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)	
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7β-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7β-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、 Sirus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Sirius2Cl146N/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Sirius2CI146N/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、 Sirius2CI146X/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うと考えられ 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的な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の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 けではなく、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が、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が、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。



(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)

(D)roGFP2 の酸化還元電位

Fig. 2 SiriusC18 酸化還元依存的スペクトル変化

360

400

240

280

320

Wavelength (nm)

(A)吸収スペクトル。赤:1 mM DTT 青:50 µM CuCl₂

(B)425 nm 蛍光励起スペクトル。赤:500 µM DTT 青:50 µM CuCl。 紫:1 mM H₂O₂ 水色: 500 µM GSSG 黒:未処理

0

240

280

320

Wavelength (nm)

360

400



Fig. 3 Sirius_{I146X/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 μM 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 mMDTT 黒:50µM 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:還元状態励起スペクトル

 Ox:酸化状態励起スペクトル

 Om:酸化状態励起スペクトル

 (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. 8 HeLa 細胞内観察

観察開始 10 分後に 1 mM Diamide または 1 mM H_2O_2 を加え、その 15 分後に 3 mM DTT を加えた。



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。

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

Table. 1 Oba-Q 新規変異体 中間酸化還元電位

- 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.
- 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.