

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05843

研究課題名(和文) 光応答性シグナル分子放出材料を用いた生体応答制御

研究課題名(英文) Regulation of cell responses by light controlled signal releasing material

研究代表者

坂口 怜子 (Sakaguchi, Reiko)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：80723197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は、生体内でシグナル分子として働いており、血管拡張や免疫系での研究は進んでいるが、神経系における作用については詳しい分子機構が明らかになっていない。

本研究では、NOのシグナル分子としての役割を解明するために、ラット由来細胞などを用いて、新規に開発された光応答性NO放出材料に対する応答を評価した。その結果、神経細胞突起のNO依存的な収縮応答を発見した。また、NO応答性Ca²⁺チャンネルと、細胞内NO産出酵素が、アダプタータンパク質を介して相互作用することを突き止め、Ca²⁺とNOシグナルを効率よく増幅するメカニズムを見出した。更に、生体内でNOを検出するセンサーを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一酸化窒素とその産出酵素が生体内で果たしている役割について明らかにした。生体内でシグナル分子として働いているNOが神経軸索伸長に関与するという知見から、神経変性疾患の発生機構やその治療、進行を抑制する手法の開発に資すると期待される。

また、本研究で見出された、NO産出酵素とCa²⁺チャンネルの機能連関は、生体で血流量の調整を担う血管拡張のメカニズムに光を当て、循環器系疾患の機構の理解に役立つと考えられる。さらに、本研究で開発された、生体内でNO産出をリアルタイムに検出することができるタンパク質ベースセンサーは、診断法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide (NO) functions as a signal molecule in our bodies and has been well studied as vasodilators and regulator of immune systems. However, its precise roles in neuronal system has not been clarified. This research aimed for elucidating the mechanism of nitric oxide production and its downstream roles by utilizing novel material that can release NO by light irradiation. By utilizing lasers for the trigger of NO release, the spatial and temporal resolution could be precisely controlled. Using this material, the effect of NO to neuronal development was investigated in PC 12 cells. The specific exposure to NO resulted in the shrinkage of neuronal axons.

On the other hand, a physical association between an NO-responding Ca²⁺ channel and nitric oxide synthase via an adaptor protein was discovered. This interaction could be a mechanism to efficiently amplify the Ca²⁺ and NO production for a positive feedback of the signals.

研究分野：生体関連化学

キーワード：細胞応答制御 ガスバイオロジー タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする高等生物の脳内では、神経細胞が複雑なネットワークを形成し、細胞同士で情報をやり取りすることによって記憶、思考、生命活動などを司っている。このネットワークが遺伝的要因や外的要因などにより異常をきたすと、体から脳、脳から体への情報伝達が正常に機能できなくなり、てんかんなどの神経疾患の原因となり得る。この神経ネットワーク形成の機構を解明し、人為的に制御する事が出来れば、一般に有効な治療法が乏しいとされる神経疾患の治療に役立つ。

神経細胞には、その生育を制御する(障害・促進の双方)成長因子と呼ばれる物質群が知られている。これらの物質の生育制御作用の機序は、「イオンチャネルを介した反応である」との一部の報告を除いて明らかになっていない。この反応を仲介する分子レベルでの機構のうちの一つとして、気体状シグナル伝達分子である一酸化窒素(NO)が候補に挙がっている。これまでの報告例から、NOは基本的には神経細胞の成長を抑制すると考えられているが、成長の初期などにおいては、神経軸索の伸長を促進する報告例もある。しかし、NOはガス状であり、目に見えない、拡散が早い、局所的運搬ができないなどの物理的性質のため、選択的な人工投与が難しく、NOを検知する分子実体と分子機構は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

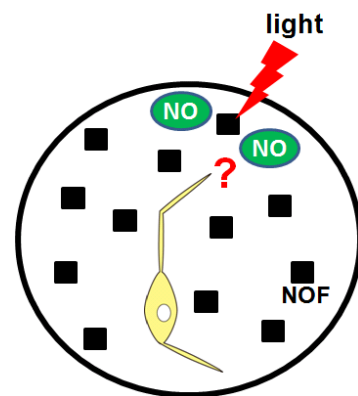
近年開発された「光に応答して一酸化窒素を放出する材料(NOF)」は、NOを大量に貯蔵し、光照射によって効率的、かつ局所的に放出することができる。従来の研究に多用されてきた、溶液中にNOを放出する供与剤と違って、細胞・個体内に対し、時間的・空間的に特異的に生体ガス分子による制御を可能にする。本研究ではこれを用いて、時間的、空間的に厳密に濃度制御されたNOを神経細胞に曝露させた場合の反応を観察し、NOが生体応答において果たす役割の解明を目的とした。

さらに、NOによって活性化するイオンチャネルとNO産出に関わる酵素の機能的なカップリングについての評価や、生体内におけるNOの産出を蛍光法でリアルタイムに検出する手法の開発を試みた。

3. 研究の方法

1: NOFによる神経細胞応答の観察

生体ガス分子の中でもNOは既に多くの研究例が存在し、特に、血管拡張や免疫系での研究は進んでいる。一方で、より局所的な制御に基づく研究はあまり進んでいない。本課題では、NOFを細胞培養皿に埋め込んだ材料を作製し、その上で神経様細胞(ラット由来PC12)を培養した。神経の分化前後の各段階で、培養皿に μm 単位の分解能でレーザー光を照射してNOを放出することによって、軸索の成長の方向性・速度・密度などを観察した。さらに、種々の阻害剤を用いて、NO依存的な応答の分子機構を探索した。観察には二光子顕微鏡を用いて、細胞毒性の少ない近赤外領域の光(ex. 740 nm付近)でNO放出を制御した。光照射の強度・間隔を制御することで細胞が晒されるNOの濃度を調節することができ、通常の細胞培養条件下で、NO放出をしながら長時間(~数日間)観察することで、神経分化から軸索の成長までを観察した。



図「神経細胞応答の光による制御」の概念図

2: NOの標的分子の解明

生体内におけるNOの標的分子を解明するために、様々なイオンチャネルと一酸化

窒素産出酵素(NOS)を HEK293 細胞に共発現させ、蛍光イメージング法と電気生理学的な手法によって NO と Ca^{2+} イオンの産出挙動の変化を観察した。また、ウェスタンブロットング法によって、NOS とイオンチャネルの物理的な相互作用を検出した。さらに、免疫染色法を用いて NOS とイオンチャネルの局在を観察し、免疫沈降法によって両者と相互作用する分子を探索することによって、NO と Ca^{2+} シグナル伝達の分子メカニズム解明を試みた。

4. 研究成果

NOF を用いた神経細胞の NO への応答評価

本研究では、NO のシグナル分子としての役割を解明するために、ラット由来細胞(PC12)などを用いて、NOF に対する応答を評価した。その結果、光 740 nm のレーザー照射によって引き起こされた NO 依存的に、神経細胞突起が収縮応答を起こすことを発見した。この応答は、光の強さ・照射時間に依存したことから、細胞内の NO 濃度に依存することが示唆された。各種のイオンチャネル阻害剤の処置実験から、この細胞応答には TRPA1、TRPV1 チャンネルは関わっておらず、 Cl^- チャンネルが関与していることが示唆された。

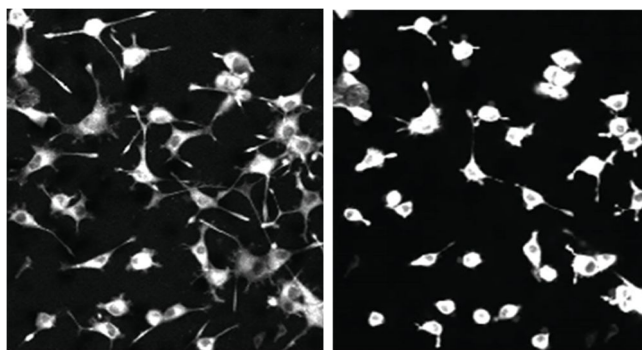


図 光照射に伴う NO 曝露による神経軸索の形態の変化。左:光照射前、右:光照射後。

NO と Ca^{2+} シグナルの効率良い増幅メカニズムの発見

NO に応答する Ca^{2+} チャンネルである TRPC5 と、細胞内で NO を産出する酵素(NOS)が、アダプタータンパク質を介して相互作用することを突き止めた。HEK293 細胞に TRPC5 と NOS を共発現させると、受容体刺激に応答して、TRPC5 を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が増強されることを見出した。この増強作用は、イオンチャネルの中でも、TRPC5 に特異的であることが分かった。さらに、TRPC5 と NOS が細胞内で物理的に共局在しており、両者の相互作用にはアダプタータンパク質が必須であることが分かった。

NOS は Ca^{2+} で活性化されるカルモジュリンによって制御されており、また、TRPC5 は NO によって活性が上がり、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる。両者を近接させるアダプタータンパク質の存在によって、ポジティブなフィードバックが実現し、 Ca^{2+} と NO シグナルを効率よく増幅するメカニズムを提唱した。この知見は、NO が制御する血管拡張などの生体応答や、その制御不全による疾患の発生機構の理解に資すると考えられる。

生体内で NO を検出するセンサーを開発

さらに、生体内で NO を検出するセンサーのプロトタイプを開発した。チャンネルタンパク質 TRPC5 は NO に応答した構造変化により開口が制御されていることが示唆されている。そこで、TRPC5 の部分構造と EGFP の融合タンパク質を作製し、NO 産出に伴うタンパク質の構造変化を、EGFP の蛍光変化により直接検出することに成功した。このセンサーはタンパク質ベースであることから、遺伝子配列上に細胞内局在シグナルを付加するだけで細胞小器官特異的に発現させることが可能で、生体内の NO センサーとしての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Christian T, Sakaguchi R, Perlinska AP, Lahoud G, Ito T, Taylor EA, Yokoyama S, Sulkowska JI, Hou YM	4. 巻 10
2. 論文標題 Methyl transfer by substrate signaling from a knotted protein fold	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nat Struct Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 941-948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/nsmb.3282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Qian N, Ichimura A, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H.	4. 巻 12
2. 論文標題 TRPM7 channels mediate spontaneous Ca ²⁺ fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 pii: eaaw4847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aaw4847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Polat OK, Uno M, Maruyama T, Tran HN, Imamura K, Wong CF, Sakaguchi R, Ariyoshi M, Itsuki K, Ichikawa J, Morii T, Shirakawa M, Inoue R, Asanuma K, Reiser J, Tochio H, Mori Y, Mori MX.	4. 巻 30
2. 論文標題 Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol	6. 最初と最後の頁 1587-1603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018070756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Masamune A, Kotani H, Sengel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R, Masson E, Nakano E, Kakuta Y, Niihori T, Funayama R, Shirota M, Hirano T, Kawamoto T, Hosokoshi A, Kume K, Unger L, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Variants that Affect Function of Calcium Channel TRPV6 are Associated with Early-onset Chronic Pancreatitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1626-1641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tajima S, Nakata E, Sakaguchi R, Saimura M, Mori Y, Morii T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Fluorescence detection of the nitric oxide-induced structural change at the putative nitric oxide sensing segment of TRPC5.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem	6. 最初と最後の頁 115430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda I, Igarashi T, Sakaguchi R, Nitharwal RG, Takase R, Han KY, Leslie BJ, Liu C, Gamper H, Ha T, Sanyal S, Hou YM.	4. 巻 45
2. 論文標題 A genetically encoded fluorescent tRNA is active in live-cell protein synthesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 4081-4093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkw1229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi
2. 発表標題 TRPC5 channel-Caveolin-1-eNOS signalplexes coordinate interplay between Ca ²⁺ and NO signals in endothelial cells
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi
2. 発表標題 Development of Real-time Sensors to Visualize Intracellular Signaling Pathway
3. 学会等名 2nd meeting on "Assembly of Innovative, Knowledgeable, and Outgoing Chemists"
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi, Seiji Tobita, Yasuo Mori.
2. 発表標題 Non-invasive, quantitative visualization of oxygen environment deep inside tumor spheroids by 2-photon excitation phosphorescence lifetime imaging.
3. 学会等名 第5回低酸素研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口 怜子、清中茂樹、森 泰生
2. 発表標題 細胞内熱産生機構の可視化-細胞内温度変化は測定可能か？-
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 ヘバ バドゥー、香西 大輔、坂口 怜子、沼田 朋大、森 泰生
2. 発表標題 アセトアミノフェンに誘導されるヒト肝ガン細胞死における酸化還元感受性TRPチャネルの役割
3. 学会等名 第130回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 坂口 怜子、清中茂樹、森 泰生
2. 発表標題 細胞内発現型温度センサーによるオルガネラ特異的な温度特性の可視化
3. 学会等名 Biothermology Workshop 生命システムの熱科学
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 安好 悠太, 波多野 雅彦, 坂口 怜子, 清中 茂樹, 浜地 格, 森井 孝, 吉崎 武尚, 森 泰生
2. 発表標題 細胞内小器官特異的な熱ダイナミクスの可視化
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi
2. 発表標題 Development of fluorescent tools to visualize intracellular signaling.
3. 学会等名 International Symposium of Biofunctional Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口 怜子, 森 泰生
2. 発表標題 蛍光性タンパク質温度センサーを用いた生体内温度分布の可視化とその意義の解明
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口 怜子
2. 発表標題 生体内シグナルの可視化と制御
3. 学会等名 新学術領域「酸素生物学」シンポジウム「分子から個体へ：俯瞰と接近の生命科学」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi
2. 発表標題 Development of Intracellular Thermosensors for the Understanding of Energy Production in Mitochondria.
3. 学会等名 The 9th International Symposium of Advanced Energy Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi
2. 発表標題 TRPC5 channel-Caveolin-1-eNOS signalplexes coordinate interplay between Ca ²⁺ and NO signals in endothelial cells
3. 学会等名 1st WPI NanoLSI-iCeMS Joint Symposium on Nanoimaging and Advanced Materials for Life Science. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Reiko Sakaguchi, Shunsuke Tajima, Yasuo Mori, Takashi Morii	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 11
3. 書名 Detection of Inositol Phosphates by Split PH Domains. In: Miller G. (eds) Inositol Phosphates. Methods in Molecular Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考