OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study on affinity variants of bioluminescent Ca2+/Mg2+ indicators toward wide range of research and inspection
Author(s)	Hossain, Md. Nadim
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77480
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Hossain Md. Nadim)	
Title	Study on affinity variants of bioluminescent Ca^{2+}/Mg^{2+} indicators toward wide range of research and inspection (広範囲な研究や検査への利用に資する生物発光性Ca^{2+}/Mg^{2+}指示薬の結合親和性変異体に関する研究)

The calcium ion (Ca^{2+}) and magnesium ion (Mg^{2+}) are essential divalent cations involved in different cellular processes. Moderate Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations are indispensable for cellular functions, and tightly regulated in different cellular compartments. For example, the [Ca^{2+}] in the endoplasmic reticulum (ER) is maintained in submillimolar, and that in the nucleus or cytosol is in submicromolar. Similarly, Mg^{2+} concentration is also different in each cellular compartment. Unlike living organisms, these cations are generally much abundant (> millimolar) in our environmental water. Water with high Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration is defined as hard water. This hard water has a negative impact on life, and household appliances. Therefore, an inspection of Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations are required with a decent measurement system. There are several bioluminescent Ca^{2+} indicators used for intracellular Ca^{2+} imaging. Unfortunately, their Ca^{2+} affinities mismatches to employ in organelles with high Ca^{2+} concentrations. To expand the applicability of the bioluminescent Ca^{2+} indicators to a broad range of intracellular Ca^{2+} dynamics in different organelles, those with different affinities and color hues should be developed. I firstly engineered an orange color indicator with an intermediate-affinity, OeNL(Ca^{2+})_18μ composed of a split Nanoluc luciferase, a mKusabira-Orange-kappa (mKOκ) fluorescent protein, a Ca^{2+} binding protein, calmodulin (CaM), and a M13 peptide from myosin light chain kinase. The Ca^{2+} dependent interaction between CaM and M13 induces the reconstitution of the split Nanoluc into a native luciferase, producing orange bioluminescence due to bioluminescence resonance energy transfer (BRET) from the reconstituted Nanoluc to mKOκ. By introduction of several amino acid mutations into the EF-hand motif in the CaM, I could reduce the affinity for Ca^{2+} binding of this indicator (K_d = 18 μM), which enabled mitochondrial Ca^{2+} concentration measurement. Similarly, a low-affinity cyan color variant, CeNL(Ca^{2+})_110μ allowed to monitor Ca^{2+} concentration in ER and with different Ca^{2+} affinity and color hues, and I demonstrated multicolor Ca^{2+} imaging in different cellular compartments with different Ca^{2+} concentration and dynamics. Low-affinity Ca^{2+} indicator is not only useful in ER, it can be applied to assess water hardness (WH) in household water. To detect WH by bioluminescence, I also developed a bioluminescent WH indicator named LOTUS-W by using a Nanoluc, a Venus yellow fluorescent protein, and a Ca^{2+}/Mg^{2+} binding domain of human centrin3 (HsCen3). Ca^{2+}/Mg^{2+} binding to HsCen3 triggered a conformational change of LOTUS-W, inducing BRET from Nanoluc to Venus, which changed the luminescence color from blue to yellow. The dissociation constants of LOTUS-W for Ca^{2+} and Mg^{2+} were 2.1 mM and 4.7 mM, respectively. These values are quite suitable for measuring WH in the household water. To demonstrate the performance of LOTUS-W, I carried out a titration experiment for Ca^{2+} and Mg^{2+} by following the WH index defined by WHO, and measured bioluminescence color changes by using a CMOS camera equipped in a smartphone., With this method, I could evaluate WH of 14 types of commercially available bottled waters. This could be used in conjunction with a smartphone camera that will enable a quick, easy and low-cost inspection of the WH not only in house but also in industry.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ HOSSAIN MD. NADIM ）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	永井　健治
	副 査　教授	栗栖　源嗣
	副 査　教授	内山　進
	副 査　教授	福﨑　英一郎
	副 査　教授	渡邉　肇
	副 査　教授	村中　俊哉
	副 査　教授	紀ノ岡　正博
	副 査　教授	大政　健史
	副 査　教授	藤山　和仁
	副 査　教授	本田　孝祐

論文審査の結果の要旨

本論文は、比較的高濃度のカルシウムイオン（Ca^{2+}）とマグネシウムイオン（Mg^{2+}）を計測可能な生物発光型指示薬の開発を行い、細胞内の特定オルガネラにおける Ca^{2+}動態可視化や飲料水の硬度計測など、生命科学研究や環境検査への実用性を記したものである。

第一章では、本研究の背景として、日常生活の中で直接または間接的に重要な役割を果たしている陽イオンとしての Ca^{2+}と Mg^{2+}が紹介され、細胞内における生理機能に関わり、環境中の水にも多く存在し、両イオンの合計濃度として定義される硬度について説明した後、硬度の高い水が生活設備にどのような悪影響を及ぼすかが記述されている。しかしながら、従来の一般的な生物発光性 Ca^{2+}、Mg^{2+}指示薬はいずれも各イオンとの結合解離定数が小さく、従って Ca^{2+}や Mg^{2+}に対する結合高親和性が高いため、比較的高濃度の両イオンの計測ができないという制限があった。

第二章では、この問題を解決できるインテンシオメトリック型生物発光性カルシウム指示薬の開発に関して記述されている。以前開発された緑色発光型指示薬である GeNL(Ca^{2+})_0.52μの Ca^{2+}に対する結合親和性および発光色を改変することで中親和性橙色カルシウム指示薬、低親和性の青色カルシウム指示薬が構築された。GeNL(Ca^{2+})_0.52μは緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen、Ca^{2+}結合タンパク質カルモジュリン、Ca^{2+}結合型カルモジュリンと相互作用するミオシン軽鎖キナーゼ由来の M13 ペプチド、それに二分割されたヒオドシエビ由来ルシフェラーゼ Nluc から構成される人工キメラタンパク質である。このうち mNeonGreen を橙色蛍光タンパク質 mKOκに置換し、カルモジュリンに複数のアミノ酸変異を導入することにより、解離定数が 18 μ M の中親和性 Ca^{2+}指示薬 OeNL(Ca^{2+})_18 μを開発し、ミトコンドリア内 Ca^{2+}動態の計測に成功した。同様に、さらに Ca^{2+}に対する親和性の低いカルモジュリン変異体を見出して置換し、蛍光タンパク質も青色蛍光を放つ mTurquoise2 に置換することで解離定数が 110 μ M の低親和性 Ca^{2+}指示薬 CeNL(Ca^{2+})_110 μを開発、これにより小胞体内 Ca^{2+}動態の計測に成功した。さらに、GeNL(Ca^{2+})_0.52 μ、OeNL(Ca^{2+})_18 μ, CeNL(Ca^{2+})_110 μをそれぞれ細胞質、ミトコンドリア、小胞体に発現させ、ヒスタミン刺激に伴う、3 つの細胞内コンパートメントの Ca^{2+}動態を可視化することにも成功した。3 色で異なる細胞区画の Ca^{2+}動態をの生物発光にてイメージングしたのは世界的に見て初めての事例である。

第三章では、飲料水の硬度を簡便に評価することが可能なレシオメトリック型生物発光 Ca^{2+}・Mg^{2+}指示薬 LOTUS-W の開発に関して述べられている。本指示薬は Nluc、ヒト Centrin3(HsCen3)の Ca^{2+}/ Mg^{2+}結合ドメイ、黄色蛍光タンパク質 Venus をタンデムに連結したデザインを有する人工キメラタンパク質である。HsCen3 を利用した理由はカルモジュリンと異なり、Ca^{2+} と Mg^{2+}に対する解離定数が同程度であったからである。HsCen3 への Ca^{2+}/ Mg^{2+} 結合は構造変化を引き起こし、Nluc から Venus への BRET を誘導し、発光色を青色から黄色に変化した。LOTUS-W の Ca^{2+}と Mg^{2+}の解離定数はそれぞれ 2.1 mM と 4.7 mM であり、これらの値は家庭で利用される日用水中の水の硬度測定に適した

値であった。そこで WHO の定める水硬度の指標に沿って Ca^{2+}と Mg^{2+}の滴定実験を分光光度計を利用して行ったところ、確かに水硬度を計測可能であることが確かめられた。さらに、スマートフォンに搭載した CMOS カメラを用いて生物発光色の変化を測定した結果、分光光度計の場合同様に水硬度と指示薬の発光色変化が比例関係を示し、水硬度を計測可能であることが確かめられた。実際に市販のボトルウォーター14 種類の水硬度を LOTUS-W で評価することもできた。

総じて、本研究で開発された指示薬は、今までの生物発光型 Ca^{2+}・Mg^{2+}指示薬では困難であった中濃度から高濃度（10 μM~10 mM の濃度範囲）までの Ca^{2+}・Mg^{2+}の計測を可能にした。細胞内の異なる区画の Ca^{2+}・Mg^{2+}濃度動態の相関の理解や飲料水の水硬度を簡便・迅速・オンサイト検査する新規方法として科学的・産業的な普及が今後期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。