

平成 29 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14456

研究課題名（和文）観るだけでわかるタンパク質間相互作用のハイスループット解析法の開発

研究課題名（英文）Development of high-throughput system of visible immunoprecipitation assay

研究代表者

中山 和久（Nakayama, Kazuhisa）

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40192679

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、独自に開発した『観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法（VIPアッセイ）』に関して、マイクロプレート上でのアッセイが可能になるように改良を加えた。

まず、抗GFP-Nanobodyを通常のポリスチレン（PS）製マイクロプレートに吸着させる方法では、十分な感度が得られなかった。次に、PS親和性ペプチドタグを抗GFP-Nanobodyに付加し、親水性PSプレートに吸着させたが、まだ十分な検出感度が得られなかったことから、さらにELISAを行い、二次抗体、三次抗体の濃度などの条件を検討することによって実用化可能な程度までの感度を得ることができた。

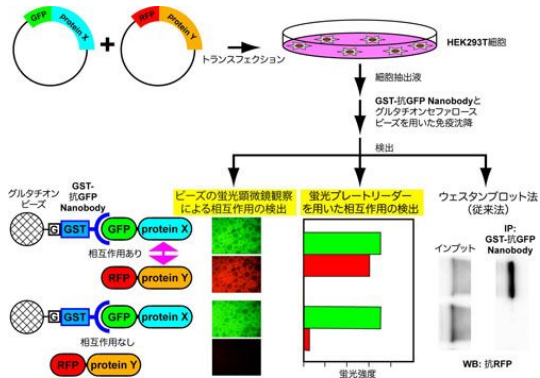
研究成果の概要（英文）：The visible immunoprecipitation (VIP) assay is a convenient, flexible method to detect protein-protein interactions. In this study, I attempted to improve the VIP assay to detect protein-protein interactions on a microplate and enable high-throughput screening. By fusing polystyrene (PS)-affinity peptide sequence to anti-GFP-Nanobody, I successfully immobilized it to PS microplate. The sensitivity was further enhanced by ELISA, through optimizing the concentrations of the secondary and tertiary antibodies.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質間相互作用 GFP Nanobody 繊毛内タンパク質輸送複合体

## 1. 研究開始当初の背景

我々が独自に開発した『観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法：visible immunoprecipitation assay (VIP アッセイ)』は、共免疫沈降を基本とするタンパク質間相互作用解析法である(図1)。



本アッセイ法では、まず、相互作用を調べたいタンパク質についてGFPおよびRFP融合遺伝子の発現プラスミドベクターをそれぞれについて作製する。次に、これらのプラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションして、GFP融合タンパク質とRFP融合タンパク質を共発現させる。蛍光タンパク質の発現を顕微鏡で確認した後、細胞抽出液を調製し、GST-抗GFP-Nanobody(大腸菌で発現・精製したラクダ型重鎖抗体)結合グルタチオン-セファロース・ビーズを用いて免疫沈降を行う。最後にビーズに結合している蛍光タンパク質のシグナルを蛍光顕微鏡観察、または蛍光プレートリーダーにより検出する。ビーズが緑と赤の両方で光っていれば(すなわち、GFP融合タンパク質とRFP融合タンパク質が共沈降していれば)相互作用があり、緑のみで光っていれば(すなわち、RFP融合タンパク質が共沈降しなければ)相互作用はないと判定できる。

本法の最大の利点は、ウェスタンブロットティング法のように手間のかかる作業が一切不要であり、観るだけ(測るだけ)で相互作用を判定できることである。ただし、沈降させたビーズを顕微鏡観察する操作があることから、アッセイのハイスループット化は難しい。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、開発済みのVIPアッセイに関して、96穴マイクロプレート上で直接アッセイできるように改良を加えて、ハイスループット化を行う。この改良によって、特定のタンパク質と相互作用するタンパク質の迅速なスクリーニングを可能にするとともに、スクリーニング規模を拡大できるよう

にする。

## 3. 研究の方法

GST-抗GFP-Nanobodyを結合させたグルタチオン-セファロース・ビーズを用いた免疫沈降法について、このNanobodyを96穴マイクロプレートに直接固定化する条件、および検出する条件について検討を行い、マイクロプレート上での相互作用アッセイの最適化を行う。

## 4. 研究成果

我々が独自に開発した『観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法(VIPアッセイ)』をマイクロプレートで行うために、まず抗GFP-Nanobodyを96穴マイクロプレート上に固定化する条件について検討を行った。

- まず、単純に親水性ポリスチレン(PS)製マイクロプレートに抗GFP-Nanobodyを吸着させる方法について検討した。しかし、従来法(グルタチオンセファロースビーズを用いて免疫沈降したのちに、ビーズをマイクロプレート上に置いて蛍光強度を測定する方法)に比べて検出感度は100分の1程度であり、単純な吸着法では実用的なアッセイは難しいことがわかった。
- 次に、抗GFP-Nanobodyを吸着させるマイクロプレートの材質についても検討したが、材質による検出感度の顕著な改善は見られなかった。そこで次に、材料親和性ペプチドタグを付加した抗GFP-Nanobodyを作製して、大腸菌で発現させて精製し、マイクロプレートへの固定化の条件について検討を行った。
- PS親和性ペプチドタグ、またはポリメタクリル酸メチル(PMMA)親和性ペプチドタグを付加した抗GFP-Nanobodyを作製し、大腸菌で発現させて精製した。コントロールとして、連続するAsp残基5個のタグ(D5タグ)付の抗GFP-Nanobodyも作製した。
- それぞれについて、親水性PSプレートおよびPMMAプレートへの吸着条件について検討した。
- PSプレートには、PSタグ抗GFP-Nanobodyが最も効率良く吸着したが、PMMAタグやD5タグのNanobodyもある程度吸着し、高濃度での吸着に関してはPSタグとほとんど差はなかった。したがって、抗GFP-Nanobody自体に親水性PSプレートに対する親和性があると考えられ、PSタグが付いていても、タグがない場合と比べて検出感度に関して劇的な改善は見られなかった。
- 一方、PMMAプレートに対しては、PMMAタグNanobodyは効率良く吸着したのに対して、PSタグやD5タグのも

- のはほとんど吸着しなかった。したがって、抗 GFP-Nanobody は PMMA プレートに対する親和性はないと考えられる。
- g) 次に、非特異的吸着を抑えるために、界面活性剤の Tween 20 が共存する条件での吸着実験を行った。しかし、親水性 PS プレートに関しては、どのタグでも同程度の吸着が見られた。したがって、Tween 20 共存下でも抗 GFP-Nanobody 自体が PS プレートに対する吸着性を示すと考えられる。
- h) 次に、BSA の共存下で同様の実験を行ったところ、PS タグ抗 GFP-Nanobody の吸着はほとんど影響を受けることがないのに対して、PMMA タグや D5 タグの抗 GFP-Nanobody の非特異的吸着を抑えられた。したがって、BSA の共存下で特異的なアッセイが可能であると考えられた。

そこで次に、感度を上げるために、GFP の蛍光強度を直接測定するのではなく、抗 GST 抗体を用いた ELISA 法によって、検出感度を上げる試みを行った。

- i) Three-Step 法 [ 一次抗体 ( 抗 GFP-Nanobody )、二次抗体 ( ウサギ抗 GST 抗体 )、三次抗体 ( HRP 標識抗ウサギ抗体 ) を順番に添加する方法 ]、Two-Step 法 ( 一次抗体と二次抗体を同時に添加したのちに、三次抗体を添加する方法 )、One-Step 法 ( 一次抗体、二次抗体、三次抗体を同時に添加する方法 ) を試したところ、検出感度は Three-Step > Two-Step > One-Step の順であり、試した条件 ( 抗体濃度等 ) では検出過程を簡便にするのは難しいことが明らかになった。
- j) そこで、二次抗体と三次抗体の濃度を上げて再度検討を行ったところ、二次抗体の濃度を 2 倍、三次抗体の濃度を 100 倍で用いると、検出感度の飛躍的な改善がみられた。この条件では、One-Step 法でもかなりの感度で検出できることが明らかになり、アッセイを実用化できる可能性が見出された。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 14 件 )

1. Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R. & Nakayama, K. (2015) Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.*, **128**, 2351-2362. ( 査読あり )  
doi: 10.1242/jcs.168740
2. Naito, T., Takatsu, H., Miyano, R., Takada, N., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2015) Phospholipid flippase ATP10A translocates phosphatidylcholine and is involved in plasma membrane dynamics. *J. Biol. Chem.*, **290**, 15004-15017. ( 査読あり )  
doi: 10.1074/jbc.M115.655191
3. Kubo, K., Kobayashi, M., Nozaki, S., Yagi, C., Hatsuzawa, K., Katoh, Y., Shin, H.-W., Takahashi, S. & Nakayama, K. (2015) SNAP23/25 and VAMP2 mediate exocytic event of transferrin receptor-containing recycling vesicles. *Biol. Open*, **4**, 910-920. ( 査読あり )  
doi: 10.1242/bio.012146
4. Takashima, K., Saitoh, A., Funabashi, T., Hirose, S., Yagi, C., Nozaki, S., Sato, S., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2015) COPI-mediated retrieval of SCAP is crucial for regulating lipogenesis under basal and sterol-deficient conditions. *J. Cell Sci.*, **128**, 2805-2815. ( 査読あり )  
doi: 10.1242/jcs.164137
5. Takada, N., Takatsu, H., Miyano, R., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2015) ATP11C mutation is responsible for the defect in phosphatidylserine uptake in UPS-1 cells. *J. Lipid Res.*, **56**, 2151-2157. ( 査読あり )  
doi: 10.1194/jlr.M062547
6. Hanai, A., Ohgi, M., Yagi, C., Ueda, T., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2016) Class I Arfs (Arf1 and Arf3) and Arf6 are localized to the Flemming body and play important roles in cytokinesis. *J. Biochem.*, **159**, 201-208. ( 査読あり )  
doi: 10.1093/jb/mvv088
7. Hamamoto, A., Yamato, S., Katoh, Y., Nakayama, K., Yoshimura, K., Takeda, S., Kobayashi, Y. & Saito, Y. (2016)

- Modulation of ciliary length by melanin-concentrating hormone receptor 1. *Cell. Signal.*, **28**, 572-584. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.cellsig.2016.02.018
8. Katoh, Y., Terada, M., Nishijima, Y., Takei, R., Nozaki, S., Hamada, H. & Nakayama, K. (2016) Overall architecture of the intraflagellar transport (IFT)-B complex containing Cluap1/IFT38 as an essential component of the IFT-B peripheral subcomplex. *J. Biol. Chem.*, **291**, 10962-10975. (査読あり)  
doi: 10.1074/jbc.M116.713883
  9. Miyano, R., Matsumoto, T., Takatsu, H., Nakayama, K. & Shin, H.-W. (2016) Alteration of transbilayer phospholipid compositions is involved in cell adhesion, cell spreading, and focal adhesion formation. *FEBS Lett.*, **590**, 2138-2145. (査読あり)  
doi: 10.1002/1873-3468.12247
  10. Tanaka, Y., Ono, N., Shima, T., Tanaka, G., Katoh, Y., Nakayama, K., Takatsu, H. & Shin, H.-W. (2016) The phospholipid flippase ATP9A is required for recycling pathway from endosomes to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 3883-3893. (査読あり)  
doi: 10.1091/mbc.E16-08-0586
  11. Nozaki, S., Katoh, Y., Terada, M., Michisaka, S., Funabashi, T., Takahashi, S., Kontani, K. & Nakayama, K. (2017) Regulation of ciliary retrograde protein trafficking by the Joubert syndrome proteins ARL13B and INPP5E. *J. Cell Sci.*, **130**, 563-576. (査読あり)  
doi: 10.1242/jcs.197004
  12. Hirano, T., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2017) Intraflagellar transport-A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 429-439. (査読あり)  
doi: 10.1091/mbc.E16-11-0813
  13. Funabashi, T., Katoh, Y., Michisaka, S., Terada, M., Sugawa, M. & Nakayama, K. (2017) Ciliary entry of KIF17 is dependent on its binding to the IFT-B complex via IFT46-IFT56 as well as on its nuclear localization signal. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 624-633. (査読あり)  
doi: 10.1091/mbc.E16-09-0648
  14. Katoh, Y., Michisaka, S., Nozaki, S., Funabashi, T., Hirano, T., Takei, R. & Nakayama, K. (2017) Practical method for targeted disruption of cilia-related genes by using CRISPR/Cas9-mediated, homology-independent knock-in system. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 898-906. (査読あり)  
doi: 10.1091/mbc.E17-01-0051
- [学会発表](計 31件)
1. 加藤洋平, 野崎梢平, 寺田将也, 中山和久 (2015) Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイによるマルチサブユニット複合体の構築様式の解明. 第62回日本生化学会近畿支部例会. 草津, 5月
  2. 加藤洋平, 野崎梢平, 寺田将也, 中山和久 (2015) Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイによるマルチサブユニット複合体の構築様式の解明. 第67回日本細胞生物学会大会. 東京, 6月
  3. Nakayama, K., Katoh, Y., Nozaki, S., & Terada, M. (2015) Architectures of the BBSome, IFT-B, and Exocyst Complexes Revealed by Visible Immunoprecipitation (VIP) Assay Using Fluorescent Fusion Proteins. FASEB Science Research Conference, "Biology of Cilia and Flagella". Snowmass Village, Colorado, USA. 7月

4. 船橋輝記、高島皓平、齋藤明奈、廣瀬祥平、申 恵媛、中山和久 (2015) COPI被覆小胞を介するSCAP-SREBP複合体のゴルジ体-小胞体間の逆行輸送による脂質代謝調節 .第14回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2015 . 千葉 . 9月12日～13日
5. 野崎梢平、加藤洋平、中山和久 (2015) Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイによるExocyst複合体の構築様式の解明 .第14回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2015 . 千葉 . 9月12日～13日
6. 船橋輝記、高島皓平、齋藤明奈、廣瀬祥平、申 恵媛、中山和久 (2015) COPI被覆小胞を介するSCAP-SREBP複合体のゴルジ体から小胞体への 逆行輸送による脂質代謝の調節 . 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 . 神戸 . 12月1日～4日
7. 寺田将也、加藤洋平、野崎梢平、武井領汰、中山和久 (2015) 繊毛内タンパク質輸送複合体IFT-Bの構築様式とCLUAP1の機能の解明 .第38回 日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 . 神戸 . 12月1日～4日
8. 西島侑哉、萩谷遥平、加藤洋平、中山和久 (2015) 中心体/基底小体で複合体を形成するRabL2とCep19の機能の解析 .第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 . 神戸 . 12月1日～4日
9. 船橋輝記、加藤洋平、中山和久 (2016) KIF17 と IFT 複合体の相互作用様式の解明と繊毛内輸送における役割 . 第63回日本生化学会近畿支部例会 . 神戸、5月21日
10. 加藤洋平、寺田将也、中山和久 (2016)「観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法」の開発と繊毛内タンパク質輸送複合体 IFT-B の構築様式の解明 .第63回日本生化学会近畿支部例会 . 神戸、5月21日
11. Nakayama, K., Katoh, Y., Terada, T., Nozaki, S., Hirano, T. & Funabashi, T. (2016) Trafficking Machineries within Cilia: Architectures and Functions of the IFT-A and IFT-B complexes. 第 68 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「高次生命機能を司るメンブレントラフィック：分子基盤からその破綻による疾患発症の理解に向けて」京都、6月15日～17日
12. 加藤洋平、寺田将也、野崎梢平、中山和久 (2016) 観るだけでわかるタンパク質間相互作用解析法」を活用した繊毛内タンパク質輸送複合体 IFT-B の構築様式の解明 . 第 68 回日本細胞生物学会大会 . 京都、6月15日～17日
13. 野崎梢平、加藤洋平、中山和久 (2016) 繊毛内のイノシトールリン脂質代謝とタンパク質の局在におけるArl13b とIFT-Bの役割 . 第68回日本細胞生物学会大会 . 京都、6月15日～17日
14. 船橋輝記、加藤洋平、中山和久 (2016) KIF17とIFT複合体の相互作用様式の解明と繊毛形成における役割 . 第68回日本細胞生物学会大会 . 京都、6月15日～17日
15. 平野友章、加藤洋平、中山和久 (2016) 繊毛内タンパク質輸送複合体IFT-Aの構築様式と機能の解明 . 第68回日本細胞生物学会大会 . 京都、6月15日～17日
16. 西島侑哉、萩谷遥平、加藤洋平、中山和久 (2016) 中心体/基底小体で複合体を形成する RabL2-Cep19-FOP の機能の解析 . 第 15 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2016 . 大阪 . 9月10日～11日
17. 平野友章、加藤洋平、中山和久 (2016) 繊

- 毛内タンパク質の輸送を担うIFT-A複合体の構築様式と機能の解明. 第15回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2016. 大阪. 9月10日~11日
18. 野崎梢平、加藤洋平、中山和久 (2016) 繊毛内のイノシトールリン脂質代謝とタンパク質の局在におけるArl13bとIFT-Bの役割. 第15回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2016. 大阪. 9月10日~11日
19. 加藤洋平、野崎梢平、中山和久 (2016) ジュベール症候群原因遺伝子産物Arl13bによって制御される繊毛内タンパク質輸送の分子機構. 第89回日本生化学会大会シンポジウム「Arfファミリー低分子量Gタンパク質群が介在する多彩な生理機能と関連疾患」. 仙台. 9月25日~27日
20. 船橋輝記、加藤洋平、中山和久 (2016) キネシン2とIFT複合体の相互作用の様式の解明と繊毛形成における役割. 第89回日本生化学会大会. 仙台. 9月25日~27日
21. 高原万梨子、平野友章、加藤洋平、中山和久 (2016) IFT-A複合体と相互作用するC11orf74の繊毛内タンパク質輸送における役割. 第89回日本生化学会大会. 仙台. 9月25日~27日
22. Funabashi, T., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2016) Differential roles of KIF17 and heterotrimeric kinesin-II interacting with the IFT-B complex in biogenesis of primary cilia. The 28th CDB Meeting, “Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions”. Kobe, Nov. 27-29.
23. Katoh, Y., Terada, M. & Nakayama, K. (2016) Overall architecture of the intraflagellar transport (IFT)-B complex revealed by a visible immunoprecipitation assay. The 28th CDB Meeting, “Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions”. Kobe, Nov. 27-29.
24. Nozaki, S., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2016) Arl13b-dependant localization of INPP5E within cilia maintains ciliary retrograde protein trafficking. The 28th CDB Meeting, “Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions”. Kobe, Nov. 27-29.
25. Nozaki, S., Katoh, Y. & Nakayama, K. (2016) Regulation of ciliary retrograde protein trafficking by Joubert syndrome proteins Arl13b and INPP5E. 2016 ASCB Annual Meeting. San Francisco, California, USA, Dec. 3-7.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山 和久 (NAKAYAMA, Kazuhisa)  
 京都大学・大学院薬学研究科・教授  
 研究者番号：40192679

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

加藤 洋平 (KATOH, Yohei)  
 京都大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：90568172

##### (4) 研究協力者

( )