

AGIA タグシステム：細胞生物学研究に最適な高感度検出および キャプチャー用ペプチドタグ

竹田 浩之, 澤崎 達也

1. はじめに

特定のペプチドあるいはタンパク質ドメインを標的タンパク質に融合し目印（タグ）とするアフィニティタグ技術は、タンパク質の検出・精製のために広く用いられている¹⁻³⁾。アフィニティタグの出現により、生化学および細胞生物学の実験手法は大きく変わった。たとえば、タグ技術が一般的になる以前のタンパク質精製は、標的とするタンパク質の生化学的性質に注目し複数の原理に基づくカラムを併用した複雑な工程で行われ、高度な知識と技術が必要であった。しかし、現在では多くの場合において、アフィニティタグを用いたワンステップ精製で生化学的なアッセイに十分な純度の標的タンパク質を得ることができる。細胞内のタンパク質局在の解析についても、過去には個々の標的タンパク質ごとに特異抗体が必要であったが、タグ融合タンパク質の発現とタグ検出抗体により免疫染色が容易に行えるようになった。このように、タグ技術の本質はタグとタグを認識するバインダーを共有することにより、精製や検出の工程を簡便化、高効率化、均質化できることにある。今やアフィニティタグは生命科学にとってなくてはならない基盤技術の一つである。

とりわけ、His タグやFLAG タグをはじめとするペプチドタグは、タグとして融合するペプチドのサイズが小さく、PCR などを用いて容易に目的タンパク質に融合することができ、目的タンパク質の局在や振る舞いに対する影響が比較的小さいなどの利点があり広く利用されている⁴⁾。代表的なペプチドタグと本稿で紹介する AGIA タグの情報を表1にまとめた。これらのタグは6~14 アミノ酸からな

るペプチドである。His タグはヒスチジン残基が金属イオンに配位する性質に注目して開発されたタグである⁵⁾。その他のペプチドタグの検出や精製にはタグを特異的に認識する抗体がバインダーとして用いられている。抗原性を持つペプチド配列を人工的にデザインしたFLAG タグを除き⁶⁾、これらのタグは、タグペプチドの由来となったタンパク質に対する高品質な抗体がまず存在し、その抗体のエピトープが解明されタグとして用いられるようになったものである⁷⁻⁹⁾。

上述のように現代の生化学・細胞生物学においてアフィニティタグは欠かせない研究ツールであるが、いくつかの改良すべき点がある。まずはタグそのものの性質である。グルタチオンS-トランスフェラーゼ（glutathione S-transferase：GST, 25 kDa）やマルトース結合タンパク質（maltose-binding protein：MBP, 42 kDa）、緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein：GFP, 27 kDa）などのタンパク質をタグとして融合する場合、水溶性のドメインを融合するためにタンパク質が凝集しづらく可溶化タンパク質として発現させやすいという利点はあるものの、サイズが大きいために融合させるタンパク質の種類や挿入位置によっては標的タンパク質本来の機能や構造が損なわれることがある。一方、ペプチドタグの場合はサイズが小さいために標的タンパク質の機能や構造に干渉する可能性は一般に低いとされている。しかし、逆に挿入位置によっては標的タンパク質の立体構造に巻き込まれてしまい未変性状態ではバインダー分子と結合できなくなることもある。また、翻訳後修飾の可能性は細胞生物学実験においては無視できない問題といえる。ペプチドタグの多くは、セリン、トレオニン、チロシン、リシンなどの翻訳後修飾を受ける残基を含む（表1）。このような残基は、タグペプチドの可溶性や抗原認識に重要な役割を果たしていることが多い。FLAG タグを開発したHoppらは、意図的にチロシン残基とリシン残基をFLAG タグの配列に入れ、可溶性の高い抗原ペプチドを開発したと述べている⁶⁾。しかし細胞内において、セリン、トレオニン、チロシンはリン酸化を、リシンはユビキチン化、チロシンは硫酸化などの翻訳後修飾を受ける可能性がある。翻訳後修飾を受けたタグが融合タンパク

愛媛大学プロテオサイエンスセンター（〒790-8577 愛媛県松山市文京町3）

AGIA tag system: a super-sensitive detection and capture peptide tag suitable for cell biology

Hiroyuki Takeda and Tatsuya Sawasaki (Proteo-Science Center, Ehime University, 3 Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8577, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890302

© 2017 公益社団法人日本生化学会

名称	タグ配列（由来）	検出	精製		文献
			キャプチャー	溶出手段	
His タグ	His ₆ ~ ₁₀	抗 His タグ抗体	Ni または Co 担体	イミダゾール, 酸, EDTA など	Porath ら (1975) ⁵⁾
FLAG タグ	DYKDDDDK (人工デザイン抗原)	抗 FLAG タグ抗体	抗体レジン	FLAG ペプチド, 3×FLAG ペプチド	Hopp ら (1988) ⁶⁾
c-Myc タグ	EQKLISEEDL (ヒト c-Myc)	抗 Myc タグ抗体	抗体レジン	c-Myc ペプチド	Evan ら (1985) ⁷⁾
V5 タグ	GKPIPNLLGLDST (SV5 P/V タンパク質)	抗 V5 タグ抗体	抗体レジン	V5 ペプチド	Southern ら (1991) ⁸⁾
HA タグ	YPYDVPDYA (HIV ヘマグルチニン)	抗 HA タグ抗体	抗体レジン	HA ペプチド	Wilson ら (1984) ⁹⁾
AGIA タグ	EAAAGIARP (ヒトドーバミン D1 タンパク質溶出精製には EDAAGIARP (AGIA/E2D))	抗 AGIA タグ抗体 (抗 DRD1 高親和性ウサギ モノクローナル抗体 Ra48)	抗体レジン	AGIA ペプチド	Yano ら (2016) ¹¹⁾

A

BILIAシグナル (RLU)

Construct	BILIAシグナル (RLU)
hDRD1	~11,500
hDRD2	~1,000
hDRD3	~1,000
hDRD5	~1,200
mDRD1a	~1,200
mDRd4	~800
mDRd5	~1,000

B

発現量 (Log₂)

Tissue	発現量 (Log ₂)
corpus callosum	~2.0
spinal cord	~0.1
subthalamic nucleus	~0.1
midbrain	~0.1
hypothalamus	~0.1
central tegmental area	~0.1
hypothalamus	~0.1
vestibular nuclei sup	~0.1
medulla	~0.1
assonum	~0.1
putamen	~0.1
temporal lobe	~0.1
pituitary gland	~0.1
frontal lobe	~0.1
occipital lobe	~0.1
cerebellum	~0.1
hippocampus	~0.1
amygdala	~0.1
adipose	~0.1
pituitary gland	~0.1
trigeminal ganglia	~0.1
adipose	~0.1
adrenal gland	~2.5
adipose	~0.1
thyroid gland	~0.1
adipose	~0.1
testis	~2.2
prostate gland	~0.1
salivary gland	~0.1
lymph nodes	~0.1
spleen	~0.1
skeletal muscle	~0.1
heart ventricle	~0.1
saphenous vein	~0.1
saphenous vein	~0.1
coronary artery	~0.1
adipose	~0.1
adipose	~0.1
kidney cortex	~0.1
liver	~0.1
colon caecum	~0.1
stomach pyloric	~0.1
stomach caecum	~0.1
lung	~0.1
bronchus	~0.1
oral mucosa	~0.1
pharyngeal mucosa	~0.1
tongue superior part	~0.1
tongue main corpus	~0.1
vagina	~0.1
cervix	~0.1
myometrium	~0.1
endometrium	~0.1
ovary	~0.1
testes	~2.2

C

HEK293T

DRD+FLAG

Mock

HeLa

Huh7

MGF7

NH4T3

DRD+FLAG

Mock

HeLa

Huh7

MGF7

NH4T3

kDa

250

150

75

50

37

25

20

15

IB: 抗AGIA抗体

DRD+FLAG

Mock

HeLa

Huh7

MGF7

NH4T3

DRD+FLAG

Mock

HeLa

Huh7

MGF7

NH4T3

kDa

250

150

75

50

37

25

20

15

IB: 抗AGIA抗体

(A) Ra48 抗体のサブタイプ認識特異性. ヒト DRD1 のホモログに対する反応性を BiLIA 法¹⁴⁾ で測定した. (B) DRD1 の発現パターン. マイクロアレイによる発現データは COXPRESSdb (<http://coxpresdb.jp/>) より抽出した. (C) 代表的な培養細胞の抽出液のウェスタンブロット解析. AGIA 抗体を一次抗体として用いた. Yano ら (2016)¹¹⁾ より一部改変の上, 転載.

訳後修飾部位を認識するタンパク質が結合することもあるかもしれない。細胞内のシグナル伝達やタンパク質間相互作用を対象とする研究においては、タグ配列内の翻訳後修飾という想定外なアーティファクトの可能性について考慮すべきである。

2. AGIA タグ開発の経緯

最近、筆者らはAGIAタグという新しいタグシステムを開発した¹¹⁾。このペプチドタグはEEAAGIARPという9残基(表1参照)からなり、タグ配列の中央付近の配列(下線部)が名前の由来である。AGIAタグは可溶性に優れ、標的タンパク質の任意の場所に融合させることが可能であり、培養細胞や無細胞タンパク質合成系での発現を妨げない。最大の特長はこのタグ配列が主要な翻訳後修飾を受ける残基を含んでいないことである。そのため我々は、AGIAタグは細胞生物学実験に最適であると考えている。この配列が得られたのは偶然によるものだが、その開発の経緯を、このAGIAタグと対をなす抗体の取得からご紹介したい。

AGIAタグの配列はヒトのGタンパク質共役型受容体の一つであるドーパミン受容体DRD1のC末端領域(404~412)に由来する。当時、筆者らは無細胞タンパク質合成系を用いた膜タンパク質合成法の開発とその応用研究に取り組んでおり、その一環として富山大学の村口らとともにDRD1の抗体作製を行った。村口グループは、特定の抗原に対する抗体を分泌する細胞をマイクロチップ上で同定単離する独自技術(immunospot-array assay on a chip: ISAAC)の開発に成功していた¹²⁾。本技術を用いることにより、一つの目的抗体分泌細胞から抗体遺伝子を直接クローニングでき、ハイブリドーマを作製することなく組換えモノクローナル抗体(以下モノクロー抗体)を作製・取得可能となる。この技術を活用すれば、ヒトやウサギといった、免疫宿主のハイブリドーマ作製が困難な抗体のモノクロー化が可能である。特にウサギ抗体は一般に親和性が高いことで知られているが、ハイブリドーマ作製が困難であり、ISSACを用いたモノクロー抗体作製が効果的である¹³⁾。我々のDRD1に対するウサギモノクロー抗体作製の取り組みの結果、配列の異なる6クローンのウサギ高親和抗体が得られた¹⁴⁾。これらの抗体の解析を進める過程で、最も親和性の高かったRa48というクローンに着目し、タグ開発を行うことを着想した。タグ開発着想の理由の一つはRa48抗体の高い親和性だが、もう一つにはRa48抗体を用いて特異性の高い検出が可能であったことにある。Ra48抗体は特異性が高く、ヒトDRD1のみを厳密に認識し、ほかのファミリー内や他生物種も含め類似タンパク質にはまったく反応しない(図1A)。また、DRD1は脳の線条体(putamen)など中枢神経系で発現しているが限定的であり、その他の組織ではほとんど発現が認められない(図1B)。そのため、Ra48抗体を用いたウェスタンブロット解析でも、一般的な培養細胞ではまったくシグナルが検出されなかった(図1C)。これらの結果から、我々はDRD1の配列と高親和性抗体を組み合わせることで、特異

的で高感度検出が可能なタグシステムが構築できるのではと考えた。

3. AGIA タグの生化学的解析

Ra48抗体のエピトープを実際にタグ化するために、スワップ変異体や欠失変異体を用いた解析により最小のエピトープ配列である前述の9残基を決定した。エピトープ配列をさまざまなタンパク質のN末端あるいはC末端に付加した融合タンパク質を無細胞タンパク質合成系で調製し、Ra48抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、他のタグ抗体と比較しても特異性が高く検出できることを確認した(図2A)。さらに、ビオチン化Mdm2とAGIAタグ融合p53の結合(図2B)、AGIAタグ融合GATA3とビオチン化DNAの結合(図2C)などをAlphaScreen系で良好に検出できたことから、AGIAタグは未変性タンパク質でもRa48抗体と結合できること、標的タンパク質の機能に大きく影響しないことを確認した。さらに、リガンド量を限界まで絞った詳細なBiacore解析から、AGIAタグと

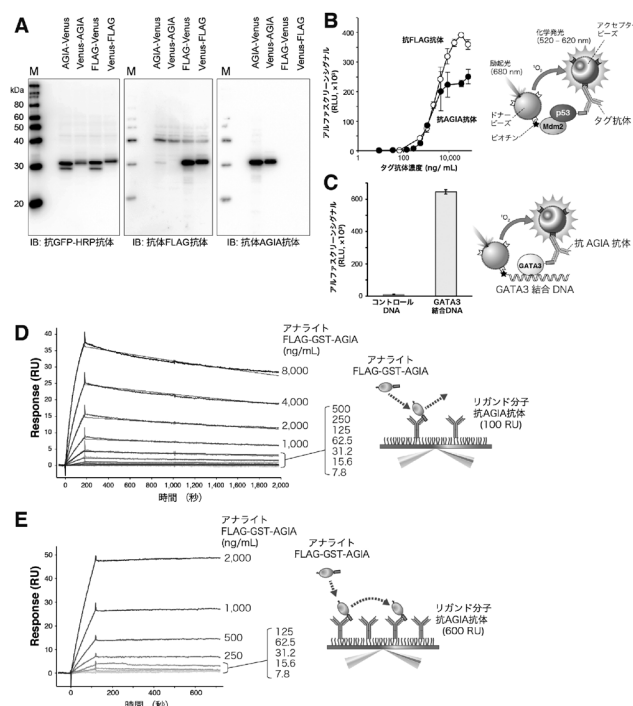


図2 AGIA タグの生化学的解析

(A) ウェスタンブロット解析. タグを融合したVenus蛍光タンパク質をコムギ無細胞系で合成し、ウェスタンブロット解析に供した。(B) AlphaScreenを用いたp53とMdm2間の相互作用解析。(C) AlphaScreenを用いたGATA3とDNA間の相互作用解析。(D) カイネティクス解析. 100 RUの抗AGIA抗体をBiacoreセンサーチップ上に固定化し、FLAG-GST-AGIA融合タンパク質をアナライトとして流した。(E) SPR解析. 固定化量を600 RUに増やし、FLAG-GST-AGIAをアナライトとして流した。Yanoら(2016)¹¹⁾より一部改変の上、転載。

Ra48 抗体の K_D 値は 4.90×10^{-9} M ($K_a = 3.18 \times 10^4$ L/Ms, $K_d = 1.56 \times 10^{-4}$ 1/s) と、タグとして十分な親和性を有していることがわかった (図2D)。リガンド量を少しでも増やした場合においては解離がみられなくなることから (図2E)、たとえば一般的な免疫沈降や精製のように十分な量のタグ抗体にキャプチャーさせる状況においては、たとえ軽微な解離があったとしても近傍のバインダーに速やかに再結合するため、高い収率が期待できる。

4. AGIA タグを用いたタンパク質精製

AGIA タグは抗体との親和性が非常に高く感度のよい検出ができる反面、FLAG タグのようにペプチドによる競合溶出には不向きである (図3A)。AGIA タグ抗体の高すぎる親和性が完全に裏目に出たわけである。そこで我々は AGIA タグを用いた精製法として二つの方法を提案している。これらの手法を用いることで、高純度な標的タンパク質を1段階の精製で取得可能である。一つ目の精製法は、TEV プロテアーゼを用いる手法である (図3B)。これは His タグや GST タグで一般的に用いられている TEV プロテアーゼ切断/精製の応用である。ただし、これまでの精製法と大きく異なる点は、AGIA タグによるキャプチャーは非常に特異的かつ安定で、従来タグよりも高純度な精製タンパク質が得られることである。たとえば 1 M の NaCl など、強い洗浄条件を選択できる点が強みである。もう

一つの手法は、AGIA タグ配列に変異を導入し、アフィニティを若干低減させる方法である (図3A)。この精製法では、2番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した変異 AGIA タグ (AGIA/E2D) を目的タンパク質に融合する (表1参照)。AGIA/E2D 融合タンパク質を抗 AGIA 抗体でキャプチャーし、野生型 AGIA タグペプチドで処理すると標的タンパク質を特異的に溶出できる (図3C)。わずかにアフィニティが低下した AGIA/E2D に、より親和性の高い AGIA ペプチドが競合的に置き換わることで溶出されているのだろうと我々は考えている。興味深いことに、Biacore で測定した K_D 値は 7.03×10^{-9} M ($K_a = 2.08 \times 10^4$ 1/Ms, $K_d = 1.46 \times 10^{-4}$ 1/s) と、パラメーター上は野生型の AGIA タグとほとんど変わらない。極端に親和性を下げていないので、前述の TEV プロテアーゼ切断/精製と同様に強い洗浄工程を用いた高純度精製が実施可能である。

5. AGIA タグは細胞生物学実験に適したタグ

前述のとおり、翻訳後修飾を受けない AGIA タグは細胞を用いた実験と非常に相性がよい。これまでに我々のグループではヒト培養細胞や植物プロトプラストに AGIA タグを融合したタンパク質を発現させ、さまざまな実験に用いている¹¹⁾。ウェスタンブロット解析はもちろん、細胞免疫染色でも非常に良好な結果が得られている。細胞免疫染色では、AGIA タグとの融合により標的タンパク質の局

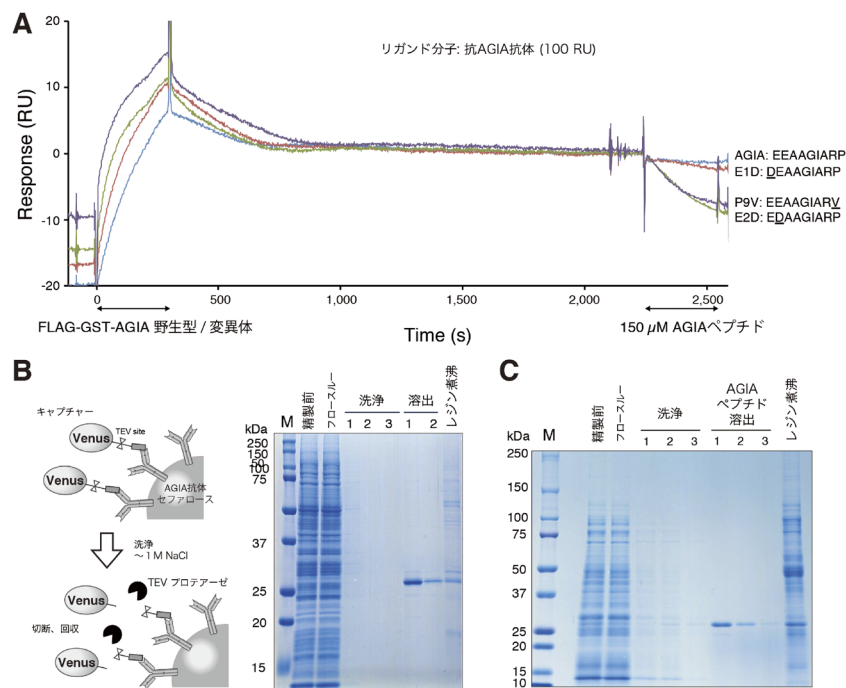


図3 AGIA タグを用いたタンパク質精製

(A) 抗 AGIA 抗体でキャプチャーした AGIA タグ融合タンパク質の AGIA ペプチドによる溶出。(B) TEV プロテアーゼ切断による精製。(C) AGIA/E2D タグを用いた精製。Yano ら (2016)¹¹⁾ より一部改変の上、転載。

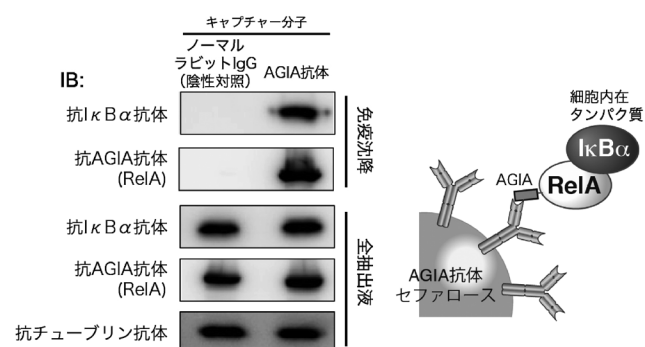


図4 RelA-IκBα共免疫沈降

Yano ら (2016)¹¹⁾ より一部改変の上、転載。

在が変化することは観察されていない。とりわけAGIA タグの効果を実感できるのは免疫沈降実験である。図4で示した例はNFκB経路のRelAとIκBαの共免疫沈降実験である。AGIA タグを融合したRelAを発現させた細胞の抽出液をAGIA抗体融合セファロースにより免疫沈降した。その結果、AGIA-RelAおよびRelAと相互作用した細胞内在のIκBαの両方を非常に良好に検出できた。筆者らは以前に同様の実験を他のタグを用いて実施していたが、非常に弱いシグナルしか得られていなかった。免疫沈降後のAGIA融合タンパク質の検出には、抗体タンパク質と反応しないHRP (horseradish peroxidase) を直接コンジュゲートしたAGIA-HRP抗体が非常に有効であることを申し添えたい。現在、筆者らの研究室内ではAGIAタグを多用しているが、これまでFLAGタグでは検出できなかったタンパク質がAGIAタグを用いて検出できた例や、細胞内のプロテアソームで分解されるいくつかのタンパク質においてFLAGタグよりAGIAタグ融合タンパク質の発現量が多い例があった。これらはAGIAタグが翻訳後修飾を受けない点、特にユビキチン化による分解を避けられたことが大きいと考えている。今後のさらなる利用により、この点も明らかにしていきたいと考えている。

6. まとめ

これまで、我々のグループはもちろん、我々の複数の共同研究先でAGIAタグシステムを試用してもらっているが、非常によい評価をいただいている。アフィニティタグの特性や性能を決定するのはバインダー分子であること

はいうまでもないが、AGIAタグは世界で初めてのウサギモノクローナル抗体とそのエピトープを基に開発されたタグである点で、ユニークなタグシステムである。細胞生物学の解析が高度化するに従い、一つの細胞中で同時に複数のタンパク質の挙動を調べる実験なども要求されるようになってきており、AGIAタグはその一つの選択肢だと考えている。AGIAタグ試用希望の場合、我々へのコンタクトを御願いたい。多くの研究者に利用していただければと思っている。

謝辞

本技術の開発は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）の支援により実施された。

文 献

- 1) Malhotra, A. (2009) *Methods Enzymol.*, **463**, 239–258.
- 2) Terpe, K. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 523–533.
- 3) Wood, D.W. (2014) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **26**, 54–61.
- 4) Uchinomiya, S., Ojida, A., & Hamachi, I. (2014) *Inorg. Chem.*, **53**, 1816–1823.
- 5) Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975) *Nature*, **258**, 598–599.
- 6) Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Pat Cerretti, D., Urdal, D.L., & Conlon, P.J. (1988) *Nat. Biotechnol.*, **6**, 1204–1210.
- 7) Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenson, A.R., Connolly, M.L., & Lerner, R.A. (1984) *Cell*, **37**, 767–778.
- 8) Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., & Bishop, J.M. (1985) *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3610–3616.
- 9) Southern, J.A., Young, D.F., Heaney, F., Baumgärtner, W.K., & Randall, R.E. (1991) *J. Gen. Virol.*, **72**, 1551–1557.
- 10) Schmidt, P.M., Sparrow, L.G., Attwood, R.M., Xiao, X., Adams, T.E., & McKimm-Breschkin, J.L. (2012) *PLoS One*, **7**, e37779.
- 11) Yano, T., Takeda, H., Uematsu, A., Yamanaka, S., Nomura, S., Nemoto, K., Iwasaki, T., Takahashi, H., & Sawasaki, T. (2016) *PLoS One*, **11**, e0156716.
- 12) Jin, A., Ozawa, T., Tajiri, K., Obata, T., Kondo, S., Kinoshita, K., Kadowaki, S., Takahashi, K., Sugiyama, T., Kishi, H., & Muraguchi, A. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 1088–1092.
- 13) Ozawa, T., Piao, X., Kobayashi, E., Zhou, Y., Sakurai, H., Andoh, T., Jin, A., Kishi, H., & Muraguchi, A. (2012) *PLoS One*, **7**, e52383–e52389.
- 14) Takeda, H., Ogasawara, T., Ozawa, T., Muraguchi, A., Jih, P.-J., Morishita, R., Uchigashima, M., Watanabe, M., Fujimoto, T., Iwasaki, T., Endo, Y., & Sawasaki, T. (2015) *Sci. Rep.*, **5**, 11333.

著者寸描

●竹田 浩之 (たけだ ひろゆき)



愛媛大学プロテオサイエンスセンタープロテオ創薬科学部門准教授。博士(学術)。

■略歴 1976年徳島県生まれ。2004年広島大学大学院生物圏科学研究科博士課程修了。同年生物情報解析研究センター特別研究員。06年株式会社オキシジェニクス研究員。08年京都大学農学研究科特定研究員。11年愛媛大学無細胞生命科学工

学研究センター助教。13年愛媛大学プロテオサイエンスセンター助教。16年4月より現職。

■研究テーマと抱負 無細胞技術を活用した創薬支援技術開発。プロテインアレイや化合物ライブラリーのスクリーニング、膜タンパク質などの創薬標的タンパク質の合成および解析、抗体医薬のための技術開発を行っています。

■ウェブサイト <http://www.pros.chime-u.ac.jp/proteodrugdiscovery/>

■趣味 料理、パソコンのセットアップ。

●澤崎 達也 (さわさき たつや)



愛媛大学プロテオサイエンスセンター無細胞生命科学部門教授。博士(理学)。

■略歴 1968年大阪府に生る。92年広島大学理学部生物学科植物学専攻卒業。94～96年日本学術振興会特別研究員DC1。98年同大学院理学研究科博士課程修了。同年愛媛大学で日本学術振興会未来開拓学術研究リサーチ・アソシエイト。99年愛媛大学工学部応用化学科助手。2003年

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター准教授。12年同教授。13年組織変更により愛媛大学プロテオサイエンスセンター教授。現在に至る。

■研究テーマと抱負 研究対象は、蛋白質すべて。いつか、この摩訶不思議な蛋白質とは一体何者なのか?、どの様に生命現象を支えているのか?を理解したいと思っています。

■ウェブサイト <http://www.pros.chime-u.ac.jp/cell-free/>

■趣味 船釣り(最近は鯛ラバ主体)、サッカー。