

令和元年6月14日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18289

研究課題名(和文) 生体膜局在型H2O2センサーの開発および炎症モデルへの応用

研究課題名(英文) Development of membrane-targeted H2O2 sensor and its application to inflammation model.

研究代表者

羽鳥 勇太 (Hatori, Yuta)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：00759730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内では、H2O2産生やグルタチオン酸化に代表される酸化シグナルが局所的に制御されていることが予想されているが、信頼性の高いエビデンスは得られていなかった。本研究で作製した生体膜標的型酸化シグナルセンサーにより、細胞内の酸化シグナルが局所制御を受けていることが判明し、その位置情報を高分解能で得ることに成功した。さらにセンサーをオルガネラ膜上に局在させ、高精度の解析を行った。センサーの消化管炎症モデルへの導入に向け、センサー発現の時間制御の系を確立し、共培養系を用いたin vitro実験系を構築した。今後、これらの系を用いた解析により、炎症時の酸化シグナルの動態が明らかになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化シグナルは様々な病態との関連が報告されている一方で、細胞内のどこで、どの程度発生するのかについて、明確な情報が得られていなかった。本研究では、細胞質内の酸化シグナルの動態を高分解能でとらえることにはじめて成功し、酸化シグナルがユニークな空間分布を持つことが判明した。細胞中心部では、周縁部と比較して、高レベルの酸化シグナルが発生しており、細胞全体とは異なる独自の反応が起きている可能性が示された。今後、消化管炎症などの酸化ストレス関連疾患について、酸化シグナル動態の詳細な解析を進めることで、新たな作用機序を持った治療薬の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cells utilize various oxidative signals such as hydrogen peroxides and glutathione oxidation for normal metabolism. Spatiotemporal pattern of oxidative signal has been unclear due to the limited resolution of the current sensor-based analyses. This study provided a set of membrane-targeted sensors to locally detect hydrogen peroxide and glutathione oxidation. These sensors unveiled the high-resolution image of oxidative signals within cultured human cells and revealed that oxidative signals are spatially regulated. Aiming to further improve the resolution of the analysis, organelle-targeted sensors were developed. In order to assess the redox-disease association, we established in vitro inflammatory bowel disease model and inducible expression system for our sensors. These sensors and disease model have provided essential resource for understanding the role of oxidative signals in human pathology.

研究分野：分子生物学

キーワード：グルタチオン レドックスバイオロジー 消化管炎症 潰瘍性大腸炎 パイオイメーキング

## 1. 研究開始当初の背景

消化管炎症は難病に指定されており、患者数は近年急速に増えてきている。病態の成因については不明な点が多いが、慢性的な過剰免疫応答が主要因の一つと考えられている。しかし、免疫応答が惹起される分子機序は明らかにされていない。近年のレドックスバイオロジーに関する知見から、炎症と酸化ストレスの亢進に相関が認められており、更に  $H_2O_2$  をはじめとした活性酸素種が細胞内セカンドメッセンジャーとして炎症を制御することが示されている。

このような背景のもと、申請者は細胞内レドックス環境の解析の手法を用いて (Hatori et al. J. Biol. Chem. 2012, Hatori et al. Antioxid. Redox Signal. 2013)  $H_2O_2$  動態と消化管炎症の相関を明らかにすることに取り組んできた。消化管炎症モデルとして、マクロファージと腸上皮細胞の共培養系を確立し、実際に遊離ヘムなどの  $H_2O_2$  動態攪乱因子により腸上皮炎症が顕著に亢進することを明らかにした。遊離ヘムによる酸化ストレスが炎症を亢進することは、遊離ヘム分解酵素欠損マウス (Tonegawa et al. PNAS. 1997) やヒト (Yachie et al. J. Clin. Invest. 1999) でも確認されているが、その分子機序は未だ不明である。

炎症に与える細胞内  $H_2O_2$  の影響を明らかにする上で、まず細胞内  $H_2O_2$  動態を解析する手法を確立することが喫緊の課題として挙げられる。 $H_2O_2$  は細胞内の様々な区画の生体膜上に存在する  $H_2O_2$  産生酵素 (Nox, Duox, AO) の働きにより特異的に生じ、その後直ちに拡散・分解除去される。その為、 $H_2O_2$  シグナルは発生場 (膜表面) に近い領域でのみ観測可能であり、結果として細胞内  $H_2O_2$  は局所的な分布を示すと予想される。しかし、局所  $H_2O_2$  レベルを高分解能で検出することは、現行の技術では困難である。その最大の理由として、 $H_2O_2$  センサーの細胞質全体への拡散の問題が挙げられる。細胞質全体に非局所的に導入された  $H_2O_2$  センサーでは、細胞質内でセンサーが絶えず拡散混合する為、結果として細胞質全体で平均化された情報しか得られない。したがって、局所性  $H_2O_2$  シグナルの可視化には、センサーを膜にターゲットングして拡散を阻止する必要があると考えられる。本研究は、まずそのような膜局在型  $H_2O_2$  センサーを作成し、局所性  $H_2O_2$  シグナルを任意の膜区画で解析する系を構築することから開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内の酸化シグナル、特に  $H_2O_2$  産生とグルタチオン酸化を高分解能で可視化し、消化管炎症モデルに適用することによって、炎症と酸化シグナルの関連を明らかにすることを目的とした。まず  $H_2O_2$  センサーおよびグルタチオン酸化センサーを改良して局所性酸化シグナルを測定する系の完成を目指した。次にそれを用いて消化管炎症モデルにおける細胞内  $H_2O_2$  産生・グルタチオン酸化動態の解析を行った。

- 1) 局所性酸化シグナルの検出を可能とする、膜局在型  $H_2O_2$  センサー・グルタチオン酸化センサーの作製
- 2) 上記センサーの消化管炎症モデル (マクロファージ・腸上皮細胞) への適用による、 $H_2O_2$  産生・グルタチオン酸化動態の可視化

## 3. 研究の方法

### (1) 膜局在型 $H_2O_2$ センサー・グルタチオン酸化センサーの作製

蛍光タンパク質性  $H_2O_2$  センサーおよびグルタチオン酸化センサーが複数開発されてきているが、センサーの膜への局在化についてはミトコンドリアを除いて報告例がない。本研究では Morgan らによって改良された細胞質  $H_2O_2$  センサー (蛍光タンパク質 roGFP2-Orp1, Morgan et al. Free Radic Biol Med. 2011) および Gutcher らによって改良されたグルタチオン酸化センサー (Grx1-roGFP2) に様々な膜ターゲットングドメインを付加することで複数の膜局在型センサーを作成した。ターゲットング対象膜区画として、細胞膜、小胞体膜、エンドソーム、リソソーム、オートファゴソーム、ミトコンドリア、核膜、focal adhesion を選択した。それぞれの区画に局在する GFP 付加組み換え蛋白質内の GFP コード領域を roGFP2-Orp1 配列または Grx1-roGFP2 配列に置換し、融合蛋白質として CMV プロモーター下で発現した。各センサーを HeLa 細胞にトランスフェクション法により導入した後、 $H_2O_2$  反応性を  $H_2O_2$  処理によって確認し、局在マーカー蛋白質との二重免疫染色によりセンサーの細胞内局在を検討した。以上、細胞毒性・ $H_2O_2$  反応性・細胞内局在の評価を全センサーについて行った。

roGFP2-Orp1 を用いた  $H_2O_2$  レベルの解析手法は基本的に Morgan らのプロトコールに従った。Grx1-roGFP2 を用いたグルタチオン酸化レベルの解析手法は Gutcher らのプロトコールに従った。センサーを発現した細胞を共焦点顕微鏡下で、波長 488 nm および波長 405 nm の励起レーザーを用いて二波長解析を行った。画像解析ソフトウェア (Image J) を用いて二波長画像から ratio metric image を生成し、各ピクセルに Hanson 式を適用してセンサー酸化レ

ベル(0 ~ 100%)に画像変換した。

(2) 作製したセンサーの消化管炎症モデル(マクロファージ・腸上皮細胞)への適用による、 $H_2O_2$  産生・グルタチオン酸化動態の可視化

ヒト由来腸上皮細胞 Caco-2 細胞を 35mm fluorodish または透明 PET インサート上で培養し、inversed transfection 法により  $H_2O_2$  センサー遺伝子を導入した。ヒト単球由来 THP-1 細胞を LPS で刺激してマクロファージへと分化誘導した細胞を、Caco-2 細胞と共培養することにより、消化管炎症の *in vitro* 系を構築した。

#### 4. 研究成果

(1) パルミチン酸付加型(細胞膜局在型)  $H_2O_2$  センサー・グルタチオン酸化センサーの作製

グルタチオン酸化センサー Grx1-roGFP2 および  $H_2O_2$  センサー-roGFP2-Orp1 のセンサー遺伝子配列の N 末端にパルミチン酸付加配列を接続し、細胞膜局在型センサーを作製した。EGFR をはじめとした細胞内局在マーカーとの共免疫染色により局在を検討した結果、いずれのセンサーも細胞膜にターゲティングされることが確認された(図1)。さらに、作製したセンサーは共に細胞内の構造体の膜表面にもターゲティングされ、やはり EGFR と共局在することがわかった。HeLa 細胞に遺伝子導入した後、センサー反応性を検討したところ、両センサーとも良好な反応を示した。

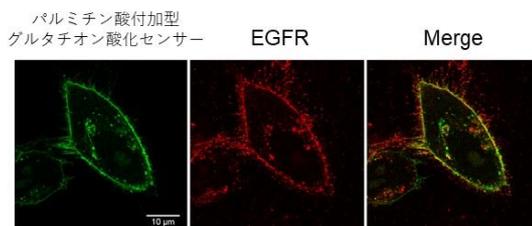


図1: パルミチン酸付加型グルタチオン酸化センサーの細胞膜への局在

(2) パルミチン酸付加型  $H_2O_2$  センサー・グルタチオン酸化センサーを用いた解析

パルミチン酸付加型グルタチオン酸化センサーおよび  $H_2O_2$  センサーを HeLa 細胞内で発現し、細胞膜および細胞内膜構造近傍の酸化シグナルの解析を行った。細胞膜近傍のグルタチオン酸化レベルは高度に還元された状態に維持されている一方、細胞内部では有意に高い酸化レベルが観察された(図2)。 $H_2O_2$  産生レベルも同様に細胞内部の方が有意に高く、高い  $H_2O_2$  産生レベルがグルタチオン酸化の原因となっている可能性が示された。本結果は、細胞質内の酸化レベルの不均一性をライブセルイメージングによって可視化することに成功したはじめての例として、Redox Biology 誌に掲載された。

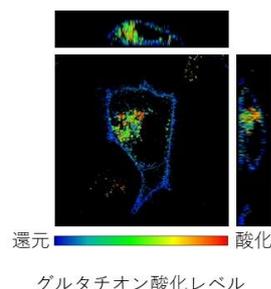


図2: パルミチン酸付加型グルタチオン酸化センサーを用いた解析

(3) 様々なオルガネラ膜を標的としたセンサーの作製

様々なオルガネラ膜の細胞質側のグルタチオン酸化レベルを比較する為、小胞体膜局在型、ケラチンフィラメント局在型、アクチンフィラメント局在型、ペルオキシソーム膜局在型、エンドソーム膜局在型、ミトコンドリア膜局在型センサーをコードする組換え遺伝子を作製した。各コンストラクトを HeLa 細胞に導入し、DTT・ $H_2O_2$  応答性および細胞内局在を(1)と同様に検討した。その結果、小胞体膜局在型、ケラチンフィラメント局在型センサーで良好な反応性と想定した局在が認められた(図3)。アクチンフィラメント局在型センサーとペルオキシソーム膜局在型センサーは想定した局在を示した一方、 $H_2O_2$  応答性に伴う蛍光スペクトルの変

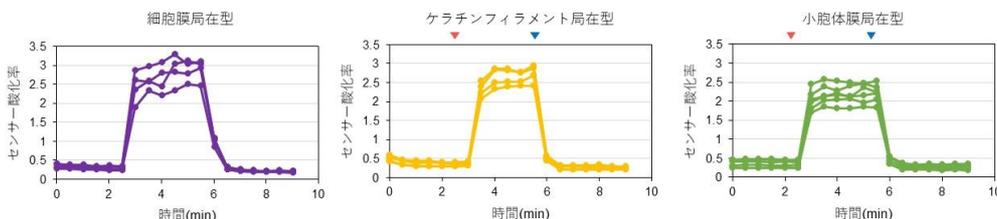


図3: オルガネラ膜標的型グルタチオン酸化センサーの応答性(矢頭 赤:  $H_2O_2$  添加, 青: DTT 添加)

化が小さく、解析に適さないことが判明した。エンドソーム膜局在型、ミトコンドリア膜局在型センサーについては細胞質全体や核に局在が認められ、現在ターゲティング配列の変更を進めている。

#### (4) 小胞体膜局在型、ケラチンフィラメント局在型グルタチオン酸化センサーを用いた解析

小胞体膜局在型、ケラチンフィラメント局在型グルタチオン酸化センサーをHeLa細胞に導入し、局所グルタチオン酸化レベルの解析を行った。小胞体膜上のグルタチオン酸化レベルは、細胞周辺部ほど低く、核に近い細胞内部で有意に高かった。ケラチンフィラメント局在型センサーでも同様の傾向が見られた。(2)の結果と合わせ、細胞内グルタチオン酸化レベルは、全体的な傾向として、細胞内部の核に近い領域に向かうほど高い、との結論が得られた(図4)。

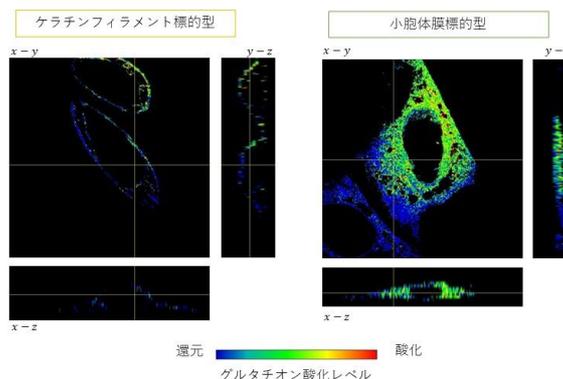


図4:ケラチンフィラメント、小胞体膜標的型センサーの解析結果

#### (5) 消化管炎症モデルへのセンサーの適用

Caco-2細胞をFluorodish上に播種し、(1)および(3)で作製したグルタチオン酸化センサーを導入した後、酸化レベルの解析を行った。HeLa細胞と同様、細胞内部で顕著なグルタチオン酸化が認められた。

Caco-2細胞単層は、10日前後の時間をかけて徐々に腸上皮組織様の構造(タイトジャンクションの形成、微絨毛の発達、細胞層の垂直方向への伸長)をとる。播種・遺伝子導入から10日間にわたる持続的なセンサー発現が分化誘導に与える影響を懸念し、テトラサイクリン制御型発現ベクター(pTetOne, Clontech)に発現系を切り替えた。pTetOneベクターはドキシサイクリン依存的アクチベーターを恒常的に発現し、ドキシサイクリン添加によって組換え遺伝子を発現する性質を有する。本ベクターにGrx1-roGFP2および(1)・(3)で作製した膜標的型センサーを組み込み、任意のタイミングでセンサーを発現できる系を確立した。現在、本発現系を用い、十分に分化した状態のCaco-2細胞でセンサーを発現し、分化時の酸化シグナルの動態の解析を進めている。さらにマクロファージとの共培養時の酸化シグナルの解析を行い、炎症時の酸化シグナル動態が明らかになることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hatori Y, Inouye S, Akagi R, Seyama T. Local redox environment beneath biological membranes probed by palmitoylated-roGFP. *Redox Biology* **14**, 679-685 (2018)

〔学会発表〕(計3件)

羽鳥勇太, 「消化管炎症モデルの構築および細胞内酸化還元センサーの適用」, 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2018)

羽鳥勇太, 井上幸江, 赤木玲子, 「蛍光プローブを用いた生体膜近傍レドックス環境の解析」, 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会)(2017)

Yuta Hatori, Mao Takagaki, Sachiye Inouye, Reiko Akagi. Heme oxygenase-1 is induced by heat shock in mouse hepatoma cells through a coordinated function of Nrf2 and HSF1. 8th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Turku, Finland (2017)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。