

Fluo-Chase Kitを用いた

RalBのGTPase activity依存的なSec5との相互作用検出

RalBとは

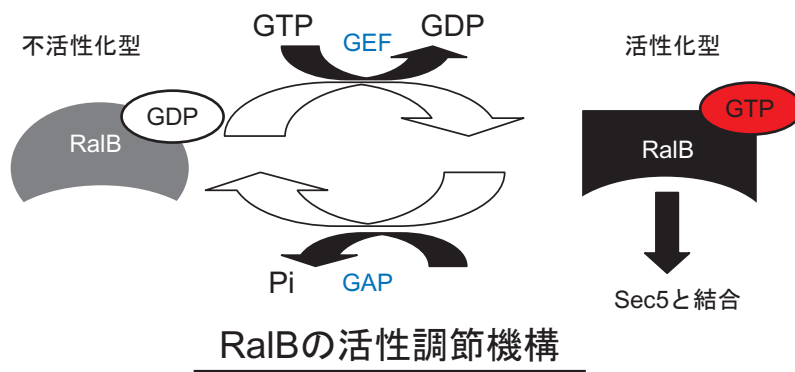
低分子量Gタンパク質のRas familyに属するタンパク質で、Ral sub familyにはRalA、そしてRalBが属しています。

活性化型であるGTP結合型のRalは、exocyst複合体の構成因子であるSec5、Exo84と直接結合し、exocyst複合体の関与するエキソサイトーシスや膜のリモデリング、極性輸送に関与することが明らかとなっている分子です。

今回、RalBの標的因子として上述のSec5を選択し、RalBのGTPase活性依存的なSec5との相互作用が、Fluo-Chase Kitにて検出できるか検討を行いました。

<低分子量Gタンパク質>

グアニンヌクレオチド結合タンパク質で、GTP結合型とGDP結合型のコンフォメーション転換により、上流からのシグナルを下流に伝達する分子スイッチとして働いています。通常は不活性化型であるGDP formですが、上流からのシグナルによりGDPを解離し、GTPと結合することで活性化型となることが知られています。活性化した低分子量Gタンパク質は、標的因子を介して下流にシグナルを伝達します。



GEF: Guanine nucleotide exchange factor. グアニンヌクレオチド交換因子。GDPの解離反応に作用し、低分子量Gタンパク質の活性化因子といえる。
GAP: GTPase-activating protein. GTPアーゼ活性化因子。GTP水解反応に作用し、低分子量Gタンパク質の不活性化因子といえる。

Protocol

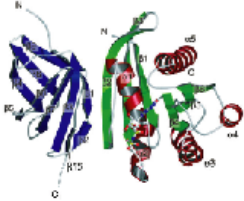
[Transfection]

- 1: 1 ug mKG_N断片融合 plasmid + 1 ug mKG_C断片融合 plasmid を190 ul Opti-MEM (Invitrogen)に懸濁
 - 2: 4 ul Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を190 ul Opti-MEMに懸濁し、5分間インキュベート
 - 3: 1のDNA混合液に、2のLipofectamine 2000混合液を加え、20分間インキュベート
 - 4: Glass bottom dish (IWAKI, collagen-coated)に播種した 4×10^5 HEK 293T細胞 (2 mL DMEM, Gibco)に、3の混合液を添加
 - 5: transfection1日後、蛍光観察
- * 使用したDNA量は、Invitrogen推奨プロトコールの1/2量、またLipofectamine 2000は2/5量を用いています。

[蛍光観察]

medium: PBSで2回洗浄後、2 mL PBSにて観察
Instrument: 倒立型蛍光顕微鏡 IX71 (OLYMPUS)
CCD camera: CoolSnap HQ (Nippon Roper)
Lens: x20 UPlanApo NA 0.7 ph2 ∞ /0.17
Light: 75 W, Xenon
ND filter: 30 %
Binning: 2x2
Exposure time: 400 msec

1:RalBとSec5が相互作用する位置の検討



Sec5 Ral-binding domain と GppNHp-bound RalAの結晶構造。 Sec5 (amino acid 1-99)(左)、RalA (右)。 Fukui, S et al., (2003) EMBO J.22,3263-3278

Fuo-Chase Kitの原理であるProtein Complementation法では、分割したタンパク質、つまりここではmKG断片同士が、目的タンパク質の相互作用依存的に再構成できる"位置"にあるかが非常に重要です。

今回、RalB, Sec5のmKG断片融合plasmidを作製するにあたり、既に結晶構造が明らかとなっているRalAと、Sec5のRal-binding domainである1-99番(1-99)の相互作用(左図)を参考にコンストラクトを作製しました。結晶構造から、RalAのN末端とSec5のN末端が近接していることから、RalBのN末端にmKG_NまたはmKG_C断片を、同様にSec5(1-99)のN末端にmKG_NまたはmKG_C断片を融合し、各2通りの組み合わせを検討しました。

<作製したplasmid>

RalB: mKG_N-RalB, mKG_C-RalB

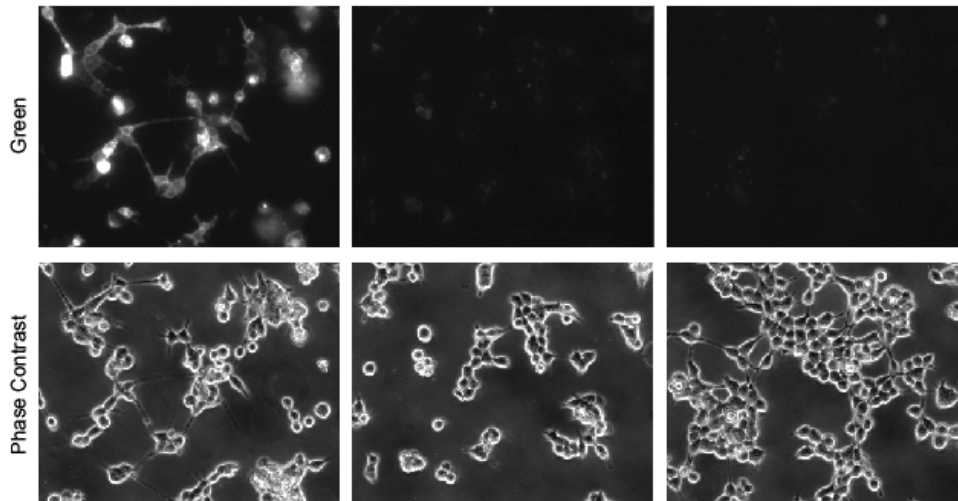
Sec5: mKG_N-Sec5, mKG_C-Sec5

<組み合わせ>

① mKG_C-RalB / mKG_N-Sec5

② mKG_N-RalB / mKG_C-Sec5

① mKG_C-RalB / mKG_N-Sec5 ② mKG_N-RalB / mKG_C-Sec5 ③ HEK 293T細胞



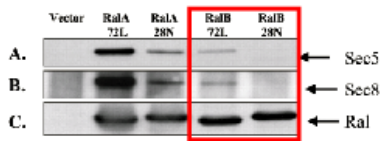
Green: mKGの蛍光像(上)。Phase Contrast:位相差像(下)。 lens: x20
蛍光像は、輝度の比較を行いやすいように全て同スケール(200-450)にて示している。

<結果>

① mKG_C-RalB / mKG_N-Sec5の組み合わせにおいて、mKG由来のシグナルが観察されました。一方、mKG断片を入れ替えた② mKG_N-RalB / mKG_C-Sec5においては①と比較しても非常に暗く、③のHEK 293T細胞の自家蛍光と同程度のシグナルしか得られませんでした。

次に、①mKG_C-RalB / mKG_N-Sec5の組み合わせで、RalのGTPase活性がRalB/Sec5の相互作用と相関するのか検討を行いました。

2: RalBのGTPase活性とRalB/Sec5の相互作用の相関



RalB抗体で免疫沈降し、Sec5抗体で染色。
Michail Shiptitsin and Larry A. Feig
Molecular and Cellular Biology, July 2004,
p5746-5756, Vol. 24, No. 13 (文献1)

RalBのGTPase活性と、RalB/Sec5の相互作用に相関が見られるか検討を行いました。

左上の論文では、RalBにactive formとして知られているQ72L、またinactive formとして知られているS28Nの変異を導入すると、標的因子であるSec5との相互作用がactive formでは強く、またinactive formでは弱くなることが示されています。

そこで、RalB WTにも同様の変異を導入しました。

<作製したplasmid>

mKGC-RalB (Q72L) - active form

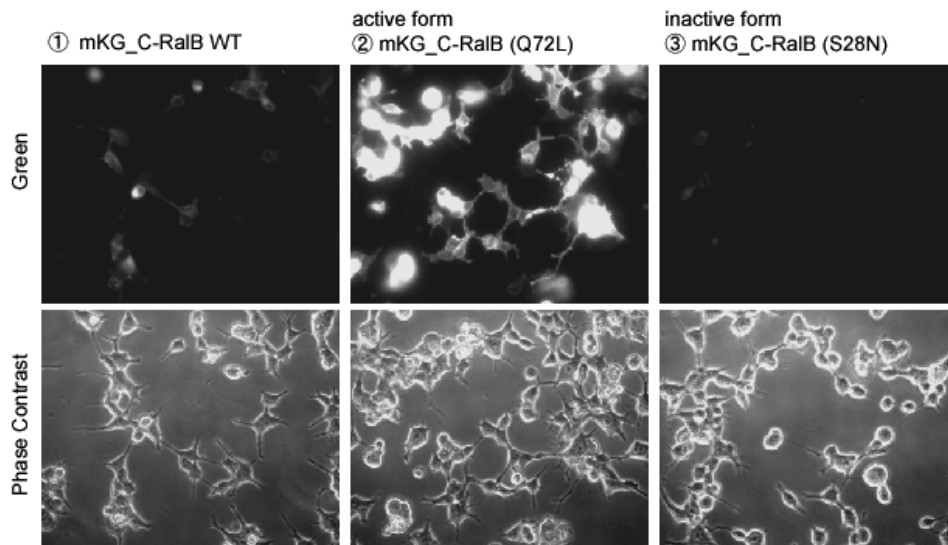
mKGC-RalB (S28N) - inactive form

<組み合わせ>

① mKG_C-RalB WT / mKG_N-Sec5

② mKG_C-RalB (Q72L) / mKG_N-Sec5

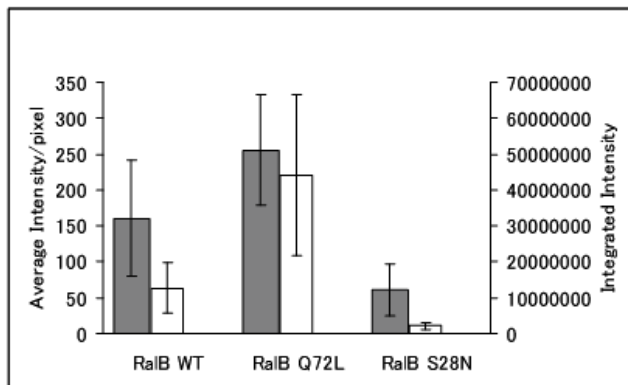
③ mKG_C-RalB (S28N) / mKG_N-Sec5



① mKG_C-RalB WT、② active form mKG_C-RalB (Q72L)、③ inactive form mKG_C-RalB (S28N)、各断片とmKG_N-Sec5 (1-99)を発現したHEK 293T細胞。

Green: mKGの蛍光像(上)。Phase Contrast:位相差像(下)。 lens: x20

蛍光像は、輝度の比較を行いやすいように全て同スケール (300-1000)にて示している。



光っている細胞の1pixelあたりの平均輝度(バックグラウンドを引いた値)(グレー)。画像一枚あたりの総蛍光輝度 (バックグラウンドを引いた値)(白)。N=14。

<結果>

②のactiveformでは①のWTより高い蛍光シグナルが、また③のinactiveformでは①のWTより低い蛍光シグナルが得られ、これは文献の免疫沈降の結果(文献1)と相関が得られました。

また、得られた蛍光シグナルは細胞膜に局在しており、本来報告されている局在と一致しました。

今回の実験により、

Fluo-Chase Kitを用いて得られるRalB/Sec5の蛋白質間相互作用のシグナルについて、

①免疫沈降で得られた蛋白質間相互作用のシグナル、つまりRalBのGTPase活性とSec5との相互作用のシグナルと相関する。

②細胞内局在を反映する。

以上のことが確認されました。