

## 細胞内 cGMP の動的変化を可視化する高感度蛍光タンパク質センサーの開発

### 1. 発表者：

松田 翔吾（東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 大学院生）  
原田 一貴（東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 大学院生）  
伊藤 幹（東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 大学院生）  
滝澤 舞（東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 大学院生）  
坪井 貴司（東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 准教授）

### 共同研究者

Devina Wongso（早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所 技官）  
北口 哲也（早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所 主任研究員）

### 2. 発表のポイント：

- ◆生命現象に関わる重要な分子である細胞内 cGMP の動態を可視化解析できる緑色蛍光タンパク質センサー（注 1）の開発に成功しました。
- ◆本研究で開発した蛍光タンパク質センサーは、cGMP と結合することで蛍光輝度が約 7.5 倍に上昇します。
- ◆細胞内 cGMP と他の細胞内分子とを 2 色の蛍光で同時に可視化する、デュアルカラーイメージングに適用できます。

### 3. 発表概要：

環状グアノシンリン酸 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) は生体内において、神経応答や筋肉の弛緩など、様々な生理機能や生命現象を調節しています。しかし、細胞内 cGMP と他の分子との階層性や、それらの濃度の時空間変化パターンを解析することは困難でした。これは、これまで開発された FRET 型 cGMP センサー（図 1a）がマルチカラーイメージングへ適用するには技術的困難が伴うこと、既存の単色型 cGMP センサー（図 1b）は蛍光輝度変化率が大きくないことに由来します。

本研究では、二分割をした緑色蛍光タンパク質 Citrine の間に、cGMP 分解酵素 (Phosphodiesterase 5 $\alpha$ , PDE5 $\alpha$ )（注 2）の cGMP 結合部位を挿入しました。さらに PDE5 $\alpha$  を挿入した部位のリンカーの長さやアミノ酸配列を最適化したところ、最終的には試験管内で cGMP との結合により蛍光輝度が約 7.5 倍に上昇する緑色 cGMP センサー蛍光タンパク質 (Green cGMP visualizing fluorescent protein, Green cGull と命名) を獲得しました。この Green cGull を培養細胞に遺伝子導入し、細胞内 cGMP 濃度を増加させるさまざまな薬剤を投与したところ、試験管内で見られた反応と同様に蛍光輝度が約 7 倍以上に上昇しました。さらに、Green cGull を赤色 Ca<sup>2+</sup> 蛍光指示薬 (Rhod2) と共に培養細胞に導入し、単一細胞での cGMP、Ca<sup>2+</sup> の 2 色蛍光色イメージングに成功しました。

以上の結果から、Green cGull は高感度で細胞内 cGMP 濃度変化を検出できるだけでなく、細胞内の複数の分子がどのように相互作用しているのかをマルチカラーで検出するセンサーの 1 つとしても有望であることが示されました。

#### 4. 発表内容：

##### ■背景

cGMP は生体内において、様々な生理機能を調節するセカンドメッセンジャー分子として利用されています。例えば、ヒトにおいては視覚情報の伝達や、平滑筋の弛緩などに関与することが知られています。細胞内では cGMP 合成酵素 (guanylate cyclase, GC) と cGMP 分解酵素 (Phosphodiesterase, PDE) の活性や発現量のバランスによって、複雑な濃度調節が行われています。この調節機構を解明する手法として、cGMP と結合すると蛍光輝度が増加する蛍光タンパク質センサーが用いられています。蛍光輝度の経時変化を観察することで、細胞を破壊することなく、細胞内 cGMP 動態の時空間的な変化をリアルタイムで解析することができます。

蛍光タンパク質センサーは、その構造によって 2 つにタイプが分類できます。1 つはフォルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET) 型で、異なる 2 色の蛍光タンパク質と分子結合部位が連結された構造をしています。標的分子と結合もしくは解離をすると、異なる 2 色の蛍光タンパク質の距離が近くなることで励起エネルギーの移動が起き、蛍光比が変化します。この FRET 型は、異なる 2 色の蛍光タンパク質を使っているため、他の細胞内シグナル伝達分子の動態や異なる細胞内小器官における分子動態などの細胞内で起こる複数の現象を同時に観察するためには、他の蛍光色を用いて異なる 3 色の蛍光を同時に観察することが必要なため、技術的な困難が伴います。

もう 1 つのタイプは、単色蛍光タンパク質輝度変化型というもので、分割などによって構造を変化させた 1 色の蛍光タンパク質と分子結合部位が連結された構造をしており、標的分子と結合もしくは解離をすると蛍光タンパク質の構造が変化することで、蛍光輝度が増加します。単色蛍光タンパク質輝度変化型は、励起光を 1 色しか用いないため、異なる色で可視化された他の現象と同時観察が行いやすい利点があります。

##### ■内容

本研究では、緑色蛍光タンパク質 Citrine を発色団近傍で二分割し、その間にアミノ酸のリンカー配列を介して cGMP 分解酵素 (PDE5 $\alpha$ ) の cGMP 結合部位を挿入しました (図 2)。すると、Citrine は cGMP を添加すると、わずかに蛍光輝度が上昇するようになりました。つまり、cGMP 結合部位に cGMP が結合することによって、cGMP 結合部位の構造変化がリンカーを介して蛍光タンパク質に伝わり、蛍光輝度変化が起こると考えられます。次に、リンカーのアミノ酸配列長や配列を最適化し、最終的に、蛍光輝度が約 7.5 倍に上昇する Green cGull の獲得に成功しました (図 3)。これは現時点で世界最高の蛍光輝度変化率です。

この Green cGull をヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に導入し、cGMP 合成酵素を活性化する薬剤 (SNAP) を投与したところ、約 7 倍以上の蛍光輝度上昇が観察されました。さらに、Green cGull と赤色 Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬 (Rhod2) を細胞に共導入し、SNAP を投与したところ、同一細胞内の cGMP と Ca<sup>2+</sup>濃度変化を同時に可視化解析することに成功しました (図 4)。

##### ■影響・波及効果

今回開発した cGMP 可視化蛍光タンパク質 (Green cGull) を用いることで、従来の蛍光タンパク質では検出できなかった細胞内 cGMP のわずかな変化も可視化できるようになると期待されます。また、細胞内の複数の分子がどのように相互作用しているのかを可視化解析するマルチカラーイメージングへの貢献が期待されます。

## 5. 発表雑誌：

雑誌名：「ACS Sensors」（オンライン速報版 2016 年 12 月 26 日）

論文タイトル： Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid linkers between a fluorescent protein and PDE5 $\alpha$ .

著者： Shogo Matsuda<sup>#</sup>, Kazuki Harada<sup>#</sup>, Motoki Ito, Mai Takizawa, Devina Wongso, Takashi Tsuboi<sup>\*</sup>, Tetsuya Kitaguchi<sup>\*</sup>（<sup>#</sup>共同筆頭著者、<sup>\*</sup>責任著者）

DOI 番号： 10.1021/acssensors.6b00582

アブストラクト URL： <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssensors.6b00582>

## 6. 問い合わせ先：

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系  
准教授 坪井 貴司（つばい たかし）

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3 丁目 8 番地 1 号

Tel: 03-5465-8208

E-mail: [takatsuboi](mailto:takatsuboi@bio.c.u-tokyo.ac.jp) [アットマーク] [bio.c.u-tokyo.ac.jp](http://bio.c.u-tokyo.ac.jp)

（メールアドレスの [アットマーク] は@に置き換えてください。）

## 7. 用語解説：

（注 1）蛍光タンパク質センサー

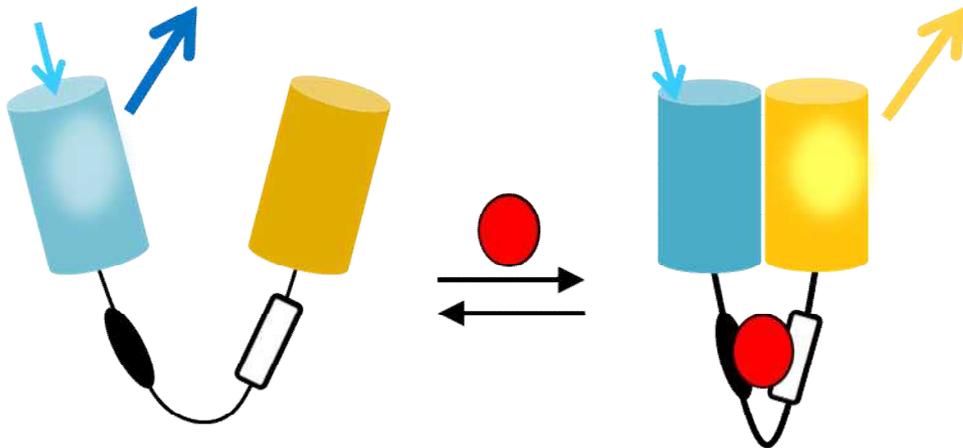
蛍光タンパク質は、ある特定の波長の光（励起光）を吸収し、吸収した光よりも波長が長い光（蛍光）を放出する性質を持つ、発色団という構造を形成している。蛍光タンパク質センサーは蛍光タンパク質を応用し、標的分子の濃度変化や活性などを蛍光輝度の変化によって検出する。

（注 2）cGMP 分解酵素

cGMP は、ホスホジエステラーゼ（PDE）という環状ヌクレオチド加水分解酵素によって分解される。環状ヌクレオチドは cGMP 以外にも構造が似ている cAMP があり、PDE は cAMP も分解する。哺乳類の PDE は 11 種類あり、PDE5 は cGMP を特異的に分解する性質を持つ。

8. 添付資料：

a フォルスター共鳴エネルギー移動(FRET)型



b 単色蛍光タンパク質輝度変化型

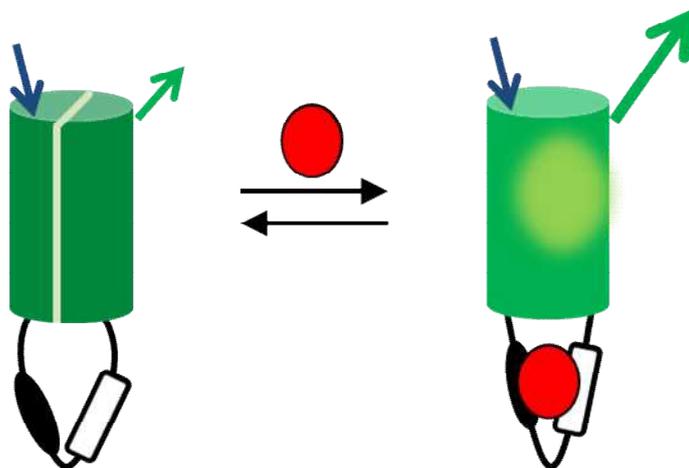


図 1. 蛍光タンパク質の構造模式図

(a) FRET 型は、2 色の蛍光タンパク質と標的分子結合部位が連結された構造をしている。標的分子と結合、もしくは解離することで構造が変化し、2 つの蛍光タンパク質の距離が近づくことで、片方の蛍光タンパク質の励起エネルギーがもう片方へと移動し、蛍光比が変化する。

(b) 単色蛍光タンパク質輝度変化型は、構造を変化させた 1 色の蛍光タンパク質に標的分子結合部位が連結された構造をしている。標的分子と結合、もしくは解離することで蛍光タンパク質の構造が変化し、蛍光輝度が変化する。

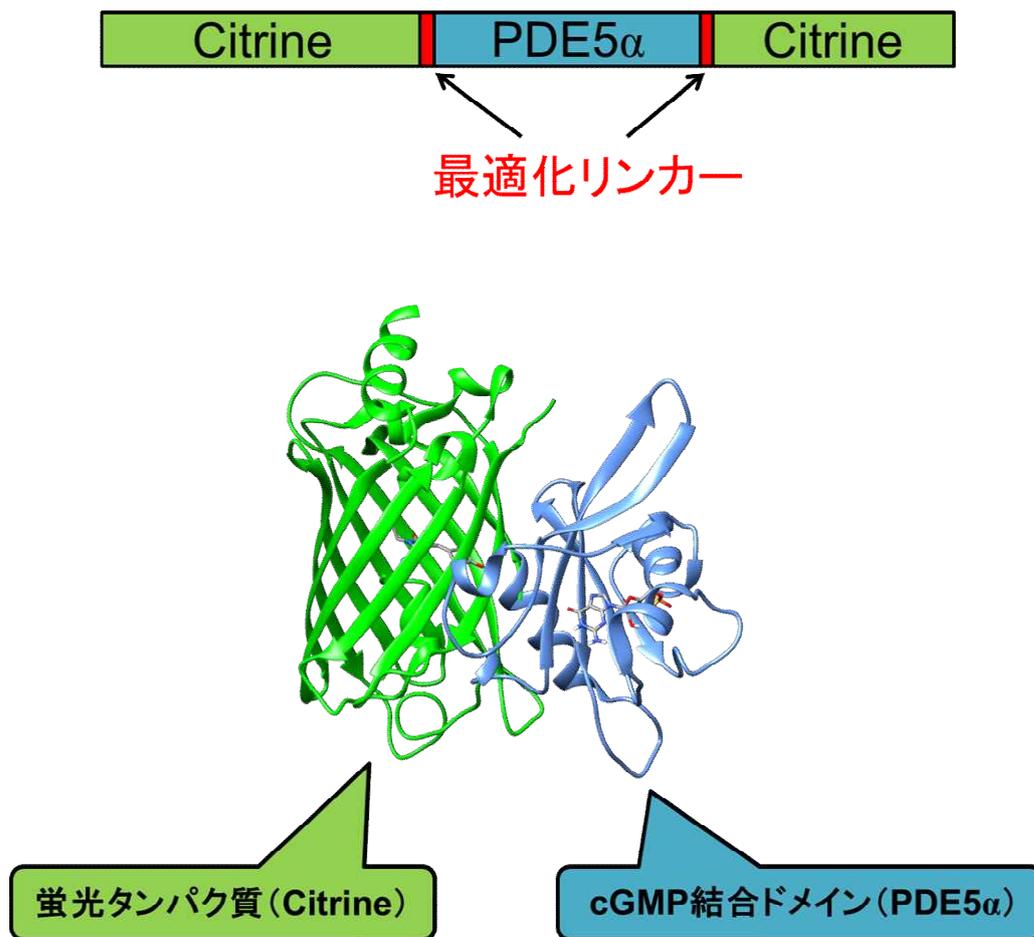


図2. Green cGull の構造模式図

Green cGullは、分割した緑色蛍光タンパク質Citrineの間に、リンカーを介してPDE5αのcGMP結合ドメインが挿入されている。また、リンカーのアミノ酸配列長や配列を最適化し、蛍光輝度変化率を最大化した。

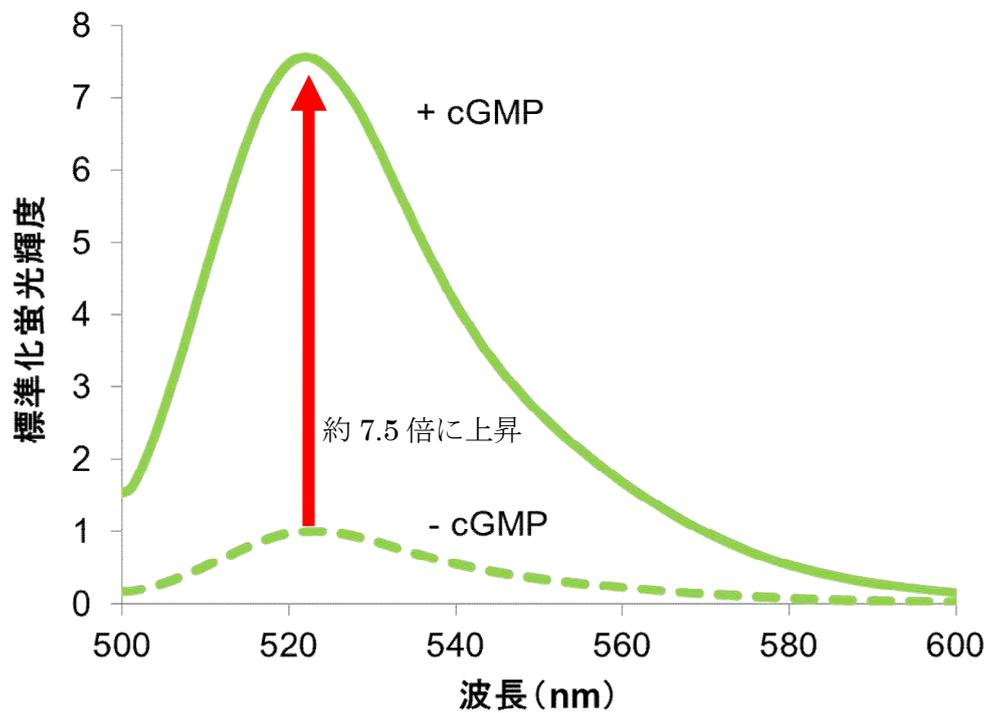


図 3. Green cGull の蛍光スペクトル

Green cGull を 480 nm の波長で励起した場合の蛍光スペクトル。点線は cGMP を加えていない条件、実線は cGMP を加えた条件での蛍光輝度。522 nm が蛍光波長のピークで、cGMP を加えると約 7.5 倍に蛍光輝度が上昇した。

(Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid linkers between a fluorescent protein and PDE5a. Matsuda et al., ACS sensors, 2016, doi/10.1021/acssensors.6b00582 より一部改変)

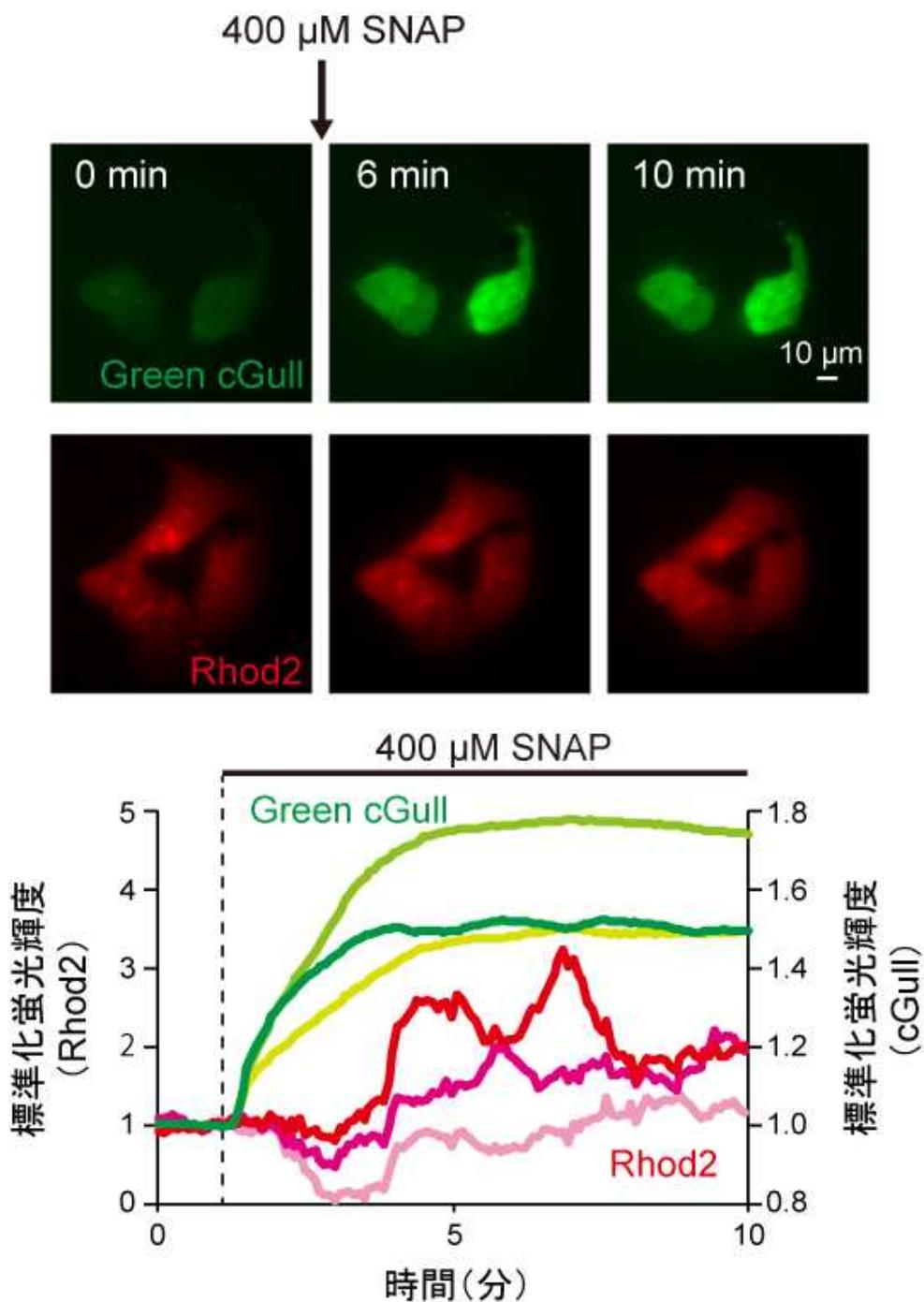


図4. Green cGull と Rhod2 とを共導入した HEK293 細胞の 2 色同時蛍光イメージング画像

撮影開始 1 分後に cGMP 合成酵素を活性化する薬剤 (SNAP) を投与したところ、細胞内の cGMP 濃度と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を、2 色の蛍光で同時に可視化解析することに成功した。Green cGull の蛍光輝度は投与直後から上昇した。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  の蛍光指示薬である Rhod2 の蛍光は下降や上昇を伴う複雑な波形を示した。

(Generation of a cGMP indicator with an expanded dynamic range by optimization of amino acid linkers between a fluorescent protein and PDE5a. Matsuda et al., ACS sensors, 2016, doi/10.1021/acssensors.6b00582 より一部改変)