

生細胞におけるアポトーシス機序解析のための FRET Probe の作製と利用

山本 淳子、田中幸枝、松川 茂
福井大学 総合実験研究支援センター・バイオ実験機器部門

YAMAMOTO Junko, TANAKA Yukie, MATSUKAWA Shigeru

Developement of FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) probe systems capable of a
real-time observation and analysis of apoptotic process in live cells

Programmed cell death, apoptosis, is a integrated system highly regulated by a number of genes. For *in situ* detection of apoptotic cell death taking place in whole body or various tissues, we so far have attempted the development of two types of FRET probes. One is the caspase-3 substrate protein with a DEVD sequence (specific target site of caspase-3) joining two distinct fluorescent proteins, GFP² and DsRed. Another type is composed of GFP²-CAD fusion protein and DsRed-ICAD fusion protein. CAD plays an essential role in terminal apoptosis process, in which activated CAD degrades chromatin DNA, when ICAD suppressing DNase activity of CAD is cleaved by caspase(s) activated in an early apoptotic process. Now we are preparing various types of plasmid constructs which can produce such fluorescence fusion proteins and we are validating prokaryotic and eukaryotic expression systems which enable an assay of protein-protein interaction between such fusion proteins by FRET system.

【目的】

アポトーシスは数多くの遺伝子に支配された高度な制御機構であり、それらの作用機序や、生体や組織内でアポトーシスが起きている部位を *in situ* で検出するための手段の一つとして、アポトーシス関連蛋白の機能変化を即時的に検知する FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer : 蛍光共鳴エネルギー移動) プローブを作製し(図 1)、それを生細胞内で発現させ、顕微鏡下においてアポトーシス進行状態を可視化するためのモデル系の検討を行った。

【方法】

1 カスパーゼ 3 の基質の FRET プローブ作製

カスパーゼ(Ca²⁺-プロテアーゼ)はアポトーシス刺激により活性型となり、細胞に存在するさまざまな基質をアスパラギン酸残基の後ろで切断する。FRET の Donor 遺伝子 (GFP²) と Acceptor 遺伝子 (DsRed-Monomer) の間に、アポトーシス刺激により活性化されたカスパーゼ 3 が切断するアミノ酸配列 DEVD を挿入し FRET 発現ベクターを作製する (図 2)。

(1) カスパーゼ 3 が切断するアミノ酸配列 DEVD を Donor 遺伝子 (GFP²) と Acceptor 遺伝子 (DsRed-Monomer) の間に挿入するために、PCR法で GFP² 発現ベクターから GFP2+DEVD の cDNA を作製する。PCR

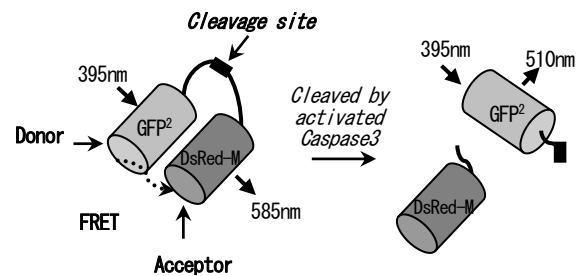


図1 GFP²+DsRed-M FRET模式図

GFP²は395nmの励起光で510nmの蛍光を発する。DsRed-Mは557nmの励起光で585nmの蛍光を発する。GFP²をDonor蛍光蛋白、DsRed-MをAcceptor蛍光蛋白としてFRETを起こさせると395nmの励起光で585nmの蛍光が発する。GFP²とDsRed-Mの間にカスパーゼ3により切断されるアミノ酸配列DEVDを挿入しておく、カスパーゼ3により切断され、DonorとAcceptorが離れ距離が遠くなるためFRETが起きなくなり、395nmの励起光で510nmのGFP²の蛍光を発する。

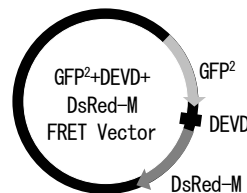


図2 GFP²+DEVD+DsRed-M FRET Vector

に使用するプライマーはUpper PrimerにはDsRed-M発現ベクターのMCS (Multi Cloning Site) の制限酵素サイトを上流に付けたGFP² N末側の配列を使用し、Lower primerにはGFP²のC末側の配列の下流にDEVDをコードする遺伝子配列を、さらに下流にDsRed-M発現ベクターのMCSの制限酵素サイトを付けたものを使用する。

- (2) DsRed-M 発現ベクターにGFP²+DEV²のcDNAを挿入しGFP²+DEV²+DsRed-M FRETベクターを作製する。
- (3) DEV²がカスパーゼ3で切断されることを *in vitro*、*in vivo* で確認する。
 - ① GFP²+DEV²+DsRed-M FRET ベクターを培養細胞に Transfection し、細胞内で発現させる。
 - ② 蛍光顕微鏡で蛍光蛋白の発現を確認後、蛋白を抽出する。抽出液は蛋白の構造を壊さないSucrose と NP-40 を含むものを使用する。Native-PAGE を行い、ゲルの蛍光を蛍光イメージアナライザー (Typhoon TRI0+:アマシャムバイオサイエンス) で観察する。
 - ③ 共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP II AOBIS:Leica) で、細胞内のGFP²+DEV²+DsRed-MのFRETを観察し、アポトーシスを誘導すると FRET が消失するのを観察する。さらに時系列で取り込んだ画像の Ratio imaging 解析 (Lumina Vision Lite:三谷商事) を行う。

2 核クロマチン分解ヌクレアーゼ (CAD) とヌクレアーゼ阻害蛋白 (ICAD) 間の相互作用を観察するための FRET プローブ作製

ICAD は CAD と細胞内で複合体を形成し CAD の活性を抑えている。アポトーシス刺激でカスパーゼ3が活性化し ICAD を分解する。ICAD が解離し活性化した CAD は核内に移入後、核クロマチンを分解し DNA の断片化を進める (図3)。

この CAD と ICAD をそれぞれ Donor 蛍光蛋白と Acceptor 蛍光蛋白に融合する発現ベクターを作製する。FRET が起きる条件を *in vitro* で検討するために、大腸菌内で CAD-及び ICAD-蛍光蛋白融合体を発現させる。

- (1) 大腸菌内で蛋白発現が可能な pCold DNA Vector (Takara) を用いて、CAD・GFP² 発現ベクター、ICAD・DsRed-M 発現ベクターを作製する。

- ① 培養細胞から CAD、ICAD の cDNA を PCR 法で合

成する。この時使用するプライマーには、Upper、Lower 両方に pCold DNA Vector の MCS に挿入できる制限酵素サイトを付けておく。

- ② pCold DNA Vector に CAD、ICAD の cDNA を挿入する。
- ③ CAD、ICADの下流にそれぞれGFP²、DsRed-Mを挿入し、pCold CAD・GFP² 発現ベクター、pCold ICAD・DsRed-M 発現ベクターを作製する。(図4)

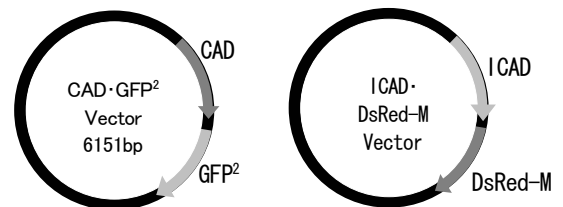


図4 CAD・GFP² Vector, ICAD・DsRed-M Vector

- (2) CAD+GFP²とICAD・DsRed-Mの *in vitro*での複合体形成を確認する。

- ① 大腸菌 (DH5α) 内でそれぞれの発現ベクターを発現させる。
- ② 共焦点レーザー顕微鏡で蛍光蛋白の発現を確認する。
- ③ 蛋白抽出し、蛋白抽出液を等量混ぜ合わせ、4℃・一晚透析。
- ④ Native-PAGE で蛍光を観察する。

- (3) 大腸菌内でCAD・GFP²とICAD・DsRed-Mを共発現させ、複合体の形成を確認する。

- ① pCold ICAD・DsRed-M 発現ベクターを持ったコンピテントセルを作製する。
- ② 両方の発現ベクターを持つ大腸菌を選択するためにpCold CAD・GFP² 発現ベクターの Ampicillin 耐性遺伝子を、Zeocin 耐性遺伝子に変える。

- I) PCR で使用するプライマーは Upper Primer に pCold CAD・GFP² 発現ベクターのAmpicillin耐性遺伝子より上流の pCold Vector の骨格部分の配列をつけ Zeocin 耐性遺伝子の N 末側の配列を使用する。Lower PrimerにはpCold CAD・GFP² 発現ベクターの Ampicillin 耐性遺伝子より下流の pCold Vector の骨格部分の配列をつけ Zeocin 耐性遺伝子の C 末側の配列を使用する。テンプレートには Zeocin 耐性遺伝子を持つベクターを使用する。

- II) pCold Vector の骨格部分の配列を前後に持った Zeocin 耐性遺伝子の cDNA をプライマーとし

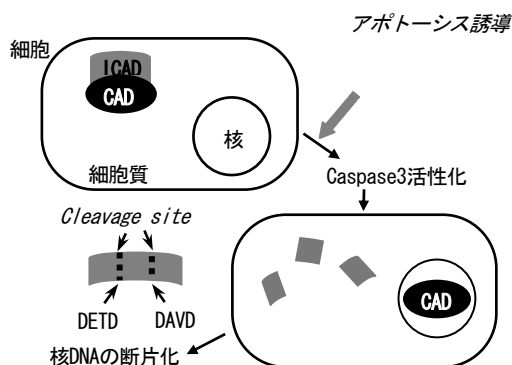


図3 CAD・ICAD 模式図

てpCold CAD・GFP² 発現ベクターをテンプレートとしてベクター全体のPCRをおこなう。

III) 鋳型のpCold CAD・GFP² 発現ベクターを制限酵素 DpnI で切断すると PCR で合成した pCold CAD・GFP² 発現Zeocin耐性ベクターのみが得られる。

- ③ pCold CAD・GFP² Zeocin耐性発現ベクターを pCold ICAD・DsRed-M 発現ベクターを持ったコンピテントセルに Transformation する。コンピテントセルはあらかじめ Ampicillin で選択されているため、さらに Zeocin で選択すると両方のベクターを持つ大腸菌を選択することが出来る。選択された大腸菌に IPTG (1mM) を添加後 15℃ で 24 時間振とう培養し、両方のベクターを共発現させる。
- ④ 共焦点レーザ顕微鏡で両方の蛍光蛋白を発現。
- ⑤ 蛋白抽出し、蛋白抽出液に活性化したカスパーゼ 3 を添加し、37℃で 1 時間インキュベート。
- ⑥ Native-PAGE で複合体の蛍光を確認する。

【結果】

1. GFP²+DEVD+DsRed-M FRET ベクターのDEVD配列がカスパーゼ 3 で切断されるのを確認

DEVD 配列を挿入した FRET プローブを培養細胞に Transfection し発現させた後、蛋白を抽出した。抽出液に活性化したカスパーゼ 3 を添加し 37℃で 1 時間インキュベート後 Native-PAGE を行い、蛍光イメージアナライザーでゲルの蛍光を観察した。カスパーゼ 3 を添加していない蛋白抽出液は、GFP²とDsRedの蛍光が同じ場所に見られるが、カスパーゼ 3 を添加した蛋白抽出液はGFP²とDsRed-Mの蛍光のバンドは別々の場所にある (図 5)。GFP²+DEVD+DsRed-M FRET ベクターの DEVD 配列はカスパーゼ 3 により切断され、2 つの蛍光蛋白が離れることが確認できた。

次に、GFP²+DEVD+DsRed FRET ベクターを Transfection した培養細胞をレーザ顕微鏡 (LSM-GB200:OLYMPUS) で観察した。GFP²の励起光 350nmで



図5 DEVDのカスパーゼ3での切断をNative-PAGEで確認

GFP²(Ex488nm, Em 526nmSP)の蛍光画像(緑)とDsRed(Ex532nm, Em 580nmBP)の蛍光画像(赤)を重ね合わせた画像
レーン1: 蛋白抽出液
レーン2: 蛋白抽出液+カスパーゼ3
37℃ 1hr処理

DsRed の蛍光が観察でき、FRET が起きていることが確認できた。この細胞にアポトーシスを誘導し、時系列で観察し、DsRed蛍光強度をGFP²蛍光強度で割る Ratio 画像解析(Lumina Vision Lite: 三谷商事)を行った結果、Ratio 値が徐々に下がり、FRET が消失していく過程が観察され、カスパーゼ 3 が活性化し DEVD 配列を切断したことが可視化できた。(図 6)

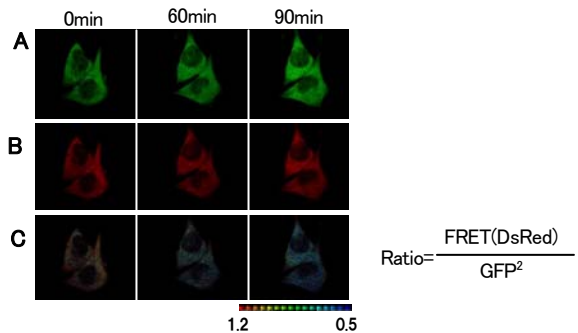


図6 GFP²+DEVD+DsRedを発現している細胞の共焦点レーザ顕微鏡画像

A: GFP²蛍光画像 B: FRET (DsRed蛍光)画像
C: Ratio Imaging画像(Lumina Vision Lite: 三谷商事)
CHO細胞 Ex: 350nm 対物: ×40
アポトーシス誘導: TNFα 50ng/ml + Cycloheximide 10μg/ml
時間はアポトーシス誘導後経過時間

2. CAD・GFP²とICAD・DsRed-Mのin vitroでの複合体形成の確認

CAD・GFP²及びICAD・DsRed-Mの発現ベクターを別々に発現させて共焦点レーザ顕微鏡で観察したところ、それぞれの蛍光蛋白が大腸菌内で発現していることが確認できた。(図 7) その大腸菌から蛋白抽出を行い、抽出液を等量混ぜ合わせた。複合体形成を蛋白抽出バッファーが阻害する場合を考え、抽出バッファーをリン酸バッファーに置き換えるため 4℃で一晩透析をおこなった。透析後の蛋白抽出液でNative-PAGEをおこない、蛍光イメージアナライザーでゲルの蛍光を観察した。抽出液を混ぜ合わせたものはGFP²とDsRed-Mの蛍光バンドは別々の場所にあり、二つの蛍光が重なるバンドは見られなかった。この結果から蛋白抽出液を混ぜ合わせただけでは複合体は作られないということがわかった (図 8)。

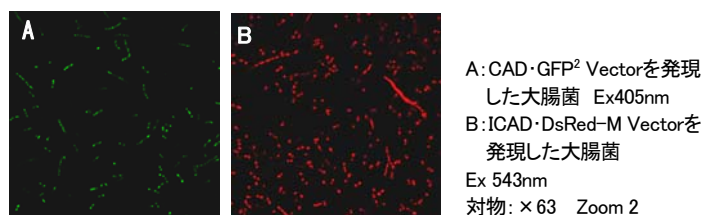
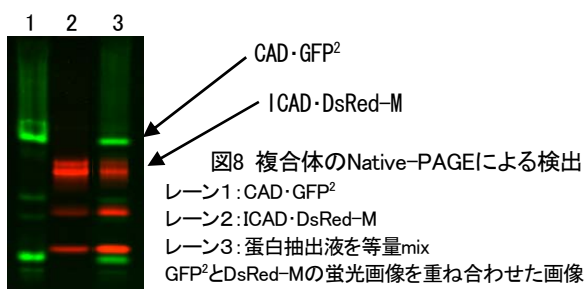


図7 蛍光蛋白を発現した大腸菌の共焦点レーザ顕微鏡画像



3. 大腸菌内でCAD・GFP²とICAD・DsRed-Mを共発現させて複合体の形成を確認

ICAD・DsRed-M 発現ベクターを体内にもつコンピテントセルを作製し、それに抗生剤耐性遺伝子を Ampicillin から Zeocin に変えた CAD・GFP² 発現ベクターを形質転換して両方のベクターを持つ大腸菌を選択する。選択された大腸菌を培養し、蛋白を発現させる。

共焦点レーザー顕微鏡で蛍光タンパクの発現を確認し、さらに 405nm の励起光で DsRed-M の蛍光も観察した (図 9)。単独で発現させた蛍光蛋白より共発現させた蛍光蛋白は GFP² はあまり変わらなかったが DsRed-M の蛍光が弱かった。DsRed-M の蛍光が弱いため FRET が起きているかは確認できなかった。

複合体が出来ているかを確認するため、共発現させた大腸菌から蛋白を抽出し、Native-PAGE をおこなった (図 10)。蛋白抽出液に活性化したカスパーゼ 3 を添加して ICAD が切断される確認もおこなった。GFP² と DsRed-M の蛍光バンドはほとんど別々の場所にあるが、非常に少ないが別々のバンドよりさらに上にわずかに 2 つの蛍光が重なるバンドがあった。カスパーゼ 3 を添加したところその場所のバンドは消失したことから、それが複合体である可能性が示唆される。そこで、更に CAD と ICAD がバンドに共存することを確認するためウエスタンブロッティングを行った。その結果、CAD と ICAD のそれぞれの抗体が、同じ場所に反応していることから複合体のバンドであると確認できた (図 10B)。プロテオーム解析でもそのバンドから CAD と ICAD が確認できた。単独で発現している量に比べれば

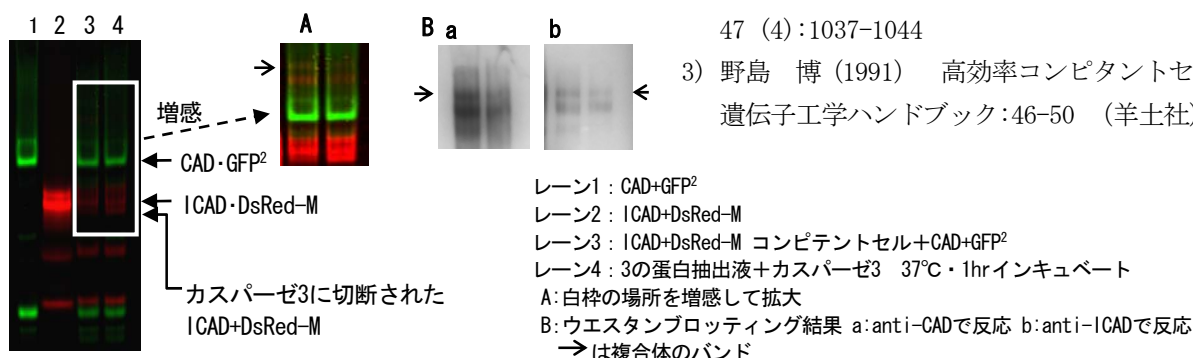


図10 大腸菌内で共発現させたCAD・GFP², ICAD・DsRed-Mの複合体のNative-PAGEによる検出

少ないが共発現させた場合には明らかに CAD と ICAD の複合体が形成されることが確認された。

【考察】

一つのベクターに Donor 蛍光蛋白と Acceptor 蛍光蛋白をつないで、その間にアポトーシス刺激で切断されるような遺伝子配列を挿入すれば FRET プローブとして有効であり、その挿入方法も確立できた。

Donor 蛍光蛋白や Acceptor 蛍光蛋白との融合蛋白として別々に作製し複合体を形成させる CAD-ICAD 系では、十分量の複合体形成までには至っていない。開発した共発現系でも相互作用複合体の形成は少ない。効率のいい共発現系の確立及び蛍光蛋白融合体の高次構造が複合体の形成を阻害している可能性があるので蛍光蛋白と CAD 及び ICAD の融合方式を変えて相互作用を検証する必要がある。in vitroでの複合体形成についても条件の検討が必要と考えている。複合体形成が成功すれば、培養細胞内で同時に発現させ、in vivoでの FRET の観察を可能にする方法を検討したい。

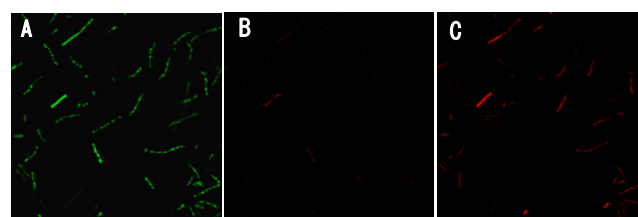


図9 CAD・GFP²とICAD・DsRed-Mが共発現した大腸菌の蛍光の共焦点レーザー顕微鏡画像

A: CAD・GFP² Ex 405nm B: FRET画像(ICAD・DsRed-M) Ex 405nm
C: ICAD・DsRed-M Ex 543nm 対物×63, ZOOM 2

本研究は平成 17 年度科学研究費補助金 (奨励研究、課題番号 17924026) の助成を受けておこなった。

参考文献

- 1) 宮脇敦史編集 (2000) GFP とバイオイメージング (羊土社)
- 2) P. Widlak. (2000) The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. Acta Biochimica Polonica 47 (4):1037-1044
- 3) 野島 博 (1991) 高効率コンピテントセル調整法 遺伝子工学ハンドブック:46-50 (羊土社)