

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500379

研究課題名（和文） 赤色蛍光カルシウムセンサーの開発

研究課題名（英文） Development of a red fluorescent Ca²⁺ sensor

研究代表者

中井 淳一（NAKAI JUNICHI）

埼玉大学・脳科学融合研究センター・教授

研究者番号：80237198

研究成果の概要（和文）：

この研究の目的は、蛍光蛋白質をもとに蛋白質でできた「赤色光励起により赤色蛍光を発する」カルシウムセンサーを開発することである。我々は独自に開発した緑色カルシウムセンサー蛋白質 G-CaMP2 の GFP 円順列変異体ドメインを RFP の円順列変異体で置換して赤色センサーのプロトタイプを作製し、このプロトタイプにランダム変異導入を行った上で高性能なセンサーの探索を進めた。その結果、Ca²⁺結合に伴って大きな赤色蛍光変化を示すセンサー（R-CaMP と命名）を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to develop a fluorescent protein-based red fluorescent Ca²⁺ sensor which can be excited by red light and emit red fluorescence. We generated a prototype red fluorescent Ca²⁺ sensor by replacing the circularly permuted GFP domain of G-CaMP2, which is our original green fluorescent Ca²⁺ sensor, with the circularly permuted RFP, then randomly mutagenized this prototype sensor and screened variants with high performance. As a result, we successfully found the sensor termed R-CaMP, which showed a great red fluorescence change upon Ca²⁺ binding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：カルシウム、シグナル伝達、バイオテクノロジー、生理学、神経科学

1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオンは周知のごとく、細胞内のセカンドメッセンジャーであり、神経細胞、筋肉、分泌細胞などほとんどすべての細胞で重要な働きをしている。従って、種々の細胞の活動をモニターするためカルシウムセンサーは広く利用されている。

カルシウムセンサーは、人工合成された Fura2 等に代表される色素や、Green Fluorescent Protein (GFP) を用いた蛍光カルシウムセンサー、エクオリンに代表される発光蛋白質が現在利用されており、分子センサーの分野では最も研究や応用が進んでいる。GFP を代表とする発光蛋白質を用いた分子

センサーは、1990年代後半から作成されるようになり、これまでpH、カルシウム、イノシトール三リン酸 (IP₃) など種々のものを感知するセンサーが作成されている¹。GFPを用いた蛍光カルシウムセンサーに関しては、これまでCameleon、Pericam、G-CaMP、Troponinなどが開発されている^{2,3}。このうちG-CaMPは、我々が開発した蛍光カルシウムセンサーで^{4,6}、平滑筋や心筋、神経細胞などの細胞機能をin vivoで解析し報告してきた^{6,9}。

これまでのGFPを用いた蛍光カルシウムセンサーはほとんど緑色から黄色の蛍光カルシウムセンサーで、赤色蛍光蛋白 (DsRed) を用いて赤色の蛍光を持つ蛍光カルシウムセンサーも開発されているが¹⁰、励起光は青～緑の波長の励起光を用いる必要があった。

本研究の目的は「赤色光励起により赤色蛍光を発する」カルシウムセンサーを開発することにあるが、赤色光で励起できる蛍光カルシウムセンサーができれば以下の点で非常に有効である。

(1) 赤色の励起光はエネルギーが低く、組織に対する光・熱損傷を軽減できる。

(2) 光の波長が長くなると組織の散乱がより少なくなるので、励起光が組織の深部に到達する。また組織の深部からの蛍光も波長が長いほど散乱されにくくなる。

(3) in vivo測定ではフラビンなどの緑～黄色の自家蛍光が測定の障害となることがあるが、赤色のスペクトル領域では自家蛍光が格段に弱く、自家蛍光に影響されず測定できる。

(4) これまでGFPをマーカーとした種々のトランスジェニック動物が作成され、世界中で利用されている。これらのGFPを組み込んだ動物に赤色のカルシウムセンサーは使用することができ、同じサンプルで、細胞を同定しながらカルシウムの測定を行うことが可能となる。

(5) channelrhodopsin、halorhodopsinなど光刺激が可能な分子との同時使用が可能である。

以上のことは一光子および二光子励起についていえる。

欠点として、波長が長くなると分解能が低下する。しかし、神経細胞のスパインを観察する程度の分解能は十分確保できると考えられる。また、二光子励起顕微鏡での測定には、さらに長波長のレーザーが必要になる可能性がある。

我々は、開発したG-CaMPの遺伝子を、これまで国内外の300箇所以上の研究室に提供してきた。こうした研究者は、新たなカルシウムセンサーに対する期待が大きく、使用できるセンサーの選択肢が増えることは歓迎されている。他のカルシウムセンサー (CameleonやTroponin) についても地道な

改良努力が続けられており、最も進んでいるカルシウムセンサーといえども、まだまだ研究する余地が十分に残されている。

このように研究代表者は、GFPを用いたカルシウムセンサーの開発経験およびカルシウムイメージングの経験から本研究の赤色光励起により蛍光カルシウムセンサーの着想に到った。

文献

- ① Tsien RY (2002) Imagining imaging's future. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 906-918.
- ② Miyawaki A (2005) Innovations in the imaging of brain functions using fluorescent proteins. *Neuron* **48**, 189-199.
- ③ Nakai J & Ohkura M (2003) Probing calcium ions with biosensors. *Biotechnol and Gen Engineer Rev* **20**, 1-19.
- ④ Nakai J, Ohkura M & Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **19**, 137-141.
- ⑤ Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, Imoto K & Nakai J (2005) A genetically encoded bright Ca²⁺ probe applicable for dynamic Ca²⁺ imaging of dendritic spines. *Analytical Chem* **77**, 5861-5869.
- ⑥ Tallini YN*, Ohkura M*, Choi B-R*, Ji J, Imoto K, Doran R, Lee J, Plan P, Wilson J, Xin H-B, Sanbe A, Gulick J, Mathai J, Robbins J, Salama G, Nakai J & Kotlikoff MI, *These authors contributed equally. (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high signal Ca²⁺ indicator G-CaMP2. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4753-4758.
- ⑦ Ji G, Feldman M, Deng K-Y, Green KS, Wilson J, Lee J, Johnston R, Rishniw M, Tallini Y, Zhang J, Weir WG, Blaustein MP, Xin H-B, Nakai J & Kotlikoff MI (2004) Ca²⁺-Sensing Transgenic Mice: Postsynaptic Signaling in Smooth Muscle. *J Biol Chem* **279**, 21461-21468.
- ⑧ Reiff DF, Ehring A, Guerrero G, Isacoff EY, Joesch M, Nakai J & Borst A (2005) In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activities in flies. *J Neurosci* **25**, 4766-4778.
- ⑨ Díez-García J, Matsushita S, Mutoh H, Nakai J, Ohkura M, Dimitrov D, Yokoyama J & Knöpfel T (2005) Activation of cerebellar parallel fibers monitored in transgenic mice expressing a fluorescent calcium indicator protein. *Eur J Neurosci* **22**, 627-635.
- ⑩ Mizuno H, Sawano A, Eli P, Hama H & Miyawaki A (2001) Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner

for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **40**, 2502-2510.

2. 研究の目的

この研究は、蛍光蛋白質をもとに蛋白質でできた「赤色光励起により赤色蛍光を発する」カルシウムセンサーを開発することである。最終的に開発したセンサーをモデル動物に発現させ、神経細胞およびグリア細胞の細胞活動を *in vivo* で測定できることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 赤色蛍光カルシウムセンサーcDNAの作製

分子生物学的方法を用いて、赤色の蛍光蛋白質 DsRed やその他の RFP の種々の変異体 cDNA と、カルシウム結合蛋白質 (カルモジュリン等) の cDNA と、ミオシン軽鎖キナーゼの M13 断片の cDNA を結合させ、大腸菌の発現ベクターに組み込んだ。この際、蛋白質精製を効率的にまた、容易に行うためタンパク質の N 末端に His tag を導入した。また、PCR による random mutagenesis により変異を導入した。配列は制限酵素による解析および DNA シーケンスにより確認した。

(2) 大腸菌での発現と *in vitro* 機能評価

DNA を大腸菌に導入し、蛋白質発現を誘導した。目的の蛋白質は His tag を持っているため、His tag 用のアフィニティービーズをもちいて精製した。精製した蛋白質は蛍光分光光度計および分光光度計を用いて、カルシウムイオン濃度に対する蛍光変化量、Kd、ヒル係数、モル吸光係数、量子効率を測定した (Ohkura M et al, (2005) *Analytical Chem* 77, 5861-5869)。場合によって pH や塩素イオンに対する感受性を蛍光分光光度計を用いて測定した。

(3) 培養細胞でのカルシウムセンサーの検討

分子生物学的手法により、cDNA を動物細胞発現ベクターに組み込んだ。こうして作成した DNA を HEK293 や HeLa 等の培養細胞に、リポフェクチン法 (Lipofectamine2000, Invitrogen) により導入した。

カルバコールやイオノマイシン等のカルシウムの上昇を誘発する試薬を投与し、その際の蛍光変化を蛍光顕微鏡を用い測定した。測定は CCD カメラ (ORCA-ER 浜松ホトニクス) を用い AquaCosmos (浜松ホトニクス) にて解析した。またコンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて測定した。

(4) マウスでの発現と生体内でのセンサーの *in vivo* 機能評価

マウスの海馬からスライス標本を作成し、培養した。CCD カメラ (OrcaER 浜松ホトニクス) やコンフォーカルレーザー顕微鏡 (CUS-XI Yokogawa) により神経活動に伴うカルシウム変化を記録した。電気生理学方法により活動電位を記録し、活動電位と蛍光変化とを対比して、センサーの有効性を検討した。

また、マウスの海馬からスライス標本を作成し、channelrhodopsin 2 と開発した R-CaMP を共発現させ、channelrhodopsin 2 を刺激するための青色光が R-CaMP を励起するかどうかを光学的手法により検討した。さらに、R-CaMP の励起光が channelrhodopsin 2 を活性化するかどうかをパッチクランプ法による電気生理学的手法とコンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた光学的方法を組み合わせることにより検討した。

4. 研究成果

(1) 赤色蛍光カルシウムセンサー蛋白質 R-CaMP の開発

我々が独自に開発した緑色カルシウムセンサー蛋白質 G-CaMP2 (図 1) の GFP 円順列変異体 (cpGFP) ドメインを RFP の円順列変異体 (cpRFP) で置換して赤色センサーのプロトタイプを作製し、このプロトタイプにランダム変異導入を行った上で高性能なセンサーの探索を進めた。その結果、カルシウム結合に伴って大きな赤色蛍光変化を示すセンサー R-CaMP1.01 (図 1) を見出すことに成功した。R-CaMP1.01 を汎用株細胞である HeLa 細胞に発現させたところ、予期せぬことに R-CaMP1.01 が細胞質のみならず核内にも局在することを見出した (図 2)。核内局在は、緑色カルシウムセンサー蛋白質局在



図 1 カルシウムセンサーの構造模式図

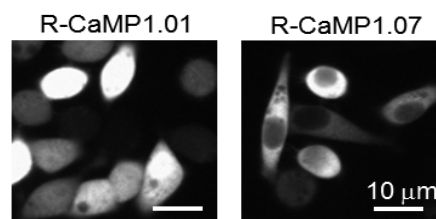


図 2 R-CaMP 発現細胞の蛍光画像

移行の現象は、緑色カルシウムセンサー蛋白質である G-CaMP では見られない現象である。構造的に R-CaMP1.01 は G-CaMP2 と cpEGFP 部分以外は全く同一であるため、R-CaMP1.01 の核内移行の問題は、cpRFP 部分に由来する問題であると考えられた。

細胞質のカルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすことが知られている ATP で R-CaMP1.01 を発現している HeLa 細胞を刺激したところ、R-CaMP1.01 の赤色蛍光強度は大きく変化した。

(2) 核内への局在を示さずさらに高い蛍光反応性を示す改良体 R-CaMP の開発

センサー性能はセンサーの N 末端や C 末端へのペプチド付加によって修飾を受けることが報告されていることから、R-CaMP1.01 の改良を目的として R-CaMP1.01 へのさまざまなペプチド付加を行った変異体を検討した。その結果、R-CaMP1.01 の C 末端に付加配列を有する変異体 R-CaMP1.07 (図 1) が核内への局在を示さず (図 2)、高い蛍光反応性を示すことを発見した (図 3)。R-CaMP1.07 の光学特性を検討した結果、R-CaMP1.07 は 562 nm の赤色光で励起され、584 nm の赤色蛍光

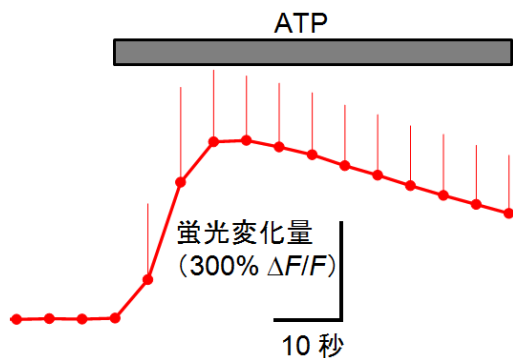


図 3 R-CaMP1.07 発現細胞の蛍光シグナル

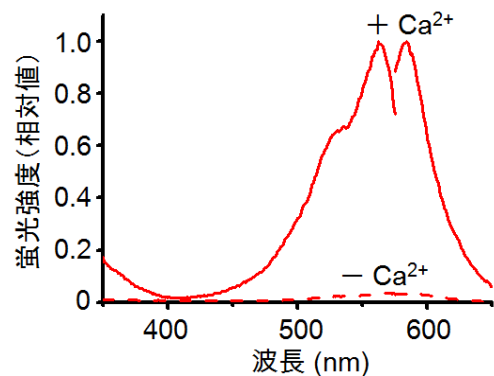


図 4 R-CaMP1.07 の励起・蛍光スペクトル

を発することが明らかになった (図 4)。上記のように本研究において我々はカルシウムイオンの結合に伴って大きな赤色蛍光変化を示すセンサー R-CaMP1.07 を開発することに成功した。

(3) マウス脳における神経発火の R-CaMP による検出機能の評価

R-CaMP1.07 をラット海馬培養スライスに発現させて神経細胞の発火に対応した微弱な細胞内カルシウムイオン濃度変化を検出可能か検討した。その結果、R-CaMP1.07 は 1 発の発火に対応した蛍光シグナルを示し、そのシグナルは少なくとも実験を行った 1 発から 6 発までの発火に対して線形的に増大することを明らかにした (図 5)。

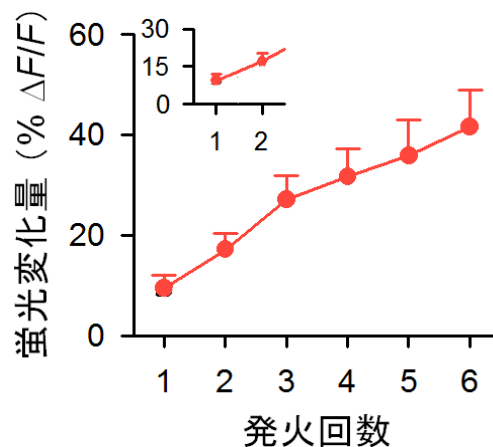


図 5 R-CaMP1.07 による神経発火検出

(4) R-CaMP 発現による細胞特性への影響の検討

次に、神経細胞の電気生理学的性質が R-CaMP1.07 発現により変化するかどうか検討した。海馬培養スライス標本に R-CaMP1.07 を発現させて、パッチクランプ法を用いた電気生理学的手法により解析した結果、パッチ電極の入力抵抗、および、神経細胞の膜容量、静止膜電位、興奮性シナプス後電流への影響はいずれも認められなかった。したがって、R-CaMP1.07 は神経細胞の電氣的興奮性に大きな影響を与えず、神経細胞の機能的な研究に利用可能であることが明らかになった。

(5) 光刺激により人為的に誘発させた神経発火の R-CaMP による検出機能の評価

近年汎用されている光活性化非選択性陽イオン透過性チャネル蛋白質である channelrhodopsin2 と共に R-CaMP1.07 を同一の神経細胞に発現させ、channelrhodopsin 2 の光刺激によって人為的に神経発火を誘発させたところ、(3) の結果と同様に、R-CaMP1.07 は 1 発の発火に対応した蛍光シ

グナルを示し、そのシグナルは発火回数に応じて線形的に増大することを明らかにした(図6)。

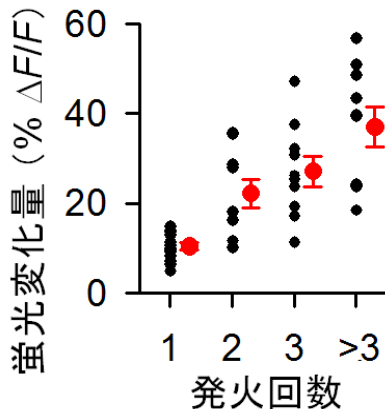


図6 Channelrhodopsin 2 の光刺激により誘発させた神経発火の R-CaMP1.07 による検出

この実験で、channelrhodopsin 2 と R-CaMP1.07 を共存させた状態で、R-CaMP1.07 のシグナルの検出に影響を与えることなく channelrhodopsin 2 を刺激することが可能であった。また、R-CaMP1.07 のシグナルの検出に使用した励起光が channelrhodopsin 2 を刺激し細胞を脱分極するかどうかを検出したが、R-CaMP1.07 の励起光で channelrhodopsin 2 が活性化されることはなかった。以上の結果は in vivo, in vitro の実験系において、R-CaMP1.07 と、channelrhodopsin 2 が同時に使用できる事を示している。これまでは G-CaMP の励起光が channelrhodopsin 2 の励起光とオーバーラップするため、同時使用することが困難で、工夫が必要であったが、今回開発した R-CaMP1.07 を用いる事によってこの問題を回避することができ、神経細胞との情報交換において光による入力および出力を R-CaMP1.07 と channelrhodopsin 2 を用いて行う事が可能となった。

本研究では、赤色の蛍光を発する蛍光カルシウムセンサー R-CaMP を開発した。開発した R-CaMP は、遺伝子でコードされているため、マウス、ラット、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、線虫、植物などすべてのモデル生物で利用可能である。今後、R-CaMP は神経細胞、筋肉細胞、内分泌細胞などの機能研究、移植再生医療の基礎的研究、生物の発生の研究に広く応用される事が期待される。

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を付した)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kawabata I, Kashiwagi Y, Obayashi K, Ohkura M, Nakai J, Wynshaw-Boris A, Yanagawa Y, Okabe S: LIS1-dependent retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nat Commun* **3**:722, 1-13 (2012). DOI: [10.1038/ncomms1736](https://doi.org/10.1038/ncomms1736), 査読有
- ② Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S-I, Nakai J, Kawakami K: Genetic visualization with an improved GCaMP reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 5425-5430 (2011). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383146>, 査読有
- ③ Shindo A, Hara Y, Yamamoto TS, Ohkura M, Nakai J & Ueno N: Tissue-tissue interaction-triggered calcium elevation is required for cell polarization during *Xenopus* gastrulation.. *PLoS One* **5**, e8897 (2010). DOI: [10.1371/journal.pone.0008897](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008897), 査読有
- ④ 大倉正道, 中井淳一: 新しい蛍光 Ca^{2+} イオンセンサー G-CaMP を用いた生体 Ca^{2+} 画像化. *生体の科学* **61**, 86-92 (2010). URL: <http://www.bitway.ne.jp/ejournal/club/2425100967.html>, 査読無
- ⑤ Sudo Y, Matsuo K, Tetsuo T, Tsutsumi S, Ohkura M, Nakai J, Uezono Y: Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca^{2+} influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: Evidence from *Xenopus* oocytes and mammalian cell expression system. *J Pharmacol Sci* **114**, 281-291 (2010). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948163>, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 大倉正道, 武藤彩, 小谷友也, 東島眞一, 川上浩一, 中井淳一: カルシウムプローブ蛋白質によるゼブラフィッシュ脊髄運動神経の時空間活動の可視化, 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 15 日, 国立京都国際会館 (京都)
- ② 中井淳一: G-CaMP によるカルシウムイメージングと線虫神経細胞の光操作, 平成 23 年度生理研研究会 神経活動の光操作 (行動制御への応用) 2011 年 9 月 29 日, 生理学研究所 (愛知)
- ③ 中井淳一, 安藤恵子, 宇佐美篤, 大倉正道, 池谷裕二, 松木則夫: GCaMP を用いた線虫体壁筋の in vivo カルシウムイメージング, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 24 日, パシフィコ横浜 (神

- 奈川)
- ④ 大倉正道, 進藤麻子, 原佑介, 山本隆正, 上野直人, 中井淳一: GCaMP 型改良カルシウムプローブ蛋白質を用いた *Xenopus* 胚発生時のカルシウム動態の可視化, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 24 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 - ⑤ Nakai J, Hoogland TM, Kuhn B, Göbel W, Huang W, Helmchen F, Flint H & Wang S S-H: 小脳グリア細胞間のカルシウム波の *in vivo* 解析. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16 日, 大阪国際会議場 (大阪)
 - ⑥ 中井淳一: 小脳バーグマングリア細胞間を伝わるカルシウム波. 第 7 回 GPCR 研究会, 2010 年 5 月 8 日, 科学未来館 (東京)
 - ⑦ 中井淳一: GFP を用いたカルシウムセンサーによる細胞活動の可視化. 病態解明から治療開発に向けたバイオイメージング研究シンポジウム, 2010 年 6 月 4 日, 自治医科大学 (栃木)
 - ⑧ Muto A, Nakai J, Kawakami K: Brain Imaging with Improved GCaMPs in Zebrafish, *Neuro* 2010, 2010 年 9 月 3 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)
 - ⑨ Usami A, Gengyo-Ando K, Ohkura M, Matsuki N, Ikegaya Y, Nakai J: *In vivo* or *in vitro* imaging of calcium dynamics with genetically encoded sensor G-CaMP4, *Neuro* 2010, 2010 年 9 月 3 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫)
 - ⑩ 中井淳一: G-CaMP による *in vivo* calcium imaging. 平成 22 年度生理学研究所研究会「神経活動の光操作 (行動制御への応用)」, 2010 年 9 月 9 日, 生理学研究所 (愛知)
 - ⑪ 宇佐美篤, 安藤恵子, 大倉正道, 池谷裕二, 中井淳一, 松木則夫: 新規蛍光 Ca^{2+} センサー G-CaMP4 を用いた生体 Ca^{2+} の画像化, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2010, 2010 年 9 月 11 日, 京都大学 (京都)
 - ⑫ Nakai J: *In vivo* Imaging with Genetically-encoded Ca^{2+} Sensors. *Horizons In Calcium Signaling*, 2010 年 10 月 12 日, Beijing (China)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 特定部位のアミノ酸を置換した緑色蛍光蛋白質またはそのホモログを用いたカルシウムセンサー蛋白質

発明者: 大倉正道、中井淳一

権利者: 埼玉大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-232788

出願年月日: 2010 年 10 月 15 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://subsi.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 淳一 (NAKAI JUNICHI)

埼玉大学・脳科学融合研究センター・教授

研究者番号: 80237198

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし