

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19048

研究課題名（和文）小胞体ストレスを可視化するSemisyntheticプローブの開発

研究課題名（英文）Development of Semisynthetic Probe for Imaging ER stress

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体にストレスがかかると正常に構造形成できないミスフォールディング蛋白質が蓄積してくる。この異常蛋白質が正常に再フォールディングまたは除去されないと、糖尿病や神経変性疾患、または癌などの様々な疾病を引き起こす。そこで、本研究では、タンパク質のミスフォールディングを検出することを目的として、合成蛍光色素とタンパク質からなるSemisyntheticプローブの基盤技術を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレスが引き起こすタンパク質のミスフォールディングは、様々な疾患の原因となることから、タンパク質のミスフォールディングを生きた細胞で可視化することは、疾病の発症機構の解明と治療に有用な情報を提供する。また、合成色素とタンパク質からなるSemisyntheticプローブは、それぞれの分子単独では検出不可能な生命現象を調べることが可能であることから、そのプローブ構築に関する知見は、ケミカルバイオロジーの発展に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：When the endoplasmic reticulum is stressed, misfolded proteins that cannot form native functional structures accumulate. If these misfolded proteins are not refolded or removed normally, they can cause various diseases such as diabetes, neurodegenerative diseases, or cancer. In this study, we constructed a technical basis for semisynthetic probes consisting of synthetic fluorescent dyes and proteins for the purpose of detecting protein misfolding.

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：Semisyntheticプローブ ミスフォールディング ラベル化

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質や分泌タンパク質は、小胞体でポリペプチド鎖として生合成された後、機能を持った特定の立体構造へとフォールディングする。一方、ウイルス感染や炎症、化学物質などにより小胞体にストレスがかかると正常に構造形成できないミスフォールディングタンパク質が蓄積してくる。この異常タンパク質が正常に再フォールディングまたは除去されないと、糖尿病や神経変性疾患、または癌などの様々な疾病を引き起こす。このため、ミスフォールディングタンパク質の可視化は、疾病時の細胞のストレス状態を知るとともに、ミスフォールディングタンパク質が関与する病態機構の解明に繋がる。しかしながら、タンパク質の凝集を可視化する技術は開発されているものの、小胞体ストレス時に凝集する前にミスフォールディングタンパク質が時間とともにどのような量的変化を示すかを生細胞で可視化する技術は、その重要性にも関わらず開発されていない。このため、ミスフォールディングタンパク質の可視化技術の開発は、基礎科学の観点に加え、疾病解明のためにも強く望まれている。

我々は、独自のタグタンパク質として PYP (Photoactive yellow protein) タグを見出し、PYP タグと合成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¹⁾。この手法では、タグを目的タンパク質に融合し、タグをプローブでラベル化することで目的タンパク質を可視化する。PYP タグは、細菌由来の小蛋白質 (14 kDa) でありリガンドと特異的に共有結合する。そのサイズの小ささは、融合するタンパク質への影響を最小化することができることから、このタグを用いることの利点となっている。これまでに、化学原理を精査することで、PYP タグに結合したとき初めて蛍光を発する「発蛍光プローブ」の開発を行ってきた。これまでに、発蛍光プローブにより、様々なタンパク質の動態を洗浄操作なしで迅速にイメージングすることに成功してきた。一方、タグを直接ミスフォールディングする可能性のあるタンパク質に融合させても、タンパク質のフォールディング状態に反応して蛍光特性は変更しないため、小胞体ストレスに伴うタンパク質のミスフォールディングを可視化することは困難であった。このため、ミスフォールディングを可視化する新たな手法を開発することが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質のミスフォールディングタンパク質を検出するために、ミスフォールディングタンパク質を認識するドメインと蛍光応答する合成蛍光色素をハイブリッド化した Semisynthetic プローブを構築した。このために、ミスフォールディングタンパク質認識ドメインと合成蛍光色素を調整または合成し、連結する方法を開発した。

3. 研究の方法

(1) Semisynthetic プローブの分子設計

プローブ開発にあたり、ミスフォールディングタンパク質結合ドメインに着目した。このドメインは、ミスフォールディングタンパク質を特異的に認識するタンパク質であり、Semisynthetic プローブの分子認識モジュールとして用いた (図 1a)。このドメインのミスフォールディングタンパク質結合部位には、疎水性アミノ酸が幅広く分布しており疎水場を形成している。タンパク質がミスフォールディングするとき、通常はタンパク質内部にある疎水性アミノ酸が外部に露出し疎水場と相互作用すると考えられる。また、この疎水場は、いくつかの蛍光色素と相互作用することが知られている。

プローブの蛍光スイッチモジュールとして極性応答性をもつ蛍光色素を用いた。このタイプの色素は、低極性環境下では、蛍光が抑制され、極性が上昇すると、蛍光強度が上昇する。このため、極性応答性色素が上記タンパク質の疎水場と相互作用する場合、その蛍光は抑制され、ミスフォールディングタンパク質が蛍光色素と置き換わりその疎水場と結合すると、蛍光色素は水溶液中の環境下に配置され、蛍光を発すると考えられた。

生細胞内でこのシステムを機能させるには、細胞内で上記のドメインに色素を繋ぎ一つの分子にする必要があった。これを達成するために、PYP タグラベル化法を応用する。PYP タグにこのドメインを繋いだ融合タンパク質を作成し、PYP タグリガンドを介してその融合タンパク質をラベル化する。このようにして、合成蛍光色素とタンパク質からなる Semisynthetic プローブを開発した。

(2) プローブ合成と融合タンパク質および Semisynthetic プローブの作成

プローブの PYP タグリガンドとして、PCAF を採用した。このリガンドは、近年我々のグループで開発したものであり、細胞内で高効率に PYP タグをラベル化することができる。このリガンドに極性応答色素を連結した PYP タグラベル化分子を合成した。

次に、PYP タグに上記のドメインを融合したタンパク質の遺伝子を調整し、大腸菌で発現し、精製を行った。

4. 研究成果

(1) 融合タンパク質の発現・精製

まず、PYP タグを N 末端としてミスフォールディングタンパク質結合ドメインを C 末端とした融合タンパク質のさらに N 末端に GST タグを融合した遺伝子を Coldshock 発現ベクターに組み込み、IPTG 発現系において大腸菌にて発現させた。その結果、IPTG 添加に伴う目的タンパク質の発現は確認されなかった。

次に、GST タグの C 末端に上記のドメインを、そのさらに C 末端に PYP タグを融合させたタンパク質の遺伝子を Coldshock 発現ベクターに組み込み、上記と同様に IPTG 発現系にて大腸菌にて発現させた。IPTG の添加に伴い、目的タンパク質の発現バンドが確認された (図 1)。

そこで、このベクターを用いて、大腸菌をトランスフォームし、IPTG 添加後、15 分、オーバーナイトで発現させた。その後、大腸菌を超音波破碎し、遠心後上清をグルタチオンカラムに添加し、精製を行った。グルタチオンにて溶出した画分をゲルろ過クロマトグラフィーでさらに精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーでタンパク質の吸収が確認された画分を SDS-PAGE により確認したところ、精製された PYP タグを示すバンドが確認された。

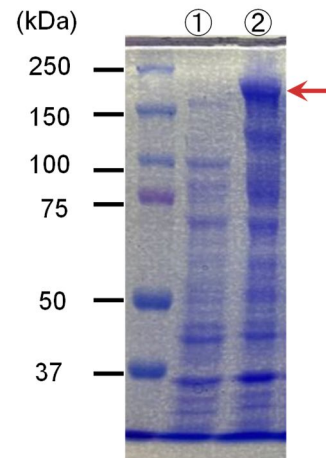


図 1. 融合タンパク質の発現。IPTG 添加前と添加後の大腸菌タンパク質発現パターン。矢印が目的タンパク質。

(2) PYP タグラベル化分子による PYP タグのラベル化反応

PYP タグには、表面電荷の異なる 2 種類の変異体が開発されている。野生型の PYPWT は、酸性タンパク質であり、リガンド結合部位に近い表面にある 3 つの酸性アミノ酸を中性アミノ酸に変異させたものが PYPNQN であり²、塩基性アミノ酸に変異させたものが PYP3R である³。そこで、野生型およびこれらの変異体と PYP タグラベル化分子の反応速度に違いがあるかどうかを検証した。その結果、表面電荷によらず大きな反応速度の違いはなかった (図 2)。また、ラベル化反応に伴い、PYPNQN は、約 2 倍の蛍光強度上昇があり、PYPWT と PYP3R は、約 3~4 倍の蛍光強度変化があった。

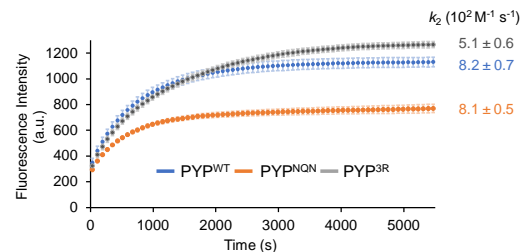


図 2. 各種 PYP タグタンパク質と反応させたときのラベル化分子の蛍光強度の経時変化。

このラベル化分子の吸収スペクトルを測定すると、遊離状態ではスペクトルのベースラインが、波長が短くなるにつれ上昇しており、ラベル化反応後にそのベースラインが低下していることから、遊離状態では可溶性凝集体を形成し、その凝集体中では極性が下がっていると考えられた。また、ラベル化に伴い、そのベースラインが低下したことから、凝集が解け、周囲の極性が高くなり、色素の蛍光強度が上昇したと考えられた。Semisynthetic プロープに採用するタグとしては、上記のドメインがある場合は蛍光強度が低いほうがよいが、ドメインがない状態はミスフォールディングタンパク質がない状態をミミックしていると考えられるため、蛍光強度が高いほうがよく、ラベル化速度も速い方が望ましいと考えられる。この観点から、Semisynthetic プロープには、PYPWT をタグとして採用することとした。

次に、PYP タグラベル化分子と上記ドメインの融合タンパク質を反応させて、SDS-PAGE を行い、ラベル化反応の有無を確認した。その結果、融合タンパク質を示すバンドから蛍光が観測された。SDS-PAGE は変性条件における実験であることから、ラベル化分子は融合タンパク質と共有結合していると考えられた。最後に、ラベル化前後の蛍光強度の変化を調べたところ、PYP タグ単体の時と比べ、融合タンパク質の場合は大きな蛍光強度の変化はなかった。このことから、当初考案した Semisynthetic プロープの設計方針に適合する結果が得られたといえる。

以上のように、PYP タグラベル化法を利用することで、極性応答蛍光色素とミスフォールディングタンパク質結合ドメインからなる Semisynthetic プロープを構築することができた。今後、

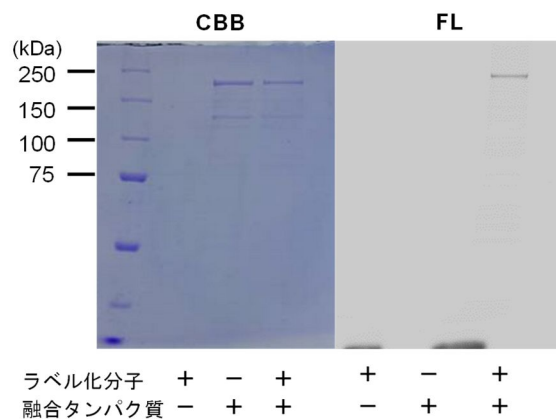


図 3. ラベル化分子と融合タンパク質の反応の SDS-PAGE 解析。CBB と FL は、それぞれクーマシーブリリアントブルー染色画像と蛍光画像を示す。

このプローブを用いた、小胞体ストレスに伴う生細胞内におけるタンパク質のミスフォールディングの可視化が期待される。

<引用文献>

1. 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.
2. Gao J, Hori Y, Nishiura M, Bordy M, Hasserodt J, Kikuchi K. Engineered Protein-tag for Rapid Live-cell Fluorogenic Visualization of Proteins by Anionic Probes. *Chem Lett.* 2020 49(3):232-235. doi: 10.1246/cl.190875.
3. 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.* 2015 54(48):14368-71. doi: 10.1002/anie.201506935.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kanikawa 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 3件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀 雄一郎 |
| 2. 発表標題 合成蛍光分子とタンパク質を駆使した生体分子イメージング |
| 3. 学会等名 医用分光学会第20回年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀 雄一郎 |
| 2. 発表標題 タンパク質の多重局在を可視化するタンパク質ラベル化技術 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143回年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023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 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuichiro Horii, 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 |

〔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 | 熱田 萌子 (Atsuta Moeko) | | |
| 研究協力者 | 寶木 洋飛 (Takaragi Hiroto) | | |

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 |
|---------|---------|