

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570175

研究課題名（和文）RAMPと相互作用するGPCRの網羅的探索と複合体機能の解析

研究課題名（英文）Investigation of GPCRs interacting with RAMPs and functional analysis of their complex.

研究代表者

樋野 展正（HINO NOBUMASA）

大阪大学大学院・薬学研究科・助教

研究者番号：90469916

研究成果の概要（和文）：(I) 解析対象とするタンパク質に光反応性を持つ非天然型アミノ酸を導入し、細胞内での相互作用因子とクロスリンクさせ、捕捉した相互作用相手を質量分析によって同定する手法の開発を行った。また、長いリンカーを持つ新規光反応性アミノ酸をタンパク質に導入することに成功し、広い範囲でのクロスリンクを可能にした。(II) 細胞膜上における RAMP とカルシトニン受容体様受容体の相互作用様式を結晶構造解析と部位特異的光クロスリンクアッセイを駆使して詳細に明らかにした。

研究成果の概要（英文）：(I) I developed a system for the identification of proteins interacting with a given target protein, by site-specific incorporation of a photo-reactive amino acid into the target protein, *in vivo* photo-cross-linking to interacting proteins, and identification of thus captured proteins by comparative quantitative mass spectrometry analysis. A novel long chain photoreactive amino acid was also successfully incorporated into proteins, which enables wide-range photo-cross-linking of proteins. (II) I showed how RAMP and calcitonin receptor-like receptor interact with each other on the membrane of living cells by X-ray crystal structure analysis and site-specific photo-cross-linking assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
2011年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
2012年度	500,000円	150,000円	650,000円
年度			
年度			
総計	3,800,000円	1,140,000円	4,940,000円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：タンパク質間相互作用、膜タンパク質、光クロスリンク、非天然型アミノ酸、質量分析、RAMP、GPCR、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

受容体活性調節タンパク質（receptor-activity modifying protein; RAMP）は RAMP1-3 から成るファミリーを形成する 1 回膜貫通型の膜タンパク質であ

る。RAMP の 3 つのファミリータンパク質はそれぞれカルシトニン受容体（CTR）もしくはカルシトニン受容体様受容体（CLR）と複合体を組み、3 種類の生理活性ペプチドに応答する計 6 つの異なる受容体を形成すると

いう興味深い性質を持っている (Christopoulos, G. *et al. Mol. Pharmacol.* 1999). CLR は血管内皮に多く発現している一方, RAMP は様々な組織にブロードに発現している. このことから RAMP のターゲットはより広範に存在していると考えられたため, RAMP と相互作用する GPCR の探索が精力的に進められてきた結果, RAMP と相互作用する因子として 4 種類の class B GPCR に加え class C に属するカルシウム感知受容体が同定された. しかしながら, これらの研究は相互作用すると考えられる GPCR を RAMP と共に細胞に発現させた際に複合体が膜表面に移行するかどうかを指標にしたアッセイを中心に行われているため, 予期しない相互作用因子については解析できていない. また, 一般的な相互作用解析法である免疫沈降法では膜タンパク質複合体を安定に単離することが難しいため, 新規相互作用因子の同定には不向きであると考えられた.

2. 研究の目的

本研究は, RAMP と複合体を形成することによって生じる新規生理活性ペプチド受容体の発見を見据え, RAMP と相互作用する GPCR を網羅的に同定することを主眼として行った. 具体的な目的は以下の通りである.

- (1) RAMP と相互作用する膜タンパク質を網羅的に同定するための手法の確立
- (2) RAMP と相互作用する GPCR 群及びその他の膜タンパク質の網羅的な同定
- (3) GPCR と RAMP の複合体としての解析

(1) では, 申請者らが独自に開発した「*in vivo* 光クロスリンク法」を改良する. 「*in vivo* 光クロスリンク法」は, ①研究対象とするタンパク質に対して, 光クロスリンカーとして働く「非天然型アミノ酸」を生細胞中で部位特異的に導入し, ②細胞に光を照射することで相互作用しているタンパク質との間に架橋を形成させ, ③安定化した複合体を細胞より抽出・精製し, その構成成分をウエスタンブロットもしくは質量分析により解析し, 細胞内での相互作用因子を同定する方法である. 本研究では, これまで困難であった質量分析による相互作用因子の網羅的同定を目指す.

(2) では, 前述のクロスリンク法により RAMP と相互作用する因子の同定を目指す. 一般に, 膜タンパク質を細胞膜から抽出するには比較的強い界面活性剤を用いる必要があるため, 膜タンパク質を複合体として調製

するのは困難である. そのため, 「*in vivo* 光クロスリンク法」を用いて膜タンパク質複合体を細胞内で安定化するアプローチは, 膜タンパク質間の相互作用解析のボトルネックを解消する非常に有効な手段であると考えられる.

(3) では, RAMP-GPCR 複合体の構造および機能について結晶構造解析, クロスリンクによる解析, 生化学的解析によって詳細に解析する.

3. 研究の方法

動物細胞内でのタンパク質への非天然型アミノ酸導入

動物細胞内に非天然型アミノ酸を認識するよう改変されたアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) 変異体と対応するアンバー・サブレッサー tRNA を発現させる. 培養液中に添加された非天然型アミノ酸は細胞内に取り込まれ, 変異型 aaRS の働きでサブレッサー tRNA に特異的に付加される. 一方, 目的のタンパク質の遺伝子上において, 目的の部位を終止コドンの一つであるアンバー・コドン (UAG) に改変しておくことで, 望みの部位に非天然型アミノ酸を持つタンパク質を発現させることができる. クロスリンク能を持つ非天然型アミノ酸としてトリフルオロメチルジアジリニルフェニルアラニン (tmdPhe), パラベンゾイルフェニルアラニン (pBpa) を用いる場合は真正細菌由来チロシル tRNA 合成酵素の変異体を用いる, Ne-トリフルオロメチルジアジリニルベンジルオキシカルボニルリジン (tmdZLys) を用いる場合は古細菌由来のピロリジル tRNA 合成酵素の変異体を用いた.

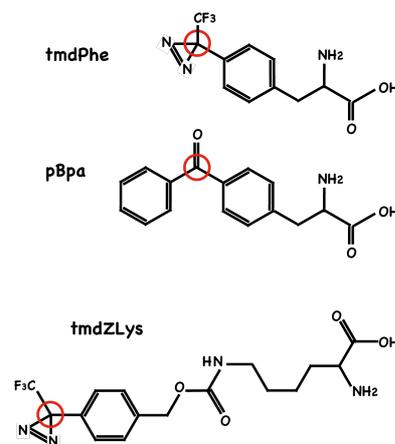


図1 本研究で用いた非天然型アミノ酸. クロスリンク時の反応中心を○で示す.

細胞内光クロスリンクと相互作用因子の同定

クロスリンカーを導入したタンパク質が発現する細胞に 365nm の波長を持つ光を照射し、細胞内での相互作用因子とクロスリンクさせた。さらに、安定化した複合体を免疫沈降法によって単離し、クロスリンク形成の有無をウエスタンブロットによって検証した。また、未知の相互作用因子の同定を質量分析によって行うにあたり、免疫沈降で得られた夾雑物を含む画分から、クロスリンクされたものだけを選択的に同定するために、比較定量的質量分析法である SILAC 法を採用した (図 2)。SILAC 法はコントロール群とサンプル群に含まれるタンパク質の量比を質量分析レベルで解析できる手法である。具体的

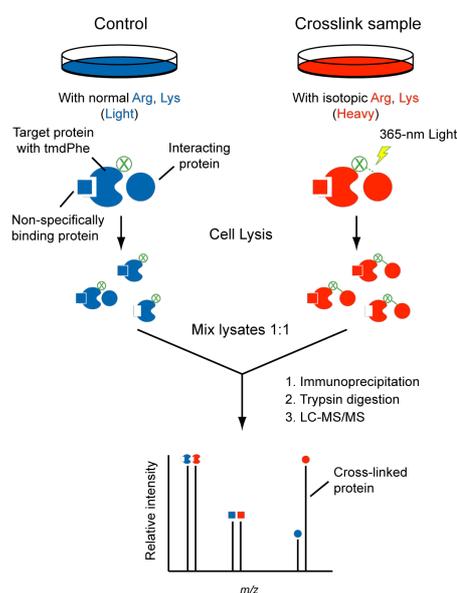


図2 SILAC法によるクロスリンク産物の同定

には、クロスリンカーを含有するタンパク質を発現する細胞を2群準備し、サンプル群にのみ光を照射して架橋反応を誘導する。両細胞群からタンパク質複合体を免疫沈降によって調製すると、サンプル群には安定化されたクロスリンク複合体が含まれる一方、コントロール群ではタンパク質複合体は解離する。結果として、両者に含まれる全タンパク質を質量分析によって同定すると、サンプル群にのみ濃縮されるタンパク質、すなわち、クロスリンクした相互作用因子が同定できる仕組みである。

4. 研究成果

「*in vivo* 光クロスリンク法」と質量分析を組み合わせることによる内在性相互作用因子の同定法の確立

細胞内で生じたクロスリンク複合体の構成成分を質量分析によって解析する手法の開発を行った。具体的には HEK293 細胞中に光クロスリンカー tmdPhe を部位特異的に導入した GRB2 アダプタータンパク質を発現させ、細胞に光を照射することで内在性の相互作用因子とクロスリンクさせた。捕捉した相互作用因子群を、SILAC 法を用いた比較定量的質量分析によって同定した。この結果、GRB2-SH2 ドメインの既知相互作用因子である EGFR と SHP2 に加え、新規相互作用因子として AF6 や GIT1、また、hnRNPF を含む複数の RNA 結合タンパク質が同定された。AF6 や GIT1 は膜近傍に存在するタンパク質複合体中に含まれ、また、その配列中に GRB2-SH2 結合配列が見出されたことからアダプタータンパク質である GRB2 の結合因子として妥当であると考えられた。一方で、RNA 結合タンパク質と GRB2-SH2 の相互作用に関する情報は殆ど無く、その相互作用様式は不明であった。そこで、GRB2 と hnRNPF の詳細な相互作用解析を行い、両者の相互作用が細胞質内および核内で生じること、GRB2 の SH2 ドメインと hnRNPF の 2 番目の RRM ドメインとが相互作用すること、また、両者の相互作用にはリン酸化が必須ではないことを示した [J. Mol. Biol. (2011)].

鎖長の長いクロスリンカーの開発とタンパク質への導入

これまで用いていたクロスリンクアミノ酸は鎖長が短く、非常に限定的な範囲でしか反応しないため、様々な相互作用因子を捕捉するためにはクロスリンカーの導入箇所を変えた複数の変異体を用意する必要があった。そこで、鎖長が長くフレキシブルな構造を持ち、かつタンパク質中に部位特異的に導入可能な新規クロスリンカー (N ϵ -トリフルオロメチル-ジアジリニル-ベンジルオキシカルボニル-リジン:tmdZLys) を開発した。このクロスリンカーは、古細菌に由来するピロリジン tRNA 合成酵素の変異体とピロリジン tRNA を哺乳類培養細胞中に発現させることで、目的のタンパク質に対して部位特異的に取り込ませることができた。さらに、実際に tmdZLys は既存のクロスリンカーと比較して広い範囲で対象タンパク質とクロスリンクすることを示した [Mol. BioSyst. (2012)].

RAMP-GPCR 間の *in vivo* 光クロスリンク

当グループ内において RMAP2 細胞外ドメインと GPCR の一種であるカルシトニン受容体様受容体 (CRLR) の細胞外ドメインとの複合体結晶構造が得られた。この複合体が実際

に細胞膜上で形成されているかどうかを調べるため、RAMP2 の様々な位置に光クロスリンカーであるパラベンゾイルフェニルアラニン (pBpa) を導入した変異体を全長の CRLR とともにヒト胎児腎臓細胞膜上に共発現させ、細胞に UV 照射した際のクロスリンクの有無を調べた。その結果、結晶構造中で見られた両者の相互作用領域の近傍に pBpa を導入した時のみクロスリンクが見られたことから、この複合体が生体膜上でも同じ様式で形成されていることがわかった [Protein Sci. (2012)]. また、RAMP1 と CRLR の相互作用様式についても同様に解析し、RAMP2 を用いて得られた結果と比較したところ、両者とも構造上ホモロジカルな位置でクロスリンクが形成されたことから、CRLR は RAMP1 および RAMP2 と同様の様式で相互作用していることが示唆された。さらに、本研究成果を応用し、インターロイキン5とその受容体、CD38 二量体の相互作用様式について *in vivo* 光クロスリンク法によって解析し、その成果を報告した [Prot. Sci. (2012), Structure (2012)].

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9件)

“Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft-association activities”

Hara-Yokoyama M., Kukimoto-Niino M., Terasawa K., Harumiya S., Podyma-Inoue K. A., Hino N., Sakamoto K., Itoh S., Hashii N., Hiruta Y., Kawasaki N., Mishima-Tsumagari C., Kaitsu Y., Matsumoto T., Wakiyama M., Shirouzu M., Kasama T., Takayanagi H., Utsunomiya-Tate N., Takatsu K., Katada T., Hirabayashi Y., Yokoyama S., Yanagishita M. *Structure* **20**, 1585-1595 (2012). (査読有)

DOI: 10.1016/j.str.2012.06.017.

“Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its alpha receptor”

Kusano S., Kukimoto-Niino M., Hino N., Ohsawa N., Ikutani M., Takaki S., Sakamoto K., Hara-Yokoyama M., Shirouzu M., Takatsu K., Yokoyama S. *Protein Sci.* **21**, 850-864 (2012). (査読有)

DOI: 10.1002/pro.2072.

“Wide-range protein photo-crosslinking achieved by a genetically encoded Ne-(benzyloxycarbonyl)lysine derivative

with a diazirinyl moiety” Yanagisawa T., Hino N. (co-first author), Iraha F., Mukai T., Sakamoto K., Yokoyama S. *Mol. BioSyst.* **8**, 1131-1135 (2012). (査読有)

DOI:10.1039/C2MB05321G

“Structural basis for extracellular interactions between calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 for adrenomedullin-specific binding” Kusano S., Kukimoto-Niino M., Hino N., Ohsawa N., Okuda K., Sakamoto K., Shirouzu M., Shindo T., Yokoyama S. *Protein Sci.* **21**, 199-210 (2012). (査読有)

DOI:10.1002/pro.2003

“Site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells” Hino N., Sakamoto K., Yokoyama S. *Methods Mol. Biol.* **794**, 215-228 (2012). (査読無)

DOI:10.1007/978-1-61779-331-8_13

“Genetic incorporation of a photo-crosslinkable amino acid reveals novel protein complexes with GRB2 in mammalian cells” Hino N., Oyama M., Sato A., Mukai T., Iraha F., Hayashi A., Kozuka-Hata H., Yamamoto T., Yokoyama S., Sakamoto K. *J. Mol. Biol.* **406**, 343-353 (2011). (査読有)

DOI: 10.1016/j.jmb.2010.12.022.

“Dissecting Cell Signaling Pathways with Genetically Encoded 3-Iodo-L-tyrosine”

Hayashi A., Hino N., Kobayashi T., Arai R., Shirouzu M., Yokoyama S., Sakamoto K. *ChemBioChem* **12**, 387-389 (2011). (査読有)

DOI: 10.1002/cbic.201000665.

“Crystallographic study of a site-specifically crosslinked protein complex with a genetically incorporated photo-reactive amino acid” Sato S., Mimasu S., Sato A., Hino N., Sakamoto K., Umehara T., Yokoyama S. *Biochemistry* **50**, 250-257 (2011). (査読有)

DOI: 10.1021/bi1016183

“Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein” Tagami S., Sekine S., Kumarevel T., Hino N., Murayama Y., Kamegamori S., Yamamoto M., Sakamoto K., Yokoyama S. *Nature* **468**, 978-982

(2010). (査読有)
DOI: 10.1038/nature09573

[学会発表] (計4件)

「インターロイキン-5 受容体 α 鎖による 2 量体インターロイキン-5 認識の構造的基盤」
草野清輔, 新野睦子, 樋野展正, 大沢登, 生谷尚士, 高木智, 坂本健作, 横山三紀, 白水美香子, 高津聖志, 横山茂之 第12回日本蛋白質科学会年会 / 名古屋 2012年6月

「新たなクロスリンカー含有非天然型アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入と、その広域性光クロスリンク能」
柳沢達男, 樋野展正, 伊良波史枝, 向井崇人, 坂本健作, 横山茂之 第14回日本RNA学会年会 / 仙台 2012年7月

「ジアジリン含有ベンジルオキシカルボニルリジン誘導体のタンパク質への部位特異的導入と広域性光クロスリンク能」
柳沢達男, 樋野展正, 伊良波史枝, 向井崇人, 坂本健作, 横山茂之 日本ケミカルバイオロジー学会第七回年会 / 京都 2012年6月

「RNA ポリメラーゼの新規コンフォメーション状態」
田上俊輔, 関根俊一, Thirumananseri Kumarevel, 樋野展正, 村上裕子, 亀ヶ盛俊介, 山本雅貴, 坂本健作, 横山茂之 第12回日本RNA学会年会 / 2010年7月

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新たな非天然タンパク質及びその利用
(N-(p-trifluoromethyl diazirinylbenzyloxycarbonyl)-lysine)

発明者: 坂本健作, 柳沢達男, 樋野展正, 伊良波史枝, 横山茂之

権利者: 理化学研究所

種類: 特許権

番号: 2011-253307

出願年月日: 2011.11.18

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋野 展正 (HINO NOBUMASA)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 90469916