

# スプリットルシフェラーゼマウスを用いた神経精神疾患研究

富山大学大学院医学薬学研究部（医学）分子神経科学講座 助教  
石本哲也

## （１）スプリットルシフェラーゼとは何か？

ホタルルシフェラーゼは、ルシフェリン＝ルシフェラーゼ反応によって発光を呈する蛋白質で、発光蛋白質の中では最も古くから知られ解析がなされてきた。哺乳類細胞内でホタルルシフェラーゼを発現させた場合、培地へのルシフェリン投与に対して発光を呈する。しかしルシフェラーゼをN末端（lucN）、C末端（lucC）のドメインに分割した状態（スプリットルシフェラーゼ）で細胞内に発現させると、もはやルシフェラーゼとしての活性を失い発光しない。ところがこれらスプリットルシフェラーゼに、互いに結合するペプチド配列を融合させることで、lucN, lucCの距離が短くなり発光能を復活させることができる。つまり lucN, lucC に融合したペプチド同士の結合を、発光を指標にして計測できる実験手法といえる。

## （２）CREB リン酸化検出スプリットルシフェラーゼの開発

今回の発表では、cAMP response element binding protein(CREB)リン酸化（活性化）を発光計測するために、スプリットルシフェラーゼ法を用いた。CREB は転写因子として知られ、記憶形成などの脳機能に深くかかわっていることが知られているが、同時に薬物中毒や精神神経疾患にもかかわることが知られている。

CREB のリン酸化ドメイン（KID）は、神経細胞の活動に応じてリン酸化され立体構造を変化させる。さらにリン酸化 KID ドメインは、CBP 蛋白質の KIX ドメインに結合した後、転写が活性化されることが明らかになっている。ホタルルシフェラーゼを N 末端（lucN）と C 末端(lucC)に分割し、両者を CREB の KID ドメインと、KIX ドメインに融合させた。KID がリン酸化されることにより KIX と結合し、分割したルシフェラーゼの N 末端と C 末端が相互作用し発光する（図 1）。

培養細胞レベルで

このスプリットルシフェラーゼからの発光が、CREB のリン酸化を引き起こすことが知られ

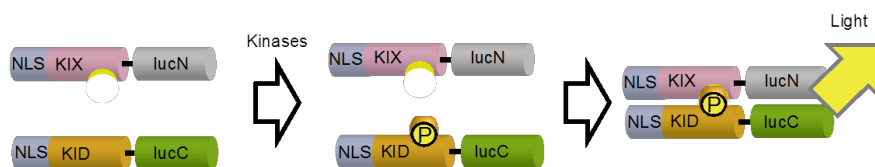


図1 KIDドメインのリン酸化により、スプリット・ルシフェラーゼからの発光が上昇する

ているフォスホコリン処理によって増強されることを確認した。さらに KID ドメイン内のリン酸化を受けるセリンをアラニンに置換することで、この反応がキャンセルされることも併せて確認することができた。すなわちスプリットルシフェラーゼ法を用いて、CREB リン酸化を検出することができる結論付けられた。

## （３）スプリットルシフェラーゼの精神神経疾患解析への応用

CREB リン酸化検出スプリットルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスシステムを作

製した。このマウスに抗うつ剤(Imipramine, Fluoxetine)を急性投与すると、マウス脳からの発光強度が上昇することが観察できた。またこのマウスの脳内 CREB をウエスタンブロットで解析すると、リン酸化が亢進していることが明らかになった。これらのことから、生体脳中の CREB リン酸化を計測することに成功したと結論できる。

次にうつ状態を誘導できるレセルピンをトランスジェニックマウスに投与し、うつ様症状の重篤度を尾懸垂試験により測定した。また、

レセルピン投与前後での脳における発光の変化も計測し、脳のどの部位での CREB リン酸化亢進が、うつ様症状の重篤度と相関が高いか解析した(図2)。この結果から、脳内の特定部位での CREB リン酸化上昇が、うつ様症状と相関が高いということが明らかになった。この手法により CREB のうつ症状における役割の解明が期待できる。

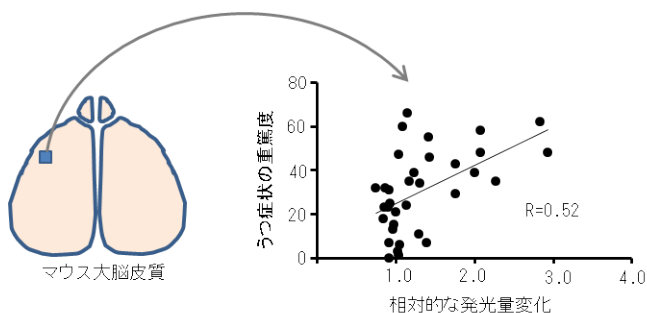


図2 CREBリン酸化の変化とうつ症状の重篤度の相関

#### (4) スプリットルシフェラーゼ発現細胞の薬剤スクリーニングへの応用

CREB による転写活性の上昇は脳において記憶形成に必要と考えられている一方、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などの精神神経疾患や薬物依存では CREB リン酸化が異常に亢進しているという報告がある。すなわち CREB リン酸化を阻害する化合物はこれらの疾患の治療薬となることが期待される。

CREB リン酸化検出スプリットルシフェラーゼを HEK293T 細胞に発現させ、CREB リン酸化経路を活性化させるフォルスコリンを加えると、KID と KIX の結合に伴って N, C 末端ルシフェラーゼが会合し発光することをまず確かめた。

スプリットルシフェラーゼを発現した HEK293T 細胞に 4800 種類の化合物を添加し、同時にフォルスコリンを用いて CREB リン酸化経路を活性化させた。フォルスコリンによる発光上昇を抑える効果のある化合物を探索した結果、CREB リン酸化の上流酵素であるアデニル酸シクラーゼ、

プロテインキナーゼ A に対して阻害効果のある化合物を新規に同定できた(図3)。これらのことから、スプリットルシフェラーゼを用いた化合物スクリーニングが有効に機能することがわかった。

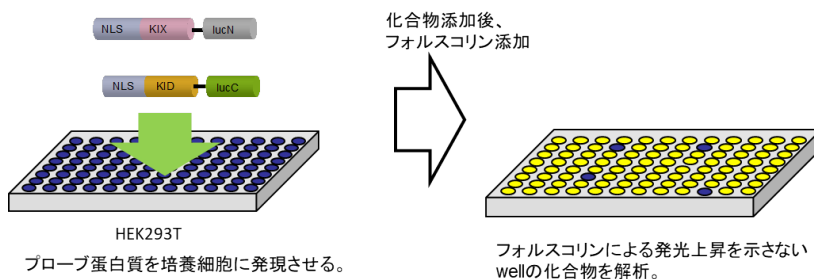


図3 スプリットルシフェラーゼを用いた薬剤スクリーニング

## 学歴

- 1994年3月 大阪大学基礎工学部生物工学科卒業
- 1996年3月 大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学分野博士前期修了
- 1999年3月 大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学分野博士後期単位取得退学
- 2000年3月 博士（理学）取得

## 職歴：

- 1999年4月 大阪工業技術研究所脳神経工学研究室
- 2002年4月 産業技術総合研究所 人間系特別研究体
- 2004年4月 産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門
- 2004年11月 富山医科薬科大学医学部分子神経科学講座助手
- 2005年10月 富山大学医学薬学研究部分子神経科学講座助教在籍中
- 2005年10月-2009年3月 JST さきがけ（生命現象と計測分析）研究員併任

## 所属学会

北米神経科学学会、アメリカ化学学会、日本神経科学学会、日本分子生物学会、日本薬理学会、日本バイオイメージング学会