

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05529

研究課題名(和文) タンパク質・プローブペアを用いた細胞内アルカリ金属イオン動態の可視化

研究課題名(英文) Imaging of alkali ion dynamics in cells using protein-coupled fluorescence probes

研究代表者

寺井 琢也 (Terai, Takuya)

埼玉大学・理工学研究科・特別研究員

研究者番号：00508145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルカリ金属イオン(ナトリウム、カリウム)は生体内で重要な役割を果たしているが、その動的挙動は十分明らかではない。本研究では有機小分子を基盤とするアルカリ金属イオン検出プローブを新たに開発し、これを特定の細胞小器官に発現させたタグタンパク質に選択的に共有結合させることで、細胞の特定部位におけるイオン動態の可視化に成功した。任意の小器官への局在は有機小分子プローブのみでは難しい場合が多いが、本手法は一般性が高く今後の展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Alkali metals (sodium, potassium) play important physiological functions in organisms, but their spatiotemporal dynamics is not well understood. In this research, we developed new organic fluorescence probes for these cations, and by conjugation of the probes to tag proteins that were expressed in some organelles, we succeeded in fluorescence imaging of target ions at the organelles of interest in live cells. Because this method has generality, it will be possible to create practical imaging tools for understanding other ion dynamics in cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子認識 合成化学 共焦点顕微鏡 蛍光センサー

TLSHalo は高い水溶性と蛍光量子収率を併せ持ち、生理的濃度の K^+ と反応して約 10 倍の蛍光上昇を示した(蛍光波長 535 nm, $K_d = 22$ mM)。また K^+ 以外の金属イオンの影響は無視できる程度であった。

続いて TLSHalo を HaloTag タンパク質に結合させて蛍光特性を測定した。この結合反応は生理的緩衝液中で 1 時間以内に完結し、他のタンパク質に対する非特異結合は見られなかった。得られた複合体に対して K^+ を順次添加したところ、プローブ単独の場合と同等の蛍光上昇が観察された。一方、スルホ基を持たないコントロールプローブの場合はバックグラウンド蛍光が上昇して K^+ への応答の鈍化が見られた。この事は、タンパク質複合型プローブの開発に当たっては適切な水溶性リンカーの導入が重要であることを示唆している。

(2) K^+ 検出プローブの細胞応用

開発した TLSHalo を用いて細胞イメージングを行った。細胞膜上に GPCR 融合 HaloTag を一過性発現させた HeLa 細胞に対してプローブを添加し共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、タグタンパク質を発現している細胞の膜上から緑色の蛍光が観察された(図 2 A)。続いて培地中の K^+ 濃度を増大させてイメージングを行ったところ、全体的な蛍光上昇は見られたものの、細胞ごとに蛍光強度がばらついており定量性のあるデータとは言えない結果となった。これは細胞ごとに「プローブの存在量」「刺激に伴う形態変化」「焦点面のずれ」が異なる点が原因と考えられる。そこでこれらの要素を補正するため、独立の蛍光波長を持つ HaloTag リガンドで同時染色した結果とのレシオを取ることを考えた。厳密には 1 分子のタンパク質は TLSHalo もしくは内部標準リガンドのいずれかと確率的に結合するのだが、通常の光学顕微鏡レベルでは十分に補正が可能であり、プローブ単独の時と比べて大幅に S/N のよい結果が得られた(図 2 B)。

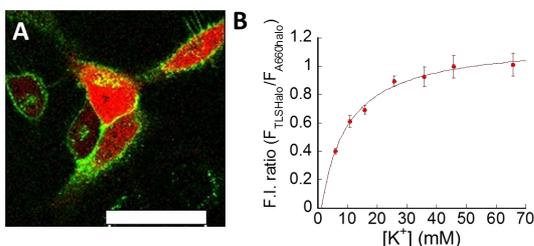


図 2 . TLSHalo の膜局在 (A、緑色がプローブ蛍光) およびレシオ測定による K^+ 濃度の定量 (B)

上記の結果を踏まえ、細胞表面に足場となる HaloTag タンパク質を発現させた HT29 細胞 (注: Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルである BK チャンネルを発現している) に対して TLSHalo を添加し、イオノマイシンによって細胞に Ca^{2+} 刺激を与えたところ、プローブの蛍光が速やかに上昇した。更にこの上昇は Ca^{2+} キレ

ーターである BAPTA および BK チャンル阻害剤 iberiotoxin によって抑えられた(図 3)。以上より、本プローブが内在性チャンネルを介して細胞外に流出する K^+ イオンを検出するのに十分な感度を有していることが確かめられた。

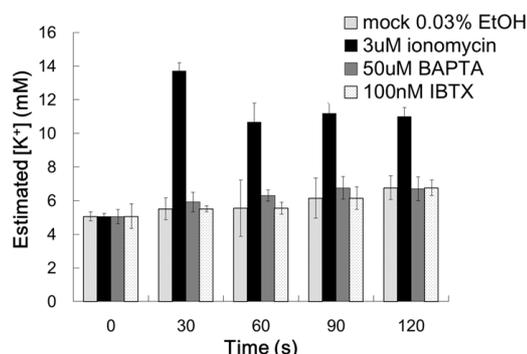


図 3 . TLSHalo により求めた HT29 細胞表面の K^+ 濃度の推移

また別の実験として、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いることでパッチクランプ法による脱分極刺激によって細胞内から放出される K^+ を捉える事にも成功した。なお本実験は名古屋市立大学薬学部の今泉祐治教授、山村寿男准教授らと共同で実施した。細胞表面での K^+ 濃度変化を選択的に蛍光イメージングした例はこれまでに無く、本研究で開発した方法論は K^+ の生理機能解明に有用と期待される。

(3) Na^+ 検出プローブの開発

Na^+ は細胞外液中に最も多く含まれる重要な金属イオンであるが、細胞内の特定小器官における濃度変化を検出可能なプローブはこれまで報告が無かった。そこで研究代表者らは K^+ での例に倣い、 Na^+ キレーター、蛍光団、HaloTag リガンドの 3 要素からなる新規蛍光プローブ HaloNa-1 を合成した(図 4)。本化合物は高い水溶性を持ち、生理的濃度の Na^+ と反応して約 3 倍の蛍光上昇を示した(蛍光波長 525 nm, $K_d = 12$ mM)。pH 6 以下では蛍光団の性質による機能低下が見られたものの中性条件では概ね問題なく、 Na^+ 以外の金属イオンの影響は無視できる程度であった。また HaloTag タンパク質との結合後も Na^+ に対する応答性は維持されていた。

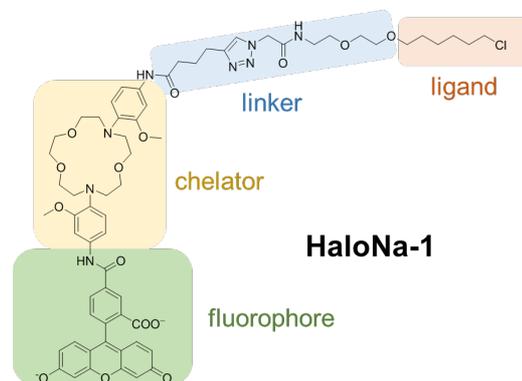


図 4 . 蛍光プローブ HaloNa-1 の構造

(4) Na⁺検出プローブの細胞応用

HaloNa-1 を HeLa 細胞にロードし、細胞内に発現させた HaloTag タンパク質との結合条件ならびに未反応プローブの洗浄条件を検討した。その結果、プローブは速やかに細胞膜を透過してタグタンパク質と共有結合を形成する一方で、HaloTag タンパク質と結合しないプローブを細胞から排出するために数時間以上のポストインキュベーションが必要であることが分かった。更に前述の K⁺プローブの場合と同様、細胞ごとの蛍光強度のばらつきを抑えるためには赤色蛍光タンパク質 mCherry との共染色 (i.e. HaloTag 融合タンパク質として発現させる) が有効であることが示された。

以上の検討を行った後、amphotericin B でカチオンの膜透過性を向上させた条件下で細胞外液の Na⁺濃度を変えてイメージングを実施した。Na⁺濃度が上昇すると細胞質の HaloNa-1 の蛍光も上昇し、mCherry との強度比を取ることでデータのばらつきを抑えることが出来た (図 5)。

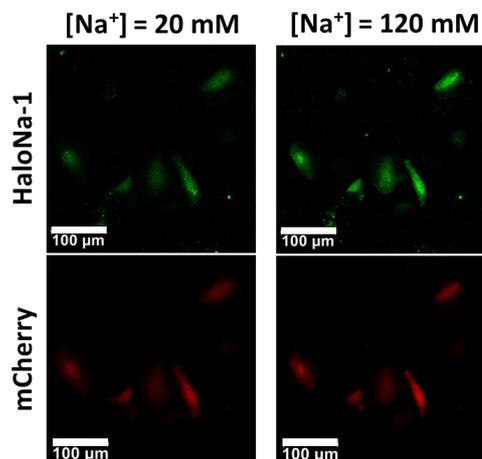


図 5. 細胞質局在 HaloNa-1 を用いた Na⁺ 蛍光イメージング

更に、細胞内の特定の小器官に局在する HaloTag 融合タンパク質を利用して HaloNa-1 の局在を制御することにも成功した。具体的には核に存在するヒストン H2A およびリソソームに存在する LAMP2 に HaloTag が遺伝子融合したコンストラクトを HeLa 細胞に導入し、HaloNa-1 を添加して蛍光イメージングを行ったところ、それぞれの小器官からプローブの蛍光が観察された。最近、リソソームやゴルジ体の膜上にも Na⁺チャネルが発現していることが報告されており、その機能解明が求められている。HaloNa-1 自体はリソソーム内の酸性環境では機能しないものの、本研究で確立したプローブの開発・局在戦略はこうした研究に十分貢献できるものと考えられる。

(5) 新規タグタンパク質の開発

上記 (1) - (4) の実験では小分子蛍光

プローブと結合させるタグタンパク質として HaloTag を利用したが、HaloTag は分子量が 34 kDa と比較的大きく、場合により目的タンパク質の機能を阻害する可能性がある。また、複数の標的分子を同時に検出したい場合には別のタグタンパク質・プローブペアを併用する必要が生じる。近年、新たなタンパク質タグはいくつか開発されてはいるものの、新規ペアの研究余地は残っている。

そこで本項目では、研究協力者である埼玉大学工学部の根本直人教授らが開発した cDNA display 法 (図 6) を用いた進化分子工学により新規タグタンパク質の開発を目指した。cDNA display 法は、翻訳阻害剤として知られる抗生物質 puromycin を用いてポリペプチドと対応する cDNA とを 1 : 1 で共有結合させる技術であり、多様な分子集団から所望の性質を有するポリペプチドを進化的に取得することができる。具体的には新規タグタンパク質候補として、生物学実験の様々な場面で広く使われる放線菌由来の streptavidin を選択した。Streptavidin は低分子ビタミンであるビオチンと強く結合することが良く知られている一方、天然のタンパク質は 4 量体であるためタグとしての利用には向かない。そこで本研究では、研究代表者らが以前開発した新規 streptavidin リガンドに対して強く結合する単量体 streptavidin の探索を目指して網羅的変異導入及び淘汰実験を行った。残念ながら今回のセレクションの範囲では有用な変異タンパク質を得る事は出来なかったものの、変異ライブラリの作製法やセレクション方法を改善することで今後目的を達成できる可能性はある。

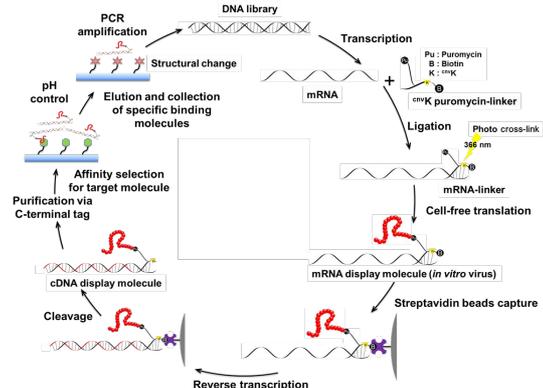


図 6. cDNA display 法による分子進化 (例)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

"A Study to Select pH-dependent Phenolphthalein-Binding Peptide Aptamers by cDNA Display Method" Hiroki Anzai, Takuya Terai, and Naoto Nemoto, *Peptide Sci.*, 2017, 54-55 (2018). 査読あり

"A protein-coupled fluorescent probe for organelle-specific imaging of Na⁺"

Ryo Taguchi, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Kenjiro Hanaoka, and Yasuteru Urano, *Sensor Actuat. B - Chem.*, **265**, 575-581 (2018). 査読あり DOI: 10.1016/j.snb.2018.03.090

"Development of an Azo-Based Photosensitizer Activated under Mild Hypoxia for Photodynamic Therapy" Wen Piao, Kenjiro Hanaoka, Tomotsumi Fujisawa, Satoshi Takeuchi, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Tahei Tahara, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 13713-13719 (2017). 査読あり DOI: 10.1021/jacs.7b05019

"Synthesis of Practical Red Fluorescent Probe for Cytoplasmic Calcium Ions with Greatly Improved Cell-membrane Permeability" Kazuhisa Hirabayashi, Kenjiro Hanaoka, Takahiro Egawa, Chiaki Kobayashi, Shodai Takahashi, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Yuji Ikegaya and Tetsuo Nagano, *Data in Brief*, **12**, 351-357 (2017). 査読あり DOI: 10.1016/j.dib.2017.04.011

"Discovery of Cell-Type-Specific and Disease-Related Enzymatic Activity Changes via Global Evaluation of Peptide Metabolism" Jun Onagi, Toru Komatsu, Yuki Ichihashi, Yugo Kuriki, Mako Kamiya, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Hiroyuki Matsuzaki, Keisuke Hata, Toshiaki Watanabe, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 3465-3472 (2017). 査読あり DOI: 10.1021/jacs.6b11376

"Enhanced mRNA-protein fusion efficiency of a single-domain antibody by selection of mRNA display with additional random sequences in the terminal translated regions" Kazuki Takahashi, Masato Sunohara, Takuya Terai, Shigefumi Kumachi, and Naoto Nemoto, *Biophys. Physicobiol.*, **14**, 23-28 (2017). 査読あり DOI: 10.2142/biophysico.14.0_23

"Improving the Solubility of Artificial Ligands of Streptavidin to Enable More Practical Reversible Switching of Protein Localization in Cells" Ryo Tachibana, Takuya Terai, Gaelle Boncompain, Shigeru Sugiyama, Nae Saito, Franck Perez, and Yasuteru Urano, *ChemBioChem*, **18**, 358-362 (2017). 査読あり DOI: 10.1002/cbic.201600640

"In vitro selection of random peptides against artificial lipid bilayers: a potential tool to immobilize molecules on membranes" Shota Kobayashi, Takuya

Terai, Yuki Yoshikawa, Ryoya Ohkawa, Mika Ebihara, Masahito Hayashi, Kingo Takiguchi, and Naoto Nemoto, *Chem. Commun.*, **53**, 3458-3461 (2017). 査読あり DOI: 10.1039/C7CC00099E

"A Protein-Coupled Fluorescent Probe to Visualize Potassium Ion Transition on Cellular Membranes" Tomoya Hirata, Takuya Terai, Hisao Yamamura, Manabu Shimonishi, Toru Komatsu, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Yuji Imaizumi, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano, *Anal. Chem.*, **88**, 2693-2700 (2016). 査読あり DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03970

"Detection of NAD(P)H-dependent Enzyme Activity by Time-domain Ratiometry of Terbium Luminescence" Takuya Terai, Hiroki Ito, Kenjiro Hanaoka, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 2314-2317 (2016). 査読あり DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.03.038

[学会発表](計 6件)

寺井琢也、安齋宏紀、小林省太、吉川祐紀、蛭原三華、根本直人、"cDNA display 法によるペプチドスクリーニングの最新線"、日本化学工学会 第49回秋季大会、2017

安齋宏紀、寺井琢也、根本直人、"進化分子工学を用いた有機小分子の構造変化を認識するペプチドアプタマーの開発"、第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017

安齋宏紀、寺井琢也、根本直人、"Phenolphthalein binding peptide aptamers by in vitro selection using complementary DNA display"、第54回ペプチド討論会、2017

寺井琢也、平田智也、長野哲雄、浦野泰照、"細胞膜上でカリウムイオンを検出するタンパク質ラベル化型蛍光プローブ"、BMB2015、2015

Takuya Terai, Tomoya Hirata, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, "A protein-coupled K⁺ probe that detects K⁺ efflux on cell membrane" Pacificchem2015, 2015

寺井琢也、平田智也、山村寿男、今泉祐治、長野哲雄、浦野泰照、"タンパク質ラベル化型蛍光プローブを用いた細胞内カリウム流出の可視化"、第9回バイオ関連化学合同シンポジウム、2015

[図書](計 1件)

寺井琢也、熊地重文、根本直人、"ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術"、技術情報協会、2017、40-49

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称：分子精製用リガンド、分子精製用タグ
ペプチド及びこれらを用いた分子精製方法
発明者：安齋宏紀、寺井琢也、根本直人
権利者：(株)Epsilon Molecular Engineering
種類：特許
番号：特願 2017-167056 号
出願年月日：平成 29 年 8 月 31 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://park.saitama-u.ac.jp/~nemoto/>

6．研究組織

(1)研究代表者

寺井 琢也 (TERAI, Takuya)
埼玉大学・大学院理工学研究科・特別研究
員
研究者番号：00508145

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

根本 直人 (Nemoto, Naoto)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：60509727

安齋 宏紀 (Anzai, Hiroki)
埼玉大学・大学院理工学研究科・大学院生