

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)	要約
Type(English)	Outline

論文題目

「細胞内酸化還元状態変化の可視化」

杉浦 一徳

(要約)

第一章 序論

(背景)

生体は日常的に酸化ストレスに曝されている。ミトコンドリア呼吸鎖や光合成電子伝達系といった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)が生じるためである。これまで、ROS については、その酵素的、非酵素的な解毒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リアルタイムに観察し、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。

(酸化還元応答蛍光タンパク質(roGFP))

細胞内の酸化還元状態変化を観察するためのセンサータンパク質として 2004 年に Hanson らによって作成された酸化還元応答蛍光タンパク質、roGFP が知られている¹⁾。roGFP では 147 番目のセリンと 204 番目のグルタミンがそれぞれシステインに置き換えられており、ジスルフィド結合の形成に伴い発色団を形成するチロシンの電離平衡が移動し、吸収スペクトルが変化する。吸収スペクトルの変化は励起スペクトルの変化として検出される(Fig.1)。このため、400 nm 励起時、及び、470 nm 励起時の 510 nm 蛍光の強度の比を測定することで、roGFP の酸化還元状態をモニタリングすることができる。

(本研究の目的)

roGFP は、細胞内の酸化還元状態を観察するために有用であるが、細胞の酸化還元状態は、複数のオルガネラにまたがって複雑に制御されており、その全容を解明するためには、複数の酸化還元応答蛍光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、本研究では 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、細胞内の酸化還元状態の変化を詳細に観察する実験系を構築した。

第2章 新規酸化還元応答蛍光タンパク質の設計

(緒言)

本章では、第一章の目的に示したroGFPとは異なる蛍光特性を持つ酸化還元応答蛍光タンパク質を作成するため、群青色の蛍光を発する蛍光タンパク質Siriusに対して変異を加え酸化還元応答する変異体の作成を試みた。蛍光タンパク質センサーの鋳型としては、GFPが広く利用されている。GFPは発色団にチロシン残基を持ち、吸収スペクトルがチロシン残基の電離・非電離状態に応じて大きく変化する。GFPの400 nmの吸収は非電離状態の発色団に由来し、480 nm付近の吸収は電離状態の発色団に由来する。発色団中のチロシンの電離状態は、 β -バレル構造上の他の残基の影響を大きく受けるため、GFPやYFPでは β -バレル構造を何らかの方法で歪める事ができれば、比較的簡単に吸収スペクトルを変化させることができる。前述のroGFPは酸化還元状態に伴うジスルフィド結合の形成解離による構造のゆがみを蛍光変化に反映させている。しかしながら、YFP、GFP以外の蛍光タンパク質は、発色団にチロシン残基を持たないため発色団の電離平衡状態を変化させるという方法は使えない。そこで、酸化還元状態変化に伴って吸収スペクトルではなく蛍光量子収率が変化する蛍光タンパク質の作成を目指し“円順列変異の導入”及び“C147のC末端側へのアミノ酸の挿入”の2つの方法を試した。

(Sirius円順列変異体の作成)

円順列変異とは、タンパク質アミノ酸一次配列を任意の位置で二つに分け、N末端側とC末端側をリンカー配列を用いて結合させることでN末端側のドメインとC末端ドメインを入れ替える手法である。Siriusに対して円順列変異を用い、蛍光量子収率に大きく影響すると考えられている第7 β -ストランド領域周辺にN末端・C末端を作り、構造を不安定化した。第7 β -ストランド領域と隣の β -ストランドとの間にジスルフィド結合を形成可能なシステインを導入することで、ジスルフィド結合形成時に構造が安定化することで蛍光量子収率の変化する変異体を作成可能であると考えた。

この方法を用いて、酸化還元状態変化に応じて蛍光強度が変化する変異体SiriusC18を作成することに成功した。Sirius C18は酸化還元に伴い吸収スペクトルは変化しないが酸化されると還元状態と比べ約25%強い蛍光を発する(Fig. 2)。この結果は、SiriusC18が、設計どおりジスルフィドの形成によって構造が安定化され、量子収率が向上する蛍光タンパク質であることを強く示唆している。しかしながら、酸化還元に応じて蛍光強度が25%変化するだけでは、バックグラウンド蛍光が高すぎて生体内の酸化還元を詳細に観察することはできない。そこで次に「C147のC末端側へのアミノ酸の挿入」を試みた。

(C147のC末端側へのアミノ酸の挿入)

Jeremy R. Lohmanらは、roGFP1をもとに147番目のシステインのC末端側に様々なアミノ

酸を挿入し、148番目のヒスチジンをセリンに置換することで、roGFPよりも高い酸化還元電位を持つ変異体を作成した²⁾。これらのタンパク質は、roGFP1-iXと名付けられた(Xには挿入したアミノ酸の1文字表記が入る)。roGFP1-iXの中で最も高い酸化還元電位を持つroGFP1-iL変異体の中間酸化還元電位はroGFP1の-287 mVと比べ58 mV高い-229 mVである²⁾。Avezovらは、2013年の論文でroGFP1-iEが酸化還元に応じて量子収率が変化することを利用して、酵母の小胞体内の酸化還元状態変化を観察している³⁾。roGFP1では、酸化還元状態変化に応じて470 nm励起時(発色団電離状態時)の蛍光寿命がほとんど変わらないのに対して、roGFP1-iEでは蛍光寿命が比較的大きく変化している。これらの研究を参考にして、Siriusに対してジスルフィド結合を形成可能な147番目及び204番目の位置にシステインを導入しさらに147のC末端側にアミノ酸を挿入することで酸化時に大きく蛍光強度が減少するSirius変異体を作成することに成功した。さらに、CFPにおいて蛍光量子収率に大きく影響している146番目のイソロイシンを他のアミノ酸に置換することで、より大きく蛍光強度が変化する蛍光タンパク質を作成できることがわかった。この方法で作成した変異体のうち最も大きく蛍光強度が変化するSirius2C_{146N/S147CD}では、酸化によって還元時の20%程度まで蛍光強度が減少した(Fig. 3)。

第3章 酸化還元応答蛍光タンパク質Oba-Q

(緒言)

第2章で作成したSirius2C_{146N/S147CD}は、酸化されると蛍光が著しく減少する。その特性から、このタンパク質をOba-Q (oxidation balance sensed quenching proteins)と名づけた。また、Sirius2C_{146X/S147CX}と同様の変異をCFPに対して加え、やはり酸化状態において蛍光強度の低下する酸化還元応答タンパク質を作成した。そこで、SiriusをベースとしたものをOba-Qs、CFPをベースとしたものをOba-Qcと呼ぶことにした。本章では、Oba-Qs、Oba-Qcについて蛍光スペクトル変化や蛍光寿命、酸化還元電位、pH依存性、生体内での酸化還元応答性など、酸化還元応答蛍光タンパク質としての特性を調べた。さらに、GutscherらのGrx1-roGFP2の研究を参考にして、Oba-QcとGrx1をリンカー配列を用いて連結したGrx1-Oba-Qcも合わせて作成し、その特性を調べた。

(酸化還元による Oba-Q の蛍光特性変化)

Oba-Qs、Oba-Qcの酸化・還元時の蛍光・励起スペクトル、吸収スペクトル、及び、蛍光寿命を測定した。Oba-Qs、Oba-Qcともに酸化還元状態変化に伴って蛍光・励起スペクトルの形状は変化せず、蛍光強度のみが変化した。また、この時に吸収スペクトルは、形状・強度ともに変化しなかった。酸化時と還元時の蛍光寿命の比はOba-Qsで0.22、Oba-Qcでは0.42であり、これは蛍光強度の減少率とよく一致した(Fig. 4)。これらの結果はOba-Qが酸化還元状態の変化に伴って蛍光量子収率の変化する蛍光タンパク質であることを示し

ている。

(酸化還元電位・pH依存性)

Oba-Qのシステイン周辺の立体構造は酸化還元電位が高いことが知られているroGFP1-iXと類似であるために、酸化還元電位が必然的に高くなってしまふと考えられる。実際、Oba-Qsの中間酸化還元電位を測定したところ -232 mVという極めて高い値であった(Fig. 5A)。この値は小胞体など酸化環境でのモニターに適しており、細胞質やミトコンドリアといった還元的な環境には適さない。Oba-Qcの中間酸化還元電位は -249 mVであり、Oba-Qsに比べれば低いものの、roGFP1、roGFP2の -287 mV、 -272 mVに比べるとやはりかなり高い(Fig. 5B)。そのため、Oba-Qを細胞質などに発現させた場合、ほぼ全ての分子が常に還元状態になってしまい、酸化還元電位の変化を測定するセンサーとしての役割を果たすことができない。この点は更なる改良が必要である。また、Siriusをベースとして酸化還元応答性を付与したOba-Qsは、ベースとなるSiriusがpH非感受性であるにもかかわらず、pHに依存して蛍光強度が変化した(Fig. 6)。

(Grx1-Oba-Qc)

グルタチオンは、生体内において酸化還元の緩衝剤として働いている低分子で、生体内の酸化型・還元型グルタチオンの比は生体内における酸化還元状態を表す重要な指標の一つである。しかし、roGFPは直接グルタチオンと反応することができず、生体内ではGrxを通してグルタチオンの酸化還元電位をモニタリングしていると考えられている。そこで、Gutscherらはヒト由来のグルタレドキシニン1(Grx1)をリンカーでroGFP2に繋ぎ、GrxとroGFP2の衝突頻度を高くすることで、グルタチオンの酸化還元状態の変化を単体で観察することが可能な蛍光タンパク質センサーを開発した⁴⁾。

この研究を参考に、Oba-Qcをヒト由来のGrx1とリンカーを用いて接続することで、グルタチオンと高い反応性を示すGrx1-Oba-Qcを作成することができた。Grx1-Oba-Qcは酸化型グルタチオンによって速やかに酸化される。また、グルタチオンの酸化還元のバランスに応じて蛍光強度が変化することが確認できた(Fig. 7)。

(HeLa細胞内観察)

共焦点蛍光顕微鏡を用いて、HeLa細胞内に発現させたOba-Qの蛍光輝度変化を観察した。Oba-Qs、Oba-Qc、Grx1-Oba-Qcのいずれも細胞を培養している液体培地に1 mM Diamideを加えることで速やかに消光し、3 mM DTTを加えることで蛍光の回復が観察された(Fig. 8)。これらの蛍光タンパク質を導入した細胞は、酸化剤や還元剤を加えていない状態でも、DTTを加えた後と同等の蛍光輝度を示していたことから、Oba-Qs、Oba-Qc、Grx1-Oba-Qcは細胞内でほぼ100%還元状態であったことがわかる。この結果は、これらの蛍光タンパク質の中間酸化還元電位の値からも予想されたことである。

(結言)

本研究で作成したOba-Qタンパク質は、酸化還元状態変化に伴い、蛍光強度が大きく変化し、その変化量は蛍光顕微鏡観察に用いるのに十分である。しかし、中間酸化還元電位が生体内での観察に用いるには高すぎることや、pH感受性があることなど、まだ改善すべき部分は多い。中間酸化還元電位やpH依存性はC147のC末端側に挿入したアミノ酸や、146番目のアミノ酸、その周辺のアミノ酸の種類に影響を受けると考えられるが、これらのアミノ酸を置き換えた変異体を網羅的に作成することは非常に困難である。そこで、次の第4章では、ランダム変異を加えた蛍光タンパク質を網羅的に選抜するためのスクリーニングの系を作成することとした。

第4章 蛍光スクリーニングシステムの開発

(緒言)

第3章の研究で、Oba-Qの酸化還元電位やpH依存性、蛍光強度の変化率などの特性を決定しているのが、147番目のシステインの周辺のアミノ酸の種類であることが分かった。この部分のアミノ酸の種類を組み合わせを変えた変異体を網羅的に作成し解析することで、生体内に適した中間酸化還元電位を持つ変異体を作成することができると考えられるが、組み合わせパターンは膨大であり、その作成には大きな困難が伴う。そこで、ランダム変異導入法を用いて様々な組み合わせの変異を持ったOba-Qタンパク質のライブラリを作り、その中からより望ましい特性を持つものを選抜することにした。

(プレートリーダー・画像解析ソフトの作成)

本研究ではランダム変異を加えたOba-Qを発現させた大腸菌をプレート培地上で培養し、コロニーに励起光を照射する。この時コロニーが発する蛍光の酸化還元状態変化に伴う強度変化を記録する。そのために必要な蛍光プレートリーダーを自作した(Fig. 9)。CMOSセンサーと投光管をつなぐ金具は、東工大技術部精密工作機械センターにおいて作成した。暗箱の加工も同様に精密工作機械センターで行った。プレートリーダーにより得られた画像を解析するプログラムはJAVAを用いて記述した。

(Oba-Q 変異体の選抜)

作成したプレートリーダー及び解析ソフトを使用して、Oba-Q に対してランダムに変異を加えた変異体のライブラリから大きく蛍光強度が変化する変異体を選抜した(Fig. 10)。

(結言)

本章に記述した蛍光スクリーニングシステムを用いて、酸化還元応答を示す新規の蛍光

タンパク質を複数選抜することができた。この選抜系は、酸化還元応答蛍光タンパク質だけでなく、他の生体内低分子のセンサーの開発にも利用可能であると考えられる。

第5章 新規酸化還元応答タンパク質の特性確認

(緒言)

第3章の研究で作成したOba-Qは、生体内で予想される酸化還元電位(-300 mV)と比べてタンパク質が示す蛍光の酸化還元応答の中間酸化還元電位(-232 mV~-249 mV)が高すぎるという欠点があった。第4章では、Oba-Qの蛍光特性に大きく影響するアミノ酸の種類を効率よく最適化するためのスクリーニングシステムを作成し、酸化還元状態変化に伴う蛍光強度の変化量の大きい変異体を選抜した。本章では、これらの蛍光タンパク質の組み換え体タンパク質を精製し、それらの酸化還元応答性、及び、酸化還元電位を測定することで、生体内での使用に適した中間酸化還元電位を持つ酸化還元応答蛍光タンパク質を決定した。

(酸化還元による蛍光特性変化)

第4章で選抜した酸化還元応答タンパク質の蛍光スペクトル、及び、吸収スペクトルの変化を測定した。CFP変異体は酸化還元状態の変化に伴って吸収が変化せず、蛍光強度が変化した。YFP変異体でも蛍光強度とともに吸収スペクトルも大きく変化するものが得られた。BFP変異体では、蛍光強度とともに吸収スペクトルも変化した。吸収の変化量は蛍光強度の変化量と比べて明らかに小さかった。

(酸化還元電位の測定)

第4章で選抜した酸化還元応答タンパク質の酸化還元電位を測定した結果、これらのタンパク質が非常に幅広い酸化還元電位を持つことが分かった(Table. 1)。最も高い酸化還元電位を持つ変異体は、第3章で作成したOba-Qsであり、その中間酸化還元電位は-232 mVである。一方、最も低い酸化還元電位を持つBFP変異体の中間酸化還元電位は-289 mVであり、両者には57 mVの差があった。このことから、Oba-Qとその変異体を適切に用いることで、実際に生体内で取りうる酸化還元電位(-360 mV ~ -230 mV)の範囲に対応できると考えられる。

(結言)

本章の研究で、第4章で選抜した蛍光タンパク質のいくつかは、生体内での観察に適した酸化還元電位を持つことが確認された。この結果から、Oba-Qの最大の欠点であった中間酸化還元電位と生体内酸化還元電位の不一致という問題は解決することができたと言える。

第6章 総括・今後の展望

本論文では、既存の酸化還元応答蛍光タンパク質roGFPとは異なる蛍光特性を持つ新規の酸化還元応答蛍光タンパク質Oba-Qを作成した。そして、Oba-Qを細胞内に発現させることで、細胞内の酸化還元電位の変化をリアルタイムに観察することが出来ることを示した。近年、蛍光タンパク質の創出・改良には、ランダム変異を用いて多くの変異体を作成し、その中から望ましい特性を持つものを選抜するという進化分子工学的な手法が主流になりつつある。本論文では、まず、既存の蛍光タンパク質センサーの作用原理について学び、蛍光タンパク質の特性を理解することで、新規の酸化還元応答蛍光タンパク質を理論的に設計することに成功した。そして、ひとたび変異を導入すべき部位を特定することが出来れば、第4章で示したように部位特異的変異によってより効率よく選抜を進めることができる。本論文で作成した蛍光プレートリーダーは、大阪大学・永井健治教授の研究室が作成したプレートリーダーを参考にして基本設計を行った。本論文で作成した蛍光プレートリーダーは、励起波長と検出側の蛍光波長を市販の蛍光顕微鏡用のフィルターセットを利用して自由に設定できるため、今後、酸化還元応答蛍光タンパク質の開発だけでなく、様々な波長特性を持った他の生体内低分子センサータンパク質の作成にも利用可能である。

今後は、本論文で作成した新規の酸化還元応答タンパク質を用いて、実際に生体内の様々な細胞内小器官の酸化還元状態の変化をモニターしたい。特に、光合成生物の細胞内において、光合成機能が働いているか否かで個々の細胞内小器官の酸化還元状態がどのようにするのかを是非知りたい。本論文で作製した新規の酸化還元応答蛍光タンパク質を利用すれば、高等植物の葉緑体で光合成によって発生する還元力や、活性酸素の発生が細胞内の他の細胞内小器官にどのように伝播していくのかを、多色観察によって記述することができるものと期待している。

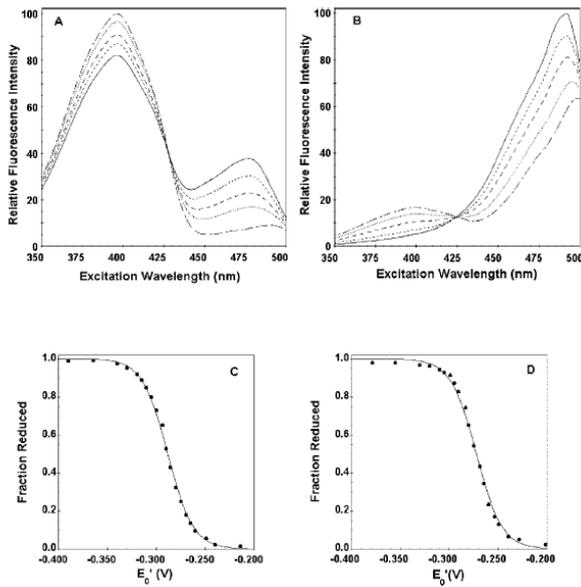


Fig. 1-1 roGFP の酸化還元特性¹⁾

(A) roGFP1 の酸化還元電位別励起スペクトル
-0.320 (solid line), -0.294 (short dashed line),
-0.286 (long dashed line), -0.275 (dotted line),
and -0.249 V (dotted and dashed line)

(B) roGFP2 の酸化還元電位別励起スペクトル
-0.310 (solid line), -0.285 (short dashed
line), -0.275 (long dashed line), -0.265 (dotted
line), and -0.240 V (dotted and dashed line)

(C) roGFP1 の酸化還元電位

(D) roGFP2 の酸化還元電位

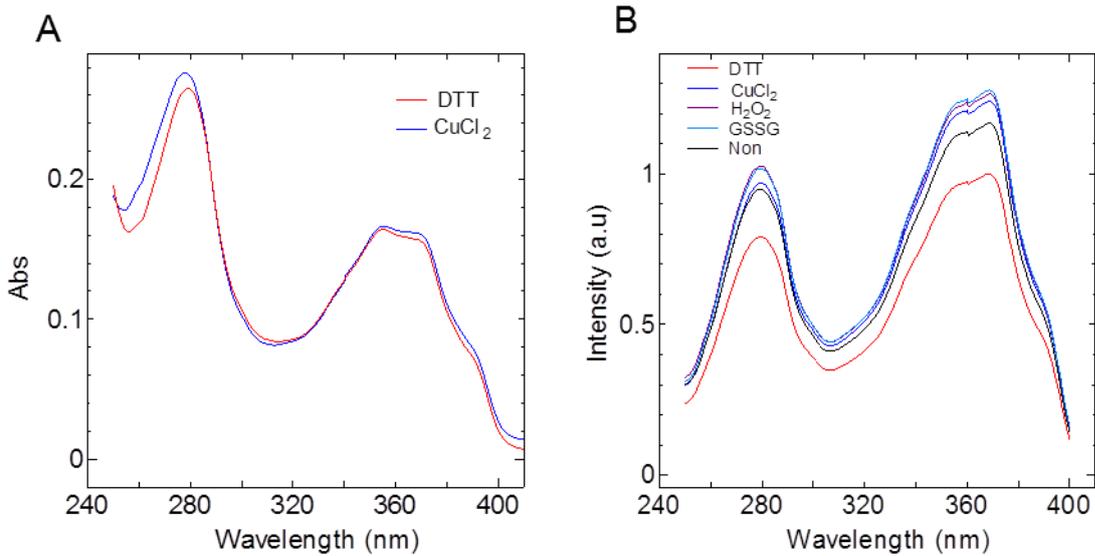


Fig. 2 SiriusC18 酸化還元依存的なスペクトル変化

(A) 吸収スペクトル。赤: 1 mM DTT 青: 50 μ M CuCl₂

(B) 425 nm 蛍光励起スペクトル。赤: 500 μ M DTT 青: 50 μ M CuCl₂ 紫: 1 mM H₂O₂

水色: 500 μ M GSSG 黒: 未処理

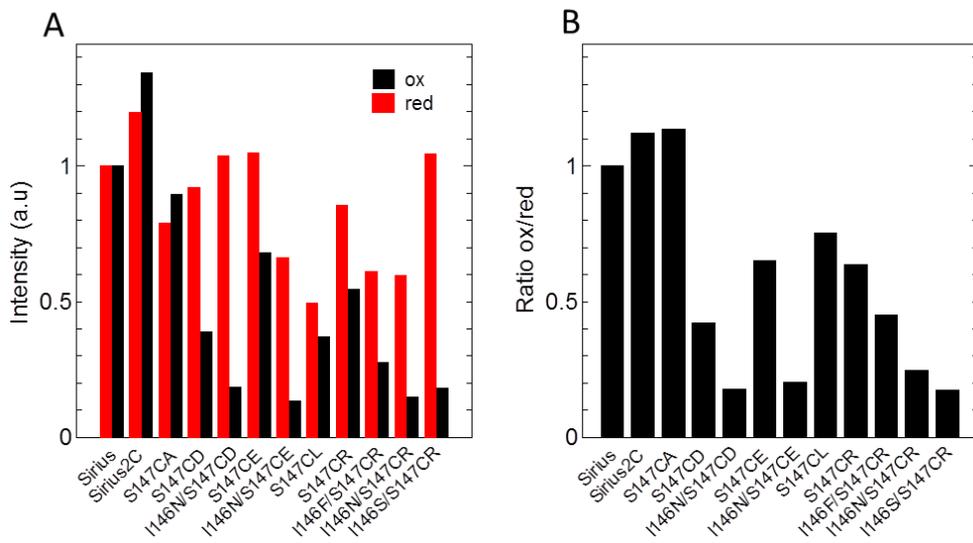


Fig. 3 Sirius_{146X/S147CX} 酸化還元依存的蛍光強度変化

(A) 蛍光強度 赤 : 5 mM DTT 黒 50 μ M CuCl₂

(B) 酸化・還元時の蛍光強度比

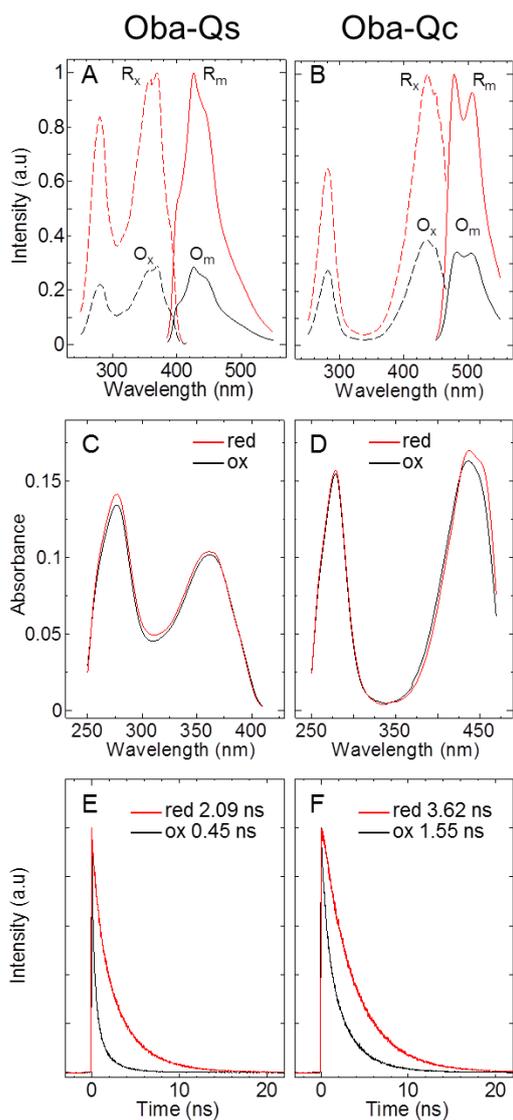


Fig. 4 Oba-Q 酸化還元蛍光変化

赤:5 mM DTT 黒:50 μ M CuCl₂

(A)(B) 酸化還元時の蛍光・励起スペクトル

Rx:還元状態励起スペクトル

Rm:還元状態蛍光スペクトル

Ox:酸化状態励起スペクトル

Om:酸化状態蛍光スペクトル

(C)(D) 酸化還元時の吸収スペクトル

(E)(F) 酸化還元時の蛍光減衰曲線(蛍光寿命測定)

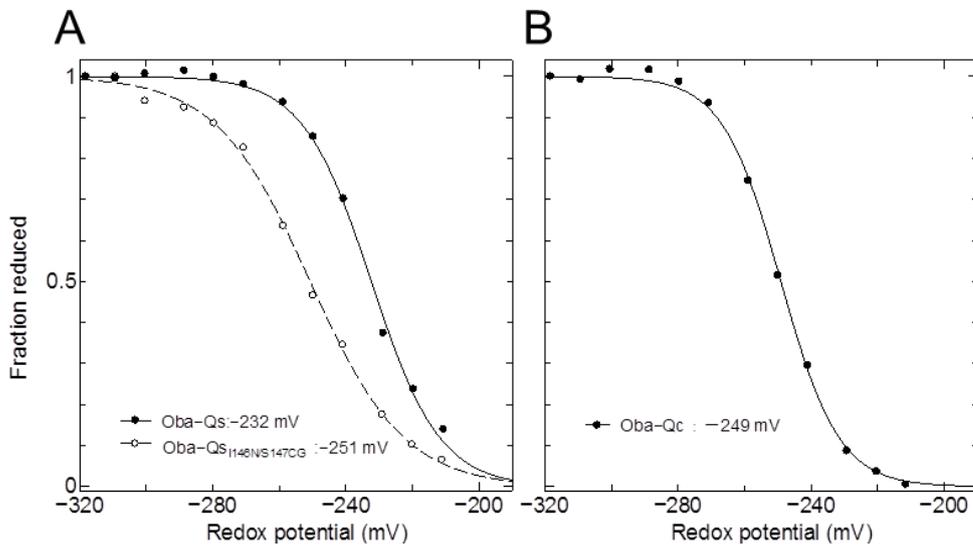


Fig. 5 酸化還元電位測定

(A)Oba-Qs、Oba-Qs_{S147CG} (B)Oba-Qc

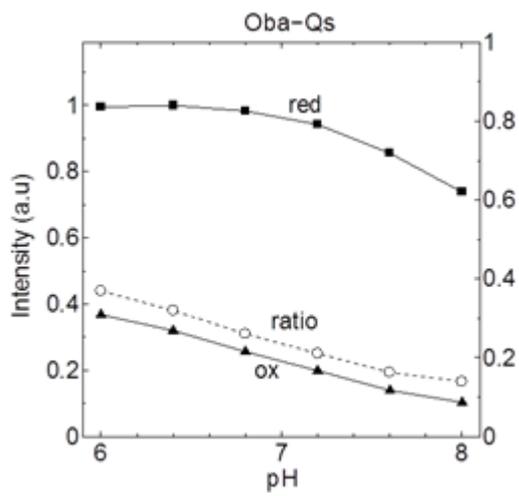
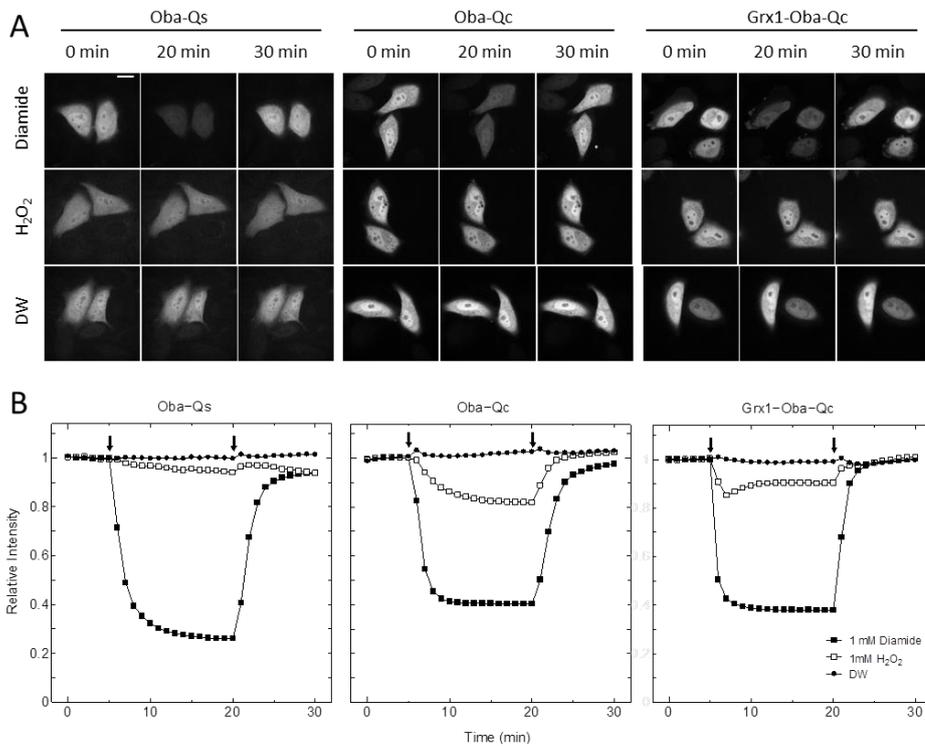
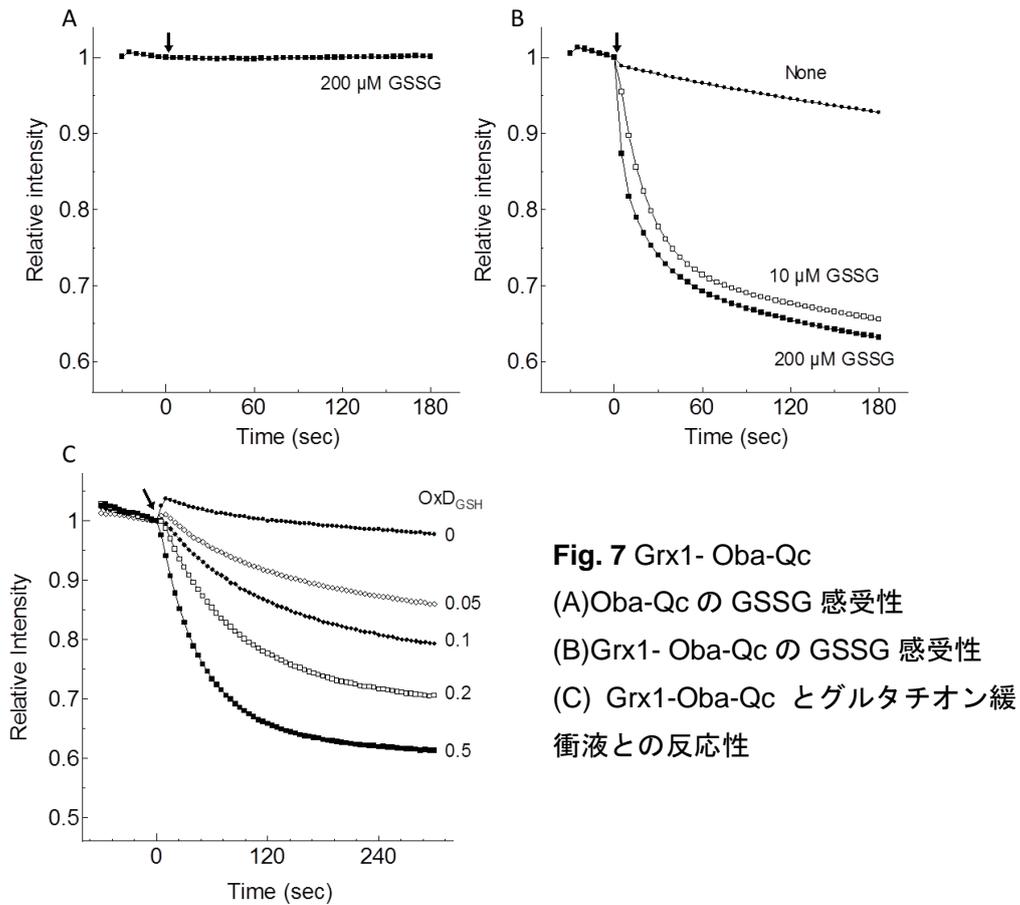


Fig. 6 Oba-Qs pH 依存性確認



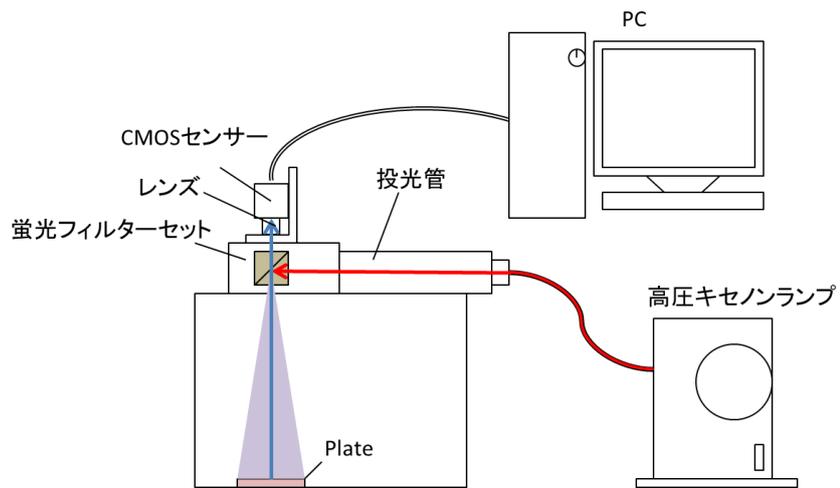


Fig. 9 蛍光プレートリーダー模式図

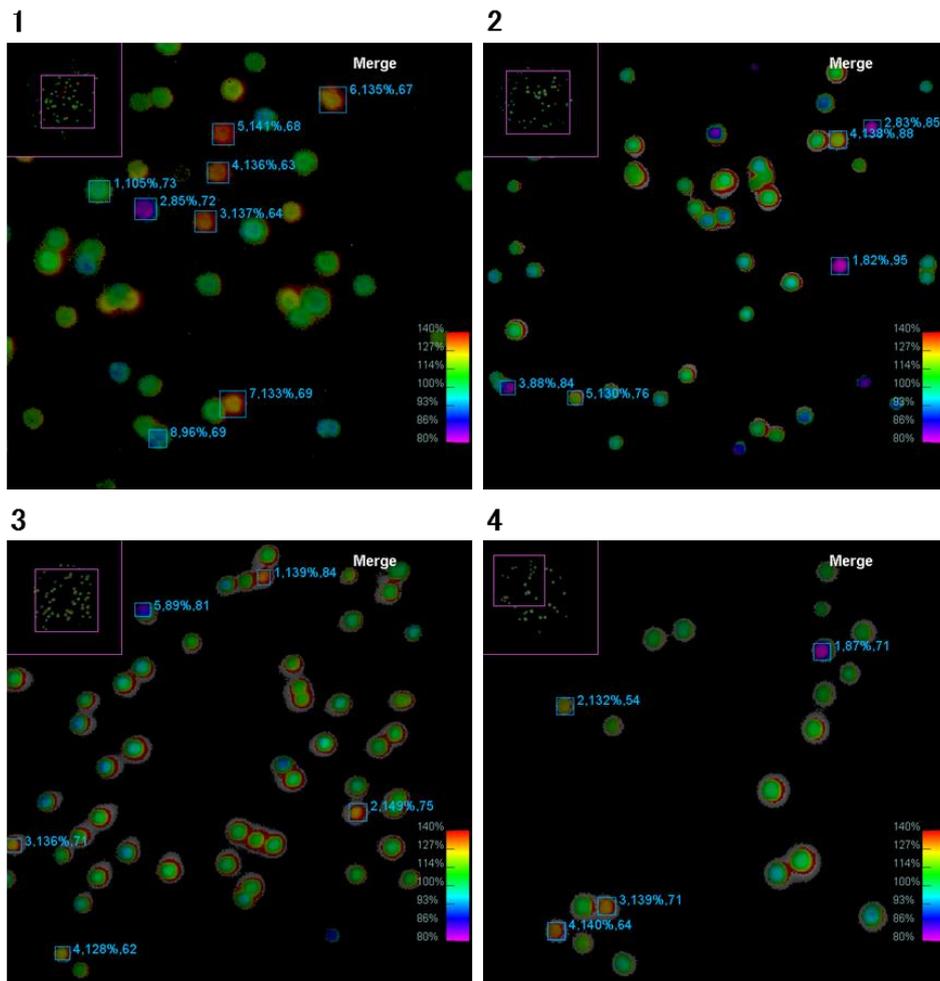


Fig. 10 Oba-Qc 変異体選抜画像解析結果

黄～赤で表示されたコロニーは還元時に、青～紫で表示されたコロニーは酸化時にそれぞれ蛍光輝度が上昇したことを示す。

Table. 1 Oba-Q 新規変異体 中間酸化還元電位

Name	Potential (mV)
Oba-Qs	-232
YFP2C-type3	-245
Oba-Qc	-249
YFP2C-type4	-251
CFP2C-type2	-259
BFP2C-type1	-263
YFP2C-type1	-263
YFP2C-type2	-263
CFP2C-type1	-267
CFP2C-type3	-286
BFP2C-type2	-289

- 1 Hanson, G.T. et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279, 13044-13053 (2004).
- 2 Jeremy R. Lohman and S. James Remington. Development of a Family of Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators for Use in Relatively Oxidizing Subcellular Environments. *Biochemistry* 2008, 47, 8678–8688
- 3 Avezov E, Cross BC, Kaminski Schierle GS, Winters M, Harding HP, Melo EP, Kaminski CF, Ron D. Lifetime imaging of a fluorescent protein sensor reveals surprising stability of ER thiol redox. *J Cell Biol.* 2013 Apr 15;201(2):337-49.
- 4 Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods.* 2008 Jun;5(6):553-9.