

## 2.HRP 遺伝子発現系を用いた新規 EMARS 法の開発

山口亜利沙<sup>1)</sup>、小谷典弘<sup>2)</sup>、本家孝一<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup>高知大・医・糖セ、<sup>2)</sup>高知大・医・先端医療セ

【背景と目的】最近本研究グループでは、生細胞表面において、任意の分子と会合する分子を簡便に同定する EMARS 法の開発に成功した。本法は、アリアルアジド基を、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の酵素作用でラジカル活性化する Enzyme-Mediated Activation of Radical Source (EMARS) 反応を原理とする。生細胞表面に存在する任意の分子に、HRP 標識した抗体を結合させ、アリアルアジド-FITC を添加すると、EMARS 反応により半径 200-300 nm の近傍分子のみが FITC 標識される。本法は、簡便に生きている細胞の細胞膜上で相互作用する分子を同定できるため、今後、細胞生物学や医学を中心として広く利用されることが期待される。しかし、標的分子を認識する優れた抗体が必要なことや、細胞膜表面での分子会合しか調べることができない等の制約があった。そこで本研究では、“HRP” を遺伝子工学的に細胞内に強制発現させることでこれらの制約を改善した、第 2 世代 EMARS 法を開発しようとした。ここでは、そのモデル系として、HRP を脂質ラフトに発現させ、細胞膜上に存在するラフト領域の会合分子を同定する方法の確立を目指す。

【方法】GPI アンカー型タンパク質は脂質ラフトに輸送・濃縮されることが知られている。そこで、まず HRP に Thy-1 由来あるいは DAF 由来の GPI アンカーシグナルをつなげた HRP-GPI を作製し、これを HeLaS3 細胞に導入した。この際、HeLaS3 細胞での HRP タンパク質の発現をウェスタンブロットおよび共焦点顕微鏡にて確認した。また、GPI アンカー型タンパク質はラフトに局在するため、HRP-GPI がラフト画分に局在するか否かについてシヨ糖密度勾配法を用いて確認した。次に、作製した HRP 発現型 HeLaS3 細胞を用いて EMARS 反応を行い、近傍分子が FITC 標識されるか否かについて、蛍光イメージアナライザーを用いて確認した。さらに、EMARS 反応にて FITC 標識されたタンパク質を、抗 FITC ビーズにて濃縮し、LC/MS/MS にて解析した。

【結果】HRP-DAFGPI あるいは HRP-Thy1GPI の発現を確認したところ、HRP タンパク質の発現がウェスタンブロットにより確認された。また、共焦点顕微鏡解析により、HRP が細胞内および細胞膜に局在していることが明らかとなった。さらに、シヨ糖密度勾配法により、HRP-GPI がラフトに局在していることが確認された。次に、これらの HRP 発現細胞を用いて EMARS 反応を行ったところ、多数の FITC 標識されたバンドが蛍光イメージアナライザーにて検出された。最後に、FITC 標識されたタンパク質を LC/MS/MS にて解析したところ、HRP-DAFGPI 発現細胞では 69 個、HRP-Thy1GPI 発現細胞では 130 個のタンパク質がそれぞれ同定された。これらのタンパク質を比較したところ、27 個のみが共通のタンパク質であり、そのほとんどが異なるタンパク質であった。よって、HRP の会合分子が、GPI アンカーシグナルの違いにより異なることが示唆された。

【まとめ】以上の結果から、遺伝子工学的に細胞内に発現させた HRP によっても EMARS 反応が起ることが明らかとなり、第 2 世代 EMARS 法を確立することに成功した。本法は、HRP と目的分子との融合タンパク質を作製することで、細胞膜さらには細胞内の様々な分子の相互作用分子を、生きている細胞で解析できるため、従来法では解析できなかった分子間相互作用の解明が進むと期待される。