

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590058

研究課題名(和文)コイルドコイルによるホモ-ヘテロ変換を応用したpH応答性バイオ素子の開発

研究課題名(英文)Development of pH-responsive bio-device by utilizing homomeric to heteromeric coiled-coil conversion

研究代表者

栗本 英治(Kurimoto, Eiji)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：90234575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵母輸送タンパク質Emp46p/47pのコイルドコイルド領域のみでpHに依存したホモ-ヘテロ会合変換特性を発現させることが可能であることを明らかとし、また、その会合制御に關与するアミノ酸残基を同定した。さらに、これらの残基に対して種々の変異導入を施すことにより、ヘテロ複合体形成のpH依存性を様々に変化させることに成功した。この他、蛍光タンパク質を融合することにより、蛍光共鳴エネルギー移動によりコイルドコイルドメインの会合状態をリアルタイムに測定する手法を確立した。以上のように、Emp46p/47pのコイルドコイル領域を各種pH応答性バイオ素子として応用するための技術基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that the coiled-coil domains isolated from the yeast cargo receptors Emp46p/47p show pH-dependent conversion of heteromeric to homomeric complexes, and identified the amino acid residues responsible for the regulation of the conversion. Mutations introduced at these residues altered the pH-dependency of the formation of heteromeric complexes. Moreover, using fluorescent protein fusions, the assembly of heteromeric complexes was successfully detected by FRET, which enabled real-time monitoring of the heteromeric complex formation. Thus, we have succeeded in providing strategies for application of the coiled-coil domains of Emp46p/47p to various pH-responsive bio-devices.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：バイオセンサー コイルドコイル FRET pH 輸送タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造モチーフであるコイルドコイルは広範に認められる普遍的な構造であり、その構造が単純であるため、これまでにタンパク質のフォールディングや新規タンパク質デザインの研究対象として様々に用いられている。また、タンパク質が多量体化する際の相互作用部位を形成することも多く、そのメカニズムについての研究も進んでいる。

コイルドコイルはタンパク質骨格としての基本的機能の他、GPCR におけるシグナル伝達のケースの様にグローバルな構造変化が重要な役割を果たすことも知られている。他にも、様々な生物機能発現の一翼を担っており、こうした中に新たなバイオ素子創出に繋がる素材があると考えられる。

本研究では、コイルドコイル領域により細胞内 pH を感知し、機能制御を行っているタンパク質に着目した。細胞質およびミトコンドリアなどの細胞内小器官の pH 変化は、様々な生理活性現象と深く関係しており、その測定は重要な意義を持つ。これまで pH 感受性蛍光プローブである SNARF-1 や pH で蛍光が変化する変異型 GFP が開発され、細胞内の pH モニタリングが報告されてきた。しかし、リアルタイムに精度よく細胞内、オルガネラ内の pH を感知できるプローブは存在せず、その開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、天然のタンパク質が示す様々な特性を、新たな機能性タンパク質の開発に応用する研究の一環として、酵母の輸送タンパク質 Emp46p および Emp47p のコイルドコイル領域に着目

したものである。

Emp46p/47p は、基質結合ドメインと膜貫通部位の中間に位置するコイルドコイル領域を介して、小胞体内でヘテロ複合体を形成し、ゴルジ体に移行した後に解離することが知られている (図 1)。この会合・解離について、オルガネラ間の pH の差をコイルドコイル自体が感知して制御している可能性が考えられているが、詳細は不明である。本研究では、Emp46p/Emp47p の会合特性の発現メカニズムを明らかとし、タンパク質工学的手法により、こうした特性を細胞内 pH センサー、また pH 応答性のバイオ素子として応用することを目的とした。

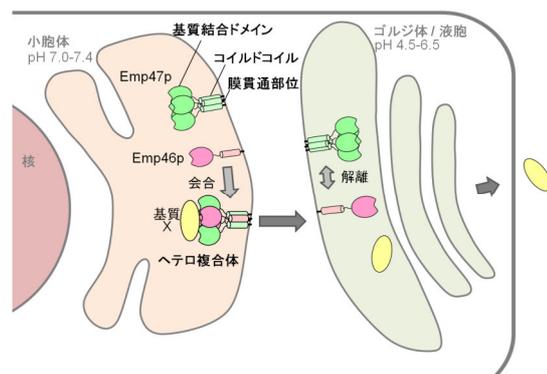


図 1 小胞体-ゴルジ体/液胞における Emp46p/47p の会合・解離

## 3. 研究の方法

### (1) 各種タンパク質の発現および調製

Emp46p、Emp47p のコイルドコイル領域 (Emp46c/Emp47c) および各種変異体タンパク質は、ヒスチジンタグを付加して大腸菌により発現させ、Chelating sepharose ( QIAGEN )を用いて精製した後、ヒスチジンタグを切断し、陰イオン交換 HPLC によりさらに精製した。

## (2) ゲルろ過クロマトグラフィー

カラムに Superdex200 (GE healthcare)を用い、流速は 0.4mL/min とし、280nm における吸光度によって検出した。複合体形成率は、複合体形成の際の Emp46c のピーク面積減少分が複合体を形成した Emp46c 量に相当するとして算出した。

## (3) CD による熱安定性の解析

各種 Emp46c を 0.1 mg/mL となるように 50 mM Tris buffer (pH 8.0) に溶解し、CD 測定用試料を調製した。測定には CD 分光計 (JASCO J-725) を用いた。測定波長は 222 nm とし、温度勾配を 1 °C/min に設定して 20°C から 90°C まで温度を上昇させた。

## (4) 蛍光測定

蛍光測定には FP-6600 (Hitachi)を用いた。蛍光スペクトルは励起波長 450 nm、励起側バンド幅 5 nm、蛍光側バンド幅 6 nm とし、20°Cにて測定した。蛍光強度の時間変化は、測定用バッファーを入れた蛍光セルに GFP-Emp47cS を加え、設定温度に達した後、RFP-Emp46cS あるいは RFP-Emp47cS を注入して素早く混合し、測定を開始した。注入から、混合して測定を開始するまでの時間は 10 秒とした。

## 4. 研究成果

### (1) Emp46c/47c の pH による可逆的会合・解離

Emp46c/47c の会合反応は中性 pH において速やかに進行し、6.5 $\mu$ M、4°Cでも数時間後にはほぼ完全に複合体が形成された。この複合体形成は、低 pH 条件下で抑制され、pH4 では複合体はほとんど

形成されなかった。また、pH8 で形成された複合体を低 pH 条件下で解離させ、このサンプルの pH を透析により pH8 とすることにより、ヘテロ複合体が再び形成されることが明らかとなった (図2)。以上のように、Emp46p/47p より抽出したコイルドコイル領域のみで、pH で制御された可逆的な会合・解離が生じることが明らかとなった。

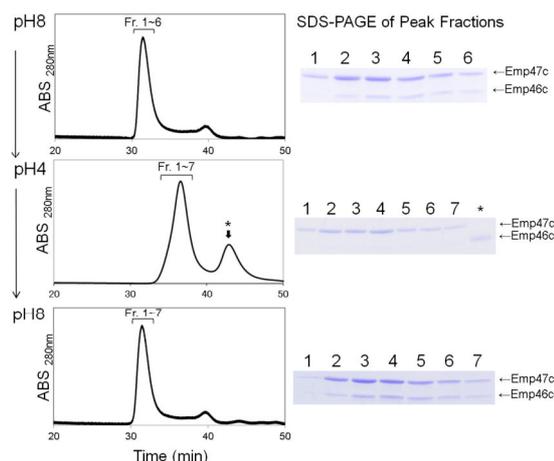


図2 Emp46p/47p コイルドコイル領域の pH による可逆的会合・解離

図3に 222 nm における楕円率を指標として、中性、酸性条件下で Emp46c の熱安定性を測定した結果を示した。Emp46c は pH7.4 では不安定であるが、pH の低下によりその熱安定性が顕著に高まることが明らかとなった。これより、Emp46c/47c の会合・解離が pH 依存的な Emp46c の安定性の変化により制御されていることが予想された。

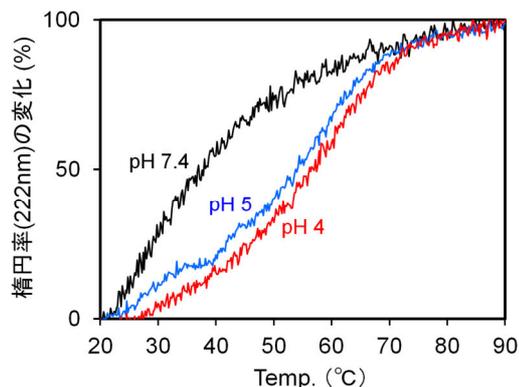


図3 Emp46c の熱安定性の pH 依存性

## (2) ヘテロ複合体形成特性の変異解析

Emp46p のコイルドコイル領域の疎水面には、荷電性アミノ酸残基 E303 が唯一存在し、この残基が複合体形成の制御に関与すると考えられた。そこで、E303 を種々のアミノ酸残基に置換した変異体を作成し、Emp47c との複合体形成特性の変化を解析した。その結果、E303A と E303D 変異体では複合体形成率が顕著に低下することが明らかとなった。これより、電荷以外に重要な要素があると予想されたため、E303L、E303Q 変異体について解析した。その結果、両者とも Emp47c とのヘテロ複合体形成能を示し、特に E303Q 変異体は野生型と同等の複合体形成率を示すことが判明した。この結果より、複合体形成には Emp46c の 303 番目のアミノ酸残基側鎖の高さが重要であると考えられた (図 4)。

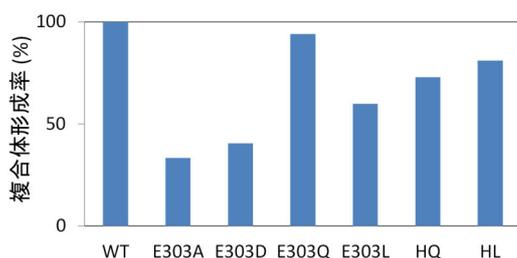


図 4 Emp46c 変異体の複合体形成率  
HQ:V300H/E303Q, HL:V300H/E303L

E303Q 変異体は、野生型と同様の複合体形成能を示したが、その pH 依存性は顕著に減弱した (図 5)。この結果から、303 番目のアミノ酸残基の電荷はヘテロ複合体形成に必須ではないが、その pH 依存性に関与するといえる。

野生型 Emp46c/47c の会合・解離は pH 5 付近で起こり、細胞内 pH センサーとして応用するためには、変化領域を高 pH 側にシフトすることが望ましい。そこで、Emp46c の E303 およびその近傍へのヒスチジン残基導入を行った。

E303H 変異体はヘテロ複合体を形成す

るが、明確な pH 依存性は認められなかった。そこで、E303Q および E303L 変異体に対して、変異箇所の近傍である V300 をヒスチジン残基に置換した変異体を作成し、解析した。V300H/E303Q (HQ)、V300H/E303L (HL) の 2 重変異体は、どちらも比較的高いヘテロ複合体形成率を示し (図 4)、また、会合・解離の変化領域は、野生型と比べて顕著に高 pH 側にシフトしていることが明らかとなった (図 5)。

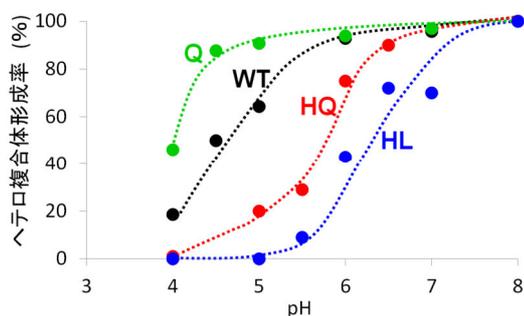


図 5 Emp46c への変異導入による複合体形成の pH 依存性の変化

Emp46c の各変異体の熱安定性を解析した結果、E303A、E303L 変異体は高い熱安定性を示すことが判明した (図 6)。これら 2 つの変異体においてはヘテロ複合体形成が抑制されており、野生型における pH の影響と同様に、変異による Emp46c の安定化が複合体形成抑制の要因となっていることが考えられた。

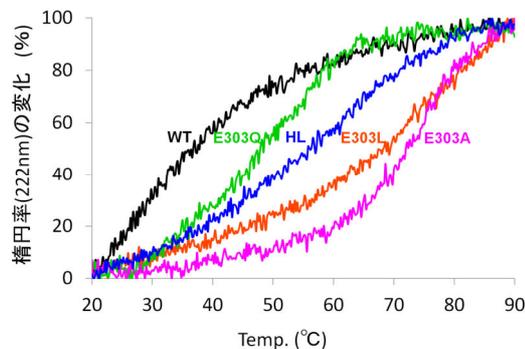


図 6 Emp46c 変異体の熱安定性の解析

(3) 蛍光タンパク質融合体を用いた FRET による複合体形成の解析

Emp46c/47c の会合を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) として観測するために、ドナー蛍光タンパク質として GFP、アクセプター蛍光タンパク質として RFP を融合したコンストラクトを作成した。

Emp46p, Emp47p の基質結合ドメインの立体構造は明らかになっているが、ストーク部分およびコイルドコイルドメインの構造は分かっておらず、コイルドコイル上部の蛍光タンパク質融合箇所と FRET 効率の相関は不明である。したがって、コイルドコイルドメイン上部に位置するストーク部分の長さの異なる複数の蛍光タンパク質融合コンストラクト (RFP-Emp46cS/Emp46c/Emp46cL、GFP-Emp47cS/Emp47c/Emp47cL) を作成し、それぞれの組み合わせでの FRET 効率を解析した。Emp46c および Emp47c はほぼ 1 : 1 のストイキオメトリーで会合すると考えられているが、詳細は明らかとなっていないため、GFP-Emp47c に RFP-Emp46c を徐々に加え、FRET が飽和した段階での値により FRET 効率 ( $\Delta F2/F1$ ) を算出した (図 7)。その結果、図 8 に示すようにコイルドコイルドメインに直接蛍光タンパクを融合した RFP-Emp46cS/GFP-Emp47cS の組み合わせにおいて最も高い効率の FRET が得られることが明らかとなった。

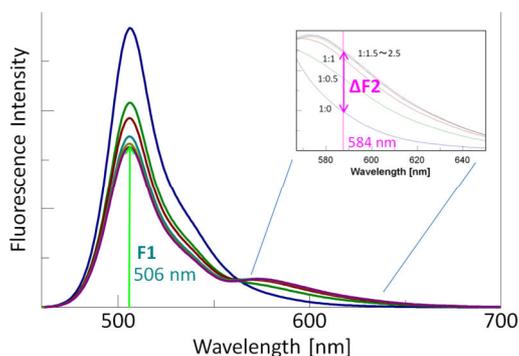


図 7 複合体形成に伴う FRET の観測

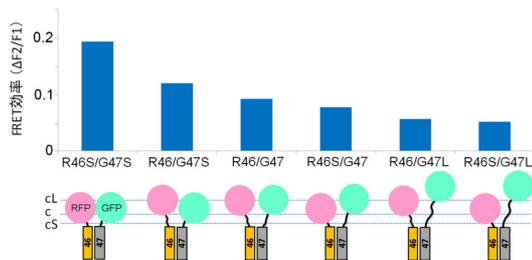


図 8 ストークスの長さ と FRET 効率の関係

次に、ヘテロ複合体形成に伴う GFP の蛍光強度の減少を指標として速度解析を行った。GFP-Emp47cS および RFP-Emp46cS の濃度は一定とし、各温度で混合した際の蛍光強度の経時変化により得られた曲線をカーブフィッティング解析した結果、会合過程は 2 重指数関数でよく近似できることが明らかとなった (図 9)。

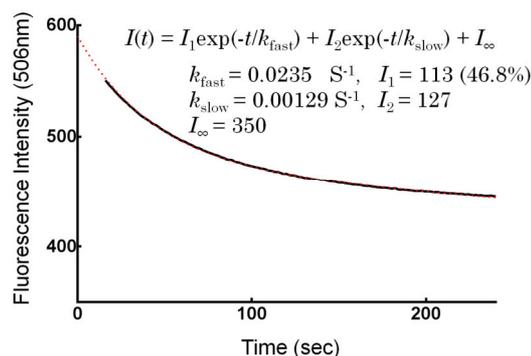


図 9 ヘテロ複合体形成に伴う蛍光強度 (FRET) の速度解析

この他、GFP-Emp47cS および RFP-Emp47cS を用いて、それらの混合に伴う蛍光強度変化についても同様の解析を行った。この FRET の変化は、ホモ 4 量体を形成している Emp47cS 間のサブユニット交換に伴うものと考えられる。

カーブフィッティングより得られた速度定数  $k_{fast}$  の温度依存性の解析から、ヘテロ複合体形成においては 67.9 kJ/mol、Emp47cS のホモ多量体におけるサブユニット交換反応においては 106 kJ/mol という活性化エネルギーの値が計算された (図 10)。Emp47cS におけるサ

ブユニット交換反応の方が高い活性化エネルギーを示したのは、サブユニット交換の際にホモ多量体の解離が必要となり、その過程のエネルギー障壁を反映したものと考えられる。

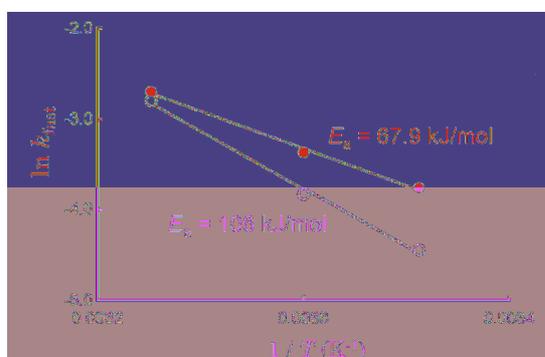


図 10 会合速度定数 ( $k_{fast}$ ) の温度依存性

- : RFP-Emp46cS+GFP-Emp47cS,
- : RFP-Emp47cS+GFP-Emp47cS

本研究により、Emp46p/47p のコイルドコイル領域のみで、pH に依存した可逆的な会合・解離特性を発現させることが可能であることが明らかとなった。また、Emp46c の E303 近傍への変異導入により、ヘテロ複合体形成の pH 依存性を様々に変化させることに成功した。さらに、蛍光タンパク質融合体を利用した FRET により、ヘテロ複合体の形成をリアルタイムに観測する手法を確立した。

以上のように、Emp46p/47p のコイルドコイルを細胞内 pH バイオセンサーとして応用するための技術基盤を構築することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 栗本英治、大島由莉、野口彩佳：コイルドコイルを介した酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p の会合・解離の解析とその応用  
名城大学総合研究所 紀要、査読無、  
第 18 号, 17-20 (2013)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 加藤紘一、古橋隆久、松山苑未、野口彩

佳、大島由梨、栗本英治：変異導入による酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p のコイルドコイル会合メカニズムの解析

日本薬学会 第134年会 (熊本)

平成26年3月28日～30日

- ② 加藤紘一、野口彩佳、大島由莉、栗本英治：酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p のコイルドコイルを介した会合特性の解析

第59回 日本薬学会東海支部総会・大会  
(名城大学) 平成25年7月6日

- ③ 栗本英治、野口彩佳、大島由梨、加藤紘一、松山苑未：FRETを利用した酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p コイルドコイルドメインの会合過程の解析

日本薬学会 第133年会 (横浜)

平成 25 年 3 月 29 日～31 日

- ④ 栗本英治、遠田 宙、神谷由紀子、野田勝紀、内山 進、小林祐次、加藤晃一：酵母輸送タンパク質 Emp46p/47p のコイルドコイル領域を介した多量体形成・解離機構の解析

日本薬学会 第132年会 (札幌)

平成 24 年 3 月 29 日～31 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗本 英治 (KURIMOTO, Eiji)  
名城大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90234575