

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6971461号
(P6971461)

(45) 発行日 令和3年11月24日(2021.11.24)

(24) 登録日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/62 (2006.01) C 1 2 N 15/62 Z N A Z
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00

請求項の数 4 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2017-80368 (P2017-80368) (22) 出願日 平成29年4月14日(2017.4.14) (65) 公開番号 特開2018-174818 (P2018-174818A) (43) 公開日 平成30年11月15日(2018.11.15) 審査請求日 令和2年4月6日(2020.4.6)</p> <p>特許法第30条第2項適用 平成28年10月20日 Nature, Vol. 538, pp. 388-391 で発表</p>	<p>(73) 特許権者 504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 (74) 代理人 100137512 弁理士 奥原 康司 (72) 発明者 大倉 正道 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国 立大学法人埼玉大学内 (72) 発明者 中井 淳一 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国 立大学法人埼玉大学内</p> <p>審査官 市島 洋介</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光カルシウムセンサー蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1で表されるアミノ酸配列の117番目のAsnがSerに、338番目のLeuがMetに置換されたアミノ酸配列からなる蛍光カルシウムセンサー蛋白質。

【請求項2】

配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる請求項1に記載の蛍光カルシウムセンサー蛋白質。

【請求項3】

請求項1または2に記載の蛍光カルシウムセンサー蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項4】

配列番号4で表される塩基配列からなる請求項3に記載の遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光カルシウムセンサー蛋白質に関する。

【背景技術】

【0002】

カルシウムは生体にとって、構造の維持に必須である骨の主要な構成成分であると同時に、筋肉の収縮、神経興奮、ホルモン分泌および酵素活性の変化などの各種の細胞機能の調節因子として、生体機能の維持および調節に不可欠な役割を担っている。このため、生

体内（細胞外および細胞内）のカルシウム変動を感知し、カルシウム濃度の測定に用いられるカルシウムセンサーの重要性が高まっている。

【0003】

発明者らは、これまでに、蛋白質性の蛍光カルシウムセンサーであるG-CaMPおよびR-CaMP（G-CaMPとR-CaMPを併せて「G-CaMPs」と記載する）を開発した。G-CaMPsは、N末側から、（1）リンカー、（2）機能性分子1、（3）リンカー、（4）改変蛍光蛋白質（改変FPと記載する）（5）リンカー、（6）機能性分子2からなる構造を基本とする蛋白質である（特許文献1～5）。ここで改変FPとは、改変GFP、改変RFPまたは改変mAppleなどのFPにリンカーをつなげた蛋白質であり、具体的には、N末側から、FPの部分配列、リンカーおよびFPの部分配列からなる。また、機能性分子1とは、カルモジュリン（CaM）に結合能を有するミオシン軽鎖キナーゼやカルモジュリンキナーゼキナーゼまたはこれらの部分配列であり、機能性分子2とはカルモジュリンおよびその変異体である。機能性分子1と機能性分子2にあたる蛋白質は入れ替えることが可能である。

G-CaMPsにカルシウムイオンが結合した際の蛍光強度の変化量は、従来の蛋白質性蛍光カルシウムプローブと比較して、より大きい。そのため、G-CaMPsは、カルシウムに対する感度が従来のカルシウムセンサーに比して高いという特長を有している。

【0004】

近年、再生医療の進展に伴い、iPS細胞などのドナー細胞が、移植先の臓器でどのように機能しているかを蛍光カルシウムイメージングでモニターする必要性が高まってきている。しかしながら、従来の蛍光カルシウムセンサーのみを細胞に導入しても、細胞をモニターするのに必要な輝度を得にくく、蛍光カルシウムセンサー以外に色の異なる蛍光蛋白質を発現マーカーとして併用する必要がある。また、細胞は、自家蛍光を発しているため、従来のセンサーでは、この自家蛍光とセンサーの蛍光との区別がつきにくく、カルシウムセンサーが導入された細胞の正確な同定が難しいことが多い。

以上のような状況から、高輝度な蛍光カルシウムセンサー蛋白質の開発の必要性は高い。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許3650815

【特許文献2】特許5669080

【特許文献3】特許5788160

【特許文献4】特許6051438

【特許文献5】W02015/190083

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記事情に鑑み、本発明は、従来のカルシウムセンサー蛋白質よりも、高輝度な蛍光カルシウムセンサー蛋白質の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、緑色蛍光蛋白質（EGFP）を用いた従来の緑色蛍光カルシウムセンサー蛋白質であるG-CaMP7（特許文献3）に種々の変異を導入し、G-CaMP7より蛍光輝度の高い緑色蛍光カルシウムセンサー蛋白質の開発を試みた。

高輝度な緑色蛍光カルシウムセンサー蛋白質は、1）センサー蛋白質の蛍光が細胞の自家蛍光の影響を受けにくく、2）組織の多細胞集団内でセンサー蛋白質を発現する細胞の位置を明るい緑色蛍光を指標として容易に同定でき、かつその細胞機能をモニターすることが可能となる、等の利点があるため生命科学研究分野での利用価値が高く、その開発が強く望まれていた。

発明者らは、これまで緑色蛍光蛋白質EGFPを蛍光素子とする蛍光変化量が大きいカルシ

10

20

30

40

50

ウムセンサー蛋白質を開発してきたが、G-CaMP7 [G-CaMP2のRSETタグ部分にHis6 His5; EGFP(aa150-239)部分にM154K, T204V, S206N; EGFP(aa1-145)部分にN106Y, E125V; Calmodulin部分にM36L, N60D, D78Yの変異が導入されている]を作製した際に導入されたアミノ酸変異のうち、いくつかのアミノ酸変異だけをG-CaMP2と同じアミノ酸残基に戻すことを試した結果、偶然にも、G-CaMP7より蛍光輝度が著しく高い蛍光カルシウムセンサー蛋白質G-CaMP7.09を作出することができた。

【0008】

すなわち、本発明は以下の(1)~(5)である。

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の117番目のAsnと338番目のLeuが、各々、異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなる蛍光カルシウムセンサー蛋白質。

10

(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の117番目のAsnがSerに、338番目のLeuがMetに置換されたアミノ酸配列からなる上記(1)に記載の蛍光カルシウムセンサー蛋白質。

(3) 配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる上記(1)または(2)に記載の蛍光カルシウムセンサー蛋白質。

(4) 上記(1)ないし(3)のいずれかに記載の蛍光カルシウムセンサー蛋白質をコードする遺伝子。

(5) 配列番号4で表される塩基配列からなる上記(4)に記載の遺伝子。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、従来の蛍光カルシウムセンサー蛋白質に比べ、輝度の高い蛍光カルシウムセンサー蛋白質の提供が可能となる。

20

【0010】

本発明にかかる蛍光カルシウムセンサー蛋白質を細胞で発現させた場合、輝度が高いため、細胞の自家発光の影響を受けにくく、また、他の蛍光蛋白質を発現マーカーとして共発現させることなく、本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質を発現する細胞の位置を同定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】G-CaMP7.09の光学特性の評価結果。Ca²⁺の有無におけるG-CaMP7およびG-CaMP7.09の励起・蛍光スペクトルを測定した。蛍光輝度(F)はEGFPの最大輝度に対する相対値として示す。

30

【図2】HeLa細胞およびNeuro2A細胞におけるG-CaMP7.09の性能評価結果。HeLa細胞(A~C)およびNeuro2A細胞(D~F)におけるG-CaMP7およびG-CaMP7.09の性能評を評価し、比較した。(AおよびD)静止状態での細胞蛍光画像。(BおよびE)細胞内のCa²⁺上昇を誘発させる薬物(HeLaでは100 mM ATP、Neuro2Aでは100 mM KCl)の投与により生じる蛍光経時変化。(CおよびF)BおよびEの実験中におけるG-CaMP7およびG-CaMP7.09の最大蛍光輝度。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の第1の実施形態は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の117番目のAsnと338番目のLeuが、各々、異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなる蛍光カルシウムセンサー蛋白質(以下、「本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質」とも記す)である。

40

配列番号1で表されるアミノ酸配列の117番目のAsnおよびLeuをいかなるアミノ酸で置換するかは、特に限定はしないが、例えば、117番目のAsnをSerに、338番目のLeuをMetに置換するのが望ましい(配列番号3)。

【0013】

本発明における蛍光カルシウムセンサー蛋白質とは、当該蛋白質に含まれる機能性分子の立体構造に影響を及ぼす因子であるカルシウムを作用させることで該機能性分子の立体構造に影響を与え、該立体構造の変化がカルシウムセンサー蛋白質に含まれる改変GFPの立体構造に影響を与えることで、該改変GFPの蛍光特性を可逆的に変化させる蛋白質をい

50

う。この変化は、蛍光顕微鏡またはレーザー顕微鏡等で捉えることが出来る程度の変化をいい、好ましくは肉眼で捉えることが出来る程度の変化をいう。

本発明において蛍光特性とは、蛍光強度、蛍光波長、蛍光強度比、吸光度、吸光波長および輝度などの蛍光特性を指す。本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質は、従来の蛍光カルシウムセンサー蛋白質として比較して、特に、輝度が高いという特長を有している。ここで、輝度とは、モル吸光係数()と量子収率()の積である。

【0014】

本発明の第2の実施形態は、本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質をコードする遺伝子である。例えば、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる蛍光カルシウムセンサー蛋白質(配列番号1で表されるアミノ酸配列の117番目のAsnがSerに、338番目のLeuがMetに置換されたアミノ酸配列からなる蛍光カルシウムセンサー蛋白質)をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号4などを例示することができる。

10

【0015】

本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質は、当該技術分野における公知技術により容易に作製することができる。

例えば、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる蛍光カルシウムセンサー蛋白質の場合、該蛋白質をコードする配列番号4で表される遺伝子配列を、適当な発現ベクターに挿入し、常法に基づいて、該蛋白質を発現し、単離精製を行うことで、本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質を作製することができる。本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質は、必要に応じて、タグ(例えば、FLAGタグ、Hisタグ、HAタグおよびGSTタグなど)を融合させて発現させてもよい。

20

【0016】

本発明の蛍光カルシウムセンサー蛋白質を発現させるための発現用ベクターとしては、例えば、pBR322、pBR325、pUC118およびpETなど(大腸菌宿主)、pEGFP-C1およびpEGFP-N1など(動物細胞宿主)、pVL1392およびpVL1393など(昆虫細胞宿主)、pG-1、Yep13およびpPICZなど(酵母細胞宿主)を使用することができる。これらの発現ベクターは、各々のベクターに適した、複製開始点、選択マーカーおよびプロモーターを有しており、必要に応じて、エンハンサー、転写終結配列(ターミネーター)、リボソーム結合部位およびポリアダニル化シグナル等を有していてもよい。

【0017】

発現させた蛋白質を培養菌体または培養細胞から抽出する際には、まず、培養後、公知の方法で菌体または細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体または細胞を破壊したのち、遠心分離や濾過により、可溶性抽出液を取得する。得られた抽出液から、公知の分離・精製法を適切に組み合わせることで目的の蛋白質を取得することができる。公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法およびSDS-PAGE等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法(例えば、GSTタグと共に蛋白質を発現させた場合にはグルタチオンを担体に結合させた樹脂を、Hisタグと共に蛋白質を発現させた場合にはNi-NTA樹脂やCoベースの樹脂を、HAタグと共に蛋白質を発現させた場合には、抗HA抗体結合カラムなどを使用することができる)、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法および等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

30

40

【0018】

本明細書において引用されたすべての文献の開示内容は、全体として明細書に参照により組み込まれる。また、本明細書全体において、単数形の「a」、「an」、および「the」の単語が含まれる場合、文脈から明らかにそうでないことが示されていない限り、単数のみならず複数のものを含むものとする。

以下に実施例を示してさらに本発明の説明を行うが、実施例は、あくまでも本発明の実施形態の例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

50

【実施例】

【0019】

1. 実験方法

1-1. 蛍光カルシウムセンサー蛋白質 (G-CaMP7.09) の調製

1-1-2. G-CaMP7.09の細菌発現用および哺乳動物発現用プラスミドの構築

G-CaMP7.09の細菌発現用プラスミドであるpRSET_B-G-CaMP7.09および哺乳動物発現用プラスミドであるpN1-G-CaMP7.09は、特許文献3(特許第5788160号)に記載のpRSET_B-G-CaMP7.09およびpN1-G-CaMP7.09を後述のように改変することによって構築した。

すなわち、G-CaMP7の配列(配列番号1)においてEGFP部分に存在するAsn-117をSerに、カルモジュリン部分のLeu-338をMetにアミノ酸置換されるよう、そのcDNA配列のAsn-117をコードしている5'-AAT-3'を5'-TCC-3'に、Leu-338をコードしている5'-CTG-3'を5'-ATG-3'に、各々、変異させてG-CaMP7.09を構築した。具体的には、pRSET_B-G-CaMP7.09およびpN1-G-CaMP7.09をSac IおよびCla Iで消化した、各々、3.00kbおよび4.19kbのベクター断片にpN1-G-CaMP5.09(Ohkuraら, PLoS One, 7 e51286 2012)をSac IとCla Iで消化した1.13kbの断片をライゲーションさせて、pRSET_B-G-CaMP7.09およびpN1-G-CaMP7.09を作製した。

制限酵素によるDNAの切断はNEB社、Toyobo社もしくはTakara社の制限酵素およびそれらの添付バッファーと添付Bovine Serum Albumin(100xBSA)を用いて行った。反応は、1~2μgのDNAに添付バッファー(3μl)、添付100xBSA(0.3μl)および各制限酵素(10ユニット)を加えて全量を30μlとした中で、37℃で、1~3時間行った。

【0020】

アガロースゲル(Agarose LE、ナカライテスク)は、TAEバッファー(4.98g/l Tris base(ナカライテスク)、1.142ml/l氷酢酸(ナカライテスク)、1mM EDTA(pH8)(Dojindo))にて加熱溶解し、1%または2%となるように調製した。Hind III digest(Toyobo)または100bp DNA Ladder(Toyobo)をDNAサイズマーカーとして使用し、DNA試料は、制限酵素に添付されている10xサンプルバッファー1/10量と、DMSO(Sigma)にて100倍希釈したSYBR Green I(Invitrogen)1/10量加えたものを、TAEバッファーを用いて100Vにて電気泳動を行った。バンドの検出は、Safe Imager(Invitrogen)を用いて行った。

【0021】

ゲルからのDNAの回収は、FastGene Gel/PCR Extraction Kit(日本ジェネティックス)を用い、添付のマニュアルに従って行った。

まず、アガロースゲル電気泳動後、Safe Imager上で目的のバンドをなるべく小さくなるようにメスで切り出し、GP1バッファーを500μl加えて時々攪拌しながら55℃に放置してゲルを完全に溶解させた。次に、そのDNA溶解液をspin columnにアプライして、約13,200xgで30秒間遠心し、DNAを吸着させた。DNAが吸着したカラムには、GP2バッファーを60μl加えて、約13,200xg、30秒間遠心し、カラムを洗浄した。さらに、約13,200xg、2分間遠心し、カラムに残った液滴を完全に除去した。カラムを新しい回収用マイクロチューブにとりつけ、カラムにGP3バッファーを10~25μl加えて室温で2分間放置した後、約13,200xg、2分間遠心し、カラムからDNAを溶出し回収した。

ライゲーション反応は、DNA Ligation Kit Ver.2(Takara)を用い、操作は添付のマニュアルに従って行った。詳細には、約25fmolのプラスミドベクターおよび約25~250fmolのインサートDNAの混合溶液に等量のLigation Mixを添加して混和した後、16℃で30分間反応させた。

【0022】

形質転換は大腸菌コンピテントセルDH5(Takara)またはKRX(Takara)を用いて行った。詳細には、100μlのコンピテントセルを氷上にて溶解し、DNA溶液1μlまたはライゲーション反応液1μlを加えて氷上で30分間放置した後、42℃で45秒間加熱した。その後、さらに氷上で5分間放置し、LB培地500μlを加えて、37℃で1時間培養後、100μg/mlのアンピシリンまたは50μg/mlのカナマイシン(Wako Chemicals)を含む選択培地(LB培地)に植菌し、37℃にて、一晚培養した。翌日、コロニーを100μg/mlのアンピシリンまたは5

10

20

30

40

50

0 µg/mlのカナマイシンを含む1~5mlの液体培地 (LB培地) に植えつぎ、37 °Cにて16時間培養した。

【 0 0 2 3 】

大腸菌からのプラスミドの回収は、FastGene Miniprep Kit (日本ジェネティックス) を用い、添付のマニュアルに従って行った。

まず、5mlの大腸菌培養液を約2,000 × g、10分間遠心し、上清をデカンテーションまたはピペティングで除去して大腸菌の沈殿を得た。この沈殿に、氷冷したRNase入りmP1バッファーを200 µl加えて懸濁し、mP2バッファーを200 µl加えて室温で2分間放置して、アルカリSDSで菌体を破碎した。その後、mP3バッファーを300 µl加えて中和した。菌体破碎液をspin columnに移し、約13,200 × g、30秒間遠心してプラスミドをカラムに吸着させた。カラム素通り液は、デカンテーションにて除去した。次に、カラムにmP4バッファーを400 µl加えて約13,200 × g、30秒間遠心してカラムを洗浄した。カラム素通り液は、デカンテーションにて除去した。また、カラムにmP5バッファーを600 µl加えて約13,200 × g、30秒間遠心してカラムを洗浄した。カラム素通り液は、デカンテーションにて除去した。さらに、バッファーを加えずに、もう一度約13,200 × g、2分間遠心してカラムに残った液滴を完全に除去した。カラムを新しい回収用マイクロチューブにとりつけ、カラムにmP6バッファーを30 µl加えて約13,200 × g、2分間遠心してカラムからプラスミドを溶出し回収した。

10

【 0 0 2 4 】

培地およびバッファー類は以下の組成のものを使用した。

20

LB液体培地

10g/l Bacto-tryptone (ナカライテスク)、5g/l Bacto-yeast extract (ナカライテスク)、5g/l NaCl (ナカライテスク)、1g/l glucose (Wako Chemicals)。オートクレーブにて滅菌して調製。

LB寒天培地

10g/l Bacto-tryptone (ナカライテスク)、5g/l Bacto-yeast extract (ナカライテスク)、5g/l NaCl (ナカライテスク)、1g/l glucose (Wako Chemicals)、15g/l Agar (ナカライテスク)。オートクレーブにて滅菌後、温度が45 °C程度まで下がったところで抗生物質 (100 µg/ml アンピシリンまたは50 µg/ml カナマイシン (Wako Chemicals)) を加え、プラスチックディッシュに流し込んで調製。

30

TE

10mM Tris-HCl (pH8)、1mM EDTA (Wako Chemicals)

【 0 0 2 5 】

1 - 1 - 2 . 蛍光カルシウムセンサー蛋白質の精製

蛍光カルシウムセンサー蛋白質の精製は、この蛋白質がHisタグを有していることを利用して、Hisタグに特異的に結合するNi-NTA agarose (Qiagen) を用い、操作はそのマニュアルに従って行った。詳細には、pRSET_B-G-CaMP7.09を大腸菌コンピテントセルKRXに形質転換し、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB選択培地に植菌し、37 °Cで一晩培養した。生じたコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含む10mlの液体培地 (LB培地) に植えつぎ、37 °Cにて16時間培養した。得られた培養液10mlを、さらに100 µg/mlのアンピシリンを含む200mlの液体培地 (LB培地) に植えつぎ、吸光度OD₆₀₀で0.5~1となるまで37 °Cで培養した後、最終濃度が1%になるようにラムノース (プロメガ) を加えて、18~25 °Cで4~5時間さらに培養した。

40

培養物を3,000回転で15分間遠心して (6200遠心機、Kubota)、大腸菌を回収した。1mlのLB培地で大腸菌を懸濁し、-20 °Cで30分凍らせた後、室温で30分解凍した。再度、凍結、解凍を繰り返した。氷上で冷やした40mlのsuspension buffer (25mM Tris-HCl (pH8) (Sigma)、1mM 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク)、蛋白分解酵素阻害剤 (0.1mM PMSF、5 µg/ml ロイペプチン (Wako Chemicals)) を加え、よく混ぜて大腸菌を懸濁した。大腸菌懸濁液を4 × 100,000 × gで15分間遠心し、上清を得た。5M NaClを最終濃度が0.3Mとなるように加え、2mlの50% Ni-NTA agarose (Qiagen; 蛋白質結合能5~10mg/m

50

Iレジンをさらに加えて1時間室温で穏やかに混合して反応させた。反応液を空のカラム（エコノカラム；カラムサイズ ~20ml（Bio-Rad））に移し、余分の液がカラムから滴下してなくなるのを待った。10mlの洗浄液（50mM NaH₂PO₄（pH8）（ナカライテスク）、0.3M NaCl、20mM imidazole（ナカライテスク））で2回洗浄した後、3~4mlの回収液（50mM NaH₂PO₄（pH8）（ナカライテスク）、0.3M NaCl、250mM imidazole（ナカライテスク））にて溶出し、Hisタグ付きの蛋白質をカラムから回収した。次に、回収した液を透析チューブ（Sankoujunyaku）に入れて125mlまたはそれ以上のKMバッファー（0.1M KCl（ナカライテスク）、20mM MOPS-Tris（pH7.5）（Dojindo））で、4にて透析した。KMバッファーは4~5時間ごとに交換し、液交換を3回以上行った後、透析チューブから蛋白質の溶液を回収した。

10

【0026】

蛋白質の濃度測定にはプロテインアッセイキット（Bio-Rad）を用い、操作はそのマニュアルに従ってBradford法（Bradford, M. M. Anal. Biochem. 1976, 72, 248-254.）で測定した。

まず、10~200 µg/mlとなるように水で希釈した蛋白質の溶液50 µlに、Bradford試薬を1ml加えて30分後に595nmの吸光度を測定した。蛋白質の基準濃度は、牛血清アルブミンを基準蛋白質として用いてその濃度を測定して求めた。測定は室温にて行った。

【0027】

1-2. G-CaMP7.09を用いた測定法

1-2-1. 励起・蛍光スペクトルおよびカルシウム結合能の測定

上述のように、精製したG-CaMP7.09蛋白質は、KMバッファーで最終濃度が0.3 µMとなるように希釈し、蛍光分光光度計F-2500（Hitachi）を用いて励起・蛍光スペクトルを取得した。励起スペクトルを取得する場合は、350~510nmで励起し、530nmで蛍光を記録した。蛍光スペクトルを取得する場合は、470nmで励起し490~550nmで蛍光を記録した。G-CaMP7.09蛋白質のカルシウム結合能は、様々なカルシウム濃度溶液中における蛍光強度を測定して得られた、カルシウム濃度 - 蛍光強度の容量反応曲線に基づいて算出した。精製したG-CaMP7.09蛋白質はCalcium Calibration Buffer Kit#1（Invitrogen社）のさまざまなカルシウム濃度溶液300 µlで、最終濃度が0.3 µMとなるように希釈し、蛍光分光光度計F-2500（Hitachi）を用いて470nmで励起し510nmの蛍光を記録した。測定は室温にて行った。

20

30

【0028】

1-2-2. HeLa細胞およびNeuro2A細胞の培養とプラスミドの導入

炭酸ガス培養器を用いて、培地（DMEM（Gibco）、10% Fetal Bovine Serum（Gibco）、1×ペニシリン・ストレプトマイシン（Gibco））にて、HeLa細胞を37°Cで培養し、Lipofectamine 2000（Invitrogen）を用いて培養細胞にpN1-G-CaMP7.09のプラスミドを導入した。導入操作は添付の説明書に従って行った。まず、血清を含まないDMEM 50 µlでプラスミド0.8 µgを希釈した。次に、2 µlのLipofectamine 2000と血清を含まないDMEM 50 µlに加え、室温で5分間放置した。その後、両希釈液を混合して室温で20分間放置した。この混合液の10 µlを96穴培養シャーレ中の培養細胞に投与してプラスミドを導入した。HeLa細胞は、37°Cで1~3日間培養した。Neuro2A細胞は、プラスミドを導入した4時間後に5 µM

40

【0029】

1-2-3. HeLa細胞およびNeuro2A細胞での蛍光測定

蛍光測定には、イメージングサイトメーターINCell Analyzer 2200（GEヘルスケア）を用いて行った。対物レンズは20×を用いた。プラスミドを導入した細胞をHBSバッファー（107mM NaCl、6mM KCl、1.2mM MgSO₄（ナカライテスク）、2mM CaCl₂、1.2mM KH₂PO₄（ナカライテスク）、11.5mM glucose、20mM HEPES（Dojindo）（pH7.4））に浸してイメージングサイトメーターにセットし、HeLa細胞の場合には最終濃度として100 µM ATP（Sigm

50

a) を、Neuro2A細胞の場合には最終濃度として100mM KCl (ナカライテスク) を細胞外に投与して細胞を刺激し、その際に起こる細胞内カルシウム濃度変化を蛍光強度変化として検出した。測定は30 にて行った。

【 0 0 3 0 】

2 . 結果

2 - 1 . G-CaMP7.09の光学特性の評価

精製したカルシウムセンサー蛋白質を用いてG-CaMP7.09の光学特性の評価を行った。

Ca²⁺存在下でのモル吸光係数()および量子収率()に関して、G-CaMP7.09は $\epsilon = 39700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $\Phi = 0.50$ 、EGFPは $\epsilon = 56000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $\Phi = 0.60$ であったことから、G-CaMP7.09の1分子当りの蛍光輝度(と の積)はEGFPの60%程度であることが分かった(表1)。また、従来のセンサー蛋白質G-CaMP7と比較して、G-CaMP7.09はCa²⁺非存在下では4.4倍明るく、Ca²⁺存在下では2.3倍明るいことが見出された(表1および図1)。

【 0 0 3 1 】

【表1】

GECI	Ca ²⁺	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{a}}$ (ϵ^{b})	$\lambda_{\text{em}}^{\text{c}}$ (Φ^{d})	Brightness ^e
G-CaMP7	-	397 499 (3250)	514 (0.11)	340
	+	392 496 (23110)	513 (0.37)	8660
G-CaMP7.09	-	402 505 (4270)	515 (0.35)	1500
	+	398 497 (39710)	512 (0.50)	20000

^a 極大吸光波長(nm). ^b モル吸光係数($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ^c 極大蛍光波長(nm). ^d 量子収率.
^e 蛍光輝度(ϵ と Φ の積; EGFP ($\epsilon = 56000$, $\Phi = 0.60$)を基準とした相対値で示す)

【 0 0 3 2 】

2 - 2 . G-CaMP7.09の培養細胞での性能評価

培養細胞であるHeLa (図2 A ~ C) およびNeuro2A (図2 D ~ F) に、G-CaMP7およびG-CaMP7.09を発現させてセンサー蛋白質の性能評価を行った。G-CaMP7.09は、いずれの細胞種においても、G-CaMP7より相当に明るいベース蛍光を示した(図2 AおよびD)。また、細胞内Ca²⁺上昇を誘発させる薬物の投与により生じる蛍光経時変化を観測したところ(図2 BおよびE)、G-CaMP7.09の最大蛍光輝度はG-CaMP7のそれより3倍程度高かった(図2 CおよびF)。

以上のように、G-CaMP7.09は蛍光輝度が非常に高い。そのため、G-CaMP7.09を細胞内で発現させた場合、その明るい蛍光を指標として、組織の多細胞集団内で注目する細胞の位置を容易に同定でき、また、その細胞機能をモニターすることが可能となる。

【 0 0 3 3 】

2 - 3 . G-CaMP7.09のCa²⁺応答性の評価

精製したカルシウムセンサー蛋白質を用いて、Ca²⁺滴定実験を行った。G-CaMP7.09のCa²⁺に対する解離定数(Kd)およびHill係数は、G-CaMP7のそれと同程度の値を示した(表2)。

このことから、G-CaMP7.09はG-CaMP7と同様に生体内のさまざまな細胞でCa²⁺応答を検

出可能であると考えられる。

【 0 0 3 4 】

【 表 2 】

GECI	Ca ²⁺ sensitivity	
	K_d^a (nM)	n_H^b
G-CaMP7	192 ± 4.8	2.83 ± 0.09
G-CaMP7.09	226 ± 7.2	2.59 ± 0.08

a 解離定数. bHill 係数.

10

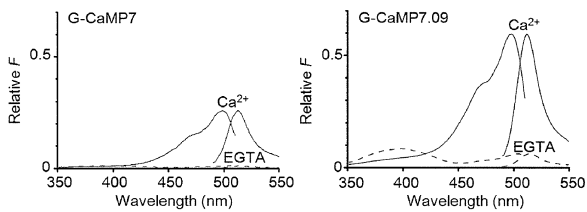
【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 3 5 】

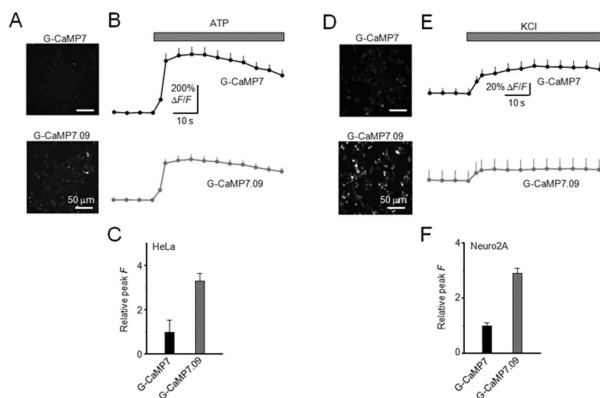
本発明は、従来のもよりも高輝度な蛍光カルシウムセンサータンパク質を提供する。従って、本発明にかかるカルシウムセンサータンパク質（G-CaMP7.09）の利用価値は高く、生体機序の解明や医学・創薬といった分野に大きく貢献するものである。

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【配列表】

0006971461000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 PLOS ONE, 2012年, Vol. 7, Issue 12, e51286
日本薬理学雑誌, 2013年, Vol. 142, pp.226-230
Nature, 2016年, Vol. 538, pp.388-391

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq