



生細胞イメージングのための汎用的な タンパク質ラベル化蛍光プローブの開発

工学研究科 応用化学専攻ケミカルバイオロジー領域

教授 菊地 和也

<https://researchmap.jp/kikuchilab315>

准教授 藁島 維文

https://researchmap.jp/cbatgcm_m33



研究の概要

本研究ではタンパク質を化学的に蛍光ラベル化する手法を開発した。任意のタンパク質に融合発現できるタグタンパク質として、哺乳細胞で発現しない細菌由来の酵素、 β -ラクタマーゼを用い、その阻害剤、およびそのプロドラッグ体からなる蛍光プローブを設計・合成した。この蛍光プローブは β -ラクタマーゼと素早く反応し、共有結合形成に基づく安定な複合体を形成した。この反応を利用し、生細胞において局所に発現させたタンパク質を特異的に蛍光ラベル化し、イメージングすることができた。特にプロドラッグ体を用いることで、膜透過性が向上し、細胞内のタンパク質のラベル化に適用することができた。さらに、pH応答性の蛍光色素を用いてタンパク質をラベル化することで、細胞内の低pH環境に反応する蛍光センサーを構築した。飢餓状態においてオートファジーを誘導し、タンパク質が低pHオルガネラであるリソソームに輸送される過程を可視化することに成功した。

研究の背景と結果

タンパク質の蛍光ラベル化法は細胞内のタンパク質の動態を生きた状態で可視化できる有用なツールである。化学的に蛍光色素をタンパク質にラベル化する手法はラベル化のタイミングや量を制御しやすい、明るい、あるいはセンサー機能を持った合成蛍光色素を導入できる等の点で近年注目されている。この手法では見たいタンパク質にタグとなるタンパク質を融合発現し、タグを介してラベル化を行う。我々のグループでは以前より哺乳細胞で発現しない細菌由来の酵素、 β -ラクタマーゼの変異体を用い、基質である β -ラクタムを有する蛍光プローブを使ったラベル化法を報告してきた。しかしながら、 β -ラクタムは化学的に不安定であり、ラベル化後の複合体も安定でないことが制限となっていた。

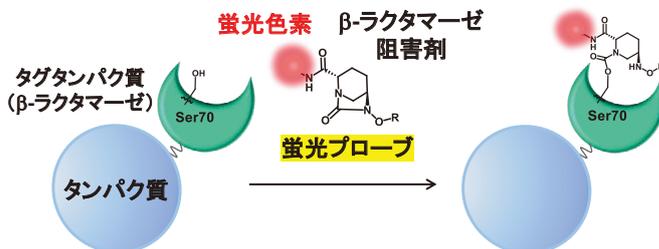
そこで、非 β -ラクタム系の阻害剤に注目し、タンパク質ラベル化用の蛍光プローブの開発に着手した。まず阻害剤に蛍光色素を連結させたプローブ(RD)を合成し、野生型の β -ラクタマーゼと反応したところ、即座にラベル化した複合体が得られ長時間安定であることが分かった。また、細胞膜上に発現させた β -ラクタマーゼをラベル化できることが分かった。一方で、阻害剤を用いたプローブは細胞膜透過性を有

していなかったことから、脂溶性を高めたプロドラッグ体を用いたプローブ(RD3)を新たに設計、合成した。このプローブを用い、細胞内のオルガネラ局所に発現させた β -ラクタマーゼを特異的にラベル化し、数時間にわたってイメージングすることができた。最後に、細胞内の酸性オルガネラであるリソソームへの移行をイメージングするため、低pHに反応する蛍光色素を用いたラベル化プローブ(pH-RD4)を開発し、細胞内の低pH環境に反応する蛍光センサーを構築した。ラベル化した細胞を飢餓状態におくと、時間経過とともにリソソームから蛍光シグナルが観察され、オートファジー誘導に伴うタンパク質のリソソーム移行をイメージングすることに成功した。

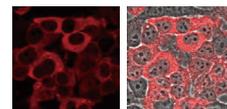
研究の意義と将来展望

タンパク質の化学的ラベル化手法は細胞内のタンパク質の動態を生きた状態で可視化できる有用なツールである。本手法は市販のラベル化法(HaloTag, SNAP-tag)と同等の条件で利用することができ、汎用的なタンパク質動態イメージングツールとして生物学研究への応用が期待できる。

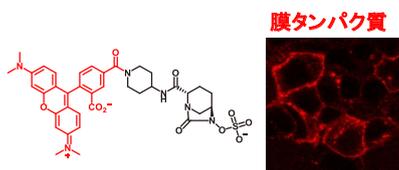
β -ラクタマーゼをタグとした汎用的なタンパク質ラベル化法



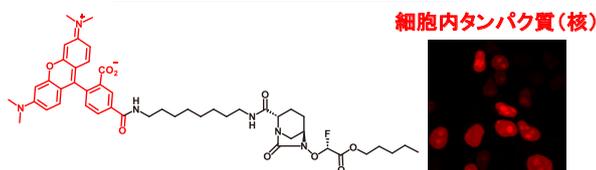
生細胞イメージング用ツールとしての応用



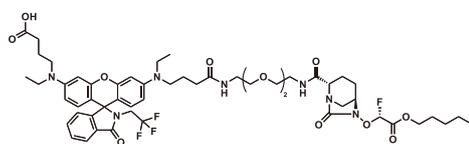
RD (細胞膜非透過プローブ)



RD3 (細胞膜透過プローブ)



pH-RD4 (pH応答性細胞膜透過プローブ)



飢餓条件下でのオートファジー検出
(タンパク質のリソソーム移行)



特許

論文

Minoshima, Masafumi; Umeno, Taro; Kadooka, Kohei et al. Development of a Versatile Protein Labeling Tool for Live-Cell Imaging Using Fluorescent β -Lactamase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*. 2023, 62, e202301704. doi: 10.1002/anie.202301704

参考URL

<https://www.molpro-mls.eng.osaka-u.ac.jp/index.html>

キーワード

蛍光プローブ、タンパク質ラベル化、 β -ラクタマーゼ阻害剤、オートファジー