

## 蛍光・発光タンパク質プローブの新たなデザインと 細胞内オルガネラを標的としたプロテオミクス

小澤 岳 昌

### 1 ク 質 添 雑 酸 置

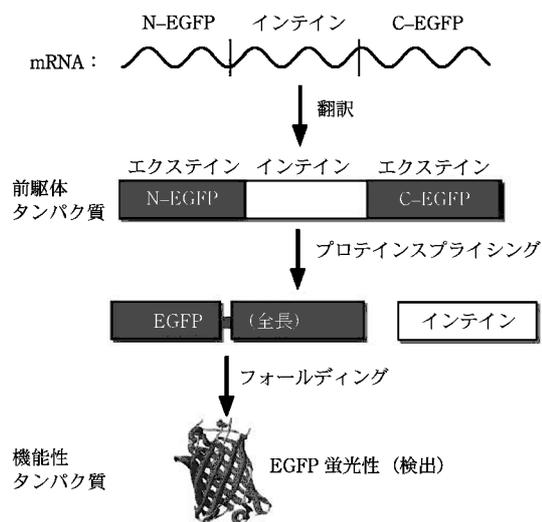
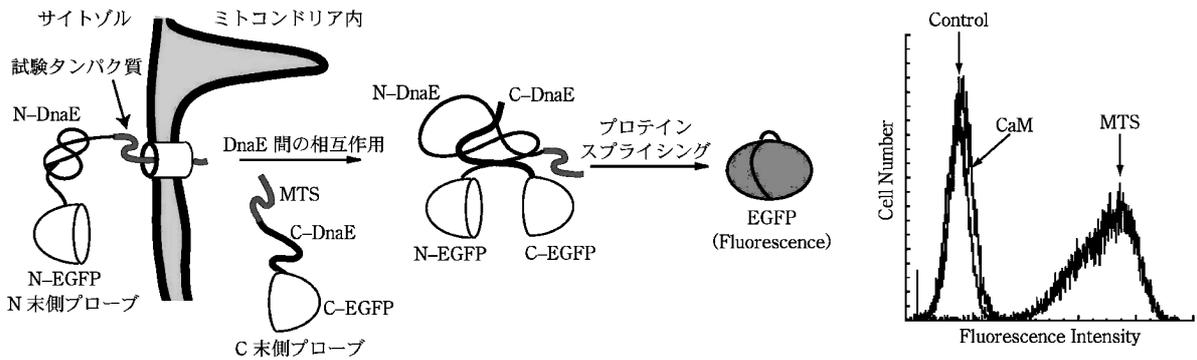


図1 プロテインスプライシングを利用した EGFP 再構成システム



左：試験タンパク質がミトコンドリアに移行すると、DnaE間で相互作用し、EGFPが再構成される。右：試験タンパク質にCaM（サイトゾル局在）あるいはMTS（ミトコンドリア局在）を用いてN末側プロープに連結した。このタンパク質をC末側プロープを含む細胞内に発現させ、細胞の蛍光強度を測定した。

図2 ミトコンドリア局在タンパク質同定の原理(左)とFACSによる細胞の蛍光強度測定(右)

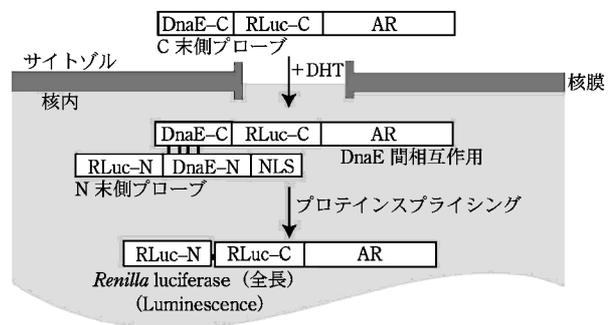
む細胞（BNL1MEmito細胞）内で発現すると、N末側にMTSを連結した場合に限り細胞が蛍光性を示した。これは、試験タンパク質がミトコンドリアに移行する現象を、蛍光強度変化として検出できることを示している。

次に、N末側のプロープに未知のタンパク質を連結した遺伝子を作製し、geneticな方法で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。まず、マウス正常肝細胞からタンパク質の遺伝情報をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を抽出する。次に、一本鎖mRNAに相補的なDNA(cDNA)を逆転写酵素を用いて作製する。このcDNAに、N末側プロープ分子のcDNAを連結する。こうして作製したcDNAは約100万種類の遺伝子情報を含んでいる。この中からミトコンドリアタンパク質をコードするcDNAを選び出すには、cDNAを細胞に導入してタンパク質を発現させた後、EGFPがミトコンドリア内で形成され光る細胞を回収すればよい。蛍光性細胞の回収には、fluorescence-activated cell sorting (FACS) という装置を用いる。FACSは1秒間に1000個以上の細胞の蛍光強度を測定し、かつ蛍光性の細胞を選別することができる。作製したcDNAをBNL1MEmito細胞に遺伝子導入した後、FACSで蛍光性の細胞数を計測した。その結果、約5000細胞に1個の割合で蛍光性の細胞が存在することが分かった。そこで、この蛍光性細胞を回収し、細胞からcDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅して、その塩基配列を解析した。その結果、既知のミトコンドリアタンパク質に加え、多くの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<sup>5)</sup>。

このように、GFP再構成システムを利用したミトコンドリアタンパク質同定法は、細胞内オルガネラ精製を必要とせず、生きた細胞内でオルガネラ局在タンパク質を同定できる特徴を有している。そのため、タンパク質を確度よく高速に同定することが可能である。

#### 4 生きた動物個体内でのタンパク質核内移行検出法

発光タンパク質 firefly luciferase (FLuc) や renilla luciferase (RLuc) の重要な特徴の一つは、バックグラウンド光



アンドロゲンレセプター (AR) が核内に移行すると、あらかじめ核内に局在していたN末側のプロープとDnaE間で相互作用する。その結果プロテインスプライシング反応が起こり、Renilla luciferaseが形成される。NLS: nuclear localization signal, RLuc: Renilla luciferase, AR: androgen receptor.

図3 タンパク質の核内移行検出法の原理

を抑えた高感度分析が可能なことである。筆者らはFLucやRLucを特定の位置で切断して生物発光能を失活させた後、プロテインスプライシングで再連結すると、その活性が回復する現象を見いだした (luciferase再構成システム)<sup>10)~12)</sup>。この原理を利用して、生きたマウス個体内でのタンパク質核内移行を検出するプロープを開発した<sup>10)</sup>。核内移行タンパク質の一つであるアンドロゲンレセプター (androgen receptor, AR) に、DnaEとRLucのC末側を連結し、サイトゾルに局在させる(図3)。一方、DnaEとRLucのN末側のタンパク質は、あらかじめ核内に局在させておく。もし、ARが男性ホルモン (dihydrotestosterone, DHT) 添加に伴い核内に移行すると、あらかじめ核内に局在していたN末側のプロープとDnaE間で相互作用する。その結果、プロテインスプライシング反応が起こり、全長のRLucが形成される。すなわち、ARが核内に移行した現象を、RLucの発光強度変化として検出することができる。

この原理を検証するために、N末とC末プロープをそれぞれCOS-7細胞の核とサイトゾルに発現させた。この細胞にDHTを添加すると、DHT濃度依存的にRLuc形成に伴う発光強度の増大が観測された(図4)。また、DHT存在下で抗ア

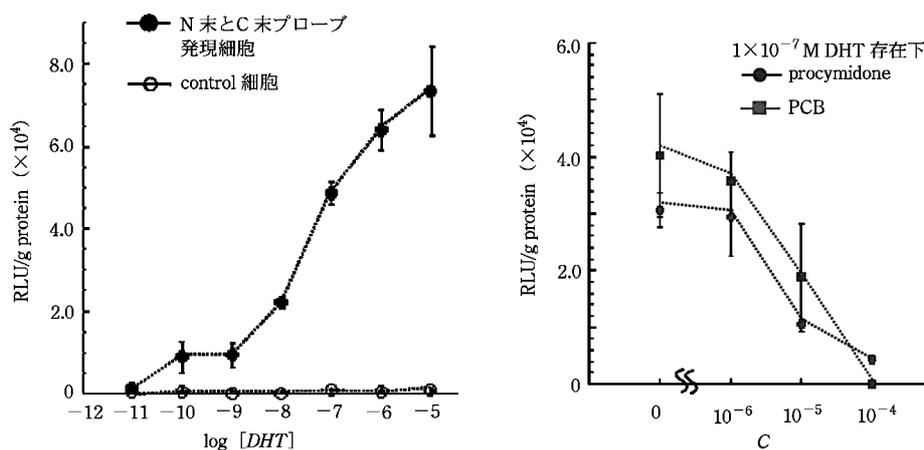


図4 DHT 濃度依存的な AR 核内移行と、抗アンドロゲン剤による AR 核内移行の阻害試験

ンドロゲン剤 procymidone や PCB を添加すると、AR の核内移行が阻害されることが分かった。次に、プローブを発現した COS-7 細胞を生きたマウス個体の脳内に移植して、procymidone や PCB を DHT とともに尾の静脈に投与した。その結果、DHT 添加に伴い強い発光が観測されること、procymidone や PCB 存在下では AR の核内移行が完全に抑制されることが分かった。これは抗アンドロゲン剤が血液脳関門を通過して、脳内 AR の核内移行を阻害することを示唆している。このように、RLuc 再構成システムを利用した発光プローブを用いて、マウス個体内での AR の核内移行を非侵襲的に検出できることを実証した。開発したプローブはタンパク質のオルガネラ内外移行を検出する一般的な方法としての有用性を示している。

## 5 おわりに

ゲノミクスやプロテオミクス等のオミックス研究は、生命科学時代の流れを象徴している。ゲノミクス研究は、この10年間に長足の進展を遂げてきた。一方、タンパク質の機能解析はまだ破壊分析に大きく依存しており、high throughput な技術を必要とする。また、生きた細胞内でタンパク質の動態を時空間解析する技術は充分とは言い難く、礎となる新たな方法論の創出や計測技術の発展は、現在の重要な課題である。オミックス研究は今後、組織や個体をターゲットとした細胞間や組織間の情報伝達の解明に展開していくことは明白であり、分析化学者の多大な貢献に大きな期待が寄せられている。

## 文 献

1) A. Sickmann, J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H. E. Meyer, B. Schönfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, C. Meisinger : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 13207 (2003).

2) S. W. Taylor, E. Fahy, B. Zhang, G. M. Glenn, D. E. Warnock, S. Wiley, A. N. Murphy, S. P. Gaucher, R. A. Capaldi, B. W. Gibson, S. S. Ghosh : *Nat. Biotechnol.*, **21**, 281 (2003).  
 3) V. K. Mootha, J. Bunkenborg, J. V. Ollsen, M. Hjerrild, J. R. Wisniewski, E. Stahl, M. S. Bolouri, H. N. Ray, S. Sihag, M. Kamal, N. Patterson, E. S. Lander, M. Mann : *Cell*, **115**, 629 (2003).  
 4) M. Fountoulakis, P. Berndt, H. Langen, L. Suter : *Electrophoresis*, **23**, 311 (2002).  
 5) T. Ozawa, Y. Sako, M. Sato, T. Kitamura, Y. Umezawa : *Nat. Biotechnol.*, **21**, 287 (2003).  
 6) R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku : *J. Biol. Chem.*, **265**, 6726 (1990).  
 7) P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Stevens : *Science*, **250**, 651 (1990).  
 8) T. Ozawa, M. Takeuchi, A. Kaihara, M. Sato, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **73**, 5866 (2001).  
 9) T. Ozawa, S. Nogami, M. Sato, Y. Ohya, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **72**, 5151 (2000).  
 10) S. B. Kim, T. Ozawa, S. Watanabe, Y. Umezawa : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 11542-11547 (2004).  
 11) A. Kaihara, Y. Kawai, M. Sato, T. Ozawa, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **75**, 4176 (2003).  
 12) T. Ozawa, A. Kaihara, M. Sato, K. Tachihara, Y. Umezawa : *Anal. Chem.*, **73**, 2516 (2001).



小澤岳昌 (Takeaki OZAWA)

東京大学大学院理学系研究科、化学技術振興機構「さきがけ」(〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)。東京大学大学院理学系研究科修了。博士(理学)。<現在の研究テーマ>タンパク質の相互作用・細胞内局在・遺伝子発現機構等の細胞内シグナルを解明するプローブ分子の開発。<趣味>体を動かすこと。

E-mail : ozawa@chem.s.u-tokyo.ac.jp