

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390009

研究課題名(和文)新規膜タンパク質ラベル法の会合状態解析への応用と高機能化

研究課題名(英文) Application of novel labeling method for membrane proteins to aggregational analysis and its sophistication

研究代表者

松崎 勝巳 (Matsuzaki, Katsumi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00201773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の中には創薬標的として重要なタンパク質が多く含まれるが、その研究手法は現在非常に限られており、より良い手法の開発・発展は重要である。本研究では代表者らが開発した、生細胞での膜タンパク質の小分子蛍光ラベル法(コイルドコイルラベル法)を発展させ、1)従来法よりも格段に精度・定量性に優れた膜タンパク質会合状態イメージング解析法を確立し、複数の膜タンパク質の会合状態を明らかにした。2)コイルドコイルラベル法を共有結合化する方法を確立し、生細胞と可溶化した環境での会合状態比較を可能にした。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins include many important proteins for drug targets. Development of better experimental methods for membrane proteins is particularly important because of limitations in the current methods. Here we developed two in-cell analysis methods based on the coiled-coil labeling method. 1) An image analysis method for measuring protein oligomeric state was established and applied for various membrane proteins. 2) A crosslinking method was developed, which was useful for direct comparison of protein oligomeric states in live cells and solubilized micelles.

研究分野：生物物理化学

キーワード：膜タンパク質 オリゴマー化 蛍光イメージング クロスリンク

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR)をはじめとする膜貫通型タンパク質は、細胞外の様々なシグナルを受容し細胞内に伝える機能を持つ、創薬ターゲットとしても最重要のタンパク質群である。膜タンパク質の構造・機能の解明にリポソーム再構成系が用いられるが、脂質組成が膜タンパク質活性に大きく影響する例が多数ある。従って、ヘテロな脂質環境を持つ生細胞膜環境で膜タンパク質の挙動を検出する手法の発展は非常に重要である。膜中でのタンパク質間の会合形成は、EGF 受容体のような 1 回膜貫通型受容体の活性化に必須である。また GPCR の場合、最小の機能ユニットは単量体だが、会合により機能調節するモデルが定説になりつつある (Pharmacol. Rev. (2010)62,701)。これらの結論は主として生細胞で、GFP 等の蛍光タンパク質や発光タンパク質を膜タンパク質と遺伝子上で融合して発現させ、蛍光・発光励起エネルギー移動 (FRET・BRET) で検出・解析した研究から得られたものである。しかし、蛍光・発光タンパク質は GPCR と同程度かそれ以上の大きさを持ち (GFP では 238 アミノ酸)、タンパク質本来の機能に悪影響を与える場合がある。また、ドナー/アクセプター蛍光タンパク質のラベル比をコントロールするのは容易ではないため、会合状態を定量的に検出できない等の問題点があり、会合状態に関しては論争が続いている。さらに、これらの融合体では細胞膜・細胞内全てのタンパク質が標識されるため、細胞膜部位のみの挙動を観測困難な場合がある。これらの問題点を補う次世代の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・発現させ、外部からタグ配列に特異的に結合する蛍光標識プローブを加え特異的ラベルを行うタグ プローブラベル法が盛んに研究されている。

タグ プローブラベル法の一つとして、研

究代表者らは近年、E3 タグ配列 (EIAALEK)<sub>3</sub> を融合し発現させた膜タンパク質に、蛍光ラベル K プローブペプチド (KIAALKE)<sub>n</sub> (n = 3 or 4) を加え E3-Kn 間の強固なコイルドコイル構造形成を利用して特異的標識を行うコイルドコイルラベル法を開発し、特許取得して試薬として市販した。コイルドコイルラベル法は、

GFP の 1/5 程度の小分子であり、

膜タンパク質の機能に影響しない、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、膜タンパク質の細胞外ドメインのみをラベル化できる、

特異性が高く (K4: K<sub>d</sub> が数 nM)

バックグラウンド染色がない、

1 分以内にラベル化が完了する、

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タグ プローブラベル法である。この手法を応用し、GPCR の内在化を指標としてハイスループットでリガンドスクリーニングが行える系を確立した。

さらに、コイルドコイル法で 2 色標識した膜タンパク質間の FRET 解析により、生細胞膜上での会合数 (単量体、2 量体、4 量体) を明確に同定できることを見出した。この解析法を用いて、会合の報告例も多い  $\beta_2$  アドレナリン受容体の自己会合が非常に弱いとの予備知見を得ている。

以上のようにコイルドコイルラベル法は現時点でも膜タンパク質の内在化や自己会合を研究する上で有用な手法であるが、一方ではラベルの共有結合化や、さらなる小分子化など、さらに高機能化できる余地を残している。

## 2. 研究の目的

研究代表者らが開発した、膜タンパク質の

小分子蛍光ラベル法であるコイルドコイルラベル法を発展させ、以下の課題に取り組む。1) 従来法よりも格段に精度・定量性に優れた膜タンパク質会合状態解析法を用いて、重要な創薬標的分子であり、しかも会合が機能に関連するとされている class A GPCR や、EGF 受容体等の生細胞中での会合状態をリガンド投与やラフト局在との関連で解明する。従来説に反して、class A GPCR の自己会合力が非常に弱いとの予備知見を得ており、その一般性を詳細に検証する。また一方で、2) コイルドコイルラベル法の共有結合化によりさらなる高機能化を目指す。

### 3. 研究の方法

会合の検出・解析に関して、標的膜タンパク質への E3 タグ配列の付加を行った。Class A GPCR として $\beta_2$  アドレナリン受容体を、チロシンキナーゼ型受容体として EGF 受容体 (ErbB-1) (Li & Hristova *Biochemistry* (2006) **45**, 6241)、また、会合の報告が多くあるグリコホリン A および A 型インフルエンザ M2 チャネルの N 末端に E3 タグ配列 (EIAALKE)<sub>3</sub> を付加した。EGF 受容体およびグリコホリン A の場合、N 末端にシグナル配列が存在するため、シグナル配列と受容体配列の間に E3 タグ配列を挿入した。

E3 タグ付加受容体を、一過性発現用プラスミド pcDNA3 に組み込んだ。また必要に応じて、G418 選択により安定発現株を作成した。

細胞への発現とコイルドコイルラベルの確認に関して、CHO-K1 細胞および HEK-293 細胞にプラスミドを導入 (リポフェクトアミンを利用) して一過性発現を行い、蛍光標識 K4 プロープで染色した。FRET 蛍光色素ペアとして、十分に会合体の検出が可能な大きな臨界移動距離 (82 Å) をもつ Alexa 568 Alexa 647 ペアを用いた。各膜タンパク質に附加した時にコイルドコイルラベルの解離定数に変化がないか共焦点顕微鏡で確認した。

$\beta_2$  アドレナリン受容体の機能は、cAMP アッセイキット (PerkinElmer AlphaScreen Kit) で確認した。M2 のプロトン透過能は pH 感受性の蛍光色素 SNARF-4F を細胞導入し、外液 pH を変化させた時の細胞内 pH 変化で評価した。EGF 受容体の機能は、リン酸化チロシン抗体を用いてウェスタン法で確認した (Clayton et al. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**, 30392)。グリコホリン A の生理的機能は現在わかっていない。

共有結合化について、コイルドコイル部位の C 末端側にクロスリンカー部位 (Cys) を導入し、リシンはすべてアルギニンに置換した R3C プロープ (RIAALRE)<sub>3</sub>-GC を Fmoc 固相合成し、Cys に sulfo-GMBS クロスリンカーを導入しアミン反応性を持つプロープを作成した。標的タンパク質に付加するタグ配列としては ER3 配列 (M-(EIAALER)<sub>3</sub>-GKGSIEGR) を用いた。標的膜タンパク質を一過性発現した細胞に対するクロスリンク反応は、PBS(+) 中で 150 nM のプロープを加え、10 分ごとに新たなプロープに入れ替える操作を繰り返す事で行った。SDS-PAGE において、プロープ蛍光とウェスタン法によりグリコホリンを検出した。

### 4. 研究成果

会合の検出・解析について、コイルドコイルラベル法で標識した生細胞膜タンパク質の会合状態を、スペクトル検出器を備えた共焦点顕微鏡で FRET 解析した。

$\beta_2$  アドレナリン受容体について、発現方法 (一過性発現または安定発現) や温度 (20-37 °C) 発現させた細胞種 (CHO, HEK293) 受容体リガンドの有無によらず FRET シグナルが検出されない事を再確認した。また 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した時には例外的に弱い FRET シグナルが見られるものの、そのシグナル上昇は刺激 10 分後以降に

起こることから、少なくともリガンド投与直後のシグナル活性化機能とは無関係であると考えられた。以上の結果より $\beta_2$  アドレナリン受容体はホモ会合体を形成せずに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、またホモ会合体を形成しなくても機能すると結論した。

M2 チャネルタンパク質について、酸性 pH では四量体を形成するが、中性付近の pH では二量体を形成することが明らかになり、従来考えられているような安定な四量体ではなく、pH に応じて会合状態が可逆に変化する事を実証した。また、抗ウイルス薬アマンタジン塩酸塩存在下では酸性条件でも四量体形成が阻害され、二量体としてしか存在できない事が明らかになった。M2 のプロトン透過能を、細胞内 pH 変化を指標として測定した所、意外な事に四量体だけでなく、二量体でもコレステロールと複合体を形成する事でプロトン透過能を持つ事が判明した。以上より M2 の最小機能ユニットは二量体であると結論した。

EGF 受容体の EGF 刺激による二量体化に関して、FRET 色素ペアを変えて測定することで、受容体の N 末端色素間距離が約 56 であること、過剰の EGF 刺激時でも全体の 70% 程度の受容体しか会合体を形成しないことが明らかになった。二量体形成はリガンド刺激直後に開始し 20 秒程度で完了した。コレステロールやガングリオシド等の脂質ラフト構成脂質を減少させても会合状態に大きな違いは見られなかった。二量体化が最大値の 50% まで進行する EGF 濃度はリン酸化が 50% 進行する濃度よりも低かったことから低濃度 EGF 存在下ではリン酸化されていない二量体の存在が示唆された。

また、アミロイド前駆体タンパク質に関して、コイルドコイルラベル法で、細胞内への内在化速度が非常に速い事、細胞内では会合が促進している事が明らかになった。

これらの成果は、生細胞環境で様々なタイプの膜タンパク質の会合状態を正確に測定できる事を示すものであり、従来の蛍光タンパク質融合体では容易でなかった stoichiometry の解析、N 末端間の距離測定、秒オーダーの経時変化測定などが本方法で可能になった。

共有結合化に関して、グリコホリン A の生細胞膜上でのクロスリンク化を最適化した。FRET 測定用に、テトラメチルローダミンおよびローダミングリーン標識プローブを合成した。両プローブとも、プローブを 150 nM で 2 回処理する事で細胞膜標的タンパク質の 90% 程度をクロスリンクできる事が明らかになった。また 4 種類の蛍光色素で同程度のクロスリンク効率が得られる事を確認した。生細胞膜ではグリコホリン A の会合は見られなかったが、SDS-PAGE では部分的な二量体化を示す泳動パターンが得られた。また、生細胞膜のコレステロール除去によって、グリコホリン A の 2 量体化が促進する事が明らかになった。今回開発した共有結合型コイルドコイルラベル法により、様々な条件下での膜タンパク質の会合状態比較が可能になった。このクロスリンク法はタンパク質間相互作用の検出やアフィニティー精製にも有用だと考えられる。

## 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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

すべて査読あり

(1) “ Oligomerization-function relationship of EGFR on living cells detected by the coiled-coil labeling and FRET microscopy ”

Yamashita H, Yano Y, Kawano K, Matsuzaki K.

Biochim Biophys Acta. 1848, 1359-1366 (2015).

doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.004.

(2) "A dimer is the minimal proton-conducting unit of the influenza A virus M2 channel."

Kawano K, Yano Y, Matsuzaki K.

J Mol Biol. 15, 2679-2691 (2014).

doi:10.1016/j.jmb.2014.05.002

(3) 「新規小分子ラベル法と in-cell FRET を用いた膜タンパク質の会合状態の定量的解析」

河野健一

薬学雑誌 134,931-937(2014)

doi:http://doi.org/10.1248/yakushi.13-00251

(4) 「コイルドコイルラベル法を用いた膜受容体のイメージング解析」

矢野義明、松崎勝巳

膜, 38, 82-86 (2013)

doi:http://doi.org/10.5360/membrane.38.82

(5) Stoichiometric analysis of oligomerization of membrane proteins on living cells using coiled-coil labeling and spectral imaging

Kawano K\*, Yano Y\*, Omae K, Matsuzaki S, Matsuzaki K

(\*equally contributed to the work)

Anal. Chem. 19, 3454-3461 (2013)

doi: 10.1021/ac400177a

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 松崎勝巳 「コイルドコイル標識法と in-cell 蛍光測定法による生細胞膜上での膜タンパク質の会合計測」日本薬学会第 135 年会シンポジウム「タンパク質の会合・凝集：計測、メカニズムから制御まで」2015.3.26 神戸学院大学(兵庫県)

(2) 上山和輝、矢野義明、松崎勝巳 「生細

胞におけるアミロイド前駆体タンパク質の会合状態解析」日本薬学会第 135 年会 2015.3.27 神戸サンボホール(兵庫県)

(3) 古川奈美、矢野義明、小野智史、松崎勝巳 「共有結合型コイルドコイルラベル法の確立とグリコフォリン A の会合状態の解明」日本薬学会第 135 年会 2015.3.27 神戸サンボホール(兵庫県)

(4) 河野健一 「新規小分子ラベル法と in-cell FRET を用いた膜タンパク質の会合状態の定量的解析」第 64 回日本薬学会近畿支部大会 2014.10.11 京都薬科大学(京都府)

(5) 河野健一、矢野義明、大前薫、松崎紗矢香、松崎勝巳 「抗インフルエンザウイルス薬アマンタジン耐性 M2 S31N 変異株の生体膜における会合状態」日本薬学会第 134 年会 2014.3.28 熊本市総合体育館(熊本県)

(6) Ken-ich Kawano, Yoshiaki Yano and Katsumi Matsuzaki "The Amantadine-Resistant S31N Mutant of Influenza A Virus M2 Protein Stably Forms a Dimer on the Living Cells" Biophysical society 58<sup>th</sup> Annual meeting 2014.2.16 Moscone Center, San Francisco, CA (アメリカ合衆国)

(7) Ken-ich Kawano, Yoshiaki Yano and Katsumi Matsuzaki . "Dimer is a Minimal Functional Unit for Influenza A Virus M2 Channel on Biomembrane" Biophysical society 58<sup>th</sup> Annual meeting 2014.2.17 Moscone Center, San Francisco, CA (アメリカ合衆国)

(8) 山下博隆、河野健一、矢野義明、松崎勝巳

「コイルドコイル蛍光ラベル法を用いた生細胞での上皮成長因子受容体多量体形成の検出」第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2013.11.21 東京大学大学院薬学研究科(東京都)

(9) Ken-ich Kawano, Yoshiaki Yano and

Katsumi Matsuzaki. "Dimer is a minimal functional unit for influenza A virus M2 channel on biomembrane" 4<sup>th</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium 2013.11.6  
ホテル阪急エキスポパーク（大阪府）

(10)山下博隆、河野健一、矢野義明、松崎勝巳「コイルドコイル蛍光ラベル法を用いた生細胞での上皮成長因子受容体多量体形成の検出」第 11 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(PPF)2013  
2013.8.29 清水テルサ（静岡県）

〔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

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：00201733

### (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