

出芽酵母(*S. cerevisiae*)を用いた *in vivo* 部位特異的光架橋法によるタンパク質間相互作用解析法

Monash 大学・Microbiology 学部

塩田 拓也

The method for protein-protein interaction analysis by *in vivo* photo-cross linking in *Saccharomyces cerevisiae*

Department of Microbiology, Monash University

Takuya Shiota

(投稿日 2016/9/23、再投稿日 2016/10/25、受理日 2016/11/5)

キーワード：部位特異的光架橋法、相互作用解析、非天然アミノ酸、BPA、UV クロスリンク

概要

部位特異的光架橋法は、タンパク質の任意の部位に非天然アミノ酸であるパラベンゾイルフェニルアラニン (BPA) を導入し、BPA が持つ光架橋側鎖の特性を生かして、タンパク質間相互作用を、UV 照射により生ずる架橋産物から解析する方法である。BPA の導入部位により架橋の有無、もしくは増減が確認できるため、アミノ酸残基レベルの空間分解能で相互作用解析が出来る。今回は、出芽酵母、*S. cerevisiae* による、*in vivo* サプレッサー-tRNA 法(1)を用いた、*in vivo* 部位特異的光架橋法を紹介する。

イントロダクション

このアーカイブをご覧になるほとんど全ての方が、一度はタンパク質間相互作用について研究したことがあるはずだと思う。タンパク質間相互作用の解析には、共免疫沈降法、化学架橋法をはじめとした様々な方法が利用されてきたが、中でも BPA を用いた、*in vivo* 部位特異的光架橋法は比較的簡便な方法で、多くの情報が得られる方法であると我々は自負している。BPA を用いた部位特異的光架橋法が開発された黎明期は、タンパク質の任意の部位への BPA の導入を *in vitro* 無細胞タンパク質合成系に頼っていたため、BPA を含むタンパク質を合成した後に、解析対象の複合体に送り込む、もしくは相互作用している状態を人為的に作り出さなければならず、多くの相互作用解析には不向きであった(2)。しかし、Peter G. Schultz をはじめとした様々なグループにより *in vivo* サプレッサー-tRNA 法が開発され、生細胞内で BPA が導入できるようになり、新たに *in vivo* 部位特異的光架橋法が可能となった(1)。*in vivo* サプレッサー-tRNA 法による、出芽酵母細胞内での具体的な BPA 導入原理は、培地に添加された BPA が酵母細胞内にとりこまれ、人為的に酵母細胞内で発現されている改変アミノアシル tRNA 合成酵素 (BpaRS) により、同じく人為的に発現されているアンバーサプレッサー-tRNA (出芽酵母で最も使用頻度の低いアンバーコドン;TAG に対するアンチコドンをもつ) に BPA がチャージされ、これが目的のタンパク質の任意の部位に入れられたアンバー変異に部位特異的に BPA を導入すると

いうものである (図 1A)。BPA が導入されたタンパク質は細胞本来の機能により、目的のオルガネラや機能複合体へと輸送されるため、よほど重要なアミノ酸を BPA に置換しない限り、非常に簡単に自然な状態の相互作用解析が可能である。本稿では筆者らが行った出芽酵母、*S. cerevisiae* におけるミトコンドリア外膜タンパク質 Tom40 の相互作用解析(3)を例に、そのプロトコルを紹介する。なお、CHO 細胞などの動物細胞をもちいた解析についても開発されているので別途参照されたい(4,6)。

装置・器具・試薬

装置

- ・遠心機 (50 mL、15 mL ファルコンチューブ用) (各社)
- ・冷却遠心機 (1.5 mL チューブ用) (各社)
- ・インキュベーター (各社)
- ・ローテーター (各社)
- ・紫外光照射器：UVP 社 B-100AP 型 100 W 365 nm (図 2)
- ・プローブ式超音波破碎装置 (各社)
- ・スラブ式泳動装置 (各社)
- ・ブロッキング装置 (各社)

器具

- ・250 mL バッフル付き三角フラスコ (各社)
- ・プラスチックシャーレ (90 × 15 mm) (各社)
- ・50 mL ファルコンチューブ (各社)
- ・15 mL ファルコンチューブ (各社)
- ・1.5 mL チューブ (各社)
- ・PVDF メンブレン (ナイトロセルロースでも可) (各社)

試薬

- ・-Ura, -Trp サプリメント：400 mg adenine sulfate、400 mg γ -histidine-HCl、600 mg γ -leucine、600 mg γ -lysine-HCl を 250mL の 10 mM HCl に溶かし、濾過滅菌。常温保存。
- ・20% (w/v) D-グルコース溶液：精製水に溶かし、オートクレーブ、常温保存。

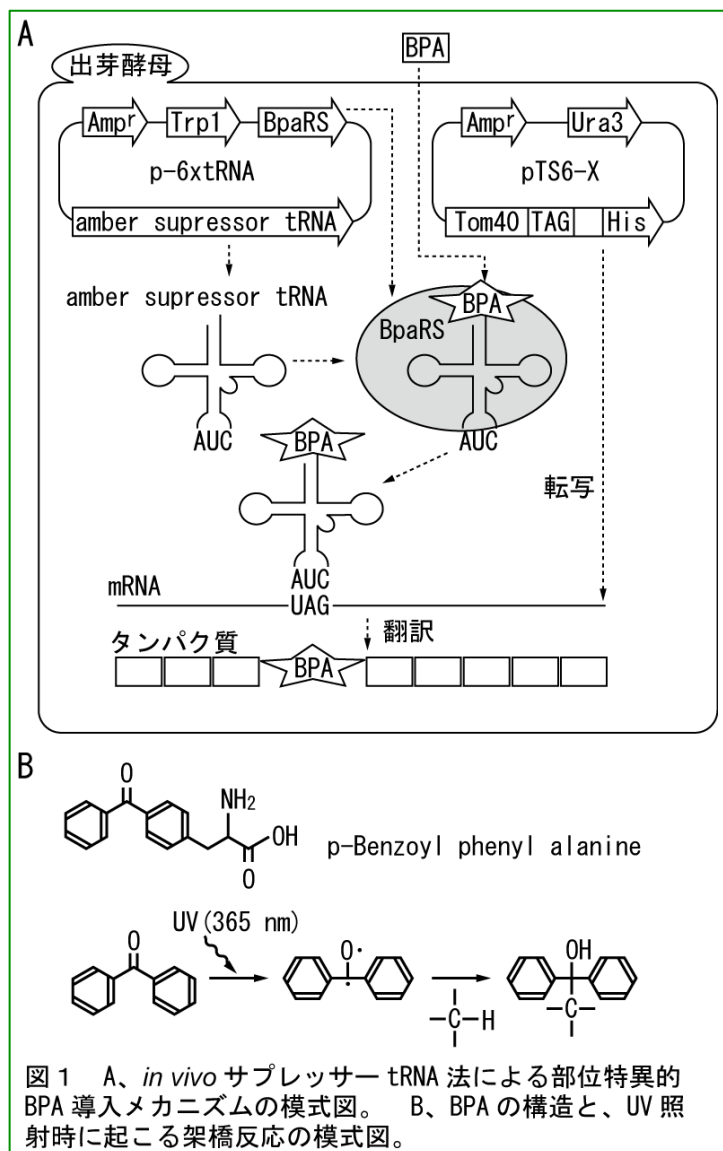


図 1 A、*in vivo* サプレッサー tRNA 法による部位特異的 BPA 導入メカニズムの模式図。 B、BPA の構造と、UV 照射時に起こる架橋反応の模式図。



図 2 UVP 社 B-100AP 型による UV 照射の様子。

- ・ 20% (w/v) ガラクトース溶液：精製水に溶かし、オートクレーブ、常温保存。
- ・ YPGal agar 培地：2 g yeast extract、4 g polypepton、4 g agar（全てベクトン・ディッキンソン社）を 180 mL の精製水に溶かし、オートクレーブ。20 mL の 20% (w/v) ガラクトース溶液を加え、プラスチックシャーレに約 20 mL ずつ分注する。
- ・ YP 培地：10 g yeast extract、20 g polypepton を 180 mL の精製水に溶かし、オートクレーブ。
- ・ SCGal agar 培地：1.35 g yeast nitrogen base w/o amino acids、1 g casamino asid（ともにベクトン・ディッキンソン社）、4 g agar を 180 mL の精製水に溶かし、オートクレーブ、20 mL の 20% (w/v) ガラクトース溶液および、2 mL -Ura, -Trp サプリメントを加え、プラスチックシャーレに約 20 mL ずつ分注する。
- ・ SC 培地：6.7 g yeast nitrogen base w/o amino acids、5.0 g casamino asid を 900 mL の精製水に溶かし、オートクレーブ、常温保存
 - ・ 5N NaOH
 - ・ 100 mM BPA: 27 mg *p*-benzoyl-L-phenylalanine（バクケム社、もしくは渡辺化学工業）を 100 mL の 1.0 M NaOH に溶かす。用時調製。
 - ・ 4M リチウム酢酸溶液：精製水に溶かす。
 - ・ 1M DTT: 精製水に溶かす。
 - ・ TritonX-100（各社）
 - ・ Ni-NTA agarose（キアゲン社）
 - ・ 100% (w/v) トリクロロ酢酸
 - ・ 氷冷アセトン

材料

- ・ 酵母株：Gal7-Tom40 株（*MATa ade2 his3 ura3 leu2 trp1 can1 GAL7-Tom40-CgHIS3*）。*Ura3* と *Trp1* マーカーが使える株であれば何でもよい。
- ・ プラスミド DNA：p-6xtRNA（アンバーサプレッサー-tRNA と BpaRS がコードされたプラスミド、*TRP1* マーカー）、pTS6-X（任意のアミノ酸 X に対応するコドンアンバーコドンに置換した Tom40-His10 を酵母細胞内で発現するプラスミド、*Ura3* マーカー）（図 1A）。

実験手順

- 1) 変異体の作製
- 2) 酵母形質転換体の作製
- 3) プレカルチャーの作製
- 4) BPA を含む培地で本培養
- 5) UV 照射および菌体回収
- 6) Ni-NTA による精製
- 7) SDS-PAGE による架橋産物の解析

実験の詳細

1) 準備

- ・変異体の作製

ここではミトコンドリア外膜透過装置 Tom40 の相互作用解析に用いた変異体を例に挙げて説明する。Tom40 は C 末端側にタグ等を付加してもその機能に影響がないことから、架橋産物の収量を上げられるように C 末端側に His タグを付加した。BPA を導入する部位は、Tom40 のマルチプルアライメントを作成し、よく保存された残基を避けながら網羅的に選択した。具体的な方法としては、クイックチェンジ法を利用した (工夫とコツ-1)。

2) 酵母形質転換体の作製

1. ディープフリーザーで保存している Gal7-Tom40 株のグリセロールストックを YPGal agar プレートに起こす。30°C でコロニーがしっかりと見えるまで 2-3 日間インキュベートする。

2. 得られたコロニーを約 5 mL の YPGal 液体培地に植菌し適度に振盪しながら 30°C で約 12 時間程度培養する。

3. Gal7-Tom40 株に、p-6xtRNA および pTS6-X を導入する。導入方法は、白石らの文献 6 を参照のこと。白石らは SmaI で切断したプラスミドを使用していたが、未切断の環状プラスミドも同様の方法で導入可能である。形質転換体のセレクションは、SCGal(-Ura, -Trp)プレートにて行う。

3) プレカルチャーの作製

得られた形質転換体を、5 mL の SCGal (-Ura, -Trp)液体培地に植菌し、30°C で 2 日間程度、OD600=約 2.0 程度まで培養する。SCGal (-Ura, -Trp)培地は、45 mL の SC 培地に、5 mL の 20% (w/v) ガラクトース溶液および、0.5 mL -Ura, -Trp サプリメントを加えて作製する。

4) BPA を含む培地で本培養

1. SCD (-Ura, -Trp, +BPA)培地の作製

250 mL バッフル付きフラスコに 90 mL SC 培地、10 mL 20% (w/v) D-グルコース溶液、1.0 mL -Ura, -Trp サプリメントを入れよく攪拌する。さらに、用時調製した 100 mM BPA 溶液を全量 (約 125 μ L)、培地を激しく攪拌しながら加える (工夫とコツ-2)。

2. プレカルチャー全量を加え、30°C で 16 から 24 時間振盪培養する (工夫とコツ-3)。

5) UV 照射および菌体回収

1. 50 mL ファルコンチューブに 50 mL ずつ培養液を回収する。

2. 一方は、25 mL ずつプラスチックシャーレに移す。

3. 紫外光照射器 (UVP 社 B-100AP 型) の下に、シャーレをふたは外した状態でセットする。
4. 10 分間 UV 照射する (図 2) (工夫とコツ-4) (実験の安全)
5. 50 mL ファルコンチューブに戻し、3,500 rpm、4°C、5 分間遠心し、菌体を回収する。
6. 得られた菌体を-20°Cで1時間以上凍結する。そのまま保存することも可能 (工夫とコツ-5)。

6) Ni-NTA による精製

1. -20°Cで保存した、菌体を室温に戻す。
2. 菌体を 5 mL の精製水に懸濁する。
3. 5 mL の 4M リチウム酢酸溶液を加える (終濃度 2 M)。
4. 氷上で 5 分インキュベート。
5. 3,500 rpm、4°C、5 分間遠心し、菌体を回収する。
6. 菌体を 5 mL の精製水に懸濁する。
7. 5 mL の 800 mN NaOH、200 mM DTT 溶液を加える。
8. 3,500 rpm、4°C、5 分間遠心し、菌体を回収する。
9. 菌体に 3 mL の 1% SDS バッファーを加える。
10. プローブ式超音波破碎装置を用いて菌体を破碎する (工夫とコツ-6)。
11. 3,500 rpm、25°C、10 分間遠心する。
12. 上清を 15 mL ファルコンチューブに移す。
13. 11.9 mL 0.5% Triton X バッファー (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100)、100 μ L Ni-NTA agarose を加える (工夫とコツ-7)。
14. 4°Cでローターで振盪しながら、1 時間以上インキュベートする。
15. 1,200 rpm、4°C、5 分間遠心し、上清を取り除き、Ni-NTA agarose を回収する。

16. 1 mL の 0.5% Triton X バッファーを加え、レジンを懸濁する。
17. 15、16 と同じ操作を 3 回繰り返す（レジンを 4 回洗う）。
18. 600 μ L の Elute バッファー (pH 8.0、50 mM Tris-HCl、400 mM imidazole-HCl、150 mM NaCl、0.5% (v/v) Triton X-100) を加える。
19. 4°C でローターで振盪しながら、20 分以上インキュベートする。
20. 1,200 rpm、4°C、5 分間遠心し、上清を 1.5 mL のチューブに移す。
21. 13 μ L の 1.5% デオキシコール酸ナトリウム溶液を加え、ボルテックスに攪拌する。
22. 68 μ L の 100% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を加え、ボルテックスで攪拌する。
23. 氷上で 10 分間インキュベート。
24. 15,000 rpm、4°C、10 分間遠心する。
25. 上清を除き 500 μ L の氷冷アセトンを加え、ボルテックスもしくはバスソニケーターで沈殿を懸濁する。
26. 15,000 rpm、4°C、10 分間遠心する。
27. 上清を除き、沈殿を 60 μ L の SDS-PAGE サンプルバッファーに懸濁する。
28. 95°C で 5 分間インキュベーション。

7) SDS-PAGE による架橋産物の解析

前項の 28 で得られたサンプル 10 μ L を 8% トリス-グリシン系 SDS-PAGE で泳動し、PVDF メンブレンにセミドライ法で転写する。抗 Tom40 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより架橋産物を解析する。UV 照射特異的に見られる高分子量の架橋産物が見られた場合、見かけの分子量から相互作用しているタンパク質を推定し、その抗体を用いたウエスタンブロッティングにより相互作用しているタンパク質を同定する。3 に示す結果の場合、Tom40 の 310 番目の残基を BPA に置換した場合、約 75 kDa の架橋産物が見られた。これは抗 Tom22 抗体でも検出されたため、Tom40 の 310 番目のアミノ酸は Tom22 と接近していることが示された (図 3)。

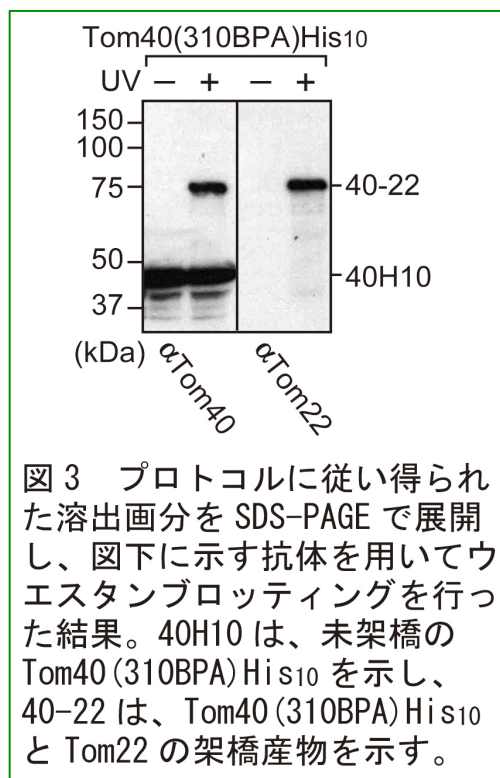


図3 プロトコルに従い得られた溶出画分を SDS-PAGE で展開し、図下に示す抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果。40H10 は、未架橋の Tom40 (310BPA) His10 を示し、40-22 は、Tom40 (310BPA) His10 と Tom22 の架橋産物を示す。

工夫とコツ

BPA の導入および、取り扱いについて

1. BPA は、図 1B に示すように、非常に側鎖が大きくかつ、疎水性の強いアミノ酸なので、変異導入の際には、よく保存された親水性のアミノ酸は避けて導入する。BPA の導入効率は前後の配列によるが、約 50%程度なので、約半分はアンバーコドンで翻訳が停止してしまったものとなるため、アンバーコドンを読みスルーし BPA が導入されたタンパク質のみを効率よく回収できるように C 末端側に His タグを付加する。
2. BPA は、培地に加える際、非常に析出しやすい。よく攪拌しながら加えるか、オートクレーブ後の暖かい培地（約 60°C）に加えるとよい。もし、析出してしまった場合は、培地をバーナーの炎等で、暖め溶かし、常温に戻して植菌する。

紫外線照射について

3. 我々は、人の出入りの少ない部屋の照明を切り、その部屋で培養を行っている。もし、培養装置のある部屋が、電気が常についていたり、培地に外部からの太陽光があたる場合は、アルミホイル等を利用して遮光する。タンパク質への BPA の導入効率は 30°Cでの培養が最も高効率であるため、酵母の生育に影響がない場合は、出来るだけ 30°Cで培養する。
4. 紫外光照射器（UVP 社 B-100AP 型）は、電源を入れた直後は光量が弱いので、10分程度暖機運転を行う。

酵母の破碎について

5. 一度凍結した酵母の方が、凍結していない酵母より、破碎およびタンパク質の抽出率が良い。
6. 通常の細胞破碎とは異なり、SDS での可溶化のための熱処理を兼ねるため、連続的に 2 分間、サンプルに超音波を与える。その際、泡立たないように、強度とプローブの深さを調節する。我々は細い方のプローブを使用している。

タンパク質の精製について

7. Ni-NTA agarose は使用前に、水で数回洗った後に、0.5% Triton X バッファーで平衡化しておく。

今回は、細胞内で目的のタンパク質に BPA を導入し、UV 照射によりタンパク質間相互作用を解析する、最も基本的な方法を紹介した。しかし、この手法の強みは、BPA をもつタンパク質がごく自然な状態で機能的な複合体や状態を取ることが出来る点である。したがって、培養の条件を検討したり、単離オルガネラ等を利用するなど工夫次第で明らかに出来ることは無限に広がる。実際に我々は、単離ミトコンドリアに、*in vitro* 合成した放射性ラベルされた前駆体タンパク質を加え、基質とトランスロケーターの相互作用を検出することに成功している。

実験の安全

本実験で使用する UV 照射器は非常に強力であるため、ラボコート、実験眼鏡を必ず着用すること。また掲示等で UV 照射中であることを周知し、むやみやたらに他の実験者が近づくことを避けること。人の出入りが多い場所しか取れない場合は、アルミホイル等で下部の紫外光が漏れている部分を覆うこと。

文献

- 1) Chin, J.W. et al., *Science*, **301**, 964-7 (2003)
- 2) Ellman, J. et al., *Methods Enzymol.*, **202**, 301-36 (1991)
- 3) Shiota, T. et al., *Science*, **349**, 1544-8 (2015)
- 4) Hino, N. et al., *Nat. Methods*, **2**, 201-6 (2005)
- 5) Liu, W. et al., *Nat. Methods*, **4**, 239-44 (2007)
- 6) 白井充典, *蛋白質科学会アーカイブ*, **6**, e072 (2013)