

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656518

研究課題名（和文） 酵素標識後に蛍光を発するスプリット蛍光タグの開発

研究課題名（英文） Turn-on split fluorescent tag responding to enzymatic ligation

研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：80398106

研究成果の概要（和文）：酵素を用いてタンパク質へ特異的に標識可能であり、また、標識して初めて蛍光を発するようなタグ配列-蛍光ラベル化剤のペアの開発を行った。その結果、ソルターゼによる特異的な連結反応後に 2.6 倍に蛍光が増大するペアを創製できた。そこで、細胞内での標識を可能にするため、細胞外で発現精製した連鎖球菌由来ソルターゼ A を細胞内に導入して連結反応を行う方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：The labeling method consisting of a peptide tag and a fluorescent dye which can specifically label a target protein and turn on the fluorescence after labeling was developed. We found the pair of tag sequences and a dye which fluorescent intensities were increased 2.6 times after specific labeling via sortase-mediated ligation. Furthermore, to enable intracellular labeling, a method for intracellular specific ligation was successfully developed by transducing *Streptococcus pyogenes* sortase A into living mammalian cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：蛍光標識、酵素、動物細胞、タンパク質、ペプチド、スプリットタグ、細胞内導入、ターンオンプローブ

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の蛍光標識技術は、生細胞内でのタンパク質の動態や相互作用を非侵襲的に可視化できるため、生命現象や疾患の機構解明に大いに貢献し、創薬などへの応用も期待されている。現在最も一般的な標識法は、蛍光タンパク質を対象タンパク質に融合して発現させる方法であるが、サイズの大きな蛍光タンパク質の融合は、対象タンパク質の生理活性や立体構造、局在に影響を与えるという問題点がある。

そこで、近年、蛍光小分子を用いた翻訳後標識法が盛んに研究されている。しかし、蛍光小分子とタグ配列との結合特異性は低く、

夾雑タンパク質が高濃度に存在する細胞内では他のタンパク質をも標識してしまい使えない。また、生細胞内では、タグと未結合の蛍光小分子が除去できないため、バックグラウンドの蛍光が大きく、対象タンパク質の可視化は困難である。そこで、特異性が高く、バックグラウンド蛍光の小さいタンパク質蛍光標識技術が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、酵素を用いて特異的に標識が可能であり、また、標識されて初めて蛍光を発するようなタグ配列-蛍光ラベル化剤ペアの開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) スプリットタグの設計

酵素による標識後に蛍光を発するようにするため、標識前後で蛍光団の環境が大きく変化する必要がある。そこで、酵素による連結後に自発的にジッパーモチーフを形成するタグ配列を用いて、標識前後で蛍光色素と消光ユニットとの相互作用を変化させることを試みた。具体的には、既報に従い、酵素としてペプチド連結酵素ソルターゼ A (sortase A: SrtA) を用いて、連結後にトリプトファンジッパー構造を形成するようなタグを用いた (図 1)。

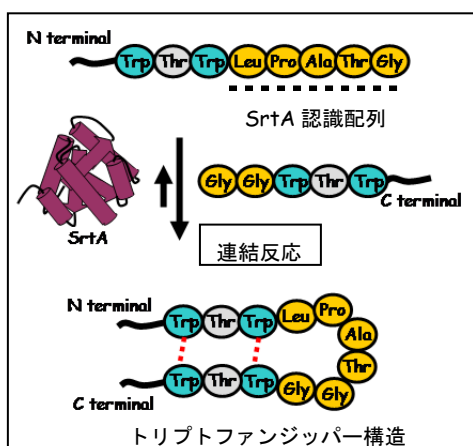


図 1 SrtA 反応後にジッパー構造を形成するタグ配列

蛍光色素を一時的に消光させるユニットとして、トリプトファン(Trp)残基を考えた。近年、Trp 残基を含むペプチドに修飾した蛍光色素は、Trp 残基と分子内で相互作用して消光されることが報告された。そこで、蛍光色素と相互作用して消光させているラベル化剤上の Trp 残基が、標識後にタグ配列上の Trp 残基と自発的にトリプトファンジッパーモチーフを形成して蛍光色素との相互作用を解消するような設計を考案した (図 2)。

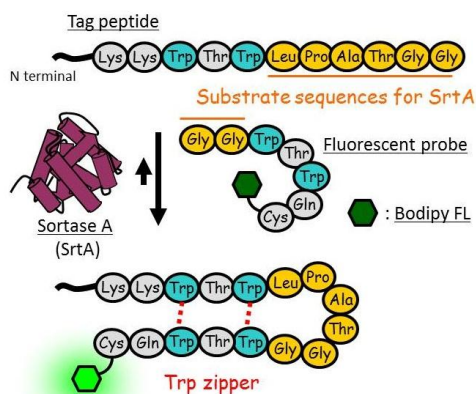


図 2 SrtA 反応に伴うジッパー構造形成により消光が解消されるタグの概念図

(2) スプリット蛍光タグの機能評価

蛍光色素として BODIPY FL (BFL) を修飾した種々のラベル化剤ペプチドを合成し、Trp を含むペプチドへの修飾による BFL の消光を確認した。同時に、SrtA によるタグ配列との連結後にできる蛍光標識ペプチドの蛍光も測定し、連結反応によって蛍光が増加する配列を探索した。

探索したタグ配列-ラベル化剤ペプチドペアの混合溶液に、大腸菌を用いて発現後精製した SrtA を加えて、酵素反応による蛍光の増加を調べた。また、同時に、高性能液体クロマトグラフィーシステム (HPLC) を用いた解析によって連結効率を調べ、連結後のジッパー構造の形成は円二色性 (CD) スペクトル測定により行った。

(3) 細胞内への SrtA の導入と連結反応

動物細胞内と同じレベルの低カルシウムイオン濃度でも活性を有する連鎖球菌由来の SrtA (SpSrtA) を発現・精製し、細胞内への導入を試みた。細胞膜透過性ペプチド(Cell Penetrating Peptide: CPP)を SpSrtA に融合させたり、脱エンドソーム活性を付与するためにラジカル発生色素を用いた光誘導型細胞導入法を用いたり、市販のタンパク質導入剤を利用したりした。細胞内でのペプチド連結反応は、緑色蛍光タンパク質 (Enhanced green fluorescent protein: EGFP) の N 末端と C 末端にそれぞれ二つの SrtA 認識配列を融合した基質 EGFP の環状化反応を検出することによって行った。HEK293T 細胞に、基質 EGFP 発現プラスミドをリポフェクション法によって導入して 1 日間基質 EGFP を発現させた後、SpSrtA を導入して環状化反応を行った。環状化反応の検出は、細胞ライセートのウエスタンブロットニングにより行った。

4. 研究成果

(1) スプリット蛍光タグの探索

SrtA 反応後にトリプトファンジッパー構造を形成する数 10 種類のペプチド、および、それに対応するラベル化剤に BFL を修飾し、それぞれの蛍光スペクトルを種々の濃度で測定した。その結果、以下の配列のペアで、ラベル化剤よりもラベル化剤にタグ配列がついたペプチドの方の蛍光が大きかった。

ペア 1

ラベル化剤 (no. QE-BFL) :

GGWTWQEC(BFL)

タグ-ラベル化剤 (no. Tag-QE-BFL)

KKWTWLPATGGWTWQEC(BFL)

(下線がタグ配列)

ペア 2

ラベル化剤 (no. Q-BFL) :

GGWTWQC(BFL)
 タグ-ラベル化剤 (no. **Tag-Q-BFL**)
 KKWTWLPATGGWTWQC(BFL)
 (下線がタグ配列)

ペア 3
 ラベル化剤 (no. **E-BFL**) :
 GGWTWEC(BFL)
 タグ-ラベル化剤 (no. **Tag-E-BFL**)
 KKWTWLPATGGWTWEC(BFL)
 (下線がタグ配列)

BFL 由来の最大蛍光波長 513 nm の蛍光強度を各ペプチド濃度でプロットしたところ、明らかにラベル化剤よりも蛍光強度の上昇が確認された (図 3, 4)。

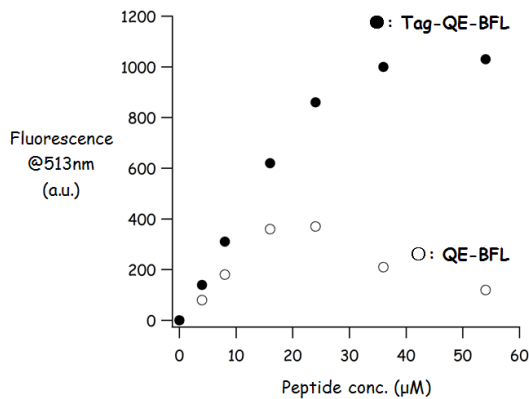


図 3 種々の濃度における QE-BFL と Tag-QE-BFL ペプチドの蛍光強度

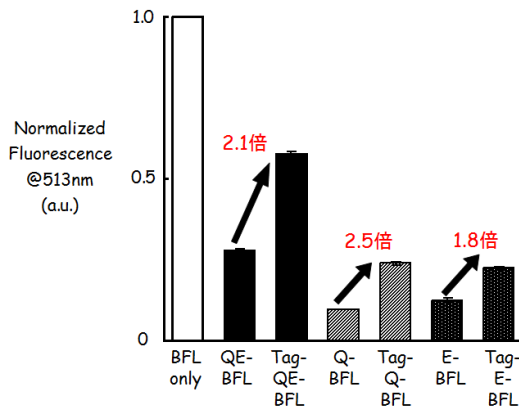


図 4 スクリーニングされた三つのペアの蛍光強度変化の比較

(2) スプリット蛍光タグの評価

タグ配列 (KKWTWLPATGG, 165 μM) とラベル化剤 (QE-BFL, Q-BFL, E-BFL, 10 μM) との混合水溶液に SrtA を添加し、2.5 時間後に HPLC によって連結反応の進行を評価した。その結果、ラベル化剤のピークが完全に消失し、連結産物のピークが検出された。これより、連結反応の進行を確認した。次に、SrtA 添加前と 2.5 時間後の蛍光スペクトルを測定

したところ、ラベル化剤として **QE-BFL** を用いた場合、連結反応に伴う蛍光の増大が確認された (図 5)。一方で、他の二つのラベル化剤では、増大がわずかであった (1.2 倍程度)。これより、**QE-BFL** をラベル化剤とした場合が最適であった。

このように、SrtA による連結反応によって標識され、標識されることによって蛍光が増大する Turn-on 型のスプリット蛍光タグの開発に成功した。

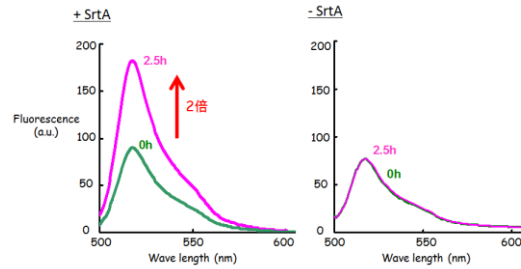


図 5 SrtA の添加/無添加時のタグペプチドと QE-BFL との混合溶液の蛍光測定結果

本研究で開発した上記のスプリット蛍光タグについて、そのメカニズムを調べた。まず、ラベル化剤の消光メカニズムについて調べるために、ラベル化剤のペプチド配列中の Trp 残基をアラニン残基に置換するコントロール実験を行った。その結果、Trp 残基の数が多いほど、また、BFL を修飾しているシステイン残基から Trp 残基までの距離が近いほど強く消光されることが示され、BFL と Trp 側鎖との相互作用によって消光されていることが強く示唆された。

次に、タグとラベル化剤との連結産物の円偏光 CD スペクトルを測定したところ、トリプトファンジッパー構造に特徴的な正負のコットンピークが確認され、設計通りに標識連結後にトリプトファンジッパー構造を形成していることが示された。さらに、BFL の吸収波長領域である近紫外・可視の CD スペクトルを測定したところ、ラベル化剤のみでは正のコットンピークが見られる一方、連結産物ではこの領域にピークが観察されなかった。この結果は、ラベル化剤上では BFL 分子が Trp 側鎖との相互作用によって固定化されているため左右の偏光の吸収に差が生じたが、連結後は BFL と Trp 側鎖との相互作用が解消して BFL が自由回転できるようになったためであると考えられる。

このように、設計通りのメカニズムで消光および蛍光の増加が起こっていることが強く示唆された。現在、この研究成果については論文投稿準備中である。

(3) SpSrtA の細胞内導入と連結反応

細胞内での標識反応を実現するために、SpSrtA を細胞外から導入する方法を検討し

た。種々の検討の結果、市販のタンパク質細胞内導入試薬である Bioporter を用いた場合に、最も細胞内への導入量が多かった(図 6)。

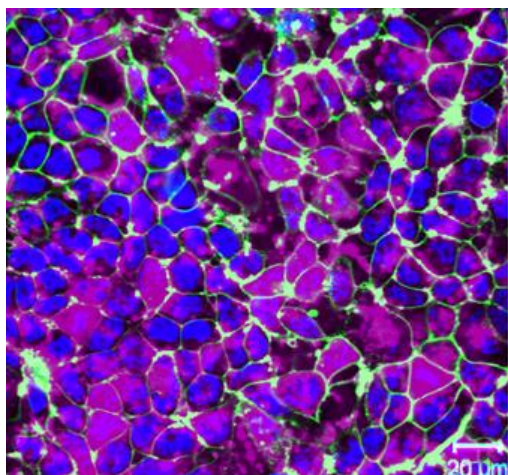


図 6 蛍光標識 SpSrtA を導入した細胞の共焦点顕微鏡画像 (紫色 : Alexa Fluor647 修飾 SpSrtA、青色 : 細胞核、緑色 : 細胞膜)

また、細胞内での連結反応を、基質 EGFP の環状化反応の進行によって評価したところ、SpSrtA の添加量および添加後の経過時間に応じて EGFP の環状化が進行することが確認された(図 7)。

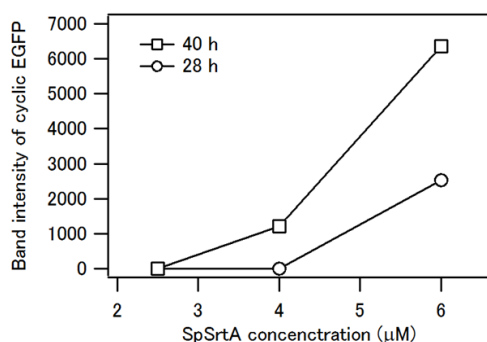


図 7 SpSrtA 導入細胞のライセートのウエスタブロットング解析における環状化 EGFP バンドの強度

このように、細胞内で SpSrtA を用いて特異的なペプチド連結反応を進行する方法を確立した。この方法では、ライバルグループが開発した SpSrtA の発現プラスミドを導入する方法に比べて、反応効率は悪いが、より精密な連結反応の時間的コントロールが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

J. Zhang, S. Yamaguchi, H. Hirakawa and T. Nagamune, "Intracellular protein cyclization catalyzed by exogenously transduced *Streptococcus pyogenes* sortase A", *J. Biosci. Bioeng.*, in press, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.03.006. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① J. Zhang, S. Yamaguchi, H. Hirakawa, T. Nagamune, "Intracellular protein cyclization catalyzed by streptococcus pyogenes sortase A through protein transduction", The 18th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2012), 徳島, 徳島大学, 2012 年 10 月.
- ② J. Zhang, S. Yamaguchi, S. Inoue, H. Hirakawa, T. Nagamune, "Enzymatic protein labeling using turn-on split fluorescent tag", 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Daegu, Korea, 2012 年 9 月.
- ③ 前田泰一, 山口哲志, 長棟輝行, 「光応答性分子修飾による蛋白質の細胞内局在制御」, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 札幌, 北海道大学, 2012 年 9 月.
- ④ 山口哲志, 井上紫織, 平川秀彦, 長棟輝行, 「酵素反応で turn-on するスプリット蛍光タグの開発」第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 札幌, 北海道大学, 2012 年 9 月.
- ⑤ Y. Maeda, S. Yamaguchi, W. Ishihara, H. Hirakawa, T. Nagamune, "Photo-assisted protein transduction into cytoplasm by modifying or mixing with fluorophore-conjugated poly-arginine peptides", The 17th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2011), Incheon, Korea, 2011 年 10 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師
研究者番号 : 80398106