

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390007

研究課題名（和文） 新規小分子蛍光ラベル法による生細胞での受容体の可視化解析

研究課題名（英文） Visualization and analysis of receptor oligomerization in living cells by using novel fluorescence labeling method

研究代表者

松崎 勝巳 (MATSUZAKI KATSUMI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00201773

研究成果の概要（和文）：近年開発した、膜タンパク質への悪影響が少ない新規蛍光ラベル法（コイルドコイルラベル法）を用いて、生細胞環境での膜タンパク質会合状態を正確に解析する手法を確立した。この手法を用いれば、既存の会合測定法では困難であった、会合数（何量体を形成しているか）の解析が容易に行える。

研究成果の概要（英文）：An accurate method to analyze oligomeric state of membrane proteins in living cells by using novel fluorescence labeling method (coiled-coil labeling method) has been established. The method enables analysis of association number of target proteins, which has been difficult by using conventional methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：蛍光イメージング・GPCR・オリゴマー化

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質である G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、最重要の創薬ターゲットである。GPCR の機能を解析するには、リガンド結合によるオリゴマー化やコンフォメーション変化、脂質マイクロドメイン（ラフト）への局在を明らかにする必要がある。オリゴマー化やラフトへの局在を計測する手法として界面活性剤による膜の可溶化を行うことが多いが、この操作により細胞膜上での本来の GPCR の状態が変化する可能性がある。従って、生細胞膜での膜タンパク質の挙動を検出する手法の発展が欠かせない。

これまで GFP 等の蛍光タンパク質を膜受容体と融合させて発現させ、共焦点レーザー顕微鏡等で細胞内局在やオリゴマー化を検出する手法が汎用されているが、蛍光タンパク質は GPCR と同程度の大きさを持ち（GFP では 238 アミノ酸）、受容体本来の局在、機能、会合状態に悪影響を与える場合がある。また、受容体の会合を FRET で検出する際、ドナー、アクセプターとなる 2 種類の蛍光色素のラベル比をコントロールすることが重要であるが、複数種の蛍光タンパク質の発現量比のコントロールは容易ではない。これらの欠点を補う次世代の特異的蛍光ラベル法として、

目的のタンパク質に短いタグ配列を融合させて発現させ、外部からタグ配列に特異的に結合する蛍光ラベルプローブを加え特異的ラベルを行うケミカルラベル法が近年盛んに研究されている。

ケミカルラベル法の一つとして、申請者らは最近、E3 タグ配列(EIAALEK)₃を融合して発現させた受容体に、蛍光ラベル K4 プローブペプチド(KIAALKE)₄を加え E3-K4 間の強固なコイルドコイル構造形成を利用して特異的ラベルを行うコイルドコイルラベル法を開発し、特許出願をした [特願 2009-534428]。本方法は、新聞報道もなされた。

コイルドコイルラベルは、

- (1) GFP の 1/5 程度の小分子であり、
 - (2) 受容体機能に影響しない。
 - (3) 蛍光色素部分を自由に変えられるため、多色ラベル及びラベル比のコントロールが容易、
 - (4) 膜タンパク質の細胞外ドメインのみをラベル化できる、
 - (5) 特異性が高く (Kd が数 nM)、
 - (6) バックグラウンド染色がない、
 - (7) 1 分以内にラベル化が完了する、
 - (8) 細胞毒性がない、
- などの優れた特徴を持ち、膜タンパク質の生細胞イメージングに最適なケミカルラベル法である。

2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質、特に GPCR の生細胞膜での挙動を解明することを目的として、コイルドコイルラベル法により生細胞膜におけるリガンド投与前後の受容体の会合(オリゴマー化)や、コンフォメーション変化を検出・解析する手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

N末端に E3 タグを付加した各膜タンパク質遺伝子を作成し、一過性発現させる場合はプラスミド pcDNA3 に、安定発現させる場合は pcDNA5 に組み込んだ。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞または Human embryonic kidney (HEK) 293 細胞への発現は、トランスフェクション試薬(リポフェクトアミン)を用いて行った。スペクトル検出器を備えた共焦点顕微鏡を用いて蛍光イメージングを行い、各蛍光色素由来の蛍光強度を得た。

4. 研究成果

コイルドコイルラベル法を用いた蛍光励起エネルギー移動(FRET)法により、生細胞膜での

膜タンパク質会合を検出した。CHO細胞膜上で、ダイマー形成が予想される代謝型グルタミン酸受容体1bサブタイプ(mGluR1b)およびモノマーで存在すると予想されるGlycopholin AのG86I変異体(GpA*)の会合stoichiometryを解析した。E3-mGluR1bまたはE3-GpA*発現CHO細胞に、FRETドナー/アクセプターペアであるローダミングリーン(RG)/テトラメチルローダミン(TMR)標識K4プローブを様々な比率で混合投与し、共焦点顕微鏡を用いて各蛍光色素由来の蛍光強度を定量した。各ラベル比での見かけのFRET効率Eappをアクセプター増感蛍光を指標に決定し、会合数nの時の理論曲線との比較を行った所、mGluR1bはダイマー(n=2)の理論曲線と良く一致し、GpA*ではモノマー(n=1)に近い曲線だった。また、mGluR1bの発現量が変わっても観測されたEappは一定であった為、色素間のランダムな接近によるFRETの影響はなく、かつダイマー形成が強固なものであることが確認できた。β2アドレナリン受容体はGPCRの中でも最も良く研究されている受容体の一つだが、その会合状態に関しては研究グループ間で論争となっている。そこでChinese hamster ovary (CHO)細胞膜上での、β2アドレナリン受容体の会合状態を調べた。FRETドナー/アクセプターペアであるローダミングリーン(RG)/テトラメチルローダミン(TMR)標識K4プローブを様々な比率で混合投与してN末端E3タグ付加受容体を標識し、蛍光強度の定量およびEapp算出を行った。受容体リガンド非存在下、有意なFRETは見られなかった。発現方法(一過性発現または安定発現)や温度(20-37°C)に関わらず、FRETシグナルは検出されなかった。また受容体アゴニスト・アンタゴニスト・逆アゴニストを添加した場合にも、FRETシグナルは見られなかった。この解釈として1)オリゴマー形成せずに単量体として存在する、2)他の受容体と会合している、また、RG/TMRペアのR₀は約55Åであることから3)自己会合しているがN末端がR₀に比べ大きく離れており検出できていない、などの可能性が考えられた。そこで、RG-TMRペアよりも長いR₀を持つFRETペア(Alexa568-Alexa 647)を用いて、N末端同士がより離れている場合(80Å程度)でもFRET検出が行えるよう改良した。この色素ペアを用いて、単量体・2量体・4量体を形成すると言われている膜タンパク質GpA G83I mutant・mGluR1b・M2 channel proteinのCHO細胞膜での会合状態を解析したところ、測定値がそれぞれ単量体・2量体・4量体の理論値とよく一致することが明らかになった。従って、この方法で生細胞膜での

膜タンパク質の会合状態が正確に解析可能なこと、また上述の各膜タンパク質が多量体のスタンダードとして有用であることが確かめられた。そこで、会合状態について論争のあるβ2アドレナリン受容体について再びFRET測定を行った。発現方法（一過性発現または安定発現）や温度（20–37℃）、発現させた細胞種（CHO, HEK293）に関わらず、FRETシグナルは検出されなかった。また受容体アゴニスト・アンタゴニスト・逆アゴニストを添加した場合にも、強いFRETシグナルは見られなかった。HEK293細胞に受容体を発現させ、アゴニストであるイソプロテレノール刺激後に、弱いFRETシグナルの増加が見られたが、FRET強度の経時変化を測定したところ、刺激5分以内に開始するcAMP応答に遅れて、刺激10分後以降にFRET値の上昇が観測された。従って観測されたFRETは、受容体による下流シグナル活性化機能とは無関係であるといえる。以上の結果より、β2アドレナリン受容体はホモオリゴマーを形成せず単量体として存在するか、他の受容体等とヘテロ会合体を形成している、またホモオリゴマーを形成しなくても受容体として機能する、と結論した。また、受容体コンフォメーション変化検出に関しても検討を行った。β2アドレナリン受容体の膜貫通ヘリックス1–7の細胞側にE3タグを挿入した変異体を作製したが、膜貫通ヘリックス1付近にタグを挿入した場合のみ弱い染色が見られ、他の部位では染色されない事が判明した。以上、本研究で確立した会合状態解析法は、従来困難であった生細胞膜でのタンパク質会合の定量評価を初めて可能にした点で画期的であり、今後様々な膜タンパク質の会合状態解析への適用が期待できる。

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）

〔雑誌論文〕（計3件）

① Yoshiaki Yano, Kenichi Kawano, Kaoru Omae, and Katsumi Matsuzaki
Coiled-coil tag-probe labeling method for live-cell imaging of membrane receptors. *Methods Enzymol.* 504, 355–370 (2012)
DOI:10.1016/B978-0-12-391857-4.00018-5

② 松崎勝巳, 矢野義明.
新規蛍光ラベル法による膜受容体の内在化の可視化
生化学 82, 494–497. (2010)
<http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/i>

ndex.html

③ Yoshiaki Yano and Katsumi Matsuzaki
Tag-probe fluorescent labeling methods for live-cell imaging of membrane proteins *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 2124–2131 (2009)
DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.07.017,

〔学会発表〕（計9件）

① Katsumi Matsuzaki, Kaoru Omae, Yoshiaki Yano Internalization and oligomerization of membrane receptors in living cells as detected by novel coiled-coil fluorescence labeling methods
5th International Peptide Symposium 2011.12.6 Kyoto International Conference Center (京都府)

② Yano Y, Kawano K, Omae K, Matsuzaki K
Detection of oligomerization and internalization of membrane receptors in living cells by novel coiled-coil fluorescence labeling method
AIMECS11 2011.11.29 京王プラザホテル (東京都)

③ 松崎勝巳, Behaviors of receptors as analyzed by novel fluorescence labeling method for membrane proteins
第49回日本生物物理学会シンポジウム（招待講演）2011.9.16 兵庫県立大学（兵庫県）

④ 河野健一、大前薫、矢野義明、松崎勝巳
Family A GPCRの受容体活性に会合体形成は本当に必要か
第9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 2011.9.12 ホテル箱根アカデミー（神奈川県）

⑤ 矢野義明、大前薫、竹田有希、松崎勝巳
コイルドコイル蛍光ラベル法：次世代の膜受容体可視化ツール
第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 富山国際会議場（富山県）
2010年11月29日

⑥ 松崎勝巳

新規蛍光標識法による膜受容体の可視化解析
とリガンドスクリーニング
第28回物性物理化学研究会

2010年6月4日

京都大学（京都府）

⑦ 大前薫、矢野義明、松崎勝巳

新規小分子蛍光ラベル法による生細胞での
GPCRオリゴマーの検出

日本薬学会第130年会岡山大学（岡山県）

2010年3月28日

⑧ Yoshiaki Yano, Kaoru Omae, and Katsumi Matsuzaki.

Oligomerization of membrane receptors:
FRET analysis using coiled-coil
tag-probe labeling and spectral imaging
Biophysical Society 54th annual meeting
San Francisco (USA)

2010年2月23日

⑨ Yoshiaki Yano, Kaoru Omae, and Katsumi Matsuzaki,

Detection of internalization and
oligomerization of membrane receptors
using coiled-coil fluorescence labeling
method

第46回ペプチド討論会

北九州国際会議場（福岡県）

2009年11月4日

〔図書〕（計2件）

① 松崎勝巳、矢野義明、他58名

ナノバイオ技術と最新創薬応用研究「新規蛍
光標識法を用いた創薬ターゲット膜受容体
のイメージング解析」、35-39、メディカルド
ウ（2012）

② 松崎勝巳、矢野義明、他120名

薬学分析化学の最前線 170-171 じほう
（2009）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 勝巳 (MATSUZAKI KATSUMI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00201773

(2) 研究分担者

矢野 義明 (YANO YOSHIAKI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60402799

(3) 連携研究者

なし