

令和元年6月14日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01912

研究課題名(和文) Chemical CALI法の確立とそれを用いた生体内蛋白質の機能操作

研究課題名(英文) Development of Chemical CALI method and application for modulation of cellular protein

研究代表者

石本 哲也 (ISHIMOTO, Tetsuya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：40397170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の狙った場所で活性酸素を発生させることで、細胞内の蛋白質の機能を操作する新しい方法を構築した。この方法では、KillerRedという蛍光蛋白質と、ホタルの発光蛋白質であるルシフェラーゼを融合させ、細胞外からルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを作用させる。この方法を用いて、細胞内のアクチン蛋白質に活性酸素を作用させ、コフィリンアクチンロッドと呼ばれるアルツハイマー病の脳内で見られる構造を作ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の特定の蛋白質の機能を修飾する技術は、基礎研究や治療技術の発展のために必要である。今回の研究成果では、ルシフェリンという無害の化合物によって、培養細胞内の特定の蛋白質に対して活性酸素を作用させるという今までにない技術の構築に成功した。これによってアルツハイマー病で見られるコフィリンアクチンロッドという構造を人工的に作り出すことに成功した。これはアルツハイマー病のメカニズム解明や治療法の確立において有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have established a new method employing firefly luciferase and KillerRed to inactivate or modulate particular protein in living cell. The fusion protein generates reactive oxygen species at target protein. We successfully induced a structure actin reorganization exposing F-actin to reactive oxygen species. Reorganized actin structure is considered as cofilin-actin rod which is seen in the brain of Alzheimer's disease patients.

研究分野：分子神経科学

キーワード：活性酸素 ルシフェラーゼ アクチン アルツハイマー病 BRET

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内の特定の蛋白質の機能を抑制もしくは修飾する技術は、基礎研究や治療技術の発展のために必要である。特定の蛋白質の機能を阻害する方法として、遺伝子ノックアウト、ドミナントネガティブ蛋白質、RNAi など存在する。このうち遺伝子ノックアウトは一過性に用いることができない。残りの2つは、tet-0 システムを用いることで、一過的にドミナントネガティブ蛋白質、RNAi を発現させることはできるが、発現をストップさせた後もそれらの蛋白質や RNA は残ってしまう。つまり現在利用できる技術では、脳内の任意の部位で一過的に特定の分子の機能を阻害することが難しいといえる。この蛋白質を改変しさらに発展させることで、生体レベルで使える「Chemical Chromophore-assisted light inactivation (CALI) 法」として確立し、生体内の蛋白質の機能を非侵襲で操作する方法を確立することを本提案の目的とする。

2. 研究の目的

本研究では特定の蛋白質機能を操作する新しい方法 Chemical CALI 法の確立を提案する。これは発光蛋白質と、励起によってスーパーオキシドを発生する蛍光蛋白質を融合させ細胞中に発現させることで、化学物質 (ルシフェリン) の添加により標的の蛋白質の近傍でスーパーオキシドを発生させる方法であり、それによって近傍の蛋白質の機能を攪乱もしくは修飾する。この方法は原理的に *in vivo* で使用可能で、一過的かつ非侵襲的に生体内蛋白質機能を攪乱修飾する唯一の方法となる。またこの方法で、抗体など細胞内で機能的な高次構造をとりにくい蛋白質の細胞内での高次構造形成も試みる。

3. 研究の方法

ホタルの発光蛋白質である Luciferase は 560nm 付近の光を多く放出する蛋白質であり、その発光は基質であるルシフェリンを酸化する過程で生じる。ルシフェリンは無毒で細胞膜を透過する性質があるので、特定のプロモーター影響下で Luciferase を発現させるトランスジェニックマウスを用い、マウス腹腔へのルシフェリン注射後の体からの発光を計測することで、生体マウスの遺伝子発現解析に用いられている (TIPS2004, 25. 337)。

KillerRed 蛋白質は 560nm の光で励起されると、スーパーオキシドを発生する赤色蛍光蛋白質で、Chromophore-assisted light inactivation (CALI) という実験方法に用いられてきた (J. Cell Sci. 2014, 127, 1621)。この方法では、KillerRed を培養細胞に発現させ、560nm のレーザー光を照射することで KillerRed の周辺にスーパーオキシドを発生させ、周囲の蛋白質の機能攪乱もしくは細胞死の誘導を行うものである。上記の Luciferase と KillerRed を融合させた蛋白質 (KillerLuc) は、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えることで、ルシフェラーゼが活性化し、そのエネルギーが bioluminescent resonance energy transfer (BRET) 効果によって KillerRed に移行し、KillerRed を励起する。その結果、KillerRed から活性酸素が発生し、周辺の蛋白質を酸化させる。この時 KillerLuc 蛋白質に細胞内局在化シグナルペプチドを付加しておけば、細胞内の特定の標的にだけ活性酸素を作用させることができる。本研究では、各シグナルペプチドを KillerLuc に作用させそれらの分子によって細胞内の蛋白質機能の操作が可能であるか調べる。

4. 研究成果

KillerLuc 蛋白質に重合アクチンに結合することが知られている Lifeact 配列を融合させた蛋白質を HEK293T 細胞に発現させ、培地に 2mM のルシフェリンを加え、24 時間そのまま培養を続けた。この操作の間、細胞の中のアクチンフィラメントは活性酸素によって酸化され続けられたと考えられる。その結果アクチンフィラメントが当初の予想と反して、大幅に増大することが発見された。アクチンフィラメントは多くの形状があり、細胞機能における意味合いが異なる。今回発見された構造がどのような種類のおアクチン構造であるか調べるたところ、アクチンとアクチン結合蛋白質であるコフィリンが共有することが特徴のコフィリンアクチンロッドという構造であることが分かった。この構造が Lifeact-Killerfirefly 以外の方法で誘導した (アクチン脱重合阻害剤 jasplakinolide) 重合アクチンと形状が異なることを確認した。また、Lifeact-Killerfirefly から本当に活性酸素が放出されているか、発せられる光のスペクトル解析を行ったところ、630nm を中心とする長波長側の光成分が増大していたことから、ホタルルシフェラーゼから KillerRed へのエネルギーの転移が起きていることがわかった。このことは、Lifeact-Killerfirefly から活性酸素が放出されていることを強く示唆し、Chemical CALI の原理が正しいことを示す。

KillerRed とルシフェラーゼの融合の方向やリンカー配列の有無によって BRET 効果が変化し、アクチンへの影響が変化する可能性も考えられるため、2 つの蛋白質の順番やリンカーの有無などの条件を振って BRET 効果の大きさを比較してみたところ、ルシフェラーゼ-リンカー配列-KillerRed の順番で融合した蛋白質が最も BRET 効率が良いという結果が出たが、実際に細胞内に発現させた場合のアクチン重合への効果は、大きな違いはないように見えた。

神経細胞に Lifact-Killerfirefly を発現させ、ルシフェリンを作用させることによって、スパインや樹状突起といったアクチンによって形状が規定される構造が変化するが調べたが、Lifact-Killerfirefly 発現によって神経細胞が細胞死を起こす傾向があり、結果を判断するまでに至らなかった。今後、培養神経細胞や生体脳に発現させてコフィリンアクチンロッドの影響を解析する場合、遺伝子導入法の改良など条件検討が必要になると考えられる。アクチン以外の蛋白質の挙動を KillerLuc を用いて操作する実験も行った。細胞膜に局在化する KillerLuc にルシフェリンを作用させ、活性酸素を発生させると細胞内小器官への KillerLuc の蛍光が増大するように見えた。この現象は活性酸素によって細胞膜の一部が陥入してベシクルが増大しているように見え、実際にどういった現象が起きているのか今後の細胞生物学的な解析が必要であるが、KillerLuc の用途がアクチン重合操作以外にも多くあることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Bioluminescence imaging of Arc expression in mouse brain under acute and chronic exposure to pesticides.

Izumi H, Ishimoto T, Yamamoto H, Mori H.
Neurotoxicology. 2019 Mar;71:52-59.

A novel serine racemase inhibitor suppresses neuronal over-activation in vivo.

Mori H, Wada R, Takahara S, Horino Y, Izumi H, Ishimoto T, Yoshida T, Mizuguchi M, Obita T, Gouda H, Hirono S, Toyooka N.
Bioorg Med Chem. 2017 Jul 15;25(14):3736-3745.

Mice lacking BCAS1, a novel myelin-associated protein, display hypomyelination, schizophrenia-like abnormal behaviors, and upregulation of inflammatory genes in the brain.

Ishimoto T, Ninomiya K, Inoue R, Koike M, Uchiyama Y, Mori H.
Glia. 2017 May;65(5):727-739.

Application of hairless mouse strain to bioluminescence imaging of Arc expression in mouse brain.

Izumi H, Ishimoto T, Yamamoto H, Mori H.
BMC Neurosci. 2017 Jan 23;18(1):18.

〔学会発表〕(計 4 件)

石本哲也, 二宮賢介, 井上蘭, 小池正人, 内山安男, 森寿. BCAS1 KO マウスは統合失調症様症状と炎症関連遺伝子の発現上昇を示す; 第 39 回日本分子生物学会年会; 2016 Nov.30; 横浜.

石本哲也. In vivo imaging of CREB phosphorylation in the brain of Tg mouse expressing split luciferase; ISBC 2016 ; 2016 May.31; 筑波.

石本哲也, 森寿. ルシフェラーゼを用いた Chemical CALI 技術の構築; 2017 年度生命科学系学会合同年次大会; 2017 Dec. 6; 神戸.

Tetsuya Ishimoto, Kensuke Ninomiya, Ran Inoue, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Hisashi Mori. Mice lacking BCAS1, a novel oligodendritic protein, display hypomyelination, schizophrenia-like behavior, and up-regulation of inflammatory genes; 第 40 回日本神経科学大会; 2017 Jul.20; 千葉.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

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。