

# Ca<sup>2+</sup>やcAMPを感知する蛍光タンパク質を開発

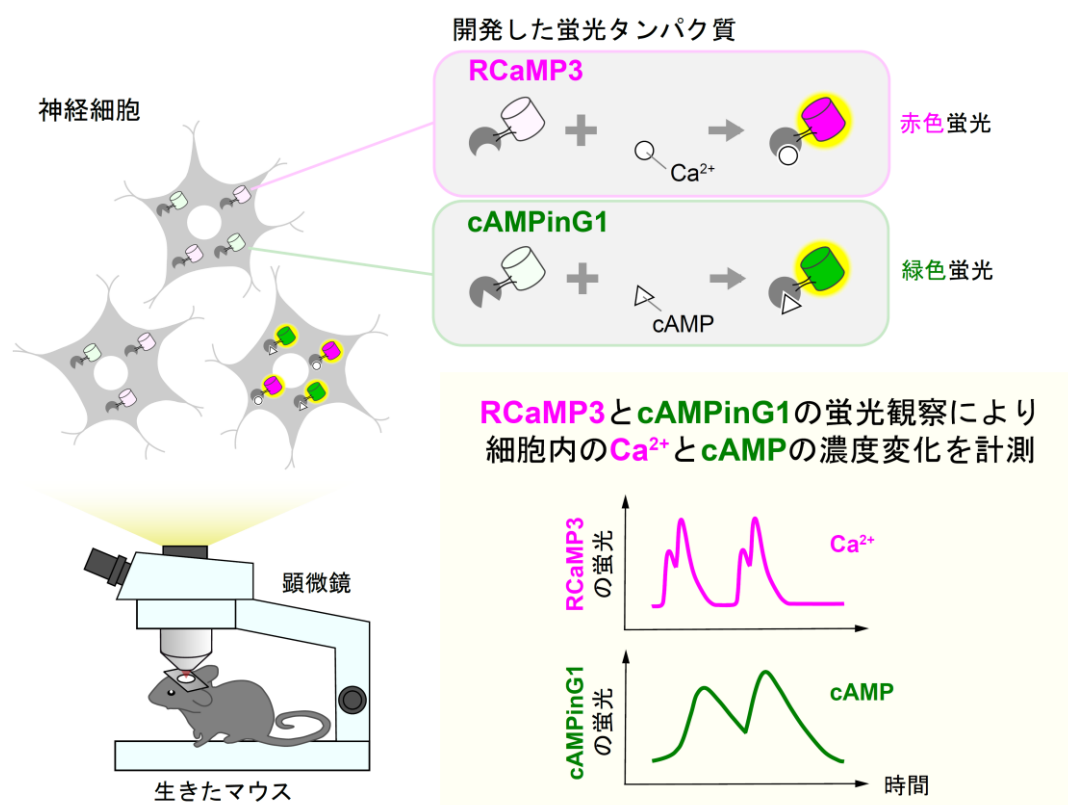
—生きた動物の細胞内セカンドメッセンジャーの動きを観察する—

## 概要

Ca<sup>2+</sup>（カルシウムイオン）やcAMP（3'-5'-アデノシンーリン酸）は、多くの生物の細胞内で情報伝達を担う重要な分子です。Ca<sup>2+</sup>とcAMPは、互いに影響しながら時々刻々とその細胞内濃度が制御されることで、細胞は役割を果たします。しかし、生きた動物のCa<sup>2+</sup>とcAMPの動態を、同時に高精度に観察する技術がこれまで不十分であったため、Ca<sup>2+</sup>とcAMPの関係性を精確に調べることはできませんでした。

今回、京都大学大学院生命科学研究科 坂本雅行准教授、横山達士研究員らの研究グループは、理化学研究所、山梨大学、東京大学と共同で、Ca<sup>2+</sup>を感知する赤色の蛍光タンパク質「RCaMP3」と、cAMPを感知する緑色の蛍光タンパク質「cAMPinG1」を開発しました。RCaMP3やcAMPinG1はそれぞれ、Ca<sup>2+</sup>やcAMPと結合すると、その蛍光が明るくなります。RCaMP3とcAMPinG1の両方を、生きたマウス的大脑皮質に存在する神経細胞に発現させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、Ca<sup>2+</sup>とcAMPの関係性を明らかにすることができました。この成果は、精神・神経疾患の病態解明および治療法の開発につながるものと期待されます。

本研究は、科学雑誌『Nature Methods』3月21日10:00（英国時間）に掲載されました。



## 1. 背景

$\text{Ca}^{2+}$ <sup>注1</sup>や cAMP<sup>注2</sup>は、多くの生物の細胞内に存在するセカンドメッセンジャーです。 $\text{Ca}^{2+}$ は、細胞膜上の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルや小胞体膜上の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプなど、細胞に存在する様々な分子により制御される細胞内情報伝達の重要な担い手です。同じく重要なセカンドメッセンジャーである cAMP はアデニル酸シクラーゼ<sup>注3</sup>により生成され、主に GPCR (G タンパク質共役受容体)<sup>注4</sup>により制御されます。更に、特に神経細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇により cAMP を生成する  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性アデニル酸シクラーゼが存在することなどから、 $\text{Ca}^{2+}$ と cAMP は互いに影響しながら時々刻々とその細胞内濃度が制御されることで、細胞は役割を果たすと考えられています。

この細胞内情報伝達の仕組みを解明するため、近年、蛍光タンパク質<sup>注5</sup>を基にした蛍光センサーが開発されてきています。例えば、神経科学分野において最も使用されている蛍光センサーの一つである GCaMP<sup>注6</sup>があります。GCaMP は蛍光タンパク質であり、 $\text{Ca}^{2+}$ と結合するとその緑色蛍光が明るくなる  $\text{Ca}^{2+}$ センサーです。GCaMP はタンパク質ですので、神経細胞に GCaMP を遺伝子導入することで神経細胞は GCaMP を細胞内に産生（発現）することができます。神経発火<sup>注7</sup>が起こると、膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが開き、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$ が細胞内に流入し、GCaMP と  $\text{Ca}^{2+}$ が結合し、GCaMP の蛍光が明るくなります。これを蛍光顕微鏡で観察することで、神経発火や  $\text{Ca}^{2+}$ 動態を計測することができます。この GCaMP の開発により、神経科学分野において神経活動イメージング法が急速に普及しました。しかし、GCaMP のように高性能なセンサーは限られており、例えば、cAMP に対する蛍光センサーや、赤色の蛍光色を持つ  $\text{Ca}^{2+}$ センサーの開発は遅れていました。このため、 $\text{Ca}^{2+}$ と cAMP の相互作用を高精度で同時に観察することはできませんでした。

そこで、本研究グループはこれらの問題を解決するために、高感度の緑色蛍光 cAMP センサーと赤色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ センサーを開発し、同時に観察することで、 $\text{Ca}^{2+}$ と cAMP の関係性を明らかにすることを目的としました。

## 2. 研究手法・成果

高感度の緑色蛍光 cAMP センサーを開発するためには、cAMP への親和性と、cAMP が結合したときの蛍光上昇率の、両方を高める必要がありました。そこでまず、cAMP への親和性を高めるため、様々な生物種由来の cAMP 結合タンパク質を比較し、cAMP 親和性が高いものを選んでセンサーに使用しました。更に、蛍光上昇率を高めるため、発色団付近のアミノ酸配列を変化させた約 250 種類の候補センサーを作製し比較しました。これらの実験結果として、高い cAMP 親和性と蛍光変化率を持つアミノ酸配列を見つけることに成功し、これを cAMPinG1 と名付けました。cAMPinG1 を既存の cAMP センサーである Flamindo2 や gCarvi、G-Flamp1 と比較したところ、cAMPinG1 は従来のものよりも高性能であることがわかりました。

cAMPinG1 は緑色蛍光を持つ cAMP センサーであるため、 $\text{Ca}^{2+}$ と cAMP の同時測定を目指す場合には、緑色ではない色の  $\text{Ca}^{2+}$ センサーが必要でした。緑色蛍光の次によく使用される蛍光色は赤色です。しかし、既存の赤色  $\text{Ca}^{2+}$ センサーとして知られていた jRGECO1a や XCaMP-R、R-GECO1.2 などは、生体イメージングにおいてはその感度が不十分であることが多く、改良の余地がありました。そこで本研究グループは、これらのアミノ酸配列を組み合わせたハイブリット体を作ることで、従来のものよりも高感度な赤色  $\text{Ca}^{2+}$ センサーである RCaMP3 の開発に成功しました。

両者を用いて生きたマウスの神経細胞に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ と cAMP の濃度変化を観察するため、次のような実験を行いました。cAMPinG1 と RCaMP3 のアミノ酸配列情報を搭載した AAV (アデノ随伴ウイルス)<sup>注8</sup>を、マウスの大脳皮質視覚野に局所投与し、神経細胞に感染させることで、cAMPinG1 と RCaMP3 を神経細胞に

発現させました。その大脳皮質直上の頭蓋骨を手術で除去し、代わりにガラス窓を取り付けました。マウスの頭部を蛍光顕微鏡の対物レンズ直下に固定することで、ガラス窓越しに神経細胞が発現する cAMPinG1 と RCaMP3 の蛍光を顕微鏡で観察しました。この手法により、数百個というたくさんの神経細胞のそれぞれから、cAMP 濃度を示す緑色蛍光と Ca 濃度を示す赤色蛍光の両方を観察することに世界で初めて成功しました。また、マウスを強制的に走らせると、ノルアドレナリン放出とアドレナリン受容体 (GPCR の一つ) の活性化による cAMP 上昇を示す細胞が観察されました。別の細胞では、Ca<sup>2+</sup>上昇に後続する cAMP 上昇がみられ、Ca<sup>2+</sup>依存性アデニル酸シクラーゼによる cAMP 上昇と考えられました。また、数百ミリ秒の単位で上昇・減少する Ca<sup>2+</sup>に比較して、cAMP の動きは数十秒単位と遅いことがわかりました。以上より、神経細胞において、発火と Ca<sup>2+</sup>シグナルが持つ情報と、GPCR シグナルが持つ情報は、cAMP シグナルとして統合され、数十秒の単位で細胞内に記憶されることを世界で初めて観察することに成功しました。

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究で開発した cAMPinG1 と RCaMP3 により、従来困難であった生きた動物の Ca<sup>2+</sup>と cAMP の同時計測が可能となりました。本研究では大脳皮質視覚野の神経細胞で実験を行いましたが、今後は、注意機能などを司る前頭前野や、記憶や情動を司る海馬や扁桃体、強化学習を司る線条体、睡眠や摂食行動などを司る視床下部など、他の脳領域に cAMPinG1 と RCaMP3 が応用されることで、様々な精神疾患の神経基盤を明らかにすることが期待されます。更に、Ca<sup>2+</sup>と cAMP は神経系に限らず多くの臓器や生物種において役割を果たすセカンドメッセンジャーであることから、広く生物学分野のイメージング法に応用されることが期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学技術振興機構 (JST)・戦略的創造研究推進事業のさきがけ研究領域「革新的光科学技術を駆使した最先端科学の創出」における研究課題「コンピュータホログラフィーを応用した活動電位発生機構の解明」(JPMJPR1906、坂本雅行)ならびに科学技術振興機構 (JST)・戦略的創造研究推進事業の ACT-X 研究領域「生命と化学」における研究課題「タンパク工学を基点としたオーファン GPCR の機能解明」(JPMJAX211K、横山達士)、日本医療研究開発機構 (AMED)・脳とこころの研究推進プログラム (領域横断的かつ萌芽的脳研究プロジェクト)における研究課題「光学的膜電位計測を応用した神経ネットワーク解析技術の開発」(JP21wm0525004、坂本雅行)の支援によって得られた成果です。

#### <用語解説>

**注1 Ca<sup>2+</sup>**：カルシウムイオン。多くの生物種・細胞種に存在する細胞内情報伝達物質 (セカンドメッセンジャー) の一つ。

**注2 cAMP**：サイクリック AMP (3'-5'-アデノシンリン酸)。多くの生物種・細胞種に存在するセカンドメッセンジャーの一つ。

**注3 アデニル酸シクラーゼ**：活性化すると cAMP を産生する酵素。アデニル酸シクラーゼを活性化する分子として、GPCR や Ca<sup>2+</sup>などが知られている。

**注4 GPCR (G タンパク質共役受容体)**：ヒトの全タンパク質の中で最大の遺伝子ファミリーを形成し、ヒトゲノムには約 800 種類の GPCR が存在している。ノルアドレナリン受容体やドパミン受容体、セロトニン受容体などを含み、創薬ターゲットとしても有用である。

**注5 蛍光タンパク質**：タンパク質の中で蛍光（物質が吸収した光のエネルギーを、光として再び放出する現象）を発するもの。その内部に発色団を持つ。励起されると、GFP（Green Fluorescent Protein、緑色蛍光タンパク）であれば緑色蛍光を、RFP（Red Fluorescent Protein、赤色蛍光タンパク）であれば赤色蛍光を放つ。蛍光タンパク質はオワンクラゲから 1962 年に初めて単離され、この発見と応用に対して 2008 年にノーベル化学賞が与えられている。

**注6 GCaMP**：緑色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーの一つ。GCaMP と  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すると、GCaMP の緑色蛍光は明るくなる。

**注7 神経発火**：神経細胞の膜電位が活動電位に達すること。発火することにより上流の神経細胞から下流の神経細胞へ情報を伝達する。

**注8 AAV（アデノ随伴ウイルス）**：神経細胞への遺伝子導入手法として神経科学分野で頻用される。任意の遺伝子を AAV に搭載することができ、神経細胞にその AAV が感染するとその遺伝子を発現する。

#### <研究者のコメント>

「この研究を始めた当初は思ったように cAMP の蛍光シグナルが *in vivo* で検出できず苦労しましたが、暗中模索しながら実験を重ね、最後には cAMP がどのような情報を脳内で表現することができるのかの一端を解明することができて良かったです。今後は、 $\text{Ca}^{2+}$  と cAMP 以外の生体内分子の動きを感知する蛍光センサーの開発を進めるとともに、これらのイメージング技術を精神疾患の病態解明に応用したいと考えています。」  
(横山達士)

「海外の研究グループとの厳しい競争になりましたが、共同研究者の先生方のおかげで、今回開発したセンサーが生体イメージングに有用であることを示すことができました。今後もさらなる脳機能の解明を目指して、実用的なツール開発に邁進していきます。」(坂本雅行)

#### <論文タイトルと著者>

タイトル： A multicolor suite for deciphering population coding of calcium and cAMP *in vivo*

著者： Tatsushi Yokoyama, Satoshi Manita, Hiroyuki Uwamori, Mio Tajiri, Itaru Imayoshi, Sho Yagishita, Masanori Murayama, Kazuo Kitamura, Masayuki Sakamoto

掲載誌： *Nature Methods*

DOI：10.1038/s41592-024-02222-9