

## レドックスを視る

若林 憲一

細胞内の特定の物質の濃度をいかに測定するか、これは生物科学の幅広い研究領域における課題だろう。そのような測定対象の一つにレドックス (reduction-oxidation, 酸化還元) 状態がある。細胞内のレドックス状態は、還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの量比によって規定される酸化還元電位として表され、通常は「ほどほどに還元的」な $-300$  mV程度に保たれる。しかし、呼吸や光合成の活性変化などの内的要因、あるいは何らかの外的な要因によって、一過的に酸化的 (電位の上昇)、あるいは過還元的な状態 (同、下降) へ変化する。この変化によって誘導される細胞の応答反応をレドックス制御と呼ぶ。レドックス制御は酸化ストレス応答、老化、また光合成生物の酵素活性制御など、さまざまな研究領域で重要な概念である。

細胞内のレドックス状態変化をどのように検出するか、よく用いられる手法の一つはチオール基の修飾である。レドックス制御に関わるタンパク質の多くは、活性部位に二つのシステイン残基を含む。この部位の酸化 (ジスルフィド結合の形成) と還元 (ジチオールへの解離) の変化を検出するのである。まず、細胞を液体窒素やトリクロロ酢酸で固定し、全細胞タンパク質に対してマレイミド試薬処理を行う。マレイミドはチオール基を修飾するがジスルフィドには反応しないため、還元状態のタンパク質は酸化状態よりも分子量が大きくなる。これを電気泳動で判別する<sup>1)</sup>。しかし、細胞固定→薬剤処理→電気泳動→ウエスタンブロッティングという手順が必要であり、即時性がないのが欠点である。

細胞内レドックス状態をライブイメージングするという要請に最初に応えたのがroGFP、文字通りredox感受性の緑色蛍光タンパク質GFPである<sup>2)</sup>。発色団付近に導入された二つのシステイン残基が酸化されると488 nmの励起による蛍光が低減し、405 nmの励起による蛍光が増加する。この二つの蛍光強度比からレドックス状態が可視化できる。酸化還元電位が既知の溶液中の蛍光強度比データとの比較により定量も可能である。

roGFPをきっかけに、多くのレドックスセンサー蛍光タンパク質が開発された<sup>3)</sup>。それぞれ一長一短があるが、大きな問題となる短所はpH感受性である。GFPやその派生蛍光タンパク質の多くは蛍光強度がpHによっても変化してしまう。つまり、これらのセンサータンパク質

を発現した細胞が蛍光強度変化を見せたとしても、酸化還元電位とpHのどちらが変化したのか区別できない。

Oba-Q (Oxidation-balance sensed quenching proteins) はこの問題をクリアしたセンサーである<sup>4)</sup>。酸化されると蛍光が大きく低減し、かつ生理的な変動域のpHには非感受性である。しかし、励起波長ピークが1点であるという短所がある。細胞ごとに蛍光強度が異なる場合、蛍光が暗い細胞が「Oba-Q発現量が低い」のか「酸化されている」のか区別できない。同一細胞のレドックス状態変化の定性評価には優れるが、蛍光寿命イメージングなどの特別な観察を行わない限り、定量には向かない。

しかし、運用方法で短所を克服することもできる。Sugiuraらは細胞がもつ規則的な構造を利用した。運動するオルガネラ「鞭毛」の内部構造は、鞭毛を構成する微小管の長さ方向に周期的な構造をもつ。その中で、24 nm周期で配列しているタンパク質とOba-Qを連結させて、緑藻クラミドモナスに発現させた<sup>5)</sup>。この方法により、鞭毛の長さあたりに存在するOba-Q分子数を、個体によらず、ほぼ一定にした。つまり発現量の個体差の問題は解消された。そしてroGFPと同様に、精製したOba-Q発現鞭毛の蛍光を酸化還元電位が既知の溶液中で観察することにより、校正曲線が得られる。鞭毛の細胞質は細胞とつながっており、グルタチオンのような小分子は拡散で行き来できるため、酸化還元電位は鞭毛と細胞で共通と見なすことができる。生きたOba-Q発現細胞の鞭毛の蛍光を観察して校正曲線に照らし合わせることで、細胞内酸化還元電位の定量評価が可能になった。

レドックスに限らず、細胞内物質測定のためのセンサー開発は日進月歩である。しかし、すべての用途、すべての計測条件に適用可能な「完璧なセンサー」は望むべくもない。センサーを用いた細胞内測定のためには、その運用方法のセンスもまた磨かれなければならぬ。

- 1) Kobayashi, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11857 (1997).
- 2) Hanson, G. T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **279**, 13044 (2004).
- 3) Comini, M. A.: *Free Radical Res.*, **50**, 246 (2016).
- 4) Sugiura, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **457**, 242 (2015).
- 5) Sugiura, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 2083 (2018).