

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19332

研究課題名（和文）電位を発光で表現するタンパク質の創成

研究課題名（英文）Creation of a luminescence protein sensing electric potential

研究代表者

中津 亨（Nakatsu, Toru）

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：50293949

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々の生命活動の維持には継続的な神経活動が行われることで達成される。神経情報伝達は活動電位という膜電位の変化が神経細胞から次の神経細胞への伝播によって行われる。本研究では、この系に生物発光を利用し、膜電位感受性発光酵素（VoltaLuc）を開発することを考案した。そこで、発光タンパク質（NanoLuc）と膜電位感受性イオンチャネル（NavAb）のキメラ蛋白質の発現を試みたが、良好な発光を示すようなタンパク質は得られなかった。そこで、高発光強度のNanoLucを開発することを目的にし、発光に重要なアミノ酸残基の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物発光現象は通常観測できない生命活動の観測に非常に有力である。これまではGFPを代表とする蛍光反応が用いられてきたが、光照射によるダメージが問題となり、化学反応により生じる発光現象の利用が注目されている。そこで、神経伝達に関する詳細を明らかにするために膜電位感受性イオンチャネルの開発を行った。そこで今回はより高発光なチャネルの開発に向けた発光酵素の発光機構解明と高発光酵素の探索を行った。その結果、反応に関わるアミノ酸の同定、さらには高発光を生じるアミノ酸変異体の作成に成功した。今回得られた知見は今後の膜電位感受性イオンチャネルの開発に向けた大きな基礎研究結果となった。

研究成果の概要（英文）：Neural activity plays a critical role in the maintenance of our vital functions. The depolarization of membrane potentials carries out neural signaling called action potentials from one neuron to the next. We developed a membrane-potential-sensitive luminescent enzyme (VoltaLuc) using a bioluminescence system in this study. Therefore, we attempted to express a chimeric protein between a luminescent protein (NanoLuc) and a membrane-potential-sensitive ion channel (NavAb). Still, no such protein that showed good luminescence could be obtained. Then, we identified the amino acid residues critical for luminescence to develop a NanoLuc with high luminescence intensity.

研究分野：構造生物学

キーワード：神経活動 生物発光

1. 研究開始当初の背景

我々の生命活動の維持には継続的な神経活動が行われることで達成される。神経情報伝達は活動電位という膜電位の変化が神経細胞から次の神経細胞への伝播でなされる。つまり、神経活動の正確な把握には神経細胞の膜電位の変化を正確にとらえることが必須である。この膜電位の可視化のために、膜電位感受性の小分子化合物や蛍光タンパク質の開発が進められている。しかしながら、蛍光を発生させるために励起光の照射が必要であり十分なシグナル対ノイズ比 (S/N 比) が得られない場合があった。さらに励起光波長と蛍光波長が近い場合に分離が困難であるなど不便な点も多かった。一方、化学反応により発光が生じる生物発光は、外部からの光照射は必要なく、発せられる光自体を観測できる。したがって、生物発光を担う発光タンパク質は S/N 比が高く蛍光が持つ問題点を解決できる標識方法として期待されていたが、実現した例は未だなかった。

2. 研究の目的

膜電位の検出に蛍光タンパク質ではなく生物発光を用いた系は構築されていない。その理由として、生物発光を行う酵素の分子量が大きいことが挙げられる。例えば、代表的な発光タンパク質であるホタルルシフェラーゼは 60 kDa 程度であり、タグとして導入するには大きい。この問題を解決するために、近年開発された発光エビの発光酵素の発光強度を改良した 20kDa 程度の発光酵素 (NanoLuc) を用いた **(1) 膜電位感受性発光酵素 (VoltaLuc) の開発** することが目的である。

今回のような融合タンパク質を作成する場合、本来の活性を出せないことが予想される。そこで、発光酵素のさらなる高発光強度を実現するために、**(2) 発光に重要なアミノ酸残基の同定** を並行して行った。

3. 研究の方法

(1) 膜電位感受性イオンチャネルとしては NavAb を使い、NanoLuc とのキメラタンパク質の開発を実施した。このイオンチャネルには N 末端側の四本の膜貫通ヘリックスは電位センサードメイン (VSD) と C 末端側の二本の膜貫通ヘリックスによって形成された四量体のポアドメイン (PD) が存在する。そこで VSD の細胞外ループに、NanoLuc を組み込むことで VoltaLuc の作成を行った。

(2) NanoLuc は発光基質としてセレンテラジンを使い、酸化反応ののち、励起状態のセレンテラミドを生成し、これが基底状態に戻る際に青色発光を生じる酵素である。すでに立体構造が決定されているものの、活性に関するアミノ酸残基は未だわかっていない。立体構造を観察すると内部に空洞が観測できる (図 1 : 左)。この付近に存在するアミノ酸残基が活性に関わっている可能性がある。さらにこれまで発光に関わる酵素では His 残基が活性に関わることが多く観測されている。そこで、空洞内部の 6 つのアミノ酸 (図 1 : 右) および表面に存在する 4 つの His 残基 (図 1 : 左) に注目し、アミノ酸変異体を 10 種類作成した。それぞれの変異体について大腸菌を用いて大量発現させ、His-tag を用いた精製を行った。そして、発光活性測定、蛍光を利用したセレンテラジンの減少速度の測定、発光スペクトル測定を行った。

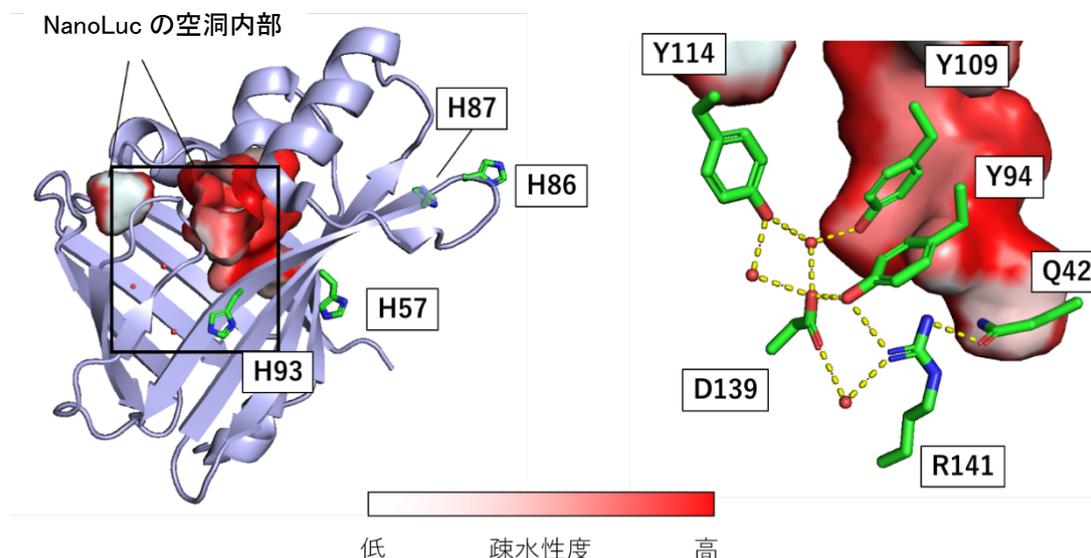


図 1 : NanoLuc の結晶構造と変異導入部位

4. 研究成果

(1) NavAb の VSD に存在する細胞外ループに NanoLuc の 157 番目以降の C 末端 13 残基の NativePeptide(NP157)を組み込み、156 番目までのアミノ酸領域(NL156)を添加して光るコンストラクトの作成を試みた。その際、いくつかの組み込む位置を検討したものの、良好な発現が観測されるものはなかった。

(2) NanoLuc の立体構造をもとに、活性に関わると考えられるアミノ酸について、10 種類の変異体(Q42A、H57A、H86A、H87A、H93A、Y94F、Y109F、Y114F、D139A、R141A)を作成し発光強度測定を行った(表 1)。

R141A の発光強度は野生型の 1/1000 以下となった。また Q42A、Y94F、Y109F、D139A の発光強度も大きく低下した。また H93A は約 1/3 となった。一方で、H57A は約 6 倍、H86A、H87A、Y114F ではわずかに発光強度の上昇が見られた。そして、発光基質であるセレンテラジンに対する K_m は野生型やいずれの変異体についても 0.1 - 0.4 μM であり、大きな違いは見られなかった。

発光活性測定では実際の発光量は観測できるものの、酵素活性、すなわち基質であるセレンテラジンからセレンテラミドに変化する活性は評価できない。セレンテラジンは蛍光を示すが、セレンテラミドは蛍光をほとんど示さない。この特性を活かし、セレンテラジンの蛍光極大である 525nm の減少速度を測定することにより、酵素活性(k_{cat})を測定した(図 2)。その結果、発光活性が 1/1000 以下に低下した R141A は野生型と比較して 1/500 程度に低下し、Q42A、Y94F、Y109F、D139A は 1/60-1/20 程度にまで低下した。His の 4 つの変異体は H57A が 2 倍程度に上昇したが、残る 3 つの変異体はわずかな変化にとどまった。Y114F は、タンパク質の内側を向いているアミノ酸の中で唯一、わずかに上昇するという結果になった。この結果は発光活性の結果とよく似た傾向にあることから、変異体の発光活性が低下したことと、酵素活性が低下したことは関連性がある可能性が考えられた。

続いて、発光スペクトルの測定を行った(図 3)。その結果、野生型を含め、極大波長は概ね 460 nm 付近に観測されたが、H57A は 451 nm、Y109F は 448 nm と、他の変異体と比較して 10nm ほど低波長側にシフトした。

5 つの変異体である、Q42A、Y94F、Y109F、D139A、R141A は発光活性および酵素活性が著しく低下したことから、この空洞内部が基質結合部位であることが予想された。表面に存在する H57A は野生型に比べて活性の上昇が見られた。この理由はまだわからないものの、他の His 変異体においても発光活性の上昇が見られたことから、今後のさらなる高発光強度変異体作成のための手がかりになるものと考えられた。

表 1 : 発光活性測定

| | CTZ | K_m |
|-------|--------|---------------------------|
| 野生型 | 1 | 0.20 ± 0.03 μM |
| Q42A | 0.021 | 0.45 ± 0.08 μM |
| H57A | 5.6 | 0.26 ± 0.07 μM |
| H86A | 1.2 | 0.23 ± 0.04 μM |
| H87A | 2.0 | 0.25 ± 0.05 μM |
| H93A | 0.31 | 0.21 ± 0.05 μM |
| Y94F | 0.011 | 0.32 ± 0.03 μM |
| Y109F | 0.006 | 0.12 ± 0.04 μM |
| Y114F | 1.3 | 0.32 ± 0.07 μM |
| D139A | 0.0017 | 0.25 ± 0.05 μM |
| R141A | 0.0004 | 0.20 ± 0.16 μM |

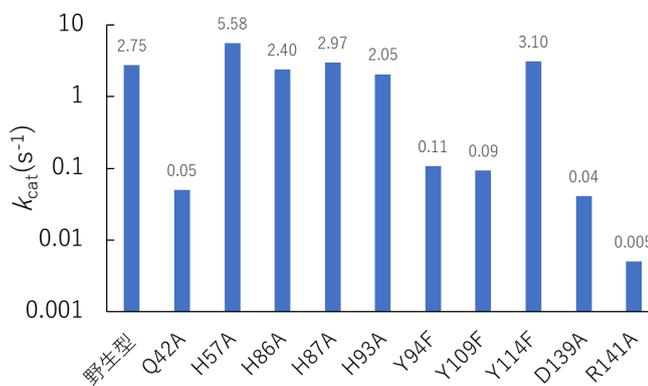


図 2 : 野生型および各変異体の k_{cat}

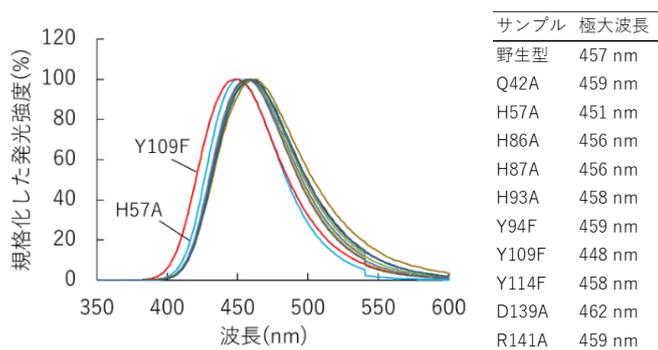


図 3 : 野生型および各変異体の発光スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 入江 克雅 (Irie Katsumasa) (20415087) | 和歌山県立医科大学・薬学部・准教授 (24701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |