

膜タンパク質相互作用解析のための PYP タグビオチン化プローブの開発

(大阪大学大学院工学研究科¹・大阪大学免疫学フロンティア研究センター²) ○寺下 功一郎¹・堀 雄一郎^{1,2}・菊地 和也^{1,2}

Development of PYP-tag biotinylation probe for analysis of protein-protein interaction on cell surface (¹*Graduate School of Engineering, Osaka University*, ²*Immunology Frontier Research Center, Osaka University*) ○Koichiro Terashita,¹ Yuichiro Hori,^{1,2} Kazuya Kikuchi^{1,2}

Protein-protein interactions (PPIs) regulate not only protein function but also protein dynamics, which are critical in maintaining cellular homeostasis. Protein labeling technology offers biological tools that enable both interaction analysis and fluorescence imaging of proteins of interest. Herein, we developed a pull-down technique that is applied for PPI analysis, using a protein labeling technique based on PYP-tag.

In this study, we selected GLUT4, a glucose transporter, as a protein of interest. GLUT4 is translocated to the plasma membrane in response to insulin stimulation and internalized in the absence of insulin. Using the PYP-tag labeling technique, we previously imaged GLUT4 translocation¹⁾, which is suggested to be involved in PPI. To detect the PPI of GLUT4, we developed PCAF-Biotin, a PYP-tag labeling probe that biotinylates GLUT4 and thereby enables pull-down experiments. In this meeting, we will report the details of the labeling reaction, live-cell imaging and pull-down experiments.

Keywords : *Protein Tag; Protein Interaction Analysis; Biotinylation*

生体内の生命現象を担っている多くのタンパク質は、他のタンパク質と相互作用することにより機能している。タンパク質間相互作用はタンパク質の動態制御にも関わり、細胞の生理機能を維持している。この相互作用の解析と動態可視化の両方が可能な技術はタンパク質の機能解明において極めて有用であるといえる。タンパク質ラベル化技術は、その両方の解析を可能とするケミカルバイオロジーツールを提供する。これまでに、演者らは、PYP タグと合成蛍光プローブを用いたタンパク質ラベル化技術を開発し、標的タンパク質の可視化を行ってきた。本研究では、この技術を応用し、タンパク質間相互作用解析に有用なプルダウン技術の開発を行った。

標的タンパク質は、グルコース輸送体の一種である GLUT4 とした。GLUT4 はインスリン刺激に応答して細胞膜移行し、インスリン非存在下では細胞内移行する。これまで、PYP タグラベル化技術を用いて GLUT4 の動態可視化に成功してきた¹⁾。その動態制御にはタンパク質間相互作用が関与している可能性があることが示唆された。そこで、本研究では、GLUT4 と相互作用するタンパク質を同定することを目的として、PYP タグラベル化技術により GLUT4 をプルダウンするべく、PYP タグリガンド PCAF にビオチンを連結した PCAF-Biotin を開発した。本講演では、PYP タグ融合タンパク質の PCAF-Biotin によるラベル化反応及びイメージング実験の詳細を報告するとともに、プルダウン実験に関して検討した。

1) S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki and K. Kikuchi, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, 853.