

東京大学 グローバル COE 特別セミナー

東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻

演者： 菊池和也 博士

大阪大学大学院工学研究科

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 教授

演題： *in Vivo*イメージングを目指した分子プローブのデザイン・
合成・生物応用

日時： 平成22年10月13日（水）14:00～15:00

場所： 東京大学理学部 3号館 3F 303号室

はじめに

近年、生きた細胞や動物個体内における生体分子の挙動や機能を直接可視化する「分子イメージング」が大きな注目を集めている。蛍光タンパク質(FP)の応用研究が進んだ現在においても、小分子有機化合物プローブ（化学プローブ）である Fura-2 は Ca^{2+} イメージングにおいて汎用されており、発表論文の引用回数は 17,000 回を超え、作製者の Roger Y. Tsien 博士の論文の中でもノーベル賞受賞対象論文の引用回数を遙かに凌いでいる。また近年、分子イメージングの研究対象は、生細胞のみならず動物個体へも移行しつつある。本講演では、演者らの研究室で行っている次世代の分子イメージング法の開発研究について紹介したい。具体的には、タンパク質の発蛍光ラベル化について概説する。

タンパク質の発蛍光ラベル化

標的タンパク質を可視化するには、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現させる手法が一般的となっている。FP では適用困難な実験を行うために、標的タンパク質を低分子の蛍光色素などで特異的にラベル化する手法が近年注目を集めている。一般的には、タグと呼ばれるペプチドあるいはタンパク質を目的タンパク質に融合させ、そのタグに特異的に蛍光色素などを結合させる方法が行われている。しかし、市販されている手法であっても、特異性に問題がある場合や、ラベル化前後におけるプローブの蛍光特性が変化しないために未反応のプローブを洗浄で完全に除く必要があるなど、改良の余地はまだ多い。そこで、演者らは既存のタンパク質ラベル化法の弱点を克服する蛍光ラベル化法の開発に取り組んだ。

汎用性を有するタンパク質ラベル化法を開発するには、適切なタグの選択が重要である。タグ分子を選択するポイントは、①内在性でないこと、②融合させた目的タンパク質の機能を阻害しないこと、の二つである。以上の条件を考慮して、タグタンパク質として β -ラクタマーゼ(β -la)を選んだ。 β -la は、酵素基質複合体の形成の後、酵素と基質がエステル結合で連結されたアシル中間体を形成する。次いで、166番目の Glu が近傍の水分子の脱プロトン化を促進し、その水分子がアシル中間体を加水分解する。この脱アシル化過程に参与する Glu を Asn に変異させた変異型酵素 E166N TEM では、実質的に脱アシル化が起こらなくなる。すなわち、基質が変異型酵素に共有結合した反応中間体が安定に存在する。そこで、 E166N TEM をラベル化タグとして利用することを考えた。

次に、プローブ化合物 CCD をデザインし、合成を行った。CCD はセファロsporin の両端に 7-ヒドロキシクマリンと、消光性色素として Dabcyl が結合している。すなわち、変異型 β -ラクタマーゼタグへのラベル化が起こると、Dabcyl が脱離して蛍光が回復するとデザインし、「発蛍光ラベル化法」の開発に成功した。次に、本手法を用いて、標的タンパク質の特異的ラベル化について検討した。標的タンパク質としては、マルトース結合タンパク質(MBP)を選択した。MBP の C 末端側に E166N TEM を繋いだ融合タンパク質を作製し、CCD を用いてこのタンパク質への蛍光ラベル化を試みた。その結果、MBP と E166N TEM の融合タンパク質のみを選択的に発蛍光ラベル化できることが確認された。以上より、タグと融合させた標的タンパク質の発蛍光ラベル化に成功した。

発表論文

Y. Hori, H. Ueno, S. Mizukami & K. Kikuchi, "Photoactive Yellow Protein-Based Protein Labeling System with Turn-on Fluorescence Intensity", *J. Am. Chem. Soc.*, (2009) 131, 16610.

S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori & K. Kikuchi, "Covalent Protein Labeling Based on Non-catalytic β -Lactamase and a Designed FRET Substrate", *J. Am. Chem. Soc.*, (2009) 131, 5016.

世話人：理学系研究科 濡木 理 (内線 24392)