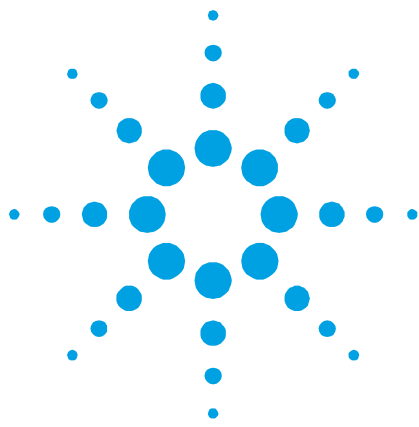




Agilent Cary Eclipse を用いた 出芽酵母の溶解物で発生する GFP 融合間蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の観測

アプリケーションノート

著者

Paul Gavin* and Mark
Prescott*, Ph.D

Daren J. Fyfe, Ph.D**

*Department of Biochemistry and
Molecular Biology, Monash University,
Clayton campus, Victoria 3800,
Australia

**Technical assistance: Agilent
Technologies, Inc. Mulgrave,
Victoria 3170, Australia

はじめに

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) は、非破壊の分光学的方法であり、生体細胞中におけるドナーおよびアクセプタのフルオロフォアの近接度と角度方向を観測することができます¹。励起されたドナーフルオロフォア (ここでの例は、青色蛍光タンパク質 – BFP) の共鳴エネルギーは、ドナーとアクセプタが近接近 (10~80 オングストローム²) する場合に、アクセプタフルオロフォア (緑色蛍光タンパク質 – GFP) によって吸収されます (図 1)。ドナーフルオロフォアの発光スペクトルは、アクセプタの吸収スペクトルに十分オーバーラップしなければなりません。一方、ドナーとアクセプタのそれぞれの吸収および発光スペクトルの間のオーバーラップは、最小にならなければなりません³。

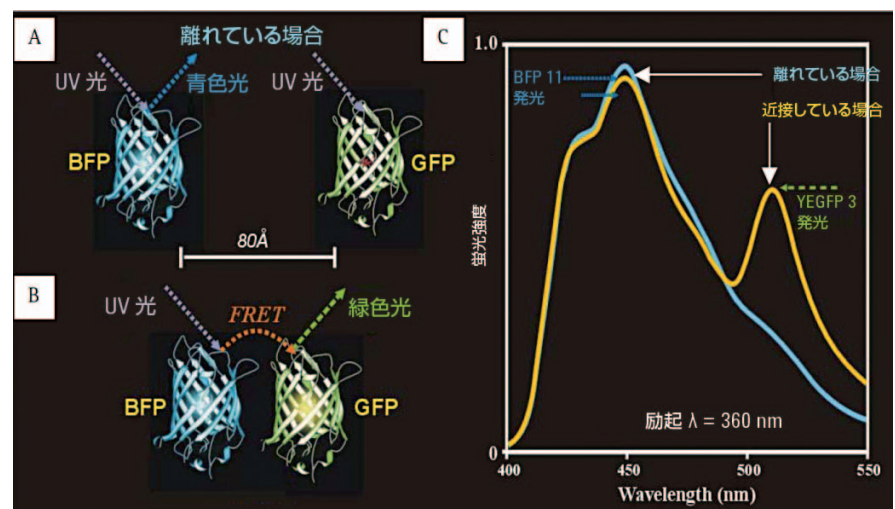


図 1. FRET を生じさせるための GFP 変異体の使用

A. 離れている場合: 青色光 (ピーク発光 = 450 nm) を発光するために、UV 光が BFP (ドナーフルオロフォア) を励起しますが、GFP (アクセプタ) には励起されたドナーからエネルギーを取り出すのに十分な近さはありません

B. 近接している場合: BFP に GFP が近接すると、無放射のエネルギー移動が生じ、刺激された BFP は、GFP を蛍光緑色 (ピーク励起 = 510 nm) に励起します。図 1C は、GFP フルオロフォアが近接している場合と離れている場合のいずれかであったときに予想される発光スペクトルを示しています



Agilent Technologies

GFP の優れた特質 (蛍光アプリケーションノート No.5 に記載されています)⁴ により、GFP および GFP 変異体に対する FRET の適用が、無傷細胞あるいは生命体中のタンパク質レベルにおける相互作用を観測するための強力なツールになります。FRET は、カルシウム¹ のようなリガンド結合、または特定の GFP⁵ でそれぞれタグ付けされた個別のタンパク質間の相互作用に応じて、2 つの GFP 変異体でタグ付けされた分子中での立体構造の変化を測定することができます。このような研究では、生体細胞中でタンパク質間のわずかな関係および動的な相互作用を研究するための独自の環境が提供されます。

今回の研究は、Agilent Cary Eclipse を用いて酵母細胞の細胞質ゾル溶解物中の BFP と GFP の間の FRET の変化を検出し、観測することを目的としています。

装置

- Cary Eclipse 蛍光分光光度計
- マルチセルベルチェ
- 温度制御装置
- クオーツ 10 mm、ストッパー付
- Eclipse Thermal ソフトウェア (Bio ソフトウェアパッケージ)

酵母株

この研究では、酵母 *S.セレビシエ* の YRD15 (*MAT α* , *his3*, *ura3*, *leu2*, *p+*) を親株に用いました。プロテアーゼトリプシンの認識部位を含んでいる 27 アミノ酸ペプチド脂質に連鎖した BFP と GFP をコード化して遺伝子カセットを構成しました。このカセットを、細胞質発現において酵母発現プラスミド pAS1N にクローン化し、前述したように、酵母株 YRD15 に転換しました⁶。転換細胞を必要に応じて成長剤で酵母の最少培地 (アミノ酸なしでの 0.75 % 最少培地、2 % ブドウ糖、1.5 % 寒天) に沈着させ、3 ~ 5 日間、28 °C で成長させました。

手順

メーカーの説明書に従って、酵母細胞を 1 ml MilliQ 水で 2 回洗浄し、Y-PER (プロジェン) を用いて溶解しました。ペプチドリンカーのプロテアーゼ消化を可能にするため、すべての細胞で溶解物を優先しました。Y-PER 溶解物 (10 μ l) を 1.2 ml の Tris/HCl pH 8 で希釈し、Agilent Cary Eclipse のサンプルチャンバに設置したマルチセルホルダーの使い捨て蛍光キュベット (Sarstedt) 中に入れました。トリプシンによるペプチドリンカーの切断を促進するため、キュベット中の温度を 25 °C に設定しました (図 2)。「Scan」アプリケーションを用いて、BFP を 360 nm の光で特異的に励起し、融合タンパク質の発光スペクトルを 400 ~ 500 nm の領域で記録しました。0.25 μ g のトリプシンを添加した後で、経時的に蛍光スキャンを記録しました。

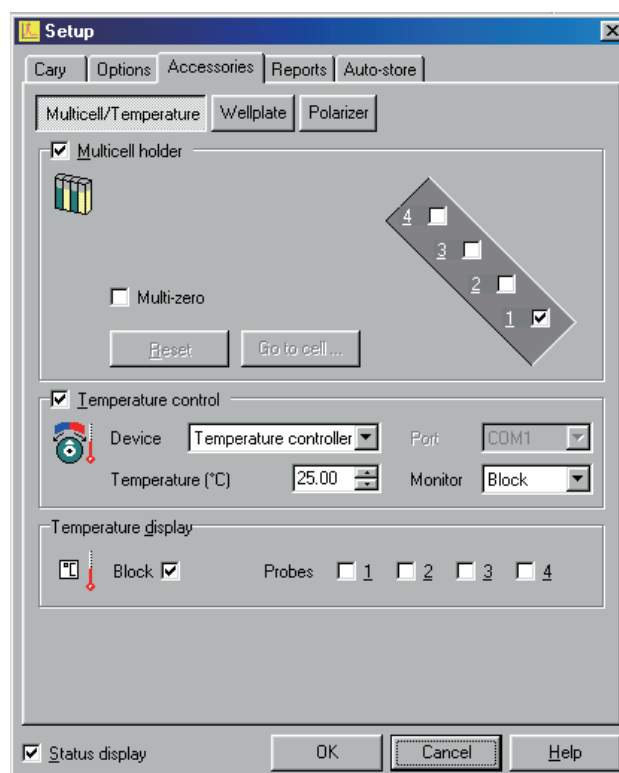


図 2. トリプシン活性の促進のための温度制御の設定

結果

360 nm の励起に続く BFP-GFP の融合タンパク質の発光スペクトルを図 3 に示します。初期スペクトルを time = 0 min で取得しました。その後、トリプシンを添加し、指示された時間でスペクトルを記録しました。BPF のみの特定励起 (360 nm) では、FRET を示す GFP 発光 (約 510 nm) がみられます。FRET のスペクトル特性 (510 nm の緑ピークによって表示) は、GFP を繋ぎ止めるペプチドリinkerを切断するトリプシンを添加した後に、次第に消失しました。FRET が減少するにつれて、BFP 発光において小さな増加がみられます。

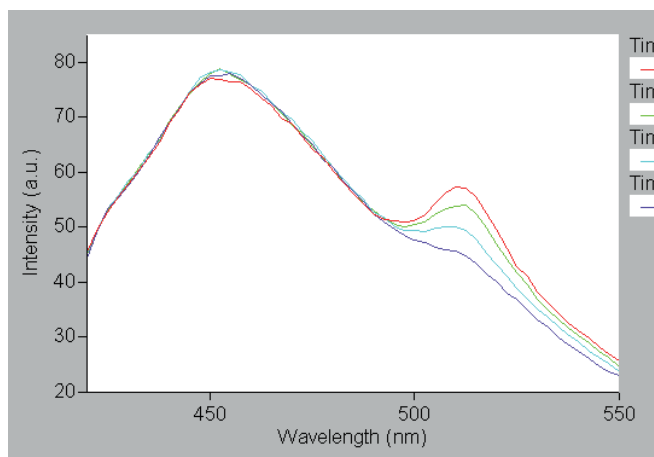


図 3. BFP-GFP の融合タンパク質についての発光波長と強度。初期スキャン time = 0 の後でトリプシンを添加しました

考察

生物系におけるタンパク質の相互作用を観測するための理想的な方法の 1 つとして、対象となる標的種に結合している BFP と GFP の間の FRET を検出する方法があります。このようなアプリケーションにおいて、蛍光を検出する最適な選択性と感度を得るには、(a) 細胞の自己蛍光の検出と (b) 光退色を最小限に抑える必要があります。これらの問題は、内部フィルタ (励起と発光モノクロメータの両方に内蔵) および Cary Eclipse キセノンフラッシュランプで対応しています。光退色の問題点は非常に重要であり、別のアプリケーションノートでも取り上げられています。

データ (図 3) は、FRET が酵母細胞からの細胞質の溶解において正確に観測されていることを示しています。トリプシンを用いた BFP-GFP 融合の切断 (ペルチェ温度を 25 °C で制御) は、GFP 発光が FRET によるもので、励起波長による GFP の直接刺激でないことを明らかにしています。これは、図 3 に示されたスキャンによって明らかにされます。同図は、33 分間にわたる連続スキャンで、緑色 (FRET) ピークが小さくなっている (BFP が GFP から切断される) ことを示しています。

結論

ペルチェ温度制御装置とマルチセルアクセサリを備えた Agilent Cary Eclipse は、酵母細胞からの細胞質の溶解において、タンパク質レベルで細胞機能を観測するための簡単で正確なアセンブリを提供します。生体細胞中で外部または内部刺激に応じてタンパク質-タンパク質の相互作用を研究するためのプラットフォームとして、このモデルを使用することができます。

参考文献

1. Miyawaki *et al.* (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, **388**, 882-887.
2. Ha *et al.* (1996) Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6264-6268.
3. Cubitt *et al.* (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins, *TIBS*, **20**, 448-455.
4. Gavin, P and Prescott M. (2001) Cytosolic expression of green fluorescent protein (GFP) and its derivatives in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Detection *in vivo* using the Agilent Cary Eclipse. Fluorescence Application Note #5.
5. Mahajan *et al.* (1998) Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer, *Nature Biotechnology*, **16**, 547-552.
6. Prescott, M., et al (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 943-949.

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2001. 2012
Published December 18, 2012
Publication Number SI-A-1834JAJP



Agilent Technologies