

AcGFP1およびDsRed-MonomerをFRETパートナーとして用いる FRETによるタンパク質-タンパク質相互作用のモニタリング

Bing-Fen Liu¹⁾, Kumarasamy Anbarasu¹, & Jack J-N. Liang^{1,2)}

1) Ophthalmic Research/Surgery, Brigham and Women's Hospital

2) Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, MA

はじめに

タンパク質-タンパク質相互作用は、細胞やタンパク質の機能に重要な役割を果たしている。眼球の水晶体（レンズ）の主なタンパク質成分であるクリスタリンは2つのファミリー、すなわち α -および β - γ -クリスタリンに分類される（1）。 α -クリスタリンは、2つのポリペプチドサブユニット（ α A-および α B-クリスタリン）から形成されたヘテロオリゴマーである。 α A-および α B-クリスタリンは*in vitro*ではホモオリゴマーを形成することもできる。 β - γ -クリスタリンはより多様であり、ヘテロオリゴマーの β -クリスタリンは7つのサブユニット（4つの酸性の β A1~4-クリスタリン、および3つの塩基性の β B1~3-クリスタリン）を含み、一方、単量体の γ -クリスタリンには6つのサブユニット（ γ A~ γ F-クリスタリン）が存在する。

溶液中のクリスタリン分子間の相互作用の研究に用いられる方法の多くは、純度の高い精製タンパク質を必要とする。一方、two-hybridシステムを用いて細胞内のタンパク質間相互作用を研究する場合はタンパク質を精製する必要はないが（2-3）、レポーター遺伝子を活性化するために、両方のタンパク質が核に移行できなければならない。 α -クリスタリンのような大きなタンパク質は核への移行が困難であると思われる。

これらに代わるタンパク質間相互作用の有力な研究方法として、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET； fluorescence resonance energy transfer）*が挙げられる。この方法では、生細胞内の環境でタンパク質間相互作用を直接評価することができる。FRETは*in vitro*の実験と違ってタンパク質の精製を必要とせず、またtwo-hybridシステムと違ってレポーターアッセイや細胞溶解を必要としない。

*FRET：蛍光スペクトルの重なりがある蛍光分子D（ドナー）とA（アクセプター）が近接して適切な配向をとっている場合、Dを励起すると、共鳴による励起エネルギーの移動（FRET）が起こり、Aが励起されて蛍光を発する。蛍光タンパク質Dとの融合タンパク質（D-P1）と、蛍光タンパク質Aとの融合タンパク質（A-P2）を細胞内で共発現させた場合、FRETが観察される（Dを励起することによりAが励起されて蛍光を発する）と、タンパク質P1とP2が相互作用をしていることがわかる。

水晶体の透明性におけるタンパク質間相互作用の役割

本研究では、共焦点FRET顕微鏡を用いて α A-クリスタリンと他のクリスタリンとのタンパク質間相互作用の検出を行った。クリスタリン間の相互作用によりタンパク質の構造が安定化され、それにより水晶体の透明性が維持されることが報告されている（4）。また、翻訳後修飾あるいは変異によってこの相互作用が阻害されると、白内障を発症することが報告されている（5）。これまでの水晶体タンパク質の研究では加齢性白内障と関係する翻訳後修飾が注目されていたが、最近では先天性白内障で見られる部位特異的変異が注目されるようになった。

本稿では、デスミン関連筋疾患と白内障の原因であるR120G α B-クリスタリン変異（6）に焦点を当てる。組換えR120G α B-クリスタリンについては、構造異常とシャペロン様活性の低下（7）、 α A-クリスタリンとのタンパク質間相互作用の低下（8）が報告されている。我々は α A-クリスタリンとAcGFP1の融合タンパク質をドナーとし、R120G α B-クリスタリン変異体等とDsRed-Monomerの融合体をアクセプターとしてFRET画像解析を行った。FRET画像によりタンパク質間相互作用を直接視覚化することができ、また相互作用の程度を定量化することができた。

方法

Living Colors pAcGFP1-C1 ベクター（製品コード 632470）と pDsRed-Monomer-C1ベクター（製品コード632466）をクロンテック社から購入した。pAcGFP1-C1 ベクターは*Aequorea coerulea*（オワンクラゲ）由来の緑色蛍光タンパク質（ $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 475/505$ nm）をコードし、pDsRed-Monomer-C1ベクターは*Discosoma sp.*（ハナイソギンチャクモドキ；サンゴの一種）由来の単量体赤色蛍光タンパク質（ $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 557/585$ nm）をコードする。 α A-、 α B-、 β B2-、および γ C-クリスタリン・コンストラクトとR120G α B-クリスタリン・コンストラクトを、すでに報告した我々の方法（2, 8）に従って調製した。 α A-クリスタリン遺伝子をpAcGFP1-C1 ベクターにサブクローニングし、また α A-、 α B-、R120G α B-、 β B2-、および

γ C-クリスタリン遺伝子をpDsRed-Monomer-C1ベクターにサブクローニングした。得られたコンストラクトを、順にAcGFP1- α A-クリスタリン、DsRed-Monomer- α A-クリスタリン、DsRed-Monomer- α B-クリスタリン、DsRed-Monomer-R120G α B-クリスタリン、DsRed-Monomer- β B2-クリスタリン、およびDsRed-Monomer- γ C-クリスタリンと呼ぶことにする。また、陽性コントロールとして用いるために、AcGFP1とDsRed-Monomerの間に17アミノ酸のリンカーを含むAcGFP1-DsRed-Monomer融合タンパク質 (G-17-R) を発現するコンストラクトを調製した。

標準的な方法に従ってHeLa細胞を培養した。トランスフェクションの前日に、HeLa細胞 (1×10^5 cells/ml) を35 mm培養ディッシュに播種した。脂質由来のトランスフェクション試薬を用いて、前培養した細胞にベクターをコトランスフェクトした。6時間培養した後、培地交換し、48時間まで培養を続け、画像解析に供した。画像解析の直前に、FBSを含まないL-15培地と培地交換した。

Zeissレーザースキャンマイクロスコープ (LSM) 510 META Axioplan 2 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss社) を用いて画像を得た。次の設定条件でマルチトラックチャンネルの画像 (12ビット) を記録した。488 nm励起の緑色チャンネル (ドナーの励起/ドナーの蛍光: Green_{ex/em}) とFRETチャンネル (ドナーの励起/アクセプターの蛍光: FRET_{ex/em}) にはアルゴン/2レーザー (25 mW、T1およびT3=10%レーザー露光) を、543 nm励起の赤色チャンネル (アクセプターの励起/アクセプターの蛍光: Red_{ex/em}) にはHeNe 1 レーザー (T2=100%) を用いた。

LSM画像はMetamorph 7.0ソフトウェア (Molecular Devices社) を用いて解析した。FRET解析の詳細については、本稿の元になっている学術雑誌*Molecular Vision*に掲載されている我々の論文 (9) を参照されたい。

クリスタリンのFRET解析に対するAcGFP1・DsRed-Monomerペアの適合性

FRETパートナーのspectral bleed-through (SBT: FRETチャンネルへの蛍光の漏れ込み) はFRET顕微鏡解析における主要な問題である。我々は、AcGFP1チャンネルのFRETチャンネルへのSBTは約35%で、DsRed-MonomerチャンネルのSBTは約5%であると推定した。このSBTは、シアン蛍光タンパク質 (CFP) と黄色蛍光タンパク質 (YFP) のペアなど、よく用いられている他の蛍光タンパク質のペアのSBTよりもはるかに小さい。CFPとYFPのペアでは、シアンチャンネル・シグナルの70%および黄色チャンネル・シグナルの20%がFRETチャンネルにクロスオーバーすることが報告されている (10)。

我々は最初に、G-17-R融合タンパク質を陽性コントロールとし、個々のAcGFP1とDsRed-Monomerを陰性コントロールとして用いたコントロール実験を行った。G-17-RをHeLa細胞にトランスフェクトした場合は、強いFRETシグナルが観察された。しかし、AcGFP1とDsRed-MonomerをHeLa細胞にコトランスフェクトした場合は、非常に弱いシグナルしか観察されなかった (データ非掲載; 9)。この結果は、AcGFP1融合タンパク質とDsRed-Monomer融合タンパク質を用いてタンパク質間相互作用をFRETで検出できる可能性を強く示唆している。

クリスタリン分子間相互作用の強度の測定

FRET顕微鏡解析実験で、我々はAcGFP1- α A-クリスタリン融合タンパク質をドナーとし、各DsRed-Monomer-クリスタリン融合タンパク質をアクセプターとして用いた。その結果、我々が試験したクリスタリンはすべて α A-クリスタリンと相互作用することが明らかになった (図1)。ノーマライズしたFRET (nFRET) シグナルから、ドナーの α A-クリスタリンと、アクセプターの α A-、 α B-、 β B2-、および γ C-クリスタリンの相互作用の強度を調べることができた (図2)。また、R120G α B変異体では、野生型 α B-クリスタリンに比べてnFRETが著しく減少していることを認めた。

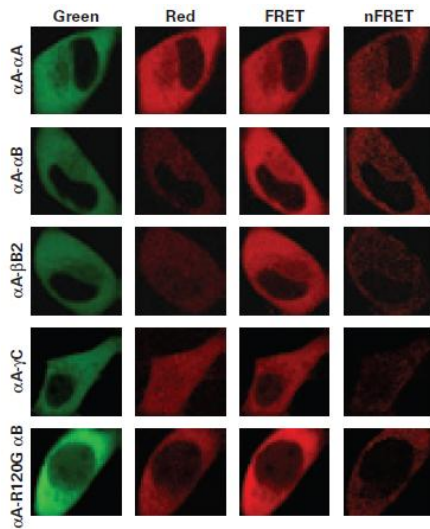


図1. α A-クリスタリンと α B-クリスタリン間の相互作用は、 α A-クリスタリンと β B2-または γ C-クリスタリン間の相互作用よりも強い AcGFP1およびDsRed-Monomerコンストラクトを発現する細胞の LSM-FRET画像を示す。AcGFP1- α A-クリスタリンをドナーとし、DsRed-Monomer-クリスタリン (α A-、 α B-、 β B2-、 γ C-、または R120G α B-クリスタリン) をアクセプターとした。それぞれのコンストラクト (図の左側に示す) をHeLa細胞にコトランスフェクトした。レーザースキャン顕微鏡 (LSM) を用いて、各培養細胞の画像を得た。緑色または赤色蛍光の検出には、それぞれ緑色または赤色フィルターセットを用いた。ノーマライズしたFRETシグナル (nFRET) を右端のカラムに示す。

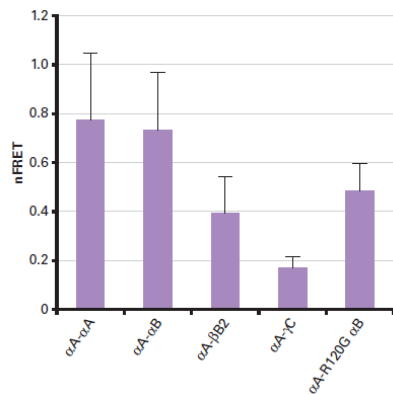


図2. α A-クリスタリンは他のクリスタリンと種々の強度で相互作用するクリスタリン分子間のnFRET値をLSM-FRE画像から算出した。nFRET値は、3回のトランスフェクション実験で得られた画像の対象領域 (ROI; n = 60~90) の平均値である。対象領域は、凝集したタンパク質を含まない領域で選択した。(α A-または α B-クリスタリンと γ C-クリスタリン)、(β B2-クリスタリンと γ C-クリスタリン)、および (α B-クリスタリンとR120G α B-クリスタリン) のペアで有意差が観察された。 α A- α A-クリスタリン・ペアと α A- α B-クリスタリン・ペアとでは、統計学的な有意差はない。

α B-クリスタリンはタンパク質の凝集に重要な役割を果たしている

細胞内で発現される個々のクリスタリンの相対的な溶解性は、他のクリスタリンを共発現させることにより著しく変化する。 α A-クリスタリンを単独でトランスフェクトした細胞では、レーザースキャン顕微鏡でタンパク質の凝集はほとんど観察されなかった (データ非掲載)。しかし、 α B-クリスタリンを単独でトランスフェクトした細胞では、タンパク質の凝集が認められた (図3のパネルA)。 α A-クリスタリンを α B-クリスタリンとともにトランスフェクトすると、細胞内の凝集タンパク質の割合は1/4以下に減少した (図3のパネルC、図4)。このように、 α A-クリスタリンと α B-クリスタリンの相互作用 (図1、図2) により、 α B-クリスタリンの溶解性が非常に増加する。

しかし、野生型の α B-クリスタリンではなく、先天性白内障で見られる α B-クリスタリンの変異体R120Gを細胞にトランスフェクトすると、凝集タンパク質を含む細胞の数が著しく増加し、また凝集タンパク質のサイズも大きくなった。また、 α A-クリスタリンを共発現させても、野生型 α B-クリスタリンを含む細胞で共発現させた場合ほどタンパク質の凝集が減少することはなかった (図3、図4)。

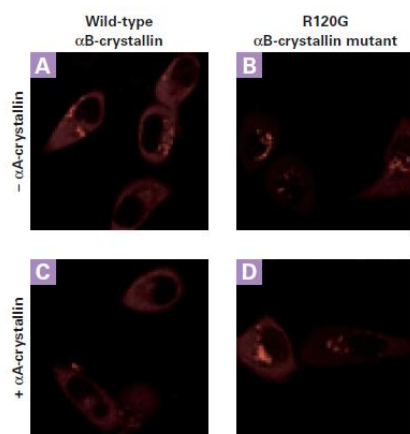


図3. R120G α B-クリスタリン変異体をトランスフェクトした細胞（パネルB）では、野生型 α B-クリスタリンをトランスフェクトした細胞（パネルA）よりもタンパク質の凝集が起こりやすい

α A-クリスタリンをコトランスフェクトしても、野生型 α B-クリスタリンの場合で凝集の減少が認められた（パネルC）ほど、変異型 α B-クリスタリンの凝集が減少することはなかった（パネルD）。野生型および変異型 α B-クリスタリンをそれぞれ単独でトランスフェクトした場合と、それぞれを α A-クリスタリンとともにコトランスフェクトした場合のHeLa細胞のレーザースキャン顕微鏡画像の代表例を示す。

パネルA. DsRed-Monomer- α B-クリスタリン。

パネルB. DsRed-Monomer-R120G α B-クリスタリン。

パネルC. AcGFP1- α A-クリスタリンとDsRed-Monomer- α B-クリスタリン。

パネルD. AcGFP1- α A-クリスタリンとDsRed-Monomer-R120G α B-クリスタリン。

赤色チャンネルで得られた画像のみを示す。

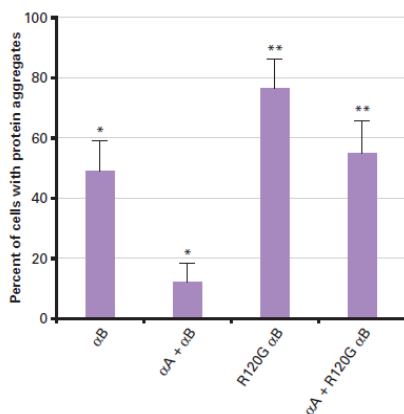


図4. タンパク質凝集における α B-クリスタリンの役割

α A-クリスタリンと α B-クリスタリンをコトランスフェクトした場合には、凝集タンパク質を含む細胞の数が1/4に減少した（*は $p=0.006$ を示す）。しかし、 α A-クリスタリンとR120G α B-クリスタリンをコトランスフェクトした場合には、1/1.5しか減少しなかった（**は $p=0.02$ を示す）。平均値と標準偏差値を% \pm SDで示す。これは別々に3回行ったトランスフェクション実験の平均である。各実験では、30~50の共焦点LSM画像で細胞を数えた。

考察

in vitro のタンパク質-タンパク質相互作用の研究では、タンパク質を高度に精製する必要があるという不都合な点があり、また精製タンパク質のコンフォメーション（立体配座）が *in vivo* 環境でのコンフォメーションと異なる可能性がある。一方、two-hybridシステムは生細胞内のタンパク質間相互作用を検出でき、タンパク質の精製を必要としないが（2）、FRET顕微鏡法はさらなる利点、すなわち、生理学的に意義のある生細胞内の自然環境でタンパク質間相互作用を検出できるという利点がある。

今回のAcGFP1とDsRed-MonomerをFRETペアとして用いたFRET顕微鏡法によるクリスタリン間相互作用の研究の結果は、我々が以前報告したtwo-hybridシステムによる研究の結果と一致しており、この方法は水晶体タンパク質におけるタンパク質間相互作用の将来の研究（例えば、クリスタリンと膜タンパク質または細胞骨格タンパク質との相互作用の研究）にとってより優れた技術といえる。FRETでは、ドナータンパク質とアクセプタータンパク質が非常に近接（約50Å）して存在し、かつドナータンパク質の蛍光スペクトルがアクセプタータンパク質の励起スペクトルと重なると、エネルギーがドナータンパク質からアクセプタータンパク質に非放射的に移動する（11）。AcGFP1とDsRed-Monomerは非常に有用なFRETペアであることが示され、それらのspectral bleed-through（SBT）値はCFP-YFP FRETペアのそれよりも優れている。

FRET顕微鏡法によるクリスタリン分子間（ α A- α A-、 α A- α B-、 α A- β B2-、および α A- γ C-クリスタリン）相互作用の検出結果は、以前に報告したHeLa細胞でのtwo-hybridシステムによる研究（2）、およびタンパク質溶液中でのFRETによる研究（12）の結果と一致している。 α A-クリスタリンと α B-クリスタリンは β B2-クリスタリンや γ C-クリスタリンよりもはるかに疎水性が高いため（13）、 α A-クリスタリン間のFRET値が高いのは疎水的な相互作用が関与している可能性がある。

タンパク質間相互作用は、タンパク質構造の安定化、細胞機能のためのタンパク質複合体の形成、およびタンパク質の溶解性など、多くの役割を果たしている。水晶体では、散乱を最小限にして光が網膜に焦点

を結ぶように、クリスタリンが相互作用して屈折率の勾配を作っている(5)。正常なタンパク質と水晶体の構造を維持するために、クリスタリンは互いに相互作用し、構造の安定性を強化している。例えば、我々は最近、単独で発現させたときは β A2-クリスタリンは不溶性であるが、 β B2-クリスタリンを共発現させると β A2-クリスタリンの溶解性が非常に増大することを認めている(未発表)。 β A4- β B2-クリスタリンおよび α A- α B-クリスタリンについても、同様な効果が報告されている(14-15)。

翻訳後修飾あるいは部位特異的変異はこれらの相互作用を阻害あるいは減少させるであろう。溶液中でのタンパク質間相互作用の変化をFRETで研究した例が数多く報告されている(16-20)。AcGFP1とDsRed-Monomerを用いて細胞内でのタンパク質間相互作用をFRETで研究する手法は、タンパク質の構造や相互作用に変化をもたらす脱アミノ化やカルボキシル末端の短小化などの翻訳後修飾の検出にも応用できる。脱アミノ化は高齢者の水晶体で主に見られる翻訳後修飾で(21)、タンパク質を不安定化させる(22-23)。カルボキシル末端の短小化は、高齢者や糖尿病患者の水晶体で見られることが報告されており(24-25)、カルボキシル末端の5アミノ酸が切断された α A-クリスタリンではサブユニット交換が減少することが報告されている(26)。

加齢に伴う欠陥に加えて、デスミン関連筋疾患と白内障の原因であるR120G α B-クリスタリン変異(6)など、多くの先天性白内障変異も報告されている。本研究で検出されたR120G α B-クリスタリン変異体でのnFRETの減少は、タンパク質溶液中(12)および細胞内(8)で観察された結果と一致している。また、我々が得た共焦点顕微鏡画像は、R120G α B-クリスタリンは野生型 α B-クリスタリンよりもはるかに溶解性が低く、 α A-クリスタリンを共発現させても、野生型 α B-クリスタリンの場合ほどR120G α B-クリスタリンの凝集を防ぐことができないことを示している。この結果は、タンパク質凝集体の形成がR120G α B-クリスタリン変異における水晶体の混濁の主な原因であることを示唆している。

AcGFP1とDsRed-MonomerをFRETペアーとして用いた FRET解析はクリスタリン間のタンパク質-タンパク質相互作用の重要性和水晶体の混濁に及ぼすそれらの影響を実証する非常に有力な手法であることが本研究で示された。

謝辞

本稿で紹介した研究は、*Molecular Vision* (9)に発表された論文が元になっている。

参考文献

1. Harding, J. (1991) *Cataract: Biochemistry, Epidemiology, and Pharmacology*. (Chapman & Hill, London).
2. Fu, L. and Liang, J. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(6):4255-4260.
3. Boelens, W. C. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(43):28085-28090.
4. Delaye, M. and Tardieu, A. (1983) *Nature* **302**(5907):415-417.
5. Ponce, A. et al. (2006) *Mol. Vis.* **12**:879-884.
6. Vicart, P. et al. (1998) *Nat. Genet.* **20**(1):92-95.
7. Bova, M. P. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(11):6137-6142.
8. Fu, L. and Liang, J. J. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**(3):1155-1159.
9. Liu, B. F. et al. (2007) *Mol. Vis.* **13**:845-861.
10. Trinkle-Mulcahy, L. et al. (2001) *J. Cell. Sci.* **114**(Pt 23):4219-4228.
11. Wu, P. and Brand, L. (1994) *Anal. Biochem.* **218**(1):1-13.
12. Liang, J. J. and Liu, B. F. (2006) *Protein Sci.* **15**(7):1619-1627.
13. Fu, L. and Liang, J. J. (2001) *Mol. Vis.* **7**:178-183.
14. Sun, T. X. and Liang, J. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(1):286-290.
15. Marin-Vinader, L. et al. (2006) *FEBS J.* **273**(14):3172-82.
16. Cobb, B. A. and Petrash, J. M. (2000) *Biochemistry* **39**(51):15791-15798.
17. Pasta, S. Y. et al. (2004) *Mol. Vis.* **10**:655-662.
18. Liang, J. J. (2004) *Protein Sci.* **13**(9):2476-2482.
19. Liang, J. J. and Fu, L. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**(1):7-12.
20. Bova, M. P. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**(2):1035-1042.
21. Wilmarth, P. A. et al. (2006) *J. Proteome Res.* **5**(10):2554-2566.
22. Lampi, K. J. et al. (2006) *Biochemistry* **45**(10):3146-3153.
23. Flaugh, S. L. et al. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**(41):30782-30793.
24. Srivastava, O. P. and Srivastava, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**(1):44-49.
25. Thampi, P. et al. (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**(10):3265-3272.
26. Aquilina, J. A. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**(15):14485-14491.

製品ガイド

- ▶ Clontech 蛍光タンパク質ベクター一覧