

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620106

研究課題名(和文) 活性酸素種の革新的イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of optical indicators for reactive oxygen species

研究代表者

佐藤 守俊 (Moritoshi, Sato)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：00323501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種は、ガンや糖尿病、心血管疾患(心筋梗塞、脳卒中、脳梗塞、動脈硬化)など、すべての疾患のうち約90パーセントにも及ぶ疾患の原因になっていることが知られている。本研究では活性酸素種の細胞内動態を可視化する新しい分子プローブを開発した。本研究での技術開発により、様々な疾患に関係する活性酸素種の動態を簡便かつ正確に計測できるようになったインパクトは非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species are involved in many diseases, such as cancer, diabetes and cardiovascular diseases. In this study we have developed novel optical probes to detect the dynamics of reactive oxygen species generated in living cells.

研究分野：分析化学

キーワード：活性酸素種 生物発光 生物発光タンパク質 細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種は、ガンや糖尿病、心血管疾患（心筋梗塞、脳卒中、脳梗塞、動脈硬化）など、すべての疾患のうち約 90 パーセントにも及ぶ疾患の原因になっていることが知られている。さらに活性酸素種は、病態生理に限らず、生体内での細胞の正常な移動、染色体上での遺伝子発現メカニズムなど、非常に基本的な生命機能の制御にも深く関わっているという研究成果が最近の重要な学術雑誌を賑わしている。活性酸素種は、ドラッグデリバリーやアンチエイジングを指向するナノマテリアルや薬物候補物質の毒性評価の観点でナノテク産業や製薬産業においても極めて注目を集めている。このように疾患のメカニズムにおいて圧倒的な重要性を持ち、かつ生命機能の理解やナノマテリアル、薬物の評価においても欠くことのできない活性酸素種が、細胞や生体において、どこで・いつ・どの程度生成しているのかを可視化できる革新技術が開発されれば、生命機能の理解を目指す研究はもとより、疾患の治療や制御においても多大なインパクトを与えることが予想される。

2. 研究の目的

申請者は最近、分泌型ルシフェラーゼと呼ばれる数種類の生物発光タンパク質に内在する非常に興味深い物性を発見した（「3. 研究の方法」に詳述）。分泌型ルシフェラーゼは、ホタル由来のルシフェラーゼのように細胞質で機能する、いわゆる細胞質型ルシフェラーゼとは区別される。本研究では、このような特徴的な物性を内在する分泌型ルシフェラーゼを用いて、細胞内の活性酸素種を計測するための分子センサーを開発することを目的とする。

細胞内で生成する活性酸素種を観察するための既存技術として、フルオレセインの誘導体であるジクロロフルオレセインに代表される有機蛍光プローブが開発され、基礎研究の現場で用いられている。しかし、この既存の有機蛍光プローブは、マウスなど透明でない動物での観察に用いることは極めて困難である。これは生体組織による励起光の透過不良や自家蛍光等が原因である。また、既存の有機蛍光プローブはいずれも活性酸素種と不可逆的に反応して蛍光を発するため、ダイナミックに変動する活性酸素種の動態を可逆的かつ詳細に追跡することが不可能であることも、既存の有機蛍光プローブが最先端の生命科学の要請に応えることが困難な理由となっている。本研究では、海洋生物由来の分泌型ルシフェラーゼに内在する特異な物性の発見に基づいて、上述のように既存技術が抱える問題（自家蛍光、可逆性）を克服する全く新しい原理の分子センサーを開発し、活性酸素種の革新的イメージングを実現する点を最大の特徴としている。

活性酸素種はガンや脳血管疾患など様々

な疾患の原因となる鍵因子であると共に、ナノマテリアル・薬物等による毒性作用の原因となる因子でもある。従って本研究の成果は、ライフサイエンスおよびヘルスケアの広い分野における革新技術を生み出し、将来、国民の福祉に寄与することが期待できる。測定機器等の周辺の技術分野に対する波及効果も大きいと考えている。

3. 研究の方法

ホタル等の発光生物の多くが生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）を有している。申請者は最近、海洋生物が有する数種類のルシフェラーゼに内在する非常に面白い物性を発見した。「数種類のルシフェラーゼ」とは、細胞での発現に引き続いて細胞外・体外へと放出される、いわゆる分泌型のルシフェラーゼであり、生命科学研究で頻繁に利用されるホタルやウミシイタケのルシフェラーゼのように細胞質で機能する、いわゆる細胞質型ルシフェラーゼとは区別される。分泌型ルシフェラーゼはその N 末端に小胞体移行シグナルとして機能するアミノ酸配列を有するのが特徴で、この配列が当該ルシフェラーゼを分泌経路（小胞体→ゴルジ体→分泌小胞→分泌）に引き込む役割を担っている。この配列を除去すると分泌型ルシフェラーゼは小胞体へは移行せず、細胞質で発現する。申請者は最近、シグナル配列を除去した分泌型ルシフェラーゼを細胞質に発現させたところ、その生物発光活性が完全に失われることを発見した。なお野生型の分泌型ルシフェラーゼは小胞体に取り込まれる過程で当該シグナル配列が切断されるため、最終的なアミノ酸配列としてはシグナル配列の欠失変異体も野生型も同じである。それでは、野生型と欠失変異体の間で、なぜこのような生物発光活性の大幅な差異が観察されたのか？この疑問について考える過程で、分泌型ルシフェラーゼ全体のアミノ酸配列を細胞質型ルシフェラーゼと比較したところ、分泌型ルシフェラーゼはいずれもシステイン残基の含有率が細胞質型ルシフェラーゼに比べて圧倒的に高いことに気付いた。

上述の検討を通じて、我々は、酸化環境にある小胞体に分泌型ルシフェラーゼが移行することにより同分子内でジスルフィド結合が形成され、これによりはじめて成熟した構造を有する、つまり高い生物発光活性を有するルシフェラーゼが形成されるのではないかの作業仮説を立てるに至った（なお、分泌型ルシフェラーゼはモノマーであり、分子間でのジスルフィド結合形成を考慮する必要はない）。この仮説を検証するために、野生型の分泌型ルシフェラーゼをジチオスレイトール（還元剤）で処理したところ、その生物発光活性が欠失変異体と同程度にまで激減することが分かった。この結果は、確かに分泌型ルシフェラーゼの生物発光活性には分子内でのジスルフィド結合の形成が

必須であることを示している。なお、ホタルルシフェラーゼ等の細胞質型ルシフェラーゼにも同様の還元剤添加実験を行ったが、いずれも還元剤の影響は全く観察されなかった。酸化的環境の小胞体を経由して分泌されるルシフェラーゼは、酸化的環境で形成されやすい分子内ジスルフィド結合を積極的に利用して成熟するように進化し、一方、還元的環境の細胞質で機能することを余儀なくされている細胞質型ルシフェラーゼは、ジスルフィド結合がその活性に関与しないように進化してきたのかも知れない。

最後に、本研究の着想に至った最も直接的な先行研究を説明する。分泌型ルシフェラーゼの欠失変異体（生物発光活性が失われている）を細胞質に発現させ、過酸化水素を添加してみた。その結果、当該変異体が野生型同様に迅速に分子内ジスルフィド結合を形成し、これに伴って生物発光活性が出現することが明らかになった。この発見は、分泌型ルシフェラーゼの欠失変異体が、活性酸素種の優れた分子センサーになる可能性を強く示唆している。

以上をまとめると、我々は先行研究において、(1) 分泌型ルシフェラーゼが小胞体（酸化的環境）を経由する分泌経路の中で、分子内ジスルフィド結合を形成して成熟していること、(2) N末端の小胞体移行シグナル配列を除去した欠失変異体は細胞質（還元的環境）に発現するためジスルフィド結合を形成できず、生物発光活性を失っていること、(3) 細胞質に発現させた当該欠失変異体は、活性酸素種に反応して迅速にジスルフィド結合を形成して成熟し、生物発光活性が出現することを発見した（図1）。

本研究では、このような分泌型ルシフェラーゼに内在する特異な物性に関する発見を出発点として、活性酸素種の革新的イメージング技術を開発する。以降、当該欠失変異体を roLuc (*redox-sensitive luciferase*) と呼ぶこととする。

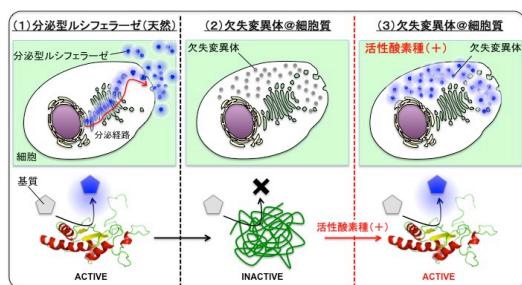


図 1. 我々の先行研究で明らかになった分泌型ルシフェラーゼとその小胞体移行シグナル配列の欠失変異体 (roLuc) の生物発光活性. roLuc は活性酸素種に反応して生物発光を生起する.

4. 研究成果

我々ばまず、roLuc の応答メカニズムを明らかにするために、10 個のシステイン残基のそれぞれをアラニンに置換してみた。その結果、9 個のシステインのアラニン変異体について、生物発光シグナルの大幅な減少が観察された。特にそのうち4つについては、生物発光活性を完全に失うことが明らかになった。この結果は、活性酸素種に依存したジスルフィド結合の形成により、roLuc が生物発光シグナルを生起していることを示している。さらに、そのジスルフィド結合は、一つではなく、複数形成されることも明らかになった。

先行研究では、roLuc が過酸化水素に反応することを明らかにしていたが、本研究では、それ以外の活性酸素種に対する roLuc の選択性を調べた。その結果、roLuc は過酸化水素のみならず、ペルオキシナイトライト (ONOO⁻)、次亜塩素酸イオン (OCI⁻)、スーパーオキシドアニオン (O₂⁻)、一酸化窒素 (NO) といった様々な活性酸素種に幅広く応答することが分かった。

さらに、roLuc の可逆性を調べるために、roLuc を発現する細胞に過酸化水素を加えたあと、これを除去する実験を行った。roLuc の生物発光シグナルは過酸化水素の添加とともに上昇し、過酸化水素の除去によって消失した。この結果は、roLuc が活性酸素種の有無によってジスルフィド結合を形成・切断することにより生物発光シグナルを ON・OFF させる可逆的な分子センサーであることを示している。

以上のような基礎検討に加えて、roLuc が様々な刺激によって細胞内に生成する活性酸素種を検出できるのかを検討した。roLuc を細胞に発現させ、ここにピオシアニン、スタウロスポリン、ドキシソルピシン、酸化型低比重リポタンパク質 (oxLDL) をそれぞれ添加し、roLuc の生物発光シグナルを観測した。ちなみに、ピオシアニンは緑膿菌が産生する

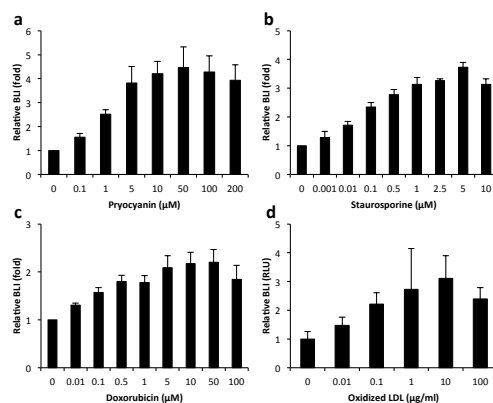


図 2. 様々な物質により細胞内に生成する活性酸素種を roLuc が検出.

毒素であり、緑膿菌の病原性の一端を担っている。スタウロスポリンとドキシソルビシンはいずれも抗がん剤である点は共通しているが、前者がプロテインキナーゼの阻害剤であるのに対して、後者はDNA二重鎖に結合し、DNAの複製と転写を阻害することにより効果を発揮するなど、メカニズムは異なっている。oxLDLはいわゆる悪玉コレステロールのLDLが酸化により悪性化したものであり、動脈硬化症を発症させる原因物質である。上述のようにroLucを発現する細胞にピオシアニン、スタウロスポリン、ドキシソルビシン、酸化型低比重リポタンパク質(oxLDL)をそれぞれ添加したところ、いずれもroLucの生物発光を数倍程度上昇させることが分かった(図2)。この結果は、roLucを用いることにより、様々な活性酸素種の生成源の評価を簡便に行うことができることを示している。

最後に、roLucを用いて、紫外線照射により細胞に生成する活性酸素種の計測を行った。既存技術には可逆性がないため、紫外線により細胞内にどのように活性酸素種が生成するのか、その動態は不明のままだった。roLucを発現する細胞に対して、波長が長い紫外線(UV-A)を照射したところ、roLucはほとんど生物発光シグナルを示さなかった。このことは、細胞にUV-Aが照射されても、活性酸素種はほとんど生成しないことを示している。一方、波長が短い紫外線(UV-B)を細胞に照射したところ、5分の照射ではほとんど活性酸素種を生成しなかったが、15分の照射により、高いレベルで細胞内での活性酸素種の生成を誘起することが明らかになった。紫外線による活性酸素種の生成は、特に肌科学やコスメティクスの分野で非常に重要と考えられている。roLucの開発により、簡便かつ正確に活性酸素種の動態を計測できるようになったインパクトは非常に大きいと考えている。

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)

- ① Nishihara R, Suzuki H, Hoshino E, Saganuma S, Sato M, Saitoh T, Nishiyama S, Iwasawa N, Citterio D, Suzuki K. Bioluminescent coelenterazine derivatives with imidazopyrazinone C-6 extended substitution. Chem Commun (Camb). 2015 Jan 7;51(2):391-4. doi: 10.1039/c4cc06886f. Epub 2014 Nov 18. PubMed PMID: 25407088.

〔学会発表〕(計 2件)

- ① M. Sato, New Prospect for Bioanalytical Chemistry, *Asian Symposium on Analytical Sciences*, 広島大学東広島キャンパス(広島県・東広島市) (2014.9.17)

- ② 佐藤守俊, バイオ分析の最前線, JAIMA セミナー, 幕張メッセ国際会議場(千葉県・千葉市) (2014.9.5)

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ:

<http://system.c.u-tokyo.ac.jp/common/professor/sato.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守俊 (MORITOSHI SATO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 00323501

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: