

# 膜タンパク質を可視化する蛍光スイッチプローブの開発

## Development of Probe with Fluorescence Switch for Imaging Membrane Protein

九州大学 堀 雄一郎



細胞膜タンパク質は、細胞内で生合成され細胞膜に移行した後、再度エンドサイトーシスと呼ばれるプロセスにより内在化するだけでなく、もう一度細胞膜に再移行したり、ゴルジ体と呼ばれる小器官に移行したり、分解器官であるリソソームへ移行するなど多様な運命をたどる。また、ある種のがん細胞では、細胞膜タンパク質は、遺伝子が貯蔵されている核やエネルギー産生を司るミトコンドリアといった小器官など通常では見られない場所に移行することも報告されている。このように、膜タンパク質は、必要なタイミングで様々な場所へ移動し機能を発揮するとともに、時には異常な動態を示すことで、細胞の生理機能の制御と疾病の発症に深く関わっている。このため、膜タンパク質の細胞内動態や分解を可視化し、その制御機構を明らかにすることは、生命科学と医学の大きな課題といえる。

我々のグループは、タンパク質の局在とその制御機構を明らかにすべく、独自のタンパク質ラベル化・イメージング技術を開発してきた。この技術では、遺伝子工学の手法を用いて、ある特定の化合物と結合するタグタンパク質と呼ばれるものを、動態を調べたいタンパク質に融合させて細胞内に発現させる。その化合物に蛍光色素を連結した蛍光プローブと呼ばれるものを細胞に添加すると、プローブが細胞内でタグタンパク質に結合し、融合させた目的タンパク質の細胞内における場所や動きを、プローブから観測される蛍光シグナルにより可視化することができる。我々は、独自のタグタンパク質である PYP タグと名付けたものを用い、その蛍光プローブを開発し、様々なタンパク質を可視化することに成功してきた。特に、この技術を用いて、膜タンパク質の動態を可視化し、その動態制御機構を明らかにする研究に取り組んできた。標的とした膜タンパク質は、2種類あり、1つはがん細胞の増殖に関わる EGFR と呼ばれる受容体タンパク質と、糖尿病の発症に関わるグルコース輸送体 GLUT4 である。これらのタンパク質の発現量や動態の異常は、疾患の発症に関わることが知られている。

膜タンパク質は、細胞膜から細胞内に内在化する過程で、その周辺環境の pH が徐々に低下し酸性化していくことが知られている。これまでの我々の研究で開発してきた蛍光プローブは、この pH 変化を捉えることができず、内在化の進行度合いを明確にすることができなかった。そこで、この問題を解決するために、本研究では、PYP タグをラベル化すると蛍光性となり、pH が低下すると蛍光波長が変化し、PYP タグが分解すると蛍光強度が低下するマルチスイッチ機能を有する蛍光スイッチプローブを開発した。本講演では、この蛍光スイッチプローブの分子設計戦略と *in vitro* での評価結果の詳細について報告する。更には、このプローブを用いて、上記二つの膜タンパク質に PYP タグを融合し、その生細胞イメージングを行ったことから、その結果についても講演する。

【キーワード】膜タンパク質ラベル化、蛍光スイッチプローブ

【参考文献】

- ・堀 雄一郎、菊地 和也「GLUT4 の細胞内動態を可視化する 化学アプローチで明らかとなった糖鎖の役割」、化学と生物、55, 659-660 (2017) [https://katosei.jsbba.or.jp/download\\_pdf.php?aid=862](https://katosei.jsbba.or.jp/download_pdf.php?aid=862)
- ・Kamikawa, T., Hori, Y. *et al.* Bioisostere-conjugated fluorescent probes for live-cell protein imaging without non-specific organelle accumulation. *Chem. Sci.* **15**, 8097-8105 (2024) DOI: [10.1039/d3sc06957e](https://doi.org/10.1039/d3sc06957e)