

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790044

研究課題名（和文）一分子蛍光測定による膜受容体の構造変化・リガンド結合解析

研究課題名（英文）Analysis of structural change and ligand binding of membrane receptors by single molecule spectroscopy

研究代表者

矢野 義明 (YOSHIAKI YANO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60402799

研究成果の概要（和文）：無細胞合成でGタンパク質共役型受容体を合成し、リガンド結合能を持つ受容体を得ることおよび一分蛍光測定への応用を目指して研究を開始した。最初に、GPCRを組み込む環境として、脂質ナノディスクの調製を行った。昆虫由来の無細胞合成系で合成したβ2アドレナリン受容体がりガンド結合能を持つか確認するために、リポソーム共存下で合成した受容体への蛍光リガンドCA200689の特異的結合を全反射蛍光顕微鏡で観察したが脂質膜への非特異的吸着が多く見られた。また、蛍光リガンドとして報告例のあるノルアドレナリン誘導体Cy3-NAおよび、より非特異的吸着が少ないと予想されるAlexa647-NAの合成を行い、CHO細胞に発現したβ2受容体をコイルドコイルラベル法で染色し、蛍光リガンドと共染色できるか試みたが、Cy3-NA、Alexa647-NAのいずれでも受容体を染色する事ができなかった。今後より特異性の高い蛍光染色法の開発が必要だと考えられる。また、無細胞合成でリガンド結合能を持つ受容体を得るためにはタンパク質透過チャネルを含む膜の添加が必要だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In vitro synthesis of G protein coupled receptors (GPCRs) was examined to develop experimental systems useful for single-molecule fluorescence measurements. Firstly, lipid nanodiscs proteins were prepared as a platform for folding of GPCRs. Secondary, β2 adrenergic receptors were synthesized in insect-derived cell-free translational system in the presence of liposomes and ligand-binding ability was assessed by binding of fluorescent ligand. However, a commercially available fluorescent ligand had a significant nonspecific binding to lipid membranes. To find fluorescent ligands with little nonspecific binding, Cy3- and Alexa647- labeled noradrenaline were synthesized. Both Cy3-NA and Alexa647-NA did not have sufficient binding affinity to the receptors that were expressed on CHO cells, suggesting importance of further development of probes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生体膜の生物物理学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：一分子蛍光・GPCR・無細胞合

## 1. 研究開始当初の背景

最重要の創薬ターゲット分子群である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) をはじめとする多くの重要なタンパク質は膜タンパク質であるが、膜タンパク質はその高い疎水性のためハンドリングが難しく、水溶性タンパク質研究で汎用される手法がそのままでは適用できないことが多い。近年発達してきた一分子蛍光計測技術は、タンパク質の一分子レベルでのコンフォメーション変化やリガンド結合のダイナミクス解析を可能にする非常に強力な手法であり、今後膜タンパク質研究でも広い適用が予想される有望な手法である。しかしながら GPCR での測定例は現在殆どなく、これを汎用の手法とするためには、生体膜環境に近い条件で GPCR を可溶化し、かつ特異的蛍光標識に有利な実験系の確立が重要な課題だと考えられる。

生細胞 (大腸菌、昆虫細胞、哺乳類細胞) に発現させた膜タンパク質を単離・精製するには、界面活性剤ミセルによる可溶化が行われる (図 1 A) が、ミセル環境は生体膜本来の脂質二分子膜環境とは根本的に異なり、タンパク質の不可逆的変性や凝集を伴うことも多い。膜タンパク質の活性はしばしば脂質組成に大きく影響されることも考慮すると、リポソーム (図 1 B) やアポリポタンパク質と脂質の複合体である脂質ナノディスク (図 1 C) などの脂質二分子膜系に膜タンパク質を組み込む実験系が必要である。特に脂質ナノディスクはリポソーム系に比べて 1) サイズが小さく (直径約 10nm、リポソームは 40nm 以上)、かつ 2) 粒子径の均一性が非常に高いため、一分子ずつ膜タンパク質を組み込むのに適しており、一分子蛍光計測との相性が良い。また、3) リポソームと異なり、薬物等を外部から加える際に膜の両面からアク

セス可能である点も、GPCR と相互作用しうる様々な薬物やタンパク質 (G タンパク質、 $\beta$  アレスチン等) の影響を調べる上で有利である。

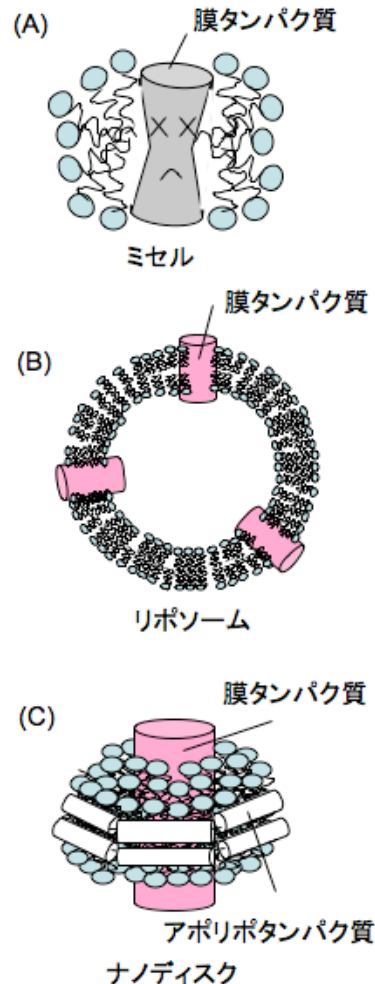


図 1 膜タンパク質を可溶化させるための (A)ミセル、(B)リポソーム、(C)脂質ナノディスク系

## 2. 研究の目的

本研究では GPCR である  $\beta_2$  アドレナリン受容体をテストケースとして、無細胞合成で膜タンパク質を調製する技術を確認し、それを用いて蛍光一分子計測を行うことを目指す。具体的には

1) 無細胞合成系を用いて、高効率で GPCR を

### 合成する条件の検討

#### 2) 蛍光リガンドのGPCRへの結合測定

コイルドコイルラベル法でC末端を蛍光標識したGPCRを用いた受容体の蛍光検出を行う。

#### 3. 研究の方法

本研究で用いる無細胞合成、脂質ナノディスク調製は報告された方法を元に、一分子蛍光計測系は申請者らで確立済みの手法をベースに、GPCR研究に適用するための基礎検討と蛍光検出を行う。GPCRを高効率で脂質膜に組み込むのに必要な条件を検討する。また、蛍光リガンドのGPCRへの結合を測定する。また末端をコイルドコイルラベル法で特異的蛍光標識したGPCRを用い、CHO細胞発現系で蛍光検出を試みた。Apo-A1改変タンパク質の遺伝子を入手し(Addgene)、大腸菌でのリコンビナント合成・精製を行った(Methods Mol. Biol. (2009) 498, 273)。膜タンパク質の合成については、大腸菌および小麦胚芽由来の合成系での報告例が多い(New Biotech. (2010) in press)が、糖鎖修飾を考慮して、近年キット化されている昆虫由来(shimadzu)の合成系を用いた。この際、コイルドコイル蛍光ラベル法を適用できるように、受容体末端にE3タグ配列(EIAALEK)<sub>3</sub>配列を融合した遺伝子E3-β2AR/pTD1を作成した。タンパク質合成溶液に含まれる受容体をコイルドコイルラベル用の蛍光色素Cy3Bで標識したK4プローブCy3B-(KIAALKE)<sub>4</sub>(561nm励起)や、蛍光リガンドCA200689(propranololの蛍光標識体、637nm励起)で蛍光標識し、全反射蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

無細胞合成でGタンパク質共役型受容体を合成し、リガンド結合能を持つ受容体を得ることおよび一分蛍光測定への応用を目指して研究を開始した。最初に、GPCRを組み込む環境

として、脂質ナノディスク用アポリポタンパク質(MSP1D1)の調製を行った。pET28a/MSP1D1遺伝子は大腸菌BL-21(DE3)pLysS株へ導入し発現を試みたが全く発現しなかった。そこで、菌株をより高発現が期待できるBL-21 Gold(DE3)に変更したところ、MSPタンパク質の発現が見られた。Niカラム精製を行い高純度のタンパク質溶液を得た。菌液1Lあたり30mg以上の精製タンパク質を回収可能であることを確認した。昆虫由来の無細胞合成系で合成したβ2アドレナリン受容体リガンド結合能を持つか確認するために、リポソーム共存下で合成した受容体への蛍光リガンドCA200689の特異的結合を全反射蛍光顕微鏡で観察した。タンパク質合成効率はリポソーム添加によって減少しないこと確認した。蛍光リガンド溶液の容器への吸着を抑える工夫を行った後、リポソーム存在下で受容体の合成を行い蛍光リガンドの結合を評価したが、mRNA非添加のコントロールにおける非特異的吸着と比較して、有意なリガンドの結合は見られなかった。またCA200689の脂質膜への非特異的吸着が多く見られたため、一分子計測には不適と判断した。次に、蛍光リガンドとして報告例のあるノルアドレナリン誘導体Cy3-NAおよび、より非特異的吸着が少ないと予想されるAlexa647-NAの合成を行った。アミノ基反応性の蛍光色素スクシンイミジル誘導体を用いてノルアドレナリンのアミノ基を標識し、HPLC精製を行った。CHO細胞に発現したβ2アドレナリン受容体をコイルドコイルラベル法で染色し、蛍光リガンドと共染色できるか試みたが、Cy3-NA、Alexa647-NAのいずれでも受容体を染色する事ができなかった。結合力が低い、あるいは結合型の色素の量子収率が低いと考えられる。今後より特異性や輝度の高い蛍光染色法の開発が必要だと考えられる。また、無細胞合成

でリガンド結合能を持つ受容体を得るためにはタンパク質透過チャネルを含む膜など、受容体のフォールディングを助ける因子の添加が必要だと考えられる。

#### 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)

矢野義明 “生細胞膜タンパク質の会合・内在化の可視化解析ツール：コイルドコイルラベル法” 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日～30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[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

矢野義明 (YOSHIAKI YANO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60402799