

日本ーフランス 国際共同研究「分子技術」 平成29年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	発蛍光プローブのデザイン・合成による蛋白質機能の細胞内局在履歴の「記憶型」イメージング
研究課題名（英文）	Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMOEY imaging
日本側研究代表者氏名	菊地 和也
所属・役職	大阪大学大学院工学研究科・教授
研究期間	平成28年 9月 1日～平成32年 3月31日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
菊地 和也	大阪大学・大学院工学研究科・教授	研究統括
堀 雄一郎	大阪大学・大学院工学研究科・准教授	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
蓑島 維文	大阪大学・大学院工学研究科・助教	有機合成実験担当
有菌 賢志	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生 (M2)	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
山崎 康平	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生 (M2)	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
森 和真	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生 (M2)	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
渡部 圭一郎	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生 (M1)	有機合成実験担当

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

前年度までに作成した PYP や β -lactamase と GLUT4 のコンストラクトを HeLa 細胞やその他の細胞で一過性もしくは安定発現させ、発現の最適化を行う。また、HeLa 以外の細胞として、脂肪細胞や筋肉細胞などの各種細胞への遺伝子導入・発現を行う。これらの細胞への遺伝子導入は、遺伝子導入試薬に加え、エレクトロポレーションやウイルスベクターを用いて、最適化する。

発現の確認は、ウェスタンブロットや PYP ラベル化蛍光プローブや PYP や β -lactamase とともに GLUT4 に導入した蛍光蛋白質の蛍光を指標にイメージング実験によって行う。また、GLUT4 融合蛋白質のインスリン添加時の動態変化や内在化を蛍光イメージングによって明らかにする。

3. 【日本側研究チームの実施概要】

膜蛋白質の細胞内局在の変化は、その膜蛋白質の機能の制御に関わることが知られている。このため、膜蛋白質の生理的役割を明らかにするうえで、細胞内動態を解明する技術の開発は極めて重要である。現在、蛋白質の細胞内動態を調べる技術として、免疫染色法と蛍光蛋白質によるイメージング法が広く用いられている。しかしながら、免疫染色法は細胞固定を伴うため、生細胞における蛋白質の局在をリアルタイムで見ることができない。これに対し、蛍光蛋白質は、蛋白質の生細胞動態を検出する強力な手法である。一方、蛍光蛋白質は、発現後自動的に蛍光団が成熟するために、標的蛋白質の局在に応じて蛍光シグナルを制御することが困難である。そこで、本研究では、この問題を解決するため、合成分子を用いた新たな蛋白質動態検出技術の開発に取り組んだ。

本研究では、細胞膜非透過性で特定のタグ蛋白質と特異的に反応する合成分子を用い、標的とする膜蛋白質が、細胞膜に移行したときのみシグナルを検出することのできるシステムを構築した。まず、タグ蛋白質としては、紅色細菌由来 PYP タグと大腸菌由来 β -lactamase を用いた。前者のタグでは、クマリンや桂皮酸の誘導体をリガンドとタグが特異的に共有結合することを利用する。これまでに、我々は、タグと反応すると蛍光強度を増大させるプローブの開発を行ってきた。後者のタグでは、 β -ラクタム構造を持つ分子が酵素反応により加水分解されることを利用して、発色する分子が開発されている。本年度は、これらのタグと分子を利用することで、グルコース輸送体の一種である GLUT4 の細胞膜移行を検出する技術を開発した。GLUT4 は、通常は、細胞内の貯蔵小胞に存在するが、インスリン刺激により細胞膜に移行する。蛍光蛋白質を GLUT4 に融合させてイメージングを行った場合、細胞内で蛍光は観測されるが、わずかな量の細胞膜移行を検出することは、困難であった。我々の開発した PYP タグシステムでは、細胞膜非透過性のプローブを用いることで、細胞膜に移行した GLUT4 のみを選択的に蛍光検出することができることが分かった。更に、細胞膜に移行した GLUT4 が細胞内に内在化する過程を捉えられるように、タグを改変した。また、 β -lactamase を用いたシステムでは、細胞膜非透過性の発色分子を用いることで、GLUT4 の細胞膜移行を吸光度の増加により検出することが可能であった。このシステムでは、酵素反応のシグナル増幅を利用することで、インスリン非存在下のわずかなレベルでの GLUT4 の細胞膜移行を検出することができた。なお、これらのシステムでは、一過性発現や安定発現の条件を検討している。今後、 β -lactamase のシグナル増幅を蛍光検出できる分子を開発し、より高感度な細胞内動態検出システムを開発していく予定である。