

マルチ蛍光スイッチプローブによる GLUT4 の細胞内動態の可視化

Imaging of Intracellular GLUT4 localization Using Protein-Labeling Probe with Multiple Fluorescence Switches

(日本化学会推薦)

代表研究者 九州大学

堀 雄一郎

Kyushu University

Yuichiro HORI

Understanding the dynamics of proteins in living cells is critical for deciphering biological systems and developing new therapeutic approaches. We have developed a protein labeling platform based on the PYP-tag and its tailored fluorescent probes, which has enabled us to image protein localization and dynamics with high specificity. In earlier studies, we developed protein-labeling probes with OFF-ON-OFF type fluorescence switch to visualize intracellular protein degradation. This probe, however, lacked detectability to pH change associated with endocytic trafficking. In this study, we report the development of an advanced fluorescent probe capable of responding to both acidic pH environments and lysosomal degradation events (Figure 1). This dual functionality allows for real-time observation of membrane protein internalization followed by degradation. This probe was thus applied to imaging of intracellular translocation of GLUT4, which is known to show multiple subcellular localization. By capturing both pH-dependent changes during endocytosis and subsequent protein degradation, this system offers a more complete picture of the endocytic pathway. This innovation not only enhances our ability to study the spatiotemporal regulation of membrane proteins but also provides a valuable tool for probing cellular processes relevant to disease mechanisms. The ability to monitor multiple cellular events with a single probe opens new avenues for research in cell biology and drug development.

研究目的

タンパク質の発現および局在の動的な変化は、生体内の恒常性や生理機能の維持に重要な役割を果たす。特に、ある種の膜タンパク質は、細胞膜とオルガネラ膜や小胞膜をシャトルするとともに、細胞内の複数の部位に同時に局在し、その機能を制御している。これらの膜タンパク質の発現や局在の異常は、がんや生活習慣病をはじめとする様々な疾患の原因となることが知られている。そのため、生細胞内でタンパク質がどこに、どのように局在・移行しているのかを精密に可視化することは、生命科学や医学における重要な課題といえる。

この課題を達成するために、我々は PYP タグと呼ばれるタグタンパク質と独自の化学スイッチを備えた合成蛍光プローブを用いたタンパク質ラベル化技術を開発し、タンパク質の発現、移行、分解の可視

化を実現してきた。開発してきたプローブのうち、OFF-ON-OFF 型蛍光プローブは、タンパク質とのラベル化反応によって蛍光を発し、タンパク質の分解に伴って蛍光が消光するものである¹。一方、このプローブは、エンドソームやリソソームにみられるような酸性環境への移行を正確に検出できないことから、膜タンパク質のエンドサイトーシスの進行度を精密に明らかにすることはできない。そこで、本研究では、pH とタンパク質分解に応答して、蛍光の波長と強度が変化する蛍光スイッチを持つタンパク質ラベル化プローブを開発することを目的とした。さらに、このプローブを用いて、グルコーストランスポーター4 (GLUT4) の動態の可視化に取り組んだ。

GLUT4 は通常、主に GLUT4 貯蔵小胞やゴルジ体の膜に局在しているが、インスリン刺激により細胞膜へと移行し、細胞外のグルコースを細胞内に取り

込むことで血糖値を低下させる。このように、GLUT4 の移行および多重局在はその機能の発現に重要な役割を果たしており、その異常は糖尿病の発症につながる。このため、その動態を可視化する技術は、GLUT4 の動態制御機構や関連する疾病の発症機構の解明を行う研究の有用なツールとなる。本研究では、GLUT4 のような多重局在を示すタンパク質を可視化するツールの技術基盤を構築することを目指した。

研究経過

(1) 蛍光スイッチプローブの設計

PYP タグは、細菌由来の 14 kDa からなる小タンパク質であり、桂皮酸やクマリンのチオエステル誘導体をリガンドとして、Cys69 とのチオエステル交換反応により共有結合する。蛍光スイッチプローブの開発を行ううえで、PYP タグの発蛍光性リガンドである 7-Dimethylaminocoumarin (DMAC) に着目した²。この DMAC リガンドは、極性の高い水中では、非蛍光性で、極性の低い溶媒中では蛍光強度を上昇させる。このため、DMAC リガンドは、遊離状態では、蛍光強度が抑制され、極性の低い PYP タグのポケットに結合すると蛍光強度が上昇することがこれまでの研究で示されてきた。このリガンドに pH 応答性色素である Virginia Orange (VO) を連結し、消光基として作用するジニトロベンゼンを組み込んだプローブ VODMAC を設計した (Fig 1)。このプローブは、遊離状態では、DMAC だけでなく、ジニトロベンゼンによるコンタクトクエンチングの効果により、VO の蛍光も消光する。一方、PYP タグのラベル化反応により、ジニトロベンゼンは脱離し、その結果、VO の蛍光強度が上昇する。一方、前述の通り、DMAC リガンドもラベル化反応により、蛍光強度が上昇するが、DMAC から VO へフェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) が起こる。このため、DMAC を励起すると VO 由来の蛍光が観測される。このとき、pH が低下すると、VO はスピロ環化し、吸収・蛍光ともに消失していく。一方、DMAC は生理条件下での pH 範囲では、ほとんど pH 応答性を示さない。このため、pH 低下時には、VO の吸収がなくなるため、FRET が抑制され、DMAC の蛍光が上昇する。したがって、VO と DMAC の蛍光を同時に観測することで、pH 低下の度合いを見積もることができる。最後に、PYP タグが目的タ

ンパク質とともに分解されると、タンパク質の疎水場が消失するため、DMAC の蛍光強度が低下する。このように、蛍光の波長と強度をモニタリングすることで、酸性化と分解を一挙に可視化することができ、膜タンパク質のエンドサイトーシスからリソソームにおける分解を精密に解析することが可能となる。

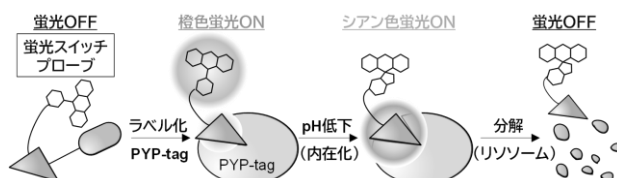


Fig 1. 蛍光スイッチプローブによるタンパク質ラベル化、pH 変化とタンパク質分解の可視化の原理。

(2) 蛍光スイッチプローブの合成・開発

VODMAC のうち、pH 応答性蛍光色素部位である VO を合成した。まず、Methyl 2-bromo-4-fluoro-5-methoxybenzoate を原料として、VO のキサンテン環部位の 2 つのヒドロキシ基をアセチル化し、6 位のカルボキシ基を NHS 化した Diacetyl-VO-NHS を 11 工程で合成した。リガンドである DMAC 部位は、5-methylresorcinol を原料として、PEG リンカーを連結した後、クマリン環の 7 位のヒドロキシ基を Tf 化し、Buchwald-Hartwig Cross Coupling により、ジメチルアミノ基に変換することで、12 工程で合成した。PEG の末端のアミンを介して、Diacetyl-VO-NHS を縮合させ、保護基を脱保護することで、VO と DMAC の連結体を合成した。最後に、消光基を含む脱離基部位を DMAC に縮合し、全 29 工程で VODMAC を合成した。

(3) 蛍光スイッチプローブの検証

これまでの研究で、PYP タグのラベル化にはプローブとタンパク質表面の静電相互作用が影響を与えることを報告してきた。今回開発した VODMAC は、2 価のアニオンであり、酸性タンパク質である PYP と静電反発することが予想された。そこで、PYP 表面の酸性アミノ酸を中性アミノ酸に変異を導入した PYP 変異体をタグ³として用いることとした。

PYP の VODMAC によるラベル化反応を調べるために、これらの分子を混合し、SDS-PAGE により解析した。その結果、PYP を示すバンドの位置から蛍光が観測された。

次に、ラベル化反応に伴い、蛍光強度が変化するかを検証するために、蛍光スペクトルの測定を行った。遊離状態では、蛍光強度が抑制されており、ラベル化すると蛍光強度が大きく上昇した (Fig 2a)。また、その蛍光強度の変化は、1 時間程度で飽和した。次に、pH 変化に伴う分光特性の変化を調べるために、吸収と蛍光の両スペクトルを測定した。吸収スペクトルの測定結果から、pH 低下に伴い、DMAC 部位の 450 nm 付近のピークはほとんど変化しないのに対し、VO 部位の 565 nm 付近のピークは減少した。このことから、想定した通り、DMAC は pH 非依存性であり、VO は pH 低下に伴い、スピロ環化し吸収がなくなったものと考えられる。また、蛍光スペクトルの測定結果から、pH 低下に伴い、DMAC 由来の 500 nm 付近の蛍光強度は上昇し、VO 由来の 586 nm 付近の蛍光強度は低下した (Fig 2b)。これは、VO の吸収がなくなったため、DMAC を励起した時に、FRET が起こらなくなったためであると考えられる。

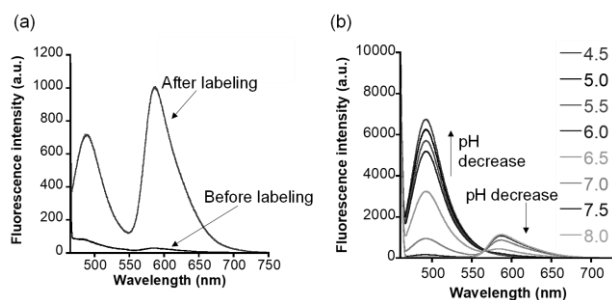


Fig 2. (a) ラベル化に伴う VODMAC の蛍光上昇と FRET. (b) ラベル化された VODMAC の蛍光スペクトルの pH 依存性。矢印が向かう方向に pH が低下。

最後に、タンパク質が分解されたときの蛍光強度の変化について検証した。まず、タンパク質の分解は、切断配列特異性の異なる 3 つのタンパク質分解酵素である Trypsin、Glu-C、および Chymotrypsin を添加することで引き起こした。PYPNQN を VODMAC でラベル化後、酵素を添加し、SDS-PAGE により解析した。その結果、PYP を示すバンドの消失が確認され、PYP は分解されたことが確認された。次に、VODMAC によるラベル化とタンパク質分解酵素による分解を行いながら、VODMAC の蛍光をリアルタイムでモニタリングした。その結果、VODMAC の蛍光は、酵素添加後に低下することが分かった (Fig 3a)。また、リソソームにおける pH 環境での蛍光強度を測定するために、ラベル化後にタンパク

質を分解し、pH を低下させた後で、VODMAC の蛍光スペクトルを測定した。その結果、前述の結果と同様に、蛍光強度が大きく抑制されることが示された (Fig 3b)。

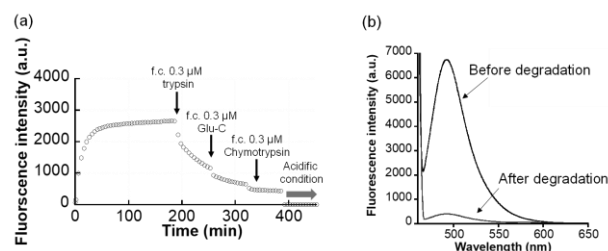


Fig 3. (a) VODMAC のラベル化に伴う蛍光強度の上昇とタンパク質分解酵素添加および酸性化に伴う蛍光強度の減少。 (b) 酸性条件下 (pH 4.5) における VODMAC のタンパク質分解前後の蛍光スペクトル。

以上の結果から、VODMAC は、ラベル化すると蛍光強度が上昇し、pH が低下すると蛍光波長が変化し、タンパク質分解に伴い、蛍光強度が低下する、マルチスイッチ蛍光プローブであることが示された。

(4) 蛍光スイッチプローブによる GLUT4 の可視化

まず、細胞膜のタンパク質を VODMAC でイメージングする実験系の構築を行った。モデルタンパク質として、イメージング実績の豊富な上皮成長因子受容体 EGFR を選択し、細胞外ドメインに PYP を挿入し HEK293T 細胞で発現させた。VODMAC を発現細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、細胞膜上から VODMAC のうち VO 由来の蛍光が観測された (Fig 4a)。一方、DMAC 由来の蛍光は観測されなかった。次に、エンドサイトーシスに伴う VODMAC の蛍光特性の変化を調べるために、発現細胞に対して、上皮成長因子 EGF を添加した。時間の経過とともに、細胞膜上の VO 由来の蛍光が消失し、細胞内に DMAC 由来の蛍光輝点が観測されるようになった。この結果から、エンドサイトーシスに伴い、VODMAC 周辺の pH が酸性化したと考えられる。

最後に、VODMAC を用いて、GLUT4 の動態解析を行った。GLUT4 の細胞外第一ループに PYP を挿入したコンストラクトが安定発現する HeLa の細胞株を作成した。この HeLa 細胞に対して、VODMAC を添加し、その後の GLUT4 の動態を共焦点レーザー顕微鏡で観測した。その結果、VODMAC のうち、VO および DMAC 両方の蛍光が細胞内から観測され

た。DMACの蛍光がかなり明確に観測されたものの、VOの蛍光はやや弱く観測された (Fig 4b)。一方、EGFRの際に観測されたような細胞内の蛍光輝点はあまり観測されなかった。

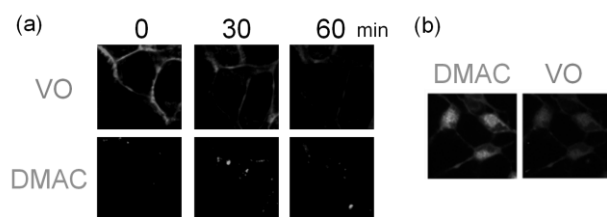


Fig 4. (a) EGF 添加後の PYP-EGFR の動態の VODMAC による経時的観測。 (b) PYP-GLUT4 の動態の VODMAC による可視化。なお、(a) (b)ともに VODMAC の蛍光のうち、VO と DMAC に由来する蛍光画像をそれぞれ表示している。

考察

膜タンパク質のなかには、細胞膜だけでなく、細胞内のオルガネラ膜や小胞膜など、様々な場所に局在し、それらが動的平衡状態にあるものが知られている。その代表的なタンパク質が GLUT4 である。このようなタンパク質は、免疫蛍光染色してもその動きに関する情報は十分には得られず、蛍光タンパク質による生細胞解析やタグタンパク質の合成蛍光ラベル化プローブを用いたパルスチェイス解析でも、どのような軌跡をたどって膜から膜へと移り動いているのか判然としない場合が多い。これまでの報告者のグループの研究では、細胞膜選択的にラベル化するプローブや細胞内選択的にラベル化するプローブを駆使することで、細胞内で異なるダイナミクスを示す GLUT4 を識別することに成功してきた³。一方、これまでの研究では、細胞内のどの部位に局在し、どの部位に動いているか、また、最終的に分解しているかは判然としない点があった。そこで、本研究では、このことを克服するために、pH と分解に応答するマルチスイッチ蛍光を持つ蛍光プローブを開発した。開発した VODMAC は、意図した通りの応答を示すプローブであり、生細胞イメージングへの応用にも成功した。EGFR は、EGF 非存在化では、主に細胞膜に局在し、EGF 添加によりエンドサイトーシスがおこりリソソーム分解へと進行する。EGF の添加タイミングをコントロールできるため、VODMAC の機能検証には適している。実際に、EGFR の細胞膜から細胞内へのエンドサイトーシスが確認され、それに伴い、VODMAC から検出される蛍光の

波長変化も確認された。GLUT4 のイメージングに関しては、細胞内から DMAC 由来の蛍光が明確に観測された一方、VO の蛍光はやや弱かったことは、GLUT4 の置かれている細胞内 pH 環境の影響が考えられる。また、蛍光輝点あまり観測されなかったことは、EGFR と GLUT4 の動態の違いが反映されたのかもしれない。ただ、GLUT4 のイメージングに関しては、更なる検証・検討が必要であるといえる。

以上をまとめると、VODMAC は、pH 環境やタンパク質の分解状態を反映させて、精密にタンパク質を検出・可視化できるものであることから、膜タンパク質のダイナミクスを精密に解析する有用なツールであるといえ、今後さらなる生細胞イメージングへの応用が期待される。

参考文献

1. Reja, S. I. Hori, Y., Kamikawa, T., Yamasaki, K., Nishiura, M., Bull, S. D., Kikuchi, K. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 1419–1427.
2. Hori, Y., Hirayama, S., Sato, M., Kikuchi, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14368–14371.
3. Gao, J., Hori, Y., Nishiura, M., Bordy, M., Hasseroth, J., Kikuchi, K. *Chem. Lett.* **2020**, *49*, 232–235.
4. Nishiura, M., Hori, Y., Umeno, M., Kikuchi, K. *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 5925–935.

研究の発表

口頭発表

1. 堀 雄一郎、「タンパク質・核酸の化学修飾を可視化するタグ・蛍光プローブ技術」、第 96 回生化学会大会、2023 年 11 月 1 日、福岡（主催シンポジウム）
2. 堀 雄一郎、「タンパク質の多重局在を可視化する蛍光ラベル化技術の開発」第一回関西私立大学創薬研究シンポジウム、2023 年 11 月 4 日、オンライン開催（招待）
3. 堀 雄一郎、「蛍光分子とタンパク質を駆使した生体分子イメージング技術の開発」、光科学協会応用講座、2024 年 11 月 14 日、オンライン開催（招待） -
4. Yuichiro Hori, “Chemical Tools to Image Protein Multiple Localization and Degradation”, 4th Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS2024), 2024.7.7-8, Uji (Invited)

5. Yuichiro Hori, “Probes with Chemical Switches to Image Multiple Localization and Degradation of Proteins”, 7th Asian Chemical Biology Conference (ACBCS2025), 2025.1.9-12, Hong Kong (Invited)

誌上発表

1. Kamikawa, T., Hashimoto, A., Yamazaki, N., Adachi, J., Matsushima, A., Kikuchi, K. Hori, Y. ***Chem. Sci.*** **2024**, *15*, 8097 - 8105.