

タンパク質間相互作用の可視化技術に関する研究

児玉 豊 (宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター)

kodama@cc.utsunomiya-u.ac.jp

はじめに

タンパク質間相互作用は生命現象を制御する重要な生体反応である。これまでこれを解析するために、生化学や遺伝学などの手法が用いられてきたが、生体内で反応を直接に解析することは難しかった。しかしながら、近年、蛍光タンパク質を用いた解析法が開発され、生体内でタンパク質間相互作用を可視化および解析することが可能となっている。様々な技術の中でも、二分子蛍光補完法は、この10年間ほどで急速に認知され、広く使用されている^{1,2)}。二分子蛍光補完法は、海洋性発光生物であるオワンクラゲなどから単離された蛍光タンパク質を利用した解析技術であり、2002年に University of Michigan の Chang-Deng Hu 博士 (現・Purdue University) らによって医学研究の過程で開発され、一般に BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法と呼ばれている¹⁾。

BiFC 法では、蛍光タンパク質を2つに分断し、それぞれを解析したい2種のタンパク質に融合させる。細胞内で2つの融合タンパク質が近接すると、蛍光タンパク質の立体構造が再構築されて蛍光が発せられる (図1)。この蛍光は、蛍光顕微鏡などを用いて容易に観察することができるため、BiFC 法は農学分野でも急速に普及した。

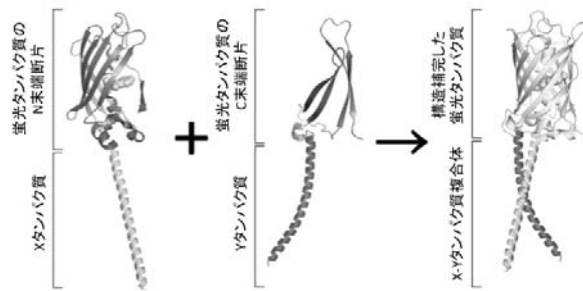


図1. BiFC 法の概要図

BiFC 法の利用

これまで演者は、主に植物科学分野において BiFC 法を用いた研究を展開し、様々なタンパク質間相互作用を明らかにした。2006年には、植物の細胞周期を制御するタンパク質間相互作用³⁾、2008年には、カフェイン生合成に関わるタンパク質間相互作用⁴⁾、2010年には、葉緑体運動を制御するタンパク質間相互作用⁵⁾を明らかにした。本節では、BiFC 法を利用した研究の一例として、葉緑体運動を制御するタンパク質間相互作用に関する研究⁵⁾を以下に紹介したい。

オルガネラ運動は植物の環境適応にとって重要な生理現象であり、様々な環境変化の中で固着生活を営む植物の細胞内で頻繁に観察される。代表例は、光誘導性の葉緑体運動である。たとえば葉緑体は、光合成を効率よく行うために弱い光に集まり、光ダメージを避けるために強い光から逃げるということが知られている。演者らは、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、葉緑体の運動速度が遅い変異体植物を2種類単離した。原因遺伝子を同定したところ、2遺伝子は、いずれもコイルドコイル領域を持つ新規タンパク質 (WEB1 と WEB2 と命名) をコードしていた。一般に、コイルドコイル領域は、タンパク質間相互作用に関与するため、BiFC 法を用いて解析を行った。その結果、WEB1-WEB1 ホモ二量体が細胞膜近傍で形成され、WEB1-WEB2 ヘテロ二量体が細胞質で形成されることが明らかになった⁵⁾。さらに遺伝学解析と組み合わせることによって、WEB1-WEB2 ヘテロ二量体が葉緑体の運動速度上昇に関与することもわかった。

BiFC 法の改良

これまで、前述した BiFC 法を用いた研究だけでなく、技術改良にも取り組んできた。[1] 2009 年には、完全に異なる 2 つのタンパク質複合体を同時に可視化するマルチカラー BiFC 法⁶⁾、[2] 2010 年には、高いシグナルノイズ比を持つ黄色 BiFC 法⁷⁾、[3] 2011 年には、高い蛍光輝度となる緑色 BiFC 法を開発した⁸⁾。以下に、それぞれを簡単に紹介する。

[1] 完全に異なる 2 つのタンパク質複合体を同時に可視化するマルチカラー BiFC 法

最初の BiFC 法の報告¹⁾の翌年には、3 つのタンパク質による二者択一的な相互作用（例：A-B と B-C）を複色で同時に可視化するマルチカラー BiFC が発表された⁹⁾。これに対して、演者らは、完全に異なる 2 つのタンパク質複合体（例：A-B と C-D）を複色で同時に可視化可能なマルチカラー BiFC 法を開発した⁶⁾。

[2] 高いシグナルノイズ比を持つ黄色 BiFC 法

演者は、2009 年 4 月から一年間、BiFC 開発者の Hu 博士の研究室 (Purdue University) にポスドクとして滞在し、高いシグナルノイズ比を持つ黄色 BiFC 法を開発した⁷⁾。黄色蛍光タンパク質 Venus に点変異 I152L を導入することによって、BiFC 法の擬陽性シグナルを選択的に低下させることに成功した。

[3] 高い蛍光輝度となる緑色 BiFC 法

緑色蛍光タンパク質 GFP-S65T を用いた BiFC 法は、蛍光輝度が低いことが知られていたため、点変異導入による GFP-S65T の改良を行った。最終的に、GFP-S65T の C 末端断片 (155-238 アミノ酸残基) に点変異 V163A を導入することにより、蛍光輝度を約 7 倍上昇させることに成功した⁸⁾。

啓発・普及

BiFC 法に関する啓発活動も積極的に行なってきた。依頼されればセミナーや学会シンポジウムなどで BiFC 法を紹介してきた¹⁰⁾。最近では、過去 5 年間の BiFC 法の進展について総説をまとめ、農学分野を含めた世界中の BiFC 利用者に最新かつ正確な情報を提供した²⁾。とくに、この総説の中では、BiFC 法の利用の際に誤解されて実施されているコントロール実験について詳しく解説し、BiFC 法の正しい利用方法を啓発した。さらに 2013 年には、BiFC 法を利用したタンパク質間相互作用の定量化に関する標準プロトコルを発表した¹¹⁾。これまで BiFC 法を利用した解析は、ほとんどが定性的なタンパク質間相互作用解析であったため、今後は、BiFC 法を利用した定量的なタンパク質間相互作用解析も盛んになることを期待している。また演者の研究室では、開発した様々な BiFC ベクターを無償で配布しており、これまでに国内外の研究者から多くのリクエストをいただいた。またリクエストが多い一部のベクター⁷⁾ [pBiFC-VN155(I152L) および pBiFC-bJunVN155(I152L)] については、米国の非営利団体 Addgene に配布を委託しており、Addgene への手数料 (US\$65) と送料を支払うことで容易に入手することが可能である¹²⁾。Addgene のホームページを確認したところ、既に、pBiFC-VN155(I152L) は 100 研究室以上、pBiFC-bJunVN155(I152L) は 50 研究室以上に配布されたようである (2013 年 11 月 1 日現在)。農学分野における BiFC 法の利用拡大のために、今後も啓発活動や普及活動は継続していくつもりである。今後に BiFC 法の利用を予定されている方、あるいは BiFC 法に御興味のある方は、演者までご一報いただけたら幸いである。

おわりに

本稿で紹介した BiFC 法を用いたタンパク質間相互作用の可視化技術に関する研究は、もともとは、演者が植物学研究を行う傍らでスローペースながらコツコツと実施してきたものである。最近では、温度依存的な葉緑体運動に関する研究^{13,14)}に BiFC 法を取り入れることによって、分子メカニズムの解明を目指している。BiFC 法と出会った当初は、ただの利用者であったが、今では、蛍光タンパク質の改変によって BiFC 法を改良し、専門家の端くれとして啓発活動や普及活動も行うようになった。最近では、見ず知らずの研究者から、メールなどにより、BiFC 実験に関する相談を受けることも多い。今回、BiFC 法を基盤としたタンパク質間相互作用の可視化技術に関する研究に対して名誉ある日本農学進歩賞を授与していただき、身に余る光栄であると同時に身の引き締まる思いである。これを励みにして、今後も、様々な研究者の BiFC 研究をサポートしていく所存である。また現在、新しいイメージング技術の開発にも挑戦しているため、今後も、できるだけ多くの研究者に使ってもらえる技術を提供していきたい。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターより推薦を賜りました。山根健治センター長をはじめ、ご支援いただきました専任教員の松田勝准教授および職員の皆様に深く感謝申し上げます。本稿で紹介した研究内容は、演者が博士後期課程の大学院生からポスドクを経て研究室主宰者になるまでに関わった複数の研究室で考案・実施されました。佐野浩博士（奈良先端科学技術大学院大学・元教授）および和田正三博士（九州大学・特任教授）、Chang-Deng Hu 博士（Associate Professor・Purdue University）、松井南博士（理化学研究所・グループリーダー）には、多くの御指導と御鞭撻を賜りました。この場を借りて心から御礼申し上げます。また、これまでの BiFC プロジェクトに関して研究費を支援していただきました奈良先端科学技術大学院大学・植物科学研究教育推進ユニット事業、東洋紡百周年記念バイオテクノロジー研究財団・長期研究助成、日本学術振興会・特別研究員 PD 事業、ノバルティス科学振興財団・ノバルティス研究奨励金、宇都宮大学・CORE 公募研究事業および UU-COE 事業に深く感謝いたします。最後になりましたが、現在、宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターにて、演者と共に様々な研究プロジェクトを推進してくれている学生諸氏にも感謝の意を表したいと思います。

引用文献

- 1) Hu CD, Chinenov Y and Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9:789-798.
- 2) Kodama Y and Hu CD (2012) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*, 53:285-298.
- 3) Yano A, Kodama Y, Koike A, Shinya T, Kim HJ, Matsumoto M, Ogita S, Wada Y, Ohad N and Sano H (2006) Interaction between methylated-DNA binding protein and Ran GTPase during cell division in tobacco cultured cells. *Annals of Botany*, 98:1179-1187.
- 4) Kodama Y, Shinya T and Sano H (2008) Dimerization of *N*-methyltransferases involved in caffeine biosynthesis. *Biochimie*, 90:547-551.

- 5) Kodama Y, Suetsugu N, Kong SG and Wada M (2010) Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:19591-19596.
- 6) Kodama Y and Wada M (2009) Simultaneous visualization of two protein complexes in a single plant cell by using multicolor fluorescence complementation analysis. *Plant Molecular Biology*, 70:211-217.
- 7) Kodama Y and Hu CD (2010) An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *BioTechniques*, 49:793-805.
- 8) Kodama Y (2011) A bright green-colored bimolecular fluorescence complementation assay in living plant cells. *Plant Biotechnology*, 28:95-98.
- 9) Hu CD and Kerppola TK (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*, 21:539-545.
- 10) 児玉 豊 (2012) 高輝度かつ正確なタンパク質間相互作用イメージングを目指した二分子蛍光補完法の改良. 第 53 回日本植物生理学会 (京都) ・シンポジウム「最先端イメージングが拓く植物科学の新時代」(2012/3/16) 要旨集 p.101.
- 11) Kodama Y and Hu CD (2013) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis of protein-protein interaction: How to calculate signal-to-noise ratio. *Methods in Cell Biology*, 113:107-121.
- 12) <http://www.addgene.org/browse/article/3891/>
- 13) Kodama Y, Tsuboi H, Kagawa T and Wada M (2008) Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. *Journal of Plant Research*, 121:441-448.
- 14) Ogasawara Y, Ishizaki K, Kohchi T and Kodama Y (2013) Cold-induced organelle relocation in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant, Cell and Environment*, 36:1520-1528.

Visualization of protein-protein interactions in living cells

Yutaka Kodama (Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University)

kodama@cc.utsunomiya-u.ac.jp