

生細胞におけるタンパク質機能を迅速かつ可逆的に調節する方法

Laura A. Banaszynski¹⁾, Ling-chun Chen²⁾, Lystranne A. Maynard-Smith¹⁾, A. G. Lisa Ooi²⁾, and Thomas J. Wandless²⁾

1) Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California 94305, USA

2) Department of Chemical and Systems Biology, Stanford University, Stanford, California 94305, USA

特定のタンパク質の機能を迅速かつ可逆的に調節する方法は、複雑な生物システムを探索するための魅力的なツールである。我々は、哺乳類細胞内の特定のタンパク質の安定性を、膜透過性リガンドShield1を用いて可逆的に調節する方法（プロテオチューナー法）を開発した。我々は、哺乳類細胞で発現すると迅速かつ構造的に分解するヒトFKBP12タンパク質変異体を作製した。この不安定化ドメインを他のタンパク質に融合させると、そのタンパク質が不安定化される。Shield1を添加すると、不安定化ドメインに結合し、融合タンパク質の分解が防がれる。そのため、融合タンパク質が蓄積し、その細胞内機能を発揮する。

リガンド応答性不安定化ドメインのライブラリー構築と同定

まず、error-prone PCR を行ってFKBP12 F36V遺伝子配列（以下、FKBPと呼ぶ）の変異体ライブラリー（2,000以上の配列を含む）を作製した。次に、各変異体を黄色蛍光タンパク質（YFP）のN末端にフレームを合わせてクローニングした。リガンド依存性の安定化を示す変異体を同定するために、FKBP変異体-YFP融合タンパク質の安定性の指標としてYFPの蛍光を利用し、発現した融合タンパク質のリガンド依存性の安定化を示す細胞クローンをスクリーニングした。

不安定化ドメインの特性

ライブラリーから5つのFKBP変異体（F15S、V24A、H25R、E60G、L106P）を選択し、さらなる分析に供した。不安定化ドメイン-YFP融合タンパク質（FKBP変異体-YFP）を安定発現する細胞をShield1の存在下または非存在下で培養し、そのタンパク質の細胞内レベルを調べた。ウェスタンブロット解析により、4つの変異体細胞のライセート中のFKBP-YFP融合タンパク質を検出した（図1）。Shield1の非存在下で培養した細胞のライセート中にはFKBP-YFPは全く検出されなかったが、Shield1の存在下で培養した細胞のライセート中にはFKBP-YFPが顕著に検出された（図1）。

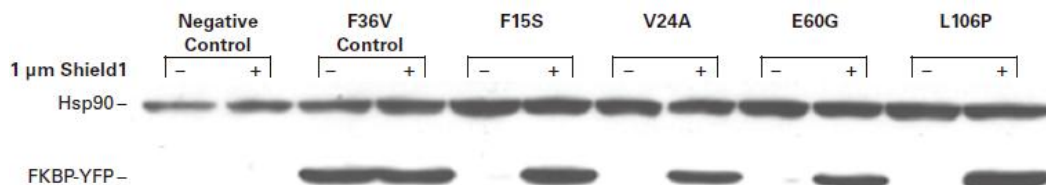


図1. Shield1によって安定化されるFKBP変異体

FKBP変異体-YFP融合タンパク質を発現する細胞と陰性コントロール細胞を1 μM Shield1の存在下または非存在下で24時間培養した。抗FKBP抗体を用いたウェスタンブロットにより細胞ライセートを分析した。分析した変異体によって、Shield1誘導性の安定化の程度が異なることが観察された。Shield1で処理しなかった細胞のライセートには、FKBP-YFP融合タンパク質は検出されなかった。

次に、Shield1の添加または除去に対する変異体の応答性を調べた。Shield1の非存在下では、5つの変異体のすべてで蛍光レベルの減少が観察され、陽性コントロールに対する不安定化の程度は変異体ごとに異なっていた。Shield1を添加すると、5つの変異体のすべてで蛍光レベルの増加が観察され、その安定化の程度は変異体によって10倍以上の違いが見られた（図2、パネルA）。Shield1を除去すると蛍光が減少したが、その減少パターンは変異体間で顕著に異なっていた（図2、パネルB）。本実験により、各変異体の分解速度と不安定化の程度は相関することが明らかになった。この結果に基づき、変異体L106P（以下、不安定化ドメインまたはDDと呼ぶことにする）を以降の実験で用いることにした。

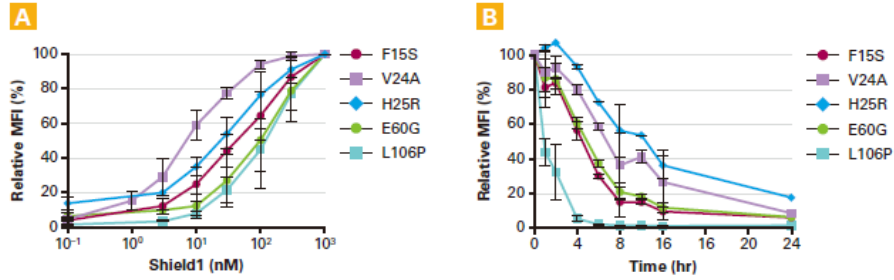


図2. Shield1依存性の安定化のキネティクス

パネルA. FKBP変異体-YFP融合タンパク質を発現するNIH 3T3細胞を0.1~1 μ MのShield1で処理した。変異体V24Aは最も効率よく安定化された (EC_{50} 約5 nM)。一方、不安定化の度合いが強いL106Pでは、FKBP-YFP融合タンパク質を安定化するために、より高濃度のShield1を必要とした (EC_{50} 約100 nM)。パネルB. FKBP-YFP融合タンパク質を安定発現するNIH 3T3細胞を1 μ MのShield1の存在下で24時間培養した後、培地で洗浄してShield1を除去した。L106Pは最も速く分解され、4時間以内にタンパク質濃度が無視できる程度まで減少した。蛍光の変化はフローサイトメトリーでモニターした。MFI = 平均蛍光強度。

編者註：クロンテックのProteoTuner™ Systems (製品コード 632167/632168/632171/632172)およびShield1 (製品コード 631037/631038) を用いることにより本技術を利用できる。

DD融合タンパク質の濃度および安定性の迅速な調節

次に、RNAi (RNA干渉) による内在性遺伝子のサイレンシング速度と、DDを融合させた目的タンパク質の分解速度を比較した。lamin A/C (RNAi実験のコントロールとしてよく用いられる、必須ではない細胞骨格タンパク質) に対するsiRNAでHeLa細胞をトランスフェクトすると、24時間後にタンパク質レベルの減少が観察された。それとは対照的に、DD-YFP融合タンパク質を安定発現する細胞では、Shield1除去後4時間以内に融合タンパク質はほぼ完全に分解され、目的タンパク質にDDを融合させると培養細胞内での安定性が劇的に減少することが実証された (図3)。

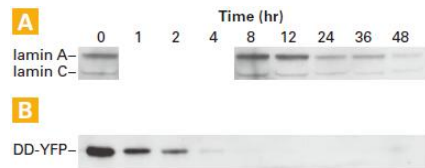


図3. RNAiとProteoTunerシステムの比較

RNAiによりlamin A/Cをノックダウンするのに要する時間 (パネルA) と、DD-YFP融合タンパク質を安定発現するNIH 3T3細胞でShield1を除去したときの融合タンパク質の分解に要する時間 (パネルB) を比較した。

予測可能なタンパク質レベルの調節

DDがリガンド感受性のFKBP変異体であることを確認するために、DD-YFPを安定発現するNIH 3T3細胞を種々の濃度のShield1存在下で、1週間にわたって培養した (図4)。観察された蛍光レベルは、図2のパネルAに示す薬剤応答実験から予測される値に近いものであり、ProteoTunerシステムはShield1濃度依存的に調節されることが実証された。

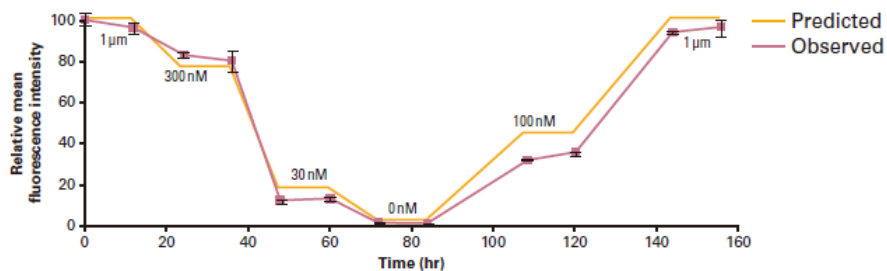


図4. 細胞内の標的タンパク質レベルのShield1による可逆的で予想可能な調節

DD-YFPを安定発現するNIH 3T3細胞を種々の濃度のShield1の存在下で1週間にわたって培養し、所定の時点でサンプリングし、蛍光強度をフローサイトメトリーでアッセイした。蛍光強度の予想値は、図2のパネルAに示す薬剤応答実験の結果をもとに求めた。MFI=平均蛍光強度。

Shield1依存性の細胞表現型の調節

DDを融合させた構成活性型のCdc42 (Q61L)変異体のShield1依存性の安定化と細胞変化との相関性を調べた。このSmall GTPase (Cdc42変異体)が発現すると、細胞の形態が変化することが知られている(1)。DD-Cdc42 (Q61L)を発現する細胞をShield1存在下で培養すると、予想通りの形態変化を示した。この形態変化は可逆的で、Shield1を除去すると線維芽細胞様の形態を呈し、Shield1の非存在下で培養した細胞と識別できなかった(図5)。

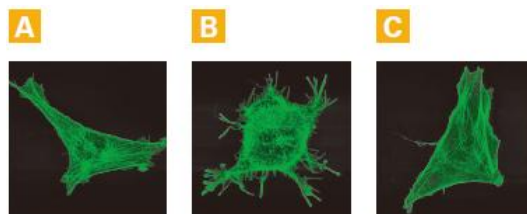


図5. Shield1によるDD-Cdc42 (Q61L)融合タンパク質の安定化により、細胞の形態が予想通りに変化した。

DDを融合させた構成活性型のSmall GTPase (Cdc42変異体)を安定発現するNIH 3T3細胞を3つのグループに分割した。第一のグループ(パネルA)はShield1非存在下で、第二のグループ(パネルB)は1 μ M Shield1存在下で24時間培養した。第三のグループ(パネルC)は1 μ M Shield1存在下で24時間培養したのち、培地で洗浄し、Shield1非存在下で48時間培養した。細胞を無血清の条件で12時間培養して血清を枯渇させた後、固定し、Alexa Fluor[®] 488-conjugated phalloidinで染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

結語

標的遺伝子の機能をDNAやRNAレベルで調べる方法はよく用いられており、特定の遺伝子にコードされているタンパク質の量を変化させる有力な戦略である。しかし、タンパク質の量を直接調節する実験手法は、特に哺乳類細胞の場合では限られている。我々は、タンパク質の安定性を低分子で調節できる“single ligand-single domain”システムを開発した。このシステムは、リガンドの非存在下で分解を誘導するリガンド結合ドメイン(DDタグ)に目的タンパク質を融合させることを基礎としている。Shield1リガンドが不安定化ドメイン(DDタグ)に結合すると融合タンパク質は安定化され、分解から保護される。このシステムは、種々のDD融合タンパク質をShield1依存的に安定化することができるため、遺伝子機能をタンパク質レベルで直接調節することができる新たな技術である。

謝辞

本稿はCell (2)で発表された論文の一部を引用したものである。

参考文献

1. Heo, W.D., and Meyer, T. (2003). *Cell* **113**(3):315–328.
2. Banaszynski, L.A., *et al.* (2006) *Cell* **126**(5):995–1004.

製品ガイド

- ▶ ProteoTuner™ (プロテオチューナー) システム
- ▶ ProteoTuner™ Quantitation システム