

平田智也は「細胞膜近傍のカリウムイオン濃度変化を可視化するタンパク質複合型蛍光プローブの開発」と題し、以下の研究を行った。

カリウムイオン (K^+) は細胞内に最も豊富に存在する金属イオンであり、神経伝達や筋肉の運動、細胞増殖など様々な生命現象に関わっている。細胞膜上の K^+ チャネルは K^+ の動的挙動を担う中心的存在であり、その活動に伴う K^+ 濃度の時間的・空間的挙動を細胞系、さらには組織レベルで可視化する手法は、基礎的な生命現象や病態の理解に加えて、創薬においても非常に重要である。 K^+ チャネル活性の評価方法としてはパッチクランプ法が汎用されているが、空間的情報を得ることが出来ない上、スループットにも課題がある。また、PBFI (*J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19449-19457) や TAC-Red (*Nat. Methods*, **2005**, *2*, 825-827) など K^+ 選択的キレーターを認識部位に用いた K^+ 蛍光プローブもいくつか報告されているが、既存のプローブは細胞内もしくは細胞外液全体に存在するため、細胞にとって重要な『細胞膜近傍』の K^+ 濃度変化を感度よく検出することはできなかった。そこで平田は、細胞膜近傍における K^+ 濃度変化を選択的かつ高精度に可視化可能なイメージングツールの開発を指向し、細胞膜上への選択的な集積が可能なタンパク質複合型 K^+ 蛍光プローブの開発を行った。

1. タンパク質複合型 K^+ 蛍光プローブの設計

平田はまず、 K^+ プローブを細胞膜上に局在させる手法として「脂肪酸による修飾」、「抗原抗体反応の利用」など数種について予備的な検討を行ったが、これらの手法では小分子蛍光プローブの物理的・光学的性質を維持したまま細胞膜へと集積させることが困難であることが示唆された。そこで平田は、タグタンパク質技術を活用した新たな検出系を設計した。即ち、まず小分子プローブと選択的に共有結合する「足場」として HaloTag タンパク質 (*ACS Chem. Biol.*, **2008**, *3*, 373-382) を標的細胞に遺伝子導入し、細胞膜上に発現させる。続いて培地に細胞外滞留性の K^+ プローブを添加し、HaloTag タンパク質に共有結合させる。この K^+ プローブが細胞膜近傍における K^+ 濃度変化を認識して蛍光を発する。従って、ここで用いる K^+ プローブは①生理的な条件下で K^+ に選択的に応答して蛍光が変化すること、②HaloTag タンパク質との結合部位を持つこと、③タンパク質との結合後も K^+ プローブとしての機能を保持すること、④細胞膜を透過しないこと、の4つの条件を満たす必要がある。平田は複数の蛍光団と K^+ 認識部位の組み合わせを合成・評価した結果、BODIPY 構造を蛍光団に持ち、 K^+ 認識部位として triazacryptand 構造を備えた TAC-Lime を K^+ プローブの母核部分として選択した。さらに、TAC-Lime と HaloTag ligand 構造とを結合するスパーサー部分の構造最適化を経て、上記の条件を全て満たす K^+ プローブ TLSHalo を開発した。

2. TLSHalo の機能評価

TLSHalo は K^+ 非存在下では光誘起電子移動 (PeT) による消光を受けているが、HEPES 緩衝液中において生理的濃度の Na^+ の存在下でも K^+ 濃度の増加に伴って緑色蛍光が約 10 倍に増大した。また、他のタンパク質 (BSA) 共存下でも目的の HaloTag タンパク質と選択的に共有結合し、結合後も K^+ プローブとしての機能を保持していた。TLSHalo は 2 つのスルホ基を有するため細胞膜透過性が低く、HeLa 細胞の細胞膜上に発現させた HaloTag タンパク質を選択的に標識することに成功した。さらに、この細胞に対して K^+ を添加したところ、外液の K^+ 濃度増加に伴って蛍光が増大する様子が観察された。また K^+ 非応答性の赤色蛍光 HaloTag ligand である Alexa660halo と共染色を行うことで、細胞ごとの HaloTag タンパク質の発現量の差や焦点面のずれによる蛍光分子数の変化などの影響を除き、細胞膜近傍における K^+ 濃度の変動を定量可能な測定法を構築することに成功した。

3. TLSHalo を用いた細胞膜近傍における K^+ 濃度変化の検出

まず、TLSHalo が K^+ 濃度の変化に対して迅速な応答を見せるかを検討すべく、マイクロインジェクション

装置を用いて細胞膜近傍に微量の高濃度 KCl 溶液を局所添加し、細胞膜上の蛍光強度変化を経時観察した。その結果、TLSHalo で標識した細胞表面においては K⁺を添加した位置に近いほど即時的に大きな蛍光強度上昇が見られ、引き続き K⁺の拡散に伴って速やかな減弱が見られた。また添加位置から離れるに従って蛍光上昇の始まりは遅く、最大強度も小さくなった。NaCl 溶液を添加した場合や K⁺非応答性の蛍光分子で細胞膜を染色した場合にはこのような変化は見られなかった。以上の検討から、TLSHalo を用いて各細胞の膜上における局所的な K⁺濃度変化をリアルタイムに可視化できることが示された。このような空間情報の取得は、パッチクランプ等の電気生理的手法では不可能である。一方、同様の実験を従来の細胞外滞留型の K⁺プローブである TAC-Lime_{dex} (*J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 7794-7795) を用いて行った場合には、細胞外液全体に K⁺プローブが存在するためバックグラウンド蛍光が非常に高くなり、細胞膜近傍の K⁺濃度変化を検出することは困難であった。

続いて、細胞内からの K⁺流出に伴う細胞外液の K⁺濃度変化を TLSHalo により検出することを試みた。まず K⁺の ionophore を用いて外液への K⁺流出を惹起することとした。脳切片や血管壁など、生体内において K⁺濃度変化が重要な意味を持つ部位においては細胞外液の体積は限られており、細胞は自分自身や周辺の細胞から流出する K⁺による K⁺濃度変動に晒されている。そのような環境を模して、ionophore の添加直後に観察部位にカバーガラスを載せることで K⁺の拡散可能な細胞外液の体積を限局した状態でイメージングを行った。その結果、ionophore 添加によって細胞膜上の緑色蛍光の経時的な増大が観察された。最後に、細胞内に存在する K⁺チャネルを刺激することによる K⁺流出の検出を試みた。具体的には、Ca²⁺依存性 K⁺チャネルである BK チャネルを発現する HT29 細胞を用いて、BK チャネルの開口に伴う K⁺流出を惹起した。ionomycin による Ca²⁺刺激の直後にカバーガラスを載せてイメージングを行ったところ、細胞膜上の緑色蛍光の経時的な増大が観察された。この蛍光増大は細胞内 Ca²⁺のキレーターである BAPTA や BK チャネル阻害剤である iberiotoxin の添加によって抑えられたことから、イメージング結果が BK チャネルを介して流出した K⁺による細胞膜近傍の K⁺濃度上昇を反映していることが強く示唆された。更に、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) とパッチクランプシステムを用いた実験により、細胞に脱分極刺激を与えた際に BK チャネルを通じて細胞外のエキストラセプト場に流出する K⁺をイメージングすることにも成功した。

まとめると、平田は有機小分子蛍光プローブの精密な設計・合成により、細胞膜近傍で起こる K⁺濃度変化をリアルタイムかつ選択的に検出可能なタンパク質複合型 K⁺プローブの開発に初めて成功した。また、開発したプローブを用いて生細胞における K⁺チャネルを通じた細胞膜上の K⁺濃度変動を可視化した。細胞表面の K⁺濃度変化は生理的に重要な意義を持つと考えられ、本研究で開発したプローブはその解明の一助となるものである。

以上の業績は疾患の機能解明や創薬に関する薬学研究の進歩に大きく貢献するものであり、博士 (薬科学) の授与にふさわしいものと判断した。

