

細胞内タンパク質のラベル化効率の向上を目指したBL-tagシステムの改良

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 物質生命工学コース 酒井 幸男

諸言

生きた状態で生体内のタンパク質の挙動を可視化する蛍光イメージング技術は生命現象を解明する上で非常に有用なツールとなっている。これまでに2008年に日本人がノーベル化学賞を受賞したことで有名な蛍光タンパク質を用いた蛍光ラベル化手法があるが、光安定性が低いなどの問題点があった^{1, 2, 3}。近年では蛍光タンパク質の欠点を補った、タグタンパク質を介した蛍光性小分子ラベル化技術が注目を浴びている。本研究室ではこれまでに変異体 β -ラクタマーゼを用いたタグタンパク質ラベル化技術 (BL-tagシステム) を開発しており、 β -ラクタム構造を有する蛍光プローブがBL-tagと共有結合することにより、タンパク質の生細胞イメージングおよび1分子イメージングを行ってきた⁴。本研究では、BL-tagを用いた細胞内タンパク質のラベル化効率の向上を目指し、リガンドの構造最適化及びBL-tagの改変を行いラベル化効率の評価を行った。

エステル構造を改変した新規BL-tagプローブの開発

これまで細胞膜透過型BL-tagプローブの基質構造として用いられてきたバカンピシリンのエステル構造は高高く、立体障害によりBL-tagとの結合安定性が低いのではないかと考えた。そこで、SiRcB4の構造をもとにエステル部位を立体障害の比較的小さなエチルエステルを有するSiRcA4-Etおよび立体障害が小さく水溶性のあるメトキシ

エチルエステルを有するSiRcA4-MOEを合成した(図2)。

BL-tagとSiRcA4-EtおよびSiRcA4-MOEのラベル化確認

新たに合成したSiRcA4-EtおよびSiRcA4-MOEがBL-tagをラベル化するかをSDS-PAGEにより確かめた。この時、細胞内の環境に近づくために細胞抽出液を反応液に混ぜて反応を行った。反応液中のタンパク質を熱変性後、SDS-PAGEを行い、蛍光ゲル画像とCBBでタンパク質を染色したゲル画像を比較した。25 kDa付近の分子量の位置から蛍光が観測され、どちらのプローブもBL-tagをラベル化することを確認した(図3)。

核にBL-tagを発現させた細胞のラベル化確認

各プローブが生細胞においても標的タンパク質を蛍光標識するかを確認した。標的タンパク質としては核移行シグナル(Nuclear Localization Signal: NLS)とBL-tagを融合させたBL-NLSを用いた。共焦点蛍光顕微鏡の画像から、細胞核からの蛍光が全く観測されず、SiRcA4-EtおよびSiRcA4-MOEは細胞内に発現したBL-tagをラベル化しないことが確認された(図4)。

この理由を考察した。変異体 β -ラクタマーゼの基質認識部位には正電荷を有するアルギニン残基が存在し、基質であるアンピシリンの2位のカルボキシ基と静電相互作用をしていることが報告されている(図5)⁵。プローブのエステル部位が切断されないとアルギニン残基との

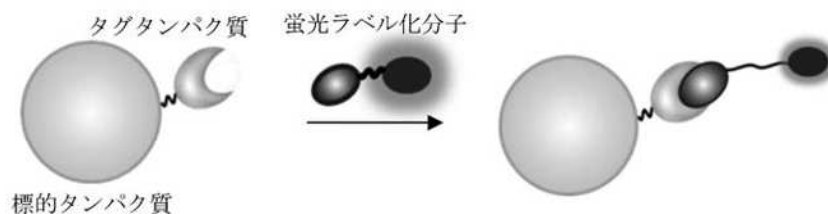


図1. タグタンパク質を用いた標的タンパク質ラベル化システムの概略図

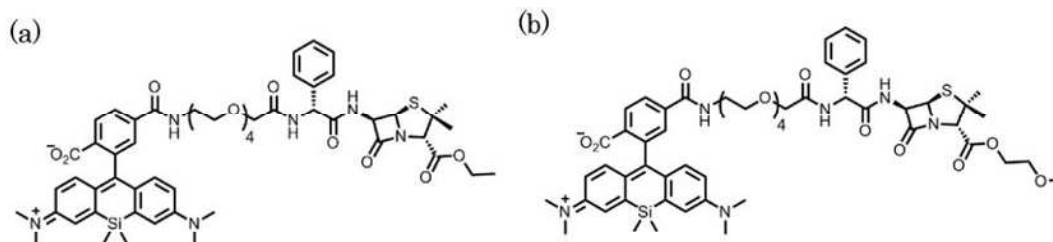


図2. (a) SiRcA4-Etの構造と (b) SiRcA4-MOEの構造

立体障害によりBL-tagとこれらのプローブが結合できないのではないかと考えた。

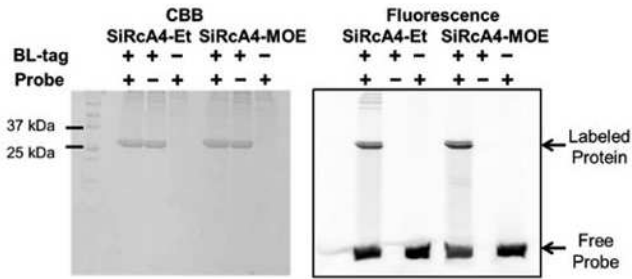


図3. CBB染色および蛍光ゲル画像

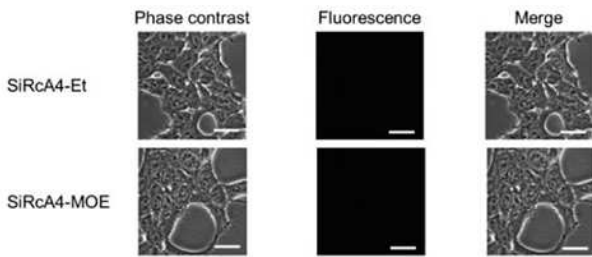


図4. BL-NLS発現HEK293T細胞の蛍光顕微鏡画像

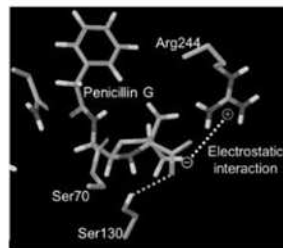


図5. BL-tagの基質認識部位の構造

細胞抽出液とSiRcA4-EtおよびSiRcA4-MOEとの反応性

BL-tagとプローブが結合するためにはプローブのエステル構造が細胞内のエステラーゼにより切断されることが重要であると考えられる。そこで、細胞内のエステラーゼを含む細胞抽出液と各プローブを混ぜ、37℃で6時間反応させ、HPLCにより解析した。解析結果より、エステル構造が切断された化合物のピークが見られず、これらのプローブのエステルは細胞内のエステラーゼにより、切断されないことが確認された(図6.)。

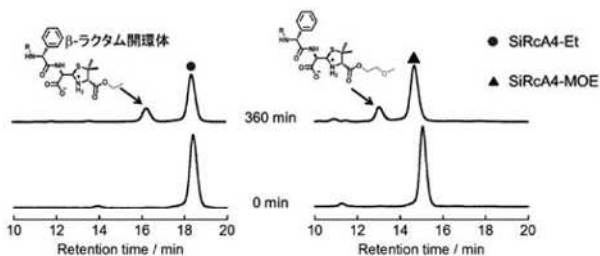


図6. 細胞抽出液と反応後の各プローブのHPLC分析結果

エステラーゼとの反応効率が高い細胞膜透過型蛍光プローブの開発

エステルの立体障害を小さくするだけではBL-tagをラベル化できないことが確認されたため、細胞内のエ

テラーゼとのプローブの反応効率を向上させることでBL-tagとの反応性を向上させようと考えた。細胞内のエステラーゼとの反応効率が良いことが知られているアセトキシメチルエステルを有するSiRcA4-AMを開発した。

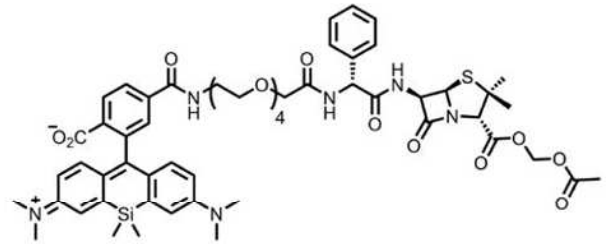


図7. SiRcA4-AMの構造

細胞抽出液とSiRcA4-AMとの反応性

意図したとおり、SiRcA4-AMのエステル構造が細胞内のエステラーゼにより切断されるかをHPLCにより確かめた。細胞抽出液とプローブを混ぜ、各インキュベーション時間でHPLC解析を行った。また、このとき比較のためにこれまでに開発されているSiRcB4でも同様の実験を行った。解析結果より、SiRcA4-AMのエステル構造は細胞内のエステラーゼにより切断されることが確認された。また、SiRcA4-AMの方がSiRcB4よりエステルの切断速度が速いことも確認された(図8.)。

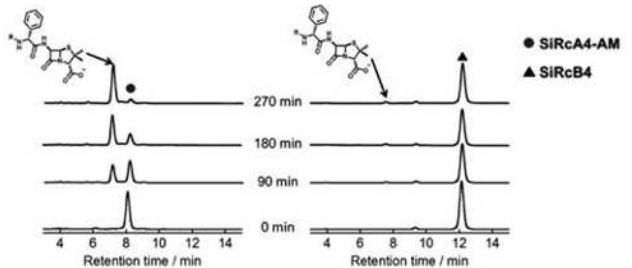


図8. 細胞抽出液と反応後の各プローブのHPLC分析結果

BL-tagとSiRcA4-AMのラベル化確認

新たに合成したSiRcA4-AMがBL-tagをラベル化するかをSDS-PAGEにより確かめた。この実験もSiRcA4-EtおよびSiRcA4-MOEの実験と同様の条件で実験を行った。実験結果よりSiRcA4-AMもBL-tagをラベル化することを確認した。また、SiRcB4と比較してラベル化されたBL-tagからの蛍光はSiRcA4-AMの方が強く、より効率的にBL-tagをラベル化することを確認した(図9.)。

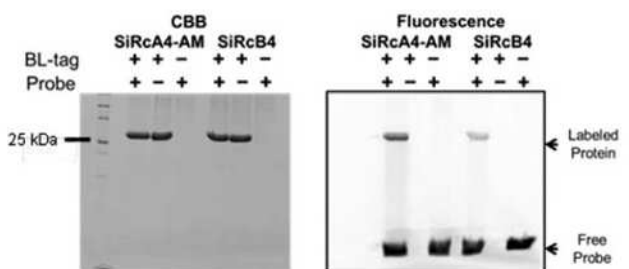


図9. CBB染色および蛍光ゲル画像

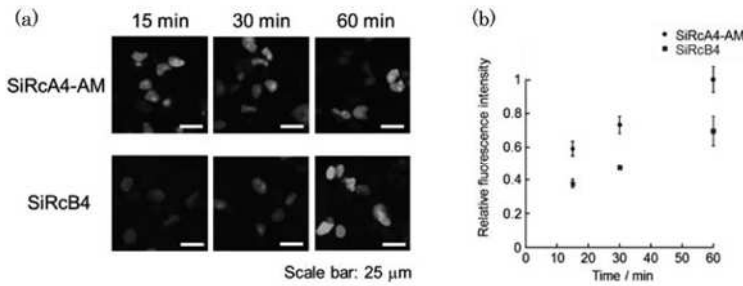
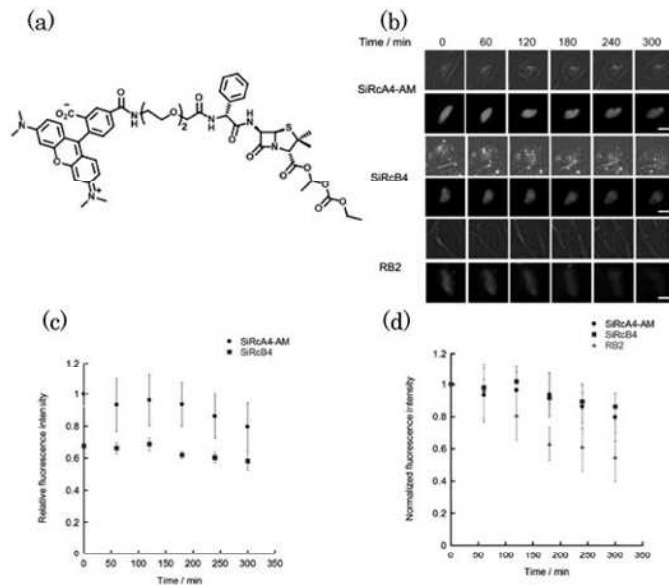


図10.
(a)BL-NLS発現HEK293T細胞の蛍光顕微鏡画像および (b)核からの蛍光強度変化

図11.
(a)RB2の構造
(b)BL-NLS発現HeLa細胞の蛍光顕微鏡画像
(c)SiRcA4-AMとSiRcB4により染色された核からの相対的な蛍光強度変化
(d)各プローブで染色された核からの蛍光強度変化



核にBL-tagを発現させた細胞のラベル化効率の確認

細胞内に発現したBL-tagにおいてもSiRcA4-AMがラベル化するかを確認した。共焦点蛍光顕微鏡の画像からも分かる通りSiRcA4-AMは細胞内に発現したBL-tagをラベル化することが確認できた。また、SiRcB4と比較してSiRcA4-AMの方が蛍光強度の増大が速いことが分かった(図10)。これは、SiRcA4-AMの方が細胞内のエステラーゼによるエステル構造の切断速度が速いためであると考えられる。

細胞内に発現したBL-tagとSiRcA4-AMおよびSiRcB4との結合安定性評価

最後に細胞内に発現したBL-tagとSiRcA4-AMおよびSiRcB4との結合安定性を評価した。これまで開発された細胞膜透過性を有してかつ、観察時間と共に脱ラベル化が起こることが知られているプローブRB2(図11a.)を用いて比較を行っている。SiRcA4-AMはSiRcB4より、どの時間においても強い蛍光強度で細胞核からの蛍光が観察されることが確かめられた(図11b, c.)。また、SiRcA4-AMはRB2と比較して核からの蛍光強度が維持されることが確かめられ、長時間のラベル化が可能となった(図11b, d.)。

結言

本研究では細胞内に発現したBL-tagを高効率で長時間安定にラベル化するプローブSiRcA4-AMを開発した。今

後、このプローブを用いて長時間の細胞内イメージング、および高精度な1分子イメージングによるタンパク質動態解析への応用が期待できる。

参考文献

1. Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. *J. Cell Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223.
2. Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., and Tsien, R. Y., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906.
3. O'Hare, H. M., Johnsson, K., and Gautier, A., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488.
4. Sato, R., Kozuka, J., Ueda, M., Mishima, R., Kumagai, Y., Yoshimura, A., Minoshima, M., Mizukami, S., and Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17397.
5. Zafaralla, G., Manavathu, E. K., Lerner, S. A., and Mobashery, S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3847.

(応用自然 平成29年卒 生命先端 平成31年前期)



大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻
物質生命工学コース
菊地研究室

勤務先: 松本油脂製菓株式会社
業務内容: 繊維工業用薬剤の開発や
機能性工業薬品の開発に
従事する予定