

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14712

研究課題名(和文) タンパク質を基盤とした酸素濃度イメージングプローブの創製

研究課題名(英文) Development of Protein-based Molecular Probes for Oxygen Concentration

研究代表者

石川 春人(Ishikawa, Haruto)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：40551338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内酸素濃度検出可能なFRETセンサータンパク質の開発を目指した。ヤツメウナギヘモグロビン(sHb)は酸素存在下では単量体だが、酸素非存在下では二量体を形成する。この酸素濃度依存的な会合形成をFRET測定に応用した。sHb内システイン残基をAlexa Fluor 488または594でラベルし、FRET観測を試みた。その結果、酸素非存在下でのみFRETシグナルが観測された。この結果はsHbが酸素濃度FRETセンサーに適していることを示唆している。次にsHbに蛍光タンパク質を融合し、細胞内発現可能なFRETセンサーの作成を目指したが、今後さらなる最適化が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have developed genetically encoded FRET sensor for oxygen tension in the cell. Sea lamprey hemoglobin (sHb) is primarily monomeric in oxy form, while sHb self-associates to dimers upon deoxygenation. The oxygen dependent monomer-dimer transition of sHb was used for the FRET sensor for the oxygen. For the detection of the oxygen concentration, the single cysteine residues in the sHb were labeled by Alexa Fluor 488 or 594. Purified sHb with Alexa Fluor dyes were mixed and measured the fluorescence spectra. There was no FRET in our system when the oxygen pressure was 0.2 atm, while sHb with Alexa Fluor dyes exhibited FRET signal in a deoxygenated condition. This result suggested that sHb system is suitable for the genetically encoded oxygen sensor. Next, we examined a FRET measurement for sHb with fluorescent protein. However, the expression of the fusion protein was difficult in E. coli. Further optimization will be necessary for the genetically encoded FRET sensor protein.

研究分野：生物物理学

キーワード：イメージング タンパク質 生物無機化学

1. 研究開始当初の背景

酸素はエネルギー産生において生命に必須の気体分子であるが、活性酸素種の問題などのため、その濃度は適切にコントロールされている。この生体中での酸素濃度検出はシグナル伝達の観点からも重要である。特にガン細胞は低酸素環境に存在するため、ガン細胞発見へのツールとしても研究が進められている。低酸素応答による制御機構や活性酸素種による細胞障害など、酸素濃度が細胞に与える様々な機構が示されている。この酸素濃度に関連した細胞内制御の解明には *in vivo* で利用可能な酸素濃度可視化技術の開発が必須である。これまでに金属錯体などを基盤とした酸素濃度イメージングプローブ分子の開発が行われてきたが、タンパク質を基盤とした実用性の高いイメージングシステムの報告はなかった。

タンパク質を基盤としたイメージングプローブ分子の利点は、遺伝子導入によって細胞内に発現可能なことが挙げられる。また、細胞内局在についてもシグナルシーケンスの付加によって制御可能である。申請者がこれまで取り組んできた O₂, CO, NO などの気体分子センサータンパク質の研究や、鉄と酸素濃度依存的にユビキチン系で分解される鉄濃度制御タンパク質の研究の経験を生かして、細胞内酸素濃度イメージングプローブ分子開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質を基盤とした新規酸素濃度イメージングプローブ分子の開発である。これまでタンパク質を基盤とした実用性の高いイメージングシステムの報告はなかったため、新規機能性タンパク質を新しいアイデアで創製し、細胞内酸素濃度の可視化技術を開発することを目指した。具体的には、細胞内酸素濃度イメージングプローブタンパク質の創製のために、既に細胞内可視化技術として確立されている蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) 法に、酸素依存的に会合状態が変化するヤツメウナギヘモグロビン (slHb) を組み合わせることで、酸素濃度に応答した蛍光シグナルの観測を試みた。

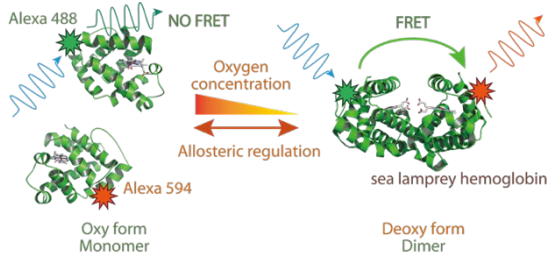


図1 .slHb のそれぞれのサブユニットにドナー蛍光分子およびアクセプター蛍光分子を融合し酸素依存的 FRET を観測する

slHb は酸素濃度が上昇すると活性中心のヘム鉄に酸素が結合し、二量体から単量体へ会合状態が変化する。これまで slHb は原始的なアロステリック制御を示すヘモグロビンとして、基礎的な研究が行われてきたが、今回新規機能性タンパク質の機能性部位として利用する点が本研究のアイデアである。つまり、既存のタンパク質に存在する酸素濃度依存的なモノマー/ダイマー平衡を FRET のスイッチとすることで、これまで存在しない酸素濃度イメージングプローブタンパク質を作り出せると考えた (図1)。

3. 研究の方法

FRET は二つの蛍光分子 (ドナー・アクセプター) 間のエネルギー移動を利用した観測技術である。ドナー分子の蛍光スペクトルと、アクセプター分子の励起スペクトルに重なりがあり、お互いの双極子モーメントの配向が適切であれば、励起されたドナー分子からアクセプター分子へエネルギーが移動する。この FRET の効率はドナー分子とアクセプター分子間の距離の 6 乗に反比例するため、距離の変化を光によって観測可能である。また、一般的に FRET が観測可能なドナー分子とアクセプター分子間の距離は ~100 オングストローム程度までである。

slHb は前述のように活性中心のヘムに酸素が結合すると、ダイマーからモノマーへ会合状態が変化する。それぞれの slHb サブユニットにドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子でラベル化すれば、slHb の酸素依存的な会合状態の変化を FRET 効率として検出できることが期待できる。結晶構造から予想される二量体 slHb (酸素非結合型) の N 末端同士の距離および C 末端同士の距離はそれぞれ約 32 オングストロームと 62 オングストロームである (図2)。この距離は FRET 観測が可能な距離である。

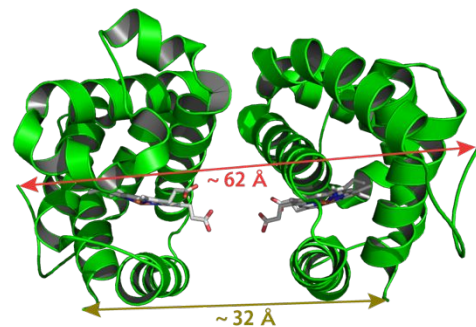


図2 .slHb の立体構造。二量体における N 末端同士の距離および C 末端同士の距離は約 32 オングストロームと 62 オングストロームである

4. 研究成果

slHb が新規酸素濃度センサーとして利用可能であることを確かめるために、大腸菌を用

いて sHb を再構成タンパク質として調製した。まず、sHb 内のシステイン残基を蛍光分子でラベル化し、酸素濃度依存的な FRET 検出を試みた。野生型 sHb はシステイン残基を 143 番目に一つだけ持っているため、特異的な蛍光ラベルが可能である。ドナー蛍光分子として Alexa488 を、アクセプター蛍光分子として Alexa594 を用いて、再構成 sHb をそれぞれラベルした (図 3)。

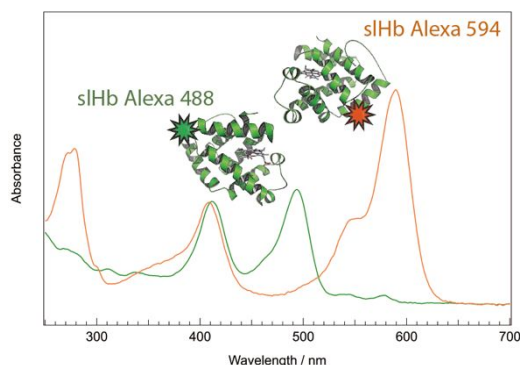


図 3 .sHb - Alexa488 および sHb - Alexa594 の紫外可視吸収スペクトル。共通して観測された 400 nm 付近の吸収帯は sHb のヘムに由来する。それ以外の吸収帯はそれぞれ Alexa488 および Alexa594 に由来するものである

蛍光ラベルした sHb - Alexa488 と sHb - Alexa594 を混合し、酸素存在下および酸素非存在下で FRET 測定を行なったところ、酸素非存在下でのみ FRET が観測された。しかし、FRET 効率は想定より非常に低くシグナルの強度は非常に弱かった。そこで、FRET 効率を改善するために、ドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子の距離を近づけることを試みた。野生型に存在するシステイン残基をセリンに置換し (C143S)、新たに距離が 10 オングストローム程度になる位置にシステイン残基を導入した (T30C)。

この sHb T30C/C143S 変異体を野生型同様に大腸菌を用いて再構成タンパク質として調製し、Alexa488 または Alexa594 でラベル化した。精製後の sHb T30C/C143S - Alexa488 と sHb T30C/C143S - Alexa594 を混合し、FRET 測定を行なった。その結果、酸素濃度依存的な FRET 効率は改善し、sHb の系が新規酸素濃度イメージングプローブ分子として利用可能であることが示された (図 4)。

また、この酸素濃度依存的な FRET 効率の変化は、sHb 濃度にも依存することが明らかとなった。これは、sHb のモノマー/ダイマー平衡の比率がタンパク質濃度に依存しているためと考えられる。つまり、sHb 濃度が低い場合はモノマー/ダイマー平衡がモノマー側に偏り、FRET 効率は低下する。逆に、sHb 濃度が高い場合は平衡がダイマー側に偏るため、FRET 効率は上昇した。

以上の点を踏まえて、タンパク質を基盤とした新規酸素濃度イメージングプローブ分子を設計した。ポイントの 1 点目は有機化合物を用いた蛍光ラベルを蛍光タンパク質に置き換え、遺伝子導入のみで細胞内発現を行い FRET 観測可能にすることである。2 点目は FRET 効率が sHb 濃度に依存することを改善するために、sHb 同士をペプチドリンカーで接続することである。ドナーとなる蛍光タンパク質には CFP を、アクセプターとなる蛍光タンパク質には YFP を選び、CFP - sHb - Linker - sHb - YFP の遺伝子を直列に繋いだ。この際のドナー蛍光タンパク質とアクセプター蛍光タンパク質間の距離は約 50 オングストロームと予想され、FRET 測定が可能な距離である。

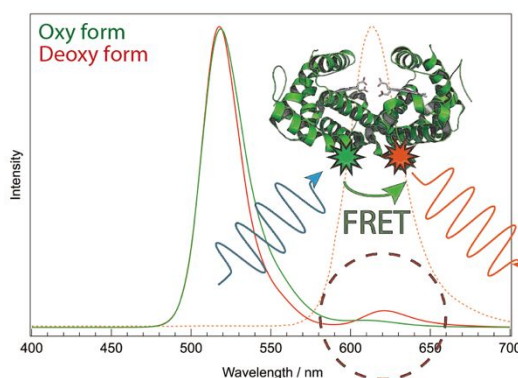


図 4 . sHb - Alexa488 と sHb - Alexa594 を混合した溶液の蛍光スペクトル。520 nm 付近の蛍光シグナルは Alexa488 (ドナー分子)、620 nm 付近の蛍光シグナルは Alexa594 (アクセプター分子) に由来する。酸素が存在しない状態 (Deoxy form) においてのみ、Alexa594 からの蛍光シグナルが観測された

この新規酸素濃度イメージングプローブ分子を大腸菌による再構成タンパク質として調製を試みたところ、全くタンパク質発現が見られなかった。発現誘導のタイミングや試薬である IPTG 濃度の検討および培養温度の調節などを行なっても改善しなかった。原因は不明であるが、4 つのタンパク質を直列に繋いだため分子量が 7 万以上と非常に大きくなり、大腸菌内での発現効率が低下したことが考えられる。

そこで、濃度依存改善のためのペプチドリンカーを一度取り除き、大腸菌でのタンパク質発現を優先することとした。また、蛍光タンパク質の種類が、sHb との融合タンパク質の発現に悪影響を与えている可能性も考えられたため、蛍光タンパク質についても変更を行った。ドナー蛍光タンパク質には mCherry を、アクセプター蛍光タンパク質には eGFP を選定し、それぞれ mCherry - sHb と eGFP - sHb の遺伝子を含むプラスミドを作成した。

mCherry - sHb と eGFP - sHb の大腸菌

発現を行ったところ、それぞれ蛍光タンパク質の発色が観測され、タンパク質がフォールドした状態で大腸菌内に存在することが明らかとなった。しかし、大腸菌を破碎し精製を試みると大部分は沈殿してしまい、FRET測定には至らなかった。

これまでの研究で、sHb がタンパク質を基盤とした新規酸素濃度イメージングプローブ分子のベースとして有用であることが示された一方で、ドナーおよびアクセプターとなる蛍光タンパク質と融合した際のタンパク質発現が課題であることが明らかとなった。融合タンパク質の発現および精製条件の検討を行うことで、試料調整に関して改善を行うことが今後の課題である。

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6件)

- (1) Ogura, M., Endo, R., Ishikawa, H., Takeda, Y., Uchida, T., Iwai, K., Kobayashi, K. & Ishimori, K. Redox-dependent Axial Ligand Replacement and its Functional Significance in Heme-bound Iron Regulatory Proteins *J. Inorg. Biochem.* (2018) **182**, 238-248. 査読有
DOI:10.1016/j.jinorgbio.2018.01.007.
- (2) Chang, S., Mizuno, M., Ishikawa, H. & Mizutani Y. Tertiary Dynamics of Human Adult Hemoglobin Fixed in R and T Quaternary Structures *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2018) **20**, 3363-3372. 査読有
DOI:10.1039/c7cp06287g.
- (3) Otomo, A., Ishikawa, H., Mizuno, M., Kimura, T., Kubo, M., Shiro, Y., Aono, S. & Mizutani, Y. A Study of the Dynamics of the Heme Pocket and C-helix in CooA upon CO Dissociation Using Time-Resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy *J. Phys. Chem. B* (2016) **120**, 7836-7843. 査読有
DOI:10.1021/acs.jpcc.6b05634.
- (4) Kobayashi, K., Nakagaki, M., Ishikawa, H., Iwai, K., O'Brian, M. R. & Ishimori, K. Redox-Dependent Dynamics in Heme-Bound Bacterial Iron Response Regulator (Irr) Protein *Biochemistry* (2016) **55**, 4047-4054. 査読有
DOI:10.1021/acs.biochem.6b00512.
- (5) Yamawaki, T., Ishikawa, H., Mizuno, M., Nakamura, H., Shiro, Y. & Mizutani, Y. Regulatory Implications of Structural Changes in Tyr201 of the Oxygen Sensor Protein FixL *Biochemistry* (2016) **55**, 4027-4035. 査読有
DOI:10.1021/acs.biochem.6b00405.
- (6) Chang, S., Mizuno, M., Ishikawa, H. &

Mizutani, Y. Effect of the N-terminal Residues on the Quaternary Dynamics of Human Adult Hemoglobin *Chem. Phys.* (2016) **469**, 31-37. 査読有
DOI:10.1016/j.chemphys.2016.02.009

[学会発表](計4件)

- (1) 石川 春人、細胞内酸素濃度可視化プローブタンパク質の開発、新学術領域「柔らかな分子系」第4回公開シンポジウム、平成28年10月27日~平成28年10月28日、名古屋工業大学、名古屋
- (2) Haruto Ishikawa、Protein-based Molecular Probes for the Local Concentrations of Oxygen and Heme、日本生物物理学会第54回年会、平成28年11月25日~平成28年11月27日、つくば国際会議場、つくば
- (3) Haruto Ishikawa、Genetically Encoded Fluorescent Oxygen Sensor、KAKENHI International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems"、平成29年6月26日~平成29年6月28日、ロイトン札幌、札幌
- (4) Haruto Ishikawa、Protein Structural Dynamics of HbI Revealed by Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy、KAIST Special Seminar、平成30年2月2日、KAIST、大邱、韓国

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 春人 (ISHIKAWA, Haruto)
大阪大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：40551338