

Lenti-X™ ProteoTuner™ システムを用いたタンパク質の随時安定化による迅速な事象変化の視覚化

クロンテック（株）細胞生物学グループ

アクチンの迅速な再編成は細胞骨格の機能に必須です。アクチンの再編成は非常に速いプロセスであるため、その経時的な研究は面倒で困難なものでした。しかし、ProteoTuner（プロテオチューナー）システムの出現により、今ではアクチンの再編成や他の迅速な細胞内プロセスをそれらに關与するタンパク質の安定性を制御することにより研究できるようになりました。

真核細胞はその形態を迅速に変えることができる能力があります。例えば、感染部位への移動や、巨大分子、膜小胞およびオルガネラの細胞内輸送の過程などでそれを見ることができます。これらの事象は細胞骨格と呼ばれるシステムを介して整然と行われます。このシステムは3種類のタンパク質繊維（フィラメント）、すなわち微小管、中間径フィラメントおよびアクチンフィラメントのネットワークから構成されています。

アクチンの再編成

アクチンは42 kDaのタンパク質で、細胞に広がる繊維系を形成し、絶えず重合と脱重合を繰り返しています（文献1~2参照）。各フィラメントのプラス端は、逆側のマイナス端よりもアクチン単量体に対してはるかに高い親和性をもっています（図1）。

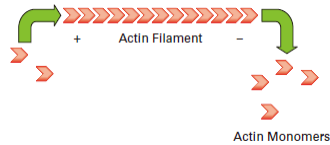


図1. アクチンの重合と脱重合

アクチンフィラメントの重合は、アクチンフィラメントのプラス端にアクチン単量体を取り込まれる様式で起こる。逆に脱重合は、マイナス端でアクチン単量体がアクチンフィラメントから解離する様式で起こる。これにより、アクチンフィラメントのネットワークは絶えず再編成される。

今日まで、細胞のアクチンフィラメント・ネットワークの再編成がどの程度の速さで起こっているかを推定することは困難でした。既存の視覚化法は、蛍光標識アクチンや抗アクチン抗体、あるいは蛍光標識ファロイジン (phalloidin; アクチンフィラメントと特異的に結合するタンパク質) などのマーカーを使用します。しかし、これらの技術は染色あるいは標識時のアクチンフィラメント・ネットワークの状態しか捉えることができず、アクチンフィラメント・ネットワークのダイナミクスをモニターすることはできません。

アクチンの再編成をモニターするために、*in vitro*-標識アクチンを細胞にマイクロインジェクションし、インジェクション後に編成あるいは再編成されたアクチンフィラメントを同定する実験がすでに行われています。この標識アクチンのアクチン・ネットワークへの完全な取り込みをもとに、PtK2上皮細胞ではアクチンフィラメント・ネットワークが1時間で完全に再編成されることが報告されています (3)。残念ながら、マイクロインジェクションは非常に労力が必要で、一度に限られた数の細胞でしか行うことができません。そのため、我々はLenti-X レンチウイルスによる遺伝子導入とProteoTuner技術を利用して、より簡単な方法を開発しました。

ProteoTuner システムによるアクチン安定性の制御

ProteoTuner システムを用いることにより、アクチンフィラメント・ネットワークの再編成など、迅速なプロセスを簡単かつ信頼性よく観察することができます。ProteoTuner システムでは、非常に不安定な不安定化ドメイン (DD) を含む融合タンパク質として目的のタンパク質を発現させます。DD を融合したタンパク質は、プロテアソームにより迅速に分解されます。しかし、DD タグ融合タンパク質を発現する細胞を、安定化リガンド Shield1 を含む培地で培養すると、そのタンパク質は分解から保護され、細胞内に蓄積します (4)。Shield1 を培養培地に添加後わずか 15~20 分で、融合タンパク質は検出可能なレベルにまで蓄積します (5)。

この理由により、細胞内のアクチンフィラメントの動的ターンオーバーを調べるために、我々は ProteoTuner システムの迅速なキネティクスを利用しました(図2)。特にこの実験では、DD タグ付きアクチン分子を神経前駆細胞に導入発現させるために、**Lenti-X ProteoTuner System** を用いました。

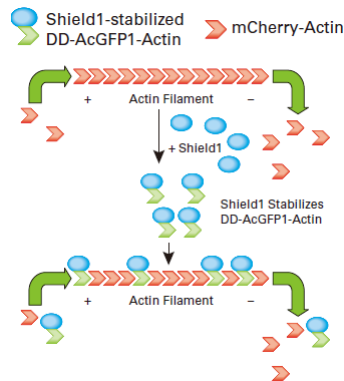


図2. 実験デザイン

Shield1の非存在下ではmCherry-アクチンのみが存在し、mCherry-アクチンは新たに形成されるアクチンフィラメントに取り込まれる。Shield1を添加すると、DDAcGFP1-アクチンが安定化されるため、DDAcGFP1-アクチンはmCherry-アクチンとともに新たに形成されるアクチンフィラメントに取り込まれる。

我々は次のように2つのレンチウイルスコンストラクトをデザインしました。一つはN末端にmCherryを融合させたヒトαアクチンをコードするもので、導入された細胞内で標識アクチンフィラメントを構成的に発現します。もう一つはN末端にDDタグ付きAcGFP1を融合させたヒトαアクチンをコードするもので、DD-AcGFP1-アクチンを発現します。このDD-AcGFP1-アクチン融合体はShield1の存在下でのみ安定で、分解から保護されました。Shield1の非存在下では、DD-AcGFP1-アクチンは細胞内のアクチンフィラメント・ネットワークに取り込まれる前にプロテアソームによって直ちに分解されました。

結果および考察

HeLa細胞と神経前駆細胞のそれぞれにmCherry-アクチンおよびDD-AcGFP1-アクチン・レンチウイルスコンストラクトを共感染させ、Shield1の存在下または非存在下で培養しました。Shield1の添加によりDD-AcGFP1-アクチンは非常に速く安定化され、我々はDD-AcGFP1-アクチンのアクチンフィラメントへの取り込みをモニターすることができました。

予想通り、Shield1の非存在下では、(mCherry-アクチンに由来する)非常に強い赤色蛍光で標識された細胞骨格が観察され、緑色チャンネルでは明確なシグナルは観察されませんでした(図3)。このことは、DD-AcGFP1-アクチンがダイナミックに変化するアクチンフィラメント・ネットワークに取り込まれる前に急速に分解されたことを示唆しています(図3、パネルA-BおよびE-F)。1時間後にShield1をHeLa細胞に添加すると、DD-AcGFP1-アクチンは安定化され、mCherry-アクチンとともにアクチンフィラメント・ネットワークに取り込まれました(図3、パネルC-D)。実際、Shield1処理のわずか15分後に、DD-AcGFP1-アクチンがmCherry-アクチンとともにアクチンフィラメントに局在化していることが観察されました(データ省略)。神経前駆細胞を用いた実験(図3、パネルE-H)より、神経前駆細胞でもアクチンフィラメントのターンオーバーが迅速に(3時間以内で)起こっていると結論できました。

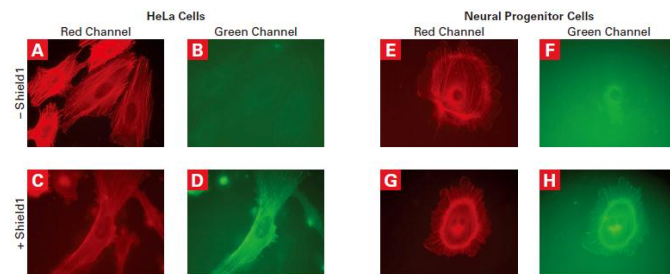


図3. ProteoTunerによるアクチン安定性の制御

Shield1の非存在下では、正常なmCherry標識アクチンフィラメント・ネットワークが存在するにも関わらず(パネルA&E)、DD-AcGFP1-アクチンは存在しない(パネルB&F)。Shield1の存在下では、DD-AcGFP1-アクチンは安定化され、mCherry-標識アクチン(パネルC&G)とともにアクチンフィラメント・ネットワークに存在する(パネルD&H)。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、Zeiss® Axioskop™顕微鏡を用いて観察した(40x

対物レンズを使用)。フィルターセットとして、green Chroma filter set HQ460/40, Q490LP, HQ515/30およびred Chroma filter set HQ 540/40X, 570DCPL, D600/50Mを用いた。

mCherry-アクチンおよび Shield1 で安定化された DD-AcGFP1-アクチンを用いたこの実験により、HeLa 細胞ではアクチンフィラメント・ネットワークは 1 時間未満で完全に再編成されることが実証されました。この結果は、前述の面倒なマイクロインジェクション実験 (3) で報告された結果と一致しましたが、はるかに簡単な ProteoTune 法を用いて結果を得ることができました。

この実験で、アクチン・ネットワークの迅速な再編成が観察されたほか、DD が融合タンパク質単量体のアクチンフィラメントへの取り込みを妨害しなかったことが実証されました。DD-AcGFP1-アクチンを用いた場合でも mCherry-アクチンの場合と全く同じフィラメントパターンが観察されました (図 3、パネル C-D および G-H)。また、Shield1 の存在下でも毒性は観察されませんでした。

結語

ProteoTuner システムは目的タンパク質の量を迅速に変化させることができます。目的タンパク質を DD 融合タンパク質として発現させ、Shield1 の添加または除去によってその安定性を制御するだけで、細胞骨格の再編成などの非常に動的なプロセスを観察することができます。

参考文献

1. Holmes, K. C., *et al.* (1990) *Nature* **347**(6288):44–49.
2. Ono, S. (2007) Mechanism of Depolymerization and Severing of Actin Filaments and Its Significance in Cytoskeletal Dynamics. In *International Review of Cytology*, Ed. Jeon, K. W. (Academic Press, NY) Vol. 253, pp. 1–82.
3. Theriot, J. A. and Mitchison, T. J. (1991) *Nature* **352**(6331):126–131.
4. Quick & Reversible Control of Your Protein of Interest. (April 2008) *Clontechiques* **XXIII**(2):1–2.
5. Banaszynski, L. A. *et al.* (2006) *Cell* **126**(5):995–1004.