

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650036

研究課題名(和文)細胞内圧力センサーの創成を目指した、蛍光蛋白質の圧力応答機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of the pressure dependent fluorescence change of the YFP mutants toward the development of a pressure sensor.

研究代表者

今田 勝巳 (Imada, Katsumi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40346143

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)：圧力応答を示すGly挿入YFP変異体の高圧下での結晶構造解析と蛍光スペクトル測定を行った。高圧下では発色団のカルボニル酸素が反転するとともに周囲の残基のコンフォメーションが常圧でのYFPと同じ配置になった。この変化が圧力に応答した蛍光増強の原因と考えられる。また、蛍光ピーク付近には2つのピークが存在し、圧力変化により両者の相対的な強度が変化することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glycine insertion in 7 of YFP dramatically changes its fluorescence property dependent on hydrostatic pressure. In this study, we determined the crystal structures of the mutants and measured their fluorescence spectra under high pressure. We found the flipping of the carbonyl oxygen of the chromophore with the conformational changes of the residues surrounding the chromophore under high pressure. These conformations are similar to those of YFP at normal pressure, suggesting these conformational changes cause the pressure response on the fluorescence property.

研究分野：生物物理学

キーワード：蛍光タンパク質 結晶構造 圧力 メカノバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、力学的な刺激を感知する機構を備えており、刺激に応答して様々な反応が引き起こされる。力学的刺激に対する細胞の感知応答機構の研究はメカノバイオロジーと呼ばれ、生命の機能維持に欠かせない機構であることから、近年、その重要性が強く認識されるようになった。しかし、生体内で各細胞や生体分子が感知応答する力学的刺激の大きさを測定する手段は限られている。特に、重要な力学的パラメーターである圧力については、適当な方法がなく、生体内で各細胞が感じる圧力や細胞内部の局所的圧力を知る手段はいまのところない。一方、生体中の分子の分布や濃度を調べる技術は、蛍光タンパク質を用いた生体分子標識技術の登場により、長足の進歩を遂げた。中でも、緑色蛍光タンパク質 (GFP) は、遺伝子操作による多くのアミノ酸置換の導入により、様々な蛍光を発する変異蛍光タンパク質が作られ、細胞や生体分子のラベルに用いられている。また、変異 GFP の中には蛍光強度やスペクトルが pH 感受性を持つものが見つかり、細胞内 pH や局所的な pH の測定に使われている。さらに、特定の分子に対して結合能を持つ適当なペプチドやタンパク質でつないだ異なる蛍光を発する GFP 間の FRET 現象を利用し、カルシウムセンサーや ATP センサーなどが作られ、細胞内のイオンや分子の濃度や分布が調べられるようになってきている。このような分子センサーは現代の医学・生物学研究に不可欠なツールとなり、広く用いられている。

最近、我々は GFP の変異体のひとつで黄色の蛍光を発する YFP に対して挿入変異を施すことで、蛍光の圧力応答性が著しく向上した変異蛍光タンパク質を作成することに成功した (Watanabe et al, *PLoS One*, 2013)。これら YFP 挿入変異体の蛍光スペクトルをさまざまな圧力下で調べたところ、0.65MPa の圧力変化でも検出可能であることを見出した。従って、この変異体をベースにして、さらに変異を導入し改良することで、細胞内の圧力や圧力変化を様々なレベルで測定することができる「生体分子圧力センサー」の創成が可能になると考えられた。しかし、挿入変異体でこのような圧力応答性が生じる原因は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、低圧から高圧までの様々な圧力下で挿入変異体の結晶構造を高分解能で解析し、各圧力での蛍光スペクトル測定結果と合わせて解釈することで蛍光圧力応答を引き起こす構造基盤を明らかにすることを目指した。蛍光の圧力応答性のもととなる設計原理を構造ベースで明らかにすることで、細胞内で特に重要と考えられる常圧から 10MPa の間での圧力変化の検出が可能であるような、より優れた機能を持つセンサーの開発へつなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) YFP 挿入変異体の高圧力下での結晶構造解析

挿入変異体のうち、Gly を 1 つ (YFP-1G) および 3 つ (YFP-3G) 挿入した変異体の蛍光スペクトルは常圧から 300MPa まで測定されており、蛍光強度の増強とスペクトルのシフトが確認されている。そこで、高圧下での X 線回折測定に用いられるダイヤモンドアンビルセルを使用し、高圧下での X 線回折強度測定を行う。ダイヤモンドアンビルセルは、高圧下での鉱物の構造研究によく用いられるが、溶液中の蛋白質結晶の高圧測定も可能である。X 線回折データの収集は、ダイヤモンドアンビルセルをマウント可能なあいちシンクロトロンビームライン BL2S1 にて行った。セル内の圧力はルビーの蛍光ピークシフトにより計測した。構造解析は常圧での YFP 変異体の構造をモデルとした分子置換法により行った。

### (2) 結晶からの蛍光スペクトル測定

これまでの吸収・蛍光スペクトル測定は溶液条件下で行われている。構造と蛍光の関係を直接関係づけるため、低温および各圧力における結晶状態での吸収・蛍光スペクトル測定を行った。測定は、顕微分光法と結晶を細かく砕いたバルクでの測定の両方を行った。また、結晶化溶液による影響を把握するため、結晶化に用いた条件下での吸収・蛍光スペクトル測定を行った。

### (3) 圧力調節が簡便に行える高圧セルの作成

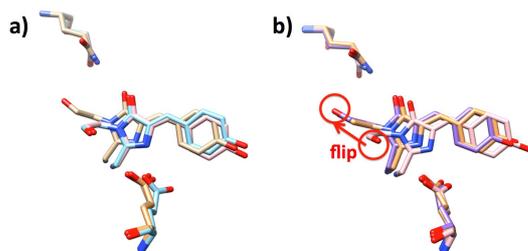
ダイヤモンドアンビルセルは高圧の測定には適しているが、特定の圧力に調節することが難しく、低圧から高圧までの各点での測定を効率よく行うには問題がある。そこで高圧クロマトグラフィー等に用いるキャピラリー系を利用して水圧により加圧し、X 線回折用ゴニオメーターに設置可能なチャンバーの作製を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) YFP 挿入変異体の高圧力下での結晶構造解析

圧力変化に対して最も大きく蛍光特性が変化する YFP-3G 結晶を作成し、ダイヤモンドアンビルセルを用いて高圧下での X 線回折測定を行った。結晶の耐圧性を調べたところ、結晶化沈殿剤である PEG の濃度を少し上げることによって、400MPa かけても回折能を保つことを確認した。次に、180MPa および 330MPa における X 線回折強度データを収集した。以前に構造解析を行った常圧低温での YFP-1G 構造を探索モデルとした分子置換法により、それぞれ 1.7 Å、2.2 Å 分解能で構造解析に成功した。その結果、常圧下では残基挿入を行ったベーター鎖が disorder し

て発色団近傍の分子内部に水分子が侵入していたが、高圧下では電子密度が現れ、この領域の水を含めた構造が変化していた。また、発色団のC末側カルボニル酸素が反転し、周囲の残基のコンフォメーションも変化し、YFPと同じ配置に変化していた。この変化がYFP-3Gの圧力に応答した蛍光増強の原因であると考えられる(投稿準備中)。



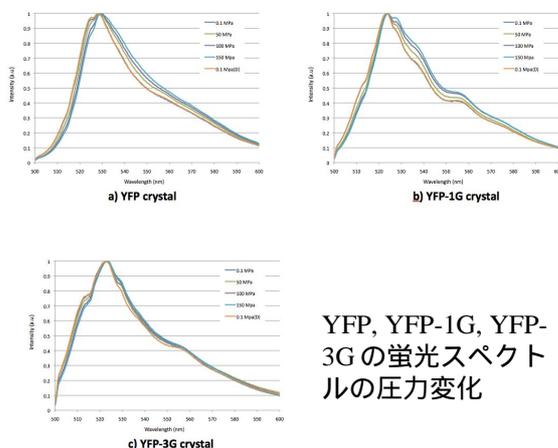
挿入変異による構造変化と YFP-3G の圧力による構造変化

a) YFP(白), YFP-1G(水色), YFP-3G(桃色)の発色団付近の構造

b) YFP-3G の常圧(桃色), 180 MPa(黄), 340 MPa(紫) 発色団付近の構造。180 MPa と 340 MPa では、発色団のコンフォメーションが常圧の YFP と同じに変化している。

### (2) 結晶からの蛍光スペクトル測定

YFP, YFP-1G, YFP-3G について結晶化条件に近い条件下で溶液状態での蛍光および吸収スペクトル測定と、各結晶について顕微分光法蛍光と結晶を細かく砕いたバルク蛍光測定を圧力および溶液条件を変えて行った。その結果、蛍光ピーク付近に2つのピークが存在し、圧力変化により両者の相対的な強度が変化することによりピークシフトしているように観測されることがわかった。また、一連の蛍光測定から YFP-1G が溶液中の疎水性分子を感知して蛍光特性を変化させる現象を見出した。これを利用して蛋白質分子濃度を計測するセンサーを開発した(論文発表済)。



YFP, YFP-1G, YFP-3G の蛍光スペクトルの圧力変化

### (3) 圧力調節が簡便に行える高圧セルの作成

ポリイミドコーティングしたキャピラリと耐圧バルブを用い、光学顕微鏡用高圧チャンバーで利用している加圧装置につなぎ、水圧を利用して圧力をかける切り離し可能な加圧セルを作成した。このキャピラリに閉じ込めた結晶の回折実験から、回折強度データの収集には問題がないことがわかった。しかし、切り離し後に起こるリークを完全に止められていないため、更なる改良が必要である。

### 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 1件)

Morikawa TJ, Fujita H, Kitamura A, Horio T, Yamamoto J, Kinjo M, Sasaki A, Machiyama H, Yoshizawa K, Ichimura T, Imada K, Nagai T, Watanabe TM. Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it. (2016), Sci Rep. 6:22342. doi: 10.1038/srep22342., 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

田中るみか, 辻井美香, 垣塚太志, 慶澤景子, 川口辰也, 渡邊朋信, 今田勝巳. 第 15 回日本蛋白質科学会年会, あわぎんホール(徳島), Jun. 26, 2015.

田中るみか, 慶澤景子, 渡邊朋信, 川口辰也, 今田勝巳. YFP 1 残基挿入変異体の系統的な構造解析. 第 87 回日本生化学会大会, 京都国際会議場(京都), Oct 17, 2014.

Tanaka R, Yoshizawa K, Watanabe T, Kawaguchi T, Imada K. Systematic structural study of single amino acid insertion mutants of YFP. 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌コンベンションセンター(札幌), Sep. 27, 2014.

Morikawa T, Machiyama H, Okamoto K, Yoshizawa K, Fujita H, Ichimura T, Imada K, Nagai T, Yanagida T, Watanabe T. Glycine-inserted mutant Forster resonance energy transfer (FRET) fluorescent protein to evaluate intracellular crowding. 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌コンベンションセンター(札幌), Sep. 26, 2014.

田中るみか, 慶澤景子, 渡邊朋信, 川口辰也, 今田勝巳. YFP の 1 残基挿入変異が引き起こす構造変化と蛍光特性. 第 14 回日本蛋白質科学会年会, ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア(横浜), June. 26, 2014.

〔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

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/imada/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

今田 勝巳 (IMADA, Katsumi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40346143

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

渡邊 信久 (WATANABE, Nobuhisa)

名古屋大学・シンクロトロン光研究センター・教授

研究者番号：70212321