

# 光プローブの新たなデザインと生体機能の可視化

小澤 岳昌

自然科学研究機構 分子科学研究所・科学技術振興機構 さきがけ研究員

## 要約

生体内におけるタンパク質間相互作用やタンパク質の局在及びその動態は、生物の高次機能を解明する上で重要なターゲットである。現在タンパク質の機能解析は、細胞をすりつぶして検出するいわゆる破壊分析に依存しており、真の生理機能が発現している“生きている状態”を反映した分析は容易ではない。我々は、二分した蛍光・発光タンパク質を再構成させる独自の技術を利用して、生きた細胞や動物個体内におけるタンパク質の機能や動態を解析する新しいイメージング法を開発している。本発表では、蛍光・発光タンパク質の再構成法について概説し、細胞内オルガネラ局在タンパク質の解析法、ミトコンドリア mRNA のイメージング法、マウス個体内におけるタンパク質の動態解析法を紹介する。

## 1. 要素技術

プロテインスプライシング反応を利用したタンパク質再構成システム(protein reconstitution system)という新しい概念を創案した。プロテインスプライシングとは、mRNA から一本のポリペプチド鎖が形成された後、介在ペプチド(intein)が抜け落ち、その N 末側と C 末側のペプチド鎖(extein)が組み継ぎ反応を起こす現象をいう(図 1)。我々は、緑色蛍光タンパク質(GFP)あるいは生物発光タンパク質(luciferase)を特定の位置で二分するとその蛍光・生物発光能が失われるが、二分したタンパク質を extein として intein に連結すると、スプライシング反応によりタンパク質の再連結が起り、再び蛍光・生物発光能が回復する現象を見いたしました。

## 2. ミトコンドリア局在タンパク質の網羅的検出

EGFP(Enhanced GFP)再構成システムを利用して、ミトコンドリア局在タンパク質を網羅解析する方法を開発した(図 2)。Intein(DnaE)のC末に EGFP のC末

を連結して、培養細胞のミトコンドリア内に予め局在化させる。一方試験タンパク質を EGFP のN末と DnaE のN末に連結する。試験タンパク質がミトコンドリアに局在すると、DnaE のN末とC末がミトコンドリア内で近接スプライシング反応が起こる。その結果、ミトコンドリア内で EGFP が形成される。試験タンパク質として cDNA ライブラリーを用いた。C 末側プローブが発現している細胞に、N 末側プローブを連結した cDNA ライブラリーを導入した。細胞を 5 日間培養後、ミトコンドリアが蛍光性の細胞を FACS を用いて回収した。蛍光性細胞に含まれる cDNA の遺伝子解析を行った結果、既知のミトコンドリアタンパク質に加え、新規ミトコンドリアタンパク質を同定することに成功した。開発した方法は、オルガネラ局在タンパク質を遺伝子から同定する新たな方法となる。

## 3. ミトコンドリア mRNA の検出法

塩基配列特異的に mRNA を認識検出する蛍光タンパク質プローブを分子設計し、生きた細胞内 RNA の動態を時空間解析する方法を開発した。標的とする RNA は、ミトコンドリアゲノムから合成される NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)mRNA とした。RNA 結合タンパク質 Pumilio(wtPUM)の核酸認識アミノ酸に mutation を加え、ND6 mRNA を特異的に認識する mutant PUM(mPUM1, mPUM2)を作製した(図 3)。この mPUM1 と mPUM2 それぞれに、split した EGFP を連結した。mRNA の発現に伴い mRNA-mPUM1-mPUM2 三元錯体が形成される。この時 split した EGFP が再構成され蛍光が回復する。EGFP の蛍光シグナルから mRNA の局在を蛍光顕微鏡により解析した。RNA はミトコンドリアに一様に局在するが、ミトコンドリアゲノム近傍に多く局在することが分かった。次に photobleaching 法を用いて、ミトコンドリア内における mRNA の動態観察を行った。そ

の結果、ミトコンドリアmRNAは自由に拡散移動できず、ミトコンドリア内で固定化された状態であること発見した。開発した分子は、細胞内の mRNA の局在と動態観察が可能な一般性を有する mRNA 検出プローブである。

#### 4. マウス個体内のタンパク質核内移行検出法

細胞外刺激や環境の変化に伴い、タンパク質は核内外を移行する。化学物質刺激に伴う男性ホルモン受容体(AR)のサイトゾルから核内への移行を、luciferase の再構成により定量・検出するプローブ分子を開発した。Intein(DnaE)のN末に luciferase のN末(RLuc-N)と核移行シグナル配列(NLS)を連結し、あらかじめ核内に局在させる(図 4)。luciferase のC末側(RLuc-C)には DnaE のC末側と AR を連結し、サイトゾルに局在させる。細胞に男性ホルモン(DHT)を添加すると、AR は DHT に結合して核内に移行する。この時 DnaE のN末とC末が相互作用して luciferase の発光能が回復する。DHT を 10pM から 10μM まで細胞に添加したところ、luciferase の発光強度は濃度依存的に増大した。また、プローブを導入した細胞をマウス個体に移植し、マウス個体内での AR の核内移行を低侵襲的に検出できることを実証した(図 4 下)。開発した方法は、ARに限らずタンパク質のオルガネラ内外を移行するタンパク質一般に応用可能である。

#### 5. まとめ

二分した蛍光・発光タンパク質を再構成させる方法は、2 分子間の化学反応により光情報変換できる重要な特徴を有する。従って、試験管内から動物個体内の生体分子を可視化できるため、様々な生体分子の機能解析に応用可能である。

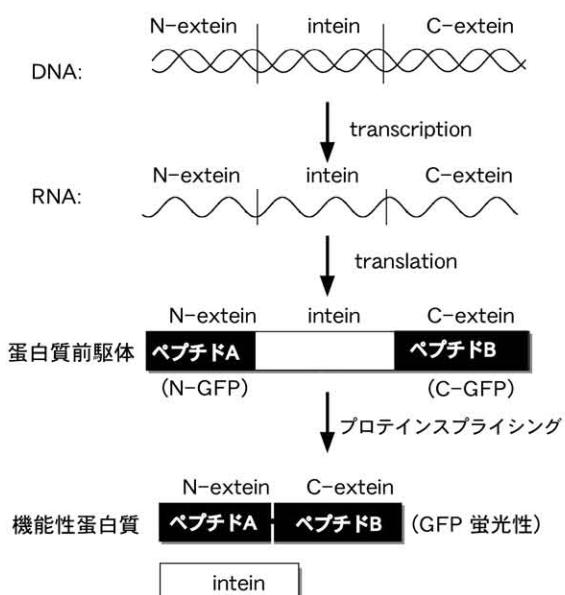


図1 プロテインスプライシングの原理

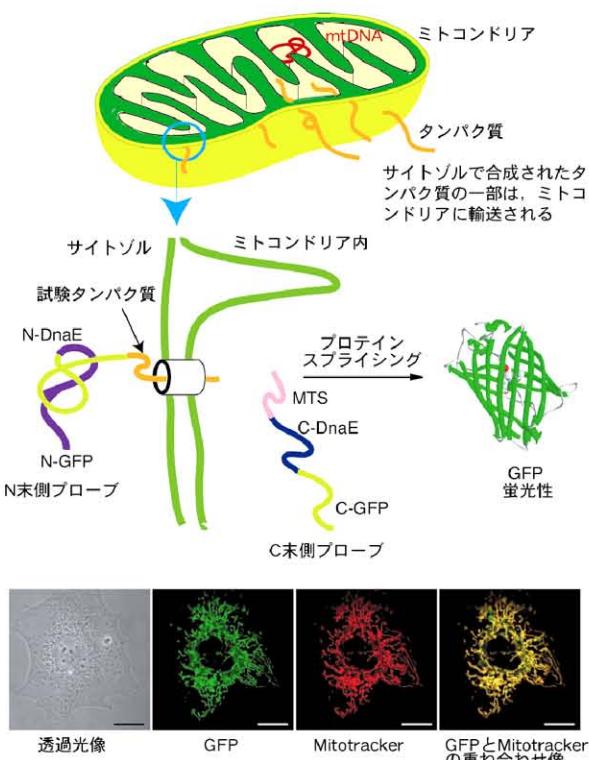


図2 (上)ミトコンドリア局在タンパク質同定法の原理。試験タンパク質がサイトソルからミトコンドリアに移行すると、インテイン(この場合 DnaE)間で相互作用する。N-GFP と C-GFP がスプライシングにより組み継がれ、GFP が再構成される。

MTS:ミトコンドリア局在化シグナルペプチド

(下)ミトコンドリア内で形成された GFP。

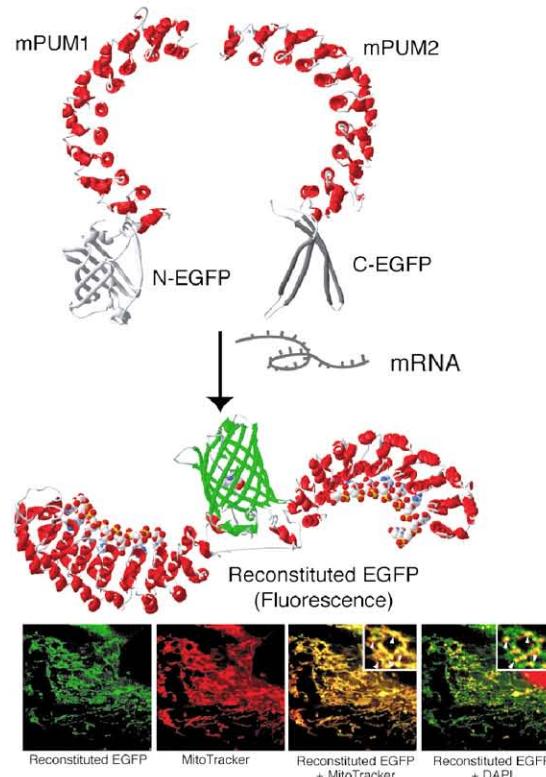


図3 mRNA 可視化プローブの原理(上)と ND6mRNA のミトコンドリア内局在(下)。

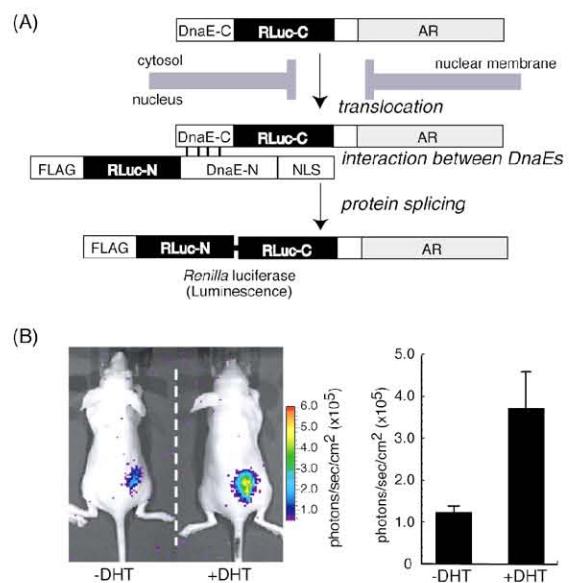


図4 Renilla luciferase 再構成システムを利用した AR 核内移行検出法。(A)基本原理。AR が核内に移行すると、DnaE-N と DnaE-C が相互作用してプロテインスプライシング反応が起こる。その結果、活性を有する renilla luciferase が形成され、発光検出が可能となる。(B)生きたマウス個体内(皮下)における AR 核内移行の検出。男性ホルモン DHT の添加に伴う AR の核内移行を、発光検出することができる。