

## アピコンプレクサ原虫におけるタンパク質レベルの迅速な調節

Carolina Agop-Nersesian<sup>1,3</sup>, Angelika Herm-Gotz<sup>1,3</sup>, Sylvia Munter<sup>1,3</sup>, Joshua S. Grimley<sup>2</sup>, Thomas J. Wandless<sup>2</sup>, Friedrich Frischknecht<sup>1</sup> & Markus Meissner<sup>1</sup>

1) Hygieneinstitut, Department of Parasitology, University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 324, D-69120 Heidelberg, Germany.

2) Department of Chemistry and Systems Biology, Stanford University, 269 Campus Drive, Stanford, California 94305, USA.

3) These authors contributed equally to this work.

アピコンプレクサ類の原虫（寄生性のマラリア原虫やトキソプラズマ原虫などが含まれる）の遺伝子機能の解析は、タンパク質レベルを簡単迅速に調節するツールがないため限界がある。リガンド調節性の不安定化ドメインを目的タンパク質に融合させることにより、トキソプラズマ原虫 (*T. gondii*) 内の目的タンパク質の迅速かつ可逆的な安定化が可能になる。これにより、寄生性原虫の宿主細胞内への侵入および（あるいは）宿主細胞内での増殖の過程において重要な役割を果たしているタンパク質の機能解析を効率的に行うことができる。

### はじめに

アピコンプレクサ類の原虫の重要な遺伝子の機能解析はこれまで条件変異 (conditional mutation) の導入により行われてきたが、その主な欠点は発現スイッチのキネティクスが遅いことである。すなわち、表現型の変化が現れるまでに数時間から数日かかることである (1)。

哺乳類細胞でタンパク質の量を迅速に調節できることが最近報告された。不安定化ドメイン (DD) を融合させた目的タンパク質に、合成リガンドを可逆的に結合させることにより、目的タンパク質を選択的に安定化することができる。Rapamycin結合タンパク質FKBP12の変異体であるDDタグは、膜透過性リガンドShield1の非存在下で迅速なプロテアソーム分解を仲介する。しかし、Shield1がDDタグに結合すると、融合タンパク質はプロテアソーム分解から保護され、細胞内の量が急激に増加する (2)。

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、この技術を利用することができる。

ProteoTuner (プロテオチューナー) 技術をアピコンプレクサ類の原虫に適用できるかどうかを調べるために、我々はモデルシステムとしてトキソプラズマ原虫 (*T. gondii*) を用いた。黄色蛍光タンパク質 (YFP) のN末端にDDを融合させたタンパク質を用いて、このシステムが*T. gondii*でうまく機能するかどうかを評価した。細胞内および細胞外のトキソプラズマ原虫で、DD-YFP融合タンパク質はShield1添加後それぞれ20分、1時間未満で検出された (データ省略)。

### ProteoTunerシステムによる機能解析

我々は*T. gondii*特異的タンパク質の中で、テトラサイクリン誘導システムによりその機能の詳細がすでに明らかにされているモータータンパク質TgMyoAの条件変異体 (3) に着目した。DD融合タンパク質システム (すなわち、ProteoTunerシステム) により必須の原虫タンパク質の制御と機能解析を行えるかどうかを評価するために、候補タンパク質としてTgMyoAを選んだ。我々は、N末端にDDとmycタグを融合したTgMyoA (DD-MyoA) を強力な構成プロモーターp5RT70から安定発現する原虫を作製した (4)。また、Shield1依存的に制御可能なDD-MyoAを発現するトランスジェニック原虫クローンも作製した。トランスジェニックDD-MyoAを安定化させると、内在性のTgMyoAの発現が抑制された (図1、パネルA)。テトラサイクリン誘導発現システムを用いたTgMyoAの過剰発現で同様なことが起こることがすでに報告されており、内在性のTgMyoAの発現抑制は転写後に起こると推測されていた (5)。しかし、我々はDD融合タンパク質システムを使用することにより、内在性のTgMyoAの発現抑制は転写後ではなく、翻訳後に起こることを発見できた。内在性のTgMyoAの発現抑制は、異所性のTgMyoAの過剰発現により、内在性のTgMyoAが相互作用する相手 (例えば、モーター複合体を安定化するミオシン軽鎖TgMLC) に対する競合が起こるためと考えられる (6)。この融合タンパク質は機能を有しなかった。しかし、タンパク質のタグ標識はタンパク質の機能に影響を与えるものであり、それはDD配列自身によるものではない。

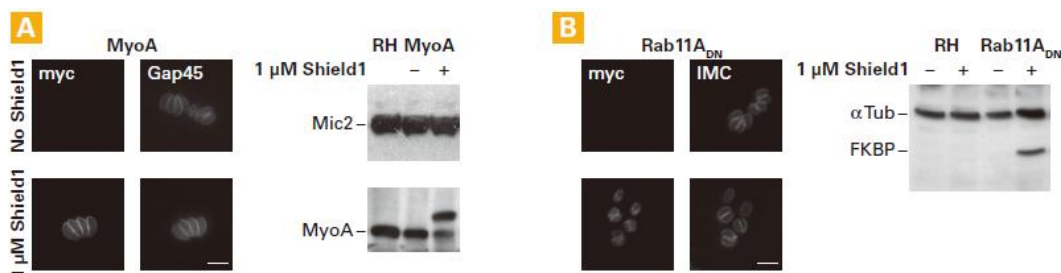


図1. ProteoTunerシステムによる必須タンパク質の機能解析

DD-MyoA (パネルA) および DD-Rab11<sub>DN</sub> (パネルB) を発現する *T. gondii* 原虫に対して免疫蛍光染色およびウェスタンブロット分析を行った。どちらの方法でも、DD 融合タンパク質はShield1の存在下で安定化されることが確認された。免疫蛍光染色はShield1誘導の4時間後に、モノクローナル抗myc抗体 (clone 9E10, Sigma) および抗Gap45抗体 (7)あるいはポリクローナルIMC1抗体 (8)を用いて行った。スケールバー (目盛尺) は10 μm。ウェスタンブロット分析は、Shield1の存在下または非存在下で48時間 (DD-MyoAの場合) または2時間 (DD-Rab11<sub>DN</sub>の場合) 増殖させた同じ原虫株に対して、それらの抗体を用いて行った。

### ProteoTuner技術によるノックアウト表現型の作製

必須遺伝子の機能を調べるためにしばしば用いられる一般的な方法は、ドミナントネガティブ対立遺伝子を過剰発現させて表現型の変化を調べる方法である。我々は、Small Gタンパク質であるRab11Aの機能を調べるために、DD融合タンパク質システム (ProteoTunerシステム) を用いて、Shield1依存性のドミナントネガティブ変異体を試みた。まず、GTPase 部位を不活性化させたドミナントネガティブ変異体であるTgRab11A (N126I)にDD領域を融合させたDD-Rab11A<sub>DN</sub>を作製した。次にこれを安定トランスフェクションし、この遺伝子を安定に発現する原虫クローンを単離した。このクローンでは、1 μM Shield1添加の2時間後にDD-Rab11A<sub>DN</sub>が検出された (図1、パネルB)。増殖アッセイにおいて、Shield1非存在下ではRH 野生型 (RHwt) 原虫と同様な正常なプラーク形成が観察されたが、Shield1存在下では原虫の増殖は認められなかった。このことは、ドミナントネガティブGタンパク質の発現は原虫の増殖に有害であることを示している。

次に、DD融合システムの迅速な誘導キネティクスを利用して、Rab11Aが細胞内と細胞外の原虫で異なる役割を担っているかどうかを調べた。細胞外の原虫をShield1存在下または非存在下で20分間培養した後、宿主細胞に3時間感染させた。細胞内に侵入しなかった原虫は除去した。さらに、細胞内の原虫をShield1存在下または非存在下で16時間培養した。これらの原虫に対して宿主細胞内への侵入と複製の能力を分析した。Shield1処理により、RHwt原虫では侵入と複製に障害が現れなかったが、細胞外の変異型原虫ではDD-Rab11A<sub>DN</sub>の安定化により、Shield1で処理しなかった変異型原虫に比べて宿主細胞への侵入力が約85%減少した (図2)。図2は、Rab11Aは原虫の宿主細胞への侵入と細胞内での増殖 (複製または成熟) に関与していることを示している。これらの結果は、Rab11Aは細胞外と細胞内の原虫において必須の機能を担っており、また細胞外と細胞内の原虫のタンパク質の機能解析にProteoTuner技術を利用できることを示唆している。

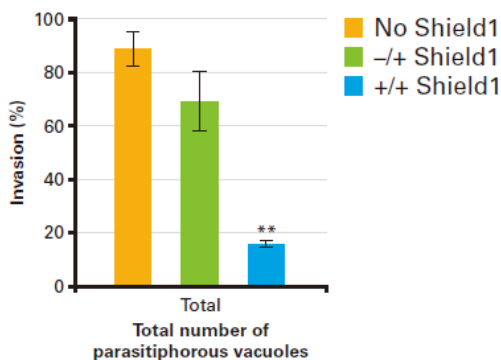


図2. 寄生性原虫DD-Rab11A<sub>DN</sub>株の侵入と複製の定量

寄生体胞 (parasitophorous vacuole) の総数を求めた。3つの個々の実験の平均値±s.d.を示す (-/+ : 侵入後にShield1処理した原虫; +/+ : 侵入の前後にShield1処理した原虫)。\*印は、Shield1処理しなかった原虫と侵入の前後でShield1処理した原虫との間で侵入率において有意差があることを示している (P < 0.01, two tailed Student's t-test)。

## ProteoTuner技術はアピコンプレクサ類の原虫の研究に利用可能である

DDシステムは*T. gondii*の研究に利用できるが、DDのようなタグを融合させると機能しないタンパク質もあるであろう。また別の問題として、すべての融合タンパク質がプロテアソームによって効率的に分解されるわけではないという可能性もある。しかし、このシステムの迅速な誘導キネティクスにより、細胞外および細胞内の原虫のタンパク質レベルを特異的に調節することができ、さらに原虫の生活環における特定のプロセスを詳細、機能的かつ正確に解析できる可能性がある。タンパク質の機能解析は、しばしばドミナントネガティブ変異体を利用して行われる。DDシステムを用いることにより、今ではこの手法をトキソプラズマ原虫やおそらく熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) (9)の研究に利用できるようになり、アピコンプレクサ類の原虫の研究に幅広く応用できるであろう。

## 謝辞

本稿で述べた研究は、*Nature Methods* (10)に発表されたものである。

## 参考文献

1. Meissner, M. *et al.* (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**(5):963–975.
2. Banaszynski, L.A. *et al.* (2006) *Cell* **126**(5):995–1004.
3. Meissner, M. *et al.* (2002) *Science* **298**(5594):837–840.
4. Soldati, D. & Boothroyd, J.C. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**(1):87–93.
5. Meissner, M. *et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**(22):E115.
6. Herm-Gotz, A. *et al.* (2002) *EMBO J.* **21**(9):2149–2158.
7. Gaskins, E. *et al.* (2004) *J. Cell Biol.* **165**(3):383–393.
8. Mann, T. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(43):41240–41246.
9. Armstrong, C.M. & Goldberg, D.E. (2007) *Nat. Methods* **4**(12):1007–1009.
10. Herm-Gotz, A. *et al.* (2007) *Nat. Methods* **4**(12):1003–1005. Erratum in: (2008) *Nat. Methods* **5**(1):113.