

14 蛍光応答性ロイシンジッパーペプチドペアの合成と機能評価

(東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

○堤 浩・阿部清一郎・蓑友明・長谷山正樹・野村渉・玉村啓和

e-mail: tsutsumi.mr@tmd.ac.jp

電話: 03-5280-8137 FAX: 03-5280-8039

細胞のもつ機能や情報を理解する上でタンパク質の時間依存的な発現動態や局在状態、活性化・不活性化等の機能調節などを詳細に解析することが重要である。細胞内のタンパク質を観測する方法として、GFP などの蛍光タンパク質を観測対象のタンパク質に融合してイメージングを行う手法が幅広く用いられている。しかしながら、多くの蛍光タンパク質では特定の時間ごとに区別して観測することが困難であるため、新たなタンパク質の蛍光ラベル化・イメージングの方法が必要とされている。近年、タンパク質の新たな蛍光ラベル化法としてタグ・プローブシステムが提案されている。あらかじめ観測対象のタンパク質にタグペプチドまたはタンパク質を融合させ、このタグ選択的に結合するプローブ分子を作用させることにより標的タンパク質の蛍光ラベル化を行うことができる。この方法では、さまざまな蛍光波長のプローブ分子を使い分け、プローブ分子を作用させるタイミングを調節することにより任意の時間に標的タンパク質を「染め分ける」ことが可能であることから、細胞内タンパク質のリアルタイムパルスチェイスイメージングを行う上で優れたツールとなることが期待されている。これまでに数例のタグ・プローブペアが報告されているが、タンパク質のイメージングに利用できるタグとプローブの組み合わせは未だ限られているため、新たなタグ・プローブペアの創製が望まれている。また、多くの場合、タグに結合していない遊離のプローブ分子に由来するバックグラウンド蛍光を低減するために、遊離のプローブ分子を洗浄操作によって除去する必要が生じる。そこで我々は、タグ・プローブペアに蛍光応答能を付与し、プローブ分子がタグに結合したときにのみ蛍光波長の変化および蛍光強度の増大を誘起することを考えた。これにより、遊離のプローブ分子とタグに結合したプローブ分子を容易に識別可能となり、洗浄操作を行わなくても標的タンパク質を選択的に蛍光検出できると考えられる (Fig.1)。本研究では、新たなタグ・プローブペアとして蛍光応答性ロイシンジッパーペプチドペアの開発を行ったので報告する。

ロイシンジッパーは複数の α -ヘリックスペプチドが選択的に会合して形成されるペプチド高次構造の一つであり、非常に疎水性の高いコアを形成している。我々は、疎水性コアを形成するロイシン残基の一部をアラニン等の側鎖の小さなアミノ酸に置換することにより、有機小分子を結合することが可能な疎水性ポケットを形成できることに着目した。この疎水性ポケットに親水/疎水の環境に応じて蛍光波長と蛍光強度が大きく変化する蛍光色素を選択的に取り込ませることにより、蛍光応答型のタグ・プローブペアの創製が可能になると考えられる。そこで、比較的コンパクトな構造で疎水性ポケットを形成可能な 3 本鎖のロイシンジッパー構造に着目し、

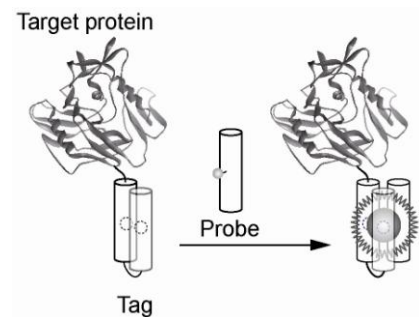


Fig.1 The protein labeling by the fluorogenic tag-probe system

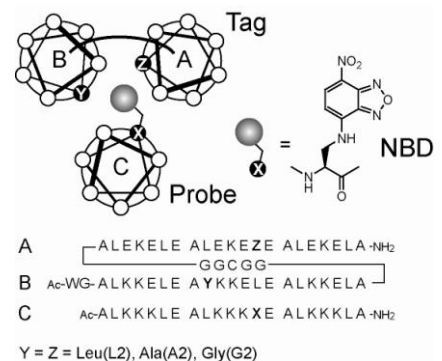
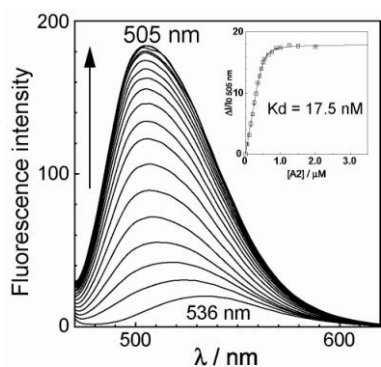


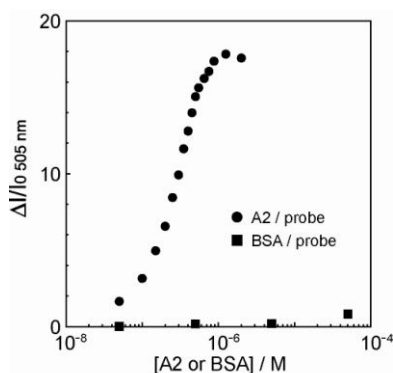
Fig.2 The sequences of tag and probe peptides

逆平行 3 本鎖ロイシンジッパーの結晶構造をもとに、2 本の α -ヘリックスペプチドをループを介して逆平行に連結したタグペプチド(A-B 鎖)、疎水性環境下で緑色の強い蛍光を発する色素である 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を有する 1 本鎖のプロープペプチド(C 鎖)をそれぞれ設計・合成した(Fig.2)。タグペプチドは、蛍光色素と相補的な位置(Fig.2、**Y**, **Z**)にロイシンを配置した L2、ロイシンより側鎖の小さなアラニン配置した A2、側鎖をもたないグリシンを配置した G2 をそれぞれ合成した。これらのプロープとタグの組み合わせについて HEPES 緩衝溶液中において蛍光滴定実験を行い、タグとプロープの結合親和性および蛍光応答能について評価を行った。その結果、プロープは A2 と 1:1 で結合し、結合親和性は $K_d = 17.5 \text{ nM}$ で抗原-抗体の結合親和性に匹敵する結合親和性を有することが明らかとなった。これは標的タンパク質を蛍光ラベル化するのに十分な親和性であると考えられる。またプロープの蛍光極大波長は A2 との結合にともなって 536 nm から 505 nm へと大幅にシフトし、かつ 505 nm における蛍光強度は約 18 倍まで増大することが明らかとなった(Fig.3)。一方、プロープペプチドは L2、G2 と結合しても顕著な蛍光変化を示さなかったことから、プロープと A2 は NBD に適合した疎水ポケットに NBD を取り込む形で複合体を形成することにより NBD の顕著な蛍光変化を引き起こしたと考えられる。さらに、紫外光照射下において、プロープペプチド単独の溶液では微弱な黄色の蛍光が観測されるのに対し、A2 タグ-プロープペプチド複合体の溶液では明るい緑色の蛍光が観測され、遊離のプロープと容易に識別可能であることを確認している。プロープペプチドに導入している NBD はアルゴンレーザーで励起可能な蛍光色素であるため、顕微鏡による蛍光観察にそのまま適用することも可能と考えられる。次に円二色性スペクトル測定を行い、タグおよびプロープペプチドの二次構造について検討した。プロープペプチド、L2、A2 はそれぞれ単独で α -ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示したが、G2 はランダムコイルに近い構造であることが示唆された。また、プロープペプチドと L2、A2 との複合体はそれぞれ単独のときより α -ヘリックス性が高く、3 本鎖の安定な α -ヘリックス構造を形成していることが示された。一方、プロープペプチドと G2 の複合体は G2 単独よりも α -ヘリックスは向上するものの、その構造は不安定であることが示唆され、プロープとの結合に伴う蛍光応答が小さかったことも構造の不安定さに起因するものと考えられる。以上の結果から、A2 とプロープペプチドの組み合わせは、十分な結合親和性と蛍光応答能を備えた新規のタグ-プロープペアとして機能することが期待される。また、プロープペプチドと BSA との蛍光滴定実験を行ったところ、プロープペプチドはほとんど蛍光変化を示さなかったことから、プロープペプチドは A2 タグ



[probe] = 0.5 μM
[A2] = 0-2.0 μM
in 50 mM HEPES buffer (pH 7.2, 100 mM NaCl)
 $\lambda_{\text{ex}} = 456 \text{ nm}$

Fig.3 The fluorescent titration spectra of the probe peptide with A2.



[probe] = 0.5 μM
in 50 mM HEPES buffer (pH 7.2, 100 mM NaCl)
 $\lambda_{\text{ex}} = 456 \text{ nm}$

Fig.4 The fluorescent titration plots of the probe peptide with A2 or BSA.

に選択的に結合するものと考えられる(Fig.4)。さらに、細胞破碎液中でプロープペプチドと A2 の蛍光滴定実験を行った結果、HEPES 緩衝溶液中と同様の結合親和性および蛍光応答能を示すことが明らかとなった。以上の結果から、ロイシンジッパー構造に基づいて設計したタグおよびプロープペプチドは、細胞内においても蛍光応答性のタグ-プロープペアとして機能することが期待される。