

博士(医学) 安達英輔

論文題目

A technique for monitoring multiple signals with a combination of prism-based total internal reflection fluorescence microscopy and epifluorescence microscopy

(プリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡法の連結システムを用いた複数の細胞内シグナル伝達経路の同時計測手法)

論文の内容の要旨

[はじめに]

全反射照明蛍光顕微鏡は開口放出のメカニズムなど細胞膜直下の生体分子の動態の解析に有用であるが、従来の対物レンズ型全反射照明顕微鏡は細胞膜より離れた細胞質内の計測や多数の細胞を同時に観察することには適していなかった。我々はプリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、多数の細胞で細胞質内と細胞膜表面の蛍光分子の動態を同時に計測可能なシステムを構築した。細胞内シグナル伝達は GPCRs (G-protein coupled receptors) を介した Ca^{2+} 、cyclic adenosine monophosphate (cAMP)、diacylglycerol (DAG) などのセカンドメッセンジャーにより仲介されている。特にインスリン分泌シグナルでは複数のセカンドメッセンジャーが関与する経路の相互作用が注目されており、我々は本システムを用いて3つのシグナル伝達経路の同時計測を行った。

[材料ならびに方法]

細胞内 cAMP 濃度及び Ca^{2+} 濃度は、両端に yellow fluorescent protein (YFP) と cyan fluorescent protein (CFP) を結合させた cAMP 結合タンパク (epac1-camps)、及び Fura-2 をそれぞれのプローブとして測定した。DAG の産生は、C1ドメインに red fluorescent protein (RFP) を結合させた protein kinase C γ (C1₂-mRFP) の細胞質から細胞膜への移動を指標に解析した。測定装置はオリンパス倒立顕微鏡 (×20, 開口数(NA)= 0.45; ×40 NA= 0.6, LUCPlanFL N) と励起/蛍光フィルターウィールセット/ウィール制御装置 (MAC 5000 Ludl Electronic Products, Hawthorne) を用いた。始めにプリズム式全反射照明顕微鏡による DAG の可視化技術を確立した後、cAMP/ Ca^{2+} /DAG がお互いに干渉せず同時に計測できる実験系を構築し、その正当性を評価した。その後、linear unmixing を用いることにより計測ウィンドウ内の蛍光のオーバーラップを評価した。さらに、ラット膵β細胞株である Ins1 細胞内でインスリン分泌シグナルを観察した。

[結果]

ATP 刺激 (50 μM) に伴う DAG の産生による C1₂-mRFP の膜表面への移動をプリズム式全反射照明蛍光顕微鏡により計測すると、細胞膜近傍の蛍光強度の約 40% の増強として定量できた。本システムでは 63 個の細胞を同時に観察することが可能であった。このプリズム式全反射照明顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡を組み合わせた同時計測システムを構築し Cos-7 細胞内に 3 つのプローブを導入した。cAMP 薬理学的アゴニスト (Br-cAMP) を投与すると epac1-camps の蛍光が対称的に変化し、他のプローブの蛍光変化は観察されなかった。DAG アナログ (1,2-dioctyl-sn-glycerol、Dic8) や Ca^{2+} イオノフォア (ionomycin) を導入しても同様に他のプローブの計測ウィンドウには影響を与えずに C1₂-mRFP の蛍光強度の変化が観察可能であった。Cos7 細胞のプリン体受容体は

cAMP/Ca²⁺/DAG による3つのセカンドメッセンジャーを介したシグナルを同時に惹起することがわかっている。対応する3つのプローブを導入した細胞を ATP (50 μM)により刺激すると cAMP/Ca²⁺/DAG 細胞内濃度が同時に変化の様子が観察された。cAMP/Ca²⁺/DAG 細胞内濃度の同時計測に対して linear unmixing を行うと、Ca²⁺の計測ウィンドウにのみ僅かな CFP 蛍光の漏れ込みがあったものの cAMP、DAG の計測ウィンドウ内には他の蛍光のオーバーラップはなかった。さらに INS-1細胞内でインスリン分泌におけるセカンドメッセンジャーの相互作用を観察することができた。

[考察]

プリズム式全反射照明蛍光顕微鏡は低倍率/低 NA のレンズを用いても、優れたシグナルノイズ比で細胞内タンパク質の細胞膜への移動を観察することができた。細胞のサイズや CCD カメラにもよるが数十個の細胞の同時計測にも成功し、より定量的な測定が可能であった。蛍光スペクトルの広がりによる計測ウィンドウ内の蛍光のオーバーラップは蛍光顕微鏡の実験に内在する問題であるが、このシステムでは適当なフィルターセットの選択とプローブの導入量を調節することにより、これを解消することができた。また linear unmixing を用いてオーバーラップを評価することができ、その正当性を証明できた。GPCR はヒトの遺伝子の 1%以上を占めており、臨床で使用されている薬剤の半数以上が GPCR のリガンドとして作用しているため、このシステムはドラッグスクリーニングにも応用可能であり、高い汎用性が期待される。

[結語]

我々はプリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡と組み合わせることにより、細胞質内と細胞膜表面の動態を同時に計測し、cAMP/Ca²⁺/DAG の同時計測を行うシステムを構築することに成功した。インスリン分泌シグナルのように複数の経路の相互作用がある細胞内シグナル伝達の解析に有用である。

論文審査の結果の要旨

全反射照明蛍光顕微鏡は開口放出のメカニズムなど細胞膜直下の生体分子の動態の解析に有用である。一方、従来の対物レンズ型全反射照明顕微鏡は細胞膜より離れた細胞質内の計測や多数の細胞を同時に観察することには適していなかった。

申請者らは、プリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、同一細胞群を対象に細胞内 cAMP 濃度、Ca²⁺ 濃度、DAG 産生など多種のシグナルの経時的変化を同時計測するシステムを本研究で構築した。細胞内 cAMP 濃度及び Ca²⁺ 濃度は、両端に yellow fluorescent protein (YFP) と cyan fluorescent protein (CFP)を結合させた cAMP 結合タンパク(epac1-camps)、及び Fura-2 をそれぞれのプローブとして用い、DAG の産生は C1 ドメインに red fluorescent protein (RFP) を結合させた protein kinase C γ (C1₂-mRFP)の細胞質から細胞膜への移動を指標に解析した。3つのプローブを導入した Cos7 細胞を ATP (50 μM)により刺激すると cAMP/Ca²⁺/DAG 細胞内濃度が同時に変化の様子が観察された。さらに INS-1細胞内でインスリン分泌におけるセカンドメッセンジャーの相互作用を観察することに成功した。

申請者らは本研究において、プリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、細胞質内と細胞膜表面の動態を観察し、多種のシグナル変化を同時計測可能な

システムを構築することに成功した。また **linear unmixing** を用いて、蛍光スペクトルの広がりによる計測ウィンドウ内の蛍光のオーバーラップの問題を検討し、Fura-2 の蛍光がわずかに過小評価されるが、本システムにより得られる結果は適切であることを確認した。本研究は、リガンド刺激下のシグナル伝達の序列決定に有用であり、新たなドラッグスクリーニング技術としても高く評価される。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 渡邊 裕司
副査 福田 敦夫 副査 山本 清二