

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 5 月 24 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22750071

研究課題名（和文） 特異な酵素反応を利用した細胞内タンパク質機能制御システムの開発

研究課題名（英文） Regulation of protein function in living cells by using a unique enzyme reaction

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・准教授

研究者番号：00325581

研究成果の概要（和文）：古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化反応は、ビオチン化酵素がそのビオチン化された基質タンパク質と安定な複合体を形成するという特異な性質を有している。本研究ではこのビオチン化酵素反応系を利用して、標的タンパク質の細胞内での機能を制御できるシステムの構築について検討を行った。実際にこの酵素反応系を利用して、動物細胞内に発現させた標的タンパク質に関して、その細胞内での局在を制御することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Biotinylation reaction from archaeon *Sulfolobus tokodaii* has a unique characteristic that the biotin ligase forms a stable complex with its biotinylated substrate protein. In the present work, by using this unique biotinylation reaction, we attempted to construct the system that enables the regulation of the functions of the target proteins in living cells. As a result of the study, we have succeeded in the regulation of localization of a target protein in living cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：タンパク質機能制御・ビオチン化反応・膜タンパク質・細胞膜

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在するすべてのタンパク質の機能解明を目的とした、プロテオーム解析が精力的に展開されている。細胞内での特定のタンパク質の機能・役割を推定する手法としては、遺伝子ノックアウト法や遺伝子

ノックダウン法があるが、これらにはそれぞれ問題点がある。具体的には、遺伝子ノックアウト法では、対象とするタンパク質がその生物（細胞）の生育にとって必須である場合、原理的にその遺伝子を破壊した細胞株を作製することができないため、こ

のような系に遺伝子ノックアウト法を適用することはできない。一方でRNAi法などに代表される遺伝子ノックダウン法では、必ずしも目的遺伝子の発現を抑えることができない可能性や、目的以外の遺伝子の発現が抑制される可能性があるという問題点が指摘されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、このような既存の手法とは原理の異なる細胞内でのタンパク質の機能解析手法を開発することを目的として検討を行った。この目的のために、古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応系を利用した。この酵素反応系を利用して、標的タンパク質の細胞内での局在を制御することにより、特異的にタンパク質の機能制御が可能なシステムの構築について検討した。

3. 研究の方法

ビオチン化酵素反応は、ビオチンリガーゼ (BPL) がその基質タンパク質 (BCCP) の特定のリジン残基にビオチンを固定化する反応である。 *S. tokodaii* 由来のビオチン化反応は、BPL がその反応生成物であるビオチン化された BCCP と非常に安定な複合体を形成するという特徴を有している (図1)。

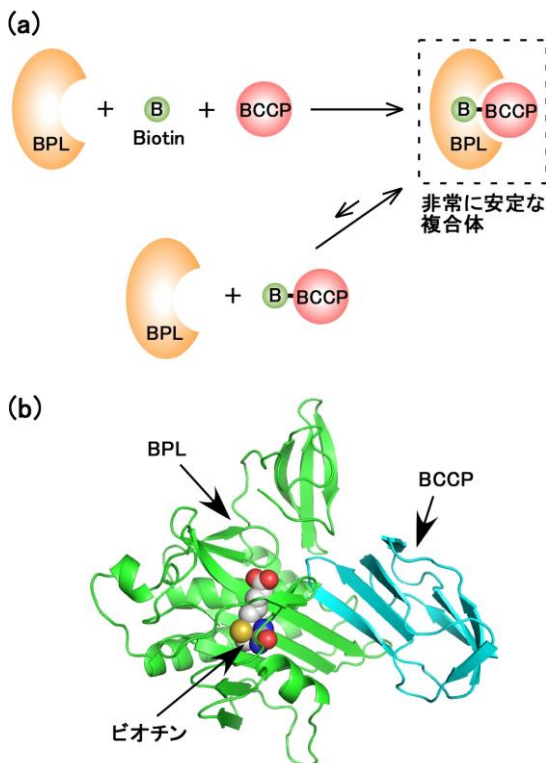


図1 *S. tokodaii* ビオチン化反応の模式図 (a)ならびに BPL-BCCP 複合体のモデル図

本研究では標的とするタンパク質を BCCP との融合タンパク質として発現させ、BPL との複合体形成反応を通じて、その細胞内での機能を制御することを試みた (図2)。具体的には、BCCP を連結した標的タンパク質を細胞内に発現させた後、膜タンパク質を連結した BPL を共発現させる。この際、BCCP 部位と BPL との間で安定な複合体が形成され、標的タンパク質が細胞膜の内側に固定されることになる。これにより標的タンパク質が細胞内で自由に動くことができなくなり、その細胞内での働きが抑制されることが期待される。その後、その細胞株の表現型を調べることにより、標的タンパク質の機能を推定することができる。

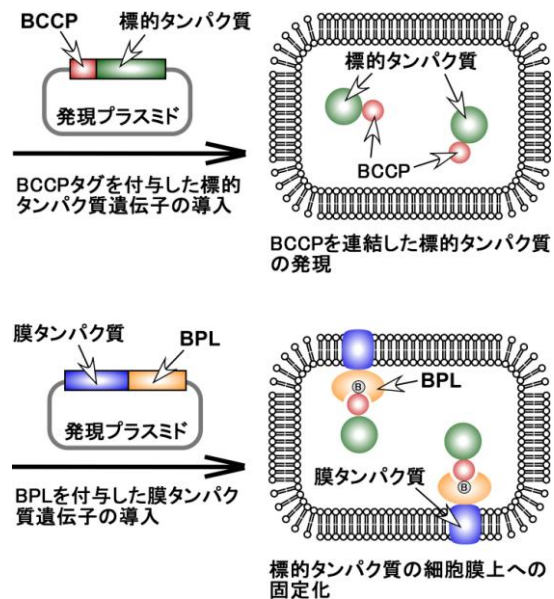


図2 *S. tokodaii* ビオチン化反応を利用したタンパク質の機能制御システムの模式図

4. 研究成果

(1) 融合タンパク質の発現系の構築

膜タンパク質と BPL の融合タンパク質、並びに標的タンパク質と BCCP の融合タンパク質の動物細胞での発現系を構築した。膜タンパク質としては、ブラジキニン B2 レセプター (B2R) 及び PDGF レセプターの膜貫通ドメイン (TM) を選び、それぞれを BPL の N 末端に連結した融合タンパク質 (B2R-BPL 及び TM-BPL) の発現プラスミドを作成した (図3)。この際、膜タンパク質と BPL 間での立体的な衝突を回避するために、両タンパク質間に十分長さのリンカー配列を挿入した。また、発現確認を容易にするために、膜タンパク質とそのシグナル配列 (膜移行配列) の間に FLAG タグ配列を挿入した。一方で、BCCP を連結する標的タンパク質としては、蛍光タンパク質 (GFP) を選び、GFP の N 末端に BCCP を連結

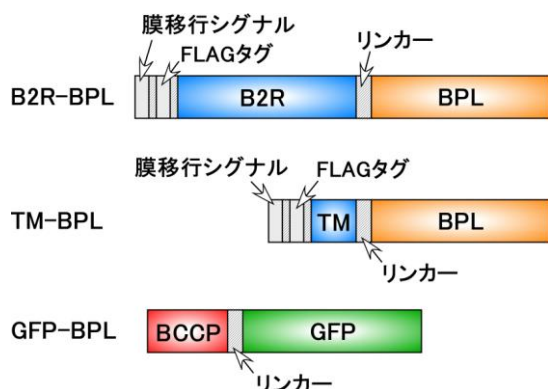


図3 本研究で使用した融合タンパク質のドメイン構造

した融合タンパク質 (BCCP-GFP) の動物細胞での発現系を構築した (図3)。標的タンパク質として GFP を選んだ理由は、その細胞内での局在が蛍光顕微鏡を利用して容易に観察ができるためである。

(2) 融合タンパク質の発現確認

まず目的の融合タンパク質の動物細胞 (HEK293 細胞) での発現確認を行った。発現プラスミドの細胞への導入 (トランスフェクション) は、市販のリポフェクション試薬を用いて行った。トランスフェクション後、1日あるいは2日細胞を培養した後、発現確認を行った。BCCP-GFP に関しては、トランスフェクション後 24 時間で十分に細胞内に発現することが、蛍光顕微鏡を利用した観察や、アビジンプロットングにより確認できた。同じく、TM-BPL についてもトランスフェクション後 24 時間で十分に細胞内に発現することがわかった。この際、発現確認は FLAG 抗体を利用した蛍光イメージングやプロットング解析により行った。一方で B2R-BPL に関しては、十分な量の発現には、トランスフェクション後 48 時間程度の培養が必要であることがわかった。これは B2R が 7 回膜貫通構造を有する GPCR タンパク質の一種で、一回膜貫通構造の TM よりも複雑な構造を有するためであると考えられた。

(3) ビオチン化反応を利用した標的タンパク質の細胞内での局在制御

BCCP を連結した標的タンパク質 (BCCP-GFP) を、膜タンパク質を連結した BPL と共に細胞内に発現させ、その細胞内での局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。まず B2R-BCCP を用いて検討を行ったところ、GFP に由来する蛍光が細胞の輪郭から確認できた (図4A)。一方で BCCP-GFP のみを発現させた場合にはこのような局在は確認できなかった (図4C)。これより期待通り BCCP と BPL 間の複合体形成反応 (ビオチン化反応)

を通じて、標的タンパク質の細胞内での局在を制御できることがわかった。

細胞内に発現させる B2R-BPL と BCCP-GFP の量比について検討を行ったところ、B2R-BPL を過剰に発現させた方が、BCCP-GFP の局在化が明瞭になることがわかった。また培地へのビオチンの添加効果について検討を行ったところ、ビオチンを添加することにより局在化が抑制されることがわかった。これは過剰のビオチンが細胞内に存在すると、BPL の活性サイトにビオチンが結合し、すでに細胞内でビオチン化されている BCCP 融合タンパク質の BPL への結合を阻害するためであると考えられた。これより、血清入り培地中に元々存在する少量のビオチンだけを利用した方が、標的タンパク質の局在化制御に有利であることがわかった。

同様に TM-BPL と BCCP-GFP を共発現させた細胞について蛍光観察を行った。その結果、この場合も BCCP-GFP の細胞内での局在は確認できたが、BCCP-GFP は細胞膜 (形質膜) ではなく、主として核膜上に局在化することがわかった (図4B)。形質膜よりも核膜に局在化した理由は不明であるが、核の外膜が小胞体と連続していることを考えると理論的に起こり得る事象である。この性質を利用する

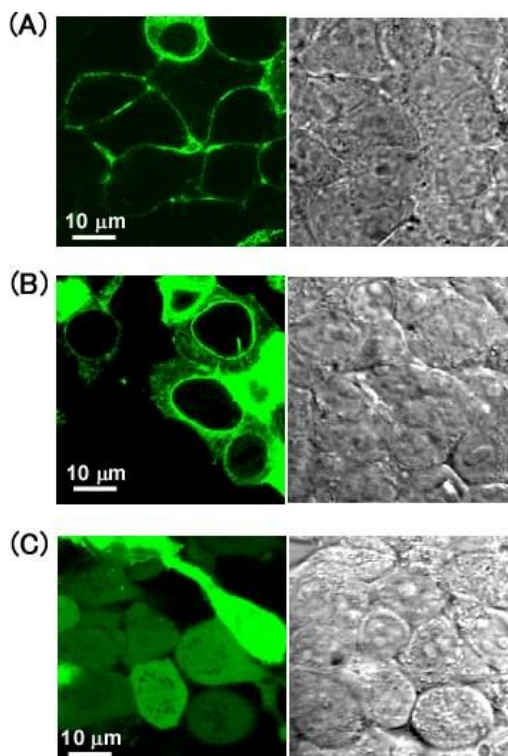


図4 膜タンパク質を連結した BPL と BCCP-GFP を共発現させた細胞の共焦点レーザー顕微鏡像 (左: 蛍光像、右: 微分干渉像)、(A) B2R-BPL を共発現させた系、(B) TM-BPL を共発現させた系、(C) BCCP-GFP のみを発現させた系 (コントロール)

と核へ移行する性質を有するタンパク質の機能を積極的に制御できるものと期待される。例えば転写調節因子などの機能制御が考えられる。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけ等・今後の展望

本研究では *S. tokodaii* 由来の特異なピオチン化酵素反応系を利用して、タンパク質の細胞内での局在を制御することに成功した。細胞内に存在する多くのタンパク質は、細胞内での動きを制御されることによりその機能を果たせなくなるため、本手法はタンパク質の機能制御システムとして活用できるものと期待される。本手法では細胞の生育に必須なタンパク質についても解析可能であり、またその反応特異性が非常に高いため、既存の遺伝子ノックアウト法や遺伝子ノックダウン法を代替あるいは補完する手法として発展させることが可能であると考えられる。

今後はまず本システムを実用化に近づけるために、細胞内に元々存在するタンパク質を標的として実験を行う必要があると考えられる。そのためには染色体上に存在する標的タンパク質の遺伝子を、BCCP を有する同遺伝子で置換する必要がある。従来は高等生物の遺伝子の組み換えは熟練した技術と長い時間を有することが常識であったが、最近では配列特異的な人工ヌクレアーゼが開発され、比較的容易に染色体上の遺伝子の改変が可能となっている。したがって、このような人工ヌクレアーゼを利用して、染色体上の標的タンパク質の遺伝子に BCCP をコードする DNA 断片を挿入する。そして、このような染色体上の遺伝子について改変を行った細胞を利用して解析を行うことにより、これまで得られていなかった様々な有用な知見が得られるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① 末田慎二、新北幸、草場壮、An SH2 domain-based tyrosine kinase assay using biotin ligase modified with a terbium(III) complex、Vol. 29、2013、pp. 491-497、査読有り
DOI: 10.2116/analsci.29.491
- ② 末田慎二、米田佐和子、林秀樹、Site-specific labeling of proteins by using biotin protein ligase conjugated with fluorophores、Vol. 12、2011、pp. 1367-1375、査読有り
DOI: 10.1002/cbic.201000738

[学会発表] (計9件)

- ① 有須田一馬、末田慎二、膜タンパク質とピオチンリガーゼの融合体を利用した細胞内タンパク質の局在制御、日本分析化学会第61年会、2012年9月19日、金沢大学角間キャンパス (石川県)
- ② 有須田一馬、末田慎二、特異な酵素反応を利用した細胞内タンパク質の機能制御システムの構築に関する検討、第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場 (福岡県)
- ③ 末田慎二、米田佐和子、山本千裕、蛍光性ピオチンリガーゼを利用した生細胞系でのタンパク質の蛍光ラベル化技術の開発、日本分析化学会第60年会、2011年9月24日、名古屋大学東山キャンパス (愛知県)

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号：00325581