

論文題目

哺乳細胞内におけるタンパク質間相互作用を観測するための新規 In-cell NMR 測定法の開発

氏名 荻野新治

【序】

細胞内では、膜タンパク質や、細胞骨格、細胞小器官などの構造体が、様々なタンパク質や補因子を保持しており、機能的な複合体としてその役割を担っている。そのため、生命現象の発動をタンパク質間相互作用の観点で解析する場合、機能を発揮する環境にある、よりインタクトに近い状態を構造生物学的対象とすることが望まれる。しかし、一般的な構造生物学的な解析では、高い純度のサンプルが解析対象となり、精製過程を必要とするため、構造体やタンパク質複合体を維持したまま調製することは困難である。また、膜タンパク質は、界面活性剤中では安定性が著しく低下するため試料調製が問題となるケースが多い。その一方で NMR 法は、生体試料に対し非侵襲測定が可能であり、また、安定同位体標識により解析対象のみを選択的に観測可能であるという他の構造生物学的解析法には無い特長を持っている。そのため、細胞をそのまま用いて、細胞内におけるタンパク質の立体構造・相互作用解析への適用が可能である。特に、動物細胞内における高次生命現象を、インタクトに近い状態にて構造的に解析することができれば、創薬へと応用する道も開かれる。そこで、本研究では、哺乳細胞を用いて、細胞内におけるタンパク質-タンパク質間の相互作用を検出するための NMR 測定法の開発を目的とした。

【方法】

細胞調製方法の戦略とモデル相互作用系

細胞内にてアミノ酸残基毎の NMR シグナルを観測するためには、安定同位体標識を施した観測対象タンパク質を数 10  $\mu$ M 程度細胞内に存在させる必要がある。これまでに、大腸菌内に過剰発現させた場合、および *Xenopus laevis* oocyte 内に microinjection した場合において、細胞内 NMR シグナルの観測が報告されているが、いずれの方法も哺乳細胞に対する適用は困難であるため、新たな手法が必要となる。そこで特別な装置を必要とせず、様々な種類の哺乳細胞に対して汎用性の高い手法として、セミインタクト細胞の調製に用いられる streptolysin O (SLO) に注目した。SLO は、コレステロールと結合して形質膜上にポアを形成し、細胞骨格や細胞内構造を保持した状態で、細胞質成分を自由に交換することを可能とする。SLO が形成するポアの直径は約 30 nm であり、抗体 (150

kDa) の導入が確認されているため、通常、NMR 観測対象となる 30 kDa 以下のタンパク質の導入は可能と判断した。また、SLO により形成した形質膜上のポアは、細胞外に  $\text{Ca}^{2+}$  を添加することにより、再び塞がれる (reseal) ことが報告されている。そこで、SLO 処理と reseal を組み合わせることにより、細胞内部のみのタンパク質に由来する NMR シグナルを選択的に観測するための細胞調製方法の確立を目指した (Fig.1)。

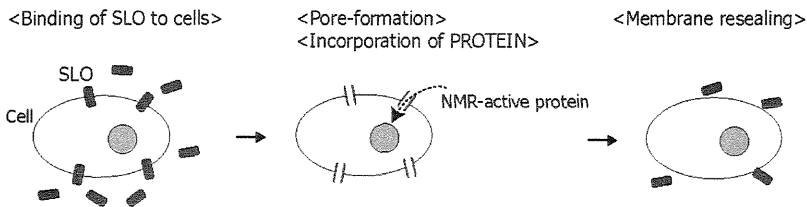


Fig.1 細胞調製方法の概略

細胞膜に対する SLO の結合、NMR 観測対象タンパク質 (あるいは、FITC 標識タンパク質) の導入、 $\text{Ca}^{2+}$  添加による細胞膜の再生 (resealing) のステップから成る。

細胞内にて NMR 観測および相互作用解析を行うためのモデル系として、G-actin と相互作用する Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) を用いた。T $\beta$ 4 は、43 アミノ酸残基から成る、分子量約 5 kDa のタンパク質であり、細胞内に導入した場合に内在性 G-actin との相互作用が観測されることを期待した。T $\beta$ 4 は、大腸菌により発現・精製したものをを用いた。細胞は、浮遊培養に適応させた 293F 細胞を用いた。

### 【結果および考察】

#### 細胞内 NMR 観測のための細胞試料の調製方法の確立

まず、 $10^7$  個程度の大量の細胞を SLO 処理し、NMR 観測可能な分子数の T $\beta$ 4 を導入するための細胞の調製条件を、Fluorescein isothiocyanate (FITC) にて蛍光標識した T $\beta$ 4 の導入を指標として検討した。Resealing の成否は、細胞調製後に、細胞膜非透過性の核染色試薬である Propidium iodide (PI) を添加して、染色されるか否かにて判断した。フローサイトメトリーにて FITC-positive/PI-negative の細胞集団が最も多く得られる条件を決定した (Fig.2a)。また、導入した FITC 標識 T $\beta$ 4 を共焦点蛍光顕微鏡にて観測した結果、細胞内に分布していたことから、細胞内アクチンと相互作用可能な状態にて存在することが示された (Fig.2b)。次に、細胞内 T $\beta$ 4 導入量の見積もりを行った。SLO 非添加時と添加時の FITC の蛍光強度 (蛍光波長 518 nm) の差より FITC-T $\beta$ 4 導入量を算出した結果、平均の細胞内濃度は 50  $\mu\text{M}$  程度であったことから、NMR 測定に適用可能な量の T $\beta$ 4 が細胞内に導入されたと判断した (Fig.2c)。

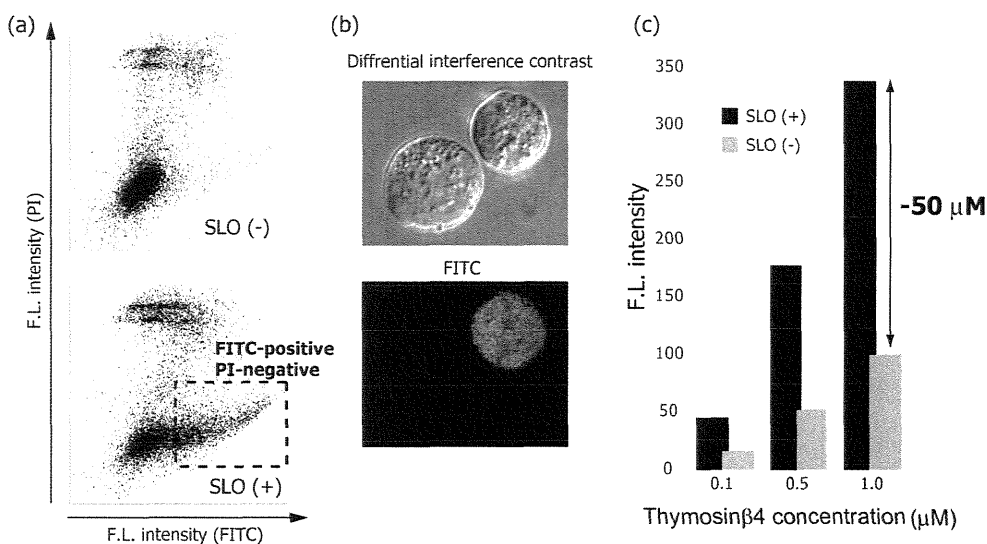
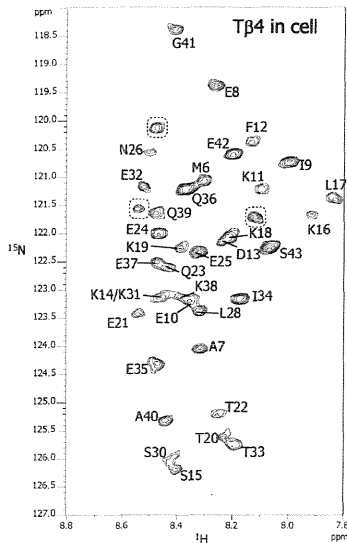


Fig.2 (a) 細胞調製時のフローサイトメトリーのプロファイル。SLO 非添加時(上)、SLO 添加時(下)。破線枠内の領域の細胞が、T $\beta$ 4 が導入された細胞集団を示す。(b) 細胞内に導入した T $\beta$ 4 の蛍光顕微鏡像。右上の細胞に FITC-T $\beta$ 4 が導入されている。(c) 細胞内 T $\beta$ 4 導入量の見積もり。横軸は、導入時に細胞外に添加した T $\beta$ 4 濃度を示す。SLO 非添加時と添加時の蛍光強度の差から、細胞内 T $\beta$ 4 導入量を算出した。



最適化した条件を用いて  $[ul-^{15}N]$  T $\beta$ 4 を導入した細胞の  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトルを測定した結果、10 時間の測定にて十分な S/N 比のスペクトルが観測された (Fig.3)。測定後の細胞をスピンドウンした後の上清成分の NMR スペクトルを測定した結果、細胞を用いた測定時と比較してシグナル面積が、1/10 程度であったことから、細胞を用いた場合に観測されたスペクトルは、細胞内に存在する T $\beta$ 4 に由来すると考えた。

Fig.3 細胞内 T $\beta$ 4 の  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトル。

図中、破線にて囲んだシグナルは、緩衝液中にて観測されるシグナルと、顕著に異なる化学シフトを与えている。その他のシグナルについては、同程度の化学シフトであったため、帰属を入れている。

### 細胞内に導入した Thymosin $\beta$ 4 の N 末端アセチル化修飾

細胞内に導入した T $\beta$ 4 と内在性 G-actin との間の相互作用の検出を行うため、細胞内にて測定した場合とバッファー中にて測定した場合の  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトルを比較した。両者の間に、多くのシグナルに線幅未満のわずかな化学シフト差が観測される一方で、N 末端に近い K3, D5 では線幅以上の大きな変化が観測された (Fig.4(a))。細胞内にて測定した T $\beta$ 4 のスペクトルには、バッファー中では観測されない特徴的な化学シフトに 3 個のシグナルが観測された (Fig.4(a)拡大図)。K3, D5 の明らかに大きな化学シフト変化を説明する上で、G-actin との相互作用以外の寄与を考慮に入れる必要があると考えた。

生体内に発現した T $\beta$ 4 は、翻訳開始メチオニンが切断され、N 末端となったセリン残基がアセチル化修飾を受ける。そのため、K3, D5 など N 末端にのみ観測されている顕著な化学シフト差が、細胞内に導入した T $\beta$ 4 の N 末端アセチル化修飾を反映している可能性を検証した。化学合成した N 末端アセチル化 T $\beta$ 4 の天然存在比の  $^{15}N$  を用いて  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトルを測定した。その結果、細胞内にて特徴的な化学シフトに観測されたシグナルは、アセチル化 T $\beta$ 4 のスペクトル上においても観測された (Fig.4(b))。このことから、細胞内に導入された T $\beta$ 4 が、生体内に発現した T $\beta$ 4 と同様に、N 末端アセチル化の翻訳後修飾を受けたことが明らかとなった。

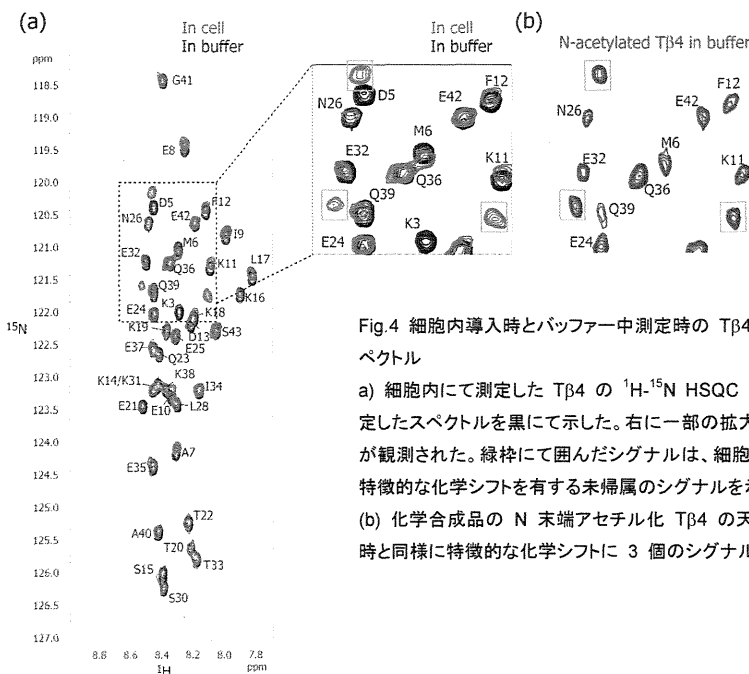


Fig.4 細胞内導入時とバッファー中測定時の T $\beta$ 4 と N 末端アセチル化 T $\beta$ 4 の  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトル

a) 細胞内にて測定した T $\beta$ 4 の  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトルを赤にて示し、HBSS バッファー中にて測定したスペクトルを黒にて示した。右に一部の拡大図を示した。K3, D5 は、線幅以上の化学シフト差が観測された。緑枠にて囲んだシグナルは、細胞内測定時において、バッファー中には観測されない特徴的な化学シフトを有する未帰属のシグナルを示す。

(b) 化学合成品の N 末端アセチル化 T $\beta$ 4 の天然存在比  $^1H-^{15}N$  HSQC スペクトル。細胞内測定時と同様に特徴的な化学シフトに 3 個のシグナルが観測された (緑枠内)。

細胞内に導入した Thymosin $\beta$ 4 と内在性 G-actin との間の相互作用の検出

細胞内にて測定した場合に、T $\beta$ 4 の N 末端アセチル化以外に、内在性 G-actin との相互作用が検出されるか否かを調べるため、各アミノ酸残基について、細胞内にて測定した場合とバッファー中にて測定した場合の化学シフト変化量を算出した (Fig.5(a))。N 末端のアセチル化に伴う化学シフト変化も同様に示すと、E10 より N 末端側の領域にて比較的大きな化学シフト変化が集中した (Fig.5(b))。細胞内測定時に観測される化学シフト変化についても、N 末端側の同領域には、N 末端アセチル化の影響を少なくとも反映しているため、その他の領域に観測される化学シフト変化から、内在性 G-actin との相互作用の検出が可能と考えた。その内、T22, Q23, N26 にて比較的大きな化学シフト変化が観測された。次に、観測された化学シフト変化が、内在性 G-actin との相互作用に由来するか否かを調べるため、バッファー中の T $\beta$ 4 に対して、G-actin を添加した場合と細胞内にて測定した場合に観測された化学シフト変化のパターンを比較した。

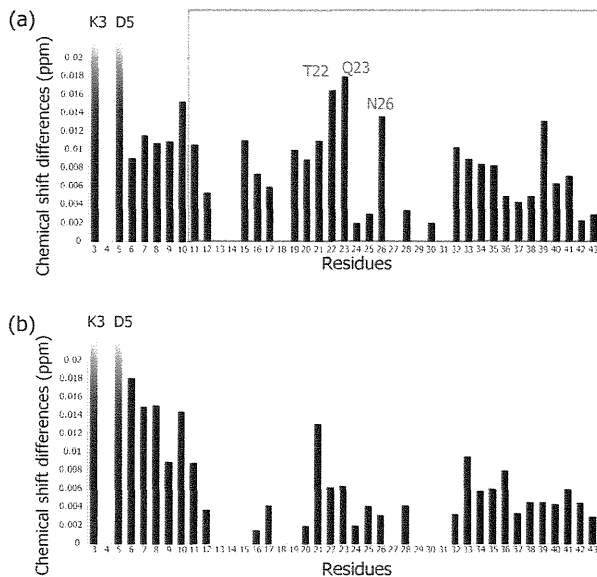


Fig.5 (a) 細胞内導入に伴って観測された化学シフト差、(b) N 末端アセチル化による化学シフト差

(a) 細胞内にて測定した場合と HBSS バッファー中にて測定した場合の化学シフト差を算出して、各アミノ酸残基について棒グラフにて示した。赤にて囲んだ領域は、N 末端のアセチル化による化学環境の変化の影響を受けていないと考えられる領域。その中で、T22, Q23, N26 は比較的大きな化学シフト差を示した。

(b) 化学合成品の N 末端アセチル化 T $\beta$ 4 の天然存在比  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルに観測されたシグナルと大腸菌にて発現精製した T $\beta$ 4 を HBSS バッファー中にて測定した場合の化学シフト差を算出して、各アミノ酸残基について棒グラフにて示した。比較的大きな化学シフト差が観測されている N 末端領域を黄色の網掛けにて示した。(a) についても同様に着色した。

生体内の G-actin には ATP 結合型 ( $G_T$ ) と ADP 結合型 ( $G_D$ ) が存在しているため、それぞれを均一  $^{15}\text{N}$  標識 T $\beta$ 4 に対して滴定した。50  $\mu\text{M}$  の T $\beta$ 4 に対して、10  $\mu\text{M}$  の  $G_T$  あるいは  $G_D$  を滴定した結果、 $G_T$  の結合に伴うスペクトルの変化は、NMR のタイムスケールと比較して遅く、観測される化学シフト差は、シグナルの線幅以上の大きな変化であった。一方、 $G_D$  の結合に伴うスペクトルの変化は、NMR タイムスケールと比較して速い交換であり、細胞内導入時に観測される化学シフト差を説明可能な変化であった。細胞内測定時に比較的大きな変化が観測された T22, Q23, および N26 のシグナルについて、細胞内測定時に観測された変化と、 $G_D$  添加に伴うシグナルの変化を比較した結果、化学シフト変化のパターンは、両者の間にて良く似ていた (Fig.6)。このことは、細胞内におけるこれらの残基の化学シフト変化が、 $G_D$  との相互作用を反映していることを示す。

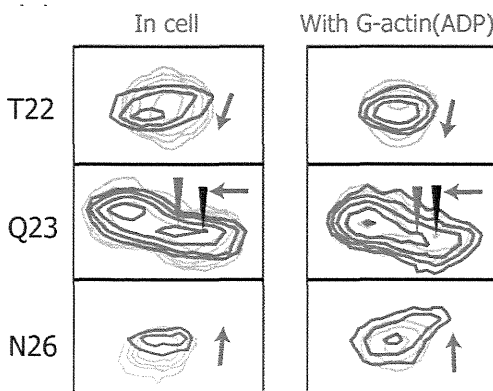


Fig.6 細胞内測定時と ADP 型 G-actin 滴定時に観測されたシグナルの変化の比較  
細胞内導入時に比較的大きな化学シフト変化を示した T22, Q23, N26 についての比較。細胞内測定時(左)、ADP 型 G-actin 滴定時(右)のシグナルを赤にて示し、観測された変化の方向を赤矢印にて示した。

## 【総括】

本研究において、哺乳細胞内にタンパク質を導入し、細胞内にて NMR 解析するための細胞試料の調製方法を確立した。細胞内に導入した T $\beta$ 4 に由来する NMR シグナルの観測に成功し、T $\beta$ 4 が内在性の ADP 型 G-actin と相互作用していることも示した。さらに、細胞内に導入した T $\beta$ 4 が細胞内で N 末端のアセチル化修飾を受けることも判明した。以上の結果は、導入した T $\beta$ 4 の NMR シグナルがインタクトに近い環境にて観測されていることを示す。したがって本手法を適用することにより、生体内の状態を保ったまま、膜タンパク質やタンパク質複合体とリガンドとの間の相互作用解析が可能と考える。また、今回観測されたアセチル化のみならず、リン酸化など翻訳後修飾をアミノ酸残基レベルにて経時的・定量的な解析を行う上でも有用な手法であると考えられる。