

日本—フランス 国際共同研究「分子技術」 平成30年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	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
研究課題名（英文）	Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMORY imaging
日本側研究代表者氏名	菊地 和也
所属・役職	大阪大学大学院工学研究科・教授
研究期間	平成28年 9月 1日～令和2年 3月31日

1. 日本側の研究実施体制

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
西浦 美也子	大阪大学・大学院工学研究科・技術補佐員	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
ガオ ジンチ	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生（D2）	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
有菌 賢志	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生（D1）	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
渡部 圭一郎	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生（M2）	有機合成実験担当
梅野 真帆	大阪大学・大学院工学研究科・大学院学生（M2）	遺伝子工学・細胞生物学実験担当
山崎 のぞみ	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

野村 佳祐	大阪大学・大学院工学研究科・ 大学院学生（M1）	有機合成実験担当
ユー チアウエイ	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

本年度は、受容体タンパク質の一種である TLR4 の動態を可視化することを目的として、PYP（Photoactive yellow protein）タグまたは β -lactamase タグを TLR4 の細胞膜外ドメイン及び細胞内ドメインに融合させた遺伝子を作成し、培養細胞に発現させる。また、グルコーストランスポータータンパク質の一種である GLUT4 の迅速なイメージングが可能となるように、PYP タグラベル化プローブ及び PYP タグの改変を行い、蛍光ラベル化速度を向上させる。これらの改良型プローブ及びタグを用いて、GLUT4 のエキソサイトーシス及びエンドサイトーシスの過程を可視化する。

3. 日本側研究チームの実施概要

TLR4 の細胞外ドメインに PYP タグ及び β -lactamase タグを融合させた遺伝子を複数種類作成し、それらの遺伝子をヒト由来細胞に導入し、TLR4 が細胞内で機能しているかを検証した。TLR4 は、LPS（リポ多糖）との結合に応じて、NF κ B（核内因子 κ B）のシグナル伝達経路を活性化させる。そこで、この経路の活性化を検出するレポーター遺伝子アッセイ法を用いて、タグを融合させた TLR4 の機能を調べた。このアッセイ法では、TLR4 が正常に機能しているとき、Luciferase が発現し、発光するようになっているため、その発光強度を調べることで、TLR4 が機能しているかどうかを明らかにすることができる。検証実験の結果、作成した遺伝子のうち、PYP タグを融合させた TLR4 が、LPS 添加時に発光強度を増大させることが分かった。同時に、PYP タグと TLR4 を融合させた遺伝子が細胞内で発現しているかをウェスタンブロットによって調べたところ、発現が確認された。次に、この融合タンパク質の細胞内局在を免疫染色で調べたところ、細胞内部に局在することが分かった。当初、TLR4 は、細胞膜に局在して機能していると考えていたが、その予測とは異なる結果となった。そこで、TLR4 が一過性に細胞膜に移行し LPS と結合して機能している可能性があるため、PYP タグの細胞膜非透過性のある蛍光ラベル化プローブにより、一過性細胞膜移行が検出されないかを調べた。しかしながら、一過性細胞膜移行は確認されなかったことから、細胞膜で機能するモデルとは異なる新たな活性化機構の存在が示唆された。

今年度実施したもう一つの研究は、PYP タグのラベル化プローブを最適化して、GLUT4 の動態を可視化することである。これまでに、クマリン骨格を持つラベル化プローブを開発してきた。このプローブは、ラベル化反応に伴い蛍光強度を増大させるものである。一方、その蛍光強度の増大度やラベル化速度に加え、励起・蛍光波長（波長が短く汎用性が低い）の観点から改良が求められていた。そこで、ヒドロキシ基を導入するというシンプルな方法で、分子設計を行うことで、これまで開発した PYP タグプローブの中でも、最速のラベル化速度と最大の蛍光強度増大度を示し、長波長化し汎用的な波長で励起でき、蛍光を検出できるプローブの開発に成功した。興味深いことに、このプローブは、細胞膜に局在するタンパク質よりも、細胞内に局在するタンパク質をラベル化・イメージングできる性質を示した。この性質を利用して、細胞膜に存在する GLUT4 と細胞内部に存在する

GLUT4 を異なるプローブで選択的にラベル化できる可能性を示した。

以上