

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13088

研究課題名(和文) OFF-ON-OFF蛍光スイッチ原理を持つ蛋白質標識プローブの開発

研究課題名(英文) Development of protein-labeling probes with OFF-ON-OFF fluorescence switches

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛋白質の一生を生細胞蛍光イメージングするため、独自開発したPYPタグ蛋白質ラベル化法と新たな化学原理「OFF-ON-OFF蛍光スイッチング」に基づき蛋白質ラベル化プローブを開発した。このプローブは、分子内会合の制御により、遊離状態では非蛍光性で、蛋白質ラベル化後、蛍光性となり、蛋白質分解により非蛍光性となる。このプローブを用いて、生細胞内蛋白質の発現及び分解を可視化した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed protein labeling probes for imaging protein lifetime using our original PYP-tag labeling method and a new chemical principle based on OFF-ON-OFF fluorescence switching. The regulation of intramolecular association made the probes nonfluorescent in a free state, fluorescent in a PYP-tag-bound form and nonfluorescent after protein degradation. By using one of the probes, we imaged protein expression and degradation in living cells.

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：OFF-ON-OFFプローブ PYPタグ 蛋白質分解

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の蛍光イメージングは、蛋白質の細胞内動態を明らかにする極めて有用な手法である。今日、その技術の中核は蛍光蛋白質となっているが、蛍光団の成熟に時間がかかることから、発現直後の蛋白質動態を観測できないことが問題であった。一方、近年、合成蛍光プローブを用いた蛋白質ラベル化技術が登場し、迅速に細胞内蛋白質をラベル化することで発現直後の蛋白質を可視化できると期待されている。しかしながら、従来のラベル化技術では、遊離状態・ラベル化状態・蛋白質分解後のプローブの蛍光を区別できず、プローブ添加直後からリアルタイムで蛋白質動態を追跡できないことが問題であった。本研究では、この問題を解決するため、我々が開発した PYP タグラベル化法を活用し、新たな蛍光スイッチング原理に基づいたイメージング技術を開発した。

PYP タグは、紅色細菌由来の小蛋白質(14 kDa)で、桂皮酸/クマリン誘導体と共有結合する。これまでに、PYP タグを融合した標的蛋白質を細胞内で特異的に蛍光ラベル化するプローブの開発に成功してきた。本研究では、蛋白質の発現直後から分解に至る一生を可視化するために、この技術を応用し、遊離プローブは非蛍光性で、ラベル化後、蛍光性となり、蛋白質分解に伴い非蛍光性となる OFF-ON-OFF 蛍光スイッチングプローブを開発した。

### 2. 研究の目的

これまでに、分子内会合を利用することで、PYP タグをラベル化し蛍光性となるプローブ FCTP を開発している。FCTP は、リガンドとしてクマリン誘導体、蛍光色素としてフルオレセインを持つプローブである。このプローブは、クマリンとフルオレセインの会合により消光し、ラベル化反応に伴いその会合が解消し蛍光強度を上昇させる。一方、FCTP はそのリガンド部位への会合が立体障害となり、PYP タグとの結合速度が極めて遅い(24 時間)ことが問題であった。

この問題を解決すべく、ラベル化速度を飛躍的(110 倍)に向上させた FCANB を開発している。FCANB では、リガンドを 4-ヒドロキシ桂皮酸誘導体に変更し、消光基であるニトロベンゼンを導入している。遊離状態では、フルオレセインはニトロベンゼンと会合し消光しているが、ラベル化時にニトロベンゼンが脱離し、フルオレセインの蛍光強度が上昇する。一方、桂皮酸リガンドはフルオレセインとの会合力が弱く、蛋白質が分解したとき、プローブは蛍光消光しない。このため、本研究では、蛋白質分解時に消光する原理を持つプローブの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)OFF-ON-OFF 蛍光スイッチングプローブの設計

上記の目的を達成するために、リガンド部位を 7-ヒドロキシクマリン、蛍光色素部位をフルオレセイン、ジニトロベンゼンを消光基とした新規プローブを設計した。このプローブでは、フルオレセインがクマリンよりも優先的にジニトロベンゼンと会合消光し、リガンド部位での会合構造の生成を抑制し、発現直後の PYP タグを迅速にラベル化することができると考えた。ジニトロベンゼンを用いる理由は、ニトロベンゼンよりもフルオレセインへの会合力が強いことが判明していたためである。更に、蛋白質分解後は、FCTP の研究から、フルオレセインとクマリンが会合しプローブの蛍光消光が引き起こされると予測される。この設計戦略により、遊離状態では非蛍光性で、ラベル化されると蛍光強度を上昇させ、蛋白質分解後に蛍光消光する OFF-ON-OFF 蛍光スイッチングプローブを開発することができると考えた。

(2)OFF-ON-OFF 蛍光スイッチングプローブの合成

2,4-ジヒドロキシ-6-メチルベンズアルデヒドとマロン酸ジエチルをピペリジン存在下で反応させ、クマリン骨格を合成した。その後、クマリンの 7 位のヒドロキシ基をメトキシメチル基で保護し、クマリンの 5 位のメチル基を *N*-プロモスクシンイミドでプロモ化した。その後、アミンを Boc 保護した PEG 鎖をそのプロモメチル基と反応させ、クマリンにリンカーをつなぎ、PYP リガンドを合成した。脱離基となる 4-メルカプトフェニル酢酸もしくは 4-メルカプト安息香酸のチオールをトリチル基で保護した後、3,5-ジニトロフェニルメタンアミンと縮合し、消光基のついた脱離基を合成した。PYP リガンド部分のエチルエステルを加水分解後、TFA で脱トリチル化した脱離基を縮合し、TFA で脱保護し、フルオレセインと縮合し、プローブ F3-DNB、F5-DNB 及び F5-DNB2 を合成した。

(3)PYP タグの発現・精製

His-PYP をコードしたプラスミドで大腸菌(BL21(DE3))を形質転換した後、LB 培地にて 37 °C で培養した。次に、IPTG を加え、20 °C で一晚培養した。培養した大腸菌を集菌し、超音波破碎した後、可溶性画分を抽出した。可溶性画分の PYP タグは、Ni カラムにより精製した。その後、HEPES 緩衝液を移動相として、ゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製した。蛋白質の濃度は、UV 法にて決定し、純度は SDS-PAGE により確認した。

(4)OFF-ON-OFF 蛍光スイッチングプローブと PYP タグの反応解析実験

プローブと PYP タグを 37 °C、HEPES 緩衝液中にて反応させ、蛍光分光光度計を用いて、蛍光スペクトルを測定した。また、蛍光強度が飽和したのちに、トリプシンを添加し、引き続き蛍光スペクトルの測定を経時的に行

った。また、同様の反応を SDS-PAGE で解析した。

次に、反応速度定数を決定するために、プローブに対し、PYP タグを過剰量混合し、蛍光強度の上昇をモニタリングし、擬一次速度定数を決定した。更に、PYP タグの濃度を変更し、それぞれ、擬一次速度定数を決定した。得られた擬一次速度定数を縦軸とし、PYP タグ濃度を横軸としてプロットした直線の傾きから二次速度定数を決定した。

#### (5) 生細胞イメージング

HEK293T 細胞に Lipofectamine3000 を用いて遺伝子導入を行い、24 時間 37 °C にて DMEM 培地において培養後、プローブを添加した。プローブを添加後、蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) F3-DNB と PYP タグの反応

F3-DNB の蛍光スペクトルを測定したところ、蛍光強度は低く、その蛍光量子収率は、0.02 であった。吸収スペクトルを測定したところ、フルオレセイン単独の時と比べて、吸光度が低下し、レッドシフトすることが分かった。このことから、フルオレセインは分子内会合を引き起こしていることが示唆された。F3-DNB を PYP タグと反応させると、蛍光強度は 22 倍となり、量子収率も 0.67 にまで増大した。また、この反応混合物を SDS-PAGE で解析したところ、PYP タグの分子量の位置から蛍光バンドが確認され、F3-DNB は、PYP タグと共有結合することが示された。この結果から、F3-DNB は、PYP タグとの結合に伴い、蛍光を OFF-ON 応答させることができるプローブであることが分かった。次に、その反応速度を調べたところ、反応完了に 18 時間以上を要し、二次反応速度定数も  $2.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と、極めて反応速度が遅いことが分かった。実用的に、生細胞イメージングで用いるには、この 50 倍以上の速度が必要であり、技術改良が必要であることが分かった。

#### (2) PYP3R タグの利用

PYP タグラベル化技術に関するこれまでの研究から、PYP タグはアニオン性であり、同じくアニオン性であるフルオレセインを持つプローブとの反応は、静電反発のために遅くなることが分かっている。一方、PYP タグリガンド結合部位付近の 3 つの酸性アミノ酸をアルギニンに変異を導入した PYP3R は、静電反発を解消し、アニオン性プローブとの反応性を向上させることが分かっている。

そこで、PYP3R をタグとして用いることで、反応速度の問題が解決できるのではないかと考えた。PYP3R と F3-DNB を反応させ、蛍光強度の上昇速度をモニタリングしたところ、二次反応速度定数は、 $14 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  となり、野生型の PYP タグより反応速度が向上している

ことが分かった。

#### (3) F3-DNB2 の開発

更なる反応速度の向上を目的として、F3-DNB の脱離基であるチオールの構造に着目した。ラベル化反応に伴い、プローブからチオフェノールが脱離するが、このチオールの  $pK_a$  を低下させ脱離能を向上させることができれば、反応速度が向上するのではないかと考えた。そこで、チオールの  $pK_a$  を低下させるため、チオフェノールのパラ位のメチレン基をカルボニル基に変更し、アミド結合で消光基であるジニトロベンゼンに繋いだ構造を設計した。この脱離基を持つプローブを F3-DNB2 とした。

F3-DNB2 と PYP3R を反応させたところ、蛍光強度が 27 倍上昇し、二次反応速度定数は、 $190 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  にまで向上した。

#### (4) 分子力学計算を利用した F5-DNB2 の設計

これまでに開発したプローブで反応速度を低下させるもう一つの要因は、色素部位とリガンド部位の分子内会合である。ラベル化前に、色素部位がジニトロベンゼンではなくリガンド部位に会合すると、PYP タグとの反応時に、立体障害となることが考えられる。そこで、分子力学計算によってシミュレーションすることで、色素部位がリガンド部位ではなくジニトロベンゼン側に会合するようにリンカーの長さや構造を改変したプローブを探索することにした。シミュレーションを行うと、これまでリンカーに用いた PEG 鎖が 3 つのものよりも 5 つのものが、色素部位がジニトロベンゼン側に会合するという計算結果が示された。そこで、このリンカーを長くしたプローブ F5-DNB2 を合成し、PYP3R との反応性を検証した。

その結果、F5-DNB2 は PYP3R との反応に伴い、24 倍蛍光強度を上昇させ、二次反応速度定数は  $420 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  となり、第一世代プローブである F3-DNB と野生型 PYP タグの組み合わせより、大きく反応速度を向上させた。

開発した上記のプローブは、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分かった(図 1)。また、SDS-PAGE により解析すると、トリプシン添加後に PYP3R は、分解することが分かった。

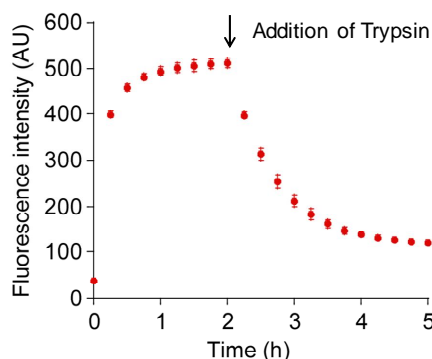


図 1 . F5DNB2 の OFF-ON-OFF 応答。

以上の結果をまとめると、F5-DNB2 は、PYP3R と迅速に反応し、蛍光強度を上昇させ、トリプシンと反応し蛋白質を分解させると、蛍光強度が低下する OFF-ON-OFF プローブであることが分かった。

#### (5)蛋白質分解の生細胞イメージング

細胞内蛋白質の分解をイメージングするうえで、細胞膜透過性プローブが必要となる。一方、アニオン性のフルオレセインを持つプローブは、膜透過しない。そこで、F5-DNB2 のフルオレセインをジアセチル化した AcF5-DNB2 を開発した。AcF5-DNB2 が細胞膜を透過し、細胞内に発現する PYP3R をラベル化できるかを検証した。核局在化シグナル配列とマルトース結合蛋白質をつけた PYP3R を細胞内に発現し、プローブを添加したところ、細胞核内から蛍光が観測された。このことから、AcF5-DNB2 は、膜透過性を有し、細胞内蛋白質をラベル化できることが示された。

また、細胞内で発現後、比較的迅速に分解する蛋白質として、マウスオルニチン脱炭酸酵素 (Mouse Ornithine Decarboxylase, MODC) を選択した。この MODC のうち、分解に起因する配列を有する PEST ドメインを PYP タグに融合させ、HEK293T 細胞にて発現させた。まず、細胞内で PYP3R-MODC が発現し分解しているかを Western blot によって確認を行った。このコンストラクトには、HA タグを N 末端につけており、抗 HA タグ抗体により、目的蛋白質を検出した。その結果、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加したとき、PYP3R-MODC の発現が確認され、MG132 非存在下では、発現バンドが確認されなかった。このことは、PYP3R-MODC が一旦細胞内で発現し、プロテアソームによって分解されていることを示している。

最後に、PYP3R もしくは PYP3R-MODC 発現細胞に AcF5-DNB2 を添加し、経時的に蛍光画像を取得した。PYP3R 発現細胞から蛍光が観測されたものの、蛍光強度の大きな減衰は見られなかった。これに対し、PYP3R-MODC 発現細胞からは、当初観測されていた蛍光が時間の経過とともに、減衰していった。細胞内部の蛍光は、約 3 時間程度で消失した。以上の結果は、AcF5-DNB2 が細胞内蛋白質と結合し蛍光を発し、その蛋白質が分解すると蛍光強度を減少させることを示している。このため、AcF5-DNB2 は、生細胞において、蛋白質発現・分解に伴い OFF-ON-OFF 応答を示す蛍光スイッチングプローブであることが示された。

以上の結果は、Western blot 実験で必要としたプロテアソーム阻害剤なしでも、蛋白質の分解を検出することができることを示している。本プローブは、蛋白質代謝が細胞機能制御に関わる現象を解明する研究にとって、極めて有用であり、今後の応用が期待される。

#### 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4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 「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)

#### [学会発表](計25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. "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)

#### [その他]

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1)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

##### (4)研究協力者

西浦 美也子 (NISHIURA, Miyako)  
平山 真也 (HIRAYAMA, Shinya)  
乙村 法道 (OTOMURA, Norimichi)

西田 会友子 (NISHIDA, Ayuko)  
森 和真 (MORI, Kazuma)  
山崎 康平 (YAMASAKI, Kohei)  
梅野 真帆 (UMENO, Maho)

---