

赤色 cAMP 可視化蛍光タンパク質センサーの開発

1. 発表者：

原田 一貴（東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 博士課程 2 年）
伊藤 幹（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 修士課程 2 年（研究当時））
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

王 筱文（理化学研究所脳科学総合研究センター神経グリア回路研究チーム 技官）
田中 三佳（理化学研究所脳科学総合研究センター神経グリア回路研究チーム 研究員（研究当時））
Devina Wongso（早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所 技官）
今野 歩（群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野 講師）
平井 宏和（群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野 教授）
平瀬 肇（理化学研究所脳科学総合研究センター神経グリア回路研究チーム チームリーダー）
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（研究当時））

2. 発表のポイント：

- ◆生命現象に関わる重要な分子である cAMP の細胞内の濃度変化を可視化解析できる赤色蛍光タンパク質センサー（注 1）の開発に成功しました。
- ◆本研究で開発した赤色蛍光タンパク質センサーは、cAMP に応答して蛍光輝度が約 4.2 倍に上昇します。
- ◆青色光で活性化する cAMP 合成酵素との併用、細胞内カルシウムイオンとの同時イメージング、生きたマウスの脳内でのイメージングに成功しました。

3. 発表概要：

環状アデノシンリン酸（cyclic adenosine monophosphate: cAMP）は細胞において、ホルモン分泌や記憶形成などの重要な生理現象を制御します。発表者らの研究グループはこれまで、細胞内の cAMP 動態を可視化するため、緑色蛍光タンパク質を基盤とした単色輝度変化型 cAMP センサーを開発してきました。しかし、他の多くの単色蛍光タンパク質センサーも緑色蛍光タンパク質由来であることから多重色イメージングへの適用が困難である点、また観察に青色の励起光を必要とするため、青色光で活性化される光遺伝学（注 2）技術と併用できない点が課題でした。

今回発表者らのグループは、赤色蛍光タンパク質を基盤とした cAMP センサーを開発し **Pink Flamindo (Pink Fluorescent cAMP indicator)** と命名しました。Pink Flamindo は試験管内において、cAMP に応答して蛍光強度が約 4.2 倍上昇し、培養細胞内においても cAMP 動態を検出することができました。また青色光照射によって光活性化アデニル酸シクラーゼ（注 3）が誘導する cAMP 産生や、緑色 Ca²⁺ 蛍光センサー G-GECO と共に使用することで細胞内の Ca²⁺ と cAMP の 2 色同時観察にも成功しました。さらに生きたマウス脳内でのアストロサイト（注 4）内 cAMP 動態の可視化にも成功しました。

以上の結果から、今回開発した Pink Flamindo は、細胞内における cAMP を含む多分子間の階層的機能相関を解析する多重色イメージングへの適用が可能です。さらに光遺伝学や生体内イメージング技術などと組み合わせることで、イメージング研究の発展に大きく寄与することが期待されます。

4. 発表内容：

■背景

cAMP は細胞における主要なセカンドメッセンジャー分子の一つで、多様な生理機能の調節に関与しています。例えば膵β細胞では細胞内の cAMP 濃度上昇によってインスリン分泌が促進され、脳の海馬の神経細胞では cAMP 濃度上昇が記憶学習反応を引き起こします。これらさまざまな生理機能における cAMP の細胞内動態を解析するため、これまで蛍光タンパク質と cAMP 結合タンパク質を組み合わせた蛍光タンパク質センサーが開発されてきました。

発表者らの研究グループは現在までに、緑色蛍光タンパク質を基盤とした cAMP センサー **Flamindo** (**Fluorescent cAMP indicator**) および **Flamindo2** を開発しています (Kitaguchi et al., *Biochem J*, 2013; Odaka et al., *PLoS ONE*, 2014)。これらは単色輝度変化型センサーと呼ばれ、分割された蛍光タンパク質の間に標的分子の結合部位が連結された構造をしています。標的分子が結合すると蛍光タンパク質の構造が変化し、蛍光強度が変化すると考えられています (図 1)。これまで、多くの単色蛍光タンパク質センサーは緑色蛍光タンパク質をもとに開発されてきましたが、複数の分子動態を同時に観察する多重色イメージングを行うには別の色のセンサーが必要です。また、緑色蛍光タンパク質は青色光で励起されますが、青色光の照射によって活性化するチャネルロドプシンなどの光遺伝学タンパク質と併用するには、励起に青色光を必要としない蛍光タンパク質センサー、とりわけ赤色のものが求められます。

■内容

今回発表者らの研究グループは、赤色蛍光タンパク質を基盤とした cAMP センサーの開発に世界で初めて成功しました。赤色蛍光タンパク質 **mApple** の発色団近傍に、cAMP に結合能をもつタンパク質 **Epac1** の cAMP 結合ドメインを遺伝子工学的に融合し、さらに両者を連結するリンカー部分のアミノ配列を最適化しました。その結果、試験管内で cAMP の結合に伴い蛍光強度が約 4.2 倍に上昇する蛍光タンパク質センサーを開発し、これを **Pink Flamindo** (**Pink Fluorescent cAMP indicator**) と命名しました (図 2)。

この **Pink Flamindo** をヒト子宮頸がん細胞株 **HeLa** 細胞に遺伝子導入し、cAMP 合成酵素の活性剤(フォルスコリン)、cAMP 分解酵素の阻害剤 (**IBMX**)、そして、cAMP 合成酵素の阻害剤 (ジデオキシアデノシン) を投与したところ、cAMP 濃度が増加するときは蛍光強度が上昇し、減少するときは蛍光強度が下降しました (図 3)。次に、光活性化アデニル酸シクラーゼ (**bPAC**) と **Pink Flamindo** を細胞に共導入し、青色レーザー光を細胞に照射し **bPAC** を活性化したところ、照射時間に伴って **Pink Flamindo** の蛍光強度の上昇と応答時間が延長しました (図 4)。またマウス膵β細胞株 **MIN6 m9** 細胞に **Pink Flamindo** と緑色 Ca^{2+} 蛍光センサー **G-GECO** を共導入し、インスリン分泌を促進し糖尿病治療薬として用いられる薬剤 (トルブタミド) を投与したところ、**Pink Flamindo** と **G-GECO** 両者で蛍光強度の上昇が見られました。つまり、同一の細胞内の cAMP と Ca^{2+} の動態の同時観察に成功しました (図 5)。

さらに、マウスの脳を構成する細胞の一種であるアストロサイトに **Pink Flamindo** を導入し、二光子顕微鏡 (注 5) を用いて生きたマウスの脳内にフォルスコリンと **IBMX** を投与したところ、蛍光強度の上昇が観察されました (図 6)。

■影響・波及効果

今回開発した cAMP センサー **Pink Flamindo** は、従来行うことのできなかった光遺伝学技術と cAMP 動態可視化の併用を可能にし、また多重色イメージングの可能性を大きく拡張させます。さらに、マ

ウスの脳内をはじめとする生体内イメージングへの有用性も示され、今後のイメージング研究を大きく加速させると考えられます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Scientific Reports

論文タイトル：Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging

著者：Kazuki Harada[#], Motoki Ito[#], Xiaowen Wang, Mika Tanaka, Devina Wongso, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Hajime Hirase, Takashi Tsuboi^{*}, Tetsuya Kitaguchi^{*} ([#]共同筆頭著者、^{*}責任著者)

DOI 番号：10.1038/s41598-017-07820-6

アブストラクト URL：http://www.nature.com/articles/s41598-017-07820-6

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関するお問い合わせ先>

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@bio.c.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注 1) 蛍光タンパク質センサー

蛍光タンパク質は発色団という構造を形成しており、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。蛍光タンパク質センサーは、蛍光タンパク質に標的分子と結合するタンパク質を連結し、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) 光遺伝学

オプトジェネティクスとも呼ばれる。光を感受して活性化する光受容体タンパク質を利用し、光によって細胞の様々な機能を人為的に操作する手法。代表的な光受容体タンパク質に、青色光によって活性化し陽イオンを透過するチャネルロドプシンがある。

(注 3) 光活性化アデニル酸シクラーゼ (Photoactivated adenylyl cyclase: PAC)

青色光によって活性化し、cAMP を合成する酵素。ミドリムシや光走性バクテリアから単離され、本研究では光走性バクテリア由来の PAC (bacterial PAC: bPAC) を用いた。

(注 4) アストロサイト (星状膠細胞)

脳を構成する細胞には、神経細胞以外にグリア細胞と呼ばれる細胞群があり、その中でも最も多くの割合を占める細胞をアストロサイトと呼ぶ。脳の形態維持や、血管から神経細胞への栄養供給を行うほか、近年ではグルタミン酸などの情報伝達物質 (グリア伝達物質) を分泌し、神経細胞間の情報伝達にも積極的に関与していることが報告されている。

(注5) 二光子顕微鏡

蛍光分子が二つの光子に同時に励起されると、励起光波長の半分の波長で励起された時と同じ蛍光を発する性質を利用し、生体透過性の高い赤外線レーザーで励起を行う顕微鏡。従来の光学顕微鏡では観察できなかった、標本の深部を高い解像度で観察することが可能となる。臓器を切片にすることなく生きたままの状態を観察できるため、とりわけ脳内の神経活動のイメージングで用いられる。

8. 添付資料：

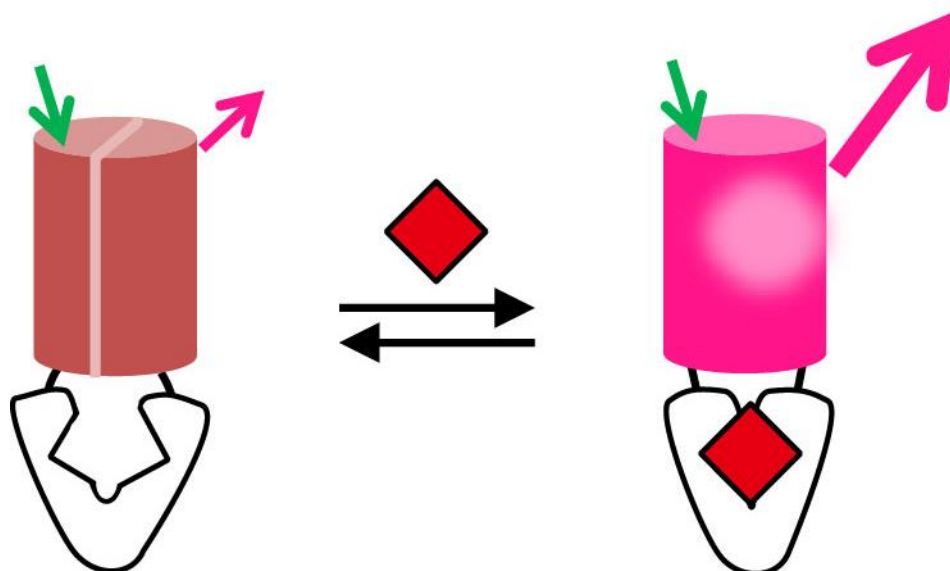


図1 単色輝度変化型蛍光タンパク質センサーの模式図

単色輝度変化型蛍光タンパク質センサーは、分割された蛍光タンパク質の間に標的分子の結合部位が連結された構造をしている。標的分子が結合すると蛍光タンパク質の構造が変化し、蛍光強度が変化する（図では上昇）。

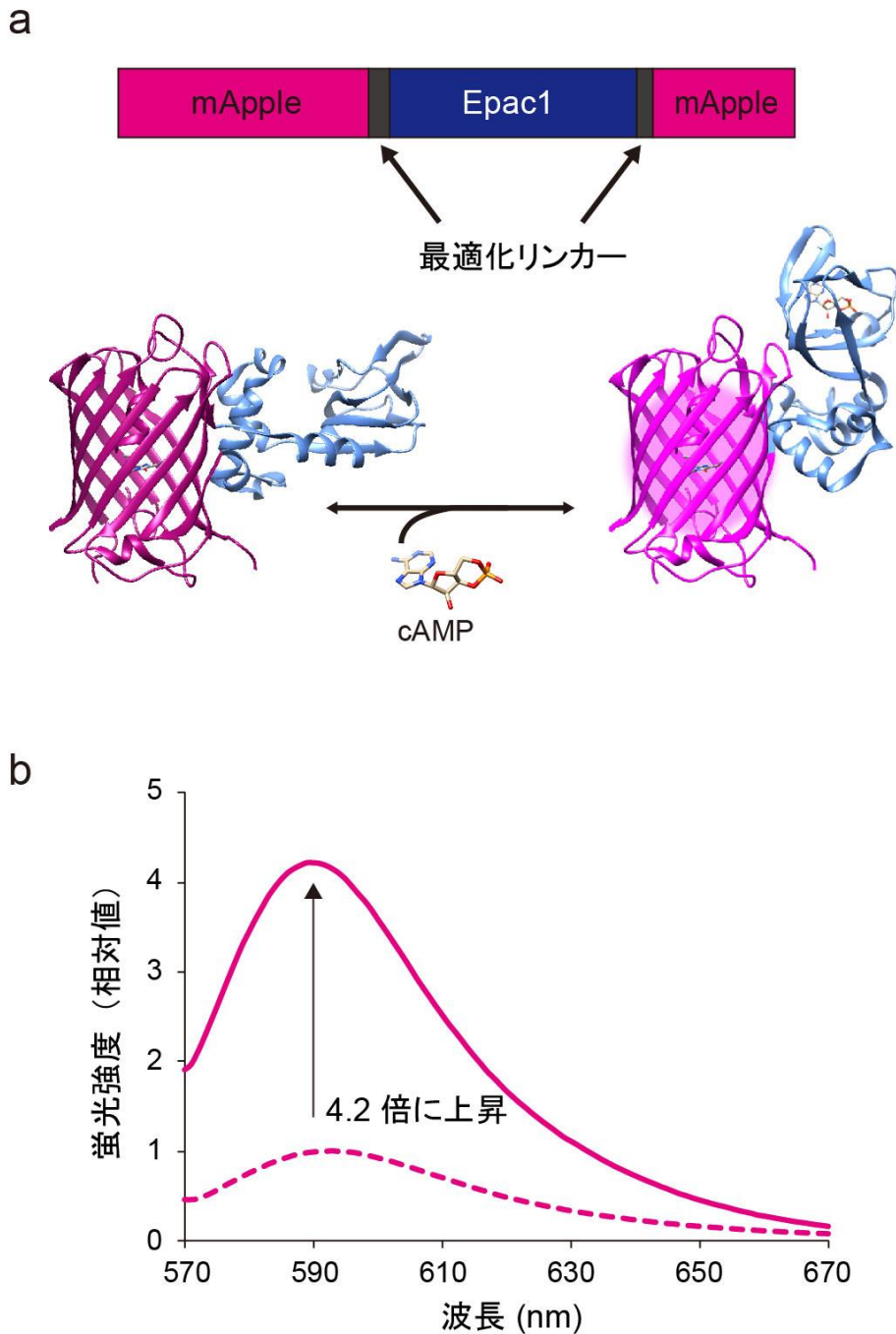


図2 Pink Flamindo の性質

(a) Pink Flamindo のタンパク質配列、および三次元構造の模式図。赤色蛍光タンパク質 mApple を発色団近傍で分割し、Epac1 の cAMP 結合ドメインとリンカーを連結した。cAMP の結合によって Epac1 の構造が変化し、蛍光強度が上昇する。

(b) 試験管内で測定した Pink Flamindo の蛍光スペクトル。cAMP の添加に伴い、蛍光強度が約 4.2 倍に上昇した。

(Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. Harada et al., Scientific Reports, 2017, doi:10.1038/s41598-017-07820-6 より一部改変)

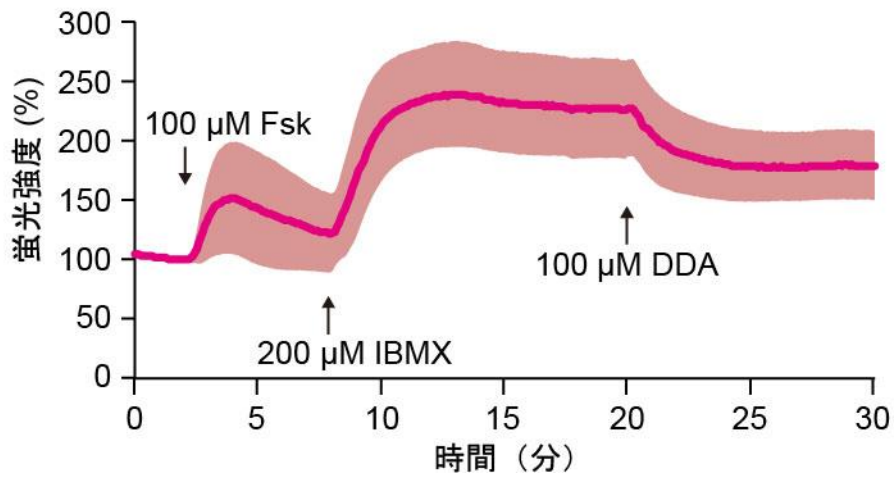
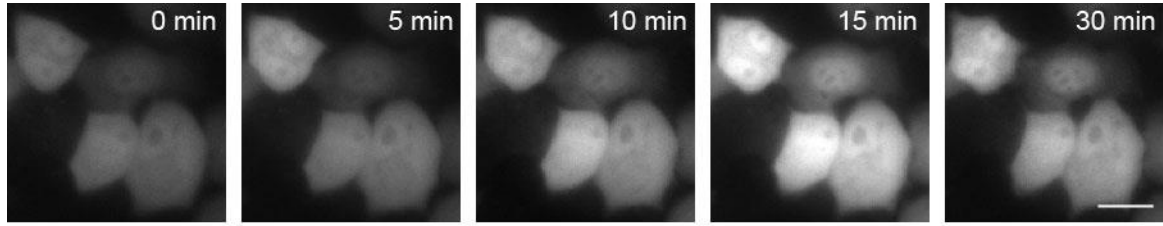


図3 Pink Flamindo を用いた細胞内 cAMP 可視化実験

HeLa 細胞に Pink Flamindo を導入し、cAMP 合成酵素の活性剤（フォルスコリン: Fsk）、cAMP 分解酵素の阻害剤（IBMX）、cAMP 合成酵素の阻害剤（ジデオキシアデノシン: DDA）を順に投与した。Fsk と IBMX の投与によって蛍光強度が上昇し、その後 DDA 投与によって蛍光強度が低下した。

(Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. Harada et al., Scientific Reports, 2017, doi:10.1038/s41598-017-07820-6 より一部改変)

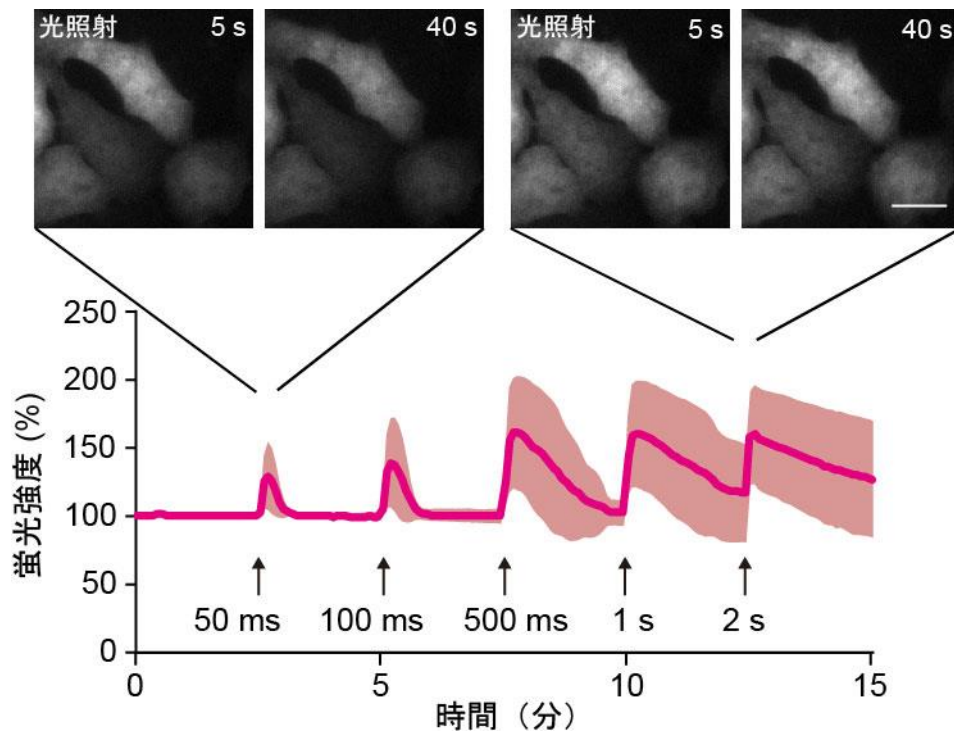


図4 光活性化アデニル酸シクラーゼ刺激時の細胞内 cAMP 変化

HeLa 細胞に光活性化アデニル酸シクラーゼ bPAC と Pink Flamindo を共導入し、2分半ごとに青色レーザー光を 50 ミリ秒、100 ミリ秒、500 ミリ秒、1 秒、2 秒照射した。照射時間が長くなるほど、Pink Flamindo の蛍光強度上昇率、また上昇時間が増大する傾向が見られた。

(Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. Harada et al., Scientific Reports, 2017, doi:10.1038/s41598-017-07820-6 より一部改変)

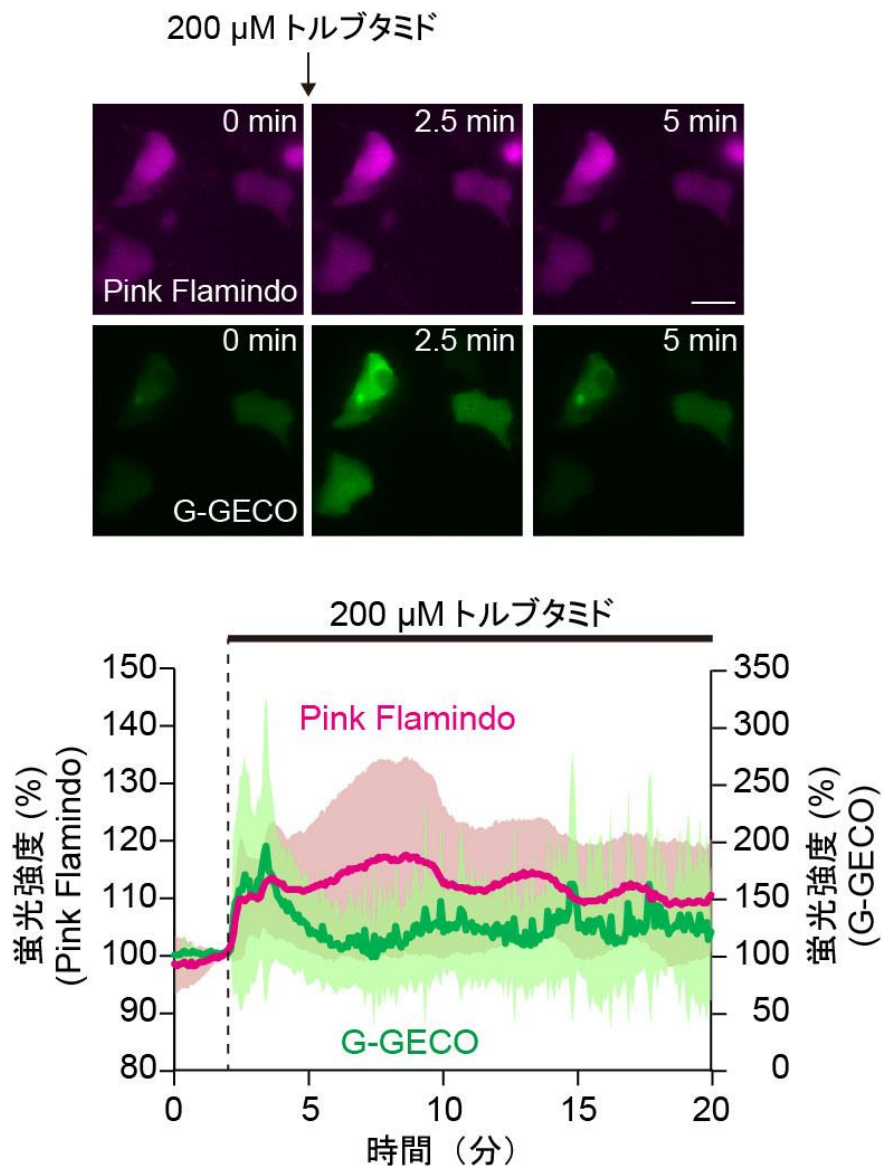


図5 細胞内 cAMP と Ca^{2+} の 2 色同時イメージング

MIN6 m9 細胞に Pink Flamindo と緑色カルシウムセンサー G-GECO を導入し、トルブタミドを投与したところ、Pink Flamindo と G-GECO の両方で蛍光強度が上昇した。

(Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. Harada et al., Scientific Reports, 2017, doi:10.1038/s41598-017-07820-6 より一部改変)

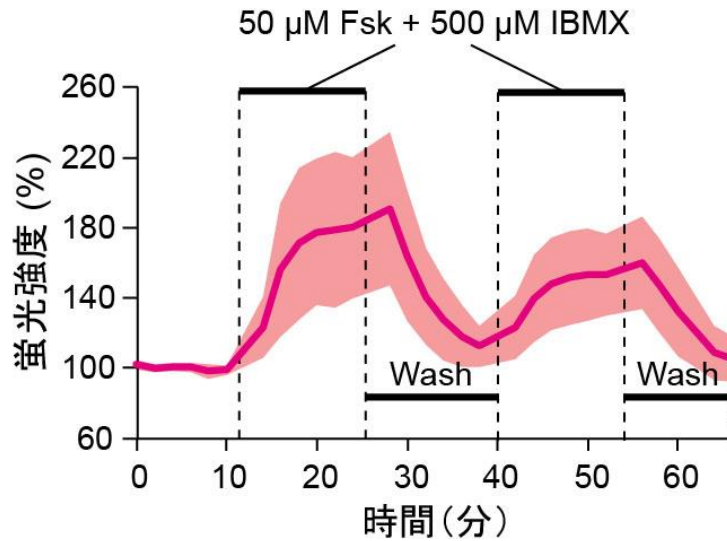
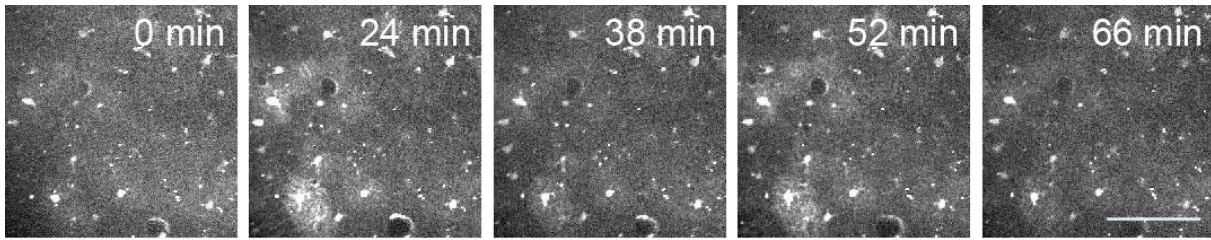


図6 マウス脳アストロサイトにおける細胞内 cAMP の可視化
 マウス脳のアストロサイトで特異的に Pink Flamindo を発現させ、生きたままの脳を二光子顕微鏡で観察した。フォルスコリンと IBMX の投与により、アストロサイトでの Pink Flamindo の蛍光強度が上昇し、また投与した薬剤を取り除くことで可逆的に低下した。

(Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and *in vivo* imaging. Harada et al., Scientific Reports, 2017, doi:10.1038/s41598-017-07820-6 より一部改変)