

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620134

研究課題名(和文) 基質認識に伴う構造変化を必要としない革新的なバイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Genetically encoded fluorescent biosensor without requiring the conformational change

研究代表者

中田 栄司 (NAKATA, EIJI)

京都大学・エネルギー理工学研究所・講師

研究者番号：70467827

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)：レシオ型バイオセンサーを構築するにはリセプタータンパク質にはリガンド認識に伴う構造変化が必須である。そのため、構造変化を伴わないリセプタータンパク質は、バイオセンサーに活用できないという問題点があった。本研究では、擬似リガンドペプチドを導入することでその問題を解決することを目指した。実際に構造変化がほとんどないとして知られているリセプタータンパク質をモデルとし、その擬似リガンドペプチドとリポータータンパク質を組み込んだバイオセンサーを構築した。また、擬似リガンドペプチドを有さないコントロールについても用意し、評価した結果、顕著な差があることが確認され、本戦略が有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Genetically encoded fluorescent biosensor proteins offer the possibility to probe the concentration of key metabolites in living cells. The approaches currently used to generate such fluorescent biosensor proteins lack generality, as they require a protein that undergoes a conformational change upon ligand binding. In this research, we try an approach that overcomes this limitation. Our biosensor consist of receptor protein for ligand, fluorescent protein and ligand mimicked peptide. In the presence of the ligand of interest, the ligand displaces the ligand mimicked peptide, thereby inducing spectral change. On the other hands, the control-biosensor, which did not have the ligand mimicked peptide, could not sense the ligand of interest because the conformational change was not induced. These results clearly indicated that our strategy was useful to construct fluorescent biosensor.

研究分野：生体関連分野

キーワード：バイオセンサー 蛍光 構造変化 リガンド

1. 研究開始当初の背景

生体内で標的物質の局在と物質量を明らかとするセンサーは、診断での利用や、生体内での情報伝達経路・未知なる機能を解明するためのツールとして期待されている。特にタンパク質を基盤としたバイオセンサーは、タンパク質本来の基質に対する高い選択性と親和性により、複雑な生体内でも標的物質を特異的に検出できる。一般に蛍光性バイオセンサーは、蛍光シグナルの変化パターンの違いによって定性的(強度変化による検出)または定量的(レシオ検出)な検出が可能なものに大別されるが、ここでは、よりバイオイメージングに有効な定量性の高いレシオ型バイオセンサーに注目する。一般的なレシオ型バイオセンサーの構成モジュールは、標的物質の認識に伴い構造が変化する「リセプタータンパク質」と「2種類の蛍光タンパク質(ドナー・アクセプター)」である。リセプタータンパク質の両端にそれぞれの蛍光タンパク質を連結することで、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が蛍光タンパク質間で起こる。一方、標的物質の認識で生じるリセプタータンパク質の構造変化により、蛍光タンパク質間の空間的配置が変化することで、FRET効率が変化する。この方法論は、構造変化を伴わないリセプタータンパク質では適用できないという問題がある(*ChemBioChem*, 10, 2560 (2009))。そのため、生物学的にも有用でも構造が変化しないためにバイオセンサー化できないリセプタータンパク質が多数存在していた。この問題の解決戦略として、申請者らは、リセプタータンパク質の擬似リガンドである人工分子を構造変化モジュールとして導入する戦略を考案し、リガンド結合によって構造変化をしないリセプタータンパク質を利用してバイオセンサーが構築できることを実証した(*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5873 (2009))。この戦略は、試験管

内および細胞表層でのバイオセンサー構築には有効であった(*J. Am. Chem. Soc.*, 133, 16235 (2011)など)。一方で、細胞内での直接バイオセンサーの構築は達成できていない。その大きな要因は、細胞内で翻訳された融合タンパク質に人工分子を導入して初めてバイオセンサーが完成するため、細胞内ではその定量的な導入が困難なためである。

2. 研究の目的

構造変化を伴わないリセプタータンパク質をこれまでに人工分子として導入していた構造変化モジュールを天然アミノ酸に置き換えて、完全に遺伝子レベルで構築されるレシオ型バイオセンサーを構築することに挑戦する。

3. 研究の方法

リセプタータンパク質と2種類のリポーター用蛍光タンパク質(ドナー・アクセプター)に加え、構造変化モジュールとして分子内に配置されたりセプタータンパク質の疑似リガンドとなるペプチド配列(疑似リガンドペプチド)を導入した新しいバイオセンサーを構築する。アフィニティーセレクションによる疑似リガンドペプチドの探索からはじめる。試験管内でのバイオセンサーの構築および検証をおこなう。特に、疑似リガンドペプチドが存在しないバイオセンサーコントロールとの比較により、構造変化を伴わないリセプタータンパク質を用いた場合でも本戦略がバイオセンサー構築に貢献できることを確認する。さらには、リガンドの親和性および選択性についてどのような義理リガンドペプチドを使用した場合にどのように変化するかなど、構造と機能の相関関係を得ることも重視する。さらに、このバイオセンサーが細胞内において標的物質を検出するまでの評価を想定している。

4. 研究成果

本戦略の有用性の確認のためにまずは、リセプタータンパク質に対し、リポータータンパク質・構造変化モジュールを組み込み、本研究で提案するシステムが実際に機能するかを評価した。リポータータンパク質としては、当初計画していた2種類の蛍光タンパク質間の FRET を利用するシステムから一種類の蛍光タンパク質(GFP)の構造変化にした。これは、バイオセンサー全体のサイズを小さくすることにより、大腸菌を宿主としたタンパク質発現システムにおいて、比較的容易に回収することができることを期待したものである。また一方で、より高感度に検出できるように円順列変異を施した GFP を用いることにした(Baird, G.S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, 96, 11241.). これは、微小な構造変化でもより高感度に検出することができるよう、構造変化部位を GFP の発色団近傍に導入するためである。また、GFP に関しては、二波長励起一波長検出型のレシオ検出が可能であるため、1種類のリポータータンパク質に変更しても、当初の予定通りのレシオイメージングが可能である。図1に今回設計したバイオセンサー(biosensor-1)の構成を示す。精製用のタグとしてN末側に His-tag を導入した。続いてN末から順に、リセプタータンパク質・リポータータンパク質・擬似リガンドとし、コントロールとして、擬似リガンドを含まない biosensor-control を用意し、本戦略の有用性を確認することにした。リセプタータンパク質と擬似リガンドとしては、過去の文献を参考にし、既知のペアを抽出して評価することにした。

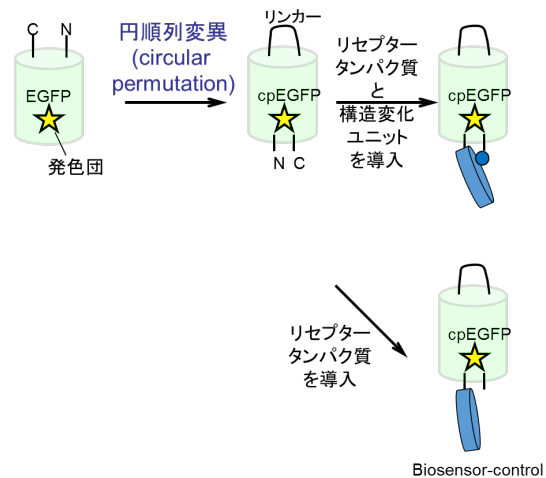


図1. バイオセンサーデザイン



図2. バイオセンサーの構造の模式図

プラスミドを常法に従い構築し、大腸菌を宿主とするタンパク質発現システムにおいて、それぞれのバイオセンサーを大量発現させた。菌体を集め、破碎後、常法に従って、目的のタンパク質 (biosensor-1, biosensor-control) を単離精製した。タンパク質の同定に関しても、SDS-PAGE において目的の分子量に一致すること、単一バンドであることで確認された。また、それぞれの分光学的測定によっても確認した。biosensor-1 および biosensor-control のいずれにも GFP 由来の特徴的な吸収スペクトルが確認されたことから、発色団を形成していることが確認された。また、励起スペクトルおよび蛍光スペクトルからも GFP 由来の特徴が確認された。次に、リガンド添加に伴う吸収・励起・蛍光スペクトルの変化を評価した。リガンド添加に伴い、biosensor-1 においては顕著な吸収スペクトルの変化および励起・蛍光スペクトルの変化が確認された。一方で、biosensor-control

においては、ほとんど変化が確認されなかった。このリセプタータンパク質はリガンド結合前後において構造変化が乏しいことが知られている。このことから、当初の予定通り、擬似リガンドペプチドが構造変化ユニットとして作用することで、初めてリガンドの検出ができるようになった蛍光バイオセンサーであることが明らかとなった。また、親和性の異なる3種類のリガンドを用いて評価をおこなった。その結果、擬似リガンドペプチドよりも高い親和性のリガンドに対しては、見かけの親和性は低下しているものの良好に検出することができた。これは、分子内に配置されている擬似リガンドペプチドがリガンドの結合と競合して阻害しているためだと考えられる。一方で、親和性の最も低いリガンド($K_d = 0.1 \text{ mM}$)に関しては、 1 mM まで添加しても全くの応答を示さなかった。これも前述と同様の理由であると考えられる。

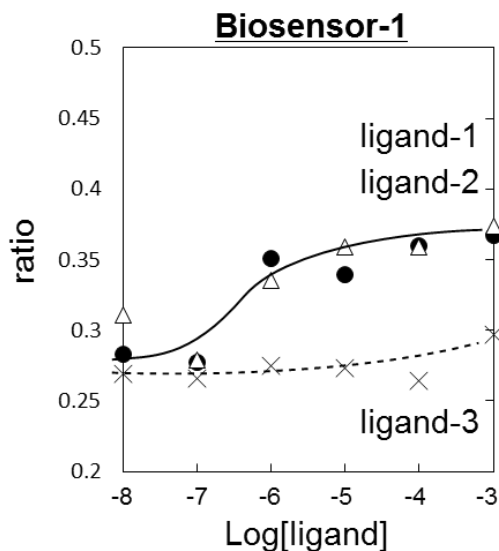


図3 . Biosensor-1 について3種類のリガンド添加に伴うレシオ値の変化を評価した結果を示すグラフ

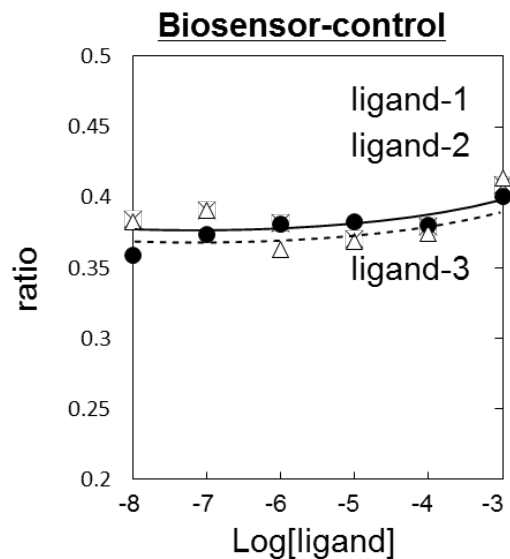


図3 . Biosensor-control について3種類のリガンド添加に伴うレシオ値の変化を評価した結果を示すグラフ

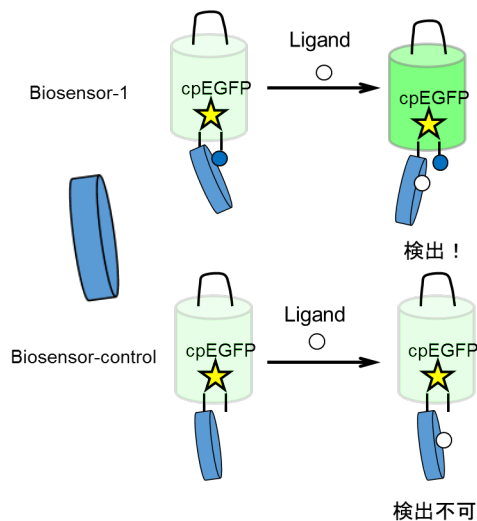


図4 . バイオセンサーの作用機序

上記のように、一連の研究成果を介して、本戦略の有用性を確認することができた。今後は、更に展開していくことを考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

田嶋峻介・中田栄司・才村正幸・森井 孝
「蛍光タンパク質を基本骨格とする一酸化窒素センサー」, 日本化学会第96春季年会,
2016.3.24-27.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
京都大学・エネルギー工学研究所・生物
機能化学研究分野・森井研究室
http://akweb.iae.kyoto-u.ac.jp/material/a-12_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 栄司 (NAKATA Eiji)

京都大学・エネルギー工学研究所・講
師

研究者番号： 70467827