

研 究 報 告 書

「立体構造に基づく化学プローブ設計と蛋白質の機能制御・局在イメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研 究 者: 堀 雄一郎

1. 研究のねらい

近年、合成分子を用いて生体分子の機能を調べる化学アプローチが生命科学の新しい解析手法として発展しつつある。合成分子の利点は、自由度の高い分子設計が可能であるため、従来の生物学的手法では得られなかった生体分子の機能・局在情報が得られることである。本研究では、化学原理と蛋白質の立体構造情報に基づき合成分子の設計を行うとともに、蛋白質工学を組み合わせることで、生命科学の課題を解決する新しい化学ツールを開発することを目的としている。

蛋白質の機能や局在を明らかにする代表的な化学的手法として、タグ蛋白質とそれに特異的に結合する蛍光プローブを用いた蛋白質標識法が挙げられる。イメージング研究では、蛍光蛋白質がよく用いられるが、蛍光蛋白質は、サイズが大きいことや、恒常的に発現するため特定のタイミングでの動態解析が困難であることが問題として指摘されていた。これに対し、タグ蛋白質と蛍光プローブを用いた手法では、小さなサイズのタグ蛋白質を利用でき、特定のタイミングで標識できるため、蛍光蛋白質の問題を解決することが期待される。一方、この手法の問題は、遊離プローブの蛍光が原因となり、イメージングの S/N 比を低下させることや、遊離プローブの除去のための洗浄に時間を要することであった。

そこで、報告者は、遊離状態では非蛍光性で、蛋白質を標識すると蛍光性となる「発蛍光プローブ」の開発により、この問題の解決に取り組んだ。これまでに、紅色細菌由来 PYP をタグ蛋白質として、その特異的発蛍光プローブの開発を行ってきた。しかしながら、これまでに開発したプローブでは標識に 24 時間以上を要し、反応速度の向上が課題となっていた。本研究では、化学原理と蛋白質構造情報に基づいたプローブ設計と PYP 変異体の創製により、迅速かつ高い S/N 比で蛋白質をイメージングする技術を開発した。また、蛋白質動態の詳細な時空間解析を行うことができるように、異なる波長の蛍光を発する発蛍光プローブによるマルチカラーイメージング技術を開発した。実際に、これらの技術を生命現象の制御や疾病に関わる蛋白質の細胞内動態の解析へ応用した。更に、蛋白質の局在を視る技術から蛋白質の機能を視る技術へと発展させるべく、機能性分子と標識技術を組み合わせることで、合成分子で機能化した蛋白質を立体構造情報に基づき設計・開発した。

2. 研究成果

(1) 概要

研究テーマ A では、PYP タグと発蛍光プローブの標識速度を向上させるため、PYP タグの蛋白質工学的改変とプローブの化学原理に基づいた再設計を行った。PYP タグは酸性蛋白質であり、アニオン性プローブとの反応速度は静電反発のため遅い。そこで、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させることで、静電反発を緩和し反応速度を

向上させた。また、プローブの脱離基の pK_a に着目し、より脱離能の高い脱離基をプローブに組み込むことによって反応速度を向上させた。更に、この改変した蛋白質標識技術を用いて、アセチルヒストン結合蛋白質であるブロモドメインの局在解析とブロモドメイン阻害剤の阻害効果の可視化を行った。

研究テーマ B では、マルチカラー蛍光標識技術を開発し応用することで、グルコーストランスポーターGLUT4 の細胞内動態における糖鎖の役割を明らかにした。まず、4 つの蛍光色素と新たな消光基としてジニトロベンゼンを導入した発蛍光プローブを設計・合成した。更に、反応速度を向上させるため、 pK_a に着目した脱離基の再設計を行った。そのうち、生細胞イメージングにおいて最適なものを選択し、GLUT4 の細胞内動態の可視化に応用した。これらのプローブと組み合わせて糖鎖の欠失変異体や糖鎖形成阻害剤を用い、マルチカラーイメージング実験を行うことで、糖鎖が GLUT4 の膜局在の維持に関わることを示唆する知見を得ることができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「ラベル化速度向上のための PYP タグの改変とプローブの再設計」

A-1) 静電相互作用に着目した PYP タグ変異体の創製

ジメチルアミノクマリンをリガンド部位とした PYP タグの発蛍光プローブ TMBDMA 及び CMBDMAを開発した⁴。しかしながら、CMBDMA は TMBDMA に比べ感度が良いものの、反応速度が遅いことが分かった。そこで、CMBDMA のラベル化速度を向上させるうえで、タグとプローブの静電相互作用に着目した(図 1a)^{1,2}。PYP タグの立体構造情報から、リガンド結合部位の近くに複数の酸性アミノ酸(D71、E74、D97)が存在していることが分かっている。アニオン性である CMBDMA と PYP タグの反応性が低いのは、これらの酸性アミノ酸との静電反発によると考えられた。そこで、これらのアミノ酸を塩基性アミノ酸であるアルギニンに換えた変異体 PYP3R を創製し用いることで、静電引力を誘起させ反応速度が向上すると考えた。その結果、PYP3R は、野生型に比べ反応速度が約 11 倍向上した。当初予測していなかったことであるが、PYP3R に結合したプローブの蛍光強度は、野生型 PYPwt に結合した時に比べ、約 1.6 倍高くなること

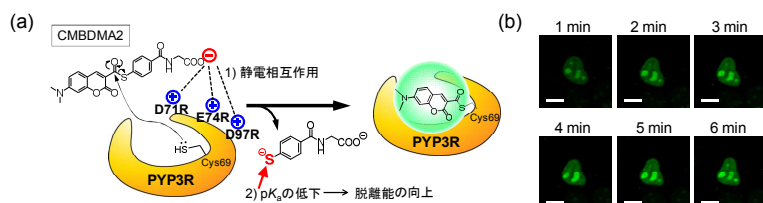


図 1. PYP 変異体と発蛍光プローブを用いた蛋白質ラベル化。(a) 静電相互作用に着目した PYP 変異体 PYP3R の創製と pK_a に着目したプローブ CMBDMA2 の開発。(b) CMBDMA2 による核局在化 PYP3R のイメージング。

A-2) pK_a に着目した脱離基の再設計

次に、更なる反応速度の向上のため、プローブの再設計に取り組んだ(図 1a)²。プローブは、チオエステル交換反応により PYP タグの Cys69 と共有結合し、このとき、プローブからチオール化合物が脱離する。ラベル化速度は、この脱離基の脱離能と相関し、脱離能はチオール化合物の pK_a と相関する。このため、 pK_a を低下させることにより、脱離能が高くなり、ラベル化速度が向上すると期待される。そこで、CMBDMA のチオフェノールの pK_a を低下させるため

に、パラ位にあるメチレンを除去し電子吸引性のカルボニルが直接結合した新規プローブ CMBDMA2 を設計・合成した。p*K_a* 計算プログラムである Epik を用いて p*K_a* を計算したところ、CMBDMA2 は、CMBDMA に比べ p*K_a* が約 1 低くなっていることが示された。ラベル化速度を検討したところ、CMBDMA2 は、CMBDMA に比べ 5.6 倍速く PYP タグに結合することが明らかとなった。次に、上述の PYP3R と CMBDMA2 を反応させたところ、PYP タグ(野生型)と CMBDMA の反応速度に比べ 18 倍反応速度が向上していることが判明した。さらに、PYP3R を細胞内に発現させ、CMBDMA2 により標識したところ、PYP-3R が特異的に標識され蛋白質の局在を可視化することができた。また、蛋白質は、約 1 分で検出できることが示された(図 1b)。

A-3) ブロモドメインとその阻害剤のイメージング解析への応用

更に、本技術のアセチル化ヒストンに結合するブロモドメインの局在の可視化解析に応用した²。BRD4 由来ブロモドメインを PYP3R に融合させ、標識したところ、核内から不均一な蛍光分布が確認された。興味深いことに、ブロモドメインとアセチル化ヒストンの結合阻害剤である JQ1 を添加したところ、その分布がより均一になった。以上のことから、ブロモドメインは、アセチル化ヒストンの豊富な領域に局在し、ブロモドメイン阻害剤によりアセチル化ヒストンから解離したことが示唆された。

以上をまとめると、変異体創製とプローブ再設計により、PYP タグとプローブのラベル化速度を向上させ、細胞内蛋白質の検出時間を 1 分にまで短縮することに成功した。また、本技術をブロモドメインとその阻害剤の生細胞解析へと応用できることを示した。

研究テーマ B「マルチカラーイメージング技術の確立と応用」

B-1) マルチカラーイメージングプローブの開発

上述のプローブは、リガンド部位と蛍光色素部位が一体化しており、異なる蛍光色素を導入して、波長の異なる蛍光を発するプローブを設計することができない。そこで、報告者は、桂皮酸リガンドを基本骨格とするプローブ FCANB に着目した。FCANB は、リガンド部位として桂皮酸誘導体、蛍光色素部位としてフルオレセイン、消光基部位としてニトロベンゼンを有している。フルオレセインは、遊離状態ではニトロベンゼンと分子内で会合し消光しているが、ラベル化に伴いニトロベンゼンが脱離し蛍光性となる。このプローブの蛍光色素部位に、より長波長の蛍光を発する色素を導入し、それらの色素に対応する消光基を組み込むことで、異なる波長の蛍光を発する複数の発蛍光プローブを設計することができる。報告者は、フルオレセインより長波長の蛍光を発する蛍光色素として、蛍光波長が 570~590 nm(黄色)である Cy3 または TAMRA、670~690 nm(赤色)である Cy5 または ATTO655 を選択した(図 2a)。また、消光基をニトロベンゼンからジニトロベンゼン誘導体へと変更した。更に、前述の p*K_a* に着目して脱離基を再設計する

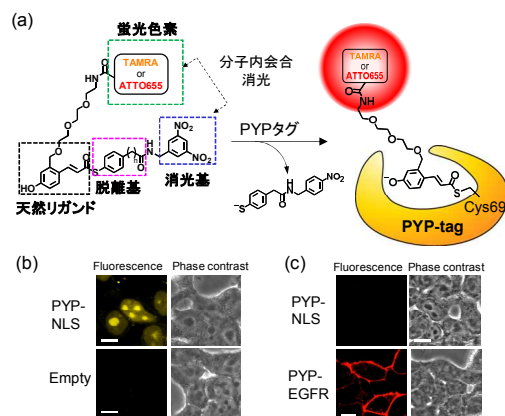


図 2. (a) 分子内会合消光を利用した発蛍光プローブの設計。(b) TAMRA-DNB による核局在化 PYP タグのイメージング。(c) AT-DNB2 による細胞膜局在化 PYP タグのイメージング。

更に、前述の p*K_a* に着目して脱離基を再設計する

ことで、反応速度に関しても検討した。これらの組み合わせの一連のプローブを設計・合成・評価した結果、黄色蛍光色素として TAMRA を組み込んだプローブ TAMRA-DNB と、赤色蛍光色素として ATTO655 を組み込んだプローブ AT-DNB2 が、標識に伴う蛍光強度変化(10 倍以上)及び標識速度(二次速度定数 $k_2 = 700 \sim 800$)において優れた結果を示した。次に、PYP タグを細胞核や細胞膜に発現させた細胞にこれらのプローブを添加し無洗浄でイメージングしたところ、TAMRA-DNB は細胞膜を透過し核内の PYP タグを標識できた(図 2b)。一方、AT-DNB2 は膜非透過性であり核内の PYP は標識できなかったものの、細胞膜表層に発現させた PYP タグを標識できた(図 2c)。

B-2) GLUT4 の細胞内動態解析への応用

開発したプローブを用いて、グルコース輸送体の一つである GLUT4 の細胞内動態を可視化した。GLUT4 は、2 型糖尿病に関わりのある蛋白質であり、インスリン刺激により細胞膜に移行し血中のグルコースを細胞内に取り込む役割を持っている。GLUT4 の膜移行が障害されることは、2 型糖尿病の一因となることから、その膜移行機構を明らかにすることは、生命科学・医学の観点から重要である。報告者は、GLUT4 の細胞外ループに PYP タグを挿入し発現させ(PYP-GLUT4)、AT-DNB2 を用いてインスリンによる PYP-GLUT4 の膜移行を可視化した。その結果、インスリン刺激により細胞膜から時間の経過とともに蛍光が観測され、インスリンを除去するとその蛍光が内在化し粒上になった。以上の結果から、PYP-GLUT4 は、インスリン応答性を保持しており、その動態を AT-DNB2 により追跡できることが分かった。

B-3) GLUT4 の糖鎖の細胞内動態への役割

GLUT4 は、細胞外の第一ループに N 結合型糖鎖が修飾された糖タンパク質であるが、その糖鎖の細胞内動態への役割には論争があり、現在のところ明確にはわかっていない。そこで、糖鎖形成を阻害するキフネンシンまたは GLUT4 の糖鎖欠失変異体(N57Q)を用いて、AT-DNB2 及び TAMRA-DNB による動態イメージング実験を行った。キフネンシン処置前に TAMRA-DNB で標識し、1 日静置した結果、GLUT4 は部分的にリソソームに移行したことが明らかとなった(図 3a)。また、キフネンシン処置の場合または GLUT4 N57Q を用いた場合において、インスリンと AT-DNB2 を同時添加したところ、その蛍光が細胞内から観測された(図 3a)。膜非透過性の AT-DNB2 の蛍光が細胞内から観測されたことから、次の仮説を立てた。GLUT4 に糖鎖がない場合や異常をきたしている場合、GLUT4 はインスリン刺激時に細胞膜移行はできるものの、膜局在を維持することなく迅速に内在化しているため、AT-DNB2 の蛍光が細胞内から観測されたのではないかと考えられた。そこで、実際に、膜移行が起きていることを確かめるために、キフネンシンもしくは GLUT4 N57Q を用いた実験で、インスリン刺激時に氷上で処置することで、エンドサイトーシスを阻害してイメージング実験を行った(図 3b)。その結果、膜上から蛍光が観測されたことから、糖鎖に異常がある場合でも過渡的に GLUT4 が細胞膜移行していることが分かった。以上の結果から、GLUT4 の糖鎖はイン

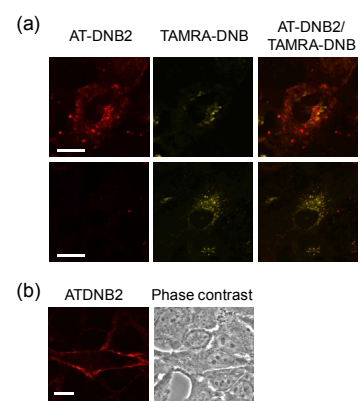


図 3. (a) キフネンシン処置細胞における AT-DNB2 及び TAMRA-DNB による PYP-GLUT4 のラベル化。(b) 氷上でインスリン刺激した際の PYP-GLUT4 の AT-DNB2 によるラベル化。

スリン刺激時における膜局在の維持に関わっていることが示唆された。このことは、PYP タグとその発蛍光プローブを用いて初めて明らかとなったことである。

3. 今後の展開

本研究では、化学原理と構造情報をもとに、プローブとタグ蛋白質を改変し、標識速度の向上に成功した。今後は、構造情報をもとに進化分子工学の手法を取り入れてタグ蛋白質を更に改変することにより、標識速度及び標識効率の一層の向上を図り、細胞内蛋白質をより高感度に検出することを目指す。また、蛋白質の動態を観測することで、糖鎖の役割を可視化解析することができた。合成プローブの利点の一つは、様々な機能を持った分子をプローブに組み込むことができることであり、タグ蛋白質標識技術を用いることで、細胞内でその機能を蛋白質に賦与することができることである。この点を活用し、機能性プローブを蛋白質に導入することで、蛋白質の局在のみならず、様々な生体分子情報を得られる技術へと進化させたい。合成分子と蛋白質の利点を活かすことで、従来の手法で見ることのできなかった生命現象を解明する技術革新へと結び付けたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、生命科学の課題に答える化学ツールを開発することを目的として、化学プローブによる蛋白質ラベル化技術の開発・最適化とその技術の生命現象可視化への応用、蛋白質の機能を視る技術の開発を行った。本さきがけ研究により、蛋白質ラベル化技術は実用化の水準にまで到達したといえ、実際の生理現象の解明への応用にも成功した。開発した発蛍光蛋白質ラベル化プローブは、生細胞での蛋白質検出時間の短さや、マルチカラーイメージングへの実用化の観点から、現在報告されているラベル化技術のなかでも最高水準にあるといえる。更に、合成分子で標識した蛋白質の機能化にも成功している。現段階では、その機能化蛋白質の研究は試験管レベルにとどまっているが、今後細胞レベルにおいて実証し、生理現象の解明に迫る成果が得られることが期待される。本研究では、化学の原理に加え、蛋白質の立体構造情報に基づき、化学プローブやタグ蛋白質が開発されており、また、領域内での共同研究の実施も行っており、このことは本領域に参画したことの成果といえる。

本研究では、報告者を中心として2名の技術補佐員と2名の大学院生を研究協力者として研究を遂行した。研究費は、主に技術補佐員の雇用や備品や試薬・器具類の購入に研究期間中に順調に執行されており、研究遂行に多大な貢献があった。

本研究で開発した蛋白質ラベル化技術は、蛋白質の生理的役割の解明に貢献するとともに、生命科学の幅広い分野の研究への応用が期待される。このため、市販化や他研究者への技術提供などによる技術の普及が今後重要となるといえる。また、研究テーマAにおいても示したように、本技術の応用で、阻害剤の効能を生細胞で検証することが可能であり、医薬品のアッセイ系への応用を見込むことができる。今後、実施例を増やし、その有用性を示していくことで、生命科学分野の研究ツールとして発展していくことが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

PYP を使った発蛍光プローブにおける、オン時間の短縮化、マルチカラー化、さらに、生体機能との関連化などを達成し、有機合成のみならず、PYP を遺伝子改変する側からのアプローチも行った。また、Regnase-1 の分解や GLUT4 の膜移行などの現象の可視化に開発システムを利用し、その proof-of-concept を証明した。

このようなプローブ開発研究は、良いアプリケーションと組み合わせた時にはじめて高く評価される。すなわち既存の技術ではできなかったことができるようになり、医学生物学的に重要な発見につながることを要求される。このことを意識して、応用先の生物学的トピックをまず慎重に選択し、それに役立つような技術という視点で開発するというのが今後ますます必要になると思われる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yuko Kamikawa, Yuichiro Hori, Kazuo Yamashita, Lin Jin, Shinya Hirayama, Daron M Standley, Kazuya Kikuchi, "Design of a Protein Tag and Fluorogenic Probe with Modular Structure for Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", Chemical Science, in press
2. Yuichiro Hori, Shinya Hirayama, Motoki Sato, Kazuya Kikuchi, "Redesign of a fluorogenic Labeling System to Improve Surface Charge, Brightness, and Binding Kinetics for Imaging the Functional Localization of Bromodomains", Angewandte Chemie International Edition, 2015, Vol. 54, No. 48, 14368-14371.
3. Reisuke Baba, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi, Intramolecular Long-Distance Nucleophilic Reactions as a Rapid Fluorogenic Switch Applicable to the Detection of Enzymatic Activity, Chemistry -European Journal 2015, Vol. 21, No.12, 4695-4702.
4. Yuichiro Hori, Tomoya Norinobu, Motoki Sato, Kyohei Arita, Masahiro Shirakawa, Kazuya Kikuchi, "Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol.135, No.33 12360-12365. (Featured in JACS Spotlights)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 菊地 和也, 堀 雄一郎, 乙村 法道
発明の名称: メチル化 DNA を蛍光標識する方法
出 願 人: 国立大学法人大阪大学
出 願 日: 2014/8/1
出 願 番 号: 特願 2014-158061 号

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yuichiro Hori, “Development of protein-labeling probes with fluorogenic switches for imaging cellular events”, Pacificchem2015, Honolulu, Hawaii, December 17, 2015 (招待講演)
2. Yuichiro Hori, “Fluorescent probes for in vivo imaging and epigenetic analysis”, 日本化学会第 94 春季年会アジア国際シンポジウム, 千葉, March 27, 2015 (招待講演)
3. Yuichiro Hori, “Development of Chemical Tools for Imaging Protein Localization and Epigenetic Phenomena”, Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014, Bern, Switzerland, October 3, 2014 (招待講演)
4. Yuichiro Hori, “Development of Fluorogenic PYP-tag Probes for Quick Live-Cell Imaging of Interacellular Proteins,” EPFL-OU workshop, Lausanne, Switzerland, September 30, 2014 (招待講演)
5. 堀 雄一郎、「環境応答性発蛍光プローブと PYP タグを利用した細胞内蛋白質抗争イメージング技術の開発と生物応用」、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 部会講演賞受賞 (2013/09/27)