

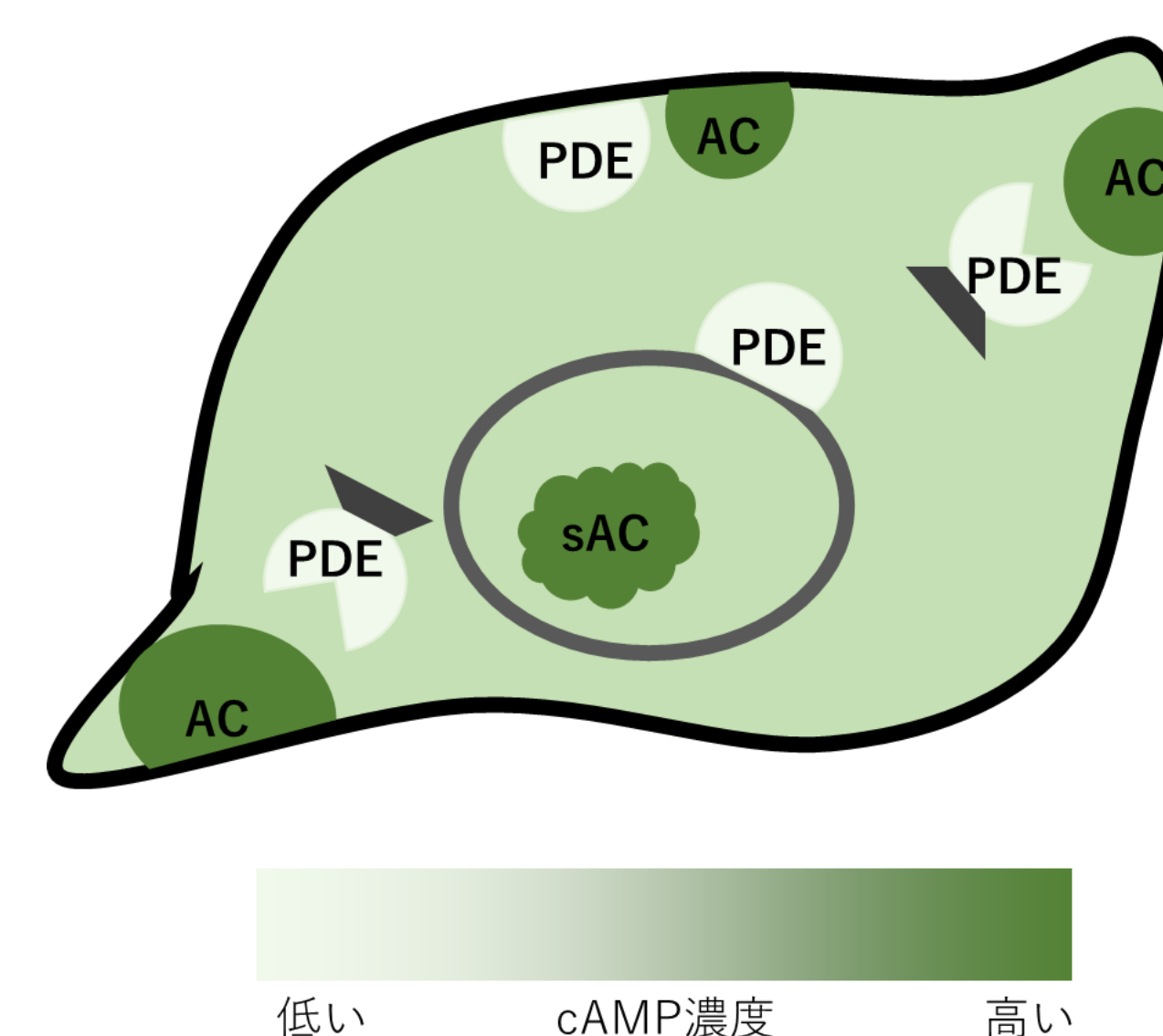
生細胞リアルタイム解析用の遺伝子発現型cAMP緑色蛍光プローブの開発

環状ヌクレオチドリン酸（cAMP）は、代謝調節や細胞分化など多種多様な生理的応答を媒介する代表的な細胞内伝達物質である。創薬評価のための基盤となるFluorescent imaging plate reader（FLIPR）技術とcAMP反応性蛍光プローブを用いたスクリーニング系は、生細胞における薬理的なcAMP動態を評価できるツールとして期待されている。FLIPR技術では輝度上昇型プローブが扱い易いと考えられる。そこで本研究では、新規に緑色蛍光タンパク質を用いてcAMP動態を可視化できる蛍光プローブを開発した。本プローブは生細胞への発現や観察が簡便であり、従来のプローブと比較してcAMPに対する特異性とリアルタイム性に優れている。そのため、エンドポイント測定では困難であった生細胞におけるcAMPの時空間動態を評価することが可能である。

背景

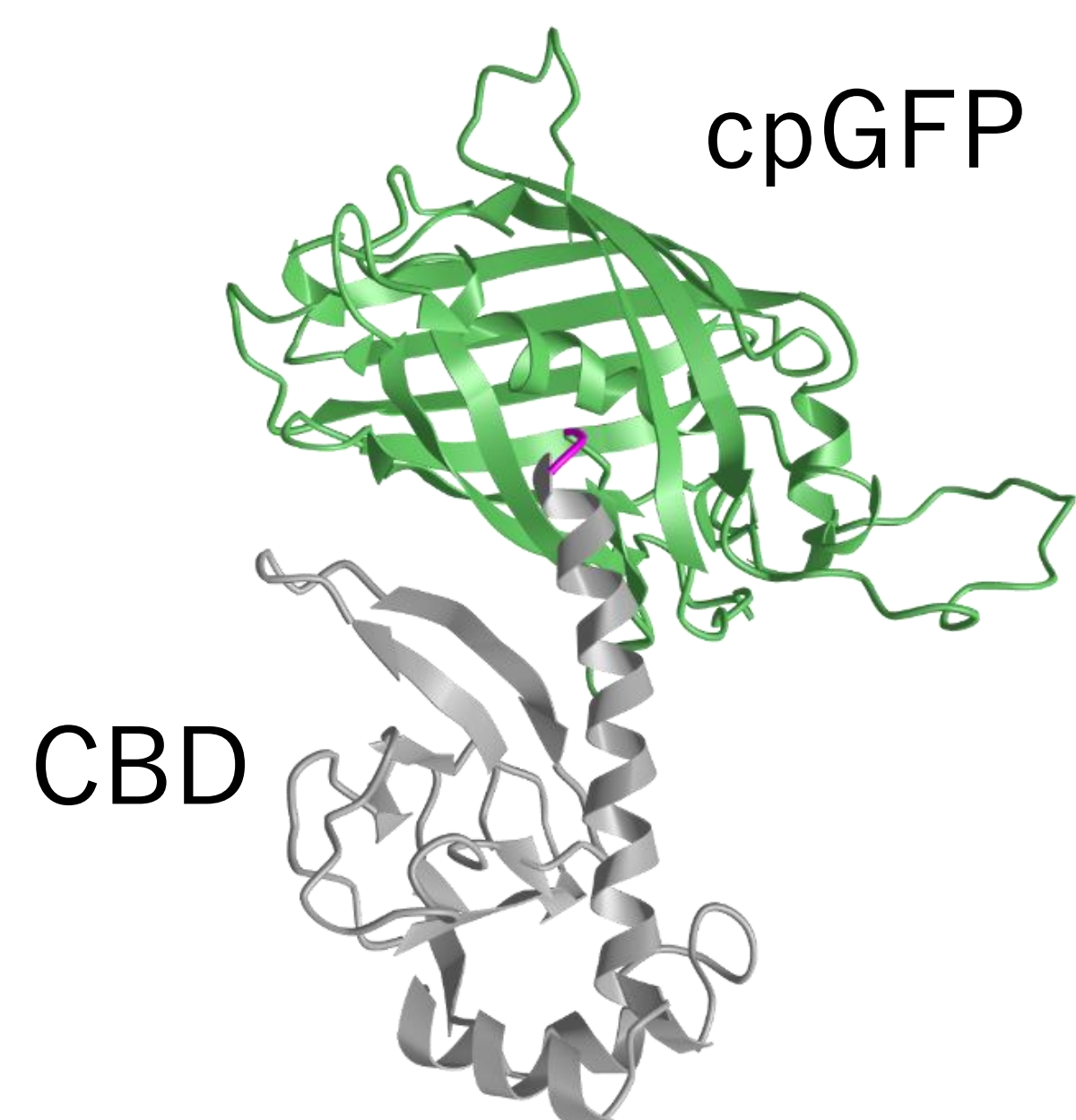
近年、生細胞におけるcAMP動態の理解は、飛躍的に発展してきている。細胞内において、cAMP動態は決して一様ではない。cAMP振動、cAMP勾配、cAMPナノドメインなどの動態が明らかになりつつある。cAMP振動やcAMP勾配は、神経細胞において重要な現象であるが、cAMPナノドメインは多くの細胞において重要な現象と考えられる。cAMPナノドメインとは、cAMPカスケード分子の局所空間におけるcAMP動態が重要であり、細胞全体のcAMP動態とは異なるというものである。このような、時空間的に特異的なcAMP動態は、生細胞リアルタイム解析によって明らかにすることができる。

細胞内cAMPナノドメインの概念図



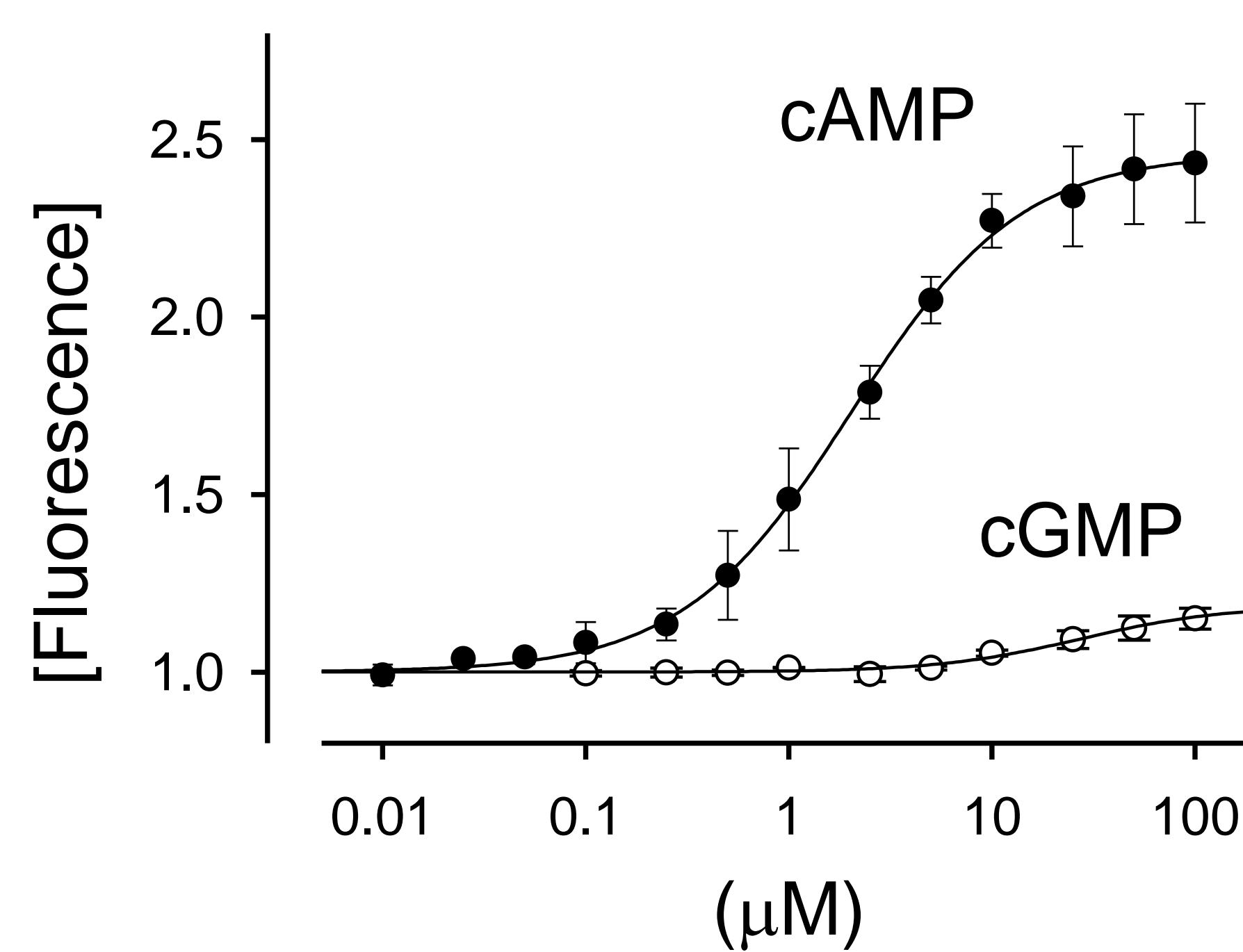
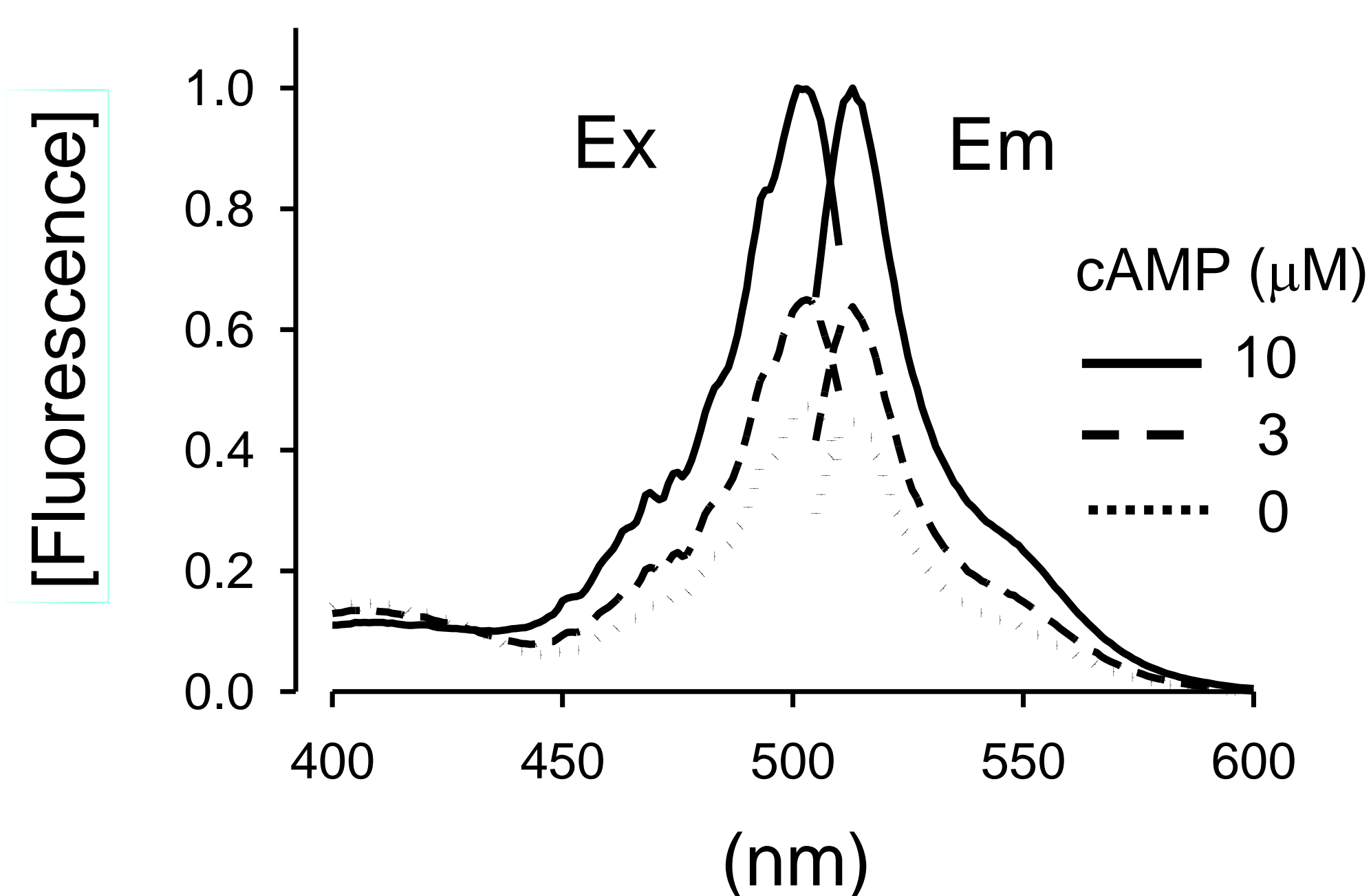
gCarviの概要

gCarvi CBD cpGFP



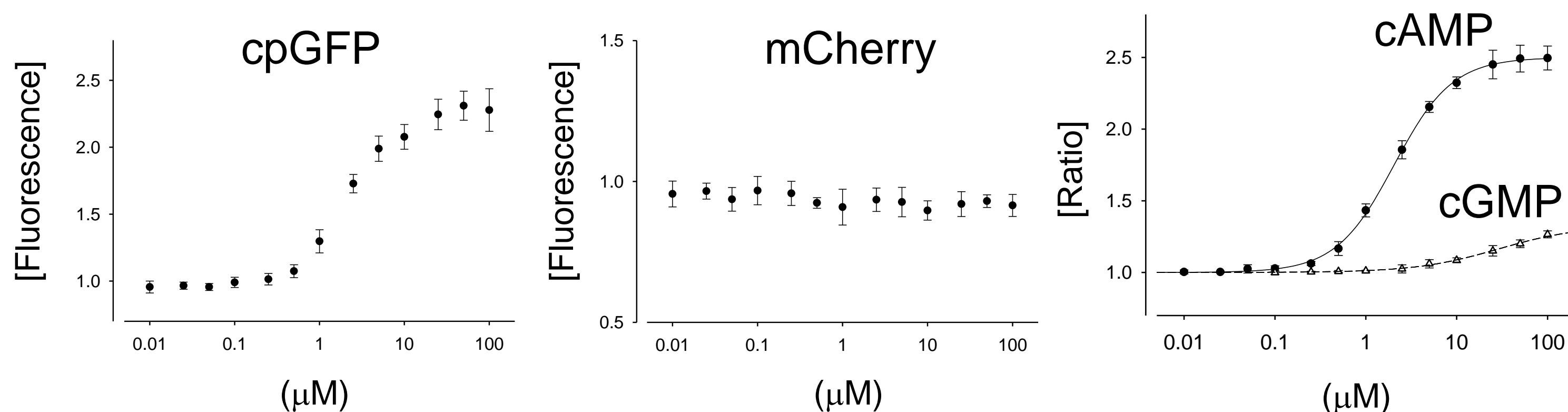
gCarviはcAMP結合領域であるCBDと円順列変異体GFPとの融合タンパク質である。

特願2021-019242



gCarviは青色光励起で緑色蛍光を発する。cGMPにはほぼ反応せず、100倍以上の特異性を持って、cAMP動態を解析できる。

Ratiometric gCarvi mCherry CBD cpGFP



定量的イメージングのため、レシオメトリック化も可能である。

cAMP定量化方法の比較

ELISA法を用いたcAMP定量キットは各社から販売されているが、細胞を溶解して測定するため、生細胞リアルタイム解析には用いることができない。Promega社からルシフェラーゼを利用したcAMP定量キットが発売されており、生細胞にも適用可能と謳っている。ただし、多くの細胞のcAMP基底濃度は0.8~4 μMであり、これらの生細胞に適用するには親和性が高すぎる。蛍光検出法が、生細胞をそのまま観察できるため、リアルタイム解析に適しているが、S/Nよくシグナルを取るためには高感度の検出システムが必要である。

	cAMP親和性	シグナル強度	操作	生細胞リアルタイム解析
ELISA法	nM	強	煩雑	×
ルシフェラーゼ検出法	nM	中	発光基質が必要	△
蛍光検出法	μM	弱~中	簡便	◎

gCarviの優位性

cGMPは多くの細胞が用いる、もう一つのサイクリックヌクレオチドであり、cAMPプローブがcGMPに反応することは望ましくない。gCarviは特異的にcAMP動態を解析できる、唯一のプローブである。また、結合解離キネティクスを解析しており、1秒以下の早い時間分解能を有する。

	Probe Type	cAMP ΔD.R.	Kd (μM)	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	cGMP ΔD.R.	Kd (μM)	cAMP/cGMP specificity
gCarvi	Intensity ↑	1.46	2.03	1.13 × 10⁶	2.19	0.19	27.4	104
cADDis	Intensity ↑↓	0.35	30	ND	ND	ND	ND	---
Flamindo2	Intensity ↓	3	3.2	ND	ND	3	22	7
Pink Flamindo	Intensity ↑	3.2	7.2	ND	ND	3.2	94	13
R-FlincA	Intensity ↑	8.6	0.3	ND	ND	5.2	6.6	37
EPAC2-camps	FRET	0.2	0.92	ND	ND	0.2	10.6	12
EPAC2-camps300	FRET	0.3	0.32	ND	ND	0.2	14	63
mICNBD-FRET	FRET	0.4	0.07	(2.5 × 10 ⁷)	(9.3)	0.25	0.5	12
CUTie	FRET	0.2	7.4	ND	ND	ND	ND	---
ICU3	FRET	1	30	ND	ND	ND	ND	---
Epac-SH ¹⁸⁷	FRET	1.64	4	ND	ND	ND	ND	---

gCarviの課題と用途

課題： gCarviをFLIPRに適用する上で、高感度の検出システムの開発を望む。

用途： これまで、核、細胞膜、シナプス前末端にターゲットするgCarviを作製した。同様に、解析を行いたい部位や分子周辺の局所cAMP動態の要望があれば、対応するgCarviコンストラクトを作製することで、創薬など多様なニーズに対応していきたい。

