

細胞内タンパク質を可視化するタグ-蛍光プローブシステム

野村 渉, 玉村 啓和

1. 生体物質のバイオイメージング

細胞内で営まれるさまざまな化学反応とその結果生じる多様な生体物質の理解は生命現象の解明において重要な意味を持つ。生化学、分子生物学の発展に伴い、さまざまな実験手法が開発されてきており、多くの細胞内の情報伝達物質やそれらを認識する分子などが同定されてきた。生命現象をより深く理解するためには、生細胞におけるさまざまな生体物質、特に、タンパク質の機能や局在、タンパク質間の相互作用について詳細に解析することが不可欠である。したがって、細胞を生きたまま観察することで生体内分子の機能解明につなげるバイオイメージングは重要な研究手法であるといえる。

細胞内に存在するタンパク質を蛍光によって可視化するためには何らかの手法でタンパク質をラベル化する必要がある。その手法としては蛍光タンパク質によるラベル化と蛍光性低分子を利用した化学的修飾に大別される。これらについて以下に詳細を述べる。

2. 蛍光タンパク質を利用した蛍光バイオイメージング

green fluorescent protein (GFP) の開発から始まった蛍光タンパク質を利用したタンパク質イメージング法¹⁾では、蛍光タンパク質は遺伝子工学的に目的タンパク質に融合されるため、目的タンパク質をほぼ100%蛍光ラベル化できるという利点がある。現在では、GFPの改良やサンゴなどから得られた新規の蛍光タンパク質の改良によってさまざまな蛍光波長(色)を有する蛍光タンパク質が開発されてきており、それらを用いた多様な蛍光ラベル化、あるいは多色による同時イメージングなどが可能になってきた。さらに最近、宮脇らによって紫外光を照射することで緑から赤

に蛍光が変化するカエデと呼ばれる蛍光タンパク質なども見いだされている²⁾。しかし、蛍光タンパク質は約27kDaと比較的大きな分子であることから、融合させる目的タンパク質の本来持つ構造、局在や機能に影響を及ぼす可能性が懸念される。また、蛍光タンパク質は遺伝子上で目的タンパク質と融合するため、ラベル化の時期をコントロールすることや、途中で観測波長を変化させることができないために経時的な変化を観察することは困難である。

3. バイオイメージングにおけるタグ-プローブシステム

近年のバイオイメージング研究においては、時間依存的に発現動態や活性化・不活性化状態が大きく変化するタンパク質についてより詳細に解析することに焦点が当てられている。このため、標的タンパク質を時間ごとに区別して観測するパルスチェイス実験を簡便かつ迅速に行う手法の開発が求められている。そこで、標的タンパク質にあらかじめ目印となるタグを付加し、そのタグと特異的に結合する蛍光性プローブを用いて目的タンパク質の蛍光ラベル化を実現するタグ-プローブシステムが新たに提唱されている(図1A)。この手法を用いるとプローブの蛍光基を変えることで、容易に時間依存的なタンパク質の染め分けが可能となるため、細胞内タンパク質のリアルタイムパルスチェイスイメージングを行う上で有用なツールになると期待されている。

このタグ-プローブペアの先駆的な例として、テトラシステインタグと二つのヒ素を有するプローブの組み合わせがある³⁾。このタグ-プローブペアはヒ素とチオール基の特異的な親和性を利用している。すでにLumioタグとFIAsH(緑色)およびReAsH(赤色)の2種類のプローブがキット化され市販されている。タグはアミノ酸6残基程度から構成が可能であり、結合親和性が非常に高いことやタグとプローブが結合することで蛍光強度が顕著に増大することからバックグラウンド蛍光の影響を無視できるなどの利点がある。一方で、細胞内に内在しているシステインやグルタチオンなどのチオール基を有する分子により、タグとプローブの相互作用が阻害される可能性や、タグのシステイン残基が還元状態でないとプローブに結合できないことが問題点としてあげられる。また、プローブ中に存在するヒ

東京医科歯科大学生体材料工学研究所 (〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10)

ZIP tag-probe system: A fluorescence imaging tool for intercellular proteins

Wataru Nomura and Hirokazu Tamamura (Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890115

© 2017 公益社団法人日本生化学会

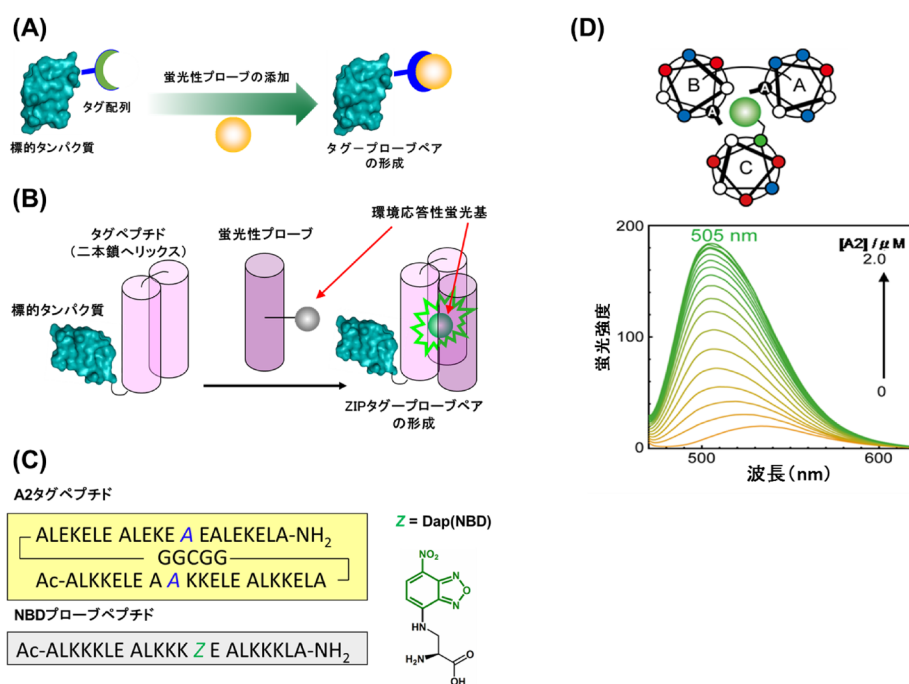


図1 タグ-プローブペアの概要と性質について

(A) タグ-プローブペアの概念。(B) ZIP タグ-プローブペアの形成。(C) A2 タグペプチド、NBD プローブペプチドのアミノ酸配列と環境応答性蛍光基。G2, L2 はそれぞれアラニン (青色, 斜体) の位置にグリシン, ロイシンを導入している。(D) タグ-プローブペア (A2 タグ/NBD プローブ) の形成と蛍光強度の増加と波長シフト。

素原子による細胞毒性なども懸念されている。他のタグ-プローブシステムとして、酵素ドメイン自体をタグとし、基質の蛍光誘導体をプローブとして利用した SNAP タグ、CLIP タグや Halo タグなどがある⁴⁾。これらは酵素の反応機構を人工的に改変することによって、酵素タグ自体が高い反応性と基質選択性でプローブと反応し、共有結合を形成することで蛍光ラベル化を達成する。利点としては、共有結合によるラベル化反応が速やかに進行することや、タグに対する基質部位と蛍光色素部分がプローブ分子において独立しているために幅広い蛍光色素誘導体を使用可能なことなどがあげられる。また、プローブ分子の膜透過性が高いため、細胞内タンパク質の蛍光ラベル化に成功した例も報告されている。しかし、蛍光タンパク質と同様に酵素であるタグの分子量が大きいことや余剰のプローブの洗浄操作が必要な点が問題点としてあげられる。

4. ZIP タグ-プローブシステムの構築

当研究室では、これまで逆平行三本鎖ロイシンジッパー構造の自己会合機構を基にしたタグ-プローブペアを開発してきた (図1B)⁵⁾。ループ構造で架橋された2本のヘリックスをタグとして利用し、1本のヘリックスをプローブとして疎水性環境下において蛍光強度が増大する環境応答性色素を導入した。このプローブではタグとの結合に

伴ってロイシンジッパー構造内部に疎水性のポケットが形成され、プローブ側に導入された環境応答性色素が収まることで蛍光強度と蛍光波長が大きく変化するため、遊離プローブとは容易に区別して標的タンパク質の蛍光イメージングが可能となる。我々が ZIP タグ-プローブペアと呼ぶシステムの主な特徴は以下のように考えられる。(1) 余剰プローブの除去操作が不要である。(2) 高い結合親和性と特異性でラベル化が可能である。(3) 蛍光団を交換することでさまざまな蛍光波長を持つプローブが設計可能である。(4) EGFP などの蛍光タンパク質や他のタグタンパク質と比較しても分子量が比較的小さく、標的タンパク質の性質に影響を与えにくい。(5) タグ配列が天然アミノ酸配列のみで構成されるため遺伝子操作で組込み可能である。また、タンパク質配列の末端に限らず、どのような位置にでも組込みが可能である。このことから、より簡便で迅速なタンパク質の選択的蛍光イメージングが可能となっている。プローブ側に導入する環境応答性色素としてまず分子量の小さい 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を用いた。ロイシンジッパー構造内部に形成される疎水性ポケットのサイズの最適化を図るため、タグペプチド側で疎水性ポケット形成に関わるアミノ酸をアラニン、グリシンまたはロイシンに置換した A2, G2 および L2 の設計、合成を行った (図1C)。これらのタグと NBD プローブペアについて HEPES 緩衝液中にて蛍光滴定実験を行い、タグ-NBD

プローブペアの結合親和性および蛍光応答性を評価した。その結果、A2タグ/NBDプローブペアが最も大きな変化を示し、結合に伴う約18倍の蛍光強度の増加と30nmの蛍光波長の短波長シフトがみられた(図1D)。プローブ単独では微弱な黄色の蛍光しか示さないのに対し、A2タグ/NBDプローブペアの溶液では明るい緑色の蛍光が観測された。さらに、A2タグ/NBDプローブペアの解離定数は17.5 nMであり、抗原-抗体並みの結合親和性を有していることがわかった。また、円二色性スペクトル測定から各タグ配列ペプチド(A2, G2, L2)とNBDプローブペプチドの二次構造についての検討を行った結果、NBDプローブペプチドとA2タグが一番安定な三本鎖 α ヘリックス構造を形成していることを確認した。細胞内のタンパク質の蛍光ラベル化に用いるためには、プローブペプチドが細胞内に存在するタグ以外の生体分子と非特異的に相互作用しないことが必要である。そこで、NBDプローブペプチドとウシ血清アルブミンとの蛍光滴定実験および細胞破碎液中でのA2タグ/NBDプローブペアの蛍光滴定実験を行ったところ、プローブペプチドと生体分子との非特異的な相互作用はみられなかった。以上のことからA2タグ/NBDプローブによるペア形成は細胞に存在するタンパク質の蛍光イメージングに十分利用できることが示された⁵⁾。

5. 細胞膜上に存在するケモカイン受容体の蛍光イメージングへの応用

このタグ-プローブシステムの利用としてまず細胞膜表面に存在するGタンパク質共役型受容体であるCXCR4を標的とした蛍光ラベル化実験を行った⁵⁾。CXCR4はいくつかのがん細胞で発現が亢進しており、ケモカイン受容体としてケモタキシス(走化性)によるがん細胞の転移などに関与することが知られている。またHIV感染時の第二受容体として利用されるため、HIV感染阻害の標的としても重要である。そのため我々の研究室ではCXCR4を標的としたペプチド性中分子の創製⁶⁾やケミカルバイオロジー研究⁷⁾を精力的に進めている。哺乳類細胞用発現プラスミドにおいてCXCR4のN末端側にタグの遺伝子配列を導入した。CXCR4との共局在を明らかにするためにCXCR4アンタゴニストであるペプチド性リガンドのT140誘導体に蛍光団TAMRAを導入した。これによってTAMRA-T140がCXCR4に結合した場合に細胞膜上でのCXCR4の位置が確認される。HeLa細胞培養液中にNBDプローブを加え共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った結果、TAMRA由来の蛍光との共局在が細胞膜表面で観察された(図2A)。

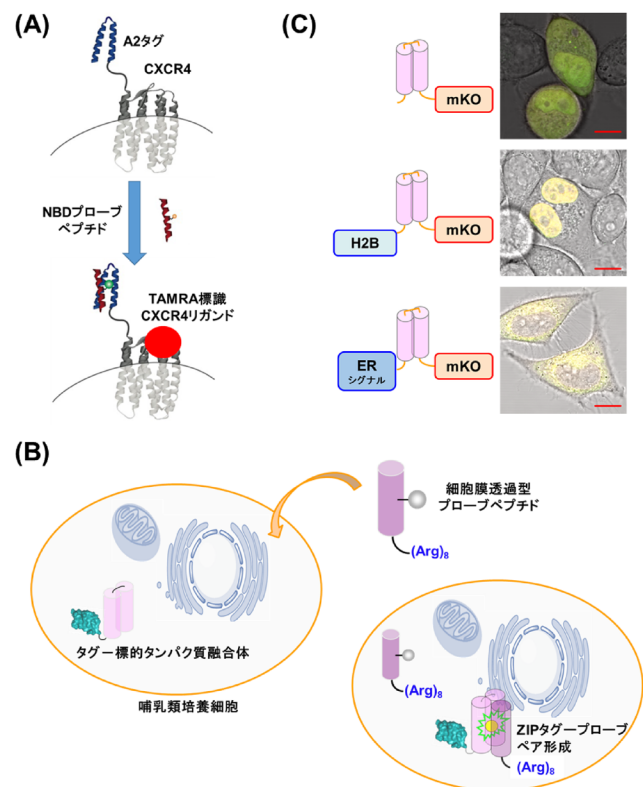


図2 タグプローブシステムを利用した細胞表面および細胞内のタンパク質イメージング

(A)細胞膜上のCXCR4に対する蛍光イメージング実験。(B)細胞膜透過型プローブペプチドを用いた細胞内タンパク質の蛍光イメージングの概要。(C)各標的モデルタンパク質の細胞内における局在解析。バーは10 μ mを示す。

6. 細胞内タンパク質局在変化を可視化する手法への応用

細胞膜に存在するCXCR4の可視化が可能なが示されたことから、次の段階として細胞内に存在するタンパク質の可視化に関する検討を行った⁸⁾。プローブペプチドに細胞膜透過性を付与することが必要となるため、細胞膜透過性ペプチドとして知られているオリゴアルギニンを利用することにした。種々の検討の結果、プローブペプチドのN末端側にオクタアルギニン(R8)配列[図2Bの(Arg)₈]を導入したR8-プローブペプチドにおいて、結合親和性は181nMでありやや低下がみられたものの、タグ-プローブ形成時の蛍光増加量は17倍であり、元のプローブペプチドと同等の値を得ることができた。オクタアルギニンを細胞へ導入する際に1-pyrenebutyrateで細胞を前処理することで効率的に細胞導入できることが知られている⁹⁾。1-pyrenebutyrateで細胞を前処理後に100nMのR8-プローブペプチドを加え、共焦点レーザー顕微鏡によって観察を行った(図2B)。細胞内でのタグの局在を可視化するための標識タンパク質として monomer Kusabira Orange

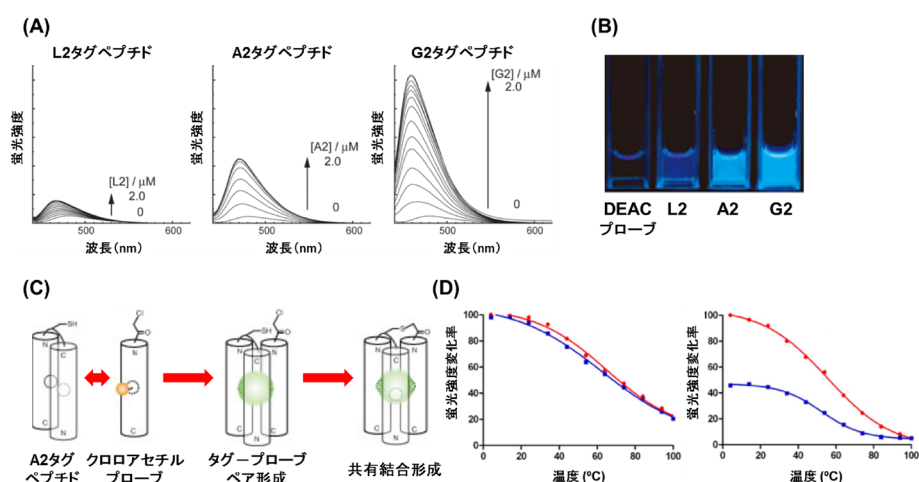


図3 タグプローブシステムの展開—環境応答性蛍光基の置換およびクロスリンク型デザインについて (A) DEACプローブのタグペプチド蛍光滴定実験について. (B) 各タグペプチドとDEACプローブのタグ-プローブペア形成時における蛍光量の比較. (C) クロスリンク型タグ-プローブペアの反応について. (D) 共有結合形成の有無による熱可塑性に関する比較. クロスリンク型(左)では昇温(赤線)から降温(青線)の変化時に100%蛍光強度が回復しているが, 非共有結合型(右)では50%程度しか回復しない.

(mKO) を利用した. また, 細胞内局在の違いによってタグ-プローブ形成機能に影響が生じないことを確認するために, ヒストンタンパク質 (H2B) あるいは小胞体 (ER) 局在シグナルペプチドとの融合タンパク質も同時に構築した. これらを標的タンパク質として細胞内で発現させた上でR8-プローブペプチドの添加を行っている. タグ-mKO 融合タンパク質では細胞全体で発現がみられ, R8-プローブとタグの会合によるNBDの蛍光も同様に観察された. H2B-タグ-mKOにおいては細胞核内でのみ蛍光の共局在が確認され, ER局在シグナル配列-タグ-mKOにおいては細胞質内で特徴的な局在を示す蛍光像が確認された. これらの結果からR8-プローブの細胞膜透過性によって細胞内に発現するタンパク質の可視化が可能であることが示された (図2C). 細胞内に発現するタンパク質の機能を解明する上で刺激による局在変化は重要な情報をもたらすと考えられる. 本システムにおいても細胞内での局在変化を追跡することが可能であることを証明するために, ホルポールエステルの添加によって起こるプロテインキナーゼC (PKC) の局在変化を例として検討を行った. 我々の研究室では, 複数存在するアイソザイムの中でも特にPKC δ に着目し, ジアシルグリセロール構造を環化して各官能基を固定化することでアイソザイム特異性を示す低分子リガンドの開発¹⁰⁾ やそれらを応用したケミカルバイオロジー研究¹¹⁾ などを行っている. PKC δ はホルポールエステル phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) を細胞に添加した場合, 細胞に存在する膜構造への局在を示すことがこれまでに知られている. よってタグ融合型PKCを用いて細胞内での局在変化をR8-プローブで追跡する検証を行った¹²⁾. この場合においてもPDBuの添加による局在変化後もNBD由

来の蛍光はmKO由来の蛍光と共局在を示していた. したがって, 本システムは局在変化などのダイナミックなタンパク質動態の追跡にも利用可能であることが明らかになった.

7. タグ-プローブシステムの機能拡張に関する研究

我々のタグ-プローブシステムの特徴として環境応答性蛍光基を置換することで異なる蛍光波長を示すプローブを構築できることがあげられる. NBDプローブと比較してより短波長側の蛍光波長を示す7-ジメチルアミノクマリン (DEAC) を利用したプローブの構築を行った. NBDと比較して分子量の大きくなるDEACのため, 疎水性ポケットについて最適化を行った. 上記に示したA2, G2, L2タグペプチドについて蛍光滴定実験による検討を行ったところNBDとは異なりG2タグが最大の蛍光増加量を示し, 約50倍という値を得た (図3A, B). DEACプローブでは蛍光スペクトルのピークが470nmであり, 505nm付近であったNBDプローブと併用できる可能性が示されている¹³⁾.

逆平行ロイシンジッパー構造の会合は非共有結合型であるため細胞内などにおける安定性が問題となる場合が考えられる. この課題を解決するためにプローブの末端にクロロアセチル基を導入し, タグの二本鎖ヘリックス構造をつなぐループ部分に導入したシステインとの共有結合形成について検討を行った (図3C). 結果としてNBDプローブのN末端にクロロアセチル基を導入した場合に架橋形成 (クロスリンク) がみられることが明らかになり, 当初想定していたとおり逆並行型ロイシンジッパー構造として会合していることもあらためて確認された. クロスリ

ンク型タグ-プローブシステムでは熱安定性も確認しており、蛍光強度変化で評価した T_m 値において非共有結合型と比較して約15°C上昇(55→70°C)することが確認され、熱可塑性を確認した場合においてもクロスリンク型では100%まで回復するのに対して、非共有結合型は昇温による熱変性後に降温した際の蛍光強度回復が50%ほどであることが確認された¹⁴⁾(図3D)。このことから共有結合型タグ-プローブシステムは構造安定性が高いと考えられる。

8. 今後の研究の展開、適用の拡張

現在バイオイメージング技術は、より成熟した技術としての開発に移行しているように見受けられる。例としてはより医療への応用を志向した研究開発、より解像度の高い詳細なイメージング技術の開発、また1分子イメージングといったこれまでは不可能であった分子単位でのイメージング技術の開発などである。加えて細胞内で起こるさまざまな反応についてより定常状態に近い条件下での解析などが求められている。具体例として、これまではラベル化したタンパク質を細胞内で強制発現させ、過剰量が存在する条件下での観察が主であり、これらの条件下では真の分子間相互作用が再現されているといいにくい場合も多数存在すると考えられる。我々のタグ-プローブシステムではタグ配列が天然アミノ酸から構成されており、遺伝子工学的にタンパク質の発現フレームへの組込みが可能である。最近になり意図した遺伝子配列部位に意図した変化を導入するゲノム編集技術の開発が加速している¹⁵⁾。我々の研究室ではゲノム編集技術で主に利用されているヌクレアーゼを基盤とした技術に加えて、より多様な遺伝子修飾、あるいはエピゲノム編集を可能にする技術に関する研究開発¹⁶⁾も進めてきており、ゲノム編集技術と本タグ-プローブシステムを融合させることで新たなイメージングツールの開発につながれると期待している。本システムでは、他のタンパク質ドメインを利用したシステムと比較して、タンパク質ドメインのフォールディング時間や共有結合形成にかかる時間などによるタイムラグが最小限に抑えられる。さらに、より多色の蛍光イメージング、より細胞内安定性の高いタグ-プローブペアシステムなどを開発し、組み合わせることでオンデマンド型蛍光イメージングシステムを構築できるものと期待している。

謝辞

本研究の立ち上げに尽力いただいた堤浩博士(東京工業大学)、機器の使用でご協力いただいた秋吉一成教授(京都大学)に御礼申し上げます。また、実験面で協力いただいた大橋南美博士、阿部清一郎、蓑友明、森あつみ各氏に感謝致します。本研究は日本学術振興会、文部科学省、旭硝子財団の助成を受けて行いました。

文 献

- 1) Griffin, B.A., Adams, S.R., & Tsien, R.Y. (1998) *Science*, **281**, 269–272.
- 2) Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N., & Miyawaki, A. (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 233–238.
- 3) Hoffmann, C., Gaietta, G., Zürn, A., Adams, S.R., Terrillon, S., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., & Lohse, M.J. (2010) *Nat. Protoc.*, **5**, 1666–1677.
- 4) Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Corrêa, I.R. Jr., Kindermann, M., Beaufils, F., & Johnsson, K. (2008) *Chem. Biol.*, **15**, 128–136.
- 5) Tsutsumi, H., Nomura, W., Abe, S., Mino, T., Masuda, A., Ohashi, N., Tanaka, T., Ohba, K., Yamamoto, N., Akiyoshi, K., & Tamamura, H. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9164–9166.
- 6) Tamamura, H., Xu, Y., Hattori, T., Zhang, X., Arakaki, R., Kanbara, K., Omagari, A., Otaka, A., Ibuka, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., & Fujii, N. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 877–882.
- 7) Tanaka, T., Nomura, W., Narumi, T., Masuda, A., & Tamamura, H. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15899–15901.
- 8) Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836–5840.
- 9) Takeuchi, T., Kosuge, M., Tadokoro, A., Sugiura, Y., Nishi, M., Kawata, M., Sakai, N., Matile, S., & Futaki, S. (2006) *ACS Chem. Biol.*, **1**, 299–303.
- 10) Tamamura, H., Bienfait, B., Nacro, K., Lewin, N.E., Blumberg, P.M., & Marquez, V.E. (2000) *J. Med. Chem.*, **43**, 3209–3217.
- 11) Nomura, W., Narumi, T., Ohashi, N., Serizawa, Y., Lewin, N.E., Blumberg, P.M., Furuta, T., & Tamamura, H. (2011) *ChemBioChem*, **12**, 535–539.
- 12) Nomura, W., Ohashi, N., Mori, A., & Tamamura, H. (2015) *Bioconjug. Chem.*, **26**, 1080–1085.
- 13) Tsutsumi, H., Abe, S., Mino, T., Nomura, W., & Tamamura, H. (2011) *ChemBioChem*, **12**, 691–694.
- 14) Nomura, W., Mino, T., Narumi, T., Ohashi, N., Masuda, A., Hashimoto, C., Tsutsumi, H., & Tamamura, H. (2010) *Biopolymers*, **94**, 843–852.
- 15) Gaj, T., Gersbach, C.A., & Barbas, C.F. III. (2013) *Trends Biotechnol.*, **31**, 397–405.
- 16) Nomura, W., Masuda, A., Ohba, K., Urabe, A., Ito, N., Ryo, A., Yamamoto, N., & Tamamura, H. (2012) *Biochemistry*, **51**, 1510–1517.

著者寸描

●野村 渉 (のむら わたる)

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所准教授。博士 (薬学)。

■略歴 2000年京都大学薬学部卒業。05年同大学院薬学研究科博士後期課程修了 (02~05年日本学術振興会特別研究員 (DC1))。同年スクリプス研究所博士研究員 (Carlos F. Barbas教授)。07年東京医科歯科大学学生体材料工学研究所助教。13年同講師。14年より現職。

■研究テーマと抱負 ペプチド~タンパク質を利用した新たな生体機能分子の構築。またゲノム、エピゲノム編集技術に関連する機能性分子の開発。

●玉村 啓和 (たまむら ひろかず)



東京医科歯科大学学生体材料工学研究所機能分子研究部門メディシナルケミストリー分野教授。薬学博士 (京都大学)。

■略歴 1988年京都大学薬学部卒業。同年同大学院薬学研究科修士課程入学。89年京都大学薬学部助手。97年同大学院薬学研究科講師。2005年助教授。同年東京医科歯科大学学生体材料工学研究所教授。この間、99年~2000年米国国立癌研究所

(National Cancer Institute/NIH) に留学 (Lab. Medicinal Chemistry, Dr. Victor E. Marquez, Chief)。

■研究テーマと抱負 ペプチドミメティックを基盤とした中分子創薬・ケミカルバイオロジー。抗HIV剤、抗がん剤等の創薬研究。有機化学と生化学の学際領域で活躍できる若い研究者を育成したい。

■ウェブサイト <http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/molb/molb-j.html>

■趣味 ワインを飲みながら paper を書くこと。