

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670812

研究課題名(和文)細胞内・細胞外メッセンジャーの生体イメージング法の確立

研究課題名(英文)Development of bioimaging methods for intra- and intercellular messengers

研究代表者

谷村 明彦(Tanimura, Akihiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70217149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、IP3濃度測定の新しい原理として「競合的リガンド結合アッセイ法」を開発した。この方法は、低親和性蛍光アデノフォスチン誘導体(FLL)と蛍光IP3センサータンパク質(ECFPを連結したリガンド結合ドメイン)と言う2つの蛍光分子の結合によるFRETを利用するものである。細胞あるいはビーズを使った実験で、蛍光IP3センサータンパク質とFLLの結合がFRETを起こし、このFRETシグナルがIP3によって減少することが確認された。この方法を使って、10 nMのIP3濃度の定量的測定が可能であり、実際にCOS-7細胞の細胞内IP3濃度を測定できることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We developed the CFLA-IP3 (Competitive Fluorescent Ligand Assay for IP3) as a conceptually new method to measure IP3 concentrations. The method is based on the combination of two rationally designed fluorescent molecules, low-affinity fluorescent Adenophostin A analogue (FLL) and a fluorescent IP3-binding protein (CFP-coupled LBD). Binding of the fluorescent ligands to the fluorescent IP3 sensor protein-expressing cells caused fluorescence resonance energy transfer (FRET). This principle was extended to a cell-free assay system using fluorescent IP3 sensor protein-bound agarose beads. The effect of FLL on the FRET signal of fluorescent IP3 sensor protein-bound beads was reduced by the subsequent addition of IP3. This method allowed quantitative measurement of IP3 concentrations as low as 10 nM and was applied to measure cytosolic IP3 concentrations in COS-7 cells.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：イメージング カルシウム イノシトール三リン酸 アセチルコリン

1. 研究開始当初の背景

唾液腺の水・電解質分泌は、主にムスカリン受容体を介する Ca^{2+} 応答によって調節されると考えられている。これまで我々は、唾液腺細胞を用いたイメージング解析によって Ca^{2+} 動態を可視化し、唾液腺細胞における Ca^{2+} シグナルの発生機構を明らかにしてきた。これらを含む *in vitro* 実験系を使った研究で、唾液腺腺房細胞における Ca^{2+} オシレーションや Ca^{2+} ウェーブ (Tojyo et al, Cell Calcium, 1997, Tanimura et al, Biochem J, 1998)、受容体を介する Ca^{2+} シグナルやイオン輸送分子 ($Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送体) の増強 (Tanimura et al, J Biol Chem 1996; Am J Physiol, 1999)、唾液腺導管細胞における自発的 Ca^{2+} オシレーションと導管細胞の容積増大 (Shitara et al, Am J Physiol, 2009) などが明らかにされた。

これらの Ca^{2+} 応答の発生機構を明らかにするために、蛍光タンパク質を使った FRET 型の IP_3 蛍光センサー (LIBRA) を開発し、 Ca^{2+} オシレーションや細胞間 Ca^{2+} ウェーブの発生における IP_3 動態や Ca^{2+} シグナル関連分子 (IP_3 受容体、Stim1、PKC など) の細胞内動態を明らかにしてきた (Tanimura et al, J Biol Chem, 2002, 2004, 2009, Tojyo et al, J Pharmacol Sci, 2008, Morita et al, J. Cell Sci, 2009)。しかし LIBRA では、腺房細胞で起こる高速の細胞内 Ca^{2+} ウェーブや局所的な Ca^{2+} シグナルに対応する IP_3 動態を解析するためには、より高感度の IP_3 センサーが必要であることがわかった。

また我々は、顎下腺開口部から逆行性にウイルスベクターを導入することによって、GEC1 (genetically encoded Ca^{2+} indicator) を唾液腺に発現させた動物を用いた *in vivo* Ca^{2+} イメージング解析法を確立した。この新しい技術によって、ピロカルピン、ベタネコール、アセチルコリンなどの薬物刺激や神経刺激による顎下腺の Ca^{2+} 応答と唾液分泌の同時解析に成功した。この研究において、アセチルコリンが唾液腺全体で同調した Ca^{2+} オシレーションを起こすことや、神経刺激では薬物刺激とは異なる Ca^{2+} 応答が起こる事が明らかになった。高感度 IP_3 センサーやアセチルコリンセンサーは、*in vivo* イメージング解析を発展させる有用なツールになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が開発した IP_3 センサー (LIBRA) を越える高感度な IP_3 センサーを開発する基本技術として CFLA を確立することである。この技術を細胞内メッセンジャーである IP_3 および細胞外メッセンジャーであるアセチルコリン濃度を測定する方法の開発に応用する。

3. 研究の方法

1) 蛍光センサー発現用プラスミドの作成

高親和性 IP_3 センサー (LIBRAvIIS) の遺伝子から蛍光タンパク質 (Venus) を切り出すことによって細胞膜発現型 CFLA センサー (LIBRAvIIS-Vd) を作成した。また LIBRAvIIS-Vd の細胞膜結合ドメイン (P) を HisTag 遺伝子と置換してセルフフリーアッセイ用 CFLA センサー (cyLIBRAvIIS-Vd) を作成した。

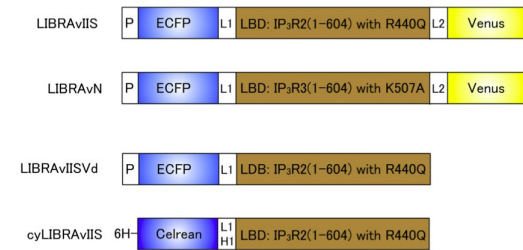


図 1 FRET 型 IP_3 センサーと CFLA 用センサー

2) セミンタクト細胞を使った解析

LIBRAvIIS-Vd を発現させた COS-7 細胞をサポート膜で穿孔し、蛍光顕微鏡 (ニコンインステック社製、TE2000) を用いて、425nm の励起光で発生する 480 nm と 535 nm の蛍光を冷却 CCD カメラ (浜松ホトニクス社製、ASHURA) を用いて記録し、蛍光変化を解析ソフトウェア (AQUACOSMOS) で解析した。

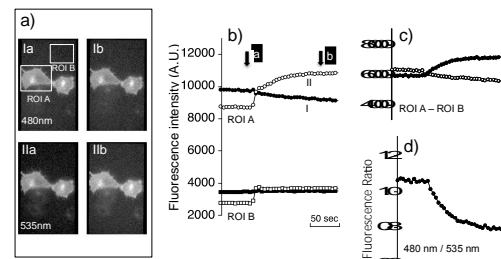


図 2 蛍光センサー発現細胞のイメージング解析

図 2 に示す様に、425nm の励起光によって蛍光リガンドが弱い 535 nm 蛍光を発するため、添加に伴ってバックグラウンドの蛍光が増加する (a, b)。バックグラウンドの蛍光を減算する画像演算によって FRET による蛍光変化を抽出し (c)、蛍光比の変化を計算した (d)。

3) セルフフリーアッセイ系

100 mm の培養ディッシュの COS-7 細胞に cyLIBRAvIIS-Vd を発現させ、これらの細胞の細胞質画分と Talon ビーズを反応させて、蛍光センサービーズを作成した。セルタックを使って蛍光センサービーズをイメージング・チャンバーに固定し、2) と同じ方法で解析を行った。

4. 研究成果

1) CFLA- IP_3 の原理

本研究で開発した新しいタイプの IP_3 センサーの原理を図 3 に示す。蛍光タンパク質

(ECFP) を連結させた IP3 受容体のリガンド結合ドメイン(LBD)を CFLA センサーとし、これに蛍光物質を連結させた蛍光リガンド(FL)が結合すると、CFP から FL への FRET が起こる。IP3 の LBD への結合は、競合的に FL を遊離させるため、FRET シグナルを低下させる。この FRET シグナルによって IP3 濃度の測定が可能である。この方法を CFLA-IP3 (Competitive Fluorescent Ligand Assay for IP3) と名付ける。

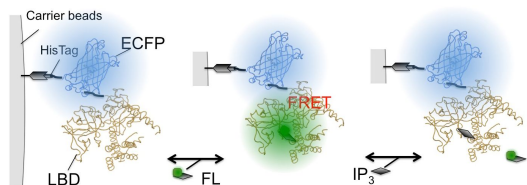


図3 CFLA-IP3の原理

2) 蛍光リガンドの合成

CFLA-IP3 を実現するために、連携研究者の周東が蛍光リガンド(FADA と FLL)を合成した(図4)。

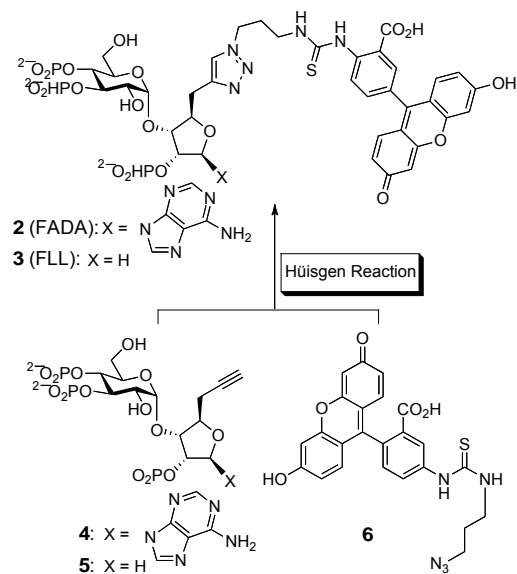


図4 FADA と FLL の合成

3) 蛍光リガンドと蛍光センサーの反応

リガンド結合ドメイン、CFP、YFP、膜結合ドメインからなる IP3 センサー(LIBRA)を発現させ、サポニンで穿孔したセミインタクト細胞に蛍光リガンドを作用させると 425nm の励起光による 480nm 蛍光の減弱と 535nm 蛍光の増強が起こった。その結果、蛍光比(480nm/535 nm)が低下した(図5 a,b)。この蛍光変化率は IP3 の(図5 c)の 3-5 倍であった。また IP3 結合能を持たない LIBRAvN 発現細胞に蛍光リガンドを作用させても FRET が起こらないことや、リガンド結合ドメインへの結合能を持たない FITC を作用させても FRET が起こらないことから(図

5 c)、蛍光リガンドはリガンド結合ドメインへの特異的結合によって FRET を起こすことが明らかになった。さらに LIBRAvIIS から Venus を除去した LIBRAvIISvd を作成し、蛍光リガンドと反応させると、蛍光比の変化率は LIBRAvIIS の 2 倍以上に増大した(図 5 e)。

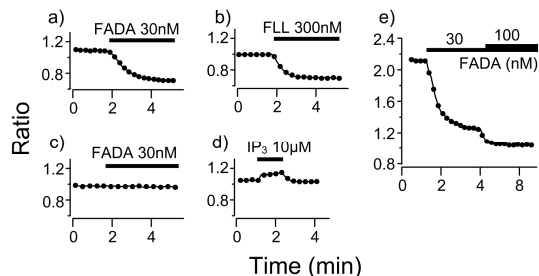


図5 蛍光リガンドと蛍光タンパク質の反応

4) 蛍光リガンドと IP3 の作用

3)のアッセイをセルフリーアッセイ系で実施するために、LIBRAvIISvd から膜結合ドメインを除去したコンストラクト cytoLIBRAvIISvd を作成し、COS-7 細胞に発現させて Talon ビーズに結合させた。この蛍光センサービーズを実験チャンバーに固定し、蛍光リガンドの作用を解析した。

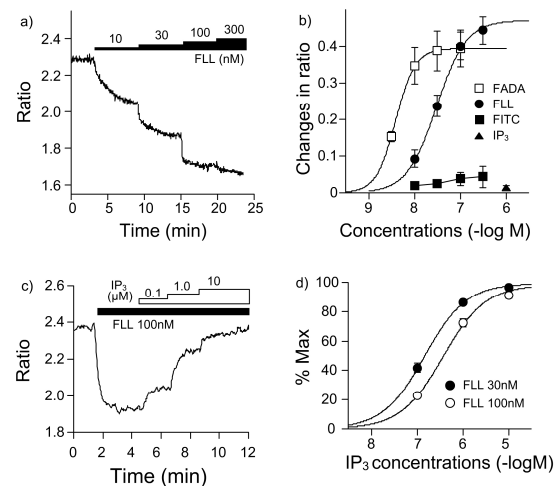


図6 蛍光ビーズに対する蛍光リガンドの作用と IP3 との競合作用

この実験でレジンセンサーの蛍光比が FADA や FLL の濃度に依存して低下することが定量的に確認された(図 6a)。この cytoLIBRAvIISvd に対する FADA と FLL の親和性は、各々 3.7 ± 0.9 nM と 29.3 ± 6.9 nM であった(図 6b)。また 100nM の FLL 存在下で IP3 を加えると蛍光ビーズの蛍光比が上昇した(図 6c)。FLL の濃度を 30nM に低下させると、より低濃度の IP3 によって蛍光比の上昇が観察された。FLL 30nM と 100nM に対する IP3 の K_i はそれぞれ 139.7 nM と 352.1 nM であった(図 6d)。

この IP3 測定法を使って、COS-7 細胞の細

胞内 IP3 濃度の測定を試みた。この実験では、100 μ M ATP で 3 分間刺激した細胞と無刺激の細胞から細胞質画分を調整し、30 nM FLL の存在下で蛍光ビーズの蛍光比の変化を測定した。IP3 による最大変化率と比較して、無刺激細胞と ATP 刺激細胞のサンプルによる蛍光比の変化率は各々 10.4 ± 2.6 % と 33.1 ± 4.5 % であった。これらの値から細胞内 IP3 濃度は、各々 116.0 ± 33.5 nM と 560.8 ± 42.7 nM と算出された。

5) CFLA を使った競合ペプチドの探索

蛍光リガンドを使った CFLA-IP3 は溶液中の IP3 濃度測定に利用できることが確認された。一方、蛍光リガンドを細胞内に注入すると、IP3 と同様に Ca²⁺ 応答を起こすため、IP3 のライブイメージングに適していない。しかし、リガンドとして機能するタンパク質あるいはペプチドが存在すれば、LIBRA と同様に遺伝子導入を使って発現する蛍光センサーの開発が可能になる。そこで CFLA を使って、リガンドとして機能するペプチドを探索した結果、Bcl-2 というタンパク質に、IP3 受容体に結合し、FLL と競合的する配列が存在することが明らかになった。

6) CFLA の応用

CFLA を応用したアセチルコリンセンサーを開発するために、ニコチン受容体に結合することが報告されているアミノ酸配列に蛍光物質 (FITC) を付加した蛍光ペプチド (F-RVG29-9rR) を合成した。このペプチドはニコチン受容体に結合したが、アセチルコリン競合しないため CFLA の応用によるセンサー開発には適さないことがわかった。

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 8 件)

T. Oura, K. Murata, T. Morita, A. Nezu, M. Arisawa, S. Shuto, A. Tanimura. Highly sensitive measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate using a novel fluorescent ligand and ligand-binding domain combination. *Chembiochem*, (査読有), in press (2016).

村田佳織, 谷村明彦, 齊藤正人. 歯原性上皮細胞株の分化における活性型ビタミン D₃ の作用. *北海道医療大学歯学雑誌*, (査読有), 34(2):37-43, (2015).

村田佳織, 高橋亜友美, 齊藤正人, 谷村明彦. ストア作動性 Ca²⁺ 流入によるエナメル質関連遺伝子の発現調節. *北海道医療大学歯学雑誌*, (査読無), 3(2):139, (2015).

Nezu A, Morita T, Tojyo Y, Nagai T, Tanimura A. Partial agonistic effects of pilocarpine on Ca²⁺ responses and salivary secretion in the submandibular glands of

live animals. *Experimental Physiology*, (査読有), 100(6):640-651 (2015)

Nezu A, Morita T, Tanimura A. In vitro and in vivo imaging of intracellular Ca²⁺ responses in salivary gland cells. *Journal of Oral Biosciences*, (査読有), 57(2):69-75 (2015).

Tanimura A. Development and application of fluorescent protein-based indicators for live cell imaging. *Journal of Oral Biosciences*, (査読有), 57(2):54-60 (2015).

Kunimoto R, Jimbow K, Tanimura A, Sato M, Horimoto K, Hayashi T, Hisahara S, Sugino T, Hirobe T, Yamashita T, Horio Y. SIRT1 regulates lamellipodium extension and migration of melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, (査読有), 34:1693-1700 (2014).

Tojyo Y, Morita T, Nezu A, Tanimura A. Key Components of Store-Operated Ca²⁺ Entry in Non-Excitable Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. (査読有), 125(4):340-346 (2014).

[学会発表](計 21 件)

根津顕弘, 森田貴雄, 石井久淑, 永井健治, 谷村明彦. アセチルコリンによって惹起される顎下腺全体で同期する Ca²⁺ オシレーションとその発生機構. 第 89 回日本薬理学会年 2016 年 3 月 9 日~2016 年 3 月 11 日, 神奈川県横浜市・パシフィコ横浜

谷村明彦, 森田貴雄, 根津顕弘. 新規透明化試薬 LICID による蛍光イメージング観察. 北海道医療大学歯学会第 34 回学術大会 2016 年 3 月 5 日, 北海道札幌市・北海道医療大学サテライトキャンパス

岩井美恵, 森田貴雄, 谷村明彦. ピロカルピンの前投与による唾液分泌亢進. 北海道医療大学歯学会第 34 回学術大会 2016 年 3 月 5 日, 北海道札幌市・北海道医療大学サテライトキャンパス

根津顕弘, 森田貴雄, 永井健治, 谷村明彦. アセチルコリン刺激による顎下腺全体で同期した Ca²⁺ オシレーションとその発生機構. 第 60 回日本唾液腺学会 2015 年 12 月 5 日 東京都文京区・文京学院大学

森田貴雄, 関有里, 石田成美, 根津顕弘, 谷村明彦. ピロカルピンの前投与による唾液分泌量増加のメカニズムの解明. 2015 年 12 月 5 日 東京都文京区・文京学院大学

根津顕弘, 森田貴雄, 谷村明彦. アセチルコリン刺激によって惹起される顎下腺全体で同期する Ca²⁺ オシレーションの発生機構. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 11 日~2015 年 9 月 13 日, 新潟市・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

森田貴雄, 根津顕弘, 谷村明彦. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた Ca²⁺ バ

イオセンサー恒常発現細胞における培養時の Ca²⁺応答と細胞の動きの同時解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 11 日～2015 年 9 月 13 日、新潟市・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

高橋亜友美、森田貴雄、倉重圭史、村田佳織、齊藤正人、谷村明彦. 哺乳類細胞を使ったリコンビナント・ヒトアメロジエニンの発現と精製法の確立. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 11 日～2015 年 9 月 13 日、新潟市・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

村田佳織、倉重圭史、森田貴雄、高橋亜友美、齊藤正人、谷村明彦. ビタミン D による分化誘導時の歯原性上皮細胞における Ca²⁺応答の発生機序. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 11 日～2015 年 9 月 13 日、新潟市・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

Tanimura A, Nezu A, Morita T, Shuto S. A novel method for IP₃ measurement with fluorescent adenophostin A derivatives. Gordon Research Conference: Calcium Signalling. 2015 年 6 月 7 日～2015 年 6 月 12 日 Sunday River, Newry, ME, USA

Han JM, Tanimura A, Kirk V, Sneyd J. A Mathematical Model of Calcium Dynamics in Salivary Duct Cells. Gordon Research Conference: Calcium Signalling. 2015 年 6 月 7 日～2015 年 6 月 12 日 Sunday River, Newry, ME, USA

Nezu A, Morita T, Nagai T, Tanimura A. Real-time imaging of Ca²⁺ dynamics in rat submandibular gland during salivary secretion in live animals. Gordon Research Conference: Calcium Signalling. 2015 年 6 月 7 日～2015 年 6 月 12 日 Sunday River, Newry, ME, USA

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦 生きた動物の唾液腺におけるアセチルコリンによる組織全体で同期する Ca²⁺振動. 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日～2015 年 3 月 20 日愛知県名古屋市・名古屋国際会議場

森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、谷村明彦 アデノウイルスの in vivo 遺伝子導入法を用いたラット顎下腺腺房細胞への Stim1-mK01 発現による Ca²⁺応答の増大および唾液分泌への影響. 第 59 回日本唾液腺学会学術集会、2014 年 12 月 6 日、東京都文京区・文京学院大学

根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、永井健治、谷村明彦 生きた動物における薬物および神経刺激による顎下腺の Ca²⁺応答、唾液分泌および血流量の同時測定. 第 59 回日本唾液腺学会学術集会 2014 年 12 月 6 日 東京都文京区・文京学院大学

谷村明彦、森田貴雄、根津顕弘 唾液腺細胞におけるカルシウムシグナルの時空間制御機構と機能連関. 生理研研究会「粘膜免疫

学と膜輸送生理学の融合」 2014 年 10 月 27 日～2014 年 10 月 28 日、愛知県岡崎市・生理学研究所

森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、谷村明彦 アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた Ca²⁺バイオセンサーの長期発現と唾液腺細胞の長時間 Ca²⁺イメージング. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 25 日～2014 年 9 月 27 日、福島県郡山市・奥羽大学

森田貴雄、根津顕弘、東城庸介、谷村明彦 唾液分泌刺激薬による顎下腺の Ca²⁺応答の intravital イメージングと唾液分泌の同時測定. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 25 日～2014 年 9 月 27 日、福島県郡山市・奥羽大学

谷村明彦、村田佳織、齊藤正人、森田貴雄、根津顕弘 競合的蛍光リガンド結合アッセイ法を活用した新規 IP 分子センサーの開発. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 25 日～2014 年 9 月 27 日、福島県郡山市・奥羽大学

村田佳織、齊藤正人、森田貴雄、倉重圭史、高橋亜友美、谷村明彦 ビタミン D による分化誘導でおこる歯原性上皮細胞の Ca²⁺応答. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 25 日～2014 年 9 月 27 日、福島県郡山市・奥羽大学

②谷村明彦、根津顕弘、森田貴雄、東城庸介、佐藤寿哉、石井久淑 Intravital Ca²⁺イメージングによる唾液分泌制御機構の解析 H26 年度生理学研究所研究会「唾液腺形成研究会～機能解析から器官再生へ～」2014 年 8 月 4 日～2014 年 8 月 5 日、愛知県岡崎市・生理学研究所

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 被検物質測定 FRET 分子センサー
発明者: 谷村明彦、周東智、森田貴雄、根津顕弘

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-096991

出願年月日: 2015 年 5 月 12 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷村明彦 (Tanimura, Akihiko)

北海道医療大学・歯学部薬理学分野・教授
研究者番号: 70217149

(2) 研究分担者

森田貴雄 (Morita, Takao)

北海道医療大学・歯学部薬理学分野・講師

研究者番号： 20326549

根津 顕 (Nezu, Akihiro)
北海道医療大学・歯学部薬理学分野・講師
研究者番号： 00305913

(3)連携研究者

周東 智 (Shuto, Satosh)
北海道大学・大学院薬学研究院・創薬有機
化学研究室・教授
研究者番号： 70241346