

〔原著〕

細胞質型イノシトール三リン酸 (IP₃) バイオセンサー “cLIBRAvIIS” を用いた唾液腺腺房細胞のIP₃測定法の開発

根津 顕弘, 森田 貴雄, 谷村 明彦

北海道医療大学歯学部薬理学分野

Development of a method for measurement of intracellular IP₃ concentrations in salivary acinar cells using the cytosolic type IP₃-biosensor “cLIBRAvIIS”.

Akihiro NEZU, Takao MORITA, Akihiko TANIMURA

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Inositol 1, 4, 5-trisphosphate, salivary acinar cells, IP₃-biosensor, Measurement method for IP₃

Abstract

We examined agonist-induced changes in cytosolic concentrations of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) in rat salivary acinar cells using the cytosolic IP₃-biosensor “cLIBRAvIIS”, containing a histidine tag. We constructed a cLIBRAvIIS-expressing plasmid vector, and transfected this plasmid into COS-7 cells. Fluorescent proteins were collected by TALON® beads in cytosolic proteins from cLIBRAvIIS-transfected cells. To evaluate the binding properties with IP₃ on purified cLIBRAvIIS, IP₃-induced changes in the fluorescence ratio (Ratio) were measured using an imaging system and a microplate reader. Various concentrations of IP₃ (0.003–30 μM) induced elevations in the Ratio in a

concentration-dependent manner (K_d value : 66 nM), indicating that purified cLIBRAvIIS has a sufficient binding function as an IP₃-biosensor. We then attempted to inject purified cLIBRAvIIS into rat parotid acinar cells using a micro-electroporation system, and observed fluorescence in approximately 12% of acinar cells. When cLIBRAvIIS-injected acinar cells were stimulated with carbachol (100 μM), a muscarinic acetylcholine receptor agonist, sustained elevations in the Ratio were observed during the stimulation. Our results show that purified cLIBRAvIIS would be a useful tool in the monitoring of changes in IP₃ in isolated living cells.

緒 論

α₁アドレナリン受容体やM₃ムスカリン受容体などのGタンパク質共役型受容体の活性化は、G_{q/11}タンパク質を介してホスリパーゼCを活性化し、ホスファチジルイノシトール4,5二リン酸の加水分解によってイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP₃) を産生する (Berridge, 1993). IP₃は細胞内Ca²⁺チャネルであるIP₃受容体を活性化することにより細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出を調節する重要な情報伝達分子である. Ca²⁺は様々な細胞反応を制

御する細胞内メッセンジャーで、細胞増殖やエネルギー産生、アポトーシス、分泌などの細胞機能の調節に関わっており (Berridge et al., 2000), 唾液腺腺房細胞ではIP₃産生系を介するCa²⁺放出が水分分泌に必要なイオンチャネル (Cl⁻やK⁺チャネル) の開口を起し、その後活性化されるイオントランスポーター (Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体やNa⁺/H⁺交換体等) の機能調節に重要な役割を果たすと考えられている (Ambudkar, 2014).

このような細胞内Ca²⁺シグナルに関する研究は、fura-2に代表されるCa²⁺プローブの開発によって急速に発達

した (Grynkiewicz et al., 1985). また, 高速かつ高解像度なイメージング技術の発達によって細胞内の Ca^{2+} 応答をリアルタイムで可視化することが可能となり, 様々な細胞で複雑なパターンをもった Ca^{2+} シグナルが発生することが明らかとなってきた. 唾液腺腺房細胞では腺腔側から始まった Ca^{2+} 上昇が基底膜まで波のように変化する Ca^{2+} ウェーブや, 腺腔側で Ca^{2+} 濃度が周期的に上下に振動する Ca^{2+} オシレーションが報告されている (Tojyo et al., 1997, 1998, Bruce et al., 2002, Nezu et al., 2002, Harmer et al., 2005).

一方で IP_3 濃度測定法は, 放射性同位元素を使った $[\text{H}]$ -D-ミオイノシトールの代謝で生成された IP_3 を陰イオン交換カラムや高速液体クロマトグラフィーを使って分離・定量する方法や IP_3 結合タンパク質を使ったバインディングアッセイが使われてきた. しかし Ca^{2+} ウェーブや Ca^{2+} オシレーションに代表される時間・空間的に制御された Ca^{2+} 応答と IP_3 濃度変化との関係を明らかにするには, 単一細胞レベルでの細胞内 IP_3 濃度変化の測定が可能な蛍光センサーが必要である.

IP_3 受容体は IP_3 に高い選択性をもつ天然の IP_3 センサーであり, その構造のアミノ末端側の 1 から 604 番までのアミノ酸からなる領域が IP_3 結合部位と考えられている (Yoshikawa et al., 1996). 我々は type 3 IP_3 受容体のリガンド結合部位の両端に GFP の変異体である CFP と YFP を結合させた最初の IP_3 バイオセンサー “LIBRA” シリズを開発した (Tanimura et al., 2004). LIBRA は蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 技術を利用したバイオセンサーで, IP_3 の結合に伴うリガンド結合部位の構造変化により FRET 効率が変化し, CFP と YFP の蛍光比 (Ratio) 変化を起こすと考えられている. その後, type I IP_3 受容体のリガンド結合部位の一部を使った IP_3 センサー “Fretino” (Sato et al., 2005) や “IRIS” (Matsu-ura et al., 2006) が発表され, FRET 型蛍光プローブの有効性が確認されている. “LIBRA” シリズはセンサータンパク質の IP_3 に対するキャリブレーションを可能にするために細胞膜局在シグナル (GAP43) が付加されている膜発現型 IP_3 センサーである (Tanimura et al., 2004). 我々はこの LIBRA の特徴を利用して細胞内 IP_3 濃度を算定し, Ca^{2+} オシレーションによって起こる IP_3 オシレーションの定量的解析に成功した (Tanimura et al., 2009).

一方, “LIBRA” シリズを含む IP_3 センサーは, 遺伝子を目的細胞に導入することでセンサータンパク質を細胞に発現させて利用する. しかし唾液腺細胞は分泌機能や細胞極性を維持したまま長期間培養することが難しいことからプラスミドによる IP_3 センサーの発現は困難で

ある. このような細胞の場合, マイクロインジェクションやエレクトロポレーション法によりセンサータンパク質を直接注入する必要がある.

本研究では, この “LIBRA” シリズを基に細胞質に発現する高感度 IP_3 センサー “cLIBRAvIIS” を作成し, これが IP_3 センサーとして機能することを確認した. さらに, この cLIBRAvIIS を耳下腺腺房細胞に注入することで, 受容体刺激を介した細胞レベルの IP_3 動態をリアルタイムで測定することに成功したので報告する.

方 法

1) 緩衝液

Equivalent wash buffer (EWB, 50 mM Na_3PO_4 , 6 M 塩酸グアネチジン, 300 mM NaCl, 25 mM イミダゾール, pH 7), Equivalent buffer (EB, 50 mM Na_3PO_4 , 6 M 塩酸グアネチジン, 300 mM NaCl, pH 7), Elution buffer (ELB, 50 mM Na_3PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, pH 7), Intracellular-like medium (ICM, 123 mM KCl, 19 mM NaCl, 10 mM HEPES-KOH, 1 mM EGTA, 330 μM CaCl_2 , pH 7.3), Hanks balanced salt solution (HBSS-H, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 0.41 mM MgSO_4 , 0.49 mM MgCl_2 , 0.34 mM Na_2HPO_4 リン酸水素二ナトリウム, 0.44 mM KH_2SO_4 , 5.5 mM グルコース, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4)

2) 細胞質発現型 IP_3 バイオセンサー “cLIBRAvIIS” 発現ベクターの作成

図1に細胞質発現型 IP_3 バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の作成の手順を示す. 小胞体 (ER) 局在シグナル, ヒスチジンタグ (His-tag), Cerulean および type 3 IP_3 受容体の一部 (1-45 番目のアミノ酸) の融合した cDNA 配列を合成し (GenScript Corp., Piscataway, NJ, USA), 制限酵素 NheI および PpuMI で処理した (図1A). 切り出された断片を, 同じ酵素を用いて我々の開発した LIBRAvIII 発現プラスミド (図1B, Tanimura et al., 2009) から GAP43, CFP および IP_3 受容体の一部を含む配列をプラスミドから切断した部位に挿入し合成 LIBRAvIII を作成した (図1C). 合成 LIBRAvIII (図1C) を SacI で処理し, ER 局在シグナルを除去した (図1D). LIBRAvIIS 発現プラスミド (図1E, Tanimura et al., 2009) のリガンド結合部位を BssHII および NotI で処理し, 切り出された配列を同じ酵素で切り出した His-tag 付き細胞質発現型 LIBRAvIII (図1D) から切断した部位に挿入した (図1F).

3) 細胞培養

COS-7細胞はRIKEN Cell Bank（東京）から入手した。グルコース（1000 mg/l）、10%牛胎児血清、L-グルタミン（584 mg/l）、ピルビン酸ナトリウム（110 mg/l）、ペニシリン（100 units/mL）およびストレプトマイシン（100 μ g/mL）を含むDulbecco's modified Eagles's medium（全てThermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA）中にて37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で維持されたインキュベータ内にて培養した。

4) TALON®ビーズを用いたcLIBRAvIISの分離

80%コンフルエントのCOS-7細胞に、10 cmカルチャーディッシュ当たり1.5 μ g/mLのcLIBRAvIIS発現プラスミドと4 μ L/mLのLipofectamine 2000（Thermo Fisher Scientific社）含むOpti-MEM（Thermo Fisher Scientific Inc.）を5 mL加えて、2日間遺伝子を発現させた。通常は1回の精製に3枚の10 cmカルチャーディッシュを用いた。1 mM EDTAを加えたCa²⁺とMg²⁺を含まないDulbecco's Phosphate-Buffered Saline（Thermo Fisher Scientific Inc.）の20分間処理によりcLIBRAvIISを発現させた

COS-7細胞を浮遊させ、タンパク質低吸着チューブ（プロテオセーブSS、住友ベークライト株式会社、東京）中で4 $^{\circ}$ C、700 \times g、2分間遠心分離し、Equivalent wash buffer（EWB）で2回洗浄した。洗浄後、250 μ L/mL（w/v）サポニン（ICN,Cleveland, OH, USA）を含むEWB中で再懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで20分間細胞を処理した。サポニン処理した細胞を4 $^{\circ}$ C、2500 \times g、30分間遠心分離後、上清をタンパク質吸着制御サンプリングチューブ（ザルスタット株式会社、東京）に採取した。採取した上清に150 μ LのTALON®ビーズ（タカラバイオ株式会社、滋賀）のスラリーを添加し、4 $^{\circ}$ Cで12時間インキュベートによりcLIBRAvIISタンパク質をビーズに吸着させた。cLIBRAvIISを吸着させたビーズはEquivalent buffer（EB）を用いて、4 $^{\circ}$ Cで2500 \times g、5分間遠心分離により2回洗浄し、実験に用いるまで4 $^{\circ}$ Cで保存した。

5) cLIBRAvIISタンパク質の精製

cLIBRAvIISが吸着したビーズをEWB中で4 $^{\circ}$ C、5000

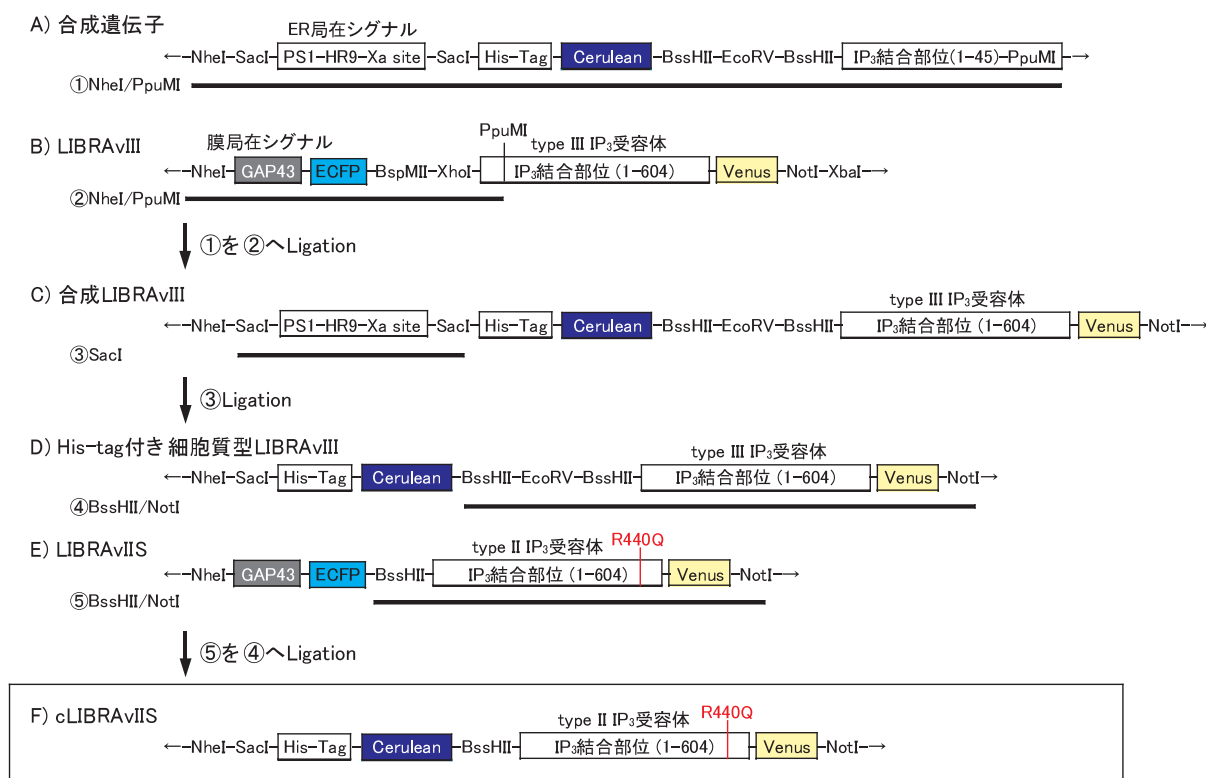


図1. 細胞質発現型IP₃バイオセンサー“cLIBRAvIIS”の作成

制限酵素を用いたcLIBRAvIISプラスミド作成は方法に示した。A) GenScript社に依頼して作成した合成cDNAの構造。B) 膜発現型LIBRAvIII。C) A) およびB) の制限酵素処理（NheIおよびPpuMI）により作成した合成LIBRAvIII。D) SacI処理により小胞体（ER）局在シグナルを除いたHis-tag付き細胞質型LIBRAvIII。E) 膜発現型LIBRAvIIS。F) D) およびE) の制限酵素処理（BssHIIおよびNotI）によって作成された細胞質発現型IP₃バイオセンサー“cLIBRAvIIS”。cLIBRAvIISは、ヒスチジンタグ（His-Tag）、Cerulean、IP₃受容体type IIの440番目のアルギニン（R）をグルタミン（Q）に置換したりガンド結合部位およびVenusで構成される。IP₃受容体のリガンド結合部位の変異（R440Q）によって、リガンド結合部位のIP₃に対する感受性を向上させた。

×gで5分間の遠心分離により2回洗浄後、Elution buffer (ELB) で4℃、1時間処理し、4℃、12000×gで10分間の遠心分離後、上清を回収して実験に使用した。採取したサンプル中のタンパク質濃度をQubit® Protein Assay kitを用いて、Qubit 2.0 fluorometer (全て Thermo Fisher Scientific Inc.) にて測定し実験に用いた。

培養細胞、ビーズおよび精製タンパク質溶液の蛍光は、Blue-LEDユニット (励起波長、440–500 nm) を搭載した可視光LED搭載光源装置 (ビジレイズ、アトー株式会社、東京) によって励起された蛍光をライトキャプチャーII (アトー株式会社) により検出した。

6) cLIBRAvIISの機能解析

(1) Talon®ビーズに吸着したcLIBRAvIISの機能解析

ビーズに吸着したcLIBRAvIISのIP₃に対する機能解析は、IP₃バイオセンサーを用いた測定法に従って行った (Nezu et al., 2006, 2010)。cLIBRAvIISの吸着したビーズをCell Takでコートした7×7mmのプラスチックシリンダーとカバーガラスで構成された測定用チャンバーに固着した。ビーズをintracellular-like medium (ICM) で洗浄後、様々な濃度のIP₃ (0.003–30 μM) を含むICMを添加した。吸引器を測定用チャンバーに固定し、チャンバー内の溶液量をおよそ200 μLになるように調整した。溶液交換は800 μLの新しい溶液を加えることで2秒以内に交換した。

IP₃添加によるcLIBRAvIISの蛍光はS Fluor40油浸対物レンズを装着したEclipse TE300型倒立顕微鏡 (全てニコン株式会社、東京) で構成されたAQUACOSMOS/ASHURAシステム (浜松ホトニクス株式会社、浜松) にて測定した。cLIBRAvIISを吸着させたビーズは430 nmの励起光を照射し、得られたCFPシグナル (420–500 nm) をC channel, YFPシグナル (500–565 nm) をY channelで測定し、蛍光比画像 (Ratio, C/Y channel) を作成した。全ての実験は室温で行った。

(2) 精製cLIBRAvIISの機能解析

精製cLIBRAvIISのIP₃に対する反応性は、マイクロプレートリーダー (Infinit F2000, TECAN Trading AG, Seestrasse, スイス) を用いて行った。1ウェルあたりに45 μLの精製タンパク質 (500 μg/mL) をガラスボトム製384ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) に入れ、そこに5 μLのIP₃溶液を加えピペッティングにより穏やかに混和した。プレート下面より430 nmの励起光を照射し、480および535 nmの蛍光を同時に測定した。

得られた蛍光強度から蛍光比 (Ratio: 480/535 nm) を計算し、IP₃に対するcLIBRAvIISの蛍光比変化を算出した。全ての実験は室温で行った。

7) ラット単離耳下腺腺房細胞の調製

ラット耳下腺腺房細胞はウィスターST系雄性ラット (300–400 g, 三共ラボサービス株式会社) からトリプシンとコラゲナーゼを用いた方法にて調製した (Nezu et al., 2002)。単離した腺房細胞は最終的に0.1% BSAを含むHBSS-H (200 μM, Sigma-Aldrich Corp. LLC, St. Louis, MO, USA) 中に懸濁し、実験に用いるまで室温で保存した。

動物実験は「北海道医療大学動物実験規定」に基づき、「北海道医療大学動物実験委員会」の審査を経て、北海道医療大学長の承認を得て行った (承認番号: 第042号)。

8) cLIBRAvIISの耳下腺腺房細胞への導入

精製したcLIBRAvIISの耳下腺腺房細胞への導入はマイクロエレクトロポレーターシステム (Microporator, MP-100, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、製品のプロトコルに従って行った。1匹のラットから調製した腺房細胞の全量の1/5を採取し、700×gで2分間遠心分離を行い上清は廃棄した。腺房細胞に144 μLのSolution R (Thermo Fisher Scientific Inc.) と120 μLの精製cLIBRAvIIS溶液 (1 mg/mL) を混和し、1500V, 20 msecで2回の電圧を加え腺房細胞へcLIBRAvIISタンパク質を導入した。

9) cLIBRAvIISを用いた細胞内IP₃濃度変化のリアルタイム測定

cLIBRAvIISタンパク質を導入したCOS-7細胞と腺房細胞における細胞内IP₃動態のリアルタイム測定は、S Fluor40油浸対物レンズを装着したEclipse TE300型倒立顕微鏡 (全てニコン株式会社) で構成されたAQUACOSMOS/ASHURAシステム (浜松ホトニクス株式会社) にて測定した。cLIBRAvIIS導入した細胞に430 nmの励起光を照射し、得られたCFPシグナル (420–500 nm) をC channel, YFPシグナル (500–565 nm) をY channelで測定し、Ratio画像 (C/Y channel) 作成した。全ての実験は室温で行った。

測定用チャンバー内で培養したCOS-7細胞あるいはCell Takで測定用チャンバーに固着した腺房細胞に様々な試薬を溶解したHBSS-Hを添加して測定した。いくつかの実験では、COS-7細胞あるいは腺房細胞をICMで洗

浄し、その後200 μM β -エスチン (Sigma-Aldrich Corp. LLC) 処理により細胞膜を穿孔した後、高濃度 IP_3 (10–30 μM) を含むICMを添加した。

10) データ解析

全ての結果は3例以上の異なる実験から得られた平均値および標準誤差 (means \pm SEM) として示した。K_d値およびHill係数 (n) は、Sigmaplot (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) を用いて解析した。

結 果

細胞質発現型 IP_3 バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の作成と機能解析

図1Fに作成した細胞質発現型 IP_3 バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の構造を示す。 IP_3 センサー “LIBRAvIII” (Tanimura et al., 2009) は、ラット IP_3 受容体type IIIの IP_3 結合部位 (1–604番目のアミノ酸) をECFPとYFPの変異体 (Venus) で挟み込み、CFP側に細胞膜局在シグナル (GAP43) を有するため細胞膜に発現する。本研究では精製した IP_3 バイオセンサーを使用するために、LIBRAvIIIのGAP43を精製用のヒスチジンタグ (His-tag) に置換した。またFRET効率を向上させるためにCFPをCFP変異体のCerulean (Rizzo et al., 2004) に置換した。さらにLIBRAvIIIのリガンド結合部位を IP_3 に対する感受性を向上させたLIBRAvIIS (Tanimura et al.,

2009) のものと置換した。

cLIBRAvIIS発現プラスミドをCOS-7細胞に導入すると、細胞質全体に435 nmの励起波長によって生じる蛍光シグナルが観察された (図2Aa)。cLIBRAvIIS発現細胞をATP (100 μM) で刺激すると蛍光タンパク質の蛍光比が上昇し、ATPを洗浄すると安静時レベルまで低下した。さらに β -エスチン (200 μM) 処理により分子サイズの大きな蛍光タンパク質をとどめたまま細胞膜を穿孔し、細胞内へ IP_3 (30 μM) を導入したところ、 IP_3 によりcLIBRAvIISの蛍光比の大きな上昇が観察された (図2A)。これらの結果から発現させたcLIBRAvIISが IP_3 に反応することが確認された。

細胞質に発現させたcLIBRAvIISを漏出させるため0.01%のサポニン処理により細胞膜を穿孔すると (Tanimura et al., 2004), cLIBRAvIISの蛍光が消失することが確認された (図2B)。His-tagでラベルされたcLIBRAvIIS (図2C) は、サポニンによる細胞膜穿孔により細胞外に漏出され、Talon®ビーズと特異的に結合する。cLIBRAvIIS発現細胞の細胞質と処理したビーズは435 nmの励起波長によりC channel (図3Aa) とY channel (data not shown) でも観察された。

cLIBRAvIISタンパク質の IP_3 バイオセンサー機能解析

COS-7細胞に発現したcLIBRAvIISタンパク質の機能を解析するため、細胞質に発現したcLIBRAvIISを単離

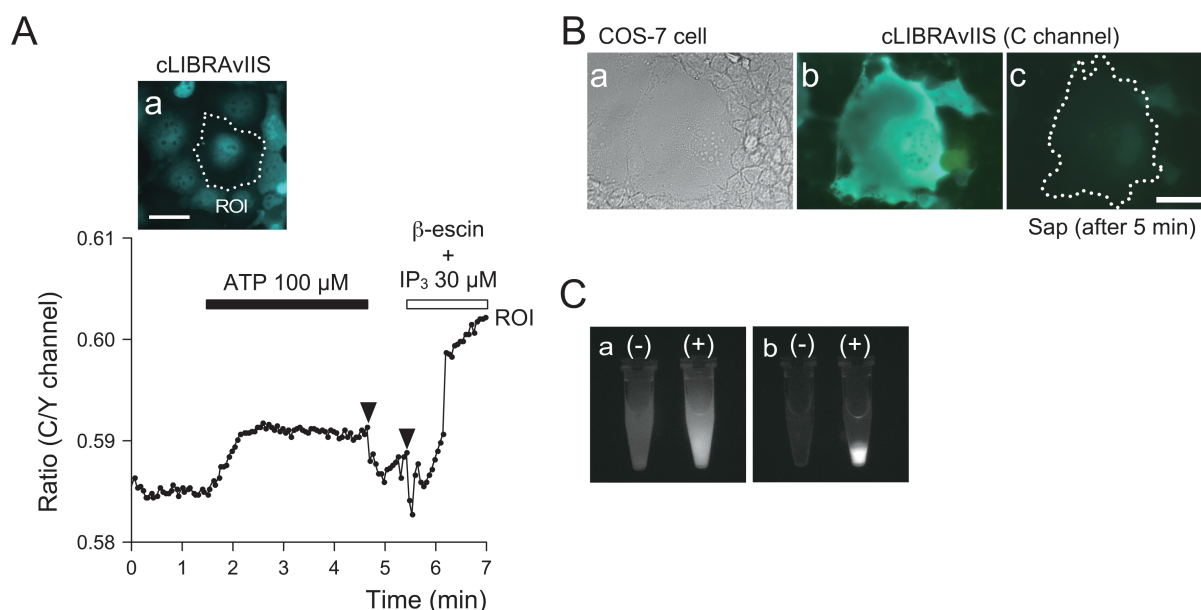


図2. 細胞質発現型 IP_3 バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の培養細胞への発現

A) cLIBRAvIISを用いたATP (100 μM) および β -エスチン処理 (200 μM) による膜穿孔後の IP_3 (30 μM) によるcLIBRAvIIS発現細胞 (ROI) の蛍光比 (Ratio) 変化。スケールバー: 20 μm 。B) COS-7細胞に発現したcLIBRAvIIS (b) と、サポニン (Sap) 穿孔処理5分の細胞内分布 (c)。C) (a) cLIBRAvIISプラスミド非導入 (-) および導入 (+) したCOS-7細胞。 (b) cLIBRAvIIS非発現細胞 (-) および発現細胞 (+) の細胞質溶液と処理したTalon®ビーズ。3例の異なるサンプルを用いて実験を行った。

し IP_3 に対する反応性を検討した。

図3はビーズに結合したcLIBRAvIIS蛍光比に対する IP_3 の作用である。cLIBRAvIIS蛍光比は IP_3 濃度に依存して上昇し、10 μM IP_3 で最大値に達した。 IP_3 の繰り返し添加で同等の上昇が観察された（図3A）。図3BはcLIBRAvIISの蛍光比に対する IP_3 の作用をまとめたもので、1日後（1day）のビーズでは IP_3 の K_d 値は9 nM、Hill係数（n）は0.897であった。4℃で1週間保存したビーズでも IP_3 に対する反応性は大きく変化しなかった（図3B, 1week, K_d 値：19 nM）が、冷凍したサンプルは IP_3 に対する反応性を消失した（data not shown）。

次に、ビーズから遊離させた精製cLIBRAvIISの蛍光比に対する IP_3 の反応性をマイクロプレートリーダーを用いて測定すると、その蛍光比は IP_3 濃度（0.003–30 μM ）に依存して上昇し、最大の蛍光比変化は30 μM IP_3 で観察された（図4A）。精製cLIBRAvIISにおいて、 IP_3 濃度に依存した蛍光比変化の範囲は0.017–0.042で（図4C）、cLIBRAvIISに対する IP_3 の K_d 値は66 nM、Hill係数（n）は1.609であった。精製cLIBRAvIISではビーズによる保存と異なり、1週間の保存で IP_3 に対する反応性が大きく低下した（図4B）。

さらに精製cLIBRAvIISの IP_3 に対する特異性を調べるため、他のイノシトールリン酸である4,5- IP_2 （ IP_2 ）および1,3,4,5- IP_4 （ IP_4 ）に対する反応性を検討した（図4C）。 IP_2 および IP_4 の K_d 値はそれぞれ1.6および3.4 μM で、cLIBRAvIISは IP_3 に対する特異性が高いセンサーであることが示された。

精製cLIBRAvIISを用いたラット耳下腺腺房細胞の IP_3 動態測定

唾液腺腺房細胞における受容体刺激を介した IP_3 動態を調べるため、精製cLIBRAvIISを用いて測定を試みた。図5Aは単離したラットの耳下腺腺房細胞の透過像（a）と蛍光像（b）である。

マイクロエレクトロポレーション法によってラットの耳下腺腺房細胞に精製cLIBRAvIISが導入され、蛍光が確認された（図5A）。この方法では、腺房細胞の約12%に蛍光が観察された。このcLIBRAvIIS導入細胞の細胞膜を β -エスチン（200 μM ）で穿孔し、 IP_3 （10 μM ）を添加すると蛍光比上昇が観察された。 IP_3 の繰り返し添加により同等の蛍光比上昇が観察されたことから（図5B）、腺房細胞に導入された蛍光タンパク質は IP_3 センサーとして機能することが確認された。さらにcLIBRAvIISを導入した耳下腺腺房細胞をムスカリン受容体作動薬のカルバコール（CCh, 100 μM ）で刺激したところ蛍光比上昇が観察され、この上昇はCCh添加後およそ1分で最大値に達し、CChを除くまで持続した（図5C）。このことからマイクロエレクトロポレーションでcLIBRAvIISを導入細胞が受容体による反応性を維持していることが示された。

考 察

今回我々は、細胞質発現型 IP_3 バイオセンサー“cLIBRAvIIS”を開発し、この IP_3 センサーの細胞内導入により耳下腺腺房細胞の IP_3 濃度変化のリアルタイム測定に成功した。

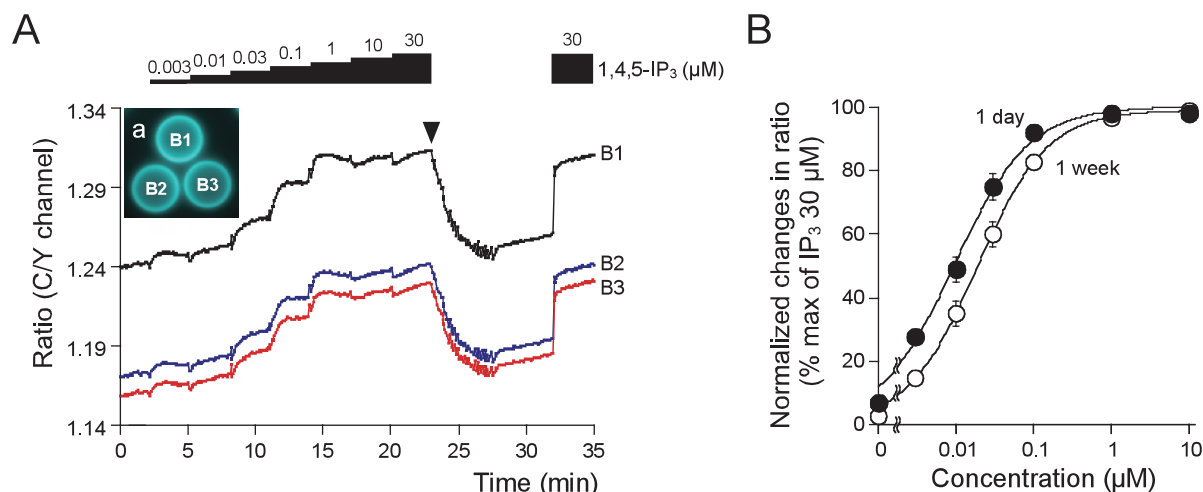


図3. 蛍光タンパク質の IP_3 に対する反応性

A) イメージングシステムを用いた IP_3 によるcLIBRAvIIS結合ビーズの蛍光比（Ratio）変化。（a）cLIBRAvIISの吸着したビーズの蛍光顕微鏡像。測定用チャンバーに固着したビーズに様々な濃度の IP_3 （0.003–30 μM ）を処理し、その蛍光比変化を測定した。B) cLIBRAvIIS吸着後1日後および7日後のビーズにおける IP_3 （0.003–30 μM ）に対する反応。Mean \pm SE, 4–7例の異なるサンプルを用いて実験を行った。

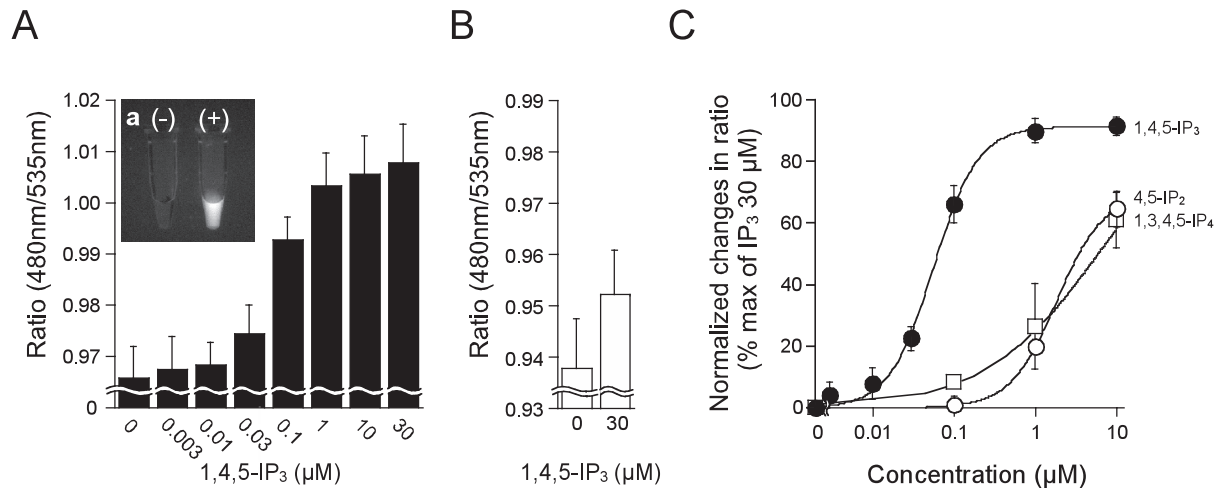


図4. 精製cLIBRAvIISタンパク質のIP₃-バイオセンサー機能解析

A) マイクロプレートリーダーを用いた精製cLIBRAvIISタンパク質のIP₃に対する反応性. (a) cLIBRAvIIS非発現細胞 (-) および発現細胞 (+) から調製したビーズをELB処理した後の上清. 精製cLIBRAvIISタンパク質溶液と様々な濃度のIP₃ (0.003–30 μM) を混和し, その蛍光比 (Ratio) を算出した. B) 精製1週間後のcLIBRAvIISのIP₃に対する反応性. ビーズから精製cLIBRAvIISを4℃にて1週間保存したサンプルを高濃度IP₃ (30 μM) と処理した時の蛍光比変化. C) 精製cLIBRAvIISに対するIP₃とその他のイノシトールリン酸 (4,5-IP₂および1,3,4,5-IP₄) によるRatio変化. IP₃ 30 μMを最大反応とした時の蛍光比変化. Mean ± SE, 3–4例の異なるサンプルを用いて測定した.

IP₃に対する特異性が高く, 蛍光比測定が可能な利点をもつIP₃受容体のリガンド結合ドメインを利用したFRET型プローブの“LIBRA”シリーズを改変した細胞質型cLIBRAvIISは, IP₃に対するK_d値が66 nMと, 他のイノシトールリン酸よりも25–50倍以上の親和性を有するIP₃センサーであった (図4). 加えて, ビーズに吸着した状態の保存で採取後に比較的長期の保存が可能で (図3), 一旦調製すると1週間以内であればIP₃センサーをビーズから精製し使用することが可能であることが明らかになった.

これまでに“LIBRA”シリーズを用いた実験により, 培養細胞では50–100 nMの細胞内IP₃濃度 ([IP₃]_i) でCa²⁺応答が惹起されると考えられている (Tanimura et al., 2009, Nezu et al., 2010). また耳下腺腺房細胞では500nM caged IP₃の光分解で生じる200 nM程度のIP₃濃度でCa²⁺応答が惹起される (Tanimura et al., 1998) ことから, cLIBRAvIISはこれらのIP₃濃度の測定に使用可能である.

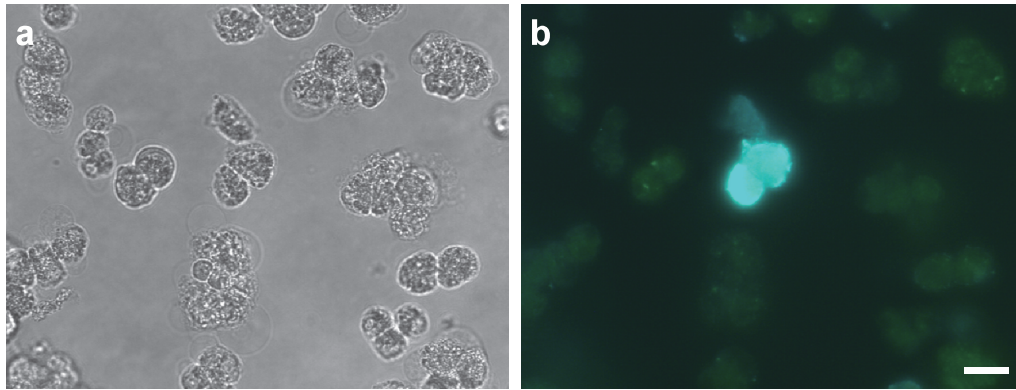
このcLIBRAvIISをマイクロエレクトロポレーションで導入することによって, ムスカリン受容体刺激による唾液腺腺房細胞の細胞内IP₃動態のリアルタイムモニターに初めて成功した (図5C). CCh刺激 (100 μM) は腺房細胞の持続的なIP₃上昇を起し, その反応は薬物洗浄で速やかに安静時レベルに低下する変化パターンを示した. これは高濃度 (100 μM) のAChやATP刺激による培養細胞 (SH-SY5YおよびCOS-7細胞) の反応とよく一致した (Tanimura et al., 2004, 2009, Nezu et al.,

2010). 唾液腺由来の培養細胞であるHSY-EA1細胞では3–30 μM ATPで周期的なIP₃濃度の上昇と下降するIP₃オシレーションが観察される (Tanimura et al., 2009). 一方で耳下腺腺房細胞では, 100 μM CCh刺激でIP₃オシレーションは惹起されなかった.

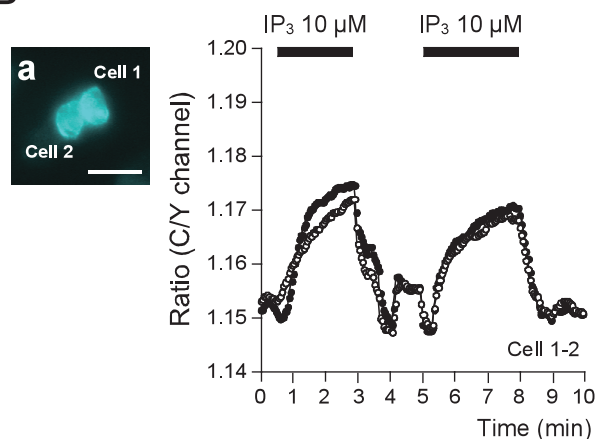
耳下腺腺房細胞において, 高濃度のCCh刺激はCa²⁺ウェーブを起し, この時CChによってCa²⁺濃度は約2秒で最大値に達する速いCa²⁺応答を起す (Tojyo et al., 1997, Nezu et al., 2002). 一方で同程度のCCh刺激による腺房細胞の [IP₃]_i上昇はプラトーに達するまでの時間はおよそ1分であった. これは耳下腺腺房細胞における最大のCa²⁺上昇は, 比較的低濃度のIP₃によって惹起されたことを示唆している.

唾液腺腺房細胞は分泌機能や極性を保ったまま培養することが難しく, 培養細胞のように発現プラスミドを用いたセンサータンパク質の導入法を適用できない. 腺房細胞にバイオセンサーを導入するには, エレクトロポレーション法や微小ガラスピペットを用いたマイクロインジェクション法 (Kubota et al., 1987) がある. エレクトロポレーション法による精製cLIBRAvIISの腺房細胞への導入効率は約12%で顕微鏡による測定には十分であった (図5A). またアフリカツメガエルの卵母細胞などに用いられるマイクロインジェクション法 (Wasserman et al., 1980, Kubota et al., 1987) を検討したが, 腺房細胞の大きさが20 μm程度と卵母細胞 (1 mm) と比べ小さく, また細胞の固定が困難なため測定に必要な精製cLIBRAvIISを注入することはできなかった (data not

A



B



C

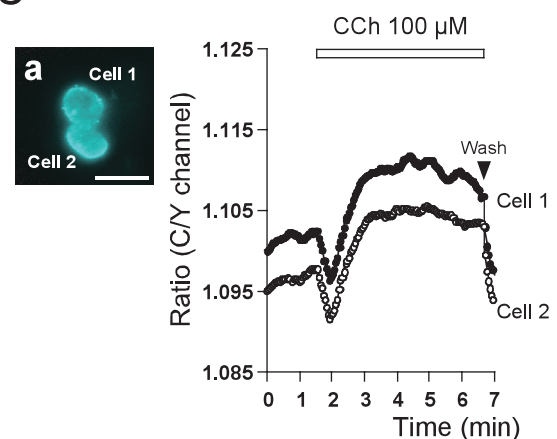


図5. 精製cLIBRAvIISを用いた単離耳下腺腺房細胞におけるIP₃動態のリアルタイムモニター

A) (a) および (b) ラットから単離した耳下腺腺房細胞への精製cLIBRAvIISの導入. 耳下腺腺房細胞の透過像 (a) と 435 nm励起によるC channel ((b), 420–500 nm) の蛍光像. B) IP₃添加による腺房細胞内の精製cLIBRAvIISの蛍光比変化. 腺房細胞をβ-エスチン (200 μM) を用いて細胞膜を穿孔し, IP₃ (10 μM) 添加による蛍光比 (Ratio) 変化を測定した. C) カルバコール (CCh, 100 μM) による細胞内IP₃動態. CChによる腺房細胞のcLIBRAvIISの蛍光比変化を測定した. スケールバー: 10 μm. 3例の異なるサンプルを用いて実験を行った.

shown). 標的タンパク質を細胞内に導入する方法として, アルギニンを多く含む配列 (TAT, R7およびR9) を付加した方法が知られている (Wender et al., 2000, Futaki et al., 2001). この配列を挿入したPHドメインタイプのIP₃センサーのDT40細胞への導入に使用されており (Sugimoto et al., 2004), cLIBRAvIISにこれらのアミノ酸配列を挿入することで, 蛍光バイオセンサーの細胞内導入法の一つの選択肢になるだろう.

本研究では, マイクロプレートリーダーを用いてIP₃による精製cLIBRAvIISの蛍光変化の検知に成功し, IP₃結合部位に特異的な結合するIP₃に対して高い選択性を持つ測定システムとして使用できることを示した. 本方法は放射性同位元素などを用いた従来法 (Bredt et al., 1989) と比べて, 簡便かつ極めて高精度にIP₃濃度を測定可能である.

また我々は以前の報告で, “LIBRA” シリーズがIP₃受

容体に特異的に結合する化合物のスクリーニングに利用できる可能性を示した (Nezu et al., 2006). IP₃受容体に結合することが知られるヘパリンは, 高濃度では非特異的な結合によりLIBRAの蛍光比変化を起こすが, このようなりガンド結合部位に対する非特異的な反応は, IP₃受容体のリガンド結合部位のアミノ酸変異によりIP₃に対する結合性を無くしたcLIBRAvIIS-Nを作成することで解決できる (Nezu et al., 2006). マイクロプレートリーダーは簡便に大量のサンプルを一度に測定できると言う点で, 蛍光顕微鏡による測定システムには無い特徴を持っている. この方法は溶液中のIP₃濃度の測定や新規IP₃受容体リガンドスクリーニングをハイスループットに解析する測定法に応用が可能である.

最近我々は, IP₃受容体に特異的に結合する蛍光リガンドを使った競合的蛍光リガンドアッセイ (CFLA) を開発し, LIBRAシリーズの約10倍の蛍光比変化を示す

IP₃測定法の開発に成功した (Oura et al., 2016). ただし, CFLAでは蛍光リガンドを生きた細胞に注入する必要があるため細胞内のIP₃測定に利用することができない. 本研究で確立した方法をCFLAに応用することによって, より高感度なハイスループット測定系を構築できると考えられる.

結 論

今回我々は, IP₃を選択的かつ高感度に検知可能な細胞質発現型IP₃バイオセンサー“cLIBRAvIIS”を開発した. このセンサーを用いることで, これまで測定できなかった唾液腺腺房細胞におけるIP₃動態のリアルタイムモニターが可能となった. また, 本センサーを用いたマイクロプレートリーダー測定法は, セルフリー系の新規IP₃濃度測定法およびIP₃受容体のIP₃結合部位へ特異的に作用する新規リガンドのスクリーニングへの応用が期待される.

謝 辞

本研究の一部は, 平成16–19年度科学研究費補助金基盤研究B (課題番号16390532; 谷村明彦), 平成19–20年度科学研究費補助金若手研究B (課題番号19791369; 根津顕弘), 平成20–21年度歯学研究科ハイテク・リサーチ・センター整備事業 (東城庸介) からの助成を受けて行われた.

参 考 文 献

- Ambudkar IS. Ca²⁺ signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. *Cell Calcium* 55, 297–305, 2014.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325, 1993.
- Berridge MJ, Lipp P, and Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21, 2000.
- Bredt DS, Mourey, RJ, and Snyder, SH. A simple, sensitive, and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5–trisphosphate in biological tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 976–982, 1989.
- Bruce JI, Shuttlesworth TJ, Giovannucci DR, and Yule DI. Phosphorylation of inositol 1,4,5–trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 277, 1340–1348, 2002.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, and Sugiura Y. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 276, 5836–5840, 2001.
- Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440–3450, 1985.
- Harmer AR, Smith PM, and Gallacher DV. Local and global calcium signals and fluid and electrolyte secretion in mouse submandibular acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G118–G124, 2005.
- Kubota HY, Yoshimoto Y, Yoneda M, and Hiramoto Y. Free calcium wave upon activation in *Xenopus* eggs. *Dev Biol* 119, 129–136, 1987.
- Matsuura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, and Mikoshiba K. Cytosolic inositol 1,4,5–trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J Cell Biol* 173, 755–765, 2006.
- Nezu A, Tanimura A, Morita T, Irie K, Yajima T, and Tojyo Y. Evidence that zymogen granules do not function as an intracellular Ca²⁺ store for the generation of the Ca²⁺ signal in rat parotid acinar cells. *Biochem J* 363, 59–66, 2002.
- Nezu A, Tanimura A, Morita T, Shitara A, and Tojyo Y. A novel fluorescent method employing the FRET-based biosensor “LIBRA” for the identification of ligands of the inositol 1,4,5–trisphosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1274–1280, 2006.
- Nezu, A., Tanimura, A., Morita, T., and Tojyo, Y. Visualization of Ins(1,4,5)P₃ dynamics in living cells: two distinct pathways for Ins(1,4,5)P₃ generation following mechanical stimulation of HSY-EA1 cells. *J Cell Sci* 123, 2292–2298, 2010.
- Oura T, Murata K, Morita T, Nezu A, Arisawa M, Shuto S, and Tanimura A. Highly Sensitive Measurement of Inositol 1,4,5–Trisphosphate by Using a New Fluorescent Ligand and Ligand Binding Domain Combination. *Chem-biochem* 17, 1509–1512, 2016.
- Rizzo MA, Springer GH, Granada B, and Piston DW. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22, 445–449, 2004.
- Sato M, Ueda Y, Shibuya M, and Umezawa Y. Locating inositol 1,4,5–trisphosphate in the nucleus and neuronal dendrites with genetically encoded fluorescent indicators. *Analytical chemistry* 77, 4751–4758, 2005.

- Sugimoto K, Nishida M, Otsuka M, Makino K, Ohkubo K, Mori Y, and Morii T. Novel real-time sensors to quantitatively assess in vivo inositol 1,4,5-trisphosphate production in intact cells. *Chem Biol* 11, 475–485, 2004.
- Tanimura A, Matsumoto Y, and Tojyo Y. Polarized Ca²⁺ release in saponin-permeabilized parotid acinar cells evoked by flash photolysis of 'caged' inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J* 332 (Pt 3), 769–772, 1998.
- Tanimura A, Morita T, Nezu A, Shitara A, Hashimoto N, and Tojyo Y. Use of Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Biosensors for the Quantitative Analysis of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Dynamics in Calcium Oscillations. *J Biol Chem* 284, 8910–8917, 2009.
- Tanimura A, Nezu A, Morita T, Turner RJ, and Tojyo, Y. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-trisphosphate in single living cells. *J Biol Chem* 279, 38095–38098, 2004.
- Tojyo Y, Tanimura A, and Matsumoto Y. Imaging of intracellular Ca²⁺ waves induced by muscarinic receptor stimulation in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 22, 455–462, 1997.
- Tojyo Y, Tanimura A, and Matsumoto Y. Digital imaging of intracellular Ca²⁺ signaling in rat parotid acinar cells. *Life Sci* 62, 1635–1639, 1998.
- Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, and Smith LD. Progesterone induces a rapid increase in [Ca²⁺] in of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1534–1536, 1980.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, and Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13003–13008, 2000.
- Yoshikawa F, Morita M, Monkawa T, Michikawa T, Furuchi T, and Mikoshiba K. Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 271, 18277–18284, 1996.



根津 顕弘

北海道医療大学歯学部薬理学分野 講師

平成5年3月 東日本学園大学 (現：北海道医療大学) 薬学部 衛生薬学科卒業

平成7年3月 北海道医療大学 薬学部薬学研究科修了 (薬学修士)

平成10年4月 北海道医療大学 歯学部 歯科薬理学講座 (現：薬理学分野) 助手

平成17年3月 北海道医療大学 歯学研究科 歯学博士

平成17年4月 米国NIH (Dr. R. James Turner) 留学 (平成19年3月まで)

平成19年4月 北海道医療大学 歯学部 薬理学分野 助教

平成19年11月 北海道医療大学 歯学部 薬理学分野 講師