

## 論文内容の要旨

### Genetically Encoded Intein-Based Probes for Monitoring Protein Dynamics in Living Subjects (インテインを利用した生体内タンパク質動態解析のための生物発光プローブ)

菅野 憲

#### 1. 序

生きた細胞内での様々な化学的プロセスにおいて、タンパク質間相互作用やタンパク質輸送は中心的な役割を担っている。現在我々が手にしている生命現象に対する知識の大半は生化学的分析法によってもたらされたものである。しかし、その手法は破壊分析であるため生きた細胞の動態に関する情報は損なわれている。当研究室では生きた細胞内のタンパク質動態を解析するため、インテインを用いた非破壊的分析手法を提案してきた。これまでにタンパク質間相互作用検出法のための蛍

光・発光プローブ、オルガネラ局在タンパク質同定のための蛍光プローブ、生物個体におけるタンパク質核内輸送検出のための発光プローブが当研究室から報告されている。インテインとはタンパク質スプライシング反応を触媒するポリペプチドである。タンパク質スプライシング反応とは、mRNA からタンパク質への翻訳後に、インテイン (intein) が切り出され隣接するエクステイン (extein) 同士が再連結する自己触媒反応である (図 1)。

本研究では、生きた細胞・個体でのタンパク質動態解析のために、インテインを利用した2つの新規発光タンパク質プローブの開発を行った。それらは、(1) タンパク質間相互作用検出のためのインテインを介したレポーター遺伝子プローブ、および (2) 生体のミトコンドリアからのタンパク質放出を検出するための発光プローブの2つである。両者とも、観測対象の現象が生起して初めて光シグナルを放出

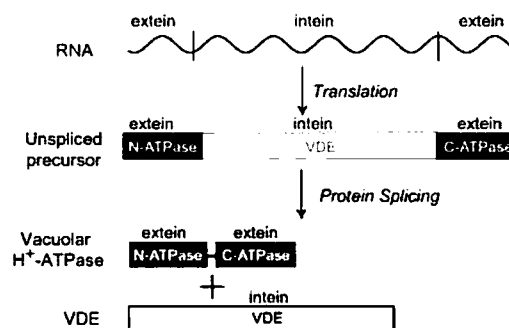


図 1. インテインによるタンパク質スプライシング反応。

する, という特性を有している.

## 2. タンパク質間相互作用検出のためのインテインを介したレポーター遺伝子プローブ

従来の非破壊的タンパク質間相互作用検出法の代表例として two-hybrid 法が挙げられる. この手法により多くの生命現象の解明されたのも事実であるが, 細胞の核外での相互作用, 分子メカニズムを同定・検出することはできない. 一方, タンパク質相補 (PCS)法を用いれば, 核外での相互作用も検出できるが, 得られるシグナルは微弱である. そこで, インテインとレポーター遺伝子とを組み合わせれば, 高感度に核外でのタンパク質間相互作用を検出できるのではないかと考えた.

検出原理を図 2 に示す. 特異的な DNA 配列に結合するタンパク質 modified LexA (mLexA)にインテイン DnaE の N 末側 (DnaEn)とタンパク質 X を繋げた融合タンパク質と, 転写活性化タンパク質 VP16AD に C 末側 DnaE (DnaEc)とタンパク質 Y を繋げた融合タンパク質を CHO-EGFR 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来)に発現させる. これと同時にタンパク質発現量の内部標準としてレニラルシフェラーゼ (Rluc)も共に発現させておく. X と Y が相互作用し, DnaE 同士が近接しスプライシング反応が起こると, 新たにキメラタンパク質 mLexA-VP16AD が生じ, 結果, レポーター遺伝子であるホタルルシフェラーゼ (Fluc)が mRNA へ転写される. まず, D-ルシフェリンを基質とする Fluc 由来の発光値 ( $L_F$ )を測定し, 続いてセレンテラジンを基質とする Rluc 由来の発光値 ( $L_R$ )を測定する. X-Y 相互作用の評価は, 相対発光値 (RLU;  $RLU = L_F / L_R$ )を基準に行う.

まず 3 種のタンパク質対をモデルとし, 相互作用に基づく RLU の変化を観察した. (i) 上皮増殖因子 (EGF)存在下で相互作用する Ras-Raf-1, (ii) 恒常的に相互作用する RasV12-Raf-1, (iii) いかなる場合にも相互作用しない Ras-delRaf-1 の 3 種である. 発光測定の結果, 相互作用する組合せでは 30 から 40 の RLU が, 相互作用しない組合せでは 10 以下の RLU が観察された (図 3).

これは, 本プローブを用いてタンパク質間相互作用の検出が可能であることを示している. 次に, Ras-Raf-1 相互作用検出を通して従来のタンパク質間相互作用検出法と本手法とを対比することで, 用いたインテインの役割を明らかにしようと考えた. Two-hybrid 法 (白抜き円), PCS 法 (黒三角)では EGF 濃度依存的な RLU 変化は観察されなかった (図 4). 本手法 (黒四角)では, RLU が  $10^{-9}$  M EGF から上昇し始め,  $10^{-7}$  M EGF で飽和に達した. 当研究室から報告されている Fluc のタンパク質再構成 (PRS)法 (灰色三角)では EGF 濃度に応じた若干の RLU 上昇が観察されたが (図 5b), そのシグナル強度は本手法で得られた 1/500 程度の RLU であった (図 5a). 従って, インテインとレポーター遺伝子を用いる

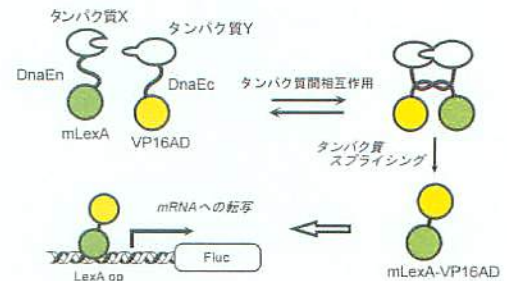


図 2. インテインを介したレポーター遺伝子アッセイ.

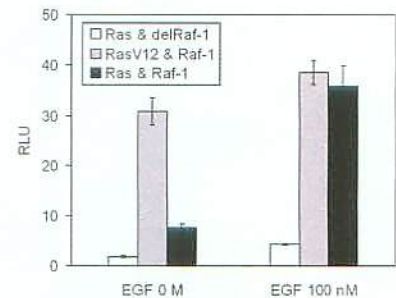


図 3. タンパク質間相互作用に基づく生物発光.

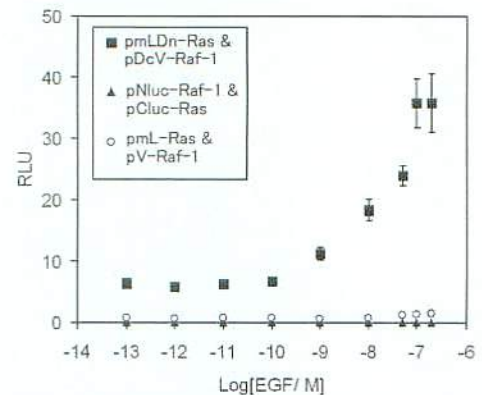


図 4. Two-hybrid 法, PCS 法と本手法の比較.

ことで、従来法では検出困難であった細胞膜近傍での Ras-Raf-1 相互作用を高感度に検出することができたと言える。また本プローブは EGF 刺激の濃度の違いによる相互作用の程度の差異を区別できると考えられる。

本検出法ではレポーター遺伝子に Fluc の cDNA を用いたが、これを緑色蛍光タンパク質 (GFP) の cDNA に置き換え、蛍光標式細胞分取器を用いることで、大量の未知のタンパク質間相互作用同定や特定のタンパク質間相互作用に影響を与える薬剤候補のスクリーニングが行える可能性を示唆している。

### 3. 生体のミトコンドリアからのタンパク質放出を検出するための発光プローブ

タンパク質の局在変化を調べる際、対象のタンパク質を GFP 等で蛍光標識し、顕微鏡下で観察する手法が広く使われている。しかし、この方法では一度に観察できる細胞数は限られる上、曖昧な局在変化の判定に陥りやすい。そこで本研究では、顕微鏡下での観察を必要としない、タンパク質局在が変化して初めて光シグナルを発する発光タンパク質プローブの開発を目指した。そのモデルとしてミトコンドリアタンパク質 Smac/DIABLO を選んだ。

ミトコンドリアに局在する cytochrome *c* や Smac/DIABLO などのタンパク質がアポトーシス過程の初段において、細胞質へ放出されることが知られている。この Smac/DIABLO に Rluc(1-229) (RlucN) と DnaEn を連結させたタンパク質 (N 末プローブ) と、Rluc(230-311) (RlucC) と DnaEc を連結したタンパク質 (C 末プローブ) を MCF-7 細胞 (ヒト乳ガン由来) に発現させる (図 6)。アポトーシスを誘導する化学物質スタウロスポリン (STS) により N 末プローブがミトコンドリアから細胞質中へ放出されると、細胞質中の C 末プローブに近接し、スプライシング反応が起きる。このとき Rluc が再構成されるため、セレンテラジンを用いれば発光値 ( $L$ ) を測定できる。続いて細胞の全タンパク質量 ( $m$ ) を測定して RLU ( $= L/m$ ) を算出し、これを N 末プローブ放出の評価に用いる。

初めに、STS 刺激前後での N 末プローブの細胞内局在を調べた。図 7a-7c に示すように、STS 刺激以前は N 末プローブが主にミトコンドリアに局在し、刺激から 1 時間も経過すれば細胞質中へ移行することが分かった。次に STS 刺激の後、発光測定を行った。このとき N 末、C 末プローブを発現している MCF-7 細胞は破碎することなく生きてまま測定に用いた。図 8 は刺激後に RLU が増加したことを示している。これと図 7a-7c と照らし合わせると、この RLU 増加は STS 刺激に誘起される N 末プローブの細胞質中への放出に基づくものと考えられる。

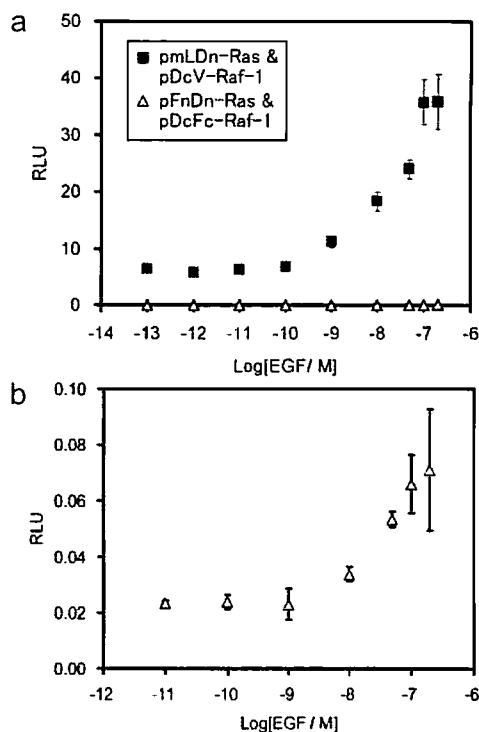


図 5. PRS 法との比較. (a) 本手法との比較. (b) (a)の拡大図.

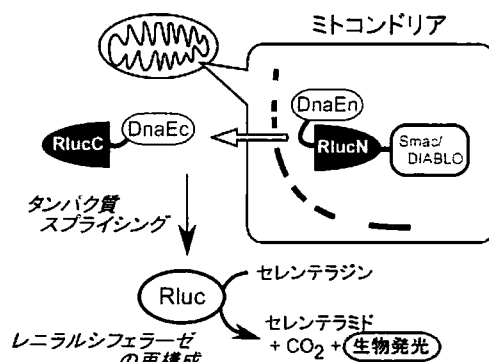


図 6. 本手法の検出原理.

さらに生物個体レベルで、この現象を観察できるか検証した。N 末、C 末プローブを発現した MCF-7 細胞をマウスの右後肢付近に、全長 Rluc を発現した MCF-7 細胞を左後肢付近に移植した。マウスの体重 (kg) あたり 10  $\mu$ g の STS を腹腔に注射したのち、移植箇所付近の発光値を冷却 CCD にて測定した。そして RLU ( $= L_R / L_L$ ) を算出し (図 9a)、生きたマウスでの N 末プローブ放出の評価を行った。結果は、刺激直後の RLU に対する各測定時間での RLU 比として図 9b に示す。RLU 比の上昇と、図 8 の結果との良い一致は、本検出法が生物個体レベルでの観察にも応用可能であることを意味している。

本研究において、分割 Rluc をインテインにより再構成させる手法で、細胞質への Smac/DIABLO 放出のスクリーニング法を確立した。これは培養細胞のみならず、生きたマウスでも Smac/DIABLO 放出の検出を可能にした。本手法の概念は他のオルガネラタンパク質へも適用可能であると考えられる。また、Smac/DIABLO はガンなどの病変に関わりがあることから、本手法は、新規薬剤候補や細胞毒性を持つ化学物質のスクリーニングへの応用も期待できる。さらに、本プローブを全身に発現しているトランスジェニックマウスを作製することで、成長過程において見られるアポトーシスの検出という展開も考えられる。

#### 4. まとめ

本研究を通じ、(1) タンパク質間相互作用検出のためのインテインを介したレポーター遺伝子プローブ、(2) 生体のミトコンドリアからのタンパク質放出を検出するための発光プローブ、の開発に成功した。(1) はインテインとレポーター遺伝子アッセイとを組み合わせることで、従来の two-hybrid 法、PCS 法では評価できない EGF 依存的 Ras-Raf-1 相互作用検出を可能にした。また本手法は当研究室すでに報告されている分割 Fluc の PRS 法よりも高感度な検出法である。さらに本手法の応用例として、未知のタンパク質間相互作用同定や、特定のタンパク質間相互作用に影響を与える物質のスクリーニングも考えられる。(2) ではインテインと分割 Rluc を利用し、生きた細胞・個体レベルでの STS に誘起される Smac/DIABLO 放出の検出に成功した。応用例として、新規薬剤候補や有毒な物質のスクリーニングが考えられる。また、本プローブを発現しているトランスジェニックマウスの作製により、新たな生命現象の解明への期待も高まると言える。

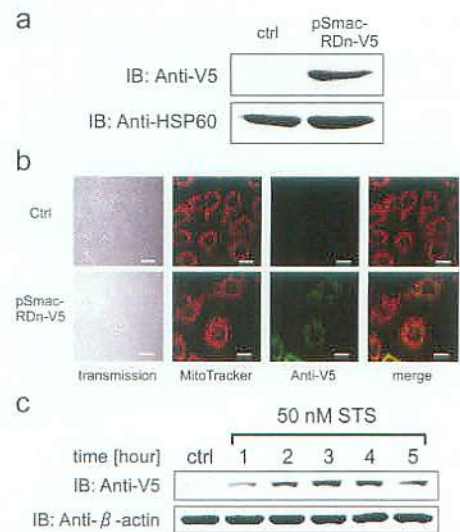


図 7. N 末プローブの細胞内局在。(a) STS 刺激前のミトコンドリア画分のウェスタンブロットティングと(b)免疫染色 (白線 20  $\mu$ m). (c) 刺激前後の細胞質画分のウェスタンブロットティング。

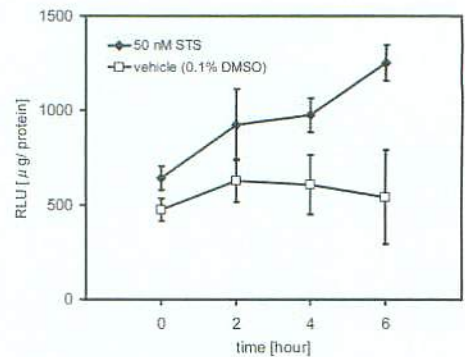


図 8. STS 刺激下での RLU 変化。

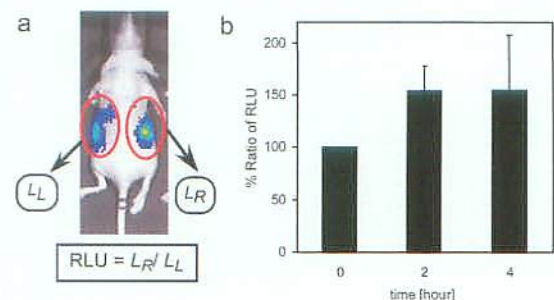


図 9. マウスの発光測定。(a) RLU 算出方法。(b) RLU 比。