

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6462684号
(P6462684)

(45) 発行日 平成31年1月30日(2019.1.30)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z N A Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	

請求項の数 14 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-527634 (P2016-527634)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月8日(2015.6.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/002869
 (87) 国際公開番号 W02015/190083
 (87) 国際公開日 平成27年12月17日(2015.12.17)
 審査請求日 平成28年11月17日(2016.11.17)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-120828 (P2014-120828)
 (32) 優先日 平成26年6月11日(2014.6.11)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 503360115
 国立研究開発法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介
 (72) 発明者 尾藤 晴彦
 東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法
 人東京大学 大学院医学系研究科 神経生
 化学分野内
 (72) 発明者 井上 昌俊
 東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法
 人東京大学 大学院医学系研究科 神経生
 化学分野内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルシウム指示遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列(c k k a p配列)をコードするヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列(C a M配列)をコードするヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの3'末端側に結合されているDNAであり、

c k k a p配列が、配列番号6に示されるアミノ酸配列である、DNA。

【請求項2】

c k k a p配列をコードするヌクレオチドと蛍光タンパクをコードするヌクレオチド、及び、蛍光タンパクをコードするヌクレオチドとC a M配列をコードするヌクレオチドが、アミノ酸リンカーをコードするヌクレオチドを介してそれぞれ結合されている、請求項1記載のDNA。

【請求項3】

蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端にc k k a p配列をコードするヌクレオチドが、3'末端側にC a M配列をコードするヌクレオチドが結合されており、c k k a p配列をコードするヌクレオチドと蛍光タンパクをコードするヌクレオチドがアミノ酸リンカーAをコードするヌクレオチドを介して結合されており、かつ、蛍光タンパクをコードするヌクレオチドとC a M配列をコードするヌクレオチドがアミノ酸リンカーBをコードするヌクレオチドを介して結合されており、

10

20

アミノ酸リンカー A 及びアミノ酸リンカー B の組み合わせが、アミノ酸リンカー A (- P r o - V a l -) ・アミノ酸リンカー B (- T h r - A r g) である、請求項 2 記載の DNA。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 5】

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) をコードするヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 5 ' 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) をコードするヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 3 ' 末端側に結合されているカルシウム指示遺伝子が導入された形質転換細胞であり、
c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列である、形質転換細胞。

10

【請求項 6】

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) をコードするヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 5 ' 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) をコードするヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 3 ' 末端側に結合されているカルシウム指示遺伝子が導入された、ヒトを除くトランスジェニック動物であり、
c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列である、トランスジェニック動物。

20

【請求項 7】

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) が蛍光タンパクの N 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) が前記蛍光タンパクの C 末端側に結合されているタンパクであり、
c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列である、タンパク。

【請求項 8】

c k k a p 配列と蛍光タンパク、及び、蛍光タンパクと C a M 配列が、アミノ酸リンカーを介してそれぞれ結合されている、請求項 7 記載のタンパク。

【請求項 9】

蛍光タンパクの N 末端に c k k a p 配列が、C 末端側に C a M 配列が結合されており、
c k k a p 配列と蛍光タンパクがアミノ酸リンカー A を介して結合されており、かつ、
蛍光タンパクと C a M 配列がアミノ酸リンカー B を介して結合されており、
アミノ酸リンカー A 及びアミノ酸リンカー B の組み合わせが、アミノ酸リンカー A (- P r o - V a l -) ・アミノ酸リンカー B (- T h r - A r g) である、請求項 8 記載のタンパク。

30

【請求項 10】

細胞内で発現されたカルシウム指示タンパクから放射される蛍光を検出する手順を含む、細胞の活動電位の測定方法であって、
前記カルシウム指示タンパクは、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) が蛍光タンパクの N 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) が前記蛍光タンパクの C 末端側に結合されている、カルシウム指示タンパクであり、
c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列であることを特徴とする方法。

40

【請求項 11】

細胞内で発現されたカルシウム指示タンパクから放射される蛍光を検出する手順を含む、細胞内カルシウムイオンのイメージング方法であって、
前記カルシウム指示タンパクは、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) が蛍光タンパクの N 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) が前記蛍光タンパクの C 末端側に結合されている、カルシウム指示タンパクであり、

50

c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列であることを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) をコードするヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 5 ' 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) をコードするヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 3 ' 末端側に結合されている、カルシウム指示遺伝子であり、

c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列である、カルシウム指示遺伝子を前記細胞に導入する手順を含む、請求項 1 0 記載の細胞活動電位の測定方法又は請求項 1 1 記載の細胞内カルシウムイオンのイメージング方法。

10

【請求項 1 3】

細胞の活動電位の測定及び / 又は細胞内カルシウムイオンのイメージングのためのカルシウム指示試薬であって、

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) をコードするヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 5 ' 末端側に、カルモジュリンのカルシウム結合配列 (C a M 配列) をコードするヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 3 ' 末端側に結合されている DNA 又は該 DNA を含むベクターを含む、試薬であり、

c k k a p 配列が、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列である、試薬。

【請求項 1 4】

前記細胞が神経細胞である、請求項 1 3 記載の試薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、カルシウム指示遺伝子に関する。より詳しくは、カルシウムセンサーとして機能する蛍光タンパクであって、蛍光特性及びカルシウム反応性に優れた蛍光カルシウム指示タンパクに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

カルシウムは、筋肉の収縮、神経興奮性やホルモン分泌、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。生体内 (細胞外及び細胞内) のカルシウム濃度を測定するため、従来、カルシウムセンサー (カルシウムインディケーター) と称されるタンパクが用いられている。

30

【 0 0 0 3 】

近年、脳高次機能の本質である認知活動を細胞レベル及び細胞内ドメインレベルで解析するため、神経活動に伴うカルシウム濃度の変化を超高速でイメージングする技術が必要とされており、優れたカルシウム反応性を備える蛍光カルシウムセンサーの開発が望まれている。

【 0 0 0 4 】

カルシウムセンサーとして機能するタンパクとして、蛍光タンパクにカルモジュリンの部分配列とミオシン軽鎖キナーゼの部分配列を結合したカルシウム指示タンパクが知られている。このカルシウム指示タンパクは、カルシウムがカルモジュリンの部分配列に結合するとタンパクの立体構造が変化し、蛍光タンパク (G F P 又は R F P) の発する蛍光強度が変化することを利用している。例えば、非特許文献 1 には、蛍光タンパクとして m A p p l e を用いたカルシウム指示タンパク (R - G E C O 1) が記載されている。また、特許文献 1 には、R - G E C O 1 を改良して作成され、R - G E C O 1 よりも大きな蛍光強度変化を示す R - C a M P 1 . 0 1 と、R - C a M P 1 . 0 1 を改良して作成され、R - C a M P 1 . 0 1 よりもさらに大きな蛍光強度変化を示し、細胞内の局在性が改善された R - C a M P 1 . 0 7 が開示されている。

40

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2014-1161号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Science, 2011, 333, 1888-1891

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、従来のカルシウム指示タンパクよりもさらに蛍光特性及びカルシウム反応性に優れるカルシウム指示タンパクを提供することを主な目的とする。 10

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題解決のため、本発明は、以下の[1]～[23]を提供する。

【0009】

[1]カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼのカルモジュリン結合配列(以下「ckkap配列」)をコードするヌクレオチド及びカルモジュリンのカルシウム結合配列(以下「CaM配列」)をコードするヌクレオチドの一方のヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端側に、他方のヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの3'末端側に結合されているDNA。 20

[2]蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端にckkap配列をコードするヌクレオチドが、3'末端側にCaM配列をコードするヌクレオチドが結合されている、[1]のDNA。

[3]ckkap配列をコードするヌクレオチドの塩基配列が、配列番号1～3に示される塩基配列のいずれか一つである、[1]又は[2]のDNA。

[4]ckkap配列をコードするヌクレオチドと蛍光タンパクをコードするヌクレオチド、及び、蛍光タンパクをコードするヌクレオチドとCaM配列をコードするヌクレオチドが、アミノ酸リンカーをコードするヌクレオチドを介してそれぞれ結合されている、[1]～[3]のいずれかのDNA。

[5]蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端にckkap配列をコードするヌクレオチドが、3'末端側にCaM配列をコードするヌクレオチドが結合されており、ckkap配列をコードするヌクレオチドと蛍光タンパクをコードするヌクレオチドがアミノ酸リンカーAをコードするヌクレオチドを介して結合されており、かつ、蛍光タンパクをコードするヌクレオチドとCaM配列をコードするヌクレオチドがアミノ酸リンカーBをコードするヌクレオチドを介して結合されており、 30

アミノ酸リンカーA及びアミノ酸リンカーBの組み合わせが、アミノ酸リンカーA(-Pro-Val-)・アミノ酸リンカーB(-Thr-Arg)である、[4]のDNA。

[6]CaM配列をコードするヌクレオチドの塩基配列が、配列番号7又は8に示される塩基配列である、[1]～[5]のいずれかのDNA。

[7][1]～[6]のいずれかのDNAを含むベクター。 40

【0010】

[8]ckkap配列をコードするヌクレオチド及びCaM配列をコードするヌクレオチドの一方のヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端側に、他方のヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの3'末端側に結合されているカルシウム指示遺伝子が導入された形質転換細胞。

[9]ckkap配列をコードするヌクレオチド及びCaM配列をコードするヌクレオチドの一方のヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端側に、他方のヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの3'末端側に結合されているカルシウム指示遺伝子が導入された、ヒトを除くトランスジェニック動物。

[10]前記カルシウム指示遺伝子において、蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの 50

5'末端にc k k a p配列をコードするヌクレオチドが、3'末端側にC a M配列をコードするヌクレオチドが結合されている、[8]の細胞又は[9]のトランスジェニック動物。

[1 1] c k k a p配列をコードするヌクレオチドの塩基配列が、配列番号1 ~ 3に示される塩基配列のいずれか一つである、[8]の細胞又は[9]のトランスジェニック動物。

[1 2] C a M配列をコードするヌクレオチドの塩基配列が、配列番号7又は8に示される塩基配列である、[8]の細胞又は[9]のトランスジェニック動物。

【 0 0 1 1 】

[1 3] c k k a p配列及びC a M配列の一方が蛍光タンパクのN末端側に、他方が前記蛍光タンパクのC末端側に結合されているタンパク。

[1 4] 前記蛍光タンパクのN末端側にc k k a p配列が、C末端側にC a M配列が結合されている、[1 3]のタンパク。

[1 5] c k k a p配列が、配列番号4 ~ 6, 15 ~ 19に示されるアミノ酸配列のいずれか一つである、[1 3]又は[1 4]のタンパク。

[1 6] C a M配列が、配列番号9又は10に示されるアミノ酸配列である、[1 3] ~ [1 5]のいずれかのタンパク。

[1 7] c k k a p配列と蛍光タンパク、及び、蛍光タンパクとC a M配列が、アミノ酸リンカーを介してそれぞれ結合されている、[1 3] ~ [1 6]のいずれかのタンパク。

[1 8] 蛍光タンパクのN末端にc k k a p配列が、C末端側にC a M配列が結合されており、

c k k a p配列と蛍光タンパクがアミノ酸リンカーAを介して結合されており、かつ、蛍光タンパクとC a M配列がアミノ酸リンカーBを介して結合されており、

アミノ酸リンカーA及びアミノ酸リンカーBの組み合わせが、アミノ酸リンカーA (- P r o - V a l -) · アミノ酸リンカーB (- T h r - A r g)である、[1 7]のタンパク。

【 0 0 1 2 】

[1 9] 細胞内で発現されたカルシウム指示タンパクから放射される蛍光を検出する手順を含む、細胞の活動電位の測定方法であって、

前記カルシウム指示タンパクは、c k k a p配列及びC a M配列の一方が蛍光タンパクのN末端側に、他方が前記蛍光タンパクのC末端側に結合されている、カルシウム指示タンパクであることを特徴とする方法。

[2 0] 細胞内で発現されたカルシウム指示タンパクから放射される蛍光を検出する手順を含む、細胞内カルシウムイオンのイメージング方法であって、

前記カルシウム指示タンパクは、c k k a p配列及びC a M配列の一方が蛍光タンパクのアミノ酸配列のN末端側に、他方が前記蛍光タンパクのC末端側に結合されている、カルシウム指示タンパクであることを特徴とする方法。

[2 1] c k k a p配列をコードするヌクレオチド及びC a M配列をコードするヌクレオチドの一方のヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端側に、他方のヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの3'末端側に結合されている、カルシウム指示遺伝子を前記細胞に導入する手順を含む、[1 9]の細胞活動電位の測定方法又は[2 0]の細胞内カルシウムイオンのイメージング方法。

【 0 0 1 3 】

[2 2] 細胞の活動電位の測定及び/又は細胞内カルシウムイオンのイメージングのためのカルシウム指示試薬であって、

c k k a p配列をコードするヌクレオチド及びC a M配列をコードするヌクレオチドの一方のヌクレオチドが蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの5'末端側に、他方のヌクレオチドが前記蛍光タンパクをコードするヌクレオチドの3'末端側に結合されているDNA又は該DNAを含むベクターを含む、試薬。

[2 3] 前記細胞が神経細胞である、[2 2]の試薬。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0014】

本発明により、蛍光特性及びカルシウム反応性に優れるカルシウム指示タンパクが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明に係るカルシウム指示タンパク R - C a M P 2 と公知技術に係るカルシウム指示タンパク R - C a M P 1 . 0 7 の構造を示す図である。

【図2 - 1】本発明に係るカルシウム指示タンパクの c k k a p 配列のアミノ酸配列の一例を示す図である。

10

【図2 - 2】本発明に係るカルシウム指示タンパクの c k k a p 配列のアミノ酸配列の他の一例を示す図である。

【図3】R - C a M P 1 . 0 7、R - C a M P 2、及び R - G E C O 2 L の $C a^{2+}$ 滴定曲線を示す図である。曲線は、ヒルの式に従ってフィッティングをした。

【図4】R - C a M P 1 . 0 7、R - C a M P 2、及び R - G E C O 2 L の *in vitro* でのベースラインの蛍光強度とダイナミックレンジ (F_{max}/F_{min}) を示す図である。

【図5】EGFPと R - C a M P 2 (A) または R - G E C O 2 L (B) を発現する海馬培養神経細胞を示す図である。スケールバー：10 μm 。

【図6】海馬培養神経細胞のシナプス終末から記録されたフィールド刺激による単一活動電位にตอบสนองした蛍光変化を示す図である。

20

【図7】海馬培養神経細胞の細胞体から記録された、MNI - g l u t a m a t e の単一 UV アンケーシングパルスにตอบสนองした蛍光変化を示す図である。

【図8】単一活動電位で誘導されるシナプス終末の $C a^{2+}$ イメージングにおいて、1 試行 (灰色) 及び R - C a M P 1 . 0 7、R - C a M P 2、R - G E C O 2 L の各試行の平均応答のトレースを示す図である。

【図9】単一活動電位で誘導されるシナプス終末の $C a^{2+}$ イメージングにおける、単一活動電位の振幅、SNR、立ち上がり時間、減衰時定数を示す図である。

【図10】海馬培養神経細胞の細胞体において、グルタミン酸アンケーシングの単一パルスに対する1回の試行 ($n=9$) 及び各試行の平均応答のトレースを示す図である。A は R - C a M P 1 . 0 7 の結果、B は R - C a M P 2 の結果を示す。

30

【図11】海馬培養神経細胞の細胞体において、単一パルスのグルタミン酸アンケーシングに対する振幅、SNR、立ち上がり時間、減衰時定数を示す図である。

【図12】急性スライスにおけるバレル野 2 / 3 層錐体細胞の活動電位 ($n=10$ 細胞) に対する R - C a M P 2 の蛍光変化 (F/F) を、R - C a M P 1 . 0 7 との比較で示す図である。

【図13 - 1】急性スライス単一活動電位によって誘発される $C a^{2+}$ 応答の振幅、SNR、立ち上がり時間、減衰時定数を示す図である。

【図13 - 2】急性スライスにおけるバレル野 2 / 3 層錐体細胞の活動電位 ($n=10$ 細胞) に対する R - C a M P 2 _ L L A の蛍光変化 (F/F) を、R - C a M P 2 との比較で示す図である。

40

【図14】急性スライスにおけるバレル野 2 / 3 層錐体細胞において、20 Hz で 1、2、4 及び 8 発のスパイクにตอบสนองする際の R - C a M P 1 . 0 7 及び R - C a M P 2 発現神経細胞の代表的なトレース (上図) と平均の性能 (下図) を示す図である。

【図15 - 1】急性スライスにおけるバレル野 2 / 3 層錐体細胞において、5 発のスパイクに固定して、異なる周波数で刺激した際の R - C a M P 2 の 1 回の試行での応答を示す図である (B)。(A) は比較のための R - C a M P 1 . 0 7 の結果を示す。

【図15 - 2】急性スライスにおけるバレル野 2 / 3 層錐体細胞において、5 発のスパイクに固定して、異なる周波数で刺激した際の R - C a M P 2 _ L L A の 1 回の試行での応答を示す図である。

【図16】エアパフひげ刺激による $C a^{2+}$ 変動を *in vivo* イメージングにより複数の神経

50

細胞で記録した結果を示す図である。

【図17】 *in vivo*でのR - CaMP2発現新皮質神経細胞のCa²⁺変動(上段)と活動電位(下段)の同時記録の代表的トレースを示す図である。各バーストのスパイク数をトレースの下に示す。スケールバー: 5 μm。

【図18】 *in vivo*の新皮質神経細胞において、200ミリ秒のピン内の活動電位数で誘導されるCa²⁺変動の振幅、SNR、時間積分値(1、2、3、4、5発の活動電位はn=254、115、45、26、13イベントを検出した。n=7匹のマウスから9細胞)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【0017】

1. カルシウム指示遺伝子及びカルシウム指示タンパク

本発明に係るカルシウム指示遺伝子及びカルシウム指示タンパクについて、実施例に記載の「R - CaMP2」及び「R - GECO2L」等を例として説明する。

【0018】

本発明に係るカルシウム指示タンパクは、蛍光タンパクのアミノ酸配列、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼ(CaMKK)のカルモジュリン結合配列(以下「ckkap配列」)のアミノ酸配列、及びカルモジュリンのカルシウム結合配列(以下「CaM配列」)のアミノ酸配列を含んでなる。同様に、本発明に係るカルシウム指示遺伝子は、蛍光タンパクをコードするヌクレオチド、ckkap配列をコードするヌクレオチド、及びCaM配列をコードするヌクレオチドを含んでいる。

【0019】

また、本発明に係るカルシウム指示タンパクは、ckkap配列と蛍光タンパクを結合するアミノ酸リンカー、及び蛍光タンパクとCaM配列とを結合するアミノ酸リンカーを有してもよい。同様に、本発明に係るカルシウム指示遺伝子は、ckkap配列と蛍光タンパクを結合するアミノ酸リンカーをコードするヌクレオチド、及び蛍光タンパクとCaM配列とを結合するアミノ酸リンカーをコードするヌクレオチドを有してもよい。

【0020】

図1に、本発明に係るカルシウム指示タンパク(あるいはカルシウム指示遺伝子)の構造の一例を示す。図上段は、特許文献1に記載される従来のカルシウム指示タンパクであるR - CaMP1.07の構造、下段は本発明に係るカルシウム指示タンパクであるR - CaMP2の構造を示す。図中、「ckkap - WL」はckkap配列の好適な一例を示す。また、「cpApple」は赤色蛍光タンパクを表す。

【0021】

本発明に係るR - CaMP2は、蛍光タンパクのアミノ酸配列cpAppleのN末端側にckkap配列が、C末端側にCaM配列が結合されている。同様に、R - CaMP2遺伝子においては、蛍光タンパクをコードするヌクレオチドcpAppleの5'末端にckkap配列をコードするヌクレオチドが、3'末端側にCaM配列をコードするヌクレオチドが結合されている。この構造は、従来のR - CaMP1.07の構造において「M13」で示されるミオシン軽鎖キナーゼのカルモジュリン結合配列をckkap配列に置換した構造に相当する。また、本発明に係るR - GECO2Lは、非特許文献1に記載される従来のカルシウム指示タンパクであるR - GECO1のM13配列をckkap配列に置換した構造を有する。R - CaMP2及びR - GECO2Lの全長アミノ酸配列を配列番号11及び配列番号13に、R - CaMP2及びR - GECO2Lをコードするヌクレオチドの全長塩基配列を配列番号12及び配列番号14にそれぞれ示す。

【0022】

本発明に係るR - CaMP2は、特許文献1に記載のR - CaMP1.07と同様に、

10

20

30

40

50

N末端側及びC末端側にそれぞれ付加配列を有していてもよい。図中、「MGS」で示される付加配列(37アミノ酸残基)は、タンパクを精製する際に用いられるタグ配列である。また、「F2A」で示される付加配列(21アミノ酸残基)は、タンパクを細胞内において細胞質に局在させるために機能する。

【0023】

本発明に係るカルシウム指示タンパクは、CaM配列にカルシウムが結合し、さらにカルシウム結合CaM配列にckkap配列が結合することで、立体構造を変化させる。本発明に係るカルシウム指示タンパクは、カルシウム存在下で立体構造を変化させることで、蛍光タンパクの立体構造変化とそれに伴う蛍光特性変化をもたらす、カルシウムセンサーとして機能する。実施例に記載する通り、本発明に係るR-CaMP2及びR-GECO2L等は、カルシウム結合CaM配列に対する結合ドメインとしてckkap配列を有することにより、同結合ドメインとしてM13配列を有するR-CaMP1.07及びR-GECO1等の従来のカルシウム指示タンパクに比して優れた蛍光特性及びカルシウム反応性を発揮する。より具体的には、R-CaMP2及びR-GECO2L等は、カルシウム存在下と非存在下との間での蛍光強度の変化量(ダイナミックレンジ)がより大きく、カルシウムとの結合と解離に伴う蛍光特性の変化速度もより大きい点で、従来のカルシウム指示タンパクに比して優位な特性を備える。

10

【0024】

R-CaMP2のアミノ酸配列を配列番号11に示す。配列番号11に示すアミノ酸配列のうち、1~37番目がMGS配列、38~63番目がckkap配列(ckkap-WL)、66~307番目がcpApple配列、310~456番目がCaM配列、472~492番目がF2A配列である。MGS配列、ckkap配列、cpApple配列、CaM配列及びF2A配列は、リンカーによって隣接する配列と結合されている。リンカーは、カルシウム指示タンパクの機能が維持される限りにおいて特に限定されない。

20

【0025】

R-CaMP2の好適なリンカー構造は、ckkap配列と蛍光タンパクを結合するアミノ酸リンカーAが「-Pro-Val-」であり、蛍光タンパクとCaM配列を結合するアミノ酸リンカーBが「-Thr-Arg」である。

【0026】

本発明に係るカルシウム指示タンパクにおける好適なアミノ酸リンカーA, Bの組み合わせは、上記の「-Pro-Val-」及び「-Thr-Arg」の組み合わせである。

30

【0027】

これらのリンカー構造を採用することにより、カルシウム存在下での蛍光強度が高く、ダイナミックレンジが大きいカルシウム指示タンパクを得ることができる。

【0028】

また、R-GECO2Lのアミノ酸配列を配列番号13に示す。配列番号13に示すアミノ酸配列のうち、1~3番目がMGS配列、4~29番目がckkap配列(ckkap-WL)、32~273番目がcpApple配列、276~422番目がCaM配列である。MGS配列、ckkap配列、cpApple配列及びCaM配列は、リンカーによって隣接する配列と結合されている。

40

【0029】

[ckkap配列]

本発明に係るカルシウム指示タンパクのckkap配列は、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼ(CaMKK)のカルモジュリン結合配列である。CaMKKのカルモジュリン結合配列には、サブユニットとサブユニットが存在するが、本発明のckkap配列は、サブユニット由来の配列(アミノ酸配列を配列番号4、当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチドを配列番号1に示す)であっても、サブユニット由来の配列(アミノ酸配列を配列番号5、当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチドを配列番号2に示す)であってもよい。なお、これらの配列は、ラットのCaMKK

50

由来のものであるが、c k k a p配列の由来は、カルシウムが結合したC a M配列に対する結合性を有する限り、任意の生物種であってよい。

【0030】

さらに、c k k a p配列は、カルシウムが結合したC a M配列に対する結合性を有する限り、配列番号4又は5に記載のアミノ酸配列中の1個又は数個(好ましくは1~5個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。このようなc k k a p配列として、上記c k k a p - W L (アミノ酸配列を配列番号6、当該アミノ酸配列をコードするヌクレオチドを配列番号3に示す)が挙げられる。また、c k k a p配列として、c k k a p - W Lのアミノ酸配列をさらに改変したアミノ酸配列(c k k a p - W L 2 ~ 6)も採用できる。c k k a p配列のアミノ酸配列は、カルシウム指示タンパクの蛍光特性及びカルシウム反応性を高める観点から、配列番号6, 15~19に示す配列が好ましく、配列番号15~19に示す配列が最も好ましい。配列番号6, 15~19に示す配列からc k k a p配列のアミノ酸配列を適宜選択することにより、カルシウム指示タンパクの蛍光特性やカルシウム反応性を所望の程度に設定することもできる。実施例に記載のR - C a M P 2及びR - G E C O 2 Lは、c k k a p配列として、c k k a p - W Lを含む。また、R - C a M P 2 _ L L Aは、c k k a p配列としてc k k a p - W L 5を含む。図2-1に、サブユニット由来のc k k a p配列(c k k a p)とサブユニット由来のc k k a p配列(c k k a p)及びc k k a p - W Lのアミノ酸配列を示す。図2-2に、c k k a p - W L 2 ~ 6のアミノ酸配列を示す。

【0031】

なお、c k k a p配列は、C a M K Kのカルモジュリン結合配列のみからなるものに限られないものとする。すなわち、c k k a p配列は、C a M K Kのアミノ酸配列のうち、カルモジュリン結合配列以外のアミノ酸配列を含んでいてもよく、例えばカルモジュリン結合配列のN末端側及び/又はC末端側のアミノ酸を数残基~数十残基含んでいてもよいものとする。

【0032】

[C a M配列]

本発明に係るカルシウム指示タンパクのC a M配列は、カルモジュリンのカルシウム結合配列である。C a M配列には、配列番号9又は配列番号10に示すアミノ酸配列を用いることができる。配列番号9に示すアミノ酸配列はR - C a M P 2が備えるC a M配列であり、配列番号10に示すアミノ酸配列はR - G E C O 2 Lが備えるC a M配列である。これらのC a M配列は、ラットカルモジュリンの2番目から148番目のアミノ酸配列に由来し、該アミノ酸配列に4残基又は5残基のアミノ酸置換を導入したアミノ酸配列である。R - C a M P 2のC a M配列をコードするヌクレオチドの塩基配列を配列番号7に、R - G E C O 2 LのC a M配列をコードするヌクレオチドの塩基配列を配列番号8に示す。なお、C a M配列の由来は、カルシウムに対する結合性を有し、カルシウムが結合した状態でc k k a p配列と結合し得る限り、任意の生物種であってよい。

【0033】

さらに、C a M配列も、カルシウムに対する結合性を有し、カルシウムが結合した状態でc k k a p配列と結合し得る限り、配列番号9又は10に記載のアミノ酸配列中の1個又は数個(好ましくは1~5個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。なお、C a M配列は、カルモジュリンのカルシウム結合配列のみからなるものに限られないものとする。すなわち、C a M配列は、カルモジュリンのカルシウム結合配列のうち、カルシウム結合配列以外のアミノ酸配列を含んでいてもよく、例えばカルシウム結合配列のN末端側及び/又はC末端側のアミノ酸を数残基~数十残基含んでいてもよいものとする。

【0034】

[蛍光タンパク]

本発明に係るカルシウム指示タンパクの蛍光タンパクには、特に限定されないが、青色蛍光タンパク(例えばB F Pなど)、緑色蛍光タンパク(例えばE G F Pなど)、黄色蛍

10

20

30

40

50

光タンパク（例えばVenusなど）及び赤色蛍光タンパクが用いられる。特に赤色蛍光タンパクが好適に用いられ、例えばmApple又はその改変体が用いられる。光刺激で細胞機能を操作し、同時に蛍光カルシウムイメージングで細胞機能を測定するためにカルシウム指示タンパクを用いる場合、蛍光タンパクが赤色蛍光タンパクであれば、その励起波長が細胞機能操作を目的として汎用される光刺激プローブChannelrhodopsin-2の励起波長と重複しないため好ましい。

【0035】

mAppleの改変体とは、蛍光特性に影響を及ぼすアミノ酸残基の近傍でmAppleのアミノ酸配列を切断して該蛋白質の構造を改変し、さらに特定部位のアミノ酸残基を置換したものである。mAppleの改変体の具体例は、特許文献1に記載されている。

10

【0036】

図1では、本発明に係るカルシウム指示タンパク（あるいはカルシウム指示遺伝子）において、ckkap配列、蛍光タンパク及びCaM配列が、この順序でN末端側（あるいは5'末端側）からC末端側（あるいは3'末端側）に配列する例を説明した。本発明に係るカルシウム指示タンパクにおいて、ckkap配列、蛍光タンパク及びCaM配列の配列順序は、N末端側からC末端側に向かって、CaM配列、蛍光タンパク及びckkap配列であってもよいものとする。

【0037】

本発明に係るカルシウム指示タンパクは、カルシウムと結合することで立体構造が変化し、該立体構造の変化がカルシウム指示タンパクに含まれる蛍光タンパクの立体構造に影響を与えることで、蛍光タンパクの蛍光特性を可逆的に変化させる。ここで、蛍光特性とは、蛍光強度、蛍光波長、蛍光強度比、吸光度、吸光波長などの蛍光特性を指す。本発明では蛍光特性の一例として、蛍光強度を使用する。蛍光特性の変化が蛍光強度の変化である場合、蛍光の変化量 F/F が、好ましくは、少なくとも0.3以上変化すること、より好ましくは0.6以上変化することをいう。

20

【0038】

本発明におけるカルシウム指示タンパクは、ckkap配列を備えることにより、従来のカルシウム指示タンパクに比べ、カルシウムとの結合時に、より大きな蛍光特性の変化を引き起こすことを特徴とする。ここでより大きな蛍光特性変化とは、蛍光特性の変化が蛍光強度の変化である場合、蛍光の変化量 F/F が、従来のカルシウムセンサーよりも大きく、好ましくは3倍以上増強されることをいう。

30

【0039】

2. ベクター、形質転換細胞及びトランスジェニック動物

本発明に係るカルシウム指示遺伝子は、公知の遺伝子工学的手法を用いて作成できる。例えば、ckkap配列、蛍光タンパク及びCaM配列等の配列をコードするヌクレオチドをそれぞれPCRにより増幅し、増幅断片を繋ぎ合わせることで本発明に係るカルシウム指示遺伝子を作成できる。

【0040】

得られたカルシウム指示遺伝子は、プラスミドやウイルス等の公知のベクターに組込むことができる。カルシウム指示遺伝子を搭載したベクターを所望の細胞に導入することにより、カルシウム指示タンパクを発現する形質転換細胞を得られる。カルシウム指示遺伝子を搭載したベクターあるいはカルシウム指示遺伝子そのものは、後述する細胞の活動電位の測定又は細胞内カルシウムイオンのイメージングのための試薬の一部となり得る。

40

【0041】

また、公知の遺伝子工学的手法を用いて、カルシウム指示遺伝子が導入されたトランスジェニック動物を作成できる。カルシウム指示遺伝子を哺乳動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中にカルシウム指示遺伝子が導入された個体を選別することによってトランスジェニック動物を作成できる。この際、組織特異的プロモーターの制御下にカルシウム指示遺伝子を組み込んで導入することによって、例えば脳神経細胞のみでカルシウム指示タンパクを発現するトランスジェニック動物を得ること

50

もできる。

【0042】

3. 細胞の活動電位の測定方法及び細胞内カルシウムイオンのイメージング方法

本発明に係るカルシウム指示タンパクは、細胞内カルシウム濃度変化を高感度に検知することができ、細胞の活動電位の測定及び細胞内カルシウムのイメージングのために好適に利用できる。細胞は、特に限定されないが、神経細胞が好ましい一例である。

【0043】

例えば、本発明に係るカルシウム指示遺伝子を搭載したベクターを測定対象とする細胞に導入してカルシウム指示タンパクを発現させる。あるいは、測定対象とする細胞でカルシウム指示タンパクを発現するトランスジェニック動物を作成する。そして、蛍光顕微鏡もしくは多光子顕微鏡等により、カルシウム指示タンパクに含まれる蛍光タンパクの励起波長に応じた波長の励起光を測定対象細胞に照射し、カルシウム指示タンパクから放射される蛍光を検出する。蛍光強度の変化を経時的に取得することで細胞の活動電位を測定することが可能であり、蛍光強度の変化をリアルタイムに画像化処理することで細胞内カルシウムのイメージングが可能となる。

【0044】

本発明に係るカルシウム指示タンパクを用いた細胞活動電位の測定方法及び細胞内カルシウムイオンイメージング方法は、細胞活動電位及び細胞内カルシウムイオン濃度に影響を及ぼす物質をスクリーニングするために応用できる。例えば、被検物質を処置した細胞あるいは被検物質を個体レベル、組織レベル又は細胞レベルで投与した動物を用いて、細胞内の細胞活動電位等を記録する。そして、記録された細胞活動電位を、被検物質を処置しないで同様に取得された細胞活動電位等と比較し、被検物質が細胞活動電位等に与える影響の有無を判定し、細胞活動電位等の亢進又は抑制に機能する物質を選択する。被検物質には、合成又は天然の各種化合物、ペプチドやタンパク、及びDNAやRNAなどの核酸などであってよく、核酸を用いる場合には遺伝子導入によって該核酸がコードする遺伝子を細胞に発現させた上で細胞活動電位等の変化を記録する。

【実施例】

【0045】

1. 材料と方法

[R - C a M P 2 , R - G E C O 2 L]

文献 (PLoS One, 2012, 7, e39933) 記載の手法に従って、 R - C a M P 1 . 0 7 発現コンストラクトを構築した。 R - G E C O 1 は、 A d d g e n e (<http://www.addgene.org/>) を通して得た。 R - G E C O 1 は、 p E G F P - N 1 (Clontech) 由来の p C M V ベクターからサブクローニングした。

【0046】

R - C a M P 1 . 0 7 及び R - G E C O 1 の M 1 3 配列をラット C a M K K の V a l 4 3 8 P h e 4 6 3 に相当する C a ²⁺ / カルモジュリン結合配列 (c k k a p 配列) に置換し、 R - C a M P 2 及び R - G E C O 2 L を作成した (図 1 参照) 。 c k k a p 配列には、 C a M K K の配列 (c k k a p 、 配列番号 4) と C a M K K の配列 (c k k a p 、 配列番号 5) とのハイブリッド配列 (c k k a p - W L 、 配列番号 6) を部位特異的変異法により作成して用いた (図 2 - 1 参照) 。 C a M 配列には、文献 (Nature, 2013, 499, 295-300, J. Biol. Chem., 2009, 284, 6455-6464) 記載のアミノ酸置換を導入した (配列番号 8 , 9) 。 R - C a M P 2 及び R - G E C O 2 L は、 p C A G ベクターにサブクローニングした。

【0047】

[R - C a M P 2 __ L L A]

R - C a M P 2 の c k k a p 配列 (c k k a p - W L) を部位特異的変異法により改変し、 c k k a p 配列を c k k a p - W L 5 (図 2 - 2 参照) とする R - C a M P 2 __ L L A を作成した。

【0048】

10

20

30

40

50

[*In vitro*におけるCa²⁺蛍光測定]

作成したカルシウム指示タンパクをHEK293T細胞に発現させて、Ca²⁺フリーのバッファー (20 mM MOPS (pH 7.5), 100 mM potassium chloride, 1 mM DTT, 1xProtease Inhibitor Cocktail (Complete, EDTA free, Roche)) にて細胞を回収した。回収後、超音波破碎を行い、遠心して上清を取りライセートとした。このライセートをスクリーニングや*In vitro*の性能評価に用いた。

【 0 0 4 9 】

*In vitro*の蛍光測定は、室温にてプレートリーダー (Fusion、Perkin Elmer) と96ウェルプレートを用いて行った。ダイナミックレンジはF_{max}/F_{min}として計算した。F_{max}は0.3 mM Ca²⁺の条件下においてCa²⁺飽和状態の時の蛍光強度を、F_{min}は15 mM EGTA存在下でのゼロCa²⁺の時の蛍光強度を測定した。Ca²⁺適定曲線は、市販のキット (Ca²⁺ Calibration Kit #1, Invitrogen) を用いて、10 mMのK₂H₂EGTAとCa₂EGTAの混合液により定量した。K_d値及びHill係数は、解析ソフトウェア (Origin Pro 7.5, Origin Lab) を用いてカーブフィットを行って算出した。

10

【 0 0 5 0 】

[海馬培養神経細胞におけるCa²⁺イメージング]

文献 (Cell, 1996, 87, 1203-1214, Cell Rep., 2013, 3, 978-987) 記載の手法に従って、海馬分散培養を行った。海馬培養神経細胞は生後当日のSDラット (日本SLC) の海馬 (CA1/CA3領域) から取った。培養後10~11日目で、CMVプロモーターのカルシウム指示タンパクをコードする遺伝子をリポフェクションにより神経細胞に導入した。遺伝子導入2~3日後、フィールド電気刺激によって引き起こされるCa²⁺イメージングをTyrode溶液 (129 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM glucose, 25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 1 mM MgCl₂ and 3 mM CaCl₂) を用いて行った。自発発火を防ぐために、Tyrode溶液には、10 μM CNQX (Tocris Bioscience) 及び50 μM D-AP5 (Tocris Bioscience) を加えた。

20

【 0 0 5 1 】

シナプス終末 (軸索起始部から100 μm以上離れてかつ、軸索の直径が3倍以上大きい部位) のイメージングを、倒立顕微鏡 (IX81, Olympus) とEM-CCD (C9100-12またはC9100-13, 浜松ホトニクス) を用いて行った。神経細胞は、ステージCO₂インキュベーター中で37℃に維持した。神経細胞は、フィールド電気刺激 (50 mA, 1 msecの電流パルス) を用いて刺激した。この刺激条件は、パルス刺激装置 (Master-8, A.M.P.I.) を用いて、確実に細胞体のスパイクを誘導するのに十分であった。

30

【 0 0 5 2 】

UVグルタミン酸アンケーシングでは、神経細胞を0.4 mMのMNI-グルタミン酸 (Tocris Bioscience) と1 μMのTTXで処置した、Mg²⁺を含まないTyrode溶液中でイメージングを行った。MNI-グルタミン酸のUVアンケーシングは、AQUACOSMOSソフトウェアプラットフォーム (浜松ホトニクス) 上で動作する紫外線光分解システム (浜松ホトニクス) と、該システムにより制御された355 nmのUVナノ秒パルスレーザー (Polaris II, New Wave Research) を用いて誘導した (Cell Rep., 2013, 3, 978-987)。

40

【 0 0 5 3 】

[子宮内電気穿孔法]

子宮内電気穿孔法は、文献 (J. Neurosci., 2009, 29, 13720-13729) 記載の方法に従った。胎生14.5日目のICRマウス (SLC日本) の側脳室に、麻酔下で、精製したプラスミド溶液約1.0 μlを注入し、5回の電気パルス (45 V, 1 Hz, 50ミリ秒の持続時間を5回) をエレクトロポレーター (BTX) により与えた。カルシウム指示タンパクを発現するマウスまたは細胞を可視化するために、体積のコントロールとしてEGFPを共発現させた。生後4~7週間後のマウスを、急性スライス標本または*in vivo*イメージングに供した。

50

【 0 0 5 4 】

[急性脳スライスにおける Ca^{2+} イメージングとホールセル記録の同時測定]

文献 (Eur. J. Neurosci., 2014, 39, 1720-1728) 記載の手法に従って、急性脳スライス実験を行った。4 ~ 7 週齢のマウスを CO_2 で深く麻酔し、断頭した。カルシウム指示タンパクは、CAGプロモーター下で、あるいは、TRE-tightプロモーターとTet3G (Clontech及びTet-Systems) を用いたテトラサイクリン誘導発現系を用いて、発現させた。

【 0 0 5 5 】

全脳を迅速に除去し、氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF) (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM $NaHCO_3$, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM glucose, bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2) 中に浸した。体性感覚野 (厚さ250 μm) の急性冠状脳スライスは、ミクロトーム (VT1200S, Leica) を使用して切断した。脳スライスを記録チャンバーに移動する前に30分で酸素飽和ACSF中に30分間培養し、続いて室温に維持した。

10

【 0 0 5 6 】

脳切片を、二光子顕微鏡ステージ上に液浸型記録チャンバーに装着し、バレル野の第4層を明視野によって同定した。ホールセルパッチクランプ記録は、バレル野の第2 / 3 錐体細胞で行った。記録中、記録チャンバーは連続的に30分の酸素飽和ACSFで灌流した。パッチピペットは、垂直プラー (PC-10、成茂) を使用して、ホウケイ酸ガラスキャピラリーから引き出し、細胞内液 (133 mM K-MeSO₃, 7.4 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM Na_2ATP , 0.3 mM Na_2GTP , 0.3 mM $MgCl_2$) が満たされたときに5 ~ 8 Mオームの抵抗を有した。ホールセル電流固定記録は、EPC10増幅器 (Heka) を用いて行った。すべての電気生理学的データは、10 kHzでフィルターし、20 kHzでデジタル化した。

20

【 0 0 5 7 】

[In vivo イメージングのための頭蓋骨手術]

In vivo イメージングのために、マウス (4 ~ 7 週齢) にウレタン (1.5 ~ 1.8mg/g) を腹腔内投与し麻酔した。加熱パッド (FHC, Bowdoin) を用いて体温を37に維持した。瞬間接着剤と歯科用セメントを用いて、右バレル野の上の頭蓋骨にステンレス製のヘッドプレートに接着した (プレグマから3.0 ~ 3.5 mm横、1.5 mm後部)。円形の開頭 (直径1.8 ~ 2.0 mm) を作製し、硬膜を慎重に取り除いた。開頭を溶液 (150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1.5% agarose, pH 7.3) で満たした。露出された脳の動きを抑制するために、ガラスカバースリップをアガロース上に置いた後、マウスを二光子顕微鏡の動物用ステージに移した。

30

【 0 0 5 8 】

[In vivo 2光子 Ca^{2+} イメージング]

カルシウム指示タンパク発現神経細胞のin vivo Ca^{2+} イメージングは右バレル野の第2 / 3 層 (軟膜から約150 ~ 300 μm 下部) で実施した。カルシウム指示タンパクの発現は、CAGプロモーターによって行った。CAGプロモーターによる永続的なカルシウム指示タンパクの発現は、測定可能な神経細胞毒性を引き起こさなかった。

【 0 0 5 9 】

感覚刺激は、短いエアパフ (40 ~ 45 psiで50 ms) を用いて対側のひげに与えた。神経細胞集団の自発的および感覚誘発活動は、3分間、 256×192 画素 (サンプリングレート = 2.3 Hz) の分解能で取得した。単一神経細胞における Ca^{2+} 変動の高速撮像のために、高速ラインスキャン (サンプリングレート = 650 ~ 700 Hz) は、皮質ニューロンの細胞体で行った。樹状突起イメージングのために、可能な限り1焦点面に多くの目に見えるスパインと樹状突起が入るように選択した。イメージングは、22秒、 232×64 ピクセルの解像度 (サンプリングレート = 4.3 Hz) で取得した。

40

【 0 0 6 0 】

[Ca^{2+} イメージング及び in vivo loose-seal cell attachment 電気記録法の同時測定]

in vivoでのセルアタッチ記録は、蛍光物質 (Alexa488, 50 μM) を含むACSFで満たさ

50

れたガラス電極 (5-7M オーム) を用いて行った。カルシウム指示タンパクを発現させたバレル野の神経細胞に、2光子ターゲットのパッチ法 (Neuron, 2003, 39, 911-918) を適用した。セルアタッチ成立から約10分後、スパイク記録と高速ラインスキャンの Ca^{2+} イメージング (サンプリングレート=675 Hz) の同時測定を細胞体にて実施した。電気生理学的データは、クランプモードでEPC10増幅器 (HEKA) を用いて増幅した。10kHzでフィルターをかけて、20kHzでデジタル化した。さらにオフラインで100Hzのハイパスフィルターをかけた。スパイクの検出は、MATLABを使用して、閾値処理することにより自動的に計数した。

【0061】

以上に説明した材料と方法については、本願優先日後に公表された文献 (Nature Methods, 2015, Vol.12, No.1, p.64-70) も参照できる。

【0062】

2. 結果

R-CaMP2とR-GECO2Lは、 K_d 値が100nM以下であった (図3参照)。また、R-CaMP2とR-GECO2Lは、 Ca^{2+} 非存在下の基底蛍光値 (Baseline Fluorescence) においてはR-CaMP1.07に比べて同等ないし2倍以内に留まり、ダイナミックレンジにおいてはR-CaMP1.07には劣るものの5倍以上であった。(図4参照)。

【0063】

R-CaMP2とR-GECO2Lを初代海馬培養神経細胞に発現させた。また、赤色指示薬の蛍光スペクトルと分離するEGFPを体積のコントロールとして発現させた。R-CaMP2は特徴的な核外の局在を示した (図5A)。一方、R-GECO2Lは細胞質だけでなく核内にも局在を示した (図5B)。さらに、R-CaMP2及びR-GECO2Lは、樹状突起、軸索及びシナプス終末において一様な分布を示した。

【0064】

フィールド電気刺激による単一活動電位 (1AP) (図6) 及び細胞体近傍へのUVパルスレーザーによる単一のナノ秒パルスによるMNI-glutamateのアンケイジング (図7) は、顕著な Ca^{2+} 変動を引き起こし、単一指数関数でフィットできた。

【0065】

R-CaMP2及びR-GECO2Lは、in vitroにおいて既存の蛍光カルシウム指示タンパクよりもずっと高い Ca^{2+} 親和性を示した (表1)。加えて、R-CaMP2及びR-GECO2Lは、生きた神経細胞において、R-GECO1及びR-CaMP1.07よりも早いキネティクスを有した (図8~11)。さらに、R-CaMP2の F/F の振幅応答はR-CaMP1.07より3倍以上大きく、R-GECO2L (図8, 9) より大きかった。

【0066】

【表1】

	dynamic range:		
	F_{max}/F_{min}	K_d (nM)	Hill coefficient
R-GECO1	9.7 ± 0.7	223 ± 95	2.0 ± 0.2
R-CaMP1.07	15.4 ± 1.4	192 ± 4	1.7 ± 0.1
R-CaMP2	5.8 ± 0.6	69 ± 8	1.2 ± 0.1
R-GECO2L	5.1 ± 0.3	26 ± 3	1.3 ± 0.3
GCaMP3	9.4 ± 0.2	365 ± 8	2.6 ± 0.1
GCaMP5G	19.2 ± 1.0	371 ± 13	2.8 ± 0.2
GCaMP6f	23.1 ± 3.0	296 ± 8	2.1 ± 0.1
GCaMP6s	31.8 ± 3.0	152 ± 8	2.7 ± 0.4
G-CaMP6※	11.4 ± 0.1	158 ± 4	3.1 ± 0.2
G-CaMP7※	36.6 ± 4.1	243 ± 14	2.7 ± 0.4
G-CaMP8※	37.5 ± 3.6	200 ± 1	2.2 ± 0.2

10

20

30

40

50

P L O S O n e , 2 0 1 2 , 7 , e 5 1 2 8 6 参照。

【 0 0 6 7 】

【 表 2 】

	Kd (nM)	Hill coefficient	F _{max} /F _{min}
R-CaMP2_LLA	97 ± 10	1.1 ± 0.1	5.1 ± 0.3

【 0 0 6 8 】

R - C a M P 2 及び R - G E C O 2 L は、1 近くのヒル係数を有する（表 1）。これは O G B - 1 (J. Neurosci., 2008, 7399-7411) のような化学合成されたカルシウム指示薬のヒル係数とほぼ同じである。このことは、既存の蛍光カルシウム指示タンパクの多くが、ヒル係数 2 以上（表 1）であることと明確に異なる。

【 0 0 6 9 】

脳組織中の R - C a M P 2 の有用性を検証するために、子宮内電気穿孔法 (J. Neurosci., 2009, 29, 13720-13729) にてバレル野第 2 / 3 層の神経細胞に R - C a M P 2 を導入し、成体マウスにおいて急性スライスを作成した。チタンサファイアレーザーで励起し、R - C a M P 2 発現神経細胞の細胞体および近位樹状突起において、ホールセルパッチクランプと組み合わせて高速 (700 Hz 近傍) の 2 光子ラインスキャンで C a²⁺イメージングを行った。R - C a M P 2 _ L L A についても同様の実験を行った。

【 0 0 7 0 】

初代海馬培養神経細胞の結果と同様に、単一の脱分極電流注入による F / F 応答振幅は、R - C a M P 1 . 0 7 発現神経細胞より R - C a M P 2 発現神経細胞の方が有意に大きかった (図 1 2、1 3)。信号対雑音比 (SNR: signal to noise ratio) (最大 4.0 倍大きい)、立ち上がり時間 (最大 2.6 倍早い)、減衰時定数 (最大 3.4 倍早い) において、R - C a M P 2 は、R - C a M P 1 . 0 7 に比して数倍の改善を示した (図 1 3 - 1)。R - C a M P 2 _ L L A は、R - C a M P 2 に比してさらに早い立ち上がり時間を示した (図 1 3 - 2)。なお、G C a M P 6 s , G C a M P 6 f は、M 1 3 配列を用いたカルシウムセンサーである。

【 0 0 7 1 】

R - C a M P 2 は、これらの改善されたパラメータと一致して、最大 4 パルスに対する電流注入の連続パルスまで F / F 振幅および SNR の改善を示した (図 1 4)。また、20 ~ 40 Hz の連続した活動電位までは単一の試行でも判別することができた (図 1 5 - 1、B)。同じ実験条件下で、R - C a M P 1 . 0 7 発現神経細胞から記録した C a²⁺シグナルは、よりベースラインのノイズが大きく、また立ち上がり時間が遅く、5 Hz の周波数のパルスまでしか活動電位を判別できなかった (図 1 5 - 1、A)。R - C a M P 2 _ L L A は、R - C a M P 2 に比してさらに高周波数の刺激に追従し、50 Hz までの分解能を有した (図 1 5 - 2)。

【 0 0 7 2 】

麻酔下の頭固定マウスのバレル野第 2 / 3 層の神経細胞における in vivo での C a²⁺イメージングを行った。第 2 / 3 層錐体神経細胞の約 30 ~ 60 % を標識した条件下では、自発的な C a²⁺スパイクを確実に記録できた (図 1 6)。触覚情報の表現はまばらな神経細胞にコードされている (Neuron, 2010, 67, 1048-1061、Neuron, 2013, 78, 28-48、Trends Neurosci., 2012, 35, 345-355)。これと一致して、ひげへのエアパフ刺激は限られた細胞でしか C a²⁺変動が生じなかった。また、R - C a M P 2 ベースの C a²⁺変動に刺激相関活性を示すアクティブ神経細胞は、連続的なエアパフ刺激の際に誘発反応を起こした。つまり、バレル野での感覚刺激に応答するアクティブな神経細胞を同定することができた。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

in vivoでの記録の解像度を確認するために、*loose-seal cell at tached*電気記録法と同時に、高速ラインスキャンの Ca^{2+} イメージングを行った(図17)。自発的な活動電位は、5パルスまでSNR、振幅、振幅の時間積分のそれぞれの応答において、線形に近い増加を示した(図18)。以上より、R-CaMP2はin vivoにおける単一の活動電位に伴う Ca^{2+} 変動の立ち上がりと減衰時間のキネティクスが、これまでに報告されているGCaMP6f(Nature, 2013, 499, 295-300)またはfast-GCaMP(Nat. Commun., 2013, 4, 2170)といった早いキネティクスを持つ緑色蛍光カルシウム指示タンパクと同程度であることが明らかになった。

【配列表フリーテキスト】

【0074】

配列番号1: CaMKKのサブユニットに由来するckkap配列(ckkap)をコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号2: CaMKKのサブユニットに由来するckkap配列(ckkap)をコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号3: ckkap-WLをコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号4: CaMKKのサブユニットに由来するckkap配列(ckkap)のアミノ酸配列。

配列番号5: CaMKKのサブユニットに由来するckkap配列(ckkap)のアミノ酸配列。

配列番号6: ckkap-WLのアミノ酸配列。

配列番号7: R-CaMP2のCaM配列をコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号8: R-GECO2LのCaM配列をコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号9: R-CaMP2のCaM配列のアミノ酸配列。

配列番号10: R-GECO2LのCaM配列のアミノ酸配列。

配列番号11: R-CaMP2のアミノ酸配列。

配列番号12: R-CaMP2をコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号13: R-GECO2Lのアミノ酸配列。

配列番号14: R-GECO2Lをコードするヌクレオチドの塩基配列。

配列番号15: ckkap-WL2のアミノ酸配列。

配列番号16: ckkap-WL3のアミノ酸配列。

配列番号17: ckkap-WL4のアミノ酸配列。

配列番号18: ckkap-WL5のアミノ酸配列。

配列番号19: ckkap-WL6のアミノ酸配列。

10

20

30

【 1 】

R-CaMP1.07 MGS- M13 cpApple CaM F2A

R-CaMP2 MGS- ckkap-WL cpApple CaM F2A

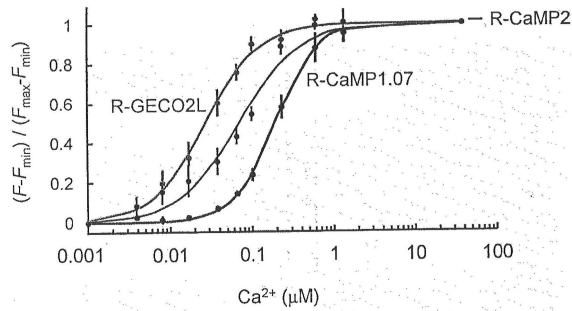
【 2 - 1 】

ckkapα VKLIPSWTTVILVKSM L RKR SFGNPF (配列番号4)
 ckkapβ VKHIPS L A TVILVK T M I RKR SFGNPF (配列番号5)
 ckkap-WL VKLIPSL T TVILVK S M L RKR SFGNPF (配列番号6)

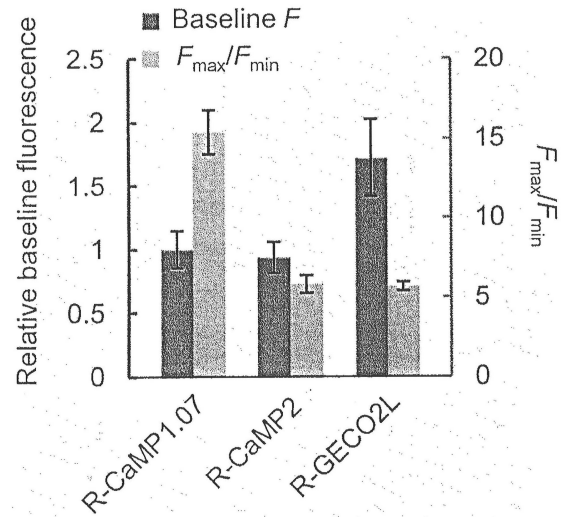
【 2 - 2 】

ckkap-WL : V K L I P S L T T V I L V K S M L R K R S F G N P F (配列番号6)
 ckkap-WL2: V K H I P S W T T V I L V K S M L R K R S F G N P F (配列番号15)
 ckkap-WL3: V K H I P S L T T V I L V K S M L R K R S F G N P F (配列番号16)
 ckkap-WL4: V K H I P S W A T V I L V K S M L R K R S F G N P F (配列番号17)
 ckkap-WL5: V K L I P S L A T V I L V K S M L R K R S F G N P F (配列番号18)
 ckkap-WL6: V K L I P S W A T V I L V K S M L R K R S F G N P F (配列番号19)

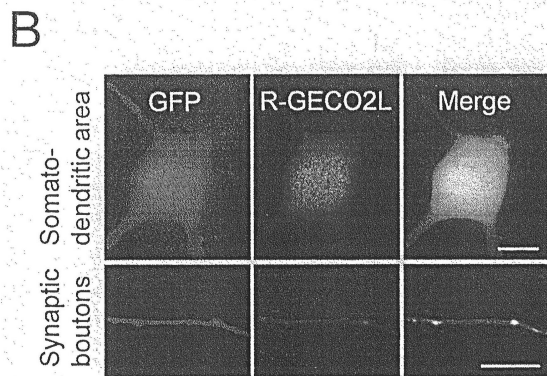
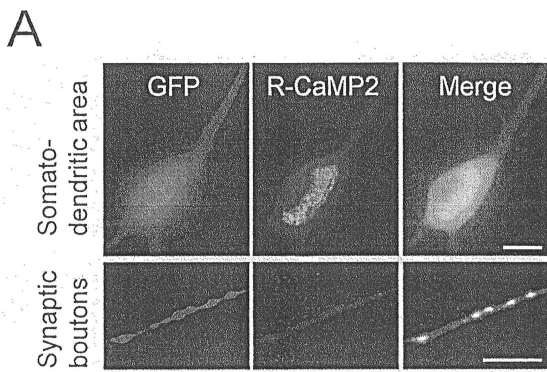
【 3 】



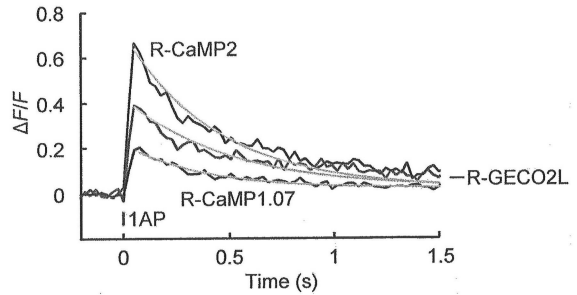
【 4 】



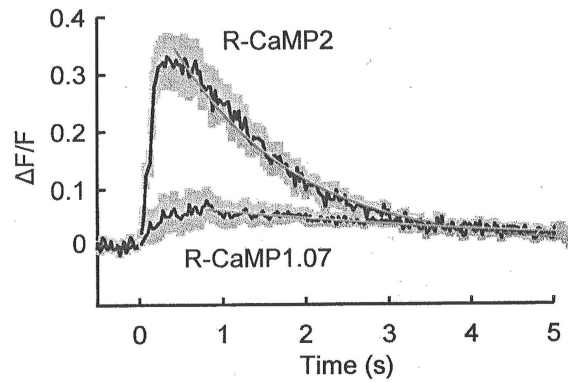
【 5 】



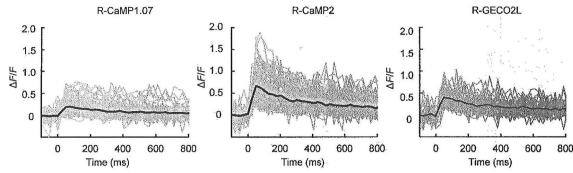
【 6 】



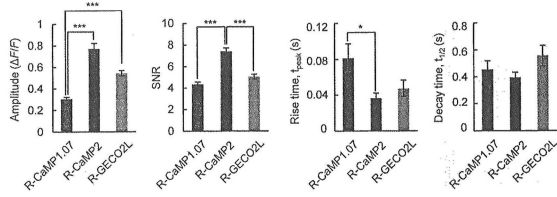
【 7 】



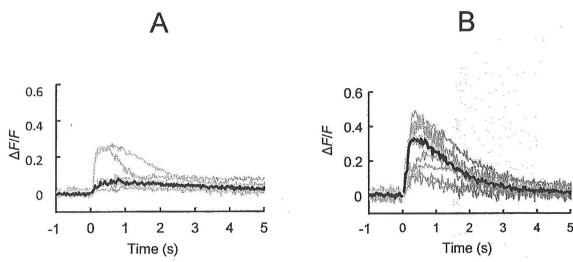
【 8 】



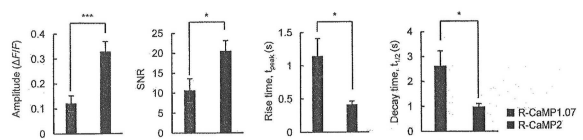
【 9 】



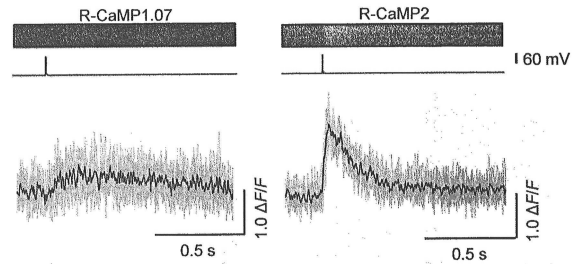
【 10 】



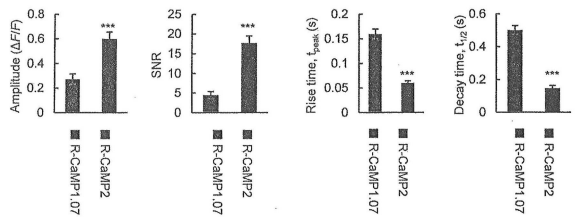
【 11 】



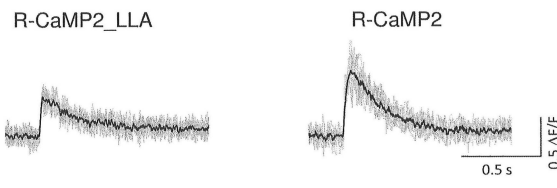
【 12 】



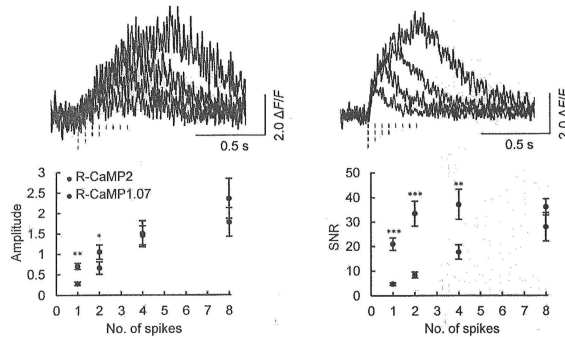
【 13 - 1 】



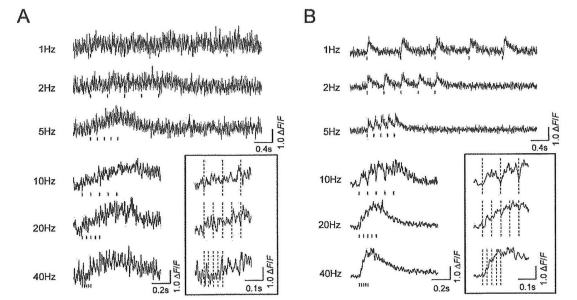
【 13 - 2 】



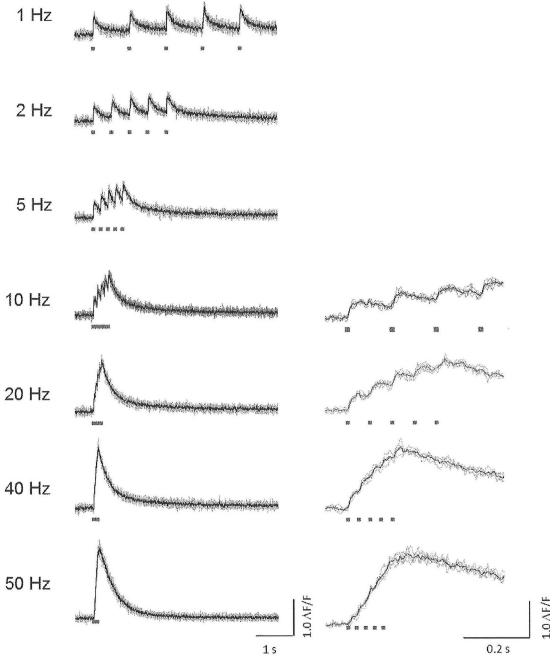
【 14 】



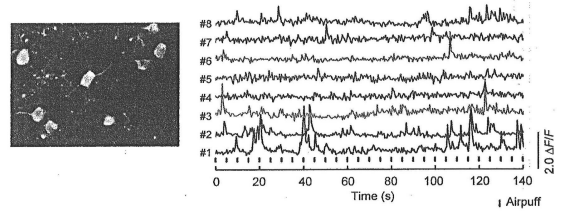
【 15 - 1 】



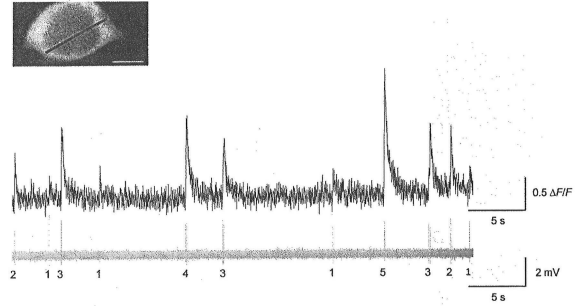
【 15 - 2 】



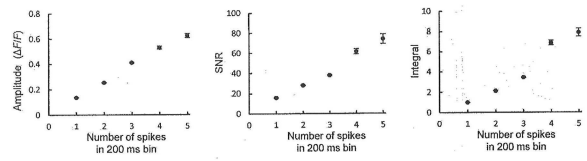
【 16 】



【 17 】



【 18 】



【 配列表 】

0006462684000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 0 1 K 67/027 (2006.01)		A 0 1 K 67/027
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 14/435 (2006.01)		C 0 7 K 14/435
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02

(72)発明者 竹内 敦也
東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 神経生理学分野内

(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 大学院理工学研究科内

(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 大学院理工学研究科内

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特開2014-001161(JP,A)
国際公開第00/071565(WO,A1)
Nature Methods, 2014年11月24日, Vol.12, pp.64-70
PLOS ONE, 2012年, Vol.7, Issue 12, e51286
PNAS, 2006年, Vol.103, pp.4753-4758
Nature, 2013年, Vol.499, Pages 295-302
Nature structural biology, 2001年, Vol.8, No.12, Pages 1069-1073

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 /
C 1 2 Q 1 / 0 2
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q
P u b M e d