

博士学位論文審査要旨

2023年1月20日

論文題目： cAMP 特異的蛍光プローブの開発及び神経細胞 cAMP ライブイメージング

学位申請者： 川田 聖香

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

副査： 生命医科学研究科 准教授 舟本 聡

副査： 生命医科学研究科 准教授 齋藤 直人

要旨：

環状アデノシンーリン酸 (cAMP) は、セカンドメッセンジャー分子として歴史的に最初に同定された分子であり、原核細胞から哺乳類細胞に至るまで様々な細胞が機能発現のために cAMP を活用している。そのような普遍的な分子でありながら、細胞内動態に関しては多くの部分が未解決である。実時間で生じる生細胞内の cAMP 動態を解析できるようにするため、川田聖香氏は cAMP 特異的蛍光プローブの開発を行い、gCarvi と命名し発表した。gCarvi は遺伝子発現型蛍光プローブであり、分子生物学的手法によって様々な細胞に発現させることが可能であるため、汎用的 cAMP 動態解析ツールになりうる。特徴としては、cAMP に対する特異性が現時点で最も高く、0.1 秒以下の時間分解能で濃度変化に追従できる高速性を有するプローブである。gCarvi の蛍光特性としてスペクトル、モル吸光係数、量子収率などの詳細についても解析を行った。次に、gCarvi を海馬神経細胞に適用するための、アデノ随伴ウイルスベクターシステムを構築した。gCarvi 発現海馬神経細胞を使い、基底状態の cAMP 濃度が $1.4 \mu\text{M}$ であることを明らかにした。この設定濃度は、ちょうど下流の cAMP エフェクタータンパク質 (cAMP dependent protein kinase、Exchange proteins directly activated by cAMP) の活性化直前の濃度となっていることから合理的と言える。cAMP 合成酵素 Adenylyl cyclase (AC) には、膜貫通型 AC と可溶性型 AC がある。基底状態の cAMP 合成はこのうち、可溶性型 AC が主に担っていることを、薬理的に明らかにした。続いて、gCarvi と赤色蛍光 Ca^{2+} プローブである jRCaMP1b を海馬神経細胞に共発現させることによって、cAMP 動態と Ca^{2+} 動態の相互作用に関して解析を行った。細胞全体の cAMP が大きく上昇すると、基底 Ca^{2+} が上昇し、そのうち半数以上の細胞では Ca^{2+} スパイクも上昇することを明らかにした。反対に、自発活動程度の低頻度の Ca^{2+} スパイクを誘発しても、cAMP は変動しないことも明らかにした。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2023年1月20日

論文題目： cAMP 特異的蛍光プローブの開発及び神経細胞 cAMP ライブイメージング

学位申請者： 川田 聖香

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

副査： 生命医科学研究科 准教授 舟本 聡

副査： 生命医科学研究科 准教授 齋藤 直人

要 旨：

上記申請者に対して、2023年1月19日、16時-17時半に総合試験を行った。論文内容の口頭発表に関しては、必要量の研究背景の説明と、要点を押さえた結果の説明が出来ていた。専門分野の質疑等を介して、1. 各々のデータに対する建設的な理解、2. 当該蛍光プローブの世界的現状の理解、3. 蛍光プローブを細胞に発現させた際の問題点や、現段階での蛍光イメージング上の限界とそれを克服するアイデアに関する理解、4. cAMP を軸とした神経生理学的な洞察力、5. 周辺学術分野に対する発展的考察力、の試験を行い、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしい人物であると判断した。また、博士（後期）入学試験時の語学試験（英語）に合格していることから、十分な語学能力を有している。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

Abstract of Doctoral Dissertation

論文題目：cAMP 特異的蛍光プローブの開発及び神経細胞 cAMP ライブイメージング
Title of Doctoral Dissertation

氏名：川田 聖香
Name

要旨：
Abstract

cAMP シグナリングは原核生物から哺乳類に至るまで様々な生物種で保存されている古典的なシグナル伝達機構である。哺乳類細胞において cAMP シグナリングは細胞接着やホルモン分泌、遺伝子発現など広範な細胞機能を制御している。特に神経細胞の cAMP シグナリングは秒単位から日単位までの幅広いタイムスケールの生理現象を制御している。例えば、発生期において軸索内に形成される cAMP 勾配が軸索伸長を決定し、成長円錐の cAMP 濃度上昇が軸索伸長を促進している。新生嗅細胞では基底状態の cAMP 濃度が嗅神経の anterior-posterior 軸の投射距離を制御し、成熟嗅細胞の匂い分子受容時には cAMP が受容器電位を発生させることで電気信号に変換している。成熟期における海馬神経細胞では、cAMP シグナリングが学習の分子基盤である長期増強の成立や、長期増強の持続時間を延ばすスイッチとなっている。小脳平行線維にあるサイレントシナプスの活性化は、cAMP シグナリングによって生じ、cAMP シグナリングは既に活性化しているシナプスでは長期増強を引き起こす。さらに、老化による cAMP シグナリングの減弱は認知機能低下と相関する。

cAMP はこれら多様な神経機能に関与しているが、細胞内 cAMP の制御機構はシンプルである。cAMP は ATP から adenylyl cyclase (AC) によって合成され、phosphodiesterase (PDE) によって分解される。細胞内の cAMP 濃度はこれらの酵素活性のバランスによって規定される。細胞内 cAMP 濃度上昇は、下流分子である cAMP dependent protein kinase (PKA) や exchange proteins directly activated by cAMP (Epac) などのエフェクタータンパク質の活性化ならびに環状ヌクレオチド作動性チャネルの開口を引き起こす。その結果として、多彩な機能的細胞応答が生じる。問題は、cAMP 動態がどのようにして、様々な入力情報や細胞内部情報に対応して、個別の下流カスケードを使い分けているのかである。

この問題を明らかにするためには、実時間の cAMP 動態をリアルタイムで直接捉えることが重要である。分子の経時的な細胞内分布を明らかにするためには、蛍光リアルタイムイメージング法が極めて有効である。特に、神経細胞は軸索や樹状突起など複雑な形態をとることから、局所空間に限局した cAMP シグナリングを使い分けていることが考えられる。以上のことから、cAMP 蛍光リアルタイムイメージング法を神経細胞に適用する意義は大きい。

蛍光リアルタイムイメージング法で用いられる蛍光指示薬は、リガンドが結合することによって生じるプローブの構造・環境変化を蛍光情報に変換して外部から測定を可能にした分子である。セカンドメッセンジャーである Ca^{2+} の動態を可視化する研究において、1980 年代初期に fura-2 を代表とする蛍光 Ca^{2+} 指示薬が登場して以降、多種類のケミカル Ca^{2+} 指示薬が作製された。1997 年に共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した遺伝子発現型 Ca^{2+} 指示薬 (GECI) として cameleon が登場した。以後、200 種類以上の GECI が開発され、現在 GECI は主要な Ca^{2+} イメージング手法として幅広い研究に用いられている。 Ca^{2+} 指示薬の登場によって、 Ca^{2+} 振動、波、ドメイン、及び様々な素量放出といった Ca^{2+} 動態の様式が明らかになり、生体機能発現基盤の理解が深まった。 Ca^{2+} の動態を可視化する研究は、リアルタイムイメージング全般の技術開発の推進力としても貢献してきた。

これに対し、最初の cAMP 指示薬として 1991 年に PKA を用いた FRET 型蛍光プローブとして FICRrhR が開発された。しかし、更なるケミカル cAMP 指示薬の開発は進まなかった。21 世紀以降、遺伝子発現型 cAMP 指示薬がいくつかの研究室から報告されるようになったが、cAMP シグナリングのより広く深い理解は確立されていない。cAMP シグナリングのダイナミクスの本質を見抜くことができていない理由の一つとして、個々の細胞での cAMP 動態の多様性に対して、使用できる cAMP プローブの種類があまりにも少ない点があげられる。現に、神経細胞に最適な cAMP プローブは未開発であった。

そこで本研究では、神経細胞の cAMP 動態の時間経過や局所濃度などの多様性を明らかにすることが可能な遺伝子発現型 cAMP 指示薬の開発を目指した。プローブの条件として、(1) 発現、検出が容易であること、(2) 細胞内 cAMP 濃度範囲をカバーするダイナミックレンジを有すること、(3) cAMP への特異性の高さ、(4) 安定して細胞内イメージングが可能であること、(5) 十分な結合・解離速度をもつことを掲げた。以上の点を考慮し、取り扱いが容易でシンプルな cAMP プローブを戦略的に開発した。

cAMP プローブの開発にあたり、まず cAMP 結合配列を選定した。哺乳類細胞に導入することを目指すため、多くの cAMP プローブで用いられている内因性の cAMP 結合タンパク質 (PKA, Epac 等) を避け、大腸菌由来の cAMP 結合タンパク質 (CRP) がもつ cAMP 結合ドメイン (CBD) を採用した。CRP の CBD は哺乳類細胞が有する CBD に対してアミノ酸相動性が 30 %未満であるため、内因性 cAMP 結合タンパク質に干渉しにくいと考えられる。また、簡便にシグナルを検出するため、採用例の多い FRET 型ではなく円順列変異型 GFP (cpGFP) を用いた単色型を採用した。CBD-cpGFP のスクリーニング時に 1) CBD の C 末端側のアミノ酸配列の長さ、2) cpGFP の種類、3) CBD と cpGFP を繋ぐアミノ酸の種類 の 3 点について検討した。また、cGMP に反応しないことに留意してスクリーニングを進めた。その結果、励起 504 nm、蛍光 523 nm の単色型 cAMP 緑色蛍光プローブ (gCarvi) の開発に成功した。gCarvi は cAMP に結合すると緑色蛍光強度が上昇し、cAMP に対する特異性は cGMP に対して 100 倍以上である。この cAMP 特異性は他の既存の遺伝子発現型 cAMP プローブと比べて極めて高い。gCarvi の分子量は 45 kDa で、cAMP プローブとしては最小クラスであり、細胞への発現も容易である。また、gCarvi は 0.2~20 μM の範囲の細胞内 cAMP 濃度をモニターでき、pH 6.5~7.5 の範囲で 2.5 倍の蛍光変化幅を保ち、pH 5.5~9.0 の間で 2 倍以上の蛍光変化幅を維持している。gCarvi の結合速度定数は $1.38 \pm 0.25 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数は $3.31 \pm 0.77 \text{ s}^{-1}$ である。この結合速度定数から、10 μM cAMP 上昇を 0.07 秒の時定数でイメージングできることがわかる。これらの結果より、gCarvi は秒単位で変化する cAMP 動態を捉えるのに十分な結合解離速度をもつ遺伝子発現型 cAMP 蛍光プローブである。次に、gCarvi を応用したプローブを多数作製した。まず、gCarvi の N 末端に cAMP 結合の有無に関わらず一定の赤色蛍光を発する mCherry を融合した ratiometric gCarvi を作製した。その他、特定の部位に局在化させるターゲティングプローブを作製した。核ターゲットとして 3×SV40 NLS 配列 (gCarvi_{nuc})、細胞膜ターゲットとして Ha-Ras C terminal 配列 (gCarvi_{mem})、シナプス前末端ターゲットとしてヒト由来の Synapsin 全長 (gCarvi_{pre}) をターゲティングタグとした gCarvi シリーズを作製し、いずれも生細胞でのイメージングに成功した。

細胞内の basal cAMP 濃度として 0.1~13 μM の範囲の報告があるが、神経細胞での正確な値については未解決である。Basal cAMP 濃度を知ることは、細胞内の生理機能を考える上での基盤となる。神経細胞には PKA や Epac が存在し、これらの分子の活性化状態を判断する上でも basal cAMP 濃度を知ることは重要である。細胞内 cAMP 濃度を定量的に解析するため、ratiometric gCarvi を使用して海馬神経細胞内の basal cAMP 濃度を算出した。Ratiometric gCarvi の 2 波長イメージングにより、プローブ濃度情報を相殺することで、正味の細胞内 cAMP 濃度の定量が可能となる。遺伝子導入にはアデノ随伴ウイルスを用い、SynTetOff システムを用

いて発現量を改善した。Ratiometric gCarvi 発現海馬神経培養細胞に既知濃度の cAMP 溶液を細胞内へ透過させることで、細胞内キャリブレーションカーブを作成した。gCarvi は細胞内でも精製 gCarvi タンパク質と同等の特性を示した。また、無傷時の cpGFP/mCherry 蛍光比と細胞内キャリブレーションカーブから、海馬神経細胞内の basal cAMP 濃度は $1.38 \pm 0.59 \mu\text{M}$ であると求めた。これは、PKA の活性化直前の濃度であると考えられる。また、gCarvi の解離定数と basal cAMP 濃度が近似していることから、gCarvi は神経細胞の cAMP 動態をイメージングする上で最適なプローブであるといえる。次に、basal cAMP 濃度がどのようにして形成されているのかを検討した。Ratiometric gCarvi を発現した海馬神経細胞に AC 阻害剤を投与したところ、可溶性 AC 活性が basal cAMP 濃度を維持する主成分であることを明らかにした。

単色型プローブの特徴として、他のプローブと共存させやすいという利点がある。そこで、実際に神経細胞内で cAMP と Ca^{2+} のイメージングを同時解析できることを海馬神経培養細胞に gCarvi と赤色蛍光 Ca^{2+} プローブ jRCaMP1b を共発現することで調べた。AC 活性化剤 Forskolin と PDE 阻害剤 IBMX を海馬神経細胞に同時投与したところ、cAMP 濃度が上昇した。この cAMP 濃度上昇に伴い、 Ca^{2+} スパイクや basal Ca^{2+} の上昇が生じた。一方で、5 Hz, 10 Hz, 20 Hz 1 秒間の電気刺激で誘発される Ca^{2+} スパイクは cAMP 動態を変化させなかった。

本研究で使用した gCarvi は、高い cAMP 特異性、広いダイナミックレンジ、海馬神経細胞の cAMP 濃度に適した K_d 値を有している。さらに、速い結合解離速度は空間的に区画化された cAMP ドメインを検出する上で非常に有利な特性である。今後、gCarvi を脳内の様々な部位に適用することで神経細胞の細胞体、軸索、樹状突起、さらにはシナプス前末端やスパインに焦点をあてた cAMP イメージングを行い、cAMP ドメインの生理的意義を明らかにできるものと考えられる。