

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07072

研究課題名(和文) 非天然アミノ酸を使用したin vivoでのシナプトタグミンの立体構造変化の検出

研究課題名(英文) Conformation change of synaptotagmin probed by the fluorescent unnatural amino acid in vivo

研究代表者

坂田 宗平 (Sakata, Souhei)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40528006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シナプトタグミン(Syt)は神経前終末でカルシウムセンサーとして働くことが知られているが本研究課題では遺伝コード拡張法を用いて生体内で機能しているSytの立体構造変化を調べることを目的とした。まずゼブラフィッシュの体内で遺伝コード拡張法を機能させる技術を確立した。これは生体に遺伝コード拡張法が適応できることを示した数少ない例である。またアセチルコリン受容体を利用して蛍光ラベルの導入場所を検討したところ、多くの場所で蛍光輝度変化が検出されなかった。このことは導入部位は慎重に検討する必要があることを示している。今後この成果をさらに発展させ、生体内でのSytの構造変化を明らかにしていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝コード拡張法はタンパク質の狙った部位特異的に蛍光タグを導入できるなど、非常に有用な方法ではあるが、培養細胞等や一部の発現系などにしか適用できなかった。本研究課題ではこれを生体に応用することに成功した。これは生体で遺伝コード拡張法を機能させた数少ない例である。また今後、他のタンパク質でも同様に細胞内での構造変化に関する情報が得られれば、新規の治療薬の開発につながる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Synaptotagmin (Syt) is known to be the calcium sensor in presynaptic terminals. I have carried out my project to examine conformation changes of Syt in vivo using the genetic code expansion method. This method enables to incorporate the fluorescent unnatural amino acid (Anap) in the polypeptide of target protein as a fluorescent marker for conformation changes. First, I established the technique to apply the method in zebrafish embryo. Second, I searched the position into which Anap is incorporated using acetylcholine receptors and showed that only one site is available for the measurement of Anap fluorescence change. This means that limited positions can be used as an incorporation site to probe conformation change. These are big steps for the measurement of protein structure changes in living animals.

研究分野：生理学

キーワード：シナプス シナプトタグミン 遺伝コード拡張法 非天然アミノ酸 イオンチャネル ゼブラフィッシュ 立体構造変化

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の機能は多くの神経細胞同士のコミュニケーションにより成り立っている。情報の伝達を行う神経細胞はお互い非常に近接したシナプスと呼ばれる構造を作り、そこで一つの神経細胞がもう一方の神経細胞に情報を受け渡す。これまでの研究によりシナプスでは情報の送り手となる細胞が電気的に興奮すると細胞内のカルシウム濃度が上昇し、それが引き金となって神経伝達物質を細胞間隙に放出し、それを情報の受け手となる細胞が受容する。神経伝達物質を受けると神経細胞は興奮性を変化させるため、シナプスにおいて情報の伝達が可能になる。

情報の送り手となる細胞内では神経伝達物質を内包した小胞が存在する。細胞内カルシウム濃度の上昇によりこれがシナプスに面した細胞膜であるシナプス前膜に融合し、細胞間隙に放出されると考えられている。膜融合のメカニズムについては未だ不明な点が多いが、近年の研究により、SNARE タンパク質と呼ばれる数種類のタンパク質が、膜融合に重要な働きを担っていることが明らかになってきた。特にシナプス前膜におけるシナプス小胞の融合ではカルシウム濃度が上昇した後、素早く神経伝達物質の放出が起こるためカルシウム依存的でかつ非常に短い時間スケールで膜融合が起こる特別な仕組みが存在する。SNARE タンパク質の中にシナプトタグミンと呼ばれるタンパク質が存在する。シナプトタグミン (Syt) は N 末端側に膜貫通領域を持ち、C 末端側にカルシウムにより制御をうける C2 ドメインを持つ。Syt のカルシウム依存性は、神経細胞において神経伝達物質の放出に必要な濃度とほぼ一致している。多くの動物種において Syt は保存されており、Syt が欠損すると神経伝達物質の放出が阻害されるという報告もあるため、これまでのところ Syt が開口放出におけるカルシウムセンサーであると考えられている。

最近、X 線結晶構造解析により Syt の 3 次元構造が明らかにされた。明らかにされた構造は Syt だけではなく、数種の SNARE タンパク質の複合体の構造であり SNARE タンパク質同士がどのように“膜融合装置”を形成するか初めて明らかにした。しかしながら小胞が存在しない状態の構造であったため、実際に細胞内で形成されるものと同じのものがどうか確かめる必要がある。さらに明らかにされた構造が実際どのように動作して最終的に膜が融合するのかわくについては更なる研究が必要である。

最近、我々の研究グループは細胞膜の脱分極刺激により酵素として働くタンパク質(VSP)の構造変化を検出することに成功した。遺伝コード拡張法を利用して蛍光を持つ人工アミノ酸を部位特異的に導入することで、導入した部位の構造変化を蛍光変化で検出した。この方法に 2 つ利点がある。一つは生理的な条件下での構造変化を明らかにできる点である。多くのタンパク質の立体構造を調べる方法ではタンパク質を生化学的に精製する必要があるため、生体膜に埋まった状態での構造変化を検出することは不可能である。2 つ目はタンパク質の“動き”が分かる点である。Syt の構造を明らかにした X 線結晶構造解析で得られる情報はいわばタンパク質のスナップショットであり、実際のタンパク質の動作に関してはほとんど情報を得ることができない。タンパク質の動作原理を理解する上で、X 線結晶構造解析のように“形”を明らかにするのは最初のステップであり、その構造を元に実際それがどう動くのか明らかにするのが次のステップであると言える。その意味で Syt の研究はまさに今、次のステップに進もうとしている所だと言える。

2. 研究の目的

X 線結晶構造解析によって構造が明らかになったシナプトタグミン (Syt) について、より生理的な条件下での構造変化を明らかにすることを目的とする。遺伝コード拡張法を用いて部位特異的に蛍光を持つ非天然アミノ酸を導入し、これをプローブとして導入部位の構造変化を検出する。最終的に Syt は生体に発現したものを使用する。本研究課題ではゼブラフィッシュの体内に発現し機能している Syt に蛍光ラベルを導入し、その構造変化を調べることを最終目標とした。

3. 研究の方法

最終的な目標を達成するために、技術的に乗り越えるべき点が 2 つ存在する。1 つは本研究課題ではゼブラフィッシュの体内で遺伝コード拡張法を利用して蛍光を持つ非天然アミノ酸を導入することを計画した。しかしながら遺伝コード拡張法は培養細胞などで使用できることは示されていたが、生体で発現しているタンパク質に応用した例はこれまでない。そのためまず、ゼブラフィッシュの体内で、培養細胞等に適用されてきた遺伝コード拡張法が機能するのか、もし機能しなかった場合、どのようにしたら機能するのか技術開発を行う必要がある。2 つ目はシナプトタグミン(Syt)は、約 400 個のアミノ酸からなるタンパク質だが、この 400 個のうちどのアミノ酸を蛍光を持つ非天然アミノ酸 (Anap) に置換するか検討する必要がある。そのためまずは測定系が確立されているアフリカツメガエルの卵母細胞にリガンド作動性のイオンチャネルであるアセチルコリン受容体を発現させる方法を用い、アセチルコリン受容体の様々な部位に Anap を組み込み、タンパク質の動作に伴う蛍光輝度変化が計測できるかどうか試した。

4. 研究成果

(1) 遺伝コード拡張法のゼブラフィッシュへの応用

タンパク質は DNA から転写された mRNA を元に、開始コドンから順に各コドンに対応するアミ

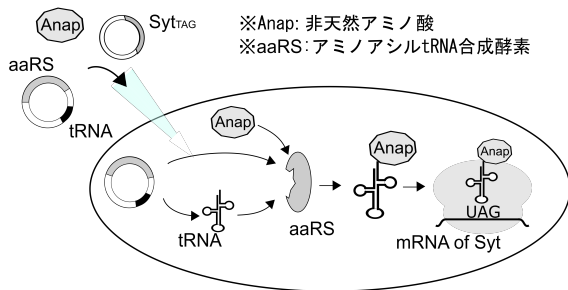


図1. 遺伝的な方法により非天然アミノ酸を組み込む方法
非天然アミノ酸、および目的の非天然アミノ酸のみを認識するaaRS、またこのaaRSにのみ認識されるtRNA、そして目的タンパク質のDNAもしくはmRNAを細胞内に導入し、部位特異的に非天然アミノ酸を組み込む。

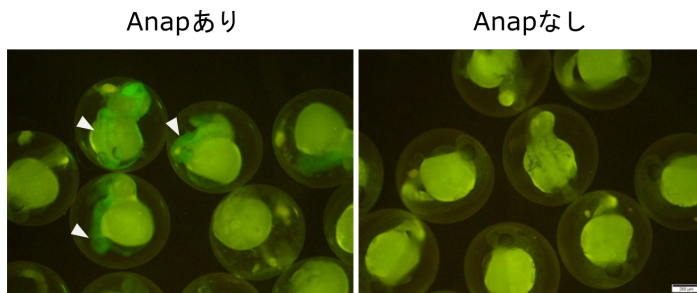


図2. ゼブラフィッシュへの遺伝コード拡張法の応用
受精後1日目の胚。受精卵の1細胞期にtRNA, aaRSおよびGFPのmRNAに加え、非天然アミノ酸 (Anap) を同時に顕微注入した胚 (左) とAnapを加えなかった胚 (右)。Anapを加えるとGFPの蛍光を発する胚が存在する (矢頭)。

シュに導入する方法はいくつか存在する。一つはこれらの遺伝子セットを持ったトランスジェニックゼブラフィッシュを作成する方法である。この場合、Anapの導入方法についての問題は残るが、特定の細胞群のみ遺伝コード拡張法を動作させたり、特定の発生段階でのみ機能させたりすることが可能となり、子孫にも形質が受け継がれるため実験を行うごとにtRNAをはじめとした因子は導入する必要がない。このようにトランスジェニック動物を作成する方法は利点が多いが、トランスジェニック動物の作成には時間と労力が必要となる。それに加え、外来のtRNAやaaRSは細菌由来のものであり、これらがゼブラフィッシュの体内で発現機能するかどうか全く不明であった。そのため、まずは遺伝コード拡張法をゼブラフィッシュの中で機能させる技術の開発から行った。ゼブラフィッシュの受精卵にmRNAを顕微注入すると、1, 2日後にmRNAがコードしているタンパク質が発現することが知られている。今回GFPのmRNAを使用した。GFPの40番目のチロシンをTAGの終止コドンに変換しておき、Anapが意図したとおり組み込まれるとGFPの全長が翻訳されGFPの蛍光が観察できる。もしAnapが組み込まれなかった場合、TAGは終止コドンなので、ここで翻訳が止まりGFPの蛍光が観察できない。tRNAは全長のセンス鎖とアンチセンス鎖をアニールさせて2本鎖のDNAにしたのち、in vitroでRNAを合成した。aaRSとGFPはそれぞれのmRNAを準備し、これらをAnapと共に1細胞期の受精卵に顕微注入した。しかしながら、GFPの蛍光は観察されなかった。そこで注入するtRNAの量を10ug/ulに調整し、受精卵に注入したところ、受精後1日目の胚にGFPの蛍光を持つものが観察された(図2)。このことより、遺伝コード拡張法はゼブラフィッシュの体内で機能するが、そのためには高濃度のtRNAが必要であることが分かった。

(2) アフリカツメガエルの卵母細胞の発現系を利用したAnap挿入部位の検討

タンパク質は通常数百ものアミノ酸が一本の鎖状につながったものである。このうちどのアミノ酸をAnapに置換するべきか検討する必要がある。Anapの蛍光信号の現れ方が導入する場所によって異なる可能性があるため、あらかじめ挿入場所によってどの程度バラつきがあるのか調べることが重要である。そのため神経細胞と筋細胞の間のシナプスである神経筋接合部で発現しているアセチルコリン受容体を利用して、これをアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させてAnapを様々な場所にそれぞれ挿入して蛍光信号がどのように異なるか調べた。アセチルコリン受容体は五量体で機能する。特に筋のシナプスでは2タイプ存在するが、簡単のために本課題では、の3種類で構成されるものを使用した。Anapはsubunitのリガンド結合部位を持つ細胞外に露出した部分に挿入した。実験は蛍光に加え、受容体を通る電流を測定した。電流計測によりタンパク質が機能しているかどうか確かめながら、Anapの蛍光輝度がどれだけ変化するか、つまりタンパク質機能とどれだけ相関するか調べた。10か所以上、それぞれAnapを挿入したところ、蛍光輝度変化が観察されたのは一か所のみだった(図3)。他の多くの場所

ノ酸が数珠つなぎに結合されて合成される。合成の場合はリボソームであり、各アミノ酸はそれに対応するコドンと反対の配列であるアンチコドンを持ったtRNAに結合してリボソームに送られてくる。遺伝コード拡張法はこのシステムを利用して人工アミノ酸をポリペプチドに組み込む。終止コドンにはそれに対応するtRNAが存在しない。そのため終止コドンを持ったtRNAを細胞内に導入し、これに目的の人工アミノ酸、本研究では蛍光を持つ非天然アミノ酸(Anap)を結合させる。その上で目的のタンパク質のターゲット部位を終止コドンに変異させればAnapを部位特異的に導入できる。tRNAとアミノ酸の結合にはアミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)による触媒が必要である。そのため遺伝コード拡張法に必要なものは人工アミノ酸(Anap)、Anap専用のtRNAおよび、AnapとAnap専用のtRNAの結合を触媒するaaRSの3つであり、これらを細胞に導入すると同時にターゲット部位を3つの終止コドンのうちのTAGに変異させた目的タンパク質のDNAもしくはmRNAが細胞内に存在することが必要である(図1)。これらをゼブラフィッ

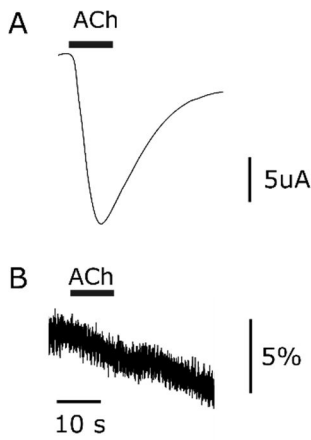


図3.アフリカツメガエルの卵母細胞を利用したAnap挿入部位の検討。 α サブユニットの223番目のアミノ酸をAnapに置き換えた時のアセチルコリン受容体の電流(A)。およびAnapの蛍光輝度変化(B)。アセチルコリン(ACh)を添加したタイミングで蛍光輝度変化している。比較のためAとBの横軸(時間軸)をそろえて表示した。

ではアセチルコリン受容体は機能するが蛍光輝度変化は観察されなかった。この事実はAnapの蛍光輝度変化を計測するには、あらかじめ予備実験を行い挿入場所を入念に検討する必要があることを示している。

今回の研究課題を遂行した結果、まず、ゼブラフィッシュにおいて遺伝コード拡張法を適

用できることが分かった。これまで培養細胞等、発現系を利用したものでした適用例がなかったが、生体にも応用できることが示された。これは今後、生体内で機能しているタンパク質の構造変化を可視化する基礎技術になると考えられる。またアフリカツメガエルを使ったAnap挿入部位の検討では多くの部位で蛍光輝度変化が検出されなかった。これは生体を使った実験を行っていく上でも、やはり発現系を使った予備実験は重要であり、Anapの挿入場所をあらかじめ検討しておく必要があることを示している。これらの知見を元に、今後もゼブラフィッシュ体内で発現機能しているSyntがどのように機能しているのか、立体構造変化に注目して明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawanabe A, Hashimoto M, Mishizawa M, Nishizawa N, Narita H, Yonezawa T, Jinno Y, Sakata S, Nakawaga A and Okamura Y	4. 巻 7
2. 論文標題 The hydrophobic nature of a novel membrane interface regulates the enzyme activity of a voltage-sensing phosphatase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLIFE	6. 最初と最後の頁 e41653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.41653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakata S and Okamura Y	4. 巻 597
2. 論文標題 Dynamic structural rearrangements and functional regulation of voltage sensing phosphatase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 29-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP274113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Egashira Y, Zempo B, Sakata S and Ono F	4. 巻 4
2. 論文標題 Recent advances in neuromuscular junction research prompted by the zebrafish model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Opinion in Physiology	6. 最初と最後の頁 70-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cophys.2018.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakata S, Matsuda M, Kawanabe A, Okamura Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Domain-to-domain coupling in voltage-sensing phosphatase.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophys Physicobiol.	6. 最初と最後の頁 85-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.14.0_85	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakata S, Jinno Y, Kawanabe A and Okamura Y	4. 巻 113
2. 論文標題 Voltage-dependent motion of the catalytic region of voltage-sensing phosphatase monitored by a fluorescent amino acid	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 7521, 7526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1604218113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, Ozkucur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y, Okamura Y.	4. 巻 1858
2. 論文標題 Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 2972, 2983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2016.09.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawai T, Miyata H, Nakanishi H, Sakata S, Morioka S, Sasaki J, Watanabe M, Sakimura K, Fujimoto T, Sasaki T, Ikawa M, Okamura Y	4. 巻 116
2. 論文標題 Polarized PtdIns(4,5)P2 distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 26020, 26028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1073/pnas.1916867116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sakata S and Ono F
2. 発表標題 Analysis of junctophilin2 knock out zebrafish
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田宗平、小野富三人
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおけるジャンクトフィリンの発現と機能の研究
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田宗平、小野富三人
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの速筋および遅筋における網羅的な遺伝子発現解析
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----