

Transmembrane PhoxID: 膜を越える光近傍ラベリング法の開発

(京大院工¹⁾) ○荒木 文音¹・Fátima Yuri Tanimura Valor¹・高遠 美貴子¹・田村 朋則¹・浜地 格¹

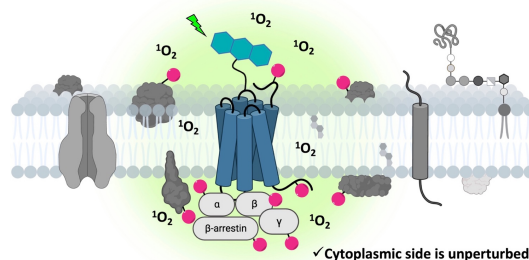
Transmembrane PhoxID: Development of a photoactivatable proximity labeling method across the plasma membrane (¹Graduate School of Engineering, Kyoto University)
○Ayane Araki,¹ Fátima Yuri Tanimura Valor¹ Mikiko Takato¹ Tomonori Tamura¹, Itaru Hamachi¹

Transmembrane proteins play important roles in intercellular signaling. Although proximity labeling (PL) methods have become mainstream for mapping protein-protein interactions in living cells, existing PL methods have difficulty in simultaneous labeling of extracellular and intracellular proteins. In contrast, transmembrane proximity labeling would be possible with PhoxID¹: the reactive species ¹O₂ has been reported to traverse membrane. In fact, we succeeded in simultaneous extracellular and intracellular labeling (Transmembrane PhoxID: tmPhoxID) targeted GluD2 in brain tissue, using propargylamine, a membrane-permeable labeling agent.

Keywords : *PhoxID; Proximity labeling; GluD2; Proteomics*

膜蛋白質は、シグナル伝達や接着、物質輸送など細胞機能に必須の役割を担っており、その動態および細胞内外における他の蛋白質との相互作用の解明は分子生物学研究の重要な課題である。近年、標的膜蛋白質の相互作用ネットワーク（インタラクトーム）解析を目的として、近傍ラベリング(PL)法が盛んに利用されている。こうした中、当研究室ではごく最近、生きたマウス脳内で適用可能な新たな光駆動型 PL 法として PhoxID 法を開発した。¹⁾ この手法では、標的蛋白質にアンカリングした光増感剤を励起して発生する一重項酸素(¹O₂)によって近傍蛋白質を酸化し、さらに求核性標識剤でラベルすることで膜蛋白質近傍のインタラクトームを網羅的に同定できる。従来の PhoxID のプロトコルは、光増感剤を標的膜蛋白質の細胞外ドメインに配置し、膜非透過性の標識剤を用いて細胞外領域のインタラクトームのみを対象とするものであった。一方、膜蛋白質が関与するシグナル伝達機構全体の解明のためには細胞内側のインタラクトームも同時に解析することが望ましい。

そこで本研究では、脂質二重膜を越えて細胞内外の膜蛋白質インタラクトームを一挙に検出可能な新技術「Transmembrane PhoxID: tmPhoxID」の開発を行った。培養細胞を用いたモデル実験から、膜透過性標識剤としてプロパルギルアミンを用いることで、近傍ラベリング反応が脂質二重膜を越えて進行することを実証した。加えて、脳組織中の GluD2 受容体を標的に tmPhoxID を実施し、本手法が生きたマウス脳内にも適用可能であることを示した。



1). Mikiko Takato *et al.* *Nat. Chem. Biol.* **2025**, *21*, 109-119.