

- gami, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1497–1506.
- 6) Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., & Kinoshita, T. (1993) *Cell*, **73**, 703–711.
 - 7) Almeida, A.M., Murakami, Y., Layton, D.M., Hillmen, P., Sellick, G.S., Maeda, Y., Richards, S., Patterson, S., Kotsianidis, I., Mollica, L., Crawford, D.H., Baker, A., Ferguson, M., Roberts, I., Houlston, R., Kinoshita, T., & Karadimitris, A. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 846–851.
 - 8) Krawitz, P.M., Schweiger, M.R., Rodelsperger, C., Marcellis, C., Kolsch, U., Meisel, C., Stephani, F., Kinoshita, T., Murakami, Y., Bauer, S., Isau, M., Fischer, A., Dahl, A., Kerick, M., Hecht, J., Kohler, S., Jager, M., Grunhagen, J., de Condor, B.J., Doelken, S., Brunner, H.G., Meinecke, P., Passarge, E., Thompson, M.D., Cole, D.E., Horn, D., Roscioli, T., Mundlos, S., & Robinson, P.N. (2010) *Nat. Genet.*, **42**, 827–829.
 - 9) Delahunty, M.D., Stafford, F.J., Yuan, L.C., Shaz, D., & Bonifacio, J.S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12017–12027.
 - 10) Wilbourn, B., Nesbeth, D.N., Wainwright, L.J., & Field, M.C. (1998) *Biochem. J.*, **332**, 111–118.
 - 11) Nagamune, K., Acosta-Serrano, A., Uemura, H., Brun, R., Kunz-Renggli, C., Maeda, Y., Ferguson, M.A., & Kinoshita, T. (2004) *J. Exp. Med.*, **199**, 1445–1450.
 - 12) Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y., & Kinoshita, T. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1135–1145.
 - 13) Muniz, M., Morsomme, P., & Riezman, H. (2001) *Cell*, **104**, 313–320.
 - 14) Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., & Riezman, H. (2000) *J. Cell Biol.*, **148**, 925–930.
 - 15) Takida, S., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2008) *Biochem. J.*, **409**, 555–562.
 - 16) Bonnon, C., Wendeler, M.W., Paccaud, J.P., & Hauri, H.P. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 1705–1715.
 - 17) Fujita, M., Umemura, M., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5253–5264.
 - 18) Howes, M.T., Mayor, S., & Parton, R.G. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 519–527.
 - 19) Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., & Mayor, S. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 411–423.
 - 20) Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B.J. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 912–918.
 - 21) Chatterjee, S., Smith, E.R., Hanada, K., Stevens, V.L., & Mayor, S. (2001) *EMBO J.*, **20**, 1583–1592.

前田 裕輔

(大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野)

Regulation of intracellular protein transport and localization by GPI-anchor through its structural remodeling
Yusuke Maeda (Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

合成蛍光プローブと発現タンパク質を用いた新規タンパク質ラベル化システム

1. はじめに

タンパク質の蛍光標識は、生細胞内のタンパク質の局在を調べる強力な研究手法であり、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となっている。その中核をなすものは2008年のノーベル賞受賞対象となった蛍光タンパク質である。蛍光タンパク質の生物応用が初めてなされた1990年代以降、蛍光強度、波長、ストークスシフト、フォトクロミズムなどの点において、様々な性質を有する蛍光タンパク質が開発されてきた¹⁾。この結果、蛍光タンパク質は、タンパク質の局在解析のためだけではなく、動態の時空間解析やタンパク質間相互作用、Ca²⁺のセンシング、リン酸化酵素などの活性の可視化など多岐にわたる応用がなされている^{1,2)}。言うまでもなくその有用性は、生命科学研究者に認められているものの、蛍光タンパク質には、いまだ解決されていない課題が存在する。例えば、蛍光タンパク質のサイズが27 kDaと比較的大きく、標的タンパク質に与える立体的影響が懸念されるが、現在のところサイズの大幅な軽減には成功していない。また、近赤外蛍光イメージングは、小動物や厚みのある組織の深部情報を得る優れた方法であるが、近赤外領域の700 nm以上に極大蛍光波長を持つ蛍光タンパク質は創製されていない。このため、これらの問題を解決するための蛍光タンパク質研究は現在も活発な領域といえる。一方、蛍光タンパク質とは別の新しいアプローチとして、合成蛍光プローブとそれに特異的に結合するタンパク質(タグタンパク質)を利用したタンパク質蛍光標識技術が開発され、注目を集めている。本稿では、この蛍光標識技術の原理と利点及び問題点について述べ、筆者らの取り組みについて紹介する。

2. タグタンパク質を利用したタンパク質標識法

タグタンパク質を利用した蛍光標識法では、遺伝子工学によりタグタンパク質を融合させた標的タンパク質を細胞内で発現させる。次に、タグタンパク質に特異的に結合する蛍光プローブにより、タグタンパク質を蛍光標識し、その結果、融合させた標的タンパク質を蛍光検出する(図1a)。ここで、重要な点は、蛍光プローブがタグタンパク質と特異的に反応し、その他の内在性のタンパク質とプロー

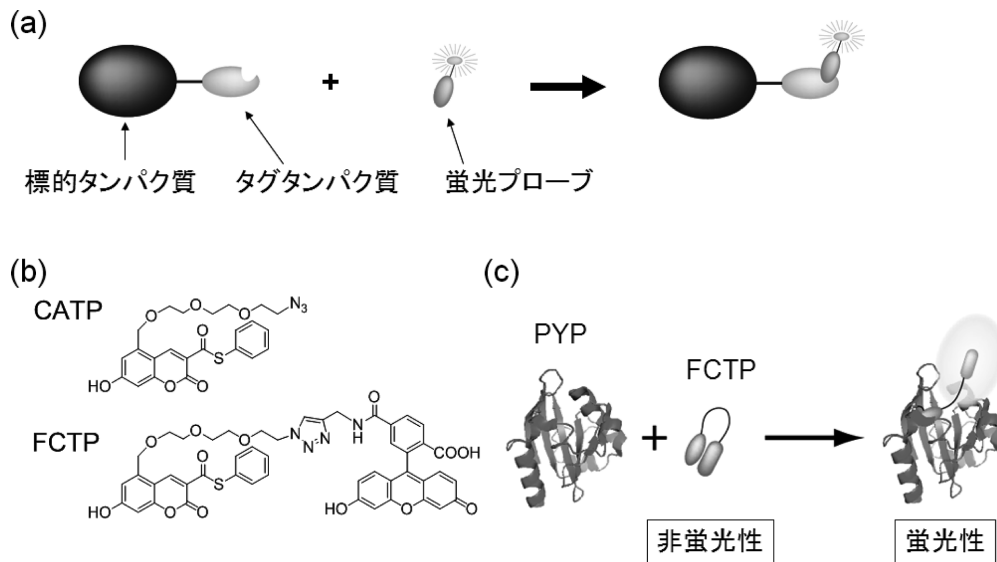


図1 タグタンパク質を用いた蛍光標識法

(a) 一般的なタグタンパク質標識法の原理. (b) PYP 標識プローブ CATP 及び FCTP. (c) FCTP による photoactive yellow protein (PYP) の蛍光強度増大型標識法. (PYP の立体構造図は PDB (1OTB) より得た.)

ブが反応しないことである。

市販されているタグとして、HaloTag (Promega)³⁾、SNAP-tag (New England Biolabs)⁴⁾、Lumio tag (Invitrogen)⁴⁾、LigandLink tag (Active Motif)⁵⁾などが知られている。Lumio tag (FIAsH, ReAsH と呼ばれるプローブが結合する6アミノ酸のテトラシステインペプチドタグ) 以外は、天然タンパク質に由来するタグであり、蛍光プローブは、それらタグと特異的に結合するリガンドをもとにして設計されている。紙面の都合上、詳細は省くが、それぞれの手法の特徴の要点は、次の通りである。蛍光タンパク質に比べ、サイズが小さいのは、SNAP-tag (20 kDa)、Lumio tag (0.6 kDa)、LigandLink tag (18 kDa) であり、プローブとの結合様式は、HaloTag, SNAP-tag は共有結合、Lumio tag は配位結合、LigandLink tag は非共有結合である。最近では、上記のタグ以外にも D4 タグやコイルドコイルからなるタグなど新しいタグ標識法の開発が進んでいる^{4,6)}。

さて、本手法の利点は、次の3点にまとめられるといえる。1点目は、特定のタイミングで標的タンパク質を容易に標識できることである。タグタンパク質は、プローブを添加するまで蛍光を放たないために、ある時間に発現しているタンパク質の局在や動態を高い時間精度で可視化することができる。また、蛍光タンパク質と異なり、蛍光団の成熟時間を気にせず速やかに蛍光イメージングを行うことができる。2点目は、蛍光プローブを構成する蛍光色素

の部位を取り替えることで、様々な蛍光特性を有するプローブを設計できることである。このことは、蛍光タンパク質では達成されていない700 nm以上の近赤外蛍光を発するプローブや蛍光タンパク質より明るい色素を利用したプローブの開発が可能であることを意味している。3点目は、前述したように、既存のタグタンパク質では、比較的小さいサイズのものが利用できることである。タグタンパク質のサイズは、必ずしも融合させた標的タンパク質の機能に影響を与えるわけではないが、実験系によっては、タグのサイズを気にする場合も多い。

一方、市販化されているタグのうち、標識反応に伴い、蛍光強度が上昇するものは、Lumio tagのみである。それ以外の標識法は、遊離のプローブの蛍光が観測されるため、洗浄操作が必要である。Lumio tagの場合でも、過去の報告⁷⁾及びメーカーのプロトコルによると、非特異結合に伴うバックグラウンド蛍光を取り除くための作業が必要である。このことは、より高い時間分解能でタンパク質の動態を追跡する際の問題となりうる。したがって、標識に伴い、蛍光強度が上昇し、そのまま顕微鏡観測可能な方法の開発が期待されている。

3. Photoactive yellow protein (PYP) をタグタンパク質とした蛍光強度増大型プローブによる標識法の開発

筆者らは、以上の問題を解決するために、新しいタグタ

ンパク質とプローブのペアからなる蛍光強度増大型標識法の開発に乗り出した⁸⁾。まず、リガンドと特異的に結合することの知られているタグタンパク質を決定する必要がある。このとき、タグタンパク質を動物以外の生物由来のタンパク質の中から探索した。これは、動物細胞で発現するタンパク質を選ぶと、標識反応を行うとき、標的タンパク質以外にその内在性タンパク質が標識されてしまうためである。また、発現によって、動物細胞中の小分子と結合したり、酵素反応を引き起こすことのないものとした。これにより、細胞中の代謝に与える影響を抑制しかつ外部から加えるプローブとの反応への影響をなくすことができると考えられる。さらにタンパク質のサイズは、できる限り小さいものとした。以上の条件のもと、探し出したタンパク質は紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* 由来 PYP であった。(なお、これとは別に、 β -ラクタマーゼ変異体をタグタンパク質とした蛍光標識法を筆者らの研究室では開発しており、こちらに関しては参考文献9を参照されたい。)

PYPは125アミノ酸(14 kDa)からなり、上記に示した市販のタグと比べると、Lumio tagに次いで小さなタンパク質であり、蛍光タンパク質(238アミノ酸:27 kDa)の約半分のサイズである¹⁰⁾。PYPは、天然の補因子である4-ヒドロキシ桂皮酸チオエステル誘導体とCys69がチオエステル交換反応により細菌内で特異的に結合することが知られている¹¹⁾。さらに、PYPは蛍光性の7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸チオエステル誘導体とも結合することが報告されており¹²⁾、このことは、蛍光強度増大型プローブを設計するうえで極めて重要な点である。以前の報告より、クマリンとフルオレセインの誘導体を柔軟なリンカーで結合させると会合消光を引き起こすことが分かっている¹³⁾。このことから、PYPリガンドのクマリン誘導体とフルオレセインをつないだプローブは、PYPと結合する前は消光しており、PYPとクマリン部位が結合するとフルオレセインとの会合が解消され、蛍光強度が上昇すると考えた。

そこで、この方針に基づいて、クマリン誘導体プローブ(CATP)を設計し、CATPにフルオレセインをつないだ構造を有するプローブ(FCTP)を設計・合成した(図1b, c)。CATPには、フルオレセインとつなぐためのリンカーをタンパク質との立体障害を考慮に入れてクマリンの5位に結合させている。また、クリックケミストリーによりフルオレセインを容易に結合させることができるように、リンカーの先端にアジド基を導入した。このCATPにフル

オレセインを結合させることによりFCTPを設計した。

まず、CATPまたはFCTPを精製したPYPと反応させSDS-PAGEで解析したところ、タンパク質を示す位置に蛍光バンドが観測された(図2a)。このことから、これらのプローブがPYPと結合することが示された。また、細胞溶解液中でPYPと二つのプローブを反応させ、SDS-PAGEで解析したところ、PYPの分子量を示す位置に単一の蛍光バンドが確認できたことから、夾雑タンパク質が存在する条件においても、それぞれの合成蛍光プローブとPYPは、特異的に結合することが示された(図2b)。

次に、PYP非存在下で、FCTPの蛍光が消光し、PYPとの結合によって蛍光強度が上昇するかを検討した。PYP非存在下でFCTPの蛍光スペクトルを測定したところ、蛍光強度は極めて低いことが示された。一方、FCTPとPYPを24時間反応させると、その蛍光強度は約20倍上昇することが明らかとなった(図2c)。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。

最後に、培養細胞に発現させたPYPを特異的に蛍光標識できるかを調べた。細胞内及び細胞膜上における標識反応を検討するために、MBP(マルトース結合タンパク質)とPYPの融合タンパク質MBP-PYPの遺伝子を組み込んだ細胞内発現用プラスミドと、PDGFR(血小板由来成長因子受容体)の膜貫通ドメインと分泌シグナルをPYPに融合させたPYP-PDGFRtmの遺伝子を組み込んだ細胞膜発現用プラスミドを構築した。まず、HEK293T細胞にMBP-PYPをコードしたプラスミドを導入し遺伝子発現後、CATPまたはFCTPを添加し、蛍光顕微鏡により観測した。このプラスミドを導入していない細胞からは蛍光は観測されなかったのに対し、MBP-PYPを発現した細胞からはCATPを添加したときのみ蛍光が観測された。このことから、CATPを用いることにより、細胞内のPYPを蛍光標識できることが示された。一方、FCTP添加細胞からは、蛍光が観測されなかった。FCTPは細胞膜非透過性のフルオレセインを組み込んでいるため、細胞内に取り込まれなかったと考えられる。次に、PYP-PDGFRtmを発現させたHEK293T細胞にCATP及びFCTPを添加し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、これらのプラスミドを導入していない細胞からは、蛍光は観測されなかったのに対し、PYP-PDGFRtmを細胞膜上に発現させた細胞からは、両プローブともに蛍光が観測された(図2d)。このことから、細胞膜上に発現させたPYP融合タンパク質が蛍光標識されたことが示された。

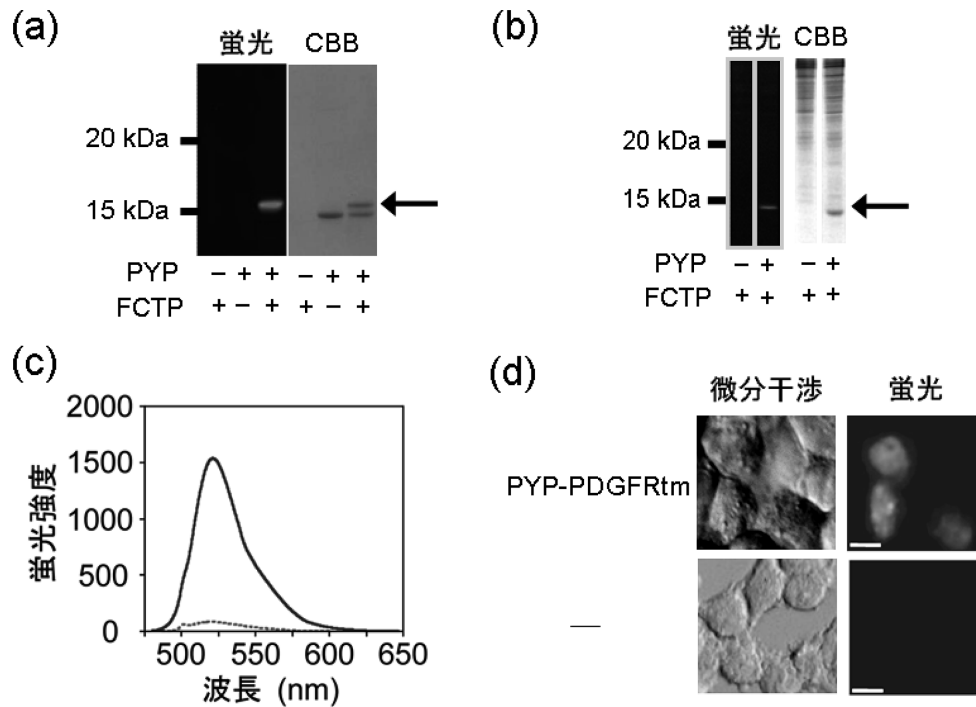


図2 蛍光強度増大型プローブ FCTP による PYP の蛍光標識

(a, b) FCTP による PYP の標識反応の SDS-PAGE による解析. 左図は蛍光画像, 右図は CBB 染色画像を示している. (a) は FCTP と精製した PYP の試験管内における標識反応であり, (b) は FCTP と PYP の細胞溶解液中における標識反応を示している. (c) PYP との結合に伴う FCTP の蛍光強度変化. 実線は PYP と 24 時間反応させた後の 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. (d) 細胞膜上に発現させた PYP の蛍光標識. 右図は蛍光画像, 左図は位相差画像, 上段は PYP-PDGFRtm 発現細胞, 下段は非発現細胞を表す. Scale bars = 20 μm.

4. おわりに

本研究では, 蛍光色素の会合・解離による蛍光スイッチを原理としたプローブを開発し, 細胞膜上における PYP 融合タンパク質の蛍光イメージングに成功した. 一方, 蛍光強度増大型プローブによる細胞内タンパク質のイメージングは, 現段階では達成されておらず, 今後の課題といえる. しかしながら, FCTP のフルオレセイン部分の構造改変を行い, プローブを膜透過性にする事で細胞内イメージングも可能になると考えている.

遊離の蛍光プローブの洗浄操作なしで細胞内タンパク質を蛍光標識することは, タグタンパク質と合成蛍光プローブを利用した標識法の理想形である. 本手法は, 小さなタグタンパク質を利用できることと, 標識反応の蛍光スイッチを有するという利点を有しており, タンパク質の動態を高精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.

- 1) Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010) *Physiol. Rev.*, 90, 1103–1163.
- 2) VanEngelenburg, S.B. & Palmer, A.E. (2008) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 60–65.
- 3) Los, G.V. & Wood, K. (2007) *Methods Mol. Biol.*, 356, 195–208.
- 4) O'Hare, H.M., Johnsson, K., & Gautier, A. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17, 488–494.
- 5) Calloway, N.T., Choob, M., Sanz, A., Sheetz, M.P., Miller, L. W., & Cornish, V.W. (2007) *ChemBiochem*, 8, 767–774.
- 6) Yano, Y. & Matsuzaki, K. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, 1788, 2124–2131.
- 7) Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J., & Tsien, R.Y. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 6063–6076.
- 8) Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S., & Kikuchi, K., (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 16610–16611.
- 9) Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., & Kikuchi, K. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5016–5017.
- 10) Kamiuchi, M., Hara, M.T., Stalcup, P., Xie, A., & Hoff, W.D. (2008) *Photochem. Photobiol.*, 84, 956–969.
- 11) Kyndt, J.A., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., & Van Beeumen, J.J. (2002) *FEBS Lett.*, 512, 240–244.

- 12) van der Horst, M.A., Arents, J.C., Kort, R., & Hellingwerf, K. J. (2007) *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 571-579.
- 13) Takakusa, H., Kikuchi, K., Urano, Y., Higuchi, T., & Nagano, T. (2001) *Anal. Chem.*, 73, 939-942.

堀 雄一郎, 菊地 和也
(大阪大学大学院工学研究科)

Novel protein labeling system based on synthetic fluorescent probe and protein tag

Yuichiro Hori and Kazuya Kikuchi (Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)
