

平成 22年 4月 14日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19750063
 研究課題名(和文) 特異な酵素反応系を利用した新規細胞内 ATP モニターリングシステムの開発
 研究課題名(英文) Development of a novel system for monitoring cellular ATP using a unique enzyme reaction
 研究代表者
 末田 慎二 (SUEDA SHINJI)
 九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授
 研究者番号：00325581

研究成果の概要(和文)：ビオチン化反応は、ビオチン化酵素(BPL)が、その基質タンパク質(BCCP)のリジン残基にビオチンを固定化する反応である。古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化反応は、反応後酵素であるBPLが、その反応生成物であるビオチン化されたBCCPと安定な複合体を形成するという特異な性質を有している。本研究では、この特異なビオチン化反応を利用した細胞内のATP検出システムの構築について検討を行なった。

研究成果の概要(英文)：

In the biotinylation reaction, biotin protein ligase (BPL) mediates the attachment of biotin to a specific lysine residue of biotin carboxyl carrier protein (BCCP). The biotinylation reaction from thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* has a unique characteristic that the enzyme BPL forms a stable complex with its product, biotinylated BCCP. In the present work, we have developed a detection system for ATP with this unique biotinylation reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：生物分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ATP検出、ビオチン化酵素、蛍光タンパク質、蛍光共鳴エネルギー移動

1. 研究開始当初の背景

細胞内のATP量は生細胞では一定に保たれているが、細胞が死滅すると細胞内の分解酵素の作用によりその量は急激に減少する。従って、細胞内のATP量は細胞生存性と相関があ

り、ATP濃度測定により生菌数の推定が可能である。また、細胞内ATP量をリアルタイムでモニターすることにより、アポトーシス等の細胞死の過程を研究することも可能である。現在、ATPの測定に一般的に用いられて

いる手法は、ルシフェラーゼの発光反応を利用したものである。しかしながらこの手法では、基質となる ATP が消費されると発光が起これなくなるため、持続的に発光させるためには ATP を再生させる酵素反応系を組み合わせる必要がある。また、細胞内での ATP の測定では、基質であるルシフェリンを添加する必要があるため、ルシフェリンそのものによる細胞毒性が問題となる。

2. 研究の目的

本研究ではルシフェラーゼを利用した検出系とは原理の異なる ATP 検出システムの開発を目的として研究を行なった。本研究では、特異なビオチン化反応と、蛍光タンパク質間の蛍光共鳴エネルギー移動を組み合わせた ATP 検出システムの構築について検討を行なった。本システムでは、基質となる ATP が消費されても、持続的に蛍光が観察できるため、ルシフェラーゼの系で必要とされる ATP 再生系を必要としない。また、細胞内での観察では、細胞毒性の可能性のあるルシフェリンなどの基質の添加を必要としない。

3. 研究の方法

ビオチン化反応は、ビオチン化酵素 (BPL) が、その基質タンパク質 (BCCP) のリジン残基にビオチンを固定化する反応である。古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化反応は、反応後酵素である BPL が、その反応生成物であるビオチン化された BCCP と安定な複合体を形成するという特異な性質を有している。本研究では、この特異なビオチン化反応を利用した細胞内の ATP 検出システムの構築について検討を行なった。すなわち、BPL と BCCP 間の安定な複合体形成反応は、基質である ATP が存在して初めて起こるため、この複合体形成反応を何らかの形でモニターすることにより、ATP の存在をモニターすることが可能である。具体的には、BCCP と BPL に関して、それぞれ蛍光ドナーおよびアクセプターとなる蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させて、BPL と BCCP 間の複合体形成に伴う蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した ATP 検出システムの構築について検討を行なった。

4. 研究成果

(1) BPL 及び BCCP と蛍光タンパク質の融合体の構築

ビオチン化反応を利用した ATP 検出システムを構築するには BPL 並びに BCCP に関して、蛍光タンパク質との融合体を作成する必要がある。そこで、まず大腸菌系での各融合タンパク質の発現系の構築について検討を行った。まず BPL に関して EGFP との融合体の構築について検討を行ったところ、BPL の C

末端には EGFP は導入できないが、N 末端には導入できることがわかった (図 1)。さらに BPL と EGFP 間を繋ぐリンカーの長さが融合タンパク質の発現に大きく影響することがわかった。また EGFP と融合させた BPL はその酵素活性を維持しており、さらに、ビオチン化反応に伴う BCCP との複合体形成能も維持していることが確認できた。一方で、BCCP と EBFP との融合体の構築についても検討を行った (図 1)。BCCP に関しては、全長が 167 残基からなるタンパク質であるが、ビオチン化に必要なのは C 末端側の 70 残基程度であることがわかっている。そこで、BCCP の C 末端側ドメインと EBFP の融合体を構築した。この BCCP の融合タンパク質が、BPL に対する基質として機能し得るかどうかの確認を行ったところ、実際に BPL によってビオチンの付加が起こり、基質活性を維持していることが確認できた。さらに、BPL と BCCP の融合タンパク質同士を使ってビオチン化反応を行ったところ、反応に伴い両タンパクが会合することが確認できた。

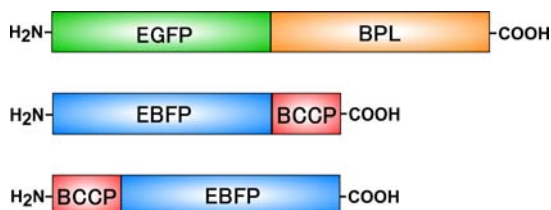


図 1 BPL 及び BCCP と蛍光タンパク質の融合体

(2) BPL 及び BCCP の蛍光タンパク質との融合体を利用した ATP の検出

BPL と BCCP の両融合タンパク質の系について、蛍光発光スペクトル及び励起スペクトルを測定したところ、蛍光タンパク質単独の場合と同様の発光能を有することが確認できた。両融合タンパク質を混合し、ATP 添加後の蛍光スペクトル変化を観察したところ、期待通り BPL と BCCP 間の複合体形成反応に伴う、EBFP から EGFP への FRET が確認できた (図 2)。この反応の温度依存性を確認したところ、室温付近でも迅速に FRET が起こり、非常に速やかにビオチン化反応が起こることがわかった。より FRET 効率の高い系の構築を目的として、BCCP と EBFP の融合タンパクに関して、その融合部位や両タンパク間をつなぐリンカーの長さについて検討を行った。その結果、リンカーが長い方が FRET 効率が高く、また BCCP を EBFP の N 末端に導入した方が同じく効率が高いことがわかった。FRET 効率の最も高かった系に関して、様々な ATP 濃度条件下における EGFP と EBFP の蛍光強度比を測定し、ATP の検量線を作成した。その結果、

少なくとも $0.1 \mu\text{M}$ ~ $10 \mu\text{M}$ の濃度範囲において ATP の検出が可能であることがわかった (図 3)。

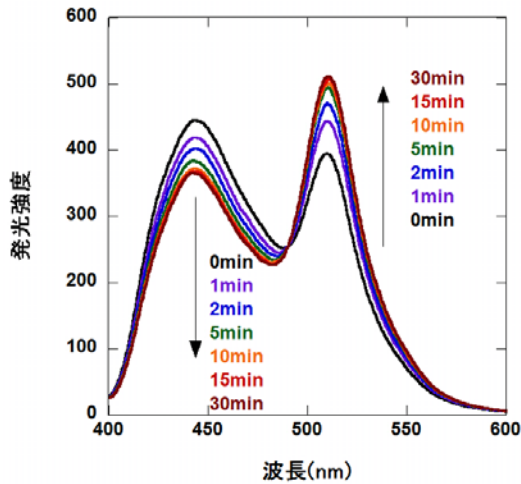


図 2 ATP 添加後の蛍光スペクトル変化

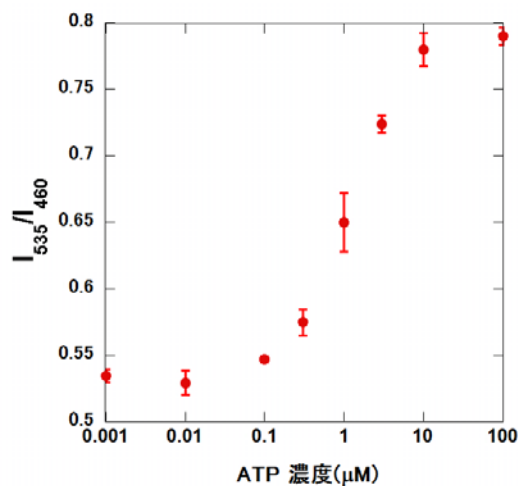


図 3 ビオチン化反応系を利用した ATP の定量

(3) 細胞系での ATP 検出系の構築に関する検討

BPL と EGFP の融合タンパク質、及び BCCP と EBFP の融合タンパク質を用いて、細胞破碎溶液中に含まれる ATP の検出を試みた。細胞破碎溶液中に ATP を添加して、BPL と BCCP のそれぞれの融合タンパク質を用いて、ビオチン化反応を行なったところ、EBFP から EGFP への FRET が確認できた。このことより、細胞成分が共存する条件下でも特異的にビオチン化反応が起こり、FRET を指標とした、ATP の検出が可能であることがわかった。次に、ヒト細胞系における ATP の検出系の構築を目

的として、まず BCCP と EGFP のヒト細胞中での発現系を構築した。この際、元々の古細菌由来の BCCP に関してコドンの使用頻度を確認したところ、ヒト細胞系での発現が困難であることが推測されたため、ヒト細胞での発現に最適化されたコドンを有する BCCP 遺伝子を作製した。このコドンを最適化した BCCP を、EGFP の N 末端に連結した融合タンパク質の発現プラスミドを作製し、HEK293 細胞に対してトランスフェクションを行なった。細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、EGFP 由来の蛍光が観察でき、ヒト細胞内においても目的の融合タンパク質が発現することが確認できた。同様に BPL に関してコドンを最適化した遺伝子を作製し、ヒト細胞系での発現系を構築した。さらに、HEK293 細胞の表層におけるビオチン化反応の確認を行なった。すなわち、膜タンパク質と BCCP の融合タンパク質を HEK293 細胞上に発現させ、蛍光標識化した BPL を用いて、ATP 共存下ビオチン化反応を行なった。その結果、期待通り細胞表層から蛍光色素に由来する蛍光が観察できた (図 4)。一方で ATP 非共存下ではこのような蛍光は観察できなかったため、細胞表層においても ATP を検出することが可能であることがわかった。

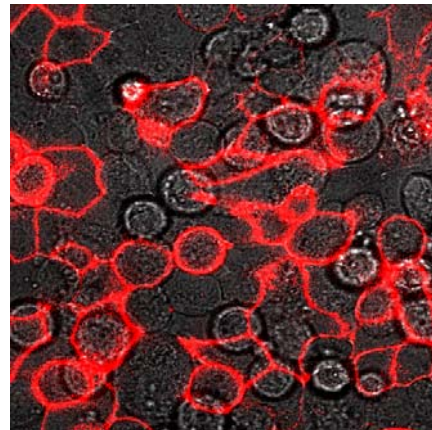


図 4 ビオチン化反応後の HEK293 細胞の蛍光顕微鏡による観察

(4) 得られた成果の国内外での位置づけ、今後の展望

本研究では、特異なビオチン化反応を利用した ATP 検出システムの構築について検討を行なった。本検出システムは、これまでに例のないまったく新規な概念に基づく ATP の検出システムである。現在、ATP の検出系としては、一般にルシフェラーゼを利用した検出系が利用されているが、この手法では基質となる ATP が消費されると発光が起こらなくなるため、持続的に発光させるためには ATP を再生させる酵素反応系を組み合わせる必要が

研究者番号：

ある。本ビオチン化反応を利用した検出系では、蛍光タンパク質間の FRET を利用しているため、励起光を照射し続けることにより、持続的に ATP の存在をモニターすることが可能である。本研究期間内では残念ながら細胞内での ATP 検出の段階まで到達することが出来なかったが、夾雑物が含まれる系においても ATP の検出が可能であることは確認できた。従って、今後さらに研究を進めることにより、細胞内での ATP の検出系へと発展させることが可能であると考えられる。

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 末田慎二、ユニークなビオチン化反応を利用したタンパク質解析、現代化学、査読有り、467 号、2010、pp. 38-43
- ② 末田慎二、田中一史、山岸正憲、A biotin-based protein tagging system、Analytical Biochemistry、査読有り、Vol. 393、2009、pp. 189-195

[学会発表] (計 3 件)

- ① 林秀樹、米田佐和子、末田慎二、特異なビオチン化反応を利用した細胞表層タンパク質の蛍光イメージング、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 28 日、近畿大学 (大阪府)
- ② 末田慎二、林秀樹、特異なビオチン固定化酵素反応を利用した生体分子検出システムの開発、日本化学会第 89 春季年会、2009 年 3 月 29 日、日本大学 (千葉県)
- ③ 末田慎二、田中一史、山岸正憲、近藤寛樹、特異なタンパク質複合体形成反応を利用したプロテインタグシステムの開発、第 10 回生命化学研究会シンポジウム、2008 年 1 月 11 日、熊本大学 (熊本県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末田 慎二 (SUEDA SHINJI)
九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授
研究者番号：00325581

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()