

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659111

研究課題名(和文) S-ニトロシル化の可視化を目指した蛍光タンパク質の改変

研究課題名(英文) S-nitrosylation sensitive fluorescent protein

研究代表者

松本 明郎 (Matsumoto, Akio)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60437308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(Nitric Oxide:NO)が生理活性を示すための機序であるS-ニトロシル化修飾(SNO化)が生じる経過を解析可能にすることを目的として、SNO化修飾に反応して蛍光強度が増強する緑色蛍光蛋白質(GFP)の改変をおこなった。野生型GFPにSNO化修飾を受けるシステインを導入し、さらにアミノ酸置換を無作為に行なったクローンを多数作成したところ、SNO化処理に伴い蛍光強度が迅速に変化する変異体が得られた。遺伝子配列の解析から、感受性はSH基のpKa変化よりも立体構造に依存している事が示唆され、SNO化修飾の生成・特異性を規定する機序に新たな視点を与えることにもなった。

研究成果の概要(英文)：The major focus of this project is to provide a method to analyze the formation of S-nitrosothiol (SNO) on cysteine residue, which is necessary to study the physiological function of nitric oxide in the cell. We worked on green fluorescent protein to use it as a reporter system to sense the SNO-formation by introducing a cysteine followed by random mutations in nucleotides sequence of GFP. Some clones showed fluorescent intensity changes following an SNO-treatment, and the sequence analysis indicates that the structure modification has greater influence on SNO-formation than other sequence changes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：S-ニトロシル化 一酸化窒素 翻訳後修飾 イメージング GFP

1. 研究開始当初の背景

NOは血管弛緩反応に関わる生理的因子であることに加え、セカンドメッセンジャーとして細胞間情報伝達経路を形成するシグナル分子でもあることが明らかにされてきた(1998年ノーベル医学生理学賞)。セカンドメッセンジャーとしての役割は、タンパク質システインチオール基のニトロシル(SNO)化修飾により達成され、タンパク質翻訳後修飾の一形態であることが明らかにされてきた。これまでに申請者らはSNO化修飾がアポトーシス(Matsumoto et al. Science 2003)・受容体制御(Matsumoto et al. Cell 2007)・転写因子NF- κ B制御(Kelleher, Matsumoto et al. J. Biol. Chem. 2007)などに関連していることを明らかにし、その生物学的重要性をリン酸化修飾や他のレドックス修飾との関連性を含めて明らかにしてきた(Hess, Matsumoto et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005)。さらにSNO化修飾はヒトの神経分化に関係するエピジェネティック制御やイオンチャネル制御、さらには気管支喘息や肝がんをはじめとした疾患、植物の感染防御など幅広い分野における重要な生物活性を有していることが多くのグループにより明らかにされている。

SNO化修飾は可逆的な翻訳後修飾であり、細胞外環境の変化に応じたSNO化修飾の形成・分解がおきていることが経験的に明らかにされてきた。タンパク質翻訳後修飾の中で最も研究が進んでいるリン酸化修飾におけるキナーゼやフォスファターゼに相当する酵素群がSNO化修飾にも存在している事が明らかにされてきた。しかし、これらの調節因子が実時間においてどのように働き、SNO化形成を複合的に制御しているかについては依然として明らかではない。その大きな理由として、SNO化修飾の形成・消失をとらえることのできる時空間的解像度の高い解析手法がないことがあげられる。現在利用可能な解析手法は、時間と手間のかかる生化学的手法であり、実時間で解析を行う事はほぼ不可能である。そのため、経時的にSNO化の生成・分解をモニター出来る手法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、時空間的分解能を持つSNO化の解析手段、すなわちリアルタイムでSNOの生成・分解を解析することに応用可能な手法を開発することを目的とした。SNO化修飾の増減を経時的に観察することができるだけでなく、細胞内でのSNO化修飾の形成部位の検討などにも応用が可能になる事を目標として、時間分解能だけではなく高い空間分解能も合わせ持つ方法を検討した。これらの目的に合致する手法としては、蛍光タンパク質を用いる手法が適当であると考えられる。すなわち、緑色蛍光蛋白質(GFP)は細胞に対して比較的障害性が少ない

ため、SNO化修飾によりGFP由来の蛍光強度が変化するようにできれば、SNO化修飾の増減を実時間でモニターする事が可能になると考えた。

3. 研究の方法

SNO化処理により蛍光強度が増強する様にGFPのアミノ酸配列を改変することを目標とした。野生型では蛍光を示さないAequorea coerulescens由来のacGFPLは、G222E変異を導入し紫外線照射を行なうことによりGFP様の蛍光タンパク質となる。さらに変異を追加し安定した蛍光を示すものはAcGFPとして市販されている。このAcGFPからSNO化処理により蛍光強度が変化するSNO感受性GFPを作成する事にした。AcGFPのChromophoreに隣接した部位にSNO化のターゲットとなるシステインを導入し、SNO化修飾によるシステイン残基の構造的な変化がChromophoreに影響し、蛍光強度の変化として表現されると予想した。SNO化の標的となるシステインの導入に加え、大腸菌発現ベクターに組み込まれたAcGFP遺伝子配列にPCR法を用いてランダムに変異を導入した。またAcGFPの由来にあたるacGFPLはG222E変異により蛍光タンパク質としての機能を獲得するため、G222の近傍にSNO化モチーフを導入したクローンも作成した。

これらの改変AcGFPプラスミドを用いて、大腸菌(BL21)を形質転換し寒天プレート上でクローン化した。これらの大腸菌がGFPを発現していることを確認するために、青色LEDを用いた励起装置を作製し、目視下でGFP陽性クローンの識別・取扱を可能にした。これらのクローンは、IPTGなどによる誘導をおこなわなくてもGFPタンパク質を発現した。寒天プレートからクローンを96-wellプレートに単離し、液体培地中で培養した。

96-wellフォーマットを利用することにより、ハイスループットにSNO化処理の前後での蛍光強度の変化を蛍光プレートリーダーで経時的に測定することが可能になった。蛍光強度を縦軸に、時間経過を横軸としてグラフ化しSNO化処理による蛍光強度の増大を計測した。SNO化処理により蛍光強度が増大するクローンを選択し、再度寒天プレート上でクローンの単離を実施した。得られたクローンを8ヶずつ液体培地中で培養し、再びSNO化処理により蛍光強度が増強するかを確認した。これら2回のSNO化処理に対する蛍光強度の増大反応を確認したクローンを選び、プラスミドDNAを抽出した。これらのプラスミドを用いてプラスミド増殖用の大腸菌(JM109)を形質転換し、DNAシークエンス用のサンプルを調整した。AcGFPコーディングDNA配列を確認し、遺伝子変異の部位と付随して生じたアミノ酸変異を確認した。

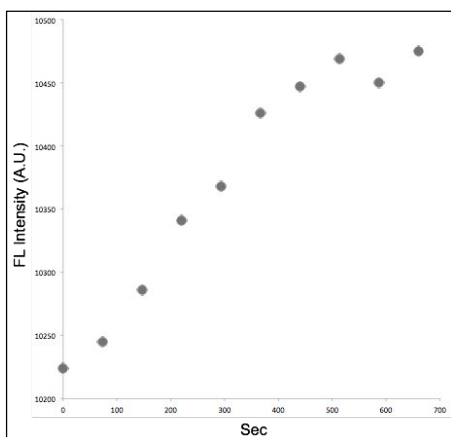
ついで、これらのアミノ酸配列を既知の

AcGFP 結晶構造データに当てはめ、それぞれの遺伝子変異と標的システインの位置関係を解析した。

4. 研究成果

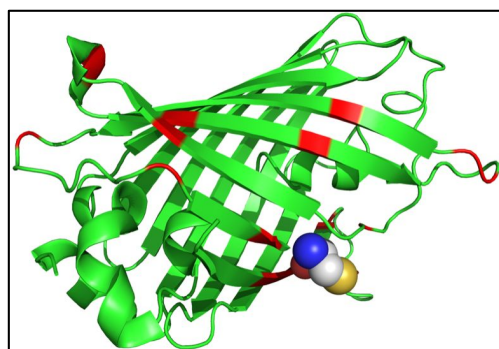
システイン SH 基の pKa は、周囲のアミノ酸によって変化する。特定のシステインにのみ SNO 化が生じるのは、各々の pKa の違いによると考えられてきたため、システイン周囲に存在するアミノ酸を含めて「SNO 化モチーフ」の概念が提唱されてきた。そこで、まず GFP のアミノ酸 222 番近傍に SNO 化モチーフが形成される様に 3 通りの異なるアミノ酸変異を導入し、SNO 化に伴う蛍光強度の変化を検討した。遊離システインを SNO 化させた CysNO と、グルタチオン (GSH) を SNO 化させた GSNO を SNO 化試薬として用いた。いずれのモチーフも SNO 化処理に伴う蛍光強度の変化を認めることはできたが、その変化の程度は小さく、効率的な SNO 化測定を行なうためには不十分であった。

次に、GFP の Chromophore 近傍に位置する部位にシステインを導入し、立体構造データから比較的近傍に位置する範囲に PCR 法を用いてランダムに変異を導入した。このプラスミドを用いて形質転換した大腸菌を、寒天プレート上でクローン化した上で、10,000 個以上のコロニーを 96-well フォーマットに整理し、SNO 化処理による蛍光強度の変化を経時的に検討した。SNO 化処理前と処理後を 10 分間ずつ計測し、SNO 化処理後に蛍光強度が経時的に上昇するクローンを選択した。下図に示した様に、SNO 化処理後



に蛍光強度が経時的に上昇し、その後停滞する複数のクローンが得られた。その程度は各クローンによって異なり、また蛍光強度の上昇が早いもの、遅いものなどかなり多くのバリエーションが認められた。これらのサンプルを再度寒天培地上で単一クローン化した後、68 サンプルについて AcGFP の DNA シークエンスの確認を行なった。遺伝子変異が全サンプルに対して導入され、アミノ酸変異が引き起こされていることを確認した。これらのアミノ酸変異を部位毎に頻度を検討したところ、多くの重複が生じている事が明

らかになった。そこで、重複したアミノ酸変異が 4 つ以上のクローンで確認されたアミノ酸位置を選び、標的システインとこれらの変異アミノ酸の位置関係を AcGFP 立体構造モデル上で検討した。下図にその結果を示すが、SNO 化の標的として導入したシステイン (球表示) の近傍だけではなく、立体構造上ある程度離れた位置関係にあるアミノ酸 (赤) が効率的に SNO 化処理に伴う蛍光強度変化を規定することが明らかになった。これらのアミノ酸の位置関係は、アミノ酸の一次配列からは予測出来ないが、立体構造上では互いに隣接しており、とりわけ GFP のバレル構造のゆがみを生じさせる様な位置関係にあった。



これまでタンパク質に含まれる多くのシステイン残基の中で SNO 化修飾が生じるのは特定のシステインだけである事が経験的に知られてきた。特異性が生じる理由としては、近傍のアミノ酸配列により規定される SH 基の pKa が重要であると考えられ、SNO 化の標的となるシステイン周囲には SNO 化モチーフが形成されていると考えられてきた。しかし、本研究成果よりモチーフの形成だけではなく、SNO 化修飾により惹起されるシステイン側鎖の構造変化 (S-NO 結合の形成) により生じるタンパク質立体構造の変化がその活性発現に重要である事が強く示唆された。

本研究成果より得られた GFP 変異体の最適化より、生細胞・生体内で生じる SNO 化修飾を実時間で計測・可視化する事が可能になると考えられる。今後、脱 SNO 化反応や SNO 化阻害反応などに関与する酵素・物質の検索や解析にも、本研究成果は利用されるであろう。

本研究結果より、従来考えられてきたシステイン pKa を変化させるアミノ酸モチーフ以上にシステイン周囲の構造的な要因が SNO 化には強く働くことが明らかになり、SNO 化修飾が特異的に生じる機序に新たな視点を与えられ、シグナル伝達制御における SNO 化修飾の重要性を示す事にもつながった。

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 11 件)

Matsumoto A, Yamafuji M, Tachibana T, Nakabeppu Y, Noda M, Nakaya H. Oral "hydrogen water" induces neuroprotective ghrelin secretion in mice. Scientific reports (査読有) 3 (2013) 3273. DOI:10.1038/srep03273

松本明郎 酸化ストレス制御によるレドックスシグナルの維持 - とくに一酸化窒素(NO)によるシグナル伝達とその制御機構 医学のあゆみ (査読無) 247(9) (2013) 770-775

Shimizu T, Tsutsuki H, Matsumoto A, Nakaya H, Noda M. The nitric oxide reductase of enterohemorrhagic Escherichia coli plays an important role for the survival within macrophages. Mol Microbiol (査読有) 85 (2012) 492-512. DOI:10.1111/j.1365-2958.2012.08122.x

松本明郎 SNO 化制御の破綻と疾患 細胞工学 (査読無) 31 (2) (2012) 171-172

松本明郎 一酸化窒素由来ストレスの制御とシグナル機構の維持 実験医学増刊 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患 (査読無) 30(17) (2012) 57-63

[学会発表](計 16 件)

山藤芽実, 松本明郎, 立花知子, 中別府雄作, 野田百美, 中谷晴昭 Drinking 'hydrogen water' induces ghrelin secretion and protects dopaminergic neurons in MPTP- induced Parkinson's disease model mice 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 03 月 19 日 ~ 2014 年 03 月 21 日 仙台

小島章光, 西田洋文, 松本明郎, 岩田和実, 白山武司, 矢部千尋, 中谷晴昭 低酸素時における洞徐脈に対する Nox1/NADPH オキシダーゼの保護作用 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 03 月 19 日 ~ 2014 年 03 月 21 日 仙台

松本明郎 水素水による新たな生理作用の発現機序 - 胃におけるグレリン産生の活性化 - 第 4 回分子状水素医学シンポジウム(招待講演) 2014 年 02 月 01 日 ~ 2014 年 02 月 01 日 東京

Sanayama, Y., Matsumoto, A., Kohno Y., Nakaya H. Establishment of phenylalanine sensitive cells revealed mTOR inhibition by excessive phenylalanine. The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) 2013 年 11 月 27 日 ~ 2013 年 11 月 27 日 千葉

松本明郎, 清水健, 津々木博康, 野田公俊, 中谷晴昭 一酸化窒素(NO)による腸管出血性大腸菌(EHEC)の感染制御と重症化機序 第 13 回日本NO学会学術集会 2013 年 06 月 28 日 ~ 2013 年 06 月 29 日 沖縄

松本明郎 ガス状分子によるシグナル伝達制御:NO による S-ニトロシル化修飾 第 3 回分子状水素医学シンポジウム(招待講演) 2013 年 02 月 09 日 ~ 2013 年 02 月 10 日 東京

Matsumoto, A., Endo, H., Matsumoto, A., Nakaya H. Redox sensitive regulation of thioredoxin interacting protein (TxnIP) in mouse vascular smooth muscle cells. The 33rd Naito Conference 2012 年 06 月 26 日 ~ 2012 年 06 月 29 日 札幌

[その他]

ホームページ等:
千葉大学大学院医学研究院薬理学
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/pharmacology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 明郎 (MATSUMOTO, Akio)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 60437308