

論文内容の要旨

論文題目 **Toward real-time visualization of small molecule dynamics: development of amino acid detection system based on genetically encoded FRET nanosensors**

(細胞内小分子のリアルタイム動態解析へ向けて:FRET 利用型ナノセンサーによるアミノ酸検出システムの開発)

氏名 岡田 悟

[目的・背景]

細胞は細胞内外の環境に応じて代謝を制御する。この代謝制御の理解のためには、低分子代謝物動態データが不可欠である。しかし、従来の低分子測定手法の多くは破壊的なステップを伴うため、リアルタイムでの動態観測に使用できない。また、破砕によって生じるコンタミネーションを除外することは困難である。低分子代謝物を高い時空間的解像度で観測するためには、以上の問題を回避できるセンサー及び検出システムが必要であり、かつ、これらのセンサーはできる限り低侵襲で、リガンドに対する高い特異性がなければならない。

上記の条件を満たすセンサーシステムとして、Frommer らは FLIPs (fluorescent indicator proteins) とよばれるナノセンサーを開発した (Fehr *et al.*, 2003, *PNAS* **99**:9846)。FLIP は、リガンドを結合する結合エレメントと、リガンド結合を観測可能な物理現象に変換する出力エレメントからなる。結合エレメントとして、バクテリア由来の PBP (periplasmic binding protein) が利用されている。PBP はリガンドの結合によって構造変化を起こす。PBP は大きなタンパク質ファミリーを構成しており、糖・アミノ酸・金属・無機イオンなど、多様なリガンドにそれぞれ対応する分子が知られている。また、PBP は高い特異性・親和性をもつ。FLIP の出力エレメントとしては、2種の GFP 変異体が利用されている。2種の蛍光タンパク質を PBP の両末端に融合させることで、リガンド結合による構造変化を蛍光タンパク質間の FRET (fluorescence resonance energy transfer) 効率の変化として検出する。光を利用した検出方法は低侵襲であり、連続観測に好適である。FLIP は低侵襲かつ特異的センサーとして利用できると考えられる。

しかし、細胞内で利用できる FLIP を作成するためには、さらに以下のような条件が挙げられる。1) tunability: リガンドに対する親和性は対象となる細胞での生理的濃度範囲に応じて改変できる必要がある。2) reliability: ノイズの多い *in vivo* での測定に耐えられるダイナミックレンジが必要である。3) generality: 設計原則は単純かつ多様な分子に対して適用可能であることが求められる。4) high resolution: 細胞小器官を区別できる空間解像度、生理現象を追跡できる時間解像度が求められる。

本研究では、アミノ酸を測定対象とし、酵母生細胞におけるアミノ酸濃度の動態観測を目的として、上記の要求を満たすセンサー及び検出システムの開発を行った。

[結果と考察]

1. FLIPs の親和性・特異性は tunable である

上記の設計原則に基づいて、アミノ酸 6 種類に対する FLIPs を作成した。大腸菌で FLIPs を発現後、精製し、*in vitro* で各 FLIP の親和性・特異性を評価した。3 種の FLIPs はリガンド濃度依存的な FRET 変動を示したが、その他 3 種は有意な FRET 変動を示さなかった (Table 1)。FRET 変動が見られた 3 種の FLIPs のリガンド親和性は、酵母細胞質における生理的濃度に対して高すぎたため、細胞内で使うためには親和性を弱める必要があった。FLIP-HisJ を対象として、PBP 部分に変異を導入することで、リガンドに対する親和性を弱めることを試みた。その結果、生理的濃度範囲に親和性を持つ、FLIP-HisJ 変異体を得た。また、ドッキングシミュレーション結果に基づく変異導入により、ヒスチジンへの親和性を維持しつつ、FLIP-HisJ の特異性改善にも成功した。これらの結果は、FLIPs の親和性・特異性が改変できることを示している。

Table 1. Properties of FLIPs for amino acids

Sensor	PBP	PDBID	Ligand	Dynamic range	Apparent Kd (μM)
FLIP-HisJ	HisJ	1HSL	His	-14%	0.023
FLIP-cpHisJ194	HisJ	-	His	+63%	14
FLIP-ArgT	ArgT	2LAO	Lys, Arg, Orn	~ 0%	-
FLIP-cpArgT194	ArgT	-	Lys, Arg, Orn	+57%	48 (for Arg)
FLIP-ArtJ	ArtJ	-	Arg	~ 0%	-
FLIP-cpArtJ185B	ArtJ	-	Arg	+54%	9.4
FLIP-GlnH	GlnH	1GGG	Gln	-6%	0.048
FLIP-cpGlnH183	GlnH	-	Gln	+13%	0.040
FLIP-GltI	GltI	-	Asp, Glu	~0%	-
FLIP-cpGltI210	GltI	-	Asp, Glu	+31%	35
FLIP-LivJ	LivJ	1Z15	Leu, Ile, Val	-14%	0.15 (for Leu)
FLIP-cpLivJ261	LivJ	-	Leu, Ile, Val	+25%	>1100 (for Leu)

2. PBP への円順列変異導入は FLIPs の信頼性を改善する一般的戦略になりうる

ダイナミックレンジ、ひいては FLIP による測定信頼性を向上させるため、円順列変異を導入した PBP を結合エレメントとして用いた、FLIP-cpPBP シリーズを作成した (Fig. 1)。円順列変異により、各蛍光タンパク質が別々のローブに結合した状態を作り出せる。このため、FLIP-PBP よりもダイナミックレンジが大きくなると予想された。実際に、FLIP-cpPBP シリーズは元の FLIP-PBP シリーズに比べてより大きなダイナミックレンジを示した (Table 1)。特筆すべき点として、FLIP-PBP 構成では FRET 変動が見られなかった 3 種の PBP についても、円順列変異の導入によりリガンド濃度依存的な FRET 変動が見られた。更に、円順列変異の導入によるダイナミックレンジの拡大は、構造的な分類によらず、今回使用したすべての PBP について有効だった。以上の結果は、PBP に対する円順列変異が、ダイナミックレンジの拡大、すなわち FLIPs の信頼性向上のために一般適用できる戦略であることを示している。

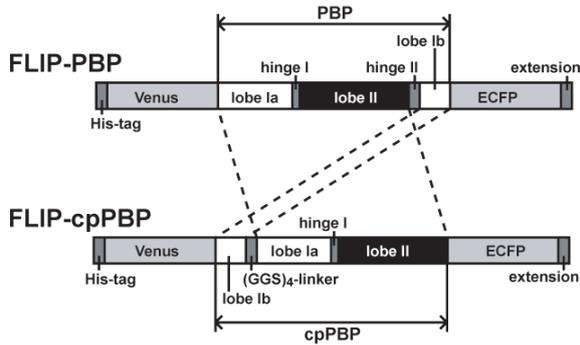


Figure 1. FLIP-PBP および FLIP-cpPBP の設計

3. FLIPs を用いて生細胞の低分子動態を観測できる

FLIPs の生細胞における応用例として、酵母細胞の細胞質におけるヒスチジン濃度の動態観測を試みた。FLIP-HisJ を発現させた細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、センサー分子は細胞質のみに存在し、液胞では見られなかった。FLIPs が細胞小器官を区別できる解像度をもっていることを示している。

まず、FLIP-HisJ または FLIP-cpHisJ を発現する出芽酵母細胞について、細胞外からのヒスチジンの流入を観測した。細胞懸濁液に各濃度のヒスチジンを添加したときの蛍光スペクトルの変化を記録した。ヒスチジンを加えることで FRET 比が変動することが観察され、その変動の大きさは添加したヒスチジン濃度と相関していた。この結果は、FLIP-HisJ によって、培地から酵母の細胞質へのヒスチジン流入をリアルタイム観測できたことを示している。

しかし、細胞懸濁液を使用した測定には培地の自家蛍光という問題点がある。この問題を回避するため、培地の蛍光の影響をほぼ無視できる FCM (flow cytometry) の利用を試みた。FCM の利用により、S/N 比は約 2 倍向上し、前処理の必要のない、単純で迅速な測定が可能となった。

続いて、低分子が重要な役割を果たすシグナル伝達経路のモデルとして、GCN 経路を選択し、低分子動態とパスウェイの活性化状態の関係性を観測することを試みた。細胞質内のヒスチジン濃度 ($[\text{His}]_{\text{cyto}}$) を追跡するために FLIP-HisJ R77L T121A を利用し、GCN 経路活性化の指標として eIF2 α のリン酸化状態をイムノブロッティングにより測定した (Fig. 2)。ヒスチジンを合成できない細胞をヒスチジン飢餓条件下におくと、急速な $[\text{His}]_{\text{cyto}}$ の低下とそれに続く比較的ゆっくりした eIF2 α リン酸化が観測された (Fig. 2)。細胞外からヒスチジンを添加すると、急速な $[\text{His}]_{\text{cyto}}$ の上昇と急速な eIF2 α の脱リン酸化が観測された。興味深いことに、ヒスチジン添加による eIF2 α の脱リン酸化は、ヒスチジン飢餓によるリン酸化よりも急速だった。

最後に、細胞外のヒスチジン濃度の変化を伴わない刺激による $[\text{His}]_{\text{cyto}}$ の動態変化について調べた。FLIP-cpHisJ194 Y14H を発現する細胞に対して、3 種類の刺激 (低温シフト、ラパマイシン、シクロヘキシミド) を加え、FRET の変化を FCM により観測した。その結果、いずれの刺激を加えた場合でも、 $[\text{His}]_{\text{cyto}}$ の上昇が観測された (Fig. 3)。以上の結果は、細胞質のヒスチジン濃度は、細胞外のヒスチジン濃度とは独立に変化し得ることを示唆する。 $[\text{His}]_{\text{cyto}}$ の上昇機構としては、タンパク質合成阻害によるヒスチジン消費速度の低下によって、余剰のヒスチジンが生じている可能性が考えられる。

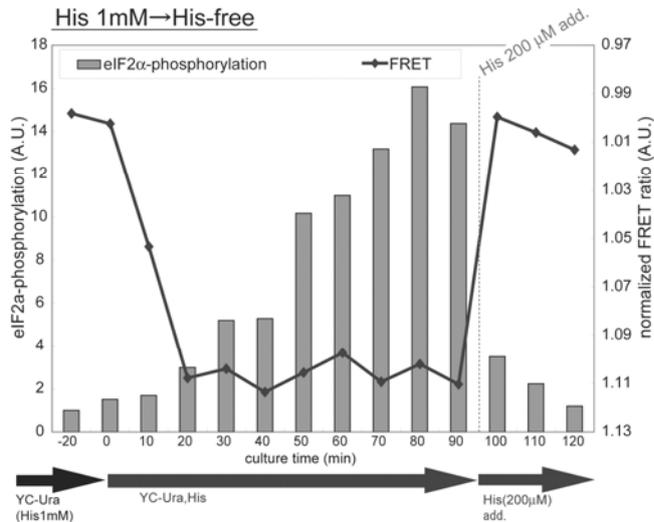


Figure 2. 細胞質のヒスチジン濃度及び GCN 経路活性化に対するヒスチジン飢餓の影響

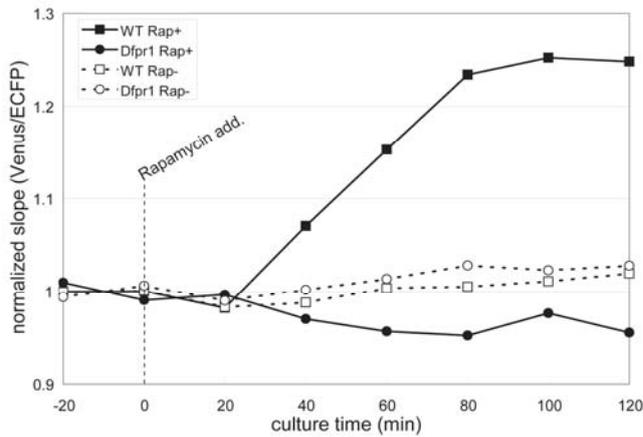


Figure 3. ラパマイシン添加時の細胞質ヒスチジン濃度の動態

【結論】

本研究では、FRET 利用型ナノセンサーFLIPs を利用して細胞内の小分子動態をリアルタイム観測するためのシステムを開発した。

- 1) FLIPs の特異性・親和性は構造情報・ドッキングシミュレーションに基づく変異導入により改変できる。
- 2) PBP モジュールに対する円順列変異の導入により、FLIPs のダイナミックレンジの拡大が可能であり、これによって測定信頼性を向上できる。
- 3) 円順列変異導入戦略は PBP の構造分類によらず、一般的に適用可能である。
- 4) 本研究で開発したアミノ酸検出システムは、出芽酵母細胞質のアミノ酸動態を、十分な時空間的解像度をもって観測することができる。

今回開発したシステムは低分子動態解析に資するものであり、代謝制御についての理解・代謝制御機構のモデル化に貢献できるものと考えられる。