

蛍光タンパク質の H^+ 感受性を利用した 新規蛍光プローブの開発

学位論文内容の要旨

細胞内、ことに細胞内小器官の pH は、様々な細胞内機能に密接に関与しており、それらの機能の適切な活性制御のために厳密に調節されている。細胞内小器官内の pH の重要性については広く認められているが、生きている細胞内での計測には様々な難点が存在し、その pH 測定に関する報告は少ない。近年、オワンクラゲ *Aequorea victoria* 由来の green fluorescence protein (GFP)、およびその変異体は、*invivo*, *insitu*, *in real time* に遺伝子の発現やタンパク質の局在をモニタリングできる強力なツールとして広く使用されるようになった。これらの蛍光タンパク質は、程度の差はあれ H^+ 感受性を示し、pH の低下に伴って蛍光強度が減少する。GFP 誘導体のこの欠点は、逆用すれば pH 指示薬としての有用性を意味している。また、低分子有機化合物からなる pH 指示薬と異なり、分子生物学的な手法を用いて様々なオルガネラ特異的に局在させることが可能であると考えられる。

本研究では、蛍光タンパク質を基にした pH indicator の改良、開発研究を行い、以下の新知見を得た。

1. 蛍光タンパク質由来の pH indicator-ratiometric-pHluorin の改良

現在までに、蛍光タンパク質を基にした pH indicator の一つとして、ratiometric-pHluorin (R-pHluorin) が報告されている。この蛍光タンパク質は二波長励起一波長測光型の pH indicator であるが、暗い酸性条件下で蛍光強度が低下するため ratio が崩れ、使用しにくいなどいくつかの欠点を有している。本研究ではその欠点を改良した蛍光タンパク質の作製を試みた。Site-directed mutagenesis を用いて作製した変異体をスクリーニングし、最も蛍光強度の強い変異体 improved ratiometric pHluorin (IR-pHluorin) を得た。IR-pHluorin を *E. coli* と哺乳類細胞内で発現させ、その蛍光強度を元の R-pHluorin と比較した。また *E. coli* で発現させたリコンビナントタンパク質を精製してその蛍光特性を評価した。

検討の結果、IR-pHluorin は R-pHluorin よりも 37°C での発色団形成効率が上昇し、哺乳類細胞内でより強い蛍光 (R-pHluorin と比べて約 30 倍) を発するようになった。

また酸性条件下でも蛍光強度が低下しにくくなっており、さらに **dynamic range** も増大していた。この **pH indicator** を用いて細胞内小器官内の **pH** を測定したところ、オルガネラ特異的局在と、**pH** 依存性の励起強度変化が認められた。このプローブの測定範囲はおよそ **pH 5.5-8.0** であり、生理的な細胞内の **pH** 変化をトレースするのに適していると考えられる。

2. H^+ 感受性蛍光タンパク質、及び非感受性蛍光タンパク質を組み合わせた **ratiometric pH indicator**

真核細胞の分泌小胞内腔は酸性 (**pH 5.5** 以下)であり、これと細胞外の **pH** (**medium** の **pH**, **pH7.4** 付近)の差を検知できるようなプローブは、開口放出の観察に有用であると考えられる。本研究では **S/N** 比の上昇を目指すため、分泌小胞内では光らず、細胞外でのみ蛍光を発するような蛍光タンパク質の開発を試みた。

上記の目的で作製した **VenusH148G (VeH)**は励起/蛍光波長が、それぞれ **513/528 nm**, **pKa=7.3** の一波長励起一波長測光型 **pH indicator** である。実際に、酸性の小胞内ではほとんど蛍光は検出されず、中性条件下で強い蛍光を発することが示された。神経シナプスにおける開口放出に関与する **VAMP-2** (別名 **synaptobrevin 2**)の **C** 末端にこの **VeH** を融合して、**rat** 海馬由来の神経細胞に発現させ **imaging** したところ、高濃度 K^+ またはグルタミン酸刺激に応じてシナプス後部での蛍光強度増加が観察された。一波長励起一波長測光型のプローブは、プローブ濃度の局所的な変化、細胞の運動などによる偽シグナルを生じやすい。この **VeH** は一波長励起一波長測光型であり、上記の欠点を有するものと考えられる。そこで他のプローブと組み合わせ、**ratiometric pH indicator** を作製した。このペアプローブには **VeH** と光学的に分離可能で、**pH** 依存性のないことが要求される。しかし現在報告されているほとんどの蛍光タンパク質は H^+ 感受性であり、この条件を満たすものは報告されていない。本研究ではこのような蛍光タンパク質を探索し、アザミサンゴ (*Galaxeidae*) 由来の変異体 **mAG407** を得た。この蛍光タンパク質は **sapphire type** の蛍光特性を持ち(励起/蛍光波長ピークが **407/496nm**)、**VenusH148G** と光学的に分離可能である上、生理的 **pH** (**pH 4.0 - 9.0**) でほとんど蛍光強度が変化しなかった。**VeH** を、**mAG 407** とタンデムに結合し、**ratiometric pH indicator** を作製したところ、この新規の **pH indicator** である **4-VeH** は、元の二つの蛍光タンパク質の特性を受け継いでおり、**dynamic range** の大きな **pH** 依存性の **ratio** 変化、**pH** 非依存性の安定した強度の蛍光(**mAG 407**)を示した。

上記の通り、本研究では蛍光タンパク質由来の **pH indicator** の改良、作製を行い、得られた標品は生体内の **pH** 測定に優れたプローブであることを示した。また機能タンパク質との融合により、開口放出などの細胞生物学的現象を検出することが可能であることを示すとともに、開口放出を可視化するための実験的方法論を提示できた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 助 教 授 横 沢 英 良
副 査 助 教 授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

蛍光タンパク質のH⁺感受性を利用した 新規蛍光プローブの開発

近年，細胞生物学，分子生物学の領域において盛んに用いられるようになったオワンクラゲ *Aequorea victoria* 由来の green fluorescence protein (GFP)，及びその変異体は，*in vivo*，*in situ*，*in real time* に遺伝子の発現やタンパク質の局在をモニタリングできる強力なツールである．しかしこれらの蛍光タンパク質は，程度の差はあれ H⁺感受性を示し，pH の低下に伴って蛍光強度が減少する欠点を有している．申請者は GFP 誘導体のこの欠点を逆用し，pH indicator としての可能性を模索した．これまでの低分子有機化合物からなる pH 指示薬は細胞内局在性に乏しく，また細胞からの溶出が起こる等の欠点を有している．そのため，生きている細胞内での pH の計測には様々な難点が存在する．申請者の作製した蛍光タンパク質からなる pH indicator は分子生物学的な手法を用いて様々なオルガネラ特異的に局在させることが可能であり，実際の細胞内での pH 測定に極めて有用なツールとなることを示した．まず申請者は蛍光タンパク質由来の pH indicator -Ratiometric-pHluorin の改良を行った．現在までに，蛍光タンパク質を基にした二波長励起一波長測光型の pH indicator として，ratiometric-pHluorin (R-pHluorin)が報告されているが，この蛍光タンパク質は 37°C条件下で蛍光強度が極めて弱い，酸性条件下で蛍光強度が低下するため ratio が崩れ使用しにくい等，いくつかの欠点を有していた．本研究では site-directed mutagenesis を用いて変異体を作成し，その欠点を改良した蛍光タンパク質 improved ratiometric pHluorin (IR-pHluorin)を作製し

た。R-pHluorin との比較の結果、IR-pHluorin は R-pHluorin よりも 37°Cでの発色団形成効率が上昇し、哺乳類細胞内でより強い蛍光 (R-pHluorin と比べて約 30 倍) を有することが示された。また、酸性条件下でも蛍光強度が低下しにくくなっており、さらに dynamic range も増大していた。これらのことからこの新しい pH indicator は元の R-pHluorin よりも有用性の高い pH indicator であると考えられる。またこの pH indicator の測定範囲はおよそ pH 5.5-8.0 であり、生理的な細胞内の pH 変化をトレースするのに適していると考えられる。

また申請者は H⁺感受性蛍光タンパク質を作製し、開口放出の可視化を行った。真核細胞の分泌小胞内腔の pH (pH 5.5 以下)と、細胞外の pH (medium の pH 7.4 付近)との差を検知できるようなプローブ VenusH148G (VeH)を作製し、神経シナプスでの開口放出に関与する VAMP-2 (別名 synaptobrevin 2)の C 末端にこの VeH を融合して、rat 海馬由来の神経細胞の開口放出をシナプス後部の蛍光強度増加として可視化した。この方法は、多数のシナプス前部の開口放出を繰り返し解析可能であり、神経生物学的な研究に有用であることを示した。

さらに、申請者は H⁺感受性蛍光タンパク質と H⁺非感受性蛍光タンパク質を組み合わせて、新規の ratiometric pH indicator を作製した。H⁺感受性蛍光タンパク質として上記の VeH を、H⁺非感受性蛍光タンパク質としてアザミサンゴ (*Galaxeidae*) 由来の変異体 mAG407 を使用し、タンデムに結合して二波長励起一波長測光型の ratiometric pH indicator を作製した。この新規 pH indicator は dynamic range が極めて大きく、感度の高い pH indicator であることを示した。

以上の通り、申請者は、蛍光タンパク質由来の pH indicator の改良、作製を行い、生体内の pH 測定に優れたプローブを作製した。また、機能タンパク質との融合により、開口放出などの生物学的現象の検出の可能性を示し、蛍光タンパク質を使用した新しい実験方法を提示しており、博士 (薬学) の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。