

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03090

研究課題名(和文) 化学ラベル化法を応用したタンパク質の超高解像度可視化解析

研究課題名(英文) Ultra-High Resolution Protein Analysis Using a Chemical Labeling Method

研究代表者

王子田 彰夫(Ojida, Akio)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質を小分子プローブでラベル化するリアクティブタグ法を開発し、これを電子顕微鏡によるタンパク質の一分子レベルでの解析に応用することを目指した。本研究では、アスパラギン酸リッチなペプチドタグと特異的に反応するリアクティブタグ法ならびにヒスチジンリッチなペプチドタグと特異的に反応するリアクティブタグ法の二種類の開発に成功した。さらにリアクティブタグ法を用いて細胞表面に発現する膜受容体タンパク質を金ナノ粒子でラベル化し電子顕微鏡により観察することで膜受容体を一分子レベルの高解像度で検出することに成功した。本成果は化学的なラベル化法をタンパク質の一分子可視化に応用した初めての例となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電子顕微鏡はタンパク質を一分子レベルで解析できる優れた手法である。これまでタンパク質の電子顕微鏡解析には抗体を用いた免疫電顕法が主に用いられてきたが、この手法は検出するタンパク質の正確な位置情報が得られないことやタンパク質複合体に適用できないなどの問題がある。本研究では、申請書の開発する小分子を用いたケミカルラベル化法が電子顕微鏡によるタンパク質解析に応用できることを世界で初めて証明した。今後、本成果を活用することで免疫電顕法の持つ上記の問題点を解決し、電子顕微鏡によるタンパク質の機能解析がさらに発展すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have developed the chemical protein labeling method (reactive tag method) and applied it to detect proteins in a single molecular level using electron microscopy (EM). We have successfully developed the two reactive tag methods; one is specific for labeling of the aspartate-rich peptide tag and another is specific for labeling for histidine-rich peptide tag. We have also demonstrated that our reactive tag method is applicable to the high resolution EM detection of cell-membrane receptors through labeling with gold nano particles. This is the first example of single molecular level protein detection by EM using chemical labeling method.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛋白質 電子顕微鏡 ケミカルラベル化 ペプチドデザイン 脳神経科学

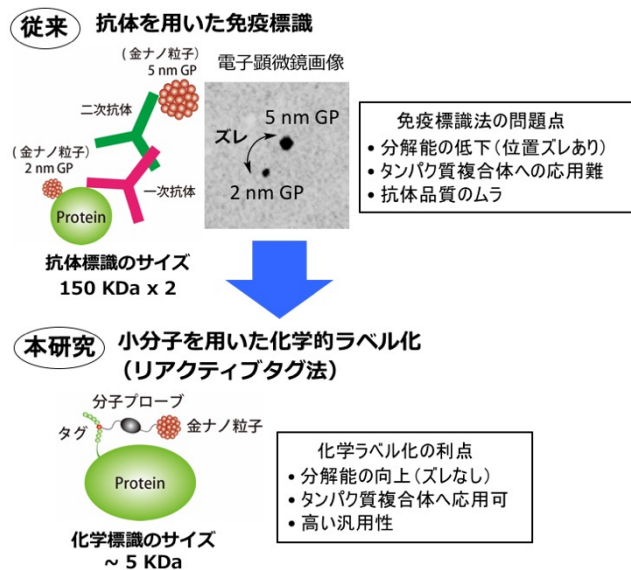
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電子顕微鏡法は、生体試料中のタンパク質をナノメートルレベルの超高解像度で一分子可視化できる優れた技術であり、これまでに神経伝達物質受容体やイオンチャネルをはじめとする様々なタンパク質の機能解析に貢献してきた。従来から透過型電子顕微鏡を用いたタンパク質の可視化には、金ナノ粒子など電子散乱因子の大きな物質を結合させた抗体が標識剤として用いられてきた(いわゆる免疫電顕法)。しかし免疫電顕法では、標識に用いる抗体分子(150 kDa)が大きく、抗体のサイズ以下(〜 8 nm)の空間分解能を得る事は事実上できない。実際に、一次および二次抗体を介して金ナノ粒子標識する一般的な手法により観察したタンパク質の局在は、実際のタンパク質の局在と異なることが明らかにされている。同様に、抗体の高高さの問題から、タンパク質複合体中の異なるタンパク質を二重標識することは多くの場合困難である。生体内にあるタンパク質の約7割は何らかのタンパク質複合体を形成して機能していることを考えると、この問題は、電子顕微鏡解析の応用範囲を制限する深刻なボトルネックであるといえる。以上の事から、免疫電顕法の問題を解決できる新しい電子顕微鏡イメージング技術の確立が脳神経科学を始めとする生物学研究の分野において強く求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の免疫電顕法の問題を解決できるタンパク質のラベル化技術の開発と、それを用いたタンパク質複合体解析への応用である。本研究では、申請者がこれまでに開発を行ってきたペプチドタグと小分子プローブを用いたタンパク質の共有結合ラベル化技術「リアクティブタグ法」に、独自の反応化学と分子デザインの知見を取り入れ、標的タンパク質を極めて高い特異性で金属ナノ粒子標識できるケミカルラベル化法を開発する。さらに、この手法を用いて細胞膜レプリカ試料上の受容体タンパク質を標識し、電子顕微鏡による一分子イメージングを実現する。特に本研究では、異なるタンパク質を区別してラベル化できる直交性ある二種類のリアクティブタグ法を開発し、受容体タンパク質複合体のサブユニット構成と記憶(長期増強)との関連を脳神経科学の観点から明らかにすることを目的とする。



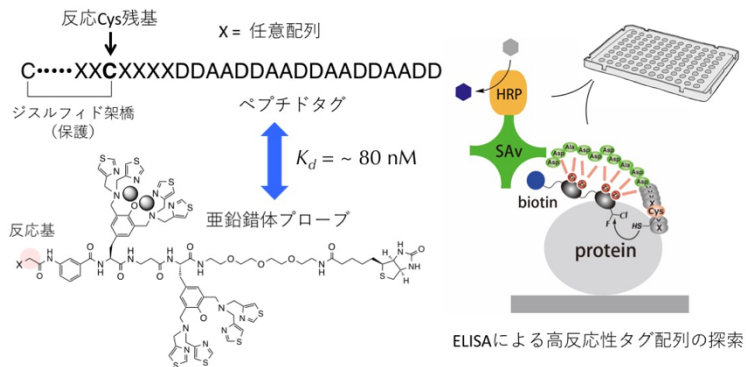
3. 研究の方法

本研究では、膜レプリカ上のタンパク質ラベル化を実現するため、① 非特異反応の少ない新しいアスパラギン酸リッチペプチドタグと小分子プローブのペア(第三世代型リアクティブタグ法)の開発、および② 高反応性を示すヒスタグ反応型のリアクティブタグ法の開発を行った。また、③ リアクティブタグ法を細胞膜レプリカ上のタンパク質ラベル化への応用について検討を行い、金属ナノ粒子標識による電子顕微鏡イメージングを行なった。

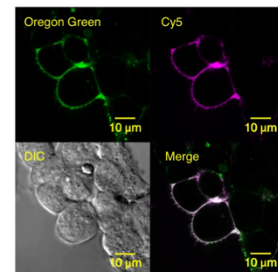
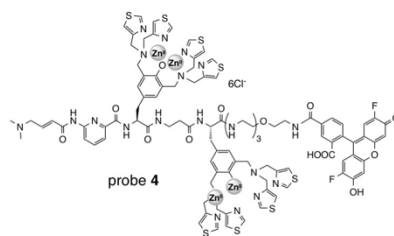
4. 研究成果

① 非特異反応の少ない新しいタグ・プローブのペア(第三世代型リアクティブタグ法)の開発

非特異反応性を抑えて標的タンパク質のみを特異的にラベル化することは、電子顕微鏡解析において正確なデータを得るために非常に重要である。本研究では、これまでに開発した二つのリアクティブタグ法よりも、さらに非特異反応が少なく高効率なタンパク質ラベル化を実現できる第三世代型リアクティブタグ法の開発に取り組んだ。具体的な実験としては、申請者がこれまでに見出した亜鉛錯体と強く相互作用する($K_d = 83 \text{ nM}$)アスパラギン酸リッチなペプチド配列(DDAADDAADDAADD)を用い、この配列にシステインの反応性部位を組み込んだペプチド

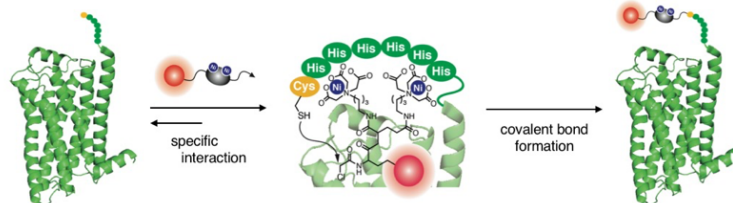


タグを多数デザインした。ペプチドタグはマルトース結合タンパク質(MBP)に組み込んで大腸菌より発現させ、精製後にビオチン-アビジン相互作用を利用した ELISA 法(HRP 発色)により亜鉛錯体型プローブと反応をスクリーニング評価した。その結果、二十種類以上のペプチドタグを用いた検討から、DCP3 タグ (DCPPDDAADDAADDAADD)がマイケルアクセプターを反応基として持つ亜鉛錯体型プローブと最も早く反応し、その半反応時間($t_{1/2}$)は 2.9 min と非常に早いことが明らかとなった。最終的に プローブの反応性をさらに高めたプローブ 4 は DCP3 タグを有する MBP タンパク質(1 μ M)と中性水溶液中で $t_{1/2} = 17.1$ min で反応すること、さらに細胞表層に発現させた DCP3 タグを有するブラジキニン受容体を蛍光イメージングにより可視化に應用できることが分かった。また、プローブ 4 は以前に開発した第二世代型プローブよりも細胞表層における非特異反応性が低い結果を蛍光イメージングから得ることが出来た。以上の結果より今回開発を行った第三世代型のリアクティブタグ法は、電子顕微鏡解析により適した化学ラベル化法であることを明らかとした。なお、当初に計画していたハロアルカンを反応基に用いた検討は、それらの反応性が低く高い反応効率得られないことから十分な検討を行っていない。

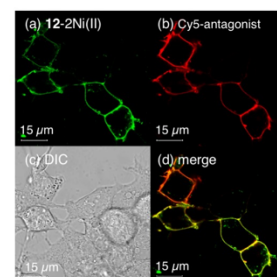
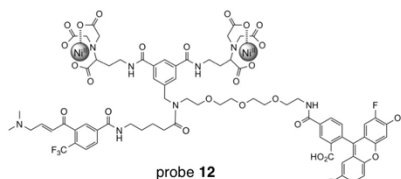


② 高反応性を示すヒスタグ反応型リアクティブタグ法の開発

上記のアスパラギン酸リッチなペプチド配列 DCP3 タグ・亜鉛錯体のペアと反応直交性を持つリアクティブタグ法は、複数のタンパク質の同時ラベル化を可能にする。したがって、これらの



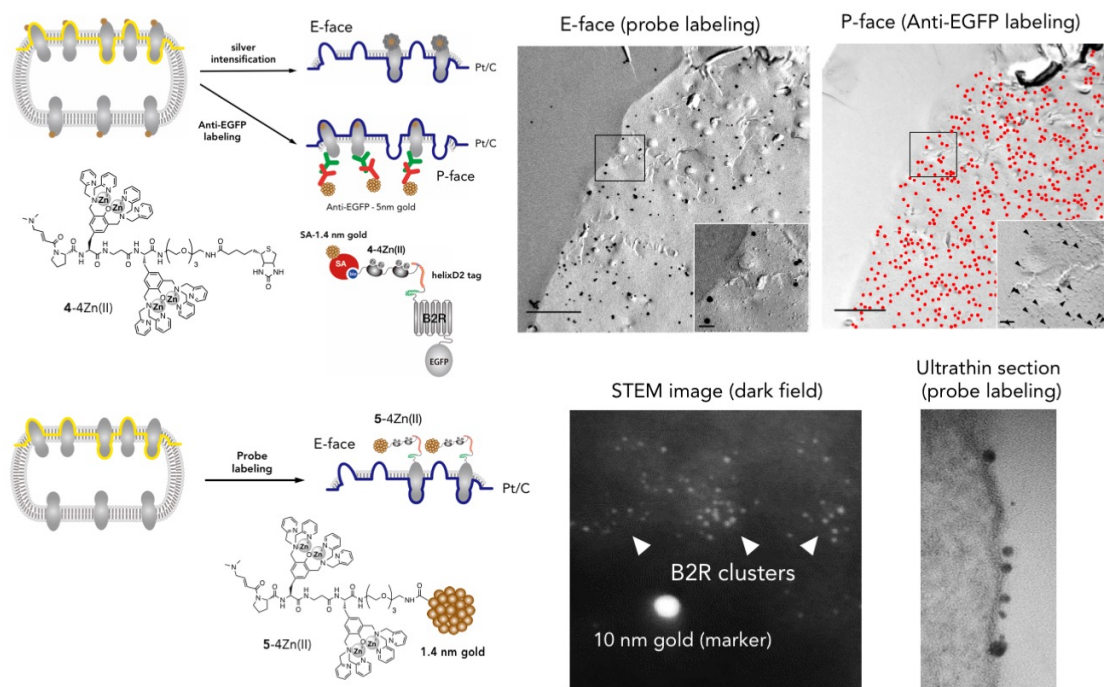
の化学ラベル化法を併用することでタンパク質複合体のサブユニット構成を電子顕微鏡で解析できる可能性が期待できる。この目的を達成するため本研究では、高効率で His タグ導入タンパク質をラベル化できるケミカルラベル化法の開発を行った。初期の検討においてシステインを中央に有する CysHis タグ配列(HHHHHCHHHHH)が、N 末端にシステインを有するタグ配列(CHHHHHHHHH)よりも高い反応性を有することを見出した。一方で反応性プローブとしては二核の Ni(II)-NTA 錯体を基本構造として、Ni(II)-NTA 部位のリンカー長、反応部位のリンカー長、反応基の種類を様々に変えることで最適なプローブ構造を探索した。その結果、マイケルアクセプターを反応基として持つプローブ 12 が最も高い反応性を示すことを MBP タンパク質のラベル化実験から明らかとした($t_{1/2} = 16.7$ min)。さらにプローブ 12 は、細胞表層に発現させた H5CH5 タグを有するブラジキニン受容体の蛍光イメージングに應用可能であった。また、細胞表層における 12 の非特異反応性は、以前に開発したクロロアセタミドを反応基として持つプローブよりも低い結果を蛍光イメージングから得ることが出来た。今回開発した CysHis タグを用いたケミカルラベル化法については、共同研究先であるオーストリア IST 研究所の重本研究室において電子顕微鏡解析への應用が継続して行われている状況にある。



③ リアクティブタグ法を細胞膜レプリカ上のタンパク質ラベル化への應用

本申請研究に先行して開発を進めていたアスパラギン酸リッチなペプチドタグをラベル化する第二世代型のリアクティブタグ法について、膜タンパク質の電子顕微鏡解析への應用をオーストリア IST 研究所の重本教授と共に検討した。これによりリアクティブタグ法が電子顕微鏡を用いたタンパク質の一分子可視化解析に有用であることを実証することを目指した。培養細胞に過剰発現させたペプチドタグ (CPYSAADAADAADAAD)を導入したブラジキニン受容体をビオチン型プローブ 4-4Zn(II)を用いてラベル化を行った後に細胞膜レプリカを作成した。得られた膜レプリカを 1.4 ナノメートルサイズの金ナノ粒子を持つストレプトアビジンで処理後に、検出を容易とするために銀増感を行い電子顕微鏡で観察した。その結果、細胞表層側の E-face に銀増感された金ナノ粒子が観察された。一方で細胞膜の内側にあたる P-face レプリカに

はブラジキニン受容体に付加した EGFP を免疫染色した 5 ナノメートルサイズの金ナノ粒子が観察された。下図に示す二枚の E-face および P-face のレプリカは、その膜形状から同じ細胞の裏と表の膜であることが判断できる。この事はリアクティブタグ法によりラベル化されたブラジキニン受容体を E-face で検出できていることを強く示唆する結果である。次に我々は 1.4 ナノメートルの金ナノ粒子を直接導入したプローブ **5-4Zn(II)** を用いてタグ修飾ブラジキニン受容体のラベル化を行った。その結果、E-face 上にブラジキニン受容体のクラスターを検出することに成功した。興味あることに **5-4Zn(II)** によるラベル化によってクラスター領域に観察される金ナノ粒子の密度は、Flag タグを介して免疫修飾した場合よりも高い事が判明した。この事は、リアクティブタグ法のラベル化効率が免疫電験法と同等以上であることを意味している。さらにラベル化した細胞の **ultrathin section** を用いた電子顕微鏡観察からリアクティブタグ法は免疫電験法と比較して、より高い空間分解能を持つことを明らかにすることができた。以上の検討から、リアクティブタグ法がタンパク質の電子顕微鏡解析に有用であることを証明することができた。本成果は、タンパク質のケミカルラベル化技術を電子顕微鏡解析へと応用した初めての事例である。今後は、本研究で新たに開発を行った第三世代型やヒスタグ反応型リアクティブタグ法の電子顕微鏡解析への応用について検討を進めるとともに、マウス脳切片に発現させたタグ導入膜受容体のラベル化解析を進めケミカルラベル化法の有用性を実証する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 N. Zenmyo, H. Tokumaru, S. Uchinomiya, H. Fuchida, S. Tabata, I. Hamachi, R. Shigemoto, A. Ojida	4. 巻 92
2. 論文標題 Optimized Reaction Pair of the CysHis Tag and Ni(II)-NTA Probe for Highly Selective Chemical Labeling of Membrane Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 995-1000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1246/bcsj.20190034	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 N. Kurashige, H. Fuchida, S. Tabata, S. Uchinomiya, A. Ojida	4. 巻 27
2. 論文標題 Discovery of highly reactive peptide tag by ELISA-type screening for specific cysteine conjugation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3486-3489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2017.05.069	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 S. Tabata, M. Jevtic, N. Kurashige, H. Fuchida, M. Kido, K. Tani, N. Zenmyo, S. Uchinomiya, H. Harada, M. Itakura, I. Hamachi, R. Shigemoto, A. Ojida	4. 巻 22
2. 論文標題 Electron Microscopic Detection of Single Membrane Proteins by a Specific Chemical Labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 256-258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.025	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 王子田 彰夫	4. 巻 116
2. 論文標題 ペプチドデザインによるタンパク質1分子レベルの電子顕微鏡解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide NewsLetter Japana	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉重伸崇, 田畑栄一, Marijo Jevitic, 城戸宗継, 内之宮祥平, 重本隆一, 王子田彰夫
2. 発表標題 Aspリッチ-タグを用いたタンパク質ケミカルラベリングの電子顕微鏡イメージングへの応用
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 善明直輝, 湊田大和, 田畑栄一, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 TEMイメージングのためのHisタグ選択的高反応性プローブの開発
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第30回サマースクール
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王子田彰夫
2. 発表標題 タンパク質システインを標的とするケミカルバイオロジー：イメージングとコバレントドラッグ開発への応用
3. 学会等名 第16回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 善明直輝, 湊田大和, 倉重伸崇, 田畑栄一, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 TEMイメージング応用を指向したHisタグ導入タンパク質の選択的化学ラベリング
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉重伸崇, 田畑栄一, Jevitic Marijo, 城戸宗継, 内之宮祥平, 重本隆一, 王子田彰夫
2. 発表標題 電子顕微鏡によるAspリッチタグ導入タンパク質の高解像度可視化
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 善明直輝・得丸祥貴・田畑栄一・内之宮祥平・王子田彰夫
2. 発表標題 TEMイメージングへの応用を目指したHisタグケミカルラベリング法の最適化
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 善明直輝、淵田大和、倉重伸崇、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 タンパク質機能解析のための新規His-tag/プローブペアの開発
3. 学会等名 第54回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉重伸崇、淵田大和、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 標的タンパク質特異的なラベル化のための新規ペプチドタグ/プローブペアの開発とバイオイメージング応用
3. 学会等名 生体機能関連化学若手の会第29回サマースクール
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 善明直輝、淵田大和、倉重伸崇、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 TEMイメージングのためのHisタグ反応型リアクティブタグの開発
3. 学会等名 第5回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 善明直輝、淵田大和、倉重伸崇、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 His側鎖の求核付加反応によるタンパク質ラベル化を目指した反応性プローブ分子の開発
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobutaka Kurashige, Hirokazu Fuchida, Shigekazu Tabata, Shohei Uchinomiya, Akio Ojida
2. 発表標題 Screening of peptide tag for selective protein labeling with zinc complex and its application to fluorescence bioimaging
3. 学会等名 第54回ペプチド討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobutaka Kurashige, Hirokazu Fuchida, Shigekazu Tabata, Shohei Uchinomiya, Akio Ojida
2. 発表標題 Development of Peptide-tag/Probe Pair for Selective Protein Conjugation and Its Application to Fluorescence Bioimaging
3. 学会等名 IRCCS-JST CREST Joint Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田畑栄一、Jevtic Marijo、城戸宗継、淵田大和、浜地 格、重本隆一、王子田彰夫
2. 発表標題 ペプチドタグ/ プローブペアを用いたタンパク質ケミカルラベリング (1): Asp リッチ - タグシステムの電子顕微鏡イメージングへの応用
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉重伸崇、淵田大和、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 ペプチドタグ/ プローブペアを用いたタンパク質ケミカルラベリング (2): 高反応性Aspリッチ - タグの探索とそのバイオイメージング応用
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 善明直輝、淵田大和、倉重伸崇、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 ペプチドタグ/ プローブペアを用いたタンパク質ケミカルラベリング(3): 電子顕微鏡イメージングへの応用を目指したオリゴHisタグ高反応性プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 善明直輝、得丸祥貴、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 TEMイメージングを目指したリアクティブタグシステムの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 善明直輝、得丸祥貴、田畑栄一、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 高選択的Cys-Hisタグケミカルラベリングの最適化とイメージング応用
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第31回サマースクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 得丸祥貴、善明直輝、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 タンパク質高解像度解析のためのHis-tagケミカルラベル化法の開発
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 得丸祥貴、善明直輝、内之宮祥平、王子田彰夫
2. 発表標題 タンパク質電子顕微鏡イメージングへの適応を目指したHis-tag高選択的ケミカルラベル化法の開発
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学薬学研究院創薬ケミカルバイオロジー研究室ホームページ
<http://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp>

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
--	---------------------------	-----------------------	----