オルガネラ内腔 Ca^{2+} イメージングの最前線

大久保洋平

細胞内小器官（オルガネラ）である小胞体やミトコンドリアは、細胞内 Ca^{2+} ストアとして機能しており、 Ca^{2+} の取り込みと放出を通じて細胞内 Ca^{2+} シグナルに大きな影響を及ぼす。よって Ca^{2+} シグナル機構の理解には、細胞質だけでなく小胞体およびミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 動態を解析することが不可欠である。また小胞体およびミトコンドリア内腔の Ca^{2+} は病態にも密接に関連しており、この点からも解析法の開発が重要である。本稿では、オルガネラ内腔 Ca^{2+} イメージングの歴史と進展について、我々の最近の取り組みを中心に紹介する。

オルガネラ内腔の Ca^{2+} を選択的に検出するためには、 Ca^{2+} 指示分子（インジケーター）をオルガネラ内腔に局在させる必要がある。Fura-2 などに代表される小分子インジケーターを用いる場合は、細胞質の余剰なインジケーターを除くために細胞膜を界面活性物質などで透過処理する必要がある、インタクトな細胞での測定は不可能であった(1)。一方、タンパク質である、gene-encoded calcium indicator (GECI) を用いる場合は、オルガネラ局在化シグナル配列が利用できるため、この問題は解決される。最初に GECI として実用化されたのは、 Ca^{2+} 依存的に発光反応を惹起するタンパク質、エクオリンであった。オルガネラ内腔の Ca^{2+} 濃度域（小胞体内腔：0.1~1 mM, ミトコンドリア内腔：0.05~300 μM ）に親和性を適合させるための変異、および局在化シグナル配列の付与を施すことで、これまでに様々なオルガネラ内腔の Ca^{2+} 動態が報告され、当該研究分野に大きく寄与してきた(2)。しかし発光による光量は非常に小さいため、細胞集団の解析に専ら用いられ、一細胞レベルのイメージングはほとんど不可能であった。ただし最近、発光効率を大幅に向上したコンストラクトが開発され、一細胞レベルでのイメージングも可能になってきている(3)。

エクオリン実用化の後、カルモジュリン等の Ca^{2+} 結合タンパク質を融合させることで、蛍光タンパク質に Ca^{2+} 感受性を付与した GECI が開発された。これにより、高解像度イメージングに資するオルガネラ内腔用 Ca^{2+} インジケーター開発の道が拓かれた。最初の蛍光タンパク質型 GECI の報告時に、細胞質のみならず小胞体内腔への応用例も示された(4)。これを受け、 Ca^{2+} 親和性の最適化をはじめとした変異が我々のグループを含め各国で進められ、小胞体およびミトコンドリア内腔 Ca^{2+} 動態を一細胞レベルの解像度で観察

することが実現された(5-8)。しかしながら、細胞内の局所のシグナルを取得するにはシグナル／ノイズ比が十分ではなく、さらなる高性能化が待たれていた。近年、蛍光タンパク質型 GECI の大幅な性能向上が相次いで報告された(9-11)。我々はこれら新世代の GECI を基にした、新規のオルガネラ内腔用 Ca^{2+} インジケーター開発に着手した。 Ca^{2+} 親和性最適化のための変異部位などを一から見直し、多数の候補分子を作製してスクリーニングを行なった。その結果、小胞体用として、それぞれ青、緑、赤色の蛍光をもつ複数のインジケーターを得て、またミトコンドリア用としては、幅広い Ca^{2+} 濃度域に対応するために親和性の異なる複数のインジケーターを得た。そして、これら一群のインジケーターを Calcium-measuring organelle-Entrapped Protein IndicAtor (CEPIA) と命名した(12)。CEPIA は過去に報告されたインジケーターのシグナル／ノイズ比を大幅に凌駕しており、細胞内局所のオルガネラ内腔 Ca^{2+} 動態を高解像度で可視化することが可能となった。これにより得られた成果のいくつかを例示すると、①小胞体内腔での Ca^{2+} ウェーブの発見、②神経細胞の樹状突起スパイン内の小胞体内腔 Ca^{2+} 動態の可視化、③細胞質、小胞体内腔、ミトコンドリア内腔 Ca^{2+} 動態の同時イメージング、などが挙げられる。詳細については文献 12 を参照されたい。

CEPIA を用いた研究はまだ端緒についたばかりであり、今後新たな知見が次々に解明されることが期待される。また GECI の開発は現在も世界中で活発に進められており、今後のさらなる高性能化も期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Hirose K, et al. Nature. 1994;372:791-794.
- 2) Bonora M, et al. Nat Protoc. 2013;8:2105-2118.
- 3) Saito K, et al. Nat Commun. 2012;3:1262.
- 4) Miyawaki A, et al. Nature. 1997;388:882-887.
- 5) Palmer AE, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:17404-17409.
- 6) Ishii K, et al. EMBO Rep. 2006;7:390-396.
- 7) Palmer AE, et al. Chem Biol. 2006;13:521-530.
- 8) Tang S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:16265-16270.
- 9) Zhao Y, et al. Science. 2011;333:1888-1891.
- 10) Ohkura M, et al. PLoS One. 2012;7:e1286.
- 11) Chen TW, et al. Nature. 2013;499:295-300.
- 12) Suzuki J, et al. Nat Commun. 2014;5:4153.

キーワード：カルシウム、小胞体、ミトコンドリア

東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

E-mail: yoheio@m.u-tokyo.ac.jp 原稿受領日：2014 年 8 月 15 日、依頼原稿

Title: Recent topics in intraorganellar Ca^{2+} imaging Author: Yohei Okubo