

博士学位論文

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

同志社大学大学院 生命医科学研究科 医生命システム専攻

神経生理学研究室

2018 年度 2003 番 川田 聖香

目次

第1章 序論	4
1.1. セカンドメッセンジャーcAMP の細胞内制御機構	
1.2. 神経細胞における cAMP シグナリングの機能	
1.3. イメージングの意義	
1.4. 蛍光プローブ開発の変遷	
1.5. 本研究の概要	
第2章 材料と方法	10
2.1. 倫理的宣言	
2.2. cAMP 蛍光プローブ作製・発現のためのプラスミド作製	
2.3. cAMP 蛍光プローブタンパク質の合成と精製	
2.4. cAMP 蛍光プローブのスクリーニング解析	
2.5. cAMP 蛍光プローブの蛍光特性解析	
2.6. 速度論解析	
2.7. 海馬初代培養	
2.8. AAV 作製・濃縮	
2.9. 蛍光イメージング	
2.10. データ解析	
第3章 結果	20
3.1. 単色型 cAMP 蛍光プローブの開発スクリーニング	
3.2. gCarvi の蛍光特性	
3.3. gCarvi の結合・解離速度論解析	
3.4. 定量型 gCarvi のスクリーニングとイメージング	
3.5. ターゲティング型 gCarvi の開発とイメージング	
3.6. 神経細胞特異的かつ高発現型の cAMP プローブ導入法の確立	
3.7. 細胞内 basal cAMP 濃度の計測	
3.8. gCarvi と jRCaMP1b を用いた細胞内 cAMP/Ca ²⁺ 同時イメージング	
第4章 考察	64
4.1. gCarvi は cAMP 高特異性プローブである	
4.2. gCarvi は秒単位の時間分解能をもつ cAMP プローブである	

4.3. 細胞内 basal cAMP 濃度と形成メカニズム

4.4. 神経細胞内 cAMP/Ca²⁺のクロストーク

4.5. 結語

参考文献 72

謝辞 80

第1章 序論

1.1. セカンドメッセンジャーcAMPの細胞内制御機構

生物は常に変化している外界の環境に適応するため、様々な情報を受容している。生体内ではそれらの情報に対応した生理的な細胞応答が生じている。このようなシステムは単細胞生物である大腸菌などの原核生物から多細胞生物であるヒトまで、幅広い生物種が保持している。

細胞外からのシグナル伝達物質はファーストメッセンジャーと呼ばれ、神経伝達物質やホルモン、サイトカインなどがある。ファーストメッセンジャーが、細胞膜上に存在する受容体に結合すると、細胞内で2次的な情報伝達物質が産生され、外部からの情報を細胞内へと伝達している。この細胞内情報伝達物質をセカンドメッセンジャーという。1957年、Earl Wilbur Sutherland Jr.が肝細胞のグリコーゲン分解に関するアドレナリンの作用を研究する過程で、環状アデノシンリン酸 (cyclic AMP, cAMP) を発見したことで、細胞内セカンドメッセンジャーという基本概念が打ち立てられた。

上記の cAMP シグナリングはファーストメッセンジャーが G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に結合し、GPCR が活性化するところから始まる。G タンパク質の α サブユニットには Gs や Gi のサブタイプがある。アデニル酸シクラーゼ (AC) は ATP から cAMP を産生している。Gs タンパク質は AC を活性化することで cAMP 産生を促進し、Gi タンパク質は阻害することで cAMP レベルを低下させる (Rodbell et al., 1971, Ross et al., 1978)。AC には膜結合型のアイソフォームが AC1~9 まで存在し、重炭酸イオンに反応する可溶性 AC (soluble AC, sAC) がある (Dessauer et al., 2017, Wiggins et al., 2018)。cAMP の下流エフェクター分子には、cAMP dependent protein kinase (PKA)、exchange proteins directly activated by cAMP (Epac)、環状ヌクレオチド作動性イオンチャネル (CNGC) や Popeye ドメイン含有タンパク質 (Popdc) など cAMP 動態を元に細胞応答に情報を変換している (図 1)。また、cAMP シグナリングを負に制御する cAMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) には PDE1~11 までのアイソフォームが存在する (Bender et al., 2006)。哺乳類細胞において cAMP シグナリングは遺伝子発現や細胞分化、ホルモン分泌など様々な細胞機能を制御している。GPCR のシグナル伝達系異常は、糖尿病やガンなどの疾患にも関係することから治療標的となっている (London et al., 2022, Gao et al., 2022)。そのため、GPCR の下流シグナルである cAMP の動態を分子・細胞レベルで理解することは今後の基礎医学研究においても重要な課題である。

1.2. 神経細胞における cAMP シグナリングの機能

脳の構造上および機能上の基本単位である神経細胞では、幼弱期から成熟期にかけて様々なタイミングで細胞内空間において絶えず情報伝達物質の処理が行われている。その内、cAMP シグナリングも神経細胞において多種多様な応答を制御している。例えば、成長円錐の cAMP が軸索伸長を促進していることも報告されている (Gorshkov et al., 2017)。海馬神経細胞の発生初期では、軸索には A キナーゼアンカータンパク質 (AKAP) によって cAMP-PKA-PDE 軸のネガティブフィードバックが存在し、cAMP 濃度が低く設定されている。しかし、後期になるとこのネガティブフィードバックがなくなり、軸索内に cAMP 濃度勾配が生じることで軸索伸長がスタートする (Kirill et al., 2017)。新生嗅細胞では基底状態の cAMP 濃度が嗅神経の投射距離を制御し、成熟後は匂い分子を受容すると 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 (Imai et al., 2006, Restrepo et al., 1996)。海馬においては、cAMP シグナリングが学習の分子基盤である長期増強 (LTP) 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 (Kovács et al., 2007)。小脳平行線維では、約半数がシナプスを形成していながら機能はしていないサイレントシナプスである。それらサイレントシナプスの活性化に cAMP シグナリングが関係している (Chavis et al., 1998, Ma et al., 1999, Yao et al., 2006)。また、すでに活性化しているシナプスでは cAMP シグナリングが LTP を引き起こす (Michael et al., 2011)。一方で、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という報告がある (Kelly et al., 2018)。これらのことから cAMP は、中枢神経系機能において重要な役割を果たしているといえる (Lee, 2015)。

しかし、多岐に渡る細胞応答を共通の cAMP シグナリングでどのようにして個別に制御しているのかは不明である。cAMP シグナリングは細胞膜上にある受容体から細胞内のエフェクタータンパク質へと直線的に作用しているだけでなく、空間的にシグナリングが個別制御され、局所的に活性化を調節しているという考えがある。このような区画化された cAMP シグナリングのことを cAMP ドメインという (Cooper and Tabbasum., 2014, Kapiloff et al., 2014)。神経細胞内に cAMP ドメインが存在しているのかは不明であるが、高度な極性をもった構造をもった細胞構造の中で cAMP 動態がこういったタイミングで、どの空間で生じているのかを明らかにするためには、実際に cAMP 動態を可視化するリアルタイムイメージング法が有効である。

1.3. イメージングの意義

肉眼では見えないものを見てみたいという欲求は、神経科学の発展にも大きく貢献してきた。脳の神経細胞の機能を解明するため、これまで様々な実験手法が駆使されてきた。ゴルジ染色法によって神経細胞の形態を詳細に調べられた。免疫染色法によって分子の組織内または細胞内の局在が調べられた。ただし、染色を行うために標本を固定するため、時間情報は失われる。一方で、電気生理学的手法は、生細胞内でのミリ秒単位での電気応答を測定できるため、時間分解能に優れているが、空間情報は得られない。これに対して、生きた細胞の実時間で分子の動きを捉えるリアルタイムイメージングは時間情報と空間情報を同時に取得できる手法である。樹状突起や軸索など複雑な形態をとる神経細胞では、その局所空間に限局したシグナリングを様々なタイミングで活用していると考えられるため、リアルタイムイメージング手法を適用する意義は大きい。

1.4. 蛍光プローブ開発の変遷

リアルタイムイメージング法を適用するには、目的分子を生細胞内で可視化する必要がある。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変化・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として、1980年代初期に fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985) を代表とする細胞膜透過性蛍光カルシウム指示薬が登場して以降、多種類のケミカル Ca^{2+} 指示薬が作製されてきた。その後、1997年にはフェルスター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 (genetically encoded calcium indicator, GECI) として cameleon (Miyawaki et al., 1997) 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生命科学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、波動、ドメイン、および多くの種類の素量放出 (Berridge, 1997, Berridge et al., 2003) といった Ca^{2+} 動態の様々な側面が明らかになり、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。

これに対して、最初の cAMP 指示薬として 1991年に PKA を用いた FRET 型ケミカル蛍光指示薬として FICRhR が開発された (Adams et al., 1991)。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、GECI の 1/20 の数ではあるが、いくつかの研究室から報告された (Jiang et al. 2017)。それにも関わらず、cAMP シグナリングの広く深い理解は確立できていない。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 ダイナミクスのバリエーションに対して、利用できる cAMP プローブのバリエーションが少ない点が挙げられる。これまでの研究から基底状態の細胞内 cAMP 濃度の範囲は 0.1 μM 未満

から 13 μM 程度であると推定される (Bacsikai et al., 1993, Muntean et al., 2018, Jiang et al., 2019, Koschinshi and Zaccolo, 2017, Byczkowicz et al., 2019)。このように、個々の細胞の cAMP 動態にあわせた K_d をもつ cAMP プローブを選定する必要があるものの、神経細胞に最適な cAMP プローブは未開発であった。

1.5. 本研究の概要

本研究では、cAMP シグナリングの時間経過や局所濃度など、神経細胞の cAMP シグナルの多様性を明らかにすることができるような遺伝子発現型 cAMP 指示薬の開発を行った。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広いダイナミックレンジを有すること、(3) cAMP に対する特異性が他のヌクレオチド、特に cGMP に対して高いこと、(4) 安定して細胞内イメージングが可能であること、(5) 内因性の cAMP 経路に干渉しないことを掲げた。

以上の点を考慮し、取り扱いが容易な cAMP プローブを戦略的に開発した。これまでに開発されてきた cAMP プローブの大部分は、PKA 調節サブユニットまたは Epac の全長、またはそれぞれの cAMP 結合ドメイン (cAMP binding domain ; CBD) を利用したものである (Jiang et al., 2017)。これらの酵素は、cAMP シグナル伝達の下流の必須分子としてよく知られており、その配列を利用したプローブでは内在性分子との相互作用を否定できない。さらに、これらの cAMP プローブは、cGMP に対して無視できない程度の応答性を有する。本研究では、細菌の CBD を用いた新しい cAMP プローブを開発した。大腸菌の転写因子である cAMP receptor protein (CRP) は、CBD に cAMP が結合することで DNA binding domain の構造変化を引き起こす (Popovych et al., 2009)。また、CRP の CBD は哺乳類の PKA や EPAC およびその他の cAMP 結合タンパク質に対して、30 % 以下のアミノ酸一致相同性しか示さない (Shabb et al., 1992) ことから内在性 cAMP 結合分子と干渉しにくいと考えた。遺伝子発現型 cAMP プローブは、大きく分けて FRET ベースのものと、円順列変異型タンパク質ベースのものに分けられる。円順列変異型プローブは、1 分子で検出可能、かつプローブサイズも小さくなることから、FRET ベースのものと比較して遺伝子発現も容易になり、測定手法も簡便である。本研究の開発する cAMP プローブは扱いやすさを念頭においているため、CRP の CBD に円順列変異型 GFP を融合したものを cAMP プローブ候補分子とした。スクリーニングの際には、プローブ候補分子の cGMP に対する応答性に留意した。もう一つの環状ヌクレオチドセカンドメッセンジャーである環状グアノシンリン酸 (cGMP) は、プロテインキナーゼ G (PKG) や CNG チャネルを活性化し、様々な細胞機能を制御している (Pfeifer et al., 2013)。また、cAMP と cGMP はともに、様々なシナプス伝達の調節に関与している (Argyrousi et al., 2020)。また、cGMP の生理的な濃度は 0.1~3 μM の範囲であると考えられることから (Trivedi et al., 1998, Thunemann et al., 2013, Ros et al., 2019)、cAMP イメージング中に cGMP を検出することがないように、cAMP/cGMP

選択性に注意して cAMP 蛍光プローブの開発を行った。また、cAMP プローブの結合解離定数はリアルタイムにシグナルを検出する上で重要な要素である。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードと局所灌流装置を組み合わせ、開発した cAMP プローブの結合解離速度を求めた。光学系で簡便なイメージングのためには、細胞への発現効率も重要である。そのため、cAMP プローブをアデノ随伴ウイルスベクターを用いて神経細胞に容易に発現可能であることを検証した。

更に定量型の cAMP プローブを開発し、神経細胞内のあらゆる生理的な細胞機能を担う cAMP シグナリングの解釈の基礎となる海馬神経細胞内の basal cAMP 濃度を求めた。

また、軸索伸長や LTP 誘導では cAMP シグナリングは常に Ca^{2+} シグナルと連動していると考えられている。アフリカツメガエルの胚性脊髄ニューロンでは cAMP と Ca^{2+} が同期することが明らかになっているが (Gorbunova and Spitzer, 2022)、同じ細胞内でのクロストークは不明であった。そこで、gCarvi と GECI の 1 つである jRCaMP1b を同一海馬神経細胞に発現させ、cAMP と Ca^{2+} の同時イメージングを行い、cAMP と Ca^{2+} との間に同一細胞内でどのようなシグナリングの連動が存在するのか検証した。

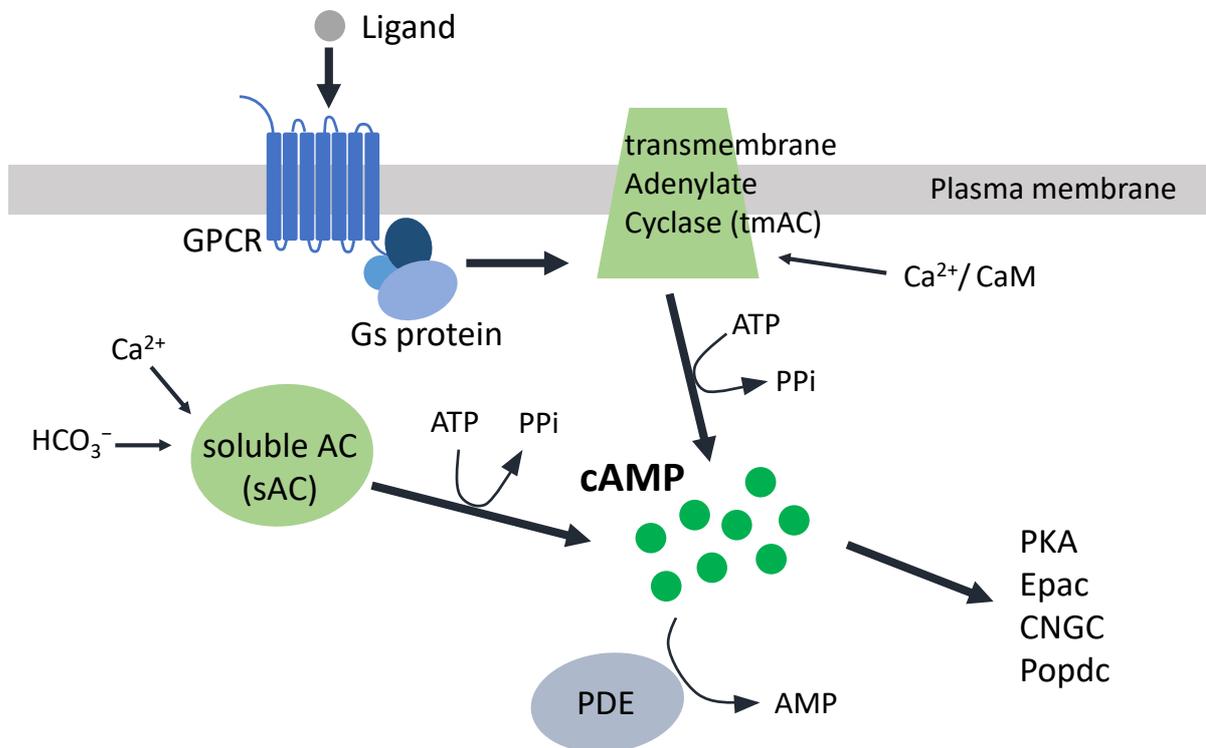


図1. 哺乳類細胞における cAMP シグナルカスケード

cAMP シグナルカスケードの制御はシンプルに合成と分解の系で成り立つ。膜貫通型ならびに可溶性アデニル酸シクラーゼ (tmAC, sAC) が ATP を基質として cAMP を合成する。これら AC は細胞外リガンドを起点とする G タンパク質の活性化や Ca²⁺によって活性化される。また、ホスホジエステラーゼ (PDE) によって cAMP は分解される。cAMP はエフェクタータンパク質である cAMP dependent protein kinase (PKA)、exchange proteins directly activated by cAMP (Epac)、環状ヌクレオチド作動性イオンチャネル (CNGC) や Popeye ドメイン含有タンパク質 (Popdc) を活性化させ、様々な細胞応答を引き起こす。

第2章 材料と方法

2.1. 倫理的宣言

実験動物の扱いは、「同志社大学動物実験等の実施に関する規程」に基づいて慎重に行った。

2.2. cAMP 蛍光プローブ作製・発現のためのプラスミド作製

大腸菌 (DH5 α , Takara) CRP の cAMP 結合ドメイン (CBD, a.a. 1-129...138, or 156, GenBank Accession No. KP670514) の Genomic DNA を表 1 のプライマーを用いて PCR で増幅し、その後シーケンス確認を行った。また、CBD135 番目のアミノ酸を置換した CBD 配列は表 2 のプライマーを用いて PCR で増幅し、シーケンス確認を行った。GCaMP3 (Addgene) 由来の cpGFP (a.a. 61-301, GenBank Accession No. HM143847) は表 3 のプライマーを用いて PCR で増幅し、シーケンス確認を行った。その後、GCaMP3 由来の cpGFP をテンプレートとし、表 4 のプライマーを用いた PCR で一連の cpGFP 変異体を作製した。これらの PCR 産物をサブクローニングベクター pBluescript II KS(+) (Agilent) に挿入した後、シーケンス確認を行った。cpGFP は CBD の C 末端にある Xho I サイトに融合させた。大腸菌でタンパク質を発現させるため、CBD-cpGFP コンストラクトを His-tag を含む pCold I (Takara) に挿入した。mCherry-CBD-cpGFP と TagRFP-CBD-cpGFP の構築には、それぞれ pmCherry-C1 (Clontech) と pTagRFP-C (Evrogen) を用いた。ターゲットコンストラクトの構築において、核ターゲットには 3 \times SV40 NLS 配列を、細胞膜ターゲットには Ha-Ras C-terminal 配列を、シナプス前末端ターゲットには hSynapsin 全長を用いた (図 10)。海馬神経細胞でタンパク質を発現させるため、gCarvi (CBD-cpGFP) コンストラクトを pAAV2-SynTetOff (Sohn et al., 2017) に挿入した。

2.3. cAMP 蛍光プローブタンパク質の合成と精製

大腸菌タンパク質の合成

His-tag を含む pCold I-gCarvi を大腸菌 BL21 コンピテントセル (BioDynamics) にトランスフォーメーションした後、37 °C で OD₆₀₀ \approx 0.4 になるまで培養し、0.5 mM IPTG を添加して更に 15 °C, 200 rpm, 20~24 時間振盪培養し、タンパク質発現を誘導した。培地は LB 培地+ 100 μ g/mL ampicillin (Nacalai) を用いた。mCherry-CBD-cpGFP および TagRFP-CBD-cpGFP も同様の工程で行った。

タンパク質精製

24 時間振盪した培養液 50 mL を 4 °C, 6000 rpm, 20 分間遠心して集菌し、5 mL Bug buster protein extraction reagent (Novagen), 2.5 mg/mL Lysozyme (Sigma), 1/200 (v/v) Protease Inhibitor Cocktail for His-tag (Sigma) を添加し破菌した。続いて Talon コバルトレ

ジソン (Clontech) を用いて His-tag 付き CBD-cpGFP を結合させた。メーカーのバッチ手順に従い、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2), 300 mM NaCl, 150 mM イミダゾールを含む緩衝液を用いて CBD-cpGFP タンパク質を溶出した。その後、10,000 MW カットの限外濾過 (VIVASPIN 6, Sartorius) を用いてタンパク質を濃縮し、その緩衝液をリン酸緩衝生理食塩水に置き換えた。mCherry-CBD-cpGFP および TagRFP-CBD-cpGFP も同様の工程で行った。濃縮したタンパク質溶液は、4°Cで暗所にて保存した。

2.4. cAMP 蛍光プローブのスクリーニング解析

希釈溶液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 5 mM Ascorbate (Na 塩), 4 mM グルタチオン (GSH), 0.1 % Bovine serum albumin (BSA)) を用いて候補となる cAMP プローブの精製タンパク質を希釈した。cAMP, cGMP, cCMP, cTMP, 2', 3'-AMP, adenosine, AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP (全て Sigma にて購入) に対する蛍光強度変化を蛍光マイクロプレートリーダー (Infinite F200, TECAN) を用いて解析した。用いた蛍光フィルターは Ex: 485 nm (半値幅 20 nm) Em : 535 nm (半値幅 20 nm) と Ex: 560 nm (半値幅 20 nm) Em : 610 nm (半値幅 20 nm) である。Gain 設定が 60~70 の範囲におさまるように希釈率を調整した。

2.5. cAMP 蛍光プローブの蛍光特性解析

gCarvi のスペクトル解析と量子収率

精製した gCarvi タンパク質の吸光スペクトルは、UV 分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) を用いて測定した (350~550 nm)。蛍光スペクトルは、蛍光光度計 (FP-6500, JASCO) を用いて測定した (Ex: 400~510 nm, Em: 505~600 nm)。マイクロプレートリーダーを用いたスクリーニング解析と同じく、希釈溶液 (50 mM HEPES-NaOH pH7.0, 5 mM Ascorbate(Na 塩), 4 mM GSH, 0.1 % BSA) を用いて gCarvi を希釈した。希釈した gCarvi 溶液に 0, 3, 10 μ M の cAMP を添加した。また、蛍光量子収率は標準 Fluorescein 溶液 (fluorescein NIST-traceable standard, Thermo Fisher) との対比から求めた。

gCarvi の pH 感受性

gCarvi の滴定曲線を作成するため、上記の希釈溶液のバッファ組成を次のバッファに変更して各 pH の希釈溶液を作製した: 50 mM 酢酸緩衝液 (pH4.5 および 5.0)、50 mM MES 緩衝液 (pH5.5, 6.0 および 6.5)、50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.0, 7.5 および 8.0)、50 mM Tris 緩衝液 (pH8.5 および 9.0)、5 mM Ascorbate(Na 塩), 4 mM GSH, 0.1 % BSA。各 pH 希釈溶液を用いて精製 gCarvi タンパク質を希釈し、0, 100 μ M の cAMP を添加した際の蛍光強度変化を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて解析した。用いた蛍光フィルターは Ex: 485 nm (半値幅 20 nm) Em : 535 nm (半値幅 20 nm) と Ex: 560 nm (半値幅 20 nm) Em : 610 nm (半値幅 20 nm) である。Gain 設定が 60~70 の範囲におさまるように希釈率

を調整した。Dynamic range はそれぞれの pH 条件における 100 μM cAMP/(-) cAMP の比として求めた。

2.6. 速度論解析

精製 gCarvi タンパク質および ratiometric gCarvi タンパク質をカバーグラスに結合させるため、Ni-NTA で表面処理をしたカバーグラスを用意した。カバーグラス (No. 1s, 18mm Φ , Matsunami) をシラン化溶液 (1 % Acetic acid, 50 % Ethanol, 2 % Mercaptosilane) に一晩以上浸した後、143°C で 1 時間乾燥させた。次に、reducing 溶液 (100 mM K-phosphate buffer (pH 7.0), 2.5 mM EDTA, 50 % Ethanol, 2 mM DTT) にて 1 時間静置し、Mercaptosilane を完全に還元化した。5 mM EDTA (pH 8.0) で洗浄後、maleimido-C3-NTA (2.5 mg/mL, Dojindo) に 2 時間浸し、NTA 基をカバーグラスの表面に結合させた。その後、50 mM NiSO₄ 溶液に 1 時間浸して Ni-NTA とし、冷蔵で保存した。使用する直前に、超純水でよく洗浄した。精製した gCarvi、ratiometric gCarvi を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で PBS に溶かし、Ni-NTA 処理カバーグラスとともに 4°C で 1 時間振盪させ、カバーグラス表面に gCarvi または ratiometric gCarvi を結合させた。gCarvi または ratiometric gCarvi 結合カバースリッパを共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss) 下に置き、微量局所灌流システム (μFlow , ALA Scientific Instruments) を用いて PBS または 30 μM cAMP を含む PBS を局所灌流させた。蛍光強度変化は空浸対物レンズ (20 \times , 0.8 N.A.) を用いた Line Scan モード (1.89 ms/line) で撮影した。cpGFP と mCherry の励起にはそれぞれ Argon 488 nm と DPSS 561 nm を用いた。蛍光波長は cpGFP を 493 nm から 556 nm、mCherry を 600 nm から 696 nm の範囲で計測した。データのフィッティングには GraphPad Prism 6J (MDF) を用いた。

2.7. 海馬初代培養

海馬初代培養には妊娠 16~18 日齢の Slc:ICR マウスを用いた。イソフルランで麻酔後、親マウスを頸椎脱臼した。その後、親マウスから取り出した個々の胎仔を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Ca²⁺/Mg²⁺ free) に浸した。胎仔の羊膜と頭皮を剥がし、矢上縫合に沿って頭蓋骨にはさみで切れ目を入れ、ピンセットを用いて頭蓋骨を開き、脳を取り出した。取り出した脳はシャーベット状の冷やした HBSS に浸した。その後、メスで小脳・中脳・脳幹を切り落とし、正中にメスを入れて大脳を二分した後、間脳を取り除き、海馬を取り出した。海馬組織を 1 mL の酵素液 (神経細胞分散培養キット, Fujifilm) に浸し、37°C のインキュベーター内で 22 回/分、30 分振盪させた。その後、1,000 rpm, 5 分間遠心した。上清を取り除き、続いて分散液 (神経細胞分散培養キット, Fujifilm) を 1 mL 入れ、手製ガラスピペットで海馬組織を穏やかにピペッティングし、細胞を分散させた。その後、除去液 (神経細胞分散培養キット, Fujifilm) を 1 mL、細胞懸濁液の下層にゆっくりと入れ、1,000 rpm, 5 分間遠心した。上清を取り除き、1 mL Neurobasal Medium (Thermo Fisher) で懸濁し、分散した海馬神経細胞懸濁液を得た。海馬神経細胞は、2 % B27 (Thermo Fisher), 2 mM L-

alanyl-L-glutamine (Fujifilm)を添加したNeurobasal Mediumを用いてPoly-D-lysine(Sigma)コート済みのカバーガラス (No. 1s, 12mmΦ, Matsunami) 上に 4×10^4 cells/cm²の密度で播種した。神経細胞は 37°C, 5 % CO₂条件下のインキュベーター内で培養した。

2.8. AAV 作製・濃縮

AAV 作製には AAVpro Helper Free System (AAV1, Takara) を用いた。前日に、HEK293T 細胞 (ATCC) を 4×10^6 cells / 10 cm dish の条件で播種し、5 % CO₂ インキュベーター内にて 37°Cで一晩培養した。培地には 10 % FBS (Thermo Fisher) 含有 DMEM high glucose (Fujifilm) を使用した。細胞播種の翌日、Transfection を行う 2 時間前に全量培地交換を行った。その後、pHelper vector (Takara)、pRC1 vector (Takara)、pAAV vector (gCarvi, ratiometric gCarvi, pAAV.Syn.NES-jRCaMP1b.WPRE.SV40(#100851; Addgene), mCherry-cpGFP) を ProFection Mammalian Transfection System (Promega) を用いてリン酸カルシウム法により細胞へコトランスフェクションした。作製した混合液は 5 分間室温で静置してから培地に滴下し、そのまま 37°Cで 6 時間培養した。その後、新しい 10 % FBS 含有 DMEM を用いて全量培地交換を行った。

Transfection 約 48 時間後にウイルス粒子を含む培地を回収し、0.4 μm PVDF 膜 (Millex-HV, Millipore)でろ過した。フィルトレーションした AAV ウイルス液に、1/4 量の AAVanced rAAV Concentration Reagent (System Biosciences) を加え、マニュアルに準拠して 1~3 日後にウイルス粒子を遠心回収し、精製した。回収したウイルス粒子は PBS 10 μL (1000 倍濃縮) で懸濁し、マイクロチューブに分注後、-80 °Cで保存した。濃縮した rAAV-SynTetOff-gCarvi, rAAV-SynTetOff-ratiometric gCarvi, rAAV-hSyn-jRCaMP1b, rAAV-SynTetOff-mCherry-cpGFP は 1 μL / 100 μL PBS に希釈後、10 μL / well で海馬神経細胞の培養液に 5 DIV に添加した。

2.9. 蛍光イメージング

gCarvi と他単色型緑色 cAMP 蛍光プローブの応答比較

gCarvi, cADDIs (BacMam Green Up cADDIs cAMP, Montana Molecular) , Flamindo2 (Addgene #73938) および cAMP_r (Addgene #99143) を発現した COS-7 細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss) を用いて観察した。対物レンズは 20×, N.A. 0.8 の空浸レンズを使用し、512×512, 12 Bit で以下のような設定で画像取得した。

Excitation : Argon 488 nm (0.6)

Emission : 493~556 nm

PMT : Gain=850, Offset=1.0

ビームスプリッターは MBS 488/561/633 を使用した。

Hank's balanced salt solution (HBSS(+), Fujifilm) 灌流後、1 μM Isoproterenol (Fujifilm) 含有 HBSS(+) を灌流し cAMP 濃度を上昇させた。タイムラプス画像は 1 秒ごとに取得し、その後 Zen 2009 ソフトウェアで解析した。

ターゲティング型 gCarvi 発現海馬培養細胞ならびに哺乳類株化細胞の観察

核、膜、シナプス前末端ターゲティング gCarvi を発現させた海馬培養細胞 (12~25 DIV) を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss) を用いて観察した。対物レンズは 20×, N.A. 0.8 の空浸レンズを使用し、512×512, 12 Bit で以下のような設定で画像取得した。

Excitation : Argon 488 nm (0.3~1.0), DPSS 561 nm (0.1~0.5)

Emission : 493~556 nm, 600~754 nm

PMT : Gain=850, Offset=1.0

ビームスプリッターは MBS 488/561/633 を使用した。

Ratiometric gCarvi ならびに核、膜、シナプス前末端ターゲティング ratiometric gCarvi を発現させた COS-7 細胞と HEK293T 細胞に HBSS(+) 灌流後、1 μM Isoproterenol 含有 HBSS(+) を灌流し cAMP 濃度を上昇させた。タイムラプス画像は 1 秒ごとに取得し、その後 Zen 2009 ソフトウェアで解析した。シナプス前末端ターゲティング gCarvi を発現させた海馬培養細胞に HBSS(+) 灌流後、10 μM Forskolin (Fujifilm) +100 μM Ibudilast (Fujifilm) 含有 HBSS(+) 灌流し、cAMP 濃度を上昇させた。タイムラプス画像は 1 秒ごとに取得し、その後 Zen 2009 ソフトウェアで解析した。

Ratiometric gCarvi 発現海馬培養細胞イメージングならびに定常時細胞内 cAMP 濃度測定

Ratiometric gCarvi を発現させた海馬培養細胞(11~35 DIV)を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss) を用いて観察した。対物レンズは 20×, N.A. 0.8 の空浸レンズを使用し、1024×1024, 12 Bit で以下のような設定で画像取得した。

Excitation : Argon 488 nm (0.6), DPSS 561 nm (0.2)

Emission : 493~556 nm, 600~754 nm

PMT : Gain=850, Offset=1.0

ビームスプリッターは MBS 488/561/633 を使用した。

HBSS(+)灌流後、10 μM Adrenaline (Nacalai) 含有 HBSS(+)を灌流し cAMP 濃度を上昇させた。タイムラプス画像は 1 秒ごとに取得し、その後 Zen 2009 ソフトウェアで解析した。

Basal cAMP 濃度測定は、HBSS(+)灌流後、30 μM Escin (Sigma) 含有緩衝液 (120 mM potassium methanesulfonate, 20 mM NaCl, 0.55 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 40 mM HEPES/KOH pH7.4) を用いて細胞膜透過性を上昇させた。その後、10 μM Escin 含有緩衝液に既知濃度 cAMP (1, 10, 100 μM) を添加した溶液を灌流した。また、basal cAMP 濃度形成要素阻害には、ratiometric gCarvi を発現させた海馬培養細胞に 100 μM 2',3'-DDA (MCE), 50 μM KH7 (TOCRIS), 100 μM SQ22536 (TCI), 100 μM Ibudilast, 100 μM Rolipram (TCI)をそれぞれ HBSS(+)に溶解し、灌流投与した。タイムラプス画像は 5 秒ごとに取得し、その後 Zen 2009 ソフトウェアで解析した。

海馬培養細胞 cAMP/ Ca²⁺同時蛍光イメージング

gCarvi ならびに jRCaMP1b を発現させた海馬培養細胞 (14~19 DIV) を共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5, Leica) を用いて観察した。対物レンズは 20×, N.A. 1.0 の水浸レンズを使用し、512×512, 12 Bit で以下のような設定で画像取得した。

Excitation : Argon 488 nm (0.6), He-Ne 543 nm (0.2)

Emission : 493~535 nm, 571~700 nm

PMT : Gain=850, Offset=1.0

ビームスプリッターは MBS 488/561/633 を使用した。

cAMP 応答には 10 μM Forskolin + 100 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Fujifilm)を HBSS(+)に溶解した混合液を灌流投与した。Ca²⁺応答には培養神経細胞を播種したカバーガラス上を横断するように 2 本の白金イリジウム線 (#778000, A-M Systems) を置き、electric stimulator (15V, 200 μs duration, SEN-7203, Nihon kohden) を用いて刺激 interval 20 sec で、5 Hz/10 Hz/20 Hz 1sec の電気刺激を行った。タイムラプス画像は LAS AF ソフトウェア (Leica) を用いて 1.29 秒ごとに取得し、LAS X ソフトウェアで解析した。

2.10. データ解析

gCarvi の立体構造は Phyre2 web portal for protein modeling (Kelly et al., 2015) を用いて予測し、iCn3D (Wang et al., 2020) にて画像化した。各データは、平均値±標準偏差 (SD) で表している。平均値は、t-test、one-way ANOVA post hoc Tukey's multiple comparisons、Brown-Forsythe analysis post hoc Dunnett T3's multiple comparisons を用いて比較した。これらの統計解析には SPSS statistics 26 を用い、 $P < 0.05$ で有意に異なるとした。

Primer name	Sequence (5' to 3')
CRP F (BamHI)	TAGGATCCATGGTGCTTGGCAAACCG
CRP129 R (XhoI)	TTACTCGAGCTCTGAAGTGAAGTGCAGACGA
CRP130 R (XhoI)	TTACTCGAGTTTCTCTGAAGTGAAGTGCAGACG
CRP131 R (XhoI)	TTACTCGAGCACTTTCTCTGAAGTGAAGTGCAG
CRP132 R (XhoI)	TTACTCGAGGCCCACTTTCTCTGAAGTGAAGT
CRP133 R (XhoI)	TTACTCGAGGTTGCCCACTTTCTCTGAAGTG
CRP134 R (XhoI)	TTACTCGAGCAGGTTGCCCACTTTCTCTG
CRP135 R (XhoI)	TTACTCGAGCGCCAGGTTGCCAC
CRP136 R (XhoI)	TTACTCGAGGAACGCCAGGTTGCC
CRP137 R (XhoI)	TTACTCGAGGAGGAACGCCAGGTTGC
CRP138 R (XhoI)	TACTCGAGGTCGAGGAACGCCAGGTT
CRP156 R (XhoI)	TTACTCGAGAGCATCTGGTTGTTTTGCC

表 1. CRP の cAMP 結合ドメイン用 PCR プライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
CRP135G_R (Xho I)	TTACTCGAGCCCCAGGTTGCCAC
CRP135E_R (Xho I)	TTACTCGAGCTCCAGGTTGCCAC
CRP135V_R (Xho I)	TTACTCGAGCACCAGGTTGCCAC
CRP135T_R (Xho I)	TTACTCGAGCGTCAGGTTGCCAC
CRP135P_R (Xho I)	TTACTCGAGCGGCAGGTTGCCAC
CRP135S_R (Xho I)	TTACTCGAGCGACAGGTTGCCAC
CRP135L_R (Xho I)	TTACTCGAGCAGCAGGTTGCCAC
CRP135I_R (Xho I)	TTACTCGAGAATCAGGTTGCCAC
CRP135C_R (Xho I)	TTACTCGAGGCACAGGTTGCCAC
CRP135M_R (Xho I)	TTACTCGAGCATCAGGTTGCCAC
CRP135N_R (Xho I)	TTACTCGAGATTCAGGTTGCCAC
CRP135Q_R (Xho I)	TTACTCGAGGTGCAGGTTGCCAC
CRP135F_R (Xho I)	TTACTCGAGAAACAGGTTGCCAC
CRP135Y_R (Xho I)	TTACTCGAGATACAGGTTGCCAC
CRP135W_R (Xho I)	TTACTCGAGCCACAGGTTGCCAC
CRP135D_R (Xho I)	TTACTCGAGATCCAGGTTGCCAC
CRP135K_R (Xho I)	TTACTCGAGTTTCAGGTTGCCAC
CRP135R_R (Xho I)	TTACTCGAGGCGCAGGTTGCCAC
CRP135H_R (Xho I)	TTACTCGAGATGCAGGTTGCCAC

表 2. cAMP 結合ドメインの 135 番目アミノ酸置換用 PCR プライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
cpGFP F (XhoI)	TATCTCGAGAACGTCTATATCAAGGC
cpGFP R (Sall HindIII SpeI)	TAAGTCGACAAGCTTACTAGTGTTGTACTIONCCAGCTTGTGCC

表 3. GCaMP3 由来の cpGFP 用 PCR プライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
N302S_R	GTCGACAAGCTTACTAGTGGAGTACTCCAGCTTGTGCC
K69E_S	AAGGCCGACGAGCAGAAGAAC
K69E_AS	【Phos】 GTTCTTCTGCTCGTCGGCCTT
N77N_S	GGCATCAAGGCGAACTTC
N77Y_S	【Phos】 GGCATCAAGGCGTACTTCAAG
D86G_F	AACATCGAGGGTGGCGG
D86G_R	CCGCCACCCTCGATGTT
N98I_F	TACCAGCAGATCACCCCAT
N98I_R	ATGGGGGTGATCTGCTGGTA
S118N_S	GCGTGCAGAACAACTTTCG
S118N_AS	CGAAAGTTTGTCTGCACGC
SI118NI_S	GCGTGCAGAACATTCTTTCG
SI118NI_AS	CGAAAGAATGTTCTGCACGC
K119I_F	CGTGCAGTCCATTCTTTCGAA
K119I_R	TTCGAAAGAATGGACTGCACG
K119M_F	CGTGCAGTCCATGCTTTCGAA
K119M_R	TTCGAAAGCATGGACTGCACG
L173Q_F	GCCCATCCAGGTCGAGC
L173Q_R	GCTCGACCTGGATGGGC
I205F_S	CCTGAAGTTCTTCTGCACCAC
I205F_AAS	GTGGTGCAGAAGAACTTCAGG
T223S_F	CACCCTGTCCTACGGCGT
T223S_R	ACGCCGTAGGACAGGGTG
TY223SH_F	CACCCTGTCCCACGGCGTG
TY223SH_R	CACGCCGTGGGACAGGGTG
D260G_F	TTCAAGGGCGACGGCA
D260G_R	TGCCGTCGCCCTTGAA
N263Y_S	GACGACGGCTACTACAAGACC
N263Y_AS	GGTCTTGTAGTAGCCGTCGTC

E282V_S	CCGCATCGTGCTGAAGG
E282V_AS	CCTTCAGCACGATGCGG

表 4. 各種 GCaMP, G-GECO シリーズ由来の cpGFP 作製用 PCR プライマー配列

第3章 結果

3.1. 単色型 cAMP 蛍光プローブの開発スクリーニング

cAMP 結合ドメインの選定

これまでに開発されてきた cAMP 蛍光プローブの cAMP 結合ドメインは、cAMP シグナリングのエフェクタータンパク質である PKA や Epac、CNG チャネルの配列が用いられている (Jiang et al., 2017)。しかし、これらの cAMP 結合分子は哺乳類細胞の内因性 cAMP シグナリングの下流分子であるため、PKA や Epac を用いた cAMP プローブは潜在的に cAMP シグナル経路の生理的な機能に干渉する恐れがある。cAMP シグナルリングは学習・記憶の分子基盤である長期増強といった数時間や数日におよぶ生理的機能にも関与しているため、このようなシグナリングの干渉には細心の注意を払う必要がある。

本研究では、内因性 cAMP 結合タンパク質に干渉しないよう、*Escherichia coli* 由来の cAMP Receptor Protein (CRP) の cAMP 結合ドメインに着目した。CRP はカタボライト活性化タンパク質 (CAP) としても知られ、大腸菌内 cAMP 濃度に応じて数百の転写ユニットを制御する転写アクチベーターである (Fic et al., 2009)。CRP に cAMP が結合すると、c-helix-DBD はアロステリックな構造変化を起こし、プロモーター近くにある 150 以上の特定の DNA 配列と結合し、RNA ポリメラーゼやプロモーターとの相互作用を促進することで、遺伝子の転写を制御している。

CRP は 209 のアミノ酸のサブユニットで構成される約 50 kDa のホモダイマーを形成する。CRP のサブユニットは、N 末端側に環状ヌクレオチド結合モジュールである (i) cAMP 結合ドメイン (CBD ; 1-136 残基, coiled coil を介して二量体形成を調節する長い α -helix (C-helix と呼ばれる) を含む)、C 末端側に (ii) DNA 結合ドメイン (DBD ; 139-209 残基)、helix-turn-helix モチーフを含む) と両者を繋ぐ短いヒンジ領域 (137-138 残基) で構成される (Popovych et al., 2009)。

cAMP が結合していないとき (Popovych et al., 2009)、cAMP 結合状態 (Passner et al., 2000)、cAMP 結合状態で DNA と相互作用している際の立体構造 (Schultz et al., 1991) の結果から、CRP 二量体は cAMP 結合によって C-helix が回転し、その結果、DBD が約 60° 回転することで、DNA と相互作用するように構造変化する (図 2)。

CRP の CBD は、哺乳類細胞内の任意の CBD との同一のアミノ酸相同性が 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 (Shabb et al., 1992)。本研究では、CRP の cAMP 結合に伴って構造変化する特性を新規 cAMP 蛍光プローブ開発のモチーフとした。

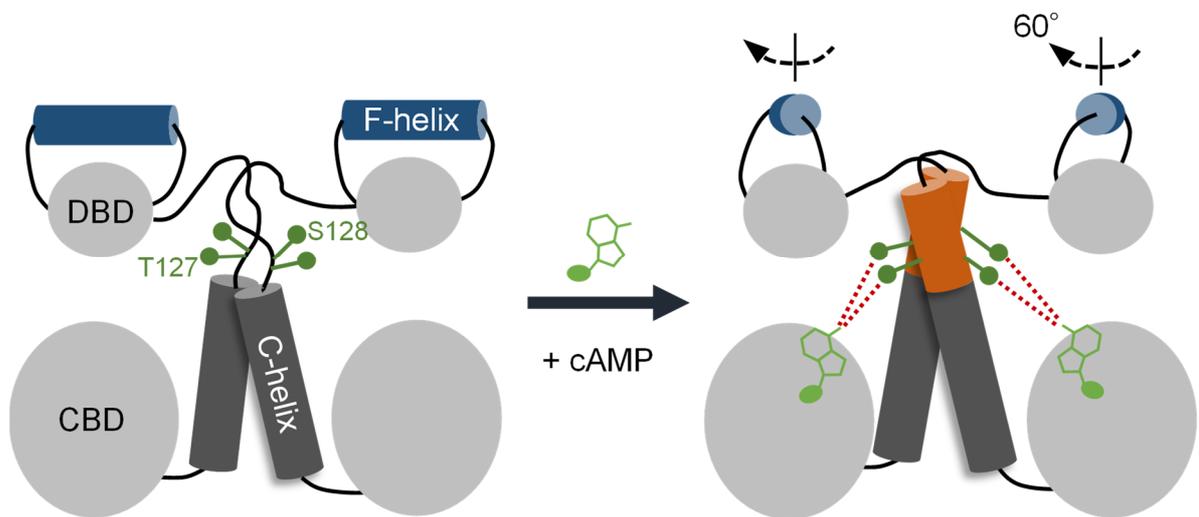


図 2. cAMP 結合時の CRP の構造変化

cAMP receptor domain (CRP) は cAMP bind domain (CBD) と DNA binding domain (DBD) のサブユニットで構成される二量体である。cAMP は CRP の Thr-127 と Ser-128 と直接接触し、CRP には C-helix が伸び (橙色)、DBD の F-helix が 60° 回転するという構造変化が生じる。本図は、Popovych et al., 2009 の図を改変した。

単色型蛍光プローブに適した蛍光物質

蛍光プローブの基本構成は、リガンド結合部位と蛍光分子、それらを繋ぐリンカーである。まず、新規 cAMP 蛍光プローブの開発するにあたり、CBD の C 末端に直接蛍光タンパク質を融合した。これまでの cAMP 蛍光プローブの多くは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を活用して開発されてきた (Gorshkov and Zhang., 2014)。FRET とは、2 つの蛍光分子 (ドナーとアクセプター) が非常に近接かつドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルに重なりがある場合にドナーの励起エネルギーが移動してアクセプターが蛍光を発する現象である。FRET 型プローブはドナーとアクセプターの間特定の分子に反応する結合領域を融合することで、cAMP が結合した際に 2 つの蛍光タンパク質間の距離が変化し、FRET の効率を測定することで cAMP を可視化している。しかし、1 つの分子を観察するために 2 つの蛍光分子を要するため、作製する分子が大きく細胞に発現する上で障壁となる場合がある。特に、AAV ベクターのように目的遺伝子のサイズが約 2.5 kb と制限がある場合にはプローブサイズが大きいことは非常に致命的である。

本研究では cAMP 動態を簡便に計測でき、他の蛍光プローブとの同時イメージングへの適応を目的としている。FRET 型プローブは観察に際して操作が煩雑な FRET 用のフィルターセットが必要であり、蛍光を 2 色用いるため他のプローブとの併用もしづらい。そのため、1 つの蛍光分子で検出できる単色型の cAMP 蛍光プローブを作製することにし、そのために適した蛍光分子を選定した。本研究ではスペクトル特性の点から多くの研究室で観察・使用されている GFP を採用した。多数の単色型プローブに用いられている蛍光タンパク質は、円順列変異型 GFP (circular permutated GFP ; cpGFP) と呼ばれる緑色蛍光タンパク質である。cpGFP は GFP 配列を二分割し、元の GFP の N 末端と C 末端をリンカーで繋ぐことで部分配列の順番を入れ替えた GFP である (Kostyuk et al., 2019)。cpGFP は固定的な立体構造をとらないため、周囲のタンパク質構造変化の影響を受け、蛍光強度が変化する性質をもつ。本研究ではまず、Ca²⁺センサーの 1 つである GCaMP3 由来の cpGFP を CRP の CBD の C 末端に融合した (表 5)。

リンカー長さのスクリーニング

CRP の CBD に GCaMP3 由来の cpGFP を融合した cAMP プローブ候補を作製し、大腸菌 BL21 株を用いて CBD156-cpGFP タンパク質の合成を誘導した。その後、精製した CBD156-cpGFP タンパク質に 100 μ M cAMP を添加したところ、蛍光強度が 37 %低下した (表 5)。この結果から、cAMP 結合に伴う CBD の構造変化が蛍光プローブとして利用できる可能性があることが示唆された。

次に、蛍光プローブ化に適している cAMP 結合領域の長さに注目した。特に cpGFP の環境変化に大きく影響を与えうる cpGFP に直接繋がる CBD の C-helix の適切な長さを検討した。C-helix の Thr-127 と Ser-128 は、cAMP と側鎖水酸基で直接相互作用し、CRP が不活性型から活性型へと構造変化する主要な要因であることから (Popovych et al. 2009)、CBD の末端が残基 129 – 138 となるよう 1 アミノ酸ずつ長さを変えた CBD(129 – 138)-cpGFP 候補を作製した。CBD(129 – 138)-cpGFP 候補を大腸菌 BL21 株に形質転換後、タンパク質合成誘導を行い、候補タンパク質をコバルトレジンを用いて精製した。プローブ候補の最大蛍光変化を調べるため、精製したタンパク質にそれぞれ 100 μ M cAMP、100 μ M cGMP を投与し、その際に生じた蛍光変化 ($\Delta F / F$ (%)) をマイクロプレートリーダーを用いて測定した (表 5)。cAMP 結合に伴う蛍光強度変化には CBD(134 – 137)-cpGFP のように輝度が上昇するものと、CBD(129 – 133)-cpGFP のように輝度が減少する 2 パターンが存在していた。アミノ酸 134-138 残基は elastic ヒンジを形成しており、このヒンジは cAMP 結合領域と DNA 結合領域を繋ぐリンカー部分として DNA 結合領域を外側に移動させることに関与している (Ryu et al., 1993)。そのため、CBD(134 – 137)-cpGFP は効率よく cpGFP の環境変化を誘導できたと考えられる。一般的にイメージングする上で、蛍光退色 (ブリーチング) と区別しやすいため、リガンド結合に伴って蛍光強度が上昇するものが好まれる。そのため表 5 から、cAMP 結合に伴い蛍光上昇 ($\Delta F = +45$ %) し、かつ cGMP への反応性が最も低い、CBD135-cpGFP を採用し、次のスクリーニングに進んだ。

cpGFP のスクリーニング

CBD135-cpGFP(GCaMP3)は cAMP に応じて蛍光上昇するが、GCaMP3 由来の cpGFP が最も適切な緑色蛍光タンパク質であるかは定かではなかった。そこで、CBD135 への融合に適した cpGFP のスクリーニングを行った。多くの緑色蛍光プローブが開発されている Ca²⁺プローブを参照し、GCaMP シリーズと G-GECO シリーズの Ca²⁺プローブの cpGFP に注目し、スクリーニングを行った。CBD135 に各 cpGFP を融合した CBD135-cpGFP 候補タンパク質に 100 μ M cAMP、100 μ M cGMP を添加した際の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した (表 6)。その結果、G-GECO1 由来の cpGFP を用いた CBD135-cpGFP (G-GECO1) が cAMP に対して蛍光輝度が 74%上昇し、cGMP に対してはほとんど反応しなかった。CBD135-cpGFP (GCaMP3) と比較して CBD135-cpGFP (G-GECO1) は 1.7 倍の蛍光上昇幅の拡張に成功した。

CBD135 のアミノ酸置換による蛍光変化幅の拡張

CBD135-cpGFP (G-GECO1) は、cAMP に特異的に反応し、cAMP 結合によって蛍光強度を 74%上昇させることがわかった。しかし、生細胞イメージングに適した蛍光プローブとして採用するには、視覚的にも検出しやすい約 150%以上の蛍光変化幅であることが好ましい。CBD135-cpGFP (G-GECO1) のダイナミックレンジを拡張するため、リガンド結合ドメインと蛍光タンパク質の間のリンカー配列のアミノ酸の種類がリガンド検出のダイナミックレンジに影響する (Kostyuk et al., 2019) ことから、CBD135 番目のアラニンを他 19 種類置換した。CBD 点変異体に cpGFP (G-GECO1) を融合した精製タンパク質に 100 μ M cAMP、100 μ M cGMP を添加した際の蛍光強度変化をマイクロプレートリーダーにて測定した (表 7)。その結果、芳香族アミノ酸がダイナミックレンジを改善させる傾向が示された。これらの候補の内、cGMP への感受性とのバランスを考慮しつつダイナミックレンジを拡張($\Delta F = +144\%$)させた CBD135 番目のアミノ酸をチロシンに置換した CBD (A135Y) - cpGFP (G-GECO1)を単色型 cAMP 緑色蛍光プローブとして採用した (図 3)。この CBD (A135Y) - cpGFP (G-GECO1)を” gCarvi ” (green fluorescent cAMP receptor protein utilizing validated indicator) と命名した。

3.2. gCarvi の蛍光特性

gCarvi のスペクトル特性

gCarvi のスペクトル特性を調べるため、pColdI-gCarvi を大腸菌 BL21 株に形質転換し、IPTG を用いてタンパク質合成誘導後、His-tag を用いて精製した gCarvi タンパク質をサンプルとして用いた。次に、gCarvi 精製タンパク質に 0, 3, 10 μM cAMP を添加し、蛍光光度計を用いて励起・蛍光スペクトルを計測した。gCarvi は cAMP の存在有無に関わらず、励起スペクトルの最大励起波長は 504 nm、蛍光スペクトルの最大蛍光波長は 523 nm であった (図 4A)。また、添加した cAMP 濃度の増加に伴い、スペクトルは山の形はそのままに蛍光強度が上昇した。

次に、gCarvi 精製タンパク質に 0, 3, 10 μM cAMP を添加し、UV 分光光度計を用いて吸光スペクトルを計測した。その結果、cAMP への結合に伴い 498 nm にピークをもつ吸光スペクトルを示した (図 4B)。また、cAMP 濃度が上昇するとスペクトルの形は変わらず、より光を吸収するという性質を示した。400 nm には発色団の非イオン型の吸光ピークがあるが、これは蛍光の励起には寄与しなかった。

gCarvi の蛍光強度

蛍光プローブの明るさは「モル吸光係数 \times 量子収率」が尺度となる。モル吸光係数 (ϵ) は、蛍光タンパク質が特定の波長において吸収する光量を指す。量子収率 (QY) は、「蛍光として放出された光子数 / 吸収された光子数」で表され、発光の効率を示す。

gCarvi は cAMP 結合に伴う蛍光変化が吸収変化よりも大きいため、モル吸光係数 (ϵ) と、量子収率 (QY) を標準フルオロセインを比較として用いた相対法で求めた。10 μM cAMP 添加時の gCarvi 精製タンパク質のモル吸光係数 (ϵ) は 20,600 で、G-GECO1 のカルシウム結合時と比較しておよそ半分の値であった。量子収率 (QY) は 0.79 で、G-GECO1 のカルシウム結合時と比較して 2 倍であった (図 4C)。gCarvi ならびに G-GECO1 のそれぞれのモル吸光係数と量子収率の積から、in vitro 条件下では cAMP 結合時の gCarvi とカルシウム結合時の G-GECO1 の蛍光強度は、同等の明るさであることが示された。

gCarvi の cAMP 用量反応曲線と cAMP への特異性の検証

次に、gCarvi の cAMP 用量反応曲線を求めた。精製 gCarvi タンパク質に 0.01~100 μM の cAMP を添加し、その際の蛍光強度をマイクロプレートリーダーで計測した。それぞれのプロットは、Hill の式を用いてフィッティングし、用量反応曲線を作成した。この用量反応曲線から、gCarvi に最大量の cAMP 溶液を投与した際の蛍光強度の値が $F_{\text{max}}=2.46 \pm 0.05$ (D.R. = 1.46) であると示された (図 5B, 表 8)。また、Hill の式からリガンドが半分飽和した状態である解離定数 (K_d) と協同性の指標である Hill 係数 (n) はそれぞれ $2.03 \pm 0.22 \mu\text{M}$ 、 1.05 ± 0.11 であると算出した。Hill 係数がほぼ 1 であることからアロステリック効果はなく、gCarvi は cAMP に 1 対 1 結合する。また、gCarvi が検出可能な cAMP 濃度はおよそ 0.2~20 μM であり、これは生理的な細胞内 cAMP 濃度変動域をカバーしている。

また、gCarvi が cAMP に特異的なプローブであるのかを確認するため、cAMP と構造が類似している分子 (cGMP、cCMP、2', 3' cAMP) や他のヌクレオチド (AMP、ATP、ADP、GMP、GDP、GTP) を精製 gCarvi タンパク質に添加し、マイクロプレートリーダーを用いてそれらの用量依存的な蛍光応答を計測し、プロットした。その結果、生理的な ATP (~3 mM)、GTP (~500 μM) 濃度以下及び多くのヌクレオチド分子 (AMP、ADP、GMP、GDP) や 2', 3' cAMP、cCMP には反応しなかった (図 5A)。また、gCarvi の cGMP への応答性は、 $F_{\text{max}}=0.19 \pm 0.01$ 、 $K_d=27.4 \pm 4.4 \mu\text{M}$ 、 $n=1.22 \pm 0.21$ であった (図 5B, 表 8)。これらの結果から、gCarvi は cAMP と比較して cGMP に対する応答が十分に低く、選択性 (K_d 比) \times 感度 (D.R. 比) で定義した cAMP/cGMP 特異性は、100 倍以上という高特異性 ($(1.46/0.19) \times (27.4/2.03)=106$) 遺伝子発現型 cAMP プローブであることが示された。

gCarvi の pH 依存性の検証

cpGFP は pH が酸性に偏ると蛍光が減弱するという pH 依存性がある。gCarvi は cpGFP を利用した蛍光プローブであるため、cpGFP の pH 依存性の影響を大きく受けている可能性が十分にあった。そこで、様々な pH 溶液下での gCarvi 精製タンパク質の蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて計測した。また、cAMP 存在下での gCarvi の pH 依存性最大蛍光変化幅を調べるため、0, 100 μM cAMP 溶液存在下で蛍光強度変化を比較した (図 6A)。その結果、cAMP 非存在下でも pH 7-9 にかけて緑色蛍光の上昇が確認された。gCarvi を用いて生細胞イメージングを行う場合は、細胞内 pH 変動に注意する必要がある。また、100 μM / 0 μM cAMP 存在下での gCarvi の蛍光強度比を各 pH 環境時でプロットした (図 6B)。100 μM cAMP 存在下で、gCarvi の蛍光変化幅は pH 6.5-7.5 にかけておよそ 2.5 倍の一定の値を示した。細胞質内 pH が pH 6.5-7.5 の範囲内にあるときは gCarvi の cAMP ダイナミックレンジは確保されている。

3.3. gCarvi の結合・解離速度論解析

ここまで gCarvi の蛍光特性について解析してきた。蛍光プローブに求める基本的な性質の一つとして、速い結合・解離速度をもつことは生細胞でのリアルタイムイメージングにとって非常に重要な要素である。CRP は Molecule optimal dynamic coordinates (MODC) を用いた分子ダイナミクスシミュレーションの結果から、溶液中で 140 ps と非常に速いスピードでダイナミックな構造を変化させていることが報告されている (Garcia and Harman, 1996)。CRP を応用して作製した gCarvi も高速に構造変化することが期待された。

cAMP がプローブに結合する速度定数を k_{on} 、プローブから cAMP が解離する速度定数を k_{off} とする。解離定数 K_d は k_{on} / k_{off} で求められる。しかしながら、既報の cAMP 蛍光プローブの結合解離速度に関する知見は 2 報のみである (Mukherjee et al., 2016, Wang et al., 2022)。本研究では、速い溶液置換を行える局所灌流システムと共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードを適用し、gCarvi の結合・解離速度の計測を行った。まず、His-tag を融合した精製 gCarvi タンパク質をカバーガラスに結合させた。Maleimido-C3-NTA をチオール基修飾したカバーガラスに固定化し、NiSO₄ 処理で錯を形成させ、His-tag つき gCarvi タンパク質のヒスチジン残基が配位することで、一方向かつ強固にカバーガラス表面に gCarvi タンパク質を結合させた。gCarvi タンパク質が結合したカバーガラス表面は PBS で常に灌流し続け、30 μ M cAMP 溶液を局所灌流し、その際の蛍光強度の経時変化を計測した (図 7)。one-site binding model を用いたフィッティングカーブから結合速度定数 (k_{on}) と解離速度定数 (k_{off}) を算出した。図 7 の結果より、gCarvi の結合速度は $1.38 \pm 0.25 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度は $3.31 \pm 0.77 \text{ s}^{-1}$ であった。この計測系から算出された K_d ($k_{off} / k_{on} = 2.49 \text{ }\mu\text{M}$) は用量反応曲線 (図 5B, 表 8) と同様の値 ($K_d = 2.03 \text{ }\mu\text{M}$) を示した。この結果から、高速灌流システムとラインスキャンを用いた計測系が正しく結合・解離速度を計測できる実験系であると考えられる。gCarvi は、1 秒以下の精度で cAMP 動態に追従することができ、細胞内 cAMP 動態を調べるために十分な結合解離速度をもつと考えられる。

gCarvi と他緑色蛍光 cAMP プローブの比較

gCarvi と他緑色蛍光 cAMP プローブ (cADDIs, Flamindo2, cAMP_r) をそれぞれ COS-7 細胞に発現させ、 β -アドレナリン受容体 (β -AR) アゴニストである Isoproterenol を灌流投与し、計測条件を一致させて蛍光強度の時間経過を比較した (図 8A)。各プローブの 20-80 % rise time を比較したところ、gCarvi が最も速い rise time を示した (図 8B, 16.7 ± 6.1 sec)。これは、cADDIs (30.8 ± 10.4 sec)、Flamindo2 (46.7 ± 14.9 sec)、cAMP_r (80.9 ± 41.2 sec) と比べて、gCarvi が COS-7 細胞の cAMP 動態に適した K_d 及び速い結合速度をもつことに起因していると考えられる (図 8B)。また、図には示していないが、cADDIs には蛍光上昇に伴いプローブがアグリゲーションする性質があることが観察された。cADDIs は cAMP 結合によって多量体化が生じていると考えられるが、プローブとしては重大な欠点である。また、gCarvi は他のプローブと比較してエラーバーが小さく、細胞ごとの蛍光変化の様子にばらつきが少なかった。gCarvi の発現系における安定性を示唆している。

3.4. 定量型 gCarvi のスクリーニングとイメージング

FRET イメージングを含むレシオメトリックイメージングは、2つの波長の蛍光強度の比から目的分子の濃度を定量的に解析できる (Adams et al., 1991)。そこで、単色型緑色蛍光プローブである gCarvi に、コントロールシグナルとして赤色蛍光タンパク質を融合することで、簡便な定量型 cAMP 蛍光プローブを開発できるのではないかと考えた。候補とする赤色蛍光タンパク質には光安定性が高く、モノマーのタンパク質である TagRFP と mCherry を検討した。cpGFP と赤色蛍光タンパク質が互いに干渉しないよう、赤色蛍光タンパク質を gCarvi の N 末端に融合した。gCarvi (CRP(A135Y)-cpGFP(G-GECO1)) 以外にも gCarvi スクリーニングで有力候補であった CRP135 のミュータントである CRP(A135I)-cpGFP(G-GECO1)、CRP(A135H)-cpGFP(G-GECO1)、CRP(A135Q)-cpGFP(G-GECO1) や野生型の CRP(A135)-cpGFP(G-GECO1) にも赤色蛍光タンパク質を融合した。これらの定量型 gCarvi 候補プラスミドを作製し、大腸菌 BL21 株に形質転換後、候補タンパク質を精製したものに 100 μ M cAMP、100 μ M cGMP を添加し、その際の緑色・赤色蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて計測した(表 9)。全般的に mCherry を gCarvi (CRP(A135Y)-cpGFP(G-GECO1)) に融合したものが TagRFP よりも cAMP への特異性が高く、広いダイナミックレンジを示した。cGMP への感受性とのバランスを考慮しつつ cAMP に対する蛍光変化幅の大きい mCherry- CRP(A135Y)-cpGFP(G-GECO1) を定量型 cAMP 蛍光プローブとして採用し、"ratiometric gCarvi" (略称: rm-gCarvi) と命名した (図 9A)。

Ratiometric gCarvi の特性を調べるため、精製 ratiometric gCarvi タンパク質を用いて mCherry 蛍光、cpGFP 蛍光の用量反応曲線を作成した (図 9B)。その結果、mCherry 蛍光は cAMP 用量に関係なく一定の蛍光強度を示したのに対し、cpGFP 蛍光は、cAMP 濃度に伴って蛍光上昇を示した。Ratiometric gCarvi の cpGFP/mCherry 比を用いて cAMP、cGMP に対する用量反応曲線を作成した。それぞれの蛍光レシオ比のプロットのフィッティングカーブは Hill の式で算出した。その結果、ratiometric gCarvi の cAMP への応答性は、D.R. = 1.50 ± 0.02 、 $K_d = 2.05 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 、 $n = 1.36 \pm 0.05$ 、cGMP への応答性は、D.R. = 0.33 ± 0.01 、 $K_d = 28.9 \pm 2.5 \mu\text{M}$ 、 $n = 0.95 \pm 0.07$ であった (表 10)。Ratiometric gCarvi は gCarvi に赤色蛍光タンパク質を融合しているが、cAMP/cGMP 特異性が 100 倍以上の高い特異性を有した cAMP 蛍光プローブという gCarvi の性質は保持したまま定量型 cAMP 蛍光プローブの開発に成功した。

また、ratiometric gCarvi の結合解離速度を gCarvi と同様に共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードと局所灌流システムを用いて計測した。その結果、Ratiometric gCarvi の cAMP 結合速度定数は $1.20 \pm 0.32 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数は $3.11 \pm 0.84 \text{ s}^{-1}$ で、mCherry を融合しても gCarvi の結合解離速度と変わらず、高速性も維持していた (表 8, 表 10)。

3.5. ターゲティング型 gCarvi の開発とイメージング

cAMP シグナルリングは細胞質だけでなく、細胞核や細胞膜など細胞内小区画によって制御が異なっている。例えば、細胞内小区画によって cAMP 産生酵素アデニル酸シクラーゼやホスホジエステラーゼのサブタイプの局在が異なっている (Zaccolo et al., 2021)。そこで、ratiometric gCarvi を応用した蛍光プローブとして細胞内の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。核へのターゲティングには SV40 核局在シグナルの 3 タンデムリピート配列、細胞膜には Ha-Ras C terminal 配列、シナプス前末端にはヒト由来の Synapsin 全長をターゲティングタグとした (図 10)。一般的に、蛍光タンパク質をターゲットとなるタンパク質の C 末端に融合すると細胞内局在が予想通りであることが多いという報告がある (Palmer et al., 2004)。これらのタグをそれぞれ ratiometric gCarvi の C 末端に融合したプラスミドを作製し、培養海馬神経細胞に導入したところ、細胞核、細胞膜、軸索末端への局在化を確認した (図 10)。

また、これらターゲティング型 ratiometric gCarvi の cAMP への応答性としてダイナミックレンジを検証した。COS-7 細胞において、核ターゲティング型 (D.R.= 1.30 ± 0.43) とシナプス前末端ターゲティング型 ratiometric gCarvi (D.R.= 1.36 ± 0.61) は非ターゲティング型 ratiometric gCarvi (D.R.= 1.37 ± 0.17) と変わらないダイナミックレンジを示した。一方で、HEK293T 細胞において、膜ターゲティング型 ratiometric gCarvi (D.R.= 0.84 ± 0.17) は非ターゲティング ratiometric gCarvi (D.R.= 1.19 ± 0.12) と比較して 29% 小さいダイナミックレンジを示した (図 11A)。これは膜ターゲティングすることで、細胞膜と ratiometric gCarvi との距離が近接し、cAMP 結合による構造変化を阻害したことでダイナミックレンジが低下した可能性が考えられる。または、細胞膜直下は膜貫通型アデニル酸シクラーゼにより cAMP が産生されているため、局所的に高い濃度の cAMP が存在している空間であるため、結果としてダイナミックレンジが低下した可能性もある。

次に、シナプス前末端ターゲティング型 ratiometric gCarvi を培養海馬神経細胞に発現させ、cAMP 応答を調べた。膜貫通型アデニル酸シクラーゼ活性化剤 Forskolin + PDE 阻害剤 Ibudilast を灌流投与したところ、シナプス前末端ブートンにおける cAMP 上昇を検出できた (図 11B)。

3.6. 神経細胞特異的かつ高発現型の cAMP プローブ導入法の確立

神経細胞への遺伝子導入ツールとして、最も汎用的な発現方法はウイルスベクターを用いることであり、中でもアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターがよく用いられている。AAV ベクターは作製も比較的容易である。また、AAV は *in vitro*、*in vivo* を問わず、分裂・非分裂細胞へ遺伝子導入することが可能で、神経細胞のような非分裂細胞では長期間の遺伝子発現が可能である (Peel and Klein, 2000)。AAV に搭載できる遺伝子の長さには制限があり、ITR 間で約 5 kb、目的遺伝子に関しては約 2.5 kb である。gCarvi と ratiometric gCarvi はそれぞれ全長が約 1.2kb と 1.9kb と軽量であるため AAV ベクターを活用しやすい。

神経細胞に特異的に発現させるプロモーターとしてヒト synapsin I (Syn) プロモーターがよく用いられているため、gCarvi および ratiometric gCarvi を神経細胞に発現する際、synapsin promoter 下の AAV ベクターを作製した。しかし、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターをはじめとするユビキタスプロモーターと比較して、synapsin promoter は発現量が低いという問題があった。GFP を発現する AAV9 ベクターを用いてマウス培養脊髄神経細胞におけるプロモーター活性を比較した実験においても、Syn プロモーターは CMV プロモーターを用いた場合に比べて発現レベルが 10 倍も低いことが報告されている (Lukashchuk et al., 2016)。発現量が低い状態では、蛍光を検出するためにレーザー強度を上げる必要があり、退色が生じやすくなる。

そこで、TetOff システムを応用した神経細胞特異的かつ高発現型 AAV ベクターである SynTetOff に着目した (Sohn et al., 2017)。SynTetOff ベクターは順天堂大学の日置寛之先生から譲渡いただいた。SynTetOff は、Syn プロモーターを介して改良型のテトラサイクリン制御トランザクティベーター (tTAad) を神経細胞に特異的に発現させ、tTAad が結合するテトラサイクリン応答エレメント (TRE) プロモーター下で目的遺伝子を強力的に発現させるシステムである。SynTetOff は AAV セロタイプ 2 (AAV2) のベクター内に存在し、AAV2 の Rep、AAV1 の Cap を用いたウイルス粒子で *in vitro* および *in vivo* で目的とするタンパク質を高発現できるという報告がある (Sohn et al., 2017)。本研究では SynTetOff ベクターに ratiometric gCarvi を組み込んだ。

SynTetOff ベクターの Ratiometric gCarvi が生理的な cAMP 動態をモニターできることをアドレナリンを ratiometric gCarvi 発現海馬神経細胞に灌流投与することで確かめた。アドレナリンは海馬神経細胞の β -AR を活性化させ、Gs 反応を介した cAMP 濃度上昇を誘導する。Ratiometric gCarvi はこの神経細胞内の cAMP 増加を検出することができた (図 12)。

3.7. 細胞内 basal cAMP 濃度の計測

細胞内 basal cAMP 濃度として 0.1~13 μM の範囲が報告されているものの、海馬神経細胞の basal cAMP 濃度については未解決である。basal cAMP 濃度を知ることは、細胞の生理機能の考える上での基盤となる。海馬神経細胞には cAMP の効果分子として PKA や Epac が存在し、これらの分子の細胞内での活性化状態を判断する上でも basal cAMP 濃度を知ることが重要である。そこで ratiometric gCarvi を用いて、海馬神経細胞内の cAMP 濃度を定量することにした。

定量するにあたり、cAMP 濃度と蛍光強度のキャリブレーションを行った。方法として Escin を用いて細胞膜透過性を高め、既知濃度 (1, 10, 100 μM) の cAMP 溶液を細胞外から灌流させる。そこで、まず細胞外から灌流させる緩衝液の pH を細胞内 pH に合わせる必要がある。Ratiometric gCarvi には pH 依存性があるため、pH プローブとして mCherry-cpGFP (G-GECO1) を培養海馬神経細胞に発現させた。pH7.2~7.5 の Escin 含有緩衝液を細胞外から灌流投与し、細胞膜透過性を上昇させた際の mCherry-cpGFP の cpGFP/mCherry の蛍光比を測定した (図 13)。無傷の神経細胞の蛍光比と escin 後の蛍光比が変化しない pH7.4 をキャリブレーション緩衝液の pH として採用した。

海馬神経細胞内の cAMP 濃度を定量するため、ratiometric gCarvi を培養海馬神経細胞に発現させた (図 14A)。Ratiometric gCarvi の 2 色が不均一に光退色すると蛍光レシオイメージングに直接影響するため、最小限の光退色条件で以降の実験を行った。Ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞に 30 μM escin 含有緩衝液で細胞膜透過性を上昇させ、その後 0, 1, 10, 100 μM cAMP 溶液 (pH7.4) を灌流した際の細胞体における ratiometric gCarvi の蛍光比を測定した (図 14B)。図 14B の結果から細胞内 ratiometric gCarvi の用量反応曲線を作成した (図 14C)。フィッティングカーブは Hill の式を用いて計算し、解離定数と Hill 係数を求めた ($K_d=3.20 \pm 0.38 \mu\text{M}$, $n=1.41 \pm 0.13$)。in vitro の ratiometric gCarvi タンパク質の解離定数と Hill 係数 ($K_d=2.05 \pm 0.06 \mu\text{M}$, $n=1.36 \pm 0.05$) と比較して、わずかに解離定数が高めに出ているが、in cell 系では細胞内に内因性の cAMP 結合タンパク質があるためだと考えられる。

このキャリブレーションカーブを元に、無傷時の ratiometric gCarvi の蛍光比から、定常時の海馬神経細胞の細胞体における cAMP 濃度を算出した結果、 $1.38 \pm 0.59 \mu\text{M}$ であった。この値は、定常時の cAMP 濃度レベルが PKA や Epac の活性化のスタートポイントに位置すると考えられる (Koschinski and Zaccolo, 2017)。また、ratiometric gCarvi の cAMP 解離定数は海馬神経細胞の定常時 cAMP 濃度の少し上であることから、ratiometric gCarvi は神経細胞内の cAMP 濃度上昇のダイナミックな変化を定量的にイメージングするのに適しているといえる。

Basal cAMP 濃度の形成要因の解明

本研究より、海馬神経細胞内の basal cAMP 濃度が約 1.4 μM であることが明らかとなった。次に、この cAMP 濃度がどのような分子機序で形成されているのか検討した。まずはじめに、cAMP 産生酵素であるアデニル酸シクラーゼの関与を検討した。アデニル酸シクラーゼには tmAC と sAC が存在する。Ratiometric gCarvi 発現海馬神経細胞に tmAC 活性化剤 20 μM FSK を灌流投与し、ratiometric gCarvi の蛍光比が上昇した後、20 μM FSK+100 μM 2',3'-DDA を投与したところ、蛍光比が半減した (図 15A)。このことから、2',3'-DDA は海馬神経細胞の tmAC を阻害できることを確認した。そこで、定常時の ratiometric gCarvi 発現海馬神経細胞に 100 μM 2',3'-DDA を灌流投与したところ、ratiometric gCarvi の蛍光比がわずかに減少した (2',3'-DDA (+)= 0.94 ± 0.09 , $p=0.005$) (図 15A)。同様に、他の tmAC 阻害剤である SQ22536 も FSK 存在下で蛍光比が半減することを確認し、basal cAMP 濃度をわずかに減少させた (SQ22536 (+)= 0.95 ± 0.12 , $p<0.001$) (図 15B)。Basal cAMP 濃度を正に制御する因子として tmAC がわずかに関与していることが明らかになった。

次に、cAMP 産生酵素である sAC の関与を検討した。Ratiometric gCarvi 発現海馬神経細胞に sAC 阻害剤である KH7 を灌流投与したところ、ratiometric gCarvi の蛍光比が大きく減少した (KH7 (+)= 0.72 ± 0.08 , $p<0.001$) (図 16A)。上記 AC 阻害剤の結果を比較したところ、basal cAMP 濃度を正に制御する因子としては主に sAC 活性に依存していることが明らかとなった。

cAMP 濃度は常に産生と分解のバランスで維持されている。そこで、cAMP 分解酵素である PDE が basal cAMP 濃度に関与するのかを検証した。PDE 阻害剤として Ibudilast と Rolipram を用いた。Ibudilast は PDE1~5 を阻害する。一方、Rolipram は PDE4 の選択的阻害剤である。これらの阻害剤をそれぞれ ratiometric gCarvi 発現海馬神経細胞に灌流投与した (図 17AB)。その結果、100 μM Ibudilast 投与ではわずかに ratiometric gCarvi の蛍光比が上昇させたが (Ibudilast(+)= 1.05 ± 0.16 , $p=0.027$)、100 μM Rolipram 投与では変化しなかった (Rolipram(+)= 1.04 ± 0.11 , $p=0.072$) (図 17CD)。Basal cAMP 濃度設定には海馬神経細胞に多く存在している PDE4 の関与が小さいと考えられる。

3.8. gCarvi と jRCaMP1b を用いた細胞内 cAMP/Ca²⁺同時イメージング

cAMP シグナリングと Ca²⁺シグナリングは、様々な神経機能を発現する上で相互調節を行っていると考えられている (Averaimo et al., 2014)。gCarvi は単色型 cAMP 蛍光プローブであるため、他色の蛍光プローブとの併用しやすいという利点がある。両セカンドメッセンジャーを同時にモニターするため、海馬神経培養細胞に cAMP 緑色蛍光プローブ gCarvi と Ca²⁺赤色蛍光プローブ jRCaMP1b (Ex 570 nm/Em 600 nm, Dana H et al. 2016) を共発現させた (図 18A)。10 μM FSK と共に、PDE 阻害剤 100 μM isobutyl methyl xanthine (IBMX) を海馬培養神経細胞に灌流投与したところ、細胞体の cAMP 濃度が約 3 分で最大レベルに達し、その後も維持された (図 18B)。この時間経過は、線条体ニューロンの細胞内 cAMP 動態の報告と一致していた (Muntean et al., 2018)。CBD 配列なしの mCherry-cpGFP 発現海馬神経細胞に同様に FSK+IBMX を投与したが、蛍光比に変化はなかった (図 19)。従って、gCarvi の蛍光強度変化は cAMP 依存的であり、FSK+IBMX の投与で細胞内 pH は変動しないと考えられる。また、FSK+IBMX を wash out 後、cAMP による蛍光強度上昇は約 5 分以内に薬剤投与前のベースラインまで戻った (図 18B)。細胞内 cAMP 動態は可逆的な制御を受けていると考えられる。次に、Ca²⁺動態の解析を行った。

実験した 57 個の神経細胞のうち、25 個は細胞内 cAMP 濃度上昇中に細胞体にて自発的な Ca²⁺スパイクの増加ならびに basal Ca²⁺の上昇が生じた (図 18C, group1)。また、group1 の Ca²⁺スパイクの増加の累積プロットから、cAMP 濃度が上昇している間、Ca²⁺スパイク上昇は一定していた (図 18D)。17 個の神経細胞は cAMP 濃度上昇とともに basal Ca²⁺上昇のみを示した (図 18E, group2)。残りの 15 個の神経細胞は、FSK+IBMX を投与しても Ca²⁺のレベルに明確な変化は見られなかった (図 18F, group3)。Group1 (=2.67±1.25) と group 2 (=0.76±0.31) では Ca²⁺スパイク上昇に有意差があった (図 18E, p<0.001)。また、basal Ca²⁺上昇は group1(=1.24±0.19) と group 2 (=1.27±0.14) に違いはなかったが (p=0.863)、Ca²⁺変動がなかった group3 (=0.98±0.08) とは有意差があった (図 18H, p<0.001)。Basal Ca²⁺上昇があったグループ (group1,2) の方が Ca²⁺応答変化がなかった group3 よりも FSK による cAMP 濃度上昇が大きかった (図 18I, p<0.001)。これらの結果から、海馬神経細胞では、細胞内 cAMP の一定以上の上昇がベースの Ca²⁺上昇を引き起こし、相加的に Ca²⁺スパイクを誘発すると考えられる。

反対に、Ca²⁺上昇は cAMP 上昇を誘導するのか検証した。gCarvi と jRCaMP1b を共発現している海馬神経細胞に Ca²⁺スパイクを誘発するフィールド電気刺激 (5~20Hz、1 秒間) を与えたところ (図 20ABC)、一過的な Ca²⁺上昇があり、その振幅の大きさは刺激頻度に比例して増加した (図 20E)。一方で、これらの刺激条件では cAMP 動態に変化はなかった (図 20D)。この結果から、自発発火程度の神経活動に起因する細胞内 Ca²⁺の一過的な濃度上昇は、細胞内 cAMP 濃度に影響を与えないと考えられた。従って、今回の実験条件では、

cAMP から Ca^{2+} への一方向の作用であったと考えられる。以上の実験は、gCarvi がマルチシグナリングイメージングにも対応できることの証明でもある。

	cAMP	cGMP
CBD156-cpGFP	-37 %	-25 %
CBD138-	-29 %	-10 %
CBD137-	13 %	-2 %
CBD136-	33 %	-3 %
CBD135-	45 %	-2 %
CBD134-	27 %	-3 %
CBD133-	-17 %	-17 %
CBD132-	-12 %	-19 %
CBD131-	-15 %	-18 %
CBD130-	-16 %	-21 %
CBD129-	-34 %	-16 %

表 5. 単色型 cAMP 緑色蛍光プローブの開発に向けた CBD の配列長の検討

E.coli 由来の CRP の CBD の C 末端側に位置する C-helix および D-helix の長さ (129-138、全長 156) を検討した。各 CBD の C 末端側に GCaMP3 由来の cpGFP を融合した。これら候補分子精製タンパク質に 100 μ M cAMP または 100 μ M cGMP を添加した際の蛍光変化幅 ($\Delta F/F$ (%)) をマイクロプレートリーダー (Ex: 485 nm, Em : 535 nm) で計測した。100 μ M cAMP 存在下で緑色蛍光が 45 %上昇した CBD135-cpGFP をリードコンストラクトとした (緑色ハイライト)。値は独立した 3 well の実験値の平均を表している。

	cAMP	cGMP
CBD135-cpGFP (GCaMP3)	44 %	-4 %
cpGFP (GCaMP6)	60 %	16 %
cpGFP (GCaMP8)	31 %	3 %
cpGFP (G-GECO1)	74 %	2 %
cpGFP (G-GECO1.01)	77 %	4 %
cpGFP (G-GECO1.1)	61 %	4 %
cpGFP (G-GECO1.2)	59 %	-10 %
cpGFP (G-GECO1+GCaMP6)	24 %	-1 %
cpGFP (G-GECO1+GCaMP8)	46 %	-4 %

表 6. 単色型 cAMP 緑色蛍光プローブの開発に向けた cpGFP の検討

CBD135 に融合した際に蛍光変化幅 ($\Delta F/F$ (%)) が最大になる cpGFP のスクリーニング。候補 cpGFP は緑色蛍光 Ca^{2+} プローブである GCaMP シリーズ、G-GECO シリーズ由来のものを使用した。CBD135-cpGFP 候補分子の精製タンパク質の 100 μ M cAMP または 100 μ M cGMP を添加した際の蛍光変化幅 ($\Delta F/F$ (%)) をマイクロプレートリーダーで計測した。CBD135 の C 末端側に G-GECO1 由来の cpGFP を融合した候補分子が cAMP に対する蛍光上昇が大きく、cGMP に対する蛍光変化率が低かった (緑色ハイライト)。値は独立した 3 well の実験値の平均を表している。

	cAMP	cGMP
CBD A135I-cpGFP (G-GECO1)	171 %	69 %
W-	164 %	43 %
Y-	144 %	11 %
M-	120 %	48 %
H-	104 %	14 %
L-	102 %	31 %
Q-	100 %	10 %
P-	95 %	-14 %
T-	86 %	-8 %
G-	84 %	-10 %
V-	80 %	19 %
R-	79 %	16 %
A- (WT)	74 %	2 %
C-	66 %	-2 %
F-	65 %	4 %
N-	64 %	-1 %
K-	59 %	4 %
S-	57 %	0 %
D-	25 %	-3 %
E-	19 %	-7 %

表 7. 単色型 cAMP 緑色蛍光プローブ候補分子の点変異スクリーニング

CBD135-cpGFP (G-GECO1 由来) の 135 番目のアミノ酸残基を他 19 種類の変異体に置換した精製タンパク質を 100 μ M cAMP または 100 μ M cGMP を添加した際の蛍光変化幅 ($\Delta F/F$ (%)) をマイクロプレートリーダーで計測した。データは cAMP に対する応答の降順で並べた。135 番目のアミノ酸を芳香族アミノ酸に置換した候補分子の蛍光変化幅が大きい傾向があった。CBD A135Y-cpGFP (G-GECO1) は、cAMP に対して 144 % 応答し、cGMP に対する応答が 11 % と小さいことから、CBD(A135Y)-cpGFP(G-GECO1) を単色型 cAMP 緑色蛍光プローブとして採用した (緑色ハイライト)。値は独立した 3 well の実験値の平均を表している。

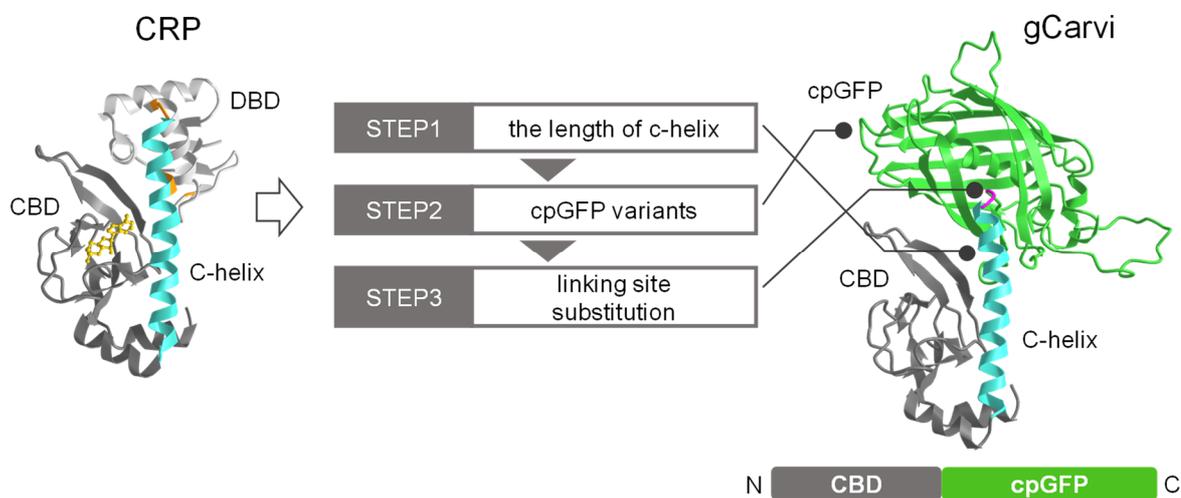


図3. 単色型 cAMP 緑色蛍光プローブの概要と立体構造

(左) *E.coli*由来の CRP (PDB_1G6N) の単量体の立体構造。CRP は C-helix (水色) を含む CBD (濃灰色) と DBD (淡灰色) から構成される。cAMP は黄色で示した。CRP の 129aa, 138aa, 156aa の位置はオレンジ色でハイライトしている。

(中央) CRP を元にステップ 1~3 の 3 段階スクリーニングによって gCarvi を開発した。

(右) gCarvi の配列概要図と Phyre2 を用いて予測された gCarvi の立体構造。CBD(1-135) の C 末端側に cpGFP (G-GECO1 由来、緑色) を融合している。CBD135aa の位置 (リンカー部位) はピンク色でハイライトしている。

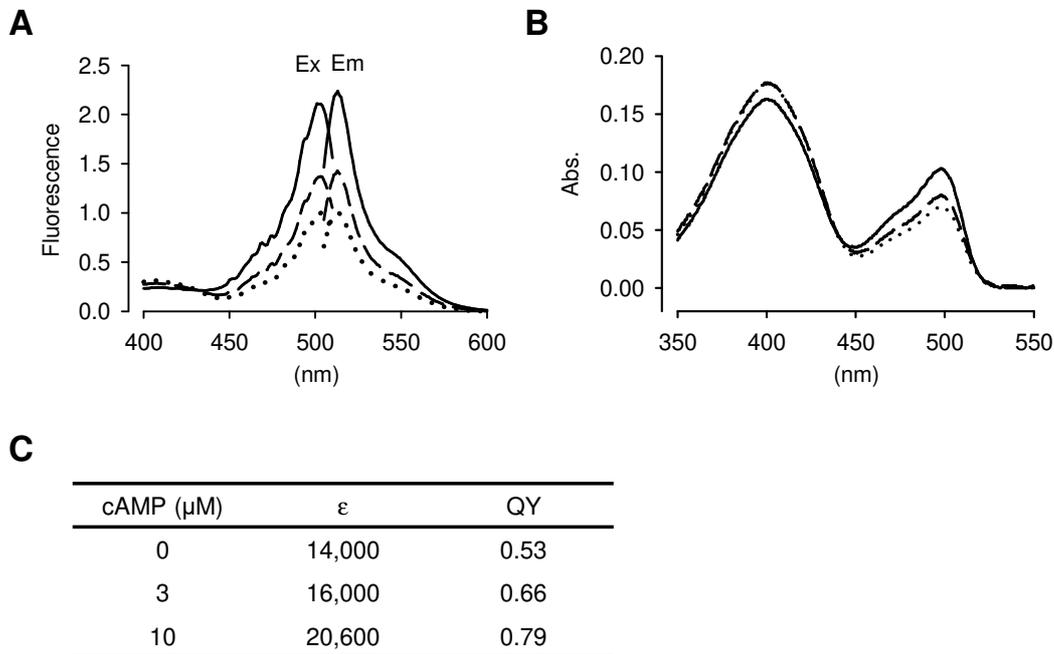


図4. gCarvi の蛍光特性

- (A) 精製 gCarvi タンパク質の 0 μM cAMP (点線)、3 μM cAMP (破線)、10 μM cAMP (実線) 下の励起スペクトル (Ex) と蛍光スペクトル (Em)。cAMP の存在有無に関わらず、gCarvi の励起スペクトルの最大励起波長は 504 nm、蛍光スペクトルの最大蛍光波長は 523 nm である。cAMP 濃度上昇に伴ってスペクトルの山は高くなる。各スペクトルは、cAMP 非存在下でのピーク蛍光値で正規化した。
- (B) 5 μM 精製 gCarvi タンパク質の 0 μM cAMP (点線)、3 μM cAMP (破線)、10 μM cAMP (実線) 下の吸光スペクトル。gCarvi は cAMP の有無に関係なく、498 nm に吸光スペクトルのピークをもち、cAMP 濃度上昇に伴ってより光を吸収する性質がある。400 nm の吸光度は cAMP 結合時にわずかに減少するが、蛍光の励起には寄与しない。
- (C) 精製 gCarvi タンパク質のモル吸光係数 (ϵ) ならびに量子収率 (QY)。QY は標準フルオレセインに対する相対値として求めた。

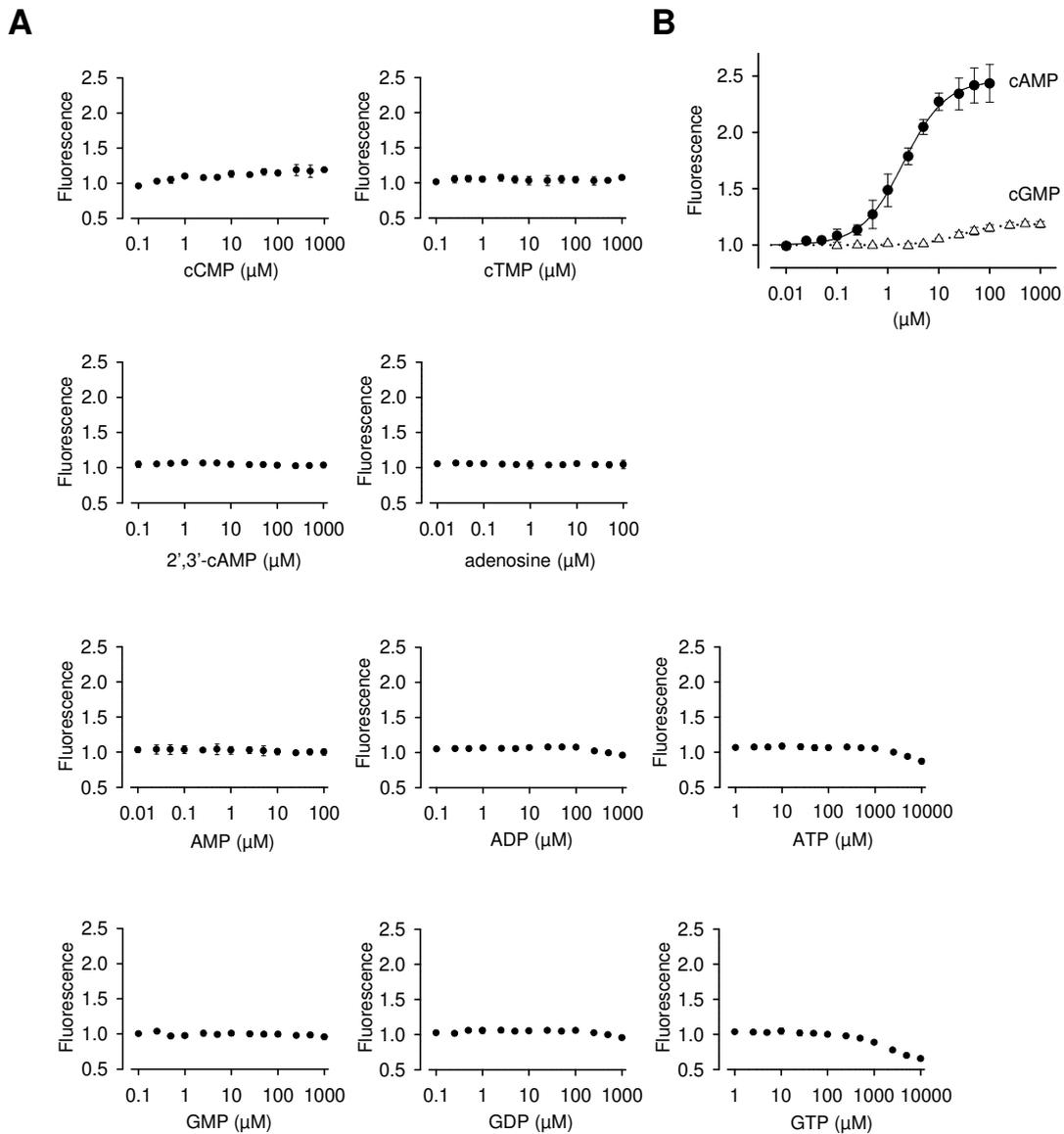
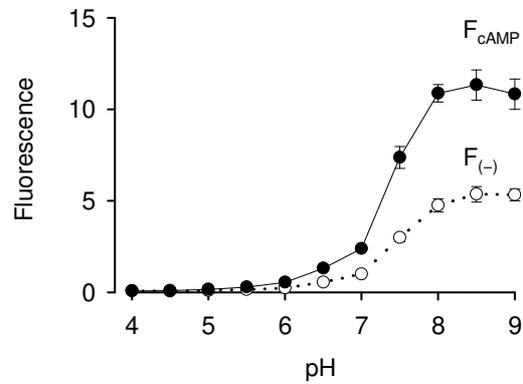
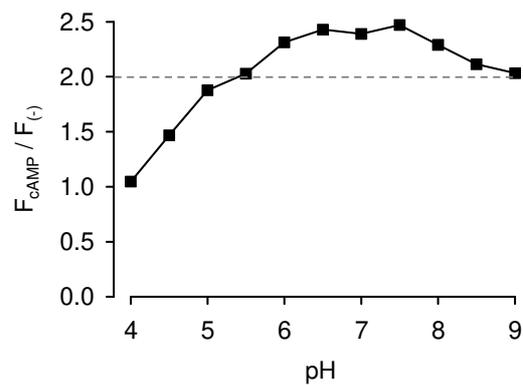


図 5. gCarvi は cAMP 特異的なプローブである

- (A) 精製 gCarvi タンパク質の cCMP, cTMP, 2',3'-cAMP, adenosine, AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP に対する用量反応。gCarvi は生理的濃度の ATP (< 3 mM)、GTP (< 500 μM) 及びその他のヌクレオチド分子には応答しない。蛍光強度はヌクレオチド非存在下の値で正規化した。プロットは独立した 3 回の実験を元に平均値 ± SD で示している。
- (B) 精製 gCarvi タンパク質の cAMP (●) と cGMP (△) に対する用量反応曲線。cAMP (実線)、cGMP (破線) のフィッティングカーブは Hill の式を用いて作成した。各蛍光強度は cAMP、cGMP の F_{\min} で正規化した。プロットは独立した 3 回の実験を元に平均値 ± SD で示している。

A**B****図 6. gCarvi の pH 感受性**

(A) 精製 gCarvi タンパク質の cAMP 非存在下 ($F_{(-)}$, ○, 点線) または 100 μ M cAMP 下 (F_{cAMP} , ●, 実線) の pH-蛍光曲線。各蛍光強度は cAMP 非存在下の pH 7.0 における平均強度で正規化した。プロットは独立した 3 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している。

(B) (A) を元に算出した各 pH 下での精製 gCarvi タンパク質の蛍光変化率 ($F_{cAMP}/F_{(-)}$)。gCarvi の蛍光変化率は pH 6.5-7.5 において約 2.5 倍で維持したことから、中性域における gCarvi の安定性を示している。

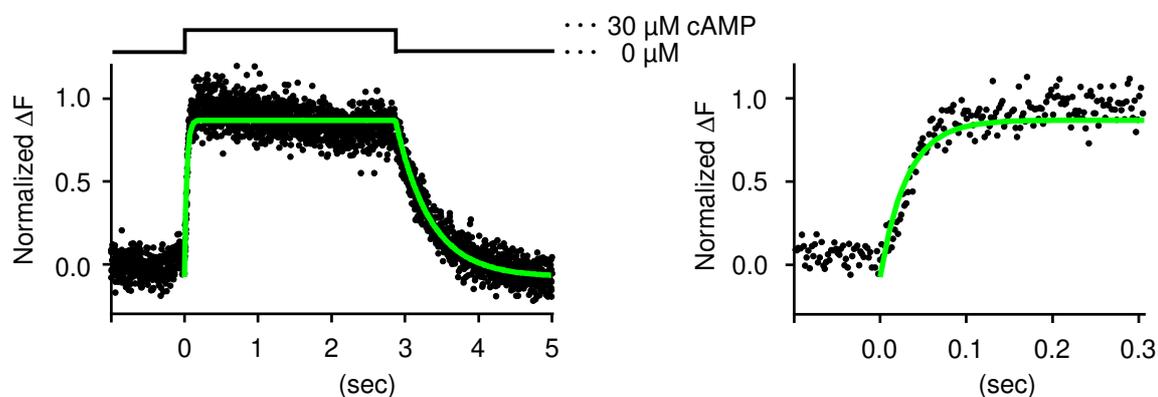


図 7. gCarvi の結合速度定数・解離速度定数の計測

(左) PBS を灌流中に 30 μM cAMP を微小局所灌流させたときの精製 gCarvi タンパク質の蛍光変化を共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードで計測した際の代表的なタイムプロファイル。精製 gCarvi タンパク質は His タグを介して Ni-NTA 処理したカバーガラスと結合させた。cAMP の結合と解離の曲線 (緑色) は、1 サイト結合モデルでフィッティングした。蛍光強度は $F_{\min} - F_{\max}$ で正規化した。

(右) 左のグラフの on-rate がわかるように拡大した。

	cAMP					cGMP		
	K_d (μM)	n	D.R.	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (μM)	n	D.R.
gCarvi	2.03	1.05	1.46	1.38×10^6	3.31	27.4	1.22	0.19

表 8. gCarvi の特性表

図 5B と図 7 の結果から gCarvi の解離定数 (K_d)、Hill 定数 (n)、ダイナミックレンジ (D.R.)、結合定数 (k_{on} , k_{off}) をまとめた。cAMP と cGMP に対する解離定数はそれぞれ $2.03 \pm 0.22 \mu\text{M}$ と $27.4 \pm 4.4 \mu\text{M}$ であった。cAMP と cGMP の Hill 定数はそれぞれ 1.05 ± 0.11 と 1.22 ± 0.21 であった。cAMP と cGMP のダイナミックレンジはそれぞれ 1.46 ± 0.05 と 0.19 ± 0.01 であった。cAMP の結合速度は $1.38 \pm 0.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数は $3.31 \pm 0.77 \text{ s}^{-1}$ であった。すべてのデータ値は独立した 4 回の実験の平均値 \pm SD である。

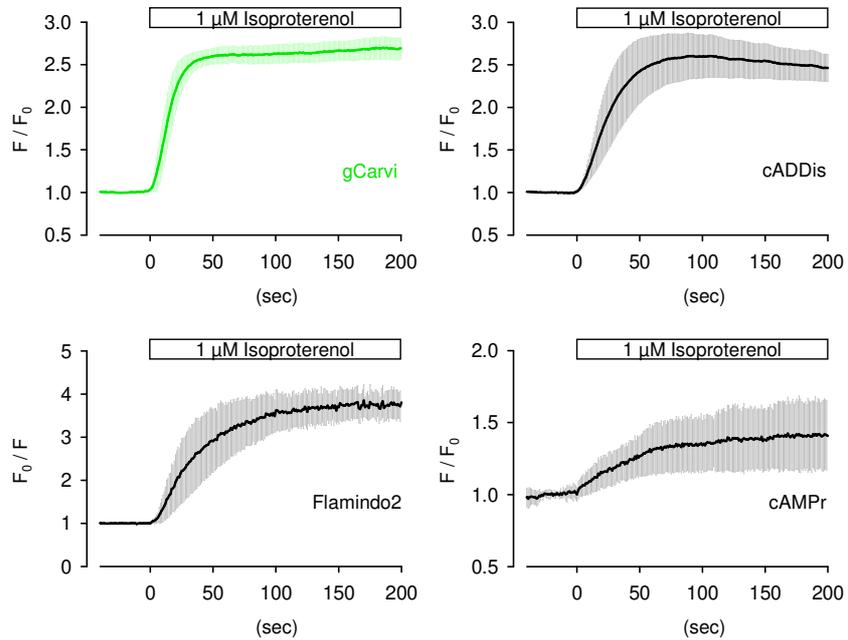
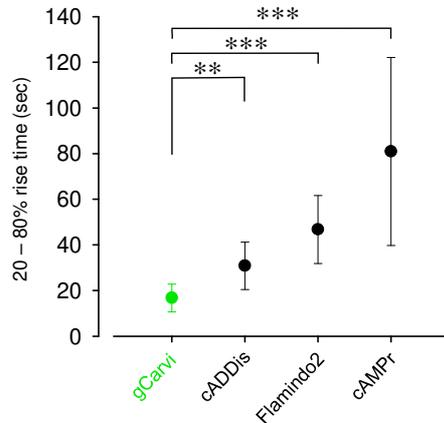
A**B**

図 8. gCarvi と他の cAMP 緑色蛍光プローブの比較

- (A) 単色型 cAMP 緑色蛍光プローブである gCarvi、cADDis、Flamindo2 および cAMPr を発現した COS-7 細胞に 1 μ M Isoproterenol (β -アドレナリン受容体アゴニスト) を灌流投与した際の蛍光強度時間変化。独立した 4 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している。
- (B) gCarvi はこれら緑色蛍光 cAMP プローブの中で最も速い 20-80 % rise time を示した (gCarvi: 16.7 \pm 6.1 sec, n = 14 cells; cADDis: 30.8 \pm 10.4 sec, n = 12 cells; Flamindo2: 46.7 \pm 14.9 sec, n = 15 cells; cAMPr: 80.9 \pm 41.2 sec, n = 14 cells)。すべてのデータは 4 つの独立した実験から得られた。プロットはすべて平均値 \pm SD で示している。gCarvi vs cADDis: p = 0.004, gCarvi vs Flamindo2: p < 0.001, gCarvi vs cAMPr: p < 0.001, Brown-Forsythe analysis post hoc Dunnett T3's multiple comparisons.

	100 μ M cAMP		100 μ M cGMP	
	Ex (nm): 485	560	485	560
TagRFP-G-CBD A135I-cpGFP (G-GECO1)	129 %	1 %	47 %	0 %
Y-	94 %	2 %	11 %	0 %
H-	77 %	2 %	9 %	-1 %
Q-	70 %	-3 %	3 %	-4 %
A- (WT)	49 %	5 %	6 %	6 %
mCherry-CBD A135I-cpGFP (G-GECO1)	202 %	2 %	64 %	2 %
Y-	139 %	-2 %	19 %	-4 %
H-	97 %	1 %	8 %	-3 %
Q-	101 %	2 %	2 %	-7 %
A- (WT)	69 %	7 %	-3 %	-2 %

表 9. Ratiometric gCarvi の開発スクリーニング

gCarvi の N 末端に 2 種類の赤色蛍光タンパク質を融合した。これら候補分子精製タンパク質に 100 μ M cAMP と 100 μ M cGMP を添加した際の蛍光変化幅 ($\Delta F/F$ (%)) をマイクロプレートリーダーで計測した。TagRFP、mCherry とともに cAMP と cGMP に反応しなかった (Ex = 560 nm)。蛍光変化幅と cAMP/cGMP 特異性を考慮し、mCherry-CBD A135Y-cpGFP (G-GECO1) を ratiometric gCarvi として採用した (赤色ハイライト)。値は独立した 3 well の実験値の平均を表している。

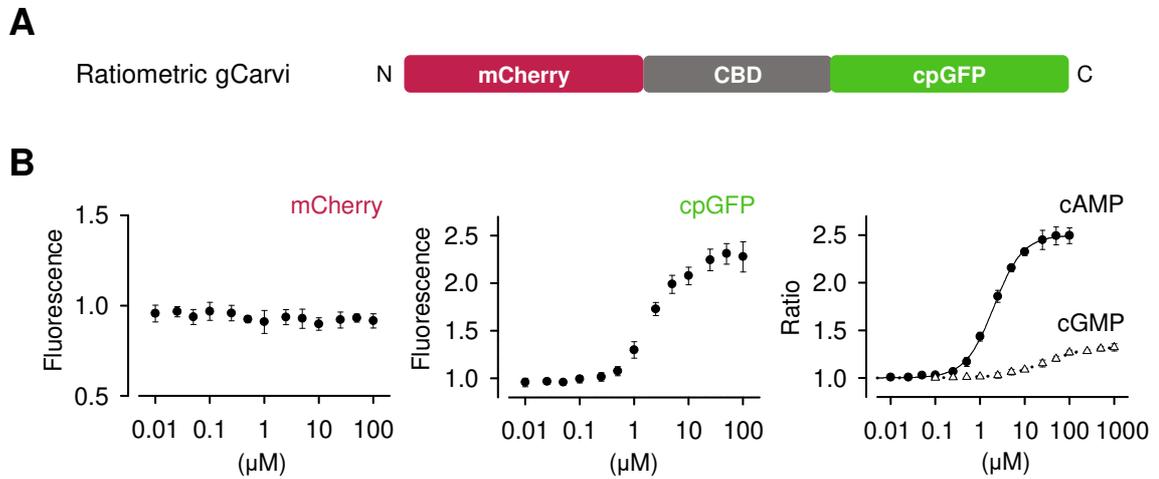


図 9. Ratiometric gCarvi の概要と用量反応曲線

- (A) 細胞内 cAMP の定量的イメージングのため、gCarvi の N 末端にコントロールシグナルとなる赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合した ratiometric gCarvi の模式的な配列概要図。
- (B) 精製 ratiometric gCarvi タンパク質の mCherry (左)、cpGFP (中央) 蛍光の用量反応プロット。mCherry と cpGFP 蛍光強度は cAMP 非存在下での値で正規化した。cpGFP のみが cAMP 結合によって蛍光上昇し、mCherry は cAMP に反応しない。(右) cAMP (●) と cGMP (△) に対する ratiometric gCarvi の cpGFP/mCherry 比の用量反応曲線。cAMP (実線) および cGMP (破線) に対するフィッティングカーブは、Hill の式から求めた。各 ratio 値は、 R_{\min} で元に正規化した。プロットは独立した 3 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している。

	cAMP					cGMP		
	K_d (μM)	n	D.R.	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (μM)	n	D.R.
Ratiometric gCarvi	2.05	1.36	1.50	1.20×10^6	3.11	28.9	0.95	0.33

表 10. Ratiometric gCarvi の特性表

Ratiometric gCarvi の解離定数 (K_d)、Hill 定数 (n)、ダイナミックレンジ (D.R.)、結合定数 (k_{on} , k_{off}) をまとめた。これらの値は ratiometric gCarvi の cAMP と cGMP に対する容量反応曲線(図 9B 右)ならびに結合解離速度定数測定から算出した。cAMP と cGMP に対する解離定数はそれぞれ $2.05 \pm 0.06 \mu\text{M}$ と $28.9 \pm 2.5 \mu\text{M}$ であった。cAMP と cGMP の Hill 定数はそれぞれ 1.36 ± 0.05 と 0.95 ± 0.07 であった。cAMP と cGMP のダイナミックレンジはそれぞれ 1.50 ± 0.02 と 0.33 ± 0.01 であった。cAMP の結合速度は $1.20 \pm 0.32 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数は $3.11 \pm 0.84 \text{ s}^{-1}$ であった。すべてのデータ値は独立した 4 回の実験の平均値 \pm SD である。

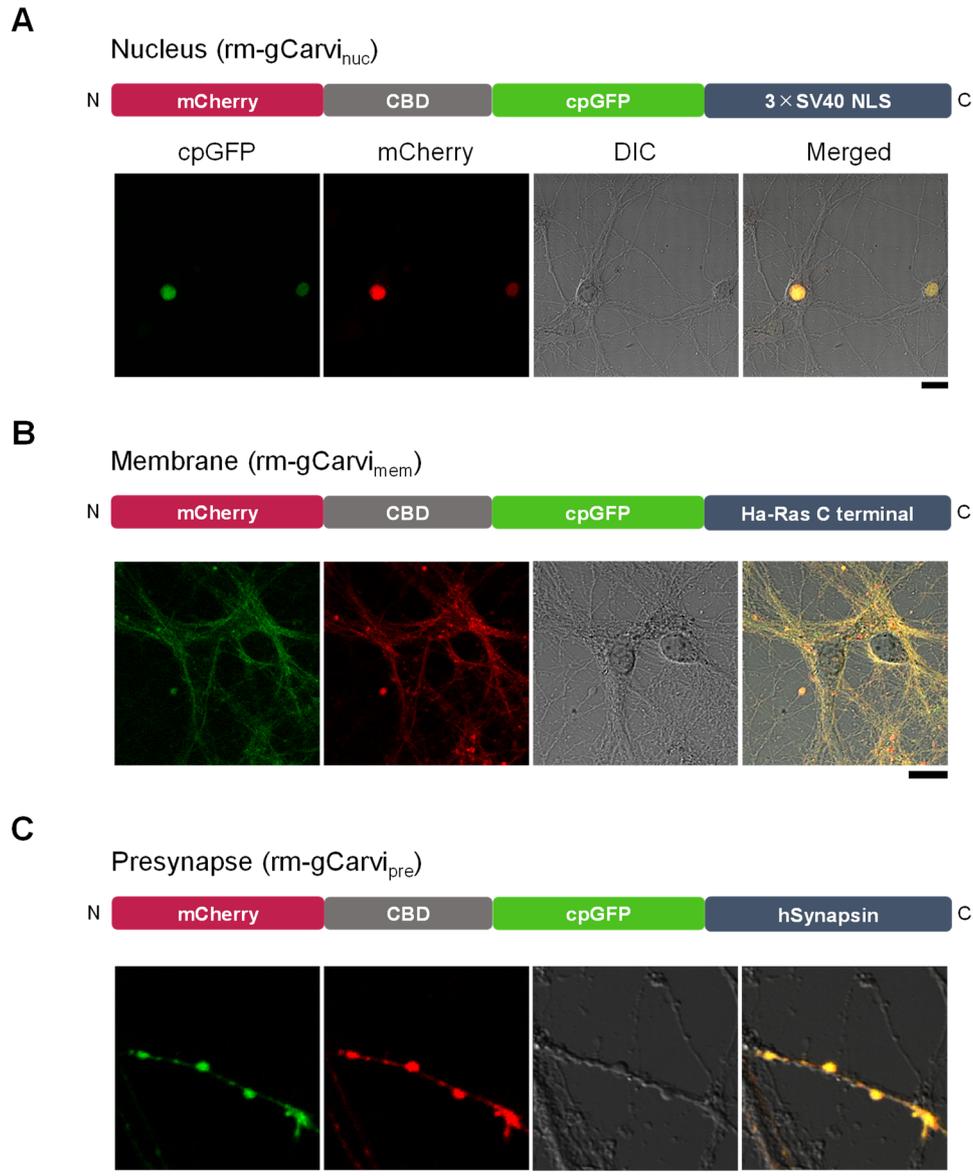
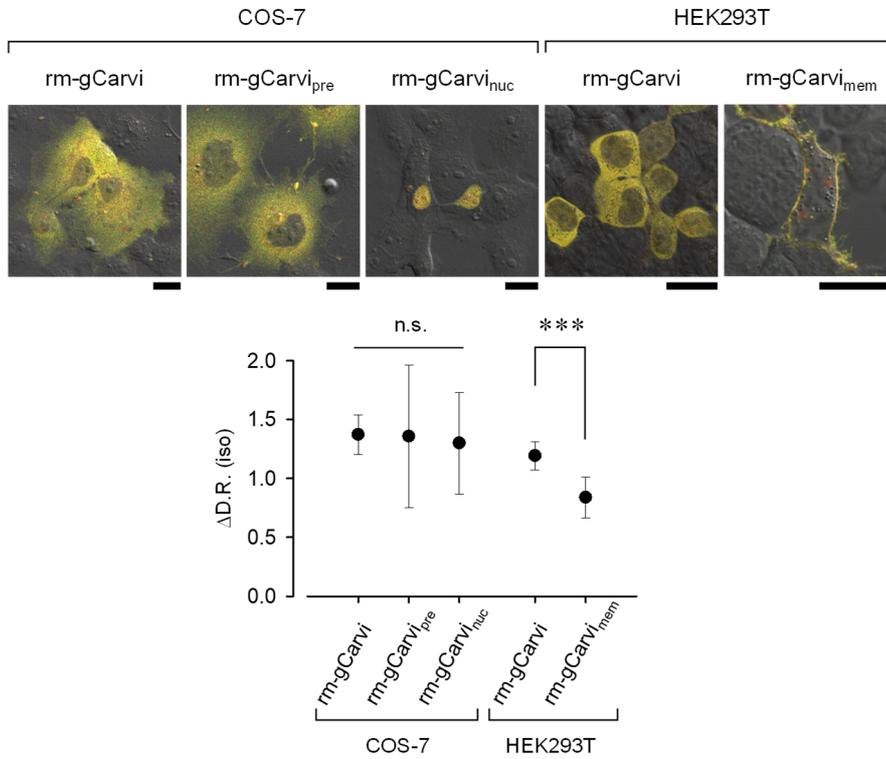


図 10. 核、細胞膜、シナプス前末端ターゲティング型 ratiometric gCarvi の開発

- (A) 核ターゲティング型 ratiometric gCarvi (rm-gCarvi_{nuc}) の配列概要図と rm-gCarvi_{nuc} を発現した海馬培養神経細胞 (10DIV)。rm-gCarvi_{nuc} は ratiometric gCarvi の C 末端に SV40 核局在シグナルの 3 タンデムリピートを融合している。
- (B) 細胞膜ターゲティング型 ratiometric gCarvi (rm-gCarvi_{mem}) の配列概要図と rm-gCarvi_{mem} を発現した海馬培養神経細胞 (11DIV)。rm-gCarvi_{mem} は ratiometric gCarvi の C 末端に Ha-Ras の C 末端配列を融合している。
- (C) シナプス前末端ターゲティング型 ratiometric gCarvi (rm-gCarvi_{pre}) の配列概要図と rm-gCarvi_{pre} を発現した海馬培養神経細胞 (13DIV)。rm-gCarvi_{pre} は ratiometric gCarvi の C 末端にヒト由来の synapsin 全長を融合している。スケールバーは全て 20 μ m。

A



B

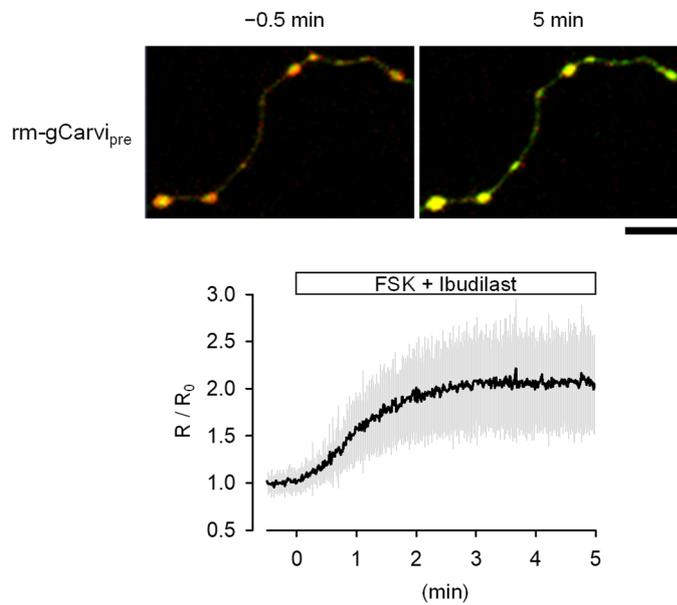


図 11. 各種細胞内ターゲティング型 ratiometric gCarvi の応答

(A) Ratiometric gCarvi (rm-gCarvi)、各種ターゲティングコンストラクト (rm-gCarvi_{nuc}, rm-gCarvi_{mem}, rm-gCarvi_{pre}) を発現した COS-7 と HEK293T 細胞を用いた細胞内ダイナミックレンジ比較。スケールバーは 20 μm 。1 μM Isoproterenol で誘導される ratio 最

大変化幅を各コンストラクトについてプロットした。COS-7 細胞実験間; $p = 0.914$, n.s., not significant, ANOVA. HEK293T 細胞実験間; $p < 0.001$, unpaired t-test. $n = 10-12$ cells. プロットは独立した 3~5 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している。

- (B) rm-gCarvi_{pre} を発現した海馬培養神経細胞。スケールバーは 10 μ m. 10 μ M Forskoline(FSK)+100 μ M Ibudilast を灌流投与し、シナプス前末端における cAMP 濃度上昇を引き起こした際の蛍光変化の時間経過 (12–25DIV, $n = 29$ boutons)。FSK+Ibudilast 添加前の蛍光比 (R_0 , cpGFP/mCherry) で正規化している。独立した 7 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している。

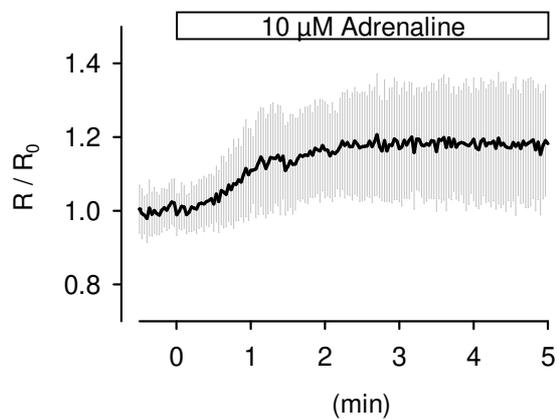


図 12. Adrenaline による培養海馬神経細胞の cAMP 上昇

Ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (26DIV) に 10 μM Adrenaline を灌流投与した際の蛍光強度比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。独立した 5 回の実験を元に平均値 ±SD で示している (n=46 cells)。

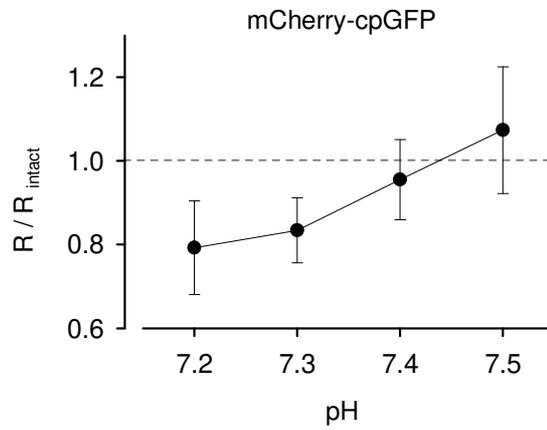


図 13. Escin による細胞膜透過処理時の灌流溶液 pH の検討

mCherry-cpGFP を発現した海馬培養神経細胞（13–25DIV）に対して各 pH の Escin 含有緩衝液を灌流投与した際の蛍光比（cpGFP/mCherry）。各プロットは無傷の神経細胞の蛍光比（ R_{intact} ）で正規化した。データは独立した 3~7 回の実験（ $n=41-69$ cells）から取得し、プロットは平均値 \pm SD で示している。

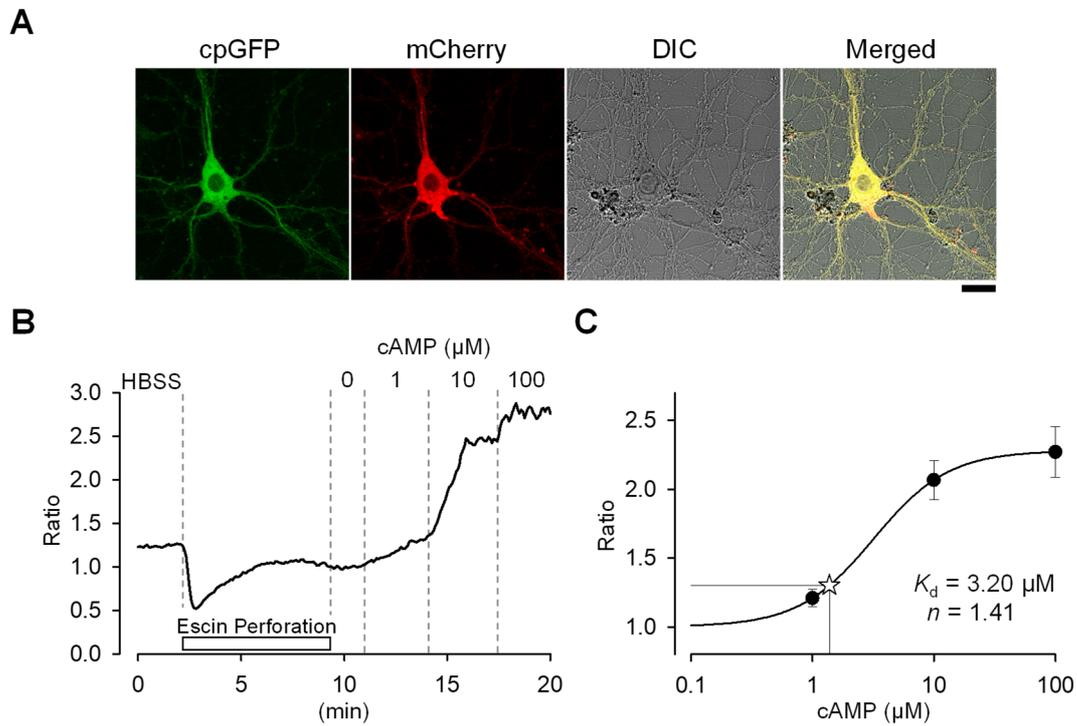


図 14. Basal cAMP 濃度計測のための定量イメージング

- (A) Ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞の代表的な蛍光画像 (14DIV)。スケールバーは 20 μm 。
- (B) 30 μM Escin 含有緩衝液で透過処理した ratiometric gCarvi 発現海馬神経細胞を 1, 10, 100 μM cAMP 溶液 (pH7.4) に暴露した際の細胞体における蛍光比 (cpGFP/mCherry) の代表的な時間経過。
- (C) Ratiometric gCarvi の細胞内用量反応曲線。データは 4 つの独立したタイムラプス画像 ($n=18$ cells) から得た。フィッティングカーブは Hill の式を用いて求めた ($K_d = 3.20 \pm 0.38 \mu\text{M}$, $n = 1.41 \pm 0.13$)。Escin 添加前の蛍光比をフィッティングカーブに当てはめたところ、海馬神経細胞の細胞体における basal cAMP 濃度は $1.38 \pm 0.59 \mu\text{M}$ と算出された (星印)。プロットは平均値 \pm SD を表している。

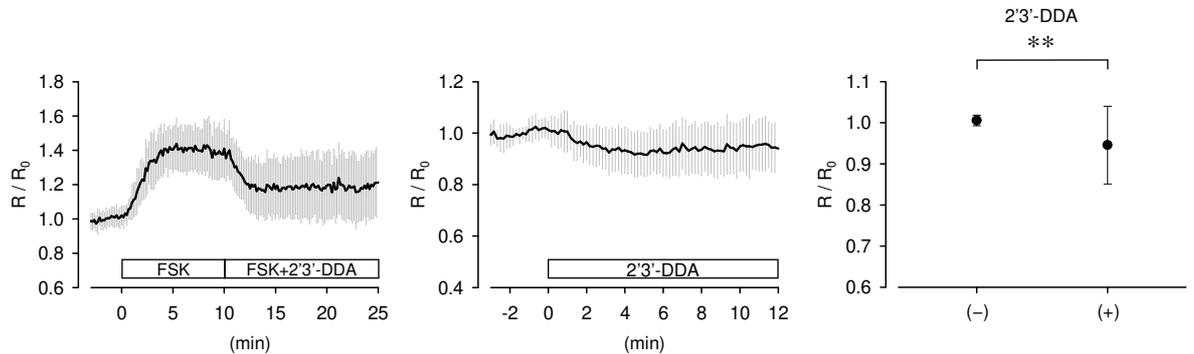
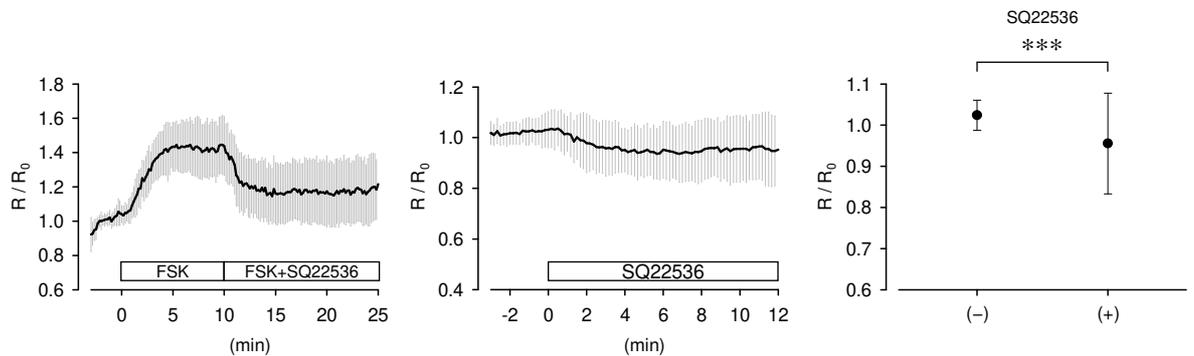
A**B**

図 15. Basal cAMP 濃度に対する膜貫通型アデニル酸シクラーゼの影響

(A) (左) 膜貫通型アデニル酸シクラーゼ阻害剤である 2',3'-DDA の阻害効果を確認するため、ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (18–29DIV) に 20 μ M FSK を灌流投与後、20 μ M FSK+100 μ M 2',3'-DDA を投与した際の蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。独立した 4 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=18 cells)。

(中央) ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (16~26DIV) に 100 μ M 2',3'-DDA を灌流投与した際の蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。独立した 5 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=23 cells)。

(右) (中央) のグラフを元に、2',3'-DDA 投与前 (-) と投与後 (+) の蛍光比の比較。プロットは投与前の平均値で正規化し、平均値 \pm SD で示している。(paired t-test, p=0.005.)

(B) (左) 膜貫通型アデニル酸シクラーゼ阻害剤 SQ22536 の阻害効果を確認するため、ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (14–17DIV) に 20 μ M FSK を灌流投与後、20 μ M FSK+100 μ M SQ22536 を投与した際の蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。独立した 4 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=18 cells)。

(中央) ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (14–17DIV) に 100 μ M SQ22536 を灌流投与した際の蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。独立し 6 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=29 cells)。

(右) (中央) のグラフを元に、SQ22536 投与前 (−) と投与後 (+) の蛍光比の比較。プロットは投与前の平均値で正規化し、平均値±SD で示している。(paired t-test, $p < 0.001$, $p = 0.0008$.)

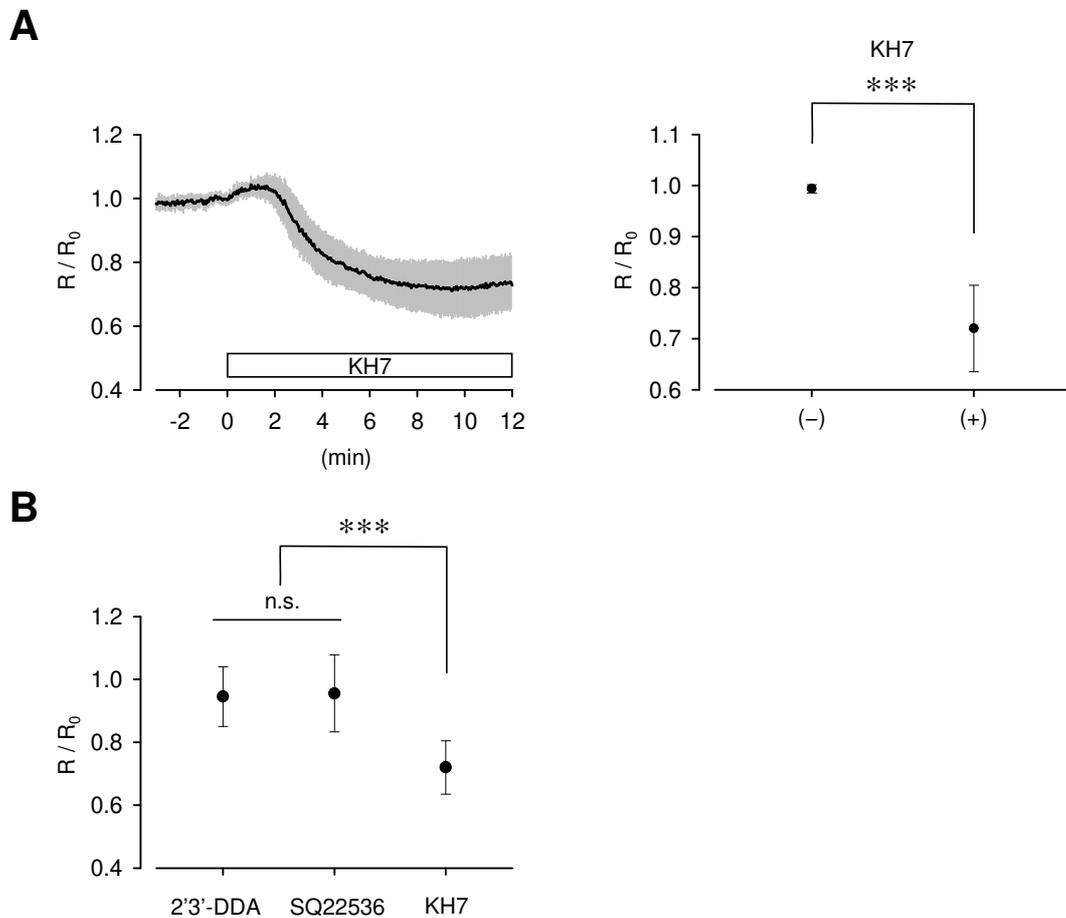


図 16. Basal cAMP 濃度の形成は可溶性アデニル酸シクラーゼ依存性が高い

- (A) (左) ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (16DIV) に 50 μ M KH7 を灌流投与したときの蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。蛍光比は KH7 投与前の平均で正規化した。独立した 4 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=16 cells)。
- (右) (左) のグラフを元に、KH7 投与前 (-) と投与後 (+) の蛍光比の比較。プロットは投与前の平均値で正規化し、平均値 \pm SD で示している。(paired t-test, $p < 0.001$)
- (B) 各アデニル酸シクラーゼ阻害剤 (2'3'-DDA = 0.95 ± 0.09 , SQ22536 = 0.96 ± 0.12 , KH7 = 0.72 ± 0.08) 投与による ratiometric gCarvi の蛍光比の比較。データは図 15AB, 図 16A の薬剤投与後 9–11 分の蛍光比を使用した。2'3'-DDA vs SQ22536 ; $p = 0.937$, n.s., not significant, ANOVA. 2'3'-DDA, SQ22536 vs KH7 ; $p < 0.001$, one-way ANOVA post-hoc Tukey's multiple comparisons.

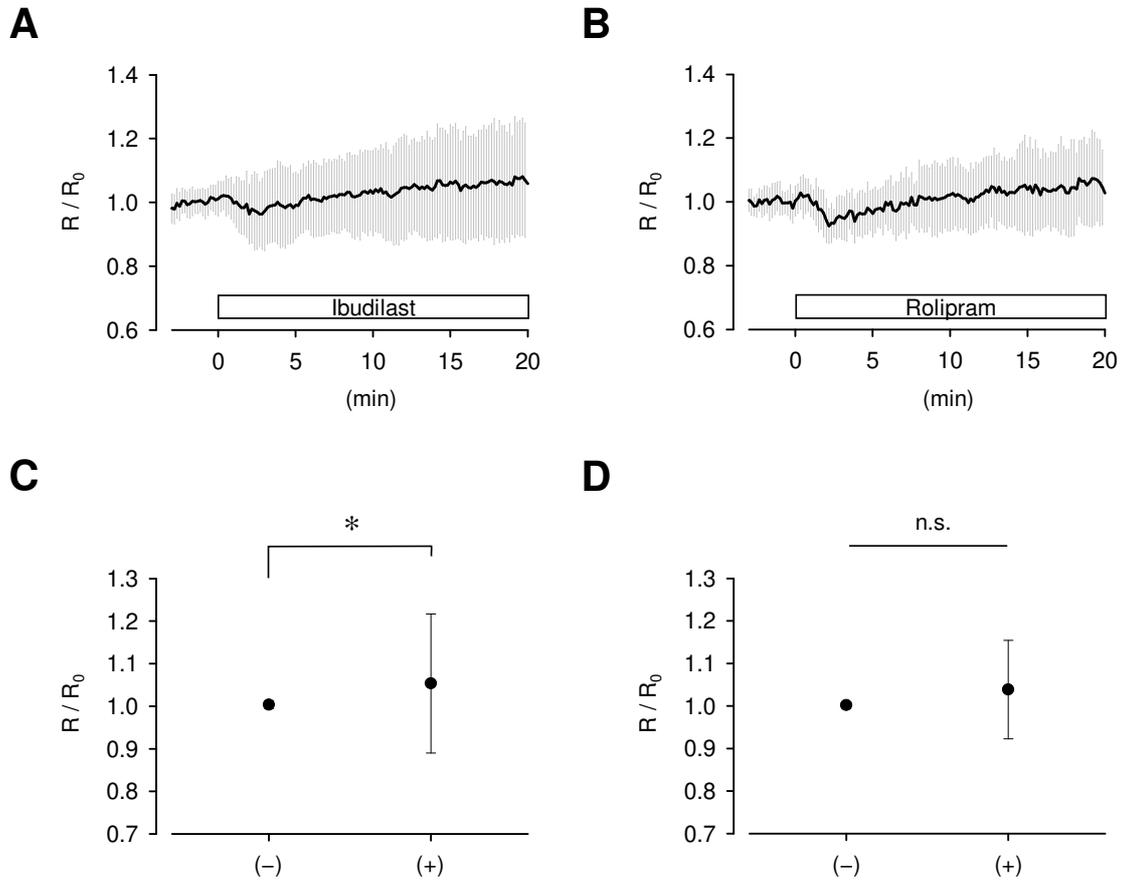


図 17. Basal cAMP 濃度に対するホスホジエステラーゼの影響

- (A) Ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (13–21DIV) に 100 μ M Ibudilast を灌流投与したときの蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。蛍光比は Ibudilast 投与前の平均値で正規化した。独立した 9 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=54 cells)。
- (B) Ratiometric gCarvi を発現した培養海馬神経細胞 (21DIV) に 100 μ M Rolipram を灌流投与したときの蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。蛍光比は Rolipram 投与前の平均値で正規化した。独立した 4 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=34 cells)。
- (C) (A) のグラフを元に、Ibudilast 投与前 (-) と投与後 (+) の蛍光比の比較。プロットは投与前の平均値で正規化し、平均値 \pm SD で示している。(paired t-test, p=0.027)
- (D) (B) のグラフを元に、Rolipram 投与前 (-) と投与後 (+) の蛍光比の比較。プロットは投与前の平均値で正規化し、平均値 \pm SD で示している。(paired t-test, p=0.072, n.s., not significant)

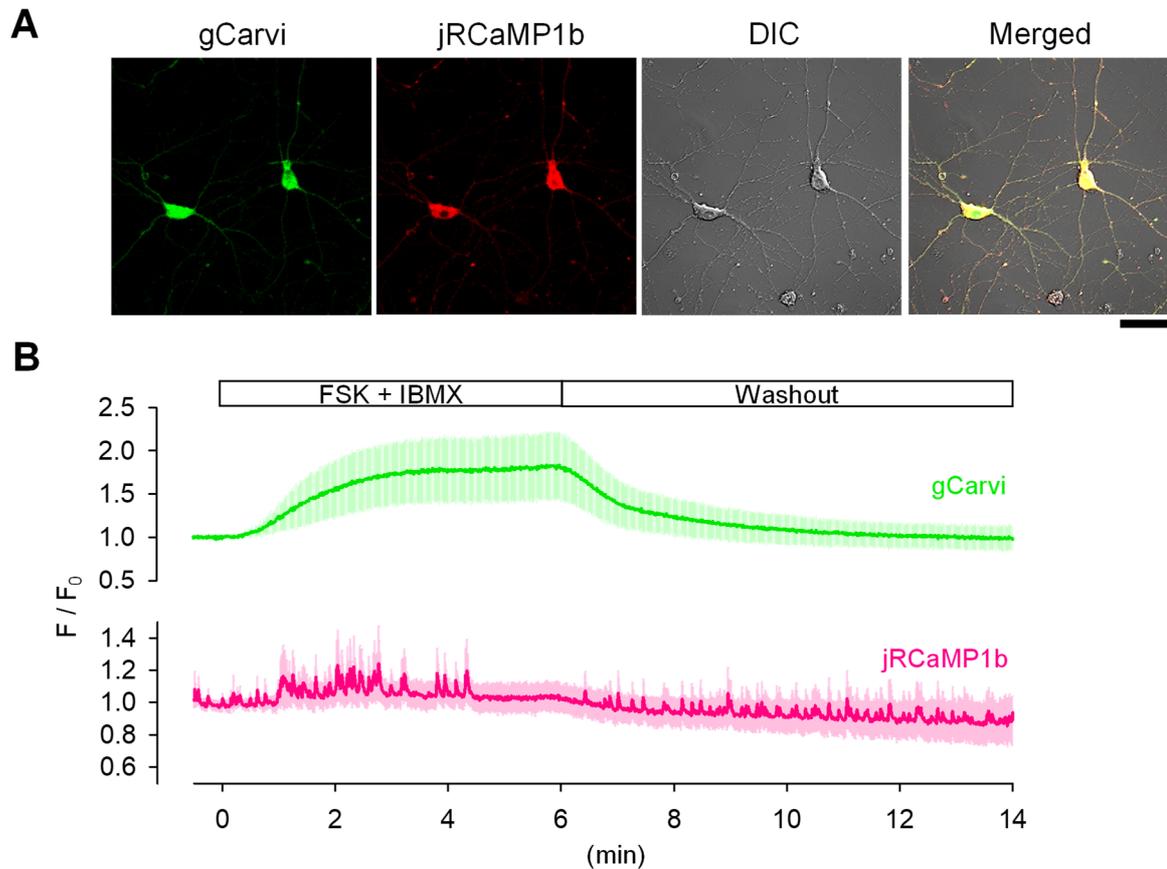


図 18. 培養海馬神経細胞における cAMP と Ca^{2+} 動態の同時イメージング

(A) gCarvi (緑色) ならびに jRCaMP1b (赤色) を発現している海馬培養神経細胞 (17DIV) の蛍光画像。スケールバーは 50 μ m.

(B) 10 μ M FSK + 100 μ M IBMX 灌流投与および wash out 時の gCarvi (緑色)、jRCaMP1b (赤色) 共発現海馬神経細胞 (17–19DIV) の細胞体における蛍光時間経過。各蛍光強度は薬剤投与前の平均ベースラインで正規化した。独立した 5 回のタイムラプス画像を元に平均値 \pm SD で示している (n=11 cells)。

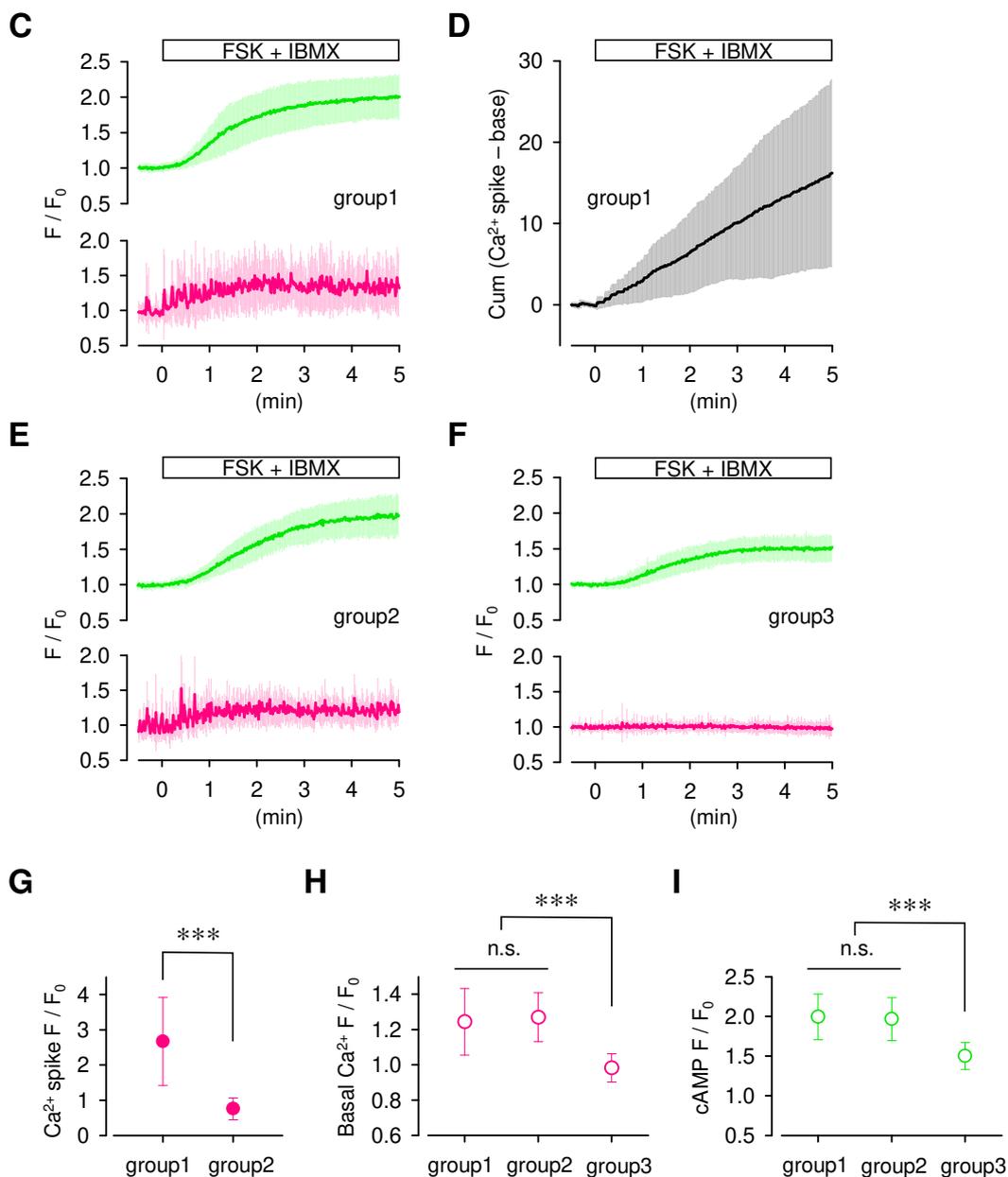


図 18. 培養海馬神経細胞における cAMP と Ca²⁺動態の同時イメージング

- (C) FSK+IBMX を投与した ratiometric gCarvi 発現培養海馬神経細胞 (n=57 cells, 17–32DIV, 独立した 11 回の実験) のうち、25 cells (group1) が細胞内 cAMP 濃度上昇中に細胞体の basal Ca²⁺と自発的な Ca²⁺スパイクが増加した。
- (D)(A)のデータを元に作成した Ca²⁺スパイク上昇の累積プロット。cAMP 上昇が一定した Ca²⁺上昇を引き起こしたことを示している。
- (E) 17 細胞 (group2) は cAMP 上昇に付随して basal Ca²⁺の増加を示した。

- (F) 残りの 15 細胞 (group3) は、FSK+IBMX に対して比較的小さな cAMP 増加を示し、 Ca^{2+} レベルに変化はなかった。
- (G) Group1(2.67 ± 1.25)と group2(0.76 ± 0.31)間の FSK+IBMX による Ca^{2+} スパイク上昇率の比較。Unpaired t-test, $p < 0.001$.
- (H) FSK+IBMX による group1(1.24 ± 0.19)と group2(1.27 ± 0.14)と group3(0.98 ± 0.08)の basal Ca^{2+} の変化比較。Group1 vs Group2: $p = 0.863$, Group1,2 vs Group3: $p < 0.001$, one-way ANOVA post-hoc Tukey's multiple comparisons.
- (I) Group 1 (1.99 ± 0.29) と group 2 (1.96 ± 0.27) の FSK+IBMX 刺激 cAMP 上昇は類似しており ($p = 0.938$)、group 3 よりも大きい (1.50 ± 0.17 , $p < 0.001$, one-way ANOVA post-hoc Tukey's multiple comparisons.)。
- 全てのデータは平均値 \pm SD で示している。

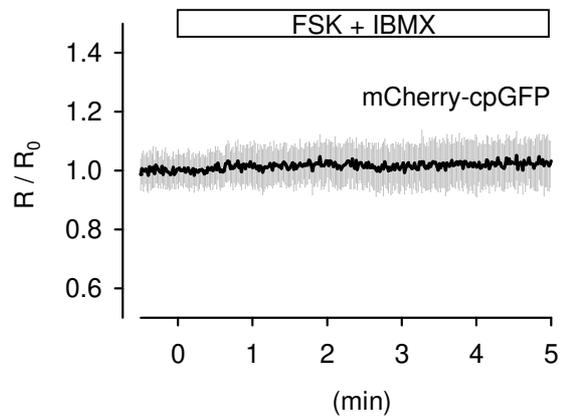


図 19. FSK+IBMX 投与は mCherry, cpGFP 蛍光に影響を与えない

mCherry-cpGFP を発現した培養海馬神経細胞 (17DIV) に 10 μ M FSK+100 μ M IBMX を灌流投与したときの蛍光比 (cpGFP/mCherry) の時間経過。蛍光比は FSK+IBMX 投与前の平均で正規化した。独立した 5 回の実験を元に平均値 \pm SD で示している (n=41 cells)。cpGFP は pH 感受性をもつため、cpGFP/mCherry は細胞内 pH 変化を検出できる。

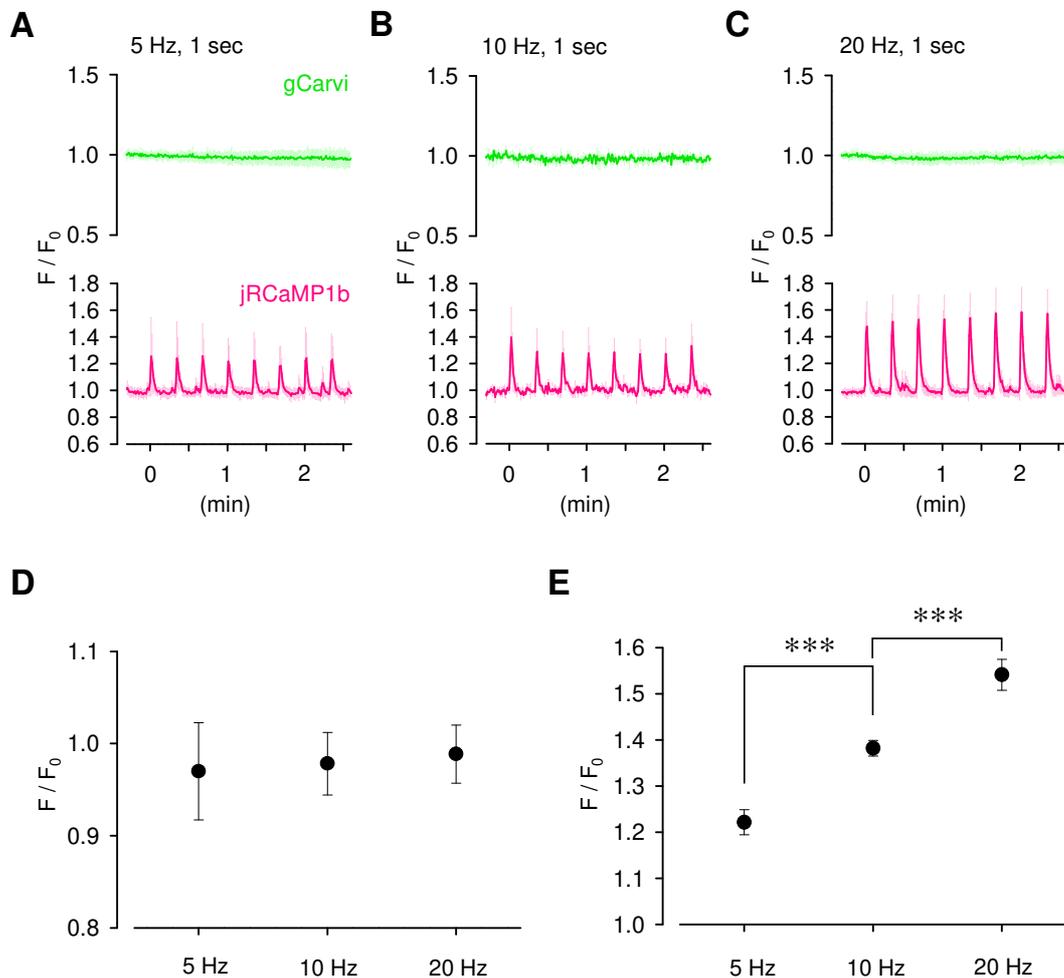


図 20. 5, 10, 20 Hz /1 秒間の反復電気刺激時の培養海馬神経細胞の cAMP, Ca²⁺変動

5 Hz (A, n=17 cells), 10 Hz (B, n=23 cells), 20 Hz (C, n=16 cells)の反復フィールド電気刺激時の gCarvi/jRCaMP1b 共発現培養海馬神経細胞 (17–19DIV) の細胞体の蛍光時間経過。電気刺激誘導前の蛍光強度で正規化した。独立した 9 回の実験を元に平均値±SD で示している。

(A)(B)(C)のデータを元に作成した gCarvi (D, $p = 0.415$, one-way ANOVA) または jRCaMP1b (E, $p < 0.001$, one-way ANOVA post hoc Tukey's multiple comparisons) の振幅における周波数依存性の比較。刺激依存的に Ca²⁺レベルが上昇するのに対し、cAMP レベルは変化しなかった。すべてのプロットは平均値±SD で示している。

第4章 考察

本研究では、cAMP が神経細胞の多様な機能を制御していることから、神経細胞に適した cAMP 動態を明らかにできる遺伝子発現型 cAMP 指示薬の開発を行った。cAMP 特異性に留意した戦略的アプローチにより、取り扱いが容易な単色型緑色蛍光 cAMP プローブ「gCarvi」の開発に成功した。gCarvi は単色型でありながら赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加することで、定量性のある 2 波長蛍光イメージングが可能となる。この利点を用いて、海馬神経細胞内の定常時 cAMP 濃度の算出に成功した。また、gCarvi は他プローブとの併用も可能であることから、Ca²⁺ 蛍光プローブとの同時イメージングを行うことで、cAMP→Ca²⁺ のクロストークが明らかとなった。以上のことから、神経細胞でのイメージングに適した gCarvi は cAMP 動態を明らかにすることで、中枢神経細胞の多様な cAMP シグナリングの多様性を明確にするプローブである。

4.1. gCarvi は cAMP 高特異性プローブである

シグナル分子プローブの重要な条件の一つは、そのリガンド分子への特異性である。特異性が担保されていなければ、得られた蛍光変化データが本当に興味分子の濃度変化によるものなのか、解釈を間違える可能性がある。

1990 年代に初となる cAMP ケミカル蛍光指示薬 FICRhR が登場した (Adams et al., 1991)。21 世紀以降、少しずつ新たな cAMP プローブが開発されてきた。しかし、これまで開発されてきた遺伝子発現型 cAMP プローブはプローブの特性を詳細に評価しているとは言い難い (表 11)。cAMP 特異性に関する評価がその例である。

多くの哺乳類細胞種で使用されている環状ヌクレオチドとして cAMP の他に cGMP がある。cAMP プローブの cAMP 特異性を評価する際には、cGMP がその比較対象として最優先の分子である。なぜなら、cGMP もセカンドメッセンジャーであり、cAMP シグナリングと連携している場面があるからである。例えば、神経細胞の初期発生段階において cAMP と cGMP のバランスは神経突起の分化決定 (Shelly et al., 2010) や成長円錐の運動性 (Kobayashi et al., 2013) の制御を行っている。また、成熟神経細胞では cAMP と cGMP が相互的にシナプス伝達の調節している (Argyrousi et al., 2020)。一方、cGMP の細胞内の生理的な変動範囲は 0.1~3 μ M 程度であり (Thunemann et al., 2013)、cAMP の変動範囲とオーバーラップしている。従って、cAMP プローブ開発にあたり cAMP に対する特異性を担保しておくことは非常に重要である。

しかし、既報の遺伝子発現型 cAMP プローブは cAMP への特異性に関して未解決である。本研究では、cAMP/cGMP 特異性を選択性 (K_d 比) \times 感度 (D.R. 比) で定義した。EPAC2-camp および MlotiK1 チャンネル由来の mlCNBD-FRET センサーは、cGMP に対して 12 倍の cAMP 特異性を有していると考えられる (Nikolaev et al., 2004, Mukherjee et al., 2016)。

また、近年開発された PKA 由来の CBD で構成された単色型 cAMP プローブである R-Flinca は、cGMP に対して約 30 倍の cAMP 特異性を有することから、cAMP プローブとして最大の高選択性をうたっている（それぞれ $K_d = 0.3 \mu\text{M}$ および $6.6 \mu\text{M}$ ）（Ohta et al., 2018）。

しかし、cGMP が $3 \mu\text{M}$ まで上昇することから、cAMP 動態を高い選択性をもって可視化するためには、cAMP プローブの cGMP に対する K_d は $30 \mu\text{M}$ 以上であることが望ましい。既存の cAMP プローブの中では Pink Flamingo、G-Flamp1、G-Flamp2 がこの要求を満たしている（Harada et al., 2017, Wang et al., 2022, Liu et al., 2022）。しかしながら、Pink Flamingo、G-Flamp1 の cAMP/cGMP 特異性はそれぞれ 13、46 である。これまでに報告されている最も高い cAMP/cGMP 特異性は、高親和性指示薬である Epac2-camps300 の 63 である（Norris et al., 2009）。本研究では、ターゲット分子への応答性にのみ留意した通常のプローブ開発方法と異なり、スクリーニングの段階から cAMP 応答と cGMP 応答の程度を常に検証していた。その結果、従来の cAMP プローブと比較して高特異性 cAMP プローブ（cAMP/cGMP 特異性： $(1.46/0.19) \times (27.4/2.03) = 106$ ）の開発に成功した。現段階で最大の特異性を持つ gCarvi は、cAMP イメージングに関わる信頼性の高い知見を提供できる。

4.2. gCarvi は秒単位の時間分解能をもつ cAMP プローブである

これまでの多くの研究において、cAMP 応答は G タンパク質共役型受容体リガンドや膜貫通型アデニル酸シクラーゼ活性化剤 Forskolin を投与して薬理的に誘導されてきた。しかしながら、神経細胞の活動に応じた生理的な cAMP 変動は薬剤の灌流投与によって誘導されるものよりも速い可能性がある。例えば、線条体の中型有棘ニューロンでは、体性感覚ニューロンの入力直後にドーパミンが放出されると、その入力を受けたスパイン特異的に cAMP-PKA シグナルを介して強固なスパイン拡大が誘導される (Yagishita et al., 2014)。ドーパミンは中型有棘ニューロンの D1 受容体に作用し、Ca²⁺依存性の AC1 活性化による cAMP 濃度上昇を引き起こしていると考えられる。興味深いことに、このドーパミン入力は体性感覚ニューロンからのグルタミン酸入力の直後から 5 秒間の間に生じる必要があり、1 秒前や 5 秒以上後ではスパインの拡大は起こらない。このことから、cAMP 動態にも秒単位の制御が備わっていることが示唆される。また、cAMP の上昇は、PDE による分解や、局在化した AC が形成する cAMP ドメインからの拡散により一過性である (Urakubo et al., 2020, Ohadi and Rangamani, 2019)。このような秒単位の神経修飾作用は、古くはウミウシの感覚ニューロンでも報告されており (Yovell and Abrams., 1992)、学習過程における Gs カップリングの神経修飾は、数秒単位のタイムスケールであると考えられている (Yovell and Abrams, 1992, Lee et al., 2020, He et al., 2015)。また、海馬苔状線維シナプス前末端では、高頻度刺激による cAMP 濃度上昇が、伝達物質放出を長期に促進すると考えられている (Nicoll and Schmitz, 2005)。この系においても、誘導刺激は 1~5 秒程度の現象である。このような短い時間経過で生じる cAMP 動態がその後、数時間に渡って維持される長期増強を引き起こすと考えられている。

このような数秒間の cAMP 動態を正確に記述するためには、相応の結合解離速度を持つプローブが必要である。例えば、gCarvi 発現 COS-7 細胞では、cADDIS 等の他の単色型緑色蛍光 cAMP プローブと比較して Isoproterenol 投与による cAMP 上昇時の 20-80 % rise time が最も早かった。しかし、これまで cAMP プローブの速度論解析についてはほとんど注目されてこなかった (表 11)。既存の cAMP プローブでは、mICNBD-FRET が k_{on} と k_{off} の値が速いと報告されている。しかし、 k_{off} / k_{on} から算出した mICNBD-FRET の K_d 値は、用量反応曲線から求めた K_d 値と比べて 7 倍以上も乖離している (Mukherjee et al., 2016)。本研究では、共焦点顕微鏡下でのラインスキャン解析を併用した局所灌流システムを用いて、gCarvi のキネティクス測定を行った。その結果、 $k_{on} = 1.38 \pm 0.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{off} = 3.31 \pm 0.77 \text{ s}^{-1}$ であった。10 μM cAMP 上昇に対する gCarvi の結合時定数は 0.07 秒、解離時定数は 0.30 秒である。また、結合解離速度定数から算出した K_d 値 ($k_{off} / k_{on} = 2.49 \mu\text{M}$) は、用量反応曲線から推定した K_d 値 (2.03 μM) とほぼ一致していることから、これらの数値の信頼性が高い。以上のことから、gCarvi は 1 秒以下の時間分解能で cAMP 動態をイメ

ージングすることが可能であり、神経細胞の活動に伴う時間経過の早い cAMP 動態をモニターすることが可能なプローブといえる。

4.3. 細胞内 basal cAMP 濃度と形成メカニズム

Basal cAMP 濃度を知ることは、基準状態の細胞機能を考える上での基盤となる。たとえば、cAMP の下流カスケードには PKA や Epac が存在するが、これらの分子の細胞内での活性化状態を判断する上でも重要である。

1990 年代、アメフラシの感覚ニューロンに FlcRhR の微量注入し、basal cAMP 濃度は 0.1 μM 未満であると報告された (Bacsikai et al., 1993)。PKA の活性化による cAMP の EC50 は、in vitro アッセイにより 0.2~0.3 μM と報告されていたため、このアメフラシ感覚ニューロンの basal cAMP 濃度は妥当な値であると考えられてきた (Beavo et al., 1974)。しかし、アメフラシの感覚ニューロンを RI を用いて生化学的に求めた basal cAMP 濃度は 1~6 μM の範囲であった (Hockberger and Yamane, 1987)。その後、数十年間に渡り、脊椎動物細胞およびその特定の領域における basal cAMP 濃度の多様性について様々なデータが蓄積されてきている。これまでの様々な実験手法により、細胞内 basal cAMP 濃度の範囲は 0.1~13 μM 程度であると推察される。

アメフラシの感覚ニューロン同様に、低い basal cAMP (< 0.1 μM) のグループには、HEK293 細胞 (Börner et al., 2011, Mukherjee et al., 2016) が含まれる。このような basal cAMP 濃度が低い細胞には、高親和性プローブも適用できる。

一方で、多くの細胞では 0.8~3 μM の範囲内とする報告が多い。(Muntean et al., 2018, Koschinski et al., 2017, Lancu et al., 2008, Börner et al., 2011, Hockberger et al., 1987, Jiang et al., 2019)。ウミウシナメクジの足根神経節ニューロンの場合、basal cAMP 濃度の平均値は 2.5 μM と報告されたものの、その推定値のばらつきは大きかった (Sudlow and Gillette 1997)。心筋細胞 (Lancu et al., 2008, Börner et al., 2011)、マウス線条体ニューロン (Muntean et al., 2018)、mIMCD3 細胞 (Jiang et al., 2019) および CHO 細胞 (Koschinski and Zaccolo, 2017) における basal cAMP 濃度の推定値は 0.9~1.2 μM の範囲であった。Basal cAMP 濃度は表面積/体積比の影響を受ける可能性がある。例えば、マウス胚性線維芽細胞の細胞体領域における cAMP 濃度は 0.8 μM であるのに対し、繊毛内の cAMP 濃度は~4 μM と推定された (Moore et al., 2016)。Basal cAMP 濃度の範囲の最大値である 13 μM は、マウス小脳苔状線維の値であり、cAMP 依存性カチオンチャネルの電流量から推定されている (Byczkiewicz et al. 2019)。

このように多様な basal cAMP 濃度設定は、他のセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} と NO のように非常に低い basal 濃度設定 (0 設定) とは異なっており、cAMP 動態を考える上で興味深いものである。本研究において、培養海馬神経細胞の細胞体における basal cAMP 濃度は in-cell 解析により 1.38 μM と推定した。この値は上記の多くの細胞の推定値とも近似していた。PKA サブタイプの in vitro における EC50 は μM 以下と報告されている (Beavo

et al., 1974, Tasken et al., 2004)。一方で、PKA 基質を用いた FRET プローブを用いた細胞内 PKA の EC₅₀ は 5 μM で、Hill 係数が 2 であるという報告がある (Koschinski and Zaccolo, 2017)。この報告から basal cAMP 濃度 1.38 μM は PKA 活性化直前の濃度であると考えられる。実際、基底状態の海馬神経細胞では PKA 活性は無視できるレベルであった (Young et al., 2006, Abel et al., 1997)。

さらに本研究では、basal cAMP 濃度形成に AC ならびに PDE がどのように関与しているのか検証した。AC の関与として場合、tmAC よりも sAC が主要因であることが明らかになった。sAC は重炭酸イオンによって活性化される。一方、tmAC の活性化にはリガンドが GsPCR に結合する必要がある。Basal cAMP の主要因が sAC であったことは、常に細胞内に存在している重炭酸イオンによるものだろう。一方、海馬神経細胞には多くの PDE4 が発現している。Basal cAMP 濃度に PDE4 が関与しているのか、PDE4 阻害剤 Rolipram を投与したが cAMP 濃度は上昇しなかった。PDE4 は cAMP 低親和性のサブタイプであり、K_m 値は 1.5~10 μM である (Bender and Beavo, 2006)。Basal cAMP 濃度である 1.38 μM は PDE4 が分解活性を示す下限値であると推察できるが、basal cAMP 濃度設定の主成分ではなかった。しかしながら、cAMP 濃度は常に AC と PDE 活性のバランスで設定されているため、cAMP 濃度が上昇しすぎないように分解酵素活性は必要であると考えられる。海馬神経細胞に発現している PDE には高親和性の PDE8 や PDE10 もある。これらの PDE の阻害実験を行うことで basal cAMP 濃度設定の分子機序の全貌が説明ができるだろう。

4.4. 神経細胞内 cAMP/Ca²⁺のクロストーク

Ca²⁺と cAMP は、様々な神経細胞で重要なセカンドメッセンジャーとして機能している。両者のシグナリングは細胞内でクロストークしていることが、様々な研究から示唆されている。例えば、アフリカツメガエルの胚性脊髄ニューロンでは、初期の cAMP 指示薬の代表である FICRhR と Ca²⁺指示薬 Fluo 4 を用いることで、cAMP 振動と Ca²⁺振動が同期することが明らかにされた (Gorbunova and Spitzer, 2002)。Ca²⁺と cAMP は神経細胞の発達期にも重要な因子として関与している。ラットの前駆体ニューロンは、神経分化に cAMP と Ca²⁺シグナリングの両方を必要としている (Lepski et al., 2013)。整然とした網膜投射の構築は、細胞外からの Ca²⁺流入に依存した cAMP オシレーションが制御している (Dunn et al., 2006)。また、連合学習の際に Ca²⁺と cAMP シグナリングの統合がよく用いられている。連合学習誘導時においてショウジョウバエのキノコ体ニューロン (Maiellaro et al., 2016) とアメフラシの感覚ニューロン (Yovell and Abrams, 1992) は、どちらも cAMP と Ca²⁺シグナリングを統合している。また、海馬の CREB 制御転写アクチベーターである CRTCl (別名 TORC1) は、後期長期増強 (L-LTP) の誘導時に cAMP と Ca²⁺シグナリングを同時に検出する (統合する) 上で必須の分子である (Kovács et al., 2007, Ch'ng et al., 2012)。このことから、cAMP と Ca²⁺シグナリングは神経細胞の多様な時間スケールで相互作用し

ていることが多い。単色型プローブである gCarvi を Ca^{2+} プローブと併用することで、cAMP- Ca^{2+} シグナリング間のクロストークを明瞭にイメージングすることができると期待される。

本研究では、gCarvi と赤色 Ca^{2+} 蛍光プローブである jRCaMP1b を用いた同時モニターに成功した。また、海馬神経細胞における大きな cAMP 濃度上昇は、複数の Ca^{2+} ダイナミクスの増加を伴うことがわかった。cAMP 濃度上昇に伴う Ca^{2+} スパイクの増加は、Xenopus 胚の脊髄神経細胞で初めて報告された (Gorbunova and Spitzer, 2002)。培養海馬神経細胞では、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドが Ca^{2+} スパイクを増加させることが報告されている (Liu et al., 2003)。海馬神経細胞内の cAMP の上昇は、PKA の活性化が L 型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} の流入 (Kavalali et al., 1997) を増加させることで Ca^{2+} スパイクを増加させていることが考えられる。また、cAMP の上昇は IP3 受容体を介した Ca^{2+} の放出 (Tovey et al., 2013) を増加させることで basal Ca^{2+} の増加を引き起こしていることが考えられる。

反対に、 $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{cAMP}$ へのクロストークの例として、海馬苔状線維で生じる長期増強 (Mf-LTP) の発現には、電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入を起点とした Ca^{2+} 依存的な tmAC である AC1 や AC8 の活性化による cAMP 濃度上昇が必須である (Nicoll and Schmitz, 2005)。FSK は cAMP 濃度を上昇させることから、化学的に LTP を誘導する条件としてよく用いられている (Otmakhov et al., 2004)。本研究において FSK による cAMP 上昇が Ca^{2+} スパイクを増加させることから、Mf-LTP の誘導においても cAMP が持続的に Ca^{2+} スパイクレベルを強化し、LTP のシグナリングを活性化している可能性が考えられる。また、本研究にて 5, 10, 20 Hz/1 秒間の低頻度の電気刺激で Ca^{2+} スパイクを誘発したが、cAMP レベルに変化はなかった。対して、海馬苔状線維において高頻度電気刺激による Ca^{2+} 流入は cAMP 濃度を上昇させ、LTP を誘導する。ある一定レベルの cAMP 濃度上昇が自発的な Ca^{2+} 応答を上昇させたように、cAMP 濃度上昇を引き起こす Ca^{2+} 流入にも、ある一定レベルの閾値が存在していると考えられる。

4.5. 結語

細胞内の cAMP レベルは主に AC と PDE のバランスによって制御されているという単純なシステムのように思われてきたが決して単純な線形シグナルではなく、 Ca^{2+} とともにクロストークしながら緻密に時間的、空間的な制御をしている。生物はこのような原始的な cAMP シグナリングの有用性をどこまで発展・拡張してきたのだろうか。高特異性、高速 cAMP プローブ「gCarvi」は、新しく書き換えられる cAMP のダイナミクスとその生理的役割の理解に貢献するだろう。

cAMP indicators	Detection	CBD	cAMP				cGMP		cAMP / cGMP specificity	Ref.
			D.R.	K_d (μ M)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	D.R.	K_d (μ M)		
gCarvi	Mono/Ratio	CRP	1.46	2.03	1.38×10^6	3.31	0.19	27.4	106	(1)
G-Flamp1	Monomeric	MlotiK1	10	2.2	3.48×10^6	7.9	~2.9	30	~46	(2)
G-Flamp2	Monomeric	MlotiK1	12	1.9	nt	nt	nt	43	—	(3)
cAMPr	Monomeric	PKA C/R	~0.5	~1	nt	nt	nt	nt	—	(4)
GG4B	Monomeric	EPAC2	~1.3	nt	nt	nt	nt	nt	—	(5)
cADDIs	Monomeric	EPAC2	~0.5	~10-50	nt	nt	nt	nt	—	(6)
Flamindo2	Monomeric	EPAC1	3	3.2	nt	nt	~3	22	~7	(7)
Pink Flamindo	Monomeric	EPAC1	3.2	7.2	nt	nt	~3.2	94	~13	(8)
R-FiincA	Monomeric	PKA RI	8.6	0.3	nt	nt	~6.2	6.6	~37	(9)
PKAR1a#7	FRET	PKA RI	0.38	0.037	nt	nt	nt	nt	—	(10)
CUTie	FRET	PKA RII	0.2	7.4	nt	nt	nt	nt	—	(11)
ICUE2	FRET	EPAC1	~0.6	12.5	nt	nt	nt	nt	—	(12)
ICUE3	FRET	EPAC1	~1.0	10-100	nt	nt	nt	nt	—	(13,14)
Epac-S ^{H187}	FRET	EPAC	1.64	~4	nt	nt	nt	nt	—	(15)
TEPAC ^{vv} /CAMPER	FRET	EPAC	~1.6	3	nt	nt	nt	nt	—	(16, 17)
PKA-camps	FRET	PKA RII	~0.15	1.9	nt	nt	nt	nt	—	(18)
EPAC1-camps	FRET	EPAC1	~0.25	2.35	nt	nt	nt	nt	—	(18)
EPAC2-camps	FRET	EPAC2	~0.2	0.92	nt	nt	~0.2	10.6	~12	(18)
EPAC2-camps300	FRET	EPAC2	~0.3	0.32	nt	nt	~0.2	14	~63	(19)
HCN2-camps	FRET	HCN2	~0.22	5.9	nt	nt	nt	nt	—	(20)
mlCNBD-FRET	FRET	MlotiK1	~0.4	0.066	2.5×10^7	9.3	~0.25	0.5	~12	(21)

nt: not tested.

~: estimated from the data in corresponding paper.

1. S. Kawata *et al.*, Green fluorescent cAMP indicator of high speed and specificity suitable for neuronal live-cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **119**, e2122618119 (2022).
2. L. Wang *et al.*, A high-performance genetically encoded fluorescent indicator for in vivo cAMP imaging. *Nat. Commun.* **13**, 5363 (2022).
3. W. Liu, C. Liu, P. G. Ren, J. Chu, L. Wang, An improved genetically encoded fluorescent cAMP indicator for sensitive cAMP imaging and fast drug screening. *Front. Pharmacol.* **13**, 902290 (2022).
4. C. R. Hackley, E. O. Mazzoni, J. Blau, cAMPr: A single-wavelength fluorescent sensor for cyclic AMP. *Sci. Signal.* **11**, eaah3738 (2018).
5. G. E. Peng, V. Pessino, B. Huang, M. von Zastrow, Spatial decoding of endosomal cAMP signals by a metastable cytoplasmic PKA network. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 558-566 (2021).
6. P. H. Tewson, S. Martinka, N. C. Shaner, T. E. Hughes, A. M. Quinn, New DAG and cAMP sensors optimized for live-cell assays in automated laboratories. *J. Biomol. Screen.* **21**, 298-305 (2016).
7. H. Odaka, S. Arai, T. Inoue, T. Kitaguchi, Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One* **9**, e100252 (2014).
8. K. Harada *et al.*, Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7**, 7351 (2017).
9. Y. Ohta, T. Furuta, T. Nagai, K. Horikawa, Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Sci. Rep.* **8**, 1866 (2018).
10. Y. Ohta *et al.*, Nontrivial effect of the color-exchange of a donor/acceptor pair in the engineering of Förster resonance energy transfer (FRET)-based indicators. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1816-1822 (2016).
11. N. C. Surdo *et al.*, FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β -adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. *Nat. Commun.* **8**, 15031 (2017).
12. J. D. Violin *et al.*, β_2 -adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *J. Biol. Chem.* **283**, 2949-2961 (2008).
13. D. Zhang, G. E. Hadhoud, K. Helm, D. A. Roess, B. G. Barisas, Fluorescence observation of single-cell cAMP signaling by G protein-coupled receptors. *J. Fluoresc.* **29**, 53-60 (2019).
14. L. M. DiPilato, J. Zhang, The role of membrane microdomains in shaping β_2 -adrenergic receptor-mediated cAMP dynamics. *Mol. Biosyst.* **5**, 832-837 (2009).
15. J. Klarenbeek, J. Goedhart, A. van Batenburg, D. Groenewald, K. Jalink, Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One* **10**, e0122513 (2015).
16. B. S. Muntean *et al.*, Interrogating the spatiotemporal landscape of neuromodulatory GPCR signaling by real-time imaging of cAMP in intact neurons and circuits. *Cell Rep.* **22**, 255-268 (2018).
17. J. B. Klarenbeek, J. Goedhart, M. A. Hink, T. W. Gadella, K. Jalink, A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* **6**, e19170 (2011).
18. V. O. Nikolaev, M. Bünemann, L. Hein, A. Hannawacker, M. J. Lohse, Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.* **279**, 37215-37218 (2004).
19. R. P. Norris *et al.*, Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* **136**, 1869-1878 (2009).
20. V. O. Nikolaev, M. Bünemann, E. Schmitteckert, M. J. Lohse, S. Engelhardt, Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching β_1 -adrenergic but locally confined β_2 -adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ. Res.* **99**, 1084-1091 (2006).
21. S. Mukherjee *et al.*, A novel biosensor to study cAMP dynamics in cilia and flagella. *eLife* **5**, e14052 (2016).

表 11. 遺伝子発現型 cAMP 蛍光プローブの特性表

gCarvi と既存の遺伝子発現型 cAMP プローブを以下の項目でまとめた: 蛍光検出、cAMP 結合ドメイン (CBD)、cAMP に対するダイナミックレンジ (D.R.)、解離定数 (K_d)、結合・解離速度定数 (k_{on} , k_{off})、cGMP に対するダイナミックレンジ (D.R.)、解離定数 (K_d)、

cAMP/cGMP 特異性 (K_d 比×D.R.比)。多くの cAMP プローブは、cAMP に対する結合・解離速度定数と cGMP に対する応答性に関して十分に評価していない。gCarvi は cAMP に対する高特異性を保持し、高スピードの cAMP 応答に追従できることを示した最初のプローブである。

参考文献

- Abel, T. et al., Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**, 615-626 (1997).
- Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buechler, Y. J., Taylor, S. S., Tsien, R. Y., Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**, 694-697 (1991).
- Argyrousi, E. K., Heckman, P. R. A., Prickaerts, J., Role of cyclic nucleotides and their downstream signaling cascades in memory function: Being at the right time at the right spot. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **113**, 12-38 (2020).
- Averaimo, S., Nicol, X., Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 376 (2014).
- Bacskai, B. J. et al., Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* **260**, 222-226 (1993).
- Baker, C. H., Tomlinson, S. R., Garcia, A. E., Harman, J. G., Amino acid substitution at position 99 affects the rate of CRP subunit exchange. *Biochemistry* **40**, 12329–12338 (2001).
- Barad, M., Bourtchouladze, R., Winder, D. G., Golan, H., Kandel, E., Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15020-15025 (1998).
- Beavo, J. A., Bechtel, P. J., Krebs, E. G., Activation of protein kinase by physiological concentrations of cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3580-3583 (1974).
- Bender, A. T., Beavo, J. A., Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical Use. *Pharmacol. Rev.* **58**, 488-520 (2006).
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L., Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517-529 (2003).
- Berridge, M. J., Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol. Paris* **499**, 291-306 (1997).
- Bock, A. et al., Optical mapping of cAMP signaling at the nanometer scale. *Cell* **182**, 1519-1530 (2020).
- Börner, S. et al., FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat. Protoc.* **6**, 427-438 (2011).
- Chang, J. C., Oude-Elferink, R. P. J. , Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in pH sensing and metabolic regulation. *Front Physiol* **5**, 42 (2014).

- Chavis, P., Mollard, P., Bockaert, J., Manzoni, O., Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron* **20**, 773-781 (1998).
- Ch'ng, T. H. *et al.*, Activity-Dependent Transport of the Transcriptional Coactivator CRTC1 from Synapse to Nucleus. *Cell* **150**, 207-221 (2012).
- Cooper, D. M. F., Tabbasum, V. G., Adenylate cyclase-centred microdomains. *Biochem. J.* **462**, 199-213 (2014).
- Cousin, M. A., Evans, G. J. O., Activation of silent and weak synapses by cAMP-dependent protein kinase in cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **589**, 1943-1955 (2011).
- Dana, H. *et al.*, Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *eLife* **5**, e12727 (2016)
- Dessauer, C. W. *et al.*, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CI. Structures and small molecule modulators of mammalian adenylyl cyclases. *Pharmacol. Rev.* **69**, 93–139 (2017).
- Dunn, T. A. *et al.*, Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades. *J. Neurosci.* **26**, 12807-12815 (2006).
- Fic, E. *et al.*, cAMP receptor protein from *Escherichia coli* as a model of signal transduction in proteins – A Review. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1-11 (2009).
- Gao, A., Lei, W. I., Lee, L. T. O., The role of neuropeptide-stimulated cAMP-EPACs signaling in cancer cells. *Molecules.* **27**, 311 (2022).
- Garcia, A. E., Harman, J. G., Simulations of CRP: (cAMP) 2 in non-crystalline environments show a subunit transition from the open to the closed conformation. *Protein. Sci.* **5**, 62–71 (1996).
- Gorbunova, Y. V., Spitzer, N. C., Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca²⁺ spikes. *Nature* **418**, 93-96 (2002).
- Gorshkov, K. *et al.*, AKAP-mediated feedback control of cAMP gradients in developing hippocampal neurons. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 425-431 (2017).
- Gorshkov, K., Zhang J., Visualization of cyclic nucleotide dynamics in neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 395 (2014)

- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y., A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985).
- Harada, K. *et al.*, Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7**, 7351 (2017).
- Havekes, R. *et al.*, Compartmentalized PDE4A5 signaling impairs hippocampal synaptic plasticity and long-term memory. *J. Neurosci.* **36**, 8936-8946 (2016).
- Hockberger, P., Yamane, T., Compartmentalization of cyclic AMP elevation in neurons of *Aplysia californica*. *Cell. Mol. Neurobiol.* **7**, 19-33 (1987).
- He, K. *et al.*, Distinct eligibility traces for LTP and LTD in cortical synapses. *Neuron* **88**, 528-538 (2015).
- Iancu, R. V. *et al.*, Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C414-C422 (2008).
- Imai, T., Suzuki, M., Sakano, H., Odorant Receptor-Derived cAMP Signals Direct Axonal Targeting. *Science* **314**, 657-661 (2006).
- Jiang, J. Y., Falcone, J. L., Curci, S., Hofer, A. M., Direct visualization of cAMP signaling in primary cilia reveals up-regulation of ciliary GPCR activity following Hedgehog activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 12066-12071 (2019).
- Jiang, J. Y., Falcone, J. L., Curci, S., Hofer, A. M., Interrogating cyclic AMP signaling using optical approaches. *Cell Calcium* **64**, 47-56 (2017).
- Jiang, L. I. *et al.*, Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 10576-10584 (2007).
- Kapiloff, M. S., Rigatti, M., Dodge-Kafka, K. L., Architectural and functional roles of A kinase-anchoring proteins in cAMP microdomains. *J. Gen. Physiol.* **143**, 9-15 (2014).
- Kavalali, E. T., Hwang, K. S., Plummer, M. R., cAMP-dependent enhancement of dihydropyridine-sensitive calcium channel availability in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **17**, 5334-5348 (1997).
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E., The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845-858 (2015)
- Kelly, M. P., Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cellular Signalling* **42**, 281-291. (2018).
- Kim, N., Shin, S., Bae, S. W., cAMP biosensors based on genetically encoded fluorescent/luminescent Proteins. *Biosensors* **11**, 39 (2021).

- Kirill, G. *et al.*, AKAP-mediated feedback control of cAMP gradients in developing hippocampal neurons. *N. ChemBio.* **13**, 425-432 (2017).
- Kobayashi, T., Nagase, F., Hotta, K., Oka, K., Crosstalk between second messengers predicts the motility of the growth cone. *Sci. Rep.* **3**, 3118 (2013).
- Koschinski, A., Zaccolo, M., Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: Implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Sci. Rep.* **7**, 14090 (2017).
- Kostyuk, A. I., Demidovich, A. D., Kotova, D. A., Belousov, V. V., Bilan, D. S., Circularly permuted fluorescent protein-based indicators: History, principles, and classification. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4200 (2019).
- Kovács, K. A. *et al.*, TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4700-4705 (2007).
- Lee, D., Global and local missions of cAMP signaling in neural plasticity, learning, and memory. *Front. Pharmacol.* **6**, 161-161 (2015).
- Lee, K. *et al.*, Temporally restricted dopaminergic control of reward-conditioned movements. *Nat. Neurosci.* **23**, 209-216 (2020).
- Lepski, G., Jannes, C. E., Nikkhah, G., Bischofberger, J., cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 10.3389 (2013).
- Liu, Z. *et al.*, Frequency modulation of synchronized Ca²⁺ spikes in cultured hippocampal networks through G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* **23**, 4156-4163 (2003).
- London, E., Stratakis, C. A., The regulation of PKA signaling in obesity and in the maintenance of metabolic health. *Pharmacol. Ther.* **237**, 108113 (2022).
- Lukashchuk, V., Lewis, K. E., Coldicott, I., Grierson, A. J., Azzouz, M., AAV9-mediated central nervous system-targeted gene delivery via cisterna magna route in mice. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* **3**, 15055 (2016).
- Malecki, J., Wasylewski, Z., The effect of Ser 128 substitution on the structure and stability of cAMP receptor protein from *Escherichia coli*. *J Protein Chem* **17**, 219–228 (1998).
- Ma, L., Zablow, L., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures. *Nat. Neurosci.* **2**, 24-30 (1999).

Michael, A.C., Gareth, J.O.E., Activation of silent and weak synapses by cAMP-dependent protein kinase in cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **598**, 1943-1955 (2011).

Mironov, S. L. *et al.*, Imaging cytoplasmic cAMP in mouse brainstem neurons. *BMC Neurosci.* **10**, 29 (2009).

Miyawaki, A. *et al.*, Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887. (1997).

Mukherjee, S. *et al.*, A novel biosensor to study cAMP dynamics in cilia and flagella. *eLife* **5**, e14052 (2016).

Muntean, B. S. *et al.*, Interrogating the spatiotemporal landscape of neuromodulatory GPCR signaling by real-time imaging of cAMP in intact neurons and circuits. *Cell Rep.* **22**, 255-268 (2018).

Murphy, J. G. *et al.*, AKAP-Anchored PKA Maintains Neuronal L-type Calcium Channel Activity and NFAT Transcriptional Signaling. *Cell. Rep.* **7**, 1577-1588 (2014).

Neves, S. R. *et al.*, Cell Shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell* **133**, 666-680 (2008).

Nicoll, R. A., Schmitz, D., Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses, *Nat. Neurosci.* **6**, 863-876 (2005).

Norris, R. P. *et al.*, Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* **136**, 1869-1878 (2009).

Ohadi, D., Rangamani, P., Geometric control of frequency modulation of cAMP oscillations due to calcium in dendritic spines. *Biophys. J.* **117**, 1981-1994 (2019).

Ohta, Y., Furuta, T., Nagai, T., Horikawa, K., Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Sci. Rep.* **8**, 1866 (2018).

Oliveria, S. F. *et al.*, Localized Calcineurin Confers Ca²⁺-Dependent Inactivation on Neuronal L-Type Ca²⁺ Channels. *J. Neurosci.* **32**, 15328-15337. (2012).

Otmakhov, N. *et al.*, Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J. Neurophysiol.* **91**, 1955-1962 (2004).

- Palmer, E., Freeman, T., Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comp. Funct. Genomics* **5**, 342–353 (2004).
- Passner, J. M., Schultz, S. C., Steitz, T. A., Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **304**, 847–859 (2000).
- Peel, A. L., Klein, R. L., Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS. *J. Neurosci. Methods.* 2000**98**, 95–104.
- Pfeifer, A., Kilić, A., Hoffmann, L. S., Regulation of metabolism by cGMP. *Pharmacol. Therapeut.* **140**, 81–91 (2013).
- Popovych, N., Tzeng, S. R., Tonelli, M., Ebright, R. H., Kalodimos, C. G., Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6927–6932 (2009).
- Restrepo, D., Teeter, J.H., Schild, D., Second messenger signaling in olfactory transduction. *J. Neurosci.* **30**, 37–48 (1996).
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Krans H. M., The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* **246**, 1877–1882 (1971).
- Ros, O. *et al.*, SponGee: A genetic tool for subcellular and cell-specific cGMP manipulation. *Cell Rep.* **27**, 4003–4012 (2019).
- Ross, E. M., Howlett, A. C., Ferguson, K. M., Gilman, A. G., Reconstitution of hormone-sensitive adenylyl cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **253**, 6401–6412 (1978).
- Ryu, S., Kim, J., Adhya, S., Garges, S., Pivotal role of amino acid at position 138 in the allosteric hinge reorientation of cAMP receptor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 75–79. (1993).
- Salin, P. A., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* **16**, 797–803 (1996).

- Salonikidis, P. S., Zeug, A., Kobe, F., Ponimaskin, E., Richter, D. W., Quantitative measurement of cAMP concentration using an exchange protein directly activated by a cAMP-based FRET-sensor. *Biophys. J.* **95**, 5412-5423 (2008).
- Schindelin, J. et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676-682 (2012).
- Schultz, S. C., Shields, G. C., Steitz, T. A., Crystal structure of a CAP-DNA complex: The DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**, 1001–1007 (1991).
- Shabb, J. B., Corbin, J. D., Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J. Biol. Chem.* **267**, 5723-5726 (1992).
- Sharma, H., Yu, S., Kong, J., Wang, J., Steitz, T. A., Structure of apo-CAP reveals that large conformational changes are necessary for DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16604-16609 (2009).
- Shelly, M. et al., Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* **327**, 547-552 (2010).
- Sohn, J. et al., A single vector platform for high-level gene transduction of central neurons: Adeno-associated virus vector equipped with the tet-off system. *PLoS One* **12**, e0169611 (2017).
- Sokolova, I. V., Lester, H. A., Davidson, N., Postsynaptic mechanisms are essential for forskolin-induced potentiation of synaptic transmission. *J. Neurophysiol.* **95**, 2570-2579 (2006).
- Surdo, N. C. et al., FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β -adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. *Nat. Commun.* **8**, 15031 (2017).
- Taskén, K., Aandahl, E. M., Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* **84**, 137-167 (2004).
- Thunemann, M. et al., Transgenic mice for cGMP imaging. *Circ. Res.* **113**, 365-371 (2013).
- Tovey, S. C., Taylor, C. W., Cyclic AMP directs inositol (1,4,5)-trisphosphate-evoked Ca^{2+} signalling to different intracellular Ca^{2+} stores. *J. Cell Sci.* **126**, 2305-2313 (2013).
- Trivedi, B., Kramer, R. H., Real-time patch-clamp detection of intracellular cGMP reveals long-term suppression of responses to NO and muscarinic agonists. *Neuron* **21**, 895-906 (1998).
- Urakubo, H., Yagishita, S., Kasai, H., Ishii, S., Signaling models for dopamine-dependent temporal contiguity in striatal synaptic plasticity. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1008078 (2020).
- Violin, J. D. et al., β 2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *J. Biol. Chem.* **283**, 2949-2961 (2008).

- Wang, J. et al., iCn3D, a web-based 3D viewer for sharing 1D/2D/3D representations of biomolecular structures. *Bioinform.* **36**, 131-135 (2019).
- Wiggins, S. V., Steegborn, C., Levin, L. R., Buck, J., Pharmacological modulation of the CO₂/HCO₃⁻/pH⁻, calcium⁻, and ATP-sensing soluble adenylyl cyclase. *Pharmacol. Ther.* **190**, 173–186 (2018).
- Yagishita, S. *et al.*, A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* **345**, 1616-1620 (2014).
- Yao, J., Qi, J., Chen, G., Actin-dependent activation of presynaptic silent synapses contributes to long-term synaptic plasticity in developing hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **26**, 8137-8147 (2006).
- Young, J. Z., Isiegas, C., Abel, T., Nguyen, P. V., Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation: a critical role for protein kinase A in synaptic tagging. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 1784-1794 (2006).
- Yovell, Y., Abrams, T. W., Temporal asymmetry in activation of *Aplysia* adenylyl cyclase by calcium and transmitter may explain temporal requirements of conditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6526-6530 (1992).
- Zaccolo, M., Zerio, A., Lobo, M. J., Subcellular organization of the cAMP signaling pathway. *Pharmacol. Rev.* **73**, 278-309 (2021).
- Zhao, Y. *et al.*, An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* **333**, 1888-1891 (2011).

謝辞

本研究に携わってから遂行するまで長年に渡り、日々熱心なご指導を頂きました同志社大学 生命医科学部 齋藤直人准教授に心より感謝申し上げます。研究を進めるにあたり、実験手法や得られたデータ、その後の方針に関して、数々の適切なお助言、ご指摘を賜りました。

本研究の推進に際して、セミナー等で多数のご意見ならびに研究に関する相談に親身になってご助言いただきました沖縄科学技術大学院大学 堀哲也先生に感謝いたします。堀先生から頂戴しましたお言葉を心の支えに、研究に励むことができました。また、原著論文の投稿に際し、数々のご助言をいただきました沖縄科学技術大学院大学 高橋智幸教授に感謝申し上げます。

基礎的な実験技術のご指導、ならびに本研究の要となるプローブスクリーニング実験に多大なご協力いただいた西村侑美技術員に厚く御礼申し上げます。

順天堂大学の日置寛之准教授には、神経細胞特異的かつ高発現型ウイルスベクターである SynTetOff プラスミドをご提供いただきました。心より御礼申し上げます。

同志社大学 生命医科学部 池川雅哉教授ならびに舟本聡准教授には、本論文の審査に際して的確なお助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

長きに渡り、日頃から私の研究生生活を見守り、楽しくディスカッションして下さった神経生理学研究室のメンバーに感謝いたします。

最後に、博士後期課程への進学を承諾し、陰ながら応援し見守り続けてくれた家族に心から感謝申し上げます。ありがとうございました。