

論文内容の要旨

論文題目 Fluorescent Indicators for Visualizing Cyclic GMP and Protein Phosphorylation in Living Cells

(サイクリック GMP 及び蛋白質リン酸化に基づく細胞内情報伝達を可視化する蛍光プローブ分子)

氏名 佐藤 守俊

[目的] ホルモン・神経伝達物質などの情報伝達因子は、主に細胞膜上の受容体蛋白質を介して細胞内のイオン・小分子・蛋白質の濃度・化学形・細胞内での局在等の変化を誘起する。この細胞内情報伝達を担う因子の一つに細胞内セカンドメッセンジャーとして知られる Ca^{2+} があるが、1980年代に始まる一連の Ca^{2+} 蛍光プローブの開発は、生きた細胞での Ca^{2+} の挙動観察、つまり Ca^{2+} イメージングを通じて情報伝達機構の理解に大きく貢献した。しかしながら蛍光プローブ分子の開発の例は少なく、セカンドメッセンジャーを含めた多くの細胞内情報伝達過程は依然として十万個以上の細胞をすりつぶして破壊分析されている。従って本研究では、(1) 循環器および中枢神経系における主要なセカンドメッセンジャーの一つであるサイクリック GMP (cGMP)、(2) 蛋白質のリン酸化に基づく情報伝達、について新しい蛍光プローブ分子を開発し、蛍光顕微鏡下の生きた単一細胞でこれら情報伝達過程を可視化検出することを目的とする。

[cGMP の蛍光プローブ] cGMP は一酸化窒素 (NO) やペプチド性ホルモン刺激により、GTP を基質としてグアニル酸シクラーゼ (GC) により合成され、cGMP ホスホジエステラーゼ (PDE) により加水分解される。cGMP の選択的分子認識のため、細胞内での cGMP 結合蛋白質の一つである cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素 $\text{I}\alpha$ (PKG $\text{I}\alpha$) を用いた。PKG $\text{I}\alpha$ は cGMP の結合により大きく構造変化することが明らかになっている。この構造変化を蛍光シグナル変化として抽出するために、オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 (GFP) の変異体で蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の優れたドナー・アクセプター蛍光団であるシアン色蛍光蛋白質 (CFP) および黄色

色蛍光蛋白質 (YFP) を、PKG $\text{I}\alpha$ の N-および C-末端にそれぞれ遺伝子工学的に連結した (図 1a)。この融合蛋白質 CFP-PKG $\text{I}\alpha$ -YFP (CGY) をコードする cDNA を培養細胞に導入し、cGMP の膜透過性のアナログである 8-Br-cGMP で CGY 発現細胞を刺激すると、440 nm でドナーである CFP を励起した際の CFP

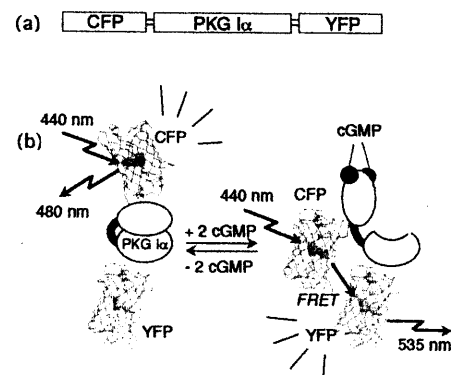


図1 (a) CFP-PKG $\text{I}\alpha$ -YFP (CGY) 融合蛋白質の構造
(b) cGMP の結合による CGY の構造変化を FRET で検出

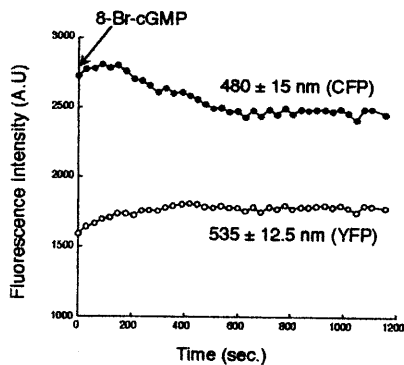


図2 1mM8-Br-cGMP刺激によるCFPとYFPの蛍光変化

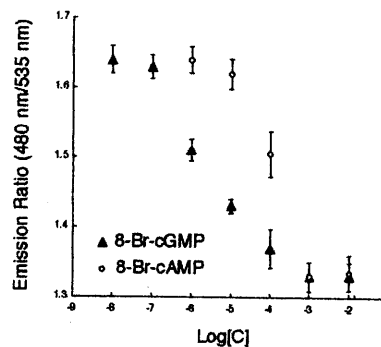


図3 サイクリックヌクレオチド選択性

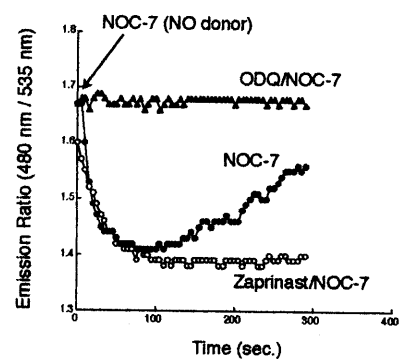


図4 NOに対する応答

の蛍光 (480 nm) が減少し、アクセプターである YFP の蛍光 (535 nm) が増加した (図 2)。このことから図 1b のように cGMP の CGY への結合により、CFP から YFP への FRET が増加することが分かった。また CFP/YFP 蛍光強度比の 8-Br-cGMP および 8-Br-cAMP 濃度依存性を図 3 に示すが、CGY は cGMP に対して cAMP の二桁近い選択性を有した cGMP 蛍光プローブ分子であり、かつ生理的な cAMP 濃度は CGY の応答を妨害しないことが分かった。次に、生理的アゴニストである一酸化窒素 (NO) でヒト胎児腎細胞株 (HEK293) を刺激し、細胞内の cGMP イメージングを行った。NO を自発的に発生させる NO ドナーとして NOC-7 を加えると、図 4 のように CFP/YFP 蛍光強度比は急激に減少した後、回復を始めた。しかし cGMP ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害剤である zaprinast 存在下で NO 刺激すると、この蛍光強度比の回復が観察されず、グアニル酸シクラーゼ (GC) 阻害剤である ODQ 存在下では NO 刺激による蛍光強度比の有意な変化は観察されなかった。このことから CGY は NO 刺激による cGMP 産生、および PDE による cGMP 分解に可逆的に応答することが分かった。また NO 濃度依存性を評価すると、NO 濃度変化に対して cGMP の濃度は必ずしもパラレルには変化せず、100 nM NOC-7 で刺激した際には細胞内の cGMP 濃度振動が起こることが見いだされた。この生理的な NO 濃度下での cGMP 濃度振動の生理的意義は現在研究中である。本研究での cGMP 蛍光プローブ分子は、細胞内での cGMP 情報伝達の新たな発見・検証のみならず、生体内の cGMP 濃度を制御する医薬品の高速度スクリーニングにも貢献すると期待される。

[蛋白質リン酸化の蛍光プローブ: Synthetic approach] 蛋白質を構成するチロシン・セリン・トレオニン残基のリン酸化は主要な細胞内情報伝達メカニズムの一つであり、細胞増殖・糖代謝など生体内の膨大な細胞機能発現のキーステップである。Synthetic approach の一例として、インスリン受容体による蛋白質リン酸化を蛍光顕微鏡下の生きた細胞で可視化検出するために、図 5 のような蛍光プローブ分子を設計した。インスリン受容体の細胞内基質蛋白質 IRS-1 のチロシン-リン酸化部位の一つからなる 12 残基の合成リン酸化ペプチド pY939 と、このリン酸化部位を認識し結合する PI3-kinase の SH2 ドメインを含む SH2N 蛋白質を、それぞれテトラメチルローダミン (T) とフルオレセイン (F) で蛍光標識した (T-pY939,

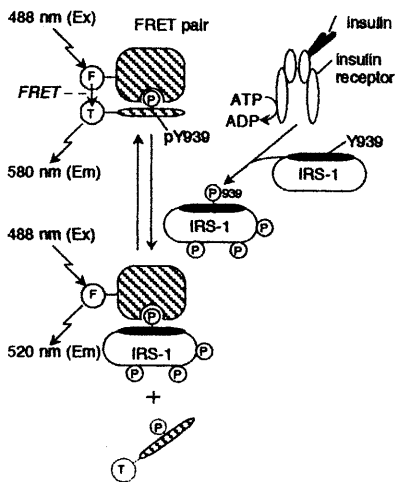


図5 インスリン受容体によるリン酸化を検出するFRET pairの原理

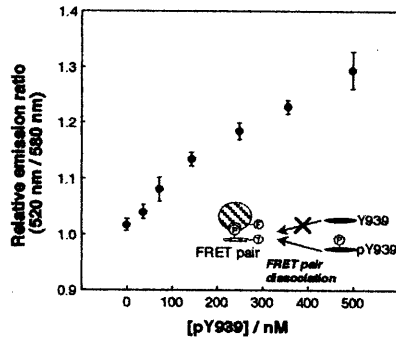


図6 pY939濃度依存的なFRET pairの解離

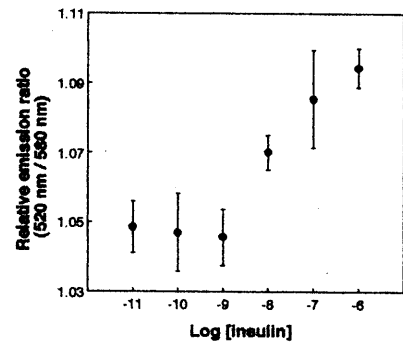


図7 FRET pair応答のインスリン濃度依存性

F-SH2N). F-SH2N-T-pY939 錯体 (FRET pair) 形成によるドナー蛍光団 F とアクセプター蛍光団 T の相互近接により、蛍光団間に FRET が誘起されることを蛍光スペクトル変化から確認した。500 nM の FRET pair に合成リン酸化ペプチド pY939 を加えると、ドナー F の蛍光 (520 nm) とアクセプター T の蛍光 (580 nm) 強度比 (Em520/Em580) が増加し、FRET が解消したことから、リン酸化ペプチド濃度依存的に FRET pair が競争的に解離したことが分かった (図 6)。一方リン酸化していないペプチド Y939 には応答しなかった。さらに培養細胞より抽出・粗精製したインスリン受容体をインスリン刺激したところ、濃度依存的 ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ M) な基質ペプチド Y939 のリン酸化を、この FRET pair を用いて検出できた (図 7)。これにより、FRET pair が細胞内環境により近い protein rich なキナーゼ溶液においても十分機能する蛍光プローブであることが分かった。

[蛋白質リン酸化の蛍光プローブ: Genetic approach] 有機合成した分子でなく、遺伝子工学的にプローブ分子を設計・合成することにより、マイクロインジェクション等の手段に頼る必要なく、生細胞および動物個体に蛍光プローブを発現させ、その中の情報伝達を可視化することができると期待される。図 8 のように Genetic approach に基づいて、蛋白質リン酸化を検出する蛍光プローブ分子 phocus を開発した。

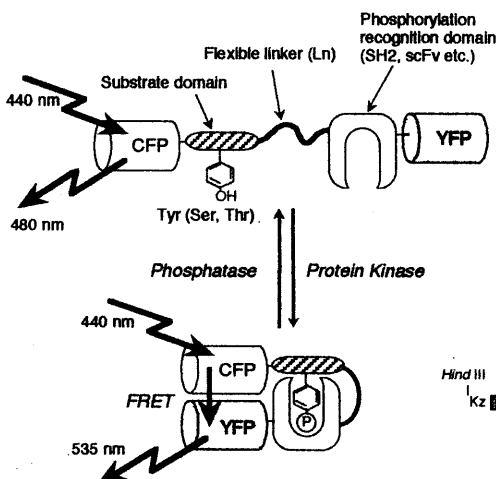


図8 蛋白質リン酸化を検出する蛍光プローブ分子の原理

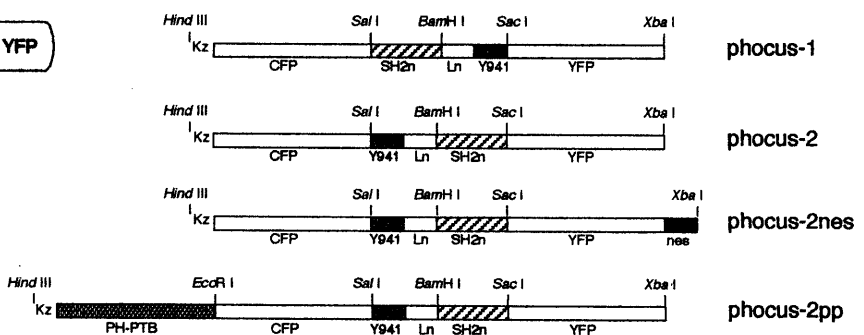


図9 インスリン受容体によるリン酸化を検出するphocusの構造

Phocus は基質ドメインとして IRS のリン酸化配列 (Y941), リン酸化認識ドメインとして PI3-キナーゼの SH2 ドメイン (SH2n) を含み, インスリン受容体が phocus 内のチロシン残基をリン酸化すると隣の SH2 ドメインがここに結合して phocus に大きな構造変化が起こる. この構造変化を N-および C-末端に連結した CFP と YFP 間の FRET を指標に検出する. 図 9 に今回設計・解析した phocus を示す. まず phocus の基質としての能力を評価するために, 培養細胞に phocus をコードする cDNA を導入して蛋白質発現を行わせた後に 100 nM インスリンで 20 分間細胞を刺激し, 抗-リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロッティングを行った. 図 10a に示すように phocus-2 は細胞内で効率よくリン酸化されるのに対して, phocus-1 はほとんどリン酸化されないことが分かった. これはリン酸化配列と SH2 ドメインの並べ方の違いで蛍光プローブとインスリン受容体との相互作用に差があることを意味する. 蛍光顕微鏡下でイメージングを行ったところ, phocus-2 は細胞質と核に存在し (図 10b), 細胞質の CFP/YFP 蛍光強度比は 100 nM インスリン刺激により大きく減少した (図 11). 以上のことから, phocus-2 はインスリン受容体の優れた基質であり, インスリン受容体によるリン酸化に応答して CFP から YFP への FRET が増加することが分かった. また図 11 に示すように核に存在する phocus-2 はリン酸化されず, 蛍光プレートリーダー等での多細胞同時解析では蛍光強度比変化の感度低下の原因となることが予想された. これに対して phocus-2 の C-末端に 10 アミノ酸程度の核排出シグナル (nes) を連結した phocus-2nes は核には入っていかず (図 10b), phocus-2 と同様にインスリン刺激によって効率よく蛍光強度比変化することが分かった (図 12). また, IRS 蛋白質の N-末端に存在する PH-PTB ドメインは, 細胞内でのインスリン受容体と IRS の選択的相互作用に重要であることが知られているが, phocus-2 の N-末端にこの PH-PTB ドメインを連結した phocus-2pp は, 図 11 に示すように phocus-2 に比べてリン酸化される速度が速くなることが分かった. 本研究では phocus のリン酸化認識ドメインとしてインスリン情報伝達蛋白質の SH2n を用いたが, その他の細胞内に数多く存在するリン酸化認識ドメイン, あるいは抗体の可変領域 (scFv) を用いることにより, 蛋白質リン酸化に基づく情報伝達一般に適用可能な方法論として期待される.

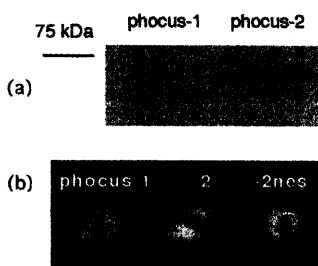


図10 (a)抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロッティング(b)蛍光プローブ発現細胞の蛍光イメージ

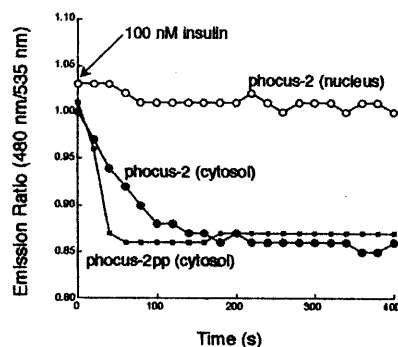


図11 100nMインスリン刺激によるCFP/YFP蛍光強度比変化

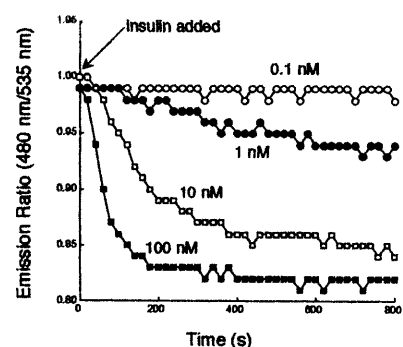


図12 phocus-2nes応答のインスリン濃度依存性