



北海道大学  
HOKKAIDO UNIVERSITY

2011年9月6日

北海道大学 総務企画部広報課

Tel : 011-706-2610



九州大学

九州大学 広報室

Tel : 092-642-2106

## 青，緑，赤の蛍光を発する超高性能蛍光性カルシウムイオン センサータンパク質の開発に成功

### 研究成果のポイント

- ・細胞活動の指標となるカルシウムイオンを鋭敏に検出することができる青，緑，赤などの各色蛍光性  $\text{Ca}^{2+}$  センサーの開発に成功
- ・他の各種蛍光センサーと組み合わせて，神経を含む多くの細胞の働きを多面的に同時測定することが可能に
- ・光遺伝学的技術と組み合わせて，行動，思考，記憶の過程における神経回路の動作メカニズムの解明が一層進むことに期待

### 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の研究グループはカナダ・アルバータ大学化学科のロバート・キャンベル教授ら，九州大学理学研究院生物科学部門の石原健教授らとの共同で細胞活動の指標となるカルシウムイオン(以下: $\text{Ca}^{2+}$ )<sup>\*1</sup>を鋭敏に検出することができる青，緑，赤などの各色蛍光性  $\text{Ca}^{2+}$  センサータンパク質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標識することを主な用途として，医学・生物学研究に広く用いられています。近年ではこの GFP を遺伝子工学的に改変することにより，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ことを可能にする蛍光分子センサーも開発されています。例えば，細胞内の信号伝達を担う  $\text{Ca}^{2+}$  を生きた細胞内でリアルタイムに検出するセンサーとして cameleon (カメレオン)<sup>\*2</sup> や pericam (ペリカム)<sup>\*3</sup>，GCaMP (ジーカンプ)<sup>\*3</sup> 等が開発され，世界中の研究者によって利用されています。しかしながら，これらの  $\text{Ca}^{2+}$  センサーは計測波長域が青緑色から緑色域に限定され，また  $\text{Ca}^{2+}$  結合に伴う蛍光シグナル変化も小さいために，僅かな  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度変動を捉えることはできませんでした。本研究グループは独自に開発した遺伝子進化工学技術を用いることで，2,600% のシグナル変化率を有する緑色のセンサー G-GECO (ジーゲッコウ : green fluorescent genetically-encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators for optical imaging) の開発を皮切りに，青(B-GECO)や赤(R-GECO)，さらに励起 2 波長計測型(GEX-GECO)，蛍光 2 波長計測型(GEM-GECO)などの様々な  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを作り出すことに成功しました。特に蛍光 2 波長型  $\text{Ca}^{2+}$  センサーは  $\text{Ca}^{2+}$  結合により蛍光シグナルが 11,000% も変化し，従来の  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを遙かに凌駕する性能を有します。これらの各種  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを用いる事で，細胞活動の指標となる  $\text{Ca}^{2+}$  と他の生体分子反応の同時計測や，ミトコンドリアや核，細胞質など細胞内コンパートメント毎の

Ca<sup>2+</sup>変動の同時計測だけでなく、生きた動物の刺激に依存した神経活動を鋭敏に測定することにも成功しました。さらに、光で細胞の活動を制御しながら Ca<sup>2+</sup>変動を可視化するなど、従来の Ca<sup>2+</sup>センサーではできなかった解析法への道を拓きました。

本研究成果は、米国科学誌『Science』の電子版で2011年9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：An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators

（和訳；遺伝子にコードされた Ca<sup>2+</sup>指示薬の拡張パレット）

著者：Yongxin Zhao, 荒木聡子, Jiahui Wu, 寺本孝行, 張郁芬, 中野雅裕, Ahmed S. Abdelfattah, 藤原学, 石原健, 永井健治, Robert E. Campbell

公表雑誌：Science 電子版 <http://www.sciencemag.org/>

公表日：日本時間（現地時間）2011年9月9日午前3時00分（米国東部時間9月8日午後2時00分）

## 1. 背景

カルシウムはすべての細胞にイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )の状態が存在し、様々な細胞機能を制御している最も重要な因子です。通常、細胞質中の  $\text{Ca}^{2+}$  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します。身近なところでは筋肉の収縮は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度上昇により引き起こされることが知られています。この他、細胞分裂やアポトーシス、細胞分化、ホルモン分泌、嗅覚や味覚などの感覚受容、免疫応答、神経活動など非常に多くの生理現象に  $\text{Ca}^{2+}$  が関与しています。実際、 $\text{Ca}^{2+}$  の濃度動態に異常が生じると、アレルギー疾患や心疾患、てんかんなど様々な病気を発症します。従って、このような疾患の発症機序を知る上で  $\text{Ca}^{2+}$  が果たす役割を理解することは非常に大切です。

これまで  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度が細胞内でどのように制御されているのかについては多くの研究が行われてきました。このような研究は専ら蛍光性  $\text{Ca}^{2+}$  センサーが利用されます。蛍光性  $\text{Ca}^{2+}$  センサーは  $\text{Ca}^{2+}$  と結合すると蛍光強度が増加したり、蛍光色に変化したりするものが知られています。従来は有機化合物でできたセンサーが用いられていましたが、細胞種によっては導入が困難であることから、限られた細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  動態が調べられてきました。近年ではタンパク質性の蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーが開発され、遺伝子を導入することさえできればセンサーを細胞内に“作り出す”ことができるので、非常に多くの細胞種に応用され、それらの  $\text{Ca}^{2+}$  動態が調べられてきました。

このようにこれまでは  $\text{Ca}^{2+}$  の動態のみを観察するケースが多かったのですが、 $\text{Ca}^{2+}$  が関わる上記に挙げた多くの生理現象をより詳細に理解するには、その生理現象に関与する他の生体因子との関連を同時に調べることが重要になります。あるいは細胞内のコンパートメント毎で  $\text{Ca}^{2+}$  がどのように変動するのかを解析する必要もあります。さらには個体丸ごとの中で注目する細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルがどう変化するのか、その時にその他の生体因子がどのような挙動を示すのか等々を解析しなければなりません。

このような研究を可能にするためには蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーと蛍光ラベルされた生体分子を同じ細胞に導入して観察する必要があります。その際には、両者を区別するために、蛍光ラベルされた生体分子の蛍光色とは異なる蛍光を発する  $\text{Ca}^{2+}$  センサーが不可欠です。

しかしながら、これまで開発されたタンパク質性の  $\text{Ca}^{2+}$  センサーは青緑～緑色の蛍光色ばかりであったため、異なる蛍光色で計測できる  $\text{Ca}^{2+}$  センサー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 GFP の円順列変異体を利用した緑色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサー<sup>※3</sup> である GCaMP3 の遺伝子にエラー誘発 PCR 法を用いてランダムに遺伝子変異を導入し、それを大腸菌のペリプラズムと呼ばれる細胞膜の外側の部分に発現させました。この大腸菌を  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する溶液または  $\text{Ca}^{2+}$  が存在しない溶液に曝し蛍光シグナルを計測し、 $\text{Ca}^{2+}$  の有無によって蛍光シグナルが最も大きく変化する大腸菌を選択して培養し、そこからより高性能の  $\text{Ca}^{2+}$  セン

サーの遺伝子を単離しました。これを何度か繰り返すことで研究グループは先ず 2,600%のシグナル変化率を有する緑色のセンサーを得ることに成功し G-GECO と命名しました (図 1)。この G-GECO の蛍光団を構成するアミノ酸の 1 つであるチロシンをヒスチジンに置換することで青色の蛍光を発する  $\text{Ca}^{2+}$  センサー B-GECO を、また mApple という赤色蛍光タンパク質をもとに赤色の蛍光を発する  $\text{Ca}^{2+}$  センサー R-GECO を開発することにも成功しました (図 1)。さらに、エラー誘発 PCR において B-GECO, G-GECO, flash-pericam の遺伝子混合物を鋳型に利用することで、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合により蛍光色が緑から青色に変化する GEM-GECO を開発することに成功しました (図 1)。特筆すべきは  $\text{Ca}^{2+}$  の結合により GEM-GECO の蛍光シグナル(青の蛍光強度/緑の蛍光強度)が 11,000% も変化することです。この変化率はこれまでに開発されたいかなるタンパク質性の蛍光センサーよりもずば抜けて高く世界最高の値を示しました (図 1)。

これら GECO シリーズの性能は細胞内で維持され、極めて高いコントラストで細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  変動を観察することができただけでなく、細胞質、核、ミトコンドリアの 3 つのコンパートメントにおける  $\text{Ca}^{2+}$  の動態を同一細胞内で測定すること (図 2) や  $\text{Ca}^{2+}$  と ATP の同時計測にも成功しました (図 3)。また、ラットの海馬神経細胞 (図 4) や線虫 *C. elegans* の嗅覚受応答に関わる神経細胞の活動 (図 5) を GEM-GECO を用いて測定したところ、従来のセンサーよりも鋭敏に神経活動を捉えることができました。

### 3. 今後の期待

GECO シリーズを用いることによって、他の各種蛍光センサーと組み合わせることで神経を含む多くの細胞の働きを、多面的かつ同時に測定することが可能になります。また、励起・蛍光波長が多様な GECO シリーズは、光照射により細胞の活動やタンパク質の機能を制御することができる光遺伝学的技術と組み合わせることによって、例えば神経回路の人為的な活性制御と測定を同時に行うことができるようになり、行動、思考、記憶などの過程における神経回路の動作メカニズムの解明が一層進むものと期待されます。

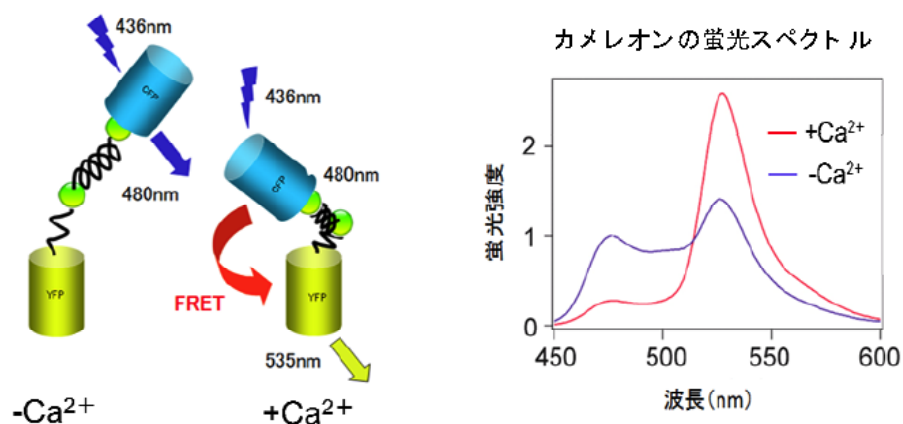
## 補足説明

### ※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( $\text{Ca}^{2+}$ )の状態が存在し、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ます。通常、細胞質中の  $\text{Ca}^{2+}$  結合能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します。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  結合能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ります。

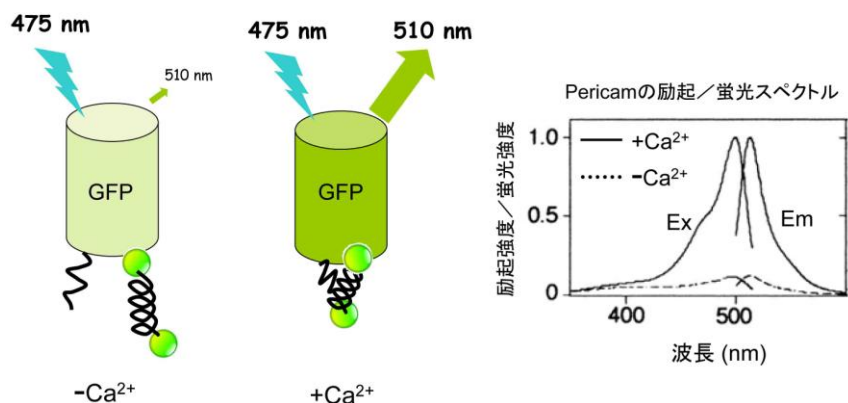
### ※2 カメレオン (Cameleon)

$\text{Ca}^{2+}$  結合能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 GFP の青緑色変異体と黄色変異体でサンドイッチした構造を持つタンパク質。  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に応じて青緑色から緑黄色へと蛍光色に変化するためカメレオンと命名されました。



### ※3 ペリカム(Pericam), ジーカンブ(G-CaMP)

GFP 円順列変異体のアミノ末端に M13, カルボキシル末端に CaM を連結した構造を持つタンパク質。  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に応じて緑色の蛍光強度が変化します。



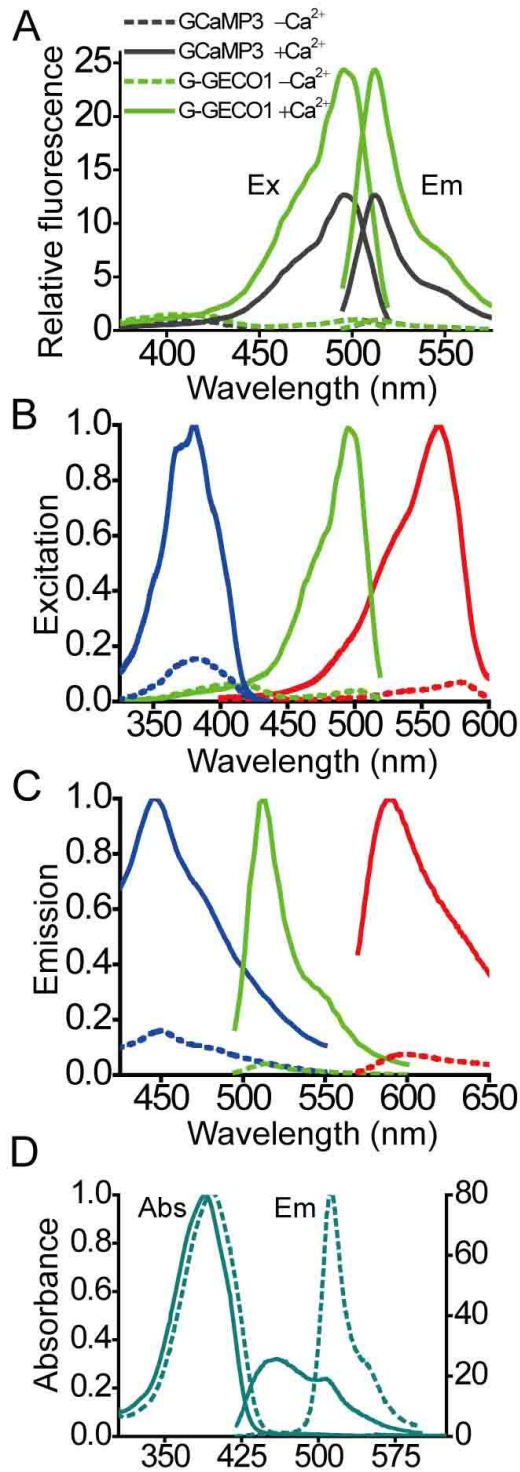


図 1. Ca<sup>2+</sup>センサー GECO シリーズの励起(Ex), 蛍光(Em)スペクトル

A. GCaMP3 (黒) と G-GECO (緑) の比較

B. B-GECO (青), G-GECO (緑), R-GECO (赤) の励起スペクトル

C. (C)B-GECO (青), G-GECO (緑), R-GECO (赤) の蛍光スペクトル

D. GEM-GECO の吸収スペクトル(Abs, 実線: +Ca<sup>2+</sup>, 波線: -Ca<sup>2+</sup>), 励起スペクトル (右実線), 蛍光スペクトル (右波線)

A-C は実線は+Ca<sup>2+</sup>, 波線は-Ca<sup>2+</sup>を表す

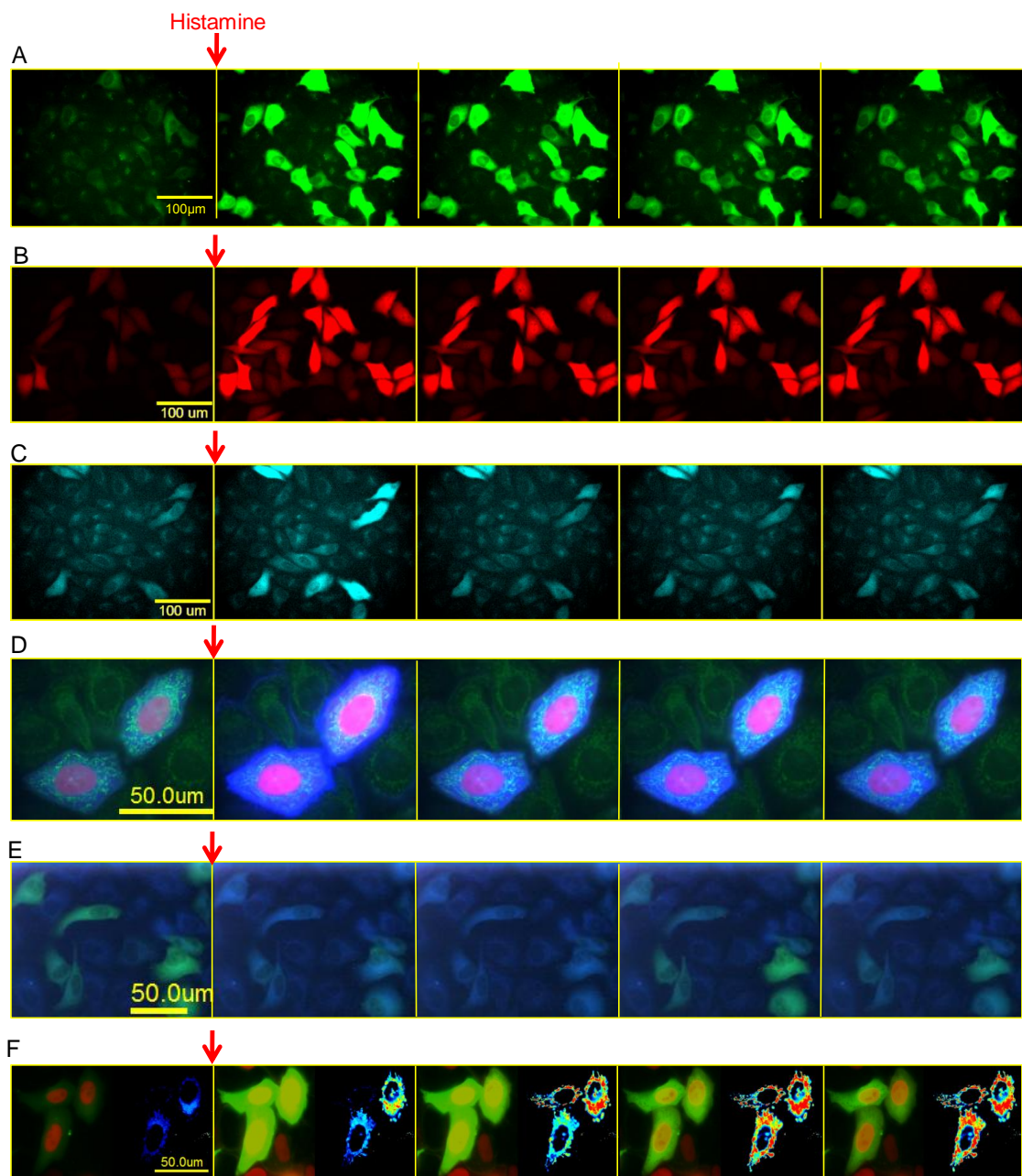


図 2. GECO による  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング

- A. G-GECO による HeLa 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング
- B. R-GECO による HeLa 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング
- C. B-GECO による HeLa 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング
- D. G-GECO (緑: ミトコンドリア), B-GECO (青: 細胞質), R-CECO (赤: 核) による HeLa 細胞内の細胞内小器官  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング
- E. GEM-GECO による HeLa 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング
- F. G-GECO (左パネル緑: 細胞質), R-CECO (左パネル赤: 核), GEM-GECO (右パネル疑似カラー: ミトコンドリア) による HeLa 細胞内の細胞内小器官  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング

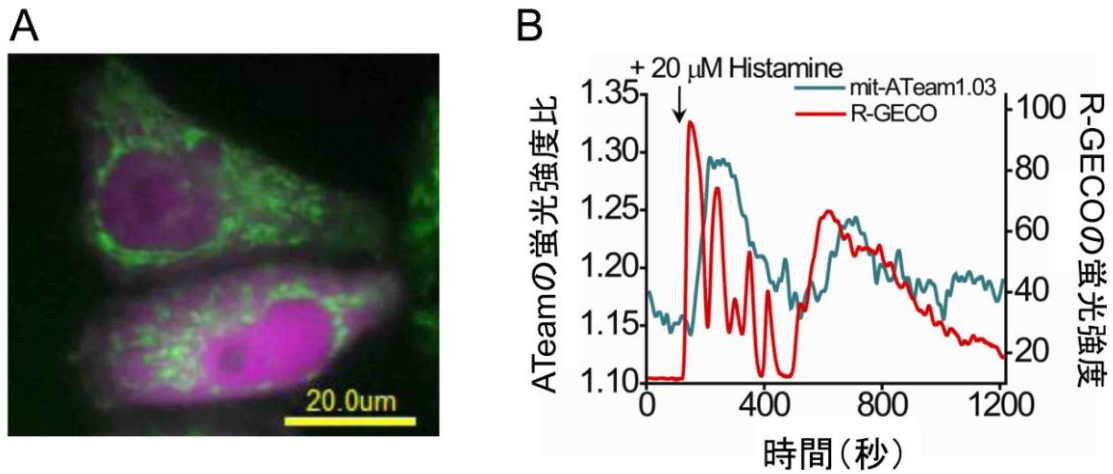


図3. R-GECOと mtATeam1.03 による HeLa 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  と ATP の同時可視化

- A. R-GECO を細胞質に蛍光 ATP センサー ATeam1.03 をミトコンドリアに発現する HeLa 細胞の蛍光顕微鏡写真.
- B. ヒスタミン刺激に伴う細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度とミトコンドリア内 ATP 濃度の経時変化. 細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇した後にミトコンドリア内の ATP 濃度が上昇することが分かる.

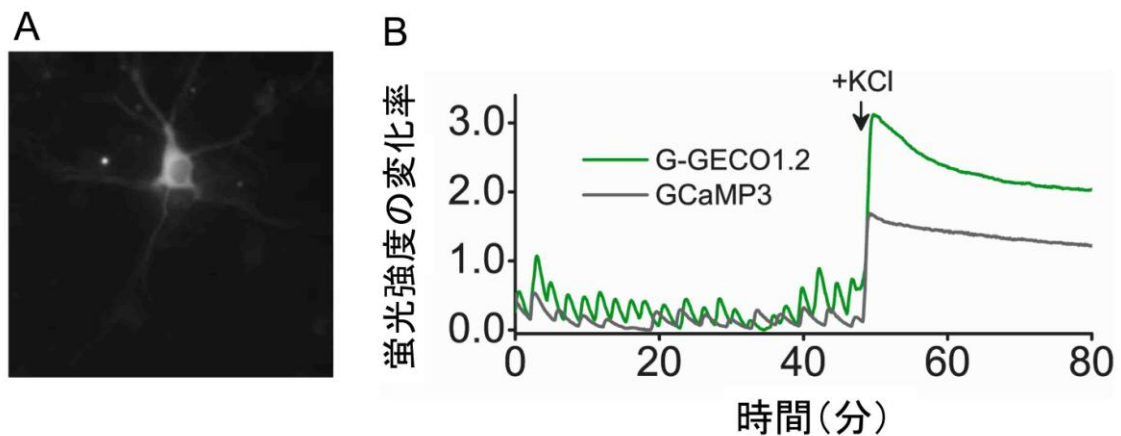


図4. G-GECO と GCaMP3 によるラット海馬神経細胞の活動測定

- A. G-GECO を発現するラット海馬神経細胞の蛍光顕微鏡写真.
- B. 海馬神経細胞の活動を G-GECO または従来の  $\text{Ca}^{2+}$  センサー (GCaMP3) で測定した時の蛍光シグナル変化の比較. G-GECO の方が GCaMP3 よりも大きなシグナル変化を示すことがわかる.



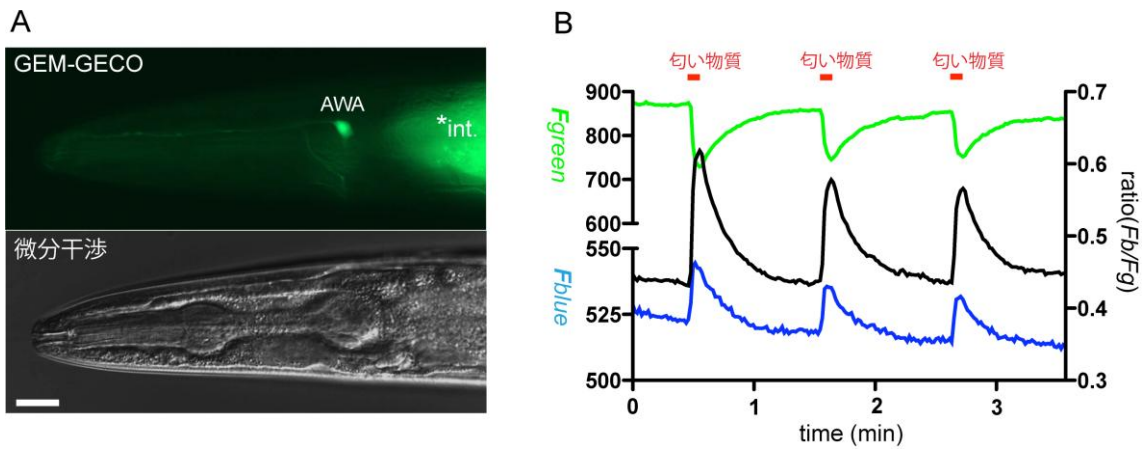


図5. 線虫 *C. elegans* における GEM-GECO を用いた嗅覚応答の測定

**A.** AWA 嗅覚ニューロンに特異的に GEM-GECO を発現している線虫 *C. elegans* の蛍光顕微鏡写真(上)と微分干渉顕微鏡写真(下). int.は腸の自家蛍光. スケールバーは 20 $\mu$ m

**B.** 匂い物質に依存した蛍光量(緑及び青)の変化(左軸)とそのレシオ(黒)の変化(右軸)

匂い物質で刺激することによって、嗅覚ニューロンの  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度が上昇していることがわかる.

(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 総務企画部広報課  
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

九州大学 総務部広報室  
水江 朱里 (みづえ じゅり)  
〒812-8581 福岡市東区箱崎 6 丁目 10-1  
Tel : 092-642-2106 / Fax : 092-642-2113  
E-mail : koho@jimukyushu-u.ac.jp

※この情報は、科学記者会、北海道教育庁記者クラブ加盟各社、九州大学記者クラブへ提供  
しています。