

2019年7月10日
夏季実習2日目

黒田研究室
担当：衛藤樹

蛍光プローブと化学反応シミュレーション

-蛍光プローブの性質をシミュレーションで理解する-



本日のファイルはこちら↓

<http://kurodalab.bi.s.u-tokyo.ac.jp/class/Summer/2019/Day2>

今日の目的



- 化学反応シミュレーションに慣れよう！
 - 題材：蛍光プローブ（特にカルシウム指示薬）
 - プログラムとしては昨日やった以上のことは覚えられないのでそんなに難しくないはず……
 - 生物学的な意味を考えながらやりましょう

実習の概要

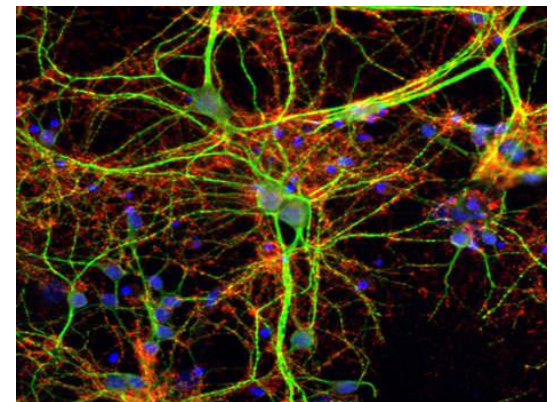
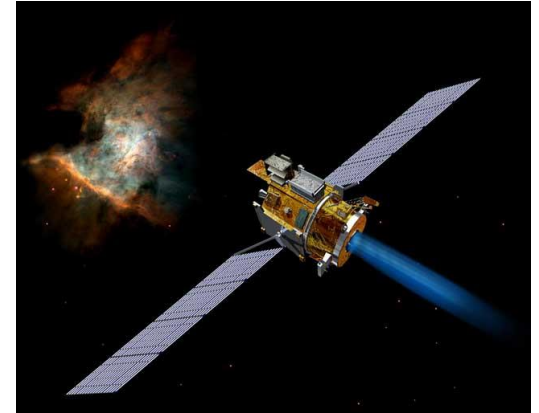
- 第1章 蛍光プローブ(カルシウム指示薬)
 - 化学的指示薬と遺伝子工学的指示薬
- 第2章 プローブの反応速度
 - 反応速度が応答波形に与える影響
- 第3章 プローブの解離定数
 - 解離定数が応答感度に与える影響
- 第4章 プローブの緩衝作用
 - 競合阻害の可能性

実習の概要

- 第1章 蛍光プローブ(カルシウム指示薬)
 - 化学的指示薬と遺伝子工学的指示薬
- 第2章 プローブの反応速度
 - 反応速度が応答波形に与える影響
- 第3章 プローブの解離定数
 - 解離定数が応答感度に与える影響
- 第4章 プローブの緩衝作用
 - 競合阻害の可能性

蛍光プローブとは何か？

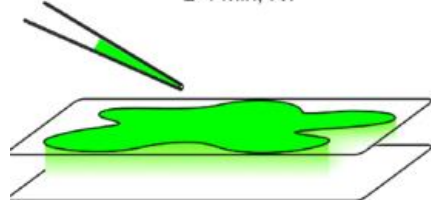
- Probe = “探査する道具”
 - 例：宇宙探査機(Space probe)
 - 宇宙を調べることが目的
- 蛍光プローブ(fluorescent probe)
 - 生物を調べることが目的！
 - 様々な分子を可視化できる
 - 細胞内/細胞/組織/器官/個体
様々なスケールで使われる



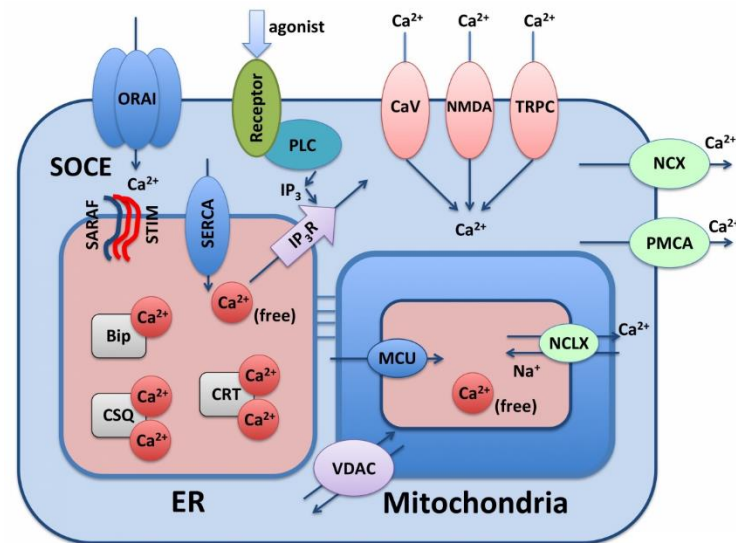
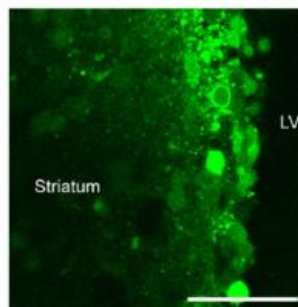
蛍光プローブの例： カルシウム (Ca^{2+}) 指示薬

- 細胞内の Ca^{2+} を可視化&定量化できる
- Ca^{2+} は炎症・代謝・筋収縮・記憶・免疫など、非常に多くの生命現象に関わるので重要！

C Pressure application on slice surface
2-4 min, RT



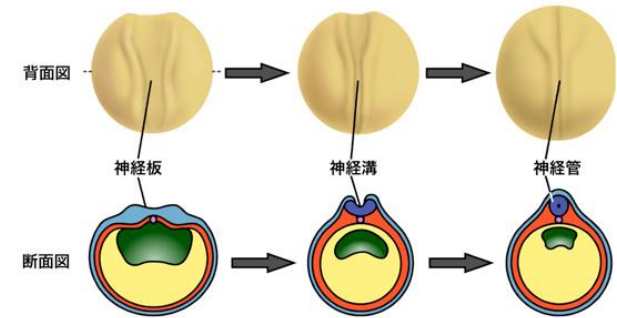
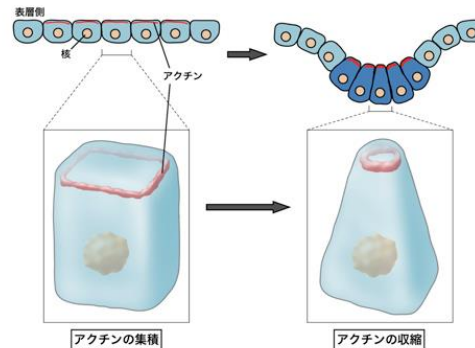
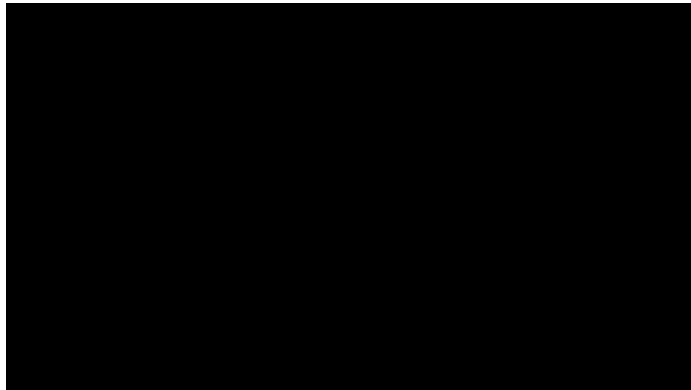
De-esterification
30-45 min, RT



“Preparation of Acute Subventricular Zone Slices for Calcium Imaging.”
Lacar et al. *Journal of Visualized Experiments*: JoVE. 2012

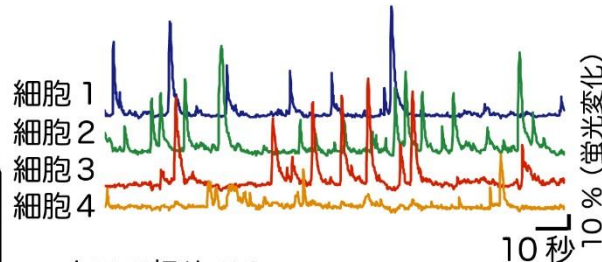
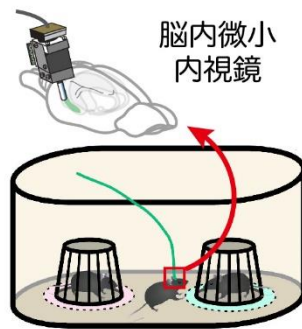
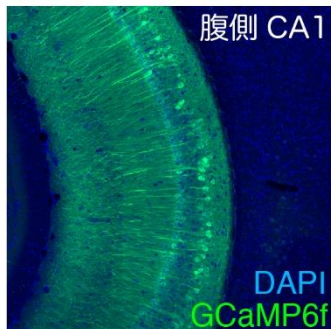
参考: Ca^{2+} 指示薬が使われた最近の研究

【カエルの形態形成における細胞骨格変化】



基生研・上野研 (<http://www.nibb.ac.jp/press/2017/03/07.html>)

【マウスの社会性行動におけるニューロン発火】



マウスで初めての
「ジェニファー・アニンストン細胞」の検出

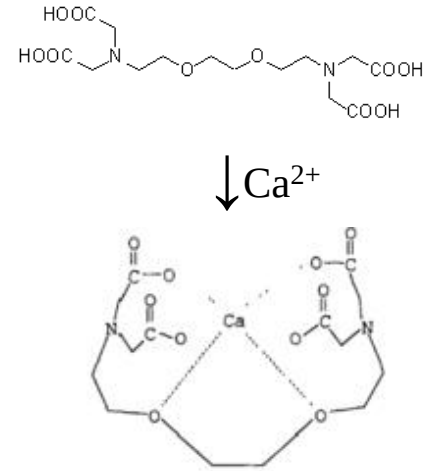


ニューロンの組み合わせで記憶を表現

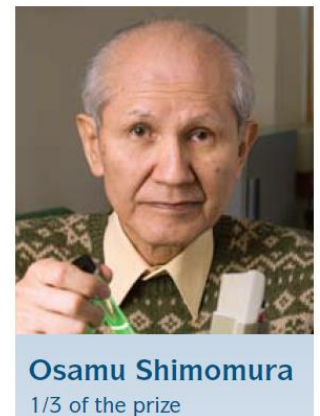
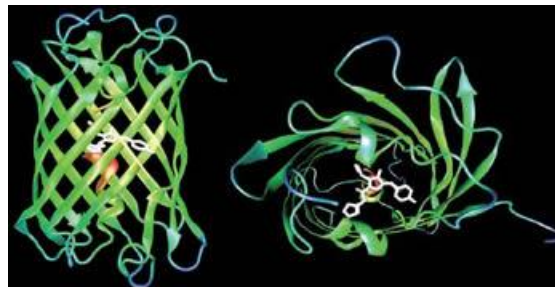
東大・奥山研 (<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/okuyamalab/>)

カルシウム (Ca^{2+}) 指示薬の分類

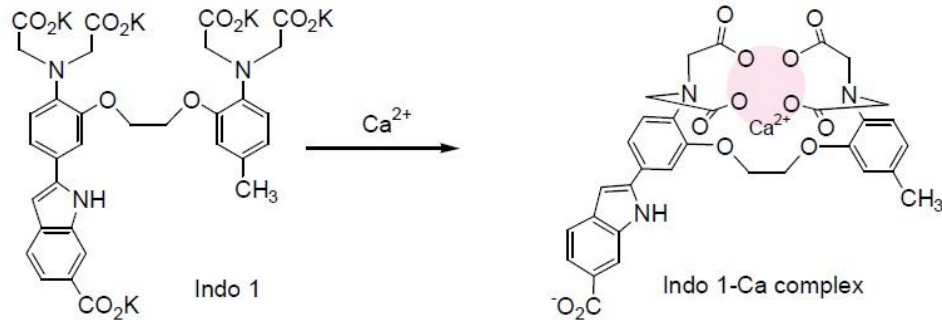
- 化学的指示薬 (Chemical indicator)
 - キレート剤 (EGTA) を改変した小分子
 - in vitro (生体外) でしか使えない
- 遺伝子工学的指示薬 (GECI)
 - 生物由来の蛍光タンパク質を改変した高分子
 - 遺伝子組み換えによって細胞自身に作らせる
 - in vivo (生体内) でも使える



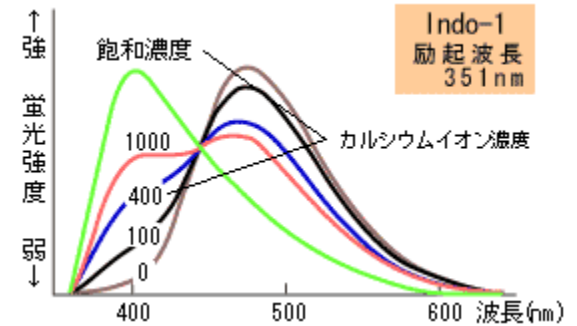
2008 ノーベル化学賞
「緑色蛍光蛋白質
(GFP; Green fluorescent protein)
の発見と開発」



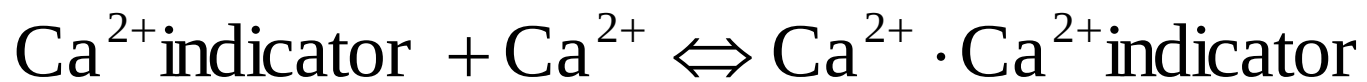
Ca²⁺ 指示薬は基本的にキレート剤 (Ca²⁺と複合体を形成する)



Indo1 のスペクトル変化

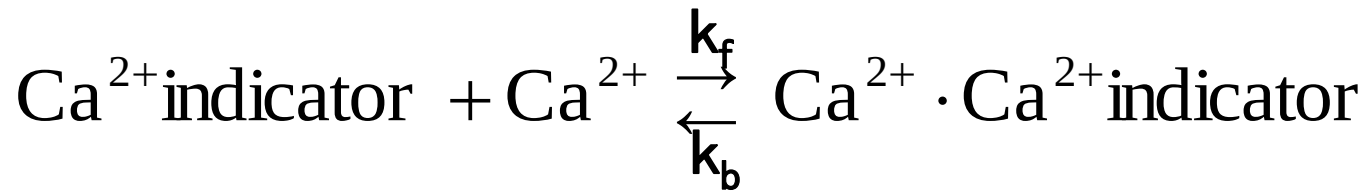


Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Indo1	191	9.4*10 ⁸	180
Fura2	230	15*10 ⁷	23
Rhod2	1870	0.069*10 ⁹	130



Ca²⁺ 指示薬の応答は分子間相互作用としてモデル化できる

分子間相互作用のおさらい



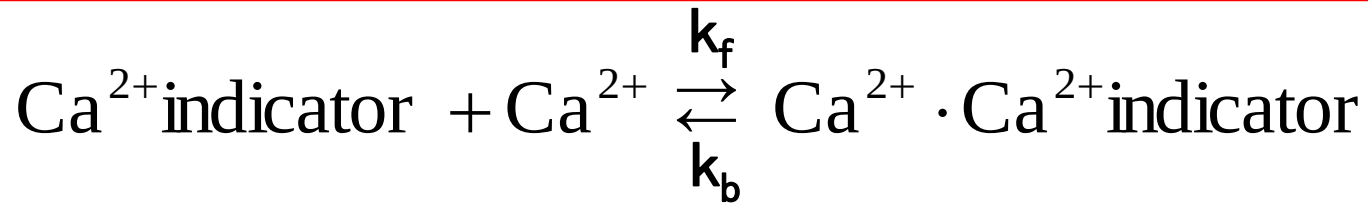
- 順反応速度 $v_f = k_f \cdot [\text{Ca}^{2+}\text{indicator}] \cdot [\text{Ca}^{2+}]$
 - 逆反応速度 $v_b = k_b \cdot [\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+}\text{indicator}]$
- ⇒ k_f 、 k_b が大きいほど順反応、逆反応速度が大きい

平衡状態では両方向の反応速度が等しい ($v_f = v_b$)

$$k_f \cdot [\text{Ca}^{2+}\text{indicator}] \cdot [\text{Ca}^{2+}] = k_b \cdot [\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+}\text{indicator}]$$
$$K_d = \frac{k_b}{k_f} = \frac{[\text{Ca}^{2+}\text{indicator}] \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+}\text{indicator}]} \quad (\text{解離定数の定義})$$

⇒ 基質親和性が高いほど、 K_d (k_b/k_f) は小さい

分子間相互作用のおさらい



カルシウムと結合しているプローブの割合P

$$\begin{aligned} P &= \frac{[\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+} \text{ indicator}]}{[\text{Ca}^{2+} \text{ indicator}]_0} = \frac{[\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+} \text{ indicator}]}{[\text{Ca}^{2+} \text{ indicator}] + [\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+} \text{ indicator}]} \\ &= \frac{1}{\frac{[\text{Ca}^{2+} \text{ indicator}]}{[\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+} \text{ indicator}] + 1}} = \frac{1}{\frac{K_d}{[\text{Ca}^{2+}]} + 1} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{K_d + [\text{Ca}^{2+}]} \end{aligned}$$

両辺逆数をとると

$$\frac{1}{P} = K_d \cdot \frac{1}{[\text{Ca}^{2+}]} + 1$$

1/Pは1/[Ca²⁺]に対する1次関数

各種のCa²⁺指示薬

名称	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	Ca錯体解離定 数K _d (nM)	摘要
Quin2	339	492	115	
Fura2	340/380	510	224	2波長励起・1波長蛍光
Fluo3	508	527	0.4	
Indo1	330	Ca free 485, Ca bind410	250	1波長励起・2波長蛍光
Rhod2	553	576	1000	
Fluo4	493	518	345	
Cameleon	各波長	各波長	各濃度	遺伝子工学的指示薬、 多数の変異体がある。
GCaMP	各波長	各波長	各濃度	遺伝子工学的指示薬、 多数の変異体がある

プローブを用いて観測されるカルシウム応答は生体内の応答を正しく反映しているか？

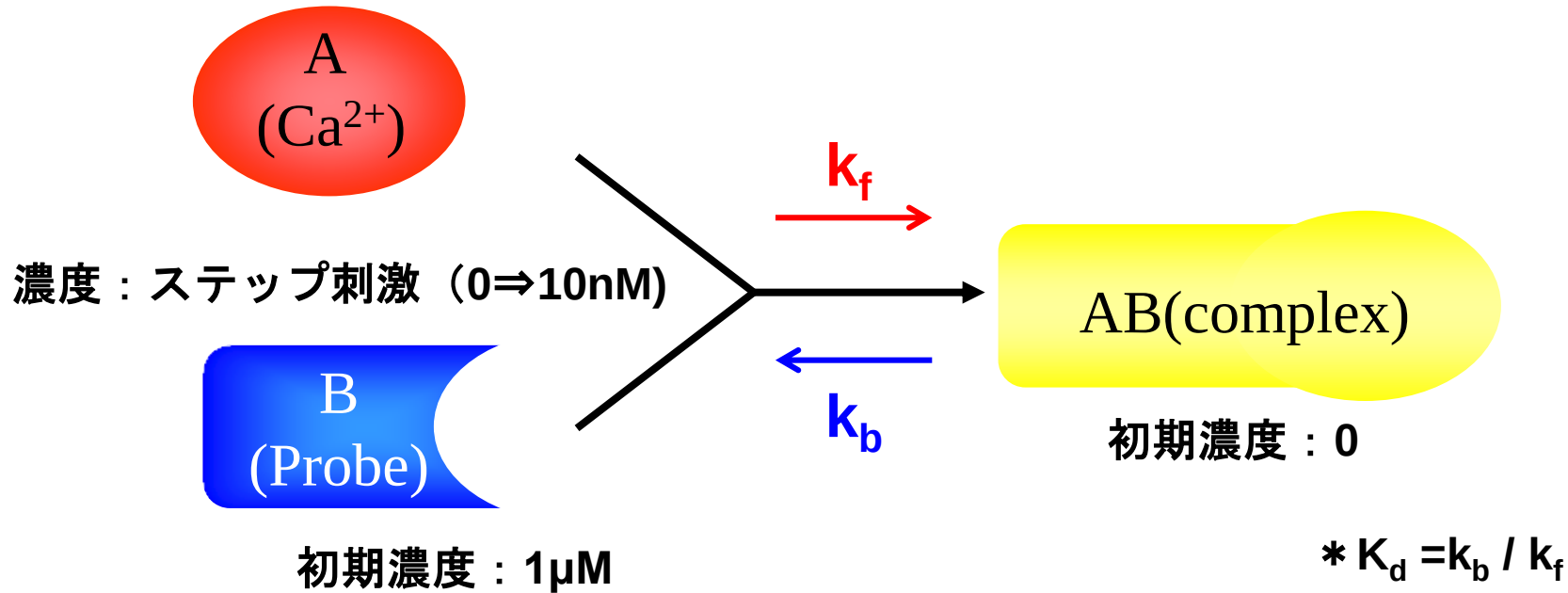
本実習で検証するポイント

- プローブはカルシウム応答に追従できる？
- 定量できるカルシウム濃度の限界とは？
- プローブは生体(生化学反応)に影響を与えない？

実習の概要

- 第1章 蛍光プローブ(カルシウム指示薬)
 - 化学的指示薬と遺伝子工学的指示薬
- 第2章 プローブの反応速度
 - 反応速度が応答波形に与える影響
- 第3章 プローブの解離定数
 - 解離定数が応答感度を与える影響
- 第4章 プローブの緩衝作用
 - 競合阻害の可能性

モデルの作成 #1: 分子間相互作用の改良



○微分方程式を作成し、その時間変動をプロットする

各分子濃度の時間変化を微分方程式で表現する

各分子濃度： $[A]$, $[B]$, $[AB]$ パラメータ： k_b , k_f

$$\frac{d[A]}{dt} = 0 \quad \leftarrow \text{注意！バッファーの仮定}$$

(=カルシウム濃度は一定に保たれている)

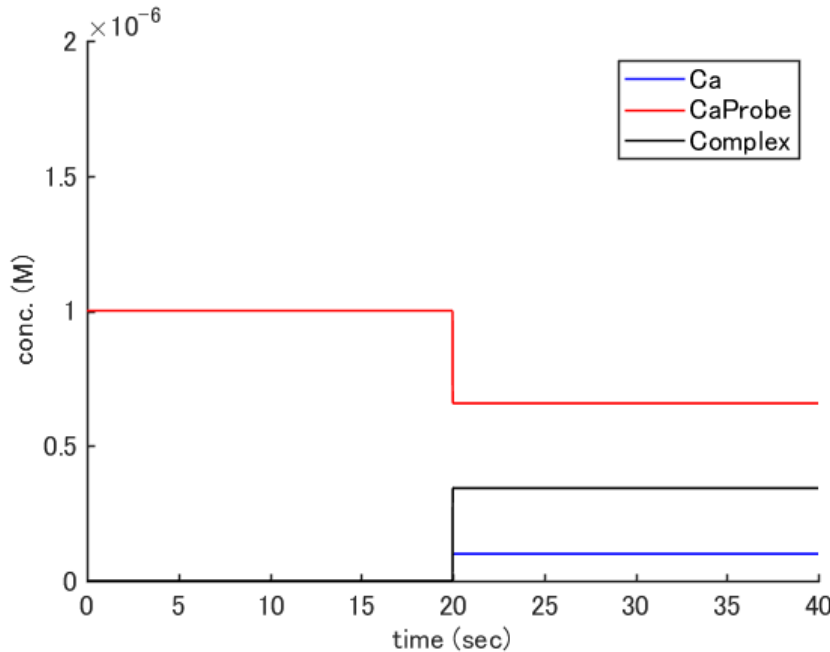
$$\frac{d[B]}{dt} = -k_f \times [A] \times [B] + k_b \times [AB]$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_f \times [A] \times [B] - k_b \times [AB]$$

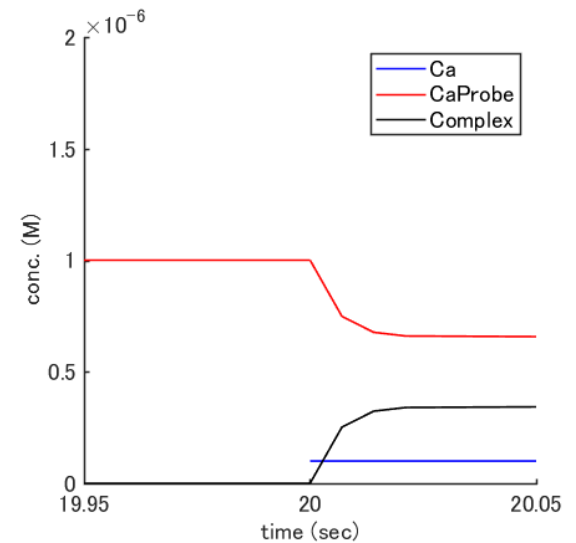
Ca²⁺プローブのカルシウム結合

課題1: ステップCa²⁺刺激 (t=20において0nM⇒100nM) を与えた時のCa²⁺指示薬 (Indo1)の応答をシミュレートしなさい (task1CaProbeIndo1Step.m)

実行例



発展課題



Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Indo1	191	9.4*10 ⁸	180

発展課題： グラフ（19.95-20.05sec）を拡大して、プローブの応答を詳細に観察しなさい

Ca²⁺プローブのカルシウム結合

課題1: ステップCa²⁺刺激 (t=20において0nM⇒100nM) を与えた時のCa²⁺指示薬 (Indo1)の応答をシミュレートしなさい (task1CaProbeIndo1Step.m)

```
function task1CaProbeIndo1Step()  
%Indo1 Ca応答をシミュレート  
param = [**, **]; %kf,kbのパラメータ  
y0 = [0,1*10^(-6),0]; %A:カルシウム, B:プローブ, AB:複合体の初期濃度(M)
```

```
function dydt = ODE(t,y,param) % ODE(t,y,param)という関数の定義  
A = y(1); % A:カルシウムの濃度  
B = y(2); % B : プローブの濃度  
AB = y(3); % AB : 複合体の濃度  
  
kf = param(1); % kfはparamの1番目の値  
kb = param(2); % kbはparamの2番目の値  
  
dydt(1,:) = **; % dydtの1行目(分子A:カルシウム)の式の定義  
dydt(2,:) = **; % dydtの2行目(分子B : プローブ)の式の定義  
dydt(3,:) = **; % dydtの3行目(分子AB : 複合体)の式の定義  
end
```

発展
課題

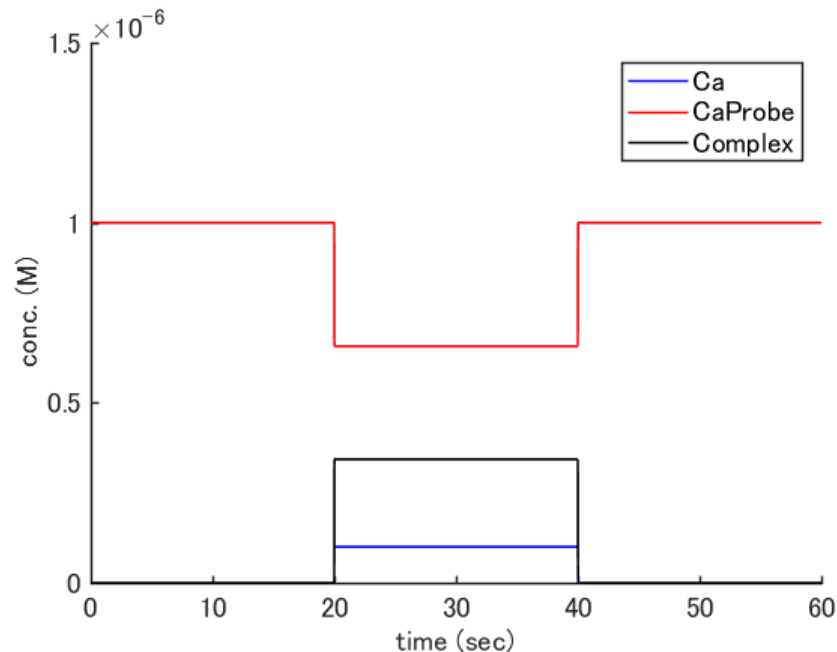
```
%発展課題  
%以下のコマンドをコメントアウトしてコマンドウィンドで実行  
%axis([19.95, 20.05, 0, 2*10^(-6)]);
```

Ca²⁺プローブと反応速度定数

-化学的指示薬（反応速度定数が高いプローブ）-

課題2-1: task1CaProbeIndo1Step.mを書き換え、100nMパルスCa²⁺刺激を与えた時のCa²⁺指示薬(Indo1)の応答をシミュレートしなさい(task2CaProbeIndo1Pulse.m)

実行例



Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Indo1	191	9.4*10 ⁸	180

Ca²⁺プローブと反応速度定数

-化学的指示薬（反応速度定数が大きいプローブ）-

課題2-1: task1CaProbeIndo1Step.mを書き換え、100nMパルスCa²⁺刺激を与えた時のCa²⁺指示薬(Indo1)の応答をシミュレートしなさい(task2CaProbeIndo1Pulse.m)

```
t0 = 0;  
dt=20;%刺激の時間間隔  
[t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0,t0+dt],y0);%ODEソルバを解く(0-20sec)  
plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k');%ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット  
axis([0, 3*dt, 0, 1.5*10^(-6)]);% x軸 0-3*dt秒、y軸0-1.5uMまで表示
```

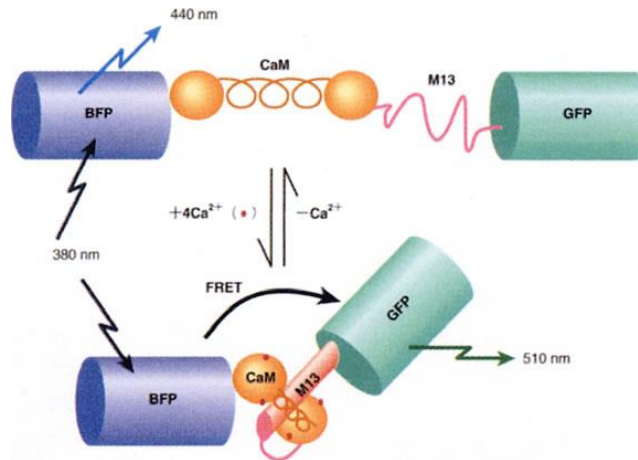
%刺激後のシミュレート

```
t0 = t(end); % t の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す  
y0 = y(end,:); % y の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す  
y0(1) = 1*10^(-7); %Aの濃度を100nMに設定  
[t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0,t0+dt],y0); %ODEソルバを解く(20-40sec)  
plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k'); %ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット
```

```
**;% t の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す  
**;% y の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す  
**;%Aの濃度を0nMに設定  
**;%ODEソルバを解く(40-60sec)  
**;%ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット
```

Ca²⁺プローブと反応速度定数 -遺伝子工学的指示薬-

Cameleonの構造



宮脇敦史 (R.Tsien lab.出身)

Ca指示薬	Indo1の1/700		
	Indo1の1/550		
Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Cameleon3.60	215	1.33*10 ⁶	0.33
Cameleon-Nano15	15	2.36*10 ⁷	0.33
Indo1	191	9.4*10 ⁸	180



永井健治 (宮脇研出身)

※Cameleon Nano15の反応速度定数は論文から推定した

Ca²⁺プローブと反応速度定数 遺伝子工学的指示薬(速度定数が小さいプローブ)

課題2-2: Cameleon3.6に100nMのパルスカルシウム刺激を与えた時の応答波形をシミュレーションしなさい。task2CaProbeIndo1Pulse.mを再利用してもよい

```
function task2CaProbeIndo1Pulse()  
%Indo1 Ca応答をシミュレート  
param = [9.4*10^8,180]; % Indo1 kf,kbのパラメータ  
% param = [**,**]; % Cameleon kf,kbのパラメータ←(課題2.2)  
y0 = [0,1*10^(-6),0]; %A:カルシウム, B:プローブ, AB:複合体の初期濃度(M)
```

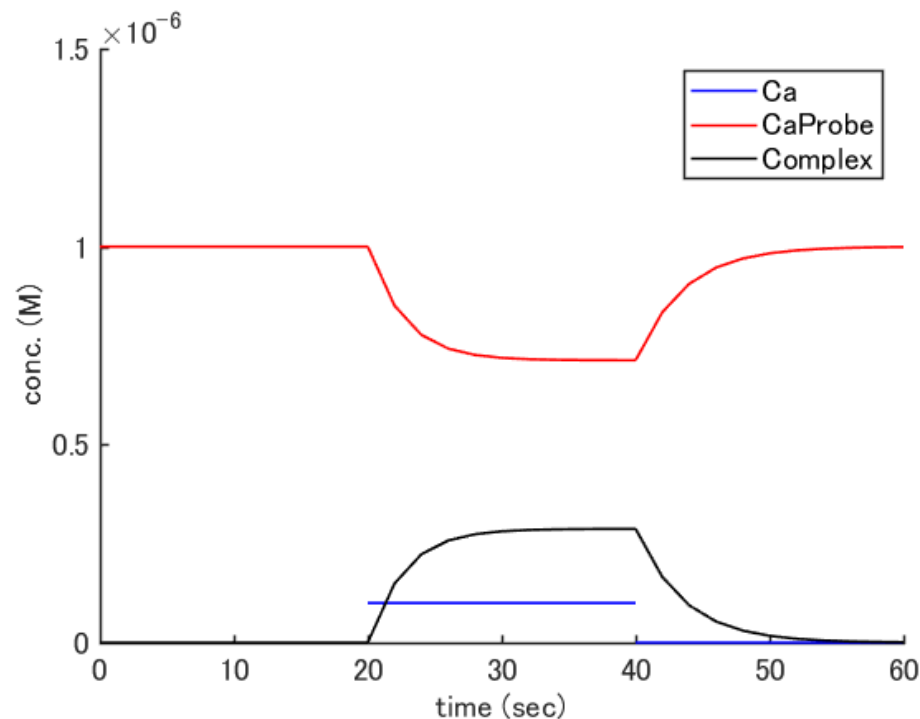
	ほぼ同じ	Indo1の1/700	Indo1の1/550
Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Cameleon3.60	215	1.33*10 ⁶	0.33
Indo1	191	9.4*10 ⁸	180

Ca²⁺プローブと反応速度定数

遺伝子工学的指示薬(速度定数が小さいプローブ)

課題2-2: Cameleon3.6に100nMのパルスカルシウム刺激を与えた時の応答波形をシミュレーションしなさい。task2CaProbeIndo1Pulse.mを再利用してもよい

実行例



Ca²⁺プローブと反応速度定数 遺伝子工学的指示薬(速度定数が小さいプローブ)

課題2-2: Cameleon3.6に100nMのパルスカルシウム刺激を与えた時の応答波形をシミュレーションしなさい。task2CaProbeIndo1Pulse.mを再利用してもよい

```
function task2CaProbeIndo1Pulse()  
%Indo1 Ca応答をシミュレート  
%param = [9.4*10^8,180]; % Indo1 kf,kbのパラメータ  
param = [1.33*10^6,0.33]; % Cameleon kf,kbのパラメータ  
y0 = [0,1*10^(-6),0]; %A:カルシウム, B:プローブ, AB:複合体の初期濃度(M)
```

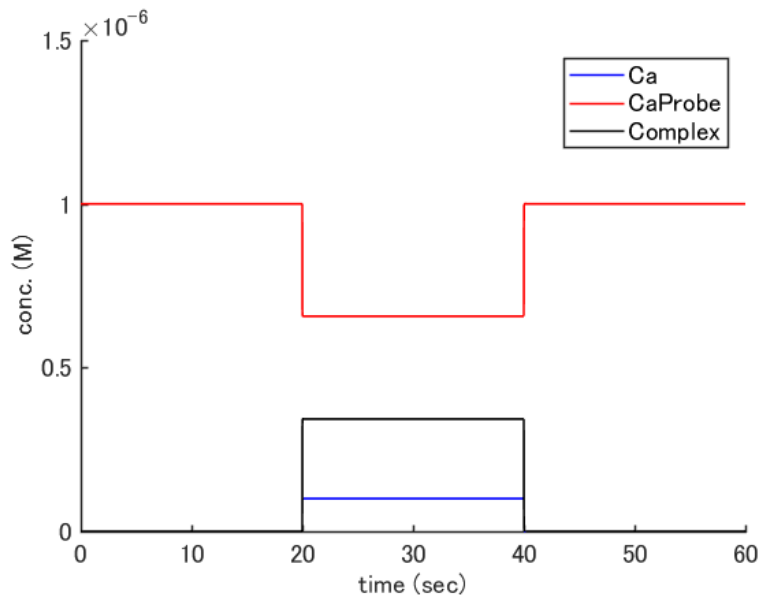
	ほぼ同じ	Indo1の1/700	Indo1の1/550
Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Cameleon3.60	215	1.33*10 ⁶	0.33
Indo1	191	9.4*10 ⁸	180

Ca²⁺プローブと反応速度定数

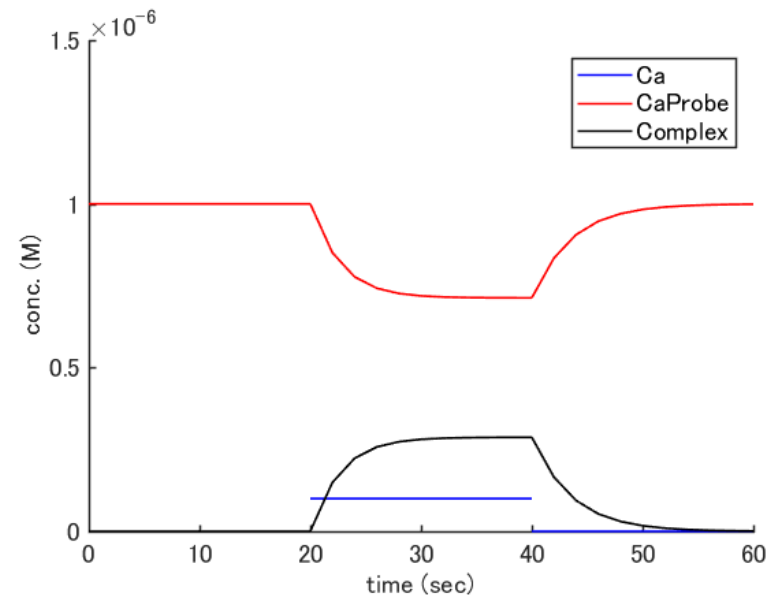
遺伝子工学的指示薬(速度定数が小さいプローブ)

課題2-2: Cameleon3.6に100nMのパルスカルシウム刺激を与えた時の応答波形をシミュレーションしなさい。task2CaProbeIndo1Pulse.mを再利用してもよい

Indo1



Cameleon3.6



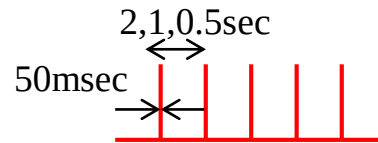
- プローブの応答はカルシウム濃度の変化を正しく反映している？
 - ⇒ 必ずしもカルシウム波形が正確に反映されるわけではない
 - ⇒ プローブを使う際は応答速度に注意する。

Ca²⁺プローブと反応速度定数

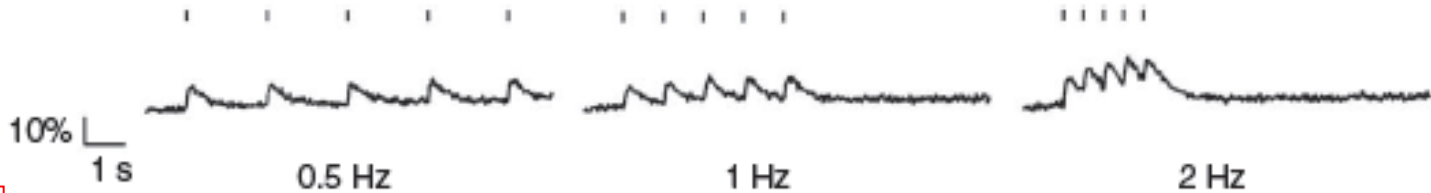
-遺伝子工学的指示薬-

課題3 Cameleon 3.6にパルス幅50msec, 100nMのカルシウムインパルス刺激を10回行った時の応答をシミュレートしなさい。刺激間隔は0.5, 1, 2秒とする
(task3CaProbeCameleonContinuousPulse.m)

インパルス刺激 (※50msec幅の矩形波を仮定)



※マウス神経細胞を一定の時間間隔で刺激し、カルシウム応答を実測した波形

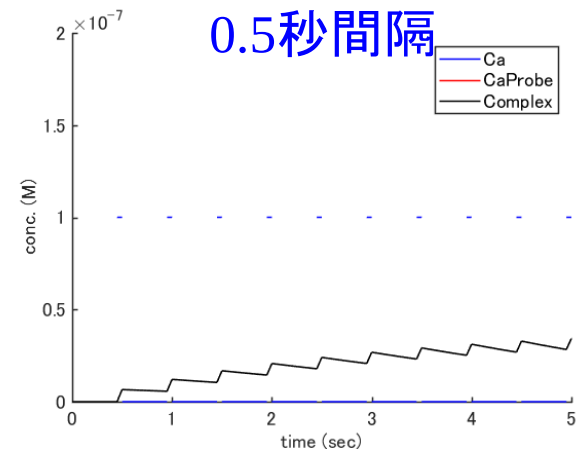
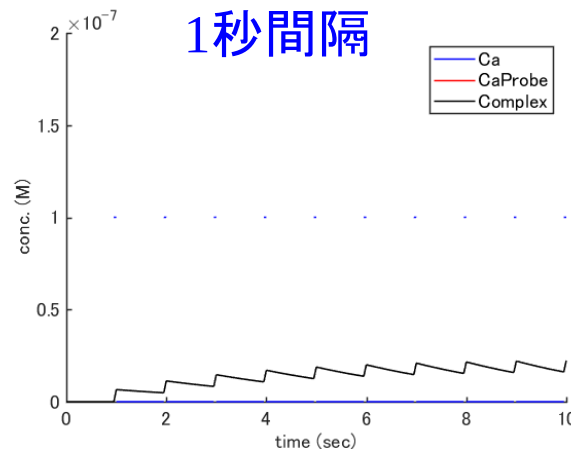
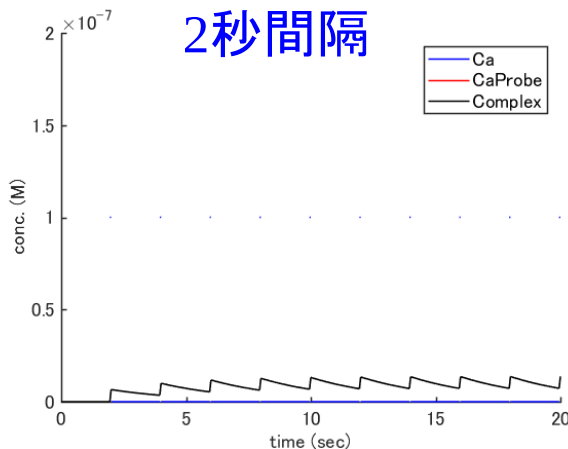


実行例

2秒間隔

1秒間隔

0.5秒間隔



Ca²⁺プローブと反応速度定数 -遺伝子工学的指示薬-

課題3 Cameleon 3.6にパルス幅50msec, 100nMのカルシウムインパルス刺激を10回
行った時の応答をシミュレートしなさい。刺激間隔は0.5, 1, 2秒とする
(task3CaProbeCameleonContinuousPulse.m)

```
for i= **
    %刺激後のシミュレート
    [t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0, t0+dt-0.05],y0); %ODEソルバを解く(刺激なし
    、t0-刺激開始時刻まで)
    plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k'); %ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット

    y0 = y(end,:);% y の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0(1) = 1*10^(-7);%Aの濃度を100nMに設定

    [t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0+dt-0.05,t0+dt],y0);%ODEソルバを解く(刺激あり
    、刺激開始時刻-t0+dtまで)
    plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k'); %ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット

    t0 = t(end);% t の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0 = y(end,:);% y の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0(1) = 0;%Aの濃度を0nMに設定
end
```

実習の概要

- 第1章 蛍光プローブ(カルシウム指示薬)
 - 化学的指示薬と遺伝子工学的指示薬
- 第2章 プローブの反応速度
 - 反応速度が応答波形に与える影響
- 第3章 プローブの解離定数
 - 解離定数が応答感度に与える影響
- 第4章 プローブの緩衝作用
 - 競合阻害の可能性

Ca²⁺イメージングの応答感受性について

Ca指示薬	K _d (nM)	k _f (1/M/sec)	k _b (1/sec)
Cameleon3.60	215	1.33*10 ⁶	0.33
Cameleon-Nano15	15	2.36*10 ⁷	0.33

※ Cameleon Nano15の反応速度定数は論文から推定した



宮脇敦史（R.Tsien lab.出身）

課題4 それぞれのプローブにステップカルシウム刺激を与えた際の応答波形とドーズレスポンスを調べなさい

(task4CaProbeCameleonDoseResponse.m)

課題5 それぞれのプローブに100nMおよび5nMの繰り返し矩形波刺激を与えた時にどのような応答波形になるかシミュレートしなさい

(task5CaProbeCameleonnContinuousPulse.m)



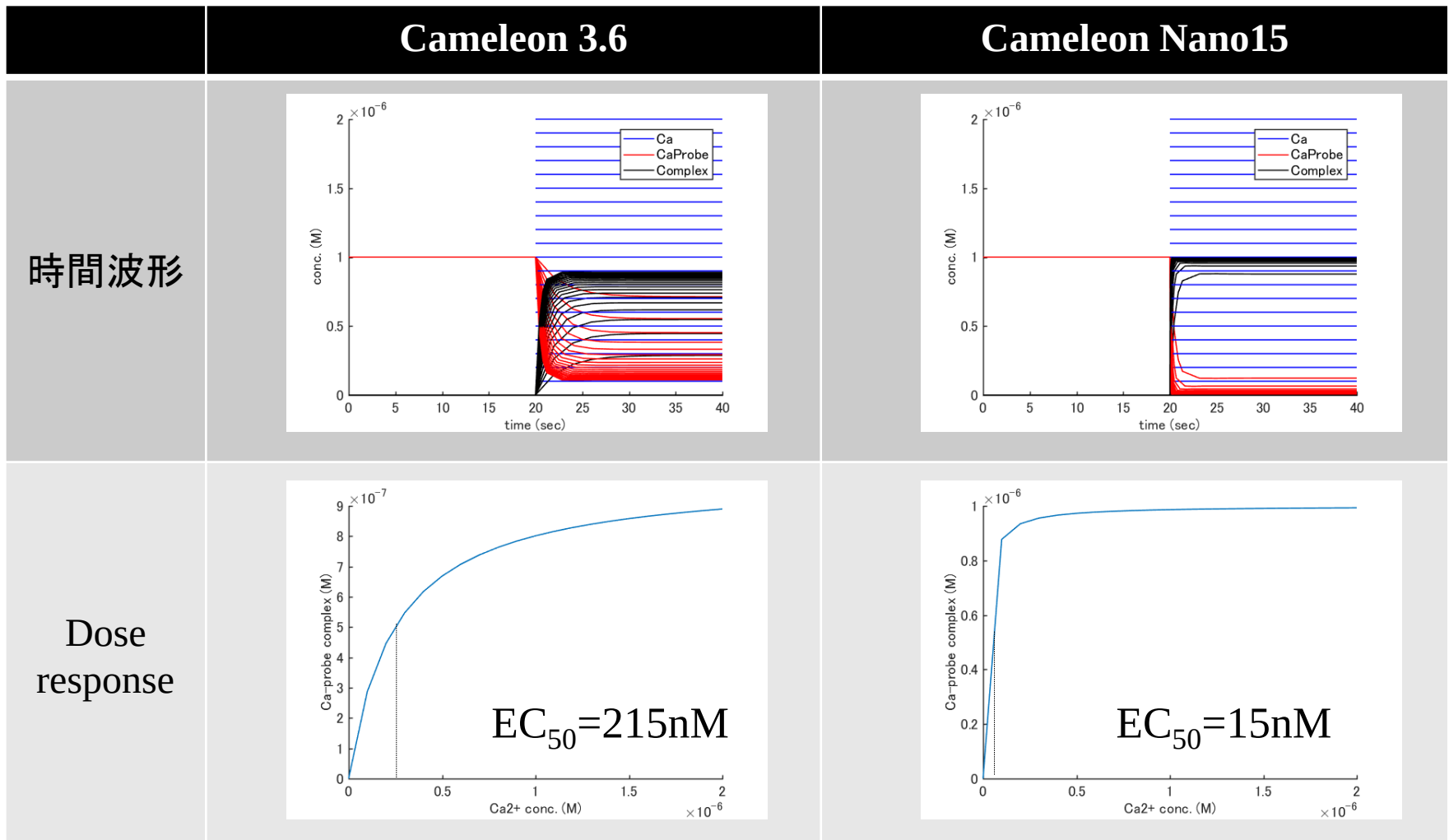
永井健治（宮脇研出身）

Ca²⁺イメージングの問題点 #2 (検出限界の問題)

課題4 それぞれのプローブにステップカルシウム刺激を与えた際の
応答波形とドーズレスポンスを調べなさい

(task4CaProbeCameleonDoseResponse.m)

実行例



Ca²⁺イメージングの問題点 #2 (検出限界の問題)

課題4 それぞれのプロープにステップカルシウム刺激を与えた際の応答波形とドーズレスポンスを調べなさい

(task4CaProbeCameleonDoseResponse.m)

```
t0 = t(end); % t の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
y0(1) = 1*10^(-7)*i; % y0(1), つまりカルシウムの濃度を (100*i)nM に設定
% ※ for ループが回ると for ループの変数 i が 1 つずつ大きくなる。これを利用してカルシウム濃度を上昇させる
```

```
[t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0,t0+dt],y0); % ODE ソルバを解く
plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k'); % ODE ソルバから返されたベクトル t、y をプロット
```

```
** = y0(1); % y0(1), つまりカルシウムの濃度を Dt(i+1,1) に格納
** = y(end,3); % y(end,3), つまり複合体の濃度を Dt(i+1,2) に格納
end
```

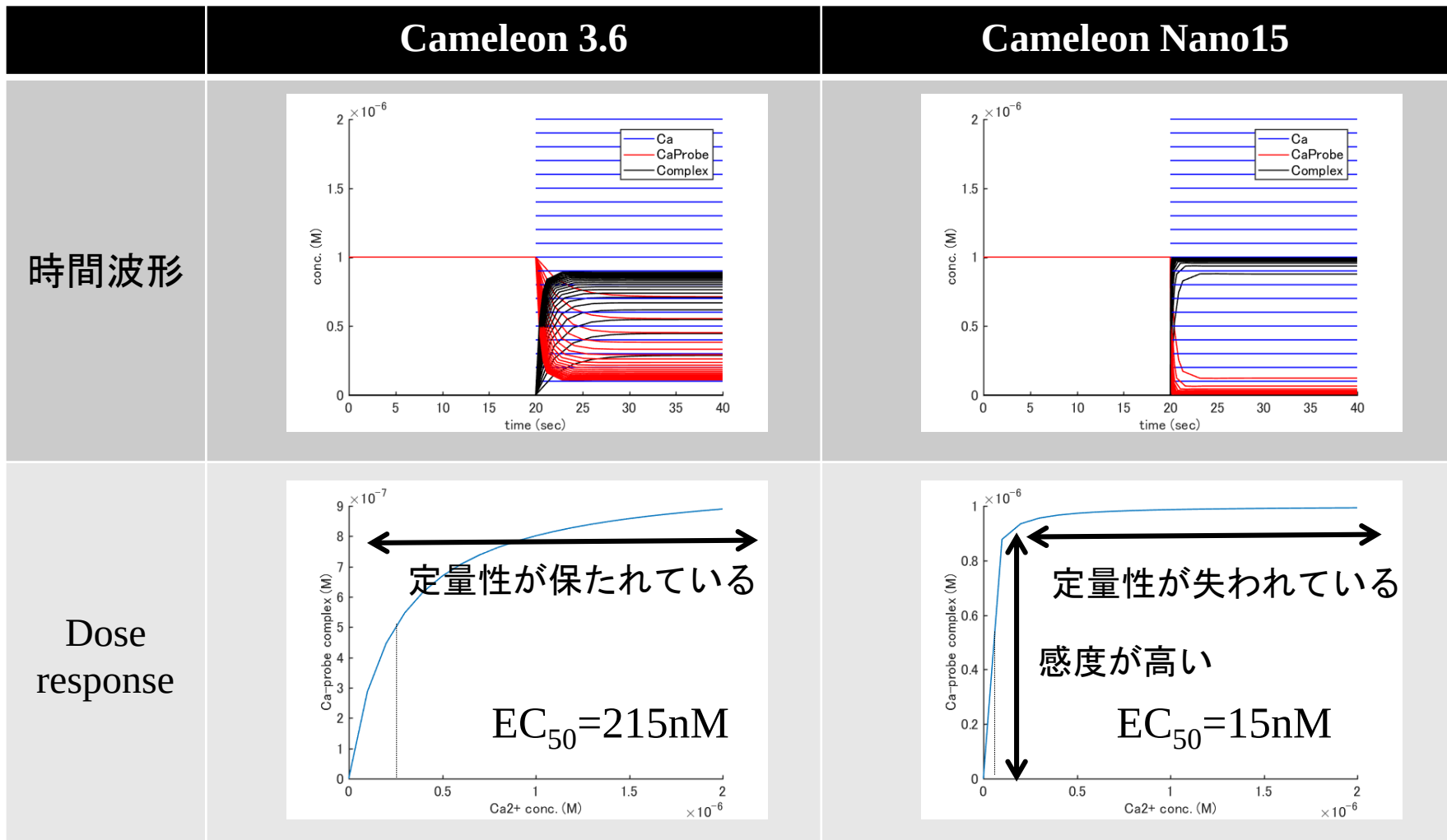
```
figure;
hold on;
plot(**,**)% x 軸 : カルシウム濃度、y 軸 複合体濃度のグラフをプロットする。
% ある行列 A の 1 行目全体を指定する時は A(:,1)
xlabel('Ca2+ conc. (M)');
ylabel('Ca-probe complex (M)');
```

Ca²⁺イメージングの問題点 #2 (検出限界の問題)

課題4 それぞれのプローブにステップカルシウム刺激を与えた際の
応答波形とドーズレスポンスを調べなさい

(task4CaProbeCameleonDoseResponse.m)

実行例



Ca²⁺イメージングの問題点 #2 (検出限界の問題)

課題5 それぞれのプローブに100nMおよび5nMの繰り返し矩形波刺激を与えた時にどのような応答波形になるかシミュレートしなさい
(task5CaProbeCameleonnContinuousPulse.m)

```
for i=0:10
    [t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0,t0+dt],y0); %ODEソルバを解く(刺激なし、20秒間)
    plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k'); %ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット

    t0 = t(end);% t の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0 = y(end,:);% y の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0(1) = 1*10^(-7);%yAの濃度を100nMに設定
    % y0(1) = 5*10^(-9);%Aの濃度を5nMに設定

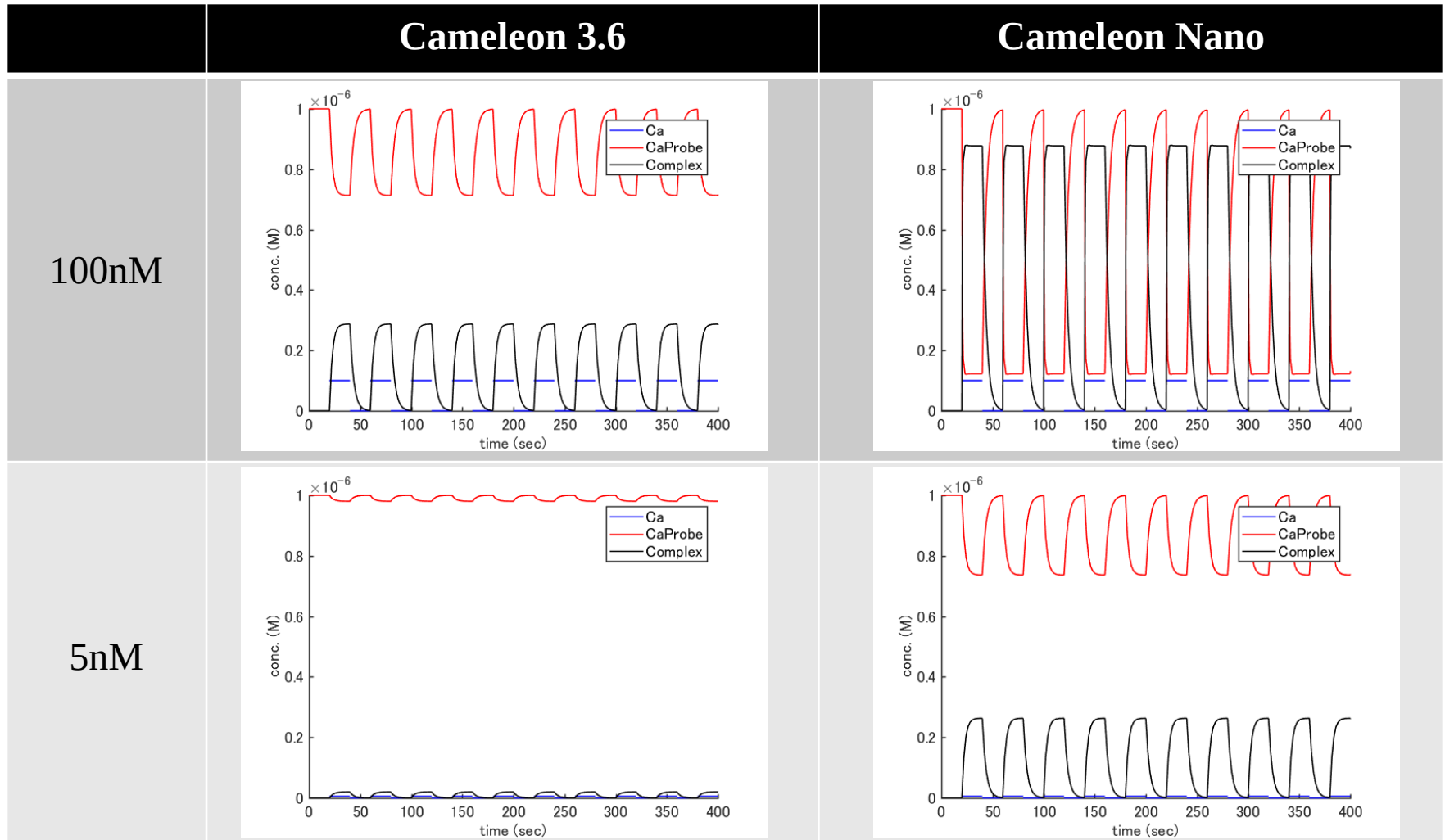
    [t,y] = ode15s(@(t,y) ODE(t,y,param),[t0,t0+dt],y0);%ODEソルバを解く(刺激あり、20秒間)
    plot(t,y(:,1),'b',t,y(:,2),'r',t,y(:,3),'k'); %ODEソルバから返されたベクトルt、yをプロット

    t0 = t(end);% t の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0 = y(end,:);% y の最後の値を次のシミュレーションの初期値に設定し直す
    y0(1) = **;%Aの濃度を0nMに設定してforループで矩形波にする
end
```

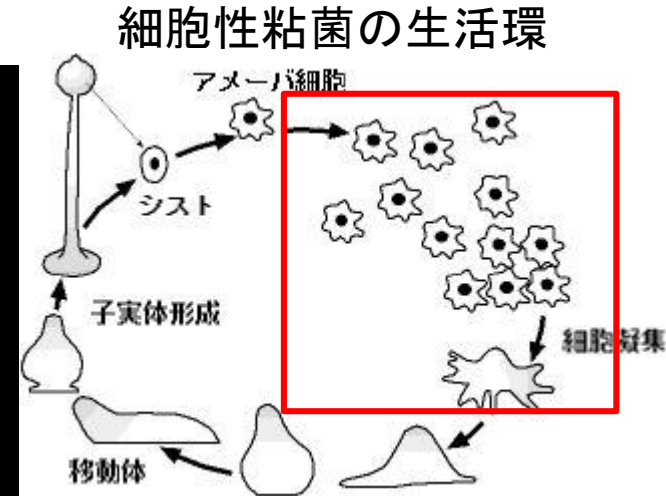
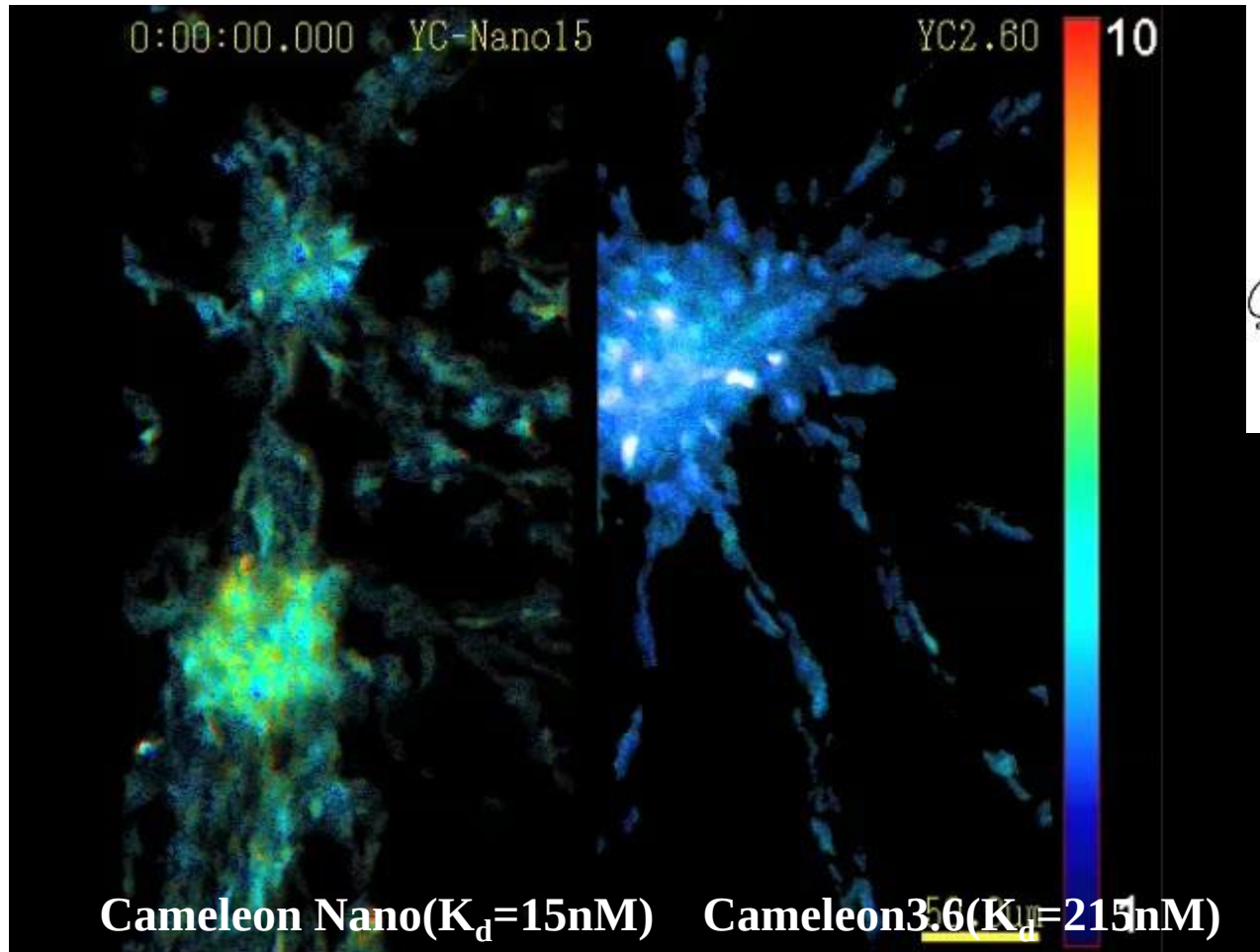

Ca²⁺イメージングの問題点 #2 (検出限界の問題)

課題5 それぞれのプローブに100nMおよび5nMの繰り返し矩形波刺激を与えた時にどのような応答波形になるかシミュレートしなさい
(task5CaProbeCameleonnContinuousPulse.m)

実行例



Ca²⁺イメージングの問題点 #2(検出限界の問題)



カルシウム濃度 $\ll 100\text{nM}$

感度 ○	感度 △
定量性 △	定量性 ○

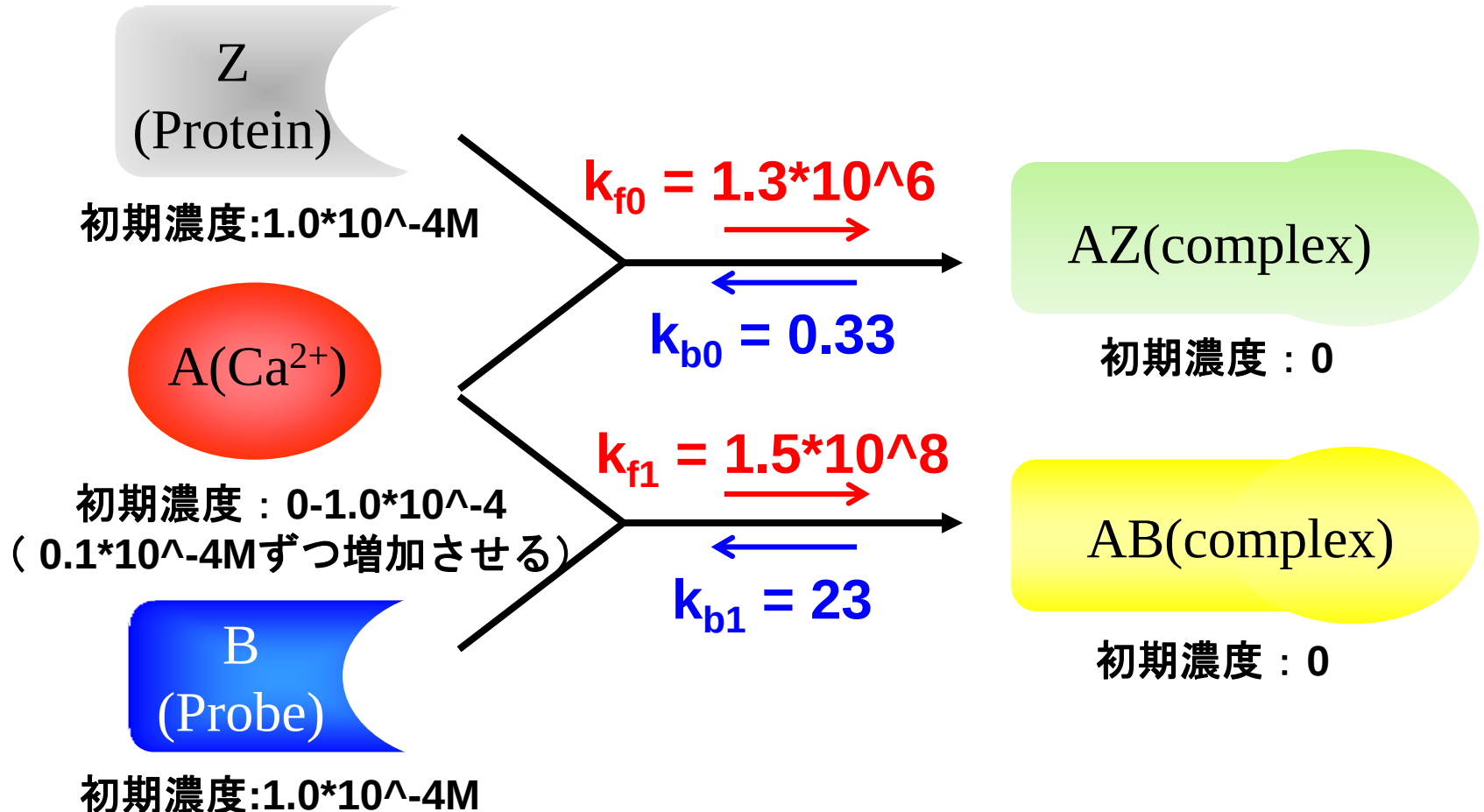
⇒プローブを使う際には K_d 付近の物を使用する。

実習の概要

- 第1章 蛍光プローブ(カルシウム指示薬)
 - 化学的指示薬と遺伝子工学的指示薬
- 第2章 プローブの反応速度
 - 反応速度が応答波形に与える影響
- 第3章 プローブの解離定数
 - 解離定数が応答感度に与える影響
- 第4章 プローブの緩衝作用
 - 競合阻害の可能性

モデルの作成 : 分子間相互作用の改良

課題6 以下をモデル化し、カルシウムのステップ刺激を与えなさい。
また、カルシウム濃度を増加させた時のAZ複合体の濃度をプロットしなさい
ただし、カルシウム濃度は有限とする(task6CaProbeCameleonnCompetitiveInhibition.m)



Ca²⁺プローブの問題点

-カルシウム量が限られている場合-

○微分方程式を作成し、その時間変動とDose responseをプロットする

各分子濃度の時間変化を微分方程式で表現する

各分子濃度： [Z], [A], [B], [AZ], [AB] パラメータ： k_{f0} , k_{b0} , k_{f1} , k_{b1}

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{f1} \times [A] \times [B] - k_{f0} \times [A] \times [Z] + k_{b0} \times [AZ] + k_{b1} \times [AB]$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_{f1} \times [A] \times [B] + k_{b1} \times [AB]$$

$$\frac{d[Z]}{dt} = -k_{f0} \times [A] \times [Z] + k_{b0} \times [AZ]$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{f1} \times [A] \times [B] - k_{b1} \times [AB]$$

$$\frac{d[AZ]}{dt} = k_{f0} \times [A] \times [Z] - k_{b0} \times [AZ]$$

Ca²⁺プローブの問題点

-カルシウム量が限られている場合-

○微分方程式を作成し、その時間変動とDose responseをプロットする

各分子濃度の時間変化を微分方程式で表現する

各分子濃度 : [Z], [A], [B], [AB], [AZ] パラメータ : k_{f0} , k_{b0} , k_{f1} , k_{b1}

```
function dydt = ODE(t,y,param) % ODE(t,y,param)という関数の定義
A = y(1); % A:カルシウムの濃度
B = y(2); % B : プローブの濃度
Z = y(3); % Z:蛋白質の濃度
AB = y(4); % AB : カルシウム・プローブ複合体の濃度
AZ = y(5); % AZ:カルシウム・蛋白質複合体の濃度
kf0 = param(1); % kf0はparamの1番目の値
kb0 = param(2); % kb0はparamの2番目の値
kf1 = param(3); % kf1はparamの3番目の値
kb1 = param(4); % kb1はparamの4番目の値

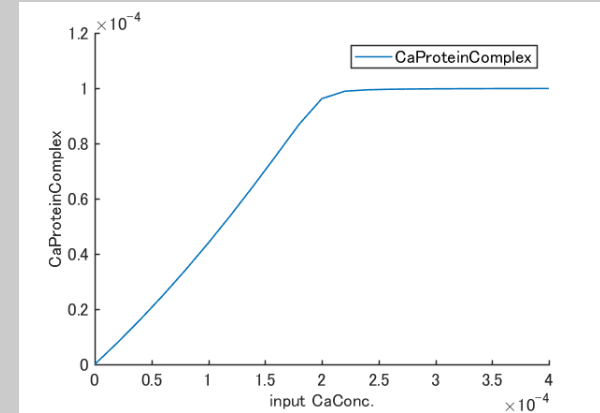
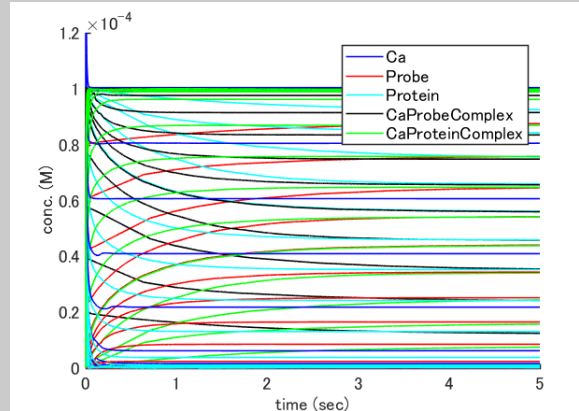
dydt(1,:) = **; % dydtの1行目(分子A:カルシウム)の式の定義
dydt(2,:) = **; % dydtの2行目(分子B : プローブ)の式の定義
dydt(3,:) = **; % dydtの4行目(分子Z:蛋白質)の式の定義
dydt(4,:) = **; % dydtの3行目(分子AB : カルシウム・プローブ複合体)の式の定義
dydt(5,:) = **; % dydtの5行目(分子AZ : 蛋白質・プローブ複合体)の式の定義
end
```

Ca²⁺プローブの問題点：内在性蛋白質との競合阻害

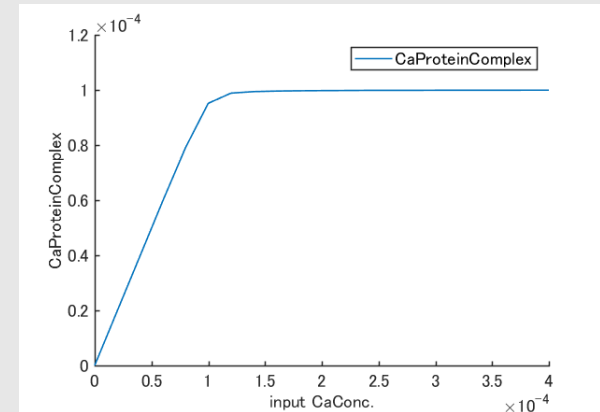
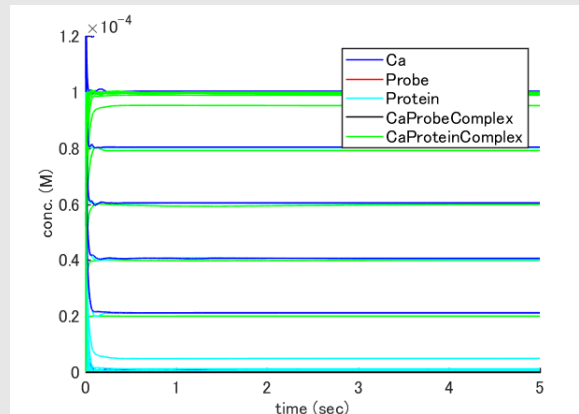
○微分方程式を作成し、時間変動とDose responseをプロットする

実行例

+プローブ



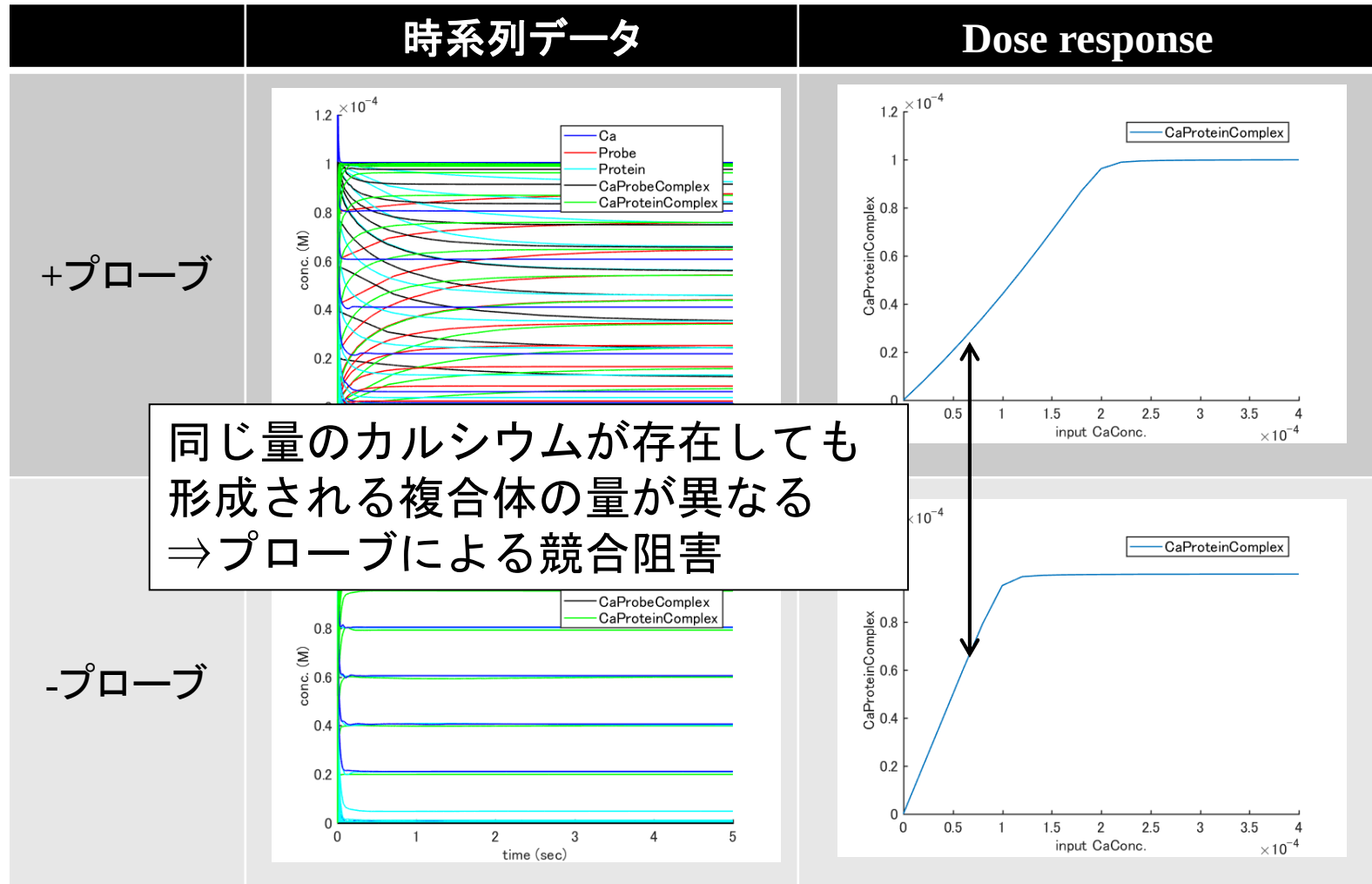
-プローブ



Ca²⁺プローブは内在性の蛋白質とCa²⁺に競合的に結合し、内在性蛋白質に影響を与える ⇒ プローブはシステムの内部状態を変える

Ca²⁺プローブの問題点：内在性蛋白質との競合阻害

○微分方程式を作成し、時間変動とDose responseをプロットする

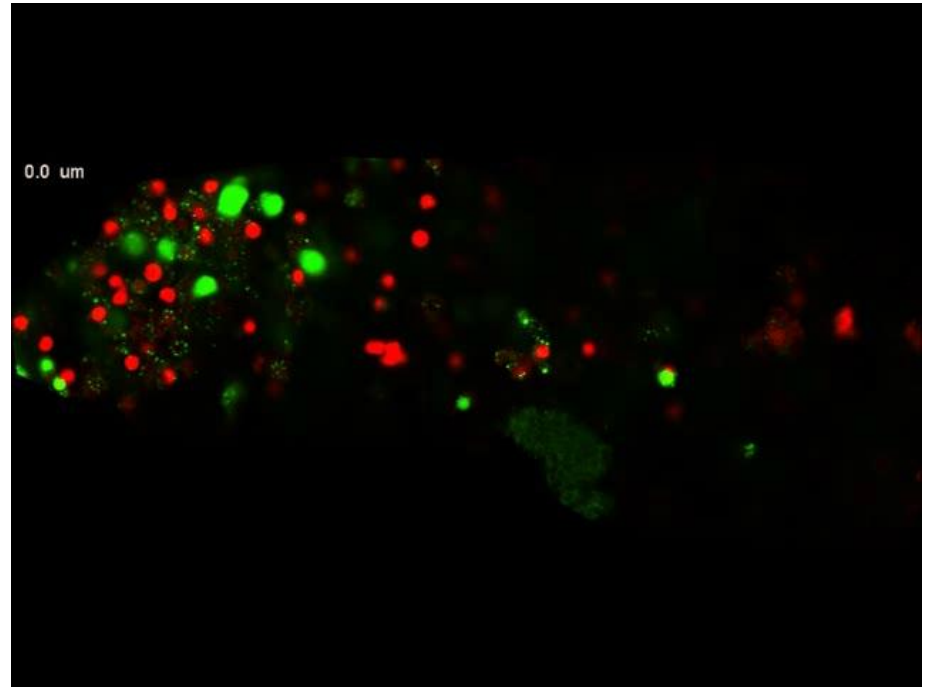
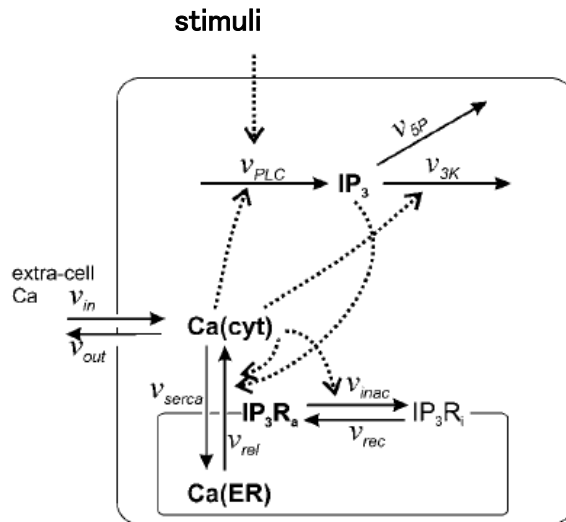


Ca²⁺プローブは内在性の蛋白質とCa²⁺に競合的に結合し、内在性蛋白質に影響を与える ⇒ プローブはシステムの内部状態を変える

Ca²⁺プローブの問題点

-カルシウム量が限られている場合-

カルシウム振動のモデル



課題7 カルシウム振動する細胞にプローブを加えて振動がどの様に変調されるか観察しなさい。加えるプローブ量は2,20,200 μ Mとする
(task7CaProbeCameleonnProbeConcOscillation)

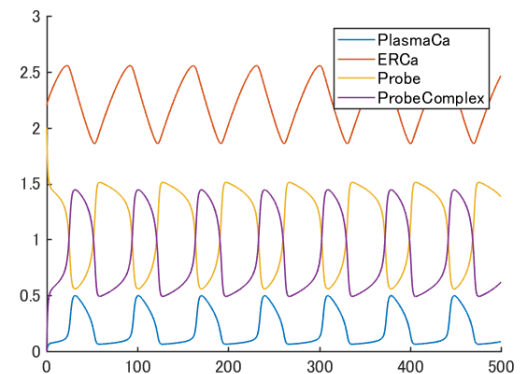
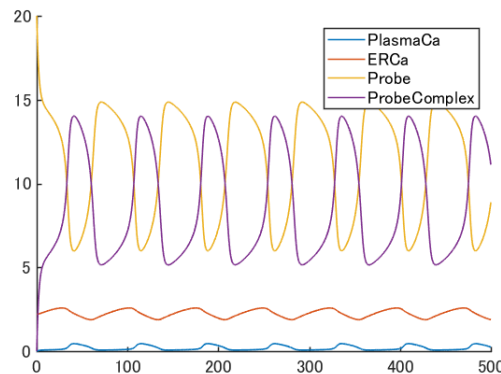
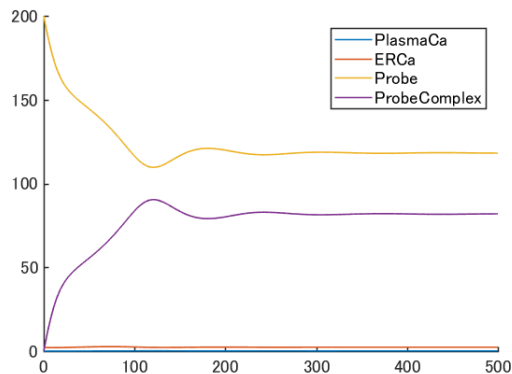
プローブは細胞内の応答に影響する

```
function task7CaProbeCameleonnProbeConcOscillation()  
%Model based on BJ 77,1244-1256(1999),Thomas Hofer  
time=0.001:0.01:500;  
s0=zeros(1,4);  
% Ca conc in plasma membrane, Ca conc in ER, Probe conc in plasma membrane, Ca/Probe complex in plasma membrane  
s0(2)=2.2;% ERのカルシウム濃度の初期値を2.2uMに設定  
s0(3)=2;% 細胞質のプローブ濃度の初期値を2uMに設定 ←順番に2, 20, 200(uM)の値を入れてください
```

プローブ濃度が高すぎる場合
⇒細胞内応答が阻害される
(200 μ M)

プローブ濃度が適正な場合
⇒細胞内カルシウムの変動が見える
(20 μ M)

プローブ濃度が低い時
⇒プローブの応答が小さい
(2 μ M)



⇒プローブは適正量を使用する

実行例

まとめ

- 機能性プローブにより細胞内の反応を可視化できる
- プローブの応答速度や基質親和性によっては画像から受ける印象が実際の応答とは大きく異なる
- プローブは添加量によっては細胞内応答を阻害しうる

事務連絡

明日は紙とペンの持参をお願いします

以下は、発展課題です

発展課題 1

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

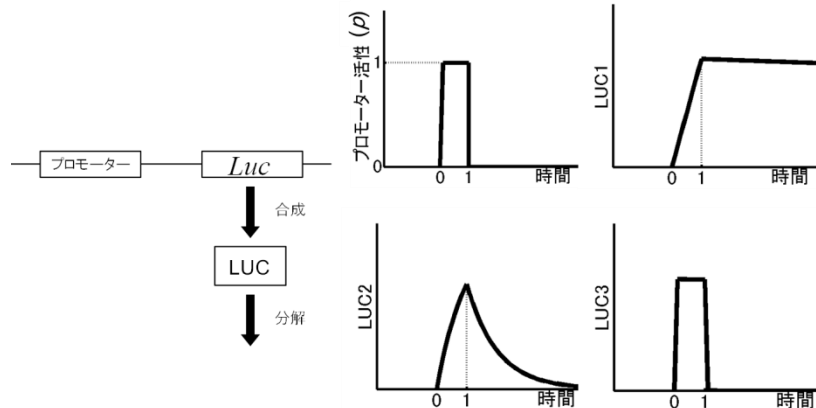
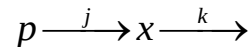


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問1. 下線部(a)について。ルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子は、どのような原理に基づきプロモーター活性を計測することができるか。ルシフェラーゼの発光原理もふまえて5行程度で説明せよ。

問2. レポーター遺伝子産物(LUC)の量(x)は、プロモーター活性(p)に依存した合成と産物自身の量に依存した分解により制御されている。この反応はここでは近似的に以下の化学反応で与えられるものとする。



x の濃度の時間に対する変化率 dx/dt は p と合成の速度定数 j の積に比例して増加し、 x の濃度と分解速度定数 k の積に比例して減少する。 x の時間に対する変化率 dx/dt を p と x 、 k を用いて表せ。ただし、 $j=1$ 、 x の分解速度定数 k については $k>0$ とする。

発展課題 2

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、^(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

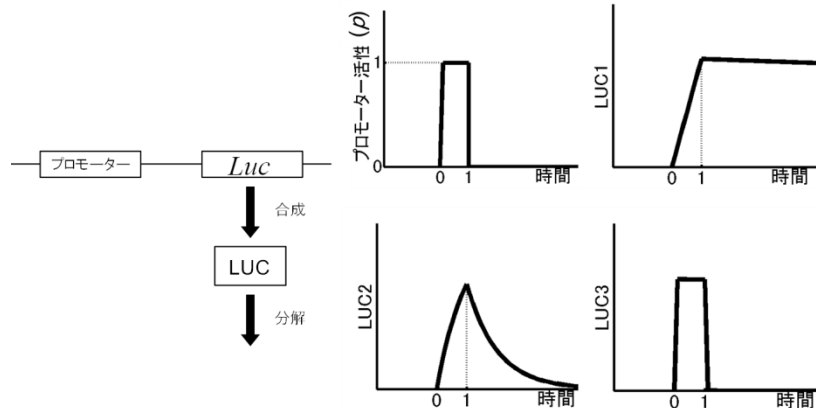


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問3. 時刻 $t=0$ における x の初期条件を $x=0$ とした場合、仮に p が一定とした場合の x の時間変化が以下の式であらわされることを示せ。

$$x(t) = \frac{p}{k} \{1 - \exp(-kt)\}$$

問4. 変異体 LUC1、LUC2、LUC3 の分解速度定数 k_1 、 k_2 、 k_3 はそれぞれ $k_1=0.01$ 、 $k_2=1$ 、 $k_3=100$ であった。図において、時刻 $t=0$ から $t=1$ の間、 $p=1$ としたパルス刺激を与えた場合の、時刻 $t=1$ における変異体レポーター遺伝子産物 LUC1、LUC2、LUC3 の量を求めよ。ただし、 $\exp(-0.01) \approx 0.99$ 、 $\exp(-1) \approx 0.37$ 、 $\exp(-100) \approx 0$ とし計算せよ。

問5. 問4の結果から、分解速度と時刻 $t=1$ におけるレポーター遺伝子産物の量の関係を1～2行で述べよ。

発展課題 3

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、^(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(*Luc1*、*Luc2*、*Luc3*)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外に酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

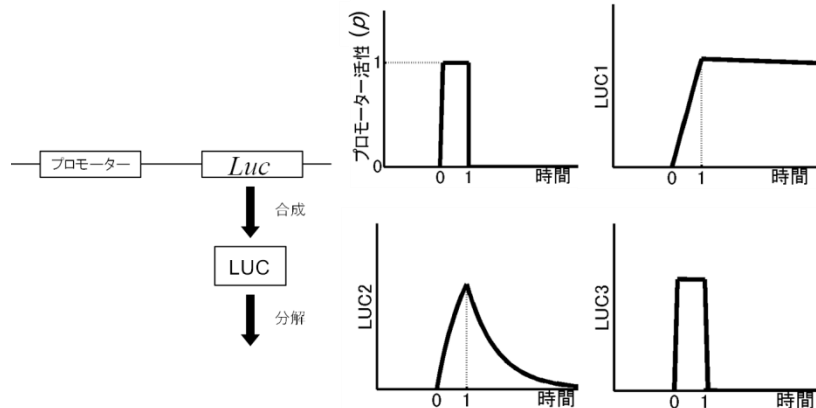


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問6. 図1におけるプロモーター活性と変異体レポーター遺伝子産物の量の時間波形の類似性と、変異体の分解速度定数との関係を1～2行で述べよ。

発展課題 4

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、^(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

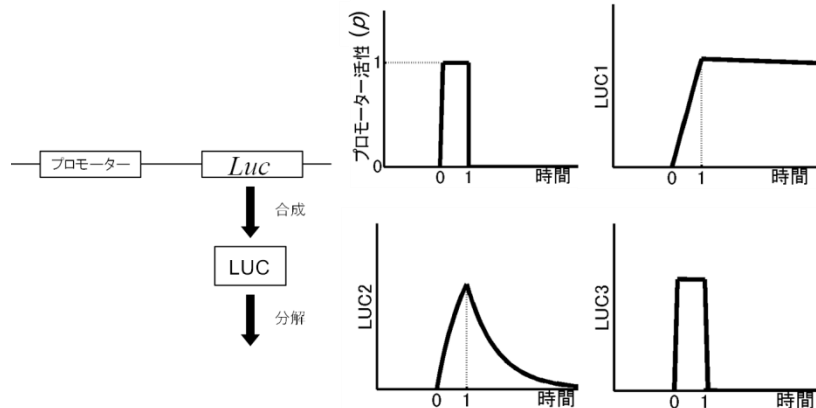


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問7. 問5と問6の結果から考察される変異体の分解速度の役割について、正しいものをすべて以下の選択肢から選べ。

- (ア)レポーター遺伝子産物の分解速度が遅いほど、レポーター遺伝子産物の量が多くなる。
- (イ)レポーター遺伝子産物の分解速度が速いほど、レポーター遺伝子産物の量の時間パターンはプロモーター活性の時間パターンに類似する。
- (ウ)レポーター遺伝子産物の分解速度を上げると、レポーター遺伝子産物の量の時間パターンとプロモーター活性の時間パターンとの類似度は上がるが、一方、レポーター遺伝子産物の量は逆に減少するため信号強度は下がる。
- (エ)全く分解されないレポーター遺伝子産物を用いた場合、レポーター遺伝子産物の量はプロモーター活性の積分値となる。
- (オ)分解が遅いレポーター遺伝子産物の場合、プロモーター活性の持続時間が十分長ければ、レポーター遺伝子産物の量の時間変化と、プロモーター活性の時間変化の類似度は下がる。

発展課題 1

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(*Luc1*、*Luc2*、*Luc3*)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

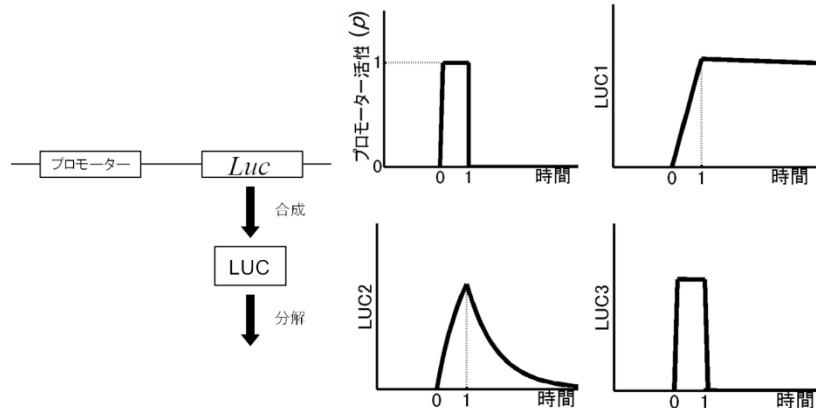


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問1. 下線部(a)について。ルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子は、どのような原理に基づきプロモーター活性を計測することができるか。ルシフェラーゼの発光原理もふまえて5行程度で説明せよ。

レポーター遺伝子をプロモーターの下流に組み込むことで、プロモーター活性に依存してレポーター遺伝子mRNAが発現して、その産物であるルシフェラーゼが産生される。ルシフェラーゼはATP依存的に基質であるルシフェリンを酸化するが、この反応は発光を伴う。この発光信号をプロモーター活性の指標とする

発展課題 1

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、(a) ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

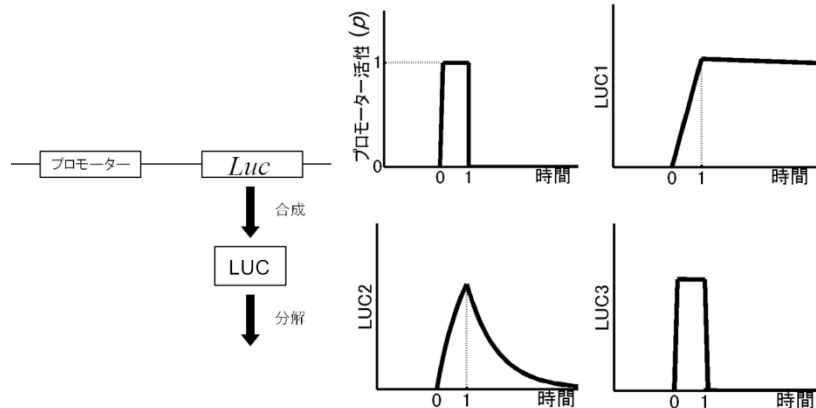
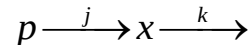


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問2. レポーター遺伝子産物(LUC)の量(x)は、プロモーター活性(p)に依存した合成と産物自身の量に依存した分解により制御されている。この反応はここでは近似的に以下の化学反応で与えられるものとする。



x の濃度の時間に対する変化率 dx/dt は p と合成の速度定数 j の積に比例して増加し、 x の濃度と分解速度定数 k の積に比例して減少する。 x の時間に対する変化率 dx/dt を p と x 、 k を用いて表せ。ただし、 $j=1$ 、 x の分解速度定数 k については $k>0$ とする。

$$dx/dt = p - k \cdot x$$

発展課題 2

解答例

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、(a) ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ (LUC) の3つの変異体 (*Luc1*, *Luc2*, *Luc3*) をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物 (LUC1, LUC2, LUC3) の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

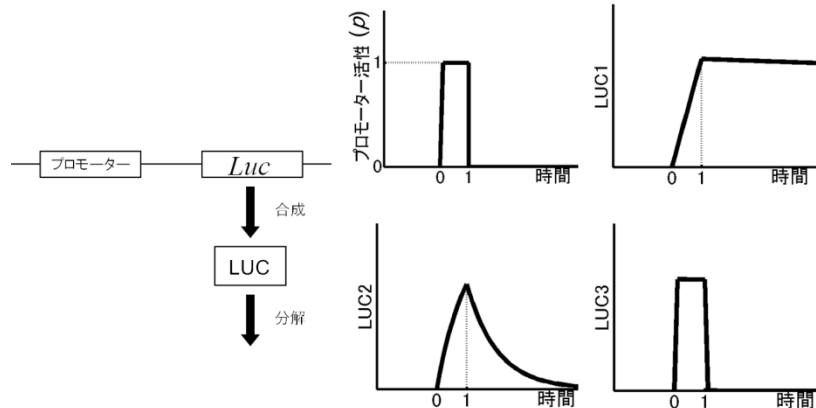


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問3. 時刻 $t=0$ における x の初期条件を $x=0$ とした場合、仮に p が一定とした場合の x の時間変化が以下の式であらわされることを示せ。

$$x(t) = \frac{p}{k} \{1 - \exp(-kt)\}$$

$dx/dt = p - kx = -k(x - p/k)$, $\{1/(x - p/k)\} dx = -k dt$ なので、

両辺を 0 から t まで定積分して $\log\{(x - p/k)/(-p/k)\} = -k \cdot t$,

両辺指数をとって $\{x - p/k\}/(-p/k) = \exp(-k \cdot t)$

辺辺整理して $x(t) = (p/k) \cdot \{1 - \exp(-k \cdot t)\}$

発展課題 2

解答例

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、^(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外に酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

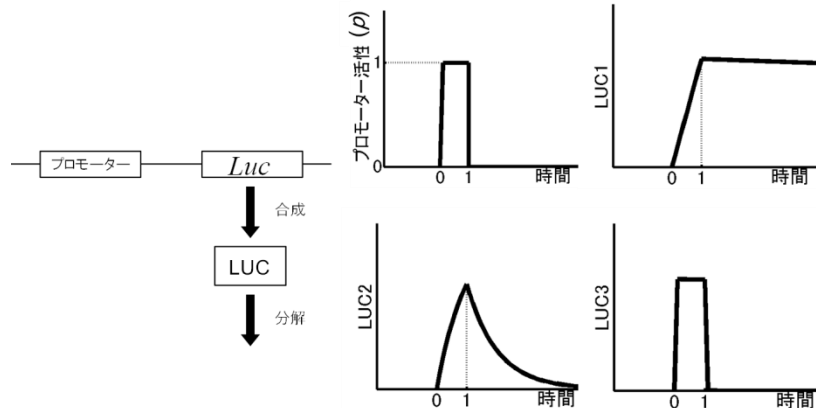


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問4. 変異体LUC1、LUC2、LUC3の分解速度定数 k_1 、 k_2 、 k_3 はそれぞれ $k_1=0.01$ 、 $k_2=1$ 、 $k_3=100$ であった。図において、時刻 $t=0$ から $t=1$ の間、 $p=1$ としたパルス刺激を与えた場合の、時刻 $t=1$ における変異体レポーター遺伝子産物LUC1、LUC2、LUC3の量を求めよ。ただし、 $\exp(-0.01)\approx 0.99$ 、 $\exp(-1)\approx 0.37$ 、 $\exp(-100)\approx 0$ として計算せよ。

LUC1,LUC2,LUC3それぞれ1, 0.63, 0.01

問5. 問4の結果から、分解速度と時刻 $t=1$ におけるレポーター遺伝子産物の量の関係を1～2行で述べよ。

分解速度が遅いほどレポーター遺伝子産物の量は多くなる

発展課題 3

解答例

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、^(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外に酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

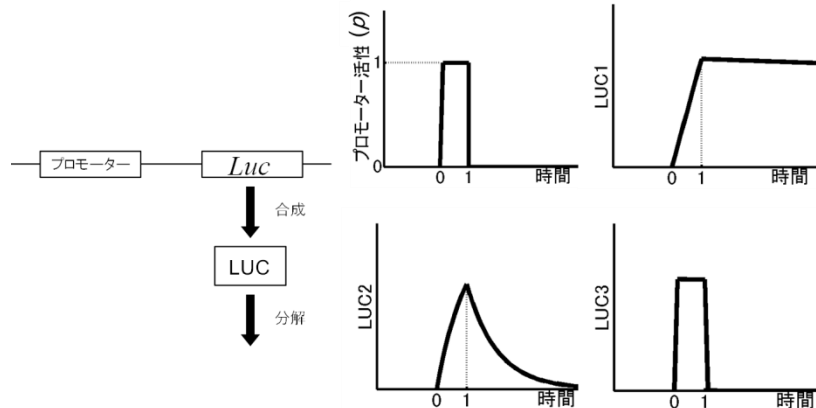


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問6. 図1におけるプロモーター活性と変異体レポーター遺伝子産物の量の時間波形の類似性と、変異体の分解速度定数との関係を1～2行で述べよ。

変異体の分解速度が高ければ高いほどプロモーター活性と変異体レポーター遺伝子産物の時間波形は類似する

発展課題 4

解答例

次の文を読み、以下の問1～7に答えよ。

細胞内の分子の活性をライブでモニターするためにさまざまなプローブが用いられている。実際に観測できるのはプローブが発する信号であり、目的の分子活性を直接計測しているわけでないため、プローブが発する信号の強度や時間パターンは必ずしも目的の分子活性の強度や時間パターンと一致するとは限らない。ここでは、^(a)ルシフェラーゼをプローブとして用いたレポーター遺伝子によるプロモーター活性の計測を例にとり、プローブの量と目的の分子活性の関係性を考えてみよう。

異なる分解速度を持つルシフェラーゼ(LUC)の3つの変異体(Luc1、Luc2、Luc3)をそれぞれ用いて、ある遺伝子のプロモーター活性を測定する場合を考える(図1)。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に、これらのレポーター遺伝子をそれぞれ組み込んだベクターを作成して細胞へ導入して、レポーター遺伝子産物の量を計測した。プロモーターが一過的に活性化された場合、変異体を用いて得られたレポーター遺伝子産物(LUC1、LUC2、LUC3)の量は図1のようになった。

ただし、図中のレポーター遺伝子産物の量のスケールはパネルごとに異なる。図中のプロモーター活性、レポーター遺伝子産物の量、時間はすべて無次元量である。ルシフェラーゼの変異体は分解速度以外は酵素活性を含みすべて同じ特性を示すものとする。レポーター遺伝子ベクターは同じ量だけ細胞内に導入されたとする。分子数や反応のゆらぎなどは考慮しない。

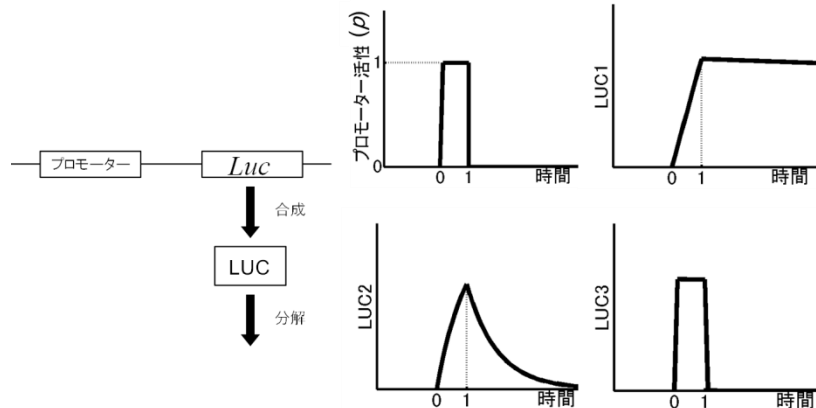


図1 レポーター遺伝子システム
によるプロモーター活性測定

問7. 問5と問6の結果から考察される変異体の分解速度の役割について、正しいものをすべて以下の選択肢から選べ。

- (ア)レポーター遺伝子産物の分解速度が遅いほど、レポーター遺伝子産物の量が多くなる。 (ア)、(イ)、(ウ)、(エ)
- (イ)レポーター遺伝子産物の分解速度が速いほど、レポーター遺伝子産物の量の時間パターンはプロモーター活性の時間パターンに類似する。
- (ウ)レポーター遺伝子産物の分解速度を上げると、レポーター遺伝子産物の量の時間パターンとプロモーター活性の時間パターンとの類似度は上がるが、一方、レポーター遺伝子産物の量は逆に減少するため信号強度は下がる。
- (エ)全く分解されないレポーター遺伝子産物を用いた場合、レポーター遺伝子産物の量はプロモーター活性の積分値となる。
- (オ)分解が遅いレポーター遺伝子産物の場合、プロモーター活性の持続時間が十分長ければ、レポーター遺伝子産物の量の時間変化と、プロモーター活性の時間変化の類似度は下がる。

参照情報

文献

- Chemical calcium indicators R. Madelaine Paredes 1, Julie C. Etzler 1, Lora Talley Watts, Wei Zheng, James D. Lechleiter * *Methods* 46 (2008) 143–151
- Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators
- Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca^{2+} indicators, yellow Cameleon-Nano
- Model of Intercellular Calcium Oscillations in Hepatocytes:

Synchronization of Heterogeneous Cells

- Correlated Oscillations in Glucose Langerhans Intracellular Free Ca^{2+} in Single Islets of Consumption, Oxygen Consumption, and Qian and Robert T. Kennedy Sung-Kwon Jung, Lisa M. Kauri, Wei-Jun *J. Biol. Chem.* 2000, 275:6642-6650.
- Glucose-Stimulated Calcium Dynamics in Islets of Langerhans in Acute Mouse Pancreas Tissue Slices Andraž Stožer, Jurij Dolensek, Marjan Slak Rupnik

株式会社 同仁化学研究所 <http://www.dojindo.co.jp/>

ノーベル賞財団 <http://www.nobelprize.org/>