

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657101

研究課題名(和文)細胞内タンパク質の微小な構造変化を可視化する手法の開発

研究課題名(英文)Development of methods to visualize small conformational change of proteins inside cells

研究代表者

今村 博臣 (Imamura, Hiromi)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：20422545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の構造変化を利用したフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)型バイオセンサーは、生きた細胞内の情報を得るための非常に有用なツールとなっている。しかし、構造変化の小さいタンパク質をバイオセンサーに利用することが非常に困難であるという欠点があった。本研究では、微小な構造変化を見分ける抗体を利用することによりこの問題を克服することを試みた。重要な細胞内代謝物であるアセチルCoA結合タンパク質とそれに対する抗体を利用することで、アセチルCoAに対するFRET型バイオセンサーの開発をおこなった。

研究成果の概要(英文)：Forster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors that employ conformational changes of proteins are useful tools to obtain information inside living cells. However, it has been quite difficult to use proteins with small conformational changes for FRET biosensors. In this study, we used antibody to discriminate small conformational changes of proteins in order to overcome the above problem. We developed a FRET biosensor for an important metabolite, acetyl-CoA, by using an acetyl-CoA binding protein and an antibody against it.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング FRET タンパク質動態

1. 研究開始当初の背景

細胞あるいは生命の動的特性を理解する上では、細胞内における物質濃度やタンパク質活性などの時空間パターンを知ることは欠かせない。これらの情報を得るための非常に強力な技術として、遺伝子コードされた蛍光バイオセンサーが近年多用されるようになってきている。これらの蛍光バイオセンサーの大部分は、目的物質が結合するタンパク質あるいは活性を調べたいタンパク質と蛍光タンパク質を融合させたものであり、タンパク質が働く際の構造変化や相互作用の変化を、蛍光強度やフェルスター共鳴移動(FRET)効率の変化として検出できるように設計されている。しかし、これまで作製されているタンパク質ベースの蛍光バイオセンサーは、生物が持つタンパク質の膨大な種類から考えるとあまりにも少ない。FRET バイオセンサーを作製する場合は、FRET 効率の変化が生じなければならないため、目的タンパク質自身が大きな構造変化を示すか、あるいはリン酸化などの修飾によって別のタンパク質との相互作用が変化しなければならない。しかし、多くのタンパク質は単独で働き、かつ構造変化が小さく、FRET バイオセンサーの素材として用いることは困難であった。

2. 研究の目的

このような学術的な背景のもと、申請者は、抗体が有する高い選択性を FRET バイオセンサーに適用すれば、構造変化が小さくかつ他のタンパク質と相互作用しないタンパク質であっても、機能の変化を可視化できるのではないかと考えた。そこで、本研究ではタンパク質の微小な構造変化を検出可能な FRET バイオセンサーを一本鎖抗体 (scFv) を利用して開発することを目標とした。本研究の概念は、原理上全てのタンパク質に適用可能であり、生細胞内でタンパク質の動きを網羅的に知るために有用な方法論となると期待される。具体的にはアセチル CoA 結合タンパク質のリガンド結合状態の変化を見分ける scFv をスクリーニングすることにより、生細胞内アセチル CoA 濃度を可視化する FRET バイオセンサーを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の流れで研究を進めた。

- (1) Protein data bank (PDB)から構造既知のアセチル CoA 結合タンパク質の検索
- (2) ファージディスプレイ scFv ライブラリーを用いてタンパク質のアセチル CoA 結合状態を識別する scFv のスクリーニング
- (3) アセチル CoA 結合タンパク質と上記の scFv、および蛍光タンパク質を連結させた人工タンパク質の作製
- (4) 上記の人工タンパク質の精製と評価

4. 研究成果

(1) アセチル CoA 結合状態を特異的に認識する scFv の単離

まず、構造既知のアセチル CoA 結合タンパク質として、シロイヌナズナ At1g77540 タンパク質、*Bacillus licheniformis* グリホサートアセチル転移酵素 (GAT)、サルモネラ菌 RimI を選択した。これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製したタンパク質とアセチル CoA を混合した後に脱塩カラムを通し、タンパク質の画分に出るアセチル CoA の量を調べることにより、各タンパク質とアセチル CoA の結合能を評価した。その結果、発現量とアセチル CoA 結合能の両方について GAT が最も優れていたため、以降の実験はすべて GAT を用いておこなうこととした。GAT を avi-tag との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製した。この avi-GAT をストレプトアビジン磁気ビーズに固定し、scFv ファージディスプレイライブラリー (Thomlinson I + J) のパニングを 3 回おこなった。パニングの際には常にアセチル CoA を溶液に入れておいた。次に、得られた scFv のクローンを精製し、アセチル CoA の有無で GAT との結合調べた結果、アセチル CoA の有無によって GAT との結合能が大きく変化する scFv のクローンを得た (図 1)。

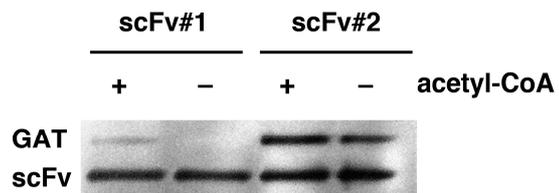


図 1. Acetyl-CoA を結合した GAT を特異的に認識する scFv

GAT をビーズに固定し、acetyl-CoA の存在下および非存在下で pull-down アッセイをおこなった。scFv#1 クローンは acetyl-CoA の存在下でのみ、GAT と結合している。

(2) scFv を用いた FRET センサーの構築
GAT と scFv および 2 種類の蛍光タンパク質が 1 本のポリペプチドとして作られるように、図 2 に示す 4 種類の組換え遺伝子を作製した。大腸菌で発現させ精製したタンパク質の蛍光スペクトルを蛍光分光器によって解析した。その結果、アセチル CoA が存在しないときの、1 から 4 のコンストラクトの 530 nm/470 nm の蛍光強度比は、それぞれ 0.8、0.9、1.9、2.2 であった。しかし、アセチル CoA を加えてもそのスペクトルに大きな変化は見られなかった。この結果は、GAT と scFv を 1 本のポリペプチドとして発現させたために実効濃度が高くなり、アセチル CoA 非存在下でも両者が結合していることを示唆している。そこで、両者の結合力を低下させるため、GAT の表面に位置するアミノ酸に点変異

を加え、アセチル CoA の有無で FRET 効率が変化する変異体をスクリーニングした。その結果、現時点でアセチル CoA によって FRET 効率が 40% 程度変化するものが得られた (図 3)。この結果は、本研究で提案した scFv を用いた FRET センサーの開発が実際に可能であることを実証するものである。今後は、FRET 効率変化量をさらに高めた変異体を作製した上で、このセンサーが生細胞内のアセチル CoA 濃度を実際に検出可能かどうかの検証をおこなう予定である。

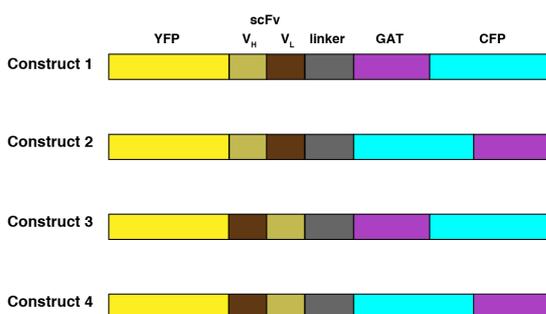


図 2 . 作製したコンストラクト

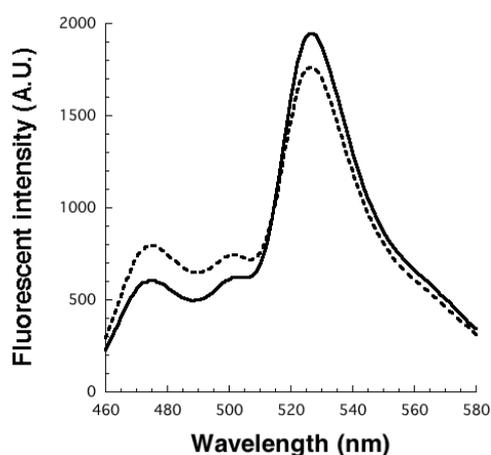


図 3 . scFv を利用したアセチル CoA センサーの蛍光スペクトル

アセチル CoA 添加前(点線)および添加後(実線)

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 11 件)

- Shintani Y, Drexler HC, Kioka H, Terracciano CM, Coppen SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S, Nakayama H, Takashima S, Yashiro K, Suzuki K. "TLR9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2" *EMBO Rep*, 2014; 15(4): 438-45. DOI: 10.1002/embr.201337945 査読有
- Vishnu, N, Jadoon Khan, M, Karsten, F, Groschner, LN, Waldeck-Weiermair, M, Rost, R, Hallström, S, Imamura, H, Graier, WF,

Malli, R. "ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca^{2+} -release." *Mol Biol Cell*, 2014; 25(3): 368-79. DOI: 10.1091/mbc.E13-07-0433 査読有

- Tanaka, T, Nagashima, K, Inagaki, N, Kioka, H, Takashima, S, Fukuoka, H, Noji, H, Kakizuka, A, Imamura, H. "Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca^{2+} influx and subsequent Ca^{2+} oscillations." *J Biol Chem*, 2014; 289(4): 2205-16. DOI: 10.1074/jbc.M113.499111 査読有
- Kioka, H, Kato, H, Fujikawa, M, Tsukamoto, O, Suzuki, T, Imamura, H, Nakano, A, Higo, S, Yamazaki, S, Matsuzaki, T, Takafuji, K, Asanuma, H, Asakura, M, Minamino, T, Shintani, Y, Yoshida, M, Noji, H, Kitakaze, M, Komuro, I, Asano, Y, Takashima, S. "Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014; 111(1): 273-8. DOI: 10.1073/pnas.1318547111 査読有
- Kiyonaka, S, Kajimoto, T, Sakaguchi, R, Shinmi, D, Omatsu-Kanbe, M, Matsuura, H, Imamura, H, Yoshizaki, T, Hamachi, I, Morii, T, Mori, Y. "Genetically encoded fluorescent thermo-sensors for visualizing subcellular thermoregulation in living cells." *Nature Meth*, 2013; 10(12): 1232-8. DOI:10.1038/nmeth.2690 査読有
- Tsuyama, T, Kishikawa, J, Han, YW, Harada, Y, Tsubouchi, A, Noji, H, Kakizuka, A, Yokoyama, K, Uemura, T, Imamura, H. "In vivo fluorescent adenosine 5'-triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures." *Anal Chem*, 2013; 85(16): 7889-96. DOI: 10.1021/ac4015325 査読有
- De Bock, K, Georgiadou, M, Schoors, S, Kuchnio, A, Rita Cantelmo, A, Wong, RW, Quaegebeur, A, Ghesquière, B, Cauweberghs, S, Eelen, G, Phng, LK, Betz, I, Tembuysen, B, Brepoels, K, Welti, J, Geudens, I, Segura, I, Cruys, B, Bifari, F, Decimo, I, Blanco, R, Wyns, S, Vangindertael, J, Rocha, S, Collins, R, Munck, S, Daelemans, D, Imamura, H, Devlieger, R, Rider, M, Van Veldhoven, PP, Schuit, F, Bartrons, R, Hofkens, J, Fraisi, P, Telang, S, DeBerardinis, RJ, Schoonjans, L, Vinckier, S, Chesney, J, Gerhardt, H, Dewerchin, M, Carmeliet, P. "Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting." *Cell*, 2013; 154(3): 651-63. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.037 査読有
- 今村博臣、安東友美、藤川誠 . 細胞内 ATP

- の分布とダイナミクス、その制御 (2013) **生物物理**, 53, 20-23. DOI: 10.2142/biophys.53.020 査読有
9. Waldeck-Weiermair M, Alam MR, Khan MJ, Deak AT, Vishnu N, Karsten F, Imamura H, Graier WF, Malli R. Spatiotemporal correlations between cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} signals using a novel red-shifted mitochondrial targeted cameleon. (2012) **PLOS ONE**, 7, e45917. DOI:10.1371/journal.pone.0045917 査読有
10. Hatsugai N, Koldenkova VP, Imamura H, Noji H, Nagai T. Changes in cytosolic ATP levels and intracellular morphology during bacteria-induced hypersensitive cell death as revealed by real-time fluorescence microscopy imaging. (2012) **Plant Cell Physiol**, 53, 1768-1775. DOI:10.1093/pcp/pcs119 査読有
11. Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. Assessing the actual contribution of IF1, an inhibitor of mitochondrial F_0F_1 , to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology and cell viability. (2012) **J Biol Chem**, 287, 18781-18787. DOI: 10.1074/jbc.M112.345793 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 今村博臣「膵臓ランゲルハンス島における ATP と Ca^{2+} の同時イメージング」第3回発生におけるエネルギー代謝を考える会、2014.2.13、熊本大学発生医学研究所
2. 田中喬、今村博臣「膵臓ランゲルハンス島における ATP と Ca^{2+} の同時イメージング」日本生体エネルギー研究会 第39回討論会、2013.12.19、静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ
3. 今村博臣「ATP イメージングによる生細胞内ミトコンドリア機能の評価」日本生化学会第86回年会 シンポジウム「ミトコンドリアワールド:エネルギー生産から生体内環境保全まで」、2013.9.11、パシフィコ横浜
4. 今村博臣「蛍光 ATP バイオセンサーATeamを用いた膵島エネルギー代謝の解析」第13回 Islet Biology 研究会、2013.7.20、日本都市センターホテル
5. 今村博臣「蛍光 ATP バイオセンサーを用いた ATP 代謝の解析」第50回日本臨床分子医学会学術集会 第50回記念特別企画シンポジウム「分子イメージングの最前線」、2013.4.12、東京国際フォーラム
6. Sakamoto S, Kakizuka A, Imamura H, Imaging of intracellular ATP dynamics in single apoptotic cells, 11th International Student Seminar, 2013.3.10, Kyoto University, Japan
7. 坂本修一朗、野地博行、垣塚彰、今村博臣、アポトーシスにおける細胞内 ATP の挙動

の解析、日本生体エネルギー研究会 第38回討論会、2012.12.24、岡山大学(岡山)

8. Imamura H, Tsuyama T, Uemura T, Kakizuka A, Fluorescent ATP biosensor optimized for imaging of cells from non-vertebrate model organisms, International Symposia "New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences", 2012.9.28, University of Tokyo, Japan.
9. Imamura H, Tsuyama T, Kishikawa J, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Genetically-encoded ATP biosensor for low temperatures, 17th European Bioenergetic Conference, 2012.9.19, University of Freiburg, Germany.

〔図書〕(計1件)

1. Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Iwao, Y., Yokoyama, K. and Sato K. "ATP imaging in *Xenopus laevis* oocyte." In a book entitled "Sexual Reproduction in Animals and Plants" from Springer Japan. Hitoshi Sawada, Naokazu Inoue, and Megumi Iwano (eds.) :181-186.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/imamura/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今村 博臣 (IMAMURA HIROMI)

研究者番号 : 20422545

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし