

## 生細胞における三量体型 G タンパク質の活性検出のためのプローブ開発

綿谷 光高 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 桑山 秀一 (筑波大学 生命環境系)

## 背景、目的

細胞性粘菌の一種であるキイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) は、増殖期には単細胞として生息するが飢餓状態に陥ると cAMP を介した走化性応答により集積し、多細胞体を形成する。キイロタマホコリカビの走化性応答は細胞の前後において高低差 1% の細胞外 cAMP の濃度勾配を判別する非常に高い感度を有している (Mato et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1975)。一方で、cAMP を受容するヘテロ 3 量体型 G タンパク共役型膜受容体 (GPCR) から細胞骨格形成につながるシグナルカスケードは哺乳類と比較してよく保存されており、GPCR を介したシグナル伝達のモデル系として研究の対象となっている。

ヘテロ 3 量体型 G タンパク質は G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$  の 3 つのサブユニットから構成される。ヘテロ 3 量体型 G タンパク質はリガンドに結合した GPCR により活性化されると G $\alpha$  と G $\beta\gamma$  に分離し、G $\alpha$  はそれまでの不活性化型 (GDP 結合型) から活性化型 (GTP 結合型) へと変換される。GTP 結合型として遊離した G $\alpha$  は自身の持つホスホターゼ活性により GDP 結合型に変化し、細胞膜に移動した後再び G $\beta\gamma$  とヘテロ三量体を形成する。遊離した G $\alpha$  サブユニットあるいは G $\beta\gamma$  は細胞応答へのシグナル伝達を担うことが知られている。

近年、キイロタマホコリカビにおいて細胞質中で GDP 結合型 G $\alpha$  を GTP 結合型に変換する酵素 Ric8 が発見された。この遺伝子を欠損した細胞では低濃度域で勾配感知能の低下が見られた (Rama Kataria 2013)。また、GDP 結合型 G $\alpha$  が三量体を形成することで G $\beta\gamma$  の活性の阻害を示唆している実験結果 (Freek van Hemert 2010) もあり、細胞質中での G $\alpha$  のダイナミックな活性制御が走化性において重要であることが示唆されている。

キイロタマホコリカビの走化性応答において、G タンパク質の活性化解析は三量体から G $\alpha$  と G $\beta\gamma$  への分離を指標に行われてきた。しかし、この方法では細胞質中の G $\alpha$  が GDP 結合型か GTP 結合型かを判別できない。そこで本研究では、活性化型 G $\alpha$  サブユニットの細胞内局在を定量的に計測できるプローブを開発することを目的とした。このプローブが開発されることにより、細胞外刺激に対する細胞内の応答特性を時空間的に解析することが可能となり、細胞内情報伝達機構の理解が格段に進むことが期待される。

## 材料と方法

## ・プローブ発現ベクターの作製

活性化型 G $\alpha$  サブユニットの検出は、蛍光顕微鏡下で測定できる系として蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用する。FRET とは、距離が 1 Å 付近あるときに 2 個の色素分子の間で励起エネルギーが電子の共鳴により直接移動する現象のことであり、蛍光タンパク質を利用する場合は波長の短いタンパク質 (CFP 等) の励起波長を当て、波長の長いタンパク質 (YFP 等) の蛍光波長を観測する。本研究では、先行研究により収集された活性化型 G $\alpha$  と特異的に結合するペプチド断片候補 (G Protein Alpha subunit Binding sequence: GPAB 配列、表 1) の両端に色調の異なる蛍

光タンパク質 (mseCFP; CFP の改変タンパク質と yPet; YFP の改変タンパク質) を融合させ細胞内で発現させる。G $\alpha$  と結合した時に構造が変化して蛍光タンパク質同士が接近、あるいは離反し FRET における蛍光シグナルの変化を観察できる GPAB 配列を選択する。GPAB 配列は、先行研究により cAMP の走化性応答シグナル伝達に関連する G $\alpha$  タンパクである G $\alpha 2$  サブユニットに活性化型のみ特異的に結合する配列として Yeast Two Hybrid (Y2H) 法によって 45 種類のポリペプチド断片を選出した。この配列は両端に発現ベクターのクローニングサイトに対応した制限酵素認識配列を付加したプライマーを用いて PCR 法によって増幅後、クローニング、配列決定し、作製した両端に蛍光タンパクを持つベクターに組み込んだ。

蛍光タンパクの特性は mseCFP (励起波長: 434 nm, 蛍光波長: 474 nm, 量子収率: 0.4) 及び YPet (励起波長: 517 nm, 蛍光波長: 530 nm, 量子収率: 0.77) である。これらの遺伝子を発現ベクターにおいて N 末端あるいは C 末端にクローニングし、その間に特異的な制限酵素認識配列を組み込むことで任意の配列を導入することが可能となる発現ベクターを、pHK12 を元に 2 種作製した。

(図 1)。また、コントロールとして用いるために、N 末端あるいは C 末端のみに傾向タンパクを持ち、任意の GPAB 配列を組み込めるプローブも同時に作製した。

## ・キイロタマホコリカビの培養、遺伝子導入、発現解析

キイロタマホコリカビは AX2 株 (野生株)

を用いた。HL5 培地中 21 °C で培養した AX2 株細胞への発現ベクターの遺伝子導入は電圧ポレーション法によって行った。次に選択薬剤である G418 を添加し、遺伝子導入株を取得、さらに培養細胞を PB buffer で置換した後、蛍光顕微鏡で CFP、YFP の蛍光波長を観察し、蛍光タンパクの発現を確認することにより蛍光の発現量の高いクローンを選別した。

## 結果と考察

現在、N 末端に mseCFP、C 末端に YPet を持つベクター 12 種と mseCFP あるいは YPet のみ発現するベクターをキイロタマホコリカビに遺伝子導入し、クローニングまで終わっている。

今後、cAMP を加える前後の細胞の蛍光波長を測定、比較することで FRET 活性を持つプローブを選出する。次に G $\alpha 2$  の特異性の検証、そして FRET 効率を改善し、生細胞での活性化型 G $\alpha 2$  の時空間解析を行う。

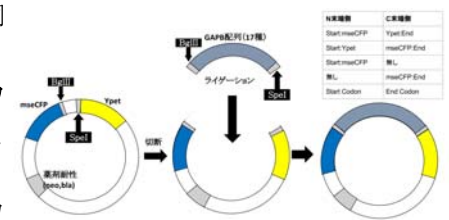


図1 ベクターの構造