

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13720

研究課題名(和文)メモリー型蛍光プローブの創製

研究課題名(英文)Fluorescent memory proteins

研究代表者

佐藤 守俊(SATO, Moritoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00323501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体イオンや生体分子の濃度変動に対して忠実に蛍光シグナルを変化させるタイプの従来の蛍光プローブは、当該イオン・分子の細胞内動態の解明に大きく貢献してきた。しかし、特に生体(in vivo)での蛍光イメージングにおいては、その“忠実な応答性”が技術的に大きな制約を与えることがある。本研究では、従来の忠実応答型の蛍光プローブとは一線を画する全く新しいタイプの“メモリー型蛍光プローブ”を創製し、当該蛍光プローブが環状核酸に応答して大きく蛍光シグナルを生起することを示した。

研究成果の概要(英文)：Optical imaging could be the most powerful technique available for observing spatial and temporal dynamics of molecular processes in living cells, if optical indicators for the relevant molecular processes become available. We have developed genetically encoded fluorescent probes for imaging cyclic nucleotides, based on insertion of cyclic nucleotide binding domain into green fluorescent protein (GFP).

研究分野：蛍光イメージング

キーワード：環状核酸 蛍光 メモリ 細胞 モデル小動物 イメージング

1. 研究開始当初の背景

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 等の原理に基づく従来の蛍光プローブは、生体イオンや生体分子の濃度変動に忠実に応答する。従って、当該イオン・分子の動態の可視化計測を実現するためには、その蛍光シグナルを常にモニターし続ける必要がある。このことは、従来型の蛍光プローブを用いた *in vivo* イメージングでは、モデル動物 (線虫やショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなど) を常に蛍光顕微鏡下に固定した状態で行わなければならない、ということの意味する。このため、従来型の蛍光プローブでは、同時にイメージングできるサンプルの数が基本的には 1 個体に限られてしまい、統計的に有意な数のデータを取得するために、膨大な時間をかけることを余儀なくされる。このように、従来型の蛍光プローブは *in vivo* イメージングに対して技術的に大きな制約を与えている。

2. 研究の目的

本研究では従来の蛍光プローブとは一線を画する全く新しいタイプの蛍光プローブを開発する。特に、環状核酸のイメージングを例として、新しいプローブを開発する。環状核酸は脳機能に関わる重要なセカンドメッセンジャーであるため、申請者らのものも含めて、多くの蛍光プローブが開発されている。既存のプローブは、いずれも環状核酸の濃度変動に忠実に応答して蛍光シグナルを増減するように設計されている。一方、本研究で開発する蛍光プローブは、環状核酸の濃度上昇に応答して蛍光シグナルを発する点は従来型の蛍光プローブと同様であるが、環状核酸の濃度が減少に転じてもその蛍光シグナルが減少しない点が従来型の蛍光プローブと大きく異なる。このように、環状核酸の濃度上昇を記憶するメモリー型蛍光プローブの開発が本研究の目的である。

本研究で開発する蛍光プローブは、記憶媒体 (メモリー) としての機能を有する分子 (タンパク質) である。従来の“忠実応答型”の蛍光プローブとは異なり、本研究の“メモリー型”蛍光プローブでは、環状核酸の細胞内動態に関する“情報”が消失せず蓄積される。従って、モデル動物が自由に動き回る状態で、記憶や学習に関連した様々な刺激を与え、その後に、脳のどの神経細胞が活性化して記憶が形成されたのか、学習が行われたのか等について、じっくりと精査することができる。この際、組織の固定化技術や透明化技術と、本研究のメモリー型蛍光プローブによるイメージング技術を組み合わせれば、脳の深部に至るまで環状核酸の動態に関する“情報”を探索できる。しかも、大量のサンプル (モデル動物) に対して同時に記憶・学習刺激を施して、その結果を一気にイメージングして簡便に評価できるため、短時間で、統計的に有意な数のデータ

を取得することができる。このような特徴を有するメモリー型蛍光プローブは、刺激によって活性化される神経細胞とそのネットワーク (神経回路) を同定する上で極めて有用である。以上のように、従来型の蛍光プローブでは不可能だった、脳機能の新しいイメージングを実現する新しいタイプの蛍光プローブを創出することが本研究の最大の特徴である。

3. 研究の方法

研究代表者はかつてより、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく様々な蛍光プローブを開発してきた。可視化計測の対象は、セカンドメッセンジャーと呼ばれる様々な生体小分子からタンパク質リン酸化反応やタンパク質間相互作用に至るまで多岐に及んでいる。研究代表者が開発した一連の蛍光プローブには、当時の世界初となる環状核酸 (cGMP) の蛍光プローブも含まれている。このプローブは、アメリカやドイツの研究グループによって改良が施され、現在でも様々な細胞やモデル動物において当該セカンドメッセンジャーのイメージングに利用されている。しかし、FRET 型の蛍光プローブは 2 色の蛍光タンパク質を含んでおり、マルチカラーイメージングには不利である。その観点から研究代表者は本研究において、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と環状核酸結合ドメインを用いた単色のメモリー型蛍光プローブの開発を行なった。

4. 研究成果

上述のように、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と環状核酸結合ドメインの融合タンパク質を作成したところ、細胞内の環状核酸濃度の上昇・減少に忠実に応答して、蛍光強度を上昇・減少させることが分かった。この蛍光プローブの応答性の向上を狙って、その GFP 部分にランダムにアミノ酸変異を導入したところ、得られた変異体の一つが目的とする蛍光メモリーとしての性質を示すことが分かった。具体的には細胞に発現させて環状核酸の濃度を上昇させると蛍光が上昇し、環状核酸の濃度を減少させても蛍光が減少しないメモリー変異体を開発できた。

なお、部位特異的な変異導入によって生成した多数の変異体の評価は次のように行った。変異体をそれぞれ発現する大腸菌を寒天培地で培養し、コロニーを形成させた。大腸菌コロニーの蛍光強度を CCD カメラで可視的にハイスループットスクリーニングし、輝度が大幅に向上した変異体を単離した。このとき、環状核酸の類似体を霧吹きで寒天培地に吹きかけて大腸菌に供給し、環状核酸を供給した後の蛍光の増加速度と飽和蛍光強度をイメージングすることにより、速い応答速度と高輝度の両方を兼ね備えた変異体を選択的に単離した。単離した変異体について、培養した単一細胞 (シング

ルセル)での機能評価を蛍光顕微鏡下で行った。

上述の二つの変異体、つまり、細胞内の環状核酸濃度の上昇・減少に忠実に応答して、蛍光強度を上昇・減少させる変異体と、蛍光メモリーとしての性質を示す変異体について、その蛍光団を調べてみると、なぜ前者の変異体は“忠実応答型”なのか、そしてなぜ後者の変異体が“メモリー型”なのか分かってきた。忠実応答型の場合、GFPと同様に、タンパク質発現後のフォールディングの過程で、3つのアミノ酸(65番目のトニオン、66番目のチロシン、67番目のグリシン)に環化・脱水・酸化反応が立て続けに起こって蛍光団が形成される。環状核酸が存在しなければ蛍光団のチロシン部位はフェノール型(無蛍光)だが、環状核酸が結合するとプローブに構造変化が起こって、蛍光団の当該部位がフェノレート型に変換されて蛍光を発することが分かった。両者(フェノール型とフェノレート型)の変換は可逆的であるため、前者の変異体は忠実応答型として機能するのだ。一方、後者の変異体の場合、蛍光団の形成反応そのものが環状核酸依存的事であることが明らかになった。この反応は不可逆反応なので、後者はメ

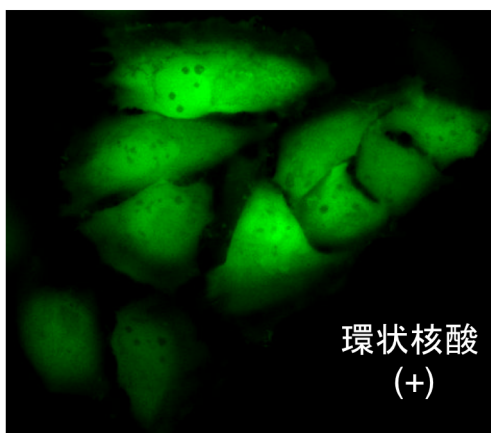
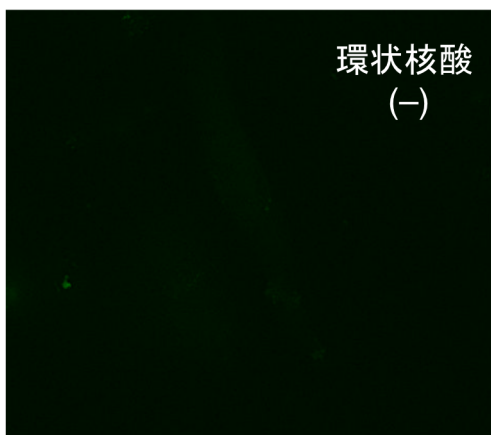


図 蛍光メモリーを発現する細胞の蛍光イメージング画像。環状核酸がないときにはほとんど蛍光を示さないが、環状核酸存在下では蛍光を示すようになる。

モリー型として機能するのである。

本研究ではさらに、メモリー変異体の輝度を大幅に向上させるために、当該変異体にアミノ酸変異を導入した。特に、当該変異体の蛍光団近傍に集中的にアミノ酸変異を導入した。当該変異体の蛍光団は19個のアミノ酸に囲まれているが、蛍光タンパク質の輝度の向上を目的とした従来研究を参考に、特に蛍光強度に重要な蛍光団のフェノレート部位を取り囲むアミノ酸を狙って集中的に変異を導入した。なお、このときの変異体のスクリーニングは、上述のように、部位特異的な変異導入によって生成した多数の変異体をそれぞれ発現する大腸菌を寒天培地で培養してコロニーを形成させ、大腸菌コロニーの蛍光強度をCCDカメラで可視的にハイスループットスクリーニングすることにより行った。この変異導入とハイスループットスクリーニングの結果、暗所ではほとんど蛍光を持たないが、環状核酸の濃度が上昇すると非常に明るい蛍光を生起する変異体を取得することに成功した。なお、この高輝度変異体が、環状核酸の濃度が低下しても蛍光強度が低下しない、メモリーとしての性質を保持していることを示した。

さらに上述のハイスループットスクリーニングを温度をコントロールしながら行うことにより、様々な温度で最適の応答を示す変異体を取得できた。モデル動物によって、最適の飼育温度や体温が異なるため、このようにそれぞれの温度で最適な応答を示す変異体を取得できたことは非常に意義深い。

研究期間内では以上のような成果を得ることができたので、現在、当該蛍光プローブを線虫(*Caenorhabditis elegans*)の神経細胞に導入し、*in vivo*での評価を始めているところである。この線虫の神経細胞における*in vivo*での評価に基づいて、必要に応じて上述のエンジニアリングのステップに戻って問題を解決する。このような開発と*in vivo*での評価という実験サイクルを回すことにより、実用性の高いツールとして完成させたいと考えている。

蛍光メモリーが完成した暁には、様々なモデル動物でのイメージングに当該ツールを応用したいと考えている。線虫はわずか302個しか神経細胞を持っておらず、神経機能を解析するための非常にシンプルなモデル動物として幅広く研究されている。神経細胞における環状核酸の産生は、当該細胞の活性化の一般的な指標として利用できる。線虫の感覚受容を担う神経細胞(代表例として、水溶性誘引物質(NaClなど)を検知するASE神経細胞や揮発性誘引物質(ブタノンなど)を検知するAWC神経細胞)に蛍光メモリーを発現させることを考えている。水溶性誘引物質や揮発性誘引物質で刺激して、線虫の感覚神経細胞を活性化させ、蛍光

メモリーの評価を行う予定である。蛍光メモリーでは、数多くのサンプルに対して同時に刺激を施して、その結果を一気にイメージングして簡便に評価できるため、短時間で、統計的に有意な数のデータを取得して意味ある情報を抽出できると期待している。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、上述の線虫よりも複雑な、約 135,000 個の神経細胞からなる脳を持っている。キイロショウジョウバエでも環状核酸が神経細胞の活性化の一般的な指標として利用できる (マウスやヒトを含めた哺乳類も同様)。キイロショウジョウバエの脳のすべての神経細胞に蛍光メモリーを発現させ、様々な感覚刺激 (嗅覚, 聴覚) によって活性化される神経細胞やその回路を明らかにすることができれば非常に意義深いと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

[http://system.c.u-](http://system.c.u-tokyo.ac.jp/common/professor/sato.html)

[tokyo.ac.jp/common/professor/sato.html](http://system.c.u-tokyo.ac.jp/common/professor/sato.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守俊 (SATO, Moriotshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号 : 00323501

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()