

受賞者

堤 浩 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所機能分子研究部門 分子認識分野

研究テーマ

細胞内タンパク質イメージングのための分子ツールの開発

1. 緒言

細胞内で相互に関連しあう複数のタンパク質が、いつ、どこで、どのくらい存在して機能しているかを詳細に調べることは、複雑な生命現象の理解において重要な課題の一つである。そのためには、任意の時間・空間において複数のタンパク質の機能解析を同時平行で行う方法が必要となる。細胞内のタンパク質を直接観測する方法として、標的タンパク質を選択的に蛍光ラベル化し、その蛍光を観測する方法がある。蛍光タンパク質を融合する方法は、標的タンパク質の蛍光ラベル化法として最も汎用的に用いられている。一方、近年では標的タンパク質に目印となるタグを融合し、このタグに対して選択的に結合するプローブ分子を用いて標的タンパク質を蛍光ラベル化する手法が提唱され、タグ-プローブペアの開発が精力的に行われている¹⁾。蛍光タンパク質およびタグ-プローブ法を併用することにより、複数のタンパク質を個別に蛍光ラベル化して標的タンパク質群の時空間的動態変化や機能解析をより詳細に行うことが可能になると期待される。しかしながら、さまざまな励起・蛍光波長の蛍光タンパク質が利用可能である一方で、細胞内タンパク質を蛍光ラベル化するためのタグ-プローブペアは未だ限られている。このような背景から、我々はロイシンジッパーペプチドの特異な高次構造形成能に基づいて、蛍光変化型のタグ-プローブペア (ZIPタグ-プローブペア) の開発を行っている。ZIPタグ-プローブペアは、標的タンパク質に融合したタグにプローブが結合したときのみ、顕著なプローブの蛍光波長シフトと蛍光強度増大が観測されるため、細胞内において標的タンパク質を特異的に蛍光検出することが可能になると期待される (図1)。本研究では、ZIPタグ-プローブペアを用いた細胞膜受容体のリアルタイム蛍光イメージング²⁾について検討を行うとともに、タンパク質の蛍光イメージングに必要とされる複数の励起・蛍光波長を有するZIPタグ-プローブペア群の創製をするため、新たなタグ-プローブペアの合成と機能評価を行った。

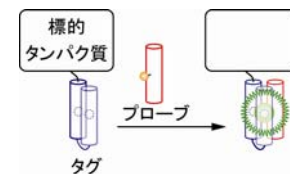


図1 ZIP タグ-プローブペアによるタンパク質蛍光イメージング

2. 方法

2-1. ZIPタグ融合ケモカイン受容体CXCR4の蛍光イメージング

Gタンパク質共役型受容体の一つであるケモカイン受容体CXCR4をモデルタンパク質として選択し、細胞外領域に存在するN末端側に遺伝子工学的にZIPタグを融合した。トランスフェクションによりZIPタグ融合CXCR4をCHO-K1細胞表層に一過的に発現させ、4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を有するZIPプローブを用いて共焦点レーザー顕微鏡による蛍光イメージングを行った (図2)。また、ZIPタグ融合CXCR4を選択的に蛍光ラベル化していることを確認するために、tetramethylrhodamine (TAMRA) を有するCXCR4アンタゴニスト³⁾を用いた共染色実験を行った。

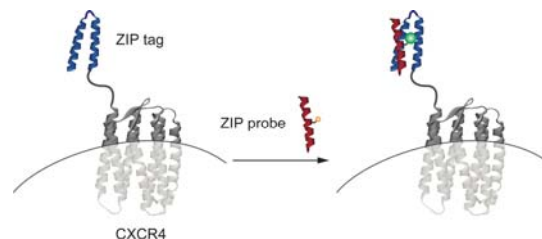


図2 細胞表層のZIPタグ融合CXCR4の蛍光ラベル化

2-2. 青色蛍光型ZIPタグ-プローブペアの開発

これまでに開発したNBDを有する緑色蛍光型ZIPタグ-プローブペアに基づき、NBDを7-Diethylaminocoumarin-3-carboxamide (DEAC)に置換したZIPタグ-プローブペアを新たに設計・合成し、機能評価を行った。ZIPタグペプチドおよびDEAC型ZIPプローブペプチドはそれぞれペプチド固相合成法により合成を行い、HPLCを用いて精製、ESI TOF-MSによる同定を行った。合成したタグ、プローブペプチドを用いて蛍光滴定実験を行い、タグ-プローブペアの結合親和性および蛍光応答活性を評価した。

3. 結果・研究成果

3-1. ZIPタグ融合ケモカイン受容体CXCR4の蛍光イメージング

NBD型ZIPプローブを用いて蛍光イメージング実験を行った結果、ZIPタグ融合CXCR4を発現したCHO-K1細胞の細胞膜上にNBDに由来する明るい緑色の蛍光が観測された(図3)。このとき、タグに結合していない余剰のプローブ分子に由来する蛍光はほとんど観測されていないことから、細胞表面においてもZIPタグ-プローブペアの蛍光応答能は保持されていると考えられる。また、この緑色蛍光はTAMRAを有するCXCR4アンタゴニストに由来する赤色蛍光とよい一致を示した。さらに、余剰のプローブ分子を洗浄操作により除いた後もZIPタグ融合CXCR4発現細胞上にNBDに由来する緑色蛍光が観測された。一方、ZIPタグ融合CXCR4を発現していない細胞ではNBD型ZIPプローブの蛍光は観測されなかった。以上の結果から、NBD型ZIPプローブペアは、蛍光応答能を保持したまま、細胞表面のZIPタグ融合CXCR4を選択的に蛍光イメージングできることが示された。

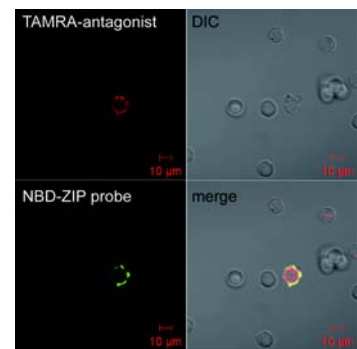


図3 NBD型ZIPプローブによるZIPタグ融合CXCR4の蛍光イメージング

3-2. 青色蛍光型ZIPタグ-プローブペアの開発

蛍光滴定実験を行った結果、DEAC型ZIPプローブはZIPタグペプチドと数十nMの結合親和性で相互作用することが示された。また、DEAC型ZIPプローブは単独ではほとんど蛍光を示さないが、ZIPタグペプチドと相互作用することにより、その蛍光強度が最大で50倍まで増加することが示された(図4 (a))。この蛍光変化は視認可能であるほど十分に大きいものであった(図4 (b))。以上の結果から、新たに青色の蛍光応答型プローブ分子の開発に成功した。

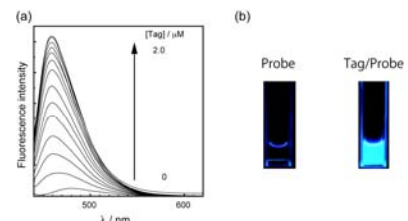


図4 (a) DEAC型ZIPタグ-プローブペアの蛍光的スペクトル変化 (b) DEAC型ZIPプローブの蛍光画像

4. 考察・まとめ

本研究では、ロイシンジッパー構造に基づいて蛍光応答能を有する新規のタグ-プローブペアであるZIPタグ-プローブペアを開発し、ZIPタグ-プローブペアが細胞表面に発現した膜受容体を選択的に蛍光イメージングできることを明らかにした。このZIPタグ-プローブペアは、細胞表面においても蛍光応答能を保持しており、タグに結合しているプローブに由来する蛍光のみが観測されたことから、細胞内タンパク質イメージングへの適用が可能と期待される。また、緑色蛍光を示すNBD型ZIPプローブに加え、新たに青色蛍光を示すDEAC型ZIPプローブを開発することに成功した。NBDからDEACへの蛍光色素の変換というシンプルな戦略に基づいて蛍光応答能を有するプローブの拡張が可能であることから、さまざまな励起・蛍光波長を有するZIPタグ-プローブペア群の創製と、標的タンパク質のマルチカラーイメージングへの応用が可能になると期待される。

5. 発表論文、参考文献

1. a) K. M. Marks, M. Rosinov, G.P. Nolan, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 347-356; b) H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488-494.
2. H. Tsutsumi, W. Nomura, S. Abe, T. Mino, A. Masuda, N. Ohashi, T. Tanaka, K. Ohba, N. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Tamamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *121*, 9328-9330.
3. W. Nomura, Y. Tanabe, H. Tsutsumi, T. Tanaka, K. Ohba, N. Yamamoto, H. Tamamura, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1917-1920.