

The background of the entire page is a grayscale fluorescence microscopy image of cells. The cells are arranged in a grid pattern, with each cell appearing as a bright, irregular shape against a dark background. The cells have a distinct nucleus and some show fine filaments or structures. The grid lines are faint and light gray, creating a subtle pattern across the image.

SLIPT-PM ユーザーガイドブック

Ver.202207

目次

1. SLIPT 法とは？	p.2
2. SLIPT-PM とは？	p.3
3. SLIPT-PM 実験のはじめかた	p.7
4. 製品情報とプロトコール	p.11
5. デモンストレーション	p.14
6. アプリケーションデータ	p.15
7. 参考文献	p.29
8. 資料	p.30

1. SLIPT 法とは？

SLIPT 法とは Self-localizing ligand (SL)-induced protein translocation (自己局在性リガンド誘導型タンパク質局在移行) の略称で、2013 年に現・名古屋工業大学 築地 真也 教授らにより開発された「オルガネラ局在性化合物でタンパク質の細胞内局在をコントロールする技術」です。SLIPT 法は汎用的な展開が可能な基盤技術であり、基本的に 2 種類のコンポーネントをペアとして使用します。1 つ目は、局在性リガンドと呼ばれる特定のオルガネラに自発的に局在化する低分子化合物、もう 1 つは、局在性リガンドに特異的に結合するタグタンパク質です。局在性リガンドは、細胞内の標的となる場所を選択的に集積する局在決定モチーフとタグタンパク質に特異的に結合するリガンド構造をリンカーで結んだ構造をしています。これまで局在性リガンドとして、細胞膜、細胞核、小胞体膜、ゴルジ体膜、微小管に選択的に局在するものが開発されています。タグタンパク質と任意のタンパク質を融合して細胞内に発現させることで、局在性リガンドにより任意のタンパク質を狙ったオルガネラに輸送することができます。

タグタンパク質とリガンドのペアとしてさまざまな組み合わせが提案されていますが、大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (*E. coli* dihydrofolate reductase; eDHFR) とその特異的低分子リガンドである trimethoprim (TMP) が主に活用されています。その理由として、TMP はもともと大腸菌抗菌剤として開発された化合物で大腸菌由来 eDHFR に対して数 nM オーダーの解離定数で結合する一方で、哺乳動物由来の DHFR 類に対しては 1000 倍以上アフィニティが低いため、TMP は哺乳動物細胞への影響が低く抑えられるためです。そのため eDHFR と TMP のペアは細胞生物学や細胞工学において広く汎用されています。

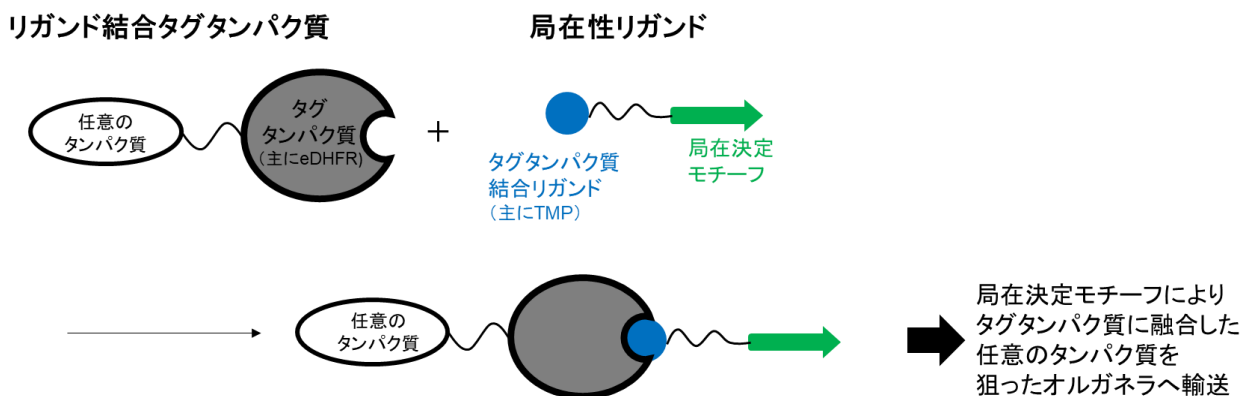


図 1-1 SLIPT 法の基礎イメージ

2. SLIPT-PM とは？

SLIPT-PM

SLIPT-PM は 2020 年に築地教授らにより発表された細胞膜 (Plasma membrane; PM) 局在性リガンド (原著論文名 m^DcTMP) で、専用の eDHFR 改変型 $iK6DHFR$ と組み合わせて使用することで、 $iK6DHFR$ 融合タンパク質を細胞膜に速やかに、かつ長時間安定的に移行させることが可能です。また、製品付属の Free-TMP を添加することで、 $iK6DHFR$ 融合タンパク質の細胞膜局在を解消させることが可能で、可逆的に操作することができます (図 2-1)。

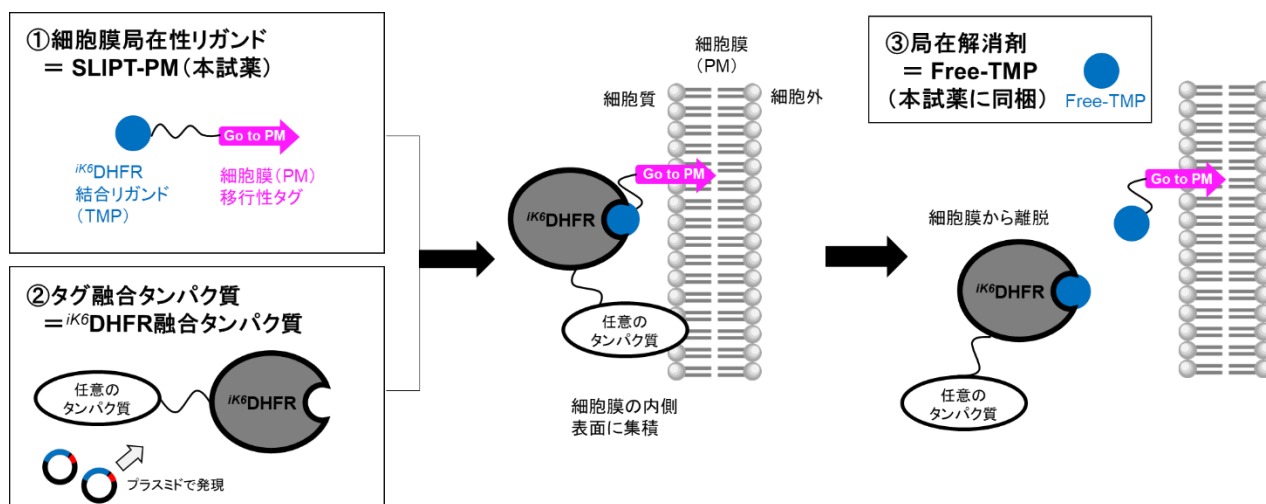


図 2-1 SLIPT-PM による $iK6DHFR$ 融合タンパク質の輸送イメージ

SLIPT-PM の詳細

SLIPT-PM は N -ミリスチル化 D Cys と TMP をリンカーで結んだ構造を有しています (図 2-2 左)。 N -ミリスチル化 D Cys は可逆的なタンパク質の脂質翻訳後修飾である S -パルミトイル化のモチーフで、SLIPT-PM は細胞内で速やかに内在性の S -パルミトイル化修飾酵素により D Cys の側鎖チオール基(-SH) にパルミトイル基 (C16 脂肪酸パルミチン酸) が付与され SLIPT-PM(Palm) に変換されることで、細胞膜局在決定モチーフとして機能します (図 2-2 右)。そのため本試薬による $iK6DHFR$ 融合タンパク質の局在移行活性は細胞内のパルミトイル化修飾酵素活性に依存することにご留意ください。SLIPT-PM(Palm) は細胞膜だけでなくゴルジ体膜にも局在性を示すため、一般に汎用される野生型 eDHFR (eDHFR^{WT}) をタグとして使用すると細胞膜だけでなくゴルジ体膜にも輸送が認められます。**細胞膜選択的に輸送するためには SLIPT-PM 専用の改変型 $iK6DHFR$ を使用する必要があります (次項参照)。**

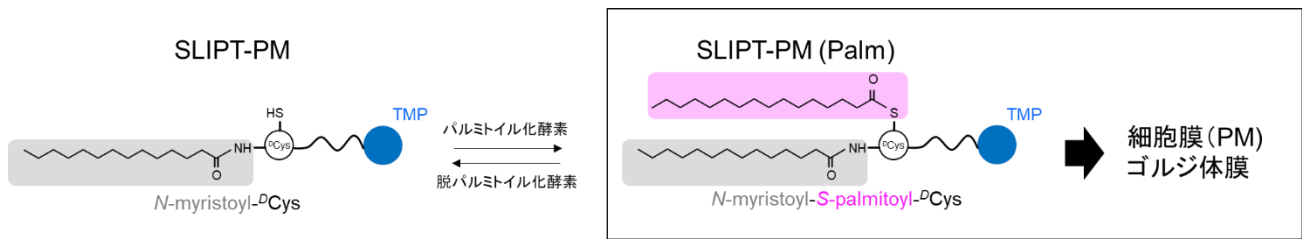


図 2-2 SLIPT-PM の構造と局在性

SLIPT-PM 専用の改変型 eDHFR ; *iK6*DHFR

前述のように SLIPT-PM は細胞内でパルミトイル化修飾を受け SLIPT-PM(Palm)になることで細胞膜とゴルジ体膜に集積する性質があり、一般に汎用される野生型 eDHFR (eDHFR^{WT}) をタグタンパク質として使用すると細胞膜とゴルジ体膜の両方への移行を示し、細胞膜とゴルジ体間の相互移動を繰り返します。多くのシグナル伝達の起点である細胞膜選択的な輸送を実現するために 2022 年築地教授らは eDHFR の中間配列に細胞膜親和性のタグとして**ループ状の Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys 配列 (K6 loop)**を導入した変異体 *iK6*DHFR (internal K6 loop eDHFR、別名 eDHFR(69K6)) を新たに開発し、SLIPT-PM 添加により細胞膜選択的なシグナル因子活性化を可能にしました。ポリカチオン性の K6 loop ループを eDHFR タンパク質の TMP 結合部位近傍の細胞膜に近い領域に挿入することで、細胞膜の内側に豊富に存在するホスファチジルセリンなどのアニオン性脂質と高い親和性を持ち、細胞膜上に安定かつ強く繫留されます (図 2-3)。この静電相互作用により細胞膜-ゴルジ体間の相互輸送が著しく抑制され細胞膜選択性が大きく改善されました (図 2-4)。*iK6*DHFR は目的タンパク質の N 末端、C 末端いずれに融合しても高い細胞膜特異性を示すため (図 2-5)、柔軟な実験設計が可能です。

※*iK6*DHFR の DNA 配列およびアミノ酸配列は 8 章をご参照ください。

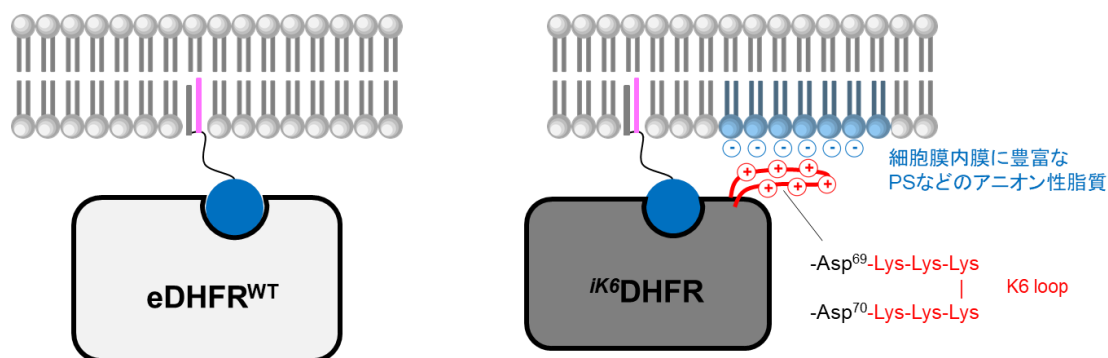


図 2-3 *iK6*DHFR の構造イメージ図

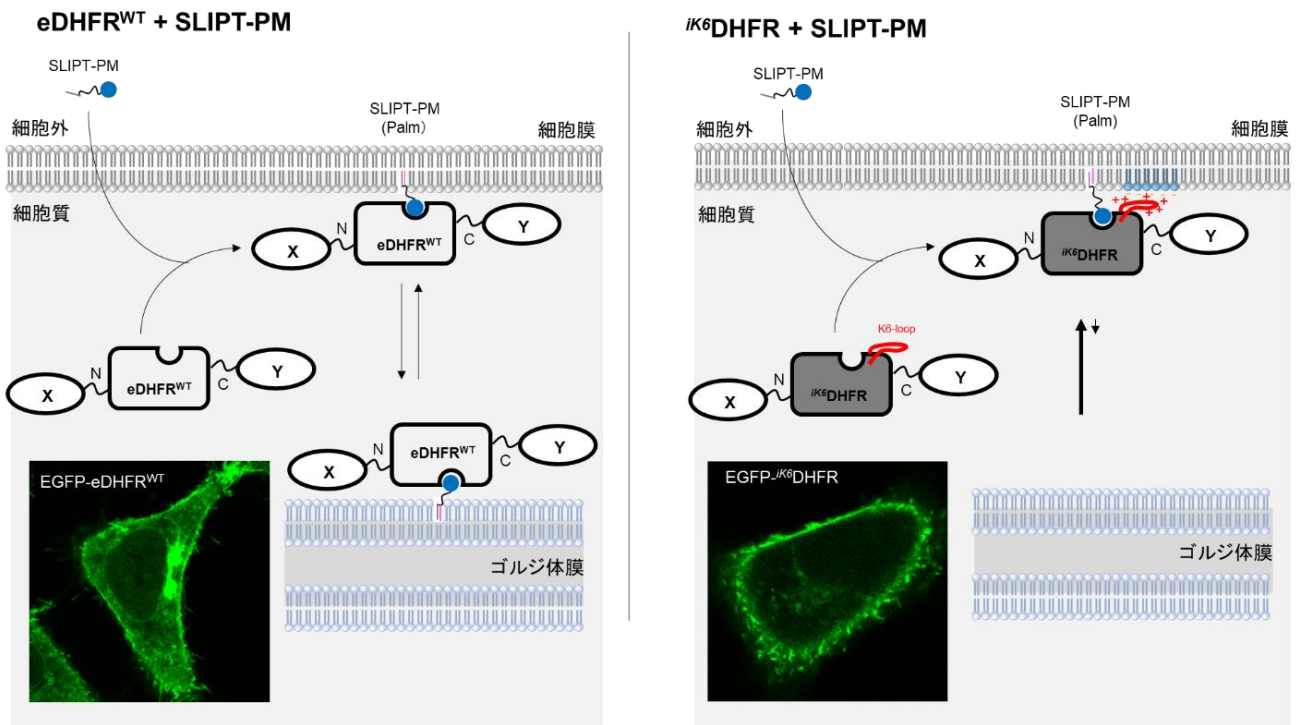


図 2-4 eDHFR^{WT} と *iK6*DHFR の局在移行性の違い

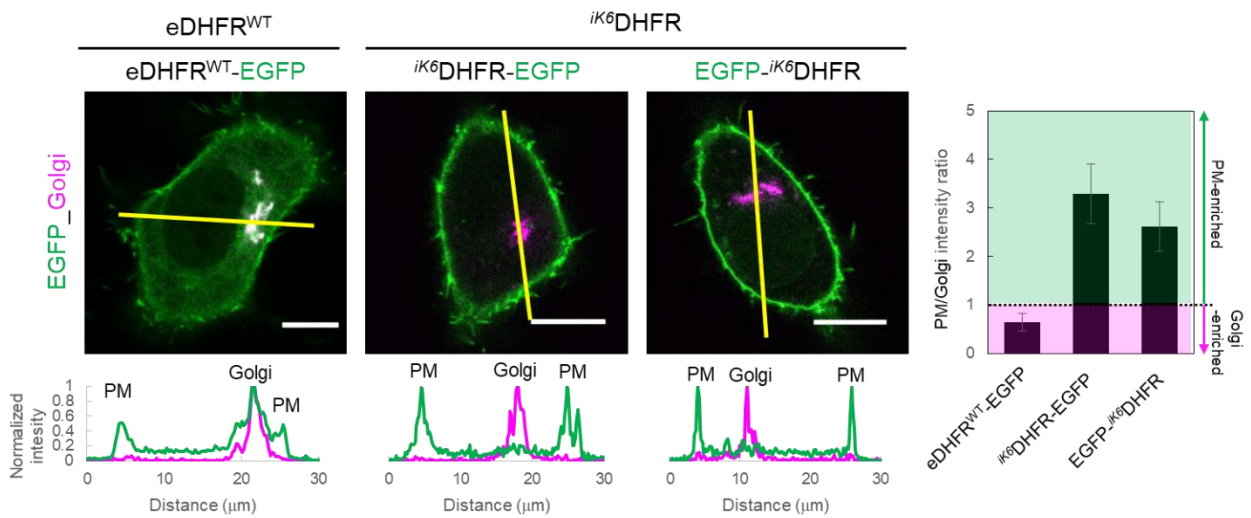


図 2-5 eDHFR^{WT} と *iK6*DHFR の局在移行性の定量的評価

シグナル伝達解析における SLIPT-PM の有用性

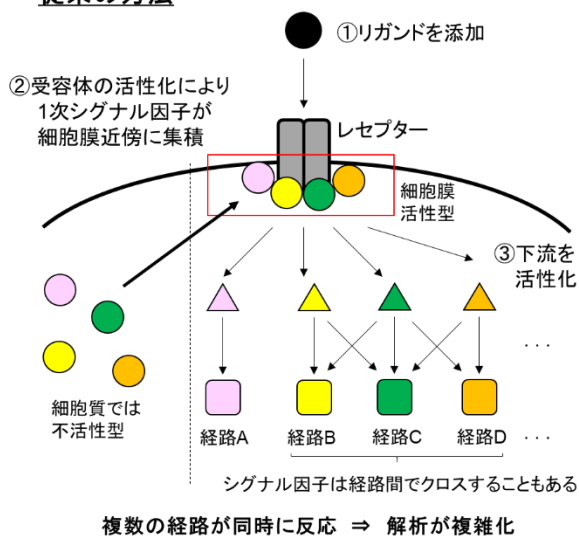
従来、シグナル伝達の解析はシグナル経路の最上流であるレセプターのリガンドによる活性化を起点とし、その応答を観察することが一般的でした。しかし、リガンドを用いてレセプターを活性化するとレセプターの下流のさまざまなシグナル経路が同時に活性化され、複数のシグナル経路の総和の応答が観察されます。個々のシグナル経路は相互にクロストークすることもあり、さらに解析を複雑化しています（図 2-6 左）。この課題を解決するためさまざまな解析ツールの開発が進められていますが、特定のシグナル経路のみを活性化できるような汎用的技術は不十分でした。この技術的課題に SLIPT-PM は大きく寄与する可能性があります。

SLIPT-PM と iK^6 DHFR のペアを用いることで、任意のタンパク質を細胞膜上に移行させることができますが、このタンパク質が細胞膜上で機能発現を誘導できるものであれば、その下流シグナル伝達を活性化することが期待できます。図 2-6 右のように、シグナル経路 A の上流因子を iK^6 DHFR 融合タンパク質として細胞に発現させ、SLIPT-PM により細胞膜に移行させることでレセプター刺激を伴わずに経路 A を活性化するイメージです。実際に、築地教授らのグループでは Ras シグナル、Rac シグナル、三量体 G タンパク質 $G\alpha$ シグナル、PI3K-Akt シグナルなど主要なシグナル伝達経路の経路特異的な活性化に成功しています。

<現在実績のあるシグナル経路>

- ・ cRaf-MEK-ERK 経路
- ・ RasGEF-Ras-Raf-MEK-ERK 経路
- ・ PKC δ -Raf-MEK-ERK 経路
- ・ $G\alpha_q$ -PLC β -IP $_3$ -Ca $^{2+}$ 経路
- ・ $G\alpha_s$ -adenylate cyclase-cAMP 経路
- ・ PI3K-PIP $_2$ -PIP $_3$ -Akt 経路
- ・ RacGEF-Rac-actin 経路

従来の方法



SLIPT-PMを用いた方法

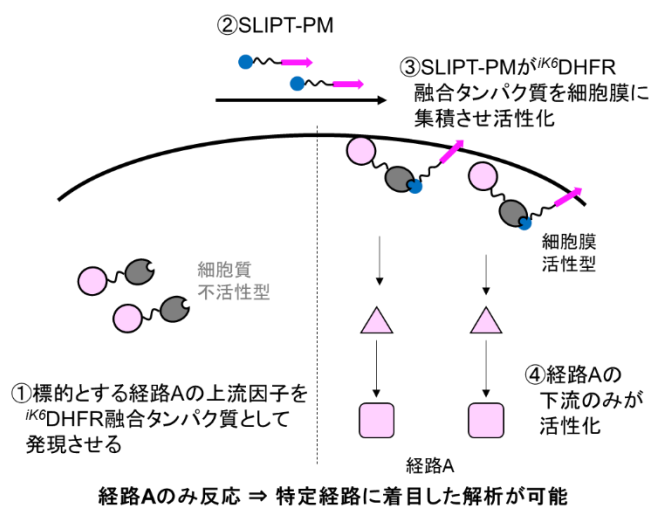


図 2-6 SLIPT-PM のシグナル伝達解析における優位性

3. SLIPT-PM 実験のはじめかた

弊社製品 SLIPT-PM (商品コード #FDV-0045) には下記の 2 点が同梱されていますが、***iK6*DHFR 発現用プラスミドは同封されておりません**ので、SLIPT の構築には弊社試薬とは別に適切な *iK6*DHFR 発現プラスミドをご準備いただく必要があります。試薬 SLIPT-PM のご購入だけでは実験を構築できませんので、下記のフローをご購入前に必ずご参照ください。

<製品内容>

A : SLIPT-PM 0.2mg/vial

B : SLIPT supplement (Free-TMP) 5 mg/vial

SLIPT-PM 実験の構築フロー

1) *iK6*DHFR 発現プラスミドの選択方法・入手方法

マルチクローニングサイト (MCS) を有する *iK6*DHFR 発現プラスミド (EGFP 融合タンパク質) およびポジティブコントロール用発現プラスミドは addgene で入手頂く、または eDHFR^{WT} をもとにご作製頂く必要があります。addgene のプラスミド登録情報は下記をご参照ください。本ガイドブックで紹介する各種アプリケーション実験に使用されている *iK6*DHFR 融合タンパク質発現プラスミドも addgene から入手できます。eDHFR^{WT} をもとにご自身で作製される場合は、原著論文 3 をご参照ください。

*iK6*DHFR の遺伝子配列およびアミノ酸配列は 8 章をご参照ください。

表 3-1 *iK6*DHFR 融合タンパク質発現用プラスミド

用途	プラスミド名	addgene ID
任意のタンパク質 X を <i>iK6</i> DHFR の C 末端に入れたい (EGFP- <i>iK6</i> DHFR-X)	pCMV-EGFP-eDHFR(69K6)- MCS	172100
任意のタンパク質 X を <i>iK6</i> DHFR の N 末端に入れたい (X- <i>iK6</i> DHFR-EGFP)	pCMV-MCS-eDHFR(69K6)- EGFP	172101

注 *iK6*DHFR=eDHFR(69K6)

表 3-2 各種ポジティブコントロール用発現プラスミド

用途	本マニュアルにおける コンストラクト名	addgene プラスミド名	addgene ID
cRaf-MEK-ERK 経路の 活性化	EGFP- <i>iK6</i> DHFR-cRaf	pPBpuro-EGFP-eDHFR(69K6)-cRaf	178849
	cRaf-mNeonGreen(mNG)- <i>iK6</i> DHFR	pPBpuro-cRaf-mNG-eDHFR(69K6)	172107
G α_q 経路の活性化	mNeonGreen(mNG)- <i>iK6</i> DHFR-G α_q	pCAGGS-mNG-eDHFR(69K6)- G-alpha-q	172106
	mNeonGreen(mNG)- <i>iK6</i> DHFR-G α_q (L254A)	pCAGGS-mNG-eDHFR(69K6)- G-alpha-q(L254A)	178851
G α_s 経路の活性化	miRFP670- <i>iK6</i> DHFR-G α_s	pPBpuro-miRFP670-eDHFR(69K6)- G-alpha-s	172105
	miRFP670- <i>iK6</i> DHFR	pCSIIpuro-miRFP670-eDHFR(69K6)	178852
PI3K-Akt 経路の活性化	mNeonGreen(mNG) <i>iK6</i> DHFR-p85 _{iSH2}	pPBpuro-mNG-eDHFR(69K6)- p85iSH2	172103
	mNeonGreen(mNG) <i>iK6</i> DHFR	pCSIIpuro-mNG-eDHFR(69K6)	178853
RacGEF-Rac 経路の活性化	mNeonGreen(mNG)- <i>iK6</i> DHFR-Tiam1 _{DH-PH}	pPBpuro-mNG-eDHFR(69K6)-Tiam1	172102
	mNeonGreen(mNG) <i>iK6</i> DHFR	pCSIIpuro-mNG-eDHFR(69K6)	178853
Grb2/SOS1-Ras-Raf-MEK- ERK 経路の活性化	Grb2 _{mimic} -iRFP713	pCAGGS-chGrb2/eDHFR(69K6)- iRFP713	178854
	<i>K6</i> DHFR-iRFP713	pCAGGS-eDHFR(69K6)-iRFP713	178855

各実験例は7章アプリケーションデータをご参照ください。

2) 実験デザインの検討

SLIPT 法の構築には導入したいタンパク質（以下 X と略）と $iK6$ DHFR の融合方法など事前の実験デザインの検討が重要です。

2-1) 何を $iK6$ DHFR 融合タンパク質として発現させるか？

導入したいタンパク質 X の全長を使用するのか、特定の機能ドメインを使用するのか、など実験目的に応じた構造をご検討ください。例えば、X の全長分子量が大きい場合は、SLIPT-PM の応答性に影響を示す場合がありますのでシグナル伝達に必要な特定の機能ドメインの使用をご検討ください。なお、現在実績のあるタンパク質の最大は cRaf full length (73 kD; アプリケーション例 1 で使用 (p.15)) です。また、X が潜在的に何らかの膜結合性を有する場合（膜貫通領域、脂質修飾、膜タンパク質との結合領域など）、SLIPT-PM に依らず膜移行する可能性があるため、膜結合部位を欠損した変異体の検討が必要です。

2-2) どのような $iK6$ DHFR 融合タンパク質をデザインするか？

$iK6$ DHFR の N・C 末端どちらに導入するかによってベースとする発現プラスミドが異なります。 $iK6$ DHFR は N 末端・C 末端いずれに導入しても SLIPT-PM により細胞膜に高い移行性を示すため、X の性質や構造、機能発現に必要な要件に応じてご検討ください。 $iK6$ DHFR の両末端にタンパク質を融合 (X- $iK6$ DHFR-Y の構造) しても局在移行に成功しています。タンパク質の特定の膜結合ドメインを $K6$ DHFR に置換したドメイン置換法も成功実績があります (7 章 例 7 をご参照ください)。

検討例

・ X の末端構造と機能への影響

X の末端構造が機能発現に重要である場合、その末端を維持するのが望ましいです。

例えば、C 末端が機能発現に重要であり C 末端はできるだけフリーにしたい

⇒ EGFP- $iK6$ DHFR-X のように X の N 末端側に $iK6$ DHFR を設計するのが望ましい

・ X と $iK6$ DHFR の間にリンカー配列の必要有無

⇒ タンパク質の種類によっては、融合タンパク質作製時にリンカー配列を導入したほうが機能発現に良いケースがあります。

・ 蛍光タンパク質の種類や必要性

⇒ 上記のプラスミドリストは EGFP 発現プラスミドを提示しておりますが、目的に応じて蛍光タンパク質の種類（色・構造（単量体・2 量体など））や必要性を考慮し、ご自身の実験にあったプラスミドへ乗せ換えをご検討ください。

2-3) 何を指標にシグナルの活性化を検出するか？

本製品の各種アプリケーションデータでは主にイメージングの結果を示しており、SLIPT-PMによりシグナルが活性化した際に局在変化がみられるようなレポーター蛍光タンパク質を活用していますが、ウェスタンブロットなど生化学的なアプローチで検出することも可能です（詳しくは原著論文1参照）。*iK6*DHFR 融合タンパク質のデザインだけでなく、シグナル活性化の解析方法についても併せてご検討ください。

3) *iK6*DHFR 融合タンパク質の発現確認

ご使用される細胞において、目的の *iK6*DHFR 融合タンパク質が発現していることをイメージングやウェスタンブロットなどによりご確認ください。発現が認められない・極めて発現量が少ないなど目的タンパク質の発現に問題が認められる場合は、ご使用される細胞に適した発現プラスミドのプロモーターへの変更や *iK6*DHFR 融合タンパク質のコンストラクションの見直しを推奨します。

4) *iK6*DHFR 融合タンパク質の定常状態での局在確認

*iK6*DHFR 融合タンパク質が良好に発現していることが確認できたら、定常状態における *iK6*DHFR 融合タンパク質の局在をご確認ください。定常状態で *iK6*DHFR 融合タンパク質が細胞膜に局在する場合、SLIPT-PM を添加しても効果がない可能性があります。この場合は導入タンパク質自身に何らかの膜結合能（例、膜貫通ドメインや膜結合部位、パルミトイル化・ミリストイル化などの脂質修飾、膜タンパク質との結合部位など）を有する可能性があります、コンストラクションの見直しが必要です。SLIPT-PM に依存した局在変化を期待するには細胞質にメインに発現することが望ましいです。また、*iK6*DHFR 融合タンパク質によっては核に集積しやすい場合がありますが、多くの場合 SLIPT-PM による局在移行に影響はありません。もし核に強く局在する場合、核外搬出シグナル（Nuclear export signal; NES）を付与することで改善したケースがあります。

5) SLIPT-PM の使用濃度の検討

定常状態で細胞質など細胞膜以外の領域に局在が認められた場合、SLIPT-PM を添加して応答を検証します。SLIPT-PM は 1-10 μM を目安に最適化を行ってください。細胞種や *iK6*DHFR 融合タンパク質によって SLIPT-PM の最適濃度や応答速度が異なるケースがあります。

※重要な注意点※

SLIPT-PM は血清成分に吸着される恐れがあります。血清を含む培地で培養している場合は SLIPT-PM 添加前に細胞を無血清培地で洗浄し、添加時も無血清培地（または適切な緩衝液）に希釈して使用する必要があります。

6) Free-TMP による膜局在解消の検討（オプション）

本製品に同梱されている Free-TMP を用いることで SLIPT-PM による膜移行性を解消できます。Free-TMP の使用濃度（SLIPT-PM の 5~10 当量を目安）や添加のタイミングをご検討ください。

4. 製品情報とプロトコール

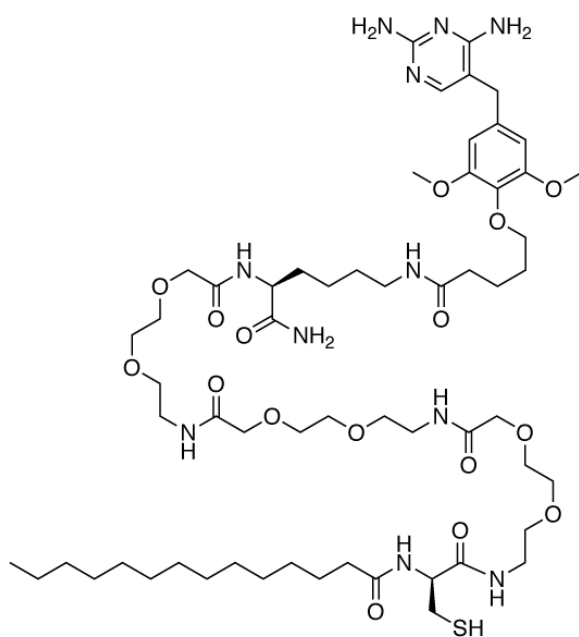
●製品情報

カタログ No.

FDV-0045

コンポーネントと物性

	名称	容量	組成式	分子量	推奨溶媒
A	SLIPT-PM (TFA salt)	0.2 mg	$C_{59}H_{101}N_{11}O_{16}S_1 + CF_3COOH$	1366.60 g/mol	DMSO
B	Free-TMP	5 mg	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290.32 g/mol	DMSO



SLIPT-PM

保管条件

-20°C以下で保管

●ストック溶液調製

A. SLIPT-PM

ストック溶液として 5-10 mM DMSO 溶液 (0.2 mg/16-32 μ L) を推奨しています。

注 1 : SLIPT-PM はチューブの底面に無色透明のシロップ状に付着しており、視認性が低いことをご留意ください。

- 1) バイアルに DMSO 16-32 μ L を添加し、ゆっくりピペティングし溶解してください。
- 2) 凍結融解を避けるため少量ずつ小分注し、冷凍 (-20°C以下) で保管してください。

注 2 : SLIPT-PM はフリーのチオール基を含み、局在制御活性に不可欠です。

酸化条件下ではジスルフィド結合を形成し失活する恐れがあります。

溶解後は冷凍条件で少なくとも 1 か月は安定ですが、できるだけはやく使用してください。

B. Free-TMP

ストック溶液として 100 mM DMSO 溶液 (5 mg/172 μ L) を推奨しています。

- 1) バイアルに DMSO 172 μ L を添加し、よく攪拌してください。
- 2) 凍結融解を避けるため少量ずつ小分注し、冷凍 (-20°C以下) で保管してください。

●プロトコール

- 1) 無血清培地に SLIPT-PM 1-10 μ M になるようストック溶液を添加し SLIPT-PM 反応溶液を調製します。

注 1 : 使用濃度は細胞種や iK6 DHFR 融合タンパク質によって異なります。適宜最適な条件をご検証ください。

注 2 : SLIPT-PM は血清成分に吸着される恐れがあります。必ず無血清条件下にてご使用ください。

注 3 : SLIPT-PM 反応溶液は細胞に添加する直前に調製 (ストック溶液を培地に希釈) してください。

- 2) iK6 DHFR 融合タンパク質発現細胞を無血清培地で数回洗浄後、1) で調製した SLIPT-PM 溶液を細胞に添加します。

注 4 : 予め無血清培地で培養した細胞に直接少量のストック溶液を添加することも可能です。この場合はピペティングなどにより溶液が均一になるようにしてください。

- 3) iK6 DHFR 融合タンパク質の局在応答を各種アッセイ系で確認します。

- 4) 必要に応じて Free-TMP を SLIPT-PM の 5-10 当量を目安にストック溶液を添加します。

5. デモンストレーション

本項では SLIPT-PM による $iK6$ DHFR 融合 EGFP の細胞膜局在化と Free-TMP による膜局在の解消の様子をご紹介します。

使用したコンストラクト：EGFP- $iK6$ DHFR (addgene ID: 172100)

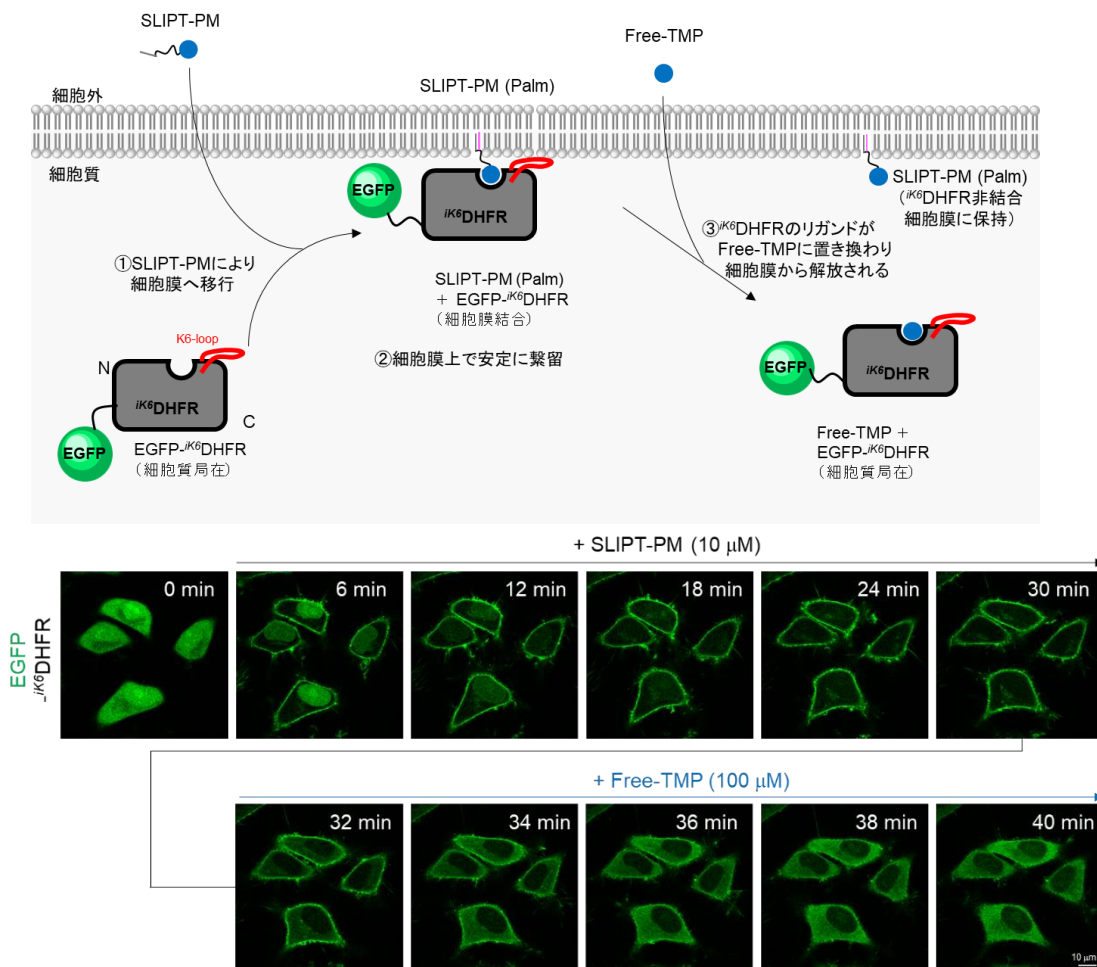
SLIPT-PM 濃度：10 μ M (0 min で添加)

Free-TMP 濃度：100 μ M (30 min で添加)

使用した細胞：HeLa

反応培地：DMEM (無血清培地)

HeLa 細胞に EGFP- $iK6$ DHFR を発現させると主に細胞質に局在が観察されます。ここに SLIPT-PM (10 μ M) を添加すると速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~1.5 min) し、安定に繫留されます。少なくとも数時間単位で細胞膜上に維持されることが分かっています。SLIPT-PM 添加後 30 分において、洗浄操作不要で Free-TMP を添加することで、EGFP- $iK6$ DHFR と SLIPT-PM の結合は Free-TMP に置き換わり、膜局在が解消される様子が観察されています。



6. アプリケーションデータ

本項では SLIPT-PM による各種シグナル伝達経路の活性化の様子をご紹介します。

例 1 Raf-MEK-ERK 経路の活性化

対象シグナル経路：cRaf → MEK → ERK

使用したコンストラクト：

- ・ *ik6*DHFR 融合タンパク質：EGFP-*ik6*DHFR-cRaf (addgene ID: 172107)
*cRaf は全長タンパク質を使用
- ・ レポータータンパク質：核内 ERK 活性化評価センサータンパク質
*ERK*KTR-mKusabiraOrange (mKO)
**ERK*KTR は ERK に対する kinase translocation reporter

SLIPT-PM 濃度：SLIPT-PM 10 μM

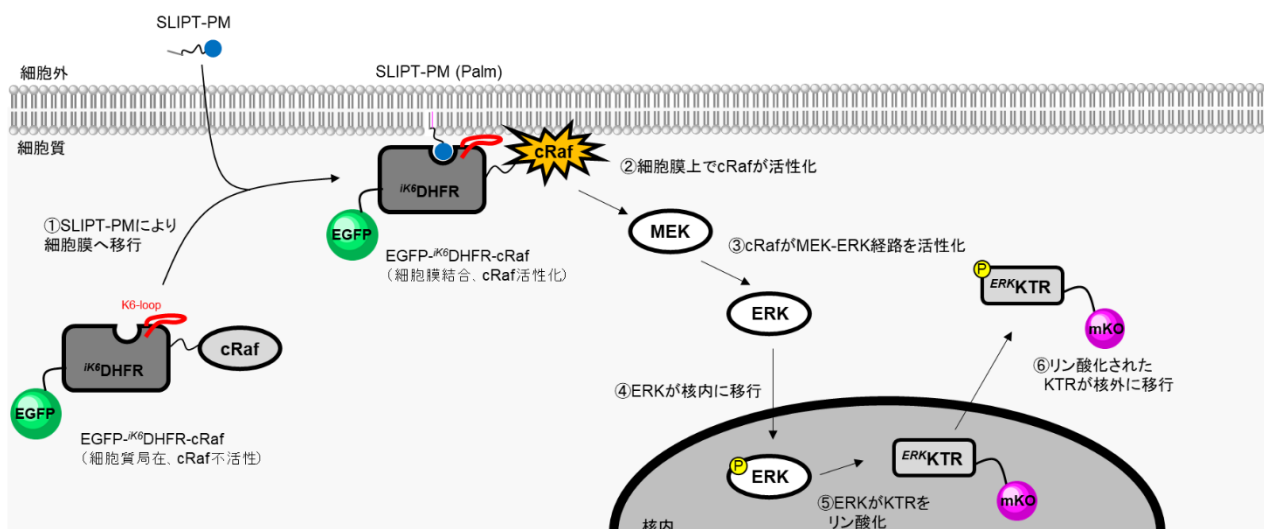
使用した細胞：HeLa

使用培地：DMEM（無血清培地）

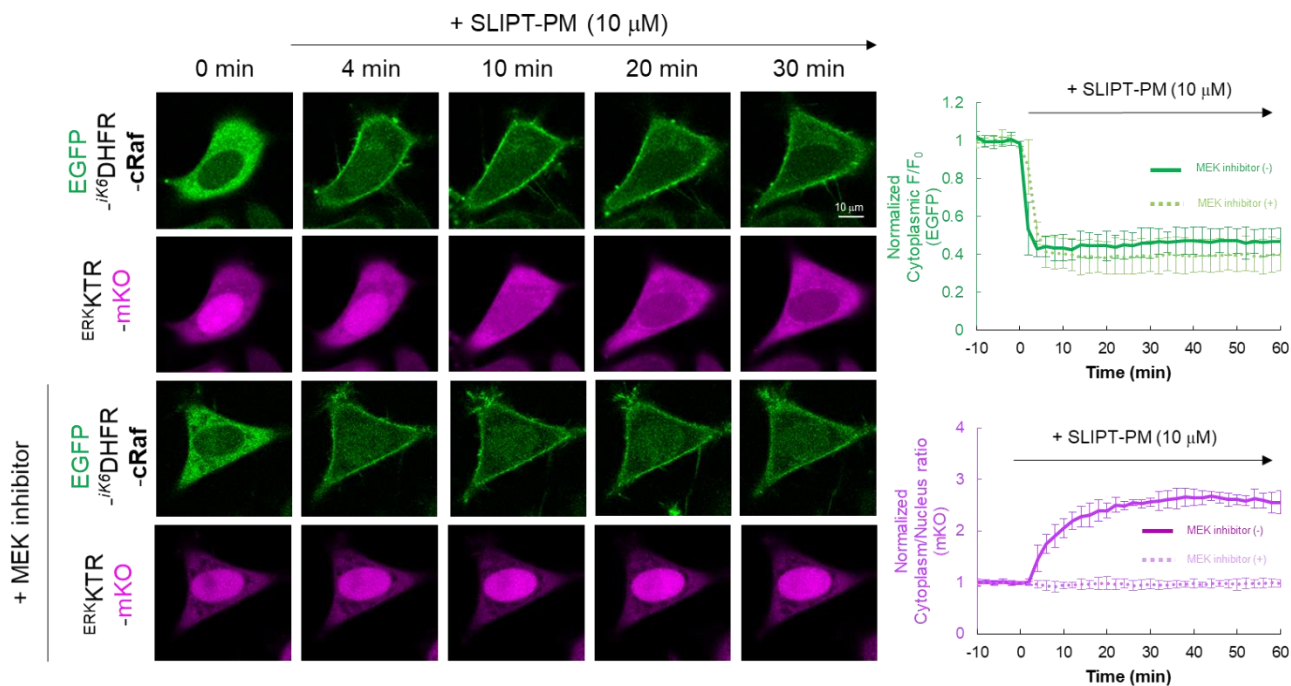
実験モデル：

cRaf は低分子量 GTPase である Ras の下流因子で、Ras により細胞膜上で活性化され、MEK-ERK 経路を活性化する機能を有します。ERK はリン酸化されることで核内に移行し転写因子のリン酸化を担います。

本実験では SLIPT-PM システムを利用し、EGFP-*ik6*DHFR-cRaf を SLIPT-PM で直接活性化することで、Ras およびその上流シグナル因子なしで cRaf から下流のシグナル伝達を誘導します。アウトプットとして、核内 ERK 活性化評価センサータンパク質 *ERK*KTR-mKO を利用し、定常状態で核内に発現する *ERK*KTR-mKO が核内 ERK によりリン酸化されると核外に移行することを指標として本経路の活性化を検出しました。



HeLa 細胞に EGFP-*iK6*DHFR-cRaf と ERK 活性化評価センサータンパク質 *ERK*KTR-mKO を共発現させると、EGFP-*iK6*DHFR-cRaf は細胞質、*ERK*KTR-mKO は核内にメインに局在している。そこに SLIPT-PM を 10 μ M 添加すると EGFP-*iK6*DHFR-cRaf は速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~1 min) する様子が観察された。それに伴い *ERK*KTR-mKO は核から細胞質に移行することが観察された。一方、MEK 阻害剤を添加すると *ERK*KTR-mKO の移行は顕著に抑制されていた。この結果は、SLIPT-PM が EGFP-*iK6*DHFR-cRaf の細胞膜移行を誘導し、cRaf を起点とする MEK-ERK シグナル経路を活性化していることを示唆している。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

例2 $G\alpha_q$ シグナル経路の活性化

対象シグナル経路： $G\alpha_q \rightarrow$ ホスホリパーゼ $C\beta$ ($PLC\beta$) \rightarrow $PI(4,5)P_2$ (PIP_2)
 \rightarrow ジアシルグリセロール (DAG) + イノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (IP_3)
 \rightarrow IP_3 レセプター型カルシウム放出チャネル \rightarrow カルシウムイオンの細胞質放出 \rightarrow カルシウム振動

使用したコンストラクト：

- ・ $iK6$ DHFR 融合タンパク質： $mNeonGreen$ (mNG)- $iK6$ DHFR- $G\alpha_q$ (addgene ID: 172106)
 $mNeonGreen$ (mNG)- $iK6$ DHFR- $G\alpha_q(L254A)$ (addgene ID: 178851)

※本実験では $G\alpha_q$ は Q209L/C9S/C10S 変異体を使用しています。

Q209L：恒常的活性化変異

C9S/C10S：パルミトイル化修飾の欠損変異で自発的な細胞膜局在性を示さない

※ $G\alpha_q(L254A)$ は Q209L/C9S/C10S/L254A 変異体を使用しています。

L254A： $PLC\beta$ 結合部位を欠損した変異体で、 $PLC\beta$ の活性化を誘導しない

- ・ レポータータンパク質：カルシウム応答性蛍光タンパク質 (R-GECO)

SLIPT リガンドと濃度：SLIPT-PM 5 μ M

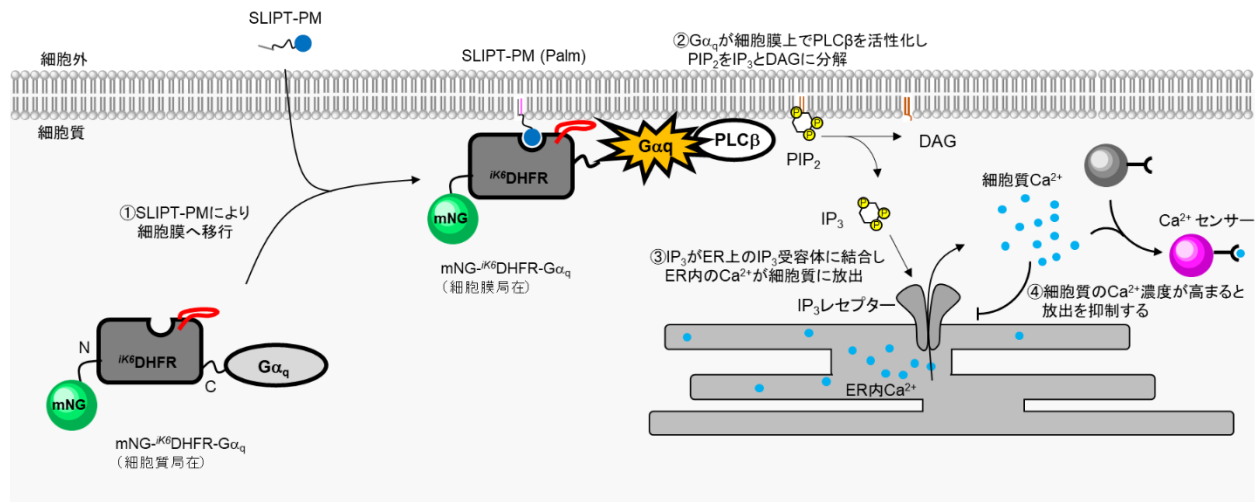
使用した細胞：HeLa

使用培地：10 mM HEPES 含有 HBSS

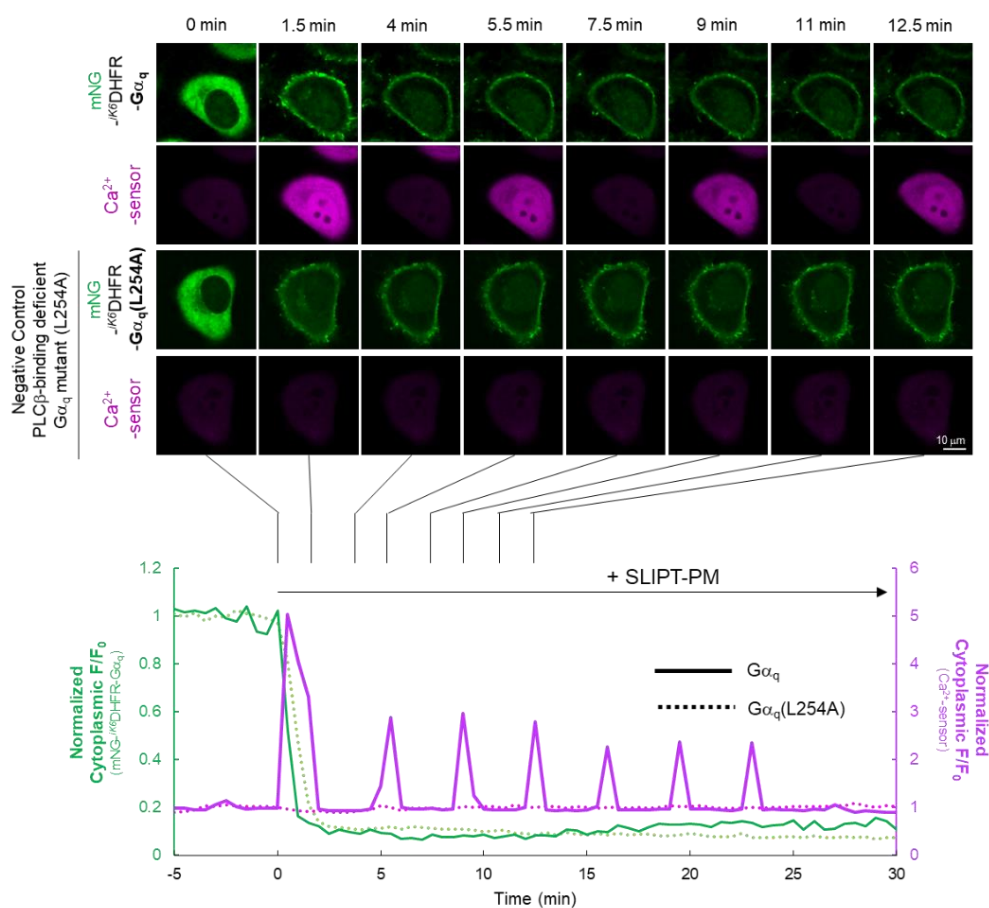
実験モデル

$G\alpha_q$ は GPCR に結合する三量体 G タンパク質 α サブユニットの一つで、GPCR のリガンド結合により活性化し $PLC\beta$ を活性化します。 $PLC\beta$ は PIP_2 を IP_3 と DAG に分解し、 IP_3 は細胞膜から解離して ER 膜上に発現するカルシウム放出チャネル IP_3 レセプターに結合し ER 内からカルシウムイオンの細胞質放出を誘導します。細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇すると負のフィードバック制御がかかり、カルシウム濃度が再び低下し、この繰り返しによりカルシウム濃度が定期的に振動変化する現象が知られています。

本実験では SLIPT-PM システムを利用し、下図のように mNG - $iK6$ DHFR- $G\alpha_q$ を SLIPT-PM で細胞膜上に輸送することで GPCR 刺激なしでも $G\alpha_q$ から下流のシグナル伝達を誘導します。アウトプットとしてカルシウムイオン応答性蛍光タンパク質（以後カルシウムセンサーと表記）を用いて、細胞質のカルシウム量を観察しています。



HeLa 細胞に mNG-*iK6*DHFR-G α_q および細胞質局在型のカルシウムセンサーを共発現させたところ、mNG-*iK6*DHFR-G α_q は細胞質に局在し、カルシウムセンサーは定常状態で低蛍光状態である。ここに SLIPT-PM を 5 μ M 添加すると、mNG-*iK6*DHFR-G α_q は速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~1 min) し、カルシウムセンサーの蛍光が定期的に振動 (オシレーション) する様子が観察された。一方で、G α_q の PLC β 結合能欠損変異体 G α_q (L254A) を有する mNG-*iK6*DHFR-G α_q (L254A) を発現させた場合、SLIPT-PM 添加により細胞膜に移行が観察されるものの、カルシウムセンサーの蛍光変化は観察されなかった。この結果は、SLIPT-PM が mNG-*iK6*DHFR-G α_q の細胞膜移行を誘導し、G α_q の下流シグナル経路を活性化していることを強く示唆している。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

例3 $G\alpha_s$ シグナル経路の活性化

対象シグナル経路： $G\alpha_s$ → Adenylate cyclase (AC) → cAMP 産生

使用したコンストラクト：

- ・ $iK6$ DHFR 融合タンパク質： $miRFP670$ - $iK6$ DHFR- $G\alpha_s$ (addgene ID: 172105)
 $miRFP670$ - $iK6$ DHFR (addgene ID: 178852)

※本実験では $G\alpha_s$ は C3S 変異体を使用しています。

C3S：パルミトイル化修飾の欠損変異で自発的な細胞膜結合性を示さない

- ・ レポータータンパク質：cAMP センサータンパク質

SLIPT-PM 濃度：SLIPT-PM 10 μ M

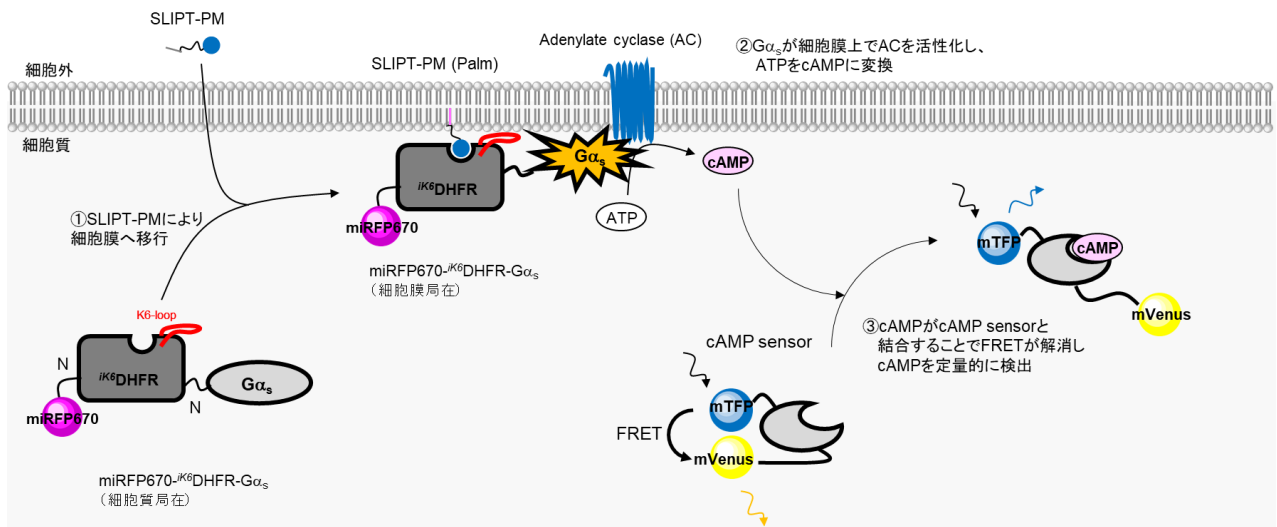
使用した細胞：HeLa

使用した培地：DMEM（無血清培地）

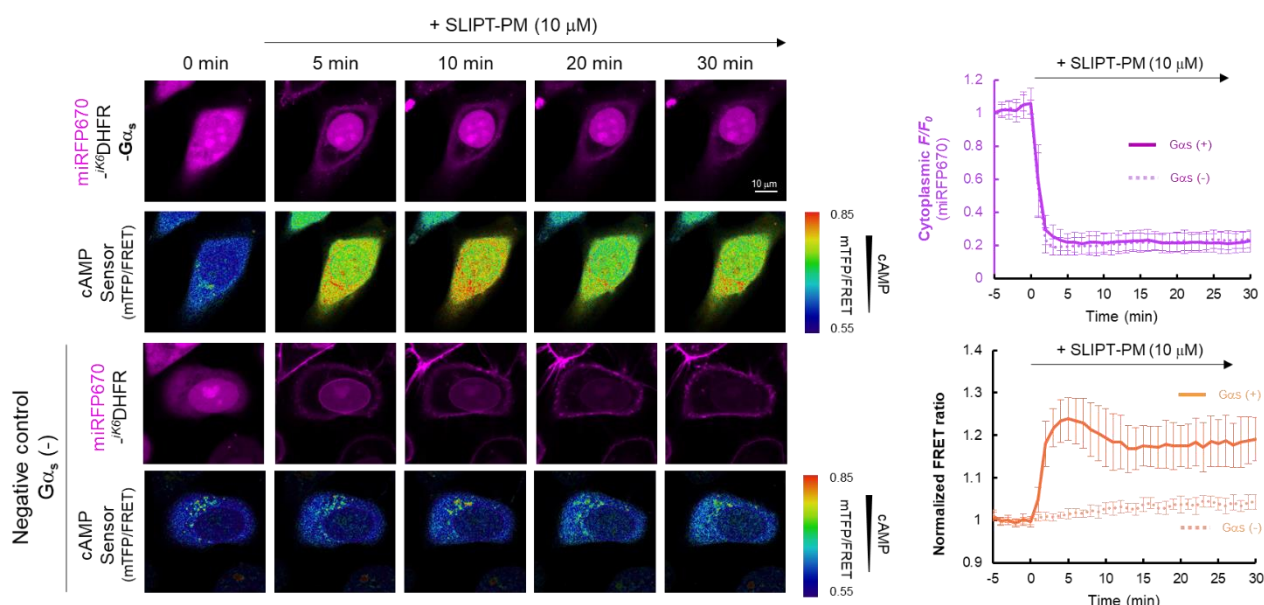
実験モデル：

$G\alpha_s$ は GPCR に結合する三量体 G タンパク質 α サブユニットの一つで、GPCR のリガンド結合により活性化し、Adenylate cyclase (AC) の活性化を促します。AC は ATP を cAMP に変換し、産生された cAMP はセカンドメッセンジャーとして PKA などの下流シグナルの誘導因子として機能します。

本実験では SLIPT-PM システムを利用し、下図のように $miRFP670$ - $iK6$ DHFR- $G\alpha_s$ を SLIPT-PM により細胞膜上に輸送することで GPCR 刺激なしでも $G\alpha_s$ の下流シグナルの活性化を誘導します。アウトプットとして、FRET 型の cAMP センサーを用いて、細胞質の cAMP 量を観察しています。



HeLa 細胞に miRFP670-*iK6*DHFR- $G\alpha_s$ および FRET (mTFP/mVenus) 型 cAMP センサー-蛍光タンパク質を共発現させたところ、miRFP670-*iK6*DHFR- $G\alpha_s$ は細胞質に局在し、cAMP センサーは低 cAMP 濃度を示している。ここに SLIPT-PM を 10 μ M 添加すると、miRFP670-*iK6*DHFR- $G\alpha_s$ は速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~1 min) し、cAMP センサーの FRET が解消され mTFP/mVenus 蛍光強度比が増加する様子が観察されたことから cAMP の増幅が検出された。一方で、ネガティブコントロールとして $G\alpha_s$ を有さない miRFP670-*iK6*DHFR を発現させた場合、SLIPT-PM 添加により細胞膜に移行が観察されるものの、cAMP センサーの変化は観察されなかった。この結果は、SLIPT-PM が miRFP670-*iK6*DHFR- $G\alpha_s$ の細胞膜移行を誘導し、 $G\alpha_s$ の下流シグナル経路を活性化していることを強く示唆している。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

例 4 RacGEF(Tiam1) – Rac シグナル経路の活性化

対象シグナル経路：RacGEF (Tiam1) → Rac → Arp2/3, PAK etc. → actin 重合形成促進
→ ラメリポディア形成

使用したコンストラクト：

- ・ SLIPT タンパク質：mNeonGreen (mNG)-*iK6*DHFR-Tiam1_{DH-PH} (addgene ID: 172102)
mNG-*iK6*DHFR (addgene ID: 178853)

※本実験では Tiam1 は触媒ドメインである DH-PH ドメインのみを使用しています。

- ・ レポータータンパク質：Actin probe (Actin-binding peptide-tagged mCherry; Lifeact-mCherry)

SLIPT-PM 濃度：SLIPT-PM 5 μM

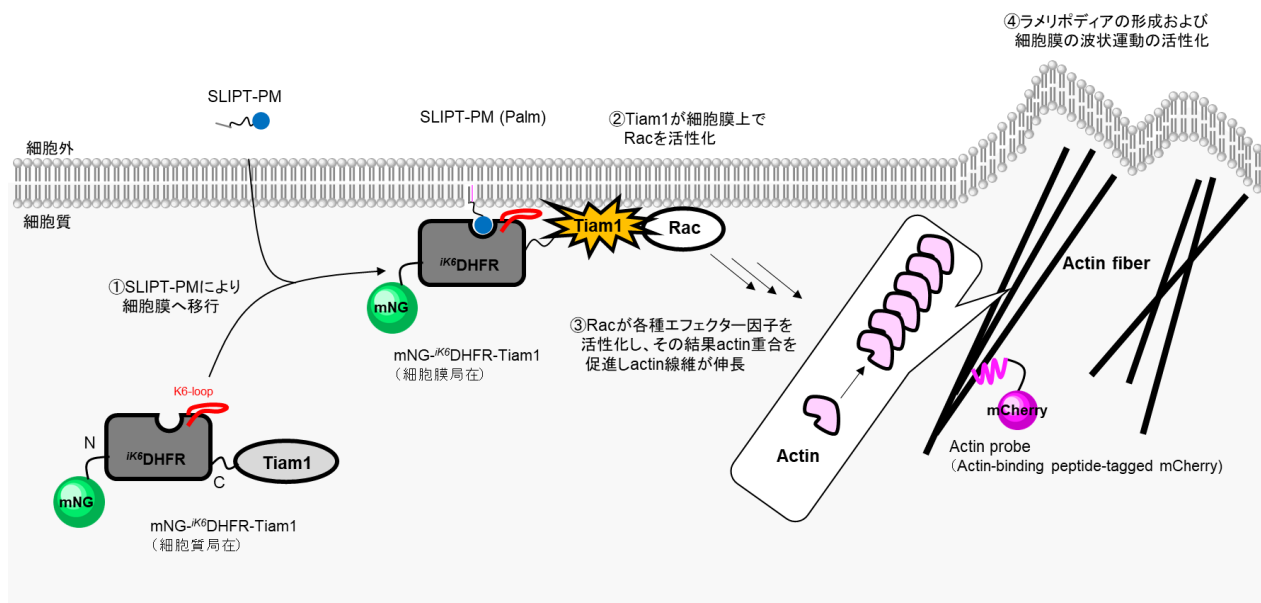
使用した細胞：HeLa

使用培地：DMEM（無血清培地）

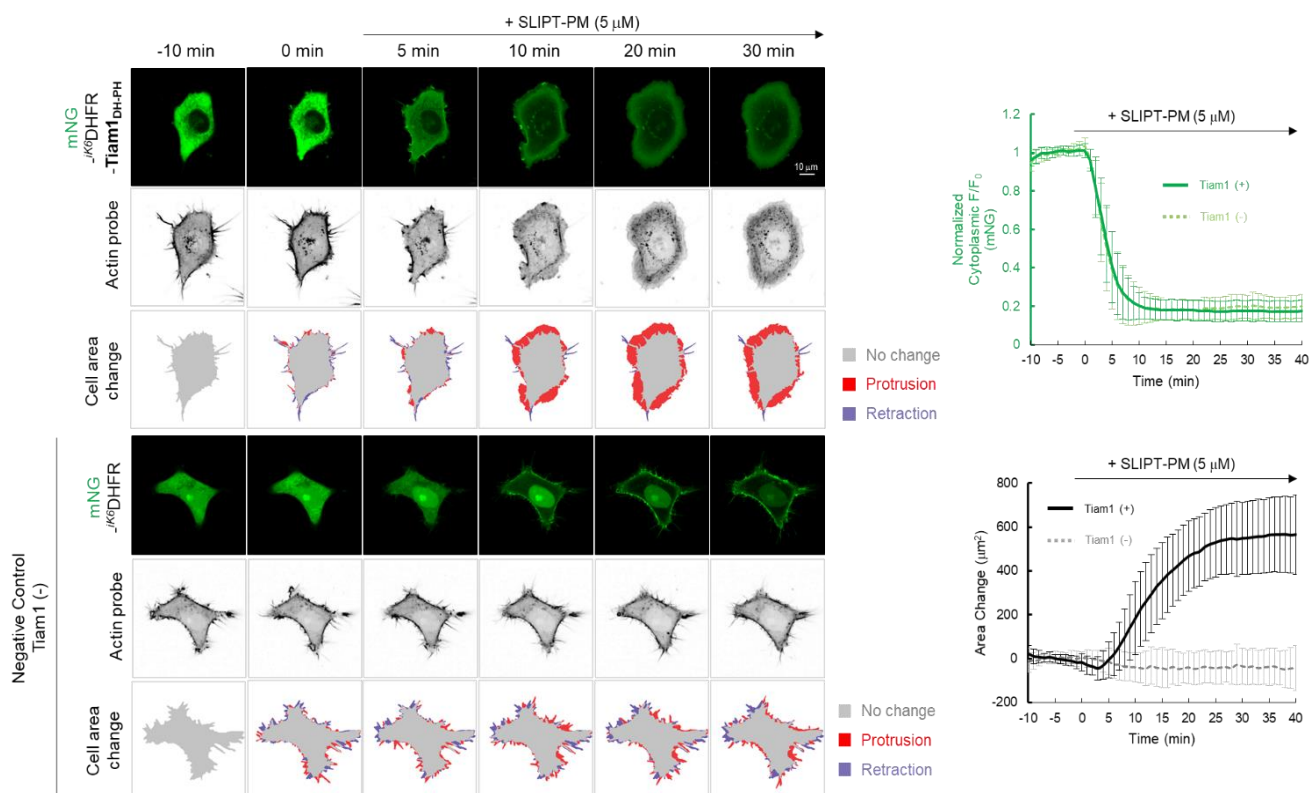
実験モデル：

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の Rac に対するグアニンヌクレオチド交換因子 RacGEF である Tiam1 は各種レセプターの下流因子として活性化し、Rac の活性化を誘導します。Rac は Arp2/3 や PAK 等のエフェクター因子の活性化を通じて actin 重合を促し、ラメリポディアの形成および細胞の波状運動に寄与することが知られています。

本実験では SLIPT-PM システムを利用し、下図のように mNG-*iK6*DHFR-Tiam1_{DH-PH} を SLIPT-PM で細胞膜上に輸送することで Rac を活性化し、Tiam1-Rac の下流シグナルの活性化を誘導します。アウトプットとして、Actin probe を使用し、さらに細胞の構造変化（面積変化）を経時観察しています。



HeLa 細胞に mNG-*iK6*DHFR- Tiam1_{DH-PH} および Actin probe を共発現させたところ、mNG-*iK6*DHFR- Tiam1_{DH-PH} は細胞質に局在し、Actin probe はフィロポディア様の構造を示している。ここに SLIPT-PM を 5 μ M 添加すると、mNG-*iK6*DHFR- Tiam1_{DH-PH} は速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2} \sim 3$ min) し、Actin はフィロポディア構造からラメリポディア構造に大きく変化し、細胞の著しい伸展による面積変化が観察された。一方で、ネガティブコントロールとして Tiam1 を有さない mNG-*iK6*DHFR を発現させた場合、SLIPT-PM 添加により細胞膜に移行が観察されるものの、Actin probe の局在変化および細胞構造の変化は観察されなかった。この結果は、SLIPT-PM が mNG-*iK6*DHFR- Tiam1_{DH-PH} の細胞膜移行を誘導し、RacGEF (Tiam1) を起点とする Rac シグナル経路を活性化していることを強く示唆している。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

例 5 PI3K-Akt シグナル経路の活性化

対象シグナル経路：Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) → PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) → Akt

使用したコンストラクト：

- ・ *iK6*DHFR 融合タンパク質：mNeonGreen (mNG) -*iK6*DHFR-p85_{iSH2} (addgene ID: 172103)
mNG-*iK6*DHFR (addgene ID: 178853)

※本実験で p85 は PI3K のサブユニットである p110 結合領域である iSH2 (inter-*Src* homology 2) ドメイン (p85_{iSH2} と略) のみを使用しています。p85_{iSH2} は内在性の p110 と結合し PI3K 活性を示します。

- ・ レポータータンパク質：mCherry-Akt_{PH}

※本実験で Akt は PIP₃ 結合ドメインである pleckstrin homology (PH) ドメイン (Akt_{PH} と略) を使用しています。

SLIPT-PM 濃度：SLIPT-PM 10 μM

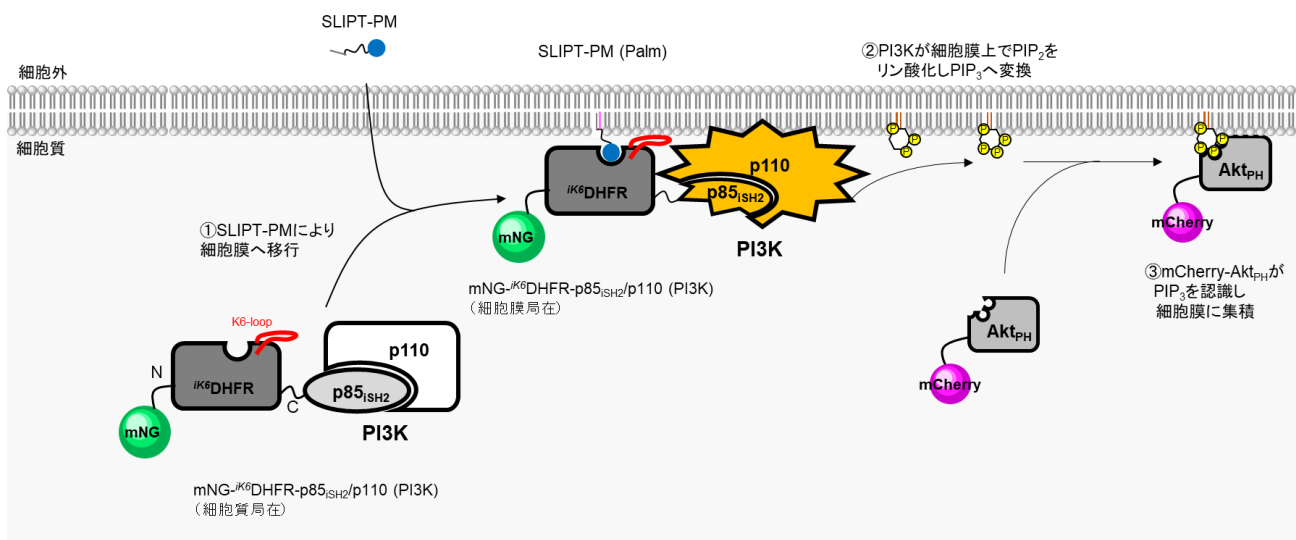
使用した細胞：HeLa

使用培地：DMEM (無血清培地)

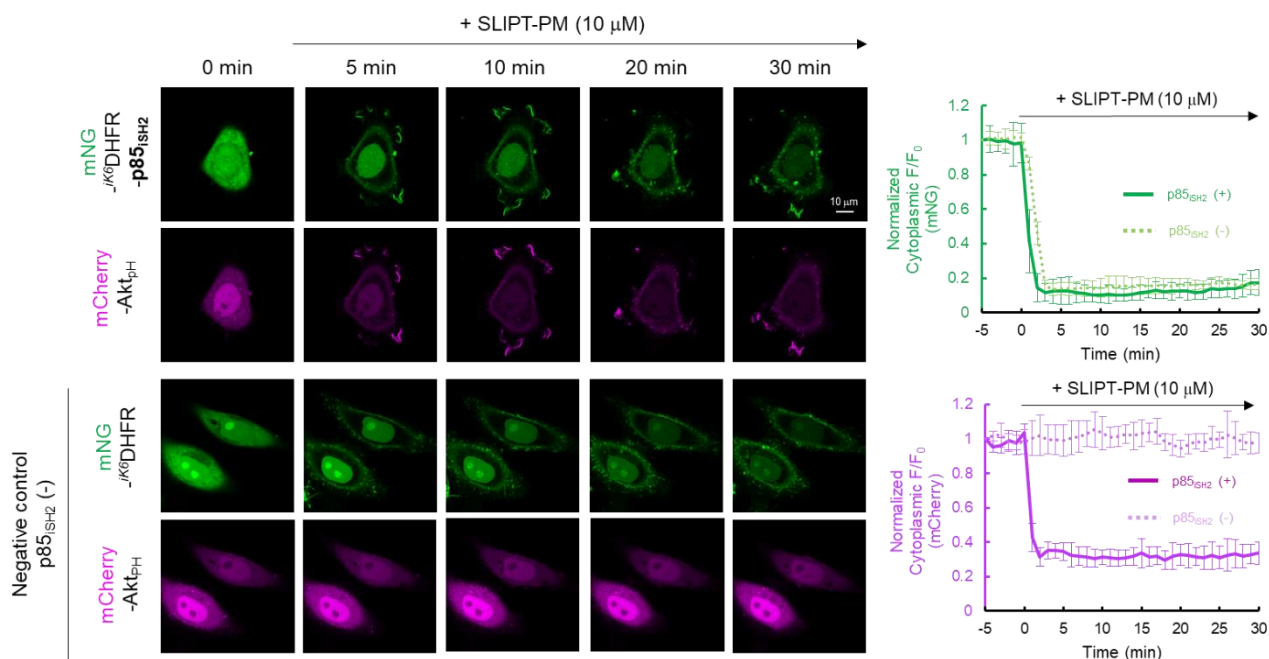
実験モデル：

PI3K (p85/p110 複合体) は各種レセプターによって活性化され、PIP₂ をリン酸化し PIP₃ に変換します。Serine/threonine kinase である Akt は PIP₃ により活性化され、細胞増殖などさまざまなシグナル伝達に寄与します。

本実験では SLIPT-PM システムを利用し、内在性の p110 と複合体を形成した mNG-*iK6*DHFR-p85_{iSH2} を SLIPT-PM により細胞膜上に移行させることで PIP₂ から PIP₃ 産生を誘導する。アウトプットとして、PIP₃ に結合能を示す Akt の PH ドメイン (Akt_{PH}) を融合した mCherry (mCherry-Akt_{PH}) を利用し、mCherry-Akt_{PH} の細胞膜移行量を観察しています。



HeLa 細胞に mNG-*iK6*DHFR- p85_{iSH2} および mCherry-Akt_{PH} を共発現させたところ、mNG-*iK6*DHFR- p85_{iSH2}、mCherry-Akt_{PH} ともに細胞質に局在している。ここに SLIPT-PM を 10 μ M 添加すると、mNG-*iK6*DHFR- p85_{iSH2} は速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~2 min) し、ほぼ同時に mCherry-Akt_{PH} も細胞膜への移行が見られた。一方で、ネガティブコントロールとして p85_{iSH2} を有さない mNG-*iK6*DHFR を発現させた場合、SLIPT-PM 添加により細胞膜に移行が観察されるものの、mCherry-Akt_{PH} の局在変化は観察されなかった。この結果は、SLIPT-PM が mNG-*iK6*DHFR- p85_{iSH2}/p110 複合体の細胞膜移行を誘導し、PI3K を起点とする PIP₃ 産生を活性化していることを示唆している。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

例 6 Raf-MEK-ERK 経路の可逆的制御

対象シグナル経路：cRaf → MEK → ERK

使用したコンストラクト：

- ・ *iK6*DHFR 融合タンパク質：cRaf-mNeonGreen (mNG) -*iK6*DHFR (addgene ID: 172107)
- ・ レポータータンパク質：ERK 核移行評価タンパク質 mCherry-ERK

SLIPT-PM 濃度：10 μ M

Free-TMP 濃度：50 μ M

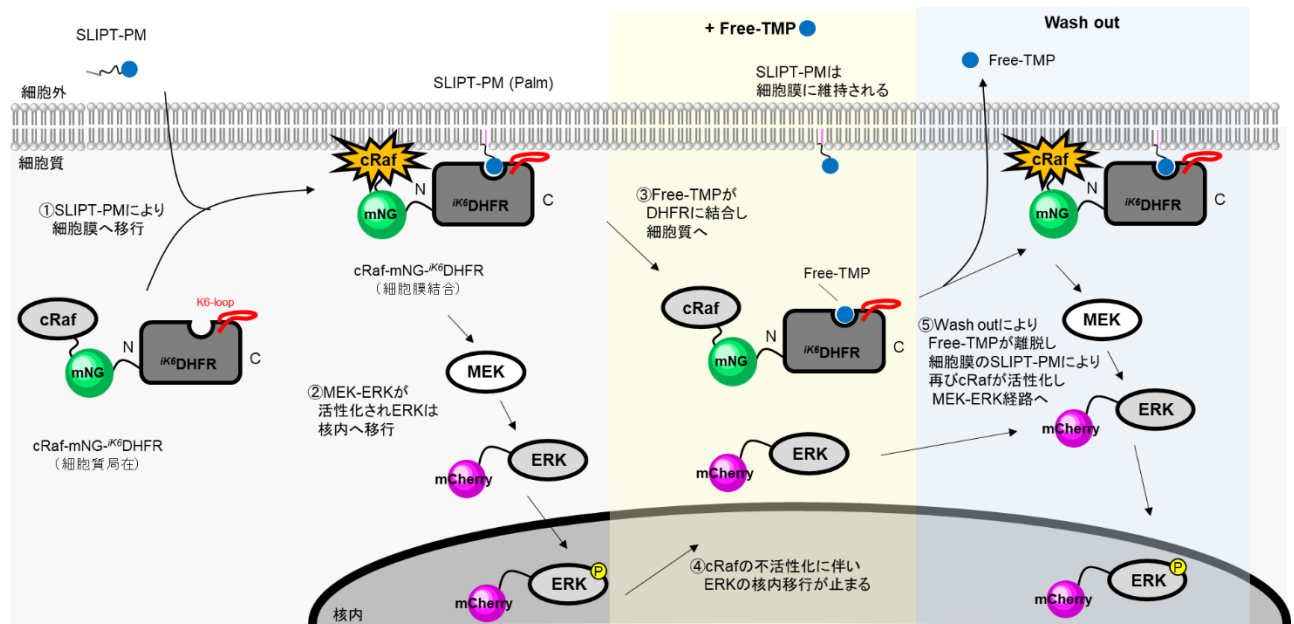
使用した細胞：HeLa

使用培地：DMEM（無血清培地）

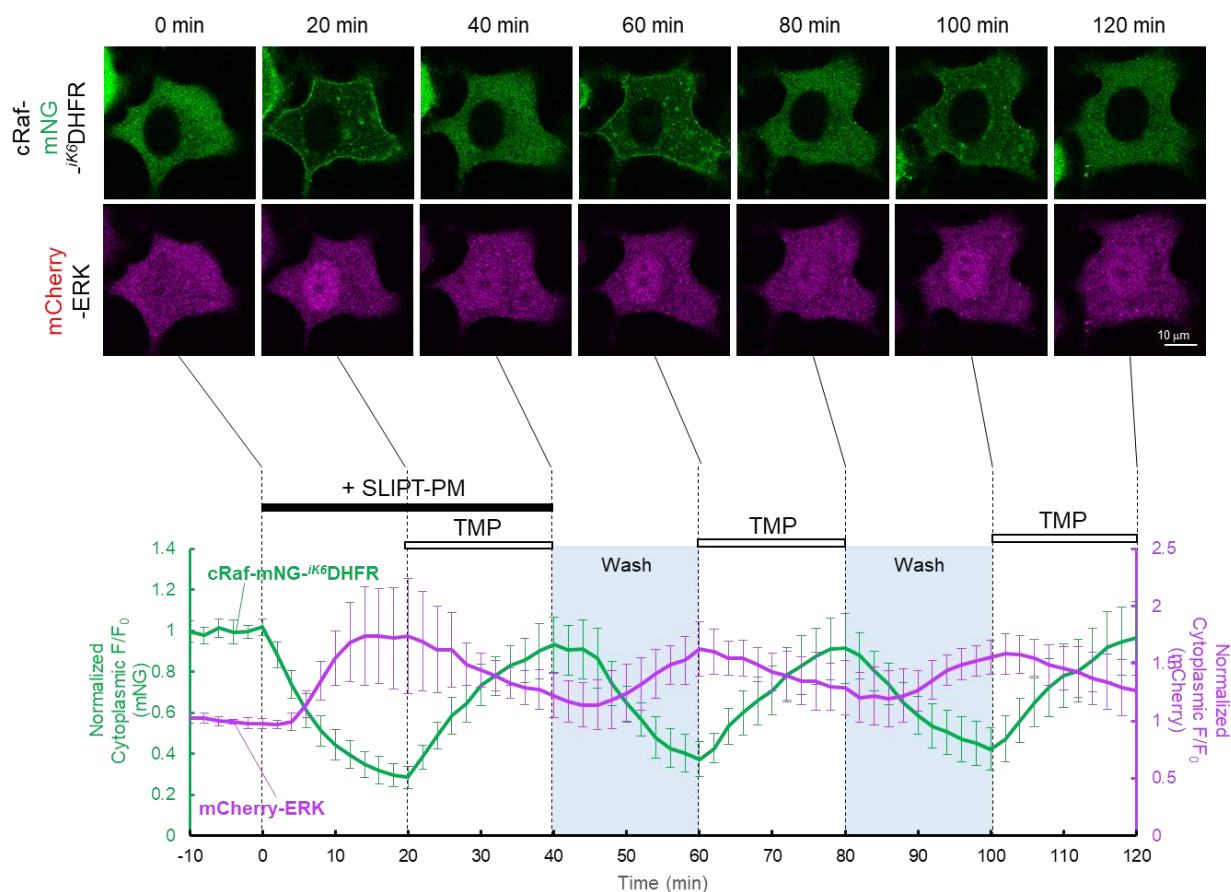
実験モデル：

cRaf は低分子量 GTPase である Ras の下流因子で、Ras により細胞膜上で活性化され、MEK-ERK 経路を活性化する機能を有します。MEK によりリン酸化された ERK は細胞質から核内に移行し、転写因子の活性化を担っています。

本実験では SLIPT システムを利用し、cRaf-mNG-*iK6*DHFR を SLIPT-PM で細胞膜上に移行させることで cRaf を活性化し、アウトプットとして mCherry-ERK の核移行を観察します。その後、Free-TMP を追添加すると、SLIPT-PM と Free-TMP が置き換わり cRaf-mNG-*iK6*DHFR の細胞膜局在が解消され、さらに洗浄操作で Free-TMP を除くことで細胞膜上に残存する SLIPT-PM によって再度 cRaf-mNG-*iK6*DHFR が細胞膜上に移行して MEK-ERK が活性化される様子を観察しています。



HeLa 細胞に cRaf-mNG-*iK6*DHFR と ERK 核移行評価タンパク質 mCherry-ERK を共発現させると、cRaf-mNG-*iK6*DHFR、mCherry-ERK はともに細胞質に局在が観察される。そこに SLIPT-PM を 10 μ M 添加すると cRaf-mNG-*iK6*DHFR は細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~7 min) する様子が観察された。それに伴い mCherry-ERK は細胞質から核に移行することが観察された。SLIPT-PM 添加後 20 分で Free-TMP 50 μ M を追添加すると、cRaf-mNG-*iK6*DHFR の細胞膜局在は解消され、mCherry-ERK の局在も緩やかに核から細胞質メインに変化した。その後 20 分間 (40-60 min) ペリスタポンプを用いた流路による連続的培地交換を行い、余剰の Free-TMP を除去すると、SLIPT-PM を追添加しなくとも cRaf-mNG-*iK6*DHFR は再び膜に局在し、mCherry-ERK の核移行が観察された。60 min において Free-TMP (2 回目) を添加すると 1 回目の添加時と同様に cRaf-mNG-*iK6*DHFR の細胞膜局在は解消され、mCherry-ERK が観察された。洗浄・Free-TMP の添加による可逆的な効果は少なくとも 2 回維持していた。この結果より SLIPT-PM は一度添加することにより細胞膜に保持され、Free-TMP と洗浄操作を繰り返すことで *iK6*DHFR 融合タンパク質を複数回可逆的に細胞膜上活性化・不活性化が可能である。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

例7 ドメイン置換 Grb2 様タンパク質による Ras シグナル経路の活性化

対象シグナル経路 : Grb2/SOS1 → Ras → Raf → MEK → ERK

使用したコンストラクト :

- ・ *iK6*DHFR 融合タンパク質 :

ドメイン置換 Grb2 様タンパク質 Grb2_{mimic}-iRFP713 (addgene ID: 178854)

※本実験では、Grb2 の SH2 ドメインを *iK6*DHFR に置き換えたキメラタンパク質を Grb2 様タンパク質 (Grb2_{mimic} と略) として構築しています。

Grb2 Grb2_{nSH3} Grb2_{SH2} Grb2_{cSH3}

Grb2_{mimic} Grb2_{nSH3} *iK6*DHFR Grb2_{cSH3}

ネガティブコントロール *iK6*DHFR-iRFP713 (addgene ID: 178855)

- ・ レポータータンパク質 : FRET 型 Nucleus ERK activity sensor

SLIPT-PM 濃度 : SLIPT-PM 5 μM

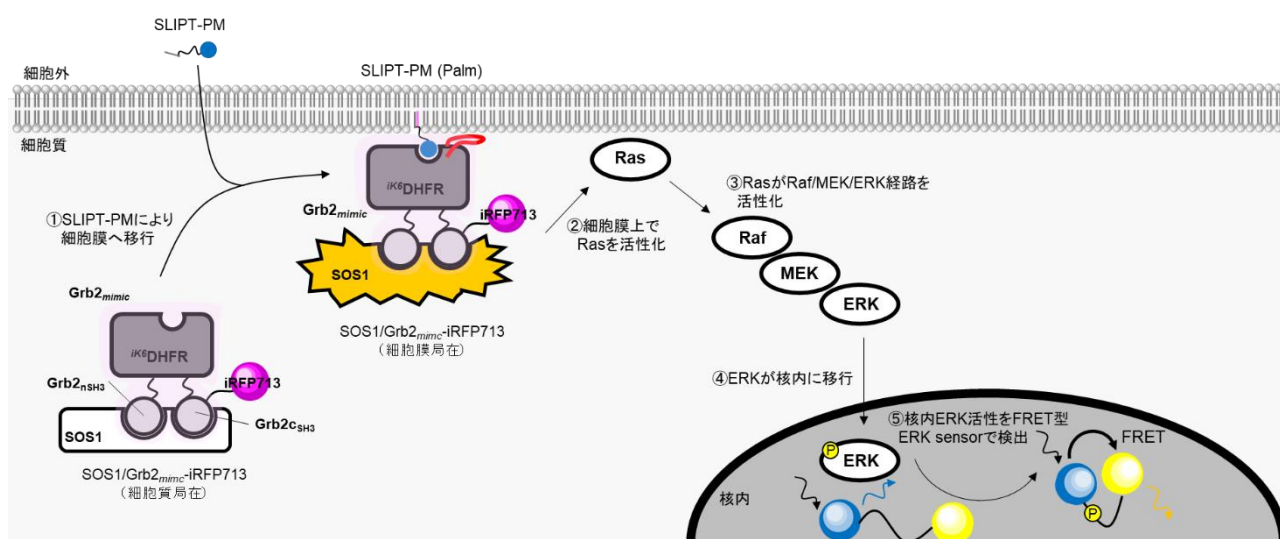
使用した細胞 : HeLa

使用培地 : DMEM (無血清培地)

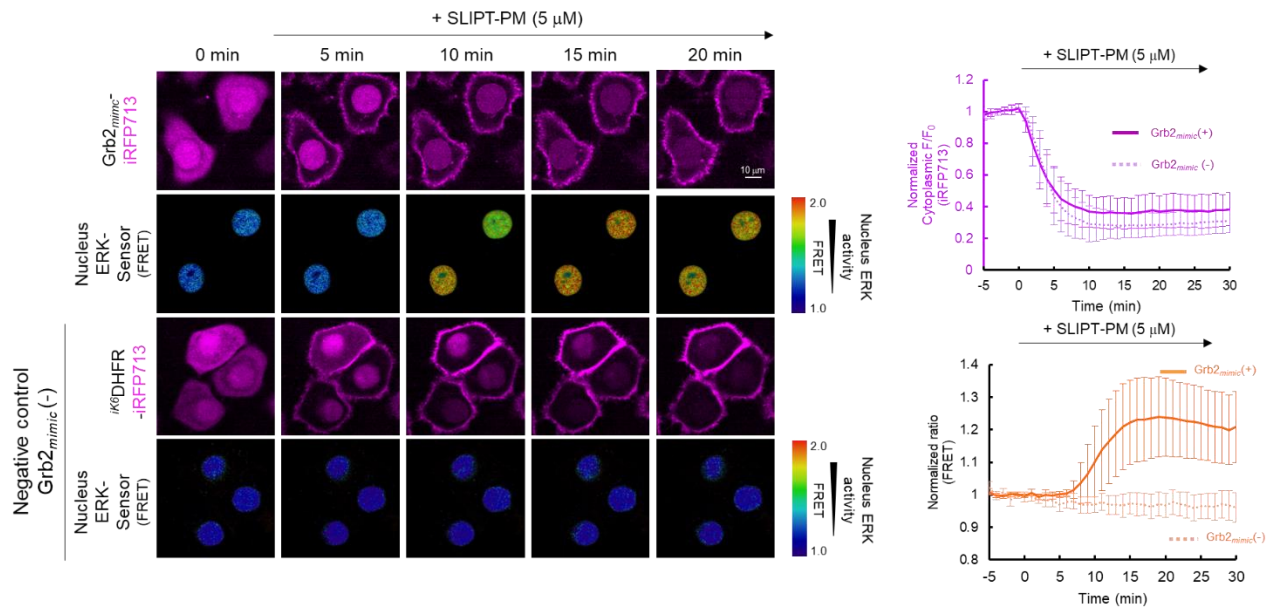
実験モデル :

Grb2 は RasGEF である SOS1 と複合体を形成し、EGFR の活性化に応答し、Grb2 の SH2 ドメイン-EGFR 細胞内ドメイン結合を介して、SOS1 を細胞膜に局在化します。Grb2 により細胞膜上に動員された SOS1 は Ras を活性化し、Raf-MEK-ERK シグナル経路の活性化を誘導します。

本実験では Grb2 の SH2 ドメインを *iK6*DHFR に置換したキメラタンパク質 Grb2_{mimic} を発現させ、レセプターシグナル非依存的に SLIPT-PM により Grb2_{mimic}/SOS1 複合体を細胞膜上に移行させることで Ras を活性化、さらに Raf-MEK-ERK 経路のシグナル伝達を誘導します。アウトプットとして、核内移行 ERK の活性を FRET 型 ERK センサータンパク質で検出します。



HeLa 細胞に Grb2_{mimic}-iRFP713 および核内 ERK センサータンパク質を共発現させたところ、Grb2_{mimic}-iRFP713 は細胞質に、核内 ERK センサータンパク質は核に局在している。ここに SLIPT-PM を 5 μM 添加すると、Grb2_{mimic}-iRFP713 は速やかに細胞膜に移行 ($t_{1/2}$ ~5 min) し、それに付随して核内 ERK の活性化が観察された。一方で、ネガティブコントロールとして ^{k6}DHFR-iRFP713 を発現させた場合、SLIPT-PM 添加により細胞膜に移行が観察されるものの、核内 ERK の活性変化は観察されなかった。この結果は、SLIPT-PM が Grb2_{mimic}/SOS1 複合体の細胞膜移行を誘導し、SOS1 を起点とする Ras-MEK-ERK シグナル経路を活性化していることを示唆している。



※ウェブにてタイムラプス動画をご参照頂けます。

7. 原著論文・参考文献

1. SLIPT 法の原著論文

Ishida *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12684-12689 (2013) Synthetic self-localizing ligands that control the spatial location of proteins in living cells.

2. SLIPT-PM (m^DcTMP)の原著論文

Nakamura *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 837-843 (2020) Designer palmitoylation motif-based self-localizing ligand for sustained control of protein localization in living cells and *Caenorhabditis elegans*

3. SLIPT-PM (m^DcTMP)と ^{iK6}DHFR ペアの原著論文

Suzuki *et al.*, *Cell Chem. Biol.*, **15**, 1446-1464 (2022) A chemogenetic platform for controlling plasma membrane signaling and synthetic signal oscillation.

4. 関連論文

4-1. 複数種類の局在性リガンドを用いた系の開発

Nakamura *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1004-1015 (2020) Engineering orthogonal, plasma membrane-specific SLIPT systems for multiplexed chemical control of signaling pathways in living single cells.

4-2. 細胞内膜局在系局在性リガンドの原著

Nakamura *et al.*, *Biochemistry*, **59**, 205-211 (2020) Chemogenetic control of protein anchoring to endomembranes in living cells with lipid-tethered small molecules.

4-3. ゴルジ体局在系局在性リガンドの原著

Sawada *et al.*, *Chem. Comm.*, **56**, 15422-15425 (2020) Protein-recruiting synthetic molecules targeting the Golgi surface.

8. 資料

● *iK6*DHFR の遺伝子およびアミノ酸配列

<遺伝子配列>

```
ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATCGCGTTATCGGCATGGAAAACGCCATGCCGTGGAACC  
TGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACC  
TGGGAATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGGGTACGG  
ACAAAAAAGAAAAAGAAAATGATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGT  
GTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGATTGGCGGCGGTCGCGTTTATGAACAGTTCTTGCCAAAAGC  
GCAAAAATGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAG  
CCGGATGACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATT  
GCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGG
```

<アミノ酸配列>

```
ISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSSQPGTDKKK  
KKKDRVTWVKSVDIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWES  
VFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR
```

eDHFR

Internal K6-loop

SLIPT-PM に関するお問い合わせ

フナコシ株式会社 試薬担当 : reagent@funakoshi.co.jp

 **funakoshi**
FRONTIERS IN LIFE SCIENCE