

様式 I

博士學位論文調査報告書

論文題目

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)

申請者 田嶋 竣介

最終学歴 令和 2年 3月

京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士後期課程
研究指導認定退学

学識確認 平成 年 月 日 (論文博士のみ)

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
(主査) 教授 森井 孝

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 片平 正人

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 佐川 尚

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	田嶋 峻介
論文題目	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)		
(論文内容の要旨)			
<p>生体内のクリーンで高効率なエネルギー利用・変換機構である代謝反応は、酵素が関与する並列した多段階の反応により成り立っている。これらの反応はシグナル伝達により時空間的に制御されているため、生体内の複雑な代謝システムを理解し活用するためには、生体内のシグナル伝達機構の理解が重要である。蛍光バイオセンサーを用いたシグナル伝達物質の生細胞内での可視化は、時空間分解能の高い手法であり、シグナル伝達機構の解明に広く用いられてきたが、バイオセンサーの開発には、大規模なライブラリーや多段階のスクリーニングが不可避であり、多大な時間と労力を要する。本論文は、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、迅速で簡便なスクリーニングによってバイオセンサーを作製する方法を論じたもので、6章からなっている。</p> <p>第1章は序論であり、シグナル伝達物質の生細胞内での可視化に用いられる蛍光バイオセンサーが時空間分解能の高い手法であり、シグナル伝達機構の解明に広く用いられてきた背景を論述するとともに、バイオセンサーの構造的な特徴と、応用例、さらに、目的とする機能を発揮するバイオセンサーを構築するうえでの問題点を論じている。そのうえで、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、迅速で簡便なスクリーニングによってバイオセンサーを作製する方法を開発するという本論文の目的を述べている。</p> <p>第2章では、チャネルタンパク質 TRPC5 が 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、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して、チャネルが開くと推定されている。Cys553 と Cys558 を含みチャネル開口部を形成する TRPC5 部分構造を、EGFP の蛍光団近傍に導入した EGFP-TRPC5 を作製した。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ことによって、NO による TRPC5 部分構造の構造変化が可視化できることを示した。</p> <p>第3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2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が示唆された。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方</p>			

の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なバイオセンサーを得る。本手法では、一段階目に *in silico* でのシミュレーションを用いて、各変異体の構造変化の大きさをジスルフィド結合形成前後の RMSD の大きさから評価し、蛍光強度変化の増大が期待される 10 個の変異体を効率的に選出した。二段階目として、ジスルフィド結合を形成した変異体が大腸菌を用いて作製し、簡易精製の後に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、EGFP-TRPC5 より 2~4 倍の大きな蛍光強度変化比を示す 3 つの変異体を選出した。

第 4 章では、第 3 章で得た 3 つの変異体が、実際に NO を検出するセンサーとして機能するかを試験管内で評価した。3 つの変異体全てについて、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、還元によるジスルフィド結合開裂により蛍光強度比は減少し、可逆的なセンサーとなる可能性が示された。これらの変異体は EGFP-TRPC5 と同様に過酸化水素に対しても応答したため、レドックスセンサーとして利用できる。また、TRPC5 の Cryo-EM 像をもとにすると、抽出した部分構造は細胞膜近傍の細胞外に露出しているため、TRPC5 部分構造自身ではなく、細胞膜の疎水性が TRPC5 の NO の選択性に寄与している可能性が示唆された。

第 5 章では、第 4 章、第 3 章で作製、評価したレドックスセンサーが、生細胞内でも機能するかを検証した。レドックスセンサーは、HEK293 細胞内において計測可能な蛍光強度を示すことが確認された。レドックスセンサーを発現させた HEK293 細胞に外部から過酸化水素を添加すると、各細胞で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、レドックスセンサーが細胞内で利用できることを実証した。

第 6 章は総括である。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応用して、TRPC5 の機能発現過程で予想された構造変化を可視化した。さらに、二段階スクリーニング法を開発して、細胞内でも利用可能な検出感度を有するバイオセンサーを作製した。この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。本研究で開発した手法は、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できる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生体内のクリーンで高効率なエネルギー利用・変換を担う代謝反応は、シグナル伝達により時空間的に制御されている。生体内シグナル伝達分子の可視化には、蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーが広く用いられるが、その一般的な作製指針は確立されていない。本論文では、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。得られた主な結果は以下の通りである。

(1) チャンネルタンパク質 TRPC5 の一酸化窒素 (NO) によるチャンネル開口には、開口部近傍のシステインがニトロソ化、さらにジスルフィド結合の形成が関与すると推定されている。このシステインを含む TRPC5 部分構造を、蛍光団近傍に導入した蛍光タンパク質の蛍光強度比は、NO に応答して増加した。部分構造でのジスルフィド結合形成が確認されたため、NO に応答した TRPC5 の構造変化を蛍光によって可視化したと考えられる。

(2) 蛍光タンパク質型バイオセンサーを構築する際に、蛍光応答性が向上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。第一段階で *in silico* シミュレーションを用いて構造を比較、選別することで、試験管内で変異体を作製して蛍光特性を評価する従来のスクリーニング法に比べて、短時間で NO センサーの候補となる変異体を選出した。

(3) 第二段階のスクリーニングとして、第一段階で選出された変異体が大腸菌を用いて作製し、簡易精製の後にジスルフィド結合開裂による蛍光強度変化を評価した。その結果、もとの NO センサーの約 4 倍の蛍光強度変化比を示す 3 つの変異体を得られた。これにより、このスクリーニング法がバイオセンサーの検出機能改善に有用であることを示した。

(4) 上記バイオセンサーが、細胞内レドックスセンサーとして機能することを実証し、本スクリーニング法が細胞内バイオセンサーの構築法として有用であることを実証した。

以上、本論文では、チャンネルタンパク質 TRPC5 で予想される構造変化を簡便に蛍光検出する手法を開発し、タンパク質の機能発現に伴う構造変化情報を、蛍光タンパク質で可視化する新しい視点を示した。また、細胞内でも利用可能なバイオセンサーを構築する際に、蛍光応答性が向上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。本研究で開発した手法は、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、今後細胞内でのエネルギー利用過程に関与するタンパク質の機能検証を加速させると期待できる。

よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 2 月 28 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降