

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650055

研究課題名(和文) 大きさと色素数を厳密制御した蛍光プローブによる細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の高時空間分解研究課題名(英文) Fluorescent Ca<sup>2+</sup> probe for high-resolution Ca<sup>2+</sup> imaging

研究代表者

鈴木 団 (Suzuki, Madoka)

早稲田大学・重点領域研究機構・准教授

研究者番号：40350475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新しいCa<sup>2+</sup>測定技術の開発を目的とした。初年度に合成した化合物を用いてプローブを準備した。プローブに最適となる顕微鏡系を新規に準備した。HeLa細胞を刺激した際に生じる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化がどのように計測されるかについて、顕微鏡下で評価した。しかし蛍光強度が低く、広くパラメータをふった条件を検討するにあわせ、顕微鏡系を再検討したが、十分なシグナル・ノイズ比を得られないことが次年度に明らかとなった。そこで、得られた知見を活用し、別のプローブに移行した。またこれと並行して、プローブを細胞内小器官へ選択的に集積させる仕組みを導入した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a novel fluorescent Ca<sup>2+</sup> probe. In the first fiscal year (FY), we prepared new probes by using compounds newly synthesized. The microscopy setup was arranged to fit these probes. The probes were evaluated in HeLa cells under stimulus. However, in the second FY, we found that the fluorescence intensity was insufficient to obtain sufficient signal-to-noise ratio. Thus, we moved on to the next probe based on the knowledge gained in this study. We also incorporated the ability of targeting into the probe.

研究分野：生物物理学

キーワード：可視化 生物物理 ナノ材料 マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織

### 1. 研究開始当初の背景

Ca<sup>2+</sup>シグナルは、生命活動の階層を通して普遍的に働く情報伝達機構である。1980年代に Tsien らが開発した Quin2 に端を発した低分子の Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブや、宮脇・永井らが開発した Cameleon に始まる純タンパク質性の Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブの発展と共に、Ca<sup>2+</sup>の分布・挙動に関する研究は大きく進歩してきた。

### 2. 研究の目的

生命活動の基本的な情報伝達機構であるCa<sup>2+</sup>シグナルを、高い時間分解能と空間分解能で記述できる測定技術を開発する。既存のCa<sup>2+</sup>蛍光プローブとは異なり、ナノ粒子化する。試験管内だけでなく生きた細胞内でも評価し合成ヘフィードバックすることを繰り返し、完成度を高める開発方針をとる。

### 3. 研究の方法

まずプロトタイプのデンドリマーを合成し、既存の顕微鏡系によるプレ評価を行った。最後の反応で外表面をCa<sup>2+</sup>蛍光プローブで修飾し、デンドリマーの蛍光ナノ粒子型Ca<sup>2+</sup>プローブを新規に合成した。以下の評価⇔合成のサイクルを加速して研究を進めた。

プローブ評価を行う細胞として、取り扱いが簡便な培養細胞のHeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来)を用いて、細胞毒性、細胞への取り込まれ方(一様に分散するか、細胞内小器官に局在するとしたらどこか)、蛍光強度、Ca<sup>2+</sup>応答性を評価した。例えば細胞の核膜は~45kDaまでの物質は自由に透過でき、色素分子は細胞質も核も拡散する。粒径が大きくなるにつれ、核が暗く抜けて細胞質だけ

が染まることが予想された。

以上の過程は新規材料の細胞内評価であると同時に、HeLa細胞の細胞質、及び核内のCa<sup>2+</sup>動態を高い時間・空間分解能で測定できることをデモンストレーションする目的もある。そこで細胞内でCa<sup>2+</sup>貯蔵を担うERに着目し、高空間分解能でのみ測定できる部位特異的なCa<sup>2+</sup>放出・取り込みの詳細を明らかにすることを目指した。シグナル分子であるヒスタミンによりHeLa細胞はCa<sup>2+</sup>振動を示すが、これをモデル系として微細なダイナミクスを解析することを試みた。

さらに任意の細胞内物質を標的にできる機構の組み込みを行った。最終的には、蛍光ナノ粒子プローブ群の構築を指向し、Ca<sup>2+</sup>以外のパラメータを検出するプローブの設計を行った。

またCa<sup>2+</sup>応答の計測対象となるモデル細胞として、ガン化したHeLaだけでなく、正常細胞での検討も進めた。その過程で、正常二倍体細胞として細胞周期研究や加齢研究にも使用される、ヒト胎児肺由来の線維芽細胞WI-38にて試験を行った。

### 4. 研究成果

Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブは、本合成で最もステップ数の多い化合物となるが、本研究開始後にこれの合成を終えた。そこでまず、プロトタイプの蛍光プローブにより既存の顕微鏡系を用いたプレ評価を行った。HeLa細胞をモデル細胞として、細胞内での評価も行った。蛍光強度、バックグラウンド、シグナル・ノイズ比、細胞毒性、細胞内での分散性、細胞内での局在能の付加、といった基本情報を得て、これをプローブ合成ヘフィードバックした。これら予備的実験による基礎データを元に、一つのプローブの設計指針に到達した。そこ

で、次のプローブ合成を行い、これについての評価を進めた。顕微鏡系はプローブに合わせ、最適となるよう変更した。生きた HeLa 細胞内にプローブを導入し、プロトタイプと同様に、シグナル・ノイズ比、細胞毒性、細胞内での分散性、細胞内での局在能の付加といった基本性能を確認した。これらとあわせ、HeLa 細胞を刺激した際に生じる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化がどのように計測されるかについて、顕微鏡下での評価を試みた。

しかし  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光プローブの蛍光強度が低く、広くパラメータをふった条件検討を行うのにあわせ、顕微鏡系の再検討も行ったが、十分なシグナル・ノイズ比を得られないことが次年度の初期に明らかとなった。そこで、ここまで得られていた知見を活用することで、別のパラメータを計測できるプローブの開発へと移行した。またこれと並行して、プローブを細胞内小器官へ選択的に集積させる仕組みを導入した。これらについては成功した。

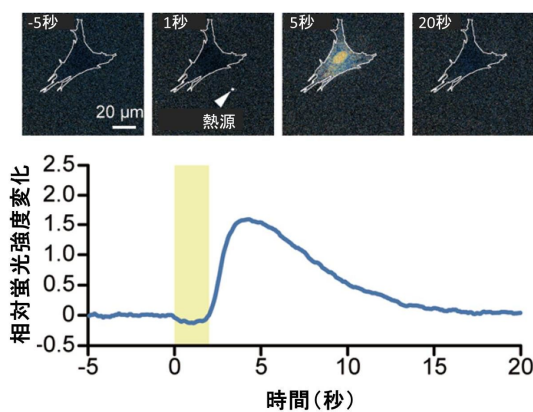


図. ヒト由来正常線維芽細胞 WI-38 で見出された、熱パルスに反応する  $\text{Ca}^{2+}$  バースト。上、 $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬に対応する蛍光像。白線で囲まれた領域に細胞が一つある。下、蛍光像の時間変化を数値化したグラフ。黄色の帯部で熱パルスを与えた。

一方、ヒト由来の正常線維芽細胞 WI-38 の試験を進めるなかで、細胞に局所加熱法を利用した熱パルスを与えると、細胞が熱パルスに反応して、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が急激に上昇したのち、ゆるやかに減衰する現象が見出された

(図)。この現象について詳細な解析を進め、反応の温度条件を明らかにした。さらに反応を引き起こす候補タンパク質の阻害剤を用いることで、細胞反応に寄与する分子を求め、反応の分子メカニズムを説明することに成功した。本成果を、本研究の研究代表者を Co-corresponding Author として BIOPHYSICS 誌に発表した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Itoh, H., Oyama, K., Suzuki, M.\*, Isiwata, S.\* (\*Corresponding authors)  
Microscopic heat pulse-induced calcium dynamics in single WI-38 fibroblasts.

*BIOPHYSICS* **10**, 109-119 (2014)

査読有

DOI:

<http://doi.org/10.2142/biophysics.10.109>

[学会発表](計1件)

Itoh, H., Oyama, K., Suzuki, M., Lane, E.B., and Ishiwata, S.

Single cell analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  bursts in response to microscopic heat pulses.

UK-Singapore Skin Research Symposium

2015年3月11日~14日、Singapore

[図書](計1件)

鈴木 団

熱パルスによる細胞機能の素早い変調

「一分子生物学」(石渡信一、原田慶恵)

編入、化学同人、262-263(2014)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 団 (SUZUKI, Madoka)

早稲田大学・重点領域研究機構・主任研究  
員 ( 研究院准教授 )

研究者番号 : 4 0 3 5 0 4 7 5

### (2)研究分担者

新井 敏 (ARAI, Satoshi)

早稲田大学・重点領域研究機構・招聘研究  
員

研究者番号 : 7 0 4 5 4 0 5 6