

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26282215

研究課題名(和文)発蛍光プローブが拓く生体分子ダイナミクスイメージング

研究課題名(英文)Imaging biomolecular dynamics verified using fluorogenic probes

研究代表者

堀 雄一郎(Hori, Yuichiro)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：00444563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子を可視化することは、生きた細胞内で生命現象を解明する有用な方法となる。これまで、蛍光蛋白質を用いた方法で蛋白質の生細胞イメージングが行われてきた。本研究では、生体分子と結合して蛍光を発する発蛍光プローブを開発して、既存技術では限界のあった生命現象を可視化した。この発蛍光プローブを用いることで、蛋白質の動態、糖鎖の機能、及び核酸の化学修飾を生細胞で解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Imaging of biomolecules is a useful method to elucidate biological phenomena in living cells. So far, fluorescent proteins have been used for live-cell imaging of proteins. In this research, to overcome limitations of existing methods, we developed fluorogenic probes, which emit fluorescence upon binding to biomolecules. By using the fluorogenic probes, we succeeded in analyzing protein trafficking, glycan function, and chemical modification of nucleic acids.

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：発蛍光プローブ GLUT4 DNAメチル化 PYPタグ

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の蛍光ラベル化は、蛋白質の動態や機能を解明する技術として生命科学分野で汎用されている。今日、蛍光蛋白質を用いた手法が主流となっているが、蛍光蛋白質のサイズが大きいことや、蛍光団の成熟に時間を要することなどの問題が指摘されている。これに対し、合成蛍光プローブとタグ蛋白質を用いた蛋白質ラベル化法は、化学を基盤とした蛋白質の蛍光イメージング技術として大きく発展しつつある。この手法では、目的蛋白質に融合させたタグ蛋白質を合成蛍光プローブにより特異的にラベル化することで目的蛋白質を可視化することができる。我々は、タグ蛋白質として PYP (Photoactive yellow protein) に着目し、その特異的蛍光ラベル化プローブの開発を行ってきた。PYP タグは、紅色細菌由来の小蛋白質であり、桂皮酸/クマリン誘導体のリガンドに特異的に共有結合する。これまでに、化学原理を精査することで、遊離状態では非蛍光性で、PYP タグに結合したとき蛍光を発する「発蛍光プローブ」を開発し、PYP タグ融合蛋白質を生細胞において特異的にラベル化することに成功してきた。本技術では、非蛍光性の遊離プローブを洗浄除去することなく蛍光ラベル化した蛋白質を高い S/N 比で迅速にイメージングできる。特に、この技術の着目すべき点は、(1) タグのサイズが小さく (14 kDa)、蛍光蛋白質の半分であり、目的蛋白質への影響を最小化できること、(2) 生細胞内蛋白質を極めて短い時間でイメージングできること (1min で検出可)、(3) 蛍光以外の機能を有する分子をプローブに組み込むことである。これらの利点は蛍光蛋白質の欠点をカバーするものであり、本研究では、蛍光蛋白質では達成されていない生命現象の可視化を行った。

2. 研究の目的

(1) 合成蛍光プローブを用いた蛋白質動態の可視化

グルコース輸送体の一つである GLUT4 は、N 型糖鎖を細胞膜外ループに一つだけ持つ 12 回膜貫通型膜蛋白質である。GLUT4 は、インスリン刺激時に血中グルコースを細胞内に取り込み血糖値を低下させる重要な役割を果たしている。インスリン抵抗性 2 型糖尿病では、インスリン刺激時においても、GLUT4 が機能しないため、血糖値が低下しない。このため、糖尿病の発症機構解明や治療の観点から、GLUT4 のグルコース取り込み機構を明らかにすることは、生命科学・医学の重要な課題である。

これまでに、GLUT4 制御機構に関する多くの研究がなされており、それによると、GLUT4 は、通常は、細胞内の GLUT4 貯蔵小胞に大部分が存在するが、インスリン刺激時に細胞膜移行し、グルコースを細胞内に取り込むことが分かっている。一方、まだ明確になってい

なかったのが、GLUT4 の細胞内動態における N 型糖鎖の役割である。本研究では、GLUT4 の動態解析を行うために、PYP タグラベル化技術を応用し、マルチカラーで GLUT4 をラベル化するプローブを開発した。次に、このマルチカラー解析技術を用いて、GLUT4 の糖鎖の役割を明らかにした。

(2) ハイブリッドプローブによる DNA メチル化の可視化

DNA メチル化は、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる重要な化学修飾であり、その異常は癌化の原因となる。このため、その生細胞可視化技術は、DNA メチル化の生理的役割の解明に有用であると同時に、DNA のメチル化酵素を標的とした医薬品の評価ツールとしての応用が期待できる。既存の DNA メチル化生細胞解析法では、蛍光蛋白質とメチル化 DNA 結合蛋白質との融合蛋白質の局在を可視化する。しかしながら、標的 DNA に結合していない融合蛋白質からも蛍光が観測されるため、DNA メチル化部位を選択的に検出できない。そこで、本研究では、機能性小分子と PYP タグを生細胞内で集積させることによって、メチル化 DNA 部位に結合したときのみ蛍光を発するハイブリッドプローブを開発した。

3. 研究の方法

(1) 合成蛍光プローブを用いた蛋白質動態の可視化

プローブの合成

4-プロモ-3-メチルフェノールのヒドロキシ基をメトキシメチル基で保護後、N-プロモ-スクシンイミドで 3 位のメチル基をプロモ化し、Boc 保護したポリエチレングリコール鎖をリンカーとして繋ぎ PYP リガンドを得た。また、4-メルカプト安息香酸もしくは 4-メルカプトフェニル酢酸のチオールをトリチル基で保護後、(3,5-ジニトロフェニル)メタンアミンを縮合し、TFA で脱保護後、脱離基を得た。リガンドと脱離基を縮合し、TFA で脱保護後、TAMRA もしくは ATTO6655 を縮合し、プローブ TAMRA-DNB、TAMRA-DNB2、AT-DNB、AT-DNB2 を得た。

PYP タグと各プローブのラベル化反応

PYP タグと各プローブを HEPES 緩衝液中、37 °C で反応させ、SDS-PAGE もしくは蛍光分光光度計を用いて解析した。

生細胞イメージング実験

Lipofectamine3000 を用いて、HEK293T 細胞もしくは HeLa 細胞に遺伝子導入し、37 °C で培養後、顕微鏡観察を行った。GLUT4 発現細胞におけるインスリン添加実験では、血清入り DMEM 培地で細胞を培養後、Krebs-Ringer Bicarbonate 緩衝液でインキュベートし、インスリンとプローブを添加し、観察を行った。顕微鏡は、共焦点レーザー顕微鏡 FV10i を用

いて、405 nm、473 nm、559 nm、635 nm のそれぞれのレーザーにて励起し、観察を行った。

(2) ハイブリッドプローブによる DNA メチル化の可視化

ラベル化分子の合成

前述のプローブと同様に、PYP タグのリガンドを合成した。脱離基に関しては、4-ニトロフェニルメタンアミンとチオールを縮合して合成した。この脱離基とリガンドを縮合後、TFA で脱保護し、オキサゾールイエローと縮合し、YOCNB を得た。

PYP タグと YOCNB のラベル化反応

PYP タグと YOCNB を 25、HEPES 緩衝液中で反応させ、紫外・可視吸収分光光度計を用いて、ラベル化反応の進行を解析した。

DNA 結合実験

まず、PYP タグと YOCNB を反応させ、ハイブリッドプローブを創製した。このハイブリッドプローブとメチル化・非メチル化 DNA をそれぞれ 25、HEPES 緩衝液中で反応させた。反応混合物を非変性アクリルアミドゲルにロードし、電気泳動を行った後、SYBR Green I にて蛍光染色し、Typhoon FLA9500 にて画像化し解析した。

生細胞イメージング実験

Lipofectamine 3000 を用いて、NIH3T3 細胞に遺伝子導入を行い、MEM 培地、37 にて細胞培養を行った。YOCNB を細胞に添加 1 時間後に Hoechst33342 を添加し 15 分インキュベート後、共焦点レーザー顕微鏡 FV10i もしくは蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて、観測を行った。また、DNA メチル化の阻害実験では、トランスフェクションの 5 時間後に 5-AzadC を添加し、24 時間、37 にて培養後、YOCNB を添加し、解析を行った。細胞分裂の観測実験では、Fucci システムの hGeminin に mCherry を用い、細胞周期インジケータとして観測を行った。

4. 研究成果

(1) 合成蛍光プローブを用いた蛋白質動態の可視化

PYP タグを標識する長波長発蛍光プローブの開発

これまでに、FCANB を呼ぶ緑色蛍光を発する発蛍光 PYP タグプローブを開発している。このプローブは、リガンドである 4-ヒドロキシ桂皮酸、蛍光色素であるフルオレセイン、消光基であるニトロベンゼンから構成される。このフルオレセインの部分、より長波長の TAMRA 及び ATTO655 に変更した。また、これらの色素の蛍光を効率よく消光できる分子として、ジニトロベンゼンを見出した。このジニトロベンゼンを組み込んだ新規プローブを TAMRA-DNB 及び AT-DNB とした。更に、ジニトロベンゼンをリガンドとつないで

いるチオフェノールの pK_a を低下させるように改変したものを、それぞれ TMARA-DNB2 及び AT-DNB2 とした。これらのプローブと PYP タグを反応させると、すべてのプローブは、FCANB よりも高い二次速度定数を示した。また、すべてのプローブは、遊離状態では蛍光強度が弱く、PYP タグとの反応に伴い、蛍光強度を上昇させた。以上のことから、PYP タグを標識できる長波長発蛍光プローブの開発に成功した。

GLUT4 の動態解析技術の確立

まず、GLUT4 の膜外第一ループに PYP タグを挿入したコンストラクト PYP-GLUT4 を HeLa 細胞に発現させ、Krebs-Ringer Bicarbonate 緩衝液でインキュベート後に、インスリンと AT-DNB2 を添加した。その結果、細胞膜上から蛍光が観測され、20~30 分程度でその蛍光が飽和した。また、インスリンを培地から除去すると、その蛍光は細胞内に内在化していく様子が観測された。これらの結果は、PYP タグを融合した GLUT4 がインスリンに反応して正常に細胞内局在を変化させることを示している。

GLUT4 の糖鎖機能の解析

糖鎖の機能を解析するために、糖鎖生合成の阻害剤であるキフネンシンを用いた。まず、PYP-GLUT4 を細胞に発現させ、細胞膜透過性プローブである TAMRA-DNB を添加し、細胞中の PYP-GLUT4 をラベル化する。その後、洗浄操作により遊離の TAMRA-DNB を除去し、キフネンシンを添加した。この結果、キフネンシン添加後に新たに発現する PYP-GLUT4 は、異常糖鎖を持つことになる。キフネンシン添加後 1 日培養し、キフネンシンを洗浄除去し、インスリンと AT-DNB2 を添加し、新たに発現した異常糖鎖を持つ PYP-GLUT4 の動態を解析した。まず、TAMRA-DNB の蛍光がリソソームから観測されることが分かった。このことから、キフネンシン添加後、正常糖鎖を持つ PYP-GLUT4 の大部分は細胞膜移行せずリソソームに移行することが分かった。また、AT-DNB2 の蛍光に着目すると、キフネンシン非添加時と異なり、細胞膜から蛍光が観測されず、細胞内から蛍光が観測された。以上の結果から、異常糖鎖を持つ GLUT4 は、一旦細胞膜に移行し、膜に維持されることなく細胞内に内在化することが考えられた。そこで、実際に過渡的なエキソサイトーシスが起きていることを確かめるために、細胞を氷上に静置し、エンドサイトーシスを阻害したところ、細胞膜から蛍光が観測され、エキソサイトーシスが起きていることが判明した。同様の結果は、GLUT4 の糖鎖欠損変異体でも得られた。

以上より、GLUT4 の糖鎖は、インスリン刺激時に GLUT4 を細胞膜に留める役割を果たしていることが示された(図 1)。GLUT4 は、細胞膜上に維持されないと細胞外のグルコー

スを細胞内に取り込むことができない。このため、糖鎖は、GLUT4 の血中グルコースの低下において重要な役割を果たしていることが示唆された。

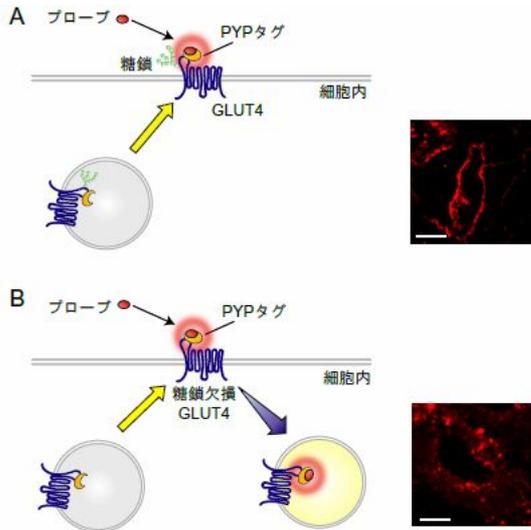


図1 . GLUT4 の細胞内移行と糖鎖の役割。

(2) ハイブリッドプローブによる DNA メチル化の可視化

メチル化 DNA を可視化する原理

PYP タグの 4-ヒドロキシ桂皮酸リガンドに PEG リンカーを介してオキサゾールイエローを繋いだ YOCNB を開発した。オキサゾールイエローは、DNA に結合すると蛍光を発する色素である。一方、DNA 結合親和性が低いため、低濃度では、DNA に対してほとんど結合しない。メチル化 DNA 結合ドメインである MBD を PYP タグ (PYP タグ変異体 PYP3R を使用) を融合させ (PYP3R-MBD)、YOCNB でラベル化する。この状態では、オキサゾールイエローはほとんど蛍光を発さない。一方、MBD がメチル化 DNA に結合すると、オキサゾールイエローが DNA 近傍に配置される。その結果、近接効果が作用し、オキサゾールイエローが DNA に安定的に結合し、蛍光を発すると考えた。

ハイブリッドプローブによるメチル化 DNA への結合

まず、YOCNB が PYP3R をラベル化できるかを検証した。YOCNB の PYP タグリガンド部位である 4-ヒドロキシ桂皮酸は、PYP タグに結合すると、450 nm 付近の吸光度が増大することが知られている。そこで、YOCNB と PYP3R-MBD を反応させ、紫外・可視吸収分光光度計により、吸収スペクトルの測定を行った。その結果、450 nm 付近の吸光度が上昇したことから、YOCNB と PYP3R-MBD は結合し、合成分子と蛋白質からなるハイブリッドプローブができていることが示された。

次に、ハイブリッドプローブとメチル化 DNA 及び非メチル化 DNA を反応させ、ゲルシフト法により解析を行った。非メチル化 DNA

と反応させたときは、DNA との結合がほとんど確認されなかったのに対し、メチル化 DNA と反応させた時、複合体形成を示すバンドが確認された。このことから、ハイブリッドプローブは、選択的にメチル化 DNA を認識し結合することが示された。

更に、ハイブリッドプローブがメチル化 DNA に結合したときの蛍光強度を蛍光分光光度計により検証した。YOCNB 単独のときは、非蛍光性であり、DNA 非存在下及び非メチル化 DNA 存在下のハイブリッドプローブは、低い蛍光強度しか示さなかった。これに対し、メチル化 DNA 存在下におけるハイブリッドプローブは、大きく蛍光強度を上昇させることが示された。以上の結果をまとめると、ハイブリッドプローブは、選択的にメチル化 DNA に結合し、蛍光強度を上昇させることが示された。

メチル化 DNA の生細胞イメージング

PYP3R-MBD と PYP3R の遺伝子及び Empty vector を細胞内に導入し培養後、YOCNB を添加し、共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光イメージングを行った。その結果、PYP3R-MBD 発現細胞の核内から複数の蛍光輝点を確認された。これに対し、PYP3R 発現細胞及び Empty vector からは細胞核内からそのような蛍光輝点は確認されなかった。更に、PYP3R-MBD の遺伝子をトランスフェクションした細胞を DNA メチル化阻害剤である 5-AzadC により処置し、生細胞イメージングを行ったところ、細胞核内の蛍光が消失した。細胞核内の蛍光は、5-AzadC の濃度に依存して減弱することも分かった。以上の結果から、YOCNB は PYP3R-MBD と細胞内で結合しハイブリッドプローブを形成し、メチル化 DNA に結合することで蛍光を発していると考えられた (図 2)。

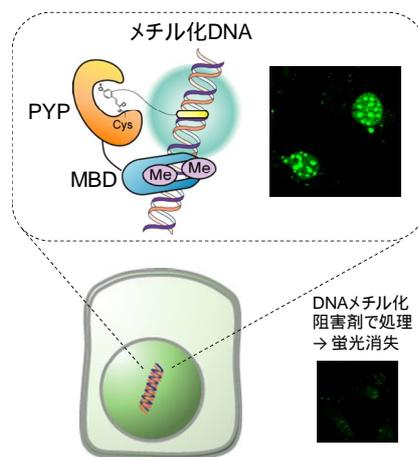


図2 . ハイブリッドプローブによるメチル化 DNA の生細胞イメージング。

更に、上記のハイブリッドプローブ含有細胞を長時間観測すると、細胞分裂が観測された。細胞核内の蛍光は、はじめは複数の輝点が観測されたが、時間の経過とともに、細胞

中心部で凝縮し、分離していく様子が観測された。このことから、細胞分裂中のメチル化 DNA が検出できたといえる。

以上の結果から、合成分子と蛋白質を組み合わせることで、内在性メチル化 DNA を生細胞で検出することに成功し、長時間観測することも可能であることを示した。本研究成果は、エピジェネティクスの新たな研究ツールを提供するとともに、内在性生体分子のイメージングの新しい原理を提示したといえる。

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12件)

- Hori, Y., Otomura, N., Nishida, A., Nishiura, M., Umeno, M., Suetake, I., Kikuchi, K. Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 1686-1690 (2018)
DOI:10.1021/jacs.7b09713
- Hori, Y., Hirayama, S., Kikuchi, K. Development of Cyanine Probes with Dinitrobenzene Quencher for Rapid Fluorogenic Protein Labeling. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* 375(2107). pii: 20170018 (2017)
DOI:10.1098/rsta.2017.0018
- 堀 雄一郎、菊地 和也 「生細胞でのタンパク質蛍光標識技術の開発と糖鎖機能の解明」, *生体の科学*, 68, 2-3 (2017)
- 堀 雄一郎、菊地 和也 「GLUT4 の細胞内動態を可視化する化学アプローチで明らかとなった糖鎖の役割」, *化学と生物*, 55, 659-660 (2017)
- 堀 雄一郎、菊地 和也 「ケミカルバイオロジーと分子イメージング」, *感染・炎症・免疫*, 47, 48-57 (2017)
- Hirayama, S., Hori, Y., Benedek, Z., Suzuki, T., Kikuchi, K. "Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-Glycosylation in Intracellular Trafficking" *Nat. Chem. Biol.* 12, 853-859 (2016) DOI:10.1038/nchembio
- Kamikawa, Y., Hori, Y., Yamashita, K., Jin, L., Hirayama, S., Standley, D. M., Kikuchi, K. "Design of a Protein Tag and Fluorogenic Probe with Modular Structure for Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", *Chem. Sci.* 7, 308-314 (2016) DOI: 10.1039/C5SC02351C
- Hori, Y., Hirayama, S., Sato, M., Kikuchi, K. "Redesign of a Fluorogenic Labeling System to Improve Surface Charge, Brightness, and

Binding Kinetics for Imaging the Functional Localization of Bromodomains", *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 14368-14371 (2015) DOI: 10.1002/anie.201506935

Baba, R., Hori, Y., Kikuchi, K. "Intramolecular Long-Distance Nucleophilic Reactions as a Rapid Fluorogenic Switch Applicable to the Detection of Enzymatic Activity.", *Chem. Eur. J.* 21, 4695-4702 (2015) DOI: 堀 雄一郎、菊地 和也 「ヒストンデアセチラーゼ活性を検出する発蛍光プローブの開発」, *薬学雑誌*, 135, 23-29 (2015) DOI: 10.1248/yakushi.14-00202-3

堀 雄一郎、菊地 和也 「ヒストン脱アセチル化酵素の活性を検出する化学プローブの開発」, *生体の科学*, 65, 559-564 (2014)

堀 雄一郎、菊地 和也 「PYP タグと発蛍光プローブを用いた生細胞タンパク質イメージング法の開発と応用」, *バイオサイエンスとインダストリー「トピックス」*, 72, 203-231 (2014)

[学会発表](計50件)

- Hori, Y. "Chemical Probes with Fluorogenic Switch for Imaging Modified Protein and DNA", ISBC2017 The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry, Uji, Japan, Dec. 14-16 (2017) (招待講演)
- 堀 雄一郎 「合成分子と蛋白質を駆使した生体分子イメージング」, サントリー生有研シンポジウム, 京都, 2017年11月28日 (招待講演)
- Hori, Y., Hirayama, H., Benedek, Z., Suzuki, T., Kikuchi, K. "Development of Multicolor Fluorogenic Probes for Elucidating Role of GLUT4 N-Glycan in Intracellular Trafficking", 2017 KSMI-FASMI Joint Conference, Seoul, Korea, Aug. 26 (2017) (招待講演)
- 堀 雄一郎 「蛋白質ラベル化技術を利用した糖鎖機能の可視化」, 日本薬学会第137年会シンポジウム, 仙台, 2017年3月25日 (招待講演)
- Hori, Y. "Chemical probes with fluorogenic switches for visualizing modified protein and DNA", BSJ-BSC Joint Symposium at the 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (BSJ), Tsukuba, Japan, Nov. 25 (2016) (招待講演)
- Hori, Y. "Development of Protein-Labeling Probes with Fluorogenic Switches for Imaging Cellular Events" Pacificchem 2015, Honolulu, U.S.A., Dec. 17 (2015) (招

待講演)
Hori, Y. "Fluorescent probes for in vivo imaging and epigenetic analysis", Asian International Symposium -Natural Products Chemistry, Chemical Biology/ Biofunctional Chemistry and Biotechnology-, Funabashi, Japan, Mar. 27 (2015) (招待講演)
Hori, Y., Otomura, N., Baba, R., Kikuchi, K. "Development of Chemical Tools for Imaging Protein Localization and Epigenetic Phenomena", Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium, Bern, Switzerland, Oct. 3 (2014) (招待講演)
Hori, Y. "Development of Fluorogenic PYP-tag Probes for Quick Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", EPFL-OU Workshop, Lausanne, Switzerland, Sep. 30 (2014) (招待講演)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称:メチル化 DNA を蛍光標識する方法
発明者:菊地 和也、堀 雄一郎、乙村 法道
権利者:国立大学法人大阪大学
種類:特許
番号:特願 2014 - 158061
出願年月日:平成 26 年 8 月 1 日
国内外の別:国内

名称:メチル化 DNA を蛍光標識する方法
発明者:菊地 和也、堀 雄一郎、乙村 法道
権利者:国立大学法人大阪大学
種類:特許
番号:PCT/JP2015/054475
出願年月日:平成 27 年 2 月 18 日
国内外の別:国外

取得状況 (計 1 件)

名称:メチル化 DNA を蛍光標識する方法
発明者:菊地 和也、堀 雄一郎、乙村 法道
権利者:国立大学法人大阪大学
種類:特許
番号:特許第 6274632 号
取得年月日:平成 30 年 1 月 19 日
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp>

堀 雄一郎 (HORI, Yuichiro)
大阪大学・工学研究科・准教授
研究者番号:00444563

(4)研究協力者

西浦 美也子 (NISHIURA, Miyako)
馬場 玲輔 (BABA, Reisuke)
平山 真也 (HIRAYAMA, Shinya)
乙村 法道 (OTOMURA, Norimichi)
田尾 知美 (TAO, Tomomi)
Gao Jingchi (GAO, Jingchi)
西田 会友子 (NISHIDA, Ayuko)
梅野 真帆 (UMENO, Maho)