

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650062

研究課題名(和文)ナノレベル分子間近接を可視化する方法の開発

研究課題名(英文)Visualization of molecular interactions at the nanometer scale

研究代表者

藤本 豊士 (Fujimoto, Toyoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50115929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質間相互作用部位を可視化する方法として、蛍光共鳴エネルギー移動法、蛍光タンパク質再構成法などがあるが、空間分解能は低い。本研究では急速凍結・凍結割断レプリカ標識法を基盤とする方法を構想した。原理は、1) 膜タンパク質A, Bの細胞質側ドメインに、それぞれビオチン化酵素BirAと基質ペプチドAcPを融合させ、2) 凍結割断レプリカ上でビオチン付加反応を起こさせ、3) 共有結合したビオチンを標識して、電子顕微鏡観察するというものである。種々の条件を検討したが、ビオチン化の検出効率が低く、満足な結果を得るに至らなかった。当初の目的を達成するためにはさらに異なる条件の検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Methods to visualize the location where two different proteins interact include fluorescence resonance energy transfer, bimolecular fluorescence complementation, and proximity ligation assay, but their spatial resolution is not high. In this study, we conceived an idea of a method based on quick-freezing and freeze-fracture replica labeling method. The principle of the method was: 1) tagging of biotinylation enzyme BirA and its acceptor peptide AcP to the cytoplasmic domain of two transmembrane proteins A and B, respectively; 2) biotinylation of AcP in freeze-fracture replicas; 3) immunolabeling and electron microscopic observation of biotins. Although various conditions were examined, satisfactory results were not obtained so far. Further trials using different conditions are needed.

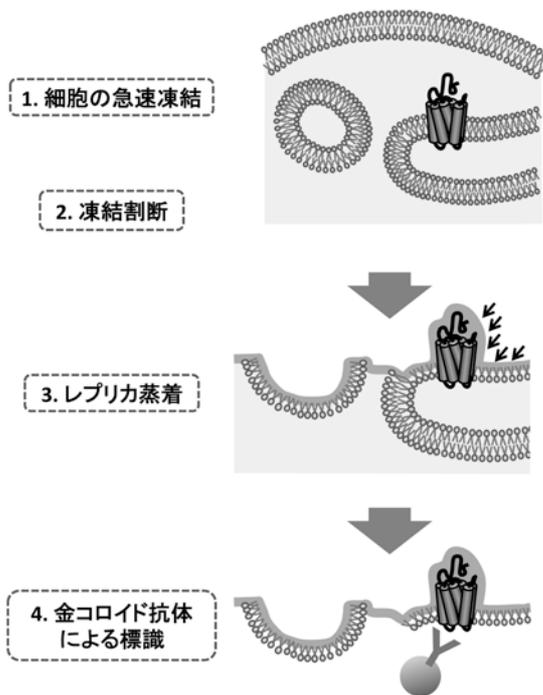
研究分野：細胞生物学

キーワード：生体膜 電子顕微鏡 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生体膜は流動性に富む2次元の液体であり、膜分子(タンパク質・脂質)は秒速数マイクロンにも及ぶ速度で側方拡散運動をしていると考えられている。このように動きの早い膜分子の局在を捉える方法として、申請者らは急速凍結・凍結割断レプリカ標識法(Quick-freezing & freeze-fracture replica labeling method: QF-FRL法)を用い、種々の膜分子のナノレベル局在を明らかにしてきた(図1)(Fujita et al, PNAS 106, 9256, 2009; Fujita et al, Nat Protoc 5:661, 2010 など)。

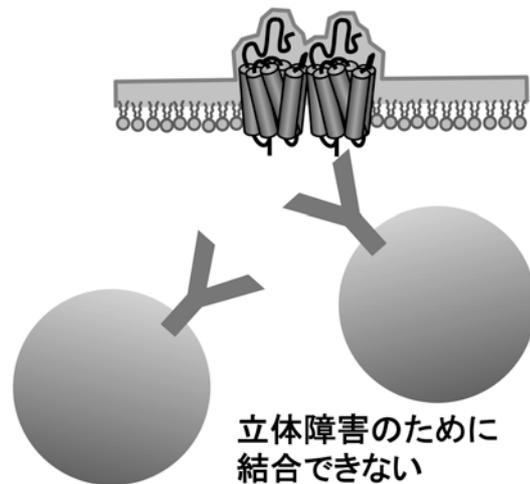
図1 QF-FRL法



QF-FRL法では、まず加圧凍結法もしくはメタルコンタクト法による急速凍結によって瞬時に分子運動を停止させた後、極低温下の凍結状態を保ったまま、白金とカーボンの薄膜を真空蒸着することによって膜分子をその場で物理的に固定する。ついで凍結割断レプリカを SDS で処理することによって膜の真表面を露出させたのち、膜分子(タンパク質、脂質、炭水化物)に特異的に結合するプローブを作用させて標識し、透過型電子顕微鏡で観察する。QF-FRL法は電子顕微鏡で膜平面を俯瞰するように観察することができるため、生体膜平面における膜分子の2次元分布に関する多くの情報を得ることができるという利点がある。

QF-FRL法で異なる2つの分子の間の相互関係を見る場合は、二重標識法を用いることができる。しかしながら標識に用いる抗体や金コロイドなどのサイズは小さめに見積もっても合計で10~15nm以上あるため、近接して存在する2つの分子の場合、立体障害のために標識が起こらない、もしくは標識効率

図2 従来の二重標識法の問題点



が著しく低下すると予想される。今回の研究ではこのような問題を回避し、タンパク質間だけでなく、タンパク質・脂質間が「ナノレベルで近接する部位」を可視化する方法を開発することを企図した(図2)。

タンパク質間の近接を解析するイメージング技術としては、蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)、蛍光タンパク質再構成法(BiFC)、近接ライゲーションアッセイ法(PLA)などが使われているが、光学顕微鏡を用いるため、分子間近接が生じる細胞内部位を特定するための空間分解能は低い。また免疫共沈降法も二分子間の近接や結合を検出するための方法に含めることができるが、細胞を破碎することを前提とした生化学的方法であるため、細胞内のどこで近接しているかを見るには適さない。今回の研究で開発をめざす方法では、電子顕微鏡で観察することによりナノレベルの分子間近接の解析が期待できる。また近接が生じる部位の微細形態を直接可視化することも大きな特色である。

さらにQF-FRL法の重要な利点として、膜タンパク質だけでなく、膜脂質も同じように可視化できることがある。この利点を生かすことにより、タンパク質間だけでなく、タンパク質・脂質間の近接を検出することが可能である。タンパク質・脂質間近接の解析は他の方法では原理的に困難であり、この検出方法が確立されれば、タンパク質機能や分布を調節する際の脂質の役割を解析する上で貴重なツールとなることが期待される。またさらに後述するように酵素やアクセプターペプチドとプローブの間をつなぐリンカー部分の長さを変えることにより近接する分子間の距離の見積りが可能なこともユニークな点であると言える。

分子間近接の詳細な解析が有用と思われる例として、アルツハイマー病の発症に関わると推測されているγセクレターゼとAmyloid precursor protein (APP)の関係がある。

γ セクレターゼと APP の間の近接と相互作用が細胞内のどのオルガネラで起こるかを解明することは、アルツハイマー病の発症機序を理解し、予防・治療に新たな展望を開くものと期待できる。

2. 研究の目的

ビオチンリガーゼ BirA による基質ペプチド (acceptor peptide, AcP) のビオチン化修飾反応を QF-FRL 法に応用することにより、2つの異なるタンパク質がナノレベルの距離に近接する場合にのみ AcP のビオチン化が起き、電子顕微鏡で観察可能な標識が生じる方法を確立する。この解析手法を応用することにより、 β アミロイド産生に関わると推測されている γ セクレターゼと APP の近接が生じる細胞内オルガネラの部位を特定する。さらに上記の方法をタンパク質と脂質間の解析にも応用し、両者がナノレベルで近接する部位を解析する方法を開発する。

3. 研究の方法

凍結切断レプリカ上で2つの膜タンパク質間が近接する部位を検出する系を確立する。実証実験には申請者が QF-FRL 法で良好な結果を得ている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いる (図3)。出芽酵母は遺伝子改変が容易であり、外因性遺伝子を生理的発現レベルで導入できる、QF-FRL 法で多くの細胞を一度に観察できるなどの利点がある。

図3 酵母細胞膜のPI(4,5)P₂標識



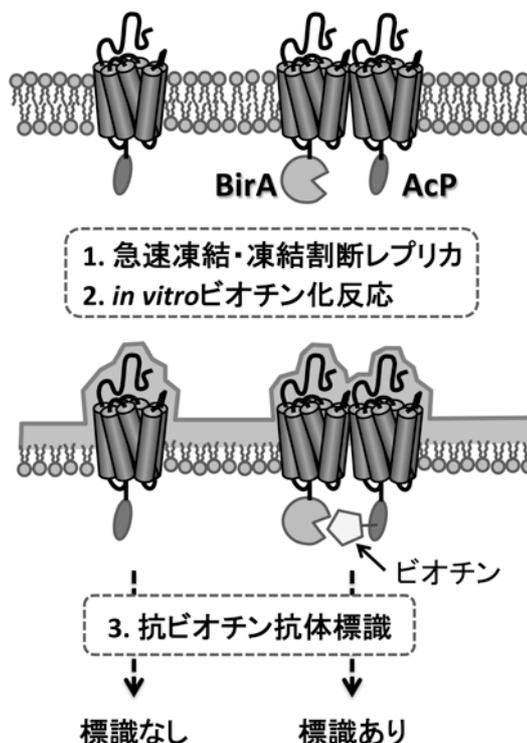
方法確立を行う際のモデル分子としてフェロモン受容体 STE2p を用いる。この分子は7回膜貫通型の G タンパク質共役受容体で、C 末端欠失変異体 (STE2DTail) はホモ2量

体として細胞膜に局限して存在することが知られている (Overton and Blumer, Curr Biol 10, 341, 2000)。

まず BirA または AcP を付加した Ste2p Δ Tail コンストラクトを作製し、内因性 STE2 を欠失させた酵母株に共発現させる。2つのコンストラクトから発現するタンパク質分子 Ste2p Δ Tail-BirA, Ste2p Δ Tail-AcP には抗体標識用にそれぞれ異なるタグ (FLAG と V5) が付加されるように設計する。Ste2p Δ Tail-BirA, Ste2p Δ Tail-AcP が十分量発現し、予定通り細胞膜に分布することを確かめるために、タグに対する抗体を用いて QF-FRL 法で検証する。

ついで凍結切断レプリカを用いて *in vitro* ビオチン化反応を行う。この際、通常の QF-FRL 法のように凍結切断レプリカを SDS で処理すると BirA の酵素活性が失われるため、凍結切断レプリカの処理は細胞壁を取り除くための酵素である Zymolyase および切断された膜以外の膜成分を除去する Triton X-100 で行う。その後凍結切断レプリカをビオチン、ATP、Mg²⁺存在下で浸漬して、AcP へのビオチン付加を誘導する。この処理のあとに、凍結切断レプリカを SDS で一晩処理して残存する膜以外の成分を取り除き、抗ビオチン抗体、金コロイド標識二次抗体を作用させて電子顕微鏡観察する (図4)。

図4 方法の原理



上記で十分な標識強度が得られた場合には Ste2p Δ Tail と BirA あるいは AcP をつなぐリンカー部分の長さや配列を様々に変えて

反応を行い、2分子間の距離を見積もるための方法について検討する。

さらにタンパク質・脂質間の近接を見るためのモデル分子として、すでに標識方法が確立されているホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] を用い (図3)、そのためのプローブである GST-PLC (phospholipase C) delta1-PH の末端に AcP を付加したリコンビナントを精製する。Ste2pΔTail-BirA と GST-PLCdelta1-PH-AcP の間に起こるビオチン付加反応を上記と同様の方法で検出し、電子顕微鏡にて観察する。

4. 研究成果

ビオチンリガーゼ BirA とその基質となる配列 AcP のそれぞれを Ste2pΔTail に付加したコンストラクトを作製し、内在性 Ste2p を予め欠失させた酵母に導入して TEF プロモータでドライブして発現させた。これらの分子が期待通りに発現、分布していることを確かめるために凍結割断レプリカを作製し、それぞれに付加したタグ (FLAG, V5) に対する抗体で標識を行った。両方の分子ともに細胞膜上に存在することを確認できたが、Ste2pΔTail-BirA および Ste2pΔTail-AcP ともに発現レベルは低く、共局在の頻度が低い可能性が示唆された。

両者の会合頻度を高めるため、プロモータをより強い GPD に変更した株を作製し、発現量を増加させた。またビオチン化反応の効率を上げるために2つの AcP をタンデムに挿入したコンストラクト、および AcP の代わりに AviTag™ を用いたコンストラクトも作製した。これらの酵母株を対数増殖期に加圧凍結して凍結割断レプリカを作製し、ビオチン化反応ののち、抗ビオチン抗体、金コロイド標識二次抗体を作用させて電子顕微鏡観察した。

この改良プロトコールでは予想通り Ste2pΔTail-BirA および Ste2pΔTail-AcP の発現量の増加が確かめられた。しかし前述の方法で行ったビオチンを示す金コロイド標識は若干増加したものの依然として低レベルであった。ビオチン化反応液に ATP を含む場合と含まない場合の結果を比較すると、前者での標識強度が有意に高く、ビオチン化反応は起こっていると考えられた。しかしながら、金コロイド標識は、Ste2pΔTail-AcP などの膜トポロジーから予想される細胞膜の内葉 (細胞質側膜葉) だけでなく、細胞膜の外葉 (外液側膜葉) や細胞外の氷の部分などにも相当程度観察され、非特異的な反応の混在が疑われた。上記の結果はタンデム AcP, AviTag™ のどちらをつないだコンストラクトでも変わらず、またビオチン化反応の温度、時間、抗体反応の時間等を変えても大きな変動が見られなかった。

十分な反応強度が得られなかった原因としては、急速凍結、凍結割断レプリカ作製、

Zymolyase 処理、Triton X-100 処理のいずれかの過程で BirA の活性が失われたことが考えられる。特に Zymolyase 中にごく僅かながら含まれるタンパク質分解活性によって BirA, AcP などが分解された可能性が最も強く疑われた。Zymolyase 処理時にはタンパク質分解酵素阻害剤を共存させているが、それでもタンパク質分解を完全に阻害することは困難であったと考えられる。今後、当初の研究目的を達成するためには Zymolyase 処理以外の方法で酵母細胞壁を除去する方法を考案する必要がある。酵母細胞壁に効果のある酵素として Westase などが知られているが、これらも低レベルのタンパク質分解活性を持つ可能性が高く、全く別の原理による方法が必要である。

また BirA による AcP のビオチン化という方法はすでに他の chemical biology 的なアプローチで使われているが、ビオチン化修飾の効率が必ずしも高くないと考えられる。この点でも酵素と基質という組み合わせにこだわらず、2分子が近接する場合に特異的な分子修飾を引き起こす他の方法を検討する必要があると考えている。

基本的なところで障碍が生じたため、当初の目的を達成することができなかったが、QF-FRL 法の優位性を生かし、2分子間の近接をナノレベルで可視化することの重要性は明らかである。これまでに得られた結果を参考にして、今後さらなる検討が必要と考えられる。

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1件)

Takatori S, Mesman, R, Fujimoto T: Microscopic methods to observe the distribution of lipids in the cellular membrane. *Biochemistry* 53, 639-653, 2014 doi: 10.1021/bi401598v 査読あり

[学会発表] (計1件)

藤本豊士: 電子顕微鏡による膜脂質ドメインの解析、理研コロキウム、埼玉県和光市・理化学研究所、2013年2月22日

[その他]

ホームページ等
名古屋大学大学院医学系研究科・分子細胞学
ホームページ
(<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index-j.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50115929

(2)研究分担者
なし