



北海道大学
HOKKAIDO UNIVERSITY



平成22年8月9日

北海道大学・総務部広報課
Tel : 011-706-2610

理化学研究所 広報室
Tel : 048-467-9272

世界最高の検出感度をもつカルシウムイオンセンサー “カメレオン-Nano”の開発に成功！

研究成果のポイント

- ・ 長年待ち望まれていた「世界最高感度のカルシウムイオンセンサー」を開発
- ・ 従来は捉えることができなかった，“細胞種毎の静止期におけるカルシウムイオン濃度の違い”や，“大脳皮質神経活動の高感度検出”，“生きた動物の神経ネットワークや筋肉組織の活動パターンの同時計測”，“大規模ネットワークにおける細胞間シグナル伝達計測”に成功
- ・ カルシウムイオン動態の異常が関連する，てんかん発作や躁うつ病，循環器疾患，アレルギー疾患，内分泌異常など様々な疾病の原因究明や創薬スクリーニングに期待

研究成果の概要

北海道大学電子科学研究所の永井健治教授らと理化学研究所脳科学総合研究センターの研究グループは，細胞内の極微量(nM:ナノモラー)レベルのカルシウムイオン(Ca²⁺)^{*1}のわずかな濃度変化を超高感度に検出することができる蛍光性 Ca²⁺センサーを開発することに成功しました。

下村脩博士らのノーベル化学賞受賞で知られる緑色蛍光タンパク質(GFP)に代表される蛍光タンパク質は，細胞や生体分子を蛍光ラベルする用途としてだけでなく，細胞内の酵素の活性化やイオンの濃度変化などを計測するための分子センサーとして，医学・生物学研究に広く用いられています。

カメレオン^{*2}は遺伝子工学技術を用いてGFPをもとに開発された蛍光タンパク質であり，細胞内の信号伝達を担うCa²⁺をリアルタイムに検出するセンサーとして利用されてきました。これまでにカメレオンをはじめとして，幾つかのCa²⁺センサーが蛍光タンパク質の改変や化学合成により開発されてきましたが，従来のCa²⁺センサーは感度が低いため，自発的な生命活動に伴う僅かなCa²⁺の濃度変化を計測することは難しく，これを可能にする高感度センサーの開発が求められていました。

研究グループはカメレオンのCa²⁺結合領域を新奇の方法で改変することにより，Ca²⁺に対する結合力を飛躍的に向上させ，超高感度Ca²⁺センサー「カメレオン-Nano」の開発に至りました。カメレオン-NanoのCa²⁺との結合力はこれまでに開発されたCa²⁺センサーの中で最も強く，世界最高の感度(解離定数K_d=15 nM)を有しています。Ca²⁺結合領域を微調節することでCa²⁺との結合力を変えたセンサーも5種類開発し，センサーのシリーズ化も実現しました。

これらの超高感度 Ca^{2+} センサーを用いることで、大脳皮質の神経活動を高感度に検出することが可能になっただけでなく、生きた動物個体内における神経ネットワークやこれに制御される筋肉組織の活動パターンの両方を同時計測することに成功するなど、従来の Ca^{2+} センサーでは検出できなかった現象を捉えることが可能になりました。

本研究は、北海道大学・電子科学研究所の堀川一樹特任准教授、独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センターの山田義之研究員、道川貴章副チームリーダーおよび御子柴克彦チームリーダーらとの共同で行われました。

本研究成果は、米国科学誌『Nature Methods』の電子版で 2010 年 8 月 8 日（米国東部時間）に公開されます。

論文発表の概要

研究論文名：Spontaneous network activity visualized by ultra-sensitive Ca^{2+} indicators, yellowameleon-Nano

（和訳 超高感度 Ca^{2+} センサー“黄色カメレオン-Nano”による自発的なネットワーク活動の可視化）

著者：堀川一樹（北大）、山田義之（理研）、松田知己（北大）、小林健太郎（北大）、橋本光浩（理研）、松浦徹（理研）、宮脇敦史（理研）、道川貴章（理研）、御子柴克彦（理研）、永井健治（北大）

公表雑誌：Nature Methods 電子版 <http://www.nature.com/nmeth/>

公表日：日本時間（現地時間）2010 年 8 月 9 日午前 2 時 00 分（米国東部時間 8 月 8 日午後 1 時 00 分）

1. 背景

近年、脳に代表される私たちの生体システムがどのように高次機能を実現しているかを理解しようという研究が注目を集めています。生体システムの高次機能は、細胞を単位とする機能的なネットワークにおける複雑な細胞間情報伝達のたまものです。したがってその「働くしくみ」を理解するには細胞間でやりとりされる情報伝達の様子を一千個以上の細胞からなる組織レベルで、細胞一個の解像度をもって計測する必要があります。

細胞の刺激応答を生体内で計測すること自体には多くの成功例がありますが、このとき細胞に提示される刺激は非常に強力であることがほとんどでした。一方、生体システムが自発的に活動している際に細胞間でやりとりされる刺激の強度は非常に微弱であると考えられています。つまり、前者を大声で怒鳴られたときの細胞応答とすれば、自発活動とは小声でのひそひそ話に相当します。既存の Ca^{2+} センサーを利用した計測では、前者の検出は容易でしたが、後者は困難であることが多く、生体内での微弱な Ca^{2+} 濃度変動を高感度に検出できる技術の開発が待ち望まれていました。

2. 研究手法と成果

研究グループは FRET 型^{※3} Ca^{2+} センサーであるカメレオンの Ca^{2+} 結合能を改良するため、センサー部分として機能する CaM-M13 部分に注目しました。 Ca^{2+} 結合能は、CaM 部分に存在する Ca^{2+} 認識配列により調節されると考えられており、確かにこの部分へのアミノ酸変異の導入により、低い結合能を持つ Ca^{2+} センサーが開発されてきました。一方、結合能の強いカメレオンは存在しませんでした。そこで、 Ca^{2+} の結合依存的に立体構造を大きく変化させる CaM と M13 ペプチド間のリンカー部分の性質が Ca^{2+} 親和性に関与するのではないかと推測し、両ドメイン間のリンカー長を変化させるという新しい改変を試みました。

その結果、既存のカメレオンに比べ Ca^{2+} 結合能が最大 6 倍向上することを見いだしました。リンカー長を変えることで Ca^{2+} 結合能は段階的に変化し、解離定数が 140 nM (ナノモラー) から 15 nM の低 Ca^{2+} 濃度領域をカバーする合計 5 種類のセンサーを開発し、ナノモラーの Ca^{2+} 濃度を検出する性能にちなんでカメレオン-Nano と名付けました (図 1)。

微弱な刺激への細胞応答が検出できることを示すために、急性脳スライス標本を用いた検証を行いました。遺伝子治療にも用いられるアデノウイルスベクターを用いて、大脳皮質の神経細胞にカメレオン-Nano を導入し、電気刺激により最小の活動単位である単一活動電位を発生させ、その応答を Ca^{2+} イメージングで検出しました。その結果、単一活動電位発生時の Ca^{2+} 変動を従来のカメレオンに比べ 2 倍のシグナル変化として検出できることを見いだしました (図 2)。

生きた動物個体における Ca^{2+} 計測の可能性を検証するため、モデル脊椎動物の一つであるゼブラフィッシュ胚の自発的な運動時の細胞活動パターンの計測を行いました。その結果、従来の Ca^{2+} センサーでは検出することが困難であった神経ネットワークならびにこれに制御される筋肉組織の活動パターンの両方を計測することに成功しました。

細胞集団での細胞間シグナルのやりとりをどれだけ大規模に計測できるか検証するため、社会性アメーバを用いた検証も行いました。アメーバ集団内で自発的にやりとりされる細胞間シグナルの発生パターンを Ca^{2+} イメージングで計測したところ、従来のカメレオンでは検出が極めて困難であった細胞間シグナル伝達の様子を、最大 10 万個からなる細胞集団においても定量的に計測できることを明らかにしました (図 3)。

3. 今後への期待

カメレオン-Nano は遺伝子にコードされた Ca^{2+} センサーであるため、任意の生物の多様な組織における Ca^{2+} 計測を可能にします。例えば、思考を司る脳神経回路だけに導入することで、その自発的な活動パターンの計測や、学習に伴う神経活動パターンの変化を高感度に計測できるようになることが期待されます。

また細胞内 Ca^{2+} 変動の異常はてんかん発作や躁うつ病、循環器疾患など様々な疾患に関連することが明らかになっています。細胞内 Ca^{2+} 変動をきわめて鋭敏に検出できるカメレオン-Nano を用いることで、より多くの疾病の原因究明やより効果的な創薬スクリーニングが期待されます。

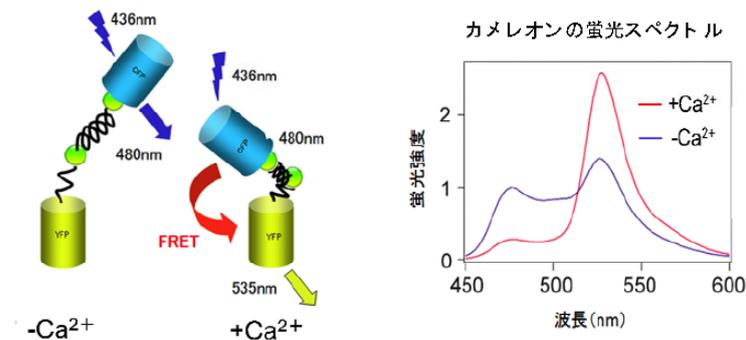
補足説明

※1 細胞内カルシウムイオン

カルシウムはすべての細胞にイオン (Ca^{2+}) の状態で存在し、細胞の刺激応答反応において最も重要な細胞内情報伝達物質として働いている。通常、細胞質中の Ca^{2+} は極めて低い濃度に保たれ、細胞外からの刺激により濃度が上昇する。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に異常をきたすと脳心臓疾患を含む様々な疾病に罹患することが分かりつつある。

※2 カメレオン (Cameleon)

Ca^{2+} の結合に依存して相互作用するカルモジュリン (CaM) と M13 ペプチドを連結し、さらにそれを2つの異なる色の GFP 変異体でサンドイッチした構造を持つタンパク質。 Ca^{2+} の濃度に応じて蛍光色が変わるためカメレオンと命名された。



※3 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

エネルギー供与体 (ドナー) となる蛍光タンパク質の励起エネルギーが、エネルギー受容体 (アクセプター) となる別の蛍光タンパク質へ移動する現象のことを指す。FRET をうまく利用することによって、 Ca^{2+} 等の生体分子の濃度変化や生体内に存在するタンパク質の構造変化・相互作用などを生きた細胞内でリアルタイムに観察することができる。

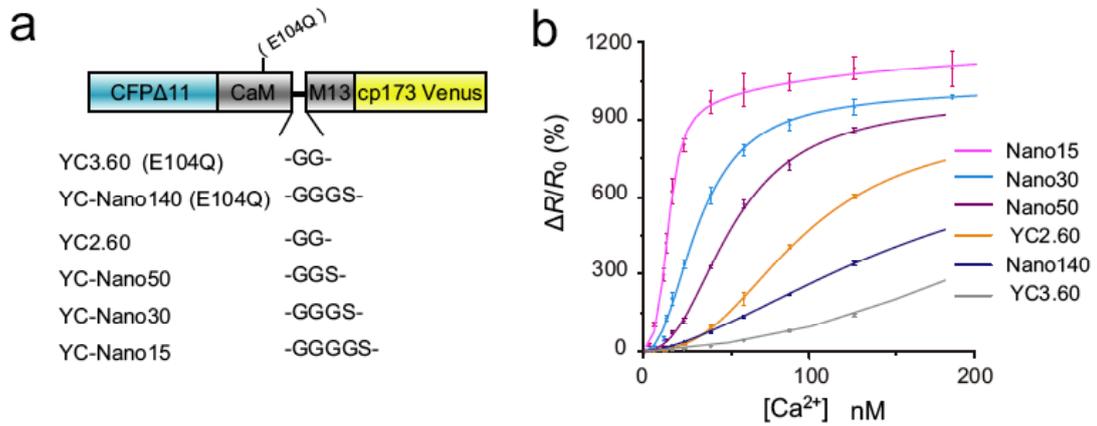


図1. 超高感度 Ca^{2+} センサー カメレオン-Nano

(a) カメレオン-Nano の構造の模式図.

CaM: Ca^{2+} 結合タンパク質カルモジュリン, M13: Ca^{2+} -カルモジュリン結合配列, CFP/cp173Venus: 青色および黄色蛍光タンパク質 YC: yellow cameleon の略.

(b) カメレオン-Nano の Ca^{2+} 結合能を表すグラフ.

FRET シグナルの変化量を Ca^{2+} 濃度に対してプロットしたもの. Nano15, 30 そして 50 は従来型 (YC2.60) よりも Ca^{2+} 結合能が高いこと, Nano140 は YC2.60 と YC3.60 の中間の Ca^{2+} 結合能を持つことがわかる.

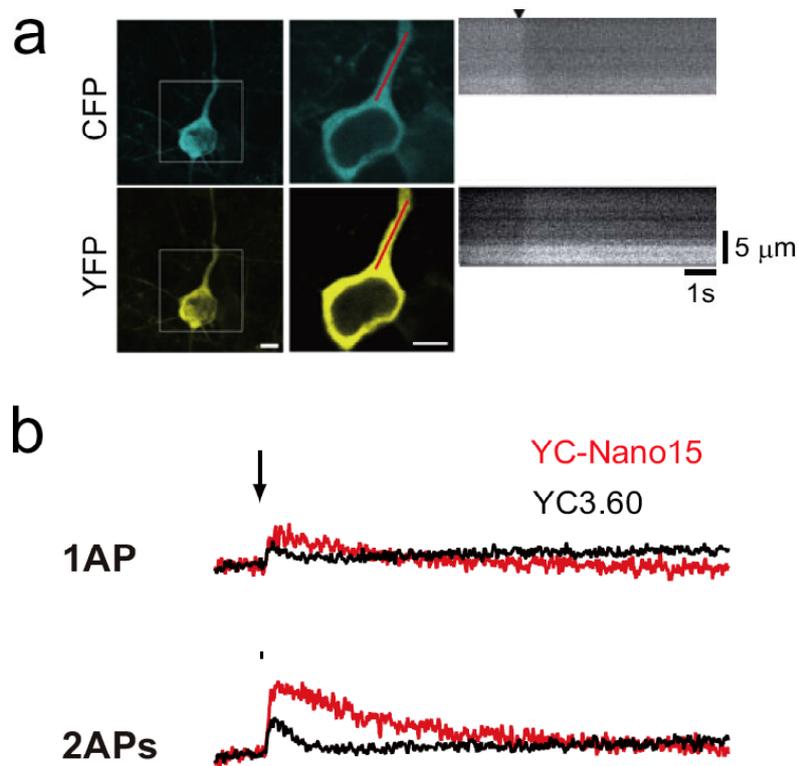


図 2. カメレオン-Nano による Ca^{2+} イメージング

(a) 大脳皮質スライス標本におけるカメレオン Nano 発現細胞と、電気刺激時の CFP および YFP シグナルの変化。

(b) カメレオン 3.60 およびカメレオン-Nano により検出される 1 回および 2 回の活動電位発生に伴う FRET シグナルの変化。

Ca^{2+} 応答をカメレオン-Nano ではカメレオン 3.60 にくらべ約 2 倍のシグナル変化量として検出できることがわかる。

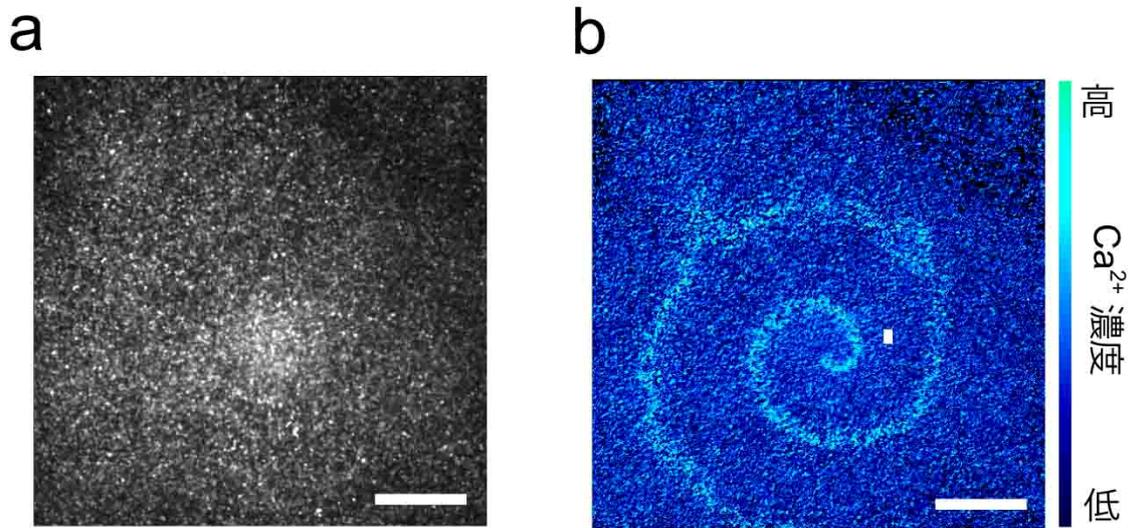


図 3. 社会性アメーバ10万個の細胞集団に生じる自己組織的な細胞間シグナル伝達パターン

(a) YFP の蛍光により可視化される細胞形態. 小さな点の一つが細胞一個に相当.

(b) 同じ視野におけるカメレオン-Nano15 で可視化された細胞間シグナルの空間パターン. 螺旋状に発生する相互作用シグナルの波面(明るい水色部分)は回転しながら中心部から周辺部へと広がっていく. スケールバーは 400 μm .

(お問い合わせ先)

<研究に関すること>

永井 健治 (ながい たけはる)
北海道大学電子科学研究所 教授
〒001-0020 札幌市北区北 20 条西 10 丁目
Tel : 011-706-9438 / Fax : 011-706-9443
E-mail : tnagai@es.hokudai.ac.jp

<報道担当>

北海道大学 総務部 広報課
菅原 暁子 (すがわら あきこ)
〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目
Tel : 011-706-2610 / Fax : 011-706-4870
E-mail : kouhou@jimuhokudai.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715