

論文内容の要旨

論文題目: **Imaging the nanomolar range of nitric oxide
with a genetically encoded fluorescent indicator in living cells**

(遺伝子コード型蛍光プローブによる生細胞内での
ナノモル濃度領域の一酸化窒素の可視化検出)

氏名 比田 直輝

【序】 一酸化窒素 (NO) はフリーラジカルの二原子分子であり、ホルモンや神経伝達物質などの外部刺激によって誘起される生体分子である。NO は血管循環器系をはじめ、脳、神経系における記憶の素過程から免疫系における生体防御までの様々な生理、病理条件下で重要な働きを担っている。生体内の NO は、血管内皮型(eNOS)、神経型(nNOS)、そして誘導型 NO 合成酵素(iNOS)によって産生される。血管は主に血管内皮細胞と平滑筋細胞の2層によって構成されている。血管内皮細胞では、ホルモン、血流等の外部刺激により eNOS によって NO が産生され血管を弛緩し血流を制御している。血管内皮細胞を取り除いた血管に nM 濃度の NO を添加するとその血管の弛緩がおこるため、nM 濃度の NO が実際に血管の弛緩を誘導すると考えられている。しかしながら、この nM 程度の生理的濃度の NO 動態を観察できる手法は未だ開発されていない。細胞内 NO を検出する手法として、ジアミノフルオレセイン (DAF) をはじめとする有機蛍光プローブが開発されている。しかしこれらの検出法は、細胞内でそのような nM 濃度 NO が検出可能な感度に至っておらず、可逆性もないので生理的な NO 動態を観察できない。そこで本研究では、こうした従来法の限界を克服するため、NO の結合タンパク質である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) の酵素活性による増幅能を利用した NO の超高感度蛍光プローブを開発し、単一細胞内での nM 領域の NO の動態を可視化検出することを目的とする。(本論文 第1章)

【NOA-1 の設計】 sGC は α サブユニット (sGC α) と β サブユニット (sGC β) のヘテロ二量体で構成された cGMP の産生酵素である。sGC β の N 末端に存在するヘムに NO が可

逆的に結合する. NO の結合により sGC の活性が 400 倍に上がり GTP から cGMP への変換を繰り返し行う. NO 蛍光プローブを開発するに当たり, 二つのキメラタンパク質を設計した (Fig.1). sGC α と sGC β の C 末端にそれぞれ cGMP 蛍光プローブ CGY を遺伝子工学的に連結した. CGY とは, cGMP の結合タンパク質である PKGI α の N 末端と C 末端にシアン・黄色の蛍光タンパク質 (CFP・YFP) を連結した cGMP 蛍光プローブであり, 申請者が修士研究において共同開発した. cGMP の結合により CGY の構造変化が誘起され, それに伴う CFP と YFP 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を cGMP の評価としている.

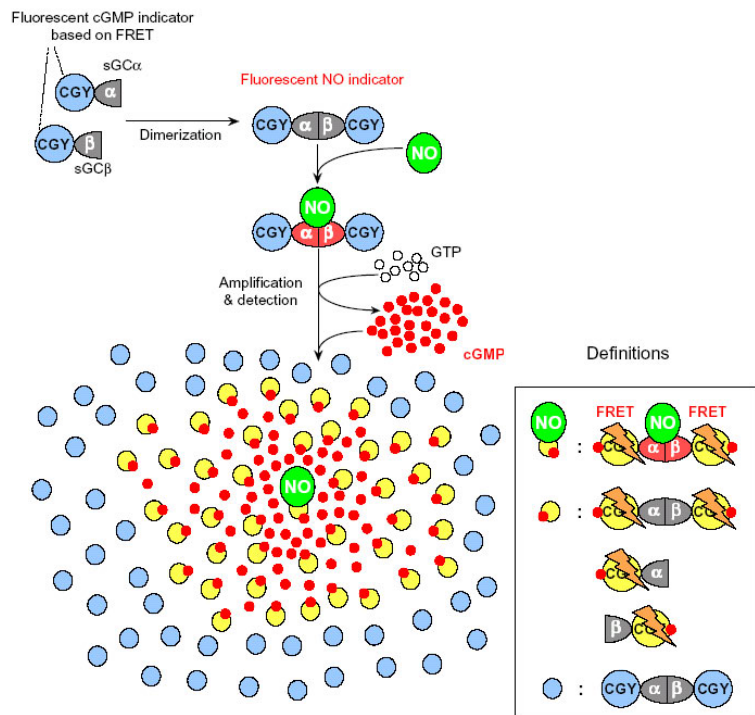


Fig.1 NOA-1 とそれを構成する sGC α , sGC β , sGC α -CGY, sGC β -CGY の構造、及び NOA-1 の NO 検出原理

【検出原理】 sGC α -CGY と sGC β -CGY のヘテロ二量体は, NO と結合することで 3000-6000 分子/min の cGMP を産生する. この産生した cGMP は, CGY 領域と結合し FRET を誘起する. また, NO と結合していないヘテロ二量体や余剰の sGC α -CGY, または sGC β -CGY 単量体もまた, cGMP によって FRET を誘起し, 蛍光シグナルを増強する(Fig.1). この sGC α -CGY と sGC β -CGY のヘテロ二量体が, 増幅検知型の NO 蛍光プローブであり, NOA-1 (a fluorescent indicator for NO with a signal amplifier) と名付けた.

【NOA-1 の検証】 NOA-1 の NO に対する応答を調べるため, eNOS が発現していない細胞 (CHO-K1) に NOA-1 遺伝子 (sGC α -CGY と sGC β -CGY) を導入した. NO の供与体である 5 nM NOC-7 で刺激したところ, CFP/YFP 蛍光強度比が速やかに減少し 300 秒以内に元の蛍光強度比に上

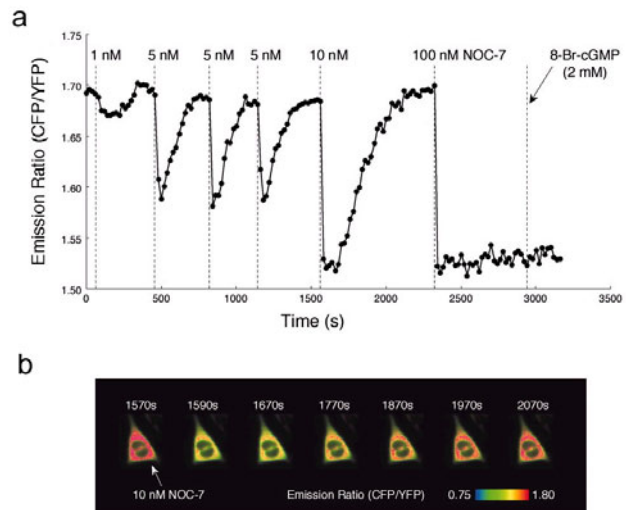


Fig.2 (a) 様々な濃度の NOC-7 に対する NOA-1 の可逆的な応答 (b) 10 nM NOC-7 刺激に対する NOA-1 の蛍光強度比変化の擬似カラーイメージ

昇した。一方, sGC α -CGY, sGC β -CGY をそれぞれ単独に発現させた場合は NO に対する応答は示さなかった。このことは細胞内で sGC α -CGY と sGC β -CGY が二量体化して本プローブ NOA-1 を形成し, NO と結合して産生した cGMP を検出していることを示している。NO の濃度を変えて刺激を行ったところ, nM の NO 濃度に依存した応答が得られた(Fig.2a)。既存の有機蛍光プローブと比較すると, NOA-1 は細胞内でそれらの 10000 倍程度の感度で NO を検出できることがわかった。NOA-1 の可逆性についても検証した(Fig.2a)。

【血管内皮細胞での NO 測定】 血管内皮細胞に NOA-1 を発現させ, 生理刺激による NO の産生の観察を行った。血管を拡張するホルモンのブラジキニン (1 nM) で細胞を刺激したところ, 一過性の NO 産生が観察された。血管中では血流により細胞の接線方向にかかる物理的な力 (shear stress) によっても NO が産生される。この shear stress 依存的な NO 産生も検出できた。この結果は, NOA-1 が生理的な NO 産生を検出できることを示している。興味深いことに血管細胞に NOA-1 を発現させると, その CFP/YFP 蛍光強度比は, NOS が発現していない CHO-K1 細胞に発現させた場合と比較して有意に低く, 血管細胞内に定常的に NO が産生していることをうかがわせた (Fig.3a)。そこで NOA-1 を発現させた血管内皮細胞の NOS 活性を NOS 阻害剤 L-NAME で阻害したところ, 低く示された蛍光強度比が CHO-K1 の蛍光強度比までに上昇した(Fig.3b)。これは, 血管内皮細胞に NO が定常的に産生されていることを示している。この NO 濃度を定量すべく,

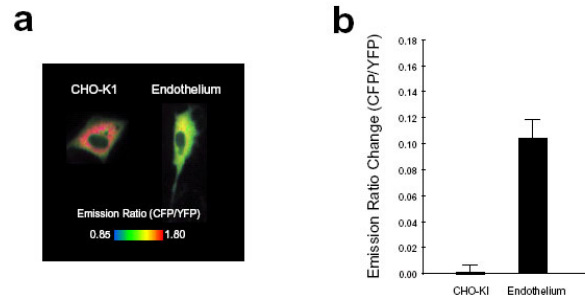


Fig.3 (a) CHO-K1 細胞と血管内皮細胞における NOA-1 の蛍光強度比の擬似カラー画像 **(b)** L-NAME 処理による NOA-1 の蛍光強度比の変化

L-NAME で eNOS の活性を阻害して細胞内 NO を完全に除去し, NO ガスを溶解して作製した様々な濃度の NO 溶液をその細胞に次々に添加し較正 (*in situ calibration*) を行ったところ, 血管内皮細胞に 1 nM NO が定常的に産生していることを見出した(Fig.4)。 (本論文 第 2 章)

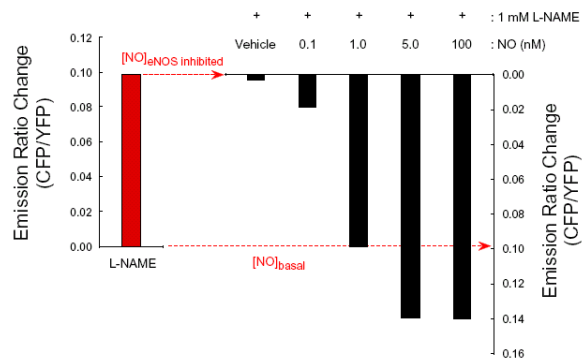


Fig.4 NOA-1 による血管内皮 NO の濃度測定

【血管内皮に持続的に低濃度 NO を産生させるメカニズムの解明】 本論文第 3 章では, 血管内皮細胞由来の持続的な低濃度 NO (1 nM) がどのようなメカニズムで産生されているのかを調べた結果を述べている。生体から切り出した血管に sGC の阻害剤や NOS 阻害剤を加えると血管が更に収縮を起こすことから, 血管内皮細胞では低濃度 NO が持続的に産生し

ていると考えられている。この NO が欠如すると高血圧や動脈硬化等の病気の原因になると考えられている。しかしながら、その NO 濃度と NO 産生メカニズムは未知であった。この NO の濃度は本論文第 2 章で 1 nM であることを明らかにした。細胞内シグナル伝達を担う分子群をそれぞれ阻害する種々の化合物のうち、PI(3)K の特異的阻害剤 LY294,002 を血管内皮細胞に添加したところ、細胞内 NO 濃度が減衰する様子が NOA-1 を用いて観察された。この LY294,002 による NO 濃度の減衰は NOS の阻害剤 L-NAME を添加した時と同程度であった。これは、血管内皮細胞内の低濃度 NO は PI(3)K の活性化を介していることを示している。またこの PI(3)K により制御され、eNOS をリン酸化するキナーゼの Akt の寄与について調べるため、Akt の優性阻害 (dominant negative) 体を血管内皮細胞に過剰発現させ、内在性の Akt の活性を阻害した。すると細胞内の NO 濃度が下がった。また、Akt の常時活性 (constitutive active) 体を過剰発現させると細胞内の NO 濃度の上昇が確認された。eNOS をリン酸化するキナーゼとして Akt 以外に PKA や PKC, CaMKII などが報告されているが、血管内皮への LY294,002 の添加や Akt の優性阻害体の発現による eNOS の活性阻害効果は L-NAME 添加による eNOS 活性阻害の結果と比較してほぼ同程度であることから、PI(3)K-Akt 以外の経路での NO 産生の寄与が小さいことは明らかである。したがって本論文第 3 章では、血管内皮細胞の 1 nM NO の産生は PI(3)K-Akt シグナル伝達経路が主要な役割を果たしていることを明らかにした。また、寄与が小さいながらも PKA, PKC, CaMKII などの低濃度 NO 産生への寄与を明らかにすることにより PI(3)K-Akt シグナル伝達経路を主とした血管内皮細胞における低濃度 NO 産生メカニズムの全容の解明が期待できる。

(本論文 第 3 章)

【結論】 増幅検知型の蛍光プローブ NOA-1 を開発し、細胞内の nM 領域の NO 動態を可視化することに成功した。また血管内皮細胞において、1 nM の NO が定常的に産生していること及びそのメカニズムを明らかにした。1 nM の NO は血管を弛緩するのに十分であり、この本研究の成果は血管の制御における低濃度 NO の重要性に定量的な基盤を与えた。NOA-1 は、その感度と可逆性において、既存の有機蛍光プローブをはるかに凌駕し、血管内皮細胞のみならず神経細胞など NO シグナル伝達が重要な役割を果たす細胞内の NO 動態を理解する強力なツールとなると期待できる。