

論文内容の要旨

Genetically Encoded Bioluminescent Indicators for Spatio-Temporal Analysis of Cellular Signaling

(細胞シグナルの時空間生物発光検出法)

貝原 麻美

【背景と目的】

(Chapter 1)

細胞内シグナルのひとつであり様々な機能を担っている蛋白質間相互作用を検出することは、非常に重要であり、酵母 Two-hybrid 法の開発により多くの核近傍の蛋白質間相互作用が明らかにされてきた。その後、スプリットさせた β -galactosidase を用いる方法、プロテインスプライシングを用いる方法などが開発され検出対象となる蛋白質を拡張した。しかしながら、依然としてこれらの方法は、形成する蛋白質あるいはその基質から生成される化合物が安定であり細胞内に拡散することから、蛋白質間相互作用の時空間解析は不可能であった。本研究において、生きた細胞内において蛋白質間相互作用を *in vivo* 時空間解析可能にすることを目的として、ウミシイタケ発光蛋白質 *Renilla luciferase* の生物発光を用いた方法の開発を行なった (図 1)。

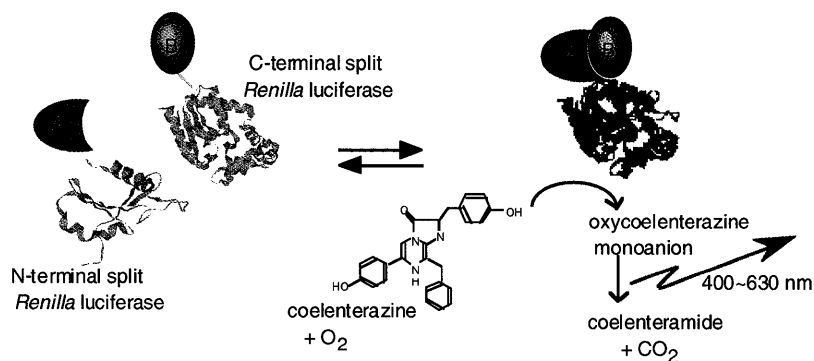


図1 蛋白質間相互作用発光検出法

生物発光酵素蛋白質である *Renilla luciferase* を N 末側と C 末側の二つに切断し、その各々に相互作用を起こす蛋白質を結合した融合蛋白質を作製し細胞内に導入する。蛋白質間での相互作用により二つに切断されている *Renilla luciferase* が近接し発光酵素活性が回復、その結果、基質 coelenterazine を酸化し発光させることを見い出した。細胞内シグナルにおいて重要な3つの蛋白質間相互作用を検出することにより、この生物発光が即時一過性であり、蛋白質間相互作用の時空間解析が可能になることを示した。分子量が小さく発現が容易な *Renilla luciferase* の ATP 非要求性発光酵素反応により酸化された細胞膜透過性の基質は近赤外領域まで波長がおよぶ光子を放出することから、本研究において開発した方法は細胞内のみならず生物個体内でも細胞内シグナルを検出することを可能にする方法である。

【研究内容】

(Chapter 2) 生細胞内における蛋白質間相互作用の空間解析

インスリンシグナル伝達に非常に重要であると考えられる IRS1 の 941 番目チロシンリン酸化部位周辺のアミノ酸ペプチド (Y941) と PI3K の p85 サブユニット SH2n ドメインの相互作用を検出した。細胞にインスリンを添加すると、ペプチドがリン酸化され相互作用が起こる。この相互作用により発光強度が増大する最適な *Renilla luciferase* の切断位置を見い出した。また、相互作用による *Renilla luciferase* の基質に対する発光酵素活性が可逆的であることを確認し、発光活性が Y941 のリン酸化による相互作用依存的であることを確認した。この生物発光が spontaneous で一過性であったことから、生きた細胞内においてインスリン添加による IRS1 と PI3kinase の SH2 ドメインの相互作用が細胞膜近傍のみでのみ起きていることを顕微鏡下で検出することに成功した (図 2)。

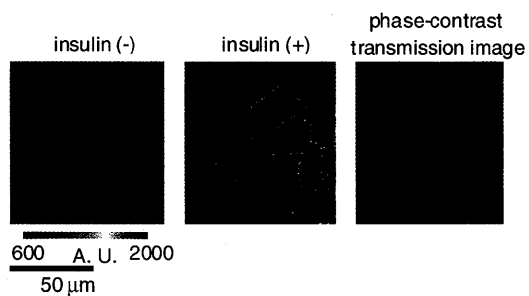


図2 IRS1 とSH2ドメイン相互作用の発光検出

(Chapter 3) 細胞内 Ca²⁺発光検出法

細胞内の Ca²⁺が引き起こす calmodulin と M13 の相互作用を split *Renilla luciferase* を用いて検出し、細胞内の Ca²⁺の濃度変化を発光強度の変化として検出した。N 末側 *Renilla luciferase* に calmodulin と M13 を介して C 末側 *Renilla luciferase* を直列に連結させた1つの融合蛋白質を作製し、MCF-7 細胞に発

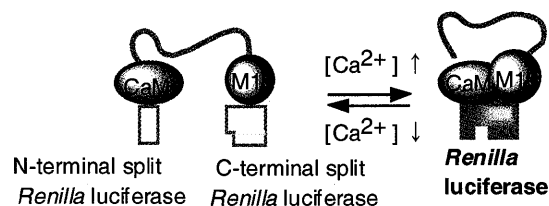


図3 細胞内Ca²⁺発光検出法

現させた (図 3)。細胞内 Ca²⁺濃度を一過性に上昇させることが知られている ATP あるいは histamine 添加した場合、発光強度の増大が検出された (図 4)。その増大は、非常にはやい一過

性の細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇に対応するものであった。本方法により細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を生物発光により検出することが可能になった。

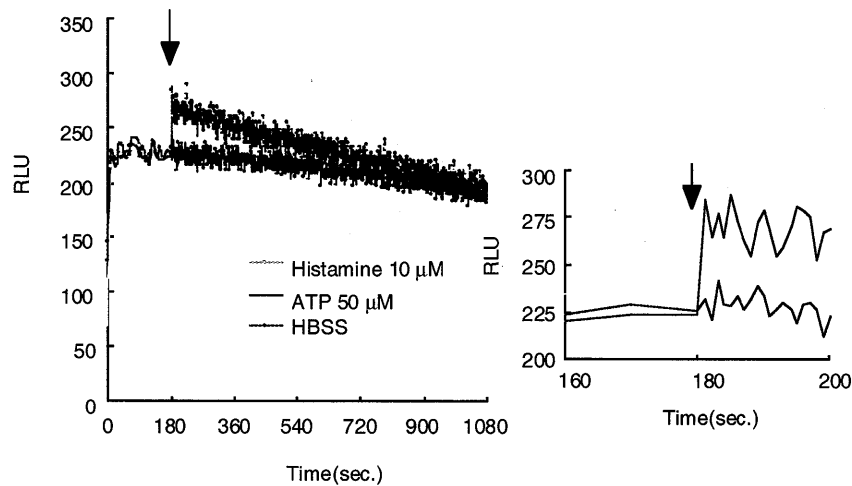


図4 細胞内 Ca^{2+} 発光検出

(Chapter 4) ERK2 の二量体形成過程の発光検出法

重要な細胞内シグナルの最下流の蛋白質 MAPK の一つである ERK2 の二量体形成過程を検出した。ERK2 は様々な情報伝達経路を介して Threonine と Tyrosine がリン酸化されることにより活性化する。リン酸化した ERK は二量体を形成し迅速に核内移行し、蛋白質の発現を調整する様々な蛋白質を基質としてリン酸化することで、細胞の分化、成長、癌化を制御している。従来の方法では、その二量体形成過程を検出することは不可能であった。本研究において、ERK2 の二量体を生物発光により細胞内において可視化する方法を開発した (図5)。

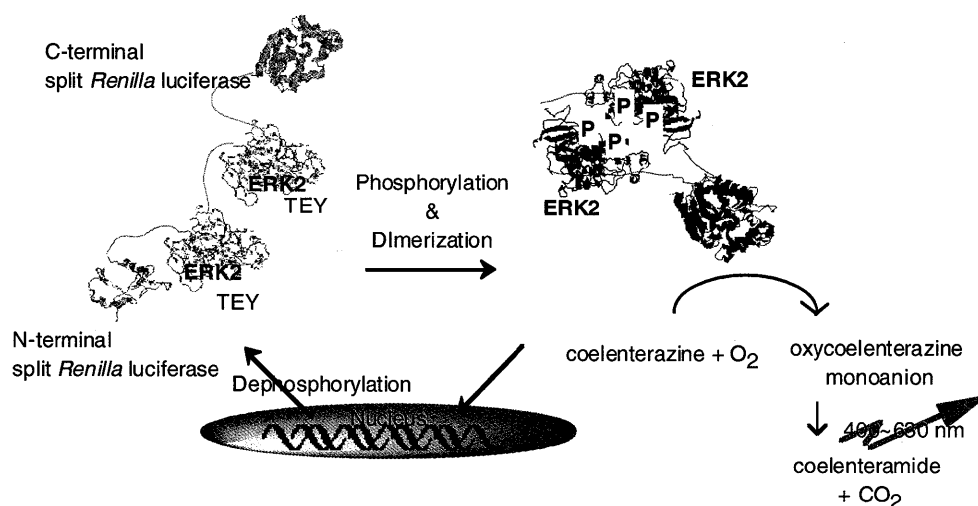


図5 ERK2の二量体形成過程の発光検出法

N 末側 *Renilla luciferase* に 2 つの ERK2 を介して C 末側 *Renilla luciferase* を直列に連結させた 融合蛋白質を作製した。ERK2 の二量体の形成により *Renilla luciferase* の N 末と C 末が近接し発

光酵素活性を回復する。本新規方法を導入した MCF-7 細胞を血清非存在下で培養し ERK2 を非活性化した後、内皮成長因子 (EGF) を添加したところ、ERK2 の二量化に伴う発光強度が増大することが確認できた (図 6)。生物発光により ERK2 の二量体形成過程を可視化する本プローブの開発は、ERK2 の活性を

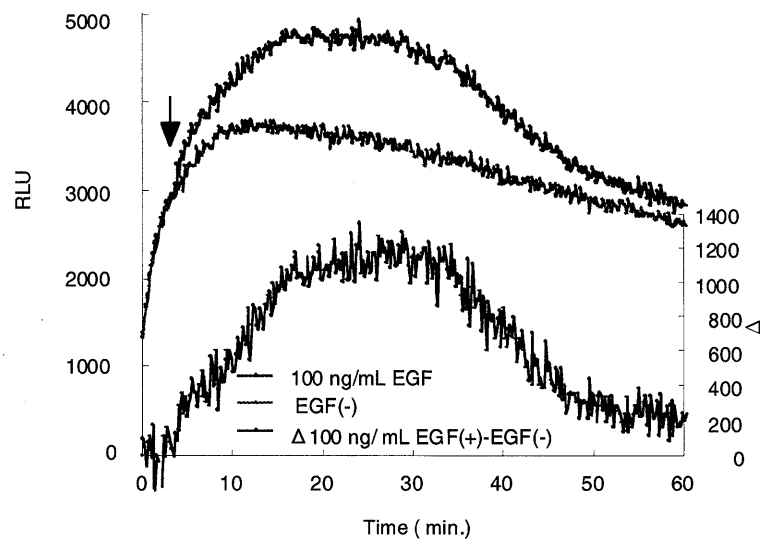


図6 ERK2の二量体形成過程の発光検出

検出する従来法とは異なる新規方法であり、MAPK の活性化による蛋白質発現調節機構に対して多くの新規知見を得ることが期待できる。

【まとめ】

(chapter 6)

生きた細胞内で、蛋白質間相互作用を時空間解析可能にする新規方法の開発を行ない、*Renilla luciferase* をスプリットさせて用いる生物発光検出法の開発に成功した。*Renilla luciferase* の生物発光は、その発光酵素活性に ATP を必要とせず、基質が 10^{-9} 秒以下で近赤外領域におよぶ波長の光子が放出することから、開発した方法は、蛋白質間相互作用を生きた細胞内において時空間解析するのみならず生物個体で蛋白質間相互作用を検出することも可能にする。インスリンシグナル経路における蛋白質間相互作用、細胞内の Ca^{2+} 依存的な蛋白質間相互作用、および乳癌細胞内における MAPK 経路の蛋白質の二量体形成過程を検出し、相互作用依存的な生物発光が即時一過性の生物発光であることを示した。本方法は様々な細胞内シグナルの可視化への応用が期待できる新規方法である。