

蛋白質間相互作用研究におけるGFP-FRET法の汎用化

●木俣 行雄

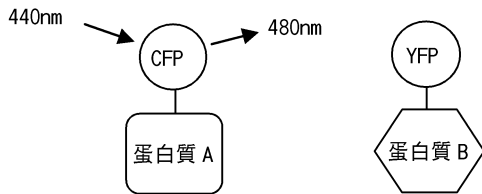
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

＜研究の目的と進め方＞

蛍光エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer）を応用して生きた細胞内での蛋白質間相互作用を調べる技法は、近年新たに開発された有望な研究方法である。この方法では、相互作用を調べたい蛋白質を蛍光蛋白質と融合させた形で（すなわち融合遺伝子を構築して）発現させる。主にはシアン色蛍光蛋白質（CFP）と黄色蛍光蛋白質（YFP）が使われるが、図1にこの方法の原理を示す。

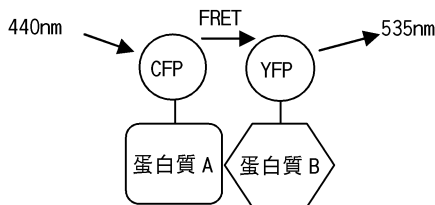
図1 CFP-蛋白質Aの融合蛋白質と、YFP-蛋白質Bの融合蛋白質を、細胞内で共発現させると・・・

・蛋白質Aと蛋白質Bとの間に相互作用が無い場合



440nmの励起光を当てると、通常のCFP蛍光（480nmピーク）が発せられる。

・蛋白質Aと蛋白質Bが会合している場合



CFPとYFPが近接するため、両者の間でFRETが起き、440nmの励起光を当てると、YFPの蛍光（535nmピーク）が見られる。

本研究では、ゲノム研究における網羅的蛋白質間相互作用解析にこの手法を用いることが出来るようにすることを目指し、この手法の汎用化を阻む問題点を解決することを第一の目的とした。すなわち、FRETが効率よく起こるためには、CFPとYFPが近接しなければならず、また両蛍光蛋白質分子の角度も重要であり、融合蛋白質の高次構造によっては、たとえ相互作用してもFRETが観察出来ない場合がある。

そこで、私は目的とする蛋白質と蛍光蛋白質の間に適当なポリペプチド（FRET効率上昇配列と呼ぶ）を入れることにより、この障害をクリアすることを考えた。

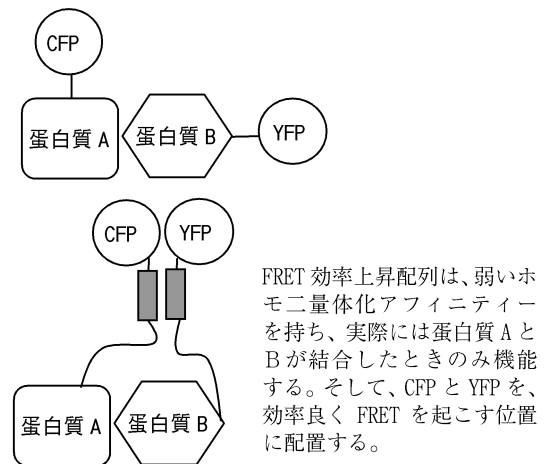
＜研究開始時の研究計画＞

本研究では出芽酵母を使い、まずヘテロ二量体化することが知られている蛋白質Tih1、Tih2をモデルとするこ

ととした。FRET効率上昇配列としては、改変型Jun由来ロイシンジッパーモチーフ（弱いホモ二量体化能を持つ）を用いる。そして、その配列にランダムに変異を導入し、FRET効率が高くなるものを選ぶ。その後、他の2量体化蛋白質でもこのFRET効率上昇配列が機能するか否かを調べ、汎用性を評価する。

図2に、期待されるFRET効率上昇配列の役割を示す。

図2 FRET効率上昇配列（灰色で図示）はどのように働くのか？



＜研究期間の成果＞

CFP-[改変型Jun由来ロイシンジッパーモチーフ]-Tih1及びYFP-[改変型Jun由来ロイシンジッパーモチーフ]-Tih2を酵母細胞で発現させた場合、初期コンストラクトではFRETは観察できなかった。しかし、改変型Jun由来ロイシンジッパーモチーフ、およびその配列とCFP,GFPの間だのスペーサー配列にランダムに変異を導入し、FRETが起きる配列を得ることが出来た。Tih1部分に変異を導入してTih1とTih2の会合を妨げるとFRETは認められなくなることから、改変型Jun由来ロイシンジッパーモチーフ変異体は期待通りFRET効率上昇配列として働いていると考えられる。

＜国内外での成果の位置づけ＞

研究の着想はユニークであり、FRET効率上昇配列が完成した場合には使用したいとの申し出を複数受けているが、汎用性があるものが得られておらず、実現していない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

今回得られたFRET効率上昇配列は、Tih1、Tih2以外のヘテロ二量体化蛋白質では効果を示さなかった。

＜今後の課題＞

さらにFRET効率上昇配列の検索を続けたい。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

無し。