

ビジュアルバイオロジー

－タンパク質でできた蛍光 Ca^{2+} センサーの開発から－



研究室紹介

永井健治*

Visualbiology
- From the Story of Fluorescent Ca^{2+} Sensor Development -

1. はじめに

我々の研究室で行っている研究を一言で表現するならば、「百聞は一見に如かず」を地でいく研究です。生きた細胞の中で繰り返されている分子レベルの様々な現象を可視化して理解する。非常に単純な戦略でありかつ説得力を持った現象の説明が可能になるものの、それを実現するのはそう簡単ではありません。また、その難しさを克服するだけでは面白い研究につながりません。同業の研究者にはもちろんのこと、一般の方たちにも面白いと思ってもらえる研究をするために我々の研究室で掲げている標語は「先ずは疑う」です。教科書や論文に書いてあることが全部正しいとは限りませんし、常識とされている知見を覆す結果を出すことほど痛快なことはいからです。そしてもう一つは、なんでも良いので研究の中に「一番」を含めることです。ただし、多くの研究者がその道の一番を目指していますので、同じようなことをやっているだけでは簡単に一番になれません。そこで「流れに掉ささない (流行に乗らない)」ことにより、あまり誰も注目していないところを突いて一番になるという姿勢も大事にしています。以下、このような研究方針のもとで得られた成果を紹介し、我々の研究の面白さを感じてもらおうと思います。

2. 世界で“一番”高感度な蛍光 Ca^{2+} センサーで垣間見えた細胞間シグナル伝達

カルシウム (Ca) は動物・植物を問わず、生きていくうえで欠かせない必須元素のひとつです。ヒトの身体にはおよそ 1.5kg の Ca が存在しており、そのほとんどが骨や歯にヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) の形で沈着しています。一方で数 g の Ca が血液や細胞内に遊離したカルシウムイオン (Ca^{2+}) の状態で存在しています。このたった数 g の Ca^{2+} は大した量ではないと思われるかもしれませんが、実は生命活動に不可欠な役割を果たしています。 Ca^{2+} の恒常性に異常が生じると、躁うつ病や循環器疾患、アレルギー疾患、内分泌異常、不整脈やてんかん等々、様々な疾病が引き起こされます。これまでの研究から Ca^{2+} の濃度は定常状態の細胞内では 100nM 弱程度に保たれており、細胞外からの生理活性分子による刺激が細胞内に伝達されると細胞外からの Ca^{2+} 流入などにより、数 μM にまで一過的に上昇することが知られています。この一過的な Ca^{2+} 濃度の上昇が多くのタンパク質を活性化し、筋収縮や神経伝達、内分泌などを引き起こすのです。このように既に Ca^{2+} についての知見は十分に蓄積していると言っても過言ではないのですが、実はまだまだ「見えていない」現象が山のようにあると我々は考えています。なぜなら、従来の知見はそのほとんどが蛍光性 Ca^{2+} センサーを細胞に導入して、細胞外から人為的な刺激を与え、センサーが示す蛍光の変化を計測することで得られた結果から帰結されたものだからです。ここで二つの疑問が生じます。一つは「使用された Ca^{2+} センサーは妥当か?」。もう一つは「人為的な刺激は生理的な刺激を反映しているのか?」です。一つ目の疑問が生じた理由は、従来使用されてきた Fura-2 や G-CaMP、YC3.60 など蛍光 Ca^{2+} センサーの Ca^{2+} に



*Takeharu NAGAI

1968年9月生
東京大学大学院医学系研究科博士課程修了 (1998年)
現在、大阪大学産業科学研究所 生体分子機能科学研究分野 教授 医学博士 生物物理
TEL: 06-6879-8480
FAX: 06-6875-5724
E-mail: ng1@sanken.osaka-u.ac.jp

対する親和性が、どれも同じようなものばかり（解離定数 (K_d) が $0.5 \mu\text{M}$ 前後）だからです。 K_d が $0.5 \mu\text{M}$ の指示薬を用いた場合、定量的に測定できる Ca^{2+} 濃度はその前後の濃度、つまり 100nM から 1000nM の範囲に限定されます。その範囲を外れるとたとえ Ca^{2+} の濃度が変動していたとしても Ca^{2+} センサーが発するシグナルは変化しません。二つ目の疑問は、どの論文においても Ca^{2+} 応答が見られるまで人為的に与える薬剤の量を増やしているということから出てきます。細胞が自発的に活動している際にも同程度の薬剤が降りかかっている保証はどこにもありません。以上を総合すると、これまでの研究結果のほとんどが“無理やり刺激をして見えた”実験に基づいている可能性が大いにあると言えます。計測しなければならないのは人為的な刺激への細胞応答ではなく、真の意味での生理的条件、つまり動物・植物が内包する多細胞ネットワークの自発活動に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動です。両者の差は、刺激の強度やパターンのみならず、それぞれに対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動レンジが異なっている可能性が考えられます。上述のように既存の Ca^{2+} センサーの感度からすると、 Ca^{2+} 濃度が 100nM から 1000nM にまで変動すれば十分に大きなシグナル変化として検出できますが、もし自発的な変動が 10nM から 50nM への微小な変化であれば検出できません。このあり得るかもしれない“低濃度で微小な Ca^{2+} 濃度の変化”の有無を検証するには Ca^{2+} に対する K_d が数 10nM 程度の Ca^{2+} センサーを細胞に導入し、 Ca^{2+} 濃度の変化を可視化する必要があります。しかしながら、そのような Ca^{2+} センサーは世の中には存在しませんでした。 Ca^{2+} に対する親

和性が強すぎるため、細胞に導入すると細胞内の Ca^{2+} を食ってしまって、生理環境を乱してしまうだろうとの考えから、誰も開発しなかったのです。ならば自分たちの手で作ってみようということになり、我々が以前開発したタンパク質でできた蛍光性 Ca^{2+} センサー yellow cameleon の改良に乗り出しました。yellow cameleon は Ca^{2+} の結合に依存して相互作用するタンパク質であるカルモジュリン (CaM) と M13 を連結し、さらにそれを緑色蛍光タンパク質のシアン色変異体 (CFP) と黄色変異体 (YFP) でサンドイッチした構造を持つタンパク質です (図 1)。 Ca^{2+} の結合により CFP から YFP へのエネルギー移動 (FRET) 効率が上昇し、シアン色から黄色へと蛍光色が変わります。我々は yellow cameleon の Ca^{2+} 親和性を上げるために、 Ca^{2+} が結合する CaM にアミノ酸変異を導入したものを多数作成しましたが、いずれも Ca^{2+} 親和性が低くなるものばかりで親和性を増すような変異を見いだすことはできませんでした。そこで戦略を変えて CaM と M13 の連結のさせ方を改変してみました。従来の yellow cameleon では CaM と M13 の間が 2 アミノ酸 (Gly-Gly) からなるリンカー配列で連結されていましたが、2 アミノ酸で連結された CaM-M13 は立体構造的に窮屈な形をとっているため、 Ca^{2+} に対する親和性が低くなっているであろうと考えた訳です。実際に CaM と M13 の間のリンカー長を 2 アミノ酸から 3 アミノ酸に伸ばしたところ Ca^{2+} 親和性は 50nM に向上しました。これに味を占めて、リンカー長を段階的にのぼした結果、リンカー長 4 アミノ酸で $K_d = 30\text{nM}$ 、リンカー長 5 アミノ酸で $K_d = 15\text{nM}$ まで向上しました。最強の Ca^{2+} キレーターとして知ら

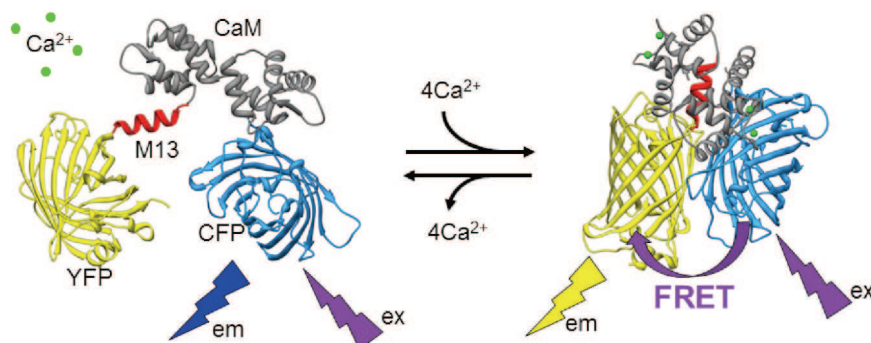


図 1. タンパク質でできた蛍光 Ca^{2+} センサー yellow cameleon の構造模式図

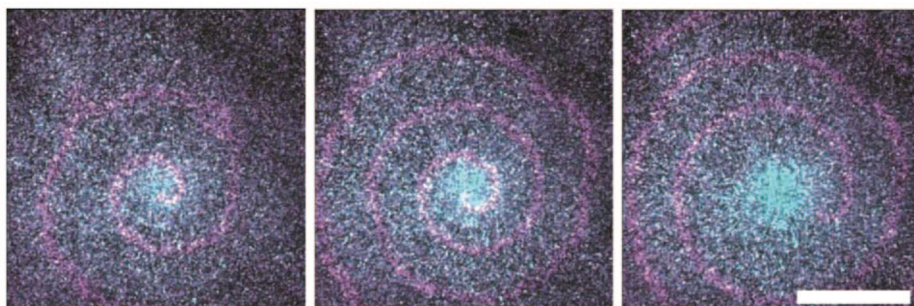


図2. YC-Nano で可視化された10万個の細胞集団中に生じるらせん状のシグナル伝播.
マゼンタ:細胞内Ca²⁺の高い領域. スケールバー 1mm

れるEGTAよりも10倍も強くCa²⁺と結合するセンサーができてしまったのです。我々はこの世界最高のCa²⁺親和性を有する改良型センサーをnMレベルのCa²⁺濃度を測定できることにちなんでyellow cameleon-Nanoと命名しました。yellow cameleon-Nanoを用いて、走化性応答により自発的に集合流を形成しつつある約10万個の細胞を対象にCa²⁺イメージングを行ったところ、周期長が400 μ m、周期が6分のらせん状に伝搬するCa²⁺波を可視化することに世界で初めて成功しました(図2)。また、1000個以上の細胞から構成される神経-筋ネットワークの自発的な活動パターンを生きたゼブラフィッシュ胚の中で計測できただけでなく、定常状態での神経細胞、筋細胞、表皮細胞のCa²⁺濃度が異なることも世界に先駆けて見出しました。これにより

Ca²⁺濃度の違いから細胞の分化状態や細胞種が特定できる可能性が示唆されました。

3. おわりに

このように我々の研究室は冒頭で述べた三つの標語「先ずは疑う」「一番」「流れに掉さず」を意識しながら面白い研究を行うことを心がけています。ごく最近では世界で最も明るい発光タンパク質Nano-lanternを開発し、動き回るマウスの体内にある癌組織をリアルタイムに可視化することに世界で初めて成功しました。現在はそのような技術を応用して「少数性生物学」なる新たな学問領域を開拓しつつあります。ご興味がありましたら、是非当研究室のホームページ(<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/>)を覗いてみてください。

