

第1回 蛋白質性脂質プローブによる細胞内脂質の可視化

東北大学大学院生命科学研究科細胞小器官疾患学分野 教授

田口 友彦

はじめに

われわれの体を構築している真核細胞は、多種多様な生体膜を有している。細胞と外界を区切る細胞膜、細胞小器官(オルガネラ)と細胞質を区切るオルガネラ膜などである。これら生体膜は水溶性分子を透過させないバリアとして機能しているが、この物理的なバリア機能に加えて、生体膜は多彩な細胞内シグナル伝達を発生させる場としても機能していることが明らかになってきた。そのキープレイヤーの1つが膜脂質である。本稿では、生体膜脂質の機能を解明する上で、近年きわめて重要な手法となっている蛋白質性脂質プローブを用いた膜脂質の細胞内局在解析法について、実際のデータを交えながら解説する。

リコンビナント蛋白質を用いた脂質の可視化

脂質に特異的に結合する蛋白質性ドメインを大腸菌などに発現させ、そこから精製したリコンビナント蛋白質が広く利用されている。Green fluorescent protein (GFP)などの蛍光蛋白質を結合させたもの、脂質結合ドメインに直接Alexa Fluor®などの蛍光色素を導入したもの、またはHis-tagやFLAG-tagなどのペプチド性のタグを導入したものなどがある。脂質に結合する蛋白質性ドメインの多くは、約50~200のアミノ酸残基から構成されている。広く利用されているものとしてPleckstrin-homology (PH)ドメイン、FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1)ドメイン、Phox-homology (PX)ドメイン、C1ドメインなどがある。

図①に示すのは、ホスファチジルセリン(phosphatidylserine; PS)を選択的に認識するevectin-2のPHドメイン¹⁾による細胞内PSの可視化の結果である。PSへの結合力を上げるために、2つのPHドメインを並列につなげた2xPH²⁾を用いている。オルガネラのPSを検出するために、細胞を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、ついで界面活性剤で処理したのち、リコンビナントの2xPHを培地に添加した。evectin-2 PHドメインにはHis-tagが付いているので、His-tagを認識する蛍光標識抗体を用いて間接的にPSを検出している。リサイクリングエンドソームに局在する蛋白質(トランスフェリン受容体)とゴルジ体に局在する蛋白質(TGN46)を染色することによって、PSがリサイクリングエンドソームに選択的に存在していることがわかる。

図②に示すのは、スフィンゴミエリン(sphingomyelin; SM)を選択的に認識するequinatoxin-II (Eqt-II)による細胞膜SMの可視化の結果である。細胞膜の外側の脂質層に存在する脂質の検出を行うには、細胞を界面活性剤処理をする必要がない。この実験では、大腸菌から精製したEqt-IIにGFPが結合したリコンビナント蛋