

Title	機能応答性蛍光プローブの開発とバイオイメーキングへの応用 : システム生物学のためのバイオイメーキング技術
Sub Title	Bio-imaging techniques for systems biological approaches in single cells
Author	岡, 浩太郎(Oka, Kotaro)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.79- 84
JaLC DOI	
Abstract	For understanding the cellular signal transduction from the viewpoint of Systems Biology, it is primary important to develop both the quantitative cell models and also methods for verification of the model. Visualization of the spatial and temporal changes for the intracellular signal trasduction may be one of the feasible approaches for Such mOdel verification. Recently, several sophisticated methods have been developed for visualizing intracellular substances including ions (K, Na, Mg, Ca, Zi and so on), gaseous molecules (oxygen and nitric monoxide). and second messengers (Ca, IP3, and cAMP)with optical recording techniques (conventional fluorescent microscopes with high-intensity CCD cameras and confocal laser scanning microscopes). To verify the model, perturbation of the intracellular signal trasduction and observation of the relaxation process is important. This kind of experiment is easy in the computer simulation but not in real cells. The promising methods are phtalysis of caged compounds that include the bioreactive substances and chromophore-assisted laser inactivation(CALI). I believe that the combination of the intracellular imaging and perturbation techniques will be an effective method to verify the simulation of a single cell model.
Notes	綜説
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040600-0079

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

綜 説

機能応答性蛍光プローブの開発とバイオイメージングへの応用
— システム生物学のためのバイオイメージング技術 —

慶應義塾大学理工学部生命情報学科

慶應義塾大学先端生命科学研究所

おか こうたろう
岡 浩太郎

ABSTRACT

Bio-imaging techniques for systems biological approaches in single cells.

Kotaro Oka^{1,2}

¹Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology,

²Institute for Advanced Biosciences, Keio University

For understanding the cellular signal transduction from the viewpoint of Systems Biology, it is primary important to develop both the quantitative cell models and also methods for verification of the model. Visualization of the spatial and temporal changes for the intracellular signal trasduction may be one of the feasible approaches for such model verification. Recently, several sophisticated methods have been developed for visualizing intracellular substances including ions (K, Na, Mg, Ca, Zi and so on), gaseous molecules (oxygen and nitric monoxide), and second messengers (Ca, IP3, and cAMP) with optical recording techniques (conventional fluorescent microscopes with high-intensity CCD cameras and confocal laser scanning microscopes). To verify the model, perturbation of the intracellular signal trasduction and observation of the relaxation process is important. This kind of experiment is easy in the computer simulation but not in real cells. The promising methods are phtolysis of caged compounds that include the bio-reactive substances and chromophore-assisted laser inactivation (CALI). I believe that the combination of the intracellular imaging and perturbation techniques will be an effective method to verify the simulation of a single cell model.

Key Words : systems biology, imaging techniques, fluorescent probes, signal transduction, perturbation technique

細胞内での生理機能の動態を追跡することは、定量的な細胞モデルを構築する上では必須である。このような方向を目指した実験技術として種々のバイオイメージング法が考案されてきた。本解説ではそのようなバイオイメージング方法のうち、特に細胞シミュレーションに代表されるようなシステム生物学に利用できる方法につい

て説明を行う。

細胞シミュレーションのためのイメージング技術

細胞内での代謝プロセス、情報伝達を統合的に調べる方法として、単一細胞の全代謝過程を連立微分方程式で

書き下し、それを数値積分して濃度を逐次求めてゆく手法が最近になって開発されはじめてきている¹⁾。特にそのような手法で有名なものに、慶應義塾大学先端生命科学研究所で行われている E-cell とよばれる研究がある²⁾。この細胞シミュレータは CD-R 等により研究者に配付されていることもあって、赤血球、癌、神経等の細胞での結果が蓄積されてきている。しかしながら、これらのシミュレーション結果を実験的に検証しようとするとなかなか難しいことに気がつく。というのも我々は細胞内の代謝過程動態を網羅的に調べる方法を持っていないからである。高々細胞内の複数イオン種を追跡することさえもなかなか容易ではない。最近になって複数の中間代謝物濃度を計測することが可能なメタボローム技術を細胞レベルの研究に適用する試みも行われるようになってきている³⁾。

またモデルサイドから今後解決して行かなければならないこととして、細胞の空間的な広がりやを考慮したモデルづくりが必要になるものと考えられる。これは集中定数系から連続分布系、つまり偏微分方程式で記載されるようなモデルへのシミュレーション技法の拡張が必要であるということである。このような空間的に広がりを持った細胞モデルは、特に神経細胞に代表されるような機能分化が顕著な細胞のシミュレーションを行う場合には本質的に重要である。細胞膜のイオンチャネルを神経細胞の種々の部位(細胞体、樹状突起、軸索、シナプス)に対応したコンパートメントに配置し、ホジキンとハック

スレーにより定式された数式モデルにより再現しようとする試みは計算論的神経科学の一分野として盛んに行われてきている⁴⁾が、E-Cell が取り扱うことができるような細胞内代謝過程の解析への拡張ははまだ手付かずの状態である。

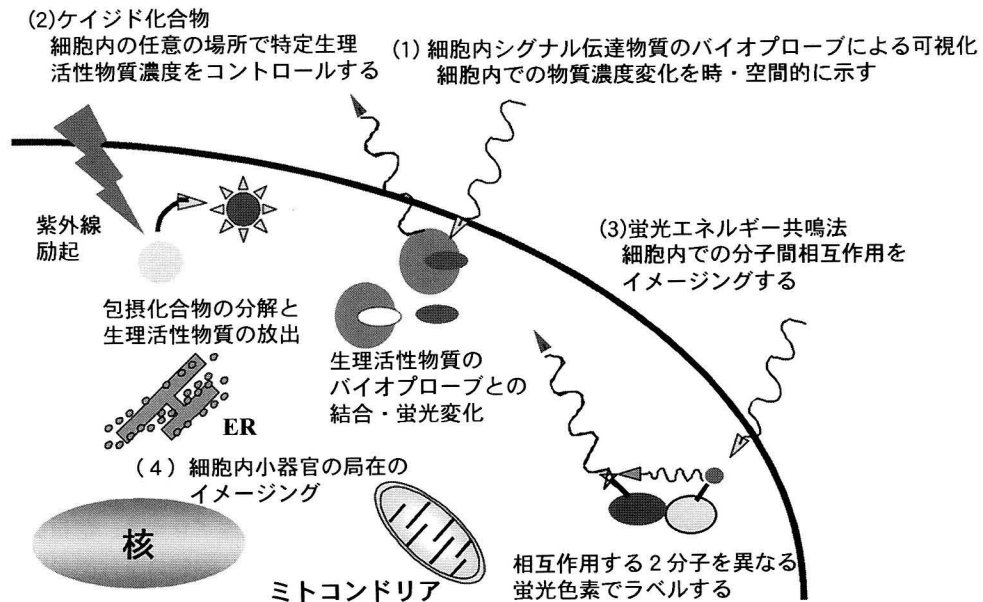
本解説では、今後のシステム生物学のターゲットになって行くと思われる、空間的な広がりをもつ細胞のシミュレーションを行う際に、車の両輪のように必要になるであろう、細胞内代謝過程および情報伝達過程の可視化技術について、その現状と展望について述べる。特に本解説では、

- (1) 細胞内情報伝達の機能応答性蛍光プローブによる可視化技術
- (2) 新規な顕微鏡技術
- (3) 観察系に擾乱を与える実験方法

に焦点を絞り、システム生物学を意識したバイオイメージング技術の紹介となるように配慮した。もちろんこれらの空間的な広がりを持つシミュレーション環境を構築・検討する際にも、ここで述べるような可視化技術は重要であると考えられる。

細胞情報伝達の可視化技術

細胞内情報伝達を「いつ、どこで、どのように」という観点から明らかにする方法として種々のプローブを用いたイメージング手法がある⁵⁾(第1図)。図中の(1)に



第1図 システム生物学のためのバイオイメージング技術の概要

ついて、まずここで取り上げたい。特定のイオン種について可視化する方法を例に取ると、例えば Ca, Mg, K, Na, Cl, Zn など枚挙にいとまがない。これらの新規な蛍光プローブに関する最新の情報は Molecular probes 社のホームページから入手することができる⁶⁾。また Ca イオン以外の細胞内セカンドメッセンジャーの可視化方法としては、蛍光エネルギー共鳴法 (FRET) を利用する試みが行われてきている (第 1 図(3), 後述)。

これらの機能応答性蛍光プローブの開発には大きく 2 つの潮流がある。まず従来より広く行われてきているのは、特定物質に選択的に結合する比較的低分子の有機物を合成し、これを適当な色素団と結合させ、細胞内に注入することによって選択性の高いプローブとしようというものである。このような研究方法は Ca イオンプローブの開発以来脈々と続けられている。同様な研究アプローチによる最近の研究として、私たちと慶應義塾大学応用化学科鈴木孝治教授の研究グループとで共同開発している細胞内 Mg 計測のための蛍光プローブ⁷⁾が、その例として挙げられる。

従来、細胞内 Mg イオン計測プローブとしては種々のものが開発されてきており、Molecular Probes 社のホームページを調べても Mg Indo-1, Mg Green などいくつかの蛍光色素を見つけることができる。しかしながらこれらの蛍光プローブは Mg 以外に Ca に関しても高い親和性を持つため、細胞へ適用した際に、実際 Mg を計測しているのか Ca が検出されているのかわからない。そこで我々は従来の分子骨格とは全く異なるクマリンに着目し、新規 Mg プローブの開発を行い、これまでに KMG-20, KMG-104 を分光学的、生物学的な検索により選びだし、細胞内 Mg イメージングを行ってきた。特に最近になって開発した KMG-104 は Mg イオンに対する結合定数が約 2 mM とほぼ細胞質中の遊離 Mg 濃度と一致しており、また KMG-20 では難しかった 488 nm での励起が可能であるため、共焦点レーザー顕微鏡による細胞内 Mg 濃度の 3 次元再構成も可能である。これらの新規 Mg プローブと fura2 などの Ca プローブを併用することにより、細胞内 Mg と Ca の同時イメージングを現在進めている。またこれら一連の研究から、従来明らかにされていなかった細胞内 Mg の動員メカニズムに関しても、新規な知見を得ることができた⁸⁾。

以上述べたような低分子有機物プローブに対し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表されるような蛍光タンパク質を改変することにより細胞内セカンドメッセンジャーを捕らえる研究が最近になって爆発的に進んできている。

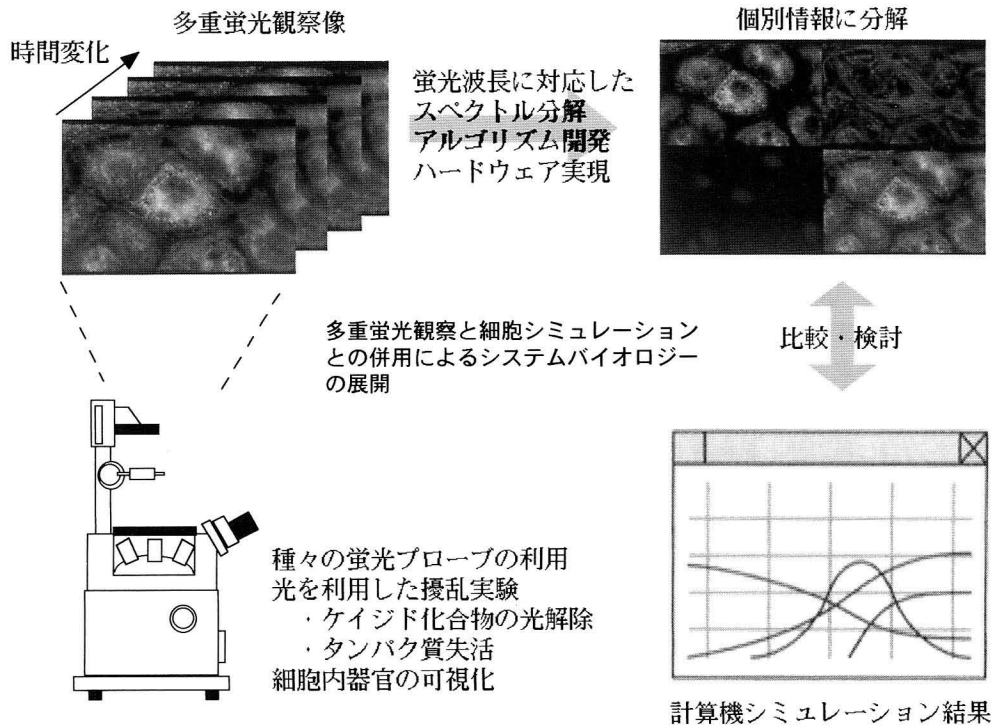
これらの研究の初期には、特に細胞内カルシウム濃度計測が注目され、最近でも G-CAMP とよばれる細胞内カルシウム濃度感受性を持つ GFP を細胞内に発現させると、連続的に細胞内カルシウム濃度の計測が可能となることが報告されている⁹⁾。また GFP を利用した細胞内情報伝達イメージングでは、細胞内でのタンパク質分子の会合と解離を利用することにより、細胞内情報伝達を可視化する試みが広く行われてきている (第 1 図(3))。また特定タンパク質のサブユニット等の解離状態を、FRET を適用することにより可視化した例として、環状アデノシンリン酸¹⁰⁾およびイノシトール三リン酸¹¹⁾の細胞内濃度変化を調べた例がある。

これらの蛍光プローブを用いた技術は次の 3 で述べられるような新規な顕微鏡技術と相性が良いために、広く用いられるようになってきているものの、未だオーダーメイドで個々の情報伝達物質に関してのプローブを開発しているのが現状である。そのため今後はプローブ開発の高速化を図る必要がある。また計算機シミュレーションを行う際には、単に濃度が上がった、下がったというよりはより定量的な変化を議論する必要がある。蛍光プローブの蛍光量から、着目している物質の絶対濃度に換算するためのキャリブレーション方法についても、できれば *in vivo* で行える方法を開発する必要がある。

新規な顕微鏡技術の開発

細胞内での情報伝達過程の追跡が簡便に行えるような環境が整ってきた一因として、蛍光像の顕微鏡観察をあげることができる。このような技術としては、微量の蛍光変化を計測することが可能なカメラの開発によるところが少なくない¹²⁾。インテンシファイヤによる増幅により、暗い蛍光像を増感して明るいイメージを取得することが可能となってきている。またここ 10 年間を見てみると、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光測定が飛躍的に進展したことも注目される¹³⁾。共焦点レーザー顕微鏡は光学断層像を取得するための装置として用いられてきた。同様に 488 nm, 514 nm で励起できる蛍光色素を用いた細胞内情報伝達過程のイメージングも容易にできることもあって、それまであまりイメージングに関係しなかった領域の研究者にも浸透していったものと思われる。特に種々のカルシウムインディケータと共焦点レーザー顕微鏡を併用した研究は非常に多くなった。

この 10 年間の間に、新規に研究者が利用できるようになった顕微鏡技術のうち、特にシステム生物学の観点から今後利用が可能であるような実験技術について以下



第2図 多重蛍光観察とデータの解析方法

に列挙してみる。

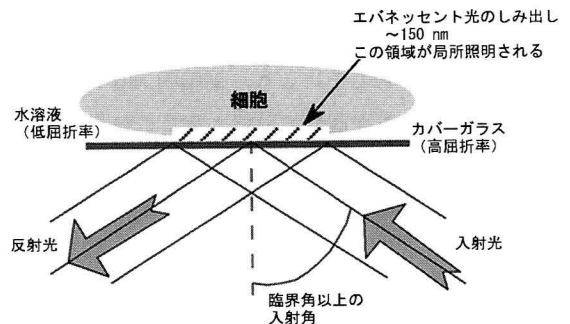
1. マルチカラー顕微鏡

これは通常の蛍光顕微鏡がフィルターを利用しているのに対して、励起にモノクロメータを利用することにより、レーザー励起の顕微鏡より任意の波長での励起が可能となる顕微鏡装置である。最近ではマルチラインのレーザー光源を利用できる共焦点レーザー顕微鏡などもこの装置の延長上にあるものと思われる。また蛍光をプリズムまたはフィルターにより選別して画像取得するような共焦点レーザー顕微鏡も多く開発されてきており、励起と蛍光観察を任意の波長で行うことが可能になってきている。特に複数の蛍光像をほぼ同時に取得することができるようなものとして、蛍光像を波長分割し、CCDカメラ上に2つまたは4つのイメージをつくる装置が市販されてきている。また共焦点レーザー顕微鏡でも複数のフォトマルを用いて（最高8つ程度）イメージを取得する装置が市販されている。複数の蛍光を同時に取得する装置は、細胞内情報伝達過程を複数・同時追跡するようなシステム生物学研究には必須と考えられる。これらの顕微鏡分光装置を組み合わせた研究を行うにあたり、複数の蛍光画像から、求めたい細胞の情報（例えば特定物質の

濃度など）を定量するためのプログラムを開発する必要がある。多変量解析的な考え方を導入し、個々の蛍光プローブの信号強度を推定する方法¹⁴⁾なども考えられる。またニューラルネットワークを利用してシグナルを分けることも可能であろう（第2図）。

2. 全反射顕微鏡

この顕微鏡は、励起光をスライドガラス上で全反射させた時にスライドガラス表面にしみ出す厚さ 100 nm



第3図 エバネッセント場を用いた近接場照明法の概略

程度のエバネッセント場を利用することにより、そこに存在する蛍光分子を選択的に励起するものである¹⁵⁾ (第3図)。この顕微鏡を用いることにより、ガラス面近傍の細胞膜直下での情報伝達過程を調べることができる。またこの顕微鏡観察方法と通常の落射蛍光観察と併用することにより、近傍のみならず細胞全体でのイメージングを行うことが可能である。この方法は特に *in vitro* における1分子イメージングに多く用いられてきたが、最近ではシナプス小胞のシナプス前膜への融合過程の観察や、細胞接着因子の観察に広く用いられるようになってきている。

3. 多光子励起顕微鏡

通常の共焦点レーザー顕微鏡とは異なり、700~900 nm 近辺の近赤外光の強いレーザーを利用して、焦点に存在する色素を多光子励起することにより光学断層像を取得することを可能とした顕微鏡である。近赤外光を利用することにより、通常の共焦点レーザー顕微鏡では観察が難しい深い組織の蛍光像を得ることができ、また取得される像の S/N がよいなどの長所を持つ。この顕微鏡を利用した研究としては、ラット錐体細胞にカルシウムインディケータを注入し、ヒゲに刺激を加えた際に錐体細胞のどの部位で細胞内カルシウム応答が生じるのかを調べた研究がある¹⁶⁾。通常の共焦点レーザー顕微鏡では脳表から深部に伸びている錐体細胞のシグナル伝達を可視化するのは難しいため、多光子励起顕微鏡の特長をもっとも生かした研究である。またこの顕微鏡は焦点面の蛍光色素を選択励起することができるために、焦点面外での色素褪色が少なく、また光ダメージが少ないなど、長時間同一の細胞を観察するような場合にも有利である。その他に多光子観察の際に興味深い現象として、励起波長のブルーシフトという現象が知られている。これは同じ蛍光色素であっても1光子励起の場合と比較して多光子励起では励起スペクトルがブロードになる現象である。これを利用すると、1光子励起では同時に励起することができない蛍光色素の組み合わせでも、多光子励起では励起できることがあり、マルチカラーイメージングに利用できる。これらの詳細に関しては他の解説を参照されたい¹⁷⁾。

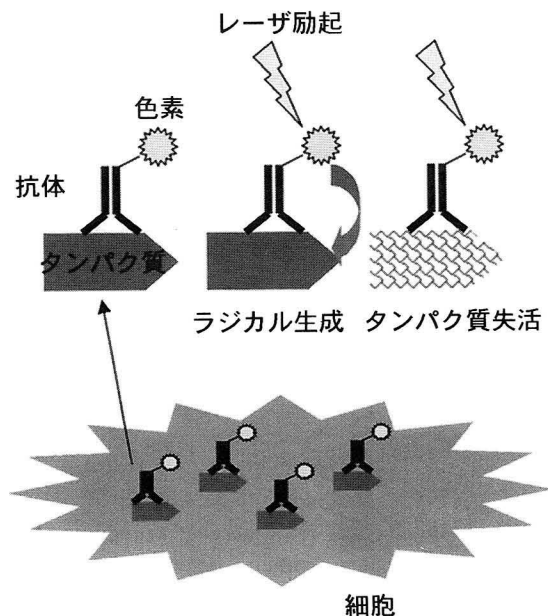
観察系に擾乱を与える実験方法

これまで述べた種々の観察方法と併用するような方法として、単に細胞内での情報伝達過程を追跡するだけでなく、種々の擾乱を細胞に加えた際の応答を解析しよ

うという試みがなされてきている。例えば細胞内にケイジド化合物とよばれる、保護基により修飾した生理活性物質（保護基により不活性化している）を導入し、適当なタイミングでこの保護基を取り除くことにより、一過的に細胞内に生理活性物質を生成する方法がある¹⁸⁾ (第1図(2)を参照)。このような実験には通常スポット状に絞った紫外線レーザーが用いられる。ケイジド化合物としては IP₃, Ca, NO, グルタミン酸など種々の細胞内信号伝達に関わる物質が合成され、市販されている。

また、例えばタンパク質の生理活性部位以外を認識する抗体を作成し、この抗体を、マラカイトグリーンに代表されるような色素でラベルし、細胞内に注入しておく。この色素に適当なタイミングでレーザー光照射を行うと、ラジカルが発生し、この抗体に結合したタンパク質を選択的に不活性化することができる¹⁹⁾ (Chromophore-Assisted Laser Inactivation, CALI 法と呼ばれる、第4図)。この方法に関しても新しい手法が開発されており、特に効率的にタンパク質を不活化するための色素の開発、および GFP を chromophore として利用できるかどうかの検討が始められている。

ここで述べたような生理活性物質を細胞内で生成または消去する技術は、計算機シミュレーションとの相性がよく、シミュレーションにおいてある時点で特定物質の濃度を0にする場合、また生理活性物質濃度を一過的に変化させることに対応した実験技術と考えられる。ま



第4図 レーザ分子不活性化法の概要

た空間的に広がりを持つ分布定数系における拡散定数の計測 (例えば細胞内での実効的なカルシウムイオンの拡散定数を計測するために、ケイジドカルシウムの光解除により細胞内で一過的にカルシウムイオン濃度を上昇させ、その時の細胞内カルシウム濃度変化を計測するなど) にも利用できる。

まとめ

本解説では分布定数系を意識した細胞の計算機シミュレーションと相補的な関係を持つウェットバイオロジーの実験方法としてバイオイメージング技術を位置付け、簡単に説明した。メタボローム解析に代表されるような、大規模かつ網羅的な中間代謝物の計測技術と本解説で説明したバイオイメージングとは、細胞内で引き起こされる代謝過程、情報伝達過程を調べる上では補完的な関係にある。つまり時間を止めて総てのパラメータを計測する方法といくつかのパラメータに限られるが経時的な変化を追跡する方法という意味である。また空間的な広がりを犠牲にしても、細胞内の代謝過程を複数の物質について追跡したいといのであれば、複数の培養細胞に異なる蛍光プローブを加え、チューニングしたマイクロプレートリーダーと組み合わせることにより、イメージングサイドからメタボローム技術の方へ歩み寄ることも可能と思われる。いずれにせよメタボローム技術とイメージング技術の組み合わせが計算機シミュレーションの詳細化とシミュレーションで得られた結果の検証に用いられていくことがシステムバイオロジーの展開を考える上でますます重要になるものと思われる (第2図)。

謝 辞

本研究は文部科学省科学技術振興調整費「システム生物学者育成プログラム」、21世紀COE「システム生物学による生命現象の理解と制御」、学術フロンティア「分子・超分子・超構造体理工学」より一部援助を受けた。

文 献

- 1) Bhalla US, Iyengar R : Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* 283 : 381-387, 1999
- 2) 中山洋一, 富田勝 : 細胞全体のコンピュータシミュレーションに向けて. *ゲノム情報生物学* (高木利久, 富田勝

- 編集). 中山書店, p. 189-205, 2000
- 3) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T : Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2 : 488-494, 2003
- 4) Koch C, Segev I : *Methods in Neuronal Modeling from Ions to Networks* (2nd ed). MIT press, 1998
- 5) 岡浩太郎, 小川宏人 : 光学測定による細胞機能の可視化. 細胞機能をリアルタイムに調べる方法. *画像ラボ*, 10 : 5-9, 1999
- 6) <http://probes.com>
- 7) Suzuki Y, Komatsu H, Ikeda T, Saito N, Araki S, Citterio D, Hisamoto D, Kitamura Y, Kubota T, Nakagawa J, Oka K, Szuki K : Design and synthesis of Mg^{2+} -selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell. *Anal Chem* 74 : 1423-1428, 2002
- 8) Kubota T, Tokuno K, Nakagawa J, Kitamura Y, Ogawa H, Suzuki Y, Suzuki K, Oka K : Na^+/Mg^{2+} transporter acts as a Mg^{2+} buffering mechanism in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303 : 332-336, 2003
- 9) Nakai J, Ohkura M, Imoto K : A high signal-to-noise ratio Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19 : 137-141, 2001
- 10) Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Yalor SS, Tsien RY : Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349 : 694-697, 1991
- 11) Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H, Iino M : Spatiotemporal dynamics of inositol 1, 4, 5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. *Science* 284 : 1527-1530, 1999
- 12) 浜松ホトニクス社ホームページ <http://hamamatsu.com>
- 13) Pawley JB : *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (2nd ed). (Ed) Pawley JB, Plenum, 1995
- 14) Eckschlager K, Danzer K : 分析化学と情報理論 (長塚義隆, 相島鐵郎共訳, 二瓶好正監訳). 培風館, 2003
- 15) 辰巳仁史 : 光近接場顕微鏡. 生命科学を拓く新しい光技術 (船津高志編集) 共立出版, p. 93-106, 1999
- 16) Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW : *In vivo* dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385 : 161-165, 1997
- 17) 河西春郎, 根本知己, 松崎政紀, 早川泰之 : 2光子励起法による神経機能研究. *生物物理*, 42 : 91-94, 2002
- 18) Ellis-Davies GCR : *Basics of photoactivation. Imaging Neurons a Laboratory Manual*. (Ed) Yuste R, Lanni F, Konnerth A, CSHL Press, New York, 24.1, 2000
- 19) 竹居光太郎, 御子柴克彦 : 神経成長円錐における機能分子の解析. CALI法による局所的分子ターゲティング. *実験医学*, 17 : 2105-2113, 1999