

タンパク質リン酸化酵素活性の光制御法とイメージング

東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻

小澤 岳昌

1. はじめに

蛍光、発光タンパク質を利用した生体分子イメージングは、ある特定のタンパク質やRNAの機能を低侵襲的に可視化する技術として、基礎生命科学研究のみならず創薬や医療に大きく貢献してきた。しかし、特定の分子を可視化するだけでは、複雑な生体をシステムとして理解することは困難である。近年、光によって生命を時空間的に制御する手法が台頭し急速に注目が集まっている。生体の機能を人為的に光で制御することができれば、任意の時間に特定の場所で生体に摂動を与えることが可能となる。生体を光で制御する技術は、チャンネルロドプシンを用いた神経におけるイオン流入制御が勢力的に行われてはいるものの、生体機能全体を鑑みるとその対象は限られ、生命を可視化する技術の蓄積に比較してまだ発展途上である。

我々は、タンパク質リン酸化酵素 Akt の機能を時空間制御する新たな方法の開発に取り組んできた。Akt は糖代謝、血管新生、細胞極性、癌増殖など、多種多様な生理現象に関わる重要なタンパク質リン酸化酵素であり、細胞内シグナル伝達の軸となる分子として注目されている。しかし、「Akt が全く異なる下流のシグナルをどのように仕分けているか」という命題は、これまで十分には理解されていない。

本研究では、外部光によりAkt活性を時空間制御する手法の開発を目的とした。さらに、この光活性型 Aktを用いて下流シグナルの活性変動を解析した。最終的には、Aktが全く異なる下流のシグナルをどのように仕分けているか、そのシグナルソーティング機構の解明を目的とした。

2. 方法

光制御可能な Akt の開発: 生体内において Akt の活性は、その細胞質から細胞膜への局在変化によって制御されている。そこで、Akt の局在変化を光制御する目的で、光感受によってヘテロ二量体を形成するタンパク質 CRY2 および CIBN を利用した¹。CRY2 は光照射によって構造変化し、膜局在化シグナル(Myrr)を付した CIBN と相互作用する。その結果、CRY2 に融合した Akt は細胞膜に局在し、Akt の基質タンパク質をリン酸化することで下流にシグナルを伝達する(図1)。CRY2 と CIBN のヘテロ二量体形成は数分オーダーの可逆的反応であるため、高い時空間分解能で Akt 活性を制御できる。この原理を実証するために、次の実験を遂行した。

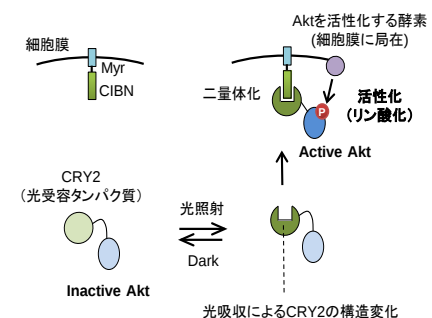


図 1. Akt 活性の光制御原理。

この原理を実証するために、次の実験を遂行した。

(1-1) 光活性型 Akt の局在解析: 作製した光活性型 Akt の細胞内での局在を確認するために、Myrr-CIBN および CRY2-Akt を蛍光タンパク質で標識した融合タンパク質を培養細胞に発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。

(1-2) 光活性型 Akt の生化学的解析: ウェスタンブロット法によって、CRY2-Akt の活性を評価した。

(1-3) 光活性型 Akt による細胞機能の光制御: Akt の下流で調節されている細胞機能を Akt の光活性化によって制御できるかを検証した。転写因子 Fox01 は Akt の基質タンパク質であり、Akt によるリン酸化修飾によって核から細胞質へ局在変化することが知られている。そこで、Akt の光活性化前後の Fox 01 動態をリアルタイム観察した。さらに Fox01 で制御される遺伝子の発現量を定量リアルタイム PCR 法で測定した。また、Akt の活性化はアクチン重合等を誘導することで細胞の移動(細胞遊走)に関与することが知られるため、顕微鏡下における一細胞内局所的 Akt 活性化によって細胞遊走が生じるかを調べた。

3. 結果

融合タンパク質の細胞内局在を解析した。Myr-CIBNは細胞膜に局在し、CRY2-Aktはレーザー光照射(440 nm, 5s)に応じて細胞質から細胞膜へ局在変化した(図2)。局在変化は光照射から1秒以内に観察され、5-10分程度で初期状態に戻る可逆反応であることを確認した。また、細胞内の局所領域のみを光照射することで、Aktの細胞膜局在変化を一細胞レベル以下の空間的スケールで誘導できることを確認した。

次にウェスタンブロット法によって、光照射パルスの回数に応じた段階的なCRY2-Aktの活性化を確認した(図3)。活性化したCRY2-AktはAktの基質タンパク質の一つであるGSK3をリン酸化修飾した。また、CRY2-Aktの活性化は可逆的であり、光照射とその停止によってCRY2-Aktを任意時間のみ活性化できることを確認した。光照射の強度、パルス幅、インターバルを調節することによって、CRY2-Akt活性の時間パターンを自在に制御可能であることが示された。

Aktの下流で制御されている細胞機能を光照射によって制御可能かを検証した。FoxO1を蛍光タンパク質で標識した融合タンパク質の動態をAktの光活性化前後でリアルタイム観察したところ、光照射に伴いFoxO1が核から細胞質に局在変化するが確認された(図4(a), (b))。さらに、FoxO1によってその発現が制御される遺伝子*Atrogin-1*の発現量が光照射に伴い減少した(図4(c))。また、光活性型Aktを発現する細胞の局所領域を光照射すると、照射した方向への細胞遊走が生じることを確認した(図5)。これは一細胞内でAkt活性の空間的勾配が生じた結果と考えられる。以上の結果は、開発した手法によって、時間のみならず空間的にもAkt活性とその下流の細胞機能を制御可能であることを示す(投稿中⁴)。

4. まとめ

本研究において、生体内タンパク質リン酸化酵素Aktの活性を光照射によって制御する手法を確立した。光はその時空間的な操作が容易であるため、生体内においてAkt活性を時空間的に制御可能である。

現在までに多岐にわたるAktの機能が明らかにされているが、単一の分子がどのようにこれらの機能を発揮、使い分けしているのか、そのメカニズムの全貌は未だ不明である²。近年、Akt活性の時間パターンによって、異なる下流シグナルが誘導されることを示唆する報告がなされた³。しかし、Akt活性の時間パターンを人為的に再構成する手法が存在しないため、その本質的な機能の解明には技術的な限界がある。

本研究で開発した手法を用いれば、Akt活性の時間パターンのみならず空間パターンも自在に再構成することが可能になる。今後、Aktの時空間的な活性がどのように下流シグナルに分配されていくのか、そのメカニズムの解明が期待できる。また、メカニズムが解明

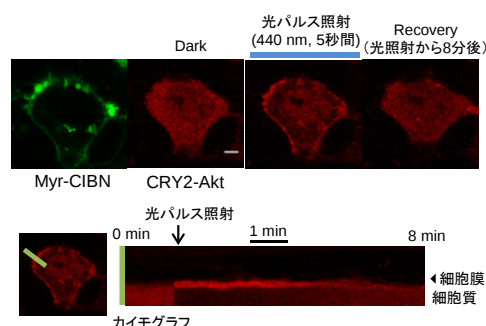


図2. 光照射によるCRY2-Aktの細胞膜移行.

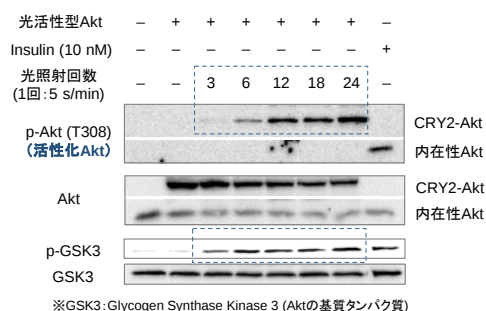


図3. 光照射によるCRY2-Aktの活性化.

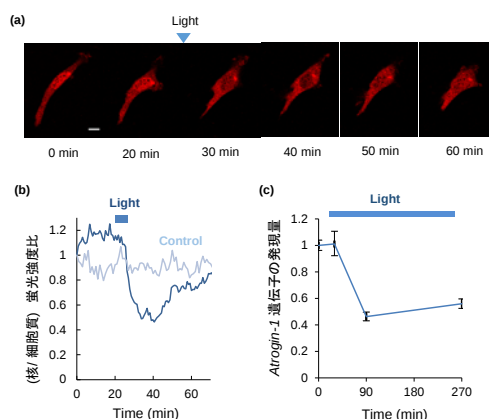


図4. Aktの光活性化による転写因子FoxO1制御。(a) FoxO1に蛍光のリアルタイム観察。(b) データ(a)の定量解析。(c) FoxO1の下流で制御されている遺伝子の発現変化誘導。

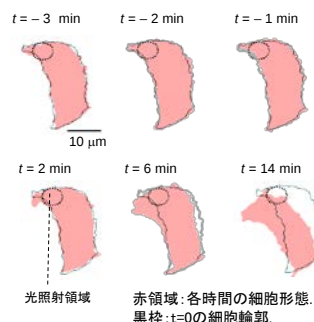


図5. Aktの局所的活性化による細胞遊走制御.

されれば、多岐にわたるAktの機能のうち特定の機能のみを選択的に抽出するなどの応用が可能である。Aktは腫瘍形成や糖尿病などヒトにおける様々な疾患に関わることから、医学、創薬研究の有効なターゲット分子と考えられている。一方で、Aktは正常な増殖や代謝においても必須な分子であることから、その活性の恒常的な阻害は様々な副作用を誘発するという問題を抱えている。Aktの活性を任意の時間に任意の場所で制御し、特定の機能のみを誘導することができれば、医学、創薬研究を前進させる基盤技術になると考えられる。

また、本研究で開発したタンパク質活性の光制御を可能とする分子設計は、Akt以外の分子に対しても応用可能である。今後、他の分子に対しても光制御技術を拡張することで、タンパク質活性が有する時間的、空間的パターンの詳細な機能解明がなされ、光を用いた多様な生体機能の操作が可能となることが期待される。

5. 参考文献

1. Kennedy, M. J. *et al.* Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **7**, 973–5 (2010).
2. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–74 (2007).
3. Kubota, H. *et al.* Temporal Coding of Insulin Action through Multiplexing of the AKT Pathway. *Mol. Cell* **46**, 820–832 (2012).
4. Katsura, Y., Kubota, H., Kunida, K., Kanno, A., Kuroda, S., Ozawa, T. Optical Control of Temporal Akt Activity Predictive with Computational Modeling. Submitted.