

## 論文内容の要旨

論文題目      **Imaging of Conformational Changes of Proteins with a New Environment-Sensitive Fluorescent Probe Designed for Site-Specific Labeling of Recombinant Proteins in Live Cells**

(組換え蛋白質の特定部位を細胞内で標識可能な環境感受性蛍光プローブによる  
蛋白質構造変化の生細胞内可視化)

氏名              中西 淳

### [序]

細胞内情報伝達に関わる蛋白質は、極めて動的に構造を変化させるため、その生きた細胞内での可視化は、細胞の分子機構を理解する上で重要である。環境感受性蛍光プローブは、環境の疎水性変化に応じて蛍光波長や量子効率が大きく変化する蛍光色素で、蛋白質の構造変化の研究に用いられてきた。しかし、従来の環境感受性蛍光プローブは、細胞内に多数存在するシステイン残基のチオールに反応性であるため、蛋白質の特定の位置に一つの分子を導入するのが困難であった。また、蛍光標識は細胞外で行うため、生きた細胞内で用いられる例は数少なかった。本研究では、Tsien らが開発した細胞内での組換え蛋白質の蛍光標識法の概念を利用して、細胞内で蛋白質の特定部位に標識可能な新規環境感受性蛍光プローブを設計・合成し、このプローブ分子を用いて生細胞内で蛋白質構造変化の可視化・検出を行った。

### [原理・設計]

上記の目的のために、分子内に2つのヒ素原子を持つ新規環境感受性蛍光プローブ分子を合成した。これらの化合物はヒ素原子を介して、遺伝子工学的に導入した $\alpha$ ヘリックス中の i, i+1, i+4, i+5 番目の4つのシステイン (4Cys-motif) に特異的に結合する (図 1 a)。そのため、細胞外に蛍光プローブを投与すると、プローブは細胞膜を透過して細胞内の4Cys-motifを持つ組換え蛋白質を特異的に蛍光標識できる。蛍光プローブは分子環境に対する感受性が高いため、プローブの蛍光強度・波長の変化を指標にして、生きた細胞内で蛋白質の構造変化を検出することが可能である (図 1 b)。

合成した蛍光プローブは、BArNile-EDT<sub>2</sub> (Bisarsenical nile red analogue, bis-EDT adduct) と mansyl FlAsH-EDT<sub>2</sub> (mansyl fluorescein argenical helix binder, bis-EDT adduct) である (図 2)。前者は、環境感受性蛍光色素 nile red 類縁体の蛍光団に直接2つのヒ素原子を導入したのに対し、後者は Tsien らによ

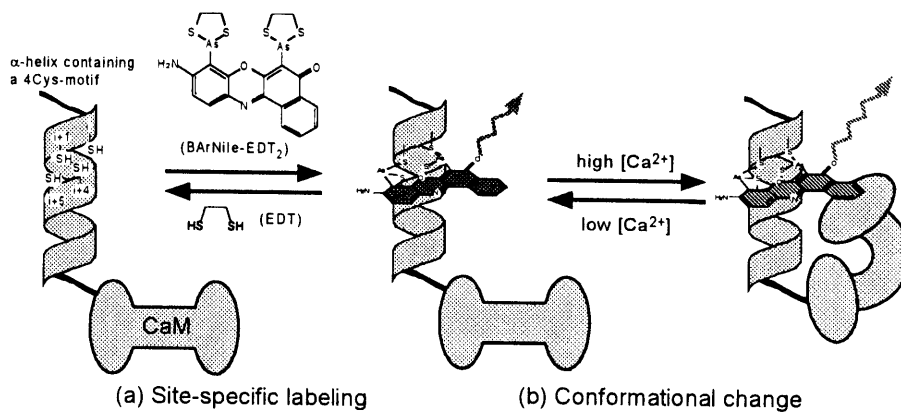


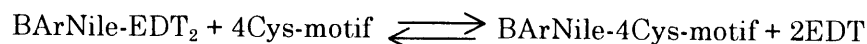
図1. BArNile-EDT<sub>2</sub>を用いた蛋白質構造変化検出の概略図

る報告から 4Cys-motif に結合すると知られている FIAsh-EDT<sub>2</sub> に、環境感受性蛍光団である mansyl chloride を結合させたものである。

標識する蛋白質として、水溶液中でもヘリックス構造をとり、且つ 4Cys-motif を含む 17 残基のペプチド (AEAAAREACCRECCARA) を、Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質のカルモデュリン (CaM) の C 末に連結させた、CaM-helix を遺伝子工学的に合成した。CaM は Ca<sup>2+</sup>濃度依存的に構造変化して疎水性ドメインを露出するため、CaM の構造変化に伴い蛍光プローブの分子環境が変化し、蛍光強度・波長が変化すると期待される。

#### [BArNile-EDT<sub>2</sub>を用いた細胞外・細胞内での 4Cys-motif の特異的標識]

細胞外において BArNile が 4Cys-motif を特異的に標識することを、C18 逆相 HPLC における保持時間の変化を指標に評価したところ、以下の式に基づく可逆的な標識反応であることが分かった。



また、非蛍光性の BArNile-EDT<sub>2</sub> が 4Cys-motif に結合すると蛍光強度を増大させることが、蛍光光度計におけるスペクトル測定から分かった。

続いて、生きた細胞に BArNile-EDT<sub>2</sub> を投与することによって、細胞内の 4Cys-motif を特異的に標識可能か評価した。CaM-helix の C 末に GFP の変異体の YFP を連結した CaM-helix-YFP を遺伝子工学的に合成した。CaM-helix-YFP に BArNile が結合・解離すると、YFP と BArNile 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の効率が変化するため、これを指標にして細胞内での BArNile-EDT<sub>2</sub> の 4Cys-motif への特異的な標識を評価することができる。CaM-helix-YFP を発現したヒト腎臓細胞由来の細胞株 HEK293 細胞を、BArNile-EDT<sub>2</sub> とインキュベート後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光像を観察した (図 3a,b)。標識前と比べると、BArNile が 4Cys-motif を標識したために明らかに赤色 (~600nm) の蛍光強度が増大しており、ここに EDT を加えると (I) 式に基づいて BArNile-EDT<sub>2</sub> が 4Cys-motif から解離して FRET が解消されるため、図 3c に示すように YFP の蛍光は増大し BArNile の蛍光は減少した。コントロールとして、YFP のみを発現した細胞を BArNile-EDT<sub>2</sub> とインキュベートしたものでは、EDT を加えても蛍光の変化は見られなかった (図 3d)。このことから、生細胞に BArNile-EDT<sub>2</sub> をふりかけることによって、細胞内の 4Cys-motif を特異的に標識すること可能であることが実証できた。

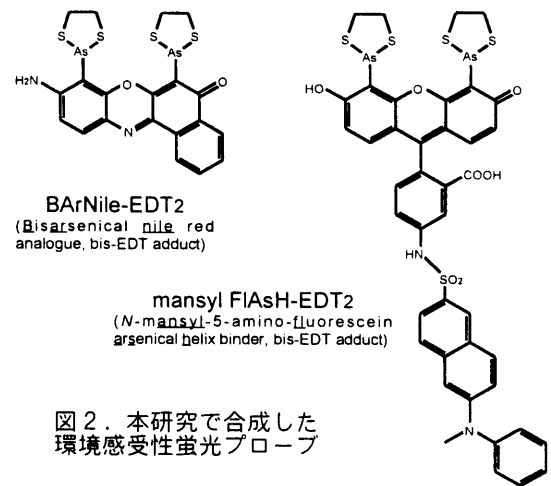


図2. 本研究で合成した環境感受性蛍光プローブ

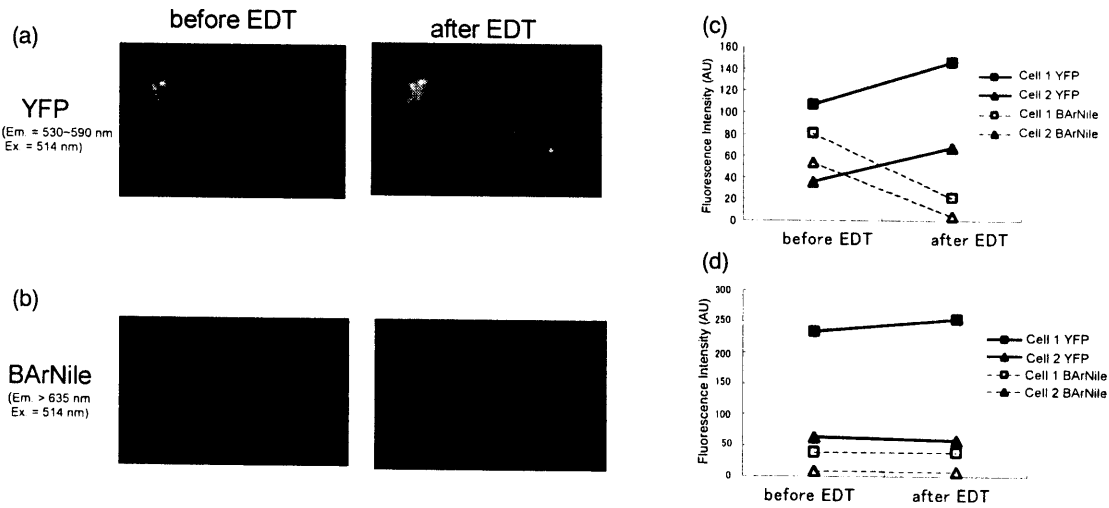


図3. BArNile-EDT<sub>2</sub>を用いた細胞内での4Cys-motifの特異的な標識のFRETによる評価. CaM-helix-YFPを発現したHEK293細胞をBArNile-EDT<sub>2</sub>と3時間インキュベートした後、1 mMのEDTを作用させた. EDT作用前後の(a)YFP, (b)BArNileに対応する蛍光像と、(c)イメージ中の二つの細胞における蛍光強度変化. (d)コントロール実験として、YFPのみを発現した細胞にBArNile-EDT<sub>2</sub>を4.5時間インキュベート後に、同様に1 mMのEDTを作用させた際のYFPとBArNileの蛍光強度変化.

### [BArNile-EDT<sub>2</sub>を用いたカルモデュリンの構造変化の検出]

細胞外において、BArNileで蛍光標識したCaM-helixは、図4に示すようにCa<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴い蛍光強度が増大することが分かった.

CaM-helixを発現したHEK293細胞を、BArNile-EDT<sub>2</sub>とインキュベート後、その蛍光像を蛍光顕微鏡で観察した(図5a). 細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度を増大させるために、1 mMのアデノシン5'-三リン酸(ATP)を加えると、蛍光強度が瞬時に増大した後、徐々に減少した(図5b). 続いて、Ca<sup>2+</sup>イオノフォアのイオノマイシンを加えて細胞膜のCa<sup>2+</sup>透過性を上げると、さらに蛍光強度が増大した. 細胞外のCa<sup>2+</sup>をEGTAでキレートすると、蛍光強度は減少した. これらの蛍光強度の時間変化は、別の細

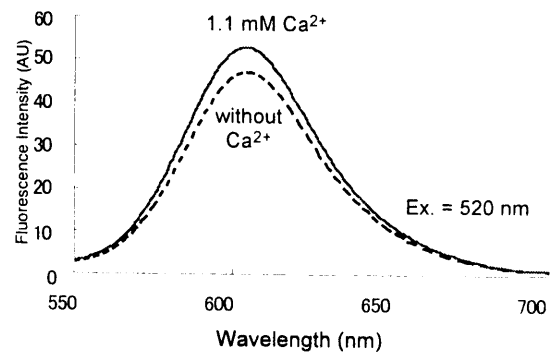


図4. 細胞外においてBArNileで蛍光標識したCaM-helixのCa<sup>2+</sup>存在下・非存在下での蛍光スペクトルの変化.

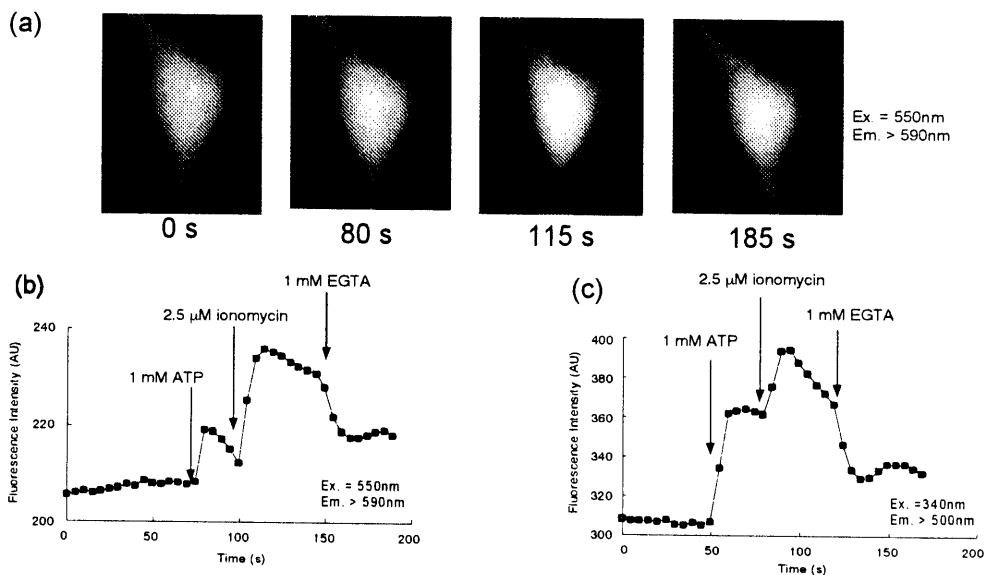


図5. BArNile-EDT<sub>2</sub>を用いた生きた細胞内でのCaMの構造変化の可視化・検出. a)BArNileで標識したCaM-helixの蛍光像. b)BArNileで標識したCaM-helixの蛍光強度の時間変化. c)Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬Fura 2をloadした細胞における、蛍光強度の時間変化.

胞における  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fura 2 を用いた蛍光変化 (図 5c) と一致していた。このことから、生きた細胞内において CaM の構造変化を検出できることが分かった。

**[mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> を用いた細胞外でのカルモデュリンの構造変化の検出, 及び細胞内での蛍光標識]**

細胞外で mansyl FIAsh で標識した CaM-helix は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変化に伴い 30% 程度の蛍光強度変化が観察された (図 6)。この蛍光変化は、BArNile で標識した CaM-helix (10%) よりも大きな蛍光変化で、また観察される蛍光強度も BArNile よりも大きかった。

続いて、mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> を細胞外に投与することによって、細胞内の 4Cys-motif を標識可能か評価した。mansyl FIAsh の FRET のドナーとしては、BArNile の時に用いた YFP ではなく CFP が適しており、CaM-helix-CFP を遺伝子工学的に

作成した。CaM-helix-CFP を発現した HEK293 細胞と mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> をインキュベートしたところ、mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> は CaM-helix-CFP の発現の有無に関わらず、すべての細胞から弱い蛍光が発せられた。ここに EDT を加えても、CFP と mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> の蛍光が変化しなかった (図 7)。これは、mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> は細胞膜透過性が低い

ため、細胞内に浸潤しなかったためと考えられる。今後、microinjection による蛍光プローブの細胞内導入、及び、膜透過性を増加させた mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> の誘導体の合成を検討している。

**[結論]**

本研究では、細胞内で蛋白質の特定部位を蛍光標識できる環境感受性プローブを初めて合成し、それを用いた生細胞内での蛋白質の構造変化の可視化・検出法の開発を行った。

BArNile-EDT<sub>2</sub> は 4Cys-motif を導入した CaM の組換え蛋白質を細胞内で特異的に標識することが可能で、プローブの蛍光変化を指標にして生きた細胞内で CaM の構造変化を可視化・検出できた。一方、mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> は、細胞外において CaM の構造変化をより高感度に検出できたものの、細胞内で 4Cys-motif を標識することはできなかった。今後、膜透過性を増大させた誘導体を合成する予定である。

これらのプローブ分子は、蛋白質中の特定の  $\alpha$ ヘリックスを蛍光標識可能であるため、X 線結晶構造や NMR による立体構造の知見を基に、合理的に 4Cys-motif の導入部位をデザインできる。そのため、他の情報伝達分子の構造変化を生細胞内で可視化・検出するための一般的な方法論として期待される。

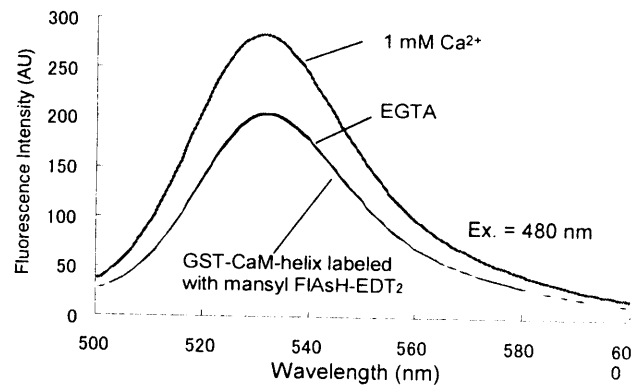


図 6. 細胞外においてmansyl FIAshで蛍光標識した GST-CaM-helixの、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下・非存在下での蛍光スペクトルの変化

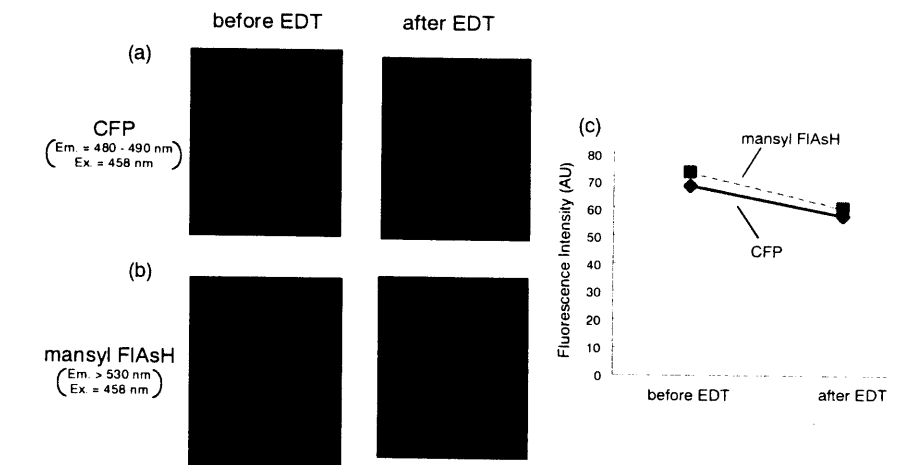


図 7. mansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub> を用いた細胞内での4Cys-motifの標識のFRETによる評価。CaM-helix-YFPを発現したHEK293細胞をmansyl FIAsh-EDT<sub>2</sub>と30分インキュベートした後、5 mM EDTを作用させた。EDT添加前後の(a)CFP、(b)mansyl FIAshに対応する蛍光像と、(c)蛍光強度変化。