

A facile screening strategy to construct auto-fluorescent protein-based biosensors

(蛍光タンパク質を利用したバイオセンサーの効率的な構築法に関する研究)

田嶋 竣介

研究背景

生体内で行われる代謝反応は、エネルギーを利用した、クリーンで高効率な物質生産システムであるため、代謝反応を活用した物質生産は、持続可能な社会の実現のために重要である。代謝反応は、酵素が関与する並列した多段階の反応で成り立っており、その反応は、シグナル伝達によって時空間的に厳密に制御されている。したがって、シグナル伝達機構を解明することが、代謝反応を理解し、活用するためには重要である。細胞内シグナル伝達は、酵素やチャネルなどが、イオンや生体小分子との反応や結合により活性化され、機能することで下流へと進行していく。したがって、シグナル伝達機構を解明していくためには、チャネルや酵素などのタンパク質の活性化機構と、イオンや生体小分子などのセカンドメッセンジャーの挙動を、解明することが重要である。

タンパク質の活性化に伴う構造変化の解明のために、NMR法、Cryo-EM法やX線結晶構造解析などにより、様々なタンパク質の構造情報が取得されている。しかし、これらの手法は、サンプル調製や測定が困難であり、未だに数多くのタンパク質の構造変化が不明なままである。そのため、従来法とは異なる、簡便な構造変化の確認手法が望まれる。

また、セカンドメッセンジャーの挙動解明には、標的を生きた細胞内で可視化し、リアルタイムに追跡することが必須である。蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーは、高い時空間分解能、生体適合性や長時間測定が可能であるなどの利点から、生細胞内の非侵襲的な、多くのセカンドメッセンジャーの可視化に用いられてきた。蛍光タンパク質型バイオセンサーは、蛍光タンパク質に機能性タンパク質を組み合わせて構築される。そして、機能性タンパク質が標的と結合や反応をすることで構造を変化させて、その変化を蛍光団に伝達することで、蛍光強度の変化として検出する。したがって、蛍光タンパク質型バイオセンサーを構築するには、標的との相互作用に伴う機能性タンパク質の構造変化の情報が必要であるとともに、蛍光応答変化を誘起できる大きな構造変化を伴う機能性タンパク質の選出が重要である。しかし、上述のように、目的の標的と相互作用する機能性タンパク質の構造変化の情報が、必ずしも得られているとは限らない。また、全てのタンパク質が大きな構造変化を示すとは限らず、これらの情報の乏しさが蛍光タンパク質型バイオセンサーの開発を困難にしている一因である。標的認識タンパク質の構造変化が不明もしくは微小な場合でも、機能性タンパク質を蛍光タンパク質の

蛍光団の近傍に導入することで、構造変化を効率的に蛍光変化へと変換する試みも行われている。しかし、依然として、その最適化には多くの誘導体の作製や多段階にわたるスクリーニングが必要不可欠である。したがって、蛍光タンパク質型センサーをより広汎に利用していくためには、構造情報が不足している機能性タンパク質を標的認識部位に用いた場合も、効率的にバイオセンサーを作製できる一般的な設計指針が必要である。

本研究の目的と結果

本研究では、シグナル伝達機構の解明を促進するための手法として、蛍光タンパク質を用いて、タンパク質の機能発現に伴う構造変化を可視化する手法と、バイオセンサーを作製する迅速で簡便なスクリーニング法の開発を目的とした。

第二章では、チャネルタンパク質 TRPC5 が一酸化窒素 (NO) に応答した際に誘起される構造変化を、蛍光タンパク質により可視化した。TRPC5 は、セカンドメッセンジャーである NO と反応し、チャネルが開口することで、Ca²⁺の流入を細胞外から細胞内へと促し、シグナルを伝達する。その活性化機構として、Cys553 が NO によりニトロソ化された後、近傍の Cys558 と分子内ジスルフィド結合を形成することにより誘起される構造変化が、予想されている。TRPC5 の Cryo-EM 画像も得られているものの、具体的な構造変化の情報は不明なままである。そこで、本研究では Cys553 と Cys558 を含み、チャネル pore を形成する TRPC5 部分構造を、蛍光タンパク質 EGFP の蛍光団近傍に導入した EGFP-TRPC5 を作製した。蛍光団近傍に導入することで、たとえ TRPC5 の不明な構造変化が微小であった場合でも、効率的に蛍光検出可能と考えた。実際に、チオール基濃度定量と蛍光強度の測定から、NO に応答したジスルフィド結合形成による蛍光強度比の増加が観測された。即ち、Cys553 と Cys558 によるジスルフィド結合の形成により、TRPC5 部分構造の構造が変化し、その構造変化が蛍光タンパク質の蛍光団まで伝播するということである。このことから、TRPC5 のジスルフィド結合形成により、チャネル pore まで構造変化を誘起されることが確認され、予想される TRPC5 の開口機構を支持する結果となった。

第三章では、蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーの蛍光強度変化を増大させるための、簡便な二段階スクリーニング法を開発した。第二章で作製した EGFP-TRPC5 の NO に応答した蛍光強度変化は、微小ではあったが、EGFP-TRPC5 をもとにして NO バイオセンサーが構築できる可能性を示唆した。そこで、EGFP-TRPC5 を NO バイオセンサーとして構築するために、蛍光強度変化の増幅を試みた。TRPC5 部分構造を短くし、Cys553 と Cys558 のジスルフィド結合形成部位を EGFP に近づけることで、ジスルフィド結合形成に伴う構造変化が、より効率的に EGFP に伝わり、蛍光変化が増大すると考

えた。しかし、TRPC5 部分構造を N 末端と C 末端の両端あるいは片端から、一アミノ酸ずつ短くしていくだけでも、計 47 個もの候補が考えられる。従来のスクリーニング法では、数多くの変異体を実際に作製し、何段階もの機能検証を経て最適化する。本手法では、一段階目に *in silico* での分子モデリングを用いたスクリーニングを行うことで、実際に作製する変異体の数を絞り、迅速で簡便にスクリーニングを行った。47 個の変異体のジスルフィド結合形成前後の構造を、分子モデリングにより予測した。さらに、ジスルフィド結合形成前後の TRPC5 部分構造の差を、RMSD で数値的に推測することで、効率的に、蛍光強度変化の増大が期待される 10 個の変異体を選出した。二段階目として、ジスルフィド結合を形成した変異体を実際に作製し、ジスルフィド結合開裂による蛍光強度変化を評価した結果、3 個の変異体が EGFP-TRPC5 より 2~4 倍の大きな蛍光強度変化比を示すものとして獲得した。

第四章では、第三章で得た 3 個の変異体が、実際に NO バイオセンサーとして機能するかを、試験管内で評価した。過去に開発された蛍光タンパク質型 NO バイオセンサーは、検出の原理上、細胞外から過剰の Fe^{2+} の添加が必要であり、細胞への毒性が懸念される。それに対し、第三章で得た 3 個の変異体が、ジスルフィド結合形成により NO を検出すれば、添加物を必要としない NO バイオセンサーとして機能する。3 個の変異体に対して、チオール基濃度定量と蛍光強度測定を行ったところ、ジスルフィド結合形成により蛍光強度比が増加し、NO を検出することが確認された。また、これらの変異体は EGFP-TRPC5 と同様に、 H_2O_2 に対しても応答することが確認された。以上から、3 個の変異体は、 H_2O_2 センサーと併用することで、添加物を必要としない NO バイオセンサーとして機能することが期待された。

第五章では、第三章、第四章で作製し評価した変異体が生細胞内でバイオセンサーとして機能するかを検証した。HEK293 細胞内において変異体が十分な蛍光強度を示すことが確認された。続いて、変異体を発現させた HEK293 細胞に、外部から H_2O_2 を添加すると、試験管内での結果と同じ程度に蛍光強度比が増大することが確認された。これらの結果から、変異体がレドックスセンサーとして細胞内で利用できることがわかった。

総括

本研究では、蛍光タンパク質型バイオセンサーの検出原理をもとにして、チャンネルタンパク質 TRPC5 の予想される構造変化を、蛍光タンパク質を利用して簡便に検出する手法を開発した。これにより、蛍光タンパク質が、タンパク質の機能発現に伴う構造変化情報を可視化するために利用できるという新しい視点を示した。また、蛍光タンパ

ク質型バイオセンサーを構築する際に、蛍光応答性が増大したセンサーを得る新たなスクリーニング法を開発した。スクリーニングの第一段階で、*in silico* シミュレーションを用いた RMSD を利用することで、試験管内で変異体を作製して評価する従来のスクリーニング法に比べて、効率的にセンサーの候補となる変異体を選出することができた。また、選出した変異体は実際に NO バイオセンサーとして機能し、最大で 4 倍の蛍光応答の増幅を示した。選択性の改良は図れなかったものの、この二段階スクリーニング法は、蛍光タンパク質型バイオセンサーの、迅速で簡便な蛍光応答性の増大を可能とすると期待される。さらに、作製したバイオセンサーは、実際に細胞内でも機能することを示し、このバイオセンサーが細胞内のシグナル伝達解明に貢献すると期待される。本研究で開発した二段階スクリーニング法は、一般的な蛍光タンパク質型バイオセンサーの構築にも不可欠な、標的認識部位の導入位置の最適化に適用できるため、効率的な蛍光タンパク質型バイオセンサー構築を促進するものである。特に標的認識部位の構造変化情報が乏しい場合に有効であるため、今後細胞内でのバイオエネルギー利用過程に関与する数多くのタンパク質の機能検証を加速すると期待出来る。

論文一覽

1. **Detection of Inositol Phosphates by Split PH Domains**

Reiko Sakaguchi, Shunsuke Tajima, Yasuo Mori, Takashi Morii

Methods Mol. Biol. **2020**, 2091, 47-57. doi: 10.1007/978-1-0716-0167-9_4.

(第 1 章)

2. **Fluorescence detection of the nitric oxide-induced structural change at the putative nitric oxide sensing segment of TRPC5**

Shunsuke Tajima, Eiji Nakata, Reiko Sakaguchi, Masayuki Saimura, Yasuo Mori, Takashi Morii

Bioorg. Med. Chem. **2020**, 28, 115430. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115430.

(第 2 章)

3. **A two-step screening to optimize the signal response of autofluorescence protein-based biosensor**

投稿準備中

(第 3 章・第 4 章・第 5 章)