

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650266

研究課題名(和文) 酸化的環境のための小さな時間分解蛍光イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of small fluorescent proteins for the oxidative environment

## 研究代表者

和田 郁夫 (Wada, Ikuo)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40182969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タグによる可視化技術は生体の様々な分子機構の解明に寄与してきた。しかし蛍光蛋白は本来、細胞質の分子なので細胞外の酸化的環境では異常な構造をとり、標識する分子本体の正しいモニタリングを妨げる可能性がある。本研究ではこの検討に基づき、酸化的環境でも影響を受けず、立体障害を防ぐために小さなタグの開発を目指した。その結果、GFPファミリーをはじめ、様々な特性をもつ細胞質性蛍光蛋白を、蛍光特性を維持したまま酸化環境の影響を受けずに機能する一連の自発蛍光蛋白タグに改変することができた。さらに分子量1万程度の小さなFMN依存性蛍光蛋白の徹底的な変異検索により、分泌系で正しく機能する分子を開発した。

研究成果の概要(英文)：It was not clear if the fluorescent proteins, which are cytosolic nature, can function properly as an inert tag in the oxidative environment. Based on our finding that GFP forms disulfide-bonds in the ER and behaves anomalously, we aimed to develop small fluorescent proteins suitable for the extracellular space. Following the successful elimination of Cys from SGFP2 and TagRFP, we developed a series of fluorescent proteins with various photochemical properties including photo-chromism, which are not affected by the oxidative folding. Those properties can be applied for photoconversion-induced FRET measurement to monitor oligomerization of secretory cargo. To generate a practical smaller fluorescent tag, we focused on a FMN-dependent fluorescent protein and found a set of mutations to adapt the molecule for the oxidative folding. Those sets of improved fluorescent proteins should be useful to study proteins in the extracellular space.

研究分野：細胞生物学

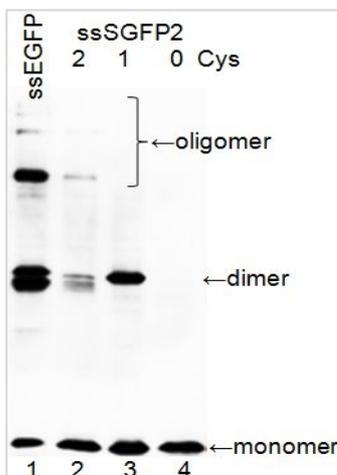
キーワード：蛍光タンパク質 分泌系 酸化環境でのフォールディング 蛍光相関分光法 小胞体

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質は、生きた生体の中で分子の動きを見ることを可能にする画期的な手法として様々な方面で活用され、これまでに多くの研究成果があげられてきた。

もともと蛍光タンパク質は下村脩博士によりオワンクラゲにおいて緑色蛍光蛋白、GFPとして発見され、その後、刺胞動物門を中心とした様々な生物種において見いだされた。これらは、実用的な蛍光強度と蛍光波長特性、また、タグとして用いるために必要な単量体特性を持つように徹底的な改良が加えられ、現在では学生実習でも使用されるほどに普及してきている。

しかし、これらは細胞質で合成される分子なので野生型ではシステイン (Cys) を分子内に持ち、改良型でも、知る限りでは mCherry を唯一の例外として、Cys を含んでいる。ただ、これらは少なくとも蛍光基の形成には直接関わらず、またチオール基はバレル構造の中側に位置するために他の分子との反応性はないとされ、開発では考慮されてこなかった。しかし下記のように SGFP2 (Biochemistry (2007)46:3775) にシグナル配列 (ss) を付加して小胞体に発現した場合にはジスルフィド結合を形成する事が、非還元状態での SDS ゲル電気泳動によって示されることに気がついた。



この結果は、小胞体内でフォールドした GFP が共有結合をした 2 量体やオリゴマーを形成する可能性を示唆した。また、その後の研究によって、これは fold した後に S-S が形成されることはほぼないが、小胞体内での酸化的な folding 過程において形成されることも明らかになった。

おそらくこのジスルフィド結合を作った分子自体は、立体構造が大きく変わることが予想され、蛍光は持たないと考えられる。従って、イメージングプローブとしての問題は無いようにも思えるが、実際には、ssSGFP2 の蛍光相関分光法 (FCS) での計測によると単純拡散が著しく妨げられており、また、他のタンパク、あるいは、タグとして融合させる分子内の Cys とジスルフィド結合を作る可能性もある。

GFP 改良研究の過程では、これら Cys を他のアミノ酸に置き変えると蛍光が失われてしまうことは知られていた。実際に、一般的にタンパク質工学で行われるように 2 つの Cys を、(性質の類似する) Ser に置き換えると蛍光は無くなる。しかし、酸化的環境での適切なイメージングには蛍光蛋白内の Cys、さらには N 型糖鎖付加部位を排除して、可能な限り小さく inert なものにする必要がある。

### 2. 研究の目的

このような背景から、細胞外の環境での蛍光蛋白による分子イメージングには、これまでの蛍光タンパク質では正しいモニタリングができない可能性が考えられた。最初に手がけた SGFP2 では、飽和変異により、これまで不可欠と考えられていた Cys を特定のアミノ酸に置き換えて Cys フリーの蛋白を作成できる可能性を示せたので、本研究において、このアプローチがどこまで有効かを検証し、可能な限り、異なる特性を持つ蛍光タンパク質を、細胞外環境において使用できるようにする。

また、細胞外で機能するタンパク質はジスルフィド結合の助けもあってコンパクトな構造を取る場合が多い。このために、分子量が 3 万近くある GFP 分子の大きさ自体が、立体障害となって、融合させる分子の正しいフォールディングや分子間相互作用を妨げる場合も少なくない。

そこで、GFP ファミリーに限定せず、酸化的環境で使用することの可能な、小さな蛍光タグも含めた開発を行うこととした。

### 3. 研究の方法

各種蛍光タンパク質発現ベクターの作成：SGFP2 はクローンテックより購入した EGFP ベクターに対して SAWANO らの方法 (NucAcidRes(2000)28:e78) による複数箇所同時変異導入法により作成した。TagRFP、Dendra は Evrogen より、mKikGR は MBL より購入した。これらの改変も SAWANO らの方法により行った。飽和変異は、多くの場合、改変するアミノ酸のうち 3 番目のコドン以外を N として、3 つめのコドンは G または C とした degenerate したオリゴヌクレオチドを合成して、塩基配列決定により各アミノ酸への置換を確認した。なお、FAP、PhiLOV については、IDT 社によるゲノム合成によって作成して、適宜、発現ベクターに移し替えて配列確認を行った後に、発現実験に用いた。発現は、すべて COS7 細胞において行い、polyethylenimine を用いる一般的な手法によって導入し、16-24 時間後に観察した。

発現産物の調製には、pQE30 ベクターに組み換えて、His タグを介した Talon 樹脂による精製によって行った。すべて、今回用いた

蛍光タンパクは、機械的破碎によって抽出され、一ステップで精製することができた。

蛍光観測には、A1plus (ニコン) による共焦点観察を主体とし、時間分解単一光子解析として2つの avalanche photodiode (APD) を備えた PicoHarp300 (PicoQuant) を顕微鏡のサイドポートにファイバー接続して用いた。パルスレーザーは 485nm 出力の 90 ピコ秒のパルス幅を持つ PicoQuant 社の製品を使用した。A1 の制御・画像解析には NIS-Elements(ver4.30)、また、TCSPC の制御解析には、Symphotime 64 ver2.0(PicoQuant) と、FFS DataProcessorver2.3e (SSTC) を用いた。なお、数値計算は、OriginPro9.0J (GraphPad)、エクセル 2010 により行った。

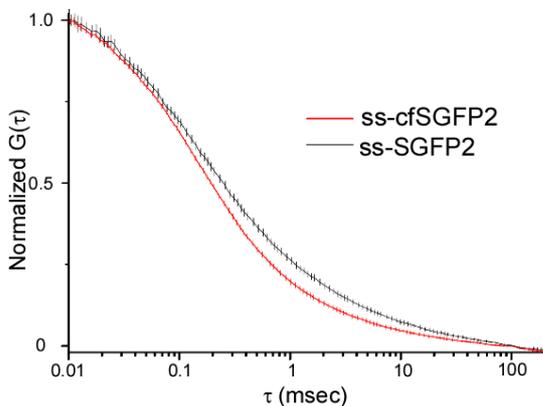
#### 4. 研究成果

本研究では、酸化環境における蛍光タグの作成のために、A)GFP 等の各種蛍光タンパク質の改変と解析、B)FAP (Fluorogen 依存性蛍光蛋白) を用いた小さな蛍光タグとしての検討、C)FMN 依存的蛍光タンパク質 iLOV の改変、において成果が得られた。紙面の制約上、有用性があると判断される項目についてのみ記す。

##### A)GFP 型蛍光タンパクの改良と解析

i) 定常的蛍光特性を持つ分子：上記の SGFP2 に含まれる2つの Cys のうち、Cys48 は、多くのアミノ酸への置換が可能だったの、Ser として、Cys70 において、飽和変異を行った。その結果、唯一 Met のみが SGFP2 と同等の蛍光強度を持つことが示された。これは細胞内に発現した場合の photon histogram 解析、また精製物溶液中での解析でも、有意な差はない。以降、Cys を持たなくした分子のことを cf (システインフリー) と呼ぶ。

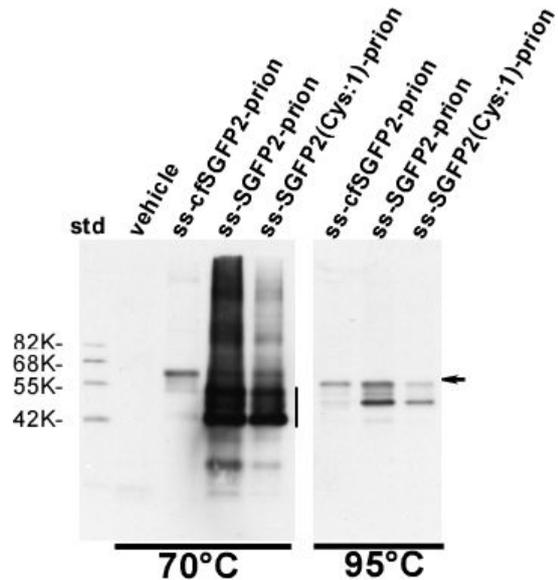
cfSGFP2 が小胞体内において SGFP2 に比べてより単純拡散をするかを調べるために、FCS を用いて解析を行ったところ、下記のように有意に早い時間減衰がみられた。



この相関関数のフィッティングを、異常拡散、隔離拡散、多成分拡散モデルについて調べたところ、3成分拡散モデルにおいてもっともよいフィットが得られたが、その物理的な意

味合いは、今後の検討課題である。少なくとも、この結果は、cf にすることでより単純拡散に近い動きをするようになり、オリゴマーは光らなくても分子挙動に影響を与えることが示唆され、cf の重要性が示された。

この点について、マウス Prion にこれらを融合させた分子を作成して調べたところ、SDS ゲル電気泳動、また細胞内局在において大きな差がみられた。



これは DTT 非存在下での電気泳動で、SDS でサンプルを処理する場合に 70 度で行うと異常な泳動をする融合分子ができることが示されており、明らかに蛍光タグ内の Cys がプリオンの構造形成に作用して異常な構造を誘発することを示している。なお、この SDS 耐性の構造が PrPsc のような構造伝播性を持つかどうかは今後の検討課題である。この SGFP2 に融合させたプリオンは、cfSGFP2 への結合物とは異なり、細胞膜への局在をあまり示さず、細胞の内膜に多く存在した。

これらのことより、蛍光タグ内の Cys はタグとして用いた分子本体に重篤な影響を与える事が明確になり、様々な蛍光蛋白において、Cys、及び、N型糖鎖付加部位を飽和変異により、蛍光特性を少なくとも劣化させないように排除する研究を行った。

TagRFP は、報告値として分子輝度が 560nm 励起において最も高い蛍光タンパクの一つであり、mKate2 は、Stokes shift が大きいものとして知られている。これらは、4つの Cys と、1つの N型糖鎖付加部位を持つので、一つ一つについて、置き換え可能なアミノ酸を求めたところ、TagRFP では、Cys26A, N71K, C114M, C172V, C222S が、また mKate2 では C172 のみが A で、他は TagRFP と同じである配列が、同等の輝度を保持するためには必要である事が明らかにされた。

なお、TagRFP の光耐性を 9 倍高めた変異体 TagRFP-T が報告されているが (NatMethods(2008)5:545-551)、これにも上

記の変異は有効なことは確認された。この cfTagRFP-T が、現在のところ最も明るく無傷性の高い赤色蛍光タンパクとして、我々は使用している。

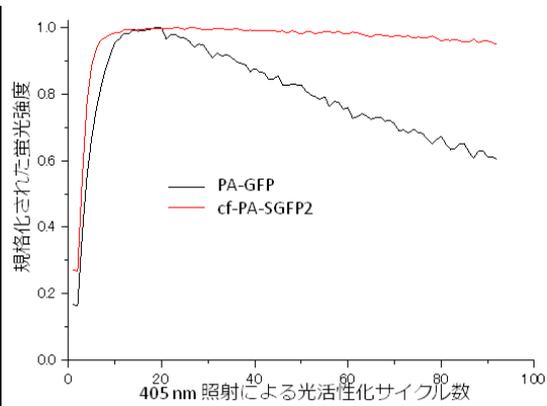
現在、共焦点顕微鏡において最も典型的な励起光は、488, 561nm の他に 405, 633nm である。405nm の場合、TagBFP2(PLOS ONE(2011)6:e28674) と SBFP2(Biochemistry(2007)46:3775)が論文上では同等の輝度を持つことがわかれるが、405nm レーザーを用いて比較すると SBFP2 のほうが明確に高い輝度を示した。そこで SBFP2 にフォーカスして改変を行ったところ、SGFP2 と同様の変異セットが有効であることがわかった。この cfSBFP2 は、SBFP2 とほとんど変わらない一分子輝度を持ち、分泌系環境での紫外領域での標識が可能となった。この波長は、488nm への漏れ込みがほとんどなく多色イメージングに適している。なお、この見いだされた C48S/C70M の変異は SGFP2 のファミリーにおいては有効だが、原型の EGFP ファミリーに導入すると蛍光は消失し、すべての GFP ファミリーに有効なものではない。

近年開発されてきた赤外領域を用いるイメージングとして、我々が試みた中で実用的な輝度を持つものは iRFP670 (NatureMethods(2013)10:751)のみであった。これは dimer であり、単量体化も試みたが、成功していない。この分子は、蛍光基として biliverdin IV を含むが、これはおそらくどの細胞でもヘム代謝中間体として含まれ、新たに添加する必要は無い。しかし、この分子の酸化環境での使用に適した形への改変には最終的にまだ成功していない。この分子はアミノ酸 6 個の Cys を含み N 型糖鎖の部位を一つ含み、糖鎖付加部位は置き換え可能であり、Cys は 5 個までは他のアミノ酸に置換できたが、一つの Cys だけが他のアミノ酸に置換できなかった。これは、本研究全体で対象とした蛍光タンパクのうち、Cys の飽和変異が有効でない唯一の例となった。

このような安定した蛍光を発する蛍光タンパクは、本研究で見いだされた変異によって蛍光特性が大きく変わることはなかった。

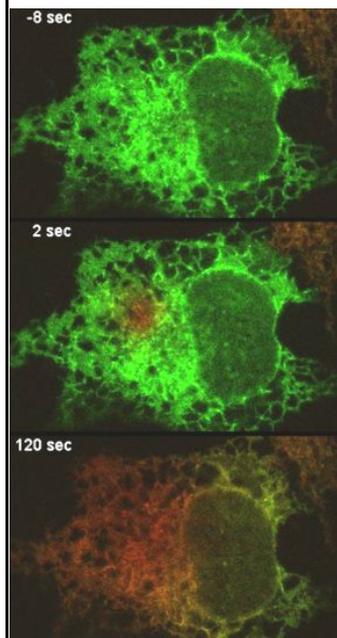
## ii) クロミズムを示す蛍光蛋白

**光活性化蛍光タンパク** 紫外領域での照射によって蛍光を発するように変換される光活性化蛍光タンパクには、現在、様々なものが知られている。ここでは最初に開発された PA-GFP に必須な変異 T203H 等を SGFP2 に導入して、飽和変異により改変を行った。その結果、得られた cf-PA-SGFP2 は、PA-GFP と比較すると、図のように光活性化サイクルにおける蛍光の低下が極めて少なく、光活性化自体に対する耐性が高い事がわかる。図では PA-GFP あるいは cf-PA-SGFP2 を COS 細胞に発現し、細胞全体を照射することで、その光活性化で得られた蛍光を測定している。この光活性化に対する強い耐性は、PALM におけ



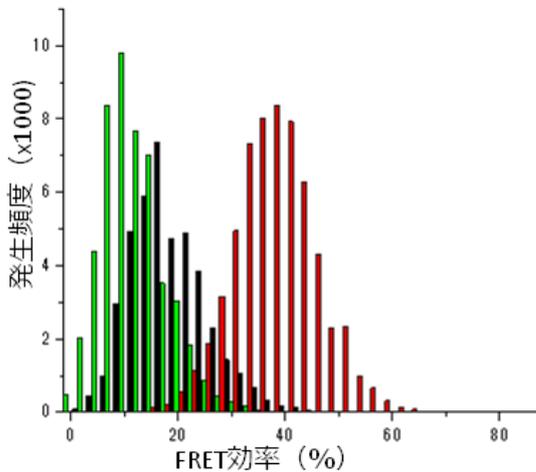
る超解像技術においてプローブとして有用性を持つ可能性があり、検討中である。

**光変換タンパク蛍光タンパク** 405nm 照射により蛍光特性を変える種類のタンパク質として、Dendra2 と mKikGR について、小胞体内で変化が起きないようにアミノ置換を検討し、最終的にいずれも至適なアミノ酸配列を見いだすことができた。mKikGR の場合には、光変換の前と後のいずれでも一分子輝度が 50-100% 増大するものを得ることができた。光変換の kinetics 定数には大きな変化はみられなかった。そこで、ミスフォールドするアンチトリプシン変異体 NHK に cgf-mKikGR を融合させて細胞に発現し、小胞体内の一カ所に 405nm レーザー照射を行って蛍光を観測するサイクルを繰り返した例を示した。初回の励起で 561nm で励起される蛍光が観測され、60 回の後には小胞体全域に拡散された。



cgf-mKikGR は単量体で、光変換は stochastic に起きるので、この融合タンパクが多量体を形成する場合には、変換前の cgf-mKikGR から変換後への分子に FRET が起きることが予測される。NHK は 2 量体とされているので、donor 分子にパルス励起光を照射してその蛍光寿命の変化を調べることで、時間分解 FRET 効率を求めたところ、

下図のように変換前には FRET 効率が 10% 程度であったもの(緑)は変換後には 40% 程度に増加し(赤) また、光変換後の分子をあらかじめ強い 561nm 照射によって消光させて(acceptor bleaching)を行って FRET 効率を計測した場合には、その効率の増加はわず



かにとどまり、光変換された分子に光変換前の分子からのエネルギーが転移されて蛍光寿命の変化が起きていることが証明された。この"photoconversion-induced FRET"によって、分子の単量体 多量体変換を検出できる事が示された。

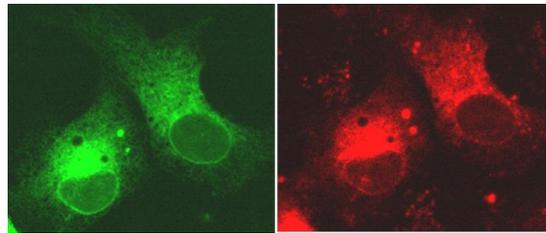
このような徹底的なアミノ酸置換の結果で、蛍光特性を変えずに Cys の代替となりうるアミノ酸は、aliphatic、または水酸基を持つアミノ酸のいずれかであった。部位により、ほぼすべての aliphatic、水酸基を持つアミノ酸であれば蛍光特性を保持する場合もあれば、特定の一つのアミノ酸だけしか許容されない箇所もあった。

なお、前項目の安定した蛍光を出すタンパクとは異なり、光活性化、光変換の特性を持つ蛍光タンパクの Cys の置換では、蛍光特性の有意な改善が、すべての場合にみられた。このことは、分子からの蛍光発生の理解につながる可能性もあるが、本研究の目的ではないために、追求していない。

#### B)FAP を用いた検討

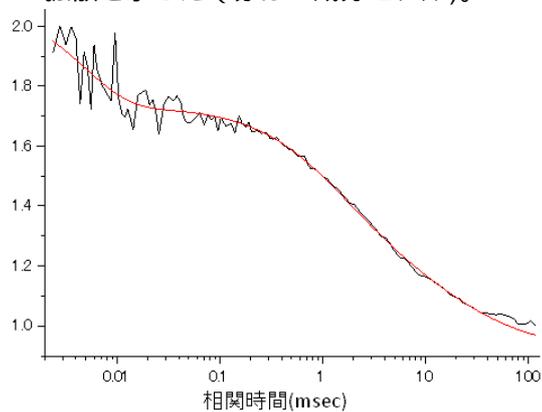
低分子化合物 (fluorogen) が結合してはじめて蛍光を発する FAP (fluorogen activatin protein) の性質を持つ一本鎖抗体ライブラリより得られた人工タンパク (NatBiotech(2008)26:235) の中で、123 アミノ酸からなる L5-MG の配列が、本課題の目的に適合する可能性があり、検討を行った。配列内には Cys を 2 個含むが、これは一本鎖抗体の基本骨格に必要な S-S 結合を形成するためのもので、他の Cys には影響しないと予想されたので、これを含める形で検討を進めた。

本分子を小胞体内に発現するために、上記アンチトリプシンの切断されるシグナル配列を付加して、C 末には KDEL 配列を付加した ssL5-MG を作成し、COS 細胞に発現して、fluorogen である MG-2p (Spectragenetics 社製 -Red を使用) を添加して 643nm での蛍光を観察したが、シグナルは得られなかった。これは、fluorogen が両分子に挟まれてはじめて蛍光を発するので、2 つの分子間の距離が問題となる可能性を考えた。そこで、L5-MG



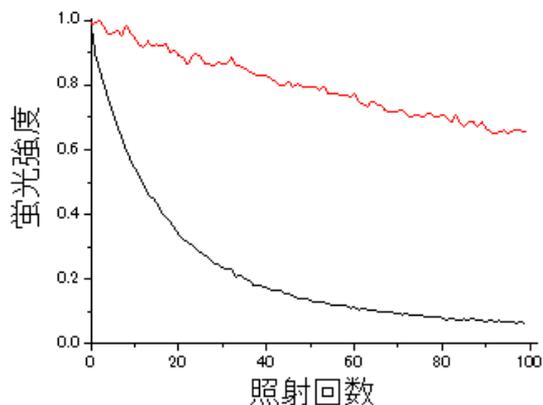
を、flexible なリンカーを介する直列 2 量体 sstdMGL5 を作成して発現したところ、MG-2p 添加により、シグナルは弱いものの、下図のような明確な小胞体シグナルが観測された。左が小胞体マーカーである Sec61b tm-SGFP2 で、右が sstdL5-MG であり、適切に小胞体内を染める事が示された。

しかし、この分子は内腔可溶性のはずだが、FCS により調べると下記のように、顕著に遅い拡散を示した (赤は 2 成分モデル)。



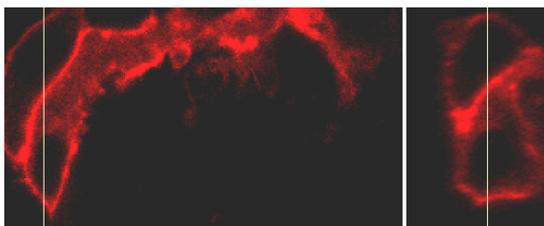
拡散時間は 1.5msec (69%) と 22msec(31%) の 2 つの成分からなり、明らかに膜に結合しておそらく多量体を形成しており、分子タグとしてはふさわしくないことがわかった。

しかし、これには顕著な光耐性という利点がある。下記はその繰り返し照射による消光の結果で、似た波長特性を持つ iRFP670 (黒線) と比較するとその耐性 (赤) は明瞭だった。



この分子は、iRFP670 と比較すると、分子輝度はかなり落ちるものの、この光耐性の性質を利用して細胞膜標識に用いることには優位性もある。sstdL5-MG から KDEL 配列を除いて膜貫通部分を付加した分子を発現すると、下記のように細胞膜に輸送されて、100 枚以上のスキャンでもほとんど消光は無く、細胞輪郭を明確に可視化することが容易であり

(上記図はZ軸方向にスキャンした100枚の画像の再構築像。左がX-Y画像、右が白線の位置でのY-Z画像) 近赤外領域で特定構造の標識が必要な場合には利用できる可能性はある。なお、他のFAP配列、H6-MGについて、先の論文ではより高い蛍光輝度の特性が記されており、上記と同様の分子を作成し調べたが蛍光シグナルは観測されなかった。



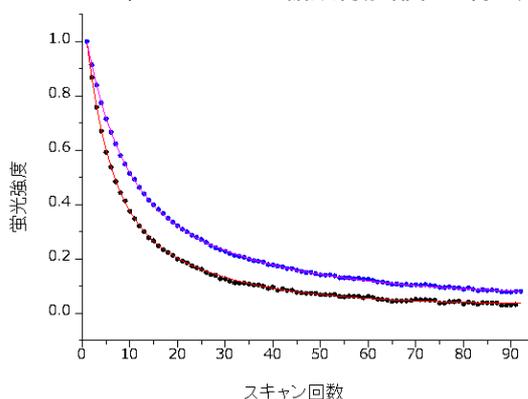
### C) FMN 依存的蛍光タンパクの改良

FMN に結合して蛍光を発するタンパクのうち、分子量が1万程度と最も小さいiLOV、さらにその改良体、PhiLov2.1 (JBiolChem (2012)287:22295)について、酸化的環境で使えるように検討した。この分子にはN型糖鎖付加部位があり、小胞体内に発現した場合には、糖鎖付加が起こり、蛍光を発現しない。そこで、この部位を除いて、さらに蛍光特性を改善できるように、各アミノ酸を徹底的に飽和変異することで試みた。

この分子は、籠状のGFPとは異なり、突出したループを持つので、このループの排除を検討してみたが、蛍光を消失させずにループを除くことはできなかった。

全体として、ほとんどの変異は蛍光を減弱・消失させたが、増加させるアミノ酸変異を見いだした。この変異体をPhiL3と呼ぶ。これは、精製標品の一分子輝度の測定ではPhiLov2.1の約2倍の分子輝度を持ち、上の図のように細胞に発現して光耐性を調べた場合、減衰時間を31%遅らせることができた(青点がPhiL3、黒点がPhiLov2.1。実線は、一成分の指数関数減衰のベストフィット曲線)。

しかし、PhiL3 から糖鎖付加部位を除去す



るように検討したところ、どのアミノ酸置換でも蛍光強度の弱い低下をもたらすことがわかった。この点は、継続して検討中である。

iLov は、GFP とは異なり、熱や酸、アルカリに対する耐性を持つことが報告されており(PLOS ONE (2013)8:e64753)、少なくとも、

今回開発した分子は細胞外環境でのイメージングに適した性質を備えている。

本項目で得られた産物は細胞外環境の分子を適切に標識でき、本研究の目的にはなっていないが、GFP ファミリーの1/3-1/4程度という輝度はそれほど改善できていない。しかし、近年、高量子効率光電管 R10699 が発売され、従来の光電管に差し替えるだけで検出器を2倍程度に低コストで高感度化することが可能となっている。また GaAsP 検出器も普及してきており、従来からの APD も画像取得用に使用できるので、これらを用いれば本タグは十分実用的で、安定した小さな分子プローブとしての優位性があると判断される。

### 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1件)

Development of Cysteine-Free Fluorescent Proteins for the Oxidative Environment. Takahisa Suzuki, Seisuke Arai, Mayumi Takeuchi, Chiye Sakurai, Hideaki Ebana, Tsunehito Higashi, Hitoshi Hashimoto, Kiyotaka Hatsuzawa, Ikuo Wada (2012)7 : e37551

〔学会発表〕(計6件)

1. 定量的イメージングを用いた細胞内構造の微小揺動の解析 荒井齊祐、鈴木貴久、橋本仁志、和田郁夫、第37回日本分子生物学学会年会 (2014)

2. Photoconversion-induced FRET の検討、鈴木貴久、橋本仁志、竹内真由美、和田郁夫、第37回日本分子生物学学会年会 (2014)

3. 細胞内反応に関わる微小揺動の定量的イメージングによる解析 和田郁夫、橋本仁志、鈴木貴久、荒井齊祐、木村耕士、今中常雄、第66回日本細胞生物学会大会 (2014)

4. Microdynamics analysis of cellular structures by structured illumination microscopy 第22回日本バイオイメージング学会学術集会 和田郁夫 (2013)

5. 酸化的環境で機能する光変換蛍光タンパクの開発と細胞機能制御計測 鈴木貴久、橋本仁志、和田郁夫、第86回日本生化学大会 (2013)

6. Live-cell molecular imaging in the oxidative environment using cysteine-free fluorescent proteins Takahisa Suzuki, Ikuo Wada. The American Society for Cell Biology The 2012 Annual Meeting (2012)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 郁夫 (WADA IKUO)

福島県立医科大学 医学部 教授

研究者番号 : 40182969