

# 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

## ■ 概要

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、緑色蛍光を用いてcAMP動態を可視化できる蛍光プローブ“gCarvi”を開発した。本プローブは生きた細胞で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の時空間的な動的挙動を評価することが可能である。

## ■ 活用例

Gタンパク質共役受容体(GPCR)等を標的とした創薬研究や細胞の機能解析研究において、生細胞を用いたcAMPのリアルタイムイメージングに活用でき、cAMP動態を指標としたドラッグスクリーニングや薬理的な評価ができるツールとして有用である。

# 生細胞におけるcAMP動態の理解

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。

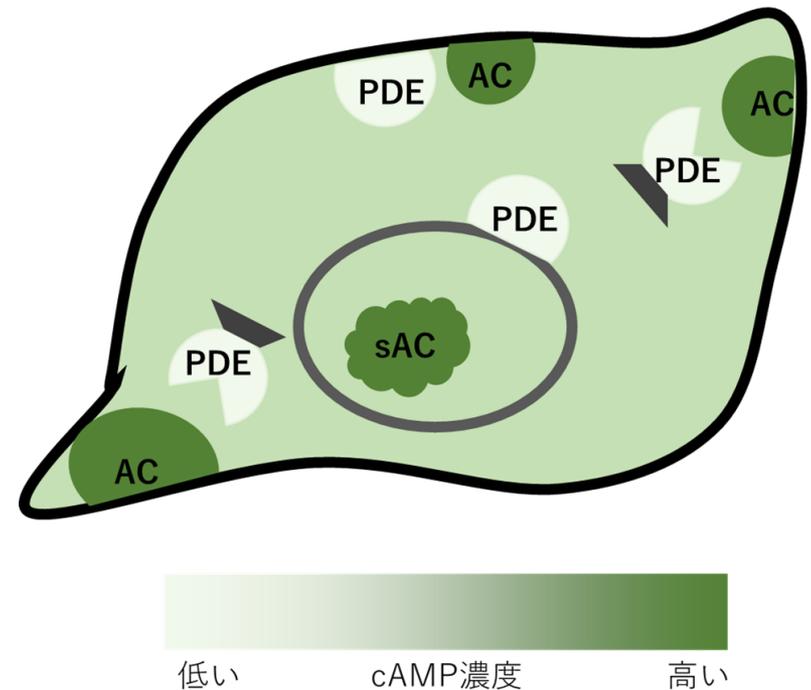
細胞内において、cAMP動態は決して一様ではなく、cAMP振動、cAMP勾配、cAMPナノドメインなどの動態が明らかになりつつある。

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。

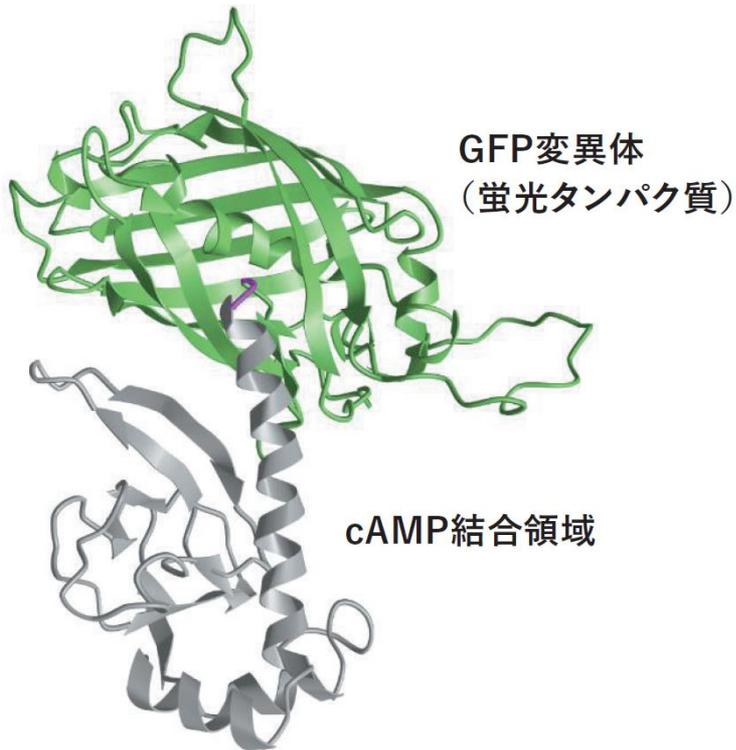
このような、時空間的に特異的なcAMP動態は、生細胞リアルタイム解析によって明らかにすることができる。

細胞内cAMPナノドメインの概念図



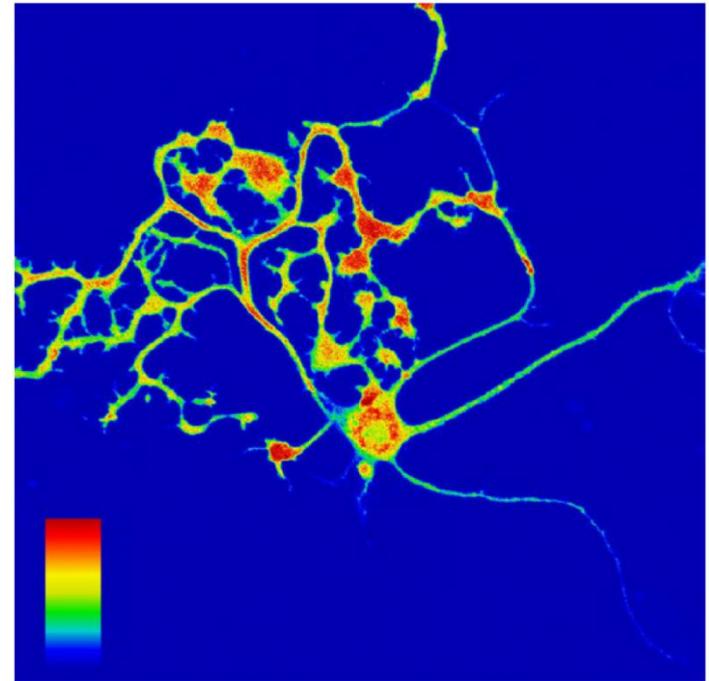
# gCarviの概要

## cAMP蛍光指示薬gCarviの予想立体構造



cAMP緑色蛍光プローブ "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。

## gCarviを発現した培養プルキンエ細胞



蛍光の強弱から細胞内のcAMP濃度を特異的に可視化できる。\_gCarviはcGMPには反応せず、特異的にcAMP動態を解析できる、唯一のプローブである。

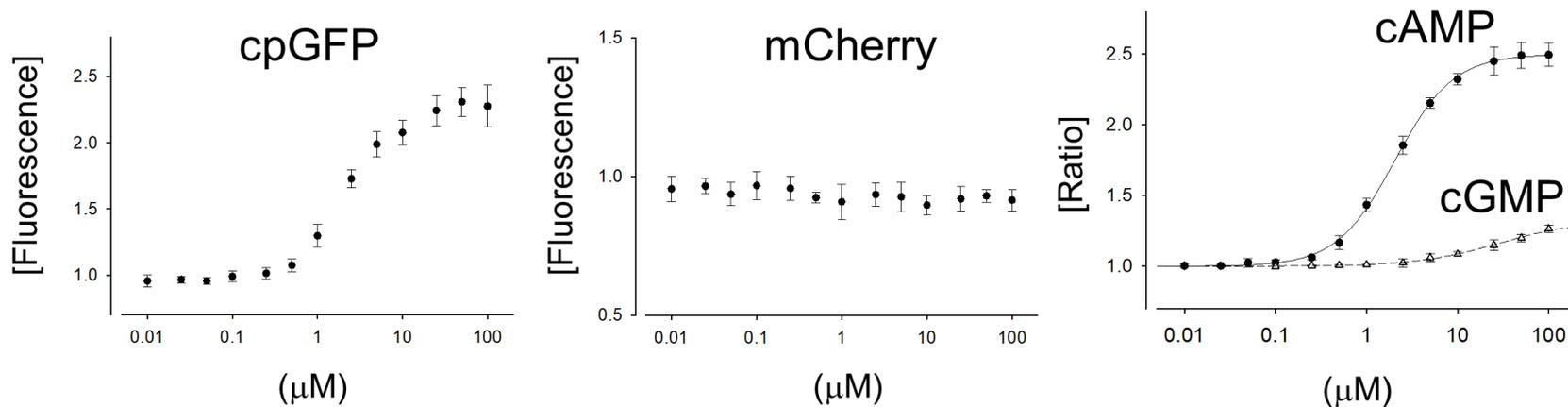
# gCarviの概要

Ratiometric  
gCarvi

mCherry

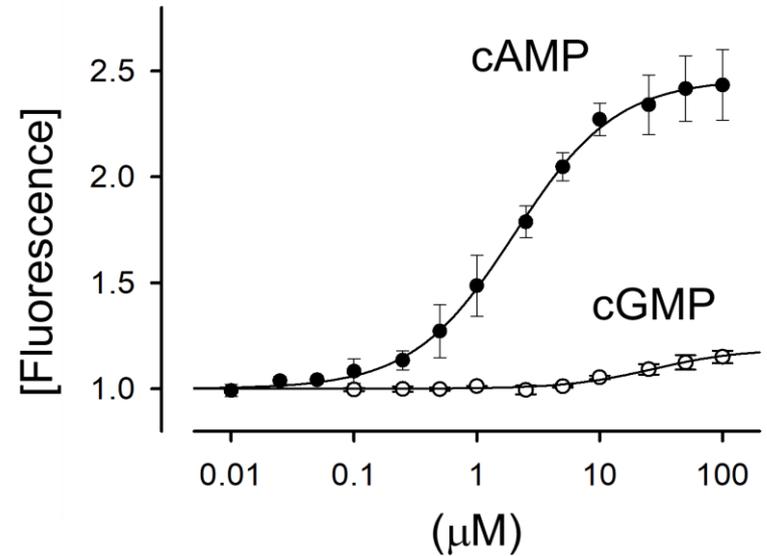
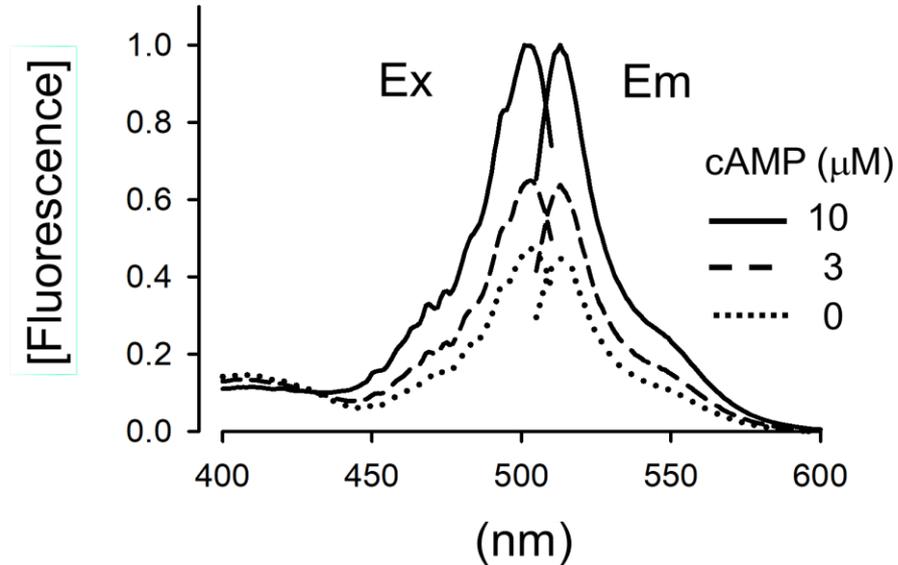
CBD

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。

# gCarviの概要



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。

# cAMP定量化方法の比較

	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	$\mu\text{M}$	弱～中	簡便	◎

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 mM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。

# gCarviの優位性

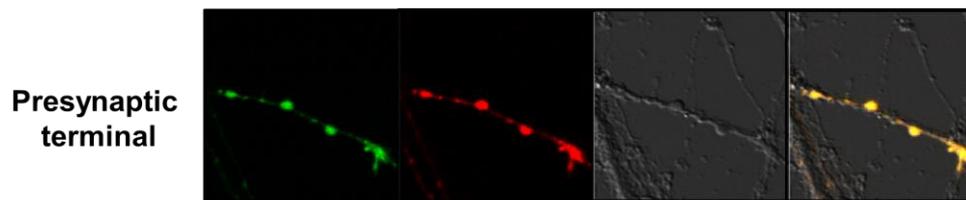
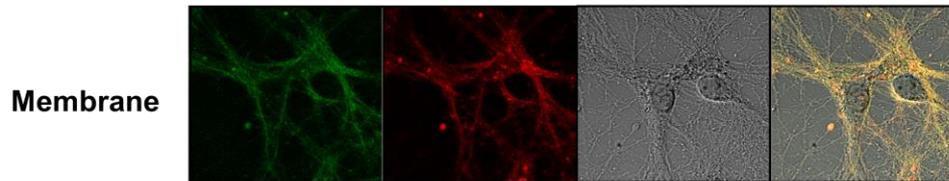
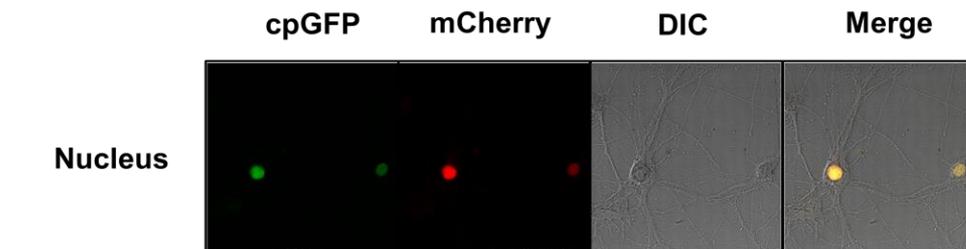
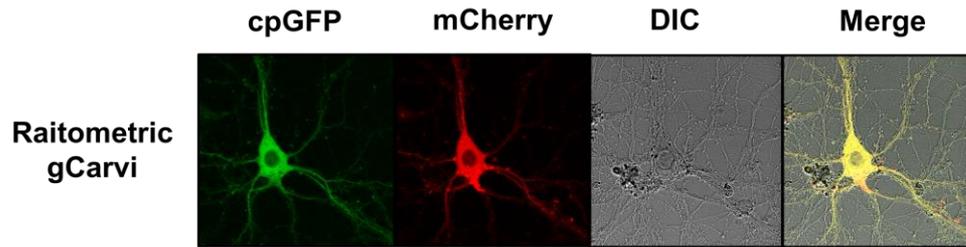
	Probe Type	cAMP $\Delta$ D.R.	Kd ( $\mu$ M)	Kon ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Koff ( $s^{-1}$ )	cGMP $\Delta$ D.R.	Kd ( $\mu$ M)	cAMP/cGMP specificity
<b>gCarvi</b>	<b>Intensity <math>\uparrow</math></b>	<b>1.46</b>	<b>2.03</b>	<b><math>1.13 \times 10^6</math></b>	<b>2.19</b>	<b>0.19</b>	<b>27.4</b>	<b>104</b>
cADDIs	Intensity $\uparrow\downarrow$	0.35	30	ND	ND	ND	ND	---
Flamindo2	Intensity $\downarrow$	3	3.2	ND	ND	3	22	7
Pink Flamindo	Intensity $\uparrow$	3.2	7.2	ND	ND	3.2	94	13
R-Flinca	Intensity $\uparrow$	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	$(2.5 \times 10^7)$	$(9.3)$	0.25	0.5	12
CUTie	FRET	0.2	7.4	ND	ND	ND	ND	---
ICU3	FRET	1	30	ND	ND	ND	ND	---
Epac-S <sup>H187</sup>	FRET	1.64	4	ND	ND	ND	ND	---

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。

# 今後の展望



Hippocampal culture

Scale bar =20  $\mu$ m

- gCarviをFLIPRに適用するための高感度の検出システムの開発。

- 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。今後、解析を行いたい部位や分子周辺の局所cAMP動態の要望に応じてgCarviコンストラクトを作製する。

→ 創薬など多様なニーズに対応