

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870291

研究課題名(和文) 単一細胞内における情報伝達物質の濃度変化を計測する細胞内蛍光センサーの開発

研究課題名(英文) Development of fluorescent sensors to quantitatively detect signal molecules in single cells

研究代表者

坂口 怜子 (Sakaguchi, Reiko)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：80723197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は、外界からの刺激に応じて特異的なシグナルカスケードを活性化し、情報を伝えている。情報伝達分子の中でもInsPnは、細胞内Ca²⁺濃度を制御し、転写・翻訳等の応答を司る。個々のInsPnは、構造上僅かな違いがあるのみで、各々独立した機能を担っている。従って、これらInsPnの挙動を、生きた細胞内でリアルタイムに高感度で計測できる技術は、生命現象を理解する上で有用である。本研究では、各InsPnに対する人工受容体及びこれらを蛍光修飾したセンサーを構築し、細胞内InsPnの挙動を観察して、各InsPnの生体内での役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Living organism utilize various signaling molecules to regulate themselves. Among them, InsPns are known to regulate intracellular Ca²⁺ concentrations and control cellular responses such as transcription and translation. Individual InsPns are very similar to each other, with only subtle differences. Nevertheless, they each play their own roles as a signaling molecule. Therefore, it will be useful to develop a technique that can monitor each of the InsPns in a live cell in real time. In this study, we have developed fluorescence based sensors that can specifically monitor several InsPns, to elucidate their physiological roles.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞は、外界からの刺激に応じて特異的なシグナルカスケードを活性化し、情報を伝えている。情報伝達分子の中でも InsPn は、細胞内 Ca^{2+} 濃度を制御し、転写・翻訳等の応答を司っている。個々の InsPn は、構造上僅かな違いがあるのみで、それぞれが独立した機能を担っていると考えられている。従って、これら InsPn の挙動を、**生きた細胞内でリアルタイムに高感度で計測できる技術**は、生命現象を理解する上で有用である。

受容体刺激を受けて、細胞内では、イノシトール 1,4,5 三リン酸 ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) が生成する。 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3/\text{Ca}^{2+}$ による細胞内情報伝達は、広範囲の生物種で、種々の細胞・組織に存在し、様々な生命現象に関与している (*Nature*, 1983, 306, 67 等)。 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ は細胞内で代謝され、リン酸基の位置や数が異なる各 InsPn が産出される。その中で、イノシトール 1,3,4,5 四リン酸 ($\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$)、イノシトール 1,3,4 三リン酸 ($\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$)、イノシトール 1,3,4,6 四リン酸 ($\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$) などは、細胞内 Ca^{2+} 制御の他、免疫細胞の発達への関与等が報告されているが (*Nat Immunol*, 2007, 8, 514 等)、現況では生きた単一細胞内の InsPn 動態を検出する手法に限られ、細胞内での役割や産出・代謝経路は不明な点が多い。これまでに、 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ とイノシトール 1,3,4,5 四リン酸 ($\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$) に対する蛍光センサーが報告されているが、他の InsPn の計測には、多数の細胞を集めて破壊し、そこから抽出して検出するしか定量的解析法がなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生きた単一細胞内、更には細胞内小器官で、十分な時間・空間分解能を持つ、InsPn に対する細胞内蛍光性センサーを作製し、これを用いて各 InsPn の生体内での役割を明らかにすることを目的とした。研究開始当初までに、本研究の蛍光性分子センサー作製法の基礎となる、「 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ をリアルタイムに検出するセンサー」 (*J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 1138) 並びに、「細胞内導入可能な $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ センサー」 (*Chem. Biol.* 2004, 11, 475, *EMBO J.*, 2003, 22, 4677) が報告されていた。申請者は既に GFP 融合型及び蛍光分子修飾型 $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ センサー作製に携わり、試験管内並びにヒト由来細胞内 $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ 濃度の挙動評価を行っていた。

本研究では、それまでの研究を進展させ、 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3 \cdot \text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ の直接の代謝産物であり、リン酸基位置の違う異性体である $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ という、「よく似ているが少し違う」分子群を標的とし、研究を進めた。上述の先行研究では、標的分子の $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 、 $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ に特異的な受容体である、天然の各 PH domain を用いたが、本研究で標的とする $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ に対しては、特異的な受容体の報告がなかった。そこでまず、Split PH domain (*J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5000) の

手法を応用し、より多様性の高いライブラリーの中から、目的に合った人工受容体を選択する手法を用いた。PH domain を二分割し、各々にランダムなアミノ酸を導入してライブラリー化し、適切な親和性と高選択性を示す分子を選択、再構築する事で、各 InsPn 受容体を得て、これらを蛍光修飾し細胞内 InsPn 観察に用いる戦略をとった。

さらに、各 InsPn に対する既存の蛍光センサーを複数組み合わせることで細胞内 InsPn の挙動を観察し、各 InsPn の生体内での役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ライブラリー法による InsPn 受容体作製

標的物質である $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ と他の InsPn の間には、とても僅かな差しかなく、各々に特異的な天然受容体は報告されていない。この差を見分けて選択的に認識する人工受容体の作製には、できるだけたくさんの受容体候補の中から、目的に合う分子を選び出す手法が適切であると考えられる。そこで、本研究では Split PH domain を用いる。 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ に特異的に結合する天然のタンパク質である PLC δ 1 PH domain を、基質結合部位付近のループで遺伝子上二分割し、各 subunit 中の基質結合部位周辺のアミノ酸をランダムに変異させたペプチドを、phage display 法でライブラリー化する手法を取った。各 subunit を独立してランダム化することで、多様性を確保できる。

まず、一つ目の subunit のループ部位のうち 7 残基のアミノ酸を、T7 phage display 系でランダムに提示させた。理論上ライブラリーの多様性は 20^7 ($\approx 10^9$) 通りとなり、ここから標的物質 $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ に高選択的に結合する配列を選び出した。

(2) 各 InsPn センサーの単一細胞内での評価

作製したセンサーを、神経細胞、上皮細胞などを含む様々な哺乳動物細胞内に導入する条件検討を行った。効率よく導入できた細胞について、共焦点顕微鏡で細胞内局在を観察した。さらに、リアルタイム蛍光イメージングを行い、細胞外刺激に伴う標的物質の細胞内における産出・代謝挙動の評価をした。

4. 研究成果

(1) $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ 特異的な受容体の作製

$\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ を標的とした蛍光性センサーの構築のために、ターゲットに対して高選択性と適切な親和性を持つ受容体の作製を行った。受容体の作製には、種々の InsPn の僅かな差異を見分けて認識するために、Split PH domain を用いた。まず、 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ に特異的に結合する天然のタンパク質である PLC δ PH domain を 2 つに分割した Split PH domain の、各サブユニット中の基質結合部位周辺のアミノ酸をランダムに変異させたペプチドを、ファージディスプレイ法でファージに提

示させ、ライブラリー化した。

アミノ酸を7残基ランダム化したライブラリーから、Ins(1,3,4)P₃に高特異的で、適切な親和性を持つ人工受容体を、ファージディスプレイ法で選び出す手法を取った。10 μMのIns(1,3,4)P₃に対して結合し、洗浄に耐える分子のみを集め、濃縮し、次ラウンドの結合ファージのプールとした。3ラウンドの選択・洗浄の後、Ins(1,3,4)P₃に対する結合能を持つ分子種は、初期プールに比べ増加した。以上の結果から、Ins(1,3,4)P₃結合能に対して選択圧をかけ、目的分子種を得ることに成功したと考えられる。天然のタンパク質を出発物質としているため、あらかじめ各InsP_nとある程度の親和性が保証され、ライブラリー法を組み合わせることで、より特異性の高い受容体が得られる事が証明できた。

今後、このアミノ酸配列をコードする遺伝子をPCR法で増幅し、配列を決定する。次に、この受容体を蛍光発色団で修飾することによって、蛍光性センサーに変換する。その後、作製したセンサーの基本的な特性を試験管内で評価する。一般に、ある物質の計測技術には、標的物質に対する高い選択性と、広範囲の濃度域で感度よく測定できる適切な感度が求められる。蛍光分光器を用いて、作製したセンサーに標的物質を加えることで、濃度依存的な蛍光特性(強度、波形)の変化を評価する。また、似通った構造を持つ異性体との競合評価や、生体内の他の物質(塩、ATPなど)の影響を評価する予定である。

(2) GFP融合型 InsP_n センサーの細胞内発現

並行して、GFP融合型のInsP_nセンサーの、哺乳動物細胞内での発現条件検討を行った。このセンサーは、試験管内での評価では高選択的に感度良く標的Ins(1,3,4,5)P₄を検出できることが報告されているが、実際の細胞内での発現・評価は行われていない。

作製したセンサーをコードする遺伝子を、細胞発現用のプラスミドにクローニングすることで構築した。このプラスミドをHEK細胞・HeLa細胞などの細胞株に、数種類の市販遺伝子導入試薬を用いて導入条件を検討したところ、GFPの発光が細胞質内で均一に確認できる条件が確立できた。この細胞に、Ins(1,4,5)P₃やIns(1,3,4,5)P₄産出を促すことが知られている受容体刺激(ヒスタミン)を与えたところ、試験管内での挙動に対応する蛍光変化が観察されたことから、このセンサーが細胞内においてIns(1,3,4,5)P₄産出を検出することに成功したことが示唆された(論文投稿準備中)。

元々のPHドメインは膜上に存在するリン脂質であるPIP₂、PIP₃などとも結合するが、本設計では、その基質結合部位付近に分子量26 kDaのGFPを融合することで、立体障害から細胞膜上に存在するPIP_nとは結合できず、細胞質内での均一な発現が可能になったと考えられる。GFPは様々な蛍光特性を持つ変異

体が多数、報告されており、GFP部分をこれらの変異体と付け替えることで、異なった励起、蛍光波長特性を持つバリエーションを作製できる。今後、これらのセンサーを用いて細胞内Ins(1,3,4,5)P₄の観察を行う予定である。

細胞外からの導入型センサーは、多種類細胞のスクリーニングに便利だが、細胞導入後の長時間観察や細胞分裂後までの観察には適さない。一方で、GFP融合型センサーを細胞内で発現させる手法は、遺伝子導入からセンサーの発現までに時間を要するが、発現後は長時間観察が可能である。今後、双方の併用により、多検体スクリーニングや長期的な評価が可能となり、両者を用いて細胞内におけるInsP_nの包括的な計測が実現する。

(3) 二種類のセンサーを用いた単一細胞内同時計測手法の確立

細胞内においてIns(1,4,5)P₃とCa²⁺については、時間的に密接な連動をしていることが知られており、実際にこの両者を単一細胞内で観察した例が報告されていた。そこで、当研究室で作製したIns(1,4,5)P₃センサー、およびそれと異なった蛍光特性を持つ市販のCa²⁺センサーを同一の細胞内に一度に導入し、受容体刺激(ヒスタミン)に対する応答を検出した。両者をそれぞれ異なった蛍光波長で励起し、選択的に挙動を検出した結果、両者の産出挙動の経時的な連動が確かめられた。また、当研究室で作製したIns(1,3,4,5)P₄センサーを用いて、Ins(1,3,4,5)P₄とCa²⁺についても濃度挙動の連動を示唆する結果が観察できた。これは両者の直接の連関を示した初めての例である。

このように、蛍光特性の異なる複数のセンサーを併用する事により、細胞内の同一の場所において各InsP_nが互いにどのような影響を及ぼしているかを評価する手法が確立できた。観察に用いる蛍光顕微鏡の性能にも依存するが、理論的には適切な蛍光発色団を選択することによって一度に6~7種類の物質を、ミリ秒オーダーのタイムラグで観察できる。この手法は、複雑に関連するInsP_n誘導体とCa²⁺の、生体応答における役割の解明に大変有用であると考えられる。

(4) InsP_nの生理学的意義の探索

次に、これらのセンサーを用いて、Ins(1,3,4,5)P₄の生理学的な意義の探索を試みた。Ins(1,3,4,5)P₄に関しては、細胞内へのCa²⁺流入を制御しているとする報告があるが、複数のグループから整合性の合わない結果が報告されており、議論的となっている。そこでまず、Ins(1,4,5)P₃をIns(1,3,4,5)P₄に変換する酵素(IP3K)の新規阻害剤を見出し、そのIns(1,3,4,5)P₄産出阻害能を、Ins(1,3,4,5)P₄センサーを用いて評価した。

阻害剤を処置した細胞では、ヒスタミン刺激に伴う細胞内Ins(1,3,4,5)P₄産出が抑制されることが、Ins(1,3,4,5)P₄センサーによって明

らかになった。次にこの阻害剤を用いて、Ins(1,3,4,5)P₄ が産出されない場合、細胞外からのCa²⁺動態にどのような影響があるかの評価を行ったところ、阻害剤存在下ではCa²⁺流入挙動が変化することが観測できた。以上の結果から、Ins(1,3,4,5)P₄ が細胞内へのCa²⁺流入を制御する役割を担っていることが示唆された(論文投稿準備中)。

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6件)

Impaired Function is a Common Feature of Neuropathy-Associated Glycyl-tRNA Synthetase Mutations. Griffin LB, Sakaguchi R, McGuigan D, Gonzalez MA, Searby C, Züchner S, Hou YM, Antonellis A. Human Mutation, 2014, 35, 1363-71.

Fluorescent sensors reveal subcellular thermal changes. Sakaguchi R, Kiyonaka S, Mori Y. Curr Opin Biotechnol, 2014, 31C, 57-64.

A Divalent Metal Ion-Dependent N1-Methyl Transfer to G37-tRNA. Sakaguchi R, Lahoud G, Christian T, Gamper, H and Hou YM. Chem Biol, 2014, 21, 1351-1360.

Deciphering Subtype-Selective Modulations in TRPA1 Biosensor Channels. Kozai D, Sakaguchi R, Ohwada T, and Mori Y. Current Neuropharmacology, 2015, 13, 266-278.

Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. Kiyonaka S, Sakaguchi R, Hamachi I, Morii T, Yoshizaki T, and Mori Y. Nature Methods, 2015, 12, 801-802.

Different contribution of redox-sensitive transient receptor potential channels to acetaminophen-induced death of human hepatoma cell line. Badr H, Kozai D, Sakaguchi R, Numata T, Mori Y. Frontiers in Pharmacology, 2016, 7, 19.

[学会発表](計3件)

Shigeki Kiyonaka, Taketoshi Kajimoto, Reiko Sakaguchi, Daisuke Shinmi, Mariko Omatsu-Kanbe, Hiroshi Matsuura, Hiromi Imamura, Takenao Yoshizaki, Itaru Hamachi, Takashi Morii and Yasuo Mori. Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. The 87th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. 2014.10.17

Reiko Sakaguchi, Takashi Morii, Yasuo Mori. Identification of the physiological role of inositol

(1,3,4,5) tetrakisphosphate (IP₄) by fluorescent biosensors. Symposium on Biological Signal Dynamics. Okazaki, Aichi, Japan. 2015.9.3.

Reiko Sakaguchi, Takashi Morii, Yasuo Mori. Identification of the physiological role of inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate (IP₄) by fluorescent biosensors. The Second Kitasato-Yale Fluid Symposium: Molecular Control of Cellular and Epithelial Function. Tokyo, Japan, 2015.12.5.

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂口 怜子 (SAKAGUCHI, Reiko)

京都大学・

物質-細胞統合システム拠点・特定助教

研究者番号：80723197

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし