T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	細胞内酸化還元状態変化の可視化
Title(English)	
著者(和文)	杉浦一徳
Author(English)	Kazunori Sugiura
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9921号, 授与年月日:2015年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:久堀　徹,若林　憲一,一瀬　宏,村上　聡,田口　英樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9921号, Conferred date:2015/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（論文博士）

論　文　要　旨　（和文2000字程度）

報告番号	乙 第　　号	氏　名	杉浦　一徳

（ 要　旨 ）

生体は、好気代謝の副産物として、強い酸化力を持ち、生体にとって有害な活性酸素種(ROS)が生じるため日常的に酸化ストレスに曝されている。これまで、ROSについては、その分解システムを中心に研究が行われてきた。その一方で、近年の研究により、過酸化水素など一部のROSの発生が、アポトーシスなど重要な生理現象を制御するシグナルとして働いていることが明らかになった。生体は、ROSの発生や除去を適切に制御することで自らの酸化還元状態を適切に保ち、環境の変化に対応している。そのため、生きた細胞内の酸化還元状態の変化を観察し、その制御機構を理解することは、生命の恒常性維持機構を理解する上で非常に重要である。現在、細胞内での酸化還元状態の可視化には、酸化還元応答緑色蛍光タンパク質(roGFP)が利用されている。しかし、細胞の酸化還元状態は、複数のオルガネラにまたがって制御されており、その全容を解明するためには、複数のセンサータンパク質を異なるオルガネラに発現させ、酸化還元状態変化がオルガネラ間でどのように伝播するかを調べる必要がある。そこで、本論文ではroGFPとは異なる蛍光特性を持ち、多色観察に応用可能な新規の酸化還元応答蛍光タンパク質を作成した。

第1章「序論」では生体内における酸化還元状態の恒常性維持と蛍光、蛍光タンパク質といった本論文の根幹を成す事柄について概説し、現在までに作成されてきた様々な蛍光タンパク質センサーを紹介した。さらに、既存の酸化還元応答蛍光タンパク質やその応用例についてまとめ、その上で本研究において作成すべき蛍光タンパク質に要求される特性を明確にした。

第2章「新規酸化還元応答蛍光タンパク質の設計」では第1章の知見を踏まえ、実際に新規の酸化還元応答タンパク質を作成する方法を模索した。GFPとは異なる発色団を持つ蛍光タンパク質Siriusに円順列変異を加え、システインを導入することで、酸化還元状態の変化に伴い蛍光強度の変化する変異体を取得することに成功した。また、Siriusにシステインを導入し、147番目のシステインのC末端側にアミノ酸を導入することで酸化還元に強く応答する変異体を取得した。さらに、この変異体の146番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することで、より大きく蛍光強度の変化する変異体が作成可能であることを示した。

第3章「酸化還元応答蛍光タンパク質Oba-Q」では第2章で考案した方法を用いて、実際に酸化還元応答蛍光タンパク質を作成した。この章ではSiriusをベースとした酸化還元応答蛍光タンパク質と共に、CFPをベースとした変異体も同様の方法で作成した。作成したタンパク質は、いずれも酸化時に蛍光が消光することから、Oxidation balance sensed quenching protein (Oba-Q)と名づけた。Oba-Qは、酸化還元状態変化に伴い蛍光強度が大きく変化し、顕微鏡下での観察に適した特性を示した。しかしながら、Oba-Qは酸化還元電位が生体内で利用するには高すぎるため、小胞体のような酸化的な環境以外では利用が難しいという欠点があった。この問題を解決するため、Oba-Qs

の挿入アミノ酸をグリシンに置き換えた変異体を作成した。この新規変異体Oba-Qs$_{I146N/S147CG}$では、Oba-Qsと比べて中間酸化還元電位を20 mV 近く低くすることができた。また、Oba-Qsは蛍光強度がpHに依存して変化してしまうが、このpH依存性に146番目のアミノ酸及び挿入アミノ酸の種類が大きな影響を与えていることも明らかにした。これらのことから、146番目のアミノ酸と挿入アミノ酸の種類を最適化することでよりよい酸化還元応答蛍光タンパク質が作成可能であると考えられた。しかし、全ての組み合わせを試すのは困難であるため、さらに効率のよい酸化還元応答蛍光タンパク質作成システムの構築を目指して、第4章の研究を行った。

第4章「蛍光スクリーニングシステムの開発」では、蛍光タンパク質の遺伝子に部位特異的ランダム変異導入を行い、優れた酸化還元応答性を示す変異体を簡便に選抜する実験系を構築した。蛍光タンパク質を発現している大腸菌に励起光を照射し、蛍光輝度を画像として記録する蛍光プレートリーダーを自作した。取得した蛍光画像を短時間で客観的に解析するためのソフトウェアはJAVAを用いて自ら記述した。これらのシステムを利用することで、短時間で多くの蛍光タンパク質変異体を選抜することが可能となった。また、新たにBFP、YFPを用いた変異体も作成し、予想したとおり酸化還元応答を示す変異体を取得することに成功した。

第5章「新規酸化還元応答タンパク質の特性確認」では、第4章で選抜した新規の酸化還元応答蛍光タンパク質を精製し、より詳細に蛍光特性を調べた。その結果、Oba-Qと同様の変異を加えたYFP変異体においては、CFPやSiriusをベースとしたOba-Qとは異なる分子機構によって酸化還元に応じて蛍光が変化している可能性が高いことを明らかにした。また、Oba-Qの欠点である中間酸化還元電位の生体内環境からのずれについては、この章で解析した新規の変異体の中に十分低い中間酸化還元電位を持つものが複数確認されたことで、おおむね解決されたといえる。

第6章「総括・今後の展望」では第1章～第5章の内容をまとめ、本研究の今後の展望について記した

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).
注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（論文博士）

論　文　要　旨（英文）　（300語程度）

（Summary）

報告番号	乙 第　　号	氏　名	杉浦　一徳

（要　旨）

Reactive oxygen species (ROS), which are generated as a by-product of aerobic metabolism or photosynthesis, are toxic and actively diminished by antioxidant enzymes in vivo. However, it is known that faint amounts of H_2O_2 show a certain functions such as cell signaling molecule. Regulation of redox status in the cell is therefore very critical to maintain the cellular homeostasis. In order to understand the regulation system in vivo, monitoring of ROS generation and change in redox states in the cell must provide the valuable information. For the purpose, roGFP, a mutant of GFP containing two Cys at the molecular surface, is used very often. In this protein, introduced two Cys residues are close enough to form a disulfide bond by oxidation. However, redox sensor proteins with different colors must be required to monitor the redox states in various organella simultaneously.

I therefore developed new type redox sensor proteins named Oba-Q (**o**xidation **ba**lance sensed **q**uenching proteins) in this study, of which fluorescence is drastically quenched upon oxidation. Oba-Q proteins had different emission wavelength with roGFP, since their chromophore molecule is very different because they were developed by adding some mutations to Sirius or CFP. Oba-Q proteins were useful tool to observe the change in intracellular redox status. One of the remarkable disadvantage of our Oba-Q proteins was that the midpoint redox potentials of these proteins were too high to apply them to measure the intracellular redox potential. To overcome this problem, I performed several site direct random mutageneses to Oba-Q proteins, and I finally obtained useful mutants by using self-made fluorescence protein screening system. I also obtained some redox sensitive mutants from BFP or YFP using the same method. These new redox sensitive fluorescent proteins had variety of redox potentials, which must be useful to apply them into the different cellular compartments. In addition, some of these new mutants showed inverse emission change in response to redox change with Oba-Q proteins.

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).