

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650231

研究課題名（和文） 生体中で蛋白質の挙動を計測できるマウスの作製と解析

研究課題名（英文） Generation of a transgenic mouse which can be used for the in vivo detection of CREB phosphorylation

研究代表者

石本 哲也（ISHIMOTO TETSUYA）

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）：ホタルの発光タンパク質であるルシフェラーゼを用いて、CREBの活性化（リン酸化）を生きたマウスの脳を用いて計測できる実験系を構築した。23年度はマウスにかかる麻酔の種類とタイミングを調節することによって、発光計測が可能になったことを報告したが、24年度は無麻酔の状態のマウスの脳を用いて、CREBの活性化を計測することに成功した。この無麻酔CREB活性化計測システムを用いて、抗うつ剤の生体脳内CREB活性化に与える影響を解析した結果、脳内のリン酸化CREBの上昇に伴って発光が上昇することが確認できた。

研究成果の概要（英文） In 23rd fiscal year, we succeeded in developing the CREB phosphorylation detecting system using anesthetized mouse by adjusting the timing and amount of anesthesia. In this year, we succeeded in observing CREB phosphorylation in non-anesthetized mouse. We confirmed acute administration of Fluoxetine up-regulated the light intensity from mouse brain which indicated the CREB phosphorylation. And we also confirmed the up-regulation of CREB phosphorylation after Fluoxetine treatment by western blotting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：トランスジェニックマウス、ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

培養細胞レベルで明らかにされた蛋白質の挙動（リン酸化、蛋白質相互作用など）は、どのように生体レベルの現象（記憶学習、病気など）と関連しているのだろうか？例えば、培養神経細胞を興奮させると cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化が起きるが、実際の生体脳で記憶が形成される時、どの部位でこういったタイミングでリン酸化が起きるのだろうか？これらの疑問に答えるには、生体中の蛋白質挙動を生きた動物でリアルタイム計測しなければならない。しかし現在ある生体計測技術

(fMRI, PET, 脳内電極など) はいずれも生体内蛋白質の相互作用などの挙動をリアルタイム計測するものではない。また、主に培養細胞で用いられている、蛍光蛋白質を用いたFRETによる蛋白質挙動計測も、生体に応用することは膨大な自家蛍光によって不可能である。

2. 研究の目的

申請者は、生体内での蛋白質挙動を計測することを目標として、自ら開発した、蛋白質挙動を検知するために改変した発光蛋白質と、トランスジェニックマウス作製技術を融合

することを考案した。ホタルの発光蛋白質ルシフェラーゼは、蛍光蛋白質と異なりノイズシグナルが非常に少ないことや励起光が不必要であることが特徴である。この発光蛋白質に特定の蛋白質の活性を検知して発光する能力を持たせ、マウスの生体に発現させることで、特定の蛋白質の活性を計測することを可能にする計画である。このようなマウスは報告がなく、成功すれば生体内の蛋白質挙動を計測する初めての方法となる。

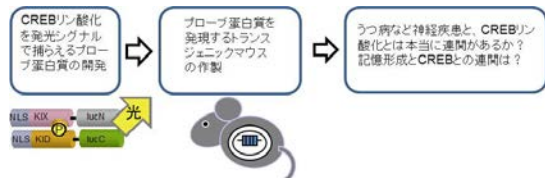


図1 研究の流れ

3. 研究の方法

CREBのリン酸化、培養細胞レベルで計測できるプローブ蛋白質をすでに開発した。このプローブは発光蛋白質ルシフェラーゼをN末端、C末端に分けることにより、発光能を失ったルシフェラーゼが蛋白質AとBの結合によって再び発光能を取り戻す。アクチン重合検出プローブは、アクチンとスプリットルシフェラーゼN末端、C末端との融合蛋白質であり、細胞内に発現させ、アクチン重合フィラメントに取り込まれ、スプリットルシフェラーゼのN末端とC末端が近接した場合に発光する。これらのプローブ蛋白質を発現するトランスジェニックマウスを作製するためには1つのベクター上で2つのプローブ蛋白質を発現させなければならないため、IRES、2Aペプチドといった近年報告された技術を用いてトランスジェニックマウス作製用コンストラクトを作製した。

トランスジェニックマウス作製にはマウスアクチン遺伝子周辺のゲノム配列を含むBAC (バクテリア人工染色体) を用いた。BAC中のアクチンをコードする配列を、大腸菌内相同遺伝子組み換え法により、プローブ蛋白質の配列で入れ替え、その遺伝子組み換えBACをマウス受精卵に注入することでトランスジェニックマウスを発現するマウスを作製した。

4. 研究成果

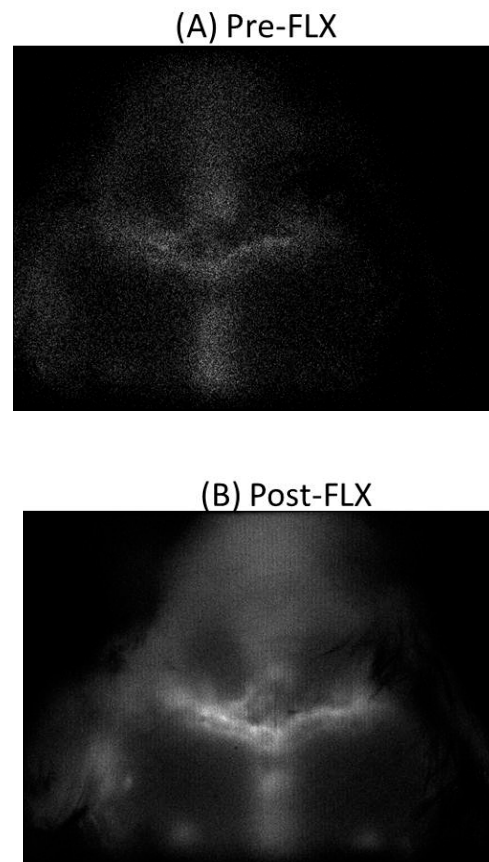
トランスジェニックマウス作製は、問題なく終了した。作製前には、発現するトランスジェニックマウスによって毒性が生じるのではないかと懸念があったが、実際に作製したトランスジェニックマウスは正常に成長し、外見や健康に異常は見られなかった。

トランスジェニックマウスは作製当初ト

ランスジェニックマウスを片側の染色体にしか持たないヘテロ接合体であったが、その後交配することによってホモ接合体となった。ホモ接合体は発生上の異常は示さず、ホモ同士の交配も可能であったので、以後の実験ではホモ接合体を使用した。

次に実際にマウス脳から発光が検出できるか実験を行った。麻酔後、マウスにルシフェリンを腹腔内注射し、脳からの一定時間当たりの発光量を計測した。その結果、バックグラウンドノイズに比べて明らかに高い発光量を示した。これは脳内でCREBリン酸化に並行してプローブ蛋白質の発光が起きていることを示している。ただし、この場合マウスに麻酔をかけているので、神経系の活動が覚醒時に比べて大きく異なっている。これを受けて次に無麻酔状態でのマウス脳からの発光測定を試みた。覚醒状態のマウス脳から発光を計測するために、マウスの固定法を構築し、発光を計測したところ十分な発光量が計測できた。

この実験系を用いて、抗うつ剤であるfuloxetine (FLX) をマウスに単回投与した場合の発光量の変化を計測した。実験ではマウスに 20mg/kg のFLXを腹腔内投与し、1時間後に脳からの発光を計測した。



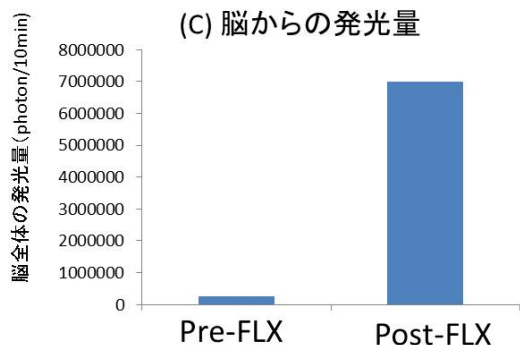


図 2 (A) FLX 処理前のマウス脳からの発光量計測。

(B) FLX 処理後のマウス脳からの発光。発光量が增大している。

(C) 発光量をグラフで表したもの

図 2 にあらわされるように、FLX 投与後 1 時間で大きく発光量が上がった。これは脳内のプローブ蛋白質が CREB リン酸化に伴って構造を変え、発光量を増大させたためだと考えられる。次に実際の脳内でリン酸化 CREB の量が増加しているかウエスタンブロット法を用いて調査した。

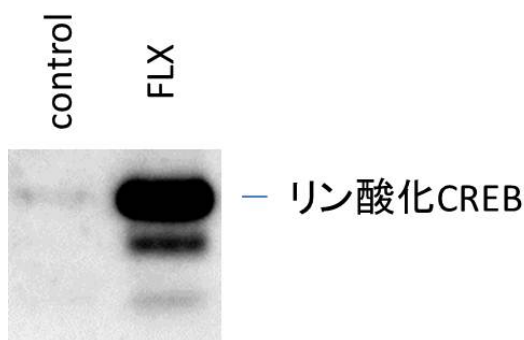


図 3 マウスに FLX (20mg/kg) を投与して 1 時間後の大脳皮質を採取し、ウエスタンブロット法によって解析した。FLX によってリン酸化 CREB の量が増加している。

これらの結果により、今回作製したトランスジェニックマウス中のプローブ蛋白質が、内在性 CREB のリン酸化に応じて、発光量を上げることが証明された。また同時に抗うつ剤の単回投与が脳内の CREB のリン酸化を 1 時間程度で誘導することも発見した。つまり、生きたマウスの脳内での CREB リン酸化をイメージングすることに成功したといえる。これにより挑戦的萌芽研究の当初の目標を達成することができた。

今後は、抗うつ剤の効果が表れることに CREB のリン酸化がどうかかわっているか

を調査する予定である。強制水泳などの行動解析でうつ症状の程度を計測する前後で、脳からの発光がどう変化するか調査する。それらの結果を基にして、発光量変化とうつ症状との相関があるかどうか、統計的に解析して結論をつける。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Measuring CREB activation using bioluminescent probes that detect KID-KIX interaction in living cells. Ishimoto, T., Mano, H., Ozawa, T., Mori, H. (2012) *Bioconjug. Chem.* 23: 923-932 (査読有)

(2) Regulation of gene expression in retrovirus vectors by X-ray and proton beam radiation with artificially constructed promoters. Ogawa, R., Morii, A., Watanabe, A., Cui, Z. G., Kagiya, G., Fukuda, S., Kume, K., Hasegawa, T., Hatashita, M., Izumi, H., Ishimoto, T., Feril, L. B., (2012) *J. Gen. Med.* 14: 316-327 (査読有)

(3) Real-time monitoring of actin polymerization in living cells using split luciferase. Ishimoto, T., Ozawa, T., Mori, H. (2011) *Bioconjug. Chem.* 22, 1136-1144 (査読有)

(4) 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. (2011) *Brain Struct. Funct.* 216, 91-104 (査読有)

(5) Purification of enzymatically inactive peptidylarginine deiminase type 6 from mouse ovary that reveals hexameric structure different from other dimeric isoforms. Taki, H., Gomi, T., Knuckley, B., Thompson, P. R., Vugrek, O., Hirata, K., Miyahara, T., Shinoda, K., Hounoki, H., Sugiyama, E., Usui, I., Urakaze, M., Tobe, K., Ishimoto, T., Inoue, R., Tanaka, A., Mano, H., Ogawa, H., Mori, H. (2011) *Adv. Biosci. Biotech.* 2: 304-310 (査読有)

〔学会発表〕（計6件）

(1) Analysis of Newly Identified Paranodal Protein BCAS1 in the Schwann cell. 石本哲也、井上 蘭、小池 正人、内山 安男、森 寿, 第 37 回日本分子生物学会年会 2012, 12, マリンメッセ福岡

(2) Detection of CREB activation in living cells using a bioluminescence-based method. Ishimoto T., Mano H., Ozawa T., and Mori H. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, 12, 13-17, 横浜.

(3) 発光蛋白質を用いた CREB 活性化の計測. 石本哲也, 眞野寛生, 小澤岳昌, 森 寿, CRESTシンポジウム「新しい計測で生命に迫る」, 2011, 12, 12-13, 東京.

(4) Monitoring of CREB phosphorylation in live cells using split luciferase technique. Ishimoto T., Mano H., Ozawa T., and Mori H. Society For Neuroscience's 41th annual meeting, 2011, 11, 12-16, Washington DC, USA.

(5) 生物発光を用いた CREB リン酸化検出, 石本哲也, 眞野寛生, 小澤岳昌, 森 寿, 第 34 回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.

(6) Detection of CREB phosphorylation in live cells using a bioluminescence based method. Ishimoto T., Mano H., Ozawa T., and Mori H. The 6th International conference of Neurons and Brain Diseases, 2011, 8, 3-5, Toyama.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 哲也 (ISHIMOTO TETSUYA)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教
研究者番号 : 40397170