

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：19790165
 研究課題名 (和文) カルパイン認識配列を用いた新規カルシウム指示タンパク質による
 生体内カルシウム動態解析
 研究課題名 (英文) Analysis of calcium dynamics using novel calcium indicator protein
 with calpain sensitive sequence
 研究代表者
 高塚 賢二 (TAKATSUKA KENJI)
 京都大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：70378701

研究成果の概要：

本研究では、研究代表者が作製した新規細胞内カルシウム指示蛋白質(F2C)について、(1) これまで困難であったカルシウム指示蛋白質の動物個体への応用、すなわちトランスジェニックマウスの作出を行い、(2) トランスジェニックマウスの臓器を用いて細胞内カルシウムの動態を観察した。全身でF2Cを発現するように作製したトランスジェニックマウスでは、ゲノムにF2Cが組み込まれたマウス9系統うち7系統で遺伝していた。この7系統のマウスをLacZ染色による発現部位解析をしたところ、脳・網膜・膵臓・甲状腺・脳脈絡叢・腎臓などで発現していることが確認された。さらに「精子でCreリコンビナーゼを発現するマウス」と掛け合わせることによって、各臓器でF2Cが正常に発現することを確認できた。

上記の臓器のうち、脳脈絡叢の細胞がカルシウムホメオスタシスに重要な機能を担っているため、臓器におけるカルシウム動態を観察するために脳脈絡叢を摘出しカルシウム動態を計測した。カルシウム流入を引き起こす刺激として4 α PDD (TRPV4のアゴニスト)を与えたところ、溶媒のみでは応答が無く、4 α PDD刺激時には応答が認められた。このことよりF2C発現マウスを用いることで、臓器によるカルシウム動態の蛍光観察が可能となり、蛍光指示薬を取り込ませる必要なくカルシウムライブイメージングができるようになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1900000	0	1900000
平成20年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	420000	3720000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：神経科学、生理学、発生学、イメージング、カルシウム、網膜、トランスジェニックマウス、組織形成

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

現在、カルシウムイオンの動態可視化は培養細胞を用いた実験が主流であり、動物個体における細胞内カルシウムの動態についてはほとんど調べられていない。これは個体に応用できるカルシウム指示薬が存在しなかった事やカルシウム指示タンパク質についてはシグナルの検出が困難である事が理由として挙げられる。この細胞内カルシウム濃度の変化を捉える分子については1997年以降、5種類の異なるタンパク質が開発された。しかしながら共通の問題点のため、組織・器官におけるカルシウムイオンの振る舞いを明らかにするために最も有効な手段であるトランスジェニック動物の作製は、現在のところ成功を収めているとは言えない。

我々はこれらの困難を克服するために、新規カルシウム指示タンパク質 (F2C) を作製し、その性質について報告した。本研究では、この新しいセンサー分子を用いてトランスジェニック動物を作製し、*in vivo* イメージング研究の先駆けとして、生きた動物内での「細胞が組織として働くときの細胞内カルシウムの動態」を捉える試みである。

2. 研究の目的

「全身で F2C を発現するトランスジェニックマウス」の臓器のうち、細胞はどのようにその機能を獲得するのかについて明らかにする。本研究では F2C を用いたカルシウムイメージングによって細胞の興奮性や活動性を得ることに加えて、それら成熟細胞が前駆細胞からの変化に伴い形態・電気生理学的性質・遺伝子発現などを変化させる過程を統合的に解析し、細胞および組織・器官がダイナミックな変化を遂げる発生段階においてどのように成熟していくかについて明らかにする。この目的のために、本研究では細胞内カルシウム濃度をレポートする新しいタンパク質 - F2C - を発現するトランスジェニックマウスを作製し生体におけるカルシウムイメージングを行うことで、「組織としての細胞群がどのようにカルシウム動態と遺伝子発現を変化させて組織として働くようになるのか」を解明する。

3. 研究の方法

平成19年には F2C を全身で発現するトランスジェニックマウスを作出し、平成20年度は組織におけるカルシウムイオンの動態を解析する。

作出したトランスジェニックマウスがトランスジェニック遺伝子を持つかどうかは PCR で判別する。作製したマウスの各ラインについて発現部位を lacZ 染色で検討する。それらのうち目的部位に F2C を発現するマウ

スが得られた場合、次のような実験を計画している。

まず組織標本を作製し、どの細胞に F2C が発現しているかを組織免疫染色で確認する。目的臓器のひとつである網膜は脳と構造が似ていながら、簡単に摘出・器官培養ができ発生を観察できるので、幼若トランスジェニックマウスの網膜器官培養を行い、発生段階でのカルシウム流入量等の変化すなわち興奮性の獲得をイメージングで行う。神経前駆細胞からそれぞれの神経もしくはグリア細胞に分化する時期は、細胞種によって時期が決められており、器官培養のステージを選択することによって細胞の分化前後の違いを解析することができる。この分化前後での発現遺伝子の変化 (および膜特性の変化) は次のように解析する。器官培養で取り出された網膜中の細胞にパッチ電極を当てることは F2C 発現細胞を蛍光顕微鏡で判別できるので容易であり、蛍光強度変化によりカルシウムイオンの動きを捉えながら細胞の電気生理学的特性を調べる。この電極を利用し1細胞の細胞質から mRNA を取り出し RT-PCR を行うことによって、細胞の機能的な成熟に際してどのように遺伝子発現のプロファイルが変化するのかを経時的に捉える。また培養を行う際、取り出した網膜にエレクトロポレーションにより転写因子を強制発現させることで細胞の運命を転換させると、機能すなわち膜特性や膜興奮性はどのように変化するのかを検討する。形態学的な特徴はパッチ電極内に F2C と蛍光が異なる色素 (赤色など) を充填することで、電気的特性を解析した細胞を含む組織に免疫染色を施し細胞の形態を調べられる。このように発生段階における神経細胞の成熟過程とカルシウムの動態の関係について検討する。

4. 研究成果

平成19年度の研究では、ベクターを作製し Tg マウスの作製をおこなった。作出後の遺伝子解析でトランスジーンを持つマウスが9匹得られ、そのうち7匹の Founder マウスの子どもに F2C が遺伝することが判明した。この7系統のマウスにおいて、どの臓器で F2C が発現するのかを調べるために lacZ 染色を主要臓器で調べたところ、1系統 (系統 No15) ではほぼ全身にくまなく F2C が発現することが判明した。(図1) この系統および他1系統 (系統 No40 ; 全身の多くの組織で lacZ を発現する系統であった) の2系統で、脳脈絡膜における lacZ 発現が認められた。他系統 (系統 No2, No44 では心臓、膵臓など、カルシウムの動態が深く研究されている臓器において lacZ が発現していた。系統 No43 のマウス

では lacZ の発現量が低いながらも大脳皮質全体および小脳プルキンエ細胞にも lacZ 発現が得られた。しかしながら 7 系統のうち 2 系統（系統 No27、No39）では lacZ の発現レベルが非常に低いため F2C の発現も同様に低いことが予想された。



図 1) LacZ を発現する F2C トランスジェニックマウス（系統 No15）の脳、心臓、脾臓

これらの結果を踏まえて平成 20 年度は lacZ の発現をもとに、臓器での F2C 発現を確認した。発現したのちにカルシウムに対して細胞および組織として応答するかどうかを検討するため、標的臓器を脳脈絡膜に絞った。脳脈絡膜は脳脊髄液のカルシウムホメオスタシスを司り、体液カルシウム濃度を一定に保つために働いていることが近年明らかにされてきている。この脈絡膜は 1 層の細胞層からなる袋状の器官であり、その構造の単純さから、臓器としてカルシウム動態を捉えるのに適した器官と言える。さらに発現するチャネルなどの研究も行われているため、チャネルに対するアゴニストを加えることによってカルシウム流入を引き起こすことができる。

この特徴を利用し組織としてのカルシウム動態計測を行うためには、脳脈絡膜で F2C を発現させる目的で、「精子において Cre を発現する」Neurogenin3-Cre マウスを用いた。このマウスを用いることで 2 世代の掛け合わせ後には全身で LacZ を切り出し F2C を発現するマウスが得られることとなる。このシステムを利用し、F2C 発現解析を行ったところ、これまでに 3 系統（系統 No2、No15、No40）において F2C が正常に発現することが判明した（図 2）。その他の系統については現在掛け合わせ中である。

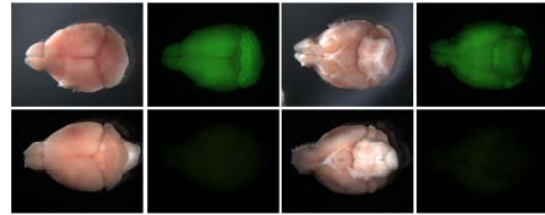


図 2) 上段；F2C を発現するトランスジェニックマウスの脳、下段；Negative control

上記の 3 系統のうち No40 系統のマウスを用いて脳脈絡膜でのカルシウム動態計測を検討した。カルシウムの流入を観察するために、脳脈絡膜で発現およびカルシウム流入が報告されている TRPV4 に着目し、そのアゴニストである 4 α PDD を刺激として加える実験を行った。溶媒のみとなる DMSO 添加では F2C の蛍光強度の変化が起こらず、4 α PDD の添加で蛍光強度の変化が起きた。

まとめとして、研究代表者が作製した新規細胞内カルシウム指示蛋白質 (F2C) について、(1) これまで困難であったカルシウム指示蛋白質発現トランスジェニックマウスを作出した。(2) トランスジェニックマウスの臓器を用いて細胞内カルシウムの動態を測光ができた。これによって F2C 発現マウスを用いることで、臓器によるカルシウム動態の蛍光観察が可能となり、蛍光指示薬を取り込ませる必要なくカルシウムライブイメージングができるようになった。現在は、網膜および海馬、小脳プルキンエ細胞に注目し、それぞれ臓器の発生とともに細胞内カルシウム動態がどのように変化するかを検討している。

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)

[学会発表] (計 2 件)

高塚賢二

FRET 用いた新規カルシウムイオン指示タンパク質 F2C の作製と特性の解析

三菱化学生命科学研究所 L 研セミナー 招待講演

平成 19 年 6 月 29 日

三菱化学生命科学研究所

高塚賢二

新規カルシウム指示タンパク質 F2C を発現するトランスジェニックマウスの作製と解析

特定領域研究「細胞感覚」平成 19 年度 夏の班会議「若手の会」

平成 19 年 8 月 12 日

神奈川県湘南国際村センター

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2件）

国内出願中) 発明の名称:「細胞内カルシウムイオン指示機能を有するポリペプチド」

出願番号:特願 2005-238034

出願者;京都大学

発明者;高塚賢二、石井孝広、大森治紀

米国出願中) 発明の名称:Polypeptide having intracellular calcium ion indicator function

出願番号:11/404167

出願者;京都大学

発明者;高塚賢二、石井孝広、大森治紀

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

高塚賢二 (TAKATSUKA KENJI)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号:70378701

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし