

蛍光で見る体内のタンパク質分解の実態 リソソーム病の解明に期待

千葉大学大学院理学研究院の板倉英祐 助教らの研究グループは、細胞内タンパク質の分解量を蛍光タンパク質によって簡便に解析できる手法を開発しました。この手法により、細胞内小器官であるリソソームのタンパク質分解活性を定量的に測定できるようになり、リソソーム病の解明と薬効評価に役立てられます。今回の研究成果は、2019年8月12日に英電子版科学誌「サイエンティフィック・リポート」に掲載されました。

研究の背景：

私たちの体の中の細胞はたくさんのタンパク質を合成します。不要になったタンパク質は、細胞内小器官のリソソームに取り込まれ、酵素の力を借りて分解されます。しかし、加水分解酵素に異常があると、タンパク質が通常通り分解できなくなり、リソソーム病の発症につながります。リソソーム病は、厚生労働省から特定疾患の「難病」に指定され、現在までに40種類もの疾患が存在することがわかっていますが、リソソーム内の活性の測定法には煩雑なものが多く、リソソームの動態を研究する上で制約になっていました。

研究成果：

研究グループは、緑色と赤色の蛍光タンパク質を組み合わせたタンパク質プローブ (Lysosomal-METRIQ) を開発しました。Lysosomal-METRIQ を細胞に発現させてこれらの発現量を測定することで、細胞ごとのリソソーム活性を定量的に解析することに成功しました（「補足」参照）。この手法では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) でリソソーム依存的経路を、赤色蛍光タンパク質 (RFP) で細胞全体を標識しました (図1)。つまり細胞あたりの各蛍光強度を測定して合算すると、正常な細胞はオレンジ色に、リソソーム活性が低い細胞は黄色に、高い細胞では赤色へ変化します (図2)。細胞内に局在する蛍光タンパク質を蛍光顕微鏡で観察すると、細胞内のどのような変化がリソソームに影響を与えたか詳細に解析することも可能になります。この解析手法により、研究グループは、CDK5(cyclin dependent kinase 5) と呼ばれるタンパク質がリソソームの恒常性維持に貢献していることを発見しました。

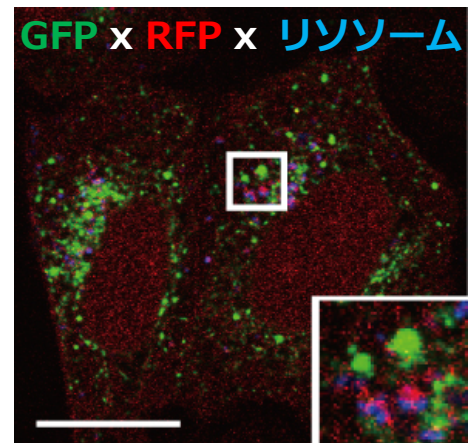


図1, Lysosomal-METRIQ を発現した正常な細胞の蛍光顕微鏡観察。RFP (赤色) は細胞内に一様に存在する一方で、GFP (緑色) は小胞体や輸送中間体などリソソーム経路に存在する。(スケールバー=20μm)

研究者のコメント：

今回の研究を主導した板倉英祐助教は、「従来と比べて簡便かつ定量的にリソソーム活性の測定が可能になったことで、今後はリソソームの動態変化の研究、細胞ストレスの評価、薬効評価のスクリーニングなど、基礎研究から治療に有効な薬剤探索まで、幅広い用途で活用されることを期待しています」と述べています。

Lysosomal-METRIQ 発現細胞

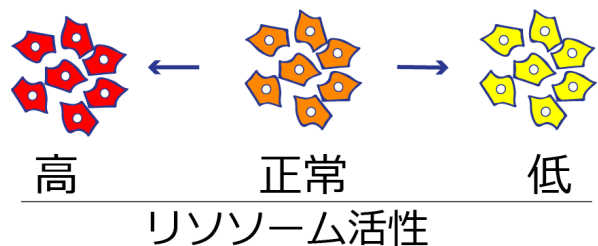


図2, 蛍光タンパク質によるリソソームの活性評価

研究プロジェクトについて：

本研究は、科学研究費補助金若手 A(16H06167)、科学研究費補助金新学術領域研究 (16H01194)、武田科学振興財団研究助成、内藤記念科学振興財団研究助成などの支援を受けて行われました。

論文タイトルと著者：

- ・ 掲載誌名：*Scientific Reports*
- ・ 論文タイトル：Identification of a factor controlling lysosomal homeostasis using a novel lysosomal trafficking probe
- ・ 著者：Shunsuke Ishii, Akira Matsuura, Eisuke Itakura
- ・ DOI：10.1038/s41598-019-48131-2

本件に関するお問い合わせ・取材のお申し込み

千葉大学大学院理学研究院 板倉英祐

電話：043-290-2778 Eメール：eitakura@chiba-u.jp

補足：タンパク質プローブ (Lysosomal-METRIQ) による活性測定原理

Lysosomal-METRIQ は、リソソームタンパク質(DNaseII α)、緑色蛍光タンパク質 GFP、自切配列 T2A、赤色蛍光タンパク質 RFP を直鎖状に融合させたコンストラクトです (図 3-A)。Lysosomal-METRIQ を細胞内に発現させると、タンパク質翻訳後に小胞体内へ移行します。T2A 配列は自己切断されるため、その後ろに位置する RFP 部位は細胞質に残ります。これにより、一つのタンパク質から、前半部の GFP 融合リソソームタンパク質は小胞体内へ、後半部の RFP は細胞質へ異所的に等量の発現をさせることができます (図 3-B)。GFP 融合リソソームタンパク質は正常なリソソームに運ばれると GFP がほとんど分解されます。リソソーム活性が低下していると GFP が分解されずに残り、逆にリソソーム活性が増加すると GFP は完全に分解されます。RFP は細胞質内に存在するため、リソソームの活性変化に関係なく内部標準として利用します。これにより、細胞 1 つ辺りの GFP 存在量と RFP 存在量をフローサイトメーターによって測定するだけで、細胞内のリソソーム活性量を調べられます。

この手法は、細胞内輸送の研究にも応用できます。Lysosomal-METRIQ は GFP 融合タンパク質を小胞体からリソソームへ輸送する際の評価系としても機能します。その輸送経路が正常である場合、GFP 融合タンパク質はリソソームの分解酵素によって速やかに分解され、蛍光を消失します。一方で細胞内のストレスにより輸送経路に何らかの機能障害が起きると、GFP は輸送経路の途中で蓄積し、蛍光色も変化します。このように、GFP 蛍光のシグナル強度や蓄積場所を通して細胞内リソソーム経路の異常を判別することも可能になります。

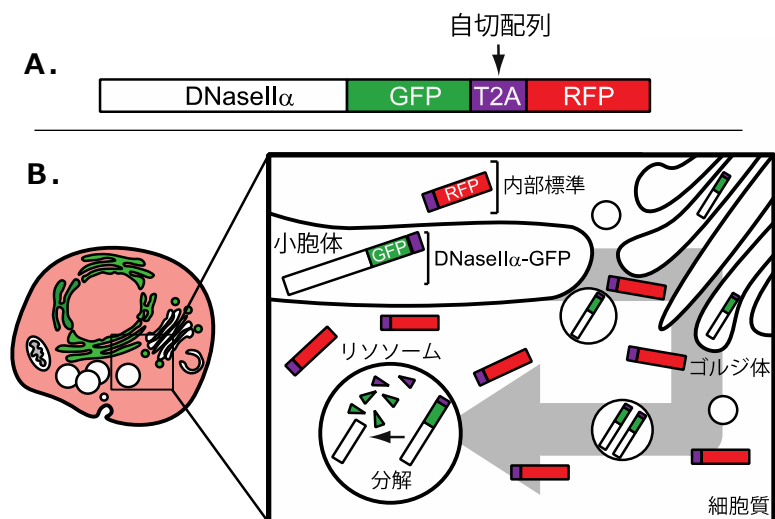


図3, Lysosomal-METRIQ の概略図