

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870429

研究課題名(和文)クエン酸指示薬として開発したGFP融合タンパク質の蛍光強度変化機構の解析と改良

研究課題名(英文) Mechanism Analysis and Improvement of Fluorescence Changes of the Green Fluorescent Protein-based Citrate Sensors

研究代表者

本田 裕樹 (Honda, Yuki)

九州大学・カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所・学術研究員

研究者番号：90583849

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)：本研究では、申請者が開発したクエン酸を特異的に検出することができる蛍光タンパク質センサーについて、そのクエン酸認識機構の解明および性能の改良を目的とした。タンパク質の一次構造のごくわずかの違いでクエン酸に対して異なる蛍光強度変化を示す本センサーの認識機構の解析には至らなかった一方、性能の改良および応用の可能性を探るために実用サンプルを用いたクエン酸検出への適用について検討した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the citrate-sensing mechanism and to improve sensitivity of the newly developed fluorescent protein-based sensor for citrate. Elucidation of mechanism for citrate sensing have not completed. On the other hand, applicability of the sensor to real samples was investigated for the improvement of sensitivity and the practical use.

研究分野：応用生物化学

キーワード：蛍光タンパク質センサー 蛍光クエン酸指示薬 バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

クエン酸は、あらゆる生物の細胞内において普遍的に検出される有機酸であり、糖代謝や脂質合成における重要な制御分子である。近年では、ガン細胞と正常細胞におけるクエン酸濃度の相違や、ガン細胞の代謝におけるクエン酸の特徴的な役割が注目されている (Biochim. Biophys. Acta, 1825, 111-116 (2012).)。蛍光指示薬を用いたバイオイメージング技術を基盤とする細胞内のクエン酸の特異的かつ迅速な精密定量を可能とする技術の確立は、生体関連化学分野における基礎研究および応用研究の両面において重要である。

申請者は、GFP の円順列変異体とクエン酸と特異的に結合し構造変化する細菌由来センサータンパク質との融合タンパク質を作製することで、新規な蛍光クエン酸指示薬 (タンパク質) を開発した (図 1、PLoS ONE, 8, e64597 (2013).、日経産業新聞 2013 年 6 月 21 日付 10 ページ)。当該蛍光クエン酸指示薬は、クエン酸に特異的かつ数十 μM から数 10 mM の範囲で濃度依存的に蛍光強度が変化する。CF98 および CF99 (センサータンパク質における GFP 挿入位置によって命名) は、クエン酸濃度の増加とともに蛍光強度が増大もしくは逆に減少する性質を示す。また、励起スペクトルに 2 つのピーク (413 nm と 504 nm) が存在し、この 2 つの励起波長における蛍光強度比を利用して指示薬濃度に依存せずにクエン酸濃度の定量が可能である (図 2)。

一方、細胞内のクエン酸濃度変化は数 mM の範囲内である。クエン酸の細胞内濃度変化の検出や精密定量には、クエン酸の数 mM 内の微量な変化に対する蛍光強度比の変化率が大きく向上した蛍光クエン酸指示薬の高性能化が必要である。高性能蛍光クエン酸指示薬の開発には、構造学的解析による CF98 と CF99 におけるクエン酸濃度依存的な蛍光強度の増大および減少機構に関する理論的な解析と、その知見を活用した指示薬の高性能化が必要となる。

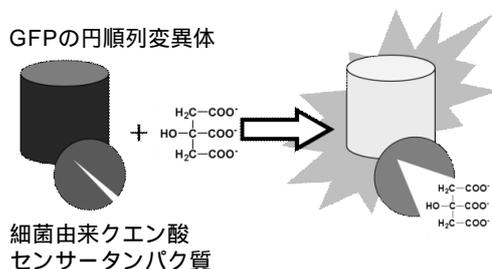


図 1 蛍光クエン酸指示薬の模式図

クエン酸と結合し構造変化するセンサータンパク質と GFP の円順列変異体を融合し、蛍光クエン酸指示薬を開発した。

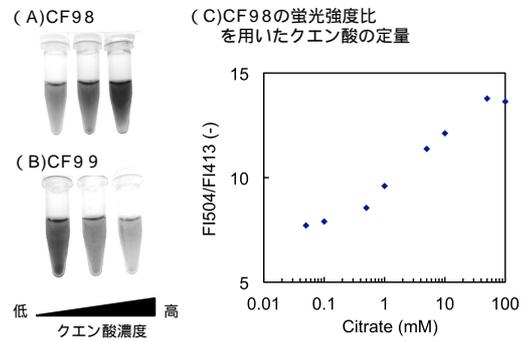


図 2 CF98 と CF99 のクエン酸濃度に応じた蛍光強度変化と蛍光強度比を用いた定量

(A, B) CF98 および CF99 溶液に励起光を照射して撮影。(C) CF98 の励起スペクトルの 2 つのピーク (413 と 504 nm) の蛍光強度比をプロット。

2. 研究の目的

本研究では申請者らが開発した新規な蛍光クエン酸指示薬の蛍光強度の増大および減少機構の解析と、指示薬としての性能向上を目的とした。加えて指示薬として利用するために必要とされるタンパク質の安定性や保存性、定量性についての基礎データを得た。

3. 研究の方法

(1) 構造解析と高性能化変異体の作製

蛍光クエン酸指示薬 CF98 と CF99 は、最近由来のクエン酸センサータンパク質に対して、円順列変異体 GFP を挿入することで得られたタンパク質である。大腸菌 BL21(DE3)株と pET システム (Novagen) を用いて His タグ融合タンパク質として CF98 および CF99 を大量生産および精製した。タンパク質精製には菌体の破碎やカラム精製などの煩雑でコストのかかる操作が必要とされることから、実験の段階によっては、細胞外からのクエン酸の取り込みと容易にするクエン酸輸送体タンパク質 CitT 遺伝子を共発現する大腸菌も使用した。

His タグ融合タンパク質として大量に生産・精製した蛍光クエン酸指示薬について、クエン酸結合・非結合状態での結晶を取得しようとして試みた。結晶化の初期条件は、スクリーニングキットを用いて検討した。高性能化についてはクエン酸との結合に参与するアミノ酸への部位特異的変異導入により、性能向上がみられる変異体の取得について検討した。

(2) 安定性等に関するデータの取得

精製した蛍光クエン酸指示薬の温度依存性については測定時の温度を所定の温度として試験した。安定性は所定の温度に一定時間保管したのちに、常温下のクエン酸検出試験に供することで試験した。凍結乾燥を行った指示薬を再度緩衝液に溶解し、性能が維持されるか確認した。

4. 研究成果

(1) 構造解析と高性能化変異体の作製

当初の目的を達成できず未完了である。変異体に作製についてはいくつかの変異体を作製し、クエン酸に対する濃度応答に変化の生じた候補を得た。これらについては詳細な解析を続けている。また、性能向上の一環として、他の色の蛍光タンパク質（具体的には mCherry）と細菌由来クエン酸センサータンパク質の融合タンパク質の作製を試みた（未発表）。

(2) 安定性等に関するデータの取得

指示薬としての性能向上と実際の応用に対しては、その物性に対する基礎的なデータを収集し問題点を明らかにする必要があった。そのため、クエン酸検出における温度依存性、温度安定性、また凍結乾燥による保存安定性を試験した。

温度依存性については、20 度から 40 度でのクエン酸濃度と蛍光強度依存性を調べた。図 3 は CF98 と CF99 において 504 nm の蛍光強度を各温度とクエン酸濃度ごとにプロットしている。温度の変化により蛍光強度が変化するもののクエン酸濃度の変化によって蛍光強度が増加する（CF98）あるいは減少する（CF99）という性質は保たれている。温度を常温付近で一定にしておけば十分クエン酸検出試薬として利用可能であることが示された。

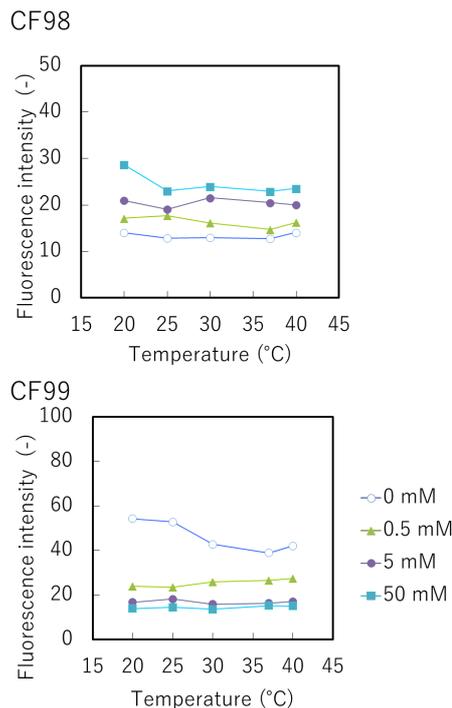


図 3 蛍光クエン酸指示薬の温度依存性クエン酸濃度変化に対する蛍光強度（504 nm）の変化を温度ごとにプロットした。

続いて温度安定性について試験した。図 4 に CF98 を各温度で所定の時間処理した後に、クエン酸濃度の検出に供した際の蛍光強度変化を示す。この結果、50 で 5 時間の処理を行った CF98 であってもクエン酸に対して蛍光強度が変化する能力に大きな劣化が見られないことが明らかになった。60 では時間経過とともに蛍光強度および強度変化能に劣化がみられはじめ、70 以上の処理では 1 時間で能力を失うことが明らかになった。しかし、常温よりはかなり高い温度域に数時間放置しても性能変化は少ないため、指示薬としての今後の利用に期待できる。なお、CF99 についても同様の結果を得た。

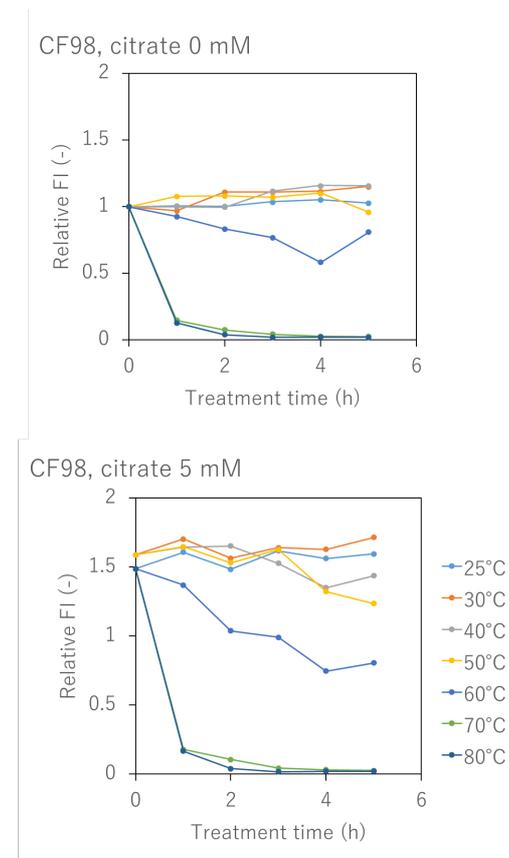
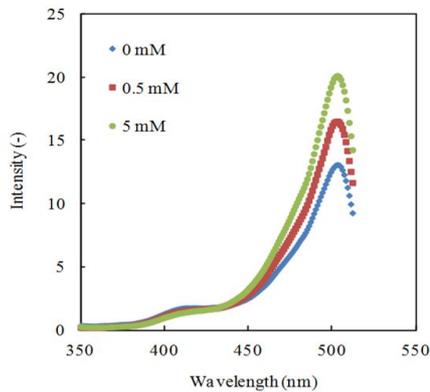


図 4 蛍光クエン酸指示薬の温度安定性各温度で所定の時間保持したのちにクエン酸 0 mM、5 mM の溶液に置いた際の蛍光強度（504 nm）の変化をプロットした。25、0 時間処理、クエン酸 0 mM の値を基準にした値をプロットした。

続いて保存性について検討するため、精製した CF98 および CF99 に対して凍結乾燥処理を行い、得られた粉末を再度緩衝液に懸濁した後にクエン酸濃度変化の検出が可能かどうか検討した。図 5 に凍結乾燥前の CF98 と、凍結乾燥後に得られた粉末を再度溶液に溶かしたものにおける蛍光強度の変化を示す。この結果、凍結乾燥をしても問題なくクエン酸濃度の検出に利用可能であることがわかった。なお、タンパク質溶液として -20 および -80 に保存した場合であっても常温で

凍結乾燥処理前



凍結乾燥処理後

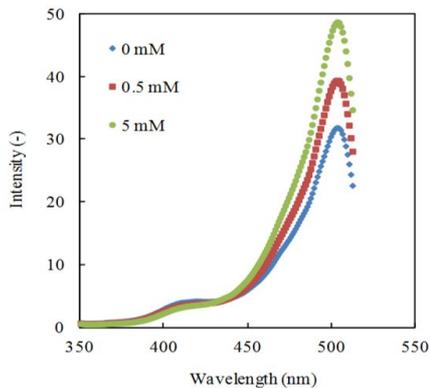


図5 凍結乾燥処理前後の CF98 のクエン酸濃度依存性

凍結乾燥処理前の CF98 および凍結乾燥処理により得られた粉末を再度緩衝液に懸濁した際のクエン酸濃度依存性を励起スペクトルにより評価した。

溶解した後に問題なくクエン酸検出に使用できることが確認できている。

ここまでの結果、温度依存性、温度安定性、保存に関する基礎的なデータを得ることに成功した。これらの結果は、実際にクエン酸指示薬としての利用を考えるうえで重要である。今後はこれらの結果をもとに、実サンプル中のクエン酸濃度検出への応用や、細胞内での使用方法について検討する予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Yuki Honda, Kohtaro Kirimura, Circularly Permuted Fluorescent Protein-based Indicators for Citrate, The International Chemical Congress

of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, No.417, December 16, 2015.

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 裕樹 (HONDA Yuki)
九州大学・カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所・学術研究員
研究者番号: 90583849

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし