

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13728

研究課題名（和文）細胞表層から細胞内への共鳴エネルギー移動を利用したレセプター間の相互作用解析

研究課題名（英文）Monitoring of association of cell membrane receptors based on the resonance energy transfer through cell membrane

研究代表者

末田 慎二（Sueda, Shinji）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：00325581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分析対象の細胞膜レセプターを細胞表層及び細胞内部でドナー及びアクセプターとなる蛍光色素でラベル化し、細胞膜を介した共鳴エネルギー移動を利用したレセプター間の相互作用解析系の構築を試みた。具体的には、分析対象のレセプターとしてブラジキニンB2レセプター（B2R）を選び、それを細胞表層においてテルビウム錯体でラベル化し、細胞内ではGFPを利用してラベル化した。ラベル化後、テルビウム錯体からGFPへのエネルギー移動に伴うシグナルをモニターしたところ、B2R間の会合を示唆するデータを得ることにできた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we attempted to construct a system for monitoring association of cell membrane receptors based on the resonance energy transfer through cell membrane by labeling the receptors with donor and acceptor dyes on the outer and inner surface of cell membrane, respectively. Specifically, bradykinin B2 receptor (B2R) was chosen as a model receptor and it was labeled with a terbium complex and GFP on the outer and inner surface of cell membrane, respectively. With this system, we obtained data suggesting the association of B2R by monitoring the signal based on energy transfer from the terbium complex to GFP.

研究分野：生物分析化学

キーワード：タンパク質間相互作用 細胞膜レセプター 共鳴エネルギー移動 テルビウム錯体 GFP

1. 研究開始当初の背景

細胞膜レセプターは、細胞膜に存在する膜タンパク質であり、外界からのシグナルを感じ、その情報を細胞内へ伝達するという生命活動において最も重要な役割の1つを担っている。近年、立体構造の解明も進み、細胞膜レセプターの機能や性質に関する多くの知見が得られつつある。そのうちの1つに、細胞膜中においてレセプター同士が会合体を形成するという現象が挙げられる。例えば G タンパク質共役型レセプター (GPCR) の1つであるブラジキニン B2 レセプター (B2R) は、そのアゴニストであるブラジキニンの添加に伴い、ホモダイマーを形成し、その情報を細胞内へ伝達することが報告されている。さらに B2R は機能的にはそれと拮抗する役割を担うアンジオテンシン II タイプ 1 レセプター (AT1R) とヘテロダイマーを形成することも知られている。このようなレセプター間のホモダイマーやヘテロダイマーの形成については、多くのレセプターについて同様の機能は推測されているが、それらの作用機序も含め、まだ十分に研究は進んでいない。

2. 研究の目的

細胞膜レセプター間での会合体形成の観察には、免疫沈降法を利用した手法が古くから活用されてきたが、近年では細胞表層における蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer: FRET) を利用した手法が提案され、それらを利用した解析例が増えつつある。この FRET を利用した手法では、細胞表層においてレセプターを、ドナー及びアクセプターとなる蛍光色素でラベル化し、レセプター間の会合に伴う FRET シグナルをモニターすることにより、会合挙動の観察を行う。しかし、この手法ではレセプターを蛍光ラベル化する際に蛍光タンパク質などの比較的高分子量のタンパク質が利用されるため、それらのラベル化剤同士の立体障害により、レセプター間の会合に影響が出る可能性がある。そこで、本研究では分析対象のレセプターを細胞表層及び細胞内部でドナー及びアクセプターとなる蛍光色素でラベル化し、ラベル化剤同士の立体障害が存在しない状態で共鳴エネルギー移動分析が可能な系を構築することを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では細胞膜レセプター間の高精度な相互作用解析を可能とする分析系を構築するために、細胞膜を介した共鳴エネルギー移動に着目した。細胞膜の厚さはその脂質二重層部分だけでも 5 nm 程度あるため、蛍光タンパク質を含め有機蛍光色素のみをドナー及びアクセプターとして利用する系ではエネルギー移動効率が低く、FRET 分析が困難である。そこで、本研究では蛍光性のラン

タノイド錯体から有機蛍光色素への共鳴エネルギー移動 (Lanthanide-based resonance energy transfer: LRET) を利用した。LRET ではランタノイド錯体の発光特性により、FRET よりも長距離のエネルギー移動分析が可能であることが知られている^①。また、ランタノイド錯体の発光はミリ秒オーダーの寿命を有しているため、時間分解測定によりバックグラウンド発光を除去した高感度な分析が可能である。本研究ではレセプターを細胞表層において Tb³⁺錯体でラベル化し、細胞内で GFP を利用してラベル化した (図 1)。Tb³⁺錯体及び GFP でラベル化したレセプターが会合した際に起こる LRET をモニターすることにより、レセプターの会合挙動を観察することを試みた。この系では先に述べたように、レセプターの会合に伴うラベル化剤同士の立体障害 (衝突) を回避することができるため、レセプター間の会合をより高精度に解析することができるものと考えた。

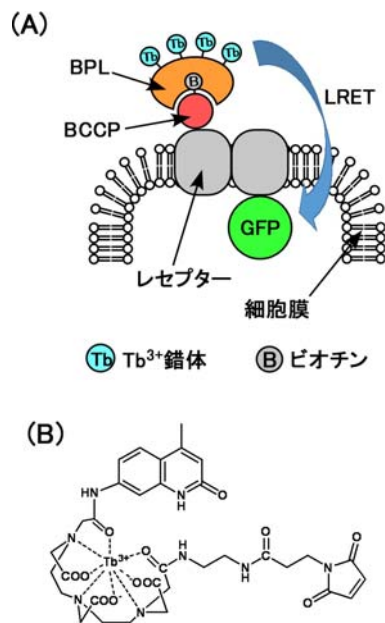


図 1 Tb³⁺錯体から GFP への共鳴エネルギー移動を利用した膜タンパク質の会合挙動の解析 (A) 模式図、(B) BPL の修飾に使用した Tb³⁺錯体の構造

このような系を構築する上で要となるのが、細胞表層でのテルビウム錯体によるレセプターラベル化である。ここで本研究では申請者が開発を行っている、古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来の特殊なビオチン化酵素反応系を利用して Tb³⁺錯体によるラベル化を行った (図 1)。*S. tokodaii* 由来の同酵素反応系では、酵素であるビオチンリガーゼ (BPL) が、その生成物であるビオチン化された基質タンパク質 (BCCP) と非常に安定な複合体を形成するということが明らかとなっている^②。この性質を利用して遺伝子

工学的に BCCP を連結した標的タンパク質に、蛍光色素で修飾した BPL を作用させることにより、部位特異的に標的タンパク質を蛍光ラベル化することが可能である。このラベル化法の特徴は、1 分子の標的タンパク質に複数の蛍光団を同時に導入できる点である。LRET を利用した分析の最大の欠点は、ランタノイド錯体の発光強度が汎用されている有機蛍光色素のそれと比較して弱い点である。しかし、*S. tokodaii* 由来のビオチン化系を利用してラベル化を行うことにより、最大 4 分子の蛍光団を 1 分子の標的タンパク質に導入することが可能であるため、この LRET の欠点を補うことができるものと考えた。

4. 研究成果

(1) 細胞表面での LRET を利用したレセプター間の相互作用解析

まず細胞表面での LRET を利用したレセプター間の相互作用解析を行った。具体的には、レセプターとして GPCR の一種であるブラジキニン B2 レセプター (B2R) を選び、B2R 間のホモ会合の形成をモニターした。ここでは B2R を細胞表面においてテルビウム錯体と GFP でラベル化するために、B2R の N 末端に BCCP を連結した融合タンパク質 (BCCP-B2R) と、GFP を連結した融合タンパク質 (GFP-B2R) の発現プラスミドを作成した。作成した発現プラスミドを利用して、両融合タンパク質を動物細胞上に発現させ、その後、テルビウム錯体で修飾した BPL (Tb-BPL) を作用させて、B2R をテルビウム錯体でラベル化した。ラベル化処理後、細胞からの発光をプレートリーダーで測定した。ここでは、GFP 及び Tb³⁺錯体からの発光をそれぞれ 520 nm と 486 nm でモニターし、それらの発光強度の比 (I_{520}/I_{486}) を LRET シグナルとして評価した。この際、時間分解測定 (delay time 0.1 ms, gate time 1.4 ms) により発光強度を測定した。また、コントロールとして GFP-B2R の代わりに、N 末端に FLAG タグを連結した B2R (FLAG-B2R) を利用して同様に解析を行った (図 2)。その結果、BCCP-B2R と GFP-B2R を共発現させた系の LRET シグナルは、コントロールの系よりも有意に大きく、エネルギー移動を利用して、レセプターの会合をモニターすることがわかった。

(2) 細胞膜を介した LRET の検証

Tb³⁺錯体から GFP への細胞膜を介したエネルギー移動が観察できるかどうか検証するために、B2R の N 末端と C 末端にそれぞれ BCCP と GFP を連結した融合タンパク質 (BCCP-B2R-GFP) を利用して解析を行った。まず BCCP-B2R-GFP の動物細胞系での発現プラスミドを作成して、これを利用して目的の融合タンパク質が細胞に発現することを確認した。その後、LRET の検証を行っ

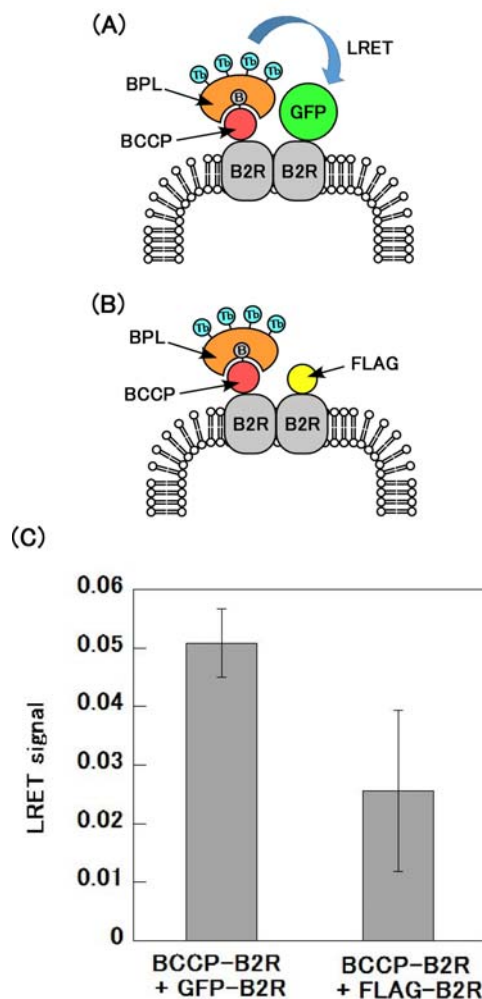


図 2 細胞表面での LRET を利用したレセプター間の相互作用解析 (A) BCCP-B2R 及び GFP-B2R を共発現させた系の模式図 (B) BCCP-B2R 及び FLAG-B2R を共発現させた系の模式図 (C) 両系の FRET シグナルの比較

た。ここでは、融合タンパク質を発現させた細胞を Tb-BPL で処理した後、細胞からの発光をプレートリーダーを用いて測定して、LRET シグナルを評価した。この際、コントロールとして、BCCP-B2R を発現させた系についても同様に測定を行った (図 3)。その結果、BCCP-B2R-GFP を発現させた系では、コントロールよりも有意に大きな LRET シグナルが観察され、細胞膜を介した LRET 分析が可能であることがわかった。

(3) 細胞膜を介した LRET を利用したレセプター間の相互作用解析

細胞膜を介したエネルギー移動を利用して、レセプターの会合挙動の解析が可能かどうか検証した。この目的のために、B2R の C 末端に GFP を連結した融合タンパク質 (B2R-GFP) を利用した。まず B2R-GFP の発現プラスミドを作成し、それを利用して動

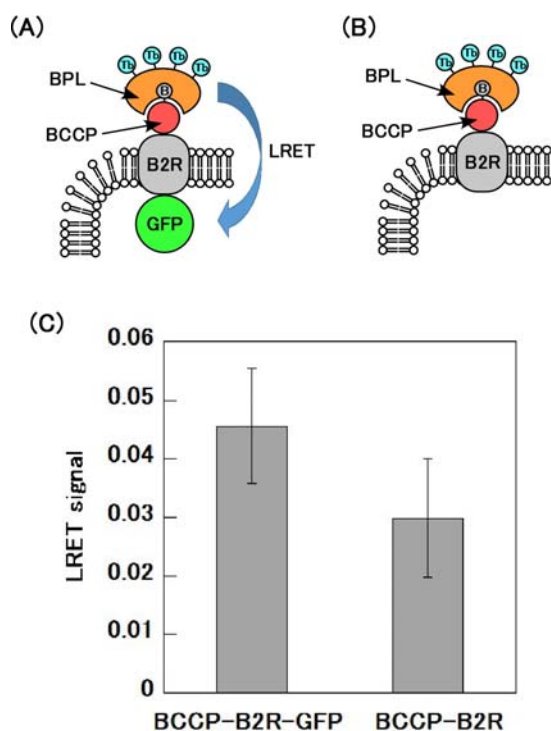


図3 細胞膜を介した LRET の検証 (A) BCCP-B2R-GFP を発現させた系の模式図 (B) BCCP-B2R を発現させた系の模式図 (C) 両系の FRET シグナルの比較

物細胞に目的の融合タンパク質を発現できることを確認した。その後、LRET を利用した相互作用解析を試みた。ここでは、BCCP-B2R と B2R-GFP を共発現させた細胞を Tb-BPL で処理し、細胞からの発光を測定して、LRET シグナルを評価した。この際、コントロールとして、BCCP-B2R と FLAG-B2R を共発現させた系についても同様に処理し測定を行った (図4)。その結果、BCCP-B2R と B2R-GFP を共発現させた系では、僅かではあるがコントロールよりも大きな LRET シグナルが観察され、レセプター間の会合を本系によりモニターできる可能性を示唆する結果が得られた。今後、測定系を改良することにより、LRET シグナルを増大させ、レセプター間の会合を確実にモニターできる系を構築することも可能であると考えている。このような系が構築できれば、従来の技術よりも生理条件に近い環境下でのレセプター間の相互作用解析データを取得することが可能となり、レセプターの作用機序の解明に大きく貢献することができるものと考えられる。

<引用文献>

- ①P. R. Selvin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2002) **31**, 275-302.
- ②S. Sueda, H. Tanaka, M. Yamagishi, *Anal. Biochem.* (2009) **393**, 189-195.

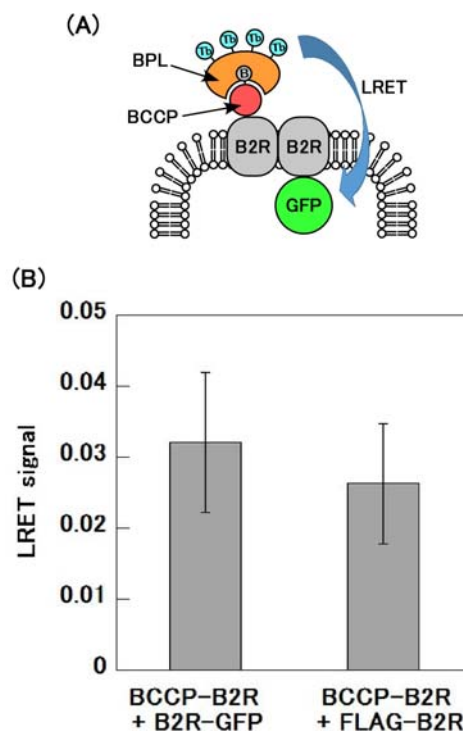


図4 細胞膜を介した LRET を利用したレセプター間の相互作用解析 (A) BCCP-B2R 及び B2R-GFP を共発現させた系の模式図 (B) BCCP-B2R 及び B2R-GFP を共発現させた系と、BCCP-B2R 及び FLAG-B2R を共発現させた系の FRET シグナルの比較

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

- ①村和真、高瀬慎也、末田慎二、テルビウム錯体から蛍光タンパク質への共鳴エネルギー移動を利用した細胞膜受容体間の相互作用解析系の構築、第23回日本生物工学会九州支部飯塚大会 (2016)、2016年12月3日、九州工業大学飯塚キャンパス (福岡県・飯塚市)
- ②末田慎二、Time-resolved luminescence assays for biomolecules using biotin ligase conjugated with a Tb³⁺ complex、Rare Earths 2016、2016年6月9日、北海道大学札幌キャンパス (北海道・札幌市)
- ③高瀬慎也、池田知弘、末田慎二、Monitoring of self-association of angiotensin II type 1 receptor based on the resonance energy transfer from luminescent Tb(III) complex to GFP、Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move、平成2016年1月22日、北九州国際会議場 (福岡県・北九州市)

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

- ④高瀬慎也、池田知弘、末田慎二、テルビウム錯体から蛍光タンパク質への共鳴エネルギー移動を利用したアンジオテンシンII受容体の会合挙動の解析、日本分析化学会第64年会、2015年9月11日、九州大学伊都キャンパス (福岡県・福岡市)
- ⑤高瀬慎也、池田知弘、末田慎二、時間分解FRETを利用したアンジオテンシンII受容体の会合挙動の解析、第33回九州分析化学若手の会夏季セミナー、2015年7月24日、熊本県上天草市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末田 慎二 (SUEDA SHINJI)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：00325581