

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770148  
 研究課題名（和文）「*in vivo* 光クロスリンク法」を用いた膜タンパク質間相互作用の網羅的解析  
 研究課題名（英文）Comprehensive analysis of membrane protein interactions by using *in vivo* photo-cross-linking technology.  
 研究代表者  
 樋野 展正 (Hino Nobumasa)  
 独立行政法人理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究チーム・研究員  
 研究者番号：90469916

## 研究成果の概要（和文）：

GPCR を始めとする膜タンパク質間の細胞内での相互作用を「*in vivo* 光クロスリンク法」によって調べた。GPCR 活性調節因子 RAMP1 の細胞外ドメインの適切な箇所にクロスリンカーとして働く非天然型アミノ酸を導入することで、GPCR の 1 種であるカルシトニン受容体様受容体と架橋を形成させることに成功した。また、異なる GPCR であるカルシトニン受容体とも同様の位置で架橋を形成したことから、RAMP1 がこれら受容体に対して同様の相互作用様式を以て結合することが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

To investigate the *in vivo* interaction between GPCRs and membrane proteins by a photo-cross-linking approach, a cross-linkable, non-natural amino acid was site-specifically incorporated at various positions of the extra-cellular domain of receptor-activity modified protein 1 (RAMP1) in mammalian cells. By exposing the cells to the light at 365 nm, the RAMP1 variants, each containing the non-natural amino acid at a specific site, were found to be efficiently cross-linked with the calcitonin receptor-like receptor, which is a GPCR known to interact with RAMP1. These variants were able to be cross-linked also with another GPCR, the calcitonin receptor. This observation revealed that RAMP1 binds to these different types of GPCRs directly, and the binding mode hardly changes, depending on the type of GPCR.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 ・分子生物学

キーワード：蛋白質間相互作用, 膜タンパク質, クロスリンク, 拡張遺伝暗号, 非天然型アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

「*in vivo* 光クロスリンク法」は、タンパク質生合成系を利用した生細胞中での非天然型アミノ酸の導入技術開発の実績を活かして申請者らが世界に先駆けて開発したものである。この手法は、①研究対象とするタンパク質に対して、クロスリンカーとして働く「非天然型アミノ酸」を生細胞中で部位特異的に導入し、②細胞に光を照射することによって相互作用しているタンパク質との間に架橋を形成させ、③安定化した複合体を細胞より抽出・精製し、その構成成分をウエスタンブロットや質量分析により解析することを基本とする。これにより、対象タンパク質と相互作用するタンパク質を網羅的に同定することができる。申請者は既にこの手法を細胞質中でのタンパク質間相互作用解析に適用することに成功していた(Hino, N. et al. *Nat. Methods* 2, 201-6, (2005), Hino, N. et al. *Nat. Protoc.* 1, 2957-62, (2007))。

この手法には、以下のような特長がある。

- ・ 架橋されたタンパク質どうしは共有結合によって繋ぎ止められるため、たとえ強い変性条件を用いたとしても、細胞からの抽出・精製時に複合体が解離する恐れがない。
- ・ 細胞内でダイレクトに相互作用しているタンパク質間のみ架橋が形成されるので、同定された相互作用は、細胞内での生理的な相互作用を反映する。

免疫沈降法のような従来の方法で膜タンパク質間の相互作用解析を行うには、細胞から膜タンパク質を抽出するのに十分な強さの界面活性剤を用い、且つ、相互作用自体を阻害しない条件を設定する必要があり、これは極めて困難である。そこで、本研究では上述した「*in vivo* 光クロスリンク法」の利点を活かし、同手法により膜タンパク質間の相互作用を解析することを試みた。

## 2. 研究の目的

生きた細胞内での膜タンパク質間相互作用を「*in vivo* 光クロスリンク法」によって解析する

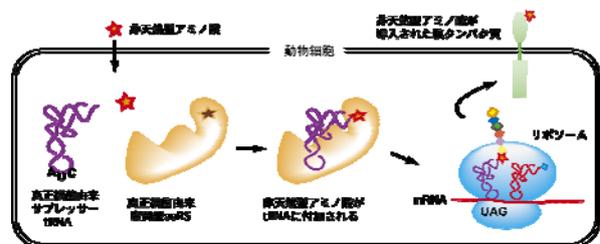
膜タンパク質は細胞膜上で他の膜タンパク質と複合体を形成することで多様な機能を発現する。特に、GPCR とその複合体は重要な創薬のターゲットである。従来、GPCR の研究は単体としての機能の解明に焦点が当

てられてきたが、その一方で、ホモ二量体やヘテロ二量体を組むことが数多く報告されている。二量体化した GPCR が自身の局在やりガンドへの結合性を変化させて新たなシグナルを生み出すケースもあり、複合体としての機能の解明が積極的に行われている。さらに、GPCR の一種であるカルシトニン受容体は RAMP (receptor-activity-modifying protein) ファミリーと呼ばれるモジュレータータンパク質群と相互作用することで初めて細胞膜へと輸送され、その組み合わせによって数種類のリガンドと結合することも知られている。このように、GPCR は他の GPCR や全く別のファミリーに属する膜タンパク質と相互作用することによって様々な機能を発現すると考えられるが、その組み合わせについてはいまだ限られた情報しか無い。本研究で申請者は「*in vivo* 光クロスリンク法」によって RAMP1 と相互作用する膜タンパク質を網羅的に同定し、複合体としての機能を理解するための基盤となるデータを収集する。

## 3. 研究の方法

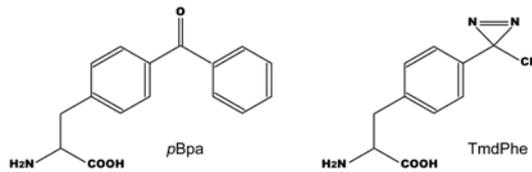
### (1) 膜タンパク質への部位特異的なクロスリンカーの導入

最初に、動物細胞内で、非天然型アミノ酸をタンパク質に部位特異的に導入する手法の概要を説明する。

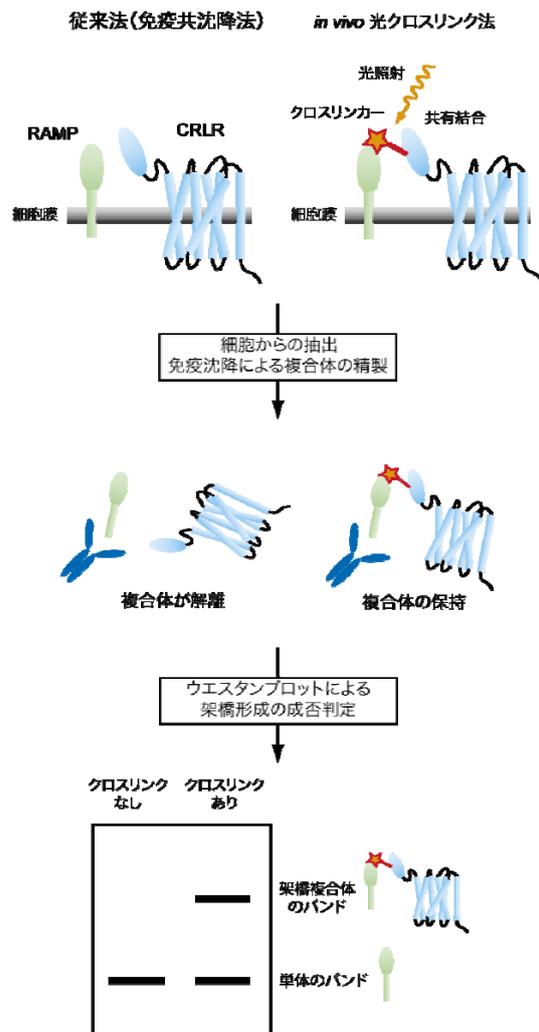


上図に示すように、真正細菌由来のアミノアシル tRNA 合成酵素 (以下、aaRS とする) の変異体とアンバー・サプレッサー tRNA を細胞内に発現させる。aaRS はアミノ酸を tRNA に結合させる酵素だが、ここでは非天然型アミノ酸を特異的に認識するように改変されている。培養液中に添加された非天然型アミノ酸は細胞内に取り込まれ、変異型 aaRS の働きでサプレッサー tRNA に特異的に付加される。一方、注目するタンパク質の遺伝子上において、目的の部位を終止コドンの一つであるアンバー・コドン (UAG) に改変しておくことで、望みの部位に非天然型アミノ酸を持つタンパク質を発現させることができる。申請者は、クロスリンカーとして働く非天然型アミノ酸として、

パラベンゾイルフェニルアラニン (*pBpa*) とトリフルオロメチルジアジリルフェニルアラニン (*tmdPhe*) という2種類のアミノ酸を利用できるシステムを開発している。これらは側鎖の大きさやクロスリンカーとしての化学的特性が異なるため、ケースに応じて使い分けを行った。



(2) 膜タンパク質間のクロスリンク  
RAMP1とCRLRのクロスリンク実験を例に、実験手法のスキームを以下に示す。



まず、RAMP1の細胞外ドメインに対し、哺乳類培養細胞中でクロスリンカー (*pBpa* もし

くは *tmdPhe*) を部位特異的に導入した。RAMP1のC末端には、精製及び検出のためにFLAG タグを付加した。また、CRLRについてもC末端に *myc* タグを融合したタンパク質として同時に発現させた。クロスリンカーの導入箇所に関しては、RAMP1の細胞外領域の構造に関する報告 (Kusano, K. et al. *Protein Sci.* 2008), CRLRとの相互作用領域に関する報告 (Simms, J. et al. *Biophys. J.* 2006) を基に数十カ所選択した。この細胞に365-nmの波長を持つ光を照射すると、クロスリンカーが相互作用領域に導入されている場合には、細胞膜上で相互作用しているRAMP1とCRLRが架橋される。RAMP1及びRAMP1/CRLR架橋複合体を細胞から抽出し、抗FLAG抗体にて精製後、SDS-PAGEにより展開した。架橋複合体はSDS-PAGEによっても解離することなく、RAMP1とCRLRの分子量を足し合わせた位置に泳動される。これを利用し、抗FLAG抗体もしくは抗*myc*抗体を用いたウエスタンプロットによって架橋形成の有無を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) RAMP1とCRLRの相互作用解析

RAMP1と相互作用するGPCRを「*in vivo* 光クロスリンク法」によって解析するには、クロスリンカーを両者の相互作用表面に特異的に導入することが鍵となる。しかし、RAMP1とGPCRの相互作用表面は明確にはわかっていない。そこで、RAMP1の細胞外ドメインの構造情報や既知の相互作用因子であるカルシトニン受容体様受容体 (CRLR) との相互作用に必要な残基の情報からRAMP1とCRLRの相互作用表面を推定した。これを基に、RAMP1の細胞外ドメイン中の様々な箇所にもクロスリンカーとして働く非天然型アミノ酸であるパラベンゾイルフェニルアラニンを導入した変異体を作製した。それぞれの変異体についてCRLRと架橋が形成されるかどうかを調べた結果、効率よく架橋が形成される数種類の変異体を得ることができた。また、クロスリンカーの導入箇所と架橋の形成効率を照らし合わせることによって、両者の相互作用様式についての詳細な情報を得た。

##### (2) RAMP1とGPCR群の相互作用解析

上記実験の結果を基に、適切な位置にクロスリンカーを導入したRAMP1変異体が他のGPCRと架橋するかどうかを調べた。しかし、カルシトニン受容体 (CTR) を始めとする他のGPCR群との架橋の形成は見られなかった。そこで、クロスリンカーの導入箇所をより幅広く選択するとともに、クロスリンカーの種類をジアジリル基を含むものに変更してさらなる検討を行ったところ、CRLR及びCTRと架橋しうる変異体を得ることに成功した。この結果は、RAMP1がCRLR、CTRに対して似たような相互作用様式で結合することを示すものである。

以上の結果は、膜タンパク質複合体を生き細胞内で架橋、安定化して単離することで、膜タンパク質間の直接的な相互作用解析が可能になるこ

とを示している。また、クロスリンカーを部位特異的に導入できるという利点を活かし、架橋した2つのタンパク質の相互作用表面についての情報を同時に得られることを示した。また、細胞に光を照射する際に、細胞膜上で複合体を形成しているもののみ架橋されるので、得られた結果が実際に細胞内で生じている生理的な相互作用を反映するという点でも有意義である。

研究成果(1)では、RAMP1とCRLRとの間の相互作用解析を「*in vivo* 光クロスリンク法」によって調べ、クロスリンカーの導入箇所と架橋の形成効率を照らし合わせることによって、両者の相互作用様式についての情報を得た。最近、RAMP1、CRLR両者の細胞外ドメインの共結晶構造モデルが報告された(Koth, C.M. et al, *Biochemistry*, 2010)が、本研究で得られた相互作用情報はこの構造と矛盾しない物であり、「*in vivo* 光クロスリンク法」の妥当性が示された。研究成果(2)では、RAMP1とCRLR、CTRが同様の相互作用様式をもって結合していることを示した。CRLR、CTRはともにclass Bに属するGPCRである。Class B GPCRはそのN末端に共通のフォールドを持つ細胞外ドメインを持ち、CRLR、CTRではこのN末端部分がRAMP1との相互作用を担っている。従って、RAMP1と他のclass B GPCRが相互作用する場合にもこのような相互作用様式が保存されていると考えられる。すなわち、CRLR、CTRと架橋を形成するRAMP1変異体は同様に他のclass B GPCRと架橋することが期待されることから、RAMP1架橋複合体を細胞から抽出し、その構成成分を質量分析によって同定することで、当初の目的であった網羅的解析が可能になるだろう。一方で、クロスリンカーの種類によって、架橋にかかる位置や効率が異なることもわかってきた。動物細胞内でタンパク質に導入できる非天然型アミノ酸の種類は研究開始当初より拡充しており(Mukai, T. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008)、鎖長や化学的性質の異なるクロスリンカーを導入することで、より普遍性が高く、効率の良いシステムを構築できると考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

樋野 展正, タンパク質の特定のモチーフを介するタンパク質間相互作用の細胞内光クロスリンク法による網羅的解析, BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会, 2008年12月12日, 神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://protein.gsc.riken.jp/sakamoto>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

樋野 展正 (Hino Nobumasa)

独立行政法人理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究チーム・研究員

研究者番号: 90469916