

共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：大阪大学 蛋白質研究所

職名：准教授

氏名：川上 徹

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： 自己活性化型 Cys-Pro エステルユニットを利用した細胞表面タンパク質の標識法の開発と軟骨前駆細胞の同定への応用

2. 再生医科学研究所共同研究者： 開 祐司

3. 研究期間： 短期研究課題 ・ 長期研究課題
(平成23年4月1日～平成24年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果： 本研究では、自己活性化型 Cys-Pro エステル (CPE) を利用した細胞表面蛋白質標識法を開発して、新たな細胞標識・同定法として応用することを目的とした (図1)。そこで、軟骨細胞や骨芽細胞に発現する副甲状腺ホルモンの特異的標識をモデルに選び、標識導入した副甲状腺ホルモン (PTH) リガンドを化学合成した。次いで in situ 標識転移反応により PTH 受容体を特異的に標識することを試みた。

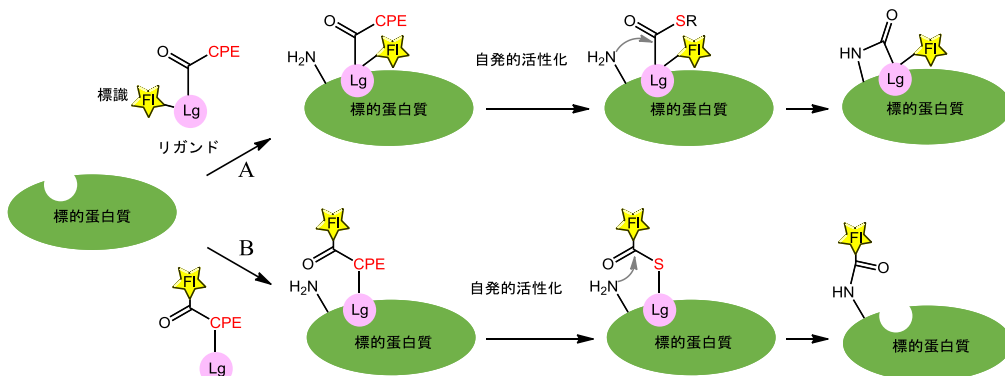


図1. CPE型自己活性化法を用いる蛋白質の部位特異的標識

本研究期間においては、まず、CPE 構造を標識転移反応に適するようにデザインした。また、最近報告された PTH 部分ペプチドと PTH 受容体部分ペプチドの共結晶の構造 (図 2) から受容体の Lys34 の近傍にリガンドの Glu19 が位置することが判明したので、この位置に自己活性化型構造を導入した蛍光標識 PTH ペプチド (N 末端部分ペプチド) を化学合成した (図 3)。Flag タグを含む PTH 受容体蛋白質を表面に過剰発現させた COS7 細胞に対して本ペプチドを反応させたところ、細胞膜上が蛍光標識され、それは Flag 抗体で可視化した PTH 受容体の局在と一致した。このことから本ペプチドを用いて細胞表面の PTH 受容体を選択的に蛍光標識できることがわかった。今後、標識実験に用いた細胞から PTH 受容体蛋白質を抽出し、共有結合により蛍光標識できているかどうか確認する予定である。

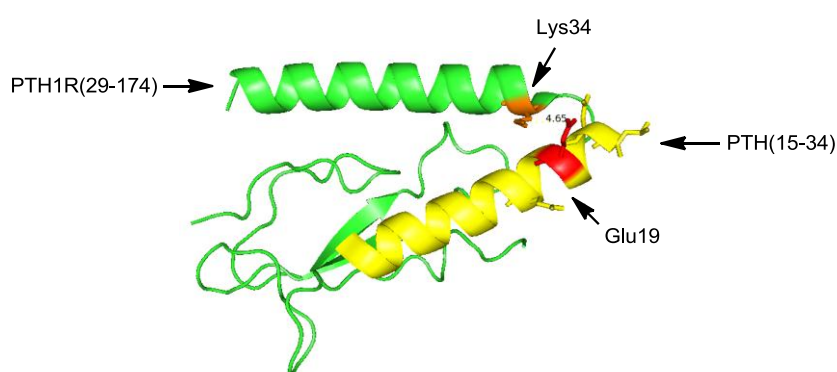
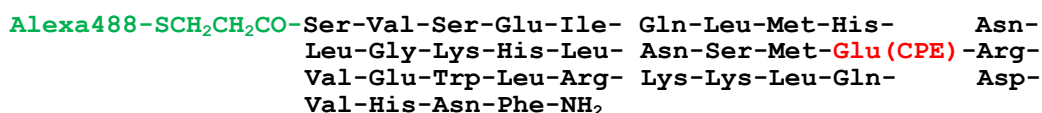


図 2. PTH 受容体 N 末端領域と PTH 部分ペプチドの共結晶構造: A. A. Pioszak, H. E. Xu, *PNAS* 2008, 105, 5034.

リガンド結合型



標識転位型

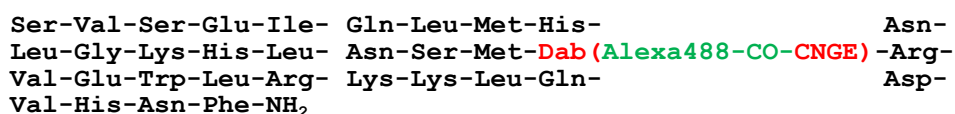


図 3. 化学合成した蛍光標識を導入した PTH ペプチド

なお、本研究の発展を目的とした研究課題において、平成 24 年度に学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) に採択されたこと、ご報告とともに感謝いたします。

5. 研究成果の公表

受容体蛋白質が共有結合により標識できていることが確認できた段階で、学会、論文等で発表する。