

2023 年度年次報告書
細胞の動的・高次構造体
2022 年度採択研究代表者

蓑島 維文

大阪大学 大学院工学研究科
准教授

持続可能な標識法による時間無制限オルガネラ動態イメージング

研究成果の概要

本研究課題では、タンパク質結合時に蛍光を発するプローブを合成し、非共有結合を利用して入れ替わりが可能なタンパク質標識法を開発する。特に、①時間無制限イメージング、②直交的なタンパク質標識法の開発とマルチカラーイメージング、③タンパク質間相互作用の検出の各項目について研究を進めた。①においては、長時間のタンパク質 1 分子イメージングが可能な本標識法を応用し、数分以上のタイムスケールでないと観察できない弱い相互作用を検出、解析できることを示した。②においては、直交的な標識法となる新たな蛍光プローブ、タグタンパク質のペアを獲得するため、タグタンパク質側の変異導入と新たな発蛍光プローブ色素の合成を行った。プローブにおいては、発蛍光性を有すること、マルチカラーイメージングのために長波長の蛍光波長を有すること、変異導入前のタグタンパク質とは結合せず変異体に特異的に結合する点を考慮して設計、合成を行った。新たに開発した発蛍光性プローブは元々のタグタンパク質にはほとんど結合せず、変異体タグタンパク質特異的に結合することが分かり、直交的なプローブ、タグタンパク質対として機能することが分かった。各タグを異なる細胞内オルガネラに発現し、プローブで同時に標識することで、細胞内オルガネラを異なるプローブで染め分けてマルチカラーイメージングを行うことができた。③においては、非共有結合を利用したプローブを市販の HaloTag を用いて一方のタンパク質側に固定化することで、タンパク質相互作用に伴い近接した時に発蛍光性を示すプローブの開発に取り組んだ。プローブと HaloTag リガンドとのリンカー構造を検討したところ、両者のタンパク質が共存した際に蛍光増大を示すプローブを開発することができた。③の成果においては特許申請を行った。

【代表的な原著論文情報】

- 1) M. Minoshima, T. Umeno, K. Kadooka, M. Roux, N. Yamada & K. Kikuchi, Development of a Versatile Protein Labeling Tool for Live-Cell Imaging Using Fluorescent β -Lactamase Inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 62, e202301704 (2023).
- 2) R. Hashimoto, M. Minoshima & K. Kikuchi, Rational Design of Hydroxylated Thiazole Orange Photocages for Green Light-Triggered DNA Recombination, *ChemBioChem*, 25, e202300799 (2024).
- 3) M. Minoshima, S.I. Reja, R. Hashimoto, K. Iijima & K. Kikuchi, Hybrid Small-Molecule/Protein Fluorescent Probes, *Chem. Rev.* 124, 10, 6198–6270 (2024).