トピックス

内在性タンパク質翻訳後修飾の生細胞計測

木村 宏, 佐藤優子, 林 陽子 大阪大学生命機能研究科

1. 生細胞内の翻訳後修飾の計測法

生きた細胞内における分子の動態は、GFP (green fluorescent protein) などの蛍光タンパク質の利用と顕微鏡技術の開発により、近年急速に理解が進んできた。タンパク質の局在は、蛍光タンパク質と遺伝子工学的に融合して細胞内で発現させることで可視化でき、また、タンパク質の分子動態の計測も1分子可視化技術やFRAP (fluorescence recovery after photobleaching), 蛍光相関分光法などにより可能となっている。しかしながら、細胞内では、同一タンパク質といえどもすべての分子が一樣に働くわけではなく、複合体形成や翻訳後修飾などにより、その機能が多彩に制御される。したがって、タンパク質の「機能」を生細胞で計測するためには、特定の状態にある分子のみを選択的に検出する技術が必要である。

これまで、タンパク質複合体の形成や翻訳後修飾の生細胞計測のために、2つの蛍光タンパク質間の距離と配向性の変化を利用したFRET (Förster resonance energy transfer; 共鳴エネルギー移動) センサーが開発されてきた¹⁾。翻訳後修飾のプロープとしては、リン酸化やアセチル化、メチル化など多くの分子内FRETセンサーが報告されている。これらのFRETセンサーは、細胞内の修飾活性の計測が可能であり、細胞内構造への局在化シグナルの付加により特定の場所における修飾シグナルを検出できる。しかし、真に有用なFRETセンサーの開発には、ダイナミックレンジやシグナル・ノイズ比の最適化が必要である。また、FRETセンサーは、修飾酵素と脱修飾酵素のバランスを計測するものであり、内在性タンパク質の修飾は検出できない。

それに対して、われわれが最近開発したFab (抗原結合断片) を用いる方法 (FabLEM; Fab-based live endogenous modification labeling) は、生細胞内における内在性タンパク質の翻訳後修飾の検出が可能である²⁾⁻⁴⁾。

2. FabLEM による内在性ヒストン修飾の検出

ヒストンは、真核生物の細胞核でゲノムDNAと共にクロマチンを形成するタンパク質であり、その翻訳

後修飾は遺伝子発現調節やDNA損傷修復などのゲノムの機能発現制御と維持に重要な役割を果たしている。ヒストン翻訳後修飾のゲノム上の分布や細胞核内の局在性は、修飾特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降や免疫染色により解析できるが、個々の生細胞におけるヒストン修飾の動態は明らかになっていなかった。

われわれは、ヒストン修飾部位特異的モノクローナル抗体由来のFabを細胞に導入することで、生細胞内でヒストン修飾を可視化できると考えた。実際、細胞へ導入された蛍光標識Fabは、その標的の修飾ヒストンに特徴的な局在性を示した (図1a)。たとえば、ヒストンH3のLys27トリメチル化特異的Fabは、その修飾が濃縮される不活性X染色体に局在化する³⁾。蛍光標識Fabが生細胞内で正しく標的の修飾を認識することは、修飾酵素のノックアウト細胞や阻害剤を用いた解析などにより確かめられた³⁾。

細胞内への抗体の導入は、しばしば機能阻害実験にも用いられるため、蛍光標識Fabが安定に標的修飾に結合し、その機能を阻害する可能性も考えられた。しかし、抗原結合部位を2つもつIgGとは異なり、Fabの抗原結合は1価であり、結合の親和性はIgGよりも1~2桁程度低下する (K_D が $10^1 \sim 10^2$ 程大きくなる)。実際、蛍光標識Fabの細胞内でのクロマチンとの結合時間は、数秒~数十秒程度であり、細胞内タンパク質の修飾部位への結合を必ずしも阻害しない。また、蛍光標識Fabを導入し、蛍光顕微鏡でタイムラプス観察しても細胞の増殖やマウス初期胚発生には影響を与えなかったことから、FabLEMは細胞機能を阻害せずに翻訳後修飾を検出できる方法であるといえる。

われわれはこの方法を用いて、細胞周期におけるヒストンH3リン酸化の動態を解析し (図1b)、G2期の細胞核中でのリン酸化はそのリン酸化酵素と脱リン酸化酵素のバランスにより制御されていることを明らかにした。そして、正常細胞とがん細胞では脱リン酸化酵素活性レベルが異なり、それが染色体の安定性に関与することを示唆する結果を得た⁴⁾。また、Fabは抗原への結合が一過性で、核膜孔を自由に通過できる大きさ (50 kDa) であることから、蛍光標識Fabの細

Monitoring Post-translational Modification on Endogenous Proteins in Living Cells

Hiroshi KIMURA, Yuko SATO and Yoko HAYASHI-TAKANAKA

Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

※図1, 図2は、電子ジャーナル (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

図 1 FabLEM の原理と例. (a) 模式図とトリメチル化 H3Lys27 特異的 Fab の不活性 X 染色体への局在. (b) 生細胞におけるリン酸化 H3Ser10 の核内局在変化 (電子付録 動画 1).

図 2 FabLEM によるヒストン修飾レベルの計測. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA; トリコスタチン A) の添加により, アセチル化特異的 Fab の核への集積が見られる. 核と細胞質の濃度比 (N/C) を測定することで, アセチル化レベルの変化を解析できる.

胞核と細胞質の存在量比の解析により, 細胞核中のヒストン修飾レベル変化の計測も可能となった (図 2). たとえば, FabLEM により, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果やマウス初期胚におけるヒストン H3 のアセチル化レベルの変化を明らかにした³⁾.

3. FabLEM の応用

FabLEM により, これまで多様なヒストン修飾の生細胞計測に成功しているが, この方法は, ヒストンのような細胞内に大量に存在するタンパク質のみならず RNA ポリメラーゼ II やリン酸化酵素複合体にも応用可能である. また, 異なる蛍光色素で標識した Fab を同時に細胞へ導入することで, 複数の修飾を単一細胞で解析できる. FabLEM 法では, Fab の抗原との親和性が重要である. 親和性が高すぎると機能阻害に働く可能性が高くなるが, 低すぎる場合は細胞中で抗原に結合しない分子の割合が増えバックグラウンドが高くなる. 細胞内の抗原の量にも依存するが, 経験的に

は, IgG で $10^{-9} \sim 10^{-11}$ 程度の K_D 値を示す抗体が適している. われわれは, 均質な Fab を大量に調製できる独自に作製したモノクローナル抗体を用いているが, 抗原に対してアフィニティー精製したポリクローナル抗体も使用できると考えられる.

FabLEM 法の短所としては, ①タンパク質の生細胞への導入が必要なこと, ②Fab の希釈や分解により長くても 2~3 日しか観察できないことがあげられる. ①のタンパク質導入に関して, われわれはガラスビーズを用いた簡便で効率のよい方法を使用している^{3), 5)}. また, ②の問題に関しては, 現在, 発生や分化に伴うヒストン修飾動態の適応的な解析にむけて, より長時間かつ個体レベルでの翻訳後修飾計測系の開発に取り組んでいる.

近年, 超解像顕微鏡や平面照明顕微鏡など, 蛍光観察技術の発展が目覚ましいが, タンパク質機能を検出するためのプローブ開発は, 一部の FRET センサーを除き^{1), 6)}, あまり進んでいない. 今回紹介した FabLEM 法は, 任意の翻訳後修飾の解析に応用可能であるため, 細胞内のシグナル伝達研究や翻訳後修飾を指標とした機能的タンパク質の生細胞動態計測のための非常に有用な技術であると考えられ, 今後の応用が期待できる.

文 献

- 1) Aye-Han, N. N. *et al.* (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 392-397.
- 2) Kimura, H. *et al.* (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 412-418.
- 3) Hayashi-Takanaka, Y. *et al.* (2011) *Nucleic Acids Res.* **39**, 6475-6488.
- 4) Hayashi-Takanaka, Y. *et al.* (2009) *J. Cell Biol.* **187**, 791-780.
- 5) 木村 宏 (2001) *実験医学* **19**, 2313-2317.
- 6) Komatsu, N. *et al.* (2011) *Mol. Biol. Cell* **22**, 4647-4656.

木村 宏

木村 宏 (きむら ひろし)

大阪大学生命機能研究科准教授
北海道大学大学院理学研究科中退, 博士 (理学).
研究内容: 細胞核の機能と構造
連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3
E-mail: hkimura@fbs.osaka-u.ac.jp

佐藤 優子

佐藤 優子 (さとう ゆうこ)

大阪大学生命機能研究科特任研究員
総合研究大学院大学博士課程修了.
研究内容: ヒストン修飾のライブ観察
E-mail: sato@fbs.osaka-u.ac.jp

林 陽子

林 陽子 (はやし ようこ)

大阪大学生命機能研究科特任研究員
東京大学大学院理学研究科博士課程修了.
研究内容: ヒストン修飾のダイナミクス
E-mail: ythayashi@fbs.osaka-u.ac.jp