

日本－フランス 国際共同研究「分子技術」 平成 28 年度 年次報告書	
<b>研究課題名（和文）</b>	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
<b>研究課題名（英文）</b>	Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMOEY imaging
<b>日本側研究代表者氏名</b>	菊地 和也
<b>所属・役職</b>	大阪大学大学院工学研究科・教授
<b>研究期間</b>	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

ワークパッケージ No. 1	膜蛋白質（GLUT4、TLR4）と各種タグの融合遺伝子の作成と発現	
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（M1）	遺伝子工学・細胞生物学実験担当

## 2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

ワークパッケージ③における各種融合蛋白質の蛍光プローブによる動態解析実験を行うために、Penicillin G amidase、Beta-lactamase、Beta-galactosidase の遺伝子断片を GLUT4 の細胞膜外の第 1 ループもしくは C 末端に融合させた遺伝子をクローニングする。また、その GLUT4 に PYP タグもしくは蛍光蛋白質を第 1 ループと C 末端のいずれかに融合させた遺伝子を作成する。これらの融合遺伝子が HeLa 細胞内で発現するかをウェスタンブロットによって検出する。融合させた位置に問題があり発現に問題がある場合は、融合部位を変更するもしくは融合時に用いるリンカーアミノ酸配列の最適化を行い、再度遺伝子発現をウェスタンブロットにより解析する。

## 3. 日本側研究チームの実施概要

Beta-lactamase (bLac) 及び mCherry の遺伝子を GLUT4 に融合させた二つの遺伝子の作成を行った。一つは、GLUT4-mCherry-bLac であり、GLUT4 の C 末端の細胞内ドメインに mCherry と bLac が提示される融合遺伝子である。もう一方は、bLac-GLUT4-mCherry であり、bLac の遺伝子を、GLUT4 の細胞外第一ループに提示し、mCherry を GLUT4 の C 末端側に提示される融合遺伝子である。GLUT4-mCherry-bLac は、膜透過性蛍光プローブにより bLac の酵素活性を検出することで、GLUT4 全体の動態を確認することを可能となる。また、bLac-GLUT4-mCherry は、膜非透過性蛍光プローブにより bLac の酵素活性を検出することで、細胞膜上にトランスロケートした GLUT4 を選択的に検出することが可能となると期待される。これらの遺伝子を HeLa 細胞に導入し、イメージングした結果、発現が良好に確認された。