

平成 23 年 5 月 19 日現在

機関番号：13201
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20700331
 研究課題名（和文） スプリットルシフェラーゼを用いた単一神経細胞での CREB 活性化計測
 研究課題名（英文） Monitoring of CREB phosphorylation in single live neuron using split luciferase
 研究代表者
 石本 哲也（Tetsuya Ishimoto）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教
 研究者番号：40397170

研究成果の概要（和文）：cAMP response element binding protein (CREB)は、リン酸化によって活性化される、転写因子である。そのリン酸化を、生きた細胞内で発光により検知するプローブ蛋白質を作製改良した。当初計画した 1 分子型プローブに加え、2 分子型プローブの作製に成功した。これによりリン酸化検出の特異性が飛躍的に上昇した。

研究成果の概要（英文）：cAMP response element binding protein (CREB) is a transcription factor which is activated by phosphorylation. We developed probe proteins that detected CREB phosphorylation using bioluminescence. In addition to the 1-molecule-type probe that was planned at the beginning of the project, we made 2-molecule-type probes. This approach increased the specificity of the probes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：CREB、リン酸化、ルシフェラーゼ、

1. 研究開始当初の背景

ホタルルシフェラーゼは発光蛋白質として知られ、SN比の良いこと、分子数と発光量が比例することから、プロモーターアッセイ等に用いられてきた。近年そのルシフェラーゼをN末端とC末端に分割したスプリットルシフェラーゼが開発された。スプリットルシフェラーゼは、N末端側とC末端側に分割

された状態では光を発しないが、細胞中で会合すると、発光を開始する。この性質を利用してN末端側、C末端側それぞれに任意の蛋白質を融合させ、細胞内で発現させると、融合させた蛋白質の結合に応じてルシフェラーゼの発光が起きる（図1）。

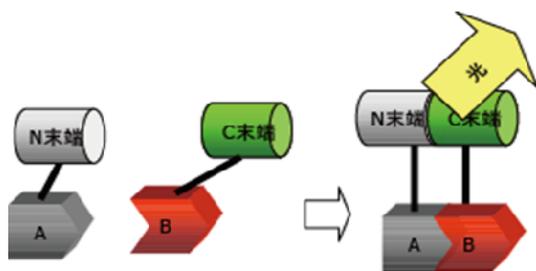


図1 スプリットルシフェラーゼの発光原理。融合蛋白質として発現させた塩尻質AとBが結合することで、ルシフェラーゼのN末端とC末端が会合し、発光する。

このスプリットルシフェラーゼを導入して、培養細胞集団や、その細胞集団をマウス個体に移植したものを計測対象として、いくつかの実験が行われている (PNAS 2002 (99) 15608, Anal. Chem 2006(78)8076)。ルシフェラーゼの発光は微弱なため、スプリットルシフェラーゼの技術は数百万以上の細胞の

	長所	短所
FRET法	時間分解能、空間分解能が良い	S/N比が悪い 励起光を必要とする
スプリットルシフェラーゼ	S/N比が良い 励起光がいら ない (細胞に害 を与えない)	暗い (単一の細胞 でリアルタイム観 察した報告はない)

集団、もしくは個体レベルでの観察に向いており、顕微鏡下の単一細胞レベルでスプリットルシフェラーゼの発光の増減を、リアルタイムで観察した報告は現在までない。

スプリットルシフェラーゼ以外で、蛋白質同士の結合を光で計測する方法として、CFP、YFPなどの蛍光蛋白質を用いたFRET法が広く知られている。この方法は顕微鏡下で単一の細胞を観察するのに十分な蛍光を発するが、半面S/N比が悪い、励起光を当てることが必要なため細胞に対して傷害を与える可能性がある、などの短所がある。表1はこれら2つの方法の長所と短所をまとめたものである。

(表1)

2. 研究の目的

スプリットルシフェラーゼを細胞生物学的実験に用いようとするとうりのように発光量が少ない点が問題になる。本研究ではスプリットルシフェラーゼの発光量を上げることによって単一培養神経細胞においても細胞中の蛋白質の挙動をリアルタイムでモニタリングできるようにすることが目的である。

今回スプリットルシフェラーゼプローブ

を用いて活性を計測するのは cAMP response element binding protein (CREB) である。この蛋白質は転写因子であり、その転写活性が上昇することで記憶形成に必要な蛋白質が合成されることが報告されている。また CREB による転写活性化はその 133 番目のセリンがリン酸化され、CREB binding protein (CBP) に結合することで起きることが明らかになっている (図2)。これ

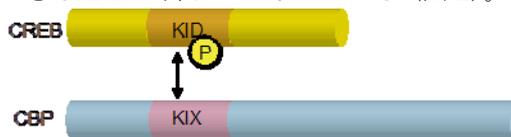


図2 CREBとCBPの結合模式図

らの知見から、CREB のリン酸化ドメインである KID、また KID が結合する CBP の KIX ドメインにスプリットルシフェラーゼを融合させることで CREB の活性化を計測できるプローブ蛋白質を作製することを試みた。CREB のリン酸化が培養神経細胞においてどのような刺激でどういったタイミングで起きるか調査することによって、記憶形成のメカニズム解明に寄与すると期待される。

3. 研究の方法

申請時の計画では一分子型スプリットルシフェラーゼを用いて、CREB のリン酸化を計測する予定であった。この一分子型プローブは神経細胞に発現させ、神経細胞を興奮させる刺激を与えると、発光量を増大させた。当初この一分子型プローブのリンカー部分の配列を改変してより発光量の大きいプローブを作製しようと試みた。しかし、一分子型プローブの 133 番目のセリンをアラニンに変換したプローブを神経細胞に発現させて、神経細胞に刺激を与えた場合でも発光の上昇がみられることが明らかになった。これは 133 番目のセリンのリン酸化が起きなくても発光が上昇することを示している。この原因として考えられるのは、一分子型プローブ作製に用いた KID ドメインが、133 番目のセリンのリン酸化以外の要因でコンフォメーシ

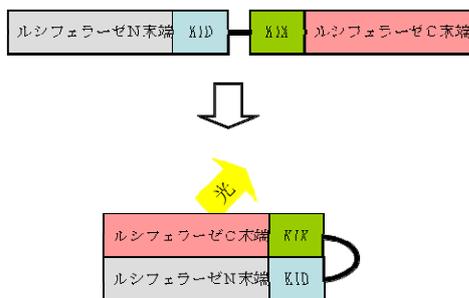


図3 1分子型スプリットルシフェラーゼCREBが活性化するとCREBのKIDドメインとCBPのKIXドメインが結合することに基づいている。

ジョンを変化させ、全体的な立体構造に影響を与えるためだと考えられた。

そこで申請時の計画に加えて、2分子型スプリットルシフェラーゼによって CREB リン酸化を検知するプローブを作製することを試みた

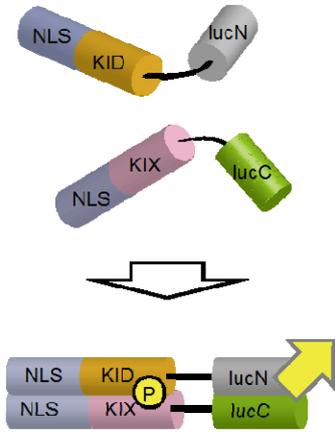


図4 2分子型スプリットルシフェラーゼによるCREBリン酸化の検出

によって KIX ドメインと結合し、その結果ルシフェラーゼの N 末端、C 末端が近傍に位置することになり、発光が復活する。研究期間内に 2 分子型プローブのリンカー配列の改変を試みる。

具体的な研究方法としては図 4 に示したように、KID、KIX ドメインとルシフェラーゼ N、C 末端からなる融合蛋白質を HEK293T 細胞に遺伝子導入する。導入 2 日後、培地中にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加え、各 well からの発光を光子カウンターを用いて計測する。HEK293T 中では内在性 CREB もある程度リン酸化されていることがすでに分かっているので、刺激をしない状態でどのプローブ蛋白質の組み合わせが最も発光量が多いか網羅的に解析する。

もっとも発光量が多い組み合わせが明らかになったら、CREB のリン酸化を上昇させる刺激を細胞に与えた時に実際に発光が上昇するかを確かめる。CREB を刺激する方法としては、細胞内の cAMP 濃度を上昇させる forskolin を用いる。

Forskolin 刺激によって発光の上昇が観測できたら、その発光上昇が CREB の 133 番目のセリンのリン酸化によるものかを試験する。プローブ蛋白質の KID ドメイン内にある 133 番目のセリンをアラニンに置換して、同様の実験を行い、forskolin に対する発光上昇がなくなるか確かめる。

4. 研究成果

研究開始時、一分子型スプリットルシフェラーゼを用いて明るい発光プローブを作製することを目標としていたが、一分子型プロ

を試みた (図 4)。このプローブは、KID ドメインとルシフェラーゼ N 末端、KIX ドメインとルシフェラーゼ C 末端の融合蛋白質であり、KID がリン酸化されること

ープでは、リン酸化部位を置換した変異体プローブも forskolin 刺激に反応し、発光を上昇させる結果となった。このことから当初の予定であった一分子型プローブの改良を断念し、2 分子型プローブを改良することとした。

2 分子型プローブの配列で主に改変した部分はルシフェラーゼの N、C 末端と KID、KIX ドメインをつなぐリンカー部分の配列と各ドメインの位置であった。それら配列の異なるスプリットルシフェラーゼの組み合わせを 72 種類試してみたところ、300 倍もの発光量を示す組み合わせが見つかった (図

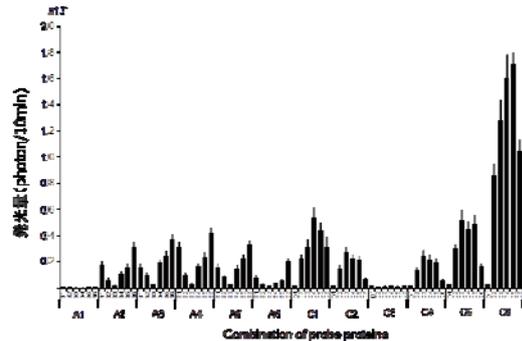


図5 プローブの組み合わせによる発光量変化

5)。もっとも発光量の高いプローブを用いて、実際に CREB のリン酸化を計測できるか検証した。図 5 で得られたプローブと、KID ドメインのリン酸化部位である 133 番目のセ

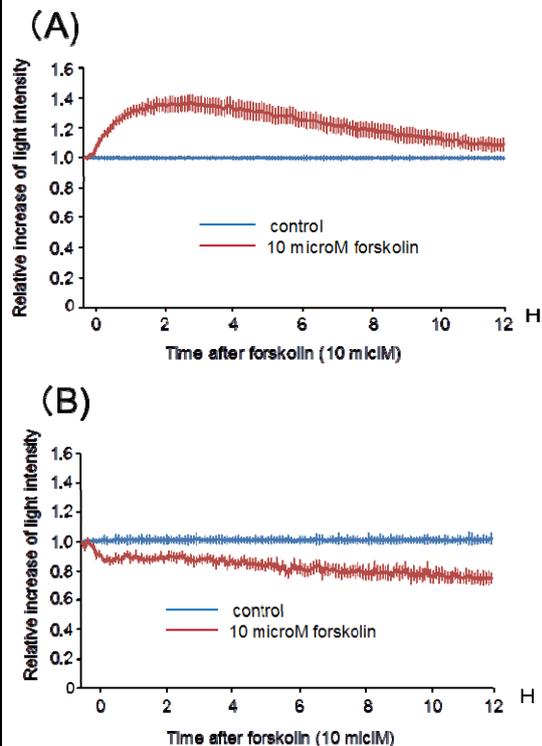


図6 (A)プローブのフォルスコリンに対する反応。(B)リン酸化部位を変異させたプローブはフォルスコリン刺激しても発光上昇がみられない。

リンをアラニンに置換した変異体プローブを HEK293T に発現させて、細胞内 cAMP の濃度を上昇させる forskolin で刺激することによって CREB のリン酸化を誘導した。その際プローブからの発光は上昇し、2-3 時間後にピークに達した。一方リン酸化部位を変異したプローブではこの発光上昇は見られなかった (図 6)。

この結果は、我々が作製したプローブが正確に CREB のリン酸化のみを計測していることを表している。ただし、単一神経細胞レベルでの発光計測にはまだ成功していない。今後 2 分子型プローブをさらに改良することによって当初の目標であった単一神経細胞レベルでの CREB リン酸化のモニタリングをめざす。

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 2 件)

① Real-time monitoring of actin polymerization in living cells using split luciferase. Ishimoto T, Ozawa T, Mori H. Bioconjugate Chemistry [in press] 査読有

② Bioluminescence imaging of Arc expression enables detection of activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. Izumi H, Ishimoto T, Yamamoto H, Nishijo H, Mori H. Brain Struct Funct. [in press] 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 石本 哲也, 小澤 岳昌, 森 寿: Actin polymerization and its role in UV-induced HEK293T cell death. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011, 3, 24, 横浜.

② 和泉 宏謙, 石本 哲也, 山本 博, 西条 寿夫, 森 寿: Bioluminescence imaging of Arc gene expression detects neural activity-dependent changes in vivo. 第 33 回日本神経科学大会, 2010, 9, 2-4, 神戸.

③ 石本 哲也, 小澤 岳昌, 森 寿: Real-time measurement of actin polymerization in live cells: Transient upregulation in F-actin after UV irradiation and its protective effect on cell death. 第 33 回日本神経科学大会, 2010, 9, 2-4, 神戸.

④ 石本 哲也, 和泉 宏謙, 小澤 岳昌, 森 寿: Real-time measurement of F-actin content during cell death using a bioluminescence based method. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009, 12, 9, 横浜.

⑤ Ishimoto T., Izumi H., Ozawa T., Mori H. : DETECTION OF PROTEIN-PROTEIN

interaction in living cells using a bioluminescence based method. The 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2009, 10, 19, Chicago, USA.

⑥ 石本 哲也, 和泉 宏謙, 小澤 岳昌, 森 寿: 生物発光を利用した細胞内アクチン重合の計測. 第 32 回日本神経科学大会, 2009, 9, 17, 名古屋.

⑦ 石本 哲也, 和泉 宏謙, 小澤 岳昌, 森 寿: スプリットルシフェラーゼを用いたアクチン重合の検出. 第 82 回日本薬理学会年会, 2008, 3, 16, 横浜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 神経活動を可視化するプローブ

発明者: 石本 哲也, 森 寿, 和泉 宏謙

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2009/64225

出願年月日: 2009, 8, 12

国内外の別: 海外

②名称: 記憶形成の神経活動を可視化するプローブ

発明者: 石本 哲也, 森 寿, 和泉 宏謙

権利者: 富山大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-207546

出願年月日: 2008, 8, 12

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

① 石本 哲也: 新規発光蛋白質プローブを用いた蛋白質活性化の計測. とやま産学官金交流会 2010, 2010, 12, 8, 富山

② 石本 哲也: 新規発光蛋白質プローブを用いた蛋白質活性化の計測. 富山大学コラボフェスタ 2010-新技術紹介, 2010, 9, 3, 富山.

③ 石本 哲也: 生物発光を利用したアクチン重合, CREB 活性化の検出. 北陸アカデミア新技術説明会. 2009, 10, 8, 東京

④ 石本 哲也: 記憶形成の脳内イメージング. さきがけ 3 領域合同研究報告会, 2008, 12, 24, 東京.

⑤ 石本 哲也: ルシフェラーゼを用いた蛋白質活性化計測技術の開発. 富山の未来を拓く科学技術交流会, 2008, 8, 18, 富山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 哲也 (Tetsuya Ishimoto)

研究者番号 : 40397170

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :