

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15027

研究課題名(和文) IP3クランプ法の開発

研究課題名(英文) Development of IP3 clamp method

研究代表者

白川 英樹 (Shirakawa, Hideki)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：40241070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞内のIP3を光照射によって任意の濃度に固定できる実験手法(IP3クランプ法)の確立を目指し、必要な分子ツール(光活性化型酵素、蛍光性プローブ)の作成を行った。ホスホリパーゼCと植物由来の光感受性タンパク質を組み合わせることで、可視光照射によってIP3産生活性が変化する酵素が得られることを示した。また、従来の蛍光性IP3プローブの励起・蛍光波長を改変し、IP3クランプ法において光活性化型酵素との併用が可能なプローブを得た。

研究成果の概要(英文)：Protein-based molecular tools were developed, aiming to establish the IP3 clamp method, a novel technique to control the intracellular IP3 concentrations in living cells by light. It was shown that the combination of human phospholipase C and plant photoreceptor proteins could give the photoactivatability to an IP3-producing enzyme. We also developed fluorescent IP3 probes that have favorable excitation/emission wavelengths to be used with photoactivatable enzymes in the IP3 clamp system.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：カルシウムシグナリング オプトジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

Ca²⁺は最も重要な細胞内シグナル因子の一つであるが、実際のCa²⁺動態は細胞や応答の種類によって多様であり、また複雑である。イノシトール三リン酸 (IP₃) は細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の調節において中核となるシグナル分子であり、細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺遊離を誘発することで[Ca²⁺]_iを増加させる。一方でIP₃の産生と分解の速度はともに[Ca²⁺]_iに依存する。

膜電位と相互依存関係にある膜電流の解析にはボルテージ・クランプ (膜電位固定) 法が必須であるのと同様に、IP₃と相互依存関係にある細胞内Ca²⁺ダイナミクスの解析には“IP₃クランプ法”が必須である。近年発展してきたオプトジェネティクス (光遺伝学) の方法論によって、光感受性タンパク質モジュールを付加することで、種々のタンパク質の機能に光応答性を付与できることが示されている。光応答性のIP₃産生酵素とIP₃分解酵素を作成すれば、蛍光性IP₃プローブによって[IP₃]_iをモニターしながら、光照射でIP₃の産生・分解の速度を制御することで、[IP₃]_iを任意のレベルにクランプすることが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

IP₃クランプ法の確立のための要となる分子ツールとして、光照射によって活性のオン/オフができるIP₃産生酵素とIP₃分解酵素を開発する。また、それらと波長域が重複せず、かつ[IP₃]_i濃度の変化を高いS/N比で測定できるように、シグナル変化率の大きな蛍光性IP₃プローブを作成する。さらに両者を用いて、生細胞の[IP₃]_iを任意のレベルに固定することができるフィードバック制御・測定系の確立を目指す。

本研究はIP₃をターゲットとしているが、同様の方法論は他の様々なシグナル分子に対しても応用可能である。細胞内シグナル分子のクランプ法が確立できれば、種々の細胞生理学研究に対する貢献は大きい。

3. 研究の方法

(1) 光活性化IP₃代謝酵素の作成

IP₃産生酵素

IP₃産生酵素であるホスホリパーゼCゼータ (PLC) のドメイン間リンカーに相当する部位に、植物由来の光受容タンパク質フォトトロピンの光感受性ドメイン (LOV2) を挿入した変異体を作成した (LOV2挿入型PLC)。また、PLCをドメイン間リンカーで2つに切断し、一方に植物由来の光受容タンパク質フィトクロームB (PhyB) を、他方にその結合タンパク質 (PIF6) を連結した変異体 (分割型PLC) も作成した。これら変異体をマウス卵に発現させ、Ca²⁺反応誘発活性の光照射による変化を指標として、IP₃産生活性の光依存性を評価した。

IP₃分解酵素

細胞膜局在型のIP₃分解酵素IP3-5-ホスファターゼA (INPP5A) を用いて、野生型INPP5Aと、細胞膜局在配列を欠損させた変異型INPP5Aの双方について、マウス卵での細胞内局在と、Ca²⁺上昇反応に対する抑制する活性を検証し、光活性化型酵素作成の材料としての適性を評価した。

(2) FRET型蛍光性IP₃プローブの改変

IP₃受容体のIP₃結合部位と2つの蛍光タンパク質からなる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたIP₃プローブ (fretino) をベースに、FRETのドナーとアクセプターとなる蛍光タンパク質として、ECFPとVenusおよびそれらの循環置換型変異体やC末端欠失変異体、TagGFP2やTagRFPなどを用いたものを作成し、マウス卵細胞を用いてそれぞれのIP₃濃度依存性のFRETシグナルの変化率や、経時的な測定画像におけるS/N比等について検討した。

(3) IP₃クランプのための光照射・蛍光測定系の構築

従来型の蛍光顕微鏡をベースに、LOV2やPhyBを光刺激するための光学系を導入するとともに、蛍光計測から光刺激へソフトウェア的にフィードバックをかける制御ソフトを、LabViewをプラットフォームとして試作した。一方、共焦点蛍光顕微鏡をベースとしたシステムについても、顕微鏡付属のアプリケーションのマクロ機能を用いて、IP₃クランプのための光照射と蛍光像取得・計測のシーケンスの自動化を試みた。

4. 研究成果

(1) PLCのEF, X, Y, C2の各ドメイン間にLOV2を挿入した計10種類の変異体について、430nmの波長の青色光を照射したときのマウス卵でのCa²⁺上昇反応の変化を調べたところ、LOV2をXYリンカー部位に挿入したもののうち2種類と、YドメインとC2ドメイン間のリンカー部位に挿入したもののうち2種類について、光照射時に[Ca²⁺]_i上昇反応の頻度の増加が確認され、光依存的なIP₃産生酵素活性の上昇による[IP₃]_iの増加がおきていることが示唆された。この結果から、光活性化型IP₃産生酵素の作成の方法論として、LOV2挿入型PLCの有効性が示された。しかし、これまでに試作したものはいずれも活性のオン・オフの切り換えがシャープではなく、IP₃クランプで実用可能なものを得るには更なる改良が必要である。今後、LOV2をリンカー部位ではなく各ドメイン内部に挿入する、PLCとの接合部位の配列を系統的に変えるなどといった検討を行う予定である。またLOV2以外の光応答性モジュールの利用も検討する。

(2) PLCをEF, X, Y, C2の各ドメイン間の

リンカー部位で2つに切断し、N末端側に PIF6、C末端側に PhyB を連結した分割型 PLC を3種類作成した。それぞれ対応するペアをマウス卵に同時に発現させたのち、赤色光 (650 nm) と近赤外光 (750 nm) の光を交互に照射した結果、XY リンカー部位で分割したのち、赤色光照射で Ca^{2+} 反応が誘発され、近赤外光照射で Ca^{2+} 反応が停止するという応答が観察された。この結果から、光活性化型 IP_3 産生酵素の作成の方針として、LOV2 挿入型だけでなく、PhyB/PIF6 を用いた分割型 PLC も有効であることが示された。しかし、現時点までに作成したものについては活性のオン・オフの切り替えがシャープではないこと、また発現量のバランスの調節が容易ではないことなど、実際に IP_3 クランプに用いるためにはまだ改良すべき点が残されている。今後は、例えば分割型 PLC の一方に細胞膜局在配列を付加して細胞膜に局在させるなどといった方策を検討する。また PhyB/PIF6 以外の光応答性モジュールの使用についても検討する。

(3) マウス卵に発現させた野生型ヒト INPP5A は細胞膜に局在したのち、野生型のC末端の脂質結合部位を含む5アミノ酸を欠失させた変異体は、細胞膜には局在せずに細胞質に均一に分布することが確認された。野生型と変異体のいずれについても、マウス卵に発現させると PLC によって誘発される Ca^{2+} 上昇反応が抑制 (潜時の延長、頻度の低下) されたが、抑制の効率は変異体のほうがやや高かった。この結果などから、光活性化 IP_3 分解酵素のベースとしては、細胞膜非局在型の変異体 INPP5A のほうが適している結論した。

(4) 蛍光性 IP_3 プローブ fretino の構成要素のうち、FRET ドナーの CFP とアクセプターの Venus のどちらか、あるいは両方を循環置換型変異体 (cpCFP, cpVenus) にしたものを作成し、それぞれについてマウス卵での IP_3 依存的な FRET シグナルの変化を測定したが、いずれも従来型に比べてシグナル変化率の向上は認められなかった。一方、従来のシアン/黄ではなく、緑/赤の FRET で測定できるようにするため、ドナーを TagGFP2 または Clover、アクセプターを TagRFP または mRuby2 に置き換えたものを作成し、マウス卵細胞における IP_3 依存的なシグナル変化を測定したところ、TagGFP2/TagRFP の組み合わせが最も大きな変化率を示した。しかし IP_3 クランプシステムに用いるには S/N 比がまだ十分ではなく、今後、FRET ドナー・アクセプターとして TagGFP2 や TagRFP の循環置換型変異体を試すとともに、 IP_3 結合部位のアミノ酸配列に手を加えて、 IP_3 に対する親和性も最適化する必要があると考えられる。

(5) IP_3 クランプシステムを構築する第一段

階として、従来型の蛍光顕微鏡をベースとして、落射蛍光照明系から 340nm, 380nm, 430nm, 490nm、透過光照明系から 650nm と 750nm の光を標本に照射する光学系を構築した。また、光照射と蛍光シグナルの強度測定とを連動して行うための LabView アプリケーションを試作した。一方、共焦点顕微鏡をベースとしたシステムについても、蛍光像の取得および蛍光強度の測定と、光刺激のため光照射との切替を自動するルーチンを作成した。今後、光活性化型 IP_3 代謝酵素および蛍光性 IP_3 プローブについて、十分な性能のものが得られ次第、これらのシステムを実際に用いて、 IP_3 クランプのためのフィードバック制御等の具体的な条件検討を始める予定である。

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 1 件)

Hideki Shirakawa, Takashi Kikuchi, Masahiko Ito, Calcium signaling in mammalian eggs at fertilization. Current Topics in Medicinal Chemistry 16: 2664-2672, 2016, 査読有

[学会発表](計 5 件)

Takasuke Murata, Kikuchi Takashi, Hideki Shirakawa, Role of luminal Ca^{2+} binding proteins in the pattern formation of Ca^{2+} oscillations in mammalian eggs. 第 94 回日本生理学会、2017 年 3 月 30 日、アクトシティ浜松 (静岡・浜松)

Noriyuki Yamada, Takuya Tsuda, Hideki Shirakawa, Functional requirements of interdomain interactions for the enzymatic activity of PLCzeta. The 22nd International Congress of Zoology, 2016 年 11 月 18 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄・宜野湾)

Takashi Yoshida, Hideki Shirakawa, Calcium oscillation-dependent dynamics of cortical actin filaments in mouse eggs. The 22nd International Congress of Zoology, 2016 年 11 月 18 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄・宜野湾)

Hideki Shirakawa, Takashi Kikuchi, Noriyuki Yamada, Takuya Tsuda. Mechanism for the generation of fast and slow Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, 2015 年 6 月 18 日、浅虫海洋生物学研究センター (青森・浅虫)

Takashi Kikuchi, Takasuke Murata,

Hideki Shirakawa, Measurement and analysis of changes in the ER Ca^{2+} concentration during Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV、2015年6月18日、浅虫海洋生物学研究センター（青森・浅虫）

〔その他〕

<http://rainbow.pc.uec.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 英樹 (SHIRAKAWA, Hideki)
電気通信大学・大学院情報理工学研究科・
准教授
研究者番号：40241070