

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07744

研究課題名(和文) 硝酸塩とNOの生理的ダイナミクスの解明と創薬基盤開発

研究課題名(英文) Elucidation of physiological role of nitrate/nitrite/NO dynamics and development of drugs

研究代表者

日高 将文(Hidaka, Masafumi)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：00584848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞中の硝酸塩・亜硝酸塩濃度変化を検知するセンサータンパク質システムsN000py(sensor for NO₂/NO₃ in physiology)を用いて、NO₃/NO₂の濃度変化を指標とした生細胞中のNOの動態を可視化し、生理的ダイナミクスを解明することを目的とした。sN000pyは生細胞中のNO₃/NO₂濃度変化検出を試みたが感度が不足していた。そこで、sN000pyシステムを構成するタンパク質NasSとNO₃、NO₂の複合体構造を明らかにし、タンパク質レベルの性情解析を組み合わせることで分子レベルの構造基盤情報を獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の硝酸塩・亜硝酸塩の濃度変化を可視化することは、様々な生理機能に関わる一酸化窒素・NOの生理機能を解明するうえで大きなメリットがある。その方法として、sN000pyシステムを応用することを目指してきた。細胞内の変化を検出することはできるようになっているものの実用化までには至らなかったが、システムの基礎的な情報を収集することで今後の改良のための道筋をつけることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to visualize the dynamics of NO in living cells using sN000py (sensor for NO₂/NO₃ in physiology), a sensor protein system that detects changes in the concentration of nitrate and nitrite in cells, and to elucidate the physiological dynamics of NO using changes in the concentration of NO₃/NO₂ as an indicator. The sN000py system was not sensitive enough to detect changes in NO₃/NO₂ concentration in living cells. In this study, we identified the complex structure of the sN000py system's protein, NasS, with NO₃ and NO₂, and combined it with protein-level characterization to obtain information on the structural basis at the molecular level.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質工学 一酸化窒素 FRET バイオセンサー

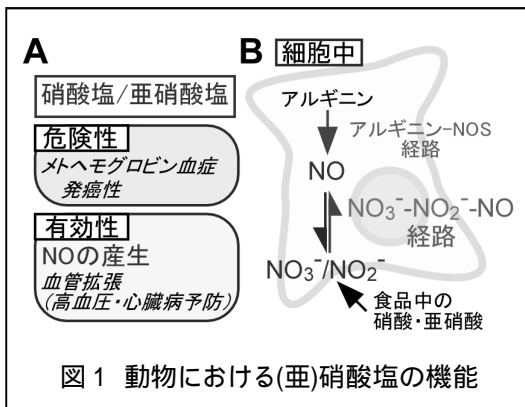
1. 研究開始当初の背景

窒素は生命活動に必須の原子である。微生物、植物の二つの界において、窒素固定や植物生理学の視点からの研究が盛んであり、硝酸塩 (NO_3^-)・亜硝酸塩 (NO_2^-) (以下、(亜)硝酸塩と表記) の重要性が解明されている。では、もう一つの界・動物では(亜)硝酸塩はどのような機能を示すのか。まず思い浮かぶのは、(亜)硝酸塩の『毒』としての一面であろう。井戸水や加工肉に含まれる(亜)硝酸塩は、血中のヘモグロビンに作用するとメトヘモグロビン血症 (酸欠) の原因となる。

また(亜)硝酸塩から生じるとされるニトロソ化合物は高い発癌性を示す(図 1A)。そのため、欧米では飲料水・食品中の(亜)硝酸塩濃度に厳しい規制が設けられている。

1990 年代後半から 2000 年代にかけて、ヒトの体内で(亜)硝酸塩が一酸化窒素 (NO) に変換される『 NO_3^- - NO_2^- - NO 経路』の存在が示された(図 1B) [1]。NO は神経伝達作用、殺菌作用など幅広い機能を示すシグナル分子である。特に注目すべきは血管拡張作用であり、NO を誘導する物質が心臓病や高血圧の治療に用いられている。すなわち、(亜)硝酸塩を含む野菜は NO の産生を促し、血管系の病気を予防する『薬』であると考えられる。

現在では、(亜)硝酸塩は生体内における NO の源と考えられており、NO の生理機能と関連して『 NO_3^- - NO_2^- - NO の生理学』の解明が期待されている。

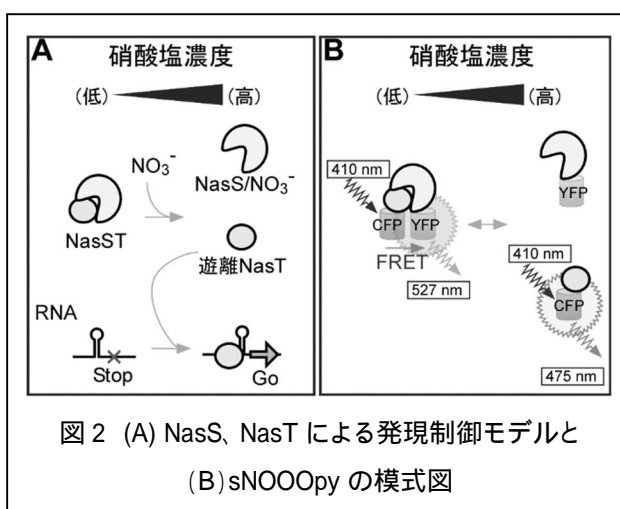


[1] Benjamin et al., *Nature*, 368, 502-503 (1994)

2. 研究の目的

超高齢化社会を迎え、心臓疾患や高血圧の患者が増加の一途を辿る現代において、シグナル分子・NO は最も重要な研究対象の一つであり、NO の代謝を司る『 NO_3^- - NO_2^- - NO の生理学』研究の発展が切望される。しかし、『 NO_3^- - NO_2^- - NO の生理学』の研究の最大の壁となっているのが、生細胞中の硝酸塩、亜硝酸塩、NO の変化を捉えることが困難である、という点である。従来の生物学研究における(亜)硝酸塩、NO 濃度の定量法は、アゾ化合物の発色法 (Griess 法) が一般的である。しかし、Griess 法は化学反応を含むサンプルの前処理が不可欠であり、生細胞中の生理反応過程における動態解析に用いることができない。

申請者は、硝酸塩濃度に応じて変化する NasS、NasT の解離-非解離の状態を、蛍光タンパク質の FRET を利用して検出することができれば硝酸塩濃度の変化を可視化できるというユニークな発想のもと、センサータンパク質・sNOOpy (sensor for NO_3^- in physiology) を開発した(図 2B)。sNOOpy は、*in vitro*、*in vivo* の両方の条件下で硝酸塩の濃度変化を蛍光スペクトルの変化として測定することを可能にした [2]。sNOOpy は『 NO_3^- - NO_2^- - NO の生理学』研究において高い壁となっていた生理作用中の(亜)硝酸塩、NO 検出法の問題を解決し、NO 研究におけるブレイクスルーとなることが期待される。



本研究では、sNOOpy の継続開発と並行して、sNOOpy を応用して動物細胞の生理作用における硝酸塩の動態を解明する。

[2] Hidaka et al., *J. Biol. Chem.*, 291(5):2260-9, (2016).

3. 研究の方法

(1) 生細胞中の硝酸塩・亜硝酸塩濃度変化の検出

sNOOpy システムは、HeLa 細胞の培養液中の硝酸塩濃度を変化させることで変化した細胞内の硝酸塩濃度変化を検出することができる。一方、sNOOpy を用いて NO の生理現象を解明するためには、生細胞中の生理的な硝酸塩濃度変化を検出できることが不可欠である。

生細胞において、硝酸塩・亜硝酸塩は一酸化窒素 NO の酸化によって生じる。この生理的な硝酸塩・亜硝酸塩濃度の変化について sNOOpy システムを用いて検出可能かどうかを検証するため、MCF-7、PC12 細胞に sNOOpy を発現させた。各種細胞は NO を生じる酵素 (eNOS、nNOS) が一定量発現しており、HeLa 細胞の系に倣って培養液中の硝酸塩濃度変化検出を検討した (表 1)。

eNOS	nNOS	iNOS
構成型NOS (cNOS) 細胞内に一定量存在		誘導型NOS 炎症やストレスにより誘導
血管内皮型	神経型	
血管内皮細胞 骨髄細胞 血小板	神経組織(中枢及び末梢) 肺 腎臓	免疫系 心血管系 肺
細胞膜	細胞膜/細胞質	細胞質
MCF-7 ヒト乳癌由来	PC12 ラット副腎髄質由来 褐色細胞腫	RAW264.7 マウスマクロファージ

表 1 細胞種と NO 産生酵素

(2) sNOOpy システムの改良

sNOOpy の基礎技術は確立しており、直ちに硝酸塩・亜硝酸塩の生理機能研究に着手することが可能であるが、細胞への応用にあたって感度・発現・特異性の問題が想定されるため解決を試みる。改良に当たっては、タンパク質工学的手法を用いた改良、構造情報に基づいたタンパク質の合目的デザインを試みる。

感度の問題： 生理的な硝酸塩濃度は μM ~ mM の幅広い範囲にあると言われている。生理機能による硝酸塩濃度変化を正確に決定するためには、適した感度を有するセンサーが必要となる。本研究では、変異体、類縁タンパク質の利用によって、様々な感度を有する sNOOpy を構築する。

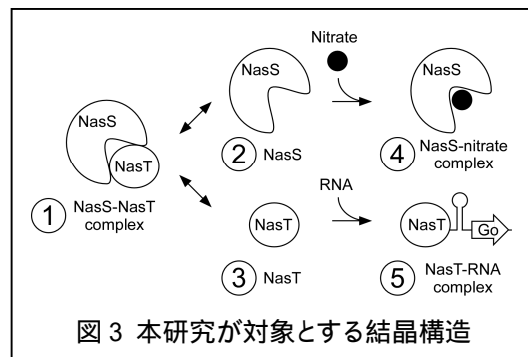
発現の問題： sNOOpy のシステムは、根粒菌の NasS、NasT の 2 種類のタンパク質を用いる。動物細胞中では、NasT-NasS 間に挿入した 2A ペプチド配列が自発的に切断されることで、CFP-NasT と NasS-YFP が異なる分子として発現する (図 1)。基礎技術の開発・解析の過程で、CFP-NasT、NasS-YFP の分子数比が一定しないことが、硝酸濃度変化測定の際の妨げになることが分かっている。そこで sNOOpy の一分子化を目指す。

特異性の問題： 現在の sNOOpy では硝酸塩・亜硝酸塩の区別が難しい。先行研究 (若手研究 B) では NasS の結晶構造を決定しており、研究過程で作製した変異体では、硝酸塩にのみ特異性を示すものが得られている。この変異体を改良し、硝酸塩にのみ特異性を示す sNOOpy の開発を行う。

NasS、NasT のタンパク質立体構造について、X 線結晶構造解析の手法を用いて解明する。

本研究では、NasS、NasT について、NasS-NasT 複合体、NasS、NasT、NasS + 硝酸、NasT+RNA の 5 つ状態 (図 3) について構造解析を目指す。大腸菌を用いた発現系を構築し、結晶化条件探索に供する。

結晶が獲得できたものから順次、高エネルギー加速器研究機構 (つくば市) で X 線を照射し、回折データを測定する。NasS、NasT は新規性が高い構造であるため、立体構造解析には位相の決定が必要となると考えられることから、セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法、重原子を用いた同型置換法を試みる。



(3) sNOOpy タンパク質の性情解析

sNOOpy の応用展開のためには、sNOOpy の分子レベルの性情解析が不可欠である。特に、NasS と NasT の分子間相互作用様式、細胞内の安定性、存在形態についての情報は、応用研究に置いて不可欠な情報であると判断している。

そこで、NasS と NasT の複合体について精密な分子量測定を試みた。細胞内環境に近い塩濃度存在化条件、sNOOpy タンパク質が過剰に発現した場合を模した高タンパク濃度条件下における解析を行った。

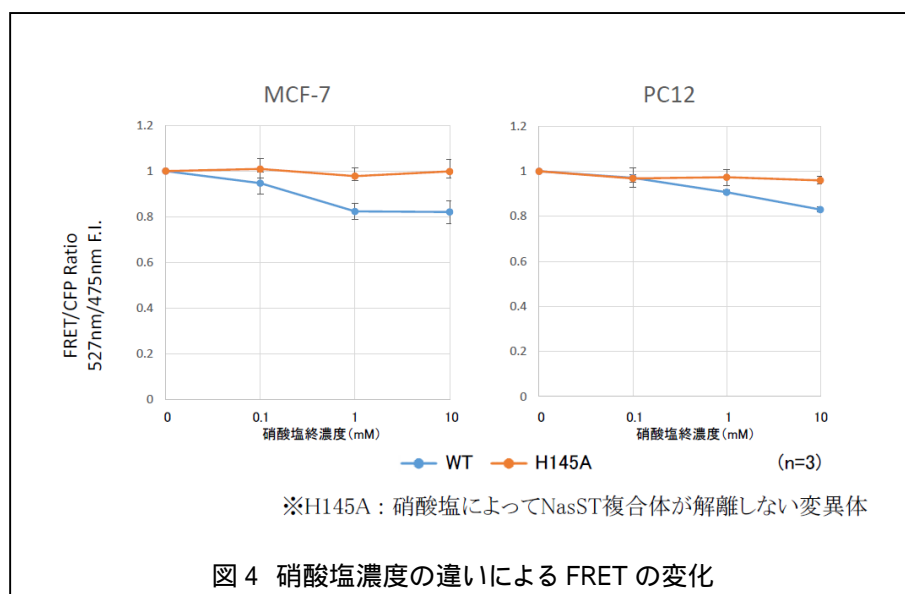
4. 研究成果

(1) 生細胞中の硝酸塩・亜硝酸塩濃度変化の検出

MCF-7、PC12 について sNOOpy を発現した MCF-7、PC12 細胞について、培養液中の硝酸塩濃度を変化させ、蛍光顕微鏡を用いて細胞内の FRET の変化を観察した (図 4)。

MCF-7 では 0.1 mM で FRET の変化が確認されたが、そのシグナル強度の変化は微弱なものであった。

PC12 細胞では、1 mM を超える濃度で FRET の変化が見られたが、シグナルの強度の変化は微弱なものであった。



また、LPS (Lipo poli saccharide) の添加による NO の産生と、それに伴う細胞内硝酸塩濃度変化の検出を試みたが、シグナルに変化は見られなかった。

以上の結果から、sNOOpy は細胞内の生理的な硝酸濃度変化を検出するためには、感度が不足していると結論付けた。この問題点を改善するため、sNOOpy を構成する NasS、NasT タンパク質の研究を重点的に進めることとした。

(2) sNOOpy システムの改良

sNOOpy システムを改良するためには、sNOOpy を構成する NasS、NasT について原子レベルの構造情報が不可欠である。

先行研究では、NasS の立体構造について明らかにした (図 5)。本研究では、NasS の硝酸塩、亜硝酸塩に対する特異性を生じている要因を探り、sNOOpy システムの感度改善、特異性の改善を目指すための分子基盤を獲得するため、NasS と亜硝酸塩、硝酸塩との複合体構造解析 (図 3-) の構造解析を試みた。

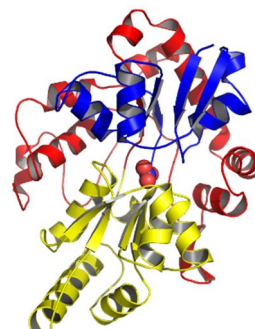


図 5 NasS の結晶構造

NasS の硝酸塩複合体構造は、当初分解能が不足しており、結合した硝酸塩と NasS の相互作用が不明瞭であったが、高分解能 (2.0 Å) の構造決定により相互作用を形成する残基を決定した (図 6: 未発表データ)。一方、亜硝酸塩との複合体については高分解能データが取得できておらず、今後の課題として残った。

NasS の特異性の改変を検討するため、図 6 に含まれる残基について変異体を作成して解析したところ、いずれの変異体も硝酸塩/亜硝酸塩に対する特異性を失った。一方、硝酸塩/亜硝酸塩以外のアニオンについても特性を検討したが、特異性の獲得は起こらなかった。

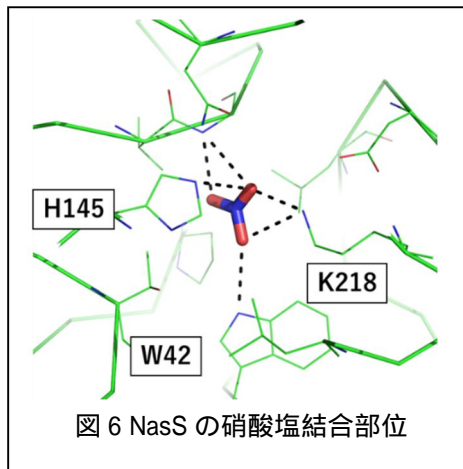


図 6 NasS の硝酸塩結合部位

(3) sNOOpy タンパク質の性情解析

NasS と NasT の相互作用を詳細に解析するため、様々な条件下における sNOOpy の FRET 比を測定した。

塩濃度を変化させて FRET 比を測定したところ (図 7) 10 mM を超える塩濃度存在下では FRET が上昇し、150 mM で飽和に達した。これは、NasS、NasT の相互作用が塩濃度によって強化されることを示唆している。生細胞中の塩濃度は 150 mM 程度であり、生細胞中では NasS-NasT が強く結合することで、sNOOpy の感度低下が起こっていることが示唆された。

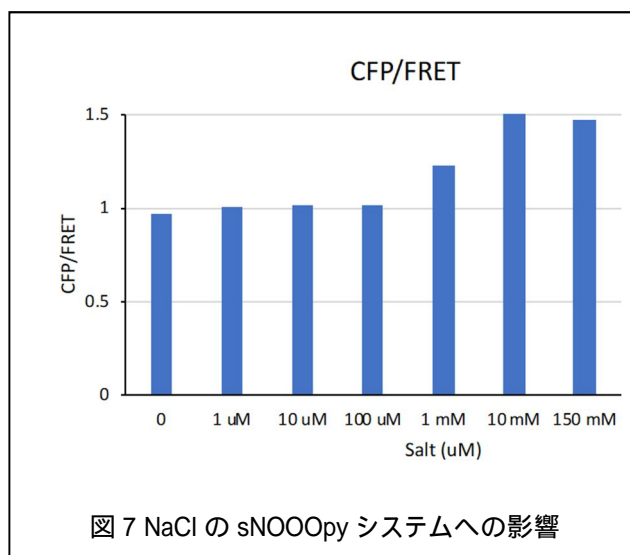


図 7 NaCl の sNOOpy システムへの影響

sNOOpy タンパク質の分子量を精密に測定したところ (図 8) NasS と NasT は 1:1 の相互作用だけではなく、2:1 もしくは 1:2 の複合体が混在していることが示唆された。この結果は、NasS と NasT の相互作用が複雑なメカニズムを持っていることを示唆しており、相互作用の改良による sNOOpy システムの改良が期待できることを示す重要な結果であると考えている。

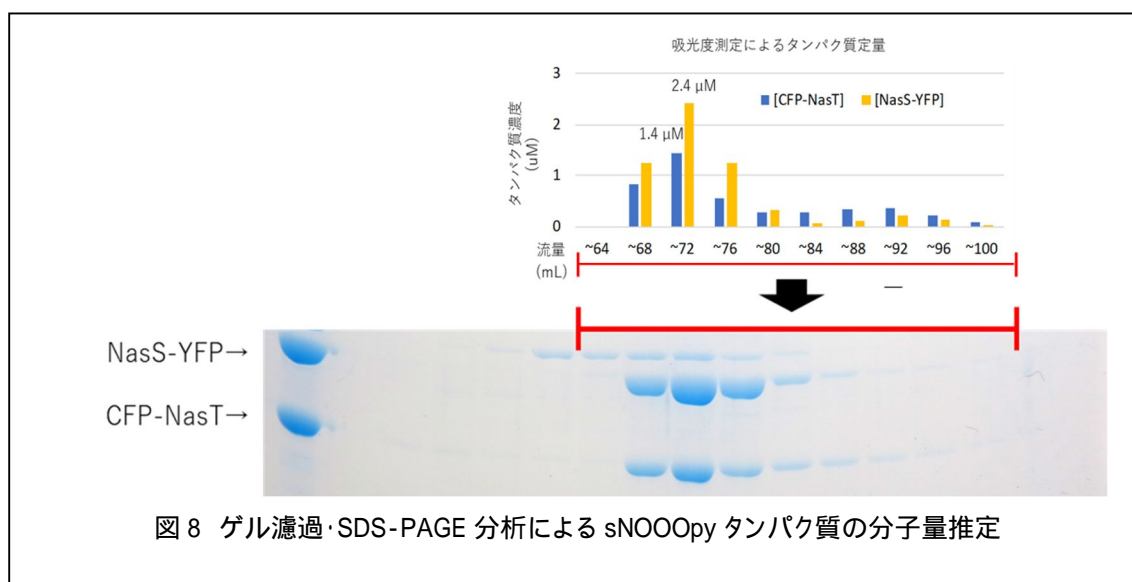


図 8 ゲル濾過・SDS-PAGE 分析による sNOOpy タンパク質の分子量推定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日高将文
2. 発表標題 東北放射光の利用と タンパク質機能開発
3. 学会等名 平成29年度生物工学会北日本支部福島シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------