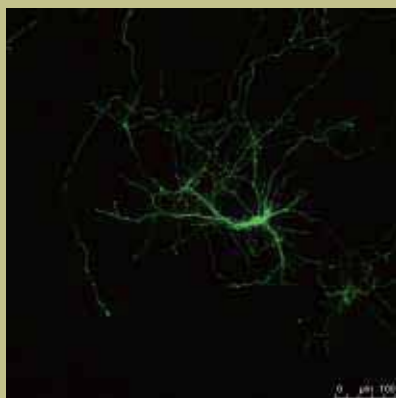


生物発光を利用したアクチン重合、 CREB活性化の検出

富山大学 大学院医学薬学研究部 分子神経科学講座 石本哲也

分子細胞レベルでの記憶研究

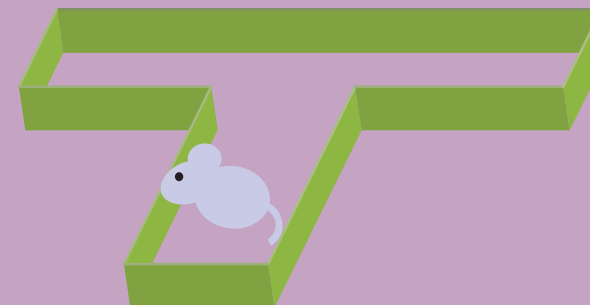


海馬神経細胞

培養細胞や脳スライスなど多彩な方法を用いて
特定の蛋白質の挙動を解析できる。
本当に記憶と関係あるのか？

両者の間に溝が
ある

個体レベルでの記憶研究



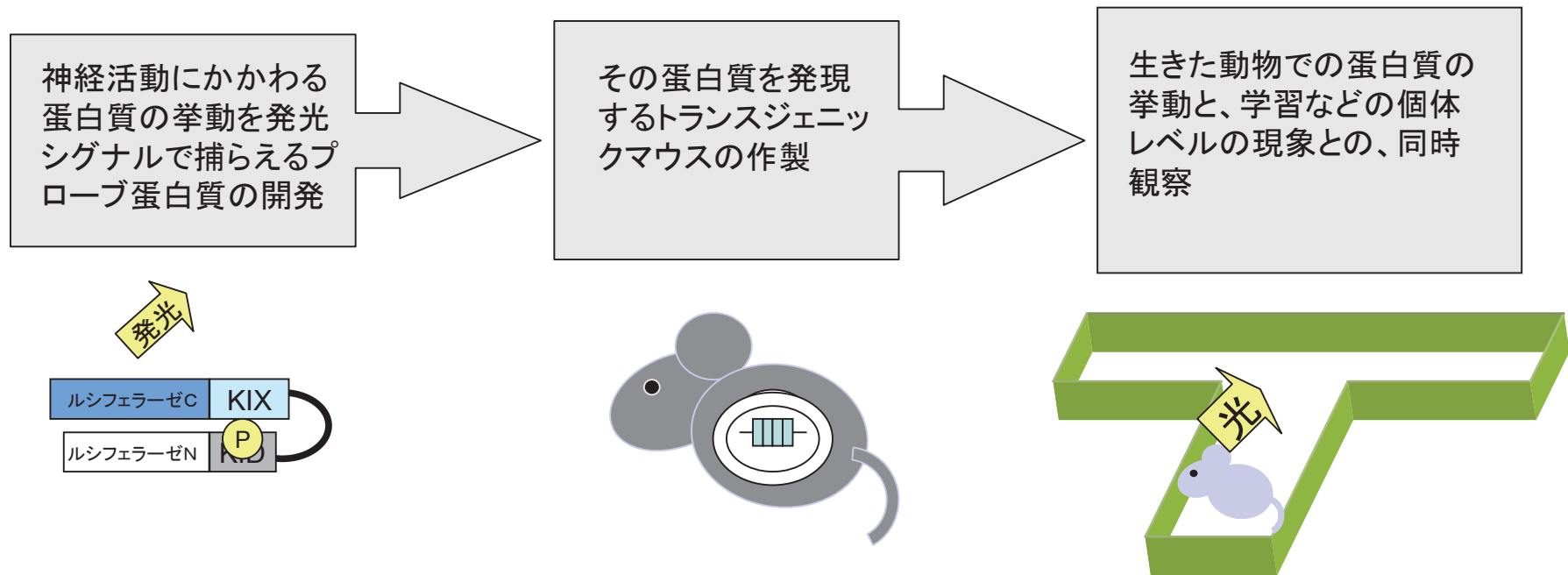
記憶形成を直接観察できるが、
脳内の分子挙動を同時計測できない。

背景となる考え方

生きた動物の脳内で、記憶形成に関わる特定の蛋白質の活性化を
計測することはできないだろうか。

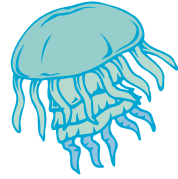
目標

生体脳における蛋白質の挙動を、光で検知できる
トランスジェニックマウスを作成する。



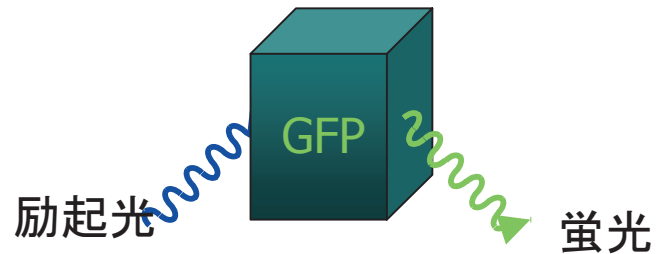
「ものを覚えると頭が光るねずみ」を作りたい。

どのような光を使うか、蛍光or発光？



蛍光

GFP(green fluorescent protein)



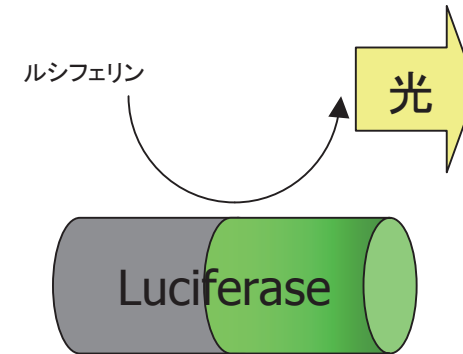
励起光と違った波長の光を放出

- ・明るい(顕微鏡観察に広く使用される)
時間空間分解能に優れる
- ・生体内では自家蛍光がある
- ・生体深部を励起するのは困難



生物発光

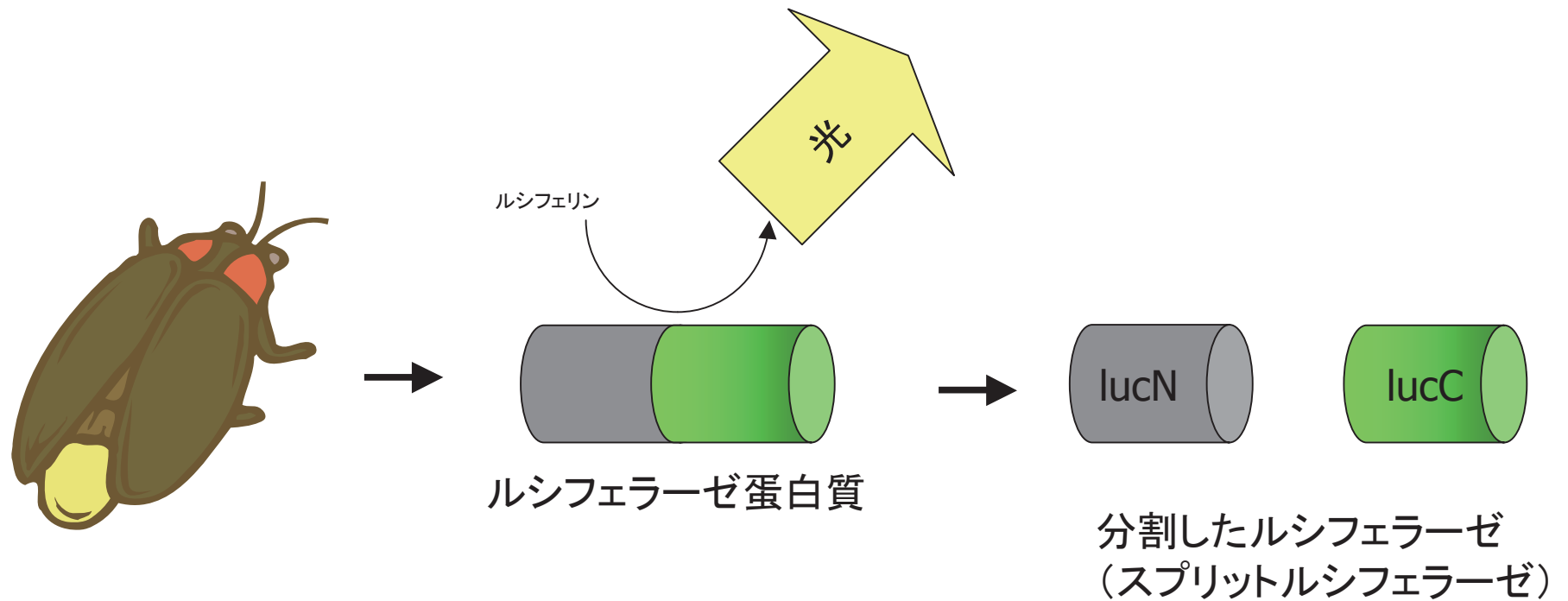
Luciferase



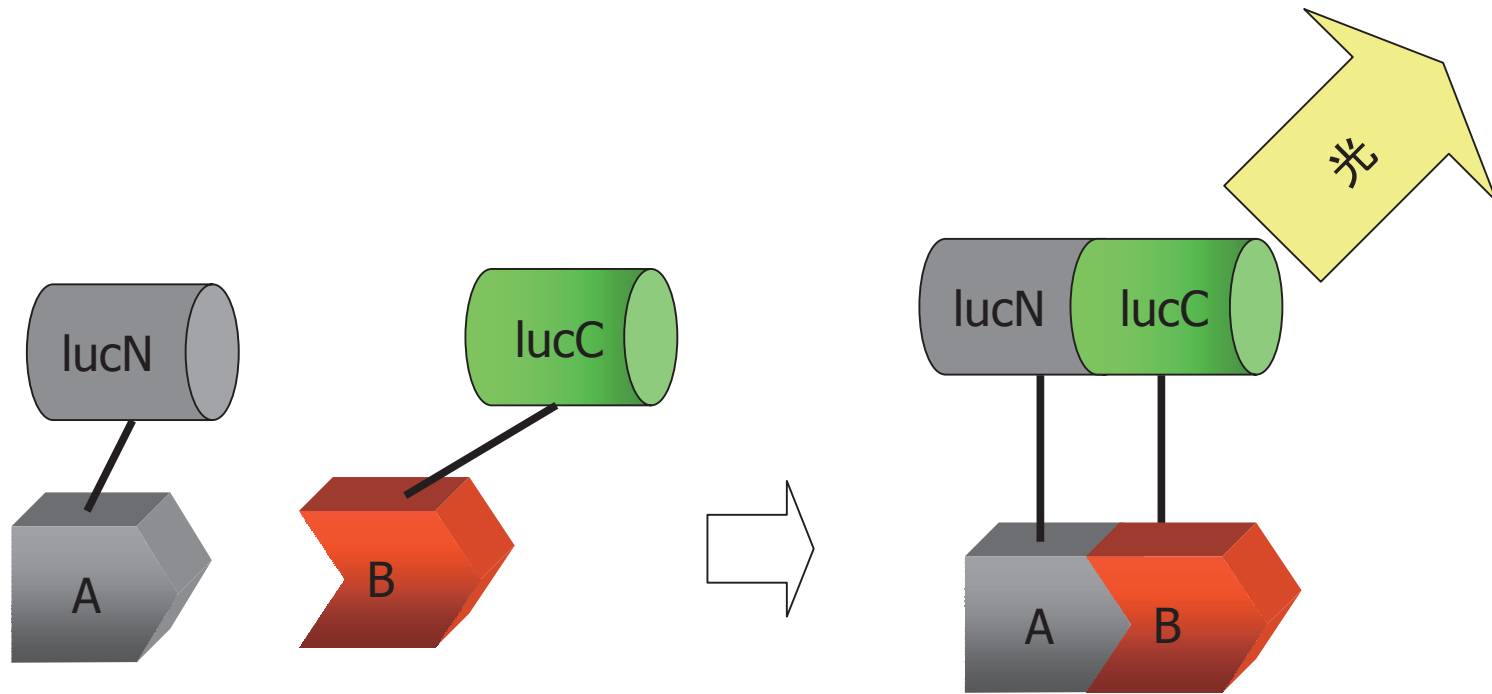
化学反応によって発光

- ・暗い(顕微鏡観察に不向き)
- ・自家蛍光に相当するものがない
(S/N比が良い)
- ・励起光を当てる必要がない

生物発光を用いた蛋白質相互作用解析(スプリットルシフェラーゼ)



発光蛋白質であるルシフェラーゼを分割すると、発光能がなくなる。



あらかじめ結合することがわかっている蛋白質AとBをそれぞれスプリットルシフェラーゼとの融合蛋白質として発現させることで、細胞内でルシフェラーゼ活性が復活し発光する。

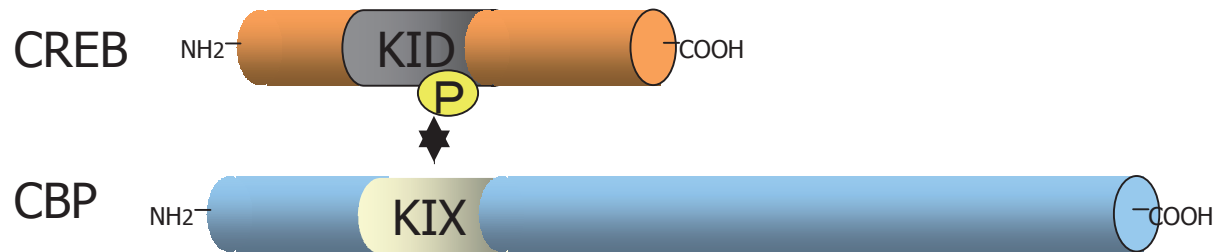
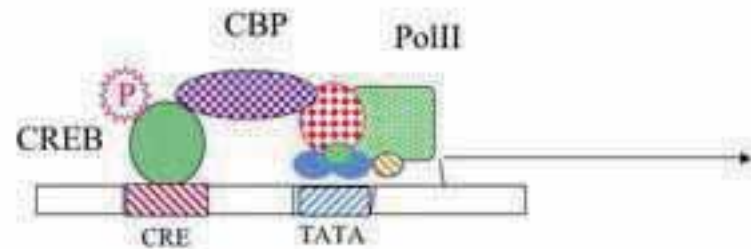
生体中の蛋白質の挙動を捉えるためには、S/N比がよく
励起装置の必要がなく、トランスジェニックマウス作成が可能な
生物発光を用いた。

生物発光を用いて、どの蛋白質の どのような挙動を計測するか

(1) CREB (cAMP response element binding protein)と
CBP (CREB binding protein)の、リン酸化を介した結合

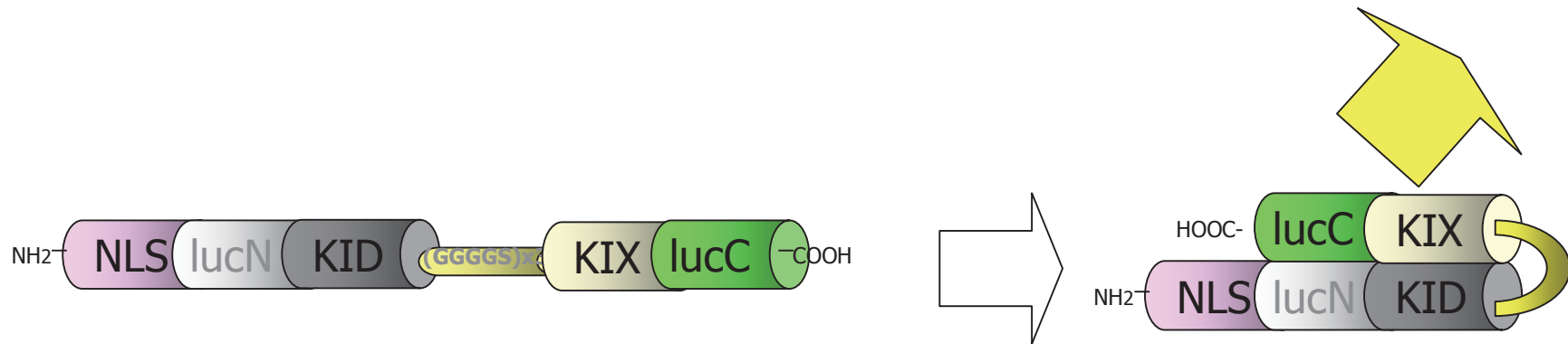
(2) 細胞の活動に応じたactinの重合

(1) CREB (cAMP response element binding protein)の活性化を検知する蛋白質の開発



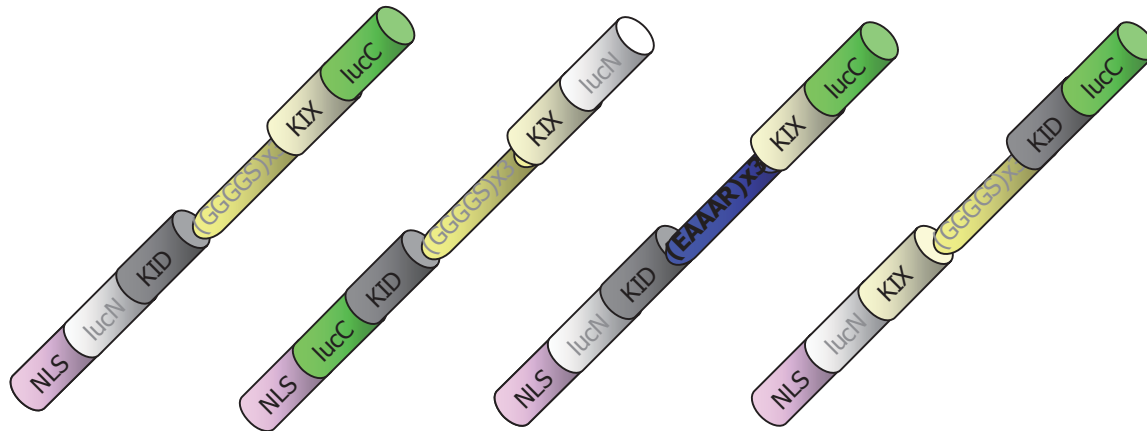
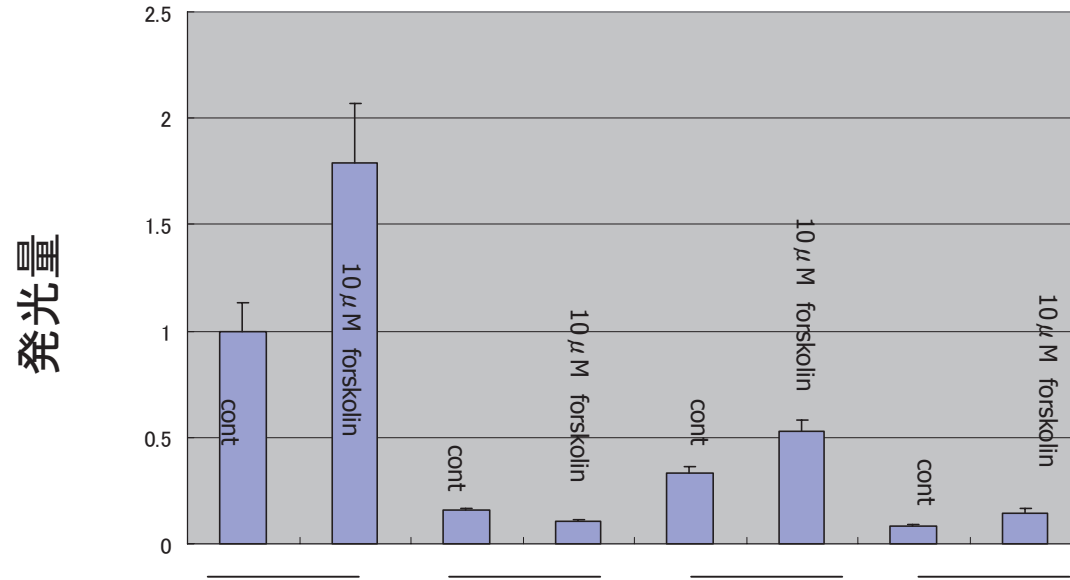
神経細胞の興奮により活性化する。
KIDがリン酸化され、KIXに結合し、転写を促進することが知られている。
シナプス可塑性、記憶形成に重要なことが報告されている。

CREB活性化モニター蛋白質作成の作戦

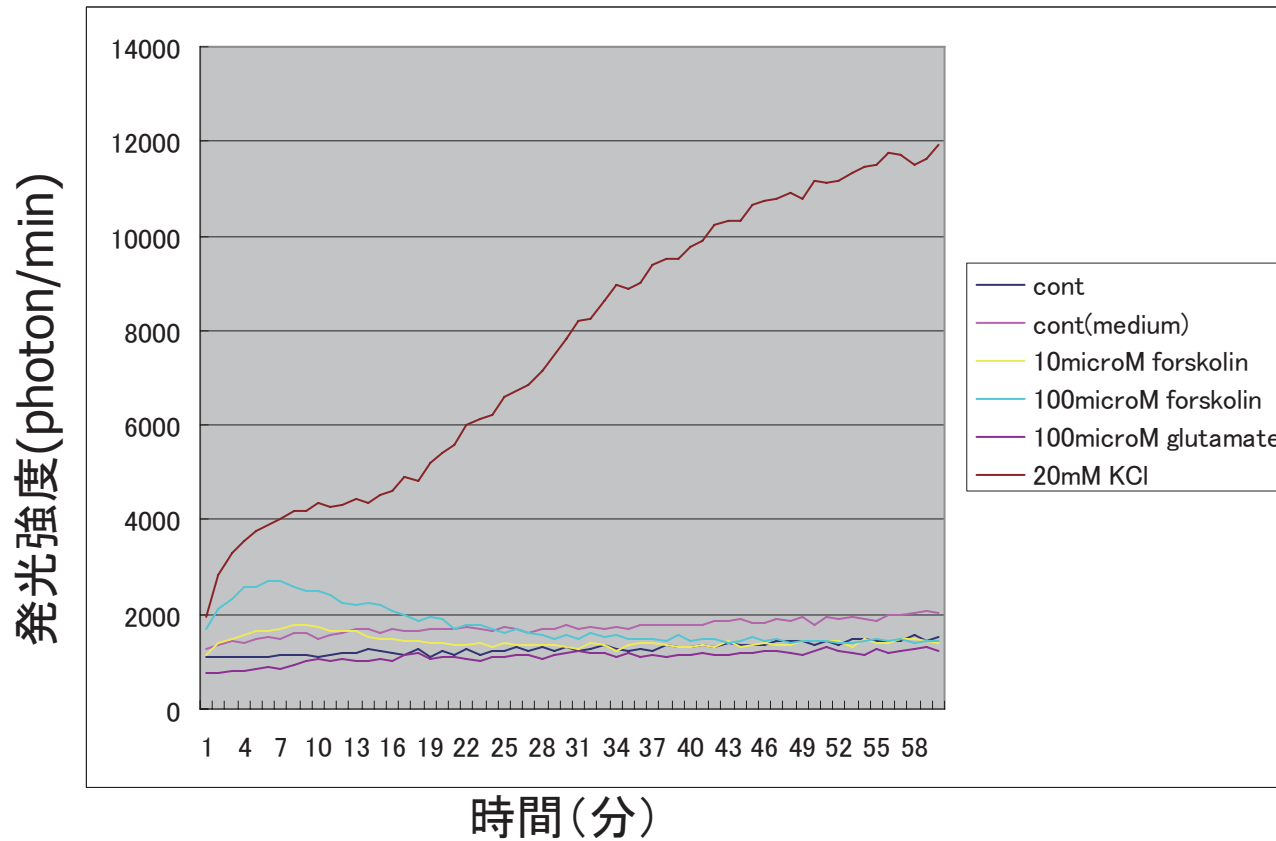


リンカーでつないだKIDとKIXが相互作用することで、発光が増大するのではないか

細胞株中でフォルスコリン刺激 (CREB活性化を誘導) に応じて発光を増大させる蛋白質のスクリーニング

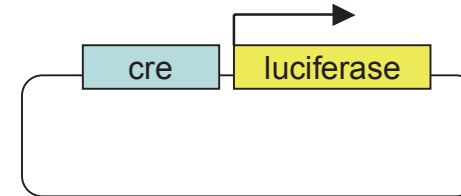


神経細胞を用いた実験

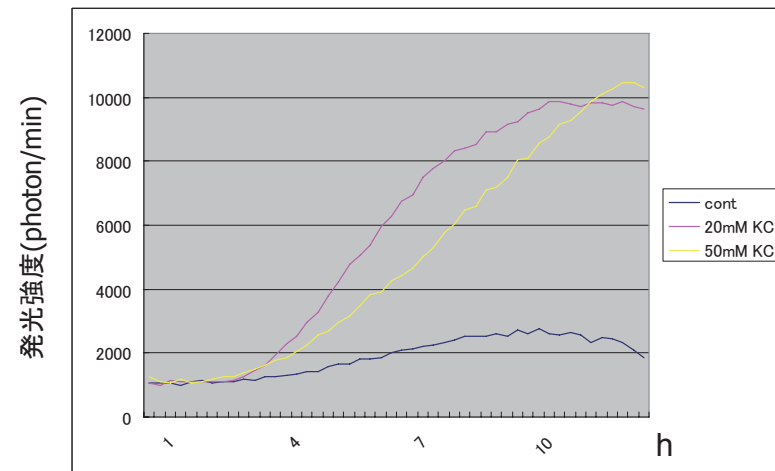
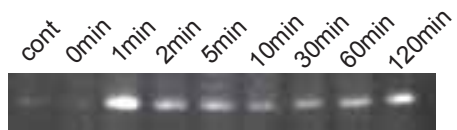


各種刺激を与え、継時的に光子の数を計測した。KCl刺激による脱分極によって、発光強度が約6倍にまで上昇した。(DIV6)

活性化CREBが結合して起きるCre配列依存的転写は、KCl添加後数時間たってから見られる。



KCl添加後の培養神経細胞でのCREBリン酸化は、添加後1分から起きる。

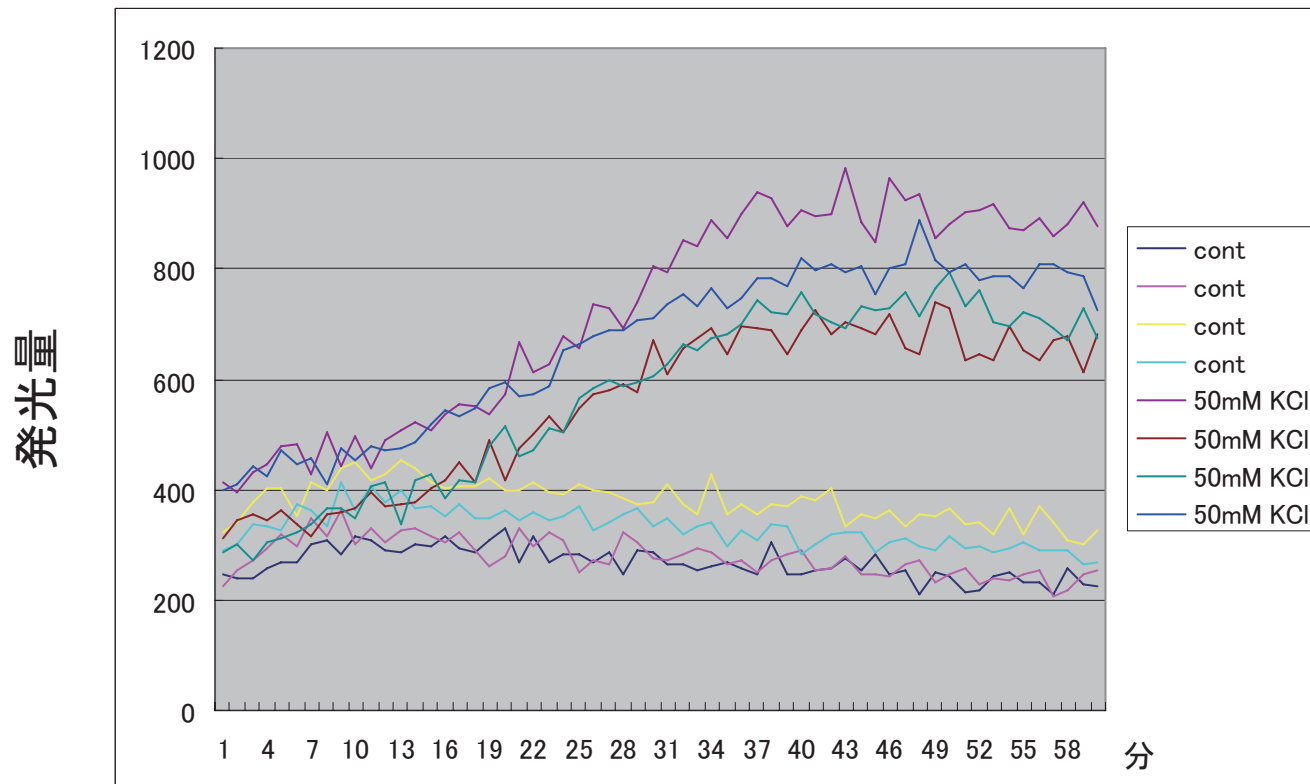


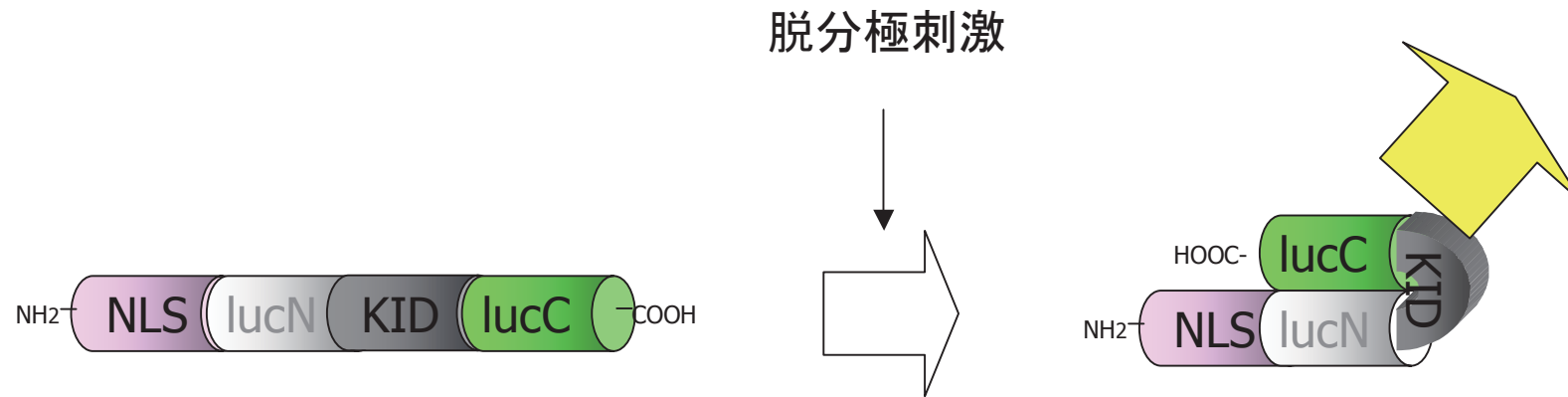
融合蛋白質の発光の増大(数十分)は、CREBリン酸化(数分)と、Cre配列依存的転写(数時間)との中間であり、時間的なつじつまが合う。



を導入した神経細胞に

KClで脱分極刺激を与えた場合も発光の上昇が見られた。



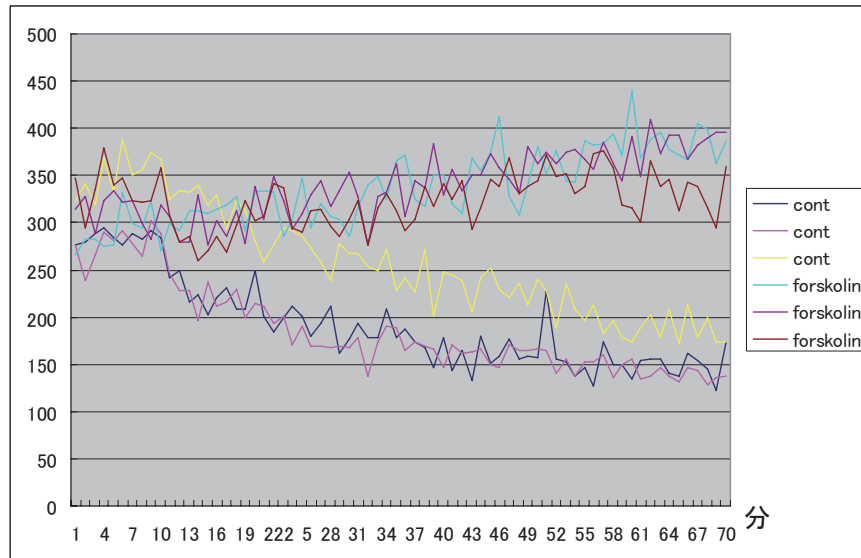
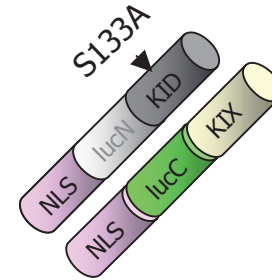
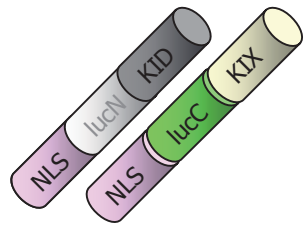


神経細胞の興奮によってKIDの構造変化がおき、
発光が増大しているらしい。

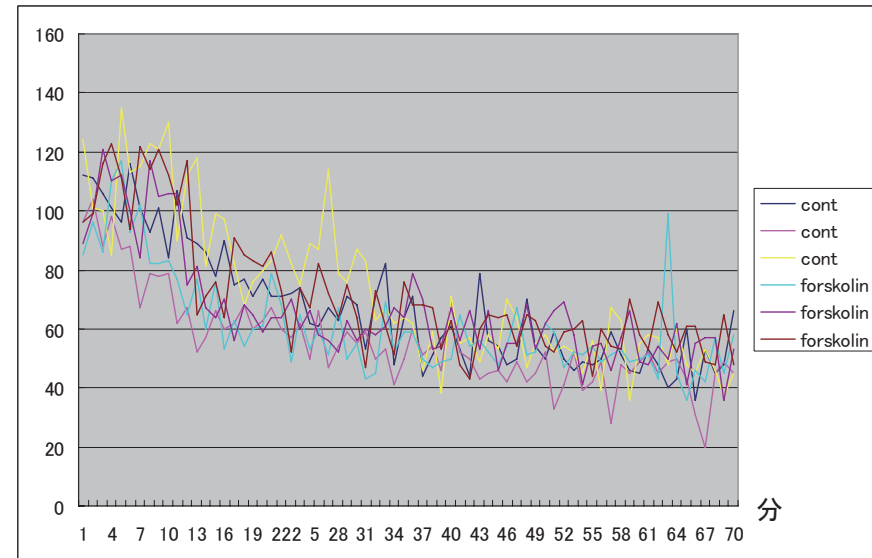
KIDとKIXは、KIDの133セリンのリン酸化依存的に結合すると考えられているが、
このプローブ蛋白質内の133セリンをアラニンに変えても、神経細胞の興奮に依存して
発光が増大する。

KIDドメイン全体的に構造が変化することで発光が上昇すると考えられる。

2分子型CREBプローブの開発



↑
フォルスコリン投与



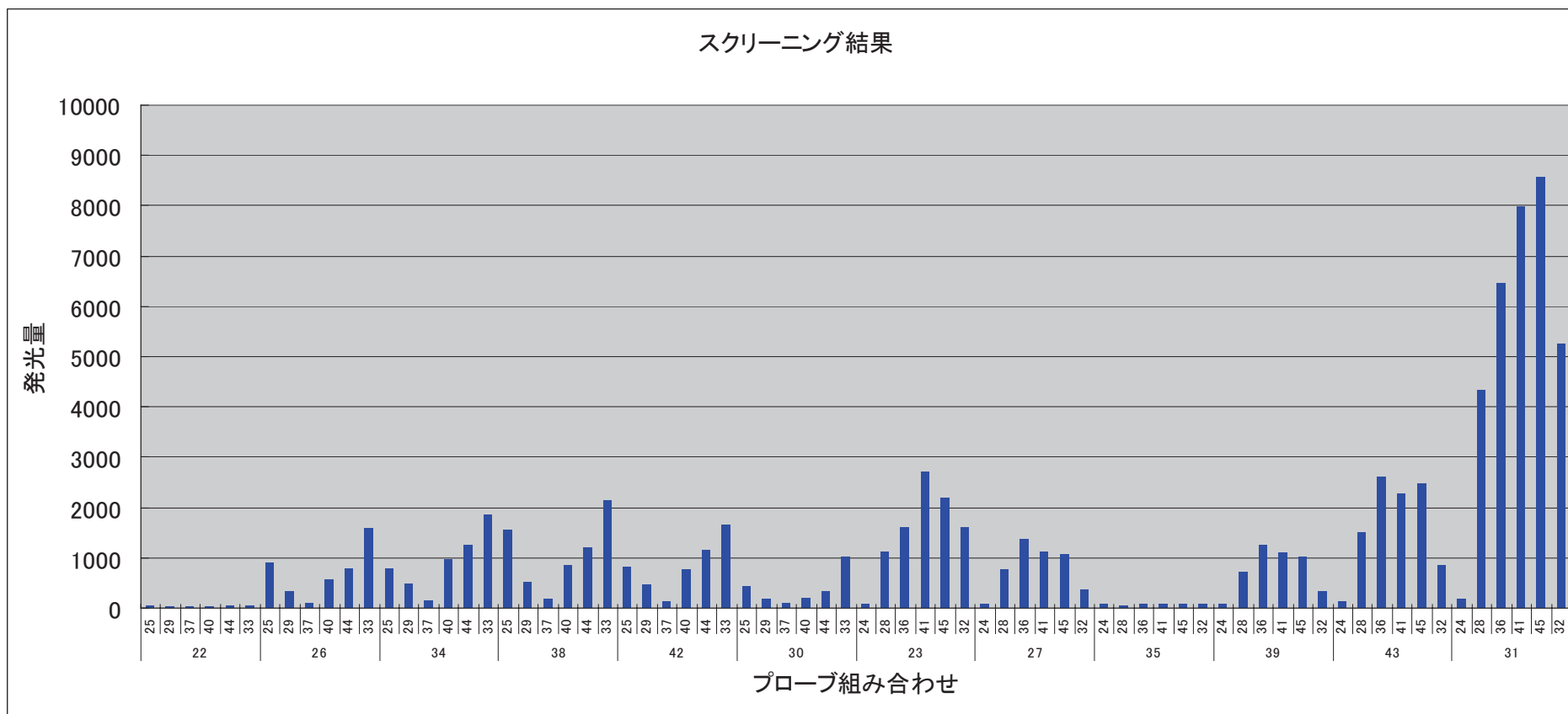
↑
フォルスコリン投与

133セリンをアラニンに置換することで、フォルスコリン刺激に対する発光量の上昇が見られなくなる。

2分子型CREBプローブの改良

リンカー部分を改変し最も発光量の高いプローブ蛋白質を探索した。

融合タンパク22: NLS-KID-KGGRADPAFLYKVE-lucN末
融合タンパク23: NLS-KID-KGGRADPAFLYKVE-lucC末
融合タンパク24: NLS-KIX-KGGRADPAFLYKVE-lucN末
融合タンパク25: NLS-KIX-KGGRADPAFLYKVE-lucC末
融合タンパク26: NLS-lucN末-KGGRADPAFLYKVE-KID
融合タンパク27: NLS-lucC末-KGGRADPAFLYKVE-KID
融合タンパク28: NLS-lucN末-KGGRADPAFLYKVE-KIX
融合タンパク29: NLS-lucC末-KGGRADPAFLYKVE-KIX
融合タンパク30: NLS-KID-GGGGSGGGGSGGGGS-lucN末
融合タンパク31: NLS-KID-GGGGSGGGGSGGGGS-lucC末
融合タンパク32: NLS-KIX-GGGGSGGGGSGGGGS-lucN末
融合タンパク33: NLS-KIX-GGGGSGGGGSGGGGS-lucC末
融合タンパク34: NLS-lucN末-GGGGSGGGGSKGGRADPAFLYKVE-KID
融合タンパク35: NLS-lucC末-GGGGSGGGGSKGGRADPAFLYKVE-KID
融合タンパク36: NLS-lucN末-GGGGSGGGGSKGGRADPAFLYKVE-KIX
融合タンパク37: NLS-lucC末-GGGGSGGGGSKGGRADPAFLYKVE-KIX
融合タンパク38: NLS-lucN末-KID
融合タンパク39: NLS-lucC末-KID
融合タンパク40: NLS-lucC末-KIX
融合タンパク41: NLS-lucN末-KIX
融合タンパク42: NLS-lucN末-GGGGSGGGGSGGGGS-KID
融合タンパク43: NLS-lucC末-GGGGSGGGGSGGGGS-KID
融合タンパク44: NLS-lucC末-GGGGSGGGGSGGGGS-KIX
融合タンパク45: NLS-lucN末-GGGGSGGGGSGGGGS-KIX



当初開発したプローブ蛋白質から、大幅に発光量を増大させることができた。

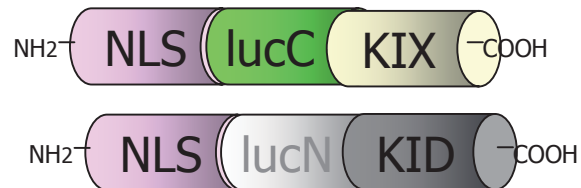
CREBプローブのまとめ

1分子型CREBプローブ



KIDドメインの全体的な構造変化を検知する。
培養神経細胞で活動依存的に発光上昇が観察される。

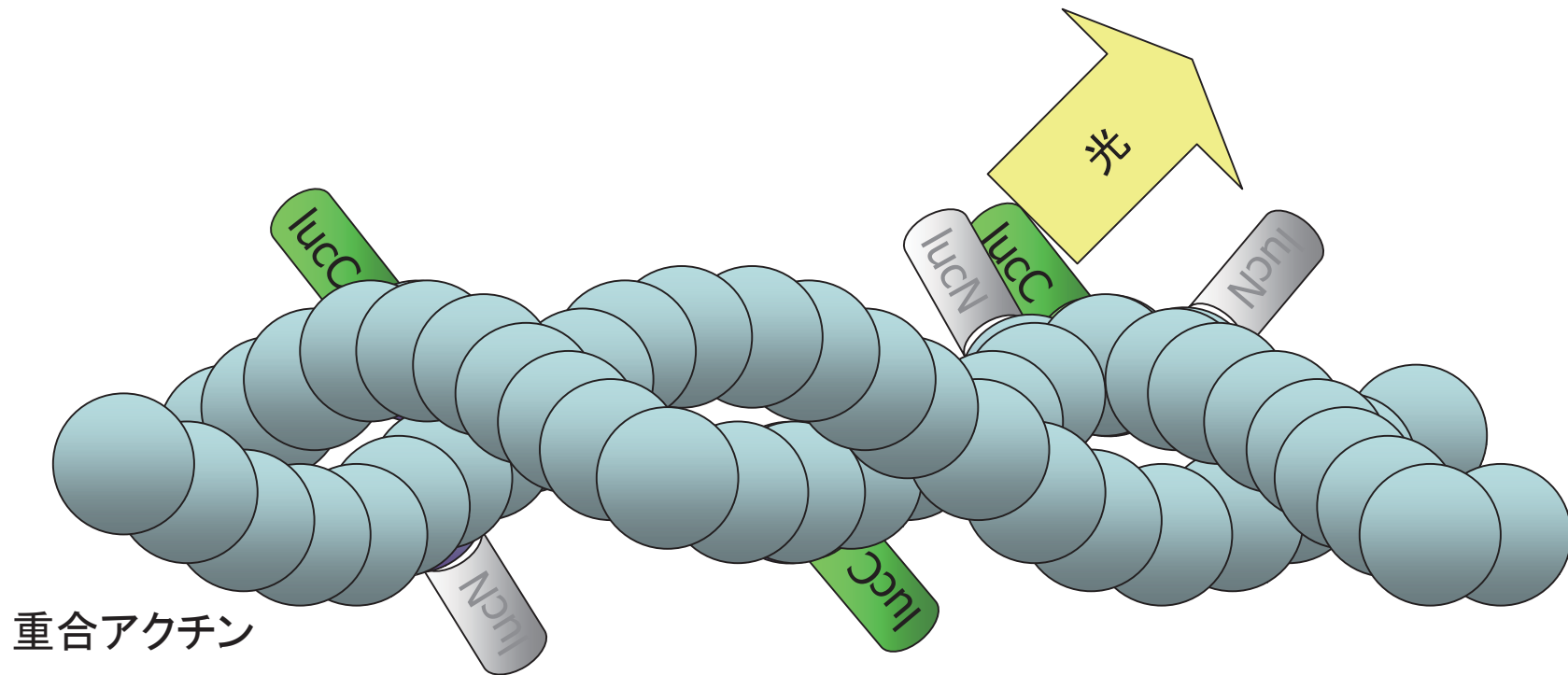
2分子型CREBプローブ



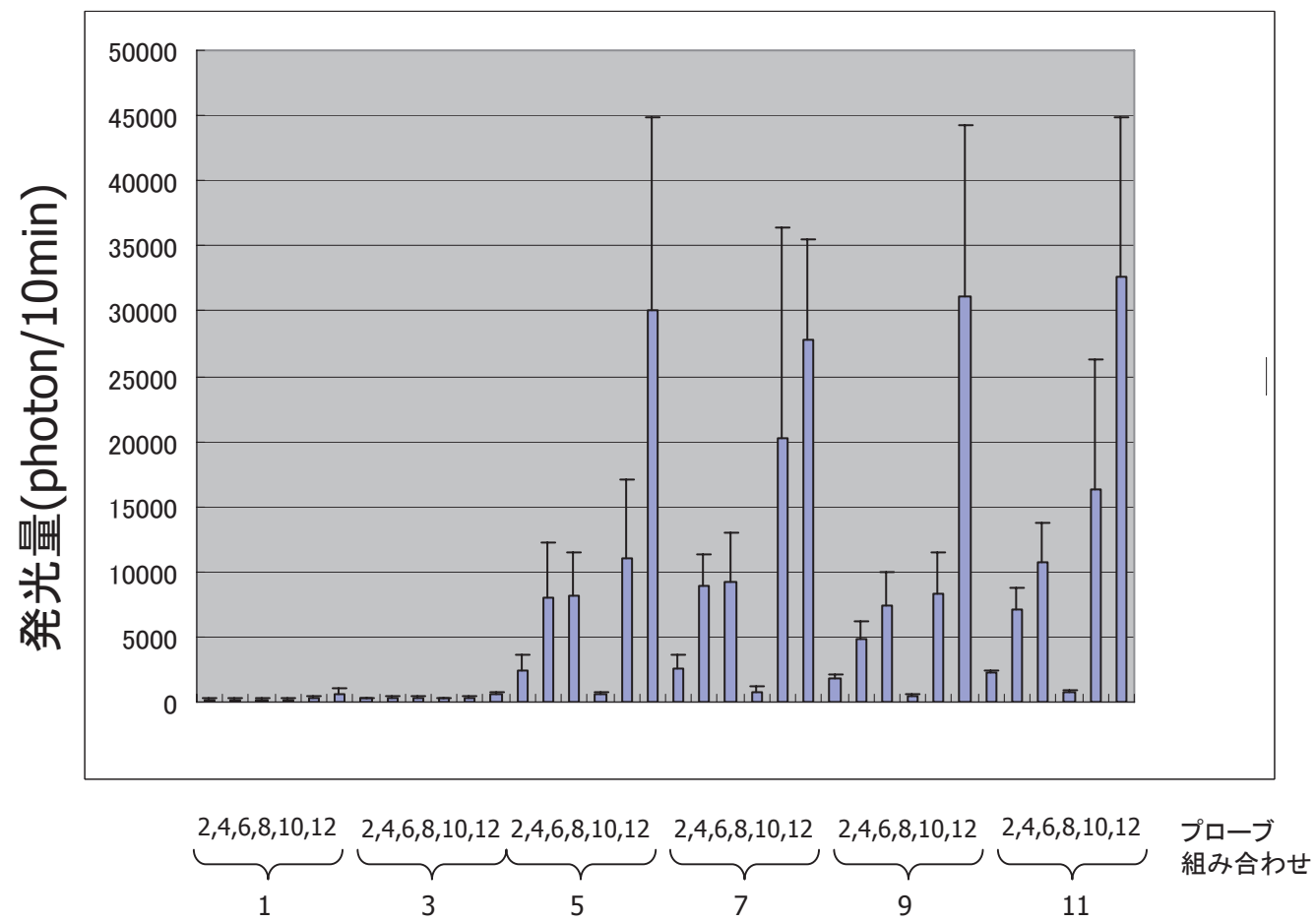
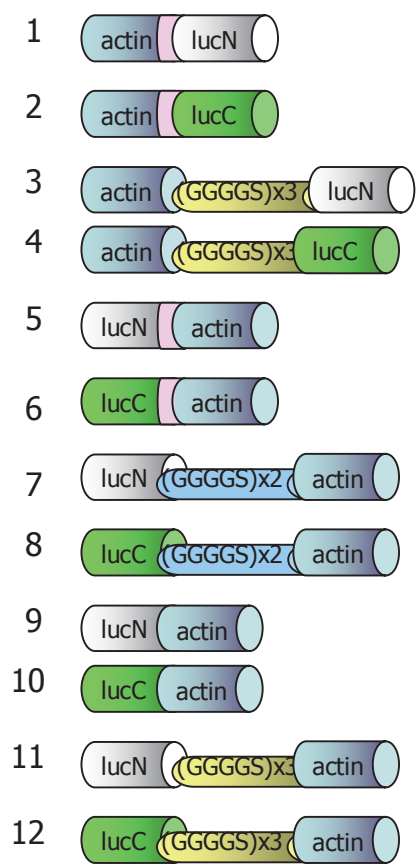
133セリン依存的KID-KIX結合を検知する。
配列の最適化を行うことによって、さらに明るいプローブを得た。

(2) アクチン重合を検知する蛋白質の開発

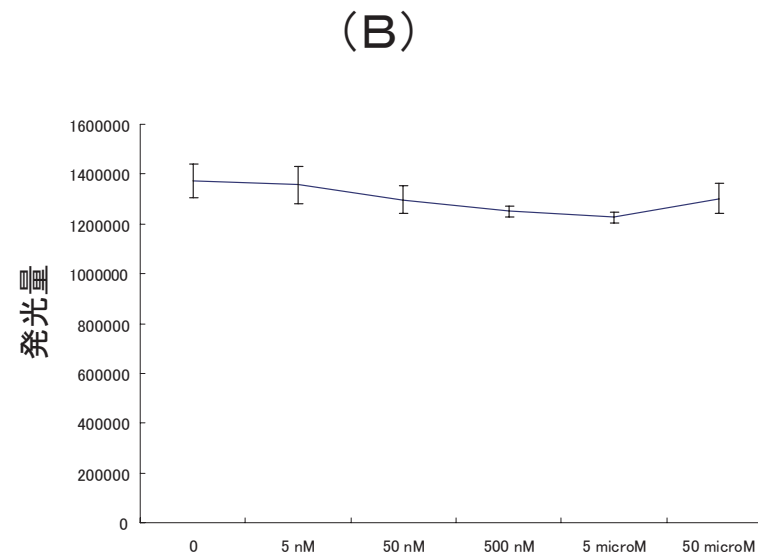
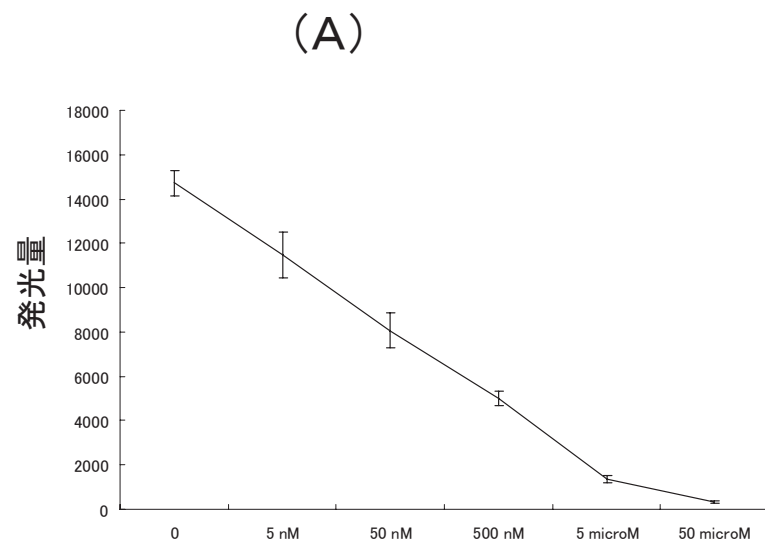
細胞骨格蛋白質。
神経細胞同士の連絡点である、
シナプスに重合アクチンの局在が見られる。



アクチン重合体にスプリットルシフェラーゼをとりこませることで、
重合の度合いがわかるのではないかと



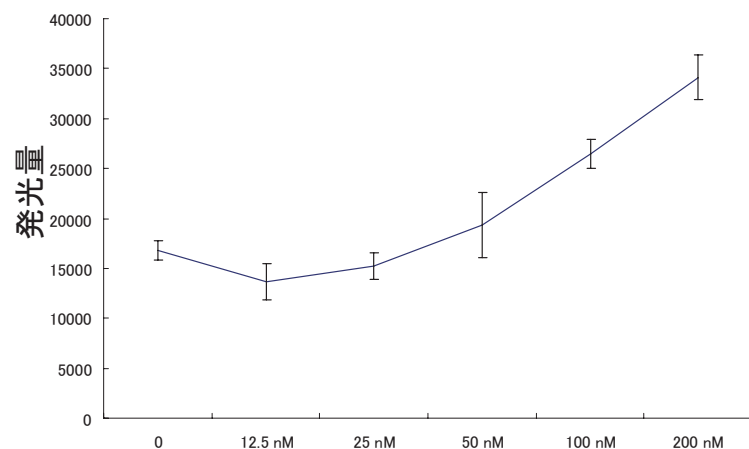
HEK293細胞に上記コンストラクトを発現させた場合の発光量。
 リンカー部分の改変で明るい重合アクチン検出プローブを得た。



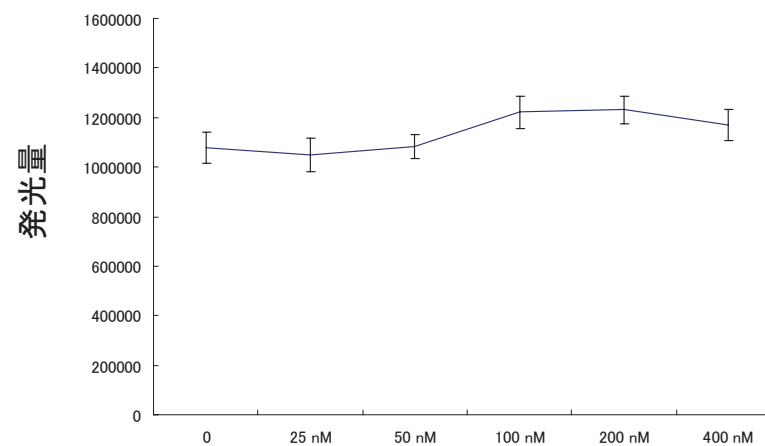
(A) 細胞株にアクチンプローブ(前ページの一番右の組み合わせ)を発現させ、
アクチン重合阻害剤ラトランクリンAを濃度を振って投与した。
3時間後ラトランクリンAの濃度依存的に発光が減少しほぼ0になる。

(B) 野生型ルシフェラーゼで同様の実験を行った。ラトランクリンによる発光の減少は
見られない。

(A)



(B)



(A) アクチンプローブを細胞株に発現させ、重合状態を固定させる薬剤であるjasplakinolideを投与し、3時間後に発光を測定した。濃度依存的に発光が上昇する。

(B) 野生型ルシフェラーゼを発現した細胞株に、jasplakinolideを投与し、3時間後に発光を測定した。発光の上昇は起こらない。

まとめと展望

- (1) 神経活動によって発光量が変化する、CREB活性化計測プローブ蛋白質を作った。
神経細胞の興奮により、発光が増大する。
1分子型のプローブではKIDドメインの構造変化に応じて発光が上昇する。
2分子型では133セリンのリン酸化に依存する。
- (2) アクチンの重合を発光で捉えるプローブ蛋白質を開発。
重合阻害剤の濃度依存的に、発光量が減少する。
経時的な細胞内アクチン重合計測に使用開始。

蛋白質プローブが完成しており、細胞レベルでは有益な実験ツールであると考えられる。

→ CREBプローブ、アクチンプローブを用いて、トランスジェニックマウス作成。

本技術に関する知的財産権

発明の名称 : 神経活動を可視化するプローブ
出願番号 : PCT/JP2009/06225
出願人 : 国立大学法人 富山大学
発明者 : 石本哲也、森 寿、和泉宏兼

お問い合わせ先

富山大学 リエゾンオフィス・富山大学TLO
産学官連携コーディネーター 佐貫大三郎

TEL 076-434-7196

FAX 076-434-5138

E-mail dsanuki@adm.u-toyama.ac.jp