

細胞内プロテアーゼ活性の *in vivo* 定量法

千葉和義

in vivo、リアルタイムで細胞内の酵素活性を定量する、もしもこれが可能になれば、情報伝達や刺激応答に伴うであろう素早い活性変化を追跡できる、細胞を破壊するために生じるかもしれないアーティファクトの心配もない、さらに1細胞で測定すれば、量的に十分調製できない貴重な試料においても対応可能となる、このような要求を満たすためには、どのような技術が必要となってくるのだろう、

Key words 【細胞内プロテアーゼ】【酵素活性】【蛍光基質】【*in vivo*】
【プロテアソーム】

はじめに「細胞を生かしたまま、細胞内のプロテアーゼ活性を定量すればいいんじゃないですか？」本研究のきっかけとなった発言である。議論の焦点はヒトデ卵内のプロテアーゼ活性で、それまで卵細胞を破碎後、適当な緩衝液に希釈して測定されていた、しかし、そのような破壊検査では、酵素活性の制御機構が取り除かれてしまう恐れがある、それを避けるには、細胞を生かしたまま、測定すればよいのだが……、

「市販されている MCA 基質(ペプチジル MCA^{*1}, 図 1a) を卵にマイクロインジェクションして、蛍光が増加するのを観察すればいいと思います。MCA 基質がプロテアーゼによって分解されると、発蛍光性の AMC^{*2} が生じるので、その蛍光量を測定するのです」などとえらそうに指摘したのだが、アイデアはまったく単純で、普通に用いられている生化学的な測定法をそのまま生きた細胞にあてはめただけである。“ピペットマンで吸いとった基質を、試験管内の酵素溶液に移す”ところを、“マイクロインジェクション装置の微小針に詰め込んだ基質を、細胞に注入する”だけの違いなのだ、いかにもうまくいきそうなので、さっそく試して

みたところ、いきなり出鼻をくじかれた、というのも、発蛍光性の AMC を卵にインジェクションしたところ、みるみるうちに卵の蛍光強度が下がっていったのだ(図 2 上段)。考えてみれば、AMC は比較的水に溶けにくい、水に溶けにくいものは、油(または細胞膜)に溶けやすいので、細胞膜に潜り込んだ AMC は細胞外に素早く漏れ出てしまう、酵素活性の指標となる蛍光物質が細胞外に出てしまうために、分解速度の定量は不可能なのだ、したがって、細胞から漏れ出ない蛍光物質、すなわち親水性の蛍光物質でつくられたプロテアーゼ基質がほしいということになった、

そこで当時筆者の指導教官であった星 元紀博士(現慶應大)が、横沢英良博士(北大・薬)に紹介していただいたのが、佐藤英助博士(現青森大)で、まさに親水性のプロテアーゼ基質用蛍光物質: ACMS^{*3}(図 1b)を開発されていた¹⁾、水に溶けやすい ACMS なら、細胞内の酵素活性測定にも使用できるかもしれない、さっそく送っていただいた ACMS を、ヒトデ卵にマイクロインジェクションしたところ、見事に細胞内の蛍光は維持されて、まったく漏れ出ないことが確かめられ

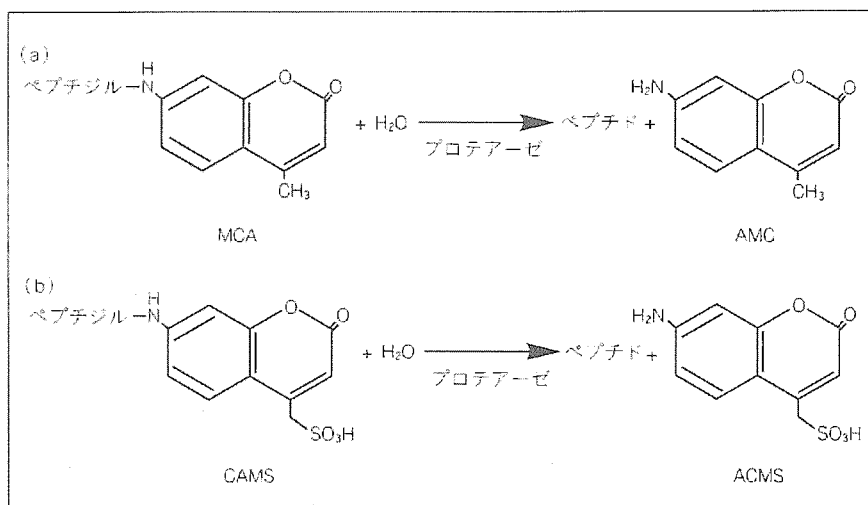


図1 蛍光基質の分解反応

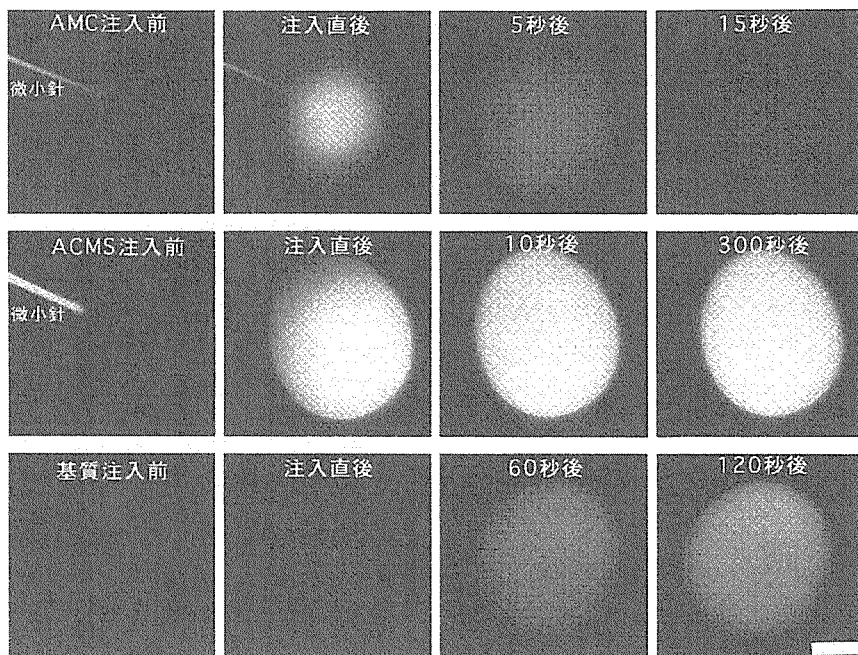


図2 蛍光物質と蛍光基質のヒトデ卵へのマイクロインジェクション(蛍光顕微鏡写真)
 上段：蛍光物質 AMC を卵にインジェクション、AMC はすみやかに卵外に拡散していく。中段：
 蛍光物質 ACMS を卵にインジェクション、ACMS は卵内にとどまっている。下段：Suc-Phe-Leu-
 Arg-CAMS を卵にインジェクション、時間が経つと基質が分解され、生成された ACMS の蛍光
 量が増加するのが見える。バーは 50 μm。

た(図2中段)。細胞内酵素活性測定の第1段階をクリアしたわけだ。

る。しかし相手が細胞であると、激しく振り回しても細胞が破壊されるだけで、細胞内には拡散しない。Z-Phe-Leu-Arg-CAMS も最終濃度が十分薄ければ水溶

I. プロテアソーム活性

そのころから研究室の沢田均博士(現 北大)は、ヒトデ卵の減数分裂再開時に細胞内高分子量プロテアーゼ(プロテアソーム)が関与しているのではないかと予測していた²⁾。ヒトデ卵のプロテアソームは、Phe-Leu-Arg の配列を認識し、よく分解する。そこで佐藤博士に Z-Phe-Leu-Arg-CAMS^{*1}(Z:保護基)を合成していただき、マイクロインジェクションしてみようという運びになった。

さて、待ちに待った Z-Phe-Leu-Arg-CAMS が届いたのだが、これが期待に反して水に溶けず、研究はまたもや座礁してしまった。DMSO(dimethyl sulfoxide)にならよく溶けるのだが、これをマイクロインジェクションするとすぐに析出して顆粒状になってしまうのだ。それだけでなく、100%のDMSOは細胞の膜構造を破壊するなどの好ましくない効果をもたらした。市販のMCA基質も水に溶けにくいものが多いので、通常は10mM程度になるようにDMSOに溶かしている。これをアッセイ用の水溶液中に投入し、すみやかに攪拌することで、何とか水溶液にしてい

*1 peptidyl-4-methyl-coumaryl-7-amide
 *2 7-amino-4-methylcoumarin
 *3 7-aminocoumarin-4-methanesulfonic acid
 *4 N-carbobenzoxy-Phe-Leu-Arg-coumarylanido-4-methanesulfonic acid

液になるが、これをマイクロインジェクションするとさらに薄まり、酵素活性の測定は困難だ。

困り果てていたところ、佐藤博士の提案で、保護基をスクシニル基(succinyl-; Suc-)に変えた Suc-Phe-Leu-Arg-CAMS を新たに合成していただき、試してみることになった。保護基 Z よりも Suc のほうが親水性が高いとの考えだ。どきどきしながら新合成品に水を加えてみたところ、これがやっぱり溶けにくい。しかしごく少量の DMSO にあらかじめ溶かしておくと、よく水に溶けることがわかり、十分実用に耐える高濃度(5 mM)の水溶液をつくることのできた(10%の DMSO を含んでいるが、細胞毒性はなかった)。このように書くと、最速で研究が進んだようだが、少量の DMSO にあらかじめ溶かすという単純なことがずっと思い浮かばず、本研究は頓挫したままの状態が続いていたことを付け加えておく。

これをヒトデ卵母細胞にマイクロインジェクションするとすみやかに細胞内に拡散し、蛍光量が増加していった(図 2 下段)。基質は水に溶けていなければならぬという第 2 関門を突破し、基質の分解も確認できたわけだ。この基質は細胞内のサイトゾル(細胞膜より内側であり、リソソーム、小胞体、さらにミトコンドリアなどの外側の領域)に存在するので、プロテアソーム活性を観察しているのではないかと期待できた。

II. 細胞内酵素活性の観測法

これでいよいよ、生きた細胞中で酵素反応を定量する準備が整ったわけだが、実験ごとに基質濃度が異なれば、反応速度の定量・比較はできない。したがって、細胞内での基質初濃度($[S]_0$)*5 を知っておく必要がある。本研究で用いた細胞は卵であり、球形なので(直径を測定すれば)体積は容易に求められる(ヒトデ卵 1 個では約 2nl)。また、マイクロインジェクションした基質体積も求められるので(数 pL~数十 pL)(図 3)、この問題は解決された(しかし厳密には、オルガネラの体積を求めることができないので、サイトゾルのみの体積は未知である。よって本研究では、便宜上オルガネラの体積を 0 とし、基質分解初速度(V_0)*6 を求めた)。

分解産物である ACMS の蛍光強度は、蛍光顕微鏡に光電子増倍管を接続して定量可能だ(図 4) [測定原理

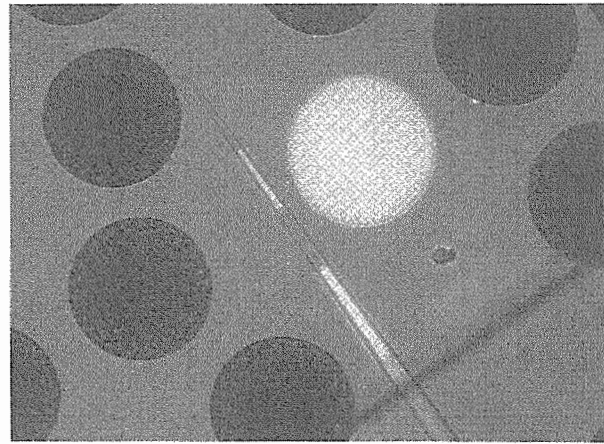


図 3 ACMS のウニ卵へのマイクロインジェクション(明視野顕微鏡と蛍光顕微鏡の二重露光写真)

視野中央に ACMS をマイクロインジェクションされて光っている卵が観察できる。マイクロインジェクションされていない卵は、明視野顕微鏡では暗く写っている。その近くに ACMS を 2カ所込めた微小針が写っている。針の中で ACMS が光っていない部分にはシリコンオイルが込められている。このようにシリコンオイルとシリコンオイルの間に定量的に蛍光物質や蛍光基質を込めることができるので、それらをマイクロインジェクションしたあとの卵内濃度も求めることができる。〈表紙参照〉

は、分光蛍光光度計と同じ。もちろん酵素が入っているセルは、石英セルじゃなくて生きたセル(細胞!)。ただし一般に細胞は自家蛍光をもっているのだから、マイクロインジェクション前に、その値(A、図 5 では 10)を記録しておく。次に既知濃度、既知体積の ACMS をマイクロインジェクションして蛍光強度(B、図 5 では 40)を定量する。B から A を引くと、蛍光量と ACMS 濃度が定量的に対応するようになる。これはキャリブレーションであり、蛍光量から細胞内の ACMS 濃度を求めるために必須の作業だ。ひき続きプロテアーゼ基質をマイクロインジェクション後、すみやかに蛍光強度の測定を開始する。本研究では 10 秒ごとに励起光を卵にあてて、発生する蛍光量を定量した(図 5)。連続して励起光を照射すると、消光が起こったり、卵にダメージが生じる可能性があるためだ。以上まとめると、自家蛍光の測定→ACMS マイクロインジェクション→蛍光の測定→基質マイクロインジェクション→10 秒ごとに蛍光の測定、という流れになる。

*5 initial concentration of substrate

*6 initial velocity of hydrolysis of the substrate

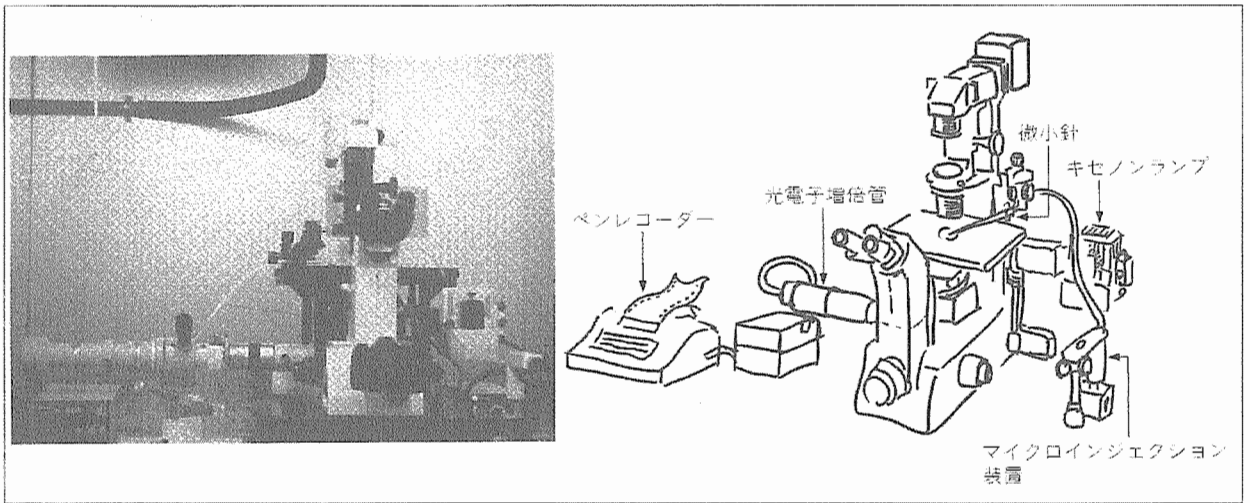


図4 蛍光顕微鏡にマイクロインジェクション装置と光電子増倍管を接続して、細胞内プロテアーゼ活性の *in vivo*, リアルタイム定量を行なうシステム

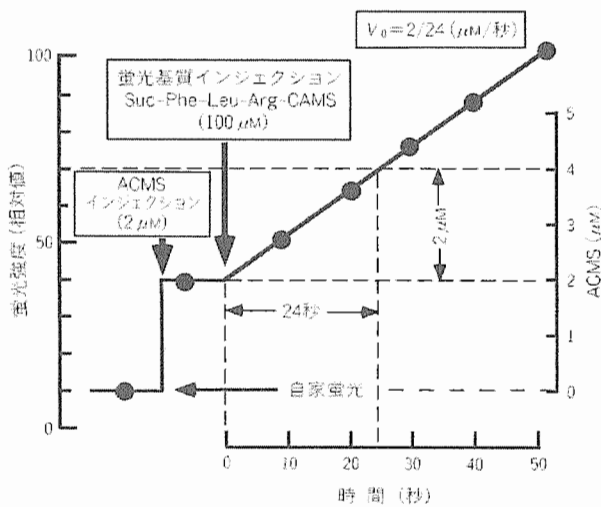


図5 基質分解初速度 (V_0) の定量
 グラフの黒丸は、細胞の蛍光強度の実測値。細胞内に終濃度 $2\mu\text{M}$ の ACMS をマイクロインジェクションした場合、この実験では、蛍光量は 40 (本文では B) になった。自家蛍光量は 10 (本文では A) なので、 $40 - 10 = 30$ が $2\mu\text{M}$ の ACMS による蛍光強度になる。基質をマイクロインジェクションしたあとに、10 秒ごとに蛍光強度を測定しグラフにプロットする。グラフから蛍光強度がさらに 30 上昇するのに必要な時間 (新たに $2\mu\text{M}$ の ACMS が生成される時間) を読み取り (図では 24 秒)、 V_0 を求める。

III. 細胞内酵素活性の定量法

さて、次の問題としては、求められた速度論的パラメーターが、真にプロテアソームのみによるものか否かを明らかにしなくてはならない。そのためには、プ

ロテアソームに対する特異的な阻害剤 (Z-Leu-Leu-Leu-H など) で卵をあらかじめ処理しておけばいい。もしも阻害剤が、蛍光強度の増加 (基質分解) を抑えれば、目的とする酵素活性を測定していると考えてよいだろう。実際、Suc-Phe-Leu-Arg-CAMS の分解は、プロテアソーム阻害剤によって、ほとんど完全に阻害された。念のため、カルパイン阻害剤 (E-64) で処理したところ、基質分解はまったく阻害されなかった。したがって、本基質はプロテアソームによって分解されていることが確かめられた。

たいへん興味深いことに、 V_0 は減数分裂を再開させるホルモン (1-メチルアデニン) 処理によって上昇することが明らかになった。すなわち卵母細胞が減数分裂を再開すると同時に V_0 は上昇しはじめ、サイクリンがプロテアソームによって分解される時期 (M 期終了時) に最大となった。このことは、プロテアソームが減数分裂再開過程で活性化されることを示している。また M 期終了時における V_{max} と K_m *7 ($V_{\text{max}} = 2.3 \pm 0.17 \mu\text{M}/\text{分}$, $K_m = 60 \pm 9.7 \mu\text{M}$) は、ホルモン処理以前の卵よりも大きな値 ($V_{\text{max}} = 0.84 \pm 0.068 \mu\text{M}/\text{分}$, $K_m = 30 \pm 6.6 \mu\text{M}$) を示した³⁾。このことから、プロテアソームが何らかの質的変化を起こしていることが示唆された。

これらの結果は、くり返しになるが、細胞を生きのまま観測したものであり、本基質などのマイクロイ

*7 V_{max} と K_m は、異なった卵にマイクロインジェクションする基質量を変えることで求められる ($V_0 \sim V_0/S_0$ プロット)。すなわち、卵ごとに異なった基質量をマイクロインジェクションしたときに得られる V_0 を集計して算出する。 V_{max} : the maximum velocity, K_m : Michaelis-Menten constant

ンジェクションは、卵（胚）の発生に何ら影響を与えないことは確認済みである。したがって、 V_{max} と K_m が変化するという結果は、酵素のおかれている細胞内微小環境を反映したものであり、酵素の真に生理的な挙動を表わすものといえる。この意味で本技法は、生化学的または組織学的な破壊検査による手法に勝るといえよう。

しかし一方、測定している活性が、真に目的とする酵素活性によるものであることを証明するのはむずかしい。本研究では、阻害剤を用いたが、その阻害効果が特異的なものであることを常に検証する必要がある。この点に関していえば、破壊検査、すなわち精製された酵素を用いての測定に強みがある。したがって本手法は、従来の破壊検査と相補的にも用いられるべきであり、破壊検査で得られる結果の確認手段としてたいへん有用である。もちろん破壊検査では、たとえば酵素の失活や制御機構の逸失の可能性がある、それらを免れる本手法によって、まったく新しい細胞像の発見がもたらされることも期待できる。

もうひとつ本手法の応用点として、さまざまな阻害剤の効力検証という点があげられよう。*in vitro* で阻害効果があっても、*in vivo* においてどの程度阻害効果をもつかを定量的に議論するのは、一般に困難だ。この点についても、本手法の利用価値は高い。細胞外から作用する薬剤（阻害剤）の効果を、本手法で確認することができるのだ。

本手法は、ヒトデだけでなくウニ（タコノマクラ）卵においても適用可能であり、受精後にプロテアソーム活性が上昇することが明らかになった。この場合、プロテアソーム活性の上昇は、細胞内 pH の上昇によってもたらされる。この結論は、細胞を生かしたまま、強制的に細胞内 pH を変化させることによっても確かめられた¹⁾。

おわりに 基本的に細胞の体積と注入する基質の体積が求められれば、すべての細胞で、 V_0 、 V_{max} 、そして K_m 値を求めることは可能である。しかし培養細胞など、体積が求められない細胞では、定量的な測定は困難だ。もちろん定性的な測定、たとえば酵素活性の有無を調べたり、阻害剤の効果を観測する場合には、十分使用可能だ。またペプチド配列を変えることによって、他のプロテアーゼ（たとえばアポトーシスに関与するカスパーゼなど）の活性定量も可能である（投稿準備中）。今後はプロテアーゼだけでなく、さまざまな酵素活性を、さまざまな色（蛍光物質）を使って観測できるようになればいいなあと夢見ている。

文 献

- 1) Sato, E., Matsuhisa, A., Sakashita, M., Kanaoka, Y.: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3496-3502 (1988)
- 2) 沢田 均・横沢英良: 蛋白質 核酸 酵素, **36**, 60-65 (1991)
- 3) Chiba, K., Sato, E., Hoshi, M.: *J. Biochem.*, **122**, 286-293 (1997)
- 4) Chiba, K., Alderton, J. M., Hoshi, M., Steinhardt, R. A.: *Dev. Biol.*, **209**, 52-59 (1999)

千葉和義

略歴：1990年 東京工業大学大学院総合理工学研究科博士後期課程修了、1990年 東京工業大学理学部生命理学科助手、1990年6月 東京工業大学生命理工学部生命理学科助手を経て、1997年3月より現所属（助教授）。研究テーマ：ヒトテ卵母細胞減数分裂再開過程における、細胞内情報伝達系の解明。関心事・抱負：細胞内の酵素活性の可視化。