

## 論文内容の要旨

Cell-Based Indicator to Visualize Picomolar Dynamics of Nitric Oxide Release from Living Cells

(細胞から放出されるピコモル濃度領域の一酸化窒素の動態を可視化するセンサー細胞)

中嶋 隆浩

【序】 一酸化窒素 (NO) は、低分子量の電気的中性なフリーラジカルであり、生体内において重要な役割を担っている。NO は生体内において、NO 産生細胞内で、NO 合成酵素によってアルギニンから生成される。生成された NO は、細胞膜を透過し、細胞外へと拡散、放出され、近傍の標的細胞に作用を示す。このように NO は、拡散性の細胞間情報伝達物質として働いている。従って、産生細胞から放出された NO の時空間的な動態を分析することは、NO の生体内での働きを理解するために重要である。生体分子の時空間分析において、蛍光プローブ分子を用いた蛍光顕微鏡による可視化分析が広く行われている。NO を可視化する蛍光プローブ分子は、有機蛍光分子型のものが既に開発されており、広く用いられている。また当研究室は近年、NO の受容体蛋白質である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) と蛍光蛋白質との融合蛋白質プローブ分子 (NOA) を開発し、サブナノモル濃度の NO の可視化検出に成功している (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 14515-14520, 2005)。しかし、これらのプローブ分子は細胞内に導入し、その細胞内の NO を可視化するものであり、細胞外へ放出された NO を分析することは出来ない。本研究では、NO 産生細胞から放出された NO を超高感度に可視化するセンサーを構築し、それを用いて、NO 産生細胞である血管内皮細胞や神経細胞からの NO 放出の動態を分析することを目的とした。

【NO センサー細胞 “Piccell” の構築】 sGC は、GTP からサイクリック GMP (cGMP) を生成する酵素である。生体内において、NO 産生細胞から放出された NO は、標的細胞内の sGC へ結合する。NO との結合により sGC の酵素活性は増大し、標的細胞内で大量の cGMP を生成する。従って NO 標的細胞は、

NO 認識能と cGMP へのシグナル増幅/変換能を持っていると言える。この細胞に、cGMP を光シグナルへと変換する機能を付与することにより、NO のセンサー (NO センサー細胞) を構築出来ると考えた (図 1)。このセンサー細胞を NO 産生細胞の近傍に置くことによって、放出された NO を可視化検出することが出来る。また、cGMP を介するシグナル増幅能によって、NO の超高感度検出が期待出来る。sGC を持つ細胞として、ブタ腎臓由来細胞株である PK15 細胞を用い、これに

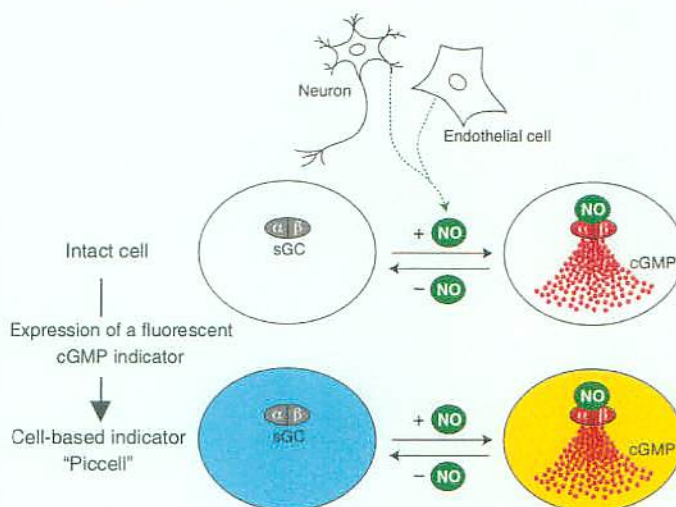


図 1. NO センサー細胞 "Piccell" の概念図。

cGMP を可視化する蛍光プローブ分子 (CGY) を導入した。蛍光蛋白質である CFP および YFP と cGMP 結合蛋白質から成る CGY は、cGMP と結合することにより蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を起こし、CFP の蛍光強度が減少し、YFP の蛍光強度が増加するプローブ分子である。安定的に CGY を発現するクローン細胞を NO センサー細胞として単離し、これを Piccell と名付けた。

**[Piccell の NO 濃度依存性, 選択性, 可逆性, 再現性]** Piccell の NO に対する応答を調べた。Piccell を NO で一過的に刺激すると、生成した cGMP に CGY が反応し FRET を起こす結果、CFP/YFP の蛍光強度比が減少した。この応答は、細胞内に存在する cGMP 分解酵素が、cGMP を分解することによって回復した。最大応答に達するまでの時間 (応答時間) は、 $26 \pm 10$  秒であった。この可逆的応答性の再現性を調べるために、Piccell を繰り返し NO で刺激して応答を観察した。NO はケージド NO を紫外線照射することで、観察領域に一過的に発生させた。その結果、Piccell は連続 10 回の繰り返し刺激に対して、再現良く応答し、その可逆的応答性は全く損なわれないことがわかった (図 2 a, b)。Piccell の応答の NO 濃度依存性を調べたところ、Piccell はピコモル濃度領域の NO を検出する超高感度なセンサーであり、その検出限界は 20 pM であることがわかった (図 3)。Piccell を生体系で応用する際に考えられる妨害物質として、sGC を弱く活性化しうる一酸化炭素 (CO)、細胞内に cGMP を生成しうるナ

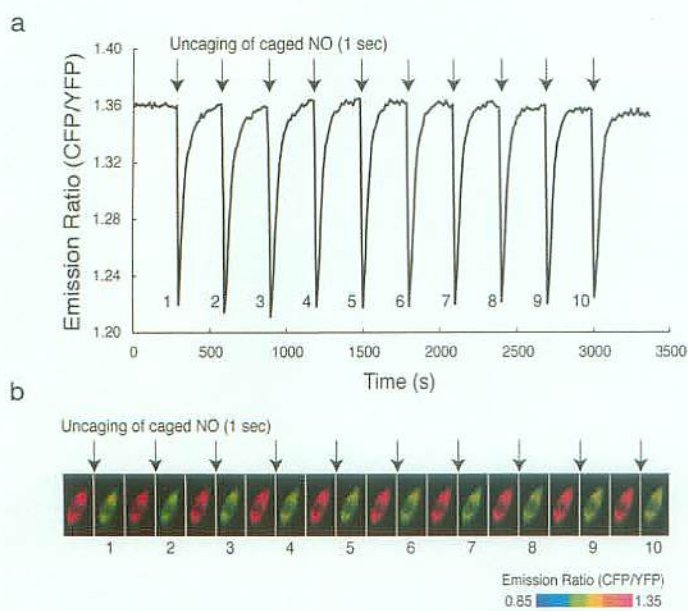


図 2. Piccell の可逆性と再現性。 (a) NO で繰り返し刺激した Piccell の応答。 (b) 刺激前後の Piccell の蛍光強度比の擬似カラー表示。番号 1-10 は (a) に対応。

ド酸 (CO) を生成しうるナ

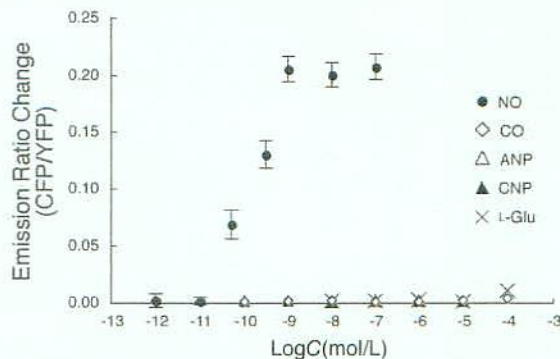


図 3. Piccell の NO 濃度依存性と選択性。

トリウム利尿性ペプチド (ANP, CNP), CGY に弱く結合する cAMP を生成するグルタミン酸 (L-Glu) が挙げられる。Piccell はこれらの妨害物質候補に対し全く応答を示さないことから、NO に対し高い選択性を持つことがわかった (図3)。Piccell は細胞から成るセンサーであり、その空間分解能は細胞の大きさによって決まる。Piccell の直径を測定した結果、空間分解能は  $21 \pm 6 \mu\text{m}$  であることがわかった。

〔海馬神経細胞から放出されたピコモル濃度領域の NO の可視化〕 海馬神経細胞と Piccell を共培養し、Piccell と隣り合った海馬神経細胞からの NO 放出を可視化検出した (図4 a)。その結果、海馬神経細胞は外部から刺激を与えなくとも、自発的かつ周期的に 100 pM の NO を産生していることがわかった (図4b)。この周期的な NO 放出がどのようにして起こっているかを調べるために、以下の実験を行った。

神経細胞は互いにシナプス結合を形成し、自発的に神経伝達を行うことが知られている。海馬神経細胞間の神経伝達は、グルタミン酸を伝達物質として行われている。そこで、グルタミン酸レセプターである NMDA レセプターの阻害剤 (APV) を添加したところ、NO の周期的放出は完全に停止した。また、

神経伝達物質の放出に重要な活動電位の阻害剤である TTX を添加したところ、同様に NO の周期的放出は完全に停止した。これらのことから、海馬神経細胞からの自発的かつ周期的なピコモル濃度領域の NO 放出は、NMDA レセプターを介した自発的な神経伝達によって起こっていることがわかった。NO 産生細胞内に導入して用いる従来の蛍光プローブ分子と違い、Piccell は NO 産生細胞の近傍に置いてその NO 放出を可視化する。従って Piccell と従来の蛍光プローブ分子を併用することで、NO 産生細胞からの NO 放出と NO 産生細胞内でのシグナル伝達過程を同時に可視化することが可能である。NMDA レセプターは  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルであり、グルタミン酸によって活性化するとチャネルが開き細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$ を透過させる。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$ の蛍光プローブ分子を導入した海馬神経細胞と Piccell を共培養することにより、海馬神経細胞からの NO 放出とその細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$

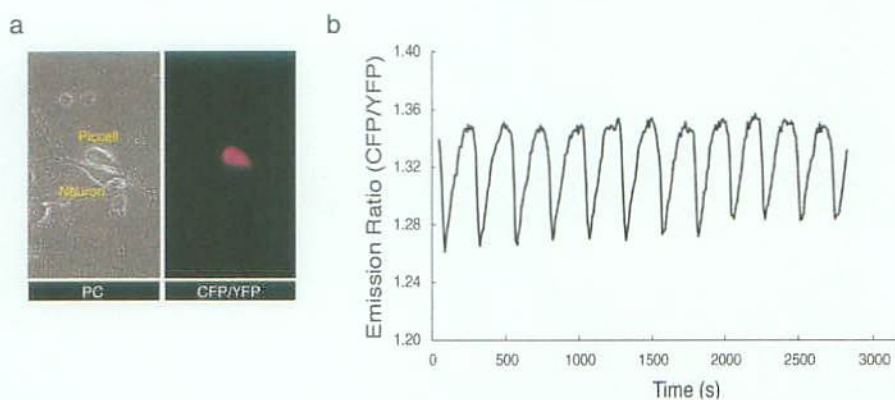


図4. 海馬神経細胞から放出された NO の可視化。(a) Piccell と海馬神経細胞の共培養。PC : 透過光像, CFP/YFP : 蛍光強度比の擬似カラー表示。(b) 無刺激条件下における海馬神経細胞と隣り合った Piccell の応答。

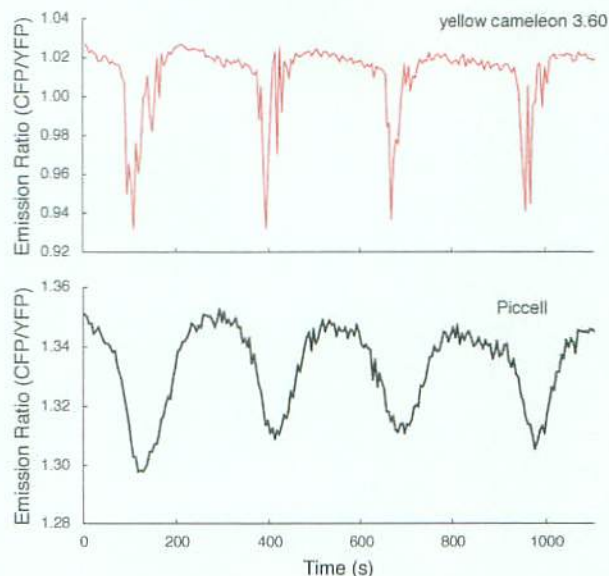


図5. 海馬神経細胞からの NO 放出と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ の同時可視化。(上)  $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光プローブ分子 (yellow cameleon 3.60) を導入した海馬神経細胞の無刺激条件下における応答。(下) その海馬神経細胞と隣り合った Piccell の応答。

濃度変化を同時に可視化検出した。その結果、NO の周期的放出は、細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度の周期的変化と同期しており、各々の NO 放出の持続時間は、連続した  $Ca^{2+}$ 振動の持続時間によって決まっていることがわかった (図 5)。このように Piccell を用いて、生理的条件下における海馬神経細胞からの自発的かつ周期的な NO 放出を初めて見出し、それが  $Ca^{2+}$ 振動によって起こっていることを突き止めることに成功した。

〔血管内皮細胞が放出した NO の拡散範囲の時空間分析〕 Piccell は生きている細胞から成るので、カバーガラス上に単層状に培養することで、容易に CCD チップのような平面検出器を作製することが出来る (Piccell sheet)。この Piccell sheet を用いて、単一血管内皮細胞が放出した NO の拡散範囲の時空間分析を行った。ケージド ATP 存在下で、

血管内皮細胞の上に Piccell sheet を置き、観察領域に紫外線照射することで、一過的に ATP を発生させ血管内皮細胞を刺激した。その結果、血管内皮細胞上の限られた数の Piccell のみが一過的に応答した (図 6 a, b)。血管内皮細胞の直上の Piccell の応答から、100 pM の NO が放出されていることがわかる。また、距離が離れるに従い Piccell の応答は減少し、60  $\mu\text{m}$  離れた Piccell は応答しなかった (図 6 b, c)。このように Piccell sheet を用いることで、NO 産生細胞から放出された NO を多点同時に可視化分析し、NO の拡散範囲の時空間分析を行うことに成功した。

〔結論〕 本研究では、細胞から放出された NO を超高感度に可視化するセンサー

細胞 (Piccell) を開発し、神経細胞や血管内皮細胞から放出された NO の可視化検出を行った。Piccell はピコモル濃度領域の NO を検出することが出来る (検出限界 20 pM)。また、高い選択性、可逆性、再現性を持つ。応答時間は  $26 \pm 10$  秒、空間分解能は  $21 \pm 6 \mu\text{m}$  である。海馬神経細胞と隣り合った Piccell を観察することで、海馬神経細胞が生理的条件下で、自発的かつ周期的に 100 pM の NO を放出していることを明らかにした。また、Piccell と  $Ca^{2+}$ 蛍光プローブ分子による同時分析から、その周期と持続時間は  $Ca^{2+}$ 振動によって決まっていることがわかった。Piccell を単層状に培養した Piccell sheet は、放出された NO を多点同時に可視化分析することが出来る。Piccell sheet を用いて、単一血管内皮細胞から放出された 100 pM の NO が、60  $\mu\text{m}$  拡散することがわかった。動脈硬化などの心血管系疾患は、血管内皮細胞の放出する NO 濃度が減少することにより起こると考えられている。Piccell の超高感度性によって、疾患状態における NO 濃度が、生理濃度 (ナノモル濃度領域) からどれだけ減少しているかを解明することが出来る。

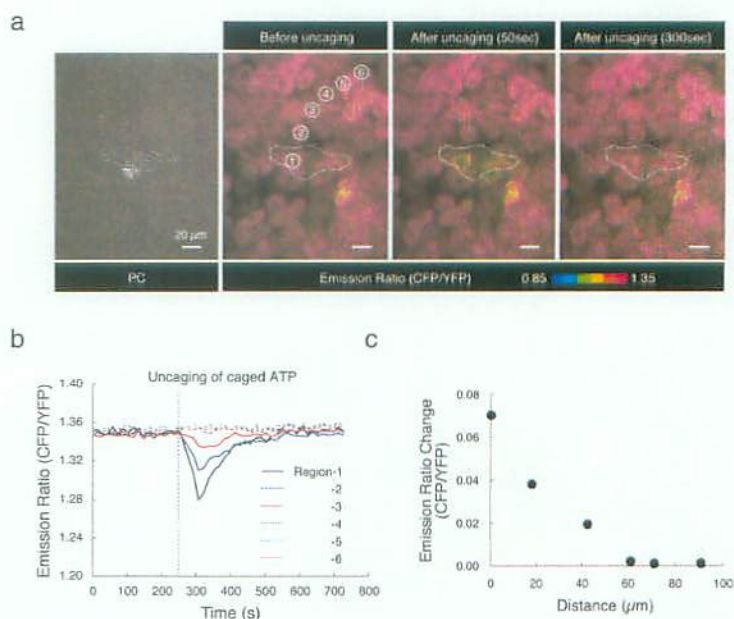


図 6. 血管内皮細胞が放出した NO の拡散範囲の時空間分析。(a) 血管内皮細胞の透過光像 (PC) と ATP 刺激前、50 秒後、300 秒後の Piccell sheet の蛍光強度比の擬似カラー表示。白点線は Piccell sheet 直下の血管内皮細胞の位置。(b) (a) 中の領域 1-6 の Piccell の応答。(c) 領域 1-6 の応答を血管内皮細胞からの距離に対してプロット。