

論文の内容の要旨

論文題目：生体分子を可視化する高性能蛍光プローブの効率的作製技術の開発

氏名 瀧川健司

背景と目的

生きた細胞の内外の生体分子の動態をリアルタイムに可視化する蛍光プローブは、細胞機能を分子的側面から理解する上で有効な研究ツールとして注目されている。しかしながら、これまでの蛍光プローブの開発手法では、蛍光プローブの開発までに膨大な時間を要すること、標的分子次第では蛍光プローブをデザインすることができないことが要因となって、目的の分子を可視化する蛍光プローブを取得することは容易ではない。そのため、蛍光プローブによる可視化解析が可能な分子は現状ではカルシウムイオンなどの一部の分子に限られている。この現状を解決するために、本研究では様々な生体分子に対する蛍光プローブの開発を可能にし得る分子デザインを有するハイブリッド型プローブに注目し、高性能なハイブリッド型プローブの効率的な作製技術の開発を目指した。

結果

1. HyFInD による蛍光プローブ開発プロセスのハイスループット化

本研究で開発する蛍光プローブは分子認識タンパク質と蛍光色素との複合体からなるハイブリッド型プローブである。蛍光イメージングに実用的な蛍光プローブを効率的に開発するために、ハイブリッド型プローブのダイナミックレンジと標的分子に対する親和性を左右する蛍光色素の標識位置を迅速かつ網羅的に評価することで蛍光イメージングに最適なハイブリッド型プローブを選抜する技術、HyFInD (Hybrid-type Fluorescence Indicator Development) を構築した。HyFInD の概要を図に示す。最初のステップではインバース PCR 法によってタンパク質発現コンストラクトに蛍光色素の標識位置となるシステインの点変異を導入する。ステップ 2 では、ステップ 1 で調製したコンストラクトを用いて大腸菌の形質転換体を作製し、培養後、タンパク質発現誘導を行う。ステップ 3 では、分子認識タンパク質の精製及び変異導入したシステイン残基への蛍光色素の標識を行う。ステップ 4 では、各候補プローブがリガンド分子の結合に伴い蛍光強度がどの程度変化するか蛍光プレートリーダーを用いて評価する。以上の工程を 2 週間程度で完了する。

HyFlnD によってハイブリッド型プローブを効率的に開発することが可能であるかを検証するために、2 種類の分子認識タンパク質 (グルコース結合タンパク質、アラビノース結合タンパク質) と 2 種類の蛍光色素 (Oregon Green、Alexa Fluor 488) を原料として、618 種類のグルコースプローブ候補と 614 種類のアラビノースプローブ候補の作製及び性能評価を行った。その結果、20% 以上のダイナミックレンジを有する 18 種類のグルコース蛍光プローブと 17 種類のアラビノース蛍光プローブを取得することに成功した。また、取得した両蛍光プローブのリガンドに対する親和性について評価した。その結果、いずれにおいても解離定数が μM から mM まで広い範囲に分布していることが明らかとなった。以上の結果から、HyFlnD を用いることでハイブリッド型プローブを効率的に開発することが可能であることが示された。

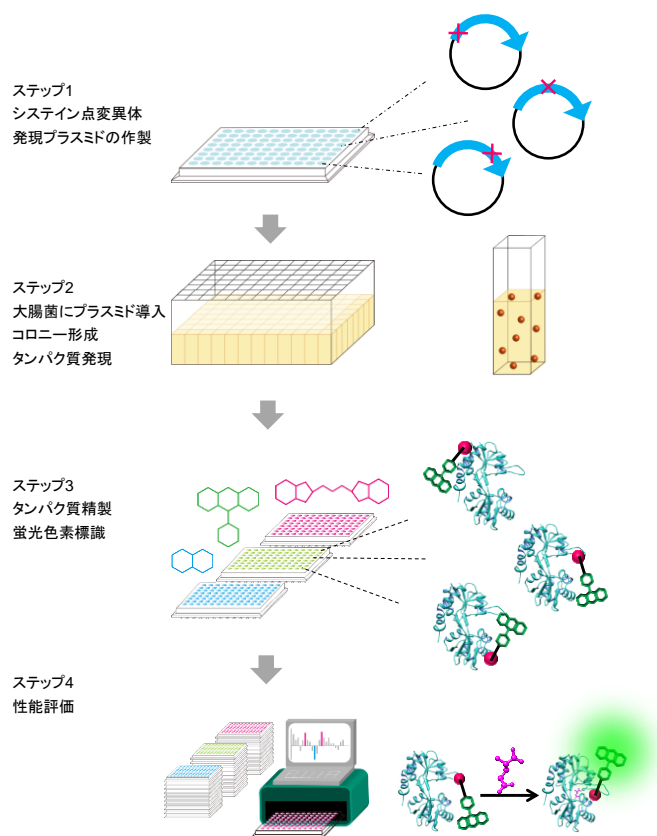


図 HyFlnD の概要

2. ハイブリッド型プローブの生体分子可視化応用

HyFlnD で開発したハイブリッド型プローブが蛍光イメージングに応用可能であることを実証し、HyFlnD の有用性を示すために、中枢神経系において主要な伝達物質であるグルタミン酸と ATP に対する蛍光プローブを開発し、培養神経細胞・アストロサイトから放出される各種伝達物質の可視化を試みた。

① 単一シナプス解像度でのグルタミン酸開口放出の可視化

グルタミン酸結合タンパク質と 4 種類の蛍光色素 (Oregon Green、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 350、Cy3) を原料として、1,080 種類のグルタミン酸プローブ候補の作製及び性能評価を行った。その結果、2,400% 以上の非常に大きなダイナミックレンジを有し、グルタミン酸に対して適度な親和性 (解離定数: $41.6 \mu\text{M}$) を示すグルタミン酸蛍光プローブ eEOS の開発に成功した。

eEOS が蛍光イメージングへ応用可能であるかを検証するために、神経細胞のシナプス前終末から開口放出されるグルタミン酸の可視化を試みた。シナプス前終末から細胞外に放出されるグルタミン酸を鋭敏に捉えるために、神経細胞選択的に結合するボツリヌス毒素の非毒性サブユニット

を介して eEOS を培養海馬神経細胞の細胞膜上に固定化した。シナプス前終末からのグルタミン酸の放出を誘発するために神経細胞に 1 発のフィールド電気刺激を与えると、シナプス前終末マーカーである VGLUT1 の免疫染色像と一致する箇所では電気刺激と同期した蛍光シグナルがスポット状に観察された。上昇した蛍光シグナルは 20 ミリ秒以内でピークに達し、その後、時定数 160 ~ 170 ミリ秒で減衰していく様子が観察された。この結果は、シナプス前終末からのグルタミン酸の放出から消失の過程を単一シナプスレベルという高時空間解像度で捉えたものであり、従来のグルタミン酸蛍光プローブでは達成されていなかった個々のシナプスを切り分けたグルタミン酸放出の可視化を達成した。続いて、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を増強することが知られているホルボールエステル (PMA) を標本中に添加した条件でグルタミン酸イメージングを行った。その結果、PMA 添加前に比べて eEOS の蛍光シグナルが増強した。従って、本グルタミン酸イメージング手法ではグルタミン酸放出の増強効果を検出できることが示された。最後に、本グルタミン酸イメージング手法の生物学応用として、神経細胞が電気刺激の頻度に依存してシナプス伝達効率を変化させる短期可塑性と呼ばれる現象の可視化を試みた。低頻度 (0.1 Hz) もしくは高頻度 (20 Hz) のフィールド電気刺激を与えた条件でグルタミン酸イメージングを行ったところ、低頻度刺激でグルタミン酸放出を増強させるシナプス、高頻度刺激でグルタミン酸放出を増強させるシナプス、刺激頻度に依存しないグルタミン酸放出を示すシナプスが同一樹状突起上に混在して分布していることが明らかになった。この結果は、短期可塑性において個々のシナプス前終末から開口放出されるグルタミン酸の放出量は刺激頻度に応じて不均一に変動し得ることを直接的に捉えたものである。

② アストロサイトから放出される ATP 及びグルタミン酸のマルチカラー同時イメージング

ATP 結合タンパク質と 3 種類の蛍光色素 (Oregon Green、Alexa Fluor 488、Cy3) を原料として、402 種類の ATP プローブ候補の作製及び性能評価を行った。その結果、ATP に選択的な反応を示す蛍光プローブ ATPOS の開発に成功した。

HyFlnD で開発した蛍光プローブがマルチカラー同時イメージングへ応用可能であることを検証するために、アストロサイトから放出される ATP 及びグルタミン酸の同時可視化を試みた。アストロサイトから細胞外に放出される ATP とグルタミン酸を鋭敏に捉えるために、互いに蛍光色の異なる ATPOS と EOS を Streptavidin-Biotin を介して培養アストロサイトの細胞膜上に固定化した。アストロサイトからの ATP 及びグルタミン酸の放出を誘発するために単一のアストロサイトの細胞膜にガラスピペットを軽く接触させた (メカニカル刺激)。その結果、刺激直後に刺激箇所付近から両蛍光プローブのシグナル上昇が起こり、各シグナルが同心円状に広がっていく様子が観察された。この結果は、ATP とグルタミン酸が刺激後直ちに放出され、周辺細胞に拡散・伝播していく過程を捉えたものであり、HyFlnD によって開発した蛍光プローブがマルチカラー同時イメージングに応用可能であることを示す。

3. ハイブリッド型プローブの蛍光強度変化をもたらす重要因子の探索

ハイブリッド型プローブの蛍光強度変化を引き起こす分子メカニズムを理解することができれば、ダイナミックレンジの大きいハイブリッド型プローブをより効率的に開発することが可能になると期待できる。そこで、ハイブリッド型プローブの蛍光強度変化を引き起こした蛍光色素の標識位置に何らかの規則性や特徴があるかを調べるために、タンパク質 X 線結晶構造情報とタンパク質内の蛍光色素の標識位置の性質を網羅的に評価した HyFInD の結果を基に、多変量ロジスティック回帰分析を行った所、以下の結果を得た。1. タンパク質の構造変化が大きい蛍光色素の標識位置ほど蛍光強度変化が起こりやすい。2. トリプトファンと蛍光色素の標識位置が近接しているほど蛍光強度変化が起こりやすい。以上の結果は、ハイブリッド型プローブの蛍光強度変化の分子メカニズムの理解に迫る重要な知見である。今後、これらの知見を基により効率的にハイブリッド型プローブの開発が可能になることが期待される。

結論

本研究では HyFInD を構築することによって、単一シナプスレベルでのグルタミン酸開口放出の可視化、マルチカラー同時イメージングへの応用を可能とする高性能なハイブリッド型プローブを効率的に開発することに成功した。HyFInD に用いる分子認識タンパク質の種類を変更することで、糖、アミノ酸、核酸に対する蛍光プローブの開発が可能であることを示し、HyFInD によって多様な分子に対する蛍光プローブの開発が可能であることを実証した。今後、HyFInD を活用して様々な分子認識タンパク質を用いて蛍光プローブの開発を行うことで、細胞機能に関与する様々な生体分子の可視化解析が実現されていくことが期待される。