

酵素変異体に基づくタンパク質ラベル化技術の開発と 新たな生物学研究ツールへの展開

水 上 進

タンパク質の持つ遺伝子による発現制御が可能な特性と、低分子の持つ多機能分子設計が可能な特性を結びつけられるタンパク質ラベル化技術が注目を集めている。筆者らは細菌酵素βラクタマーゼの変異体を用いたタンパク質ラベル化技術（BL-tag 技術）の開発に取り組んでおり、これまでに機能性部位やリガンド部位の構造が異なる複数のラベル化プローブを報告してきた。精密に機能設計を行った発蛍光ラベル化プローブを用いることで、蛍光タンパク質では困難な実験も可能であり、生細胞イメージングツールとしての有用性を示した。イメージング以外のタンパク質ラベル化技術の応用について、生体機能制御に関するいくつかの先進的な研究例を紹介するとともに、タンパク質ラベル化技術の将来像について展望する。

1. はじめに

現在、蛍光タンパク質はさまざまな蛍光色や機能性のものが報告されており、生細胞イメージングの主役の一つになっている。蛍光タンパク質が持つ特長の一つは、これらが遺伝子でコードできることである。標的タンパク質と蛍光タンパク質とを融合することで（図 1a）、生きた細胞内での標的タンパク質の局在や挙動などを容易に追跡できる。また、吸収/蛍光波長の異なる蛍光タンパク質を組み合わせることで、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET: fluorescence resonance energy transfer）の原理に基づくさまざまな蛍光センサー分子も報告されている¹⁾。これらの蛍光タンパク質プローブは、シグナルペプチド配列を融合させて細胞内局所に限局させることができるため、低分子蛍光プローブに対して大きな優位性を持っている。さらに、実用面で見逃せない点として、タンパク質をコードする DNA は無限に増幅可能であり、試料の消費を気にする必要がない。これらの特長により、蛍光タンパク質を用いたイメージング研究は瞬く間に世界中に広がった。

にもかかわらず、低分子プローブの役割は終わったわけ

ではない。それどころか、蛍光タンパク質の課題が明らかになるにつれて、低分子化合物の多彩な機能に再び注目が集まりつつある。機能性低分子の歴史は古く、19世紀半ばにはすでに蛍光化合物の研究が行われていた²⁾。1980年代半ばの Tsien らによる生細胞内 Ca^{2+} を可視化する蛍光プローブの開発³⁾が端緒となり、細胞生物学における機能性低分子の有用性が認識されるようになった。その後、多くの化学者が生物学分野に参入するようになり、さまざまな機能性低分子プローブの設計原理が確立されてきた⁴⁾。よって、低分子プローブの種類や機能のバリエーションはタンパク質プローブと比較すると圧倒的に多く、そのポテンシャルを生かせれば、生命科学の一層の進展が期待される。

そこで近年、タンパク質と低分子化合物の両者の長所を併せ持つ「機能性低分子-タンパク質ハイブリッド分子」が注目されている。このようなハイブリッド分子を生細胞実験で使用するには、細胞内などの生理条件下で機能性分子をタンパク質に効率的に修飾することが求められる。そこで本稿では、生理条件下での使用に耐えるタンパク質ラベル化技術（図 1b）を取り上げ、著者らが開発した技術を中心に研究例を紹介する。また、生化学に対して新たな視点をどのように与えられるかについて私見を述べたい。

2. タンパク質ラベル化技術

タンパク質に機能性低分子を修飾するには、反応性の高い Lys の-NH₂ 基や Cys の-SH 基などに化学的に共有結合

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（〒565-0871
大阪府吹田市山田丘 2-1）

Protein labeling technology based on mutant enzyme and its application to new biological research tools

Shin Mizukami (Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

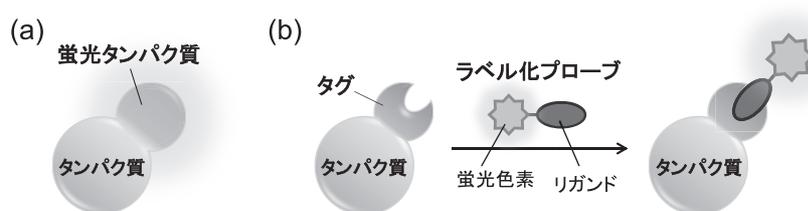


図1 タンパク質の可視化

(a) 蛍光タンパク質を融合したタンパク質. (b) タグを利用したタンパク質の蛍光ラベル化.

させる手法が古くから用いられてきた. 現在でも蛍光色素を共有結合させた抗体は, 生化学実験から蛍光イメージングまで幅広く用いられている. こうした化学修飾法は, 普遍的に存在する天然アミノ酸残基と反応するため, 未精製の状態でのタンパク質のみをラベルする目的には使用できない. そうした目的には, 特異性の高いタグタンパク質やタグペプチドを用いた手法が有効である.

タグペプチド/タンパク質の例は, Tsienらによる tetracycline tag⁵⁾ (Lumio tag) が先駆けであるが, 現在では HaloTag⁶⁾, SNAP-tag⁷⁾ など数種類が市販されるまでになっている. これらの手法では, 蛍光タンパク質と同様に遺伝子工学を用いてタグを標的タンパク質に融合し, 生細胞表面や生細胞内に発現させる. その後, タグに特異的に結合するリガンド部位を持つ機能性分子を投与すると, 標的タンパク質に機能性分子がラベルされる (図 1b). タグを用いたタンパク質ラベル化技術は, タグとリガンドの特異性が実用性の鍵であり, 一般的にはタンパク質タグの方がペプチドタグよりも特異性が高いとされる. しかしながら, 標的タンパク質の機能に影響を与える立体的な効果についてはペプチドタグに優位性があり, ビオチンリガーゼなどの酵素を用いて基質配列を持つペプチドタグに機能性低分子を修飾する手法^{8,9)} など, 特異性を保ちながらタグのサイズを小さくする試みもなされている.

タンパク質ラベル化技術を生細胞実験に用いるには, タグとリガンドの両者が①内在性ではないこと, ②内在性分子と反応しないこと, さらに③タグの融合がタンパク質機能を阻害しないこと, が重要である. タグのサイズは上記③の理由によりなるべく小さいことが望まれるが, タン

パク質機能への影響は静電的および疎水的な相互作用も考慮に入れる必要がある. ちなみに GFP の分子量は約 27,000 であり, 市販タグの大きさは最小の tetracycline tag で 575 (6 アミノ酸), 大きめの HaloTag で約 33,000 である.

筆者らは, 細菌酵素 β -ラクタマーゼをタグとして用いたタンパク質ラベル化システムを開発してきた¹⁰⁾. β -ラクタマーゼは β -ラクタム系抗生物質を特異的に加水分解する酵素で, 哺乳類細胞には内在性の相同タンパク質は存在しない. クラス A の β -ラクタマーゼに属する TEM-1 (図 2a) は分子量が約 29,000 の比較的小さな酵素であり, 基質の加水分解反応機構が詳細に調べられている. 活性中心近傍のアミノ酸に変異を導入したいくつかの変異体では酵素反応速度が変化し, 中でも E166N 変異体では基質が結合した中間体からの加水分解反応がきわめて遅く, 基質の解離が実質上停止する¹¹⁾. そこで, この E166N 変異体 β -ラクタマーゼをタグタンパク質として利用することを考えた.

β -ラクタマーゼはさまざまな β -ラクタム系抗生物質を基質とし, これらに蛍光色素などを修飾した分子が機能性リガンドとなる. そこでまず, 代表的な抗生物質であるアンピシリンのアミノ基にクマリンを修飾した化合物 CA (図 3) を合成し, E166N TEM-1 β -ラクタマーゼに選択的に共有結合することを SDS ポリアクリルアミド電気泳動により確認した. 膜タンパク質にこの変異体 β -ラクタマーゼを融合させて哺乳類細胞に発現させ, CA を培養液に添加したところ, 細胞膜上のタンパク質のみを蛍光観察することができた¹²⁾. 開発したシステムが, 既存の HaloTag や

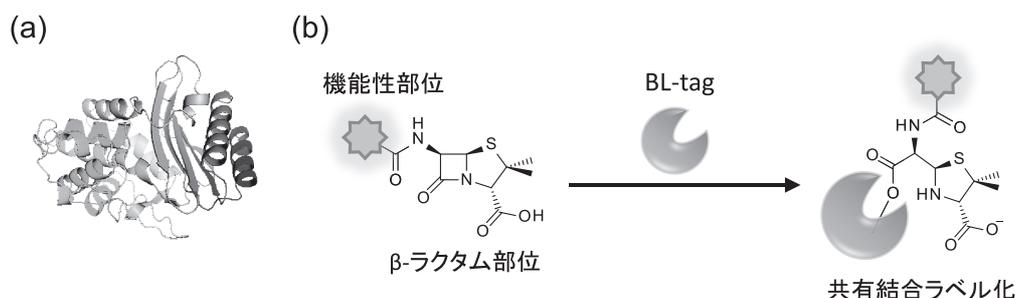


図2 変異 β -ラクタマーゼ (BL-tag) を用いたタンパク質ラベル化技術の概要

(a) TEM-1 β -ラクタマーゼの立体構造. (b) 機能性分子修飾 β -ラクタム化合物の BL-tag へのラベル化.

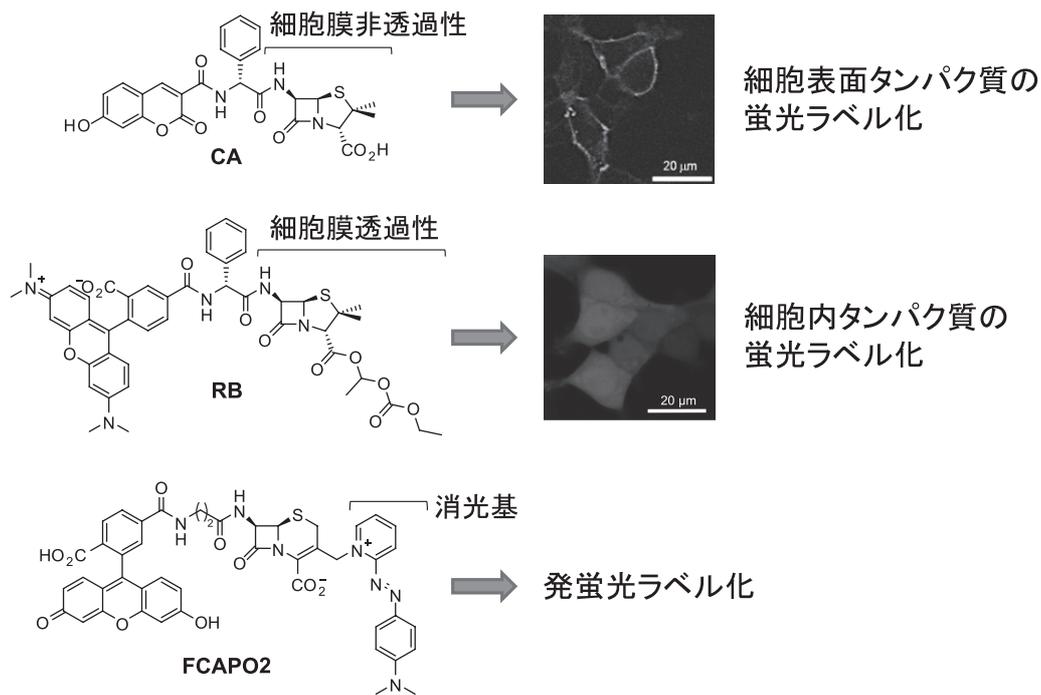


図3 開発したBL-tag 選択的蛍光ラベル化プローブの例

SNAP-tag と同じように、生細胞でも機能することが確認できたことから、この変異体を BL-tag と名づけ、さまざまな機能性ラベル化プローブの開発を行った。

本ラベル化技術の特長の一つは、リガンドとなるβ-ラクタム化合物が多種類知られており、医薬品あるいはその合成中間体として入手できることである。これにより、細胞膜透過性などの物性が異なるラベル化プローブを比較的短いステップで合成できる。これまでに合成した蛍光ラベル化分子の例を図3に示す¹³⁻¹⁵⁾。アンピシリンのプロドラッグであるバカンピシリンをリガンド部位として持つRB およびその類縁体は、細胞膜透過性を有しており、細胞内タンパク質の1分子イメージングなどに应用可能である。また、六員環を有するβ-ラクタム系抗生物質のセファロsporinを用いることで、さらに有用な機能を生み出すことができたので、次節で紹介する。

3. 発蛍光ラベル化プローブによるイメージング応用

蛍光色素ラベルしたタンパク質を蛍光顕微鏡で観察するには、通常は蛍光ラベル化プローブの投与や洗浄操作などが必要である。それゆえ、蛍光タンパク質では難しい実験の場合にタンパク質ラベル化技術を用いることが多い。そのような実験の一つに、パルスチェイス実験がある。パルスチェイス実験とは、ある時刻に発現している生体分子のみをラベルし、その後の挙動を追跡する手法である(図4a)。蛍光タンパク質は連続的に発現するため、蛍光タンパク質の蛍光シグナルはタンパク質の発現時刻等の時間情報を持たない。一方、蛍光色素をラベルした場合は、未反応色素を洗浄除去すれば、ラベル化の時刻に発現していたタ

ンパク質のみを蛍光観察できる。蛍光ラベルした細胞を一定の時間経過後に別の蛍光色素でラベルすることにより、異なる時刻に発現したタンパク質の挙動をそれぞれ別の蛍光色で追跡できる。BL-tag ラベル化技術においても、異なる蛍光色の量子ドットを経時的にラベルすることで、上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)のパルスチェイス観察が可能であった¹⁶⁾。

さらに、分子構造中にFRETの原理を組み込んだ発蛍光型ラベル化プローブFCAPO2(図3)を開発した。この分子は、励起された蛍光色素(フルオレセイン)のエネルギーがFRETにより分子内の消光基へ移動するため、ほぼ無蛍光となる。FCAPO2がBL-tagにラベル化されると、速やかに消光基が脱離して強蛍光性となるため、未反応のFCAPO2を洗浄除去する必要がない。FCAPO2の持つ発蛍光特性と細胞膜非透過性を利用して、標的タンパク質が細胞内から細胞表面に移行した瞬間に発蛍光ラベルを行う特殊なパルスチェイス実験に応用した。

まず、実験開始時に細胞表面に存在しているEGFRを細胞膜非透過性のローダミン系の赤色蛍光ラベル化プローブRAでラベルした。その後、未反応のRAを洗浄除去し、緑色の発蛍光性プローブFCAPO2を添加し、共焦点蛍光顕微鏡による経時観察を行った(図4b)。RAをラベルした段階で細胞膜上に存在したEGFR由来の赤色蛍光は、時間経過とともに徐々に細胞内に移行した。一方、新たに細胞内から細胞表面に移動したEGFRに対してはFCAPO2が発蛍光ラベルされることで、細胞膜上に緑色蛍光が現れてくるのが観察された。この手法により、タンパク質の膜提示現象を可視化できるだけでなく、同種のタンパク質を膜上への発現時間等の履歴の違いに従って区別す

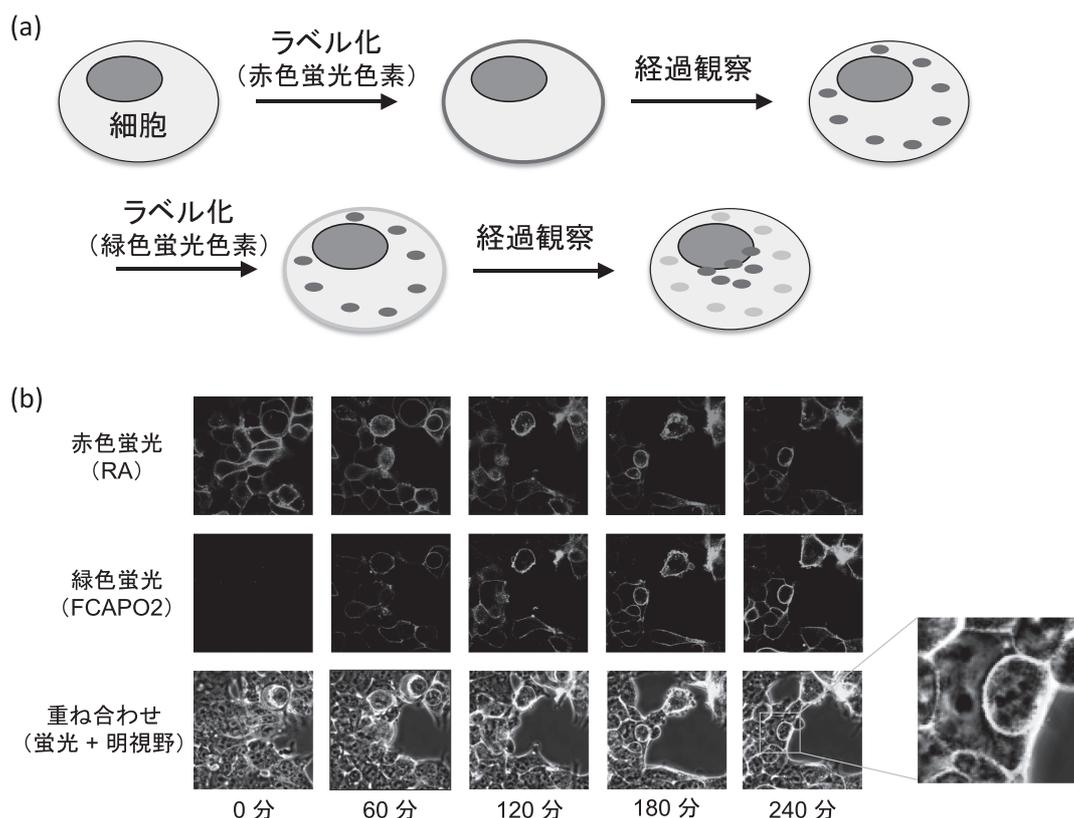


図4 タンパク質ラベル化技術を利用したパルスチェイス実験
 (a) 2種類の蛍光色素ラベルによるパルスチェイス実験の概要. (b) 発蛍光型ラベル化プローブ FCAPO2を用いたEGFRのパルスチェイスイメージング画像.

ることが可能になった.

また、タンパク質ラベル化技術の蛍光イメージング応用の中でも、特に有効に利用されている研究として、超解像蛍光イメージングが挙げられる。光の回折限界を超える解像度での観察が可能なSTED (STimulated Emission Depletion microscopy) やSTORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) などの超解像イメージング技術が開発されているが¹⁷⁾、これらはいずれも強いレーザー光を用いるため、高蛍光強度かつ光退色を起しにくい蛍光色素が望まれる。低分子蛍光色素には蛍光タンパク質よりも蛍光強度およびレーザー光耐性が優れたものが数多く知られているため、これらの色素をタンパク質にラベルすることで超解像イメージングに利用されている¹⁸⁾。また、同様に強いレーザー光を用いる1分子イメージングにおいても、タンパク質ラベル化技術は重要性を増している。

4. タンパク質ラベル化技術の新展開—生体機能制御への応用

タンパク質にラベルできる機能性分子は蛍光色素だけではない。細胞内ではさまざまなタンパク質が相互作用することで機能制御が行われている。それゆえ、細胞内シグナル伝達にかかわるタンパク質間相互作用を人為的に制御する技術は、生物を構成的に理解するための強力なツールと

なる。タンパク質ラベル化技術をこのような目的で用いる研究として、タンパク質を同種または異種で二量化させる研究がある (図5a)¹⁹⁾。報告されている例は、天然化合物であるRapamycinを用いたシステムが最も多いが、合成リガンドの例もわずかに報告されている。Bertozziらは、異なるタグタンパク質に結合するリガンドをつなげた二量化プローブを開発した。このプローブを細胞に添加することで、細胞質に発現させた糖転移酵素をゴルジ体へ局在化させ、触媒活性の制御に成功している²⁰⁾。筆者らもBL-tagと他のタンパク質タグを連結するリンカープローブを用いて、膜タンパク質の二量化を誘導し、膜タンパク質の活性化をトリガーとする細胞内シグナル伝達を人工的に制御できることを確認している (未発表データ)。

その他の応用例として、細胞内タンパク質の発現レベルを低分子によって制御することができる。生細胞内でタンパク質が変性して脂溶性部位が表面に現れると、タンパク質分解系により除去される機構が存在する。CrewsらはHaloTagを融合させた標的タンパク質を細胞に発現させた後、疎水性の高いアダマンタンを修飾したHaloTagリガンドを細胞に投与したところ、数時間後にはほとんどの標的タンパク質が消失した (図5b)²¹⁾。この手法は、タンパク質量の翻訳後制御を可能とし、非常に応用範囲の広い技術になる可能性がある。

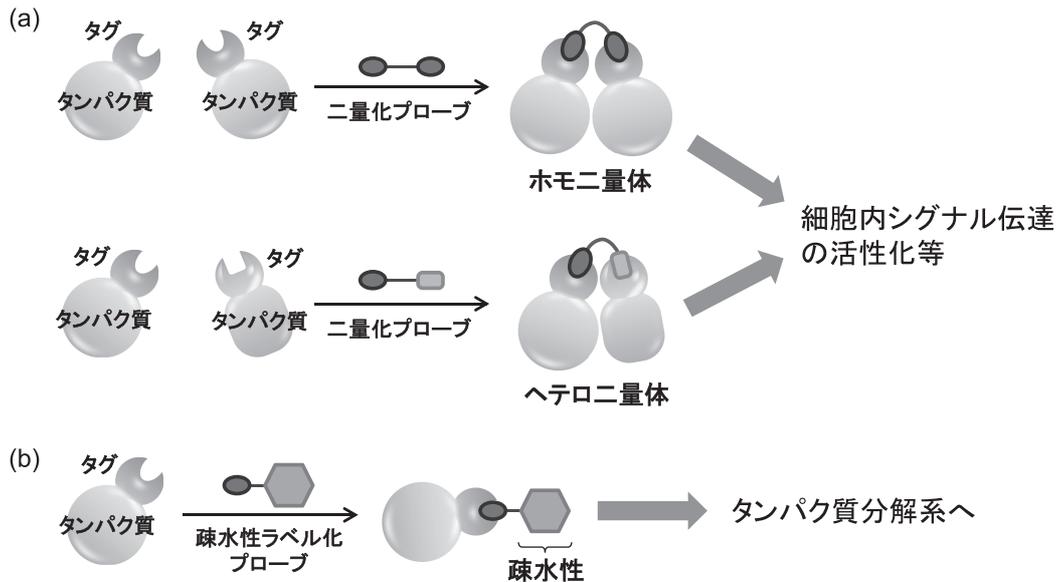


図5 ラベル化技術を用いたタンパク質の機能制御
 (a) タンパク質二量化を利用した細胞内シグナル伝達の活性化. (b) 疎水性プローブのラベル化によるタンパク質の翻訳後分解制御.

5. タンパク質ラベル化技術の将来展望

最後にタンパク質ラベル化技術の将来を展望したい。イメージング分野においては、酵素活性やイオン濃度変化などの「生体機能」を可視化する蛍光センサーとの融合が考えられる。蛍光センサーを細胞内のさまざまなオルガネラに局在させることで、蛍光センサー分子の拡散の陰に隠れていた空間的な情報が現れる可能性がある。超解像イメージングと組み合わせれば、さらに詳細な解析も可能になるだろう。そのためには、ラベル化プローブに細胞膜透過性を持たせたり、細胞内での非特異吸着を防ぐような分子設計戦略が重要となる。すでに多くの機能性化合物の細胞内での挙動などが個別に調べられてはいるが、網羅的に構造機能相関が検証された例はほとんどなく、それらの再検証により新たな設計戦略が生まれる可能性がある。

また、注目技術となっている「オプトジェネティクス」のように光を用いた機能制御への応用も期待される。タンパク質機能の光制御はオプトジェネティクス以前から行われてはいたが、光学系の著しい進歩により多様な実験系のデザインが可能になってきており、今後ますます注目されるようになるだろう。このような生体機能制御技術の発展に、タンパク質ラベル化技術は非常に重要な役割を果たすと予想している。

謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻の菊地和也教授、堀雄一郎助教、ならびに多くの学生達との共同研究の成果であり、全ての関係者に厚く御礼申し上げる。

文 献

- Miyawaki, A. (2003) *Dev. Cell*, 4, 295-305.
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Ed., Springer.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R.Y. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450.
- de Silva, A.P., Gunaratne, H.Q.N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A.J.M., McCoy, C.P., Rademacher, J.T., & Rice, T.E. (1997) *Chem. Rev.*, 97, 1515-1566.
- Griffin, B.A., Adams, S.R., & Tsien, R.Y. (1998) *Science*, 281, 269-272.
- Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohana, R.F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klauert, D.H., Bulleit, R.R., & Wood, K.V. (2008) *ACS Chem. Biol.*, 3, 373-382.
- Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., & Johnsson, K. (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21, 86-89.
- Chen, I., Howarth, M., Lin, W., & Ting, A.Y. (2005) *Nat. Methods*, 2, 99-104.
- Lin, C.-W., & Ting, A.Y. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 4542-4543.
- Mizukami, S., Hori, Y., & Kikuchi, K. (2014) *Acc. Chem. Res.* 47, 247-256.
- Matagne, A., Lammote-Blasseur, J., & Frere, J.M. (1998) *Biochem. J.*, 330, 581-598.
- Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., & Kikuchi, K. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5016-5017.
- Watanabe, S., Mizukami, S., Hori, Y., & Kikuchi, K. (2010) *Bioconjug. Chem.*, 21, 2320-2326.
- Watanabe, S., Mizukami, S., Akimoto, Y., Hori, Y., & Kikuchi, K. (2011) *Chem. Eur. J.*, 17, 8342-8349.
- Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y., & Kikuchi, K. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1623-1629.
- Yoshimura, A., Mizukami, S., Hori, Y., Watanabe, S., & Kikuchi, K. (2011) *ChemBioChem*, 12, 1031-1034.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., & Leonhardt, H. (2010) *J. Cell. Biol.*, 190, 165-175.

- 18) Wombacher, R., Heidbreder, M., van de Linde, S., Sheetz, M. P., Heilemann, M., Cornish, V.W., & Sauer, M. (2010) *Nat. Methods*, **7**, 717–719.
- 19) Rutkowska, A., & Schultz, C. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 8166–8176.
- 20) Czlapinski, J.L., Schelle, M.W., Miller, L.W., Laughlin, S.T., Kohler, J.J., Cornish, V.W., & Bertozzi, C.R. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13186–13187.
- 21) Neklesa, T.K., Tae, H.S., Schneekloth, A.R., Stulberg, M.J., Corson, T.W., Sundberg, T.B., Raina, K., Holley, S.A., Crews, C.M. (2011) *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 538–543.

著者寸描

●**水上 進** (みずかみ しん)

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻准教授。博士（薬学）。

■**略歴** 1974年東京都に生る。97年東京大学薬学部卒業。2002年同大学院薬学系研究科博士課程修了。（独）産業技術総合研究所、スタンフォード大学におけるポスドクを経て、05年大阪大学大学院工学研究科助手。09年より現職。

■**研究テーマと抱負** 主な研究テーマは生物有機化学を基にしたイメージング技術の開発。先端光科学と有機・無機化学を融合した新技術を開発し、医学・生物学の発展に貢献したい。