

論文題目 Development of Bioluminescent Indicators to Visualize Production of Cyclic Nucleotides in Single Living Cells

(単一生細胞内におけるサイクリックヌクレオチドの産生を可視化する生物発光プローブの開発)

氏名 長岡靖崇

[序]

ホルモンや神経伝達物質など外部からの刺激によって引き起こされる細胞応答は、細胞内シグナル伝達を介して行われている。環状アデノシンリン酸(cAMP)および環状グアノシンリン酸(cGMP)は、細胞内シグナル伝達物質として一過的に産生される環状ヌクレオチドであり、様々な生理機能に関与している。cAMPは神経伝達物質などの刺激を受けて産生され、細胞の遺伝子発現、嗅覚神経系の情報伝達などで広範に機能している。また、cGMPは細胞外からのホルモンやNOの刺激を受けて細胞内で産生され、血管平滑筋の弛緩による血流の増加、視神経系の情報伝達などを調節している。生体内の環状ヌクレオチドを検出し評価することは、環状ヌクレオチドの担っている多様な生理機能を理解する上で非常に重要である。生きた細胞内の環状ヌクレオチドの動態を可視化する分析手法として、これまでに蛍光タンパク質プローブが開発されている。しかし、蛍光プローブは、その励起光照射が細胞にダメージを与えるために長時間の連続的な観察に適さない。さらに、動物個体や植物個体など、励起光の透過性が低い生物試料や強い自家蛍光を持つ生物試料を対象とする場合、プローブの相対的な検出感度が低くなり、生体分子の可視化が困難であった。

本研究ではこれまでに、二分割した発光タンパク質ルシフェラーゼ断片の近接・再構成によって発光能を回復するルシフェラーゼ再構成法を確立し、細胞内タンパク質間相互作用などを発光シグナルとして検出するタンパク質プローブを開発してきた。ルシフェラーゼによる発光は、非常に低いバックグラウンドノイズのもとで検出可能である。本研究では、単一生細胞内のcAMPおよびcGMPの動態を可視化することを目的として、分割ルシフェラーゼの再構成を応用した発光タンパク質プローブを開発した。さらに、開発したプローブを応用して動物個体内のサイクリックヌクレオチド濃度変化の可視化を行った。

[cAMP プローブの開発]

<cAMP プローブの設計>本研究では、緑色クリックビートルルシフェラーゼ(ELuc)と赤色クリックビートルルシフェラーゼ(CBR)の2種類のルシフェラーゼの分割再構成に基づく、2色発光型のレシオメトリックなcAMP検出プローブを設計した(図1)。ELucのN末側断片(ELuc-N)、cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)のcAMP結合ドメイン、クリックビートルルシフェラーゼC末側断片改変体(McLuc1)、CBRのN末側断片(CBR-N)から成るプローブを細胞内に発現させる。細胞内cAMP濃度が低い時にはプローブ分子内のCBR-NとMcLuc1が近接、再構成し、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンの存在下で赤色の発光が生じる。細胞内cAMP濃度が上昇すると、cAMP結合ドメインにcAMPが結合してドメインの構造変化が起こる。この構造変化によってELuc-NとMcLuc1が近接、再構成し、緑色の発光が生じる。バンドパスフィルターを通して緑色と赤色の発光シグナルをルミノメーターや発光顕微鏡で測定し、その強度比の

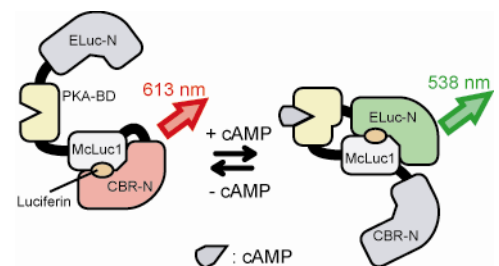


図1. cAMPプローブの原理。ELuc-N: ELucのN末側断片。PKA-BD: PKAのcAMP結合ドメイン。McLuc1: クリックビートルルシフェラーゼのC末側断片改変体。CBR-N: CBRのN末側断片。cAMP非結合状態ではCBR-NとMcLuc1が再構成して赤色の発光を示す。cAMPの結合によってELuc-NとMcLuc1が再構成し、緑色の発光が上昇する。

変化から細胞内の cAMP の濃度変化を知ることができる。

〈cAMP プローブの cAMP 濃度依存性の検証〉プローブタンパク質を発現させた培養細胞を溶解し、この溶解液に cAMP を 10nM から 1mM までの濃度域で添加した。cAMP 濃度に応じた発光強度変化を、525 ± 25nm および 630 ± 30nm

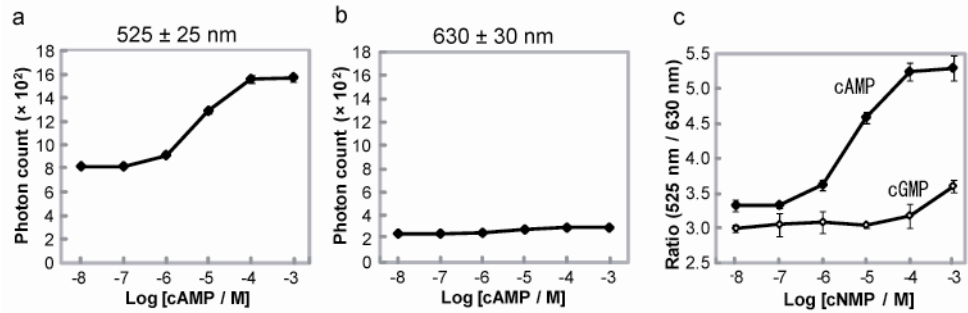


図2. cAMPプローブのcAMP濃度依存性. 525 ± 25nm (a) および 630 ± 30nm (b) のバンドパスフィルターを通して発光測定を行った. (a, b) 緑色 (a) および 赤色 (b) の発光強度の cAMP 濃度依存的変化. (c) 緑色の発光強度の赤色に対するレシオの環状ヌクレオチド濃度依存的変化.

のバンドパスフィルターを通してルミノメーターで測定すると、緑色の発光強度は cAMP 濃度依存的に上昇し、赤色の発光強度は一定のままであった (図 2a, b). 緑色の発光の赤色に対する強度比をとったところ、cAMP 濃度 10nM から 100μM にかけて発光強度比の上昇が見られた (図 2c). cAMP の生体内濃度域は 100nM から 10μM であることが知られている. 開発したプローブは、この濃度域で大きな発光強度比変化を示すことから、生細胞での観察に実用可能であることがわかった. また、このプローブは cGMP に対しては応答しなかったことから、cAMP を cGMP に対して選択的に検出可能であることがわかった.

〈ATP およびルシフェリンの濃度によるプローブの発光強度比への影響の検証〉ルシフェラーゼはコファクターである ATP やルシフェリンの濃度に比例して発光強度が増大するため、ルシフェラーゼを用いたプローブの発光強度は ATP およびルシフェリン濃度の影響を受けるとい問題がある. 本研究で開発した cAMP プローブの発光測定を、cAMP およびルシフェリンの濃度一定の下で、ATP の濃度を変化させて行った. ATP 濃度上昇に伴う緑色および赤色の発光強度の上昇が見られたが、2 色の発光強度の比は一定のままに保たれた (図 3a). また、cAMP および ATP の濃度一定の下でルシフェリンの濃度を変化させたところ、ルシフェリン濃度上昇に伴って発光強度が上昇したが、2 色の発光強度比はほとんど変化しなかった (図 3b). この結果から、開発したプローブの 2 色の発光強度比は ATP およびルシフェリンの濃度の影響を受けないことが示された.

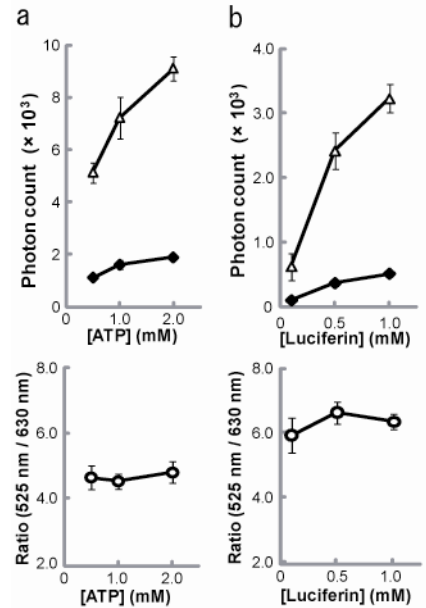


図3. cAMPプローブの発光強度 (上) と 緑色/赤色の発光強度比 (下) に対する、ATP (a) およびルシフェリン (b) の濃度変化の影響. 上図の白三角は緑色の発光強度、黒菱形は赤色の発光強度を示す.

〈プローブを導入した培養細胞における cAMP 変動の検出〉cAMP プローブを発現させた動物培養細胞

HEK293 を HBSS バッファー中に置き、細胞が生きている状態でルミノメーターを用いて経時的に発光測定しながら薬物刺激を与えた. 緑色の発光の赤色に対する強度比の変化を測定したところ、HBSS バッファーのみ、cGMP 産生を促す sodium nitroprusside (SNP) を加えた場合には発光強度比は変化せず、AMP 産生を促す isoproterenol (ISO) で細胞を刺激した場合には発光強度比の急激な上昇と減衰が見られた (図 4). これは、細胞内で産生された cAMP がプローブに結合した結果、ELuc-N と McLuc1 が再構成し、プローブの緑色/赤色の発光強度比が変化したことを示している. 発光強度比の減衰は、刺激によって細胞内で合成された cAMP が内在性のホスホジエステラーゼ (PDE) により分解され、プローブが cAMP 非結合状態に戻ったためと推測される. cAMP 特異的な分解酵素 PDE4 の阻害剤であるロリプラム

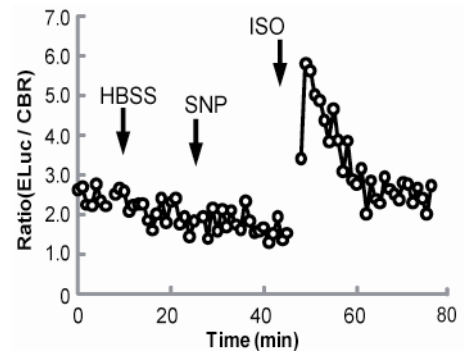


図4. プローブを発現させた培養細胞の薬物刺激に対する応答結果. 縦軸は緑色の発光の赤色に対する強度比を表す.

100nM の存在下で ISO 刺激を行うと、発光強度比はいったん上昇した後、高いままで維持された. これ

は細胞内の cAMP 分解が抑制されていることを反映した結果である。以上の結果から、このプローブを使って生細胞内における cAMP 産生をリアルタイム検出できることを実証した。

次に、二次元観察が可能な発光顕微鏡を用いて、プローブの発光イメージングが可能かどうかを検証した。プローブを発現させた細胞を $536 \pm 10 \text{ nm}$ および $624 \pm 25 \text{ nm}$ のバンドパスフィルターを通して発光顕微鏡で観察しながら、cAMP 産生を促すフォルスコリン $100 \mu\text{M}$ で刺激したところ、刺激後 20 分かけて緑色の発光の赤色に対する強度比が上昇する様子が個々の細胞で観察された。本結果から、本研究で開発した cAMP プローブを用いて、単一生細胞内の cAMP 産生を緑色/赤色の発光強度比の変化として時空間的にイメージング解析可能であることを示した。

〈マウス個体の発光イメージング〉マウス個体を用いて、cAMP 発光プローブが動物個体内で産生された cAMP 検出に応用可能かどうかを検証した。マウスの背部に cAMP プローブを発現させた培養細胞を皮下移植したのち、腹腔に ISO 20mM 150 μL を注射してマウス体内の cAMP 産生を促した。ISO 刺激前後のマウスの発光イメージングを行ったところ、ISO 刺激後に cAMP プローブの緑色の発光強度が上昇したが、赤色の発光強度は一定のままだった(図 5)。緑色の発光の赤色に対する強度比は刺激前後で約 2 倍に上昇した。これは ISO 刺激によるマウス体内の cAMP 産生を緑色/赤色の発光強度比変化として検出したことを示す。本結果から、この cAMP 発光プローブは生きた動物個体の低侵襲的なイメージングに応用可能であることを実証した。

〈結論〉ピーク波長の異なる 2 種類の分割ルシフェラーゼの単一分子内再構成に基づいて、生細胞内の cAMP 産生を 2 色の発光の強度比変化として検出するプローブを開発した。このプローブが生体内の cAMP 濃度域で cAMP に濃度依存的に応答することを実証した。また、緑色/赤色の発光強度比が ATP やルシフェリンの濃度に影響を受けないことを実証した。このプローブを用いて、単一生細胞レベルおよび動物個体レベルでの生体内 cAMP 産生を非破壊的、低侵襲的に検出することに成功した。

〔cGMP 検出プローブの開発〕

〈cGMP プローブの設計〉生細胞内の cGMP 検出プローブとして、cGMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) の cGMP 結合ドメインを、ホタルルシフェラーゼの N 末側断片 (FLuc-N) と C 末側断片 (FLuc-C) で挟み込んだ単分子型の融合タンパク質をデザインした(図 6)。細胞内 cGMP 濃度が低い時にはプローブ分子内の FLuc-N と FLuc-C は離れた状態にあり、ルシフェラーゼ活性は生じない。細胞内 cGMP 濃度が上昇すると、PDE5 ドメインに cGMP が結合してドメインの構造変化が起こる。この構造変化によって PDE5 ドメインの N 末端側と C 末端側に存在するルシフェラーゼ断片が近接し、ルシフェラーゼの構造が再構成される。これにより、ルシフェラーゼの酵素活性が回復し、ルシフェリンの存在下で発光する。この発光シグナルをルミノメーターや発光顕微鏡で測定することにより、細胞内の cGMP の濃度変化を知ることができる。

〈cGMP プローブの cGMP 濃度依存性の検証〉cGMP プローブタンパク質を大腸菌に発現させたのち単離精製した。このプローブに、ルシフェリンの存在下で cGMP を 1nM から 1mM までの濃度域で添加し、cGMP 濃度に応じた発光強度変化をルミノメーターを用いて測定した(図 7)。開発した cGMP プローブは、cGMP の生体内濃度域である 10nM から 10 μM にかけて大きな発光強度変化を示した。この

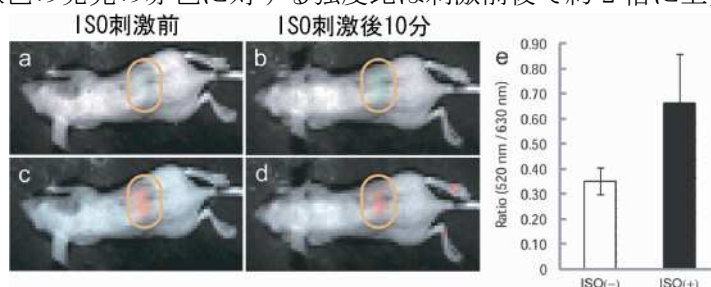


図5. 生きたマウスの体内で産生されたcAMPの発光検出。525 \pm 25nm (a, b) および630 \pm 37.5nmのフィルターを通してISO刺激前後のマウスを撮影した。(e) ISO刺激前後の、緑色の発光の赤色に対する強度比の変化。

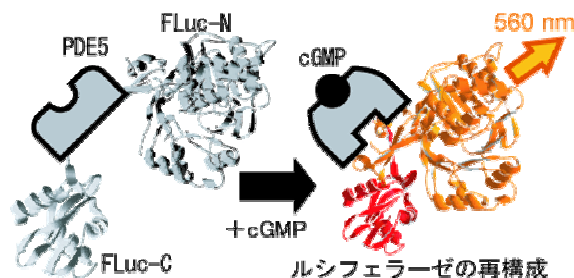


図6. cGMPプローブの原理。FLuc-N:ホタルルシフェラーゼのN末側断片。FLuc-C:ホタルルシフェラーゼのC末側断片。PDE5:ホスホジエステラーゼのcGMP結合ドメイン。PDE5にcGMPが結合するとルシフェラーゼが再構成し、発光能が回復する。

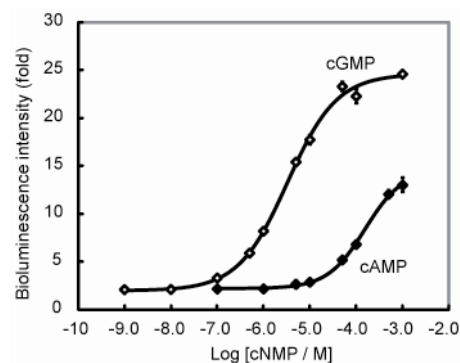


図7. cGMPプローブのcGMPおよびcAMPに対する濃度依存的な発光強度変化。

結果から、このプローブは生細胞内の cGMP 検出に実用可能であることがわかった。cAMP に対しては生体内濃度域では応答せず、cGMP 選択性が高いことがわかった。

〈プローブを導入した培養細胞における cGMP 変動の検出〉動物培養細胞 HEK293 に cGMP 発光プローブを発現させ、細胞が生きた状態でルミノメーターを用いて経時的に発光測定しながら薬物刺激を与える実験を行った。20 分おきに SNP で刺激し、細胞内に一過的に cGMP を産生させると、刺激ごとに発光シグナルが上昇した(図 8)。これは、細胞内で産生された cGMP がプローブに結合した結果、発光検出されたことを示している。一時的に発光上昇した後の発光減衰は、刺激によって細胞内で合成された cGMP が内在性のホスホジエステラーゼにより分解され、プローブが cGMP 非結合状態に戻ったためと推測される。繰り返し刺激によって発光上昇することから、このプローブは可逆的に働くことがわかった。また、cAMP 産生を促す ISO で細胞を刺激した場合には発光は上昇しなかった。これは、プローブが細胞内の cAMP の濃度変化には応答しないことを示している。以上の結果から、プローブは生細胞内における cGMP レベルの変動を選択的かつ可逆的に検出できることが明らかとなった。

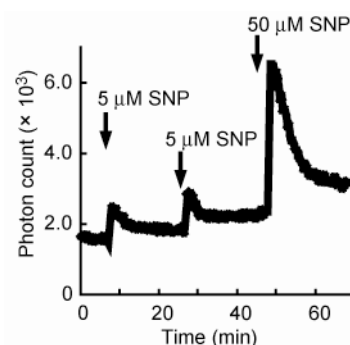


図8. cGMPプローブを発現させた培養細胞のSNPに対する応答。

次に、発光顕微鏡を用いて、細胞内 cGMP 産生の発光イメージングが可能であるかどうかを検証した。cGMP プローブを発現させた細胞を発光顕微鏡で観察しながら SNP 5 μ M で刺激したところ、刺激後に個々の細胞で発光の上昇が観察された。この結果から、cGMP プローブを用いて単一生細胞内の cGMP 濃度変化を空間的に検出可能であることを実証した。

〈アフリカツメガエル胚の cGMP 産生の可視化〉アフリカツメガエルの二細胞期胚に cGMP プローブの mRNA

を注入し、プローブを発現させた。受精後 1.5 日(尾芽胚の段階)の胚を発光顕微鏡で観察したところ、頭部の脳形成が進んでいる部位で発光シグナルが検出された。これは脳形成に伴う cGMP シグナルを検出したと推測される。発光シグナルが胚の cGMP を検出していることを検証するため、cGMP シグナル経路を阻害する実験を行った。発光している尾芽胚に、cGMP 産生酵素であるグアニル酸シクラーゼの阻害剤 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) 100 μ M を添加すると、発光が急激に減少した(図 9)。cGMP 産生が阻害され、生体内の cGMP の分解が進んで cGMP 濃度が減少した結果と推測される。この結果から、観察した発光シグナルが胚の細胞内 cGMP 濃度に応答したものであることが明らかとなった。本研究で開発した cGMP 発光プローブは、生きた動物個体内の cGMP 産生を低侵襲的にリアルタイムで検出可能であることが分かった。

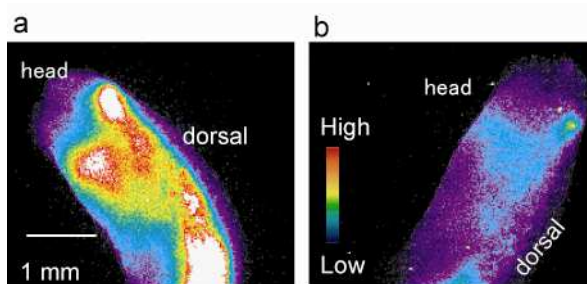


図9. ODQ刺激前後のツメガエル胚の発光観察。(a) 刺激前。(b) 刺激後40分。

〈結論〉生細胞内の cGMP 産生を、分割したホタルルシフェラーゼの単一分子内再構成に基づく発光シグナルとして検出するプローブを開発した。培養細胞実験で、cGMP 発光プローブが可逆的かつ選択的に応答することを示し、発光イメージングによる単一生細胞内の cGMP 検出が可能であることを実証した。このプローブをアフリカツメガエル胚に発現させ、自家蛍光の強い胚の中で cGMP 産生を検出できることを実証し、このプローブが生きた動物個体の低侵襲的な cGMP 検出に応用可能であることを示した。

【まとめ】

分割ルシフェラーゼの再構成法を用いて、単一生細胞内の環状ヌクレオチド濃度変化を発光シグナルとして検出するプローブの開発に成功した。このプローブを用いて、従来の蛍光プローブでは困難であった、生きた動物個体内部の環状ヌクレオチドシグナルの非破壊的、低侵襲的な可視化を実現した。本研究で開発した発光プローブは、従来法では検出できなかった cGMP および cAMP が果たす生理的機能の解明に有用であると期待される。またこれらのプローブは、病気による環状ヌクレオチド異常の検出や、新しい薬剤・毒性化学物質の評価など、病理学的・薬理的な研究への応用が可能である。