

Title	ハナガサクラゲ由来の耐酸性単量体緑色蛍光タンパク質の開発および超解像イメージングへの応用
Author(s)	篠田, 肇
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72351
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (篠 田 肇)	
論文題名	ハナガサクラゲ由来の耐酸性単量体緑色蛍光タンパク質の開発および超解像イメージングへの応用
論文内容の要旨	
<p>第一章 背景</p> <p>蛍光タンパク質は、細胞内のタンパク質・小器官の追跡マーカー、特定のイオン・生理活性物質の濃度変化を可視化するバイオセンサーとして、基礎生命科学および医学研究に欠かすことのできないツールである。しかしながら、既存の蛍光タンパク質の多くは酸性環境下で蛍光を失うため(酸解離定数: $pK_a \sim 6.0$)、リソソーム・分泌小胞・エンドソーム・液胞などの酸性細胞小器官 (pH ~ 4.5-6.0) で使用する場合には制限がある。これまでに、青・赤色の耐酸性蛍光タンパク質は開発されてきたが、生細胞イメージングに有用な耐酸性の緑色蛍光タンパク質は報告されていなかった。したがって、酸性細胞小器官中の複数種分子の相互動態およびセンサーによるイオン濃度等の同時定量解析をマルチカラーで行うことは困難であった。</p> <p>第二章 ハナガサクラゲ由来、耐酸性緑色蛍光タンパク質の開発</p> <p>ハナガサクラゲより新規蛍光タンパク質遺伝子をクローニングし、試験管内分子進化法による改良を重ねることで、耐酸性の単量体緑色蛍光タンパク質Gamillusを開発した。Gamillusの蛍光スペクトルはpH4.5からpH9.0の範囲でほぼ一定であり、酸性細胞小器官を含む全ての細胞内pH環境での使用が可能である。Gamillusの酸性細胞小器官イメージングでの実用性を証明した。</p> <p>第三章 細胞内酸性環境の超解像顕微鏡法応用に向けた、耐酸性光スイッチング緑色蛍光タンパク質の開発</p> <p>GamillusのX線結晶構造解析により得られた立体構造情報を参考にアミノ酸変異を導入することで、高い耐酸性性能を保持しつつ、光スイッチング性能を改良したrsGamillusを開発した。rsGamillusの酸性環境内の蛍光特性ならびに光スイッチング性能を評価し、細胞内酸性環境の超解像イメージング応用の可能性を証明した。</p> <p>第四章 結論と展望</p> <p>酸性細胞小器官は、生体分子の修飾・分解・輸送としての既知の役割に加え、細胞内シグナリングの制御センターとして機能するなど、生命機能の維持に多岐に渡って貢献していることが近年明らかになりつつある。本研究で開発した耐酸性緑色蛍光タンパク質Gamillus、光スイッチ型耐酸性緑色蛍光タンパク質rsGamillusは、酸性細胞小器官に存在するタンパク質や生理活性物質の未知機能を、イメージングで理解するための一助となることが期待される。</p> <p>将来、Gamillusを既存のシアン色および赤色の耐酸性蛍光タンパク質と併用することで、酸性細胞環境中の複数種分子の機能をマルチカラーで観察すること、イオンや生理活性物質を検出するためのバイオセンサーの開発が可能になる。rsGamillusを、PALMやその他の超解像イメージング法と組み合わせることで、酸性細胞環境中の微細構造やタンパク質の局在パターン・動態の観察が可能になるだろう。総じて、GamillusとrsGamillusは今までブラックボックスだった酸性細胞環境内で起こる生命現象の解明に大きく貢献することが期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (篠 田 肇)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	永井 健治
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	大政 健史

論文審査の結果の要旨

本論文では、ハナガサクラゲから酸性環境下においても蛍光する緑色蛍光タンパク質の遺伝子を単離し、その物理化学的な特性を生命科学研究、とりわけバイオイメージングに利用可能なものへエンジニアリングすることで、世界初となる耐酸性単量体緑色蛍光タンパク質、ならびに耐酸性光スイッチ型緑色蛍光タンパク質を開発し、酸性細胞環境内イメージングへの実用性を記した論文である。

第一章には、本研究の背景として、蛍光タンパク質ならびに光スイッチ型蛍光タンパク質の特徴、応用例について記述されている。蛍光タンパク質は、細胞標識、細胞内のタンパク質の局在マーカー、生理活性物質を検出するためのバイオセンサーの基礎ドメインとして汎用されている。その派生体である光スイッチ型蛍光タンパク質は、特殊な顕微鏡法と組み合わせることで、光の回折限界を超えた超解像イメージングへの応用が可能になった。しかしながら、一般的な蛍光タンパク質、光スイッチ型蛍光タンパク質のほとんどは、酸性環境下で蛍光能を失うため (pKa ~ 6)、酸性細胞環境中での使用には制限があった。

第二章では、この問題を解決できる二量体緑色蛍光タンパク質を、ハナガサクラゲから新規に遺伝子クローニングした。アミノ酸配列から予測した構造モデルを基に、18 のアミノ酸変異を合理的に導入することで、単量体で高輝度、溶解度の向上した変異体 Gamillus の開発に成功した。従来一般的な緑色蛍光タンパク質 EGFP (pKa = 6.0) と比較して、非常に優れた耐酸性能 (pKa = 3.4)、約 1.5 倍の蛍光強度、1.5 倍速い蛍光団の成熟速度、2 倍高い光安定性を示した。また、励起波長依存的に蛍光強度が可逆的にスイッチすることも判明した。X 線結晶構造解析により、Gamillus の蛍光団フェノール基が、従来 GFP とは異性型の trans 配置で安定すること、この独特な蛍光団環境により高い耐酸性能が生まれることが判明した。HeLa 細胞内でのマクロオートファジー過程によるリソソームへの蓄積を観察することで、酸性細胞環境イメージングへの実用性を示した。

第三章では、Gamillus の光スイッチ機構が、蛍光団フェノール基の trans-cis 異性化ならびにフェノール水酸基のプロトン化/脱プロトン化によることを明らかにした。この分子メカニズムを基に、光スイッチのコントラストを向上させた変異体 rsGamillus-S と rsGamillus-F を半合理的にデザインし、開発した。これら変異体は、pH 4.5 から 7.5 の緩衝液中で、ほぼ一定の蛍光強度、光スイッチオフ速度、光スイッチコントラストを示すことが示された。この性質から、ほぼ全ての細胞内 pH 範囲において、rsGamillus は 1 分子蛍光の輝点重心位置の計測に基づく超解像イメージングに応用できることを実証した。

総じて、Gamillus ならびに rsGamillus は、今までの蛍光タンパク質では制限されていた、酸性細胞環境での利用を可能にした。酸性オルガネラ内の Ca²⁺などのイオン・生理活性物質を検出するセンサー開発の基礎ツールとして、酸性細胞環境中の構造体・タンパク質の局在を超解像イメージングするためのプローブとして、酸性細胞環境の機能を理解する一助となることが今後期待される。これらの理由により、本論文を博士論文として価値あるものと認める。