

DNA でコードされたセンサーによる Ca^{2+} イメージング

Imaging with Genetically encoded Ca^{2+} sensors

中 井 淳 一

Junichi Nakai

^a 理化学研究所・脳科学総合研究センター・記憶学習機構研究チーム・副チームリーダー

要 旨 蛋白質でできたカルシウムセンサーは、DNA により符号化（コード）されているので、DNA でコードされたカルシウムセンサー（GECS）と呼ばれる。したがって、GECS は、その DNA を細胞に導入することにより、細胞内でセンサーの蛋白質が合成されて機能するようになる。GECS には発光センサーと蛍光センサーがあるが、近年の蛍光 GECS の進歩には目覚ましいものがある。本講座では GECS の種類とその特徴を説明し、蛍光 GECS の応用例を紹介して、その可能性について論じる。GECS は *in vivo* での細胞機能のモニターに優れており、現在、生物個体への応用が精力的に進められている。今後、移植・再生医療関連の研究にも応用されると予想される。

キーワード：GFP、発光、蛍光、カルシウム、センサー

1. はじめに

細胞内（特に細胞質内）のカルシウムイオン (Ca^{2+}) は、セカンドメッセンジャーの一つであって、筋肉の収縮、ホルモンや神経伝達物質の分泌、神経細胞の可塑的变化など生体内のほとんどすべての生命現象に関与しており、細胞内の Ca^{2+} 濃度の測定は、広く細胞機能をモニターするうえで非常に有効な手段である。

Ca^{2+} の光学測定は 1960 年代後半からエクオリンを用いて行われるようになり、1980 年代にはいり蛍光 Ca^{2+} 指示薬が実用化されると、CCD カメラなどの測定装置の発達も伴って、 Ca^{2+} の光学的測定は極一般的な手法となった。さらに 1990 年代後半からは、Green Fluorescent Protein (GFP) などの蛍光蛋白質を用いた Ca^{2+} センサーが開発されるようになった。また蛍光 Ca^{2+} 指示薬を用いた脳の *in vivo* Ca^{2+} 測定などの方法も開発され、新たな可能性が開けてきた。

我々はこれまで GFP を用いて蛍光 Ca^{2+} センサー (G-CaMP) を開発してきた。本稿では、細胞内遊離 Ca^{2+} のイメージング法、特に遺伝子でコードされた Ca^{2+} センサーを用いる方法について解説し、その応用例を紹介する。最近では *in vivo* の動物でカルシウム動態を解析することが盛んに行われるようになってきた。DNA でコードされた Ca^{2+} センサーはその目的に適したものであるとして期待されている。

2. Ca^{2+} の光学的測定法

2.1 蛍光カルシウム指示薬

現在広く一般に使用されているのは、Fura2 や Fluo3 などの蛍光 Ca^{2+} 指示薬による光学測定である。蛍光 Ca^{2+} 指示薬には salt 型とエステル型がある。salt 型は水溶性で、よく利用される方法は、電気生理の電極内に入れて、細胞に直接注入して使用するものである。エステル型は、Acetoxymethyl 化された蛍光 Ca^{2+} 指示薬 (Fura2AM など) で、脂溶性のため細胞膜を通過しやすくなっている。細胞外に投与すると、細胞内に移動し細胞内のエステラーゼにより分解されて本来のカルシウム指示薬となり機能する。培養細胞や脳スライスなどに使用され、最近ではエステル型の蛍光カルシウム指示薬を直接生体内に注入して *in vivo* で Ca^{2+} イメージングする方法も開発されている¹⁾ (図 1)。エステル型は指示薬の細胞内への導入が容易なため、今日最もよく利用されている。蛍光 Ca^{2+} 指示薬の欠点としては、Salt 型では細胞への導入にテクニックを要する点である。エステル型では細胞特異的に導入することは難しいが、細胞によって色素の取り込みが異なることもある。また、細胞内のエステラーゼ活性が低いとうまくいかない。そのほか、細胞内コンパートメントに蓄積されたり、長時間観察すると細胞から排除されることがある。冷却 CCD カメラやレーザー顕微鏡を用いて観察することができる。

2.2 Genetically encoded Ca^{2+} sensor (GECS) DNA でコードされたカルシウムセンサー

センサー自体は蛋白質でできている。センサーをコードする DNA を細胞に導入すると、細胞内でセンサー分子が生合成される。センサーの遺伝子は培養細胞や動植物のゲノムに

^a 〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
TEL: 048-462-1111; FAX: 048-462-4697
E-mail: jnakai@brian.riken.jp
2008 年 2 月 1 日受付

組み込むことができ、センサーを目的の細胞（組織）に特異的に発現させることができる。また、長期間の観察にも適している。さらに、センサーにタグを付加したり、他の蛋白質と融合させることにより（これらも DNA の組み換えで行う）、例えば、ミトコンドリア、核、小胞体、形質膜直下など目的の細胞小器官や局所にセンサーを選択的に発現させることも可能である。GECS は大きく分けて 2 種類に分けられる。一つは発光 Ca^{2+} センサーであり、もう一つは蛍光 Ca^{2+} センサーである。

2.2.1 発光 Ca^{2+} センサー

2.2.1.1 エクオリン：エクオリンは、オワンクラゲから発見された Ca^{2+} 結合蛋白質で、 Ca^{2+} が結合すると青く発光する性質がある。最も古くから利用されている GECS で、遺伝子がクローン化されるまでは精製したエクオリンを細胞に注入して使用していた。クローン化されたエクオリンの遺伝子産物はアポエクオリンと呼ばれ、このままでは Ca^{2+} が結合しても発光しない。cofactor（セレンテラジン coelenterazine）を加えると（膜透過性セレンテラジンが販売されている）、細胞膜を透過して、細胞内でアポエクオリンと結合しエクオリンができる。エクオリンに Ca^{2+} が結合するとアポエクオリンと cofactor に分離すると共に cofactor が分解し、発光する。

2.2.1.2 Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) センサー：BRET センサーは、エクオリンと GFP を融合させたもので、 Ca^{2+} が結合するとエクオリン部分から GFP 部分へとエネルギー移動が起こり、緑色の蛍光を出す²⁾。BRET センサーは、エクオリン単独より多くの光を出し、GFP を含んでいるため、GFP の蛍光を調べることで発現を確認できるので、今後エクオリンは BRET センサーに置き換わっていく可能性がある。

発光 Ca^{2+} センサーの利点は、励起光を必要としないので励起光による光毒性がないことである。欠点として、セレンテラジンを加える必要があり、セレンテラジンが徐々に消費されること。また、後述する蛍光センサーに比べると放出される光が弱く、多くの場合光子計数器を使用する必要があり、微細な部分からのシグナルの検出や、高速撮影には適していない。

2.2.2 GFP を用いた蛍光 Ca^{2+} センサー

現在 GFP を用いた蛍光 Ca^{2+} センサーには、fluorescent resonance energy transfer (FRET) センサーと単一蛍光蛋白質センサーの 2 種類がある。

2.2.2.1 FRET センサー：FRET センサーは色の異なる 2 種類の蛍光蛋白質を用いるもので、センサーに Ca^{2+} が結合すると 2 つの蛍光蛋白質の間の FRET 効率が変わり、放出される蛍光が変化する（図 2 左）。FRET センサーには、Cameleon, FIP-CB_{SM}, TN-L15, F2C, YC6.1 などがある^{3~7)}（表 1）。利点は、ratio 測定による安定な計測ができることである。ratio 測定には異なる 2 つの波長の画像を取り込む必要がある。そのため CCD カメラを 2 台用意するか、w-view（浜

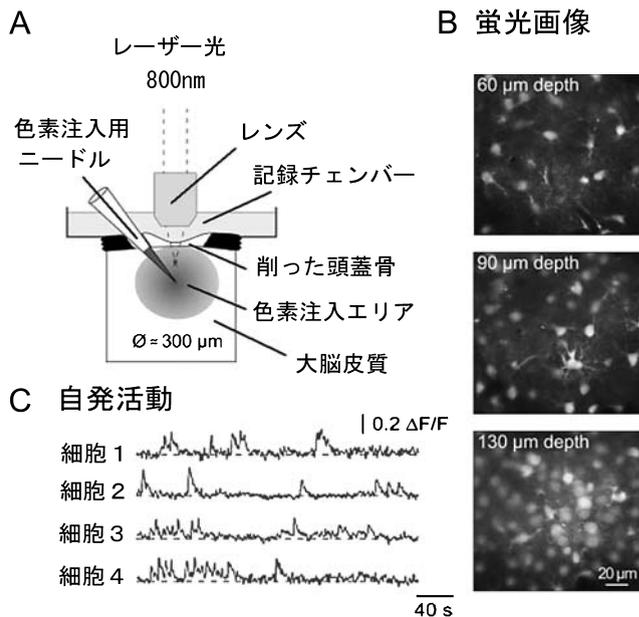


図 1 蛍光 Ca^{2+} 指示薬を用いた脳神経細胞の in vivo Ca^{2+} イメージング：Multicell bolus loading (MABL) 法
A) エステル型の蛍光 Ca^{2+} 指示薬を、13 日齢のマウスの大脳皮質に微量注入した後 30 分～1 時間後に、二光子励起レーザー顕微鏡を用いて Ca^{2+} イメージングを行った。頭蓋骨は薄く削ってある。B) 骨を通して撮影した蛍光画像。C) 別のマウス（5 日齢）を用いた実験で得られた 4 つの神経細胞の蛍光変化。自発活動が観測される。（文献 1 を改変）

松ホトニクス）などの視野を半分に分けて 2 波長の画像を 1 台の CCD カメラに同時に取り込む装置を用いるか、または、フィルターチェンジャーにより波長を切り替えて 1 台の CCD カメラで交互に撮影する必要がある。共焦点（または 2 光子）レーザー顕微鏡であれば、多くの物は 2 波長測定が可能である。

2.2.2.2 単一蛍光蛋白質センサー：もう一方の単一蛍光蛋白質センサーは、分子内に蛍光蛋白質を 1 つしか持たず、センサーに Ca^{2+} が結合すると立体構造が変わり、それにともない蛍光蛋白質の蛍光特性が変化する（図 2 右）。この仲間には camgaroo, G-CaMP, pericam, Case16 がある^{8~11)}。このタイプの Ca^{2+} センサーは大きな蛍光変化を示し、多くは一波長励起一波長測定センサーなので測定が単純である。その反面

表 1 Genetically encoded Ca^{2+} sensor (GECS)

発光 Ca^{2+} センサーのグループ	
発光センサー	エクオリンなど
BRET センサー	GFP-エクオリン融合蛋白質 (G5A など)
蛍光 Ca^{2+} センサーのグループ	
FRET センサー	cameleon, FIP-CB _{SM} , TN-L15, YC6.1, F2C
単一蛍光蛋白質センサー	camgaroo, G-CaMP, pericam, Case16

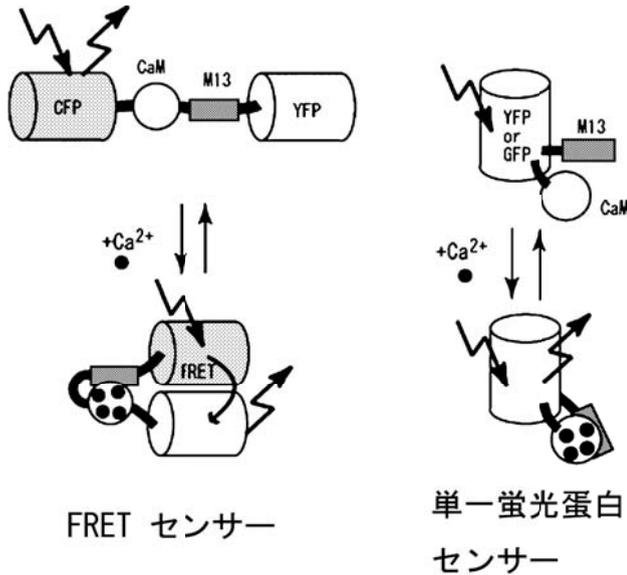


図2 蛍光カルシウムセンサーの模式図
 A) FRET センサー (cameleon の例). Ca^{2+} が Calmodulin (CaM) に結合すると立体構造が大きく変化して CFP と YFP の距離や配向が変化して、FRET が起こりやすくなる。B) 単一蛍光蛋白センサー。蛍光蛋白は1つしかなく、 Ca^{2+} が Calmodulin (CaM) に結合すると立体構造が変わり、立体構造の変化が蛍光蛋白に影響を与え、蛍光特性が変化する。

FRET センサーに比べると測定の安定性や pH 変化に対する安定性が劣る。蛍光が暗いものが多いが改良されて徐々に良くなってきている。冷却 CCD カメラやレーザー顕微鏡を用いて観察することができる。

どちらの蛍光 Ca^{2+} センサーも、生体内で合成され、発光センサーのような cofactor を必要としないため、一旦細胞に組み込んでしまえばセンサー分子の安定した発現が期待でき、いつでも測定できる利点がある。励起光をあてる必要があるが、蛍光は発光に比べて格段に出てくる光の量が多いので、リアルタイムの測定や微細な部分からのシグナルの検出に向いている。

3. GECS の応用

発光 Ca^{2+} センサーにせよ、蛍光 Ca^{2+} センサーにせよ、GECS は DNA によりコードさせているため、適切なプロモーターを用いることにより目的の細胞にセンサーの蛋白質を発現させることができる。したがって、GECS は、線虫などのような蛍光 Ca^{2+} 指示薬の導入が困難な場合や、細胞特異的に観察したいとき、細胞内の局所での変化の観察、長期間の測定などに向いている。次にいくつかの応用例を示す。

図3 は FRET 型の蛍光 Ca^{2+} センサーである CerTN-L15 を脳神経細胞に特異的に発現させた例である¹²⁾。カルシウム上昇により Citrine (黄色) のシグナルは増加し、Cerulean (シアン色) のシグナルは減少している。両者の比をとることによりセンサーの濃度の変化などの影響を受けない安定した測定を行うことができる。

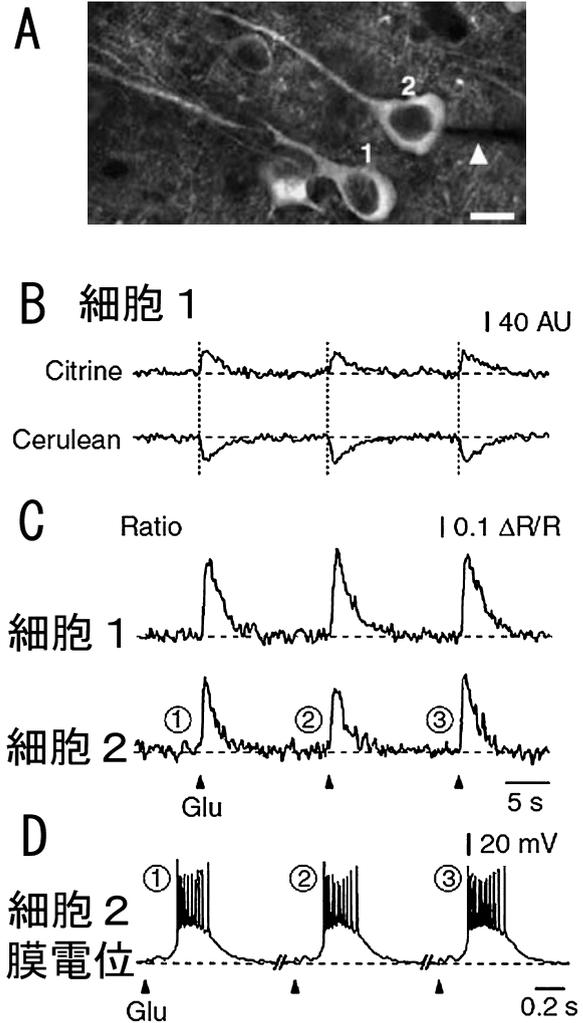


図3 FRET 型の蛍光 Ca^{2+} センサー (CerTN-L15) を脳神経細胞に発現する遺伝子導入マウス
 CerTN-L15 は TN-L15 を改良した FRET 型のセンサーである。CerTN-L15 を大脳皮質の神経細胞に発現するマウスから脳スライス標本作製し、グルタミン酸を投与した。A) 大脳皮質 2/3 層の神経細胞の蛍光画像。スケールは $10 \mu\text{m}$ 。B) 細胞 1 から記録した Citrine (黄色い蛍光蛋白) の蛍光強度の変化と、Cerulean (シアン色の蛍光蛋白) の蛍光強度の変化。C) 細胞 1 および細胞 2 における蛍光比 (Citrine/Cerulean) の変化。D) 微小電極 (写真 A の矢頭) を用いて記録した細胞 2 の電位変化。(文献 12 を改変)

図4 は心筋のミオシン軽鎖キナーゼのプロモーターを用いて G-CaMP2 をマウスの心筋特異的に発現させた例である¹³⁾。心臓の収縮に伴い、心房に続いて心室筋で Ca^{2+} が増加していることがわかる。また β アゴニストであるイソプロテレノールを投与すると心筋内の Ca^{2+} が増加し、陽性変力作用が現れることがわかる。この遺伝子改変マウスは、不整脈の発生メカニズムの解明に役立つと期待されている。

図5 は $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の C 末端に単一蛍光蛋白 Ca^{2+} センサーである G-CaMP2 を融合させたものである¹⁴⁾。融合蛋白質は形質膜に輸送されるため、センサーは形質膜直下の細胞質側に局在することになる。エステル型の Fura2AM を取り

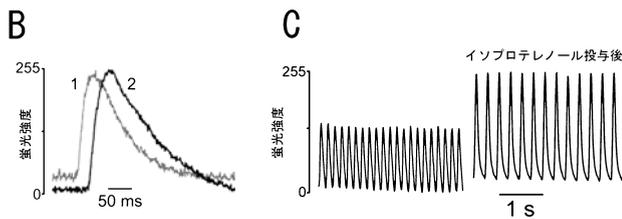
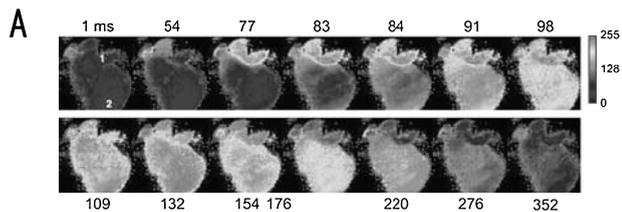


図4 G-CaMP2を心臓に特異的に発現する遺伝子導入マウス
A) G-CaMP2を導入したマウスの心臓を還流し、CCDカメラによりCa²⁺イメージングを行った。まず心房(図の1番)の蛍光変化が起こり、続いて下の心室(図の2番)の蛍光強度が増加する。B) 心房(トレース1)および心室(トレース2)の蛍光強度の時間的変化。C) βアゴニスト(イソプロテレノール)の効果。(文献13を改変)

込ませて同時測定をおこなっているが、Fura2AMはどの細胞にも取り込まれる(細胞aも細胞bも蛍光変化が観察される)。一方G-CaMPは遺伝子を取り込んだ細胞だけが発現している(細胞aのみで蛍光変化が観察される)。また、Fura2AMは細胞質のCa²⁺変化を全体として捕らえているが、Na⁺-K⁺ ATPaseと融合したCa²⁺センサーでは膜直下の局所のCa²⁺変化を捕らえることになる。

4. おわりに

この総説では、カルシウムイメージング法について簡単に紹介した。特に、蛋白質でできたCa²⁺センサーについてやや詳しくその特徴を述べるとともに、応用例を紹介した。GECSはまだ改良が続けられているセンサーであって、今後、さらに高性能なGECSが開発され、応用が進むと期待される。

再生医療は21世紀の医療として、現在多くの注目を集めている。再生医療において、再生した細胞の位置と機能をin vivoでモニターすることは重要である。この目的にGECSは非常に有効であると思われる^(注)。今後GECSがEmbryonic stem (ES)細胞や人口多能性幹(iPS)細胞に組み込まれ、利用されることが予想される。

(注) 極最近G-CaMP2を移植に応用した例が報告された¹⁵⁾。

文 献

- 1) Stosiek, C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3719–3724 (2003)
- 2) Baubet, V. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7260–7265 (2000)
- 3) Miyawaki, A. *et al.*: *Nature*, 388, 882–887 (1997)
- 4) Romoser, V.A. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 272, 13270–13274 (1997)
- 5) Heim, N. and Griesbeck, O.: *J. Biol. Chem.*, 279, 14280–14286 (2004)

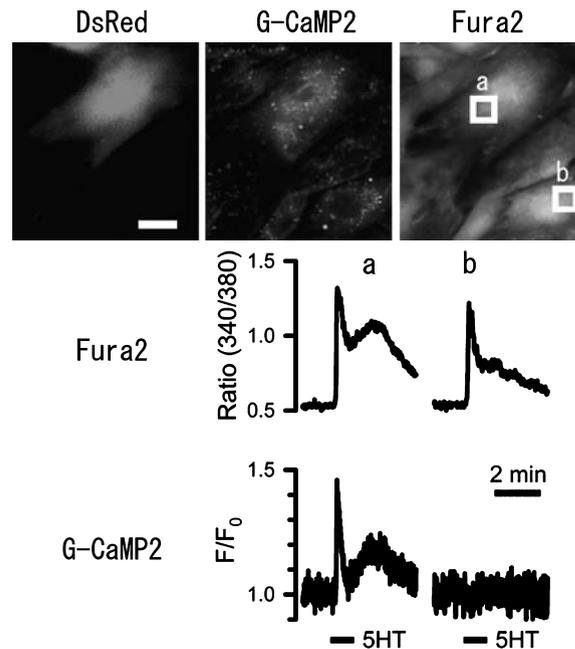
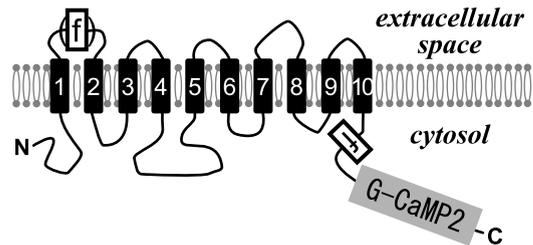


図5 G-CaMP2を細胞膜直下に局限して発現させた例
G-CaMP2をNa⁺-K⁺ ATPaseのC末端に付加した融合蛋白α2(f)G-CaMP2を作成した。したがってG-CaMP2は細胞膜直下のみに発現することになる(上段の図)。この融合蛋白をDsRedと共に培養細胞に発現させた(中段の図)。細胞aはDsRedとα2(f)G-CaMP2を同時に発現している細胞で、細胞bはDsRedもα2(f)G-CaMP2のいずれも発現していない細胞である。蛍光Ca²⁺指示薬であるFura2は細胞特異性がないので細胞aにも細胞bにも取り込まれている。5HT投与時の蛍光変化をFura2とα2(f)G-CaMP2で同時測定を行った(下段の図)。Fura2(上のトレース)では細胞aも細胞bも反応が見られる。α2(f)G-CaMP2(下のトレース)では細胞aのみに反応が見られる。(文献14を改変)

- 6) Takatsuka, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 316–323 (2005)
- 7) Truong, K. *et al.*: *Nat. struct. biol.*, 8, 1069–1073 (2001)
- 8) Nakai, J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, 19, 137–141 (2001)
- 9) Baird, G.S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11241–11246 (1999)
- 10) Nagai, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554–10559 (2004)
- 11) Souslova, E.A. *et al.*: *BMC Biotechnol.*, 7, 37 (2007)
- 12) Heim, N. *et al.*: *Nat. Methods*, 4, 127–129 (2007)
- 13) Tallini, Y.N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 4753–4758 (2006)
- 14) Lee, M.Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 13232–13237 (2006)
- 15) Roell, W. *et al.*: *Nature*, 450, 819–826 (2007)