

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02879

研究課題名（和文）蛍光制御技術が解き明かす代謝関連タンパク質の動態応答メカニズム

研究課題名（英文）Fluorescence-regulating techniques reveal translocation mechanisms of metabolism-related proteins

研究代表者

堀 雄一郎（Hori, Yuichiro）

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：00444563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の局在変化や分解は細胞内代謝を制御する重要な役割を果たしている。タンパク質分解の既存の検出法は、タンパク質合成阻害剤を添加してウエスタンブロットを行うものであるが、細胞全体のタンパク質合成に影響を及ぼす。この問題を解決すべく、本研究では、タンパク質をラベル化すると蛍光性となり、分解されると蛍光が抑制されるOFF-ON-OFF蛍光プローブを開発し、代謝関連タンパク質の分解を可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝に関わるタンパク質には、栄養状態の変化やストレスに応じて、細胞内局在や発現・分解量をダイナミックに変化させるものがある。その異常は癌や生活習慣病の原因となるため、タンパク質動態・分解の可視化は疾病治療の観点から極めて重要な課題である。一方、特にタンパク質の分解を検出する既存の技術には、タンパク質合成阻害剤を使用するなど不十分な点が多い。本研究では、新たな化学原理に基づく蛍光プローブを開発することで、現在のタンパク質動態・分解可視化技術における問題を解決し、代謝に関するタンパク質の動態研究や、代謝異常に伴う疾病に関する医療研究に有用なツールと知見を与える。

研究成果の概要（英文）：Protein localization changes and degradation play an important role in regulating cellular metabolism. Existing detection methods for protein degradation involve Western blotting with the addition of protein synthesis inhibitors, which affect whole protein synthesis throughout the cell. To solve this problem, we developed OFF-ON-OFF fluorescent probes, which become fluorescent when protein is labeled and suppress fluorescence upon degradation, to visualize the degradation of metabolism-related proteins.

研究分野：ケミカルバイオロジー・蛍光イメージング

キーワード：蛍光プローブ タンパク質の分解

### 1. 研究開始当初の背景

代謝に関わるタンパク質には、栄養状態の変化やストレスに応じて、細胞内局在や発現・分解量をダイナミックに変化させるものがある。その異常は癌や生活習慣病の原因となるため、タンパク質動態の可視化は疾病治療の観点から極めて重要な課題である。例えば、グルコース輸送体の一種である GLUT4 は、空腹時では、細胞内の貯蔵小胞に主に存在するのに対し、食事摂取によりインスリンが分泌されインスリン受容体に結合すると、そのシグナルがトリガーとなり、GLUT4 は細胞膜に移行する。その結果、GLUT4 は、グルコースを細胞内に取り込み、血糖値を低下させる。この細胞膜移行が障害されると高血糖状態が続くこととなり、2 型糖尿病の症状を示すこととなる。また、我々の最近の研究では、GLUT4 に本来結合している糖鎖が欠損すると、GLUT4 は、インスリン刺激時においても、細胞膜に留まらず、細胞内小胞における局在が優勢になるほか、一部は ER よりリソソームに移行し分解されることを示唆するデータが得られている<sup>1</sup>。このように、タンパク質の動態や分解を明らかにすることは、そのタンパク質の制御機構や疾病の理解に繋がる。

タンパク質の分解を検出する代表的な手法としては、タンパク質合成阻害剤を添加し、タンパク質合成を止めたうえで、ウエスタンブロットでタンパク質の量をモニタリングする手法がとられる。タンパク質合成阻害剤を添加するのは、タンパク質分解と合成が同時に起こり、分解のみを選択的にみることができないためである。一方、この手法では、細胞全体のタンパク質合成が止まるため、細胞毒性の影響が生じることや目的タンパク質のみの発現を止めることもできない。このため、タンパク質合成阻害剤を用いることなく、タンパク質の局在や分解を可視化する新たな技術の開発が強く求められている。

これまでに、我々は、タグタンパク質である PYP (Photoactive yellow protein) とその特異的蛍光プローブを利用したタンパク質ラベル化法を開発してきた<sup>2</sup>。PYP タグは、細菌由来の小タンパク質であり、プローブと共有結合する。本手法の利点は、タグのサイズ (14 kDa) が小さく、遊離状態では非蛍光性で、PYP タグをラベル化すると初めて蛍光性となる「発蛍光プローブ」を利用できることである。この結果、これまでに迅速・高コントラストなタンパク質の可視化に成功してきた。また、タンパク質の分解を可視化するために、タンパク質の分解とともに蛍光強度が低下するジメチルアミノクマリン型プローブの開発に成功している<sup>3</sup>。一方、このプローブは、タンパク質との結合が不安定であり、変異を導入しないと細胞内で PYP タグから解離し分解を識別できないことや、クマリン型であることから明るさにも問題があった。このため、複合体の安定性が高く、明るい色素を持つプローブの開発が課題となっていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光強度が高いものが多いキサンテン系色素を利用して、遊離状態では蛍光強度が低く、PYP タグをラベル化すると蛍光強度が上昇し、タンパク質が分解すると蛍光が再び抑制される OFF-ON-OFF プローブを開発する。また、PYP との複合体との安定性が高いとされるリガンドを用いたプローブ設計を行う。さらに、オルニチン代謝に関わり癌との関わりが示唆され、短寿命のタンパク質であるオルニチンデカルボキシラーゼを細胞内で可視化する。

### 3. 研究の方法

#### (1) プローブ分子の設計と開発

これまでの研究で、クマリンの 7 位にジメチルアミノ基がある場合、PYP タグの結合部位にある Glu46 のカルボキシ基との水素結合が効果的に形成されないことが示唆されている<sup>3</sup>。その結果、プローブと PYP タグの複合体の安定性が低くなり、プローブと PYP タグを繋ぐチオエステル結合が細胞内グルタチオンにより攻撃を受けやすくなるため、プローブが PYP タグから解離すると考えられた。一方、7 位の置換基がヒドロキシ基であるとグルタチオンによる攻撃は受けられないことが分かっている。そこで、目的とするプローブの PYP タグリガンド部位を 7-ヒドロ

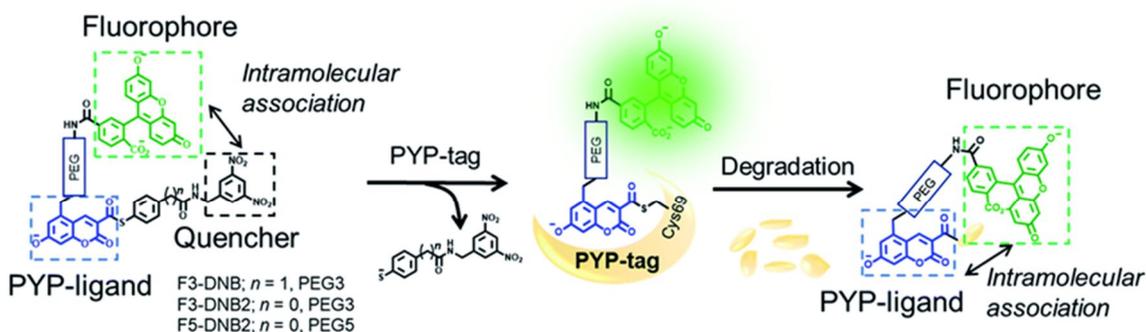


図 1. OFF-ON-OFF プローブの分子設計と蛍光制御機構。

キシクマリンとした (図 1)。

また、色素部位をモル吸光係数と蛍光量子収率が高く安価な色素であるフルオレセインとして、7-ヒドロキシクマリン型リガンドとフレキシブルな PEG リンカーで連結した。我々の以前の研究で、フルオレセインと 7-ヒドロキシクマリンをフレキシブルなリンカーで繋ぐと、これら 2 分子が会合し消光するとともに、PYP タグとのラベル化反応において、立体障害となり、ラベル化速度を大きく低下させる (24 時間以上) ことが分かっている。一方、PYP タグリガンドのチオエステルを介してジニトロベンゼンを繋いでおくと、色素部位がリガンド部位より優先的にジニトロベンゼン部位と相互作用し、蛍光消光を引き起こすと同時に、ラベル化速度を改善することができることが分かっている。そこで、本研究でも、7-ヒドロキシクマリン型リガンドにチオエステルを介してジニトロベンゼンを連結することで、フルオレセインは、ジニトロベンゼンの効果で消光し、ラベル化するとジニトロベンゼンが脱離するため蛍光を増大させ、しかもラベル化速度の低下を抑制できると考えた。また、タンパク質が分解すると、今度はリガンド部位が消光基となり、フルオレセインの蛍光を抑制できると考えた。

このとき、色素部位とリガンド部位の相互作用を抑制し、消光基の相互作用を最適化するために、色素部位とリガンド部位を繋ぐリンカーを *in silico* で複数デザインし、MacroModel を用いて conformational search を行い mimimization した。その結果、最適な相互作用を行うリンカーとして PEG5 が選ばれた。以上の設計方針に基づき、F5DNB2 が合成された。

## (2) PYP タグ変異体の設計とラベル化・イメージング実験

F5DNB2 は、水溶液中では 3 価のアニオンであるが、これまでの研究で、PYP タグが酸性タンパク質であるために、静電反発により、アニオン性分子とのラベル化速度は低くなることが分かっている。この問題を解決するために、PYP タグの反応速度に影響を与えるリガンド結合部位付近の 3 つの酸性アミノ酸をそれぞれ塩基性アミノ酸と中性アミノ酸に変異させた PYP3R と PYPNQN を用いることとして、F5-DNB2 とのラベル化反応と蛍光測定及び生細胞イメージング実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラベル化実験と蛍光測定

F5-DNB2 と PYP3R または PYPNQN と反応させ、蛍光強度を経時的に測定したところ、蛍光強度の上昇が確認できた (図 2a, b)。また、反応後に SDS-PAGE を実施すると、PYP タグのバンドから蛍光が観測されたことから、プローブは、それぞれのタンパク質を共有結合でラベル化できることが分かった (図 2c, d)。次に、ラベル化反応後に、トリプシンを添加すると蛍光強度が低下することが示された。SDS-PAGE を行ったところ、PYP タグの分子量の位置からバンドが消失していることが分かったことから、タンパク質の分解により、プローブの蛍光強度が低下していると考えられた。以上のことより、設計時に意図したとおり、遊離状態では蛍光が弱く、ラベル化反応により蛍光強度が上昇し、タンパク質の分解に伴い蛍光強度が低下する OFF-ON-OFF 型蛍光プローブが開発できたといえる。

### (2) イメージング実験

マウス由来オルニチンデカルボキシラーゼ MODC は、タンパク質発現後、比較的速やかに (ユビキチン非依存的にプロテアソームに分解される。一方、タンパク質合成阻害剤存在下で EGFP 融合 MODC の分解を調べた過去の研究によると、2 時間程度の短い半減期で速やかにタンパク質が分解されることが示されている<sup>4</sup>。このため、合成蛍光プローブとタグによるタンパク質ラベル化技術で MODC の分解を可視化するには、MODC が分解する前に迅速に MODC をラベル化し、その後蛍光強度の低下をモニタリングできる必要がある。

そこで、*in vitro* で検証したラベル化技術で半減期の短いタンパク質を可視化できるかを調べるために、PYPNQN を MODC の分解ドメインに融合させたタンパク質に核局在化シグナルをつけた HA-PYPNQN-MODC<sup>422-461</sup>-NLS (HA はエピトープタグ) を細胞核に発現させた。コントロール実験として、MODC を融合させていない HA-PYPNQN-NLS も別途発現させた細胞も準備した。F5-DNB2 をこれらの発現細胞に添加し、共焦点顕微鏡でイメージングを行った。

プローブを添加して遊離のプローブを除去し、イメージング実験を行ったところ、それぞれの

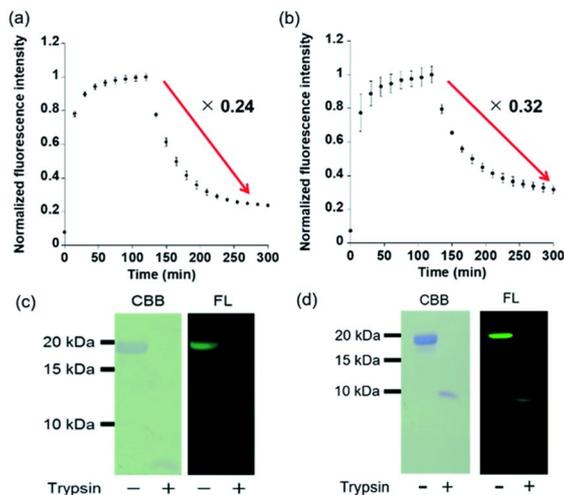


図 2. F5-DNB2 の OFF-ON-OFF 応答。(a, b) F5-DNB2 と (a) PYP3R または (b) PYPNQN を反応させ、トリプシンを添加した時の蛍光強度の経時変化。(c, d) F5-DNB2 と (c) PYP3R または (d) PYPNQN を反応後、トリプシン処理/未処理の試料の SDS-PAGE の結果。

遺伝子を発現させた細胞核から蛍光が観測された。この結果から、F5-DNB2により、HA-PYPNQN-MODC<sup>422-461</sup>-NLS は分解される前に、ラベル化されていることが分かった。また、既存のクマリン型プローブを用いて、比較したところ、色素をフルオレセインとしたF5-DNB2でラベル化した方が、明るくイメージングできることが分かった。

次に、タイムラプスイメージングにより、分解を可視化することができるかを検証したところ、HA-PYPNQN-MODC<sup>422-461</sup>-NLS 発現細胞では、迅速に蛍光が減弱したのに対し、コントロールの HA-PYPNQN-NLS 発現細胞では、蛍光は 180 min 経過後に一定程度低下したものの、明確に観測された。また、タンパク質合成阻害剤を用いて従来型のウェスタンブロットの方法でタンパク質分解を検出したところ、PYPNQN-MODC<sup>422-461</sup>-NLS の分解が確認された。さらに、PYPNQN-MODC<sup>422-461</sup>-NLS 発現細胞から観測された蛍光の強度を定量化して、タンパク質の半減期を推定したところ、107 min 程度であり、前述した半減期と同等の結果が得られた。

以上のように、本技術を用いることで、半減期の短い不安定なタンパク質でも、その分解を定量的に可視化できることが示された<sup>5</sup>。また、課題であったイメージング時の明るさの問題は解決され、安定化変異を入れることなく複合体の安定性が向上したと考えられる。

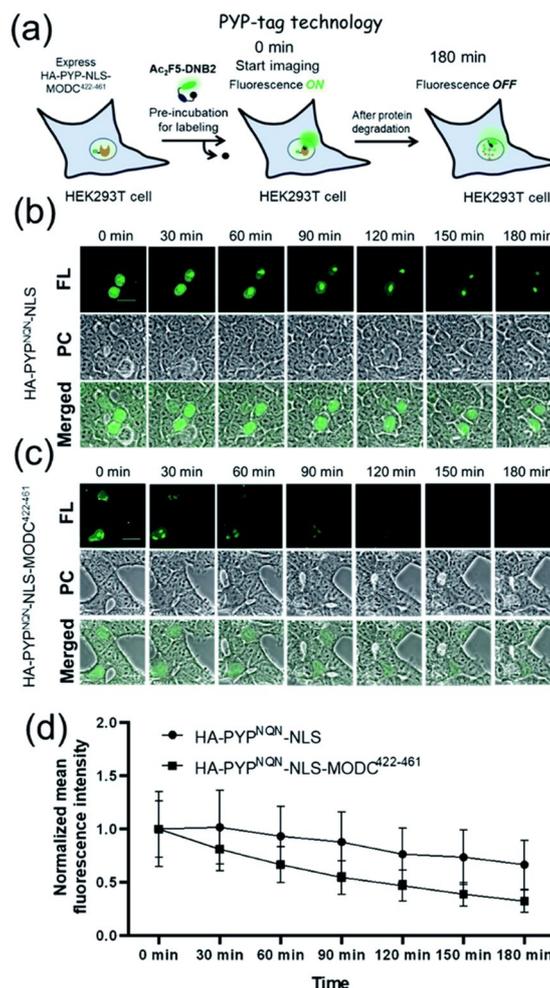


図 3. F5-DNB2 による MODC の分解イメージング。(a) イメージングの手順。(b) HA-PYPNQN-NLS と(c) PYPNQN-MODC<sup>422-461</sup>-NLS のタイムラプスイメージング。(d) イメージングの定量結果。

#### < 引用文献 >

1. Nishiura M, Hori Y, Umeno M, Kikuchi K. Visualization of multiple localizations of GLUT4 by fluorescent probes of PYP-tag with designed unnatural warhead. *Chem Sci*. 2023 May 15;14(22):5925-5935. doi: 10.1039/d3sc00724c.
2. Kumar N, Hori Y, Kikuchi K. Photoactive yellow protein and its chemical probes: an approach to protein labelling in living cells. *J Biochem*. 2019 Aug 1;166(2):121-127. doi: 10.1093/jb/mvz051.
3. Gao J, Hori Y, Takeuchi O, Kikuchi K. Live-Cell Imaging of Protein Degradation Utilizing Designed Protein-Tag Mutant and Fluorescent Probe with Turn-Off Switch. *Bioconjug Chem*. 2020 Mar 18;31(3):577-583. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00696.
4. Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*. 1998 Dec 25;273(52):34970-5. doi: 10.1074/jbc.273.52.34970.
5. Reja SI, Hori Y, Kamikawa T, Yamasaki K, Nishiura M, Bull SD, Kikuchi K. An "OFF-ON-OFF" fluorescence protein-labeling probe for real-time visualization of the degradation of short-lived proteins in cellular systems. *Chem Sci*. 2022 Jan 11;13(5):1419-1427. doi: 10.1039/d1sc06274c.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Reja Shahi Imam, Hori Yuichiro, Kamikawa Takuya, Yamasaki Kohei, Nishiura Miyako, Bull Steven D., Kikuchi Kazuya	4. 巻 13
2. 論文標題 An "OFF-ON-OFF" fluorescence protein-labeling probe for real-time visualization of the degradation of short-lived proteins in cellular systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1419 ~ 1427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1sc06274c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Torii Kenji, Benson Sam, Hori Yuichiro, Vendrell Marc, Kikuchi Kazuya	4. 巻 15
2. 論文標題 No-wash fluorogenic labeling of proteins for reversible photoswitching in live cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1393 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3sc04953a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishiura Miyako, Hori Yuichiro, Umeno Maho, Kikuchi Kazuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Visualization of multiple localizations of GLUT4 by fluorescent probes of PYP-tag with designed unnatural warhead	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 5925 ~ 5935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3sc00724c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Torii Kenji, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 95
2. 論文標題 Persistent Fluorescence Switching of a Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 8834 ~ 8841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c00163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Tao Tomomi, Baba Reisuke, Bull Steven D., Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Fluorogenic probes for detecting deacylase and demethylase activity towards post-translationally-modified lysine residues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0sc06551j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamikawa Takuya, Hashimoto Akari, Yamazaki Nozomi, Adachi Junya, Matsushima Ayami, Kikuchi Kazuya, Hori Yuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Bioisostere-conjugated fluorescent probes for live-cell protein imaging without non-specific organelle accumulation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3SC06957E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Fluorescence Imaging of Endogenous Biomolecules Using Fluorogen/Protein Hybrid Probes
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichiro Hori, Miyako Nishiura, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Fluorescent Labeling Probes that Selectively Recognize Intracellular/Cell-Surface Proteins
3. 学会等名 AIMECS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Fluorescence Imaging of Endogenous Biomolecules Using Fluorogen/Protein Hybrid Probes
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichiro Hori, Miyako Nishiura, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Fluorescent Labeling Probes that Selectively Recognize Intracellular/Cell-Surface Proteins
3. 学会等名 AIMECS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西浦 美也子  (Nishiura Miyako)		
研究協力者	レジャ シャヒ  (Reja Shahi)		
研究協力者	上川 拓也  (Kamikawa Takuya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鳥井 健司  (Torii Kenji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Bath University			
英国	The University of Edinburgh			