

A Plate of live fish! - 生きたゼブラフィッシュによる研究

お客様の技術革新と創意工夫を称える、新設の Tecan Detection Award に優れた内容の応募が数多くあった。優劣を付け難い応募者の中から、結果、Georgia Health Sciences University (GHSU) の Jeff Mumm 教授が、Tecan のインフィニット M1000 と生きたゼブラフィッシュを使用したレポーター ベースの薬剤スクリーニング研究で 2 位の座を獲得した。

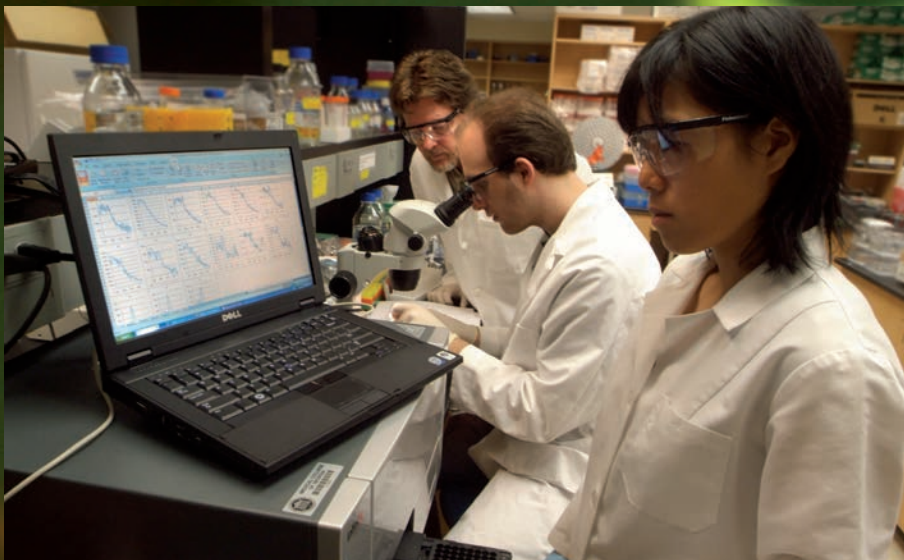
しかし我々が研究に使用している技術は、糖尿病やパーキンソン病など、研究対象とされやすい他の疾患にも応用され、それぞれインシュリンを分泌する膵臓のベータ細胞やドーパミン作動性ニューロンの再生方法を探るために使われています。

特定の種類の細胞が局所的に失われていることがわかるシステムを作ることで、幹細胞の増殖を包括的に誘導するよりもっと集中的な方法で介入できる、より目標を絞った治療法の開発が可能となります。」

標的細胞をアブレーションする（がん治療の手法を応用した）ニトロ還元酵素ベースのシステムを使用し、通常は発現しない種類の活性酵素を、破壊したい細胞に導入します。酵素は、初めのうちは全く無害ですが、プロドラッグが取り込まれると酵素がこれを毒素に変換するため、周辺の組織に影響を与えずに特定の細胞だけをきわめて特異的に破壊できます。再生研究を、神経、骨、筋肉などの組織を再生する組織レベルから、組織内の個々の細胞へと拡大するために、この方法をゼブラフィッシュにも応用しました。」

Mumm 博士は続ける。「再生法を研究するには、細胞がそこに存在する時、消失した時、再度現れた時を追跡できるよう、経時的なアッセイが必要です。そのため、ゼブラフィッシュの体内の蛍光シグナルを正確に検出できるマイクロプレートリーダーが必要となり、Tecan のインフィニット M1000 を選択しました。

インフィニット M1000 は、Z フォーカス機能と優れたシグナル / ノイズ比を備えています (>500:1)。またアッセイの感度がほぼ 10 倍に向上し、ごく弱いシグナルも検出できるようになりました。例えばベータ細胞の再生実験では、仔魚のベータ細胞が極めて微量なため、この機能はきわめて重要です。成魚も実験に使用しますが、スクリーニングできる成魚の数は、仔魚や幼魚に比べ少なくなります。仔魚の場合は 96 ウェルを使用できますが、成魚は 6 ウェルしか使用できないからです。我々は、2 種類のフルオロフォア（標的細胞への標識と近接する対照細胞への標識）を使用す

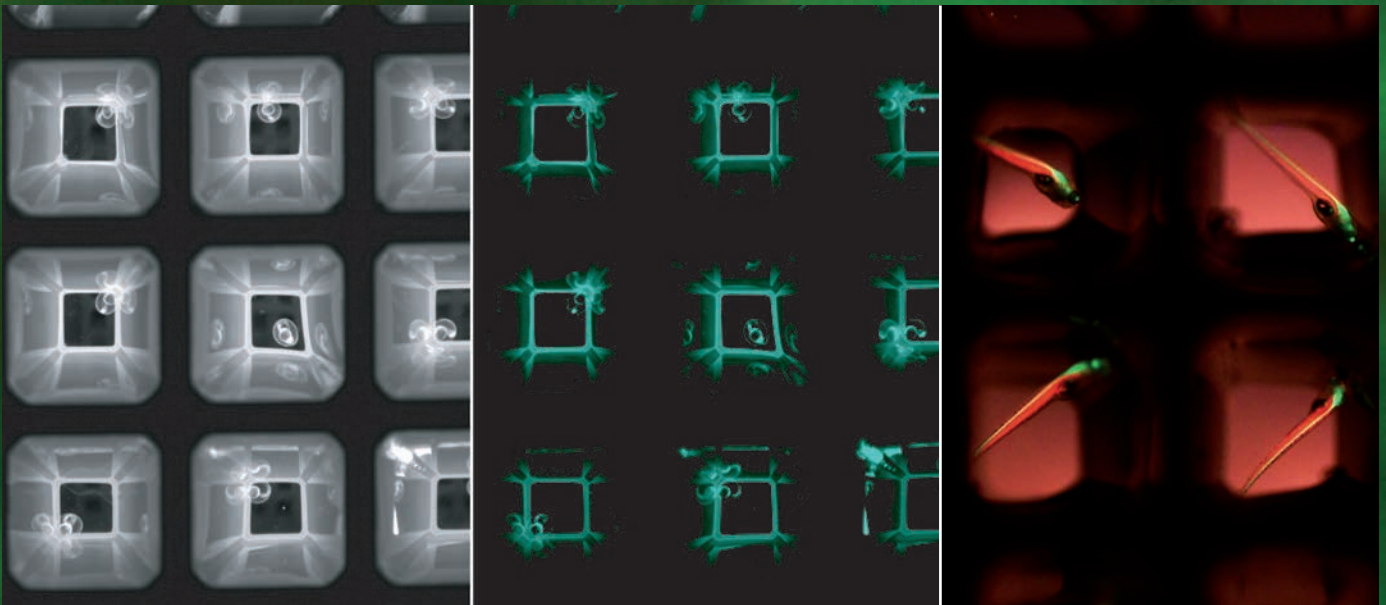


インフィニット M1000 で *in vivo* HTS アッセイを実施。Jeff Mumm 博士（左端）、Steven Walker 氏（中央）、Junko Ariga 氏（右）

GHSU の Department of Cellular Biology and Anatomy の研究者らが、生きたゼブラフィッシュを疾患モデルとして使用し、レポーターベースの薬剤スクリーニング アッセイ向けにハイ スループット システムを開発した。GHSU 准教授の Jeff Mumm 博士は、次のように語る。「ハイ スループット スクリーニング (HTS) を可能にするレポーター ベースの *in vitro/in silico* アッセイが定量マイクロプレートリーダーシステムによって開発された結果、創薬現場に大きな変化をもたらされました。この手法によって化合物の製品化率が近年、大躍進したのです。しかし今度は、HTS に対応可能な *in vivo* アッセイ用プラットフォームが不足しているため、生物学的バリデーション（薬剤候補が生きた疾患モデルにもたらす効果の確認）が創薬プロセスの課題となりました。ゼブラフィッ

シユは、薬剤のスクリーニング プロセスに独自のメリットをもたらすため、疾患モデルとしても、また HTS 法のモデルとしても適した脊椎動物のモデルシステムです。生きたゼブラフィッシュのレポーター レベルの定量化は、生物学的バリデーションの課題を軽減するための幅広い解決策となります。従って我々は、ゼブラフィッシュの各疾患モデルを対象に、蛍光レポーターの経時変化を検出できるシンプルかつ迅速で費用効率の高い検出法を開発しました。」

「私の専門は再生法で、我々のラボは変性疾患のさまざまな疾患状態を表すモデルを開発しています。我々の研究の大半は、網膜神経の再生に関するものです。網膜神経の様々なサブタイプの再生メカニズムを調査し、再生を可能にするための因子を特定しようとしています。



個々のアレイに入れられた遺伝子組み換え魚の1日齢の胚細胞（左と中央）、および5日齢の仔魚（右）

るレシオメトリック測定によって、アッセイの堅牢性を高めてきました。z-factorの数値はさまざまに良好になりつつありますが、これはおもにQuad4 Monochromators™テクノロジーのおかげです。」

「我々は、インフィニット M1000 を使用し、ゼブラフィッシュの疾患モデルにおける標的細胞の消失と再生の定量化だけでなく、疾患に関係する分子シグナル経路の低分子誘導による変化の定量化にも成功しています。シグナル/ノイズ比が高いため、各個体の変化をモニターできるのが重要なポイントです。シグナルをそれぞれの魚の基底状態に標準化することで、集団間のレポーターレベルの大きなばらつきを解消し、数日にわたる長期間の変化を検出できるようになります。我々はこのシステムを最適化するため、自己蛍光機能の特性を組み込み、レポーターの変異型を特定してシグナル/ノイズ比を調整しました。これを使用して、現在はHTSに適した独自のマルチウェルフォーマットを開発しています。インフィニット M1000 によって、我々は生きたゼブラフィッシュの蛍光/発光レポーター検出技術を応用し、幅広い化学物質や遺伝子のハイ スループット スクリーニングが可能なシンプルで費用効果の高い自動定量システムを開発することができました。」

この研究は、March of Dimes Basil O'Connor Starter Scholar Award の助成金 #FY 5-2010-7 によって部分的な支援を受けている。

Tecan のインフィニット M1000 については、www.tecan.co.jp/InfiniteM1000 をご覧ください。

Georgia Health Sciences University、Department of Cellular Biology に関する詳細は、ウェブサイト www.georgiahealth.edu/som/cba をご覧ください。

■この記事は2011年6月発行 Tecan Journal 2/2011 に掲載されているユーザーストーリーを抜粋、翻訳したものです。ご質問、ご要望は下記までお願いします。

テカンジャパン株式会社

TEL. 044-556-7311/FAX. 044-556-7312

E-mail: infojapan@tecan.com