

タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立

小澤 岳昌

自然科学研究機構分子科学研究所

概要

環境変化等の細胞外刺激が引き起こす遺伝子の発現とタンパク質の細胞内諸器官(オルガネラ)への移行は、細胞が効率的かつ協調的に機能するための重要な仕組みである。オルガネラ特有の機能を解明するためには、細胞が生きた状態で、オルガネラに局在する生体分子の機能を解析する新たな技術が必用である。本研究では、二分した蛍光あるいは発光タンパク質を細胞内で再構成させる新たな手法を用いて、生きた細胞内での遺伝子の発現とタンパク質のオルガネラへの移行の詳細を時空間解析する新しい研究手法の確立を目指した。

1. レポータータンパク質の再構成法

レポーターとなる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。この二分したタンパク質にスプライシングを起こすタンパク質(intein)を連結すると、スプライシング反応によりレポータータンパク質の再連結が起こり、再び蛍光・生物発光能が回復する(図1)。この再構成反応はタンパク質2分子間の自己触媒的反応であるため、細胞や動植物個体内の様々な現象を光シグナルに変換できる可能性を有している。また、プロテインスプライシングを利用せず、二分したレポータータンパク質を近接させても、その蛍光・発光能を回復させることが可能である。

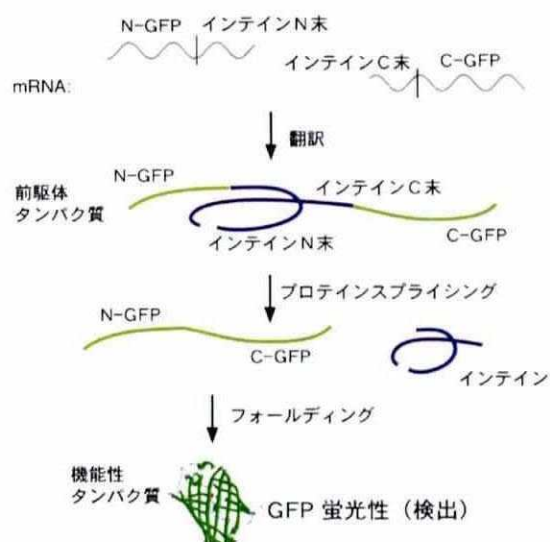


図1. プロテインスプライシング反応によるGFPの再構成。

2. ミトコンドリア膜間腔移行シグナル配列の同定

ミトコンドリアの直径は1 μ m以下であるため、通常の光学顕微鏡では外膜と内膜で仕切られた空間を判別することはできない。ミトコンドリア内膜で囲まれるマトリックスに局在するタンパク質と、外膜と内膜で囲まれる膜間腔(IMS)に局在するタンパク質を、GFPの再構成を利用して高速に判別する方法を開発した(図2)。スプリットしたGFPのC末側を含むプローブ(EGFPc-DnaEc)を作製し、マトリックスおよびIMSに局在させた細胞2種類を作製する。試験タンパク質には、GFPのN末側を含むプローブ(EGFPn-DnaEn)を連結する。もし試験タンパク質がマトリックスに移行すれば、図2左側の細胞のみが蛍光性となる。もし試験タンパク質がIMSに移行すれば、図2右側の細胞のみが蛍光性となる。

IMS局在タンパク質の一つであるSmacを対象として、どのアミノ酸がIMS局在に重要であるかを同定することを目的とした。Smacにランダムにアミノ酸置換を加え(Smac mutants)、そのミトコンドリア内局在を解析した。その結果、N末から50番目のMetがLysに、あるいは53番目のCys

が Arg に1アミノ酸置換するだけで, Smac は IMS からマトリックスに局在が変わることを明らかにした. またミトコンドリアへのシグナル配列として考えられてきたN末から 53 アミノ酸は, マトリックスへの移行シグナルとして機能していること, さらにそれに続く4アミノ酸-Ala-Val-Pro-Ile-を付加した 57 アミノ酸は, IMS へのシグナル配列として機能することを実証した.

このミトコンドリア膜間腔移行シグナル配列を, 様々な機能を有するサイズの異なるプローブタンパク質に連結した. GFP 変異体の酸化還元プローブ, GFP 変異体2分子を含むカルシウムプローブ, 外部基質でラベル可能な halotag, single chain antibody (ScFv) 等を IMS に局在させることが可能であることを実証した(図2右). このような IMS へタンパク質を輸送する短いペプチド配列は, 本研究により初めて同定されたものである. IMSシグナルペプチド配列を様々なプローブに連結すれば, IMS の機能解析の進展が期待できる.

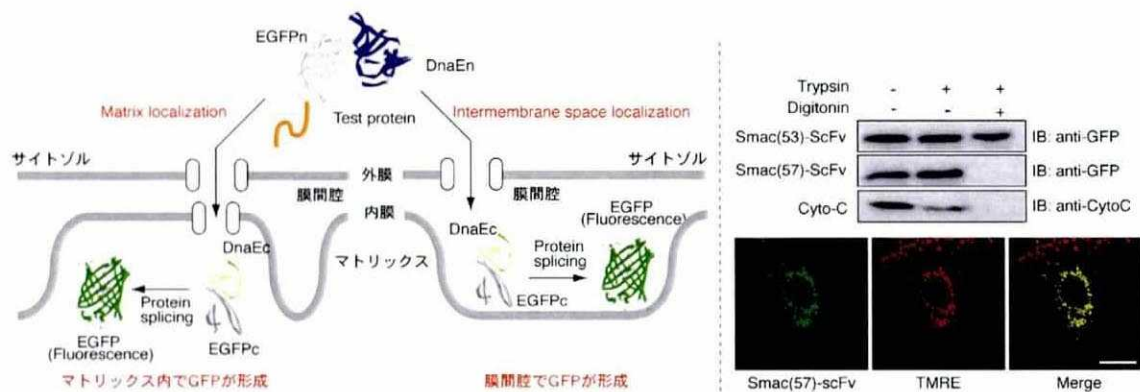


図2. ミトコンドリア内空間に局在するタンパク質の判別法の原理 (左) と ScFv のミトコンドリア膜間腔へのターゲッティング.

3. mRNA を可視化する蛍光プローブの開発

RNA の塩基配列特異的に 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研究手法の開発を目的とした. 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, NADH dehydrogenase subunit 6 の 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 が近接して, EGFP タンパク質が折り畳まれ, その結果 EGFP の蛍光が回復する. 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.

プローブをミトコンドリアにターゲットさせ, ミトコンドリアゲノムを DAPI で, ミトコンドリアを MitoTracker で染色した後, RNA の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した. 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. EGFP を bleaching 後 30 分間の蛍光観察を行うと, EGFP はミトコンドリア内で殆ど移動しないことがわかった. これはミトコンドリア mRNA が自由には拡散移動できず, ミトコンドリア内で固定化された状態であることを示している. 次に photobleaching 直後に H₂O₂ 刺激を行い, 30 分間の蛍光観察を行った. その結果, ミトコンドリア自体の motility が停止した後, mtDNA が消失し, mtRNA のミトコンドリア内での拡散が観察された. 開発した分子は, 細胞内の mRNA の局在と動態観察が可能な新たな原理に基づく mRNA 検出プローブである.

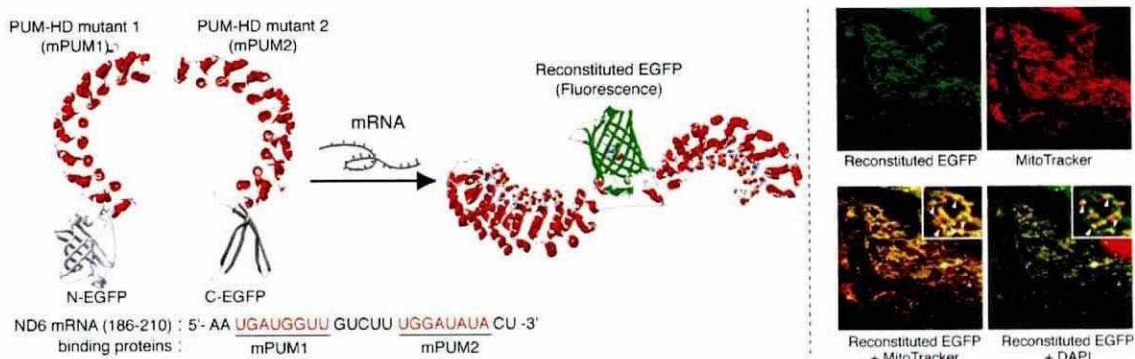


図3. mRNA可視化プローブの原理 (左) とND6 mRNAのミトコンドリア内局在 (右)

4. マウス個体内で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。DnaEのN末に *renilla* 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)。 *Renilla* 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末が相互作用してスプライシング反応が起こり、 *Renilla* luciferaseの発光能が回復する。この酵素活性を基質であるcoelenterazineにより発光強度を測定する。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。

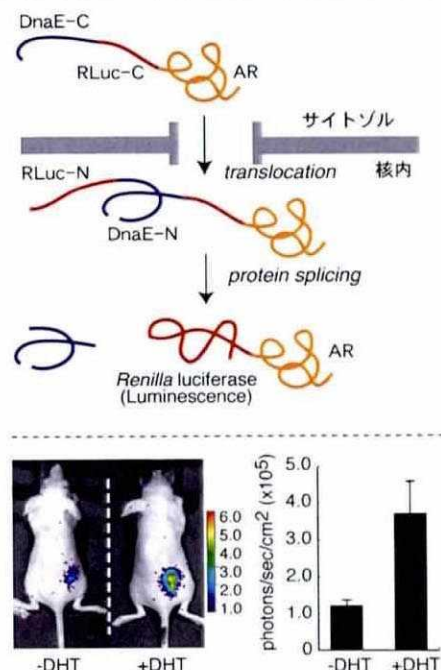


図4. *Renilla* luciferase再構成システムを利用したAR核内移行検出法の原理(上)と、生きたマウス個体内(皮下)におけるAR核内移行の検出(下)。

5. 今後の展開

RNA検出プローブの開発では、細胞質に存在する多種類のRNAを選択的に検出するには至っていない。今後は、PUMの拡散認識アミノ酸を置換することにより、サイトゾルで発現するmRNAの特異的な検出を可能にする。動物個体内での遺伝子発現を可視化するために、蛍光プローブに加え新たにluciferaseを利用したmRNA検出発光プローブを開発し、マウス個体内での遺伝子発現をリアルタイムで可視化する方法を開発する。

参考文献

- (1) High-Throughput Sensing and Noninvasive Imaging of Protein Nuclear Transport by Using Reconstitution of Split *Renilla* Luciferase. S. B. Kim*, T. Ozawa*, S. Watanabe, Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 11542-11547 (2004). (* Equal contribution to this work)
- (2) Methods of Analysis for Protein Dynamics in Living Cells Based on Protein Splicing. T. Ozawa, *Bull Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 739-751 (2005).
- (3) A High-Throughput Screening of Genes that Encode Proteins Transported into the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Cells, T. Ozawa, K. Nishitani, Y. Sako, Y. Umezawa, *Nucleic. Acids Res.*, **33**, e34 (2005).
- (4) Genetically Encoded Stress Indicator for Noninvasively Imaging Endogenous Corticosterone in Living Mice. S.B. Kim, T. Ozawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, 6588-6593 (2005).
- (5) A Genetically Encoded Indicator for Assaying Bioactive Chemicals that Induce Nuclear Transport of Glucocorticoid Receptor. S.B. Kim, T. Ozawa, Y. Umezawa, *Anal. Biochem.*, **347**, 213-220 (2005).
- (6) Quantitative Determination of Protein Nuclear Transport Induced by Phosphorylation or by Proteolysis. S.B. Kim, R. Takao, T. Ozawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, 6928-6934 (2005).
- (7) Designing Split Reporter Proteins for Analytical Tools. T. Ozawa, *Anal. Chim. Acta*, **556**, 58-68 (2006).
- (8) A Method for Determining the Activities of Cytokines based on the Nuclear Transport of Nuclear Factor- κ B. S.B. Kim, Y. Natori, T. Ozawa, H. Tao, Y. Umezawa, *Anal. Biochem.*, in press.
- (9) A Genetically Encoded Optical Probe for Detecting Release of Proteins from Mitochondria toward Cytosol in Living Cells and Animals. A. Kanno, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, in press.
- (10) A Short Peptide Sequence that Targets Fluorescent and Functional Proteins into the Mitochondrial Intermembrane Space. T. Ozawa, Y. Natori, Y. Sako, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa and Y. Umezawa, submitted.
- (11) Imaging Endogenous RNA in Single Living Cells; Dynamics of Mitochondrial RNA during Oxidative Stress. T. Ozawa, Y. Natori and Y. Umezawa, submitted.

招待講演

32nd Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Seattle, USA; July (2004).

他, 国際招待講演3件, 国内招待講演17件