

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840050

研究課題名(和文) in vivoイメージング解析による血管平滑筋の収縮機構の解明

研究課題名(英文) in vivo imaging analysis of cGMP dynamics in the smooth muscle of circulatory system

研究代表者

堀川 一樹 (HORIKAWA, Kazuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70420247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：cGMPは、血管収縮などを制御する重要なセカンドメッセンジャー分子であり、その調節機構を理解するには、ライブイメージングによる時空間動態解析が待ち望まれている。本研究では、これを可能にするための基盤技術の整備を目的に、高性能なcGMP指示薬の開発を行った。シグナル変化率向上と親和性変異体のスクリーニングを行った結果、従来の指示薬に比べシグナル変化率が最大5倍に向上した、複数の親和性変異体の開発に成功した。これらの指示薬は、人為的なNO刺激に伴うヒト培養細胞のcGMP応答だけでなく、既存の指示薬では検出が困難であった自発的走化性運動に伴う微弱なcGMP濃度変動も検出できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：cGMP, one of the most important second messenger, is responsible for a variety of physiological events. To better understand the regulating mechanisms of cGMP signaling, quantitative analysis of cGMP dynamics with the help of indicator has been waited. Here, we engineered a genetically encoded biosensor that reports the concentration change of cGMP. It consists cGMP sensing motif whose N- and C-terminus were tagged with GFP variants, in which cGMP dynamics was reported in the form of FRET signal changes. By optimizing FRET parameters and the property of cGMP sensing motifs, we developed a series of improved indicators whose dynamic range was increased to 5-fold including high- to low-affinity variants. Our cell-based assay revealed that these indicators nicely report spatio-temporal dynamics of cGMP associated with the spontaneous activity in the chemotacting cells which had not been detected with previously reported indicators.

研究分野：生物学

キーワード：イメージング cGMP 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

重要なセカンドメッセンジャー分子である cGMP の生理機能を理解するためには、その時空間動態を定量化するための技術が必須である。定量性に劣る免疫組織学ならびに生化学的方法を補完する技術として、ライブイメージングが注目を集めており、これを可能にする高性能な機能性指示薬の開発が待ち望まれていた。既に Protein kinaseG や phosphodiesterase のもつ cGMP 結合ドメインを用いた機能性指示薬が開発されているが、いずれもシグナル変化率が小さく、かつ親和性変異体が少ないという技術的な制約が存在した。

2. 研究の目的

動物個体や組織を対象にした cGMP 動態のライブイメージング解析を行うために、高性能な機能性指示薬の開発を試みた。指示薬の基本設計は、計測時のモーションアーチファクトを解消できる FRET 型指示薬とし、cGMP 濃度変動を鋭敏に検出できるように、シグナル変化率ならびに感度特性の最適化を行う。細胞内アッセイによる指示薬の性能評価ならびに指示薬発現モデル動物を作出し、生体内 cGMP イメージングを行うための基盤整備を目的とした。

3. 研究の方法

(1) シグナル変化率の最適化

FRET ドナーとアクセプターの配向性をかえることで、シグナル変化率を最大化させる。生体内イメージングに適用可能とするため、シグナル変化率が 100%を超えるものをスクリーニングする。

(2) 様々な生物種の cGMP 結合モチーフの検討や、保存部位への変異導入により、指示薬の cGMP 親和性を改良する。低濃度域での cGMP 濃度変動を検出可能とするため、Kd=0.5-1.0 μ M 程度の高親和性型指示薬をスクリーニングする。

(3) 開発した指示薬の性能を細胞内アッセイで評価し、十分な性能を有する指示薬を特定の組織で発現するモデル動物を作出する。

4. 研究成果

(1) cGMP センサーモチーフとして、PKGIbeta ならびに PDE5 の cGMP 結合ドメインに注目し、複数もしくは単独の cGMP 結合ドメインの両端に ECFP ならびに Venus を配した FRET 型蛍光指示薬をデザインした。FRET シグナル変化を最大化するため、ドナーアクセプター配向の最適化を行った。特に、円順列変異体の導入ならびにドナーアクセプターの順列の検討し、cp173Venus ならびに ECFP をこの順列で有する指示薬が有意に大きなシグナル変化を示す事を見いだした。精製タ

ンパク質を用い in vitro でのシグナル変化率を決定したところ、42%のシグナル変化率を示す従来型指示薬にくらべ、5倍以上のシグナル変化(245%)を有することが明らかになった

(2) 様々な濃度レンジでの cGMP 濃度変化を検出する事を目的に、cGMP 結合モチーフの最適化を行った。タンデムもしくは単一モチーフの検討に加え、変異導入ライブラリーのスクリーニングを行った結果、cGMP 解離定数が 500nM の高親和性型ならびに 4 μ M の低親和性型指示薬を同定することに成功した(図 1)。

(3) 開発した指示薬をヒト培養細胞へ導入しその機能評価を行った。in vitro で最大のシグナル変化を示す PKGIbeta をセンサーモチーフとする指示薬を、ヒト培養細胞で一過的に発現させ、cGMP 濃度変動のイメージングを試みたところ、指示薬発現細胞を NO 供与体である SNP で刺激することで、FRET シグナルの解消が確認された。このシグナル解消は、cGMP が結合できない変異型指示薬では認められない、cAMP 濃度変動時には認められない事から、開発した指示薬が cGMP 濃度変動を高い特異性で検出できる事が明らかになった。

ところで、詳細な機能評価により、前述の PKGIbeta 型の指示薬が pH 感受性を有する事が明らかになった。そこで pH 感受性を持たない指示薬のスクリーニングを試みたところ、PDE5 の GAF ドメインをセンサーモチーフとする指示薬が pH 感受性を有しない事が明らかになった。精製タンパク質の不安定性のため In vitro 評価は困難であったが、細胞内評価においては、SNP 刺激に伴う cGMP 濃度変動を最大 150%と大きなシグナル変化としてとらえる事が可能である事を見いだした。

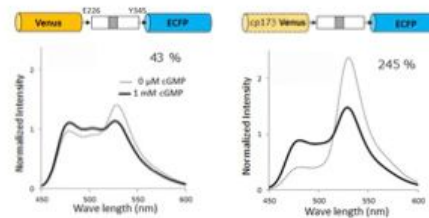


図 1: 新規開発した FRET 型 cGMP 指示薬の分子デザインと性能
従来型の指示薬(左)に比べ、改良型指示薬(右)のシグナル変化率は最大 5 倍に向上している。

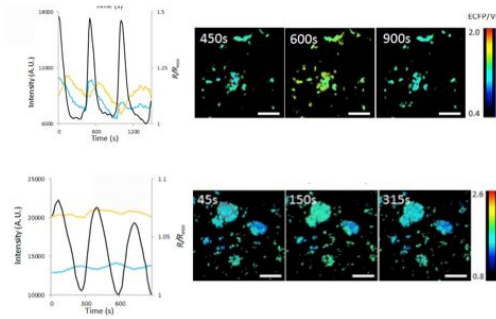


図 2. 改良型指示薬で検出された、自発的走化性運動に伴う cGMP 動態
PKGIbeta 型指示薬(上)ならびに PDE5 型指示薬での計測。10 分周期で繰り返される周期的な走化性運動に対応し FRET シグナルの変動が認められる。

(4) 生体内での cGMP 動態を検出するには、人為的な刺激応答に加え、自発的な生理活動に伴う cGMP の濃度変動を検出できる必要がある。一般に、自発活動に伴うシグナル伝達活性は人為的な刺激応答に比べ極めて微弱であり、その検出は困難を伴う。そこで、本研究で開発した機能改良型指示薬が自発的な走化性運動に伴う GMP 動態を検出できるかどうか検討した。モデル系には細胞性粘菌を用い、開発した指示薬を安定発現する細胞株を樹立した。これらの細胞を走化性誘因分子で人為的に刺激すると予想通り、大きな振幅での cGMP 濃度上昇が確認できた。次に、無刺激環境下で細胞が自発的な産生する走化性因子の放出による走化性運動を観察した。その結果、自発的走化性運動に伴う cGMP 濃度変動を高感度に検出できる事が明らかになった(図 2)。

(5) 血管内皮細胞が放出する NO は血管平滑筋に作用し、cGMP 濃度を上昇させ血管弛緩を引き起こす。この過程における cGMP 時空間動態を可視化することを目的に、血管平滑筋特異的に指示薬遺伝子を発現する系の構築を試みた。血管平滑筋特異的な遺伝子発現のため、SM22alpha プロモーター制御下に指示薬を発現する遺伝子カセットを構築した。これを、マウス動脈由来平滑筋初代培養細胞に導入しその発現の確認を試みたところ、十分量の指示薬発現を確認することが出来なかった。プロモーター強度の不足を改善するため、Cre_LoxP システムを併用することで、血管平滑筋特異的な遺伝子発現系の構築を試みた。具体的には、高レベルでの転写活性を

もつ CAG プロモーター、LoxP 配列で挟んだ停止コドン、指示薬遺伝子をこの順番で配した発現ベクター(1)と SM22alpha プロモーターの制御下で NLS-Cre を発現する二つの発現ベクター(2)を作製した。これらを電気穿孔法で培養血管平滑筋細胞に導入したのち指示薬の発現を検討したところ、Cre リコンビナーゼによる停止コドンの除去に伴い十分な強度で指示薬が発現すること、ならびに NO 刺激に伴い FRET シグナルが解消される事を確認した。以上の結果から、本研究で開発した改良型 cGMP 指示薬群が、生体内 cGMP 動態を解析するための極めて有用な基盤技術となる事が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1: Recent progress in the development of genetically encoded Ca(2+) indicators.

*Horikawa K.

J Med Invest. 2015;62(1-2):24-28. 査読有
doi: 10.2152/jmi.62.24.

PMID: 25817279

2: Identification of polyethylene glycol-resistant macrophages on stealth imaging in vitro using fluorescent organosilica nanoparticles.

*Nakamura M, Hayashi K, Nakano M, Kanadani T, Miyamoto K, Kori T, Horikawa K.

ACS Nano. 2015 Feb 24;9(2):1058-1071. 査読有
doi: 10.1021/nn502319r. Epub 2015 Feb 2.

PMID: 25629765

3: Genetically encoded Ca(2+) indicators; expanded affinity range, color hue and compatibility with optogenetics.

*Nagai T, Horikawa K, Saito K, Matsuda T.

Front Mol Neurosci. 2014 Nov 25;7:90. 査読有
doi: 10.3389/fnmol.2014.00090. eCollection 2014.

PMID: 25505381

4: In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator.

Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, *Tanaka KF.

Cell Rep. 2014 Jul 10;8(1):311-318. 査読有
doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.056. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24981861

5 Fluorescent probes for bio-imaging of bone
*Horikawa K.

THE BONE Vol.28 No.2, 67-72, 査読有, 2014

6 Spatiotemporal regulation of Ca(2+) dynamics in live cells revealed by Ca(2+) imaging.

Horikawa K., *Nagai T.

Clin Calcium. 2013 Apr;23(4):527-533. 査読有
doi: CliCa1304527533. Review. Japanese.
PMID: 2354574

〔学会発表〕(計 3 件)

1 発表者: 堀川一樹

発表表題: 生理機能を可視化する FRET プロローブの開発

学会等名: 第 55 回 日本生化学会 中国・四国支部例会

発表年月日: 2014 年 06 月 06 日

発表場所: 愛媛大学 (愛媛県松山市)

2 発表者: 堀川一樹

発表表題: ライブイメージングを容易にする高機能性指示薬の開発

学会等名: 第 91 回 日本生理学会大会

発表年月日: 2014 年 03 月 16 日 ~ 2014 年 03 月 18 日

発表場所: 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

3 発表者: 堀川一樹、佐藤朗

発表表題: 細胞性粘菌の多細胞化を可能にする細胞の数

学会等名: 第 36 回 日本分子生物学会

発表年月日: 2013 年 12 月 03 日 ~ 12 月 06 日

発表場所: 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tbis2013.net>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

堀川 一樹 (HORIKAWA, Kazuki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 70420247