

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14311

研究課題名(和文) 生体内神経イメージングへの応用を目指したタンパク質合成レポーターの開発

研究課題名(英文) Development of genetically encoded protein synthesis activity reporter

研究代表者

池内 与志穂 (Ikeuchi, Yoshiho)

東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：30740097

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)：本研究においては、神経の可塑性に関連すると考えられている細胞内タンパク質合成活性の変動を直接捉えることができるレポータータンパク質の開発を行った。測定時のシグナル強度がタンパク質合成を直接反映するように、タンパク質合成中のみ蛍光を発し、合成後に自己消化して消光するような人工レポータータンパク質を設計し、実際に自己消化機構が働くことを確認した。自己消化の効率を上げるためにリンカーの長さや、プロテアーゼ断片の配置や、蛍光タンパク質への変異導入などを行い、最適化を行った。

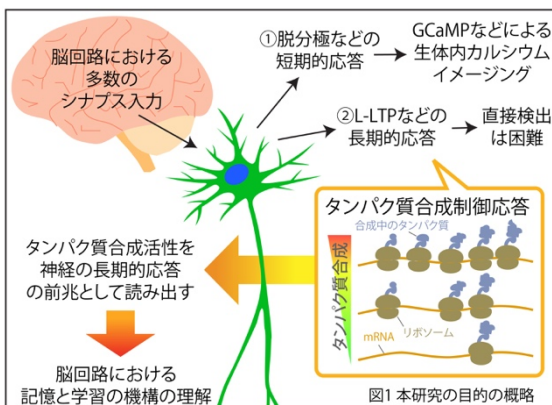
研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a reporter protein for cellular protein synthesis that is altered upon neural plasticity. To directly represent the cellular protein synthesis activity at the time of measurement, we designed an artificial reporter protein that is only fluorescent during it is under synthesis, and lose fluorescence after protein synthesis by self digestion. We generated the construct, expressed the proteins, and checked the self digestion ability of the reporter. We optimized the construct to maximize the self digestion ability.

研究分野：分子神経科学

キーワード：タンパク質合成 翻訳 リボソーム 神経 形態

1. 研究開始当初の背景

カルシウムセンサーなどの生体内神経イメージング法の発展によって、脳内の高速な神経活動の観察が可能になりつつあるが、神経の可塑性による長期的応答を直接検出することは難しい。後期長期増強(L-LTP)などの神経の長期的応答には新規のタンパク質合成が必須であり(Frey et al Brain Res 1988 など)、細胞内タンパク質合成活性の変動を測定することが、神経細胞の長期的応答を間接的に捉えるための手段として有効であると考えられる。したがって、神経におけるタンパク質合成の制御の役割を明らかにするために、細胞内のタンパク質合成活性を測定する手法が必要である。これまで、不安定化短寿命 GFP や(Aakalu et al Neuron 2001 など)、パルスチェイスの概念(Han et al Nat Methods 2014 など)の応用によってタンパク質合成活性を検出する手法が開発されてきたが、神経活動依存的なユビキチンプロテアソーム系の影響や、測定開始用低分子化合物を外部から添加することの難しさが問題となり、生体の脳内での使用には適さなかった。そこで、これらの諸問題を克服したタンパク質合成活性レポーターが必要とされていた(図1)。



2. 研究の目的

本申請研究では上記の問題を克服する、新しいデザインを用いたタンパク質合成活性レポーターの開発を目指した(図2)。

高速な神経活動パターンの観察が GCaMP などのカルシウムセンサーの開発・改良によって可能になったように(Chen et al Nature 2013)、神経活動依存的に変動するタンパク質合成活性を検出するレポーターを開発することで、神経の長期的応答の間接的な検出法として応用することが期待される(図1)。カルシウムセンサーと併用すれば、どのような高速な神経活動パターンが細胞内のタンパク質合成を引き起こし、神経の長期的応答を誘起するのかを理解することにつながると考えられる。また、FMRP や TSC1 などのタンパク質合成の制御因子が自閉症などの脳の疾患に関連しており、疾患モデルにおいてタンパク質合成がどのように異常であるかを経時的に観察することによって、疾患発症機構の理解と治療法の開発に寄与できると予測される。

本研究では、測定時のシグナル強度がタンパク質合成効率を直接反映するような新しいデザインの遺伝子工学的なタンパク質合成活性レポーターの開発を目指した。タンパク質合成後に自己消化することによりタンパク質合成中にのみ蛍光を示すという新しいコンセプトに基づくタンパク質合成活性のレポーターの開発を行った。

従来のタンパク質合成レポーターは生体内神経細胞の観察には適さないので、本研究では、生体の脳内で使用することを目指し、下に述べる新しい原理を用いて完全に genetically encoded なタンパク質合成レポーターの開発を行った。時間分解能とシグナル強度を両立するようにレポーターを開発する必要があり、チャレンジ性のあるプロジェクトである。

3. 研究の方法

測定時のシグナル強度がタンパク質合成を直接反映するように、タンパク質合成中にのみ蛍光を発するようにレポーターを作製する(図2)。GFP の改良変異体 Venus を含むレポータータンパク質の両末端に TEV プロテアーゼを2分割したもの(Wehr et al Nature Methods 2006)を融合させ、レポータータンパク質全体が合成され終わると両末端の分割 TEV プロテアーゼが会合し、レポーター自身に埋め込んであるプロテアーゼ認識配列を自己切断し、蛍光シグナルを失わせ、タンパク質合成中にのみ蛍光を示すレポーターとする(図2A, B)。自己切断を利用することで、細胞内のタンパク質分解系活性の影響を排除できる。

まず、タンパク質合成レポーターの基本骨格を作製し、試験管内において動作確認を行う。

自己消化型タンパク質合成活性レポーターについては、GFP の改良変異体 Venus を含む

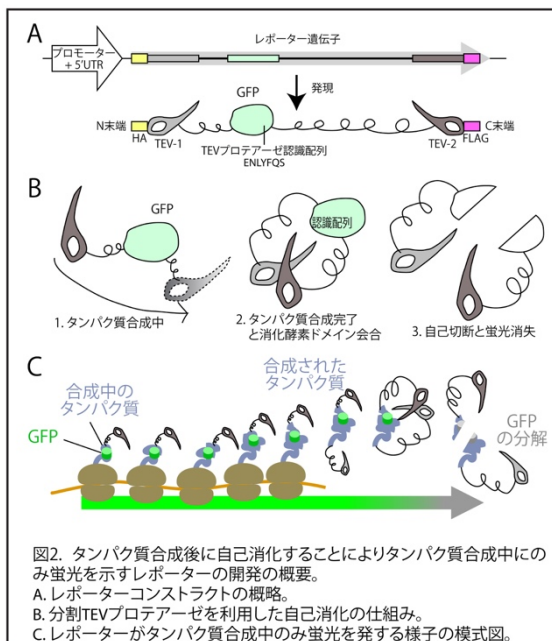


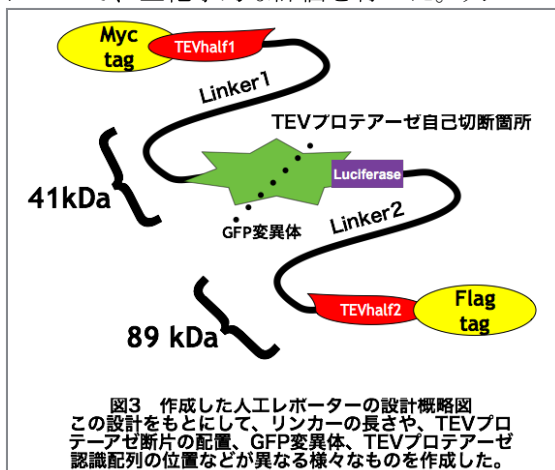
図 2A の基本レポーター骨格をプラスミド上で作製する。レポーターの基本骨格を作製後に、試験管内で発現させたレポータータンパク質が自己切断活性を持つことを確認する。自己切断の確認には、レポーターの両端に融合したエピトープタグ(N末端 Myc タグとC末端 FLAG タグ)をウェスタンブロッティングで検出し、両タグを含む全長断片が消失し、それぞれのタグを持った断片を生成することを確認することによって行う。GFP は強固な構造を持つので、もし切断が起こらない場合、あるいは自己切断後も断片が会合したまま解離しない場合には、TEV プロテアーゼ認識切断配列の位置と数を検討し、レポーターがタンパク質合成後速やかに分解されるよう最適化する。

上記の試験管内の検討を経た後、作製したレポーターを用いてヒト細胞(HeLa 細胞)内においてタンパク質合成活性の読み出しの性能試験を行う。試験の一部として、タンパク質合成の阻害剤(シクロヘキシミドなど)や、mTOR の阻害剤(ラパマイシンや Torin 1 など)および PKR の活性化(poly I:C など)によってタンパク質合成を急激に抑制し、レポーターの応答を調べる。応答性が低い場合には、レポーターの時間分解能、蛍光強度などを中心として、分子レベルでの改良を行い、より良いレポーターを作ることを目指した。

4. 研究成果

初年度には、合成されている最中のみ蛍光を呈し、合成完了後に自己消化するような仕組みを取り入れた改変 GFP 人工タンパク質の設計を行い、基本的な骨組みを備えた人工レポータータンパク質を発現するプラスミドを構築した。プラスミドの構築には、複数の人工遺伝子合成をギブソンアセンブリーによって組み合わせることによって行った(図 3)。

次に、作成したプラスミドからタンパク質を実際に発現した。細胞内と試験管内の両方で作成した。目的通りのサイズのタンパク質を合成できることを融合したエピトープタグを認識する抗体を用いたウェスタンブロッティングによって確認できた。また、自己切断について、生化学的な評価を行った。人工レ



ポータータンパク質の両端にそれぞれ異なるエピトープタグを融合し、自己切断が起こった産物を二つのエピトープタグをそれぞれ認識する抗体を用いて検出した。まず、無細胞タンパク質合成系であるウサギ網状赤血球由来の試験管内タンパク質合成系を用いて人工レポータータンパク質を合成し、生成物を生成してウェスタンブロッティングによって解析したところ、切断産物が生成していることが確認できた。さらに、細胞内で人工レポータータンパク質を合成させ、細胞を溶解して抽出液をウェスタンブロッティングによって解析したところ、切断産物が生成していることが確認できた(図4)。

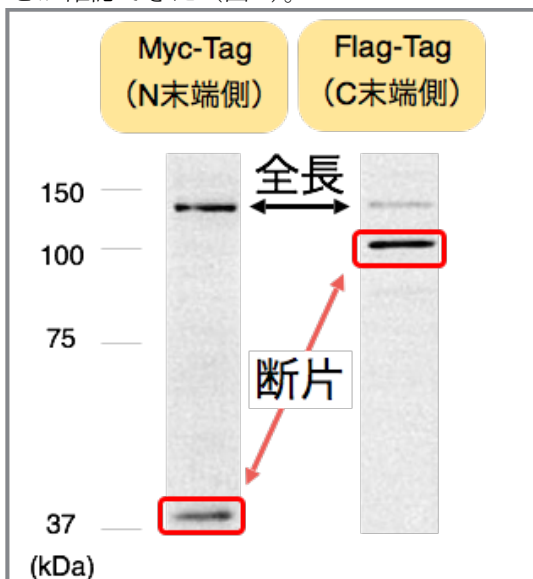


図4 ウェスタンブロッティングによる生成断片の検出
作成した人工レポータータンパク質が自己分解し、予想通りのサイズのN末端断片とC末端断片を生成することを確認した。様々なレポータータンパク質の改変体を作成し、切断効率が良いものを探した。図は一例を示している。

切断効率を指標として、タンパク質合成活性レポータータンパク質の設計の最適化を行った。2箇所埋め込んだリンカーの長さや、TEV プロテアーゼ断片のタンパク質内部での配置や、GFP に導入する変異や、TEV プロテアーゼ認識配列の GFP 内の位置などを少しずつ変えた改変タンパク質を作成し、改良を行った。この結果、当初の切断効率よりも10倍以上切断効率が上がったレポータータンパク質を作成することができた。

TEV プロテアーゼの断片を強制的に会合させることによって、自己切断をさらに誘導できると考え、FKBP と FRB を両端の TEV プロテアーゼ断片付近に融合し他ものを作成した。これを細胞内で発現し、低分子化合物ラパマイシンによって強制的にこれらを会合させることによって TEV プロテアーゼを近接させ、活性を高めることを狙った。しかし、思惑と

は逆に、FKBP と FRB はレポータータンパク質の自己切断活性効率をラパマイシンの有無にかかわらず低下させてしまった。これは、レポータータンパク質内部において予期せぬ立体障害が起きてしまったものと考えられる。

レポータータンパク質を発現させた HEK293T 細胞にタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを作用させたところ、全長タンパク質が減少し、切断断片が増加することが観察された。これにより、全長のレポータータンパク質が細胞内のタンパク質合成活性に伴って変動することがあきらかになった。

最後に、本研究で開発したタンパク質合成活性レポーターの細胞内の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞質に均一に存在することが望まれたが、実際には蛍光強度の強いタンパク質凝集体のようなものが形成されていた (図 5)。自己切断と凝集体形成の因果関係は不明であるが、関連性が強く示唆される。おそらく、レポータータンパク質の自己切断が 100%起こらず、切断されていないものが凝集してしまっているのであろう。今後は、切断効率の向上または凝集体形成の防止を達成できるようにレポータータンパク質を改変し、生体内で使用できる性能を持ったタンパク質合成活性レポーターとしたいと考えている。

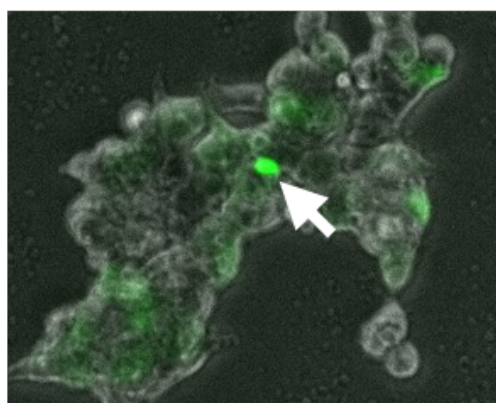


図 5 細胞内のレポータータンパク質の局在 (HEK293T細胞)
所々に強い蛍光強度を示すタンパク質凝集体のようなものが形成されてしまっている (矢印)。

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 2 件)

1. A. Chow, Y. Ikeuchi “New approaches to understand dynamics of protein synthesis in neurons” 生産研究, 69, 115-121 (2017)
2. 梅垣祐介, 池内与志穂 「神経特異的な制御を受けて生産される新生タンパク質の探索」 生産研究, 68, 201-204 (2016)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池内与志穂 (IKEUCHI, Yoshiho)
東京大学・生産技術研究所・講師
研究者番号：30740097