

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05130

研究課題名（和文）細胞表面を反応場としたタンパク質間相互作用解析系の構築

研究課題名（英文）Development of an analysis method for protein-protein interactions using the cell surface as a sensing platform

研究代表者

末田 慎二（Sueda, Shinji）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：00325581

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）：本研究では、培養細胞の表面を反応場として利用したタンパク質間相互作用解析系の開発を行った。ここでは、ターゲットとなる標的タンパク質を、膜タンパク質を介して培養細胞の表面に発現させ、そこに蛍光ラベル化したもう一方のタンパク質を添加して、両者の相互作用を蛍光イメージングにより解析する系の構築を行った。実際に本系を利用して平衡結合解析を実施し、タンパク質間相互作用に関する結合パラメーターを算出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質間の詳細な相互作用解析には一般にセンサーチップをベースとした分析手法が活用されているが、この場合、タンパク質を固定化したセンサーチップをうまく調製できない場合があり、このことが解析の妨げとなっている。本手法では培養細胞の表面に標的タンパク質を提示し、その培養細胞の表面でそのまま相互作用解析を実施するため、センサーチップ上への固定化が困難なタンパク質についても解析を行うことが可能である。したがって本手法はこれまで詳細な相互作用解析データの取得が困難であった系に対して有効な解析手法になり得るものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present work, we have developed an analysis method for protein-protein interactions using the cells surface as a sensing platform. In this method, the target protein was displayed on the cell surface by expressing it as a fusion protein with a membrane protein, while its binding partner labeled with a fluorescent dye was applied on the cell surface harboring the target protein. The binding analysis was conducted by monitoring the fluorescence from the labeled protein on the cell surface. With this method, we successfully obtained a binding parameter of a protein-protein interaction by equilibrium analysis based on the fluorescence imaging data.

研究分野：生物分析化学

キーワード：タンパク質相互作用解析 蛍光イメージング 培養細胞 平衡結合解析

1. 研究開始当初の背景

生体内には膨大な種類のタンパク質が存在しており、それらが互いに相互作用して、それぞれの機能を発現している。そのため、タンパク質の機能の全容を把握するには、そのようなタンパク質同士の相互作用をすべて把握する必要があり、これまでに様々な手法が開発され、タンパク質間の相互作用解析に活用されている¹⁾。ここで、詳細なタンパク質間相互作用解析には、一般に表面プラズモン共鳴法や水晶発振子マイクロバランス法などの分子間相互作用解析装置を利用した手法が活用されている^{2),3)}。ここではセンサーチップ上にタンパク質を固定化する必要があり、この際に一般に化学修飾反応を利用して固定化がなされるため、タンパク質の活性に大きな影響が出る可能性がある。またその固定化するタンパク質そのものをうまく入手・調製できない場合もある。そのためこのような分子間相互作用解析装置を利用した手法ではタンパク質を固定化したセンサーチップを調製するところがボトルネックとなり、解析の妨げとなっている。そこで本研究では、センサーチップをベースとした既存のタンパク質間相互作用解析法の問題を克服することを目的として、培養細胞の表層を反応場として利用したタンパク質間相互作用解析系の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、ターゲットとなる標的タンパク質を培養細胞上に発現させ、その培養細胞の表層で相互作用解析を行うことが可能な系の構築を進めた(図1)。ここでは培養細胞に発現プラスミド(遺伝子)を導入し、標的タンパク質を膜タンパク質との融合体として発現させ、標的タンパク質を細胞表層に提示する。一方で、その標的タンパク質と相互作用するタンパク質(パートナータンパク質)を蛍光ラベル化し、それを標的タンパク質を発現させた培養細胞に添加する。そして、蛍光ラベル化したタンパク質の細胞表層への結合を蛍光イメージングにより定量的に評価するという戦略である。この系では分析対象のタンパク質を固相基板上へ固定化する必要がないため、固定化に伴う失活の問題を回避することができる。また、培養細胞上に提示するタンパク質については、細胞が自ら産生し、それがそのまま細胞表層に提示されるため、そのタンパク質を精製する必要が無く、さらに入手や調製が困難なタンパク質についても解析対象とすることが原理的に可能である。本研究ではこのような解析系の構築を目的として研究を進めた。

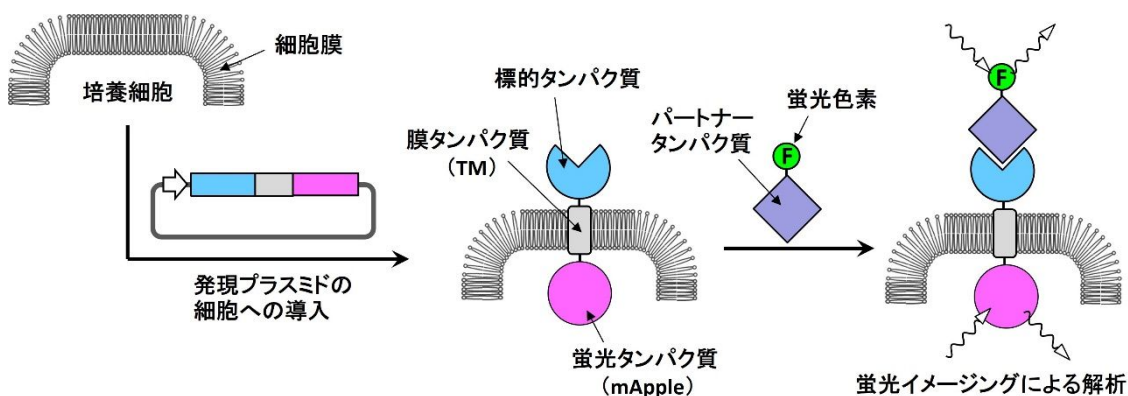


図1 細胞表層での蛍光イメージングに基づいたタンパク質間相互作用解析

3. 研究の方法

本解析系を構築する上で要となるのが標的タンパク質を細胞表層につなぎ止める役割を果たす膜タンパク質である。本研究ではこのような膜タンパク質として PDGF レセプターの一膜貫通ドメイン(TM)を利用した。TMは膜貫通機能を有する最小単位の膜タンパク質であり、TMのN末端にタンパク質を連結することにより、そのタンパク質を細胞表層に提示できることが様々な系で実証されている。本系ではさらにTMの細胞質側にあたるC末端に赤色系の蛍光タンパク質であるmAppleを連結した。このmAppleは、標的タンパク質の発現レベルを評価し、パートナータンパク質の結合レベルを補正するために用いた。また蛍光強度は、共焦点レーザー顕微鏡によって得られる蛍光イメージングデータを解析することにより算出した。共焦点レーザー顕微鏡では、ある一定平面からの情報(スライス画像)を得ることができるため、洗浄操作無しにパートナータンパク質の結合量を評価することができる。そのため、Langmuir式に基づいた平衡解析を行い、結合パラメーターの算出を試みた。

4. 研究成果

(1) タンパク質間相互作用解析系の構築

まずタンパク質間相互作用のモデル系として、代謝系酵素のピオチンリガーゼ(BPL)とその基

質タンパク質(BCCP)を利用して相互作用解析系の構築を行った⁴⁾。ここでは、BCCPをmAppleを連結したTMとの融合タンパク質(BCCP-TM-mApple)として発現させ、細胞表層に提示した。その融合タンパク質を発現させた細胞に対して、蛍光色素(フルオレセイン)でラベル化したBPLを添加して観察を行った。その結果、細胞の輪郭からフルオレセインに由来する緑色の蛍光とmAppleに由来する赤色の蛍光が同時に観察され、期待通り細胞表層においてBPLとBCCP間での結合を観察することができた(図2)。さらにフルオレセインに由来する蛍光はラベル化BPLを添加後、速やかに一定レベルに達し、その蛍光レベルは少なくとも1時間程度は持続することが確認できた。また、濃度の異なるラベル化BPL溶液を添加し、それぞれの条件下で蛍光強度を測定し、結合平衡解析を実施した。ここで細胞からの蛍光強度はBCCP-TM-mAppleの発現量に依存しているため、それを補正するために、フルオレセインに由来する蛍光強度をmAppleに由来する蛍光強度で割った値を結合レベルとして評価した。得られたデータをLangmuirの平衡式に基づいて解析を行ったところ、比較的精度の高い結合パラメーターが得られ、本手法に基づいてタンパク質間の相互作用解析を実施することが可能であることがわかった。

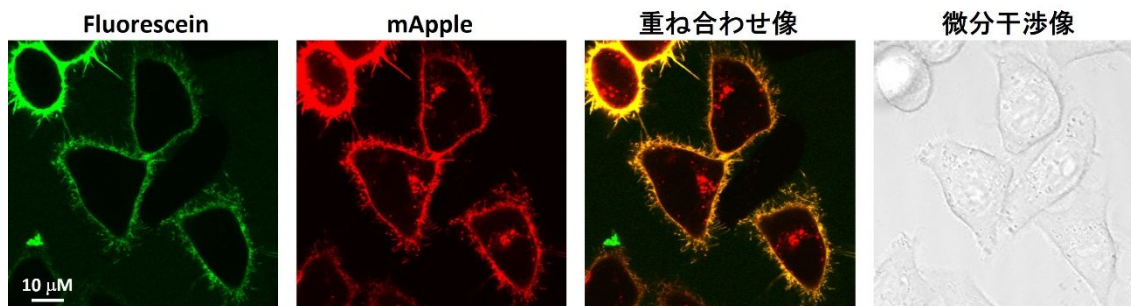


図2 HeLa細胞の表層に提示されたBCCPへの蛍光ラベル化BPLの結合

(2) 小分子を介したタンパク質間相互作用解析系の構築

次に本系が小分子を介したタンパク質間相互作用の解析にも適用できることを示すために、Rapamycin(抗生物質)によって結合が促進されることが知られている、FKBP12とFRB間の相互作用を利用して解析系の構築を行った。ここではFKBP12を、mAppleを連結したTMとの融合タンパク質(FKBP12-TM-mApple)として発現させることにより細胞表層に提示し、GFPでラベル化したFRB(GFP-FRB)を添加して評価を行った。実際に、FKBP12-TM-mAppleを発現させた細胞に、Rapamycinと共にGFP-FRBを添加したところ、細胞表層からmAppleに由来する蛍光と共にGFPに由来する蛍光を顕著に観察することができた(図3)。一方でRapamycin非共存下では細胞表層からGFPに由来する蛍光はほとんど観察されなかったため、本系を利用してRapamycinを介したFKBP12とFRB間の特異的な結合をモニターできることがわかった。

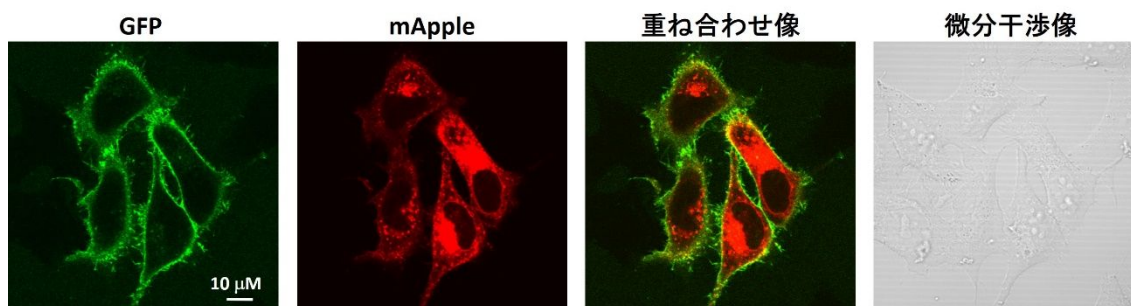


図3 HeLa細胞の表層に提示されたFKBP12への蛍光ラベル化FRBの結合

しかしながらGFP-FRBのディッシュ上への非特異的な吸着やGFPに由来する蛍光の自己吸収が問題となり精度の高い相互作用解析データを取得することができなかった。そこでGFPの代わりにフルオレセインでラベル化したFRB(Fluo-FRB)を調製し検討を行った。その結果、Fluo-FRBを使用することによりディッシュ上への非特異的な吸着レベルを、GFP-FRBを使用した場合と比較して3分の1程度まで減少させることができた。さらに両ラベル化FRBについて蛍光励起スペクトル及び発光スペクトルを測定したところ、励起スペクトルと発光スペクトルのピーク波長の差が、Fluo-FRBの方がGFP-FRBよりも10nm程度大きいことがわかり、Fluo-FRBを用いることにより蛍光の自己吸収を抑制できることが確認できた。

(3) 細胞表層でのN末端部位の存在確認

本研究で提案した解析系では標的タンパク質を膜タンパク質との融合タンパク質として発現させることにより細胞表層に提示する戦略をとっている。この際、性質が十分に把握されていないタンパク質を分析対象とする場合、まずその標的タンパク質が細胞表層に提示されていること

を確認する必要がある。そこで膜タンパク質の融合体についてその N 末端部位が細胞表層に提示されていることを確認することができる手法についても開発を行った。具体的には、FKBP12-TM-mApple の系を利用して、その N 末端にタグとして *Sulfolobus tokodaii* 由来の BCCP を連結した。 *S. tokodaii* 由来のピオチン化酵素反応系では、BPL がピオチン化された BCCP と非常に安定な複合体を形成することがわかっている。そこで BCCP を連結させた融合タンパク質に対して、蛍光ラベル化した BPL を作用させピオチン化反応を行うことにより、その BCCP 部位へラベル化した BPL を結合させることができるものと考えた (図 4)。実際に BCCP を N 末端に連結した FKBP12-TM-mApple を発現させた細胞に対して、フルオレセインでラベル化した BPL を添加しピオチン化反応を行ったところ、細胞の表層からフルオレセインに由来する蛍光を明瞭に観察することができた。したがって、この系を利用して融合タンパク質の N 末端が細胞表層に提示されていることを確認できることがわかった。この際、N 末端部位が細胞に提示されている場合、原理的にはその直後に存在する標的タンパク質も細胞表層に存在することが想定されるため、この系を利用して細胞表層に膜タンパク質が提示されているかどうか確認することができるものと考えられる。

本研究で開発した系については、他のタンパク質間相互作用を対象として解析を行うなどさらに検証を進める必要があるが、これまでにない戦略に基づいた解析手法であるため、これまで詳細な相互作用解析データの取得が困難であった系に対して有効な解析手法になり得るものと期待される。

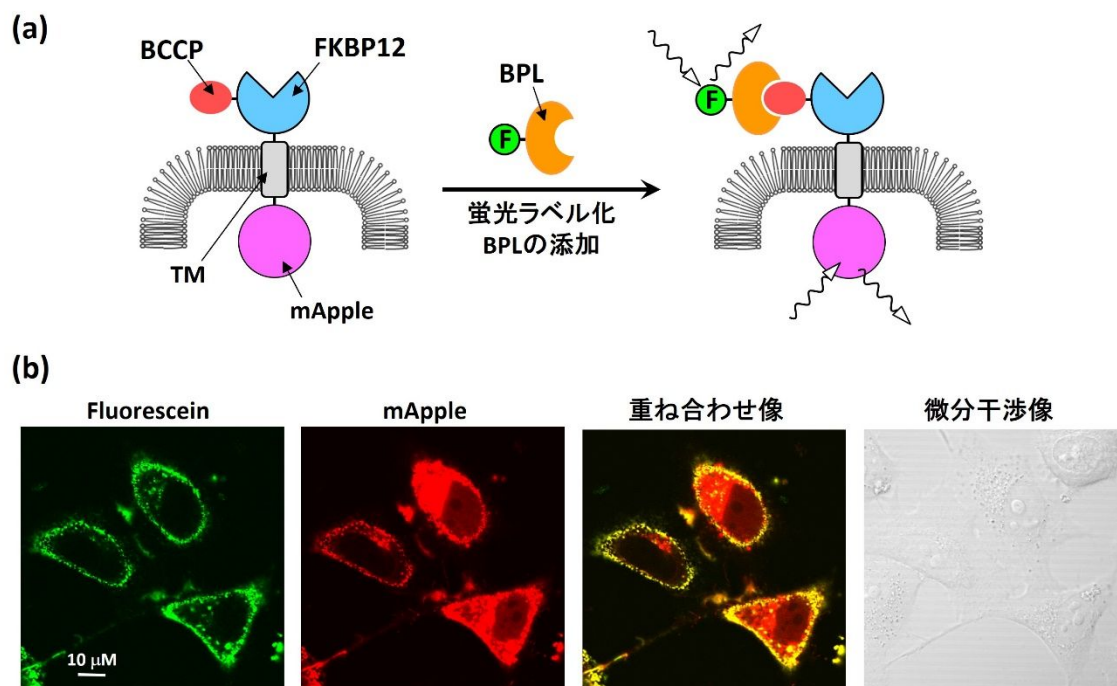


図 4 細胞表層での融合タンパク質の N 末端部位の存在確認 (a) N 末端部に BCCP を連結した FKBP12 融合タンパク質についてのラベル化の模式図 ; (b) HeLa 細胞上での FKBP12 融合タンパク質の BCCP 部位への蛍光ラベル化 BPL の結合

<引用文献>

- 1) M. Zhou, *et al.*, *ChemMedChem*, **11**, 738 (2016)
- 2) D. Capelli *et al.*, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **163**, 118079 (2023)
- 3) P.J. Jandas *et al.*, *Sens. Actuators A Phys.*, **331**, 113020 (2021)
- 4) K. Hirano, *et al.*, *Anal. Sci.*, **40**, 563 (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirano Kazuki, Sueda Shinji	4. 巻 40
2. 論文標題 A fluorescence-based binding assay for proteins using the cell surface as a sensing platform	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 563 ~ 571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s44211-023-00476-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原雅喜、平野一輝、末田慎二
2. 発表標題 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングによる細胞表層でのタンパク質間相互作用解析系の構築
3. 学会等名 第72回日本分析化学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶原雅喜、平野一輝、末田慎二
2. 発表標題 細胞表層での蛍光イメージングによるタンパク質を対象とした平衡結合解析
3. 学会等名 第71回日本分析化学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野一輝、橋本透流、末田慎二
2. 発表標題 培養細胞の表層を反応場としたタンパク質間相互作用解析系の構築
3. 学会等名 第70回日本分析化学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平野 一輝 (Hirano Kazuki)		
研究協力者	梶原 雅喜 (Kajiwara Masaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------