

新規蛍光ラベル法による膜受容体の内在化の可視化

松崎 勝巳, 矢野 義明

蛍光タンパク質を目的タンパク質に融合して生細胞蛍光イメージングを行う手法は現在広く用いられているが、サイズが大きい・多色ラベルの際にラベル比のコントロールが難しいなど問題点もある。これらの問題点を克服するため、目的タンパク質に小さなタグ配列を融合し、このタグ配列に特異的に結合する分子を蛍光ラベルしてプローブとして用いる翻訳後ラベル法が盛んに研究されるようになってきている。本稿では、著者らが近年開発した、コイルドコイル構造を形成するペプチドペア（(EIAALKE)_nと(KIAAKLEK)_n）を利用する蛍光ラベル法の原理と、膜受容体標識法としての利点を紹介する。また応用例として、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を二色標識することにより、受容体の活性化に伴う細胞内への内在化を蛍光強度レシオで簡便に評価できることを示す。

はじめに

2008年度のノーベル化学賞が「緑色蛍光タンパク質 GFP の発見と開発」に対し授与されたことからわかるように、蛍光イメージングは今や生命科学研究にとって不可欠の実験技術となっている。しかし、一方で蛍光タンパク質の利用が進むにつれ、いくつかの問題点も明らかとなってきた。蛍光タンパク質は 30 kDa 程度の大きな分子であるため、蛍光タンパク質の融合によって、イメージングしたい目的タンパク質の機能を損ねたり、凝集を引き起こしたりする場合がある¹⁾。また、タンパク質の会合を蛍光励起エネルギー移動法 (FRET) などにより調べる場合、目的タンパク質を 2 色の蛍光タンパク質でラベルする必要があるが、ラベル比のコントロールが難しい。

こうした問題点を克服する方法として、小分子による翻訳後ラベル法が近年盛んに研究されている。これは、目的タンパク質に小さなタグ配列を融合し、このタグ配列に特

異的に結合する分子を蛍光ラベルしてプローブとして用いることで、目的タンパク質を蛍光ラベルする方法である (図 1)。この方法では、1) 小分子でラベルできるため、目的タンパク質の機能を損なう可能性が低い、2) ラベルしたい時点を自由に選べる、3) 膜不透過性のプローブを用いることで、細胞表面の目的タンパク質のみ選択的に標識できる、4) 好みの蛍光色素でラベルできる、5) 2 色ラベルの際、ラベル比を自由に正確にコントロールできる、などの優れた特徴を持つ。

これまで開発された翻訳後ラベル法では、タンパク質-リガンド相互作用、ペプチド-ペプチド相互作用、ペプチ

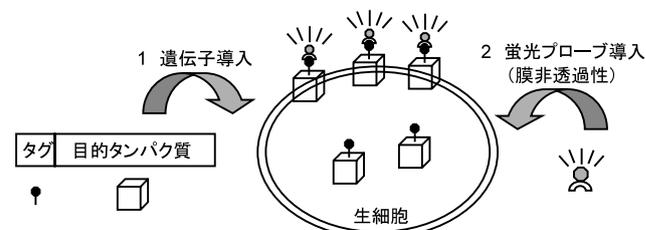


図 1 タグ-プローブ間相互作用に基づく小分子蛍光ラベル法の原理

はじめに目的タンパク質とタグ配列を遺伝子上で融合して生細胞に発現させ、発現後にタグ特異的に結合する蛍光プローブを外部から加えることで、目的タンパク質特異的な蛍光標識を行う。膜非透過性のプローブを用いることで、細胞表面の目的タンパク質のみを標識できる。

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

Visualization of membrane receptor internalization by novel fluorescent labeling method

Katsumi Matsuzaki and Yoshiaki Yano (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

ド-蛍光色素相互作用, 金属によるキレート形成, 酵素反応などが利用されている. それぞれの原理, 長所短所など詳細については, 筆者による最近の総説を参照されたい²⁾. 本稿では, 筆者らが開発したペプチド-ペプチド相互作用を利用した新規蛍光ラベル法について紹介する.

1. 原 理

Hodges のグループは, グルタミン酸を多く含み負に帯電した E ペプチド (EIAALKE)_n とリシンを多く含み正に帯電した K ペプチド (KIAALEK)_n (n=3 または 4) が強固なヘテロ二量体をつくることを報告した³⁾. 図 2 に示すように, 両者は疎水性相互作用と静電相互作用によってコイルドコイルを形成する. 我々は, これを膜受容体のラベリングに利用しようと試みた⁴⁾. E4 や K4 は, 高濃度で自己会合する傾向があるため, これらを受容体に融合する

と, 受容体のオリゴマー化を誘発する危険性がある. そこで, 短い方の E3 あるいは K3 をマウスプロスタグランジン E2 受容体 EP3 β サブタイプ の N 末端に融合し, 受容体の局在を見るため強化黄色蛍光タンパク質 (EYFP) を C 末端に融合した. これを CHO 細胞に一過性発現させ, 蛍光色素テトラメチルローダミン (TMR) でラベルした K ペプチド, E ペプチドをそれぞれ添加したところ, E3 融合受容体+TMR ラベル K ペプチドの組み合わせの場合のみ, 効率的にラベルができた (図 3). 結合の解離定数は, K3, K4 に対し, それぞれ 64 nM, 6 nM であった. この高い親和性により, プローブ濃度は 10-20 nM 程度でも十分なラベル化が可能であり, 洗浄操作をしなくても実用上問題がなく, 培地中でも標識できる. また, ラベル化に必要な時間は 1 分以内であり, きわめて迅速にラベル化ができる. また, TMR ラベル K4 とローダミングリーン (RG) ラ

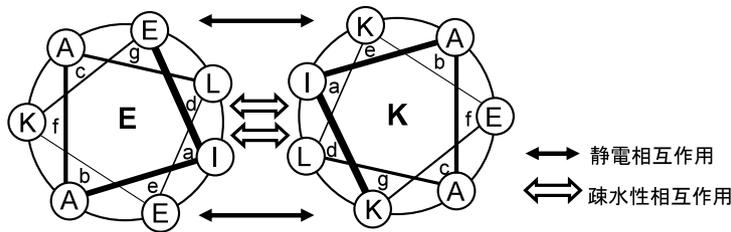


図 2 コイルドコイルラベル法の原理
E ペプチドと K ペプチドが形成するコイルドコイル構造の車輪図. Lys-Glu 間の静電引力及び疎水性残基 (Leu, Iso) 間の相互作用によりヘテロ二量体を形成する.

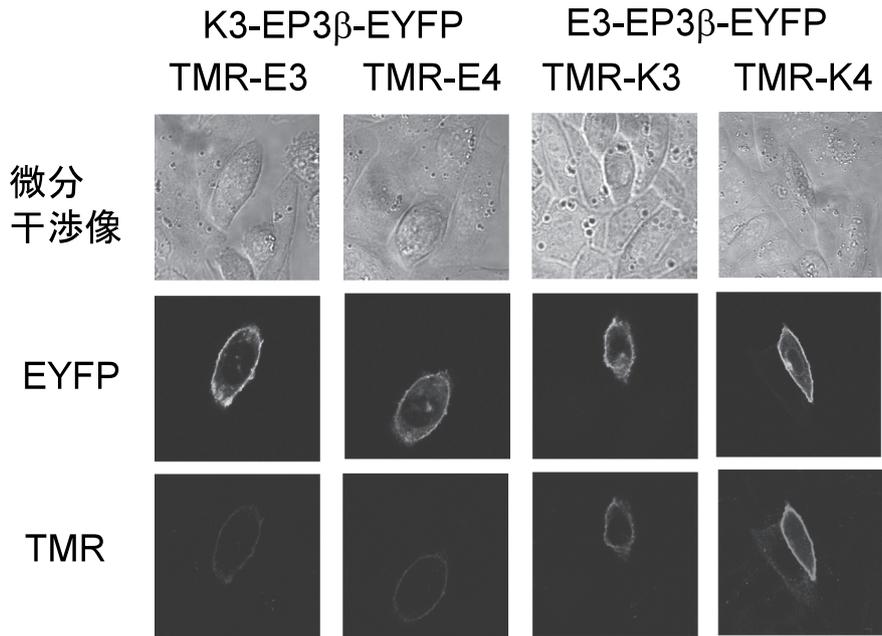


図 3 タグ-プローブ配列ペアの検討
融合タンパク質 E3-EP3 β -EYFP または K3-EP3 β -EYFP を CHO 細胞に一過性発現させ, 受容体を発現した細胞 (EYFP 蛍光で確認) に TMR ラベルした K または E ペプチド (20 nM) をそれぞれ加えた時の共焦点顕微鏡写真.

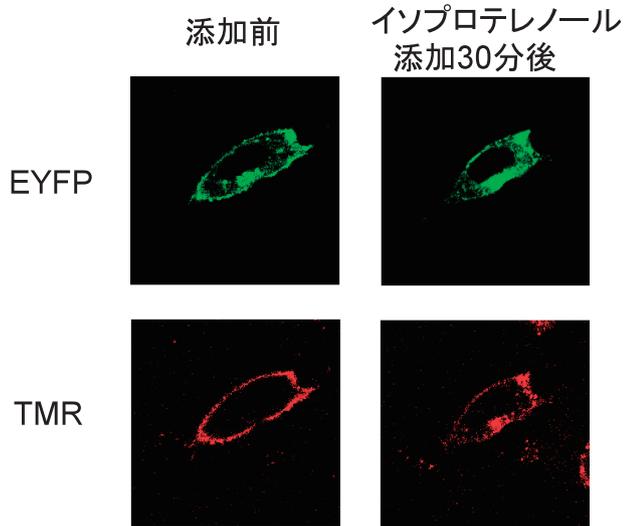


図4 アゴニスト刺激によるアドレナリンβ2受容体内在化の観測

CHO細胞に一過性発現させたE3-β2AR-EYFPをTMR-K4 (20 nM) で染色後、イソプロテレノール (10 μM) を添加した時の共焦点顕微鏡写真。

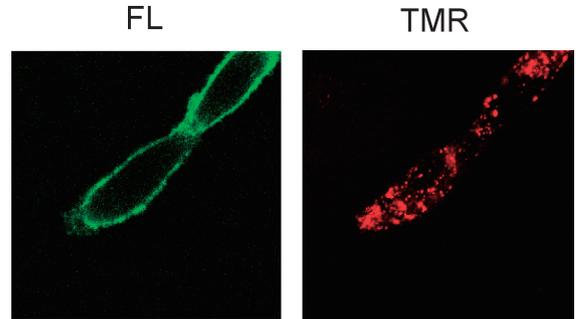


図5 パルス-チェイスラベルによる内在化した受容体と表面受容体の識別

CHO細胞に一過性発現させたE3-β2ARをTMR-K3 (60 nM) で染色後、イソプロテレノールを添加し5分インキュベートした。細胞表面のプローブをPBS洗浄した後、FL-K4 (20 nM) で再染色した。

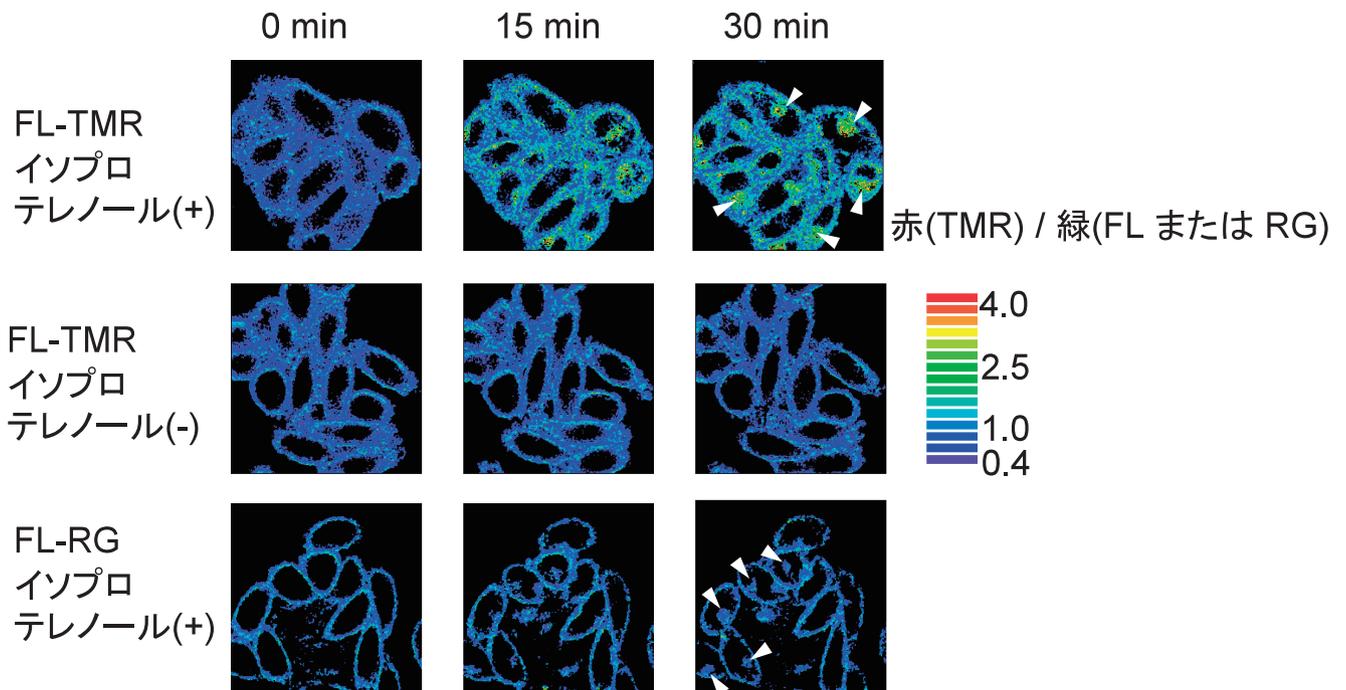


図6 内在化の蛍光レシオイメージング

CHO細胞に安定発現させたE3-β2ARをTMR-K4及びFL-K4 (各10 nM) で共ラベル後、イソプロテレノールを添加した (上段)。内在化に伴うpH低下によりTMR/FL蛍光強度比は増加する (矢尻)。(中段) イソプロテレノール非添加のコントロール。(下段) pH非感受性のRGとTMRで共ラベルした時のコントロール。

ベル K4 の 1:1 混合物を投与すると、2色で 1:1 ラベルできる。この特徴を使えば、受容体のオリゴマー化が FRET を用いて生細胞上で容易に検出できる。

この E3 タグ-K4 プロープのラベルによって受容体の機能は損なわれないことを EP3 β やヒトアドレナリン β 2 受容体 (β 2AR) で確認した。また、K4 プロープは少なくとも 10 μ M までは毒性を示さず、水溶液は 4 $^{\circ}$ C 保存で 1 ヶ月は安定であり、ラベル試薬として問題のない性質を備えている。

2. 受容体の活性化に伴う内在化の検出

本ラベル法の応用として、受容体の活性化に伴う内在化の可視化を試みた (図 4)。E3- β 2AR-EYFP を CHO 細胞に一過性に発現させ、TMR-K4 でラベルした後、アゴニストであるイソプロテレノールを加えた。EYFP の画像では、細胞膜にソーティングされていない受容体も蛍光を発するため、活性化に伴う内在化が明瞭には検出できない。これに対し、膜不透透性の TMR-K4 は細胞膜に存在する受容体のみ選択的にラベルできるため、TMR の画像では、内在化が明瞭に観察できる。

より低親和性の K3 の場合、洗浄による除去が可能であるため、パルス-チェイスラベルが可能である。図 5 に一例を示した。まず、E3- β 2AR を TMR-K3 でラベルし、イソプロテレノール投与 30 分後、まだ内在化されていない受容体に結合した TMR-K3 を洗浄除去し、新たにフルオレセイン-K4 (FL-K4) で再ラベルした。すでに内在化した受容体とそうでない受容体が明瞭に色で区別できる。

3. リガンドスクリーニングへの応用

受容体の内在化は、従来よりリガンドスクリーニングに活用されている。一般的には、蛍光タンパク質を融合した受容体を用い、内在化を画像解析によって定量化する方法が用いられている⁹⁾。しかし、上述したように、細胞膜にソーティングされない受容体が存在する場合、判定が難しい。また、高解像度の画像を必要とする、結果が画像解析のアルゴリズムに依存するなどの問題点もある。そこで、我々は、本ラベル法の利点を生かし、受容体の内在化を色調変化に変え、数値的に評価する方法を開発した (投稿中)。

エンドソームに内在化されると pH が低下することを利用し、受容体を pH 感受性色素である FL-K4 と pH 非感受性色素である TMR-K4 で共ラベルした。pH が低下すれば、FL の蛍光強度のみが低下するため、TMR/FL 蛍光強度比は増大することとなる。E3- β 2AR を安定発現した CHO 細胞にイソプロテレノールを投与すると、受容体の内在化に伴い TMR/FL 蛍光強度比は増大した (図 6)。この強度比変化が受容体の会合による FRET によるものでは

ないことを確認するため、FL と同様の蛍光特性を示すが pH 依存性を示さない RG と TMR で共ラベルしたところ、受容体が内在化しても TMR/RG 蛍光強度比は変化しなかったことから、TMR/FL 蛍光強度比の増大は、エンドソーム内の pH 低下を反映していることが明らかとなった (図 6)。エンドソーム内の TMR/FL 蛍光強度比 (約 3 倍) から、pH は 5.5~6 と見積もられ、後期エンドソーム内の pH と一致する。

さらに、画像解析をしなくてもリガンドスクリーニングが可能かどうかを調べるため、取得画像全体の TMR/FL 蛍光強度比をいくつかの薬物について計算したところ、アゴニスト、アンタゴニスト活性を濃度依存性も含めて評価できることが明らかとなった。

おわりに

以上、当研究室で最近開発した受容体の新規蛍光標識法について概説した。本手法は 1) 5~6 kDa 程度の小分子による標識のため、受容体の機能に影響しにくい、2) 迅速に任意の色素で多色ラベルできる、3) 高親和性であるため、従来法の 100 分の 1 程度の低濃度で標識ができ、非特異的染色が少ない、4) 細胞表面の受容体のみ標識できるため、受容体の内在化を正確に追うことができる、5) 細胞毒性がない等の多くの優れた特徴を有する。現在、本手法を用いて、生細胞中での受容体のホモオリゴマー検出を進めている。本手法と直交した (orthogonal な) 他の蛍光標識法とを組み合わせれば、異なる受容体同士のヘテロオリゴマー検出も可能となるであろう。将来、この方法が受容体研究に汎用されることを願ってやまない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導頂きました京都大学大学院薬学研究科藤井信孝教授、辻本豪三教授、大石真也講師、熊本大学大学院薬学教育部杉本幸彦教授ならびに学生諸氏に深謝致します。また、本研究は文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム、JST シーズ発掘試験研究によって行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Lisenbee, C.S., Karnik, S.K., & Trelease, R.N. (2003) *Traffic*, 4, 491-501.
- 2) Yano, Y. & Matsuzaki, K. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, 1788, 2124-2131.
- 3) Litowski, J.R. & Hodges, R.S. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 37272-37279.
- 4) Yano, Y., Yano, A., Oishi, S., Sugimoto, Y., Tsujimoto, G., Fujii, N., & Matsuzaki, K. (2008) *ACS Chem. Biol.*, 3, 341-345.
- 5) Lee, S., Howell, B., & Kunapuli, P. (2006) *Methods Enzymol.*, 414, 79-98.