

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月19日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14229

研究課題名(和文)新規細胞内環境モニター蛍光タンパク質開発技術の確立

研究課題名(英文) Development of fluorescent sensor protein to monitor the intracellular environment

研究代表者

久堀 徹 (Hisabori, Toru)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：40181094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体内の微細環境をリアルタイムモニターする細胞内環境モニター蛍光タンパク質の開発を目指した。特に注目したのは、細胞内のレドックス変化のモニターと生体内低分子代謝産物のモニターである。生体内のレドックス状態変化については、既に開発したOba-QやRe-Qの設計思想を活かして、新たに細胞内の酸化還元制御の鍵タンパク質であるチオレドキシンのレドックス状態を直接モニターすることの出来るタンパク質の開発に成功した。生体内の低分子代謝産物に関しては、十分な蛍光変化を示すタンパク質を得るには到らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我々が最近成功した環境応答型蛍光タンパク質の開発実績を踏まえて、細胞内の様々な代謝産物の増減をリアルタイムで直接モニターすることの出来る新規細胞内環境モニター蛍光タンパク質を開発するための技術を確立することを目指した。その結果、光環境の変化に応じて植物の生理機能を調節するタンパク質として最も重要なチオレドキシンの状態変化をリアルタイムにモニターできるタンパク質CROSTを新たに開発した。このタンパク質は、論文発表後、国際的な反響も大きくすでにドイツの研究者とMTAを締結して、遺伝子の供与を行っている。

研究成果の概要(英文)：This research intended the development of the intracellular environment monitor fluorescence protein, which can monitor the micro-environment in vivo.

We especially tried to develop the monitor protein for the intracellular redox change, and that for the in vivo low molecular metabolic-product. Applying the molecular design of already developed Oba-Q and Re-Q, we succeeded in the development of the new sensor protein which can monitor the redox state of thioredoxin, which is the key protein for the intracellular oxidation-reduction control. However, we could not obtain the sensor protein which can show an enough signal change for the low molecular metabolic-product until now.

研究分野：植物生化学、生体エネルギー変換

キーワード：レドックス 蛍光タンパク質 チオレドキシン FRET BRET 環境センサー

1. 研究開始当初の背景

細胞内の微細環境をモニターするタンパク質としては、緑色蛍光タンパク質をベースに開発された酸化還元モニター用の roGFP や pH モニター用の pHluorin がよく知られている。roGFP は 2004 年に Hanson らによって発表された GFP の変異タンパク質で、バレル構造上に酸化によってジスルフィド結合を形成可能な二つのシステインを導入したことで、この結合の形成と解離に伴って発色団の電離状態が変化して蛍光の励起スペクトルの形状が変化する。励起スペクトルの 400 nm と 475 nm の蛍光の二つのピークの比を測定することで、この蛍光タンパク質が置かれている環境の酸化還元状態を測定することが出来る。しかし、GFP の発色団のアミノ酸はチロシンであり、その電離状態は環境の pH が変化した場合にも変化してしまう。また、このタンパク質の励起スペクトルの形状の変化は、蛍光顕微鏡のような特定の波長でモニターする測定機器では、リアルタイムに観測することが難しい等の問題がある。また、GFP は汎用性の高い蛍光モニタータンパク質ですでに様々な細胞内の観測に用いられているが、二つの異なる生理現象を同時に観測するためには、GFP とは異なる励起波長、蛍光波長をもったタンパク質の方が好都合である。

このような要請から、我々はより汎用性の高い、また、他の GFP マーカーとも共存可能な酸化還元応答蛍光タンパク質を得ることを目指して、青色蛍光タンパク質 Sirius、および、CFP をベースとして新規の酸化還元応答性蛍光タンパク質の開発を進めた。その結果、酸化条件下で分子内にジスルフィド結合を形成しても吸収スペクトルには一切変化せず、蛍光ピークが劇的に減少する変異タンパク質、すなわち、酸化によって消光するタンパク質の開発に成功した (特願 2013-205598)。この新たに作成した変異タンパク質をベースとしてランダム変異を行い、環境の変化に対して分光特性の変化がより大きなタンパク質を探索したところ、発色団がより長波長側のものや、酸化ではなく還元によって消光するものなど、様々な酸化還元モニターとなり得る変異体タンパク質を作成することに成功した (特願 2014-199401)。

2. 研究の目的

これら一連の研究により、すでにこの蛍光タンパク質に新規のモニターとしての機能を付与するための変異導入の標的が絞り込まれていることから、このような蛍光タンパク質に細胞内の代謝産物を基質として結合する酵素・タンパク質をリンカーを介して接続した場合に、結合によって生じるリンカータンパク質の構造変化などを利用して、これら基質となる代謝産物の動態をリアルタイムに可視化可能なタンパク質を得ることが出来るものと期待された。そこで、本研究で

は、すでに結晶構造が解明されている酵素タンパク質の中から、基質の結合によって構造が変わる、あるいは、表面電荷が変わるなどの変化を起こすタンパク質を選抜、場合によっては設計し、これらと GFP 変異体の融合タンパク質を作成することで、様々な細胞内代謝産物を測定することの出来る新規蛍光モニタータンパク質を開発することを目指した。

3. 研究の方法

以下のように、細胞内微細環境の検知と生体分子の検知の 2 点に目的を絞って研究を実施した。

(1) 酸化還元物質を検知して蛍光が変化するタンパク質のスクリーニング

・活性酸素 (ROS)

活性酸素は、生体内のタンパク質・核酸と反応することで、これらを不活化したり、誤った情報伝達を導いたりする、生体にとっては様々な酸化障害をもたらす物質である。また、最近では、微量の活性酸素が細胞内のシグナル因子として重要であることが明らかにされている。これまで、活性酸素種と特異的に反応して蛍光を示す、あるいは、発色するなどの方法で定量化する試薬が複数開発されている。しかし、生きた細胞内で増減する活性酸素を顕微鏡下でリアルタイムに観察する手段はなかった。

・酸化還元応答タンパク質

すでに我々が開発した酸化還元によって蛍光を変化させる蛍光タンパク質は、分子内のジスルフィド結合を形成することで蛍光の消光、あるいは、蛍光の発光を示すので、活性酸素の酸化力を受けて間接的にジスルフィド結合を誘導する酵素 (以降、アンテナタンパク質とよぶ) をこの蛍光タンパク質に適当なリンカーを用いて融合させることで、細胞内の ROS をリアルタイムに蛍光変化として捉えることが出来るようになると予想され、アンテナタンパク質の選抜を行った。

(2) 生体分子を検知して蛍光が変化するタンパク質のスクリーニング

グルタチオンは、システインを含むトリペプチドであり、生体内に一般に mM オーダー存在し、また、システインの側鎖のチオールによってジスルフィド結合を形成することが出来るため、酸化還元緩衝能力を有する。酸化型と還元型のグルタチオンの存在量の変動のダイナミクスを知ることは、細胞内の酸化還元状態のダイナミクスをモニターするための一つの重要な情報となる。我々は、すでに酸化還元応答型蛍光タンパク質とグルタレドキシンの融合タンパク質を用いて、簡便にグルタチオンを測定する方法は確立している。さらに、高感度化を図るために、

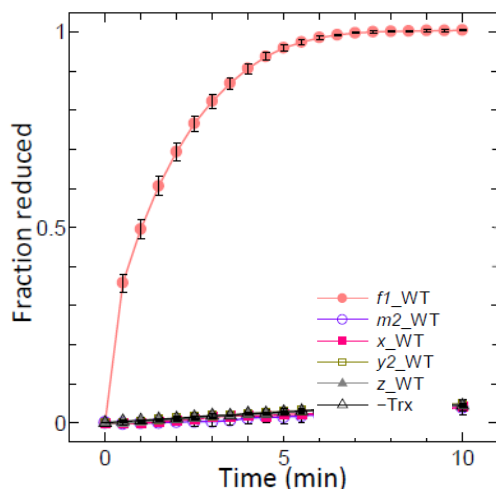
グルタチオン結合タンパク質をアンテナタンパク質として、酸化型と還元型のグルタチオンの変動を蛍光の消光の形で直接モニターする新規のモニタータンパク質を作成する。このような低分子についても、アンテナタンパク質として適当なタンパク質のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

本研究では、我々が最近成功した環境応答型蛍光タンパク質の開発実績を踏まえて、細胞内の様々な代謝産物の増減をリアルタイムで直接モニターすることの出来る新規細胞内環境モニター蛍光タンパク質を開発するための技術を確立することを目指した。

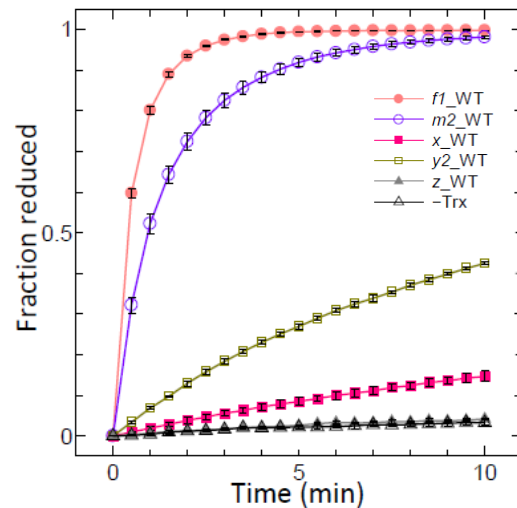
(1) 酸化還元物質の存在を検知して蛍光が変化する新規タンパク質の開発では、酸化還元に関わる細胞内低分子と電子の授受を行うタンパク質を Oba-Q に融合することで、新規にこれらの細胞内低分子の検出することが出来るシステムの開発を目指した。酸化還元応答型蛍光タンパク質として実績のある roGFP で成功例のあるグルタチオンペルオキシダーゼを融合した蛍光タンパク質では、活性酸素に対する明確な蛍光感受性を得られたが、その他のタンパク質を用いた活性酸素検出系の確立は出来なかった。

そこで、センサーの標的を生体内で酸化還元するタンパク質そのものに絞り、酸化還元応答型蛍光タンパク質の新たな開発を行った。特に生体内で酸化還元調節の鍵タンパク質であるチオレドキシシンによって特異的に還元される蛍光変化を示すユニークなタンパク質の作成を行った。その結果、細胞内の酸化還元変化を中心的に他のタンパク質に伝達するチオレドキシシンの酸化還元状態をモニターする新規蛍光センサータンパク質の開発に成功した。この新規酸化還元応答タンパク質は、チオレドキシシンによって特異的に還元され構造変化する葉緑体タンパク質の部分配列を利用して、励起・蛍光波長の異なる二種類の蛍光タンパク質を接続し蛍光変化を誘導するものである。まず、下図に示すとおり、



葉緑体の f 型チオレドキシシンで特異的に還元され、蛍光シグナルを発するタンパク質を得た (change in redox state of Trx #1, CROST1 と命名)。

次に、接続部位に使用したタンパク質をシアノバクテリア由来のものに変更したタンパク質を作成した。シアノバクテリア由来のタンパク質は f 型だけでなく m 型のチオレドキシシンによっても還元される性質がある。実際、新たに作成した蛍光タンパク質 (CROST2) は、m 型チオレドキシシンによっても効率よく還元される性質を示した。



上記の二種類のセンサータンパク質を利用して、これまで、二種類の主要なチオレドキシシンアイソフォームである f 型と m 型の酸化還元状態を特異的に見分けることに成功した。このユニークなタンパク質を、シアノバクテリアや緑色植物葉緑体内に導入し、in situ でのリアルタイム観察にも成功した。

(2) 生体内低分子の動態を検知して蛍光が変化するタンパク質の開発については、アデニンヌクレオチド、グルタチオン、NADH、NADPH、および、関連低分子に対して親和性を持ち蛍光が変化するタンパク質の作成を試みた。しかし、これらの低分子化合物を基質とするタンパク質をアンテナタンパク質としても、基質結合により蛍光変化を引き起こすのに十分な構造変化を示すタンパク質を同定することが出来なかった。このため、これらの生体内低分子については、これを検知する蛍光変化を示すタンパク質を研究期間内に開発することが出来なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

The thioredoxin (Trx) redox state sensor protein can visualize Trx activities in the light/dark

response in chloroplasts.

Sugiura K, Yokochi Y, Fu N, Fukaya Y, Yoshida K, Mihara S, Hisabori T.
J Biol Chem. 2019 Aug 9;294(32):12091-12098.
doi: 10.1074/jbc.RA119.007616.

〔学会発表〕(計4件)

(1) Kazunori Sugiura, Toru Hisabori
Making New Redox Sensitive Fluorescence Proteins
CLS, Tokyo Tech. International Forum 2018;
Redox regulation of protein functions, transcription, translation and folding (2018) 東京工業大学 CIC、田町

(2) 杉浦一徳、横地佑一、久堀徹
チオレドキシセンサータンパク質 THIS
第59回日本植物生理学会年会(2018)札幌
コンベンションセンター、札幌

(3) 横地佑一、杉浦一徳、若林憲一、久堀徹
葉緑体型 Trx による標的認識メカニズムと
Trx 様タンパク質の新奇標的探索
2018年度日本生化学会関東支部例会(2018)
埼玉大学、埼玉

(4) 横地佑一、杉浦一徳、若林憲一、久堀徹
葉緑体型チオレドキシンが持つ標的選択性
の決定因子の解明と Trx 様タンパク質の標的
探索への応用
第91回日本生化学会(2018)京都国際会館、
京都

〔その他〕

ホームページ等
東京工業大学科学技術創成研究院化学生命
科学研究所 久堀・若林研究室
http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/Hisabori_HomePage/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

久堀 徹 (HISABORI TORU)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
研究者番号：40181094