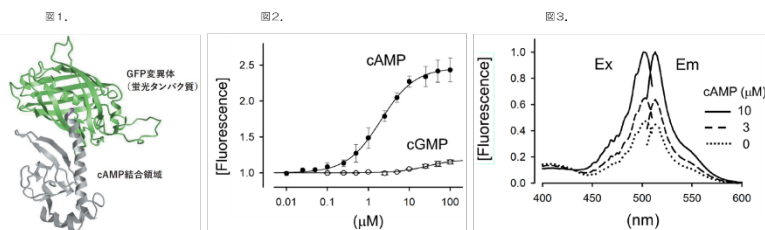


研究テーマ番号	IPSN214006
研究・発明のタイトル	生細胞内 cAMP の時空間的動態をリアルタイムに解析可能な遺伝子発現型 cAMP 蛍光指示薬の開発
研究分野	創薬
1) 研究・発明の概要	1) 多くのホルモンや成長因子、神経伝達物質は、細胞表面の受容体やGタンパク質共役型受容体 (GPCR) に結合し、サイクリックAMP (cAMP) やサイクリックGMP (cGMP) 等の細胞内セカンドメッセンジャーを介して様々な細胞機能を引き起こす。これまでcAMPの指示薬としては、基礎研究レベルの遺伝子発現型指示薬が複数報告されているが、cAMPに対してcGMPよりも特異性の高い指示薬での中で十分な反応変化幅を有するものはなかった。今回、発明者は、大腸菌由来cAMP反応タンパク質のcAMP結合ドメインを利用した新規なcAMP指示薬Carviを開発した。cAMPに対する特異性が高く、生理的な変動範囲濃度のcGMPとは反応しない。また、1秒以下の時間分解能を有するプローブであり、リアルタイムに生細胞内のcAMP動態を可視化できる。以上から、本cAMP指示薬は、cAMP動態を指標とした薬剤スクリーニングや薬理的な評価に利用可能なツールとして有用である。
2) 成果概要	2) 【gCarviのcAMP特異性及び励起/蛍光スペクトル】 cAMP指示薬Carviとして、青色励起光による緑色蛍光でイメージングが可能なgCarviや、紫色励起光による緑色蛍光でイメージングが可能なgvCarviを作製した。図1は、cAMP結合領域であるCBDとGFP変異体の融合タンパク質gCarviの予想立体構造である。図2は、gCarviのcAMP/cGMP濃度依存的な蛍光強度を示した。gCarviは、1 μM付近からcGMPよりもcAMPに対する特異性が顕著となり、cGMPと100倍以上の特異性をもって解析が可能であることがわかった。図3には、gCarviの励起スペクトルと蛍光スペクトルを示した。いずれのスペクトルもほぼ重なるものであった。 【gCarviを用いた細胞イメージング】 図4は、海馬神経細胞におけるgCarvi発現を調べたものである。培養3-6日目の海馬神経細胞にCarvi遺伝子発現アデノウイルスベクターを感染させ、12日目以降にgCarviの発現を確認した。図4A、4Bは細胞の蛍光像で、4Cは微分干渉像を示す。フォルスコリンはcAMP産生酵素であるアデニル酸シクラーゼの作動薬であるが、フォルスコリン添加前はgCarviの蛍光が弱か



3) 適用分野・目標 4) 今後の研究予定	図4. (A) フォルスコリン投与前 (B) フォルスコリン投与後 (C) 微分干渉像  ったのに対して、フォルスコリン添加後はgCarviの蛍光が強くなった。gCarvi発現神経細胞の形態は十分に発達しており、細胞毒性は認めなかった（図4C）。 3)・本 cAMP 指示薬は、cGMP に対する cAMP の特異性が高く、$\sim 3\mu\text{M}$ 程度の生理的な cGMP 変動域には応答しない。また、1 秒以下の時間分解能を有しており、cAMP 動態を可視化できる。 ・多くの細胞の cAMP の基底濃度は $1\sim 3\mu\text{M}$ である。本 cAMP 指示薬の cAMP に対する K_d 値は $2\mu\text{M}$ であり、精細胞用プローブとして最適である。また、大腸菌由来の cAMP 結合ドメインを有することから、内在性シグナルへ干渉する可能性は極めて低い。 4)・gCarvi を FLIPR 等に適用するための高感度検出システムの開発 ・特定の細胞部位あるいは特定の分子における cAMP 動態を調べるための局在化 gCarvi の作製
希望する提携の種類	MTA や使用ライセンスの下で企業の創業における研究ツールとして使っていただきたい。また、新規な系での使用やアプリケーションの共同研究も可能。
特許出願（予定）	2021 年出願済
関連特許の出願の有無	無
学術発表（予定）	有(予定)
共同研究の有無	無

註：本資料は知的財産戦略ネットワーク（株）が全ての権利を有しており、本目的外の使用を禁ずる。