

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05075

研究課題名（和文）化学プローブで「みる」タンパク質膜動態の糖鎖制御

研究課題名（英文）Chemical probes visualize glycan-regulated trafficking of membrane proteins

研究代表者

堀 雄一郎 (Hori, Yuichiro)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：00444563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,800,000円

研究成果の概要（和文）：糖鎖による膜タンパク質の動態制御は、細胞の生理機能において重要な役割を果たしており、その異常は疾病の原因となる。我々は、これまでの研究で、糖鎖がGLUT4の膜動態を制御することを明らかにしてきたが、その機構については不明な点が多い。本研究では、その制御機構を解明することを目的として、GLUT4を細胞膜上で特異的にビオチン化するプローブを開発し、GLUT4と相互作用するタンパク質を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLUT4は、インスリン刺激に伴い細胞膜移行し、グルコースを取り込むことで血糖値を低下させる役割を担っている。その動態異常は、2型糖尿病の原因となることが知られている。本研究では、GLUT4の動態制御機構の解明に資する研究ツールを開発することで、糖鎖が制御するGLUT4の動態と糖尿病に関する研究を促進する。また、本研究で開発する技術は、より一般的に生体分子間相互作用を明らかにするものであり、広範囲に生命科学研究の発展に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Regulation of membrane protein dynamics by glycans plays an important role in cellular physiology, and its abnormalities can cause diseases. Our previous studies have revealed that glycans regulate the membrane dynamics of GLUT4, but the mechanism of this regulation remains unclear. In this study, we developed a probe that specifically biotinylates GLUT4 on the plasma membrane to detect proteins that interact with GLUT4 with the aim of elucidating the regulatory mechanism.

研究分野：ケミカルバイオロジー・蛍光イメージング

キーワード：糖鎖 タンパク質動態制御 近位依存性標識 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

多くの膜タンパク質は、細胞内外からのシグナルに応答し、局在を大きく変化させる。ある時は細胞膜に存在していても、細胞外からの生体シグナルに応答し、細胞内に内在化しオルガネラ膜に移行することや分解されることがある。更には、膜タンパク質はエクソソームと呼ばれる小胞の膜に組み込まれ細胞外に分泌され、他の遠く離れた細胞に取り込まれることもある。このダイナミックな「膜動態」が膜タンパク質の機能の制御に重要であり、その異常は、癌や生活習慣病などの様々な疾患発症の原因となるため、「膜動態」の制御機構を明らかにすることは、生命科学・医学の重要な課題と言える。

近年、その制御機構に糖鎖が関わるということが明らかにされつつある。例えば、糖鎖の有無によって、膜タンパク質の安定性や細胞内への移行速度が変化することが報告されている。一方、解析の困難さから、糖鎖による制御機構には不明な点が多く、その解明が期待されている。

我々は、申請者は、オリジナルの手法として、タグタンパク質である PYP (Photoactive yellow protein) とその特異的蛍光プローブを利用したタンパク質ラベル化法を開発してきた¹。PYP タグは、紅色硫黄細菌由来の小タンパク質であり、標的タンパク質と融合させて用いる。その融合させた PYP タグを共有結合により蛍光プローブでラベル化することで、標的タンパク質を可視化する。本手法の利点は、タグのサイズ (14 kDa) が小さく、迅速・高効率・高コントラストなラベル化・可視化が可能である点である。これまでに、この技術を応用して、グルコース輸送体の 1 種である GLUT4 の動態を可視化してきた²。GLUT4 は、通常は細胞内の貯蔵小胞に存在するものが多いが、インスリン刺激に応答して細胞膜に移行し、グルコースを細胞内に取り込み血糖値を下げる。一方、その細胞膜への移行が何らかの理由で障害されると、血糖値異常が起こり、2 型糖尿病の原因となる。我々は、GLUT4 の動態を可視化することで、インスリン刺激時に糖鎖が GLUT4 を細胞膜に引き留める役割を果たすことを示してきた。さらには、糖鎖が欠損すると一部の GLUT4 は、比較的早期にリソソームに移行することも示してきた³。しかしながら、糖鎖が GLUT4 の動態をどのように制御しているかは、不明な点が残されており、その解明が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質が糖鎖と相互作用し、GLUT4 の動態を制御していると仮説を立てて、クロスリンカーまたは近位依存性標識法を用いて、相互作用するタンパク質を検出する技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PCAF-biotin の開発

GLUT4 相互作用タンパク質を検出するうえで、PYP をビオチン化するラベル化プローブを設計した。PYP に結合するリガンド部位として、我々が以前に開発したラベル化性能が高いリガンドである PCAF を採用した²。PCAF にフレキシブルな PEG リンカーを介してビオチンを連結した。また、リンカーの間には溶液中で負電荷となるスルホン酸を導入し、膜非透過性とする事で細胞膜上の GLUT4 と選択的にラベル化できるようにした。

(2) PCAF-Biotin を利用した GLUT4 の生細胞イメージング

PYP-GLUT4 を発現している細胞に対して PCAF-Biotin を用いて生細胞イメージングを行った。インスリンで PYP-GLUT4 を細胞膜上に移行させ、プローブ及びストレプトアビジンと蛍光色素の複合体を添加した。

(3) PCAF-Biotin による GLUT4 相互作用タンパク質の検出

PYP-GLUT4(NQN)安定発現細胞にインスリンを添加後、PCAF-Biotin とクロスリンカーを添加し、細胞破碎を行い、ストレプトアビジンビーズでプルダウンし、ウエスタンブロットを行った。また、近位依存性標識を行うために、PYP-GLUT4(NQN)安定発現細胞に PCAF-Biotin を加え、ストレプトアビジン結合 HRP と結合させた後、ビオチニルチラミドと過酸化水素を加え近傍タンパク質のチロシン残基をビオチン化し、細胞破碎を行いプルダウンし相互作用タンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) PCAF-Biotin によるラベル化

PCAF-Biotin と PYP タグを反応させ、SDS-PAGE を行いストレプトアビジン-HRP によりプロットを行ったところ、PCAF-Biotin により PYP タグがラベル化されることが分かった。また、ラベル化反応の経時変化を調べるために、既存の PYP タグプローブとの競合実験を行い、SDS-PAGE で解析した。また、PYP タグの野生型 PYP(WT)に加え、アニオン性プローブである

PCAF-Biotin との静電反発を抑制することを考え、PYP(WT)の酸性アミノ酸を中性アミノ酸に変異させた変異体 PYP(NQN)についても、ラベル化実験を行った。その結果、PYP(WT)はラベル化反応に 45 min 程度要したが、PYP(NQN)は 20 min 程度でラベル化が完了した。

次に、PYP(WT)-EGFR の HEK293T 一過性発現細胞に PCAF-Biotin を添加し、ストレプトアビジン-AF647 を添加したところ、細胞膜上で蛍光が観測された (図 1)。また、PYP(W T)-GLUT4 の HeLa 安定発現細胞を用いて、インスリンを添加しイメージング実験を行ったところ、細胞膜上から蛍光が観測された。また PCAF-Biotin でラベル化したこれらの細胞を破碎し、ストレプトアビジンビーズでプルダウンし、ウエスタンブロットを行ったところ、PYP タグを融合させた上記のタンパク質が検出された。以上の結果から、生細胞上に発現させた PYP タグ融合膜タンパク質を PCAF-biotin でラベル化でき、それらを生細胞で可視化できるだけでなくプルダウンで検出できることが分かった。

GLUT4 は脂肪組織や筋肉細胞に発現しているため、レトロウイルスベクターを用いて、ラット由来筋芽細胞 L6 に GLUT4(NQN)を安定発現させ、分化誘導して PCAF-Biotin を用いて上記と同様のラベル化・イメージング実験を行った。その結果、インスリン添加時に、細胞膜上から蛍光が観測されたことから、L6 安定発現・分化細胞においても PCAF-Biotin により GLUT4 をラベル化できることが分かった。

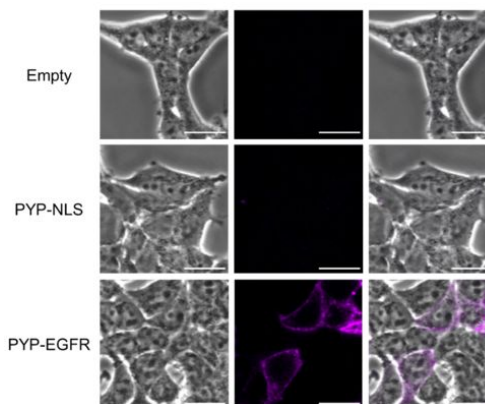


図 1. PCAF-Biotin とストレプトアビジン-AF647 を用いた PYP-EGFR のイメージング。PYP-NLS は核移行シグナル NLS をもち、PYP を核に発現させる。この手法では、細胞内の PYP はラベル化せず、細胞表面選択的に可視化できる。

(2) クロスリンカーによる GLUT4 相互作用タンパク質の検出

PCAF-Biotin でラベル化し、クロスリンカー処理した細胞を破碎し、プルダウンし解析したところ、GLUT4 と相互作用することの分かっている IRAP と LRP1 のバンドが検出された。このことから、クロスリンカーを用いて GLUT4 相互作用タンパク質を検出することができることが分かった。一方で、バンド検出時に露光時間を長くする必要があり、検出感度は低いことが分かった。また、クロスリンカー処理後に細胞破碎し、SDS-PAGE を行い、ゲルを銀染色したところ、PCAF-Biotin の添加後に変化のあるバンドは検出されなかった。このため、特異的な相互作用を検出するには、この手法では不十分であることが示唆された。

(3) 近位依存性標識による GLUT4 相互作用タンパク質の検出

GLUT4(NQN)の L6 安定発現細胞に対して、PCAF-Biotin を加え、GLUT4 をラベル化し近位依存性標識を行った。その結果、ストレプトアビジン磁性ビーズにプルダウンしたところ、PCAF-Biotin を添加したときは添加しないときに比べ、IRAP と LRP1 両方ともに、より強い強度のバンドが観測された (図 2)。また、プルダウンされた試料に対して SDS-PAGE を行い、得られたゲルを銀染色した。その結果、PCAF-Biotin 非添加時には検出されなかったバンドが、添加時に確認された (図 3)。以上の結果から、クロスリンカー処理に比べ、近位依存性標識の場合は、タンパク質複合体の構造やトポロジー、反応基の位置や距離に大きく依存せず、より包括的に相互作用タンパク質を検出できたと考えられる。

このように、PCAF-Biotin によるラベル化と近位依存性標識の両方を用いること

により、GLUT4 相互作用タンパク質を検出することができた。今後、糖鎖欠損体を発現させて同様の実験を行い得られた結果を比較するとともに、プロテオミクス解析を行うことで、GLUT4 の糖鎖と相互作用するタンパク質が明らかになると期待できる。

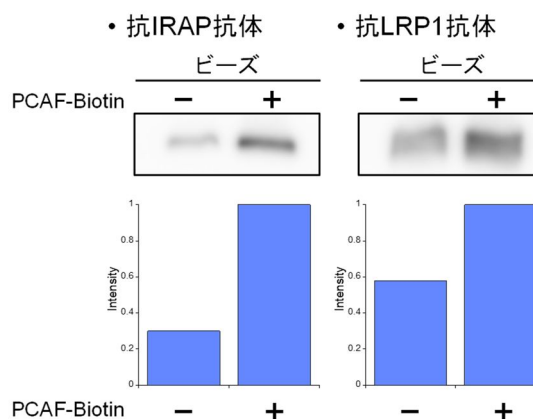


図 2. PCAF-Biotin とストレプトアビジン-HRP を用いた近位依存性標識。

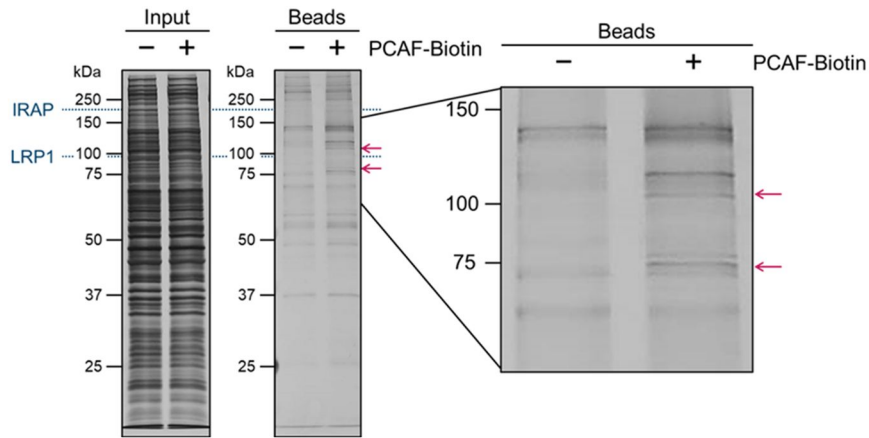


図 3. 近位依存性標識されたタンパク質の銀染色による解析。

< 引用文献 >

1. Kumar N, Hori Y, Kikuchi K. Photoactive yellow protein and its chemical probes: an approach to protein labelling in living cells. *J Biochem.* 2019 Aug 1;166(2):121-127. doi: 10.1093/jb/mvz051.
2. Hirayama S, Hori Y, Benedek Z, Suzuki T, Kikuchi K. Fluorogenic probes reveal a role of GLUT4 N-glycosylation in intracellular trafficking. *Nat Chem Biol.* 2016 Oct;12(10):853-9. doi: 10.1038/nchembio.2156.
3. Nishiura M, Hori Y, Umeno M, Kikuchi K. Visualization of multiple localizations of GLUT4 by fluorescent probes of PYP-tag with designed unnatural warhead. *Chem Sci.* 2023 May 15;14(22):5925-5935. doi: 10.1039/d3sc00724c.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Reja Shahi Imam, Hori Yuichiro, Kamikawa Takuya, Yamasaki Kohei, Nishiura Miyako, Bull Steven D., Kikuchi Kazuya	4. 巻 13
2. 論文標題 An "OFF-ON-OFF" fluorescence protein-labeling probe for real-time visualization of the degradation of short-lived proteins in cellular systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1419 ~ 1427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1sc06274c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Torii Kenji, Benson Sam, Hori Yuichiro, Vendrell Marc, Kikuchi Kazuya	4. 巻 15
2. 論文標題 No-wash fluorogenic labeling of proteins for reversible photoswitching in live cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1393 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3sc04953a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishiura Miyako, Hori Yuichiro, Umeno Maho, Kikuchi Kazuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Visualization of multiple localizations of GLUT4 by fluorescent probes of PYP-tag with designed unnatural warhead	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 5925 ~ 5935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3sc00724c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Torii Kenji, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 95
2. 論文標題 Persistent Fluorescence Switching of a Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 8834 ~ 8841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c00163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanikawa Takuya, Hashimoto Akari, Yamazaki Nozomi, Adachi Junya, Matsushima Ayami, Kikuchi Kazuya, Hori Yuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Bioisostere-conjugated fluorescent probes for live-cell protein imaging without non-specific organelle accumulation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3SC06957E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Fluorescence Imaging of Endogenous Biomolecules Using Fluorogen/Protein Hybrid Probes
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichiro Hori, Miyako Nishiura, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Fluorescent Labeling Probes that Selectively Recognize Intracellular/Cell-Surface Proteins
3. 学会等名 AIMECS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 雄一郎
2. 発表標題 ラベル化ケミストリーによる膜タンパク質の多重局在の可視化
3. 学会等名 蛋白質科学会第23回年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀 雄一郎
2. 発表標題 タンパク質の多重局在を可視化するタンパク質ラベル化技術
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西浦 美也子 (Nishiura Miyako)		
研究協力者	レジャ シャヒ (Reja Shahi)		
研究協力者	上川 拓也 (Kamikawa Takuya)		
研究協力者	鳥井 健司 (Torii Kenji)		
研究協力者	寺下 功一郎 (Terashita Koichiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Bath University			
英国	The University of Edinburgh			