

細胞内蛋白質工学のための革新的プローブラベリングシステムの開発

Development of Innovative Probe Labeling System for *In-Cell* Protein Engineering

長岡技術科学大学 築地真也

現在、生きた細胞内の対象蛋白質に蛍光色素、NMR プローブ、光架橋剤などの「合成プローブ」を選択的に修飾（ラベル化）する手法の開発が求められている。このようなプローブラベリング技術は、既存の GFP テクノロジーやその他の分子生物学的手法では実現できないさまざまな化学的アプローチによる生体機能解析を可能にする。これまでに細胞内蛋白質のラベル化法として、SNAP-tag などのタグ蛋白質を利用した手法が報告されている。それらの手法は蛋白質“末端”へのプローブ標識法として極めて有用である。一方、合成プローブラベリングのポテンシャルを最大限に発揮するためには、末端修飾法だけでは不十分である。例えば、環境応答性蛍光色素を用いてバイオセンサーを構築したり、光架橋剤を用いて蛋白質複合体を捕捉しようとする場合、プローブ分子は末端よりもむしろ蛋白質“本体”の特定部位へ修飾することが望ましい。しかし、細胞内で使用でき、機能を損なわず、対象蛋白質の本体の特定部位へ合成プローブをラベル化可能な手法というのはこれまで手つかずの状態であった。

我々は、有機化学的アプローチをもとにこの難題に取り組み、「リガンド指向型トシル (LDT) 化学」と命名した新規の蛋白質ラベル化技術を開発することに成功した (*Nat. Chem. Biol.* 2009)。LDT 化学では、標的蛋白質に結合するリガンドと任意の合成プローブを求電子性フェニルスルホン酸エステル（通称トシル基）によって連結した化合物をラベル化剤として用いる。このラベル化剤は、標的蛋白質に選択的に結合し、そのリガンド結合部位近傍の求核性アミノ酸とトシル基が反応することでプローブ分子が標的蛋白質に修飾される。このとき、リガンド部位はラベル化剤骨格から切り離されるため、標的蛋白質の活性は保持される。すなわち、LDT 化学は、標的蛋白質の機能を損なわず、その蛋白質本体への部位特異的なプローブラベリングを実現する世界初の手法である。これまでに我々は、本手法を用いることで、赤血球内の内在性炭酸脱水酵素に ^{19}F NMR プローブを導入し、その蛋白質と阻害剤との結合を *In-Cell* ^{19}F NMR によって検出することなどに成功している。

一方、LDT 化学はまだ誕生して間もなく、その応用についてはまだ十分検討されていない。そこで本研究では、LDT 化学をより実用的な細胞内蛋白質エンジニアリングツールとして発展させることを目的とした。具体的にはまず、LDT 化学の蛍光 *live-cell* イメージングへの応用に挑戦した。詳細は割愛するが、LDT 化学を用いて細胞内在性 FKBP12 を蛍光標識し、その蛍光ラベル化 FKBP12 と mCherry 融合 FRB の相互作用を細胞内 FRET によって可視化できることを実証した (*J. Am. Chem. Soc.* 2013)。また、LDT 化学と遺伝子工学を融合するという新しいアプローチを展開し、従来の LDT 化学よりもより高速かつ高効率に標的蛋白質を修飾可能な新しいプローブラベリング基盤を構築することに成功した。本研究から得られた成果は、LDT 化学による合成プローブラベリングのポテンシャルと実用性を飛躍的に拓げるものと期待される。