



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	蛍光相関分光法とFRET を用いた細胞内タンパク質品質管理機構の解析
Author(s)	北村, 朗
Citation	和文誌バイオイメージング, 23(1), 12-17
Issue Date	2014
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58213
Type	journal article
File Information	12-17.pdf



特集「顕微鏡で測る」

蛍光相関分光法と FRET を用いた細胞内タンパク質品質管理機構の解析

北村 朗

北海道大・院・先端生命科学

* E-mail: akita@sci.hokudai.ac.jp

要旨

細胞が恒常性を維持するために、タンパク質は合成と分解、輸送などの点で調節を受けている。このようにして保たれた細胞恒常性を「タンパク質恒常性」という。タンパク質恒常性の破たんは神経変性疾患などの病因となると考えられている。筆者らは、蛍光相関分光法、FRET 法、光活性化型蛍光タンパク質などを用いることで、神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因因子である SOD1 タンパク質凝集体形成と除去の機構を明らかにした。さらに、これらの蛍光イメージング法で得られた結果と、古典的な生化学解析の結果を比較または統合的に解釈することで、より詳細な機構の解明を行った結果についてまとめて紹介する。

細胞内タンパク質の誕生と死—タンパク質の品質管理—

細胞が恒常性を維持するためには、数々の分子がそれぞれの機能を維持することが重要である。タンパク質はこのような細胞恒常性を維持するために重要な生体分子である。それでは、生命の基本単位である細胞の恒常性を維持するために、タンパク質にどのようなことが求められるのであろうか。それは、「量」と「質」であると解釈することが出来る。タンパク質の「量」と「質」を維持するためにはどのようにすればよいか。それは工場における製品生産を思い浮かべるとわかりやすい。工場で生産される製品は、需要に応じた供給量と品質を維持する必要がある。このような維持機構は「工場製品の品質管理」と言われる。細胞内におけるタンパク質の生産過程では、遺伝子からの転写、リボソームにおける翻訳、そしてポリペプチドを正

しく折り畳み機能的なタンパク質へとまとめあげるフォールディング過程が必要である [1]。そしてミスフォールディングしてしまったタンパク質 (不良品) は分解して壊す必要がある。これらの過程をまとめて、細胞内における「タンパク質の品質管理機構」と呼ばれている [2]。このような品質管理機構と共に細胞内外への輸送環境など生命プロセスが維持されている状態を「タンパク質恒常性 (Protein homeostasis/Proteostasis)」という [3, 4]。

細胞内タンパク質凝集体の細胞毒性

細胞内では翻訳されたポリペプチド鎖を機能的なタンパク質へとフォールディングする際に介在するのは「分子シャペロン」である。この分子シャペロンはタンパク質恒常性を維持するために重要な一つ目の砦である [1]。次に、細胞内のタンパク質分解システムには、主要な二つの経路が知られている。ひとつはユビキチン-プロテアソーム経路、もうひとつはオートファジー-リソソーム経路である [5, 6]。前者のユビキチン-プロテアソーム経路は、不要になったタンパク質に多量体化ユビキチンタンパク質で標識をする。この標識を「ポリユビキチン化」という。ポリユビキチン化されたタンパク質は、プロテアソームに送られ、タンパク質はポリペプチドの状態へと解きほぐされながら、針の穴に糸を通すようにプロテアソームの中へ送り込まれアミノ酸へと分解される。後者のオートファジー-リソソーム経路は、タンパク質のみならずオルガネラな

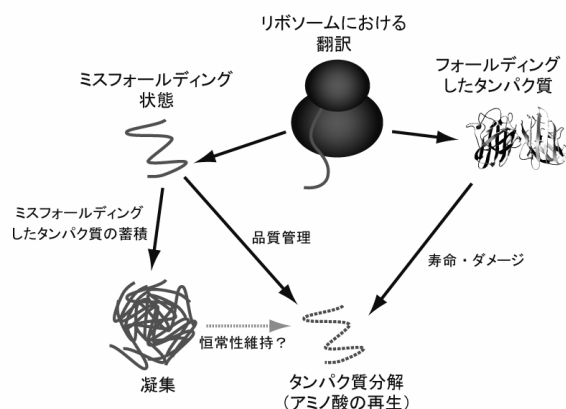


図 1. 細胞内タンパク質の品質管理機構

ども含めて不要となった対象を脂質の二重膜で隔離し、リソソームと融合させて分解するシステムである。これらのタンパク質分解経路が正しく働かなくなると、ミスフォールドしたタンパク質が増加する。増加したミスフォールドタンパク質が効率よく除去されない場合は凝集する [6]。この凝集状態には数～十量体程度の「オリゴマー」から、数 μm 程度という光学顕微鏡で容易に観察できるほどの大きさに至り、「封入体」と呼ばれるものもある。こういった凝集体は、他の正しくフォールディングしたタンパク質に結合してその機能を失わせることで、細胞にとって毒となりうることを示唆されている [7, 8]。このようなタンパク質凝集体が原因であると考えられている病気として、神経変性疾患、白内障、アミロイドーシスなどが知られている。神経変性疾患では、細胞内外にタンパク質が集積した「封入体」が病理学的によく高頻度で観察されることが多く、さらに、「封入体」には、ユビキチン化されたタンパク質が豊富に含まれることから、細胞内タンパク質分解系の破たんによるミスフォールドタンパク質の増加が「封入体」形成の重要な契機となっていると考えられている [7, 9]。目の水晶体でクリスタリンタンパク質が変性し凝集すると白く濁り光を通しにくくなるため、これが白内障の原因となることが知られている [10]。また、細胞外のタンパク質が構造変化を起こし、 β シート構造に富んだ不溶性のアミロイドという繊維状構造を形成すると、アミロイドが体内の臓器などに沈着し、機能不全を引き起こすと、アミロイドーシスと呼ばれる [11]。どの病気においてもタンパク質のフォールディング状態が変化することが共通項である。また、凝集したタンパク質の分子量はさまざまな大きさを持っているが、なかでも数量体～数十量体程度の可溶性オリゴマーが強い細胞毒性を獲得すると考えられている。

凝集体の大きさを測る—蛍光相関分光法—

それでは、タンパク質凝集体の大きさを測るためにはどのようにすれば良いであろうか？ 古典的には、ゲル濾過法やショ糖密度勾配超遠心分画などの生化学的手法が使われていた。ただし、これらの実験系は準備から検出までに長い時間を要する。そこで、著者らは、蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy; FCS) を利用することにした [12-14]。蛍光相関分光法は共焦点レーザー顕微鏡

でつくりだした微小な検出領域に蛍光分子が出入りすることにより生ずる蛍光ゆらぎを測定し、その自己相関関数を計算することで、蛍光分子の大きさと、検出領域内の平均分子数を解析する手法である。測定された蛍光強度の平均値を、検出領域内の平均分子数で割ると、単一粒子あたりの平均蛍光強度 (Counts per molecule; CPM) が求められる。この CPM 値の増大は凝集体解析において重要な情報をもたらしてくれる。細胞抽出液などの場合、蛍光分子で標識されたタンパク質が、自己会合して凝集体を形成しているのか、あるいは内在性のタンパク質と結合して分子量が大きく計測されているのかという問題点が出てくる。CPM 値はこの問題に対し、自己会合している分子種が存在することの直接的な証拠となる。著者らの研究では、神経変性疾患のひとつである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因因子である ALS 関連変異型 SOD1 タンパク質に黄色蛍光タンパク質 (YFP) を融合し、機械的に破碎した細胞抽出液の可溶性画分で凝集形成解析を行った [15]。この結果、プロテアソーム活性の阻害時、拡散係数より 1 MDa と推定される SOD1 分子種が出現した。さらに、CPM 値の増加が見られた。一方、野生型 SOD1-YFP では変化は見られなかった。次に、同様に調整した細胞抽出液に対し、抗 YFP 抗体による免疫沈降を行った後、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行ったところ、プロテアソーム活性低下に伴い、ALS 変異型 SOD1-YFP はポリユビキチン化された分子種が増えていることを確認した。これらの結果は、可溶性画分中に SOD1-YFP の凝集オリゴマーと、ユビキチン化された SOD1-YFP が混在していることを示唆している。

蛍光相関分光法は、分子量が一サンプルあたりの解析に必要なサンプル量が数十マイクロリットルですみ、さらに、測定時間が数分程度であることから、多くのサンプル数を解析する上できわめて有用なツールであると考えられる。

蛍光相関分光法のもう一つ重要な利点は、生細胞内での測定が可能なところである。上述の ALS 関連変異型 SOD1-YFP を発現する生細胞のプロテアソーム活性を阻害し、蛍光相関分光法測定を行ったところ、有意な拡散係数の低下と CPM 値の上昇が計測された [15]。このことは、生細胞内においても変異型 SOD1-YFP の凝集オリゴマーが形成されていることを示唆している。ただし、生細胞内においては、さまざまな生理的相互作用が存在することは

予想できる。そのため、測定された拡散係数の解釈は慎重に行わなければならない。著者らのグループが行った別の研究では、もやもや病リスク因子であり、ATPases Associated with diverse cellular Activities (AAA+)ファミリーに属するMysterin/RNF213タンパク質の生細胞内におけるオリゴマー化を蛍光相関分光法で解析した [16]。ここでは、生細胞内で測定された拡散係数を元に、Stokes-Einstein関係式による球状分子として仮定したときの分子量を算出した。その結果、AAA+ファミリータンパク質の性質からは六量体を形成すると考えられていたMysterinが、細胞質で拡散する成分のうち約半分が単量体として存在することが明らかとなった。CPM値は単量体GFPと比較して増加しなかったことも、この単量体説を支持する結果となった。

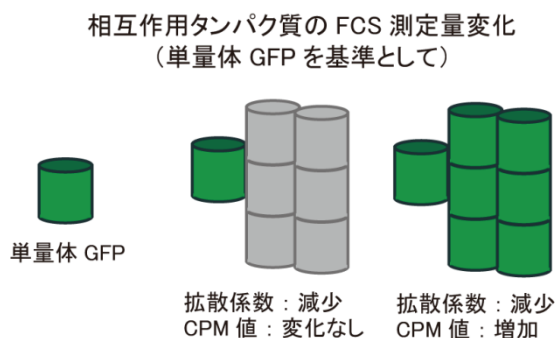


図2. 蛍光相関分光法で得られる測定値の解釈

凝集体と相互作用するタンパク質を調べる—蛍光相互相関分光法—

蛍光相関分光法の有用性は前項で概説したが、一つ大きな欠点が存在する。それは、相互作用する異種の相手が不明な点である。この問題点を解決するための方法として、蛍光相互相関分光法 (Fluorescence cross-correlation spectroscopy; FCCS)がある [17]。相互作用相手を異なる色の蛍光色素でラベルし、二色蛍光シグナル間の同時性を検出することで、相互作用の強弱を調べることができる。

著者らのグループは、細胞間でタンパク質の形質が遺伝する酵母ブリオンと分子シャペロンとの相互作用について、FCCS法を用いて検出することに成功した [18]。FCCS法も蛍光相関分光法同様、数十マイクロリットル程度の溶液量で済み、短時間で測定が可能なおことから、免疫沈降—ウェスタンブロット法などの結合実験と比較して簡便に解析ができると思われる。

また、筆者の属する研究室では、FCCS法を用いることで、生細胞内における解離定数 (K_d)を求める系を確立した [19]。FCCS法では、蛍光相関分光法同様に、各蛍光分子の平均分子数と、相互作用している分子の割合が求められる。よって、濃度に変換することで解離定数の算出が可能である。

ただし、FCCS法は相互作用相手が既知でなければ適応が困難な手法である。相互作用相手を見つけ出すためには、免疫沈降—マスマスプロトスコピー (IP-MS)法などのようなプロテオーム解析の技術と組み合わせることが肝要であると考えられる。著者らは一つの検討として、ALS関連TDP43タンパク質に着目した。このTDP43タンパク質が切断されて生じるカルボキシル末端断片 (TDP43CTF) は、全長よりも凝集しやすい。そこで、このTDP43CTFに結合するタンパク質を、IP-MS法により調べたところ、分子シャペロンであるHsp70が同定された。そこで、GFP-TDP43CTFとHsp70-RFPを共発現した細胞抽出液をFCCS法で解析したところ、相互作用が検出された (未発表データ)。この結果は、分子間相互作用解析にFCCS法が利用できることを示している。

従来型共焦点顕微鏡の光学系を元にしたFCCS法の典型的な問題点としては、10 μ M以上の高濃度域における解析が難しいことが挙げられる。より高濃度での測定を可能にするためには、検出領域の体積を減らすことが一つの解決法である。そのために、超解像蛍光顕微鏡技術の一つであるSTED (Stimulated emission depletion) 顕微鏡と、FCS/FCCSとの組み合わせが検討されている [20]。また、今回紹介したものは二色FCCS法であり、二種類の分子間相互作用のみを解析する手法であったが、四色FCCS法も

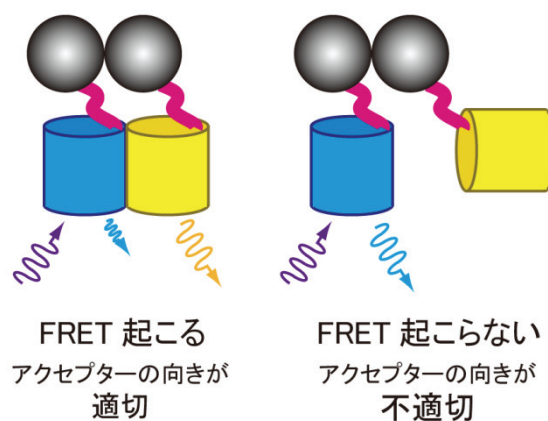


図3. ドナー・アクセプター間の立体配座がFRETに及ぼす影響の模式図

報告されている [21]。これは、六通りの分子間相互作用を同一時空間的に測定することが可能であることから、今後の生物学応用が期待される。

凝集体の構造を調べる—FRET 法—

これまで述べてきた蛍光相関分光またはその発展系である蛍光相互相関分光法は、分子の動きと数に着目するための方法であったが、凝集体を知るためには、凝集体に含まれる分子構造を解析する必要がある。このような構造に対してアプローチするための手法として、蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster/Fluorescence resonance energy transfer; FRET) 法がある。FRET は、おおよそ 10 nm 以内に近接し、エネルギーが移動しやすい相対的配座にある二つの蛍光分子間で起こる物理現象である。理論的には、蛍光分子間距離の近接は FRET を起こす必要条件にしか過ぎないことを理解しておかねばならないであろう。FRET を細胞などでイメージング計測するための手法については、文献 22 と文献 23 に詳しいが、ここでは最も重要な点のみを書き記しておきたい。それは、「FRET 効率」と「FRET インデックス」の違いである。前者の「FRET 効率」とは、励起状態にあるドナー分子のうち、アクセプター分子にエネルギーを受け渡す分子の割合を示し、アクセプターを褪色させたときのドナー蛍光強度変化 (アクセプターフォトブリーチング法) や、ドナーの蛍光寿命測定から求められる。後者の「FRET インデックス」は、ドナー・アクセプターの蛍光強度比を算出することで、FRET シグナルを強調する方法であり、計測装置によって値は変化する。分子間 FRET を利用する場合、より定量的である「FRET 効率」を計測するのが良いと思われる。そこで筆者らは、プロテアソーム活性阻害時、ALS 関連変異をもつ SOD1 タンパク質が形成する凝集体内部における分子間立体配座について解析するために、シアン色蛍光タンパク質で単一成分の蛍光寿命を示す mTFP1 を融合した変異型 SOD1 (SOD1-G85R-mTFP1) と 173 番目の残基で円順列変異を施した mVenus を融合した SOD1-G85R-cp173mVenus を共発現させた細胞に対し蛍光寿命イメージング法により解析を行った [15]。その結果、まず、プロテアソーム活性を阻害しないとき、FRET は観察されなかった。次に、プロテアソーム活性阻害を開始してから 8 時間後、封入体構造が見られない細胞質において、FRET 効率は平均 24% と

計測された。蛍光相関分光法を用いた解析結果から、分子量 1 MDa 程度のオリゴマーはこのときすでに形成していたので、この FRET は、SOD1 タンパク質のオリゴマー化による構造変化を捉えているものと思われる。続いて、プロテアソーム活性阻害を 16 時間行くと、中心体近傍にアグリソーム様の封入体構造が出現した。このアグリソーム様封入体構造中における FRET 効率は平均 38% であった。以上のことは、プロテアソーム活性阻害時、まず細胞質で形成されたオリゴマーが、次に中心体近傍のアグリソーム様封入体へと運ばれて、分子間の立体配座がより FRET が起こりやすいものに変化していることが示唆された。さらに興味深いことに、アクセプターを cp173mVenus から、通常型の mVenus へ置換した SOD1-G85R-mVenus へ変更すると、アグリソーム様封入体における FRET 効率は平均 10% へと大きく減少した。円順列変異は蛍光タンパク質発色団の向きを変化させることから、アグリソーム様封入体に含まれる変異型 SOD1 は、ランダムな立体配座で分子間が会合して凝集しているのではなく、規則的な形で会合していることが示唆された。このように、アクセプターの向きを変更して FRET 測定を行い、比較することで、凝集タンパク質の立体配座に関する情報を抽出することができる。

変異型 SOD1 を含む細胞内封入体のプロテアソーム活性依存的ダイナミクスと細胞毒性

細胞内タンパク質の品質管理においてタンパク質分解が重要な経路であることは述べてきた。では、このタンパク質の分解を可視化解析するためにはどのようなアプローチが可能であろうか。先述の変異型 SOD1-G85R-YFP タンパク質を、プロテアソーム活性阻害によりアグリソーム形成させ、続いてプロテアソーム阻害剤を培地中から洗い流した後、蛍光タイムラプスイメージングを行った [15]。細胞内に形成されたアグリソーム様封入体は、半減期 9 時間で消失した。このとき、プロテアソームで分解されるデグロンタグと融合した GFP-CL1 タンパク質を発現させた細胞で、プロテアソーム活性の回復をモニターしたところ、阻害剤の除去後すみやかにプロテアソーム活性が回復していることが示された。このことは、封入体に含まれた凝集タンパク質であっても、ときほぐされてプロテアソームで分解されることを示している。

次に、光活性化型 GFP である PAGFP を融合した SOD1-G85R-PAGFP を使って、プロテアソーム活性阻害時と活性回復時におけるアグリソーム様封入体と細胞質に存在する分子集団同士の交換速度を測定した。この結果、プロテアソーム活性回復時に交換速度が速くなっていることがわかった [15]。これは、プロテアソームの活性が回復すると、アグリソーム様封入体に集積した凝集タンパク質を分解するために再び細胞質へ送り出されることを意味すると解釈される。

さらに、封入体に含まれない、細胞質集団の SOD1-G85R-PAGFP を活性化した後、細胞の蛍光強度を観察するという細胞質内パルスチェイスイメージングを行ったところ、プロテアソーム活性阻害時よりも阻害していない時のほうが蛍光強度は速く減衰することがわかった。上述のパルスチェイスイメージング法を用いることで、局在依存的なタンパク質分解速度を生細胞内で定量化することが可能になる。

さらに、先項で述べた FRET 計測を、プロテアソーム活性回復時に行った。結果は、プロテアソーム活性回復 10 時間後の時点でアグリソーム様封入体における FRET 効率が平均 14%まで低下した。このことから、封入体に取り込まれた凝集タンパク質がときほぐされるとともに、封入体内部でもゆっくりと配座を変化させている可能性が考えられる。これらの知見から、封入体構造が静的な構造ではなく、細胞内のタンパク質分解活性の阻害や回復とともに、その性質をダイナミックに変化させることで、細胞におけるストレス回避やタンパク質品質管理を行っている予想される。このように、蛍光イメージングの手法を用いることにより、タンパク質封入体の新たな特徴が明らかになってきている。

さらに驚くべきことに、変異型 SOD1 を発現する細胞は、プロテアソーム活性阻害時より活性回復時のときに細胞死が増えることが明らかになった [15]。このことは、プロテアソーム活性回復時に生じる凝集性オリゴマーが細胞にとってより強い毒性を持つのかかもしれない。また、プロテアソーム活性の変動が繰り返されると、細胞毒性がより増加し、ALS を発症しやすくなるのかかもしれない。

以上で述べてきたように、細胞内タンパク質恒常性を維持するメカニズムを明らかにする上で、蛍光イメージング、

なかでも、蛍光相関分光法と FRET の手法は有用であり、さまざまな機構の解明に利用できるものであると思われる。なかでも、神経変性疾患は細胞内タンパク質恒常性の破たんにより引き起こされると考えられているが、タンパク質のどのような構造変化や多量体化形成が具体的に細胞毒性を獲得するのかについて、未解明な部分が多い。生細胞内におけるタンパク質の状態を明らかにするために、蛍光イメージングの手法は直接的かつ有用なアプローチであると考えられる。今後、新たな蛍光プローブの開発や計測手法の確立により、病気の原因となる分子基盤を明らかにしていきたい。

引用文献

1. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-332.
2. Wolff S, Weissman JS, Dillin A (2014) Differential scales of protein quality control. *Cell* 157: 52-64.
3. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319: 916-919.
4. Lindquist SL, Kelly JW (2011) Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004507.
5. Klionsky DJ, Schulman BA (2014) Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 21: 336-345.
6. Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* 10: 524-530.
7. Morimoto RI (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes and Development* 22: 1427-1438.
8. Calamini B and Morimoto RI (2012) Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12: 2623-2640.
9. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology* 187: 761-772.

10. Moreau KL, King JA (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in Molecular Medicine* 18: 273-282.
11. Radford SE, Weissman JS (2012) Special issue: the molecular and cellular mechanisms of amyloidosis. *Journal of Molecular Biology* 421: 139-141.
12. Rigler R, Mets U, Widengren J, Kask P (1993) Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal* 22: 169-175.
13. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 2: 444-456.
14. Kitamura A, Kubota H, Pack CG, Matsumoto G, Hirayama S, Takahashi Y, Kimura H, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K (2006) Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biology* 8: 1163-1170.
15. Kitamura A, Inada N, Kubota H, Matsumoto G, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K (2014) Dysregulation of the proteasome increases the toxicity of ALS-linked mutant SOD1. *Genes to Cells* 19: 209-224.
16. Morito D, Nishikawa K, Hoseki J, Kitamura A, Kotani Y, Kiso K, Kinjo M, Fujiyoshi Y, Nagata K (2014) Moyamoya disease-associated protein myserin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Scientific Reports* 4: 4442.
17. Bacia K, Kim SA, Schwille P (2006) Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nature Methods* 3: 83-89.
18. Ohta S, Kawai-Noma S, Kitamura A, Pack CG, Kinjo M, Taguchi H (2013) The interaction of Hsp104 with yeast prion Sup35 as analyzed by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 442: 28-32.
19. Tiwari M, Mikuni S, Muto H, Kinjo M. (2013) Determination of dissociation constant of the NFκB p50/p65 heterodimer using fluorescence cross-correlation spectroscopy in the living cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436: 430-435.
20. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schönle A, Hell SW (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457: 1159-1162.
21. Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, Gadella TW, Verkhusha VV (2012) An orange fluorescent protein with a large Stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *Journal of the American Chemical Society* 134: 7913-7923.
22. 平岡泰、原口徳子、木村宏編 (2007) 生細胞蛍光イメージング 共立出版
23. 宮脇敦史 (2010) 蛍光イメージング革命 秀潤社
(2014年5月3日受付; 2014年5月26日受理)