

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02561

研究課題名(和文) 膜タンパク質の小型標識法開発とヘテロオリゴマー解析

研究課題名(英文) Development of a small-sized labeling method for membrane proteins and its application for heterooligomer analysis

研究代表者

松崎 勝巳 (Matsuzaki, Katsumi)

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)：膜タンパク質のヘテロ会合を検出するため、当研究室で開発したE3-K4コイルドコイル標識法とorthogonalな新規タグ-プローブペアの開発を行った。認識部位にアスパラギン残基をそれぞれ1つあるいは2つ導入したEN3.5タグ-KN3.5プローブペア、EN24タグ-KN24プローブペアをデザインした。2ARを用いてこれらペアの解離定数を測定したところ、それぞれ48.7、20.4 nMであり、また、E3-K4標識法とorthogonalであったことから、ヘテロ会合を検出できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜において異なる膜タンパク質同士が会合(ヘテロ会合)することが、膜タンパク質の機能発現に重要であり、異常なヘテロ会合は疾患の原因になることがある。しかし、生きた細胞上でこのヘテロ会合を精度良く検出する方法はこれまでになかった。本研究では、蛍光イメージングに用いることのできる膜タンパク質の新規標識法を開発し、我々がすでに開発した方法と併用することで、生きた細胞上で、膜タンパク質の機能を損なうことなく、精度良くヘテロ会合を検出する道を拓いた。

研究成果の概要(英文)：To detect heterooligomer formation of membrane proteins, we developed novel tag-probe pairs that are orthogonal to our original E3-K4 coiled-coil labeling method. The EN3.5 tag-KN3.5 probe and EN24 tag-KN24 probe pairs containing one and two Asp residues, respectively, at the recognition site, were designed. The dissociation constants for these pairs were determined 48.7 and 20.4 nM, respectively, using 2AR. Furthermore, these pairs were orthogonal to the E3-K4 coiled-coil method, suggesting a possibility of detection of heterooligomers.

研究分野：生物物理化学

キーワード：膜タンパク質 蛍光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 等の膜タンパク質の多くは単量体として存在するだけでなく会合体も形成することが報告されており、その機能は単量体内の構造変化だけでなく会合状態によっても調節されている可能性があると考えられている[1]。また、膜タンパク質の会合体にはホモ会合体だけでなくヘテロ会合体も存在し、特に GPCR のヘテロ会合体は様々な疾患への関与が示唆されている[2][3]が、その会合状態には未だ不明な点が多い。

現在、生細胞での会合状態の検出には、蛍光・発光タンパク質融合体を用いた FRET や BRET 等の手法が汎用されているが、これらの手法では、膜タンパク質に付加される蛍光タンパク質のサイズが約 30 kDa と大きいため、目的膜タンパク質の機能や会合状態に悪影響を及ぼす可能性が懸念されている。加えて、定量的な解析に必要なドナー/アクセプターの発現量比をコントロールすることは困難である。

これらの問題を解決すべく、我々は、E3 タグ (EIAALEK)<sub>3</sub> と K4 プローブ (KIAALKE)<sub>4</sub> 間で形成される強固で特異的なコイルドコイル型ヘテロ二量体に基づく標識法であるコイルドコイルラベル法[4]を開発した。この標識法では、目的タンパク質の N 末端に E3 タグを付加し、生細胞に発現させたのちに、それと特異的に結合する K4 プローブの蛍光標識体を添加することにより、細胞表面の目的タンパク質を選択的かつ強固に (Kd 値: 6 nM) 標識することが可能である。また、E3 タグ-K4 プローブ複合体の大きさは約 6 kDa と小さく、膜タンパク質の機能に与える影響が少ない。加えて、K4 プローブを任意の二色の蛍光色素で標識して混合投与することで、FRET のドナー/アクセプター標識比を正確にコントロールすることが可能であるといった利点がある。我々は、この標識手法とスペクトルイメージングによる FRET を組み合わせることにより、GPCR のホモ会合体の会合状態測定を可能とした[5]。

## 2. 研究の目的

ヘテロ会合体検出のためには、二種類の膜タンパク質をそれぞれ区別して標識する必要があるが、従来の E3 タグ-K4 プローブペアのみでは不十分である。そこで本研究では、従来の E3 タグ-K4 プローブペアと交差反応性がなく、かつ結合力の強い新規コイルドコイル型タグ-プローブラベルペアの開発を目指し、相互作用部位にアスパラギン残基を含むペア配列 (EN タグ-KN プローブ) の作製を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規タグ-プローブ配列の作製

新規タグ-プローブペアとして、E3 タグ-K4 プローブにおける相互作用部位のイソロイシン残基を一部アスパラギン残基に置換した EN<sub>3.5</sub> タグ-KN<sub>3.5</sub> プローブ[6]、およびアスパラギン残基をもう 1 つ導入した EN<sub>2.4</sub> タグ-KN<sub>2.4</sub> プローブをデザインした。2 種のプローブペプチドは、Fmoc 固相合成法により化学合成し、N 末端を AlexaFluor568 で標識した。β 2AR の N 末端に E3 タグ、EN<sub>3.5</sub> タグ、EN<sub>2.4</sub> タグを、C 末端にタグ付加膜タンパク質の発現確認用に EYFP を付加したプラスミド DNA (E3-β 2AR-EYFP、r-sp-EN<sub>3.5</sub>-β 2AR-EYFP、r-sp-EN<sub>2.4</sub>-β 2AR-EYFP) を作製した。なお、EN<sub>3.5</sub> タグ及び EN<sub>2.4</sub> タグの N 末端側には GPCR の細胞膜表面への輸送を促進することが報告されているシグナルペプチド r-sp (MKALCLLLLPLVGLLVSS)[7]を付加した。

### (2) 細胞実験

CHO-K1 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、37°C で 24 時間インキュベートした後、リポフェクション法により上記のプラスミド DNA を細胞に導入し、タグ付加 β 2AR を一過性発現させた。トランスフェクション後 24~29 時間の細胞を PBS (+) (pH7.4) で洗浄後、PBS (+) で希釈された AF568 標識プローブペプチドを添加し、添加後 15 分後に共焦点蛍光画像を得た。また、プローブ濃度の関数として細胞膜上のプローブ蛍光強度を測定することにより、解離定数を見積もった。

## 4. 研究成果

### (1) EN タグ-KN プローブによる細胞の標識

EN<sub>3.5</sub> タグ-KN<sub>3.5</sub> プローブ、EN<sub>2.4</sub> タグ-KN<sub>2.4</sub> プローブのペアはいずれも EYFP の蛍光と AF568 の蛍光が共局在していたことから、AF568 標識 KN プローブは細胞に発現した EN タグ付加膜タンパク質を標識できることが確認された。

### (2) E3 タグ-K4 プローブ、EN タグ-KN プローブ間の交差反応性の有無の確認

E3-β 2AR-EYFP、r-sp-EN<sub>3.5</sub>-β 2AR-EYFP をそれぞれ一過性発現させた細胞に対し、AF568-K4 プローブ、AF568-KN<sub>3.5</sub> プローブを添加し、蛍光画像を取得した。同様に、E3-β 2AR-EYFP、r-sp-EN<sub>2.4</sub>-β 2AR-EYFP をそれぞれ一過性発現させた細胞に対し、AF568-K4 プローブ、AF568-KN<sub>2.4</sub> プローブを添加し、蛍光画像を取得した。観察の結果、E3 タグ-KN<sub>3.5</sub> プローブ、EN<sub>3.5</sub> タグ-K4 プローブ及び EN<sub>2.4</sub> タグ-K4 プローブ間ではタグ付加 β 2AR の標識は観測されなかったのに対

し、E3 タグ-K4 プローブ、EN3.5 タグ-KN3.5 プローブ及び EN<sub>2</sub>4 タグ-KN<sub>2</sub>4 プローブ間ではタグ付加β2AR の標識が観測された。以上より、EN3.5 タグ-KN3.5 プローブ、EN<sub>2</sub>4 タグ-KN<sub>2</sub>4 プローブのペアは、従来の E3 タグ-K4 プローブペアと交差性なくタグ付加膜タンパク質を標識できることが明らかとなった。

### (3) EN タグ-KN プローブ間の解離定数 Kd の測定

EN3.5 タグ-KN3.5 プローブ間の Kd は  $48.7 \pm 16.7$  nM ( $n = 5$ )、EN<sub>2</sub>4 タグ-KN<sub>2</sub>4 プローブ間の Kd は  $20.4 \pm 3.3$  nM ( $n = 6$ ) と算出された。特に、EN<sub>2</sub>4 タグ-KN<sub>2</sub>4 プローブ間の Kd は E3 タグ-K4 プローブ間の Kd (6 nM) に近い値を示し、KN<sub>2</sub>4 プローブを約 100 nM、K4 プローブを約 30 nM 添加することで、それぞれ EN<sub>2</sub>4 タグ、E3 タグ付加膜タンパク質全体の 83% を標識可能であることが分かり、従来の E3 タグ-K4 プローブペアと併用することによって、生細胞膜上における膜タンパク質のヘテロな会合状態を正確に測定するための強力なツールとなることが期待できる。

### <引用文献>

- [1] Milligan G. The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization. *Mol. Pharmacol.*, 84, 158-169 (2013)
- [2] Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, Lee-Ramos D, Nieto N, Devi LA, Raphael R. AT1R-CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.*, 30, 2350-2363 (2011)
- [3] Lodwick D. Receptor double-trouble in preeclampsia. *Nat. Med.*, 7, 999-1000 (2001)
- [4] Yano Y, Yano A, Oishi S, Sugimoto Y, Tsujimoto G, Fujii N, Matsuzaki K. Coiled-coil tag-probe system for quick labeling of membrane receptors in living cell. *ACS Chem. Biol.*, 3, 341-345 (2008)
- [5] Kawano K, Yano Y, Omae K, Matsuzaki S, Matsuzaki K. Stoichiometric analysis of oligomerization of membrane proteins on living cells using coiled-coil labeling and spectral imaging. *Anal. Chem.*, 85, 3454-3461 (2013)
- [6] Thomas F, Boyle AL, Burton AJ, Woolfson DN. A set of de novo designed parallel heterodimeric coiled coils with quantified dissociation constants in the micromolar to sub-nanomolar regime. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 5161-5166 (2013)
- [7] Qwitterer U, Pohl A, Langer A, Koller S, Abdalla S. A cleavable signal peptide enhances cell surface delivery and heterodimerization of Cerulean-tagged angiotensin II AT1 and bradykinin B2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409, 544-549 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiaki Yano and Katsumi Matsuzaki	4. 巻 1862
2. 論文標題 Live-cell imaging of membrane proteins by a coiled-coil labeling method: Principles and applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 1011-1017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2019.02.009	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野淳、矢野義明、松崎勝巳
2. 発表標題 アスパラギン間相互作用に基づく新規コイルドコイルラベル法の開発
3. 学会等名 第17回 次世代を担う若手のためのフィジカルファーマフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Takano, Yoshiaki Yano, Katsumi Matsuzaki
2. 発表標題 Development of a novel coiled-coil labeling method for heterooligomer detection
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野淳、矢野義明、松崎勝巳
2. 発表標題 GPCRのヘテロ会合検出のための新規コイルドコイル型ラベルペアの開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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 分担 者	矢野 義明  (Yoshiaki Yano)  (60402799)	京都大学・薬学研究科・講師    (14301)	

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