

学 位 論 文 題 名

Analysis of intracellular protein dynamics by the use of
fluorescence auto-and cross-correlation analysis

(蛍光自己相関分光法および蛍光相互相関分光法による
細胞内蛋白質動態の解析)

学位論文内容の要旨

プロテオミクス研究の中で特に重要な位置を占めているのが蛋白質間相互作用の解析である。真の蛋白質間相互作用の記述には相互作用のタイミング、持続時間、相互作用の強さを *in vivo* すなわち生細胞において測定する必要がある (Chapter 1)。

われわれは蛍光自己相関分光法 (fluorescence auto-correlation spectroscopy、以下 FCS) および蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy、以下 FCCS) を用いて生きた細胞内における蛋白質の動態を調べることを目標とし、本研究では、FCS によるプロテインキナーゼ C (protein kinase C、以下 PKC) の細胞膜移行機構の解析 (Chapter 2)、FCCS による細胞内プロテアーゼ活性の検出 (Chapter 3) を行なった。

FCS は共焦点光学系により集光されたレーザー光からなる微小領域内をブラウン運動している蛍光分子を蛍光強度のゆらぎとして観測し、そのゆらぎから微小領域内の分子数および滞在時間を求める手法である。分子の滞在時間からは分子の拡散定数が求められる。FCS は微小領域 (10^{-15} リットル) を非侵襲的に短時間 (数十秒) で測定する事が可能なため、細胞内における分子のダイナミックな動きの解析へと応用が進んでいる。PKC はセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞内シグナル伝達に関わる分子の一つとして知られている。ガンのプロモーターであるホルボールエステル (TPA) は PKC を特異的に活性化し、細胞質から細胞膜へと移行を促進する事が知られている。近年の緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein、以下 EGFP) 融合 PKC の蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡による生細胞の蛍光像観察から、PKC の細胞内局在についてはよく調べられてきた。しかしながら PKC は、1) 膜移行前に細胞質中の他の分子にアンカーされているのかどうか、2) 膜移行後に細胞膜で動かなくなっているのかどうか、3) どのように膜移行するのかについてはわかっていない。そこでわれわれは FCS 測定により PKC の細胞内での動態を明らかにする事を目的とした。細胞質中での PKC β II-EGFP の拡散定数は EGFP との分子量の比から推定される値とほぼ一致した。よって、PKC β II-EGFP は EGFP と同様、細胞質中では他分子とほとんど相互作用せずに自由拡散していると考えられる。次に、TPA 刺激後の細胞膜では細胞質でのものより 1/10 - 1/100 の速さでゆっくりと拡散する PKC β II-EGFP が現れた。この遅い PKC β II-EGFP は細胞膜に存在する

TPA や PKC のアンカー蛋白質および基質と相互作用している PKC β II-EGFP であると考えられる。今回の解析結果から、細胞質中で自由拡散している PKC は細胞の中心から細胞膜まで (10 μ m) を約 2.5 秒で達している事になる。また、PKC β II の膜移行は細胞骨格、エネルギーに依存せず起こる。よって PKC β II は能動的な輸送により細胞膜に移行するのではなく、細胞質中で自由拡散している PKC β II が細胞膜に付加された TPA にトラップされていく機構により膜移行しているものと考えられる。

次に我々は、FCCS による生きた細胞内での特定の蛋白質間相互作用の解析を目指した。FCCS は 2 色の異なる蛍光分子が測定領域を通過する際の光強度変化の同時性(相互相関)から、分子間相互作用を検出する手法である。細胞内での FCCS 測定としては、コレラ毒素の細胞外からの取り込みおよび細胞内でのサブユニット解離の測定および細胞内のカルモジュリンおよびそれに依存したプロテインキナーゼの相互作用を測定の報告がある。これらの測定では蛍光分子として両方または片方に合成色素を用いており、細胞内導入が煩雑になる事や色素のラベル化率の不均一性が結果の再現性を損なう可能性がある。本研究では 2 種類の異なる蛍光蛋白質を利用した細胞内 FCCS 測定を行なった。

蛍光蛋白質として EGFP および単量体赤色蛍光蛋白質 (monomeric red fluorescent protein、以下 mRFP) を用いた。まず *in vitro* で合成した融合蛋白質 EGFP-mRFP (G-x-R) を溶液中で測定し、測定条件の検討および最適化を行なった。また、enterokinase の認識配列をリンカーに挿入した融合蛋白質 (G-D₄K-R) を用い、相互相関の解消の速度が酵素濃度依存的に起こることを確かめた。次に caspase-3 の認識配列をリンカーに挿入した融合蛋白質 (G-DEVD-R) を HeLa 細胞内に発現させ、細胞内での酵素活性を相互相関の解消により観測した。細胞内の FCCS 測定においては EGFP と比較して発光の弱い mRFP をタンデムに二つ融合させた蛋白質 (G-DEVD-R₂) を用い、mRFP の蛍光強度を補う事で細胞内における酵素活性の検出を行なう事ができた。また、caspase-3 の認識配列のアミノ酸の一つを置換した融合蛋白質 (G-DEVG-R₂) においては、同条件で相互相関の解消が無かった事から、caspase-3 の DEVD 配列に対する特異的な活性が確かめられた。

以上の事から、FCS および FCCS は細胞内における蛋白質の動態の解析に有用である事がわかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一 (薬学研究科)

学 位 論 文 題 名

Analysis of intracellular protein dynamics by the use of fluorescence auto-and cross-correlation analysis

(蛍光自己相関分光法および蛍光相互相関分光法による
細胞内蛋白質動態の解析)

本論文はプロテオミクス研究の中で特に重要な位置を占めている蛋白質間相互作用を蛍光相関分光法を用いて生きた細胞内で解析したものである。

ここでは特に二つの手法すなわち蛍光自己相関分光法 (fluorescence auto-correlation spectroscopy、以下 FCS) および蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy、以下 FCCS) を用いた。

FCS は共焦点光学系により集光されたレーザー光からなる微小領域内をブラウン運動している蛍光分子を蛍光光強度のゆらぎとして観測し、そのゆらぎから微小領域内の分子数および滞在時間を求める手法である。分子の滞在時間からは分子の拡散定数が求められる。FCS は微小領域 (10^{15} リットル) を非侵襲的に短時間 (数十秒) で測定する事が可能なため、細胞内における分子のダイナミックな動きの解析へと応用が進んでいる。Protein Kinase C (PKC) はセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞内シグナル伝達に関わる分子の一つとして知られている。ガンのプロモーターであるホルボールエステル (TPA) は PKC を特異的に活性化し、細胞質から細胞膜へと移行を促進する事が知られている。近年の緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein、以下 EGFP) 融合 PKC の蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡による生細胞の蛍光像観察から、PKC の細胞内局在についてはよく調べられてきた。しかしながら PKC は、1) 膜移行前に細胞質中の他の分子にアンカーされているのかどうか、2) 膜移行後に細胞膜で動かなくなっているのかどうか、3) どのように膜移行するのかについてはわかっていない。そこでわれわれは FCS 測定により PKC の細胞内での動態を明らかにする事を目的とした。細胞質中での PKC β II-EGFP の拡散定数は EGFP との分子量の比から推定される値とほぼ一致した。よって、PKC β II-EGFP は EGFP と同様、細胞質中では他分子とほとんど相互作用せず自由拡散していると考えられる。次に、TPA 刺激後の細

胞膜では細胞質でのものより 1/10 - 1/100 の速さでゆっくりと拡散する PKC β II-EGFP が現れた。この遅い PKC β II-EGFP は細胞膜に存在する TPA や PKC のアンカー蛋白質および基質と相互作用している PKC β II-EGFP であると考えられる。今回の解析結果から、細胞質中で自由拡散している PKC は細胞の中心から細胞膜まで(10 μ m)を約 2.5 秒で達している事になる。また、PKC β II の膜移行は細胞骨格、エネルギーに依存せず起こる。よって PKC β II は能動的な輸送により細胞膜に移行するのではなく、細胞質中で自由拡散している PKC β II が細胞膜に付加された TPA にトラップされていく機構により膜移行しているものと考えられる。

次に、FCCS による生きた細胞内での特定の蛋白質間相互作用の解析を目指した。FCCS は 2 色の異なる蛍光分子が測定領域を通過する際の光強度変化の同時性(相互相関)から、分子間相互作用を検出する手法である。細胞内での FCCS 測定としては、コレラ毒素の細胞外からの取り込みおよび細胞内でのサブユニット解離の測定および細胞内のカルモジュリンおよびそれに依存したプロテインキナーゼの相互作用を測定の報告がある。これらの測定では蛍光分子として両方または片方に合成色素を用いており、細胞内導入が煩雑になる事や色素のラベル化率の不均一性が結果の再現性を損なう可能性がある。本研究では 2 種類の異なる蛍光蛋白質を利用した細胞内 FCCS 測定を行なった。

蛍光蛋白質として EGFP および単量体赤色蛍光蛋白質(monomeric red fluorescent protein、以下 mRFP)を用いた。まず *in vitro* で合成した融合蛋白質 EGFP-mRFP(G-x-R)を溶液中で測定し、測定条件の検討および最適化を行なった。また、enterokinase の認識配列をリンカーに挿入した融合蛋白質(G-D₄K-R)を用い、相互相関の解消の速度が酵素濃度依存的に起こることを確かめた。次に caspase-3 の認識配列をリンカーに挿入した融合蛋白質(G-DEVD-R)を HeLa 細胞内に発現させ、細胞内での酵素活性を相互相関の解消により観測した。細胞内の FCCS 測定においては EGFP と比較して発光の弱い mRFP をタンデムに二つ融合させた蛋白質(G-DEVD-R₂)を用い、mRFP の蛍光強度を補う事で細胞内における酵素活性の検出を行なう事ができた。また、caspase-3 の認識配列のアミノ酸の一つを置換した融合蛋白質(G-DEVG-R₂)においては、同条件で相互相関の解消が無かった事から、caspase-3 の DEVD 配列に対する特異的な活性が確かめられた。

以上の事から、FCS および FCCS は細胞内における蛋白質の動態の解析に極めて有用であり、細胞生物学における情報伝達系の解析に貢献するところ大である。よって筆者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。