

26R-am04

ペプチドタグを用いた膜タンパク質のヘテロ二量体形成制御

飯野 真丈¹, ○武内 敏秀^{1,2}, 渡辺 健介¹, 坂井 聖子^{1,2}, 河野 健一¹, 中瀬 生彦³, 二木 史朗¹ (¹京大化研, ²阪大院医, ³大阪府大 21 世紀科学研究機構)

目的: 近年、様々な細胞膜受容体が、膜上でダイマーやオリゴマーを形成することが報告されているが、その生物学的意義は未だ不明な点が多い。これを明らかにするひとつのアプローチとして、人工的にダイマー形成を制御し、機能解析を行う手法が有効と考えられる。以前我々は、Coiled coil 形成により互いに相互作用するロイシンジッパーペプチド (E3 および K4) を用いて、膜タンパク質のホモダイマー形成を制御する手法を開発した (*ACIE* 2012)。また最近我々は、カルモジュリン分子内の EF hand モチーフの部分配列に相当する 2 つのペプチド (EF3 および EF4) が、カルシウム依存的に相互作用することを報告した。そこで本研究では、E3/K4 および EF3/EF4 の 2 つの相互作用ペプチドペアにより、膜タンパク質のヘテロダイマー形成を人工的に制御する手法を開発する。

方法: 4 種のペプチド (E3, K4, EF3, EF4) の結合特異性を調べるため、これらのペプチドと GST および Thioredoxin を融合させた融合タンパク質を調製し、それぞれのペプチドタグの結合特異性を GST プルダウン法により検討した。また等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いた結合定数の測定も行った。さらにそれぞれのペプチドペアの一方を細胞膜表面に提示させ、他方を細胞外から加えることで結合の特異性、非交差性を調べた。

結果と考察: GST プルダウンの結果から、EF3 と EF4 は互いに相互作用することが確認されたが、その一方で E3 や K4 との相互作用 (交差性) は認められなかった。同様にこの結果は、ITC を用いた結合解析によっても確認された。また、細胞実験においても、EF3/EF4 および E3/K4 の特異的結合が観察された。本発表では、これら 2 つの非交差性ペプチドタグを用いた応用についても報告したい。