

平成 30 年 9 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04636

研究課題名(和文)新規蛍光ラベル法の開発と生細胞における膜タンパク質ヘテロオリゴマー検出技術の確立

研究課題名(英文) Development of a novel fluorescent labeling method for detecting heterooligomers of membrane proteins on living cells

研究代表者

松崎 勝巳 (Katsumi, Matsuzaki)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00201773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞でのGPCRヘテロオリゴマーを検出するために、研究代表者らが独自に開発したコイルドコイルラベル法と併用可能な新規標識法の開発を行った。1) ヘアピン型、2) RNAアプタマー型のラベル原理を検討したが、いずれもタグ付加によって受容体の細胞表面への発現が妨げられることが明らかになった。また、3) コラーゲン型のヘテロダイマープローブペプチドおよびタグ付加受容体遺伝子を調製した。今後融合タンパク質の生細胞膜への発現確認と、プローブによる標識を行う。

研究成果の概要(英文)：New live-cell labeling methods were examined to detect GPCR hetero-oligomers in combination with the conventional coiled-coil labeling method. 1) -hairpin and 2) RNA aptamer labeling principles were not successful because of the insufficient expression of tagged receptors on the cell surface. 3) Collagen heterodimer probe peptides and collagen-tagged GPCR were also prepared to examine the expression of the tagged receptors and selective labeling.

研究分野：生物物理化学

キーワード：蛍光イメージング 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

GPCR はあらゆる組織において細胞内外の情報伝達の大部分を担っており、重要な創薬標的であるため、GPCR 研究の進展は常に脚光を浴びてきた。Kobilka らが中心となって GPCR の典型受容体とも言える $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) の X 線結晶構造を解き [Nature (2007) 450, 383]、2012 年にノーベル化学賞を受賞した事は記憶に新しい。近年では、GPCR の結晶化技術は飛躍的に進展し、構造登録数は年々増加の一途を辿っている。しかしながら、生体膜中における GPCR の機能は実に複雑であり、1 分子の受容体が単体で働いている場合もあれば [Anal. Chem. (2013) 85, 3454]、他の受容体と多量体を形成しながら協同的に働くこともあるため、多量体形成が GPCR 機能の全容解明を困難にしている。多量体形成は大きく分類すると、同種と形成するホモオリゴマー [Drug Discov. Today (2008) 13, 1059] と、他種と形成するヘテロオリゴマー [Br. J. Pharmacol. (2009) 158, 5] に分かれる。後者は妊娠高血圧腎症や肝臓繊維化などの疾病にも関与している。

これまで会合状態の検出で主流だった共免疫沈降法等の破壊的手法に代わり、蛍光 (GFP: ~27 kDa) もしくは発光タンパク質を融合して共鳴エネルギー移動シグナルを検出する非破壊的手法が汎用されるようになったが、 $\beta 2AR$ の会合状態の論争で見られるように [Nat. Methods, (2007) 4, 3; Nat. Methods, (2007) 4, 599]、既存技術では複雑な生細胞膜環境中における膜タンパク質のホモオリゴマー形成ですらを正確に測定することが容易ではなかった。この原因は、細胞膜だけでなく細胞内のシグナルも検出していたことや、正確な会合測定に必須なドナー/アクセプター融合体タンパク質の発現比制御が困難であったことに加えて、適切なスタンダードが測定されていないことなど定量性に欠けていたからである。

この現状を打開すべく、研究代表者らは独自に開発したコイルドコイルラベル法 [ACS Chem. Biol. (2008) 3, 341; 特許 5182671] とスペクトルイメージング法を組み合わせ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) シグナルを指標に、生体膜中での膜タンパク質のホモオリゴマーを定量的に解析できる技術を開発した [Anal. Chem. (2013) 85, 3454]。コイルドコイルラベル法は、 α ヘリックス性ペプチド E3 タグ (EIAALEK)₃ と K4 プローブ (KIAALKE)₄ 間で起こる強固で特異的な相互作用

に基づいた手法である。目的膜タンパク質の N 末端に E3 タグを遺伝子導入し、生細胞に発現させた後、蛍光標識した K4 プローブを投与することで、細胞膜表面上に発現する目的タンパク質のみをわずか 1 分で標識することが可能である。加えて、タグ-プローブの合計分子量が 5-6 kDa と小さく、ドナー/アクセプターのラベル比率を正確に制御できるなど、優れた利点を数多く有している。会合状態の研究では、Förster 距離が 82 Å ある FRET ペア (Alexa Fluor 568-Alexa Fluor 647) で作製した Alexa568-K4 (ドナー) と Alexa647-K4 (アクセプター) で目的膜タンパク質を共染色した。四量体、二量体、単量体の 3 つのスタンダード膜タンパク質を用いて解析手法の定量性を証明した上で、標的膜タンパク質の会合状態を調べているため、得られたデータの信頼性は高いと言える [Anal. Chem. (2013) 85, 3454]。

2. 研究の目的

上記のホモオリゴマー検出技術に加えて、ヘテロオリゴマー検出技術の確立を目指す。ヘテロオリゴマー検出には、2 種類の受容体を別々に染め分けなければならないため、コイルドコイルラベル法と併用可能な、新たな作用機序をもつ染色方法の開発が必要となってくる。既に報告されている共有結合型ラベル法 (例: ACP ラベリング [J. Am. Chem. Soc. (2014) 126, 8896]) と組み合わせる選択肢もあるが、共有結合型はラベル時間が長いため (≥ 20 min)、ラベルされたタンパク質が内在化して膜表面上のラベル化効率が一定しない恐れが高い。研究代表者らは、独自にラベル時間の短い (~1 min) 非共有結合型の新規蛍光ラベル法の開発に取りかかる。ヘテロオリゴマーを形成している受容体ペアが見つければ、会合状態と機能の関連性を調べる。

①新規蛍光ラベル法の開発

コイルドコイルラベル法と干渉作用のない新規タグ-プローブラベル法を開発するためには、 α ヘリックス構造以外の二次構造を採用した方が良いと考えている。そこで、低分子で自発的に構造形成をすると報告されている β ヘアピン構造 [Nature (1997) 390, 196; PNAS (2001) 98, 5578] の採択を主に考える (ヘアピン-ヘアピンラベル法)。

②ヘテロオリゴマー検出技術の確立

2種類のラベル法でヘテロオリゴマー形成の候補となるタンパク質を染め分け、2種類のタンパク質間で FRET が起こることを最初に確認する。次に、会合体中におけるそれぞれの膜タンパク質のプロトマー数を定量的に解析する。

③会合状態と機能の関連性

ヘテロオリゴマーを形成する条件下で、cAMP や Ca^{2+} 応答などの機能アッセイを行い、単量体で存在する時の機能との違いを調べ、ヘテロオリゴマー形成が機能に与える影響と生理的意義を追求する。現状の既存手法では、生体膜中での会合状態を厳密に計測する技術が確立されていなかった。研究代表者らは、既に膜タンパク質のホモオリゴマーの定量的解析技術を確立することに成功している。本研究では、新規タグ-プローブ蛍光ラベル法を開発し、コイルドコイルラベル法と組み合わせることによって、ヘテロオリゴマーの高精度な検出技術の確立を目指している。本研究によって、GPCR ヘテロオリゴマーが関与する妊娠高血圧腎症や肝臓繊維化などの疾病メカニズム解明への大きな技術革新の一步になると考えている。

3. 研究の方法

①新規蛍光ラベル法（ヘアピン-ヘアピンラベル法）の開発

(1)新規タグ-プローブ間での特異的な相互作用

低分子でも自発的に構造形成をすると報告されている β ヘアピン構造に着目した。天然に存在する β ヘアピン構造のフォールディング能力は高くないが (~40%) [PNAS (2001) 98, 5578]、type I' β ターン配列 Glu-Asn-Gly-Lys と、 π - π スタッキング効果の強い Trp の導入によりフォールディング効率が著しく上昇した ($\geq 90\%$) と報告されている [Nature (1997) 390, 196; PNAS (2001) 98, 5578; Proteins (2012) 80, 44]。しかしながら、 β ヘアピン同士の相互作用を報告した例は殆ど無く、我々は独自で β ヘアピン構造をベースにした Dn と On ペプチドを考案した。デザイン上の工夫点および特徴を以下

にまとめた。

1) β ターン形成効率が良く (91%) 長さの短い Glu-Asn-Gly-Lys 配列を優先的に導入するが、必要に応じてより形成効率の高い Asp-Asp-Ala-Thr-Lys-Thr 配列 (95%) も試してみる。

2) Trp の π - π スタッキング効果によって構造はより安定化するが、過度な Trp 導入はペプチドの自己凝集に繋がるため、Trp 残基数を全体の 30%以下に抑える必要がある。最大 200 μM までは溶液中で単量体として存在し得る (*1), 2) : [PNAS (2001) 98, 5578] を参照)。

3) Trp と同一背面に位置する Ser はペプチドの水溶性向上を目的に導入しているが、必要に応じて他の親水性アミノ酸も用いる。

4) 反対面には、疎水性および静電的相互作用を示すアミノ酸残基を集約させている。

6) 相互作用面は、側鎖の長さを極力同等にするため、Leu, Ile, Asp, Orn を選択する。

7) 繰り返し配列部分を調整し、50 nM で Dn と On ペア形成率 90%以上の結合力を目指す。

8) 合計分子量は、7-8 kDa 以下 (D2 と O3 の場合) を目指す。

(2)既存のコイルドコイルラベル法との干渉作用

コイルドコイルラベル法は、静電的相互作用を示す Glu-Lys 残基と、疎水性相互作用を示す Leu-Ile 残基が、knob-into-hole 様式で交互に入り組むことで [J. Struct. Biol. (2003) 144; 349]、強固な結合力を生み出している。ヘアピン-ヘアピンラベル法も、残基が異なるものの、同様の相互作用力を利用している。ここで注目すべき点は、前者のラベル法は縦のラインで親水性-疎水性-疎水性-親水性の配列になっているのに対して、後者のラベル法は横のラインで親水性-疎水性の交互配列を形成している事である。前者と後者と噛み合わせが一致しないため、ヘアピン-ヘアピンラベル法の相互作用面互いに干渉作用は生じないと予想される。

(3)ペプチドの物性評価

蛍光標識体 Alexa568-Dn と Alexa647-Dn、そして Alexa568-On と Alexa647-On を作製する (下記実験 3-5 用)。

1) β シート形成の確認: 文献 ([PNAS (2001) 98, 5578]) を参考に、フーリエ変換赤外分

光光度計でアミド I バンドの解析を行う。フォールディング効率の確認は、円二色性スペクトルを用いる。

ジスルフィド結合で環状構造をとる Cys-Dn-Cys と Cys-On-Cys ペプチドのモル積円率を 100%としたときの、Dn と On ペプチドのフォールディング効率を見積もる。

2) コイルドコイルラベル法との干渉作用：E3 付加タンパク質発現細胞に、蛍光標識した Dn もしくは On ペプチドを添加し、共焦点顕微鏡で細胞膜の染色具合を観察する。

3) Dn-On 間での特異的な相互作用：Alexa568-Dn と Alexa647-On ペアもしくは Alexa568-On と Alexa647-Dn ペアを用いて、分光蛍光光度計でバルクの assemble FRET を測定する。また Dn タグを N 末端に遺伝子導入したタンパク質を生細胞に発現させ、蛍光標識した On ペプチドで生細胞膜上の標的膜タンパク質を染色できるかどうかを共焦点顕微鏡で観察する。

4) ラベル化効率 (Dn タグに対する On ペプチドの占有率)：プローブ濃度に対して細胞膜上の蛍光強度をプロットした飽和曲線から解離定数 Kd 値を求め、50 nM でのラベル化効率を算出する。

②ヘテロオリゴマー検出技術の確立

<理論> 定量的にヘテロオリゴマー解析を行うためには、2 種類の膜タンパク質間で FRET が起こることを確認した後、ヘテロオリゴマーを構成している各タンパク質のプロトマー数を順次求める必要がある。ただし、会合率は 2 種類の膜タンパク質の発現比率に依存するため、それぞれの発現量に注意する必要がある。いま、2 種類の膜タンパク質 X と Y があり、それぞれにタグを付加した E3-X と Dn-Y を作製し、生細胞に一過性で共発現させたとする。ここでは、例としてヘテロダイマー (XY) とヘテロトリマー (XXY) の見分け方を紹介する。

(1) タンパク質 X-Y 間の定性的な FRET 測定。まず、ドナー (Alexa568-K4) とアクセプター (Alexa647-On) の混合溶液を添加して、E3-X と Dn-Y を染め分ける。X-Y 間の FRET を定性的に測定し、ヘテロオリゴマーを形成していることを最初に確認する。

(2) ヘテロオリゴマー中の E3-X プロトマー数の定量的解析。次に第 3 の色素 Alexa488-On で Dn-Y を染色して蛍光強度から発現量を見積もった後、全ての X が会合体を形成する条

件 ($Y > X$) を満たす細胞を測定対象にする。FRET ペア Alexa568-K4 と Alexa647-K4 を同時に添加して、X-X 間の FRET シグナルを測定する。ヘテロダイマーの場合、E3-X のプロトマー数は 1 なので、どの X_0 値に対しても E_{app} の値は 0 のままである。ヘテロトリマーの場合、プロトマー数は 2 なので、 X_0 値が 1 に近づくと E_{app} の依存曲線は直線的に 0.9 に収束する。

(3) ヘテロオリゴマー中の Dn-Y プロトマー数の定量的解析。(2) と同様の手順で、 $X > Y$ の条件で Y-Y 間の FRET シグナルを測定する。ヘテロダイマー、ヘテロトリマーに拘らず、Dn-Y のプロトマー数は 1 なので、どの X_0 値に対しても E_{app} の値は 0 のままである。

(4) 会合体形成に対するラベル法の影響確認。タグを交換しても再現性がある事を証明する。

<研究対象> Hall らによると、 α_{1D} と α_{2C} アドレナリン受容体 ($\alpha_{1D}AR$, $\alpha_{2C}AR$) は、 β_2AR と共発現した時に膜表面での発現量が上がり、 β_2AR のリガンドで刺激すると αAR が内在化する現象が観察されたと言う [J. Pharmacol. Exp. Ther. (2005) 313, 16; (2006) 318, 974]。また、プロスタグランジン EP1 受容体と β_2AR のヘテロオリゴマー形成も報告されている [J. Clin. Invest. (2006) 116, 1400]。疾病関連では、妊娠高血圧腎症患者で見られるアンギオテンシン II タイプ I 受容体とブラジキニン 2 受容体 ($AT1R$, $B2R$) のヘテロダイマー形成 [Nat. Med. (2001) 7, 1003] や、肝臓繊維化に関与する $AT1R$ とカンナビノイド 1 受容体のヘテロダイマー形成 [EMBO J. (2011) 30, 2350] が挙げられる。これらの事例はいずれもその可能性が疑われるものの、生理的条件下での検証に欠けているため、十分研究の余地がある。まず、タグ付加が各 GPCR の機能に影響しないことを確認したのち、リガンド刺激の有無や温度など様々な条件でヘテロオリゴマー形成の意義を調べる。

③会合状態と機能の関連性

機能の確認には、 Ca^{2+} 応答に蛍光色素 Fluo4-AM (Invitrogen)、cAMP 応答に Alphascreen assay kit (Perkin Elmer) をそれぞれ用いて測定する。受容体が単独で存在する時と比べて、ヘテロオリゴマーを形成したときに機能にどのような影響があるのかを調べる。

4. 研究成果

(1) 低分子で自発的に構造形成をする β ヘアピン型プローブペプチドの合成

β ヘアピン型プローブペプチド（配列：GRWDKTKDKTWTWEDPGKWTWDKTKDKTWEGGG）の合成および蛍光標識に成功した。プローブペプチドをデザインする上で工夫した点を以下にまとめた。まず、ヘアピン型ペプチドは表裏二面性の構造を有する特徴があるため、隣接するアミノ酸残基の側鎖が真逆の方向に交互に突き出している。ターン配列EDPGKを中心にヘアピンカーブを形成し、Trp クラスタがジッパーとして β ヘアピン構造を安定化させている。このデザインの重要なポイントとして、Trp クラスタを Lys 残基と同じ面に配置した点である。Lys 残基は静電的相互作用を見込める残基ではあるが、溶液中では疎水性相互作用の方がより強力な駆動力となる。一般的に、疎水性の高い残基は非特異的吸着の原因に成り得ることが多いが、Trp 残基を相互作用面に配置することで、遊離時には Lys 残基が吸着を抑制し、タグ結合後は相互作用面で内側に隠れるため、上記の問題を解消することが出来ると考えた。従って、Trp クラスタは単なるヘアピンの留め金として利用しているだけでなく、相互作用の駆動力への加担および非特異的吸着の低減としての効果も見込んだ。

(2) ペプチドの物性評価

β ヘアピン型プローブペプチドの二次構造を円二色性スペクトル解析で確かめたところ、緩衝溶液中で典型的な β ヘアピン構造を取ることが分かった。また、E3 タグを付加した膜タンパク質に対して、100 nM で β ヘアピン型プローブペプチドを加えても細胞膜表面が染色されなかったことから、当研究室で開発したコイルドコイルラベル法に対する干渉性および膜への非特異的な吸着性が無いことを確認することが出来た。

(3) β ヘアピン型タグ-プローブペプチド間の親和性評価

これまでに Fmoc 固相合成した Alexa568 蛍光標識 β ヘアピン型プローブペプチド（GRWDKTKDKTWTWEDPGKWTWDKTKDKTWEGGG）に結合すると考えられるタグ（GRWTDTDTDTWENGKWTWTDTDTWEGGG）を

用いて細胞環境でのラベルを試みた。N 末端にシグナル配列とタグ配列を付加し、C 末端に蛍光タンパク質 EYFP を融合した β 2AR 遺伝子融合体を、CHO-K1 細胞に発現させた所、EYFP 蛍光が見られたが、細胞膜への局在が弱く、プローブを添加しても染色が見られなかった。タグが細胞表面へ露出していないか、またはタグ-プローブの結合力が十分でない可能性が考えられた。そこで細胞を固定、膜透過処理後した後プローブを添加したが、この場合も染色されなかったため、結合力が十分でないと考えられる。

(4) RNA アプタマー型ラベル法

β ヘアピン型タグ-プローブとは異なるラベル法として、HIV 由来のヘアピン構造を取る Rev-response element (RRE) RNA と、RRE に結合するアルギニンリッチペプチド間の相互作用に基づく、RNA アプタマー型ラベル法を検討した。RNA プローブ（UCUGGGCGCAGCGCAAGCUGACGGUACAGG）および QR タグ（ERRERRERQRNRK）を用いた。N 末端にシグナル配列と QR タグを、C 末端に EYFP を導入した β 2AR 遺伝子融合体を作成し CHO-K1 細胞に発現させた所、EYFP 蛍光が確認されたが、Alexa568 標識 RNA プローブを添加しても細胞への結合が見られなかった。細胞を固定、膜透過処理後した後プローブを添加すると細胞内染色が見られたことから、タグ-プローブの結合力は強いが細胞表面へのタグの露出が起こっていなかったと考えられる。

タグ付加によって標的タンパク質の細胞内局在が大きく変化する事、また RNA アプタマー型ラベル法に関してはプローブを細胞内導入すれば細胞質タンパク質の標識法として有用な可能性がある事が判明したが、生細胞膜タンパク質ヘテロ会合体検出に有用なラベル法をさらに検討する必要がある。

(5) コラーゲン型ラベル法

コイルドコイルラベル法と交差性がなく、かつ強い affinity で相互作用が期待されるペアとして、コラーゲンヘテロ三量体型タグ-プローブラベル法の開発を行った。タグが負電荷、プローブが正電荷を持つように、グルタミン酸とリシンをそれぞれ導入したプロリンリッチなモデルペプチドの配

列を利用した。また、コラーゲン型ペプチドは3量体で安定な構造を形成するため、1配列をタグとし、残り2配列をクロスリンクした2量体プローブペプチドをデザインした。タグ配列としては(EPG)₁₀を用い、 β_2 アドレナリン受容体(β_2 AR)のN末端に配列を付加した融合遺伝子を作製した。プローブは、(A鎖)(POG)₅-Hyc-OG-(POG)₄-NH₂ (O: (2S, 4R)-4-hydroxyproline; Hyc: homocystein) と (B鎖) (PKG)₄-P-Cys-G-(PKG)₄-NH₂ のHycとCysをジスルフィド架橋したヘテロ二量体を用いた。ジチオジピリジンを用いてA鎖を活性化し、ここにB鎖を加えることでヘテロ二量体を合成した。HPLC精製時にカラム温度を上げる事で回収率が増加することがわかり、染色検討に必要な蛍光標識プローブを精製した。

独自のタグプローブラベル法の開発について、コラーゲンラベル法の検討準備が整った段階にある。標識法が確立すれば、ヘテロ会合検出実験は比較的短期間で行うことができる。

今後、コラーゲンラベル法の検討を引き続き行うとともに、既存のコイルドコイルラベル法とは異なる配列のペアも検討する。モデル膜タンパク質として β_2 ARやグリコホリンAを用い融合タンパク質遺伝子を作製する。また蛍光標識したプローブペプチドをFmoc固相合成する。融合タンパク質の生細胞膜への発現確認と、プローブによる標識、見かけの解離定数Kd算出を行い、十分強い結合力(Kd < 10 nM)かつ既存のコイルドコイルラベル法との交差性がないペアを見出す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 勝巳 (KATSUMI MATSUZAKI)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00201773

(2) 研究分担者

河野 健一 (KENICHI KAWANO)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：70732874