

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 5 月 29 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770182

研究課題名（和文） 多細胞ネットワークの動作揺らぎを検出する階層横断的・多機能イメージング技術の開発

研究課題名（英文） Development of multi-scale and functional imaging technique to quantify the fluctuation in intercellular signaling

研究代表者 堀川 一樹 (HORIKAWA KAZUKI)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：70420247

研究成果の概要（和文）：自発的パターン形成原理を理解するためには、パターン形成初期過程におけるゆらぐシグナル入出力パターンを細胞単位で計測する事が必須である。本研究では最大 10 万個の細胞を対象に、細胞間シグナル伝達の時空間パターンを、単一細胞の解像度で計測することを可能にする超高感度指示薬の開発を行った。細胞間シグナルのうち入力シグナルである細胞外 cAMP 濃度変化を定量計測するため、乖離定数が 50 nM という極めて感度の高い蛍光型 FRET プローブの開発に成功した。また、細胞内/細胞外 cAMP ダイナミクスを同時計測する事を目的に、化学発光型 BRET プローブの開発も行った。得られたプローブの cAMP への感度特性は $K_d=50 \text{ nM} - 3 \mu\text{M}$ であり、これらを併用する事で細胞内部と細胞外 cAMP 濃度変化を鋭敏に検出できることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To better understand the principle in self-organized pattern formation, it is important to measure fluctuating input/output-relationship of intercellular communication at the onset of pattern formation. Here, we tried to develop ultrasensitive indicators for cAMP, being the major communication signaling molecule. First, we designed the FRET-based cAMP indicator whose dynamic range and K_d was optimized for the extracellular measurement, and successfully generated ultrasensitive cAMP probe whose K_d is around 50 nM. We also developed luminescent-based BRET indicators whose K_d ranges from 50 nM to 3 microM. By utilizing these probes, we can directly measure the pattern of both intra- and intercellular cAMP concentration change which should reveal the input/output-relation during the self-organized pattern formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：自己組織化, BRET

1. 研究開始当初の背景

近年、記憶・学習、恒常性の維持など生命システムに特徴的な高次機能が生み出される機構についての研究が注目を集めつつある。動的システムを対象とするこれらの研究分野では旧来の遺伝子還元型アプローチによる解析が極めて困難であるため、新たな研

究手法の開発を含めたブレークスルーが待ち望まれている。対象となる動的システムは、生体高分子から構成される超分子複合体や多数の細胞から構成される組織や個体、さらには多数の生物個体から構成される社会が含まれるが、そのいずれもが環境の変化に対し自らの動的性質を維持できるロバストネ

スと呼ばれる特性、多数の構成要素が自発的に集合し機能単位を形成する自己組織化能と呼ばれる性質を有する。特に形態や生理機能の自己組織化過程については、素子間のような相互作用が働くかについては理解が進んでいるが、秩序化そのものをトリガーする機構はよくわかってない。秩序形成過程を理解する上で最も本質的な問いである「秩序形成をトリガーする機構」を明らかにするために、自発的に集合流形成を行う社会性アメーバを材料とし、細胞間シグナル伝達の時空間パターンを計測できるイメージングツールの開発を行った。

2. 研究の目的

社会性アメーバは環状ヌクレオチドの一種 cAMP を介して細胞間シグナル伝達を行うことで、走化的集合流の形成や細胞分化に代表される高次社会性行動を実現している。この過程において個々の細胞内の cAMP 濃度は最大 $10 \mu\text{M}$ 程度にまで振動しながら上昇するが、細胞集団内に機能や形態の組織化が認められない初期過程においては細胞内外の cAMP は nM 程度の低濃度にあると考えられている。しかしながら技術的な問題のため実際の cAMP 濃度変動パターンが直接計測された例はない。

本研究では、パターン形成開始時に特徴的なシグナル伝達の自己組織化機構の解明を目指し、nM レンジでの cAMP 濃度変動を細胞内ならびに細胞外環境の両方で検出できる新規分子プローブを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

様々な生物種において環状ヌクレオチド cAMP は進化的に保存されたタンパク質構造モチーフにより認識される。そこで、cAMP dependent Protein Kinase (PKA)、Exchange Protein directly Activated by cAMP (EPAC)、cyclic nucleotide gated cation channel な

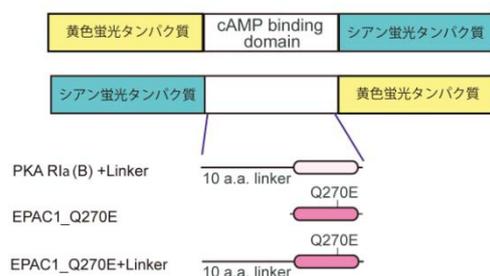


図1 新規cAMP指示薬の分子デザイン

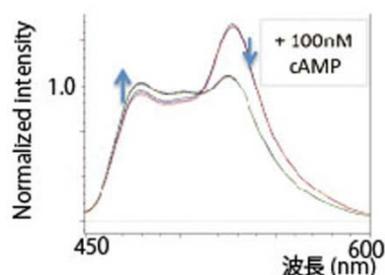


図2. FRET型新規cAMP指示薬のスペクトル変化図

どが有する cAMP 認識モチーフを利用し、cAMP の結合に伴う立体構造変化を蛍光タンパク質間の FRET 量の変化として検出できる分子プローブの開発を試みた。

4. 研究成果

ヒト由来の EPAC 遺伝子ならびに PKA 遺伝子に由来する cAMP 認識モチーフを利用し、生理的な cAMP 濃度変動を高感度に検出できる高性能指示薬の開発を試みた。特に従来 10%程度であった FRET 効率変化量の向上、ならびに乖離定数が $2 \mu\text{M}$ 程度のものしかなかった感度特性の広範囲化を試みた。

まず FRET 効率変化量を最大化させるために、cAMP 認識モチーフの両端に変異型シアン蛍光タンパク質ならびに変異型黄色蛍光タンパク質の円順列変異体を様々なパターンで配置させた合計 28 種類の指示薬をデザインした。大腸菌内ではその合成が極めて困難であったため、社会性アメーバでの遺伝子発現系を利用したタンパク合成発現系ならびにアフィニティーカラム精製を行うことで精製指示薬を得た。続いて、in vitro での性能評価を行ったところ、従来の指示薬のシグナル変化量が最大 10%程度であったのに対し、そのシグナル変化量が cAMP の添加により約 3-10 倍変化するものを見いだした。

次に、生理的 cAMP 濃度変化のより鋭敏な検出を目的とした感度特性の最適化を行うため、1) センサードメインと各蛍光タンパク質 (FRET ドナーならびにアクセプター) の連結配列の最適化、ならびに 2) cAMP 認識モチーフへの変異導入を行った。再度、精製タンパク質を用いた in vitro 性能評価を行い乖離定数を決定したところ、従来の指示薬が $2 \pm 1 \mu\text{M}$ 程度の cAMP 濃度変動しか検出できなかったことに対し (乖離定数 = $2 \mu\text{M}$)、50 nM から $3 \mu\text{M}$ までの異なるレンジの cAMP 濃度変化を検出できる複数の新規 FRET プローブを開発することに成功した。

最後に、細胞内と細胞外の cAMP 濃度変動を同一の生細胞試料において計測する事を目的に、蛍光型 FRET プロープに加え化学発光型 cAMP プロープの開発を試みた。まず、ホタルならびにウミシイタケに由来するルシフェラーゼ遺伝子の内部に cAMP 認識モチーフを挿入し、cAMP 依存的な立体構造変化を化学発光量の変化としてモニターできる化学発光型指示薬の開発を試みた。その結果、ウミシイタケルシフェラーゼの特定の部位へ cAMP 認識モチーフを挿入した場合、化学発光量が最大 2 倍変化することを見いだした。しかしながらその絶対的な化学発光量の変化は極めて小さく、EM-CCD 等の高感度検出器でも生細胞における cAMP 濃度変動を画像化することは困難であった。そこでこの化学発光量の変化をさらに増大させることを意図し、ウミシイタケルシフェラーゼ単独ではなく、ウミシイタケルシフェラーゼと黄色蛍光タンパク質変異体との融合遺伝子の利用を検討した。ウミシイタケルシフェラーゼによるセレンテラジン代謝に伴う発光スペクトルは黄色蛍光タンパク質の吸収スペクトルと大きな重なりを持つため、セレンテラジン/ウミシイタケルシフェラーゼと黄色蛍光タンパク質をドナー・アクセプターとする Bioluminescence Resonance Energy Transfer (以下 BRET) による発光量増大が期待されたからである。(黄色蛍光タンパク質の蛍光量子収率はウミシイタケルシフェラーゼのそれを凌駕するため、ルシフェラーゼ単独に比べ BRET が起こった場合絶対的な発光量の大幅な増加が期待される。) 精製タンパク質を用いた *in vitro* 性能評価を行ったところ、nM- μ M レンジの cAMP 濃度変動を計測可能であることが示され、FRET 指示薬と併用することで、細胞内外両方の cAMP 濃度変動を同時に計測できる系を確立した。

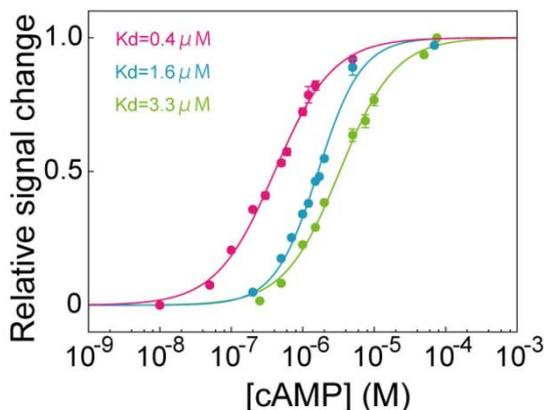


図 3. 新規 cAMP 指示薬の感度特性

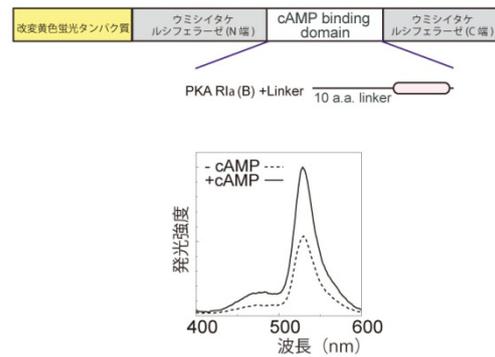


図 4 BRET 型 cAMP 指示薬のデザインと cAMP 濃度依存的な発光量変化

cAMP は、ヒトを含む高等生物の神経活動・ホルモン応答にも必須な細胞内情報伝達因子であり、記憶・学習機構の解明や創薬スクリーニングなど様々な局面において、その細胞内動態をリアルタイムに計測できる技術が求められてきた。従来の cAMP 指示薬はシグナル変化量の小ささ並びに限られた感度特性という二つの技術的問題のためその利用が妨げられていたが、本研究では従来のものをはるかにしのぐ大きさのシグナル変化量を示し、nM から μ M までの広範な cAMP 濃度変動を検出できる新規 FRET 型指示薬することに成功した。また特筆すべきことに、励起光の照射を必要とする FRET 型指示薬に加え、励起光の照射を必要としない BRET 型指示薬の開発にも成功した。本技術は、これまでの励起光の照射することで cAMP 動態を蛍光観察することが困難であった視細胞の光応答反応や、光照射の影響で生じる細胞毒性などの影響を排除できるため、完全に生理的な条件下での cAMP ダイナミクスの計測を可能にする。本研究により開発された高感度・高性能指示薬の利用により、これまでは困難であった動的な生命現象における cAMP ダイナミクスの計測・解析が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- 堀川一樹、永井健治ほか 8 名 Spontaneous network activity visualized by ultra-sensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano Nature Methods、査読あり、7、2010、729-732

[学会発表] (計 1 件)

- 堀川一樹、Spontaneous network activity

visualized by ultra-sensitive Ca²⁺
indicators, yellow Cameleon-Nano、2011年
12月13日、日本分子生物学会大会、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀川一樹 (HORIKAWA KAZUKI)
遺伝学研究所・新分野創造センター・
准教授
研究者番号：70420247

(2) 研究分担者

なし