

平成22年 6月 2日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790033
研究課題名 (和文) コイルドコイル形成に基づく生細胞膜タンパク質ラベル法のクロスリンク化と小型化
研究課題名 (英文) Crosslinking and miniaturization of protein labeling method in living cells based on coiled-coil formation
研究代表者 矢野 義明 (YOSHIAKI YANO) 京都大学・薬学研究科・助教 研究者番号：60402799

研究成果の概要 (和文) : 標的のタンパク質分子を蛍光タンパク質と遺伝子融合して生細胞に発現させることで、標的タンパク質の挙動を追う技術は基礎生命科学研究で広く用いられています。この研究では、蛍光タンパク質融合体よりもサイズが小さく、利点の多い新規ラベル法である「コイルドコイルラベル法」をさらに強力な結合でラベルし、かつサイズを小さくする改良を行いました。

研究成果の概要 (英文) : Live-cell imaging of target proteins by using genetic fusion with fluorescent proteins is widely used in basic life-science research. We performed crosslinking and further miniaturization of a recently developed labeling technology (coiled-coil labeling method), which has a smaller size compared with fluorescent protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：蛍光タンパク質、コイルドコイル、イメージング、Gタンパク質共役型受容体、クロスリンク

1. 研究開始当初の背景

生細胞膜に発現している G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を含む膜タンパク質は、創薬ターゲットとして最重要のタンパク質群である。しかし、構造・機能を調べるため

膜タンパク質を単離、精製しようとする、その過程で界面活性剤などの生体膜とはかけ離れた環境に置かれ、不可逆に変性・凝集することも多い。代わりに、生細胞膜に発現したままの状態での膜タンパク質の構造・機能

を解析するアプローチも必須だと考えられる。

標的タンパク質に GFP などの蛍光タンパク質を融合して可視化し、生細胞でのタンパク質の挙動やコンフォメーション変化を追う手法が頻繁に用いられるようになってきている。しかしながら、蛍光タンパク質は標的受容体と同程度の大きさを持ち (GFP は 238 アミノ酸、GPCR は 300–400 アミノ酸)、標的タンパク質本来の局在、機能、タンパク質間相互作用に大きく影響することがある。また、リガンド刺激による GPCR の内在化の検出は、現在よく用いられているリガンドハイスループットスクリーニング法の一つであるが、蛍光タンパク質融合体を用いた場合、元から細胞内に局在する受容体も発光するため、内在化の判別が困難な場合がある。

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 (6–200 残基程度) 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注目されている。小分子ケミカルラベル法の研究は現在非常に活発であり、ここ数年で、複数の方法が報告され始めたが、ラベル原理としては、ペプチド–金属イオン間の錯体形成を利用するものと、酵素反応を利用するもののいずれかに大別される。金属を用いる方法では迅速にラベルできるのに対し、結合が可逆的でプローブが外れる可能性がある。またヒ素やニッケルの場合、毒性が問題になる。一方、酵素法は共有結合で不可逆にラベル可能だがラベルにかかる時間が長く (典型的には 20 分–40 分) 基質となるラベル化剤も過剰量が必要である。申請者らは最近、金属も酵素も利用せず、特異的ペプチド間相互作用のみに基づく点で他に類を見ない生細胞膜受容体特異的ケミカルラベル法である、コイルドコイルラベル法を開発した。この方法では、標的受容体に E3 タグ配列 (EIAALEK)₃ を融合させて発現させ、ここに蛍光ラベルした K3 (KIAALKE)₃ または K4 (KIAALKE)₄ プロ

ーブを加え、E3-K 間のコイルドコイル形成によりラベルを行う (図 2)。申請者ら開発のラベル法は、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) バックグラウンド染色が少ない、
 - 4) ラベル化が迅速 (1 分以内)、
 - 5) 無毒性
 - 6) 細胞膜透過性を持たないため、細胞表面タンパク質の細胞外ドメインのみをラベル化できる、
 - 7) 蛍光色素部分を自由に変えられる、
- などの優れた特徴を持つ。このラベル法はこのままでも GPCR の内在化やオリゴマー形成の研究に有用であることがわかっているが、ラベルのサイズや結合様式に関してさらに改良する余地がある。

2. 研究の目的

本研究では申請者ら開発のコイルドコイルラベル法をさらに発展させ、改良を行う。具体的には(1)クロスリンク剤を導入することによりタグ-プローブ間に迅速に共有結合を形成させ、数時間以上標的タンパク質を追跡できるようにする。(2)これまでに前例のない、ラベル部分をアミノ酸 3 残基程度まで大幅に小さくできる、世界最小サイズの生細胞ケミカルラベル法を確立する。コイルドコイル部分と受容体の配列の間に特異的プロテアーゼ切断部位を導入し、クロスリンク後、プロテアーゼ処理により余分なコイルドコイル部分のみを切り離す。

3. 研究の方法

本研究で用いるプローブ (I) 配列 (RIAALRE)₃-GGIEGRCK は Fmoc 固相合成法により合成、HPLC 精製し、2 種類の蛍光色素およびクロスリンク剤 (sulfo-GMBS) を順次付加・精製する。タグ (II) 配列 (EIAALER)₃GGIEGRCK は、オリゴヌクレオチド合成を行い b2 アドレナリン受容体の N 末端に付加し、CHO 細胞に発現させる。発現後、プローブ I および Factor Xa を加え、クロスリンク反応および Factor Xa によるコイルドコイル部分の切断が行えるかどうか確認する。Factor Xa は CHO 細胞の PAR-1 受容体を活性化しうるが、活性化に重要な tissue factor を持たないため、本研究では問題にならないと考えられる。ラベル化は共焦点レー

ザー顕微鏡により観察する。

4. 研究成果

プローブ (I) はN末端及びC末端に2つの蛍光色素を持つペプチドであるため、水溶液中で自己凝集しやすい性質を持つことが予想される。そこで、比較的溶解性の良いペプチドを探索するため、複数の蛍光色素を用いて検討を行った。蛍光色素フルオレセインをN末端にラベルしたペプチドを脱保護、精製し、次にC末端アミノ基をテトラメチルローダミン SE でラベルすることを試みた。しかしながらペプチドとラベル試薬を混合すると非常に凝集しやすいことがわかった。色素がペプチド凝集を促進、またはシステインの酸化に伴うダイマー形成が原因だと考えられる。そこで、ラベル蛍光色素をより水溶性の高いCy5に変更してラベル

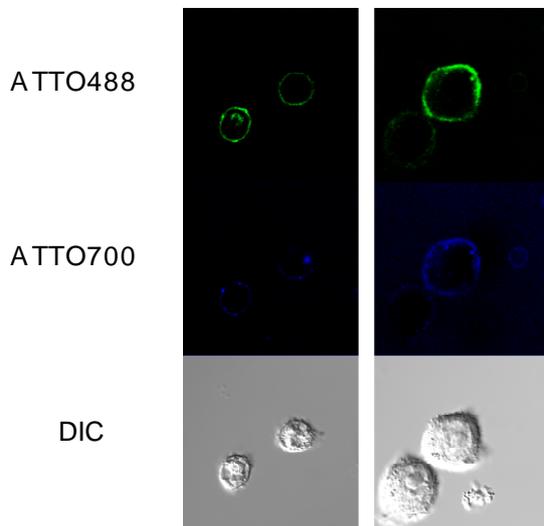
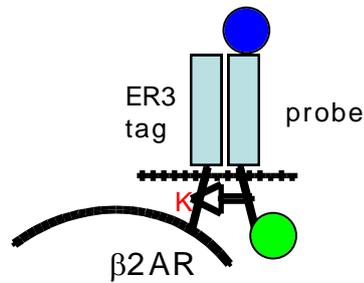


図1 タグ付加 b2 アドレナリン受容体発現 CHO 細胞の ATTO700-probe (GMBS)-ATTO488 による標識。PBS 中 100nM プローブで 30 分インキュベート後、PBS で 10 回洗浄した。受容体発現細胞の細胞膜が ATTO700 と ATTO488 の両方で染色されている。

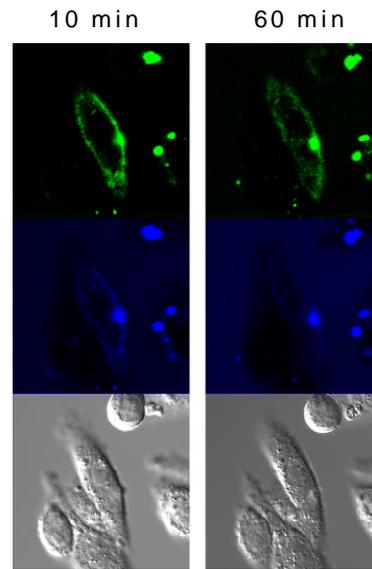
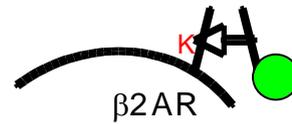


図2 プローブによる染色後、factor Xa を加えた後の蛍光強度変化。酵素添加 10 分後では ATTO700 と ATTO488 の両方が細胞膜で見られたが、60 分後には ATTO700 蛍光が殆ど見られなかった、一方で、ATTO488 蛍光は殆ど減少しなかった。

を試みた。TFE, MeOH, HFIP 等いくつかの有機溶媒中での反応を試みたがいずれも精製物が見られなかった。そこで溶媒を 100mMHEPES pH7.4 に変更したところ反応は進行したが、アミノ基に加えて Cys 側鎖のチオール基にも蛍光色素の付加がみられた。そこでここに Hydroxylamine を加えることでチオエステルを分解し、目的物を得た。その際、一部はダイマー化していたため、約 100 等量の DTT を加えて還元し、モノマーのプローブ (FL-probe-Cy5) を得た。これにクロスリンクを加えたところ最終目的プローブの精製が見られた。精製したプローブをタグ配列ペプチドと混合し、クロスリンク反応が起こるか確認を行ったところ、プローブの凝集または容器への吸着により、溶液からプローブが速やかに失われていることが明らかになった。そこで、プローブの水溶性をさらに改善する為に、比較的水溶性が高いと考えられる ATTO488 および ATTO700 を蛍光色素として用いたプローブ (ATTO700-probe (GMBS)-ATTO488) の合成を行った。これまでと同様の合成反応を行い約 7nmol の精製プローブを得ることが出来た。このプローブを用いて、タグ配列 (EIAAIER)3-GGIEGRK を N 末端に付加した

beta2 アドレナリン受容体を CHO 細胞に一過性発現させ、染色を行ったところ、細胞膜上で ATTO488、ATTO700 両者の蛍光が見られる細胞が観測できた。100nM のプローブを PBS(+)中 30 分インキュベート後に、PBS での洗浄を 10 回行ってから観察してもやはり蛍光は観察された(図 1)ことから、タグとプローブ間にクロスリンク反応が起こっていることが示唆された。さらに、プロテアーゼ factorXa を加えて観察を続けたところ、ATTO700 の蛍光が 60 分後には有意に減少したのに対し、ATTO488 蛍光は大きくは減少しなかった(図 2)。従って、プロテアーゼ処理により余分なタグ-プローブ配列を取り除くことができたと考えられる。以上、研究の目的であった新規小分子ラベル法のクロスリンク化と小型化を達成することができた。

本研究により、従来は難しかった、特異性を保ちながらサイズを小さくする生細胞標識法を確立する事ができた、コイルドコイルラベル法は特に GPCR 等の膜受容体の標識法として多くの利点を持つことから、今後、GPCR の会合や構造変化を蛍光検出する方法への応用が期待される。

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 2 件)

1. Yano Y, Yano A, Oishi S, Sugimoto Y, Tsujimoto G, Fujii N, & Matsuzaki K, Coiled-coil tag-probe system for quick labeling of membrane receptors in living cell. ACS Chemical Biology (2008) 3, 341-345. 査読有。
2. Yano Y & Matsuzaki K, Tag-probe labeling methods for live-cell imaging of membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta (2009) 1788, 2124-2131. 査読有。

[学会発表] (計 4 件)

1. 矢野義明 松崎勝巳
「Coiled-coil tag-probe system for quick labeling of membrane receptors in living cells」

International symposium on
integrated medicinal science
(IMS 2008)2008 年 12 月 13 日、
京都薬科大学

2. 矢野義明 松崎勝巳

「新規タグ-プローブ法で見る膜受容体の生細胞での挙動」
日本薬学会第 129 年会
2009 年 3 月 26 日、京都国際会館

3. 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膜での GPCR オリゴマーの検出」
日本薬学会第 130 年会
2010 年 3 月 26 日、岡山大学

[図書] (計 1 件)

1. 松崎勝巳 矢野義明
「薬学分析化学の最前線」
じほう (2009) 170-171。

[その他]

ホームページ等
研究室ホームページ
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
矢野 義明 (YANO Yoshiaki)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号：60402799