PYP タグと発蛍光プローブ を利用したタンパク質の生 細胞蛍光イメージング

はじめに

生細胞におけるタンパク質の局在や動態を解析するうえで、タンパク質の蛍光標識は極めて有用な手法であり、今日の生命科学研究において欠かすことのできないものである。なかでも、蛍光タンパク質をイメージングツールとして用いる方法は、生細胞中のタンパク質の挙動を容易に可視化することができることから、多くの研究者に用いられている。一方、これまでに多くの蛍光タンパク質が報告されているものの、分子サイズが大きいことや近赤外蛍光を十分な明るさで放つタンパク質がないため組織深部をイメージングできないことなどが、蛍光タンパク質の抱える問題といえる。

近年、これらの問題を解決するために、蛍光タンパク質に代わり化学のアプローチに基づく蛍光標識法の開発がなされている⁽¹⁾。この手法は、合成蛍光プローブとそのプローブが結合する「タグタンパク質」を用いることで生細胞中のタンパク質をイメージングするものであり、化学者の開発した新しいタンパク質の標識技術として大きく発展しつつある。特に、タンパク質との標識反応に伴い非蛍光性から蛍光性へと変化する発蛍光プローブを用いた方法は、タンパク質を高いS/N比で迅速にイメージングできることから脚光を浴びている^(2,3)。本稿において、合成蛍光プローブを用いたタンパク質標識法の概要について説明し、われわれのグループが開発した発蛍光プローブとそのタグタンパク質について紹介する。

合成蛍光プローブを利用したタグタンパク質標識法

合成蛍光プローブを用いる標識法では、標的タンパク質を特異的に標識するために、特定のリガンドと特異的に結合するタンパク質を標的タンパク質の融合タグ（タ

グタンパク質）として利用する（図1）。このタグタンパク質と標的タンパク質の融合タンパク質を細胞内で発現させ、タグタンパク質のリガンドと蛍光色素を連結した蛍光プローブをその発現細胞に添加する。その結果、リガンドとタグタンパク質の結合を介して、標的タンパク質を特異的に蛍光標識することができる。この手法の利点の一つは、特定のタイミングでタンパク質を蛍光標識できることから、パルスチェイス実験により詳細なタンパク質の挙動の解析が可能となることである。もう一つの利点は、蛍光色素部分を取り換えることで、近赤外蛍光色素を含めたさまざまな色素を蛍光プローブに導入できることである。また、選択するタグタンパク質によっては、蛍光タンパク質よりも小さなサイズのものを用いることができることも魅力の一つと言える。すでに、HaloTag⁽⁴⁾ や SNAP-tag⁽⁵⁾、テトラシステインタグ⁽⁶⁾ などのタグタンパク質（ペプチド）とそれらのプローブが市販化されており、生命科学研究に応用されつつある。

図1 ■ 合成蛍光プローブとタグタンパク質を利用したタンパク質標識法

一方、これらのタグタンパク質の市販プローブの問題は、遊離の状態もしくは細胞内成分に非特異結合した状態で蛍光を発することである。このため、タグタンパク質に結合したプローブの蛍光を高いS/N比で検出するには、このような望ましくない蛍光成分を細胞の洗浄操作で取り除く必要がある。しかしながら、プローブの構造によっては、除去が困難な場合や洗浄に時間がかかり迅速なイメージングができないことがあるため、これらの問題を解決する新しい方法の開発が望まれていた。

● PYPをタグタンパク質とした発蛍光プローブによるタンパク質標識法の開発

われわれは、細胞の洗浄操作を行うことなく迅速にタンパク質をイメージングすることを目的として、遊離の状態では非蛍光性であり、タグタンパク質と結合することで蛍光強度を大きく上昇させる発蛍光プローブの開発に取り組んだ。

最初に、新しいタグタンパク質として紅色硫黄細菌由来の小タンパク質 Photoactive yellow protein (PYP)⁽⁷⁾に着目した。PYPはリガンドである桂皮酸／クマリンのチオエステル誘導体とCys69を介して共有結合することが知られており⁽⁸⁾、そのサイズは14 kDaと蛍光タンパク質の半分と小さく、タグタンパク質として魅力的である。PYPタグを標識する発蛍光プローブとして、クマリンリガンドと蛍光色素であるフルオレセインを連結したFCTPを設計・開発した⁽⁹⁾ (図2a)。以前の研究により、クマリンとフルオレセインを連結した分子は会合消光することが知られていることから⁽¹⁰⁾、FCTPは遊離状態では蛍光色素とリガンドの分子内会合により消光し、標識反応に伴い会合が解消されプローブの蛍光強度が上昇すると考えた。

FCTPとPYPを反応させSDS-PAGEで解析したところ、FCTPはPYPと共有結合することが示された。また、細胞溶解液中で同様の反応を行い、SDS-PAGEで

解析したところ、夾雑タンパク質が存在する条件においても、FCTPはPYPに特異的に結合することが示された。

実際にFCTPが発蛍光プローブであるかを蛍光測定により調べたところ、PYP非存在下では、FCTPの蛍光強度は極めて低いのに対し、PYPとの反応に伴い蛍光強度は約20倍上昇することが明らかとなった (図2b)。以上の結果から、PYPの標識に伴い蛍光強度が上昇するプローブの開発に成功したことが示された。

● タンパク質の無洗浄生細胞イメージングが可能なプローブの設計

このようにして、発蛍光プローブの開発には成功したのであるが、細胞の洗浄操作を行うことなく迅速にタンパク質をイメージングするには、標識反応の速度が遅いことが問題となった。FCTPがPYPと完全に反応するのに24時間以上の時間を要することが判明し、無洗浄生細胞イメージングを行うためには、より反応速度の速いプローブの開発が新たに必要であった。

FCTPによるPYPの標識速度が遅い理由として考えられることは、リガンド部位であるクマリンと色素部位であるフルオレセインの会合が、PYPとの結合において立体障害を引き起こしていることである。このため、リガンドと色素が会合しない分子の設計が必要であると考えた。そこで、この点を克服した新たな発蛍光プローブを設計するうえで、PYPとの結合反応に伴いリガンドからチオール化合物が脱離することに注目した。このチオール化合物に色素会合のための消光基を組み込むことで、標識反応前では、蛍光色素はリガンドではなく消光基と会合し非蛍光性となり、PYPとの結合に伴う消光基の脱離によりプローブの蛍光強度が上昇する。この結果、発蛍光標識と反応速度の向上が同時に達成されると考えた (図3a)。分子設計において注目すべき点は、蛍光色素との動的・静的消光を引き起こすニトロベンゼ

図2 ■ a) FCTPによるPYPの発蛍光標識の原理, b) PYPとの結合に伴うFCTPの蛍光強度変化

b) 実線はPYPと反応後のFCTPの蛍光スペクトルで、点線はFCTPのみの蛍光スペクトルである。

図3 ■ a) FCANBによるPYPの発蛍光標識の原理, b) PYPとの結合に伴うFCANBの蛍光強度変化, c) 細胞膜上に発現させたPYP融合EGFRのFCANBによる無洗浄蛍光イメージング

b) 実線はPYPと反応後のFCANBの蛍光スペクトルで, 点線はFCANBのみの蛍光スペクトルである. c) 左図と右図はそれぞれEGFRのみを発現させた細胞とPYP融合EGFRを発現させた細胞の蛍光画像. Scale bars = 10 μm.

ンを消光基として採用したこと, 色素とリガンドの π - π スタッキングを抑制するために, リガンド部位をクマリンから桂皮酸に変更したことである. これらの消光基およびリガンドとフルオレセインを色素として組み込んだプローブをFCANBと名づけ合成した⁽¹¹⁾.

SDS-PAGEによる解析から, FCANBはPYPと共有結合することが示され, 細胞溶解液中においても, FCANBはPYPに特異的に結合することが明らかとなった. さらに, 蛍光スペクトルを測定したところ, FCANBは遊離の状態では消光し, PYPとの結合により蛍光強度を15倍上昇させた (図3b). これらの実験から, FCANBはPYPの特異的な発蛍光標識プローブであることが示された. 分子設計の際に意図したとおりプローブの反応速度が向上しているかを検討するために, 二次速度定数 k_2 を決定した. その結果, FCANBの k_2 は $125 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ であり, FCTP ($k_2 = 1.11 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$) に比べ大きく反応速度が向上したこと (110倍) が明らかとなった.

最後に, FCANBを用いて, 生細胞に発現させたPYP融合タンパク質を洗浄することなくイメージングすることができるかを検討した. PYPをEGFR (上皮成長因子受容体) と融合し細胞膜上に発現させ, プローブを添加後, 細胞洗浄することなくそのまま共焦点蛍光顕微鏡に

より観察を行った. その結果, 細胞内や培地からはほとんど蛍光が観測されなかったのに対し, 細胞膜上から強い蛍光シグナルが観測された (図3c). 以上により, プローブの反応速度を大きく向上させた発蛍光プローブを用いることで, 生細胞上のPYP融合タンパク質を洗浄することなく高感度に観測することができると言える.

おわりに

本研究では, 蛍光色素の会合を利用した発蛍光プローブを設計・開発し, 細胞膜上におけるPYP融合タンパク質を洗浄操作なしでイメージングすることに成功した. 今後の課題は, 細胞内タンパク質をイメージングできる発蛍光プローブを開発することである. 今回のプローブは膜非透過性であるために, 細胞内タンパク質の標識は困難であるが, 分子構造を改変し膜透過性プローブを設計することで, この問題は解決されと考えている.

本手法は, タグタンパク質のサイズが小さく, 発蛍光プローブによる無洗浄イメージングができるという利点を有しており, タンパク質の動態を迅速かつ高感度に解析するための有用なツールとなることが期待される.

文献

- 1) C. Jing & V. W. Cornish : *Acc. Chem. Res.*, **44**, 784 (2011).
- 2) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Akimoto & K. Kikuchi : *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 1623 (2012).
- 3) T. Komatsu, K. Johnsson, H. Okuno, H. Bito, T. Inoue, T. Nagano & Y. Urano : *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 6745 (2011).
- 4) G. V. Los & K. Wood : *Methods Mol. Biol.*, **356**, 195 (2006).
- 5) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel & K. Johnsson : *Nat. Biotechnol.*, **21**, 86 (2003).
- 6) B. A. Griffin, S. R. Adams & R. Y. Tsien : *Science*, **281**, 269 (1998).
- 7) M. Kamiuchi, M. T. Hara, P. Stalcup, A. Xie & W. D. Hoff : *Photochem. Photobiol.*, **84**, 956 (2008).
- 8) M. A. van der Horst, J. C. Arents, R. Kort & K. J. Hellingwerf : *Photochem. Photobiol. Sci.*, **6**, 571 (2007).
- 9) Y. Hori, H. Ueno, S. Mizukami & K. Kikuchi : *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16610 (2009).
- 10) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi & T. Nagano : *Anal. Chem.*, **73**, 939 (2001).
- 11) Y. Hori, K. Nakaki, M. Sato, S. Mizukami & K. Kikuchi : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 5611 (2012).

(堀 雄一郎^{*1,3}, 菊地和也^{*1,2}, ^{*1}大阪大学大学院工学研究科, ^{*2}大阪大学免疫学フロンティア研究センター, ^{*3}科学技術振興機構さきがけ)

プロフィール

堀 雄一郎 (Yuichiro HORI)

＜略歴＞1999年京都大学薬学部製薬化学科卒業／2001年京都大学大学院薬学研究科修士課程修了／2004年同博士課程修了／同年ロックフェラー大学博士研究員／2006年大阪大学大学院工学研究科助教, 2012年科学技術振興機構さきがけ研究者(兼任), 現在に至る＜研究テーマと抱負＞蛍光プローブの設計と蛍光イメージング, タンパク質・ペプチドの機能化学＜趣味＞読書, ジョギング

菊地 和也 (Kazuya KIKUCHI)

＜略歴＞1988年東京大学薬学部卒業／1990年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了／1994年同博士課程修了／同年カリフォルニア大学サンディエゴ校博士研究員／1995年スクリプス研究所リサーチアソシエイト／1997年東京大学大学院薬学系研究科助手／2000年同助教授／2005年大阪大学大学院工学研究科教授, 2009年大阪大学免疫学フロンティア研究センター主任研究者(兼任), 現在に至る＜研究テーマと抱負＞化学プローブの設計・合成・生物応用