

同志社大学 生命医科学研究科 齋藤直人准教授

## 特異的かつ高速な cAMP 生細胞イメージングを可能にする蛍光プローブ『gCarvi』を開発

### 概要

生物の個体や組織では、全体として情報を共有するだけでなく、その一部分だけで情報を扱う仕組みを適宜活用することで、それぞれの機能を維持しています。一個の細胞もシステムティックな工場のようなものであり、細胞全体で情報を共有する場面や、一部分だけに情報を集約する仕組みを活用していると考えられます。細胞体から役割分担の異なる複数の神経突起を長く伸ばす脳を構成する神経細胞（ニューロン）では、細胞全体/一部分の情報管理を適切に行うシステムを、高度に発達させていると予想できます。

たとえば細胞外から受け取った情報を、細胞内に伝えて応答するために、細胞内で最初に情報を伝える役割をセカンドメッセンジャーと呼びます。このセカンドメッセンジャー分子の指示に基づいて、細胞は様々な分子を動かし、適切に応答するのです。歴史的に最初に発見されたセカンドメッセンジャー分子が、サイクリック AMP (cAMP) です。cAMP をセカンドメッセンジャーとして活用する細胞は、原核・真核細胞問わず広く存在することが知られています。この cAMP を用いた指示の仕組みとして、細胞全体に渡るような全体指令に加えて、一部分にだけ行う個別指令がある可能性については、仮説（マイクロドメイン仮説）として 1980 年代に提唱されました。

cAMP が指示を行うためには、細胞内の指示を行う場所で cAMP 濃度を上昇させる必要があります。今回、同志社大学 生命医科学研究科 齋藤直人准教授の研究グループでは細胞内の cAMP の濃度変化を可視化できる蛍光プローブ“gCarvi (ジーカービィ)”を開発しました。

さらに、この gCarvi をニューロンに発現させることで、

- 1) cAMP 全体指令によって、神経回路の活動が高まること
- 2) cAMP 個別指令によって、シナプス前部\*が活性化すること

を蛍光動画解析（蛍光イメージング）によって明らかにしました。これまで仮説に止まっていた cAMP 個別指令が実際に存在することを、はっきりと示した初めての報告と言えます(図 1)。

\*：ニューロン間で信号を伝達する場（構造）をシナプスと呼びます。伝達の送り手側がシナプス前部です。

## 研究の詳細

生きた細胞内で生じる分子の動態を、可視化する手法として、蛍光イメージングは欠かせない研究手法となっています。セカンドメッセンジャーとして機能する cAMP は主要な細胞シグナリング分子であり、脳の老化（認知機能低下）や免疫・炎症反応、ホルモン応答などにも関与しています。重要なシグナリング分子であるにも関わらず、その動態を解析できるような可視化ツール（蛍光プローブ）の開発は世界的にも進んでいません。我々は蛍光イメージング用の cAMP プローブとして、gCarvi を開発しました。gCarvi は大腸菌の cAMP 結合領域と、円順列変異型緑色蛍光タンパク質を融合した遺伝子発現型 cAMP 蛍光プローブです（図 2A）。gCarvi は、1. 分子量が小さい、2. cAMP に特異的に反応する、3. cAMP 濃度の変化を高速にモニターできる、の 3 つの優れた特徴を有しています。

gCarvi は cAMP 蛍光プローブとして最小サイズであり、この点は実際に遺伝子発現する上で、哺乳類細胞に発現させやすい、つまり使いやすさに繋がります。

図 2B に gCarvi の cAMP とサイクリック GMP (cGMP) に対する容量反応曲線を示しました。cGMP は哺乳類細胞がセカンドメッセンジャーとして利用する、cAMP と構造が似たもう一つのサイクリックヌクレオチドですが、gCarvi は cGMP には小さな反応しか示さないことが分かります。細胞内では cGMP は数  $\mu\text{M}$  程度までしか上昇しないと報告されているため、現実的には gCarvi は cGMP には反応しないといっても良いでしょう。gCarvi の cAMP 応答/cGMP 応答の比は 100 倍以上と見積もることができ、またその他のヌクレオチドには反応しないことも確かめています。既存の cAMP 蛍光プローブの中で最高の cAMP 特異性を示す gCarvi を用いることで、正しく cAMP 濃度変化を可視化できるといえます。

また、微小灌流装置を用いることで、gCarvi の cAMP に対する結合速度を解析しました（図 2C）。このような解析から、gCarvi は cAMP が  $10 \mu\text{M}$  上昇する変化を、0.1 秒以内の速さでモニターできることが分かりました。この高速性は cAMP 動態を実時間でイメージングする上で、重要なポイントとなります。実際に既存の cAMP 蛍光プローブでテストを行ったところ、時間経過の遅延したイメージングになってしまうことを確認しています。

今回の研究では、gCarvi と  $\text{Ca}^{2+}$  赤色蛍光プローブである jRCaMP1b を海馬ニューロンに発現させることで、緑色蛍光で cAMP の、赤色蛍光で  $\text{Ca}^{2+}$  の動態を同時に解析しました（図 3）。薬理的にニューロン全体の cAMP 上昇を引き起こすと、これに伴ってニューロン内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇と発火活動の上昇が観察されました。このような解析結果から、ニューロン内の cAMP 濃度の設定値（cAMP 全体指令）によって、神経回路の活動レベルを制御できることが分かりました。

小脳顆粒細胞のシナプス前部は、cAMP 上昇の下流シグナリングによって、長期的に伝達物質放出を促進するような可塑性を示すことが分かっていました。そこで、1 つ 1 つのシナプス前部の cAMP 上昇率と、伝達物質放出の促進率を解析すると、シナプス前部毎に cAMP 動態は異なっており、その cAMP 上昇率と伝達物質放出の促進率との間には、強い相関があることが分かりました（図 4）。cAMP の個別指令の方法として、マイクロドメイン仮説が提唱されていま

す。cAMP が  $1 \mu\text{m}^3$  程度の空間に閉じたシグナリングを形成していることがあるのではないかと  
いう仮説です。我々は cAMP マイクロドメインの一例として、シナプス前部という微小空間  
に閉じた cAMP シグナリングーシナプス前部ドメインーを、cAMP 蛍光イメージングによって明  
らかにしました。この結果は、学習や神経回路の恒常性に寄与するシナプス可塑性が、cAMP シ  
ナプス前部ドメインによってシナプス毎に個別に制御されていることを示唆しています。

### 研究成果のポイント

- ・ 特異的かつ高速な cAMP 生細胞イメージングを可能にする蛍光プローブ『gCarvi』を開発
- ・ ニューロンの cAMP 濃度の設定値（全体指令）によって、神経回路の活動レベルが制御され  
ていることを発見
- ・ cAMP シナプス前部ドメイン（個別指令）が、シナプス可塑性におけるシナプス特異性を規定  
していることを発見

### 研究成果の社会的意義

様々な細胞応答を引き起こす G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、創薬開発の世界では主  
要な標的分子です。そして、多くの GPCR は細胞内 cAMP 濃度を増加または減少させます。この  
ような cAMP の増減は、ELISA 法などによる End-point assay を用いて研究されてきました。  
gCarvi を用いた cAMP 生細胞イメージングでは、End-point assay では見ることができない多  
様な cAMP 動態を解析することができます。微小空間に生じる cAMP シナプス前部ドメインも、  
End-point assay での解析は困難でしょう。薬の効果を評価する上で目的細胞の cAMP 動態を  
可視化できる gCarvi は、創薬開発における革新的な技術です。

一例として、認知症改善薬の開発に貢献できると考えています。老化やアルツハイマー型認  
知症による認知機能の低下の一因として、cAMP シグナリングの減弱が示唆されています。cAMP  
の分解酵素を阻害することで、低下した認知機能が改善するという実験結果も報告されていま  
す。しかし、その細胞レベルの詳細は不明であり、脳内のどこの cAMP シグナリングが認知機  
能を左右するのか分かっていません。gCarvi を用いたニューロン cAMP 動態解析は、そのよう  
な問題に直接的にアプローチすることができるため、脳内の認知機能を司る部位の特定や薬効  
の確認など、創薬の現場において新たな一手となることでしょう。

## 論文情報

本研究成果は、米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences) に掲載されました (2022年7月6日)。

URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.2122618119>

## Green fluorescent cAMP indicator of high speed and specificity suitable for neuronal live-cell imaging

Seiko Kawata, Yuki Mukai, Yumi Nishimura, Tomoyuki Takahashi, Naoto Saitoh

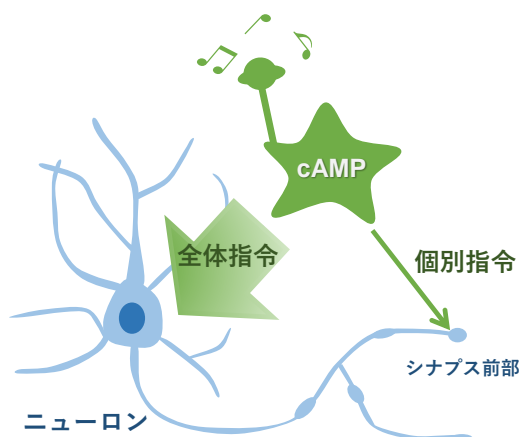
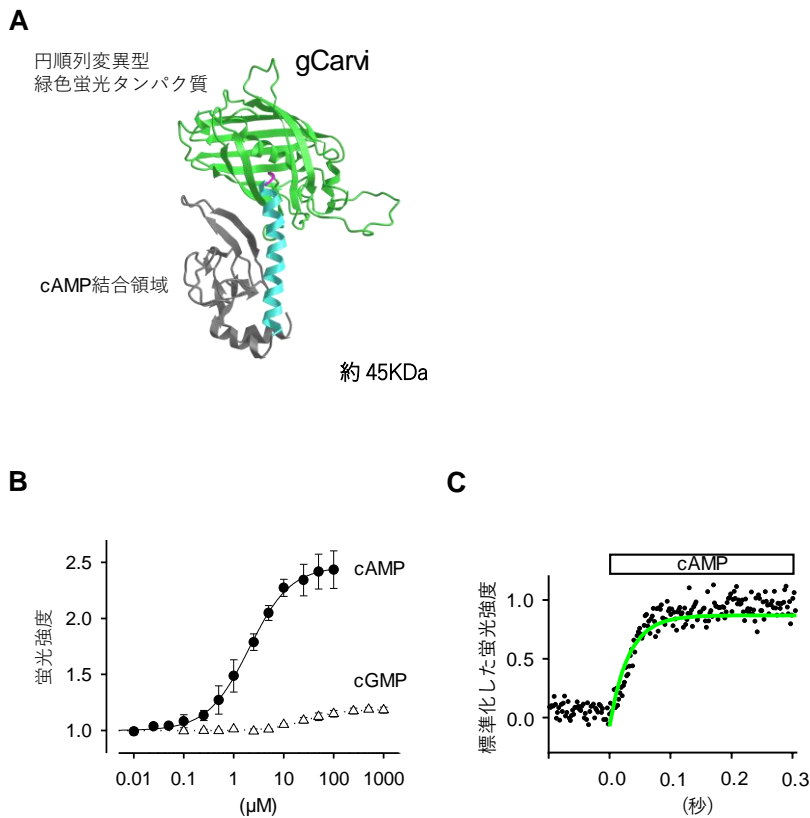


図1. ニューロンで見つかった、cAMPによる指示方式の使い分け。

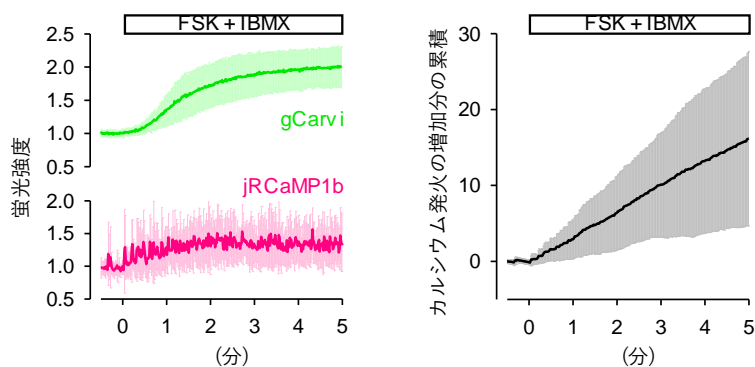


**図 2. 遺伝子発現型 cAMP 蛍光プローブ gCarvi の特徴**

(A) 大腸菌由来の cAMP 結合領域に円順列変異型緑色蛍光タンパク質を融合させた gCarvi の予想構造。

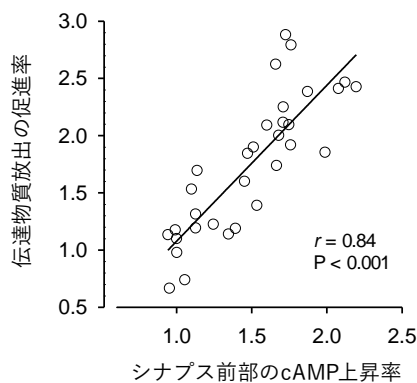
(B) 精製 gCarvi タンパク質の cAMP 及び cGMP に対する容量反応曲線。cAMP に 1 対 1 結合することで、特異的に緑色蛍光強度が上昇する。

(C) カバーガラスに固定した精製 gCarvi タンパク質に、微小灌流装置を用いて cAMP を高速に投与したときの一例。cAMP 動態を高速にイメージングできることが分かる。



**図 3. gCarvi と  $\text{Ca}^{2+}$  赤色蛍光プローブ jRCaMP1b を用いた cAMP/  $\text{Ca}^{2+}$  同時解析**

gCarvi と jRCaMP1b を発現させた海馬ニューロンに、cAMP 合成酵素活性化剤 forskolin (FSK) と cAMP 分解酵素阻害剤 IBMX を投与することで、ニューロン全体の cAMP を上昇させると、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇 (左) と発火活動の上昇 (右) が誘導された。



**図 4. 1つ1つのシナプス前部はマイクロドメインを形成し、cAMP 上昇率が高いほど、神経伝達物質の放出が促進される**

小脳顆粒細胞のシナプス前部では、様々な大きさの cAMP 上昇が観察された。シナプス小胞を染める FM 色素を用いて、エンドサイトーシスしたシナプス小胞の量を解析した。この解析から、シナプス前部の cAMP 上昇率と伝達物質放出の促進率との間には、正の一次相関があった。