞に負荷し、37°C でインキュベートすることで細胞内へ SBFI を導入した。3 時間培養後、細胞を洗浄し、HBSS に置換したあと測定を行った。

SBFI を 340nm と 380nm の励起光で励起した際の 510nm の蛍光を測定し、そのときの蛍光強度の比である 340/380 をモニタリングした。測定開始 120 秒後に薬剤を滴下し、その後の細胞内のナトリウムイオン濃度変化を計測した。

2-5 GluR 発現と表層提示の確認

前述したように GluR の発現量は遺伝子的に共発現させた GFP の蛍光量に相関する。この知見より GFP の蛍光を確認することで GluR の簡易的な発現確認を行った。図 2-5 に GFP 蛍光による発現確認と免疫染色による表層提示の確認結果を示している。GFP 蛍光は細胞ごとに異なる強度を示すことが見て取れる。これは細胞内での GluR の発現量も細胞ごとに異なっていることを意味する。GFP は導入した遺伝子のコピー数によって蛍光の強度が大きく変化することが報告されている^{2,3)}。このことから細胞ごとのばらつきは導入遺伝子のコピー数に依存していると考えられる。しかしながら、このばらつきは GFP の蛍光強度で補正することによって解決できると考えられる。

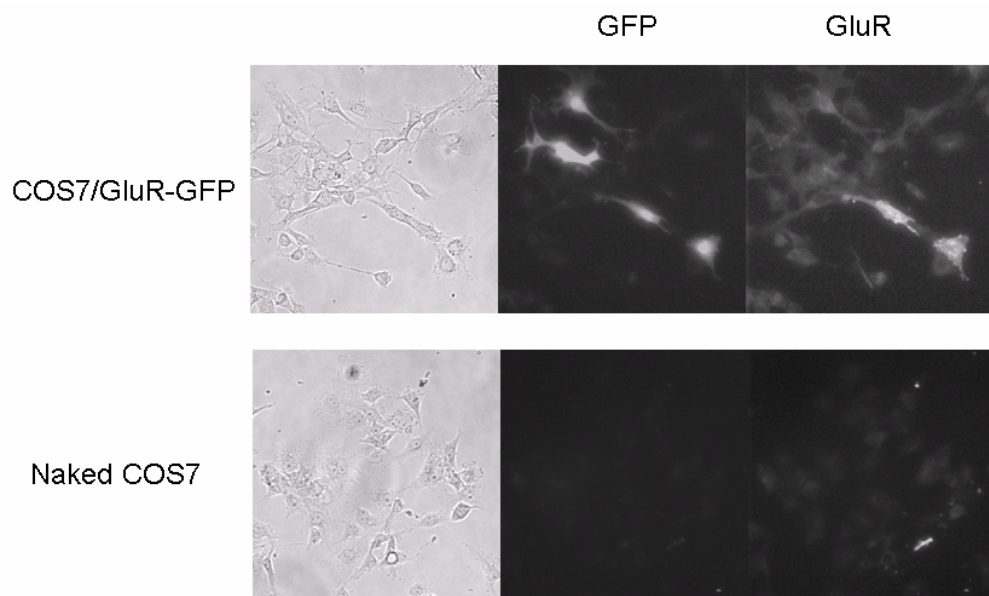


図 2 - 5 iGluR の発現と提示の確認

2-6 蛍光性イオン指示薬を用いたシナプスモデル細胞の機能評価

リガンドであるグルタミン酸を適用した際のシナプスモデル細胞の応答を図 2-6 に示す。ネガティブコントロールである COS7 細胞では細胞内ナトリウムイオン濃度に変化が見られなかったのに対し、iGluR 提示細胞では経時的な細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇が見られた。これはグルタミン酸が iGluR にリガンドすることにより、iGluR が開口し、細胞内へのナトリウムイオンの選択的な流入が見られたものと考察した。次に細胞内ナトリウムイオン濃度変化のグルタミン酸濃度依存性を図 2-7 に示す。グルタミン酸濃度に従って細胞応答が大きくなるという結果が見て取れる。さらにこの iGluR 提示細胞を用いた場合、グルタミン酸の EC50 が 0.1-1mM の間にあることが確認できる。電気生理学的測定などによって明らかにされている iGluR に対するグルタミン酸の EC50 は約 500 μ M であることから、iGluR 提示細胞のグルタミン酸に対する応答は iGluR のグルタミン酸に対する薬理学的特性との一致が示唆される。

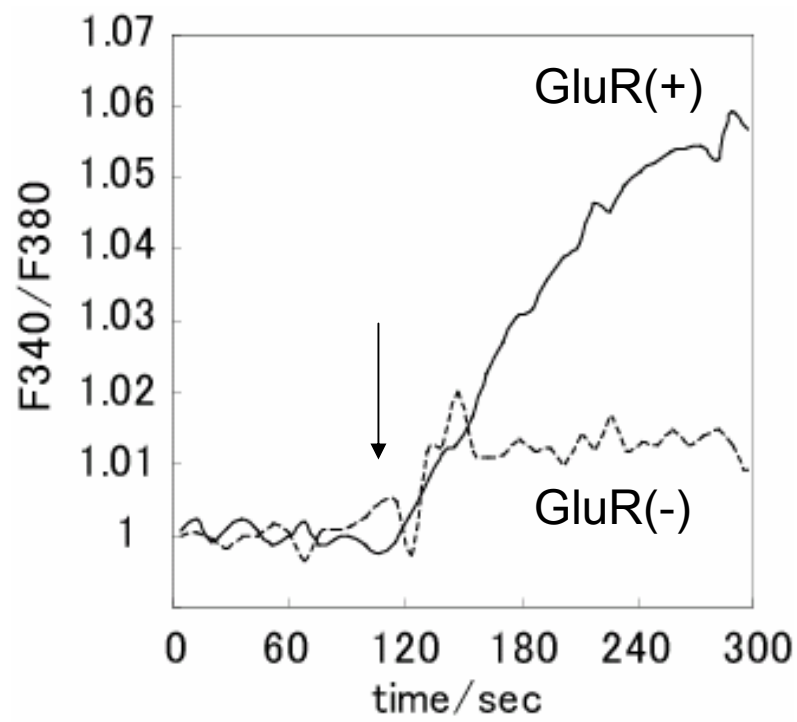


図 2-6 グルタミン酸適用による細胞内 Na 濃度の経時変化

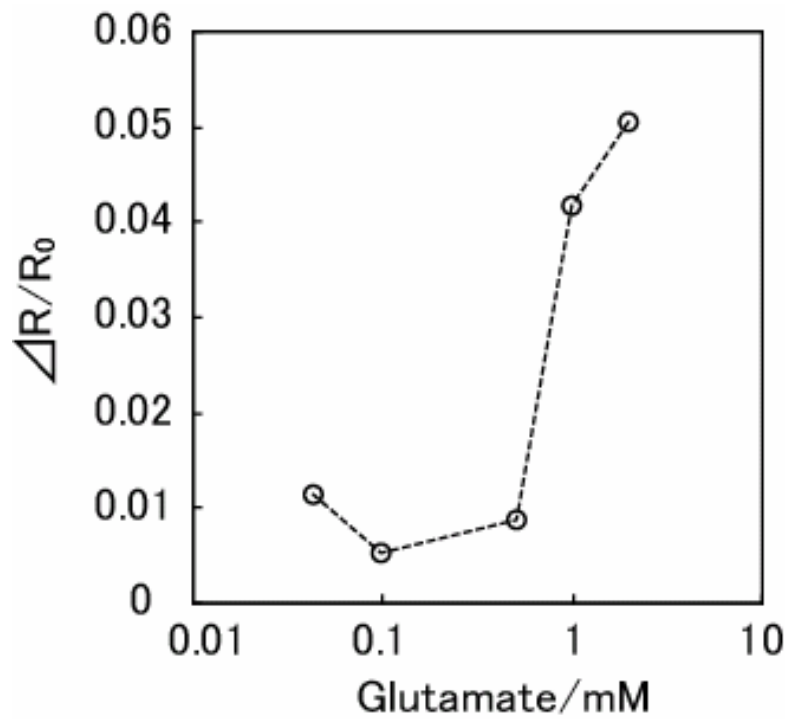


図 2-7 細胞応答のグルタミン酸濃度依存性

2-7 まとめ

本章では、ラット小脳より単離した iGluR を培養容易な異種細胞である COS7 細胞表層に提示させた細胞を構築し、機能を保持しているかどうかの評価を行った。COS7 細胞へ導入した iGluR は細胞膜表層に提示されることが示された。また、共発現させた GFP の蛍光から簡易的な発現確認も可能であることが示唆された。さらにリガンドであるグルタミン酸の適用により iGluR 提示細胞は細胞内へのナトリウムイオンの流入が認められた。その応答は iGluR に対するグルタミン酸の薬理学的特性とも一致していることが示唆された。これらのことから異種細胞表層に提示された iGluR は機能を保持したまま細胞表層に提示されており、iGluR 本来の機能であるグルタミン酸の受容による細胞内へのナトリウムイオンの流入という機能を示すと結論した。次章ではこの iGluR 提示細胞を“シナプスモデル”細胞としてシナプス機能のバイオアッセイを行う。

参考文献

1. Hayashi, M. L., Choi, S. Y., Rao, B. S., Jung, H. Y., Lee, H. K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A., Tonegawa, S., Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice, *Neuron*, **42**, 773-787, 2004.
2. Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K. M. M., Koster, H. J., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P. H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P. H., Sakmann, B., Importance of AMPA Receptors for Hippocampal Synaptic Plasticity But Not for Spatial Learning, *Science*, **284**, 1805-1811, 1999.
3. Funk, G. D., Smith, J. C., Feldman, J. L., Modulation of neural network activity in vitro by cyclothiazide, a drug that blocks desensitization of AMPA receptors, *J. Neurosci.*, **15**, 4046-4056, 1995.
4. Fomperts, N. S., Carroll, R., Malenka, C. R., Nicoll, A. R., Distinct Roles for Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptors in the Maturation of Excitatory Synapses, *J. Neurosci.*, **20**, 2229-2237, 2000.
5. Palmer, C. L., Cotton, L., Henley, J. M., The Molecular Pharmacology and Cell Biology of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptors *Pharmacol. Rev.*, **57**, 253-277, 2005.
6. Stromgaard, K., Mellor, I., AMPA Receptor Ligands: Synthetic and Pharmacological Studies of Polyamines and Polyamine Toxins, *Med. Res. Rev.*, **24**, 589-620, 2004.
7. Catarzi, D., Colotta, V., Varano, F., Competitive AMPA Receptor Antagonists, *Med. Res. Rev.*, **27**, 239-278, 2007.
8. Sheng, M., Lee, S. H., AMPA Receptor Trafficking and the Control of Synaptic

- Transmission, *Cell*, **105**, 825-828, 2001.
9. Mayer, M. L., Westbrook, G. L., *J. Physiol.*, **394**, 501-527, 1987.
 10. Jonas, P., Burnashev, N., Molecular Mechanisms Controlling Calcium Entry through AMPA-Type Glutamate Receptor Channels, *Neuron*, **15**, 987-990, 1995.
 11. Wollmuth, L. P., Sobolevsky, A. I., Structure and gating of the glutamate receptor ion channel, *Trends Neurosci*, **27**, 321-328, 2004.
 12. Tsien, R.Y., New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures, *Biochemistry*, **19**, 2396-2404, 1980.
 13. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y., A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450, 1985.
 14. Minta, A., Kao, J. P. Y., and Tsien, R. Y., Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores, *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178., 1989.
 15. Minta, A., and Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for cytosolic sodium, *J. Biol. Chem.* **264**, 19449-19457, 1989.
 16. Meier, S. D., Kovalchuk, Y., Rose, C. R., Properties of the new fluorescent Na⁺ indicator CoroNa Green: Comparison with SBFI and confocal Na⁺ imaging *J. Neurosci. Method.*, **155**, 251-259, 2006.
 17. Meuwis, K., Boens, N., Deschryver, F., C., Gallay, J., Vincent, M., Photophysics of the Fluorescent K⁺ Indicator PBFI, *Biophys. J.*, **68**, 2469-2473, 1995.
 18. Geddes, C. D., Apperson, K., Karolin, J., Birch, D. J. S., Chloride-Sensitive Fluorescent Indicators, *Anal. Biochem.*, **293**, 60-66, 2001.
 19. Sommer, B., Keinanen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A.,

- Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., Seeburg, P. H., Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS, *Science*, **249**, 1580-1585, 1990.
20. Pasternack, A., Coleman, S. K., Jouppila, A., Mottershead, D. G., Lindfors, M., Pasternack, M., Keinänen, K., α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor Channels Lacking the N-terminal Domain, *J. Biol. Chem.*, **277**, 49662-49667, 2002.
21. Coleman, S. K., Cai, C., Mottershead, D. G., Haapalahti, J. P., Keinänen, K., Surface Expression of GluR-D AMPA Receptor Is Dependent on an Interaction between Its C-Terminal Domain and a 4.1 Protein, *J. Neurosci.*, **23**, 798-806, 2003.
22. Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J. H., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., Wimmer, E., A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation, *J. Virol.*, **62**, 2636-2643, 1988.
23. Schindelhauer, D., and Laner, A., Visible transient expression of EGFP requires intranuclear injection of large copy numbers, *Gene Therapy*, **9**, 727-730, 2002.

第 3 章

シナプスモデル細胞を用いた 神経医薬 HTA システムの構築

3-1 はじめに

チャンネルゲートレセプターの評価を細胞を用いて行う場合、本来グルタミン酸レセプターを持っている神経細胞を用いることが考えられる。神経細胞でシナプスを形成させるには、神経芽細胞を培養後に神経成長因子 (NGF) などにより分化を促す必要がある。この分化した状態の神経細胞をパターンニングしようという研究が盛んに行われている¹⁻⁵⁾。現在までに、神経細胞の神経伝達物質に対する応答を検出するために、デバイスの形状、材質、電極の大きさなど電極側を改良に基づいた研究が行われている⁶⁻¹⁰⁾。しかしながら、分化した神経細胞は増殖能を失っていることや、分化した状態での長期的な培養も困難であることなどから、薬剤評価の HTA 化を目指す本研究には不向きであると考えられる。そこで、本研究では将来の薬剤評価 HTA を見据え、電極側の改変ではなく測定対象である細胞側の改変を試みた。

まず、イオンチャンネル型レセプター発現細胞の宿主を哺乳類細胞から昆虫細胞へ変更することにした。昆虫細胞は真核細胞であるため、発現したタンパク質は翻訳後の修飾を受け、哺乳類と同様の構造・機能を持ったタンパク質が得られる。また哺乳類細胞と比べて、高密度浮遊懸濁培養による大量培養が可能、CO₂ インキュベータが不要であるなど培養が容易であり、また培養皿から剥離させる際にプロテアーゼ処理を行う必要が無く、セルスクレーパーによって容易に剥離させることが出来るため、HTA システムへ適用する際には大きなメリットとなる。

チャンネルゲートレセプターを介した応答は、細胞表層に提示されているチャンネルゲートレセプターの数、膜電位、および細胞活性に依存すると考えられる。細胞側を遺伝子工学的に改変することにより、チャンネルゲートレセプターを多発現させることが可能となり、細胞応答の増幅を図れるのではないかと考えた。そこで本章では第2章で構築した CMV プロモーター発現系ではなく、昆虫細

胞を宿主としたポリヘドリンプロモーター発現系を利用することによりグルタミン酸レセプターのみを強制的に多発現させ細胞側の改変を試みた。ポリヘドリンプロモーター発現系はバキュロウイルスベクターのプロモーターである¹¹⁾。バキュロウイルスは昆虫に感染するウイルスでカイコ核多角体病ウイルスなどがその代表である。このシステムを用いることで細胞の全タンパク質の数十%にもおよぶ目的タンパク質を発現させることが可能である。

本章では、GluR を提示する一過性発現系細胞 (Sf9-GluR) を作成し、グルタミン酸刺激による Sf9-GluR の細胞外電位応答を測定する。

gluR 遺伝子を挿入したバキュロウイルスベクターを作成し、Sf9 細胞に導入した後、細胞表層への GluR の提示を確認する。そして、アレイ型マイクロ電極と細胞外電位測定法を用い、グルタミン酸刺激による細胞外電位の変化を測定する。ここでは、GluR 提示細胞を用いることにより、細胞外電位の変化を指標として、GluR の機能を測定できることを示す。

3-2 実験

3-2-1 Sf-9 細胞の培養

Sf-9 細胞は Invitrogen, GIBCO から購入し、Grace's Insect Cell Culture Medium (Invitrogen, GIBCO) に 10%FBS (ニチレイバイオサイエンス) と 50U/ml ペニシリン、50U/ml ストレプトマイシン (Invitrogen, GIBCO) を含む培地を用いて、27°C で培養し、数日ごとに培地を交換した。

細胞の継代は、セルスクレーパー (BD Falcon) で細胞を剥離させた後、800rpm で 5 分間遠心し、培地を吸引した後、細胞数 5×10^5 個になるように新しい培地を加え懸濁し、75ml のカルチャーボトル (BD Falcon) で培養した。

細胞の保存は 10%DMSO を含む培地で 1×10^6 cells/ml の細胞懸濁液を作成し、-80°C のディープフリーザで凍結保存した。凍結の際には、BICELL (日本フリーザ) を用いて温度を徐々に -80°C まで低下させた。回復の際には、37°C の恒温槽で急速解凍し、培地で洗浄することで DMSO の除去を行った。

3-2-2 昆虫細胞を宿主としたシナプスモデル細胞の構築

インサート DNA である *glia4* は Kari Keinanen 博士 (フィンランド大学) のご好意により提供していただいた。*glia4* を PCR によって増幅し、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 0.8%) によって確認した。PCR の条件は 1st サイクルでの変性を 94°C で 2 分、2nd サイクルでの変性を 94°C で 15 秒、アニーリングを 53°C で 30 秒、伸長を 68°C で 2 分を 30 回繰り返した。また、ラストサイクルで伸長を 68°C で 3 分とした。pFastBac ベクター (Invitrogen) の制限酵素処理を行うために、pFastBac を 10 μ l、10 \times H Buffer を 5 μ l、滅菌水を 14 μ l、BamHI を 0.5 μ l、NotI を 0.5 μ l をエッペンチューブに入れ、37°C で 60 分間反応させた。その後、エタノール沈殿を行い 10 μ l の滅菌水に溶解した。インサートである *gria4* の制限酵素処理も同様に、*gria4* を 30 μ l、10 \times H Buffer を 5 μ l、

滅菌水を 14 μ l、BamHI を 0.5 μ l、NotI を 0.5 μ l をエッペンチューブに入れ、37°C で 60 分間反応させた。その後、エタノール沈殿を行い 10 μ l の滅菌水に溶解した。制限酵素処理したベクターDNA とインサート DNA を用いてライゲーション反応を行った。0.5 μ l の pFastBac、4.5 μ l の gria4、5 μ l の Ligation High (TOYOBO) をエッペンチューブに加え、16°C で 1 時間反応させた。ライゲーション反応液 2 μ l を形質転換するために、50 μ l のコンピテントセル Nova Blue に加え、氷上で 40 分間放置した。その後、42°C で 90 秒間ヒートショックを行い、氷上で 5 分間急冷した後、LB (Amp) プレートに播種し、37°C で 18 時間培養した。単一コロニーを選び、1ml の LB 培地に植菌し、コロニーPCR 法によってインサートの有無を確認した

3-2-3 組み換えバクミドの構築

得られた pFastBac ベクターから、DH10Bac competent cell (Invitrogen) に GluR 遺伝子をトランスポジションにより導入した。

100 μ l の DH10Bac competent cell を 1 エッペンチューブに移し、5 μ l の pFastBac を加え、氷上で 30 分放置した。その後、42°C で 45 秒間ヒートショックを行い、900 μ l の S.O.C 培地 (Invitrogen) を加えた。これを 15ml チューブに移し、225rpm、37°C で 4 時間培養した。その後、50 μ g/ml のカナマイシン、7 μ g/ml のゲンタマイシン、10 μ g/ml のテトラサイクリン、100 μ g/ml の X-gal、40 μ g/ml の IPTG を含む LB プレートに播種し、37°C で 48 時間培養した。

ブルーホワイトアッセイによってホワイトコロニーを選び、50 μ g/ml のカナマイシン、7 μ g/ml のゲンタマイシン、10 μ g/ml のテトラサイクリンを含む 1ml の LB 培地にて、48 時間培養し、ミニプレップ法により DNA を抽出・精製した。得られた DNA をバクミド DNA とした。

3-2-4 Sf9 細胞への導入

バクミド DNA の Sf-9 細胞への導入にはリポフェクション法を用いた。

1 μ g のバクミド DNA を 100 μ l の Grace's Insect Cell Culture Medium に加えた。同様に 6 μ l の Cellfectin Reagent (Invitrogen) を 100 μ l の Grace's Insect Cell Culture Medium に加えた。両者を緩やかに混合し、45 分間、室温にて放置した後、0.8ml の Grace's Insect Cell Culture Medium を加え、Sf-9 細胞にローディングし、27 $^{\circ}$ C で 5 時間培養した。その後、Sf-9 細胞を Grace's Insect Cell Culture Medium で 2 回洗浄し、27 $^{\circ}$ C で 72 時間培養した。72 時間後、細胞から DNA を抽出し、PCR によって GluR の確認を行った。回収した培地をウイルス溶液として 4 $^{\circ}$ C で遮光保存した。

ウイルス感染は 4ml の Grace's Insect Cell Culture Medium と 1ml のウイルス溶液を混合し、培養中の Sf-9 細胞の培地と交換することで行った。インフェクション 3 日後の細胞を感染細胞として実験に使用した

3-2-5 GluR の発現と表層提示の確認

GluR の発現はウエスタンブロッティングにより確認した。細胞懸濁液をエッペンチューブに入れ、培地を除いた後、PBS で 2 回洗浄を行った。その後、0.1%Tween を添加した PBS によって細胞を懸濁し、ボルテックスミキサーによって攪拌した。このようにして得られた細胞懸濁液を 12000rpm で 60 分間遠心し、可溶化画分と膜画分に分離し、SDS-PAGE (ゲル濃度 12.5%) を行った。SDS-PAGE 後のゲルから、タンパク質をセミウエット方式の電極で PVDF 膜に 20mA で 60 分間転写した。転写後、SuperBlock (PIRCE) でブロッキングを行い、洗浄を 3 回行った。その後、一次抗体反応 (Anti-FLAG rabbit IgG)、洗浄、二次抗体反応 (Anti-Rabbit IgG AP 標識) を行い、FastRed kit (フナコシ) でアルカリフォスファターゼを発色させ、GluR-GFP を検出した。

Sf-9 細胞表層への GluR の提示を細胞免疫染色法で確認した。一次抗体には Anti FLAG Rabbit IgG (Affinity Bio Regents)、二次抗体には Anti Rabbit IgG FITC 標識 (Affinity Bio Regents) を用いた。細胞をカバーグラスに乗せ、27°Cで1時間放置した後、した。その後、100%メタノールを用い、-20°Cで5分間処理することにより固定した。20倍希釈した Super Block (Bio Rad) で30分間処理することによりブロッキングを行った。再びPBS (-) で3回洗浄した後、一次抗体反応を30分、洗浄、二次抗体反応30分、洗浄の順に行った。その後、蛍光顕微鏡 (Nikon) による観察を行った。

3-2-6 ナトリウムイオン流入イメージング

ナトリウムイオンの蛍光プローブである SBFI (Molecular Probes) は、その構造上にあるカルボキシル基により Na と結合する。このとき、外部からの励起光により蛍光現象を起こす (励起光 350-380nm に対し、510nm にピークを持つ蛍光)。

使用には細胞に浸透する SBFI/AM を用い、細胞内へ導入する。SBFI/AM は、SBFI のカルボキシル基をエステル化したもので、細胞膜を容易に透過するので、小さな細胞でも膜を傷つけることなく取り込ませることができる。

カバーグラス上に培養した細胞に 2 μ M SBFI/AM を加えた PBS をローディング後、室温で120分間インキュベートし SBFI を導入した。PBS で洗浄後、その後 27°Cで60分インキュベートした。蛍光顕微鏡で 340nm と 380nm で励起し 510nm の蛍光を測定して 340/380 をモニタリングした。観察する際には、2%のゼラチンを塗布したカバーグラスに細胞懸濁液を滴下し、細胞の固定を行った。

3-2-7 細胞外電位測定

本研究では、MED8System^{1,2)} (Panasonic) を用いて細胞外電位の変化を測定

した。MED プローブは神経細胞ネットワークを多点同時に電気生理学的に測定できる電位測定用プローブで、これまでに海馬^{1 3)}、扁桃体^{1 4)}、心筋^{1 5)}などについての研究報告がなされている。MED プローブ基板の中央部には 64 個の微小白金黒電極 (50 μ m \times 50 μ m) が 8 \times 8 のアレイ上に配置され、その外側に基準電極が配置されている。この基準電極における電位を基準にして 64 個の微小電極との間で、細胞周辺における電位変化の測定を行った。MED プローブ上の微小電極は、電極表面に白金黒メッキが施され、電極表面を有効倍率 200 倍とインピーダンスを下げることにより、安定した信号記録を実施できる。

MED プローブ上の微小電極からの信号測定はチャンネルジャンクション機とシグナル増幅とノイズカット機器、PC 上の MED8Conductor ソフトを用いて行った。また、測定細胞の選択は顕微鏡で細胞の状態を確認しながら行った。

Sf9 細胞に GluR ウイルスベクターをインフェクションして 3 日間培養したものを Sf9-GluR 細胞として測定に使用した。まず、培地をすべて除去した後、PBS に 5 \times 10⁵cells/ml の細胞濃度で懸濁した。次に、アレイ型微小電極上に 1.5ml 細胞懸濁液を添加して数分間静置した。その後、カバーガラスかけることによって細胞と電極の密着を図った。細胞の様子は顕微鏡で観察し、細胞が接している電極を作用極、細胞が接していない電極を参照極として選択して、グルタミン酸の添加に伴う細胞外電位の変化を測定した。測定データは PC 上の MED8System ソフトにおいて「電位 vs 時間」の波形グラフとして表示される。

3-3 GluR 発現提示の確認と機能確認

(i) GluR 発現の確認

Sf9-GluR 細胞における GluR 発現の確認をウエスタンブロッティングによって行った。図 3-1 (a) にその結果を示す。Sf9-GluR 細胞の可溶化画分にもみ 100-110kDa 付近に GluR と思われるバンドが検出された。この結果から、Sf9 細胞をバキュロウイルスに感染させることにより、GluR を発現させることができることが明らかとなった。

(ii) iGluR の細胞表層提示確認

Sf9-GluR 細胞における細胞表層への GluR の提示を免疫染色によって確認した。図 3-1 (b) にその結果を示す。コントロールの Sf9 細胞は染色されておらず、ほとんど蛍光を発していない。一方、Sf9-GluR 細胞は免疫染色によって細胞が染色されて蛍光を発していることが確認できた。この結果から、Sf9 細胞に GluR バキュロウイルスベクターが感染し、GluR を発現させ、それを細胞表層に提示していることが示された。

(iii) 細胞内へのナトリウムイオン流入の評価

ナトリウムイオン蛍光プローブ SBF1 を用いて、細胞内へのナトリウムイオンの流入挙動を蛍光顕微鏡により測定した。

GluR を導入した Sf9-GluR 細胞では、グルタミン酸の添加直後に、蛍光強度比が上昇し、細胞内へのナトリウムイオンの流入がグルタミン酸の添加と同時に起こるといった結果が得られた (図 3-2)。一方、GluR を導入していない Sf9 細胞では、グルタミン酸を添加しても蛍光強度比に変化は見られず、細胞内へのナトリウムイオンの流入は起こらないことが明らかになった。しかし、細胞外電位応答の強度と同様に Sf9-GluR 細胞の中でも、細胞内へのナトリウムイオンの

流入量に大きなばらつきが見られた。これは、GluR の発現量と細胞表層への GluR の提示量が細胞ごとに異なっていることに起因していると考えられる。これらの結果から、GluR を導入した Sf9-GluR 細胞は、本来のチャネルゲートレセプター機能を保持したまま Sf9 細胞の細胞表層に提示されていることが明らかとなった。

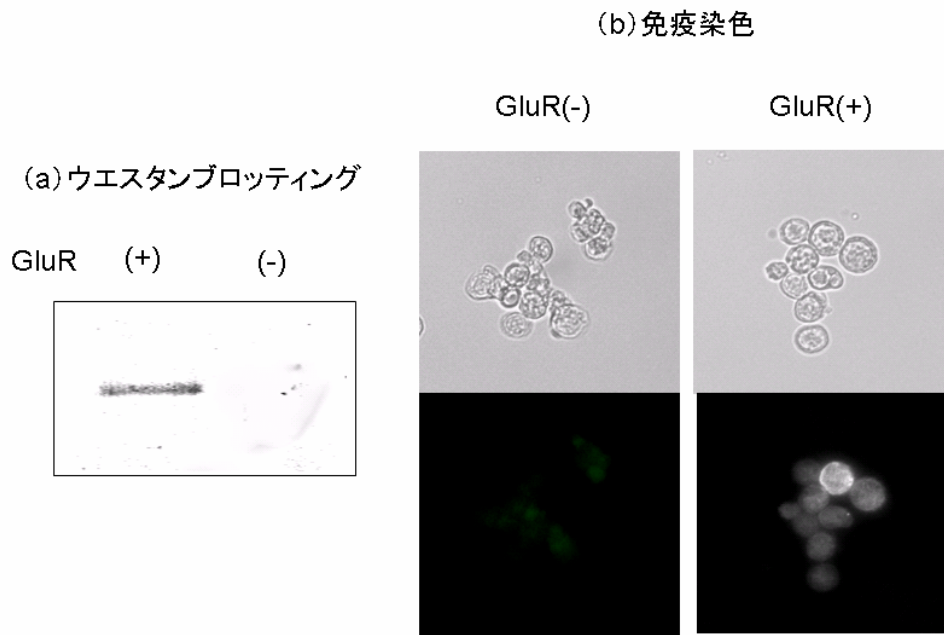


図 3-1 Sf9 細胞での iGluR の発現確認

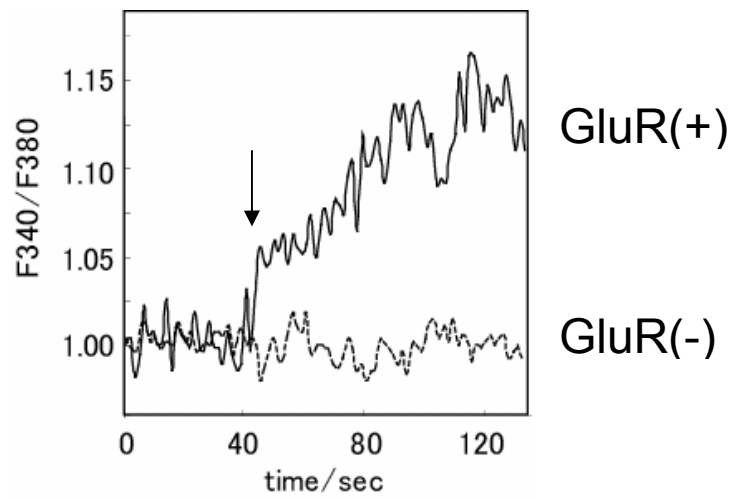


図 3-2 ナトリウムイオン蛍光指示薬を用いた機能確認

3-4 細胞外電位を指標としたレセプター機能評価

GluR 提示細胞を用いて、グルタミン酸刺激による細胞外電位の変化を測定した (図 3-3)。測定を開始して、基準電位が安定していることを確認し、グルタミン酸を添加して細胞外電位の変化を測定した。Sf9 細胞においてはグルタミン酸によって刺激しても、細胞外電位の変化は一切起こらなかった。一方、Sf9-GluR 細胞では 2mM のグルタミン酸刺激において細胞外電位の変化が観察された (図 3-4)。

この結果は、リガンドであるグルタミン酸に特異的な反応であることを確かめるために、Sf9-GluR 細胞を他のアミノ酸で刺激したときの細胞外電位の変化を測定した。

ここでは、アミノ酸の基本的な構造を持つグリシン、グルタミン酸と近似の構造骨格を持つグルタミン、グルタミン酸と同じ酸性アミノ酸であるアスパラギン酸の 3 種のアミノ酸を用いた (図 3-5)。2mM のアスパラギン酸を滴下したときの細胞外電位の変化を図に示す (図 3-6)。Sf9-GluR 細胞はアスパラギン酸には応答を示さないことが示唆された。同様に 2mM のグルタミンを滴下したときにも細胞外電位に変化は見られなかった。これらのことから、細胞外電位の変化を指標として、GluR の機能をモニタリングできることが示唆された。

細胞外電位変化の応答挙動はまず電位がマイナス側にシフトし、その後、プラスにシフトした後、静止電位に戻るというものである。これはグルタミン酸刺激により多くの GluR が開口し、それに伴い、ナトリウムイオンのみが選択的に細胞内に流入した結果、細胞が接着した微小電極の界面における荷電の偏りが大きな変化を引き起こしていると考えられた (図 3-7)。その後、バルクからのナトリウムイオンの拡散により、再び静止電位に戻ったと思われる。また、コントロールの Sf9 細胞と Sf9-GluR 細胞の比較により、この細胞外電位の変化は Sf9-GluR 細胞の GluR の機能を反映していると考えられる。

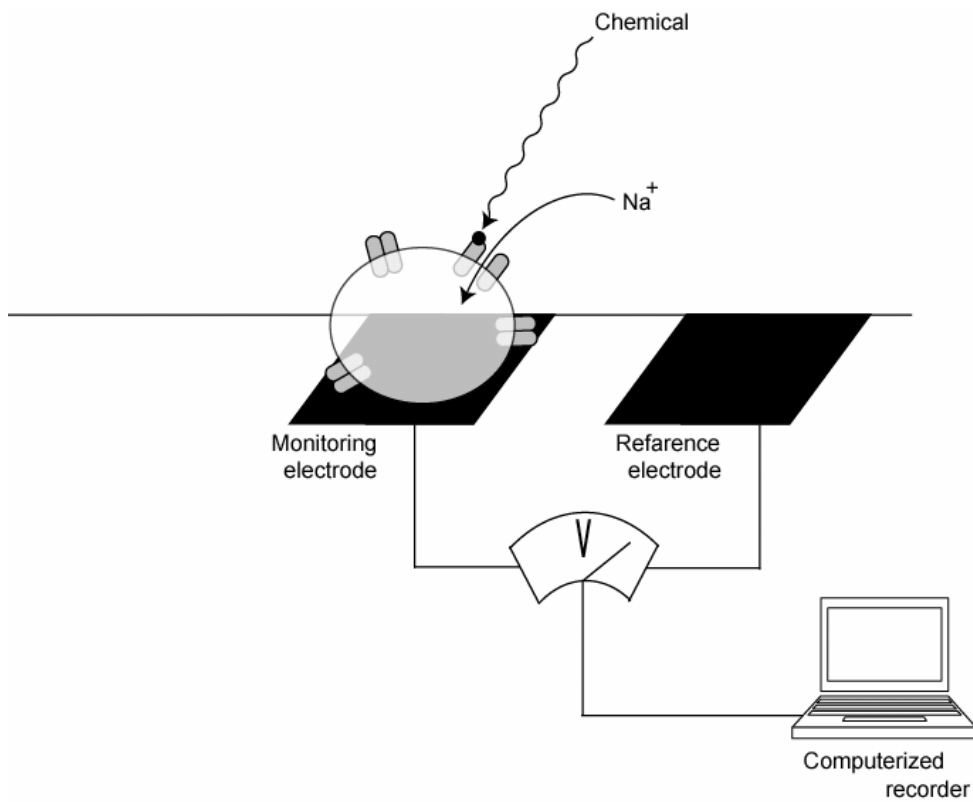


図 3-3 細胞外電位測定イメージ図

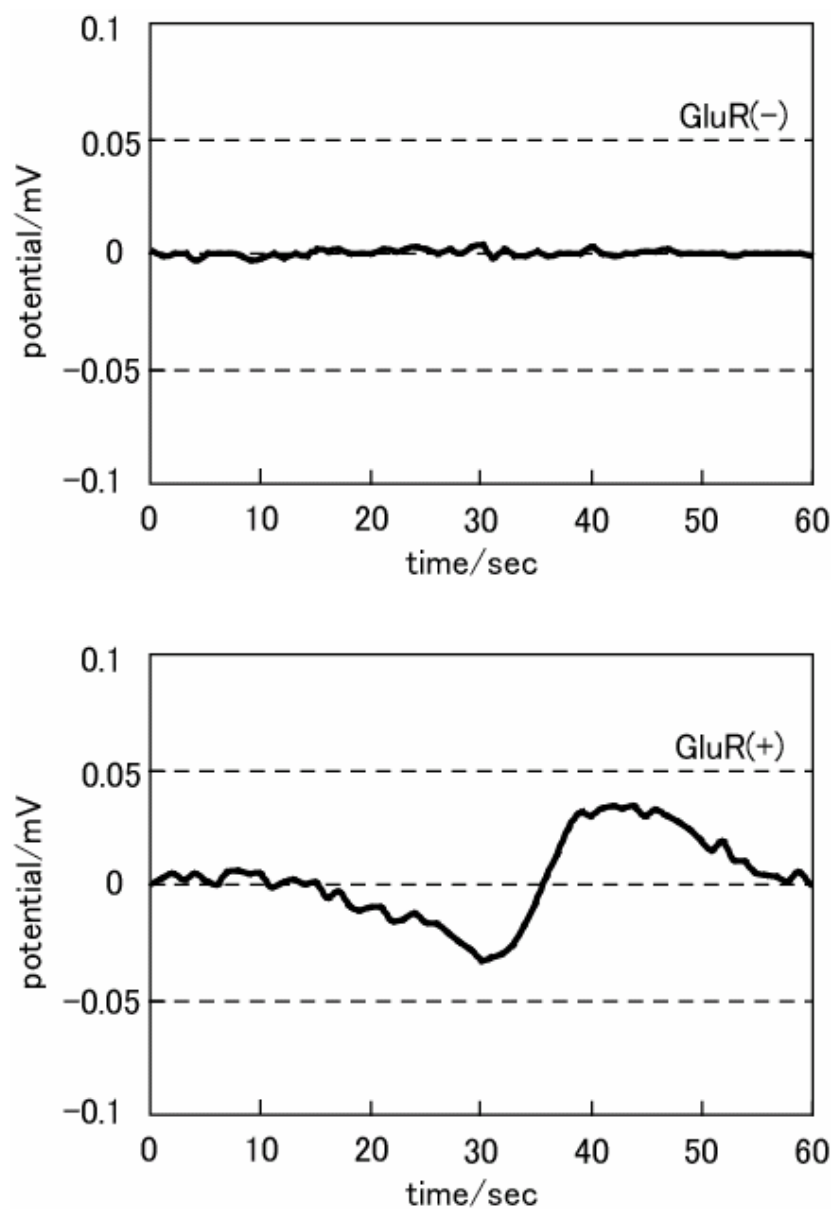


図3-4 細胞外電位測定の結果

上:コントロール GluR(-)、下:iGluR 提示細胞 GluR(+)

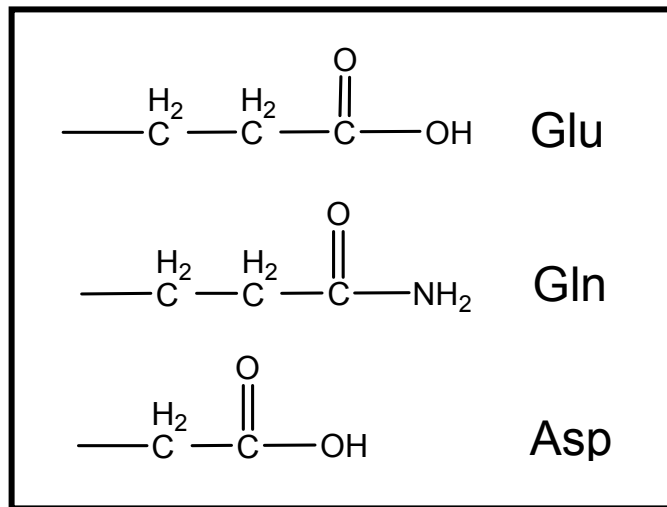


図 3-5 本研究で使用したアミノ酸の側鎖

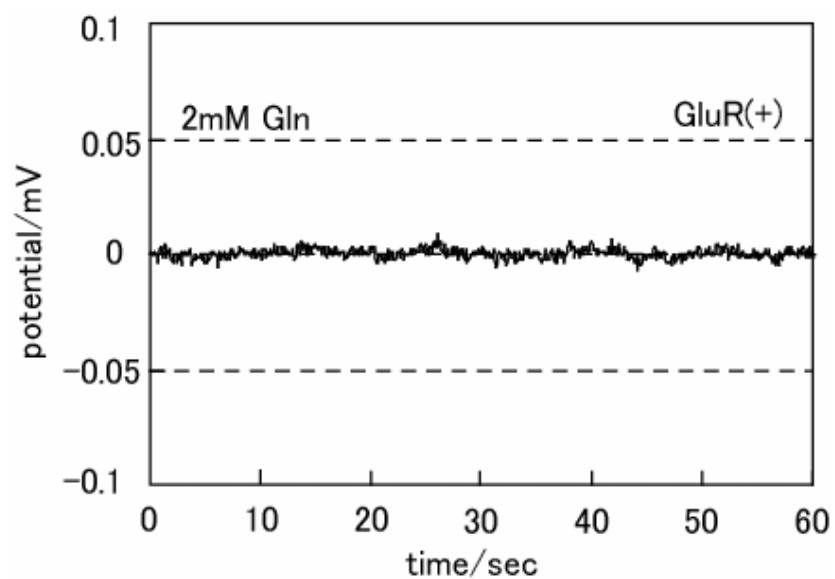
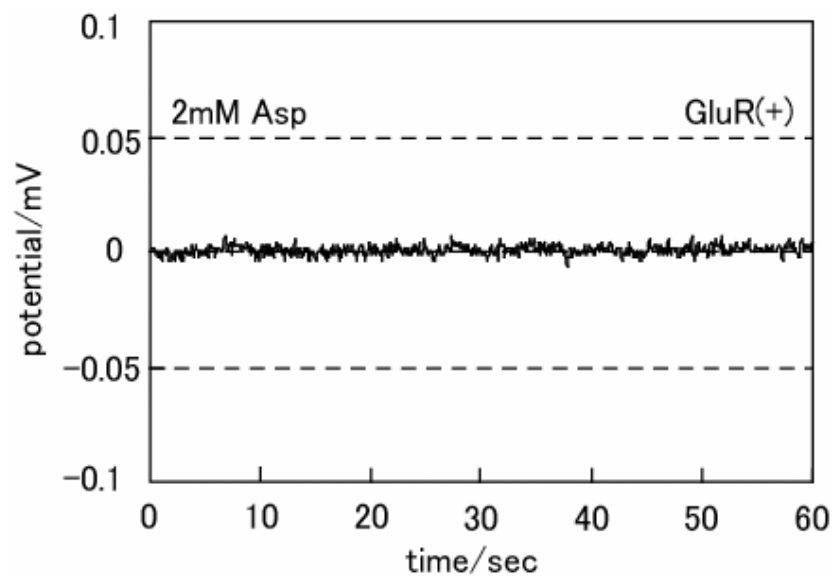


図 3-6 他種アミノ酸適用による細胞外電位への影響
上:アスパラギン酸、下:グルタミン

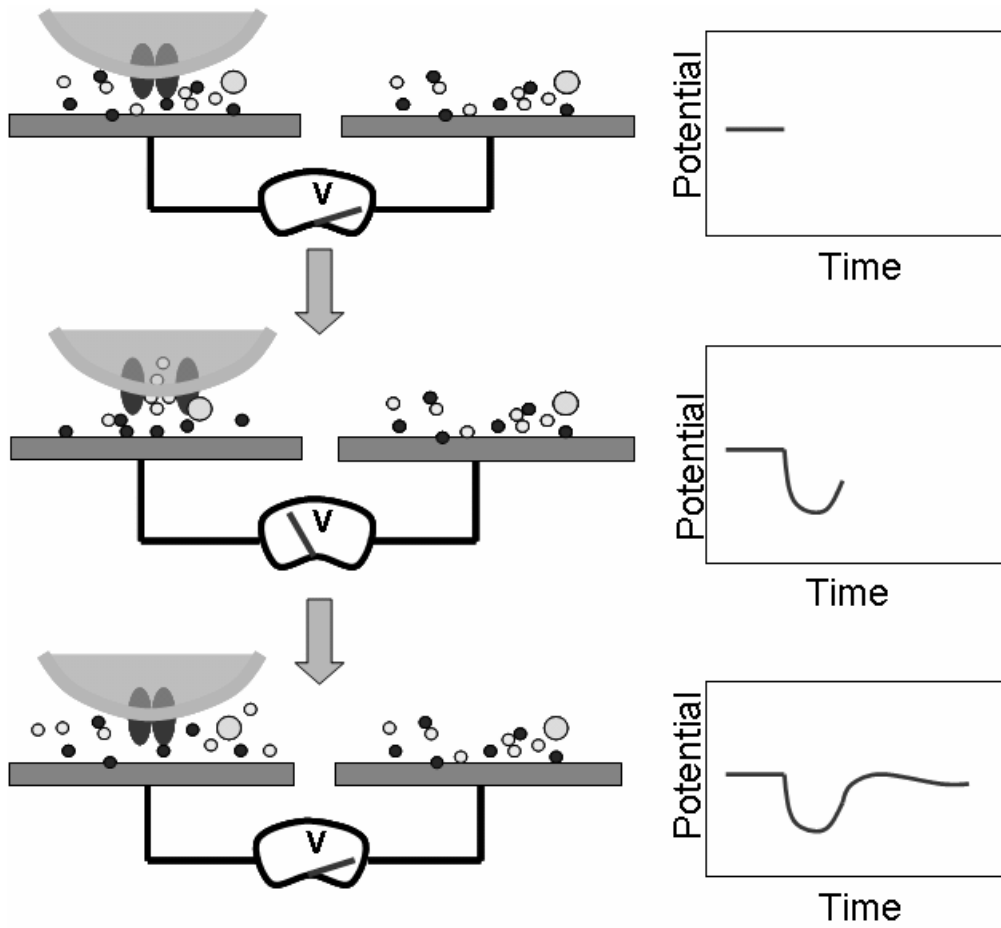


図 3-7 細胞外電位応答の考察

3-5 まとめ

本章では、従来の方法以上にチャンネルゲートレセプターの測定を簡便かつ効率よく行うためにチャンネルゲートレセプター提示細胞を細胞外電位測定法に適用し、細胞外電位の変化を指標としたチャンネルゲート機能のモニタリングを行った。

クローニングした **GluR** をバキュロウイルスベクターによって、昆虫由来の **Sf9** 細胞に導入し、細胞表層に **GluR** を多発現・提示させた細胞を作成した。その細胞へのグルタミン酸刺激によって、細胞外電位が変化することが分かった。この変化はグルタミン酸刺激にのみ現れ、その他のアミノ酸では現れないことを示した。また、細胞内へのナトリウムイオン流入を測定し、提示されたチャンネルゲートレセプターが本来の機能を保持していることを示した。

これらのことから、培養容易な異種細胞に遺伝子工学的手法によりチャンネルゲートレセプターを導入することで、組み換え後の細胞をシナプスモデル細胞として扱えることが示唆された。また、このシナプスモデル細胞を細胞外電位測定法と組み合わせることで、導入したチャンネルゲートレセプターに対する薬剤の結合解析と同時に、結合後の細胞への作用までを評価できるシステムへ応用できることが強く示唆された。

参考文献

1. Wyart, C., Ybert, C., Bourdieu, L., Herr, C., Prinz, C., Chatenay, D., Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces, *J. Neurosci. Method.*, 117, 123-131, 2002.
2. Kleinfeld, D., Kahler, K. H., Hockberger, P. E., Controlled Outgrowth of Dissociated Neurons on Patterned Substrates, *J. Neurosci.*, **8**, 4098-4120, 1988.
3. Ravenscroft, M. S., Bateman, K. E., Shaffer, K. M., Schessler, H. M., Jung, D. R., Schneider, T. W., Montgomery, C. B., Custer, T. L., Schaffner, A. E., Liu, Q. Y., Li, Y. X., Barker, J. L., Hickman, J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12169-12177, 1989.
4. Vogt, A. K., Stefani, F. D., Best, A., Nelles, G., Yasuda, A., Knoll, W., Offenhausser, A., Impact of micropatterned surfaces on neuronal polarity, *J. Neurosci. Method.*, **134**, 191-198, 2004.
5. Vogt, A. K., Wrobel, G., Meyer, W., Knoll, W., Offenhausser, A., Synaptic plasticity in micropatterned neuronal networks, *Biomaterial.*, **26**, 2549-2557, 2005.
6. Suzuki, I., Yasuda, K., Detection of tetanus-induced effects in linearly lined-up micropatterned neuronal networks: Application of a multi-electrode array chip combined with agarose microstructures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **356**, 470-475, 2007.
7. Jimbo, Y., Tateno, T. and Robinson, H. P. C., Simultaneous Induction of Pathway-Specific Potentiation and Depression in Networks of Cortical Neurons, *Biophys. J.*, **76**, 670-678, 1999.
8. Kasai, N., Jimbo, Y., Niwa, O., Matsue, T., Torimitsu K, Real-time multisite observation of glutamate release in rat hippocampal slices, *Neurosci lett*, **304**, 112-116, 2001.
9. Jimbo, Y., Robinson, H. P. C., Propagation of spontaneous synchronized activity in

- cortical slice cultures recorded by planar electrode arrays, *Bioelectrochem*, **51**, 107-115, 2000.
10. Morin, F., Nishimura, N., Griscom, L., LePioufle, B., Fujita, H., Takamura, Y., Tamiya, E., *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1093-1100, 2006.
 11. Kim, Y., Chang, K. O., Saif, L. J., Production of hybrid double – or triple – layered virus – like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system, *Virology*, **302**, 1-8, 2002.
 12. Oka, H., Shimono, K., Ogawa, R., Sugihara, H., Taketani, M., A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice, *J. Neurosci. Method.*, **93**, 61-67, 1999.
 13. Mann, E. O., Suckling, J. M., Hajos, N., Greenfield, S. A., Paulsen, O., Perisomatic Feedback Inhibition Underlies Cholinergically Induced Fast Network Oscillations in the Rat Hippocampus In Vitro, *Neuron*, **45**, 105-117, 2005.
 14. Uesaka, N., Hirai, S., Maruyama, T., Ruthazer, E. S., Yamamoto, N., Activity Dependence of Cortical Axon Branch Formation: A Morphological and Electrophysiological Study Using Organotypic Slice Cultures, *J. Neurosci.*, **25**, 1-9, 2005.
 15. Haraguchi, Y., Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T., Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation, *Biomaterials*, **27**, 4765-4774, 2006.

第4章

細胞活性評価デバイスの構築

4-1 はじめに

本研究はシナプスモデル細胞を構築し、それを利用して薬剤評価を行うというものである。前章までにシナプスモデル細胞を構築し、その機能評価と微小電極を用いた HTA システムの検討を行った。

細胞応答を指標とした薬剤評価を行う場合、測定対象である細胞の状態すなわち細胞活性が応答に大きく関与してくると考えられる。HTA 化を行うことにより、細胞は通常とは全く異なった特殊な環境に晒されることになるため、測定対象である細胞の活性を把握することは、細胞応答を指標とする薬剤評価を行うにあたって必須であると考えられる。そこで、薬剤評価において測定対象となる細胞の細胞活性を評価し、細胞応答を補償することで定量的な薬剤評価ができるのではないかと考え、細胞活性評価システムを企図した。本研究では細胞活性の指標として細胞外 ATP に着目した。細胞外 ATP は後に記すように細胞の状態と密接に関与している。

本章ではイオン感受性電界効果トランジスタ (ISFET) を信号変換素子として用いることによって、ATP の加水分解反応により生じる水素イオンおよびリン酸イオンの電荷を検出する細胞活性センサの構築を行った。

4-2 情報伝達分子としての ATP

ATP は生体内におけるエネルギー分子としてよく知られているが、一方で生体内情報伝達分子としても機能していることが分かってきている。情報伝達分子としての ATP は、図 4-1 に示すように細胞が物理的・化学的刺激を受けることによりミトコンドリアから放出され、マキシ ATP チャネルを通して細胞外へ放出される¹⁻⁸⁾。細胞外へ放出された ATP は ATP 受容体であるイオンチャンネル型の P2X レセプターと G-タンパク質共役型の P2Y へ受容される。ATP は細胞外では速やかにアデノシンにまで分解される。これらの一連の情報伝達によって血小板凝集⁹⁾、筋収縮弛緩¹⁰⁾、血圧制御¹¹⁾ などの生体応答を引き起こすことが報告されている。また、神経系における ATP のシグナル伝達への関与も報告されている^{12, 13)}。このように ATP は重要な機能を持つために細胞からの ATP の放出挙動を計測しようという研究が盛んに行われている。

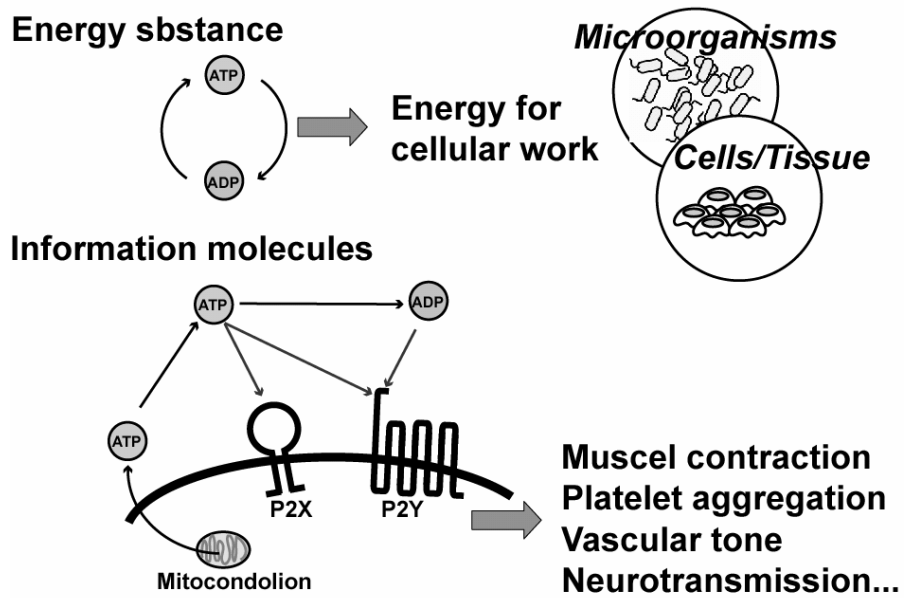


図 4 - 1 ATP の機能

4-3 従前の細胞放出 ATP 検出法

細胞から放出された ATP を検出しようとする研究は盛んに行われている。以下に研究例を示す（図 4-2）。

Hazama らは P2X 受容体を発現させた PC12 細胞をセンサ細胞として利用し、マニピュレータによって測定細胞へ接近させ、P2X 発現細胞の応答を電気生理学的に検出している¹⁴⁾。また Schneider らは原子間力顕微鏡（AFM）のカンチレバーにルシフェラーゼを固定化しそれを測定細胞に接近させてルシフェリン-ルシフェラーゼ発光分析を行っている¹⁵⁾。さらに Nakamura らは細胞膜をビオチン化し、アビジン-ビオチン/ルシフェラーゼを細胞膜へ固定化を行い、ATP 放出の検出に成功している¹⁶⁾。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光分析法は有益な ATP 検出法であるが、本研究で目的としている細胞活性評価のように、ATP の放出挙動を連続的にモニタリングしたいときには適用できない。細胞からの分子などの放出挙動をモニタリングする方法としては電気化学測定に基づくバイオセンサが挙げられる。しかしながら、ATP は電気化学的に測定することは極めて難しい^{17, 18)}。

そこでイオンを選択的に検出する素子としてイオン感受性電界効果トランジスタ（ISFET）を用いることにした。ISFET については次項で詳しく述べる。

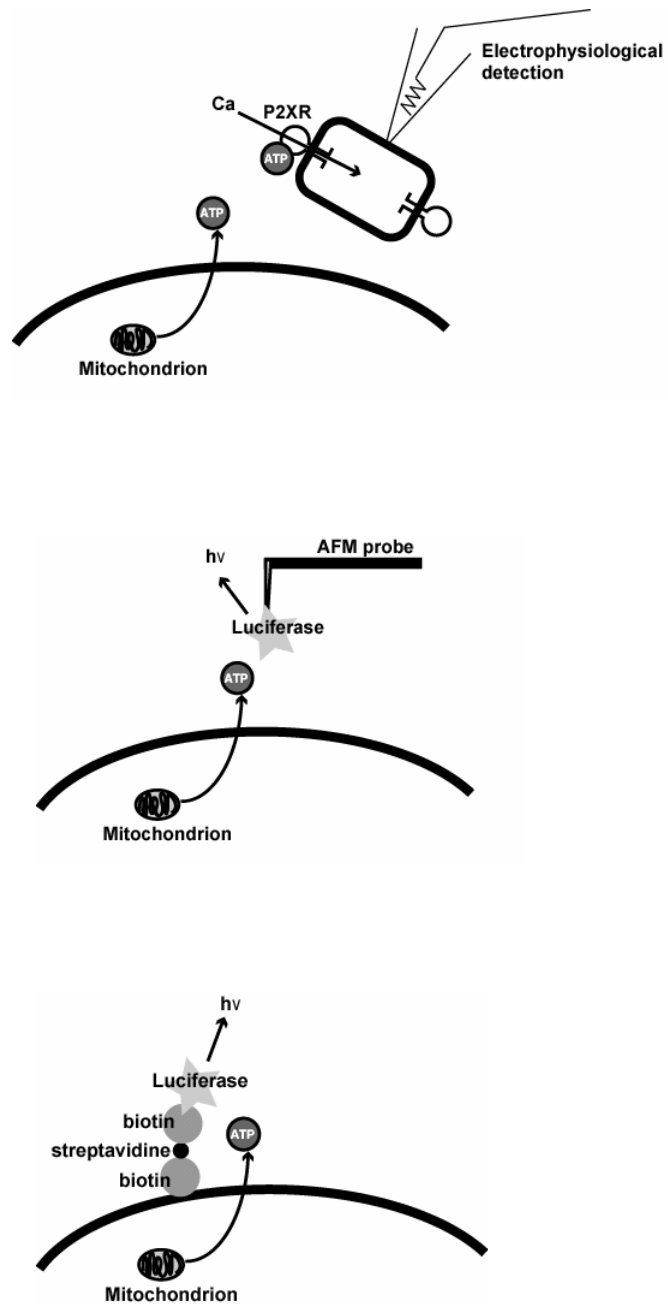


図 4-2 これまでの細胞外 ATP 検出法

上:P2X レセプター発現細胞を用いた電気生理学的検出、中:AFM プローブにルシフェラーゼを固定した発光分析、下:アビジン-ビオチンにより細胞膜にルシフェラーゼを固定した発光分析

4-4 イオン感受性電界効果トランジスタ (ISFET)

ISFET は図 4-3 のような構造をしており、半導体表面の抵抗が表面に垂直な電界によって変化するという半導体の電界効果を利用した素子である。その電界は電気化学的な作用によって半導体表面の絶縁層-溶液界面に形成される電気二重層に由来する (図 4-4)。従って半導体表面の絶縁層に機能性を付与することにより、いろいろなタイプの化学センサを実現できる。この半導体の電界効果は絶縁ゲート FET の基本原理であるが、近年では、化学センサのみならず他のセンサにも広く用いられている。例えば焦電効果や圧電効果を有する材料を使用した研究がなされている。FET センサでは界面の電気二重層に由来する電界を直接検出することになるため、電気二重層の平衡状態をほとんど乱すことなく、電気二重層はその発生源である表面官能基の密度が極めて小さな場合でも、その変化を検出できるという特徴が生じる。

FET センサとしては水素ガスなどを検出するためのガスセンサ、表面での抗原抗体反応を検出するイムノセンサなどの研究が進められている。

FET イオンセンサは 1970 年 Bergveld によって初めて提案された。これは参照電極を用いない方式であったが、1974 年松尾らは参照電極を使用し、ゲート絶縁膜に窒化シリコンを用いることによって安定な pH センサを実現した¹⁹⁻²¹⁾。

ゲート絶縁膜表面に特定のイオンにのみ応答するイオン感応層を形成するとイオン感応層と電解液との界面電位は溶液中の特定のイオンの活量によって決まり、この界面電位の変化は電界効果による FET のドレイン電流変化として検出できる。

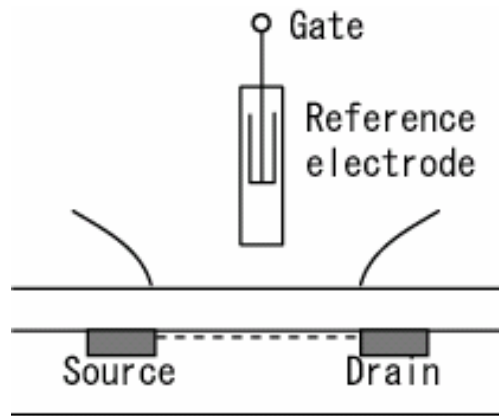


図4-3 ISFETの構造

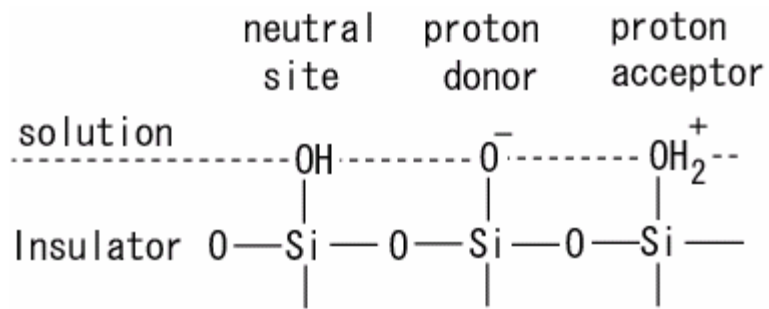


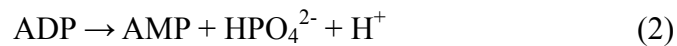
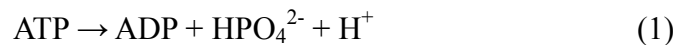
図 4-4 溶液-絶縁膜界面のモデル図

4-5 アピラーゼ膜を被覆した ISFET による ATP センサの構築

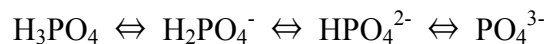
4-5-1 アピラーゼ

本研究では ATP 加水分解酵素であるアピラーゼ (E.C. 3.6.1.5.) を ISFET ゲート上に被覆した ATP センサを構築し、ATP 標準溶液による測定を行った。

アピラーゼによる ATP の加水分解反応を次式 (1) および (2) に示す。



アピラーゼは ATP を加水分解し、ADP とリン酸イオンを生成する。その後、生成された ADP を基質として AMP とリン酸イオンを生成する。結果として、アピラーゼによる加水分解反応によって 1 分子の ATP から 1 分子の AMP と 2 分子のリン酸イオンが生成される。このリン酸イオンの電離平衡は以下のようになっており pKa はそれぞれ 2.12, 7.21, 12.32 である。



これらのことから弱アルカリ性の溶液条件下でアピラーゼの加水分解反応によって生じたリン酸イオンから水素イオンが電離すると考えられる。アピラーゼを被覆した ISFET を構築することにより、ATP の加水分解反応による ISFET の酸化物絶縁膜界面での pH 変化をゲート電圧変化として捉えられるのではないかと考えた。

4-5-2 実験

(i) アピラーゼ被覆 ISFET の作成

ISFET (BAS) は酸化膜に酸化タンタルを用いているものを使用した²²⁾。アピラーゼを ISFET のゲート上に固定化するためにアクリルアミドによる固定を行った。固定化のための溶液組成は 10%アクリルアミド、1%過硫酸アンモニウム、2%TEMED とし、この溶液にアピラーゼを混合した。この混合溶液を ISFET ゲート上に滴下し、重合させることでアピラーゼ被覆 ISFET とした。

(ii) 測定方法

測定溶液は pH9.0 では Tris、pH8.0 では HEPES、pH7.0 および 7.5 では MOPS、pH6.0 および pH6.5 では MES、pH5.0 では酢酸バッファーとし、濃度はそれぞれ 100 μ M とした。アピラーゼ被覆 ISFET と参照電極 (Ag/AgCl) を電気化学分析装置 (HSV-100、北斗電工) に接続した。測定回路はソースフォロア回路 (図 4-5) とした。ソース-ドレイン間電圧 (V_{ds}) を 5V としドレイン-ソース間電流 (I_{ds}) が 100 μ A となるようにソース抵抗 (R_s) 10k Ω を設置した。センサ応答はゲート電圧 (V_{gs} 、 $\Delta V_{gs} = R_s \Delta I_{ds}$) として出力した。

4-5-3 ATP 標準溶液によるアピラーゼ被覆 ISFET の応答

ATP 標準溶液を適用した際のアピラーゼ被覆 ISFET の応答を図 4-6 に示す。アピラーゼ被覆 ISFET は ATP 適用して約 5 分後にゲート電圧 (V_{gs}) の上昇が見られた。ATP 適用から応答が見られるまでの時間は ATP 濃度に依存して短くなるということが見られるため、これはアピラーゼ膜内への ATP の拡散を表していると考えられる。このセンサの ATP 濃度依存性について示したのが図 4-7 である。ここから見て取れるようにこのセンサの検出限界は 200 μ M であった。しかしながら、この検出限界はアピラーゼ膜の厚さ、酵素活性および回路系の最適化を行うことによって改善できると考えられる。

アピラーゼは前述のように ATP および ADP を基質とし、AMP とリン酸イオンを生成する酵素である。そこで ATP、ADP および AMP に対するセンサ特性

について調べた (図 4-8)。ATP と ADP では応答が見られたが AMP では応答が見られなかった。さらに ATP 適用時の応答は ADP 適用時の 2 倍の強度を示した。これは生成物として生じるリン酸イオンの数を反映していると考えられる。このことから、このセンサはアピラーゼの酵素特性を示すことが確認できた。

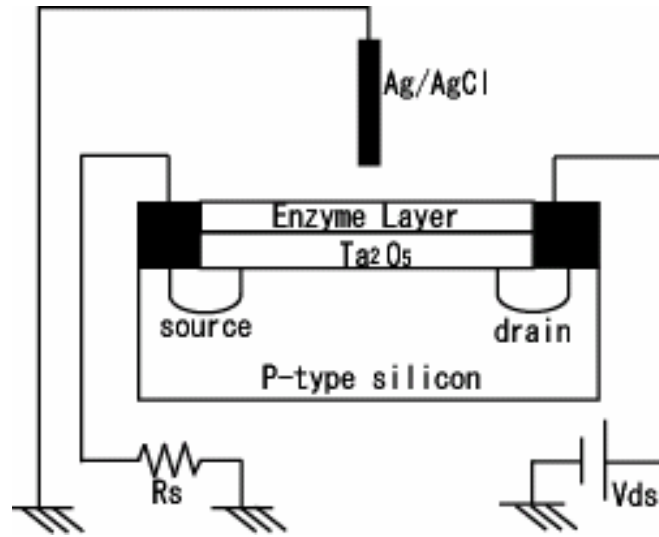


図 4-5 アピラーゼ被覆 ISFET の構造と回路図

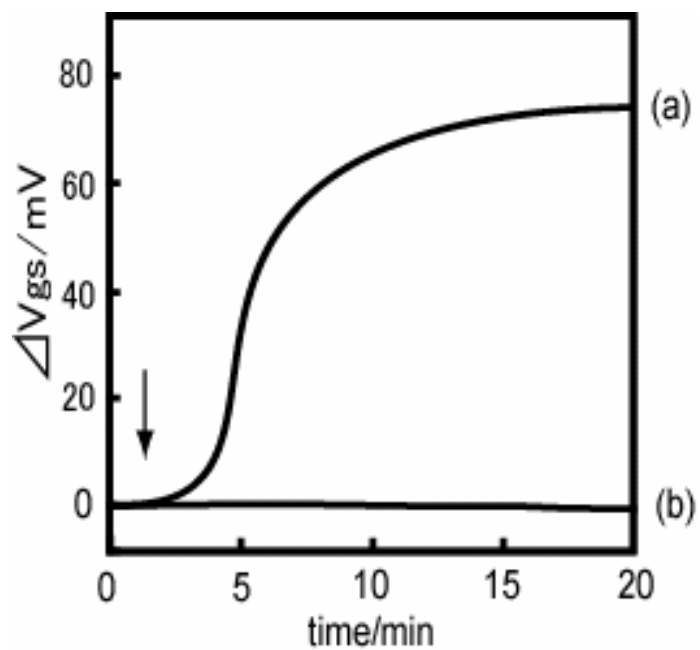


図 4 - 6 ATP 適用時のセンサ応答

(a) アピラーゼ被覆 ISFET、(b) コントロール

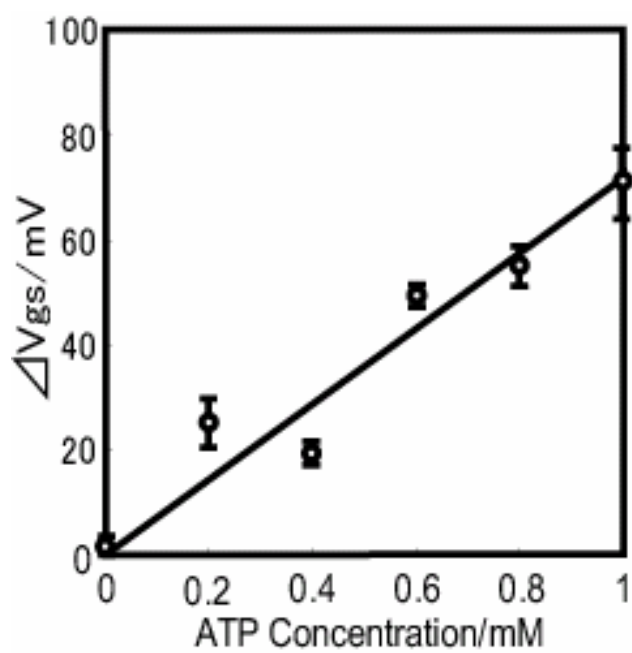


図4-7 アピラーゼ被覆 ISFET の ATP 濃度依存性

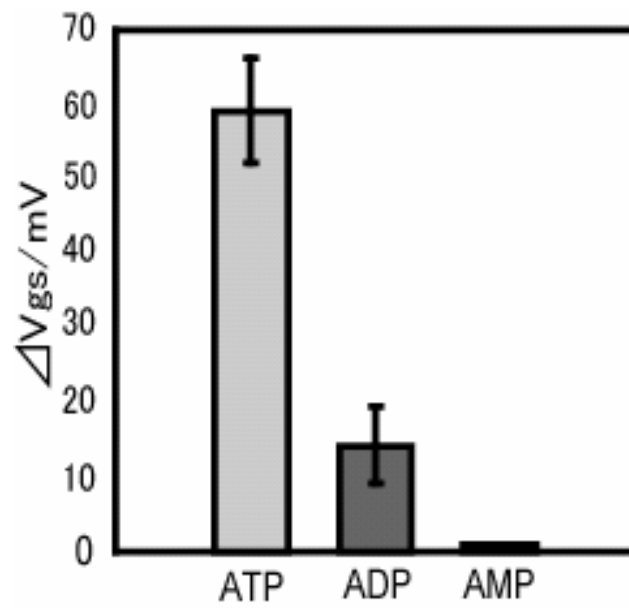


図 4-8 アミラーゼ被覆 ISFET の基質依存性

4-6 人工酵素膜を被覆した ISFET による ATP センサの構築

4-6-1 人工酵素

前項で示したアピラーゼ被覆 ISFET は ATP の加水分解によって生じるリン酸イオンの電離を利用した原理となっていた。しかしながら、この方法では測定溶液の pH が大きく影響を与えるということが明らかになった。

ISFET は絶縁膜界面での pH 変化以外にも、絶縁膜上への分子修飾によって分子認識能を付与し、分子どうしの相互作用に起因する電界の変化を検出することが可能である²⁵⁻³⁰。そこで適切な表面修飾を施すことにより測定 pH に依存しない ATP センサができるのではないかと考えた。

本研究では当研究室で研究中である ATP 加水分解能を有する人工酵素に着目した。この人工酵素はポリ-L-ヒスチジンとポリスチレンスルホン酸および銅イオンからなっている²⁹⁻³¹。この構造を利用することで ATP 加水分解によって生じたリン酸イオンを人工酵素の構成している銅イオンに配位させ、ISFET ゲート界面への電界を変化させることができるのではないかと考えた。

4-6-2 実験

人工酵素の合成は池野らの方法に従った³¹。合成した人工酵素はアクリルアミドによって包括することで膜化した。アクリルアミド溶液は 10%アクリルアミド、1%過硫酸アンモニウム、2%TEMED とした。この溶液に人工酵素を混合し 100 μm のスペーサーを利用してスラブに挟んだ状態で重合させた。ISFET 素子 (BAS) は酸化タンタルゲートのものを使用した。この膜を適切な大きさに切り抜き ISFET のゲート上に貼り付けて乾燥させた。測定は pH6.0 の MES 溶液中で行った。構築した人工酵素 ISFET と参照電極 (Ag/AgCl) は電気化学分析装置 (HSV-100, 北斗電工) に接続した。測定回路はソースフォロア回路とした。ソース-ドレイン間電圧 (V_{ds}) を 5V としドレイン-ソース間電流 (I_{ds}) が 100 μA

となるようにソース抵抗 (R_s) $10k\Omega$ を設置した。センサ応答はゲート電圧 (V_{gs} 、 $\Delta V_{gs} = R_s \Delta I_{ds}$) として出力した。

4-6-3 結果

1mM の ATP を滴下したときの結果を図 4-9 に示す。人工酵素を被覆していない ISFET では V_{gs} に変化は見られないが、人工酵素を被覆した ISFET では V_{gs} のマイナス側へのシフトが見られた。pH6.0 でのリン酸の電離状態は $H_2PO_4^-$ であるため、アピラーゼ被覆 ISFET では応答しなかった。人工酵素では生成物であるリン酸イオンを何らかの相互作用により膜内に蓄積することができ、それに起因する電界の変化を検出しているのではないかと考えた。図 4-10 に ATP、ADP、AMP それぞれに対する濃度依存性を示した。人工酵素被覆 ISFET は ATP と ADP には濃度依存的な応答を示したが、AMP には全く応答しなかった。これは人工酵素の特性を反映している。さらにこの人工酵素はポリリン酸類も基質として認識し、加水分解を触媒することが分かっている。図 4-10 にはポリリン酸類を適用したときの人工酵素被覆 ISFET の応答を示している。センサ応答はリン酸残基の数に依存して大きくなることが示唆された。しかしながら P3 と P4 には明確な差が見られなかった。これは分子が大きくなると人工酵素膜内での拡散が著しく低下し、それが触媒反応の律速になっているのではないかと考えられる。

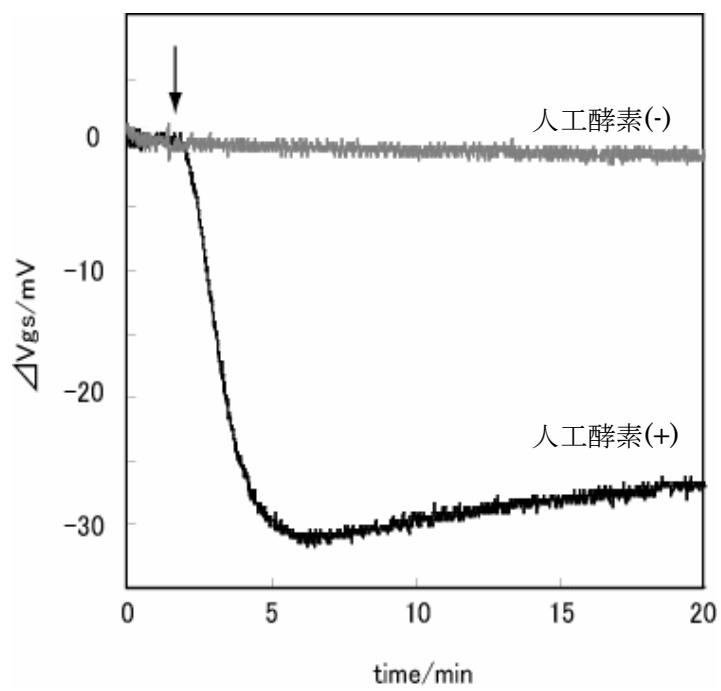


図 4-9 ATP 適用時の人工酵素被覆 ISFET の応答

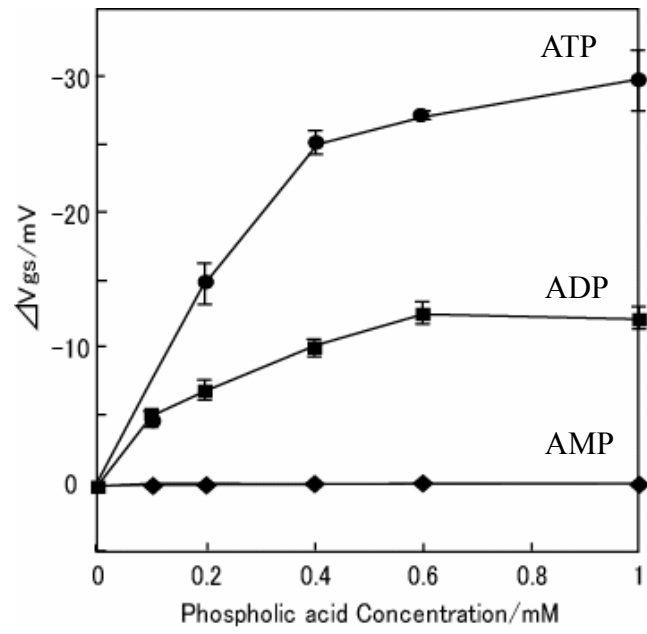


図 4-10 人工酵素被覆 ISFET の基質濃度依存性

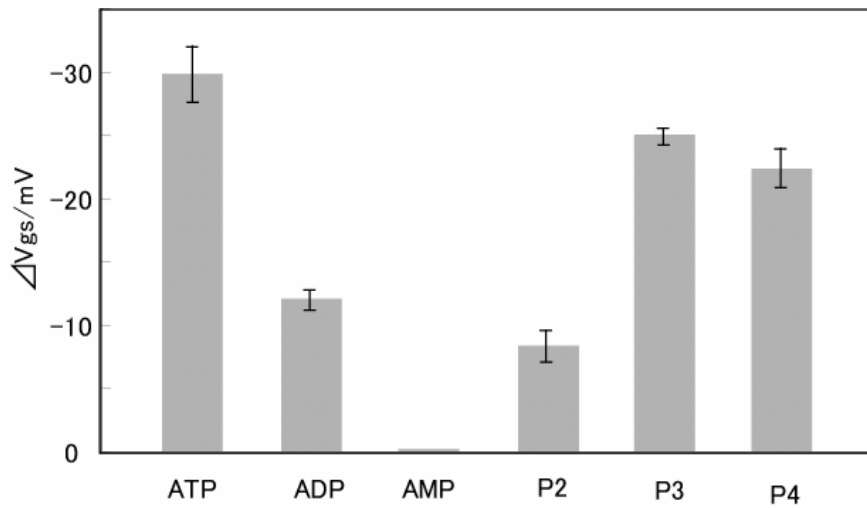


図 4-1 1 人工酵素被覆 ISFET のポリリン酸に対する応答
P2:ピロリン酸、P3:トリポリリン酸、P4:テトラポリリン酸

4-7 まとめ

本章では、定量的な薬剤評価を目指すには、測定対象である細胞の活性を把握することが不可欠であるとの認識の元に、ATP を指標とした細胞活性センサの構築を行った。本研究では分子トランスデューサ素子として ISFET に着目し、ATP 加水分解反応との共役による ATP の検出を試みた。

まず、ATP 加水分解酵素であるアピラーゼを ISFET に被覆し、ATP の加水分解反応による生成物であるリン酸イオンの電離を利用した検出が可能であることを明らかにした。このような測定原理であるため、アピラーゼ被覆 ISFET は測定溶液の pH に大きく影響を受けることも明らかになった。そこで、当研究室で研究を推進してきた人工酵素を利用することで、生成物であるリン酸の荷電そのものを検出するセンサの構築を行った。人工酵素被覆 ISFET ではアピラーゼ被覆 ISFET での応答と逆位相の応答が得られ、リン酸イオンの荷電を検出できることが示唆された。

今回用いた人工酵素は遷移金属の種類や機能性高分子の分子設計により分子濃縮、分子トランスデューサ機能、分子選択性といったセンサ機能を同時に付与することができる可能性がある。このように用途に合わせたセンサ機能を分子設計によりデザインできるため、生体分子の新しいセンサ材料として広範な応用が期待できる。

参考文献

1. Romanello, M., Pani, B., Bicego, M., D'Andrea, P., Mechanically Induced ATP Release from Human Osteoblastic Cells, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **289**, 1275, 2001.
2. Taylor, A. L., Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia, *Am. J. Physiol.*, **275**, 1391, 1998.
3. Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S. D., Fitz, J. G., Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 12020, 1996.
4. Hoebertz, A., Arnett, T. R., Burnstock, G., Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines, *Trends. Pharmacol. Sci.*, **24**, 290, 2003.
5. Sabirov, R. Z., and Okada, Y., Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway, *Biophys. J.*, **87**, 1672-1685, 2004.
6. Dutta, A. K., Saibrov, R. Z., Uramoto, H., and Okada, Y., Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions, *J. Physiol.*, **559**, 799-812, 2004.
7. Burnstock, G., Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trend. Pharmacol. Sci.*, **166**, 27, 2006.
8. P. Soto, M. G. Guzman, J. M. G. Hernandez, M. Hollmann, C. Karschin, W. Stuhmer, P2X4: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain, *Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A.*, **93**, 3684, 1996.
9. Ts'ao C., Rat Platelet Aggregation by ATP, *Am. J. Pathol.*, **85**, 581-593, 1976.
10. Korzeniewski, B., Regulation of ATP supply during muscle contraction: theoretical studies, *Biochem. J.*, **330**, 1189-1195, 1998.
11. Farouque, H. M., Worthley, S. G., Meredith, I. T., Skyrme-Jones, R. A., Zhang, M.

- J., Effect of ATP-Sensitive Potassium Channel Inhibition on Resting Coronary Vascular Responses in Humans, *Circ. Res.*, **90**, 231-236, 2002.
12. Araque, A., Perea, G., Glial Modulation of Synaptic Transmission in Culture, *Glia*, **47**, 241-248, 2004.
 13. Zhang, Y., Paterson, W. G., Excitatory purinergic neurotransmission in smooth muscle of guinea-pig taenia caeci, *J. Physiol.*, **563**, 855-865, 2005.
 14. Hazama, A., Hayashi, S., Okada, Y., Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique, *Pflugers Arch.*, **437**, 31– 35, 1998.
 15. S.W. Schneider, M.E. Egan, Jena, B. P., Guggino, W. B., Oberleithner, H., and Geibel, J. P., Continuous detection of extracellular ATP on living cells by using atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 12180– 12185, 1999.
 16. Nakamura, M., Mie, M., Funabashi, H., Yamamoto, K., Ando, J., Kobatake, E., Cell-surface-localized ATP detection with immobilized WreXy luciferase, *Anal. Biochem.*, **352**, 61-67, 2006.
 17. Ikeno, S. and Haruyama, T., Biological phosphate ester sensing using an artificial enzyme PMP complex, *Sens. Actuator*, **108**, 608, 2005.
 18. Ojida, A., Park, S., Mito-oka, Y., Hamachi, I., Efficient fluorescent ATP-sensing based on coordination chemistry under aqueous neutral conditions, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 6193, 2002.
 19. Bergveld, P., Thirty years of ISFETOLOGY What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years, *Sens. Actuator. B-Chem.*, **88**, 1-20, 2003.
 20. Matsuo, T., Esashi, M., ISFET, *DENKI KAGAKU* **50**, 64-71, 1982.
 21. Matsuo, T., Esashi, M., FET sensor, *DENKI KAGAKU* **53**, 947-950, 1985.
 22. Ito, Y., Sens., Long-term drift mechanism of Ta₂O₅ gate pH-ISFETs, *Actuator*.

- B-Chem.*, **64**, 152-155, 2000.
23. Pogorelova, S. P., Zayats, M., Kharitonov, A. B., Katz, E., Willner, I., Analysis of NAD(P)-cofactors by redox functionalized ISFET device, *Sens. Actuator. B-Chem.*, **89**, 40-47, 2003.
 24. Lahav, M., Kharitonov, A. B., and Willner, I., Imprinting of Chiral Molecular Recognition Sites in Thin TiO₂ Films Associated with Field-Effect Transistors: Novel Functionalized Devices for Chiroselective and Chiro-specific Analyses, *Chem. Eur. J.*, **7**, 3992-3997, 2001.
 25. Zayats, M., Lahav, M., Kharitonov, A. B., and Willner, I., Imprinting of specific molecular recognition sites in inorganic and organic thin membranes associated with ion-sensitive field-effect transistors, *Tetrahedron*, **58**, 815-824, 2002.
 26. Uno, T., Ohtake, T., Tabata, H., and Kawai, T., Direct Deoxyribonucleic Acid Detection Using Ion-Sensitive Field-Effect Transistors Based on Peptide Nucleic Acid, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, L1584-L1587, 2004.
 27. Mlika, R., Ouada, B. H., Jaffrezic-Renault, N., Dumazet, I., Lamartine, R., Gamoudi, M., Guillaud, G., Study of ion-selective evaporated calixarene film used as a sensitive layer on ISFET sensors, *Sens. Actuator. B-Chem.*, **47**, 43-47, 1998.
 28. Zayats, M., Kharitonov, A. B., Katz, E., Willner, I., An integrated relay/nitrate reductase field-effect transistor for the sensing of nitrate (NO₃²⁻) *Analyst*, **126**, 652-657, 2001.
 29. Ikeno, S., Haruyama, T., Biological phosphate ester sensing using an artificial enzyme PMP complex, *Sens. Actuator. B-Chem.*, **108**, 608-612, 2005.
 30. Asakawa, H., Ikeno, S., Haruyama, T., The molecular design of a PMP complex and its application in a molecular transducer for cellular NO sensing, *Sens. Actuator. B-Chem.*, **108**, 646-650, 2005.

31. Ikeno, S., Asakawa, H., Haruyama, T., Molecular Commonality Detection Using an Artificial Enzyme Membrane for in Situ One-Stop Biosurveillance, *Anal. Chem.*, **79**, 554-5546, 2007.

第 5 章

結論

創薬の現場においてコンビナトリアルケミストリーなど合成の自動化プロセスが導入されたことにより、評価すべき薬剤候補は膨大な数にのぼるといわれている。そのため、合成された薬剤候補物質の評価をハイスループットに行う技術（HTA）の需要が大きくなってきている。このような背景から、本論文ではこれまでの数多く報告されている測定デバイスの改良による HTA 化とは異なり、外部刺激が与える影響の「質」を評価する定質分析の概念に基づいて、測定対象である細胞そのものを改変することによる薬剤評価 HTA の構築を行った。同時に薬剤評価に用いる細胞の活性変化が薬剤評価結果に少なからず影響を及ぼすと考え、細胞活性をモニタリングするための細胞活性評価デバイスの構築を行った。

第 1 章では、創薬におけるイオンチャネル型レセプターの重要性と現状について記述し、本論文の位置づけを行った。

第 2 章では、イオンチャネル型グルタミン酸レセプター（iGluR）を細胞表層に提示した細胞を遺伝子工学的手法により構築し、その機能評価を行った。この細胞はリガンドであるグルタミン酸の刺激に応答し、異種細胞表層においても iGluR は機能を保持したまま細胞表層に提示されていることを明らかにした。これらのことから、この iGluR 提示細胞を薬剤評価におけるシナプス機能のバイオアッセイモデルとして利用できることが示唆された。これまでに様々なシナプス機能のバイオアッセイ手法が研究・開発されてきたが、多くは神経細胞を用いたものであり、培養そのものが煩雑であるため HTA への適用は難しかった。本研究で得られた、神経細胞から単離した iGluR が異種細胞表層でも機能を保持しているという知見から、イオンチャネル型レセプター提示細胞をシナプス機能のバイオアッセイモデルとして用いることで HTA システムへの適用が期待される。

第 3 章では、構築したシナプスモデル細胞を用いた HTA システムを構築する

ことを目的として、細胞外電位測定法への適用を検討した。シナプスモデル細胞はリガンド刺激により細胞内への特定イオンの流入を示すことから、微小電極上にシナプスモデル細胞を配置し、測定を行うことで細胞-電極界面でのイオンの偏りが生じると考えに基づき、細胞外電位法による薬剤評価系の検討を行った。リガンドを適用することで細胞が近接した微小電極と参照電極との間の電位差が発生し、シナプスモデル細胞と電極の間にはイオンの偏りが生じていることが示唆された。これらのことからイオンチャネルのチャンネルゲート機能の評価を細胞外電位測定法により行えることが明らかになった。微小電極系は様々な方法によるアレイ化、集積化されたデバイスが発表されており、このようなデバイスとシナプスモデル細胞を組み合わせることで、多チャンネルでの計測が可能である。

以上のように、本論文では中枢系薬剤評価への適用を目的としたシナプス機能のバイオアッセイモデルであるシナプスモデル細胞を構築（第2章）及びシステム化に向けた要素技術（第3章）に関する研究を行った。本論文で示したモデル細胞化という考え方とシステム化技術をうまく融合することで、より実用性の高い細胞バイオセンシングシステムを構築できるであろう。

一方で、細胞応答には細胞活性が深く関与していることが考えられるため、細胞活性のパラメータを補償することで定量的な細胞応答検出が実現できる。第4章では、薬剤評価における細胞活性の重要性について考察し、ATPを指標とした細胞活性評価デバイスの構築を行った。センサ素子としてISFETを用い、ATP加水分解反応に基づくISFETゲート界面の荷電状態の変化を測定した。ATP加水分解酵素であるアピラーゼをISFETに被覆したセンサでは反応生成物であるリン酸の電離に起因すると思われる応答が検出された。このため、測定溶液のpHに著しく影響を受けると考えられる。そこでリン酸イオンの荷電そのものを検出することを目的として、当研究室で研究を進めてきた人工酵素を被覆し

た ISFET センサを作成した。このセンサはアピラーゼ被覆 ISFET とは逆の応答位相を示し、リン酸イオンそのものを検出できていることが示唆された。これまでの細胞から放出された ATP を検出する方法としてはルシフェラーゼを用いた生物化学発光法が主なものであり、ATP 放出挙動を連続的にモニタリングすることは困難であった。本研究で示した ATP 測定法は細胞培養環境での測定が可能であり、ATP 放出挙動をモニタリングする手法として期待できる。

本論文では第 2 章から第 4 章まで論じた研究の成果、すなわちシナプスモデル細胞の構築（第 2 章）、細胞外電位測定法によるシステム化技術（第 3 章）、ATP を指標とした細胞活性センサの構築（第 4 章）の研究の成果をまとめたものである。細胞バイオセンシングは、動物細胞や微生物など生体モデルとして用いる培養細胞が外部刺激によって発信する分子的信号の動態をセンシングすることで、生体影響の評価に関する生命情報を獲得する分析技術である。この考え方に基づいて、適切なモデル細胞を構築し、それを HTA システムに組み込むことで定量的な細胞応答の検出が可能であるということが示唆された。今後、測定対象である細胞側の改変すなわち、適切な組織、疾患のモデル細胞を構築することにより、医薬品開発におけるリード化合物評価の HTA 化に寄与することを期待する。

謝辞

本論文は、九州工業大学大学院 生命体工学研究科 教授 春山哲也先生のご指導のもとに作成したものであり、多大なご指導、ご意見を賜りましたことに心より深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、九州工業大学大学院 生命体工学研究科 教授 尾川博昭 先生、准教授 加藤珠樹 先生、理化学研究所 尾笹一成 先生、ならびに北九州市立大学 国際環境工学部 准教授 中澤浩二 先生には多大なご指導、そして適切なお意見、ご助言を賜りました。ここで厚く御礼申し上げます。

細胞活性センサに関する研究にあたり、尾笹一成 先生には多大なるご助力いただきましたことに心より感謝いたします。

iGluR 遺伝子のご提供をいただきましたヘルシンキ大学 教授 Kari Keinanen 先生に深く感謝いたします。

シナプスモデル細胞の構築にあたり、ご意見、ご助言を賜りました鳥取大学 医学部 教授 押村光雄 先生、同大学 生命機能研究支援センター 准教授 大林徹也 先生に深く感謝いたします。

バキュロウイルスベクター構築にあたり、ご意見、ご助言を賜りました物質・材料研究機構 谷口彰良 先生に深く感謝いたします。

シナプスモデル細胞を用いた細胞外電位測定に関する研究を行うにあたり、ご助力をいただきました株式会社 明電舎 松本尚志 氏に深く感謝いたします。

最後に、数多くのご助力をいただきました池野慎也 先生、浅川 雅 博士、坂元博昭 氏をはじめ春山研究室の皆様方、切鼻将晴 氏、石橋伸幸 氏をはじめ春山研究室のOBの方々、ならびに様々な機会に多大なるご協力いただきました生物環境機能講座の皆様方に深く感謝いたします。

右田 聖

研究業績一覽

論文

1. MIGITA, S., OZASA, K., TANAKA, T., HARUYAMA, T.: Enzyme-based Field Effect Transistor for Adenosine Triphosphate (ATP) Sensing, *Anal. Sci.*, **23**, 45-48, 2007.
2. MIGITA, S., OZASA, K., IKENO, S. TANAKA, T., and HARUYAMA, T.: Molecular Commonality Sensing of Phosphoric Anhydride Substances Using an Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET) Covered with Artificial-enzyme Membrane, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **46**, 7539-7541 2007.
3. MIGITA, S., KEINANEN, K., and HARUYAMA, T.: Synapse Model Cell: A Cell Based Bioassay for Neural Drug High Through-put Analysis (HTA) in preparation

参考論文

1. HARUYAMA, T., ASAKAWA, H., MIGITA, S., IKENO, S.: Bio-, Nano-, technology for Cellular Biosensing, *Current Appl. Phys.*, **5**, 108-111, 2005.

国際学術会議

1. MIGITA, S., KEINANEN, K., IKENO, S., and HARUYAMA, T., Synapse model cell system: A biosensing system based on ligand-gated ion channel function to survey neural drugs, PACIFICEHM2005, Honolulu, USA
2. MIGITA, S., OZASA, K., TANAKA, T., and HARUYAMA, T., NanoBio-Tokyo 2006, 2006, Tokyo

国内学術会議

1. 右田 聖、K. KEINÄNEN、松本尚志、池野慎也、春山哲也 「シナプスモデル細胞の構築と中枢医薬スクリーニングのためのシステム化」 電気化学会第 76 回大会 熊本大学、熊本 2005 年 4 月
2. 池野慎也、尾笹一成、右田 聖、松本尚志、Kari Keinänen、春山哲也「シナプスモデル細胞を用いたバイオアッセイシステムの構築—中枢神経医薬スクリーニングへの応用を目指して—」 CREST 公開シンポジウム 研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」東京、2005 年 4 月
3. 右田 聖、尾笹一成、田中智也、池野慎也、春山哲也、「酵素／ソフトゲル層を有する電界効果トランジスタによる ATP センシング」、CREST 公開シンポジウム、研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」コクヨホール、東京 2007 年 3 月
4. 右田 聖、K. KEINÄNEN、池野慎也、春山哲也、「神経系創薬 HTA を目的としたシナプスモデル細胞の分子育種とシナプス機能モニタリングシステムの構築」、CREST 公開シンポジウム、研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」コクヨホール、東京 2007 年 3 月
5. 右田 聖、尾笹一成、池野慎也、田中智也、春山哲也、高エネルギーリン酸結合を有する化合物の人工酵素/ISFET による包括的検出、応用物理学会秋季第 68 回学術講演会、北海道工業大学、札幌 2007 年 9 月

6. 右田 聖、尾笹一成、田中智也、池野慎也、春山哲也、人工酵素／ISFET による生体エネルギー分子の包括的検出、電気化学会第 75 回大会、山梨大学、山梨、2008 年 3 月

7. 田中智也、右田 聖、尾笹一成、池野慎也、春山哲也、バイオサーベイランスを目的とした人工酵素の合成と半導体によるセンサデバイス化、日本化学会第 88 回春季年会、立教大学、東京、2008 年 3 月