

入れ替わり標識が可能な タンパク質の蛍光標識技術

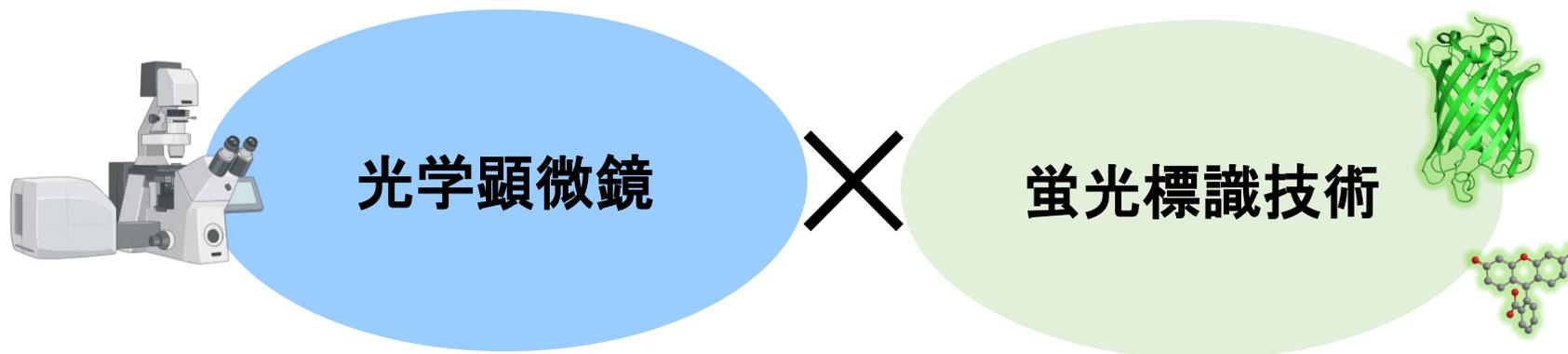
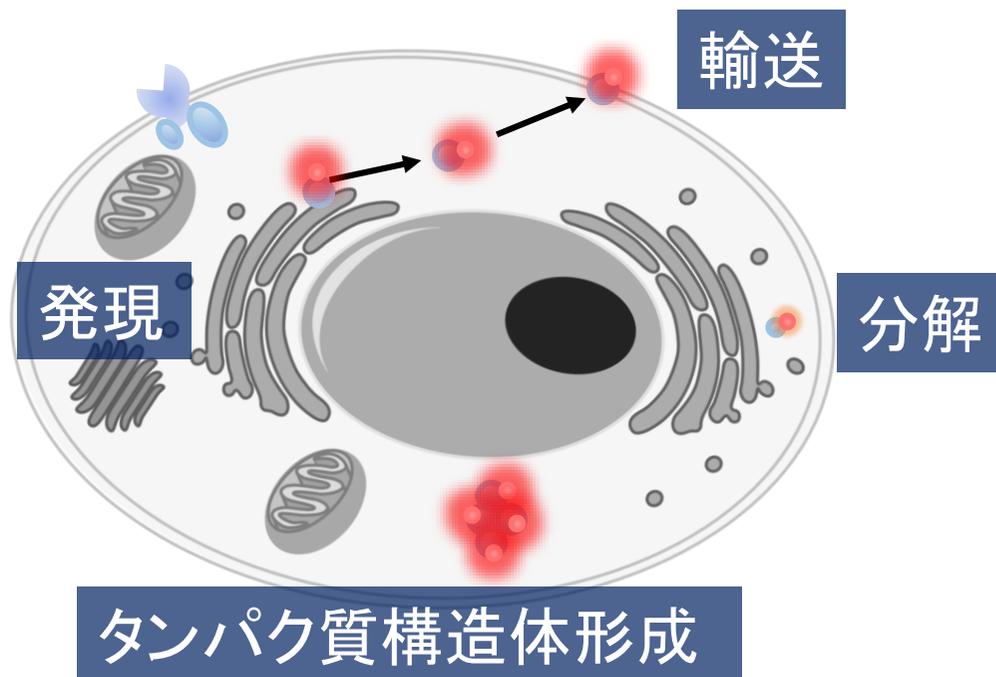
大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻
准教授 蓑島 維文

2025年1月30日

タンパク質の蛍光イメージング

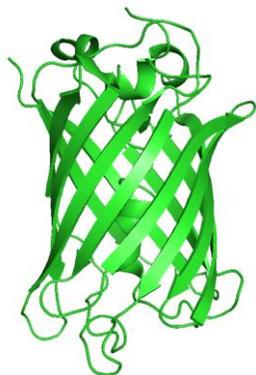
タンパク質の動態・機能解析

生きた細胞において観察可能

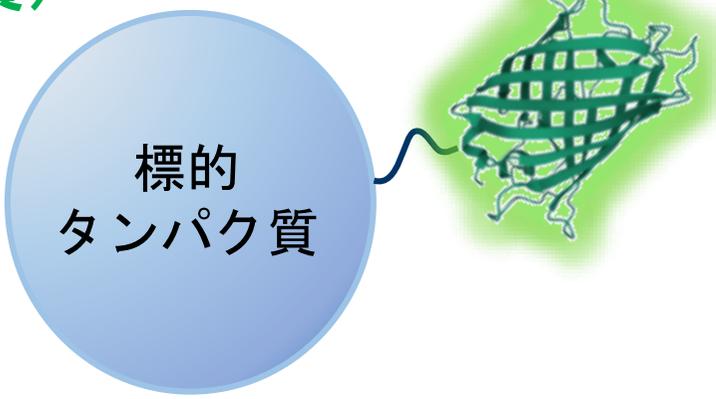


蛍光タンパク質による標識

GFP(緑色蛍光タンパク質)



PDB code:
1GFL



標的
タンパク質



標的タンパク質
遺伝子

蛍光タンパク質
遺伝子

遺伝子導入により任意のタンパク質を蛍光標識可能
蛍光波長の多色化 (青～赤)

標識のタイミング、量のコントロールが困難

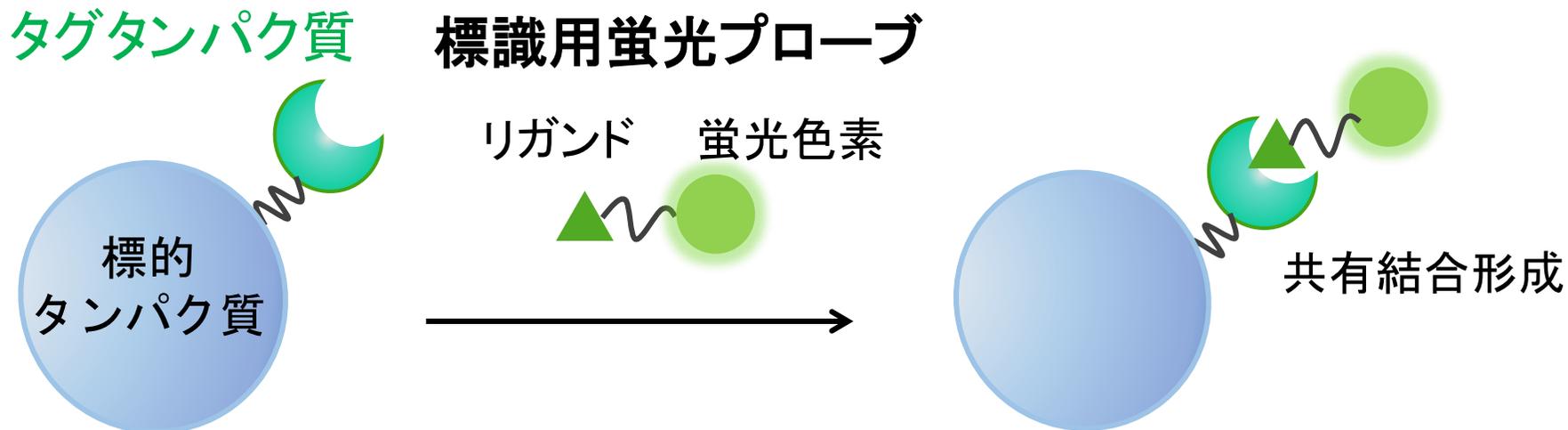
O. Shimomura *et al.* *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223.
M. Chalfie *et al.* *Science*, **1994**, 263, 802.
R. Heim, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, *Nature* **1995**, 373, 663.

タグタンパク質を用いた蛍光標識

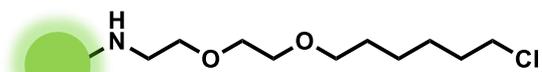


遺伝子導入により任意のタンパク質を蛍光標識可能
化学的に合成された蛍光色素を利用可能
(赤～近赤外蛍光で明るい、光安定性が高い)
標識のタイミング、量のコントロールが容易

タグタンパク質を用いた蛍光標識(非可逆)

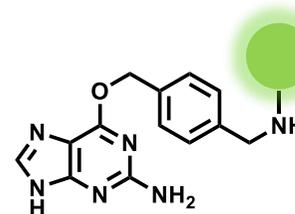
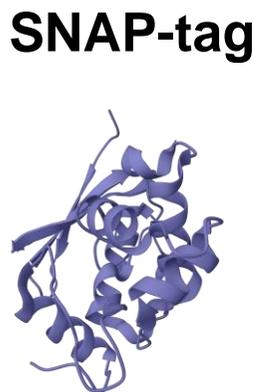


市販化されている標識システム



リガンド
(ハロアルカン)

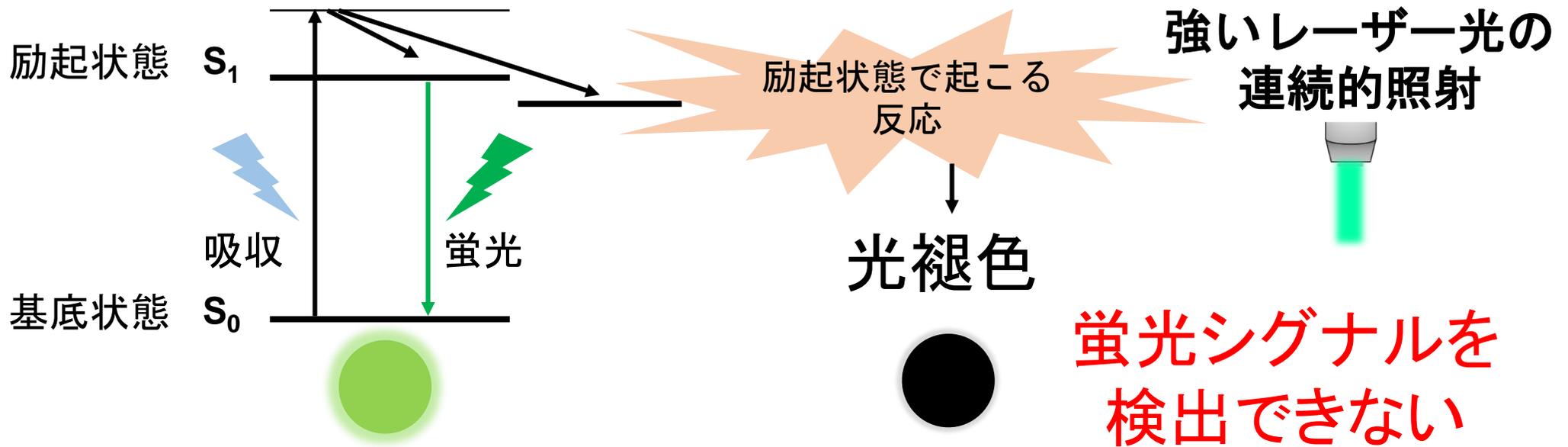
G.V. Los *et al.*,
ACS Chem. Biol. **2008**, 3, 373.



リガンド
(ベンジルグアニン)

K. Johnsson *et al.*,
Nat. Biotechnol. **2003**, 21, 86.

蛍光イメージングにおける光褪色の問題



光褪色によるイメージング時間の制限

近年は光安定性の高い蛍光タンパク質、色素の開発が行われている

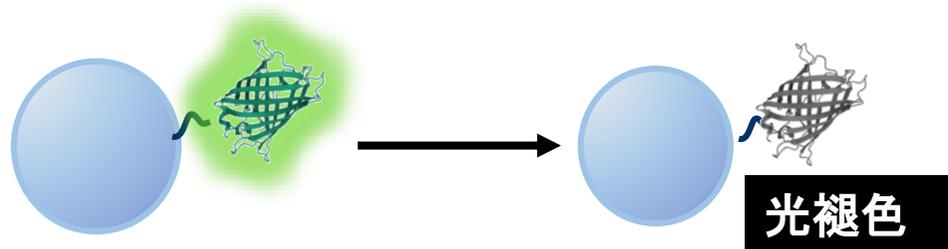
従来技術とその問題点

既に実用化されている蛍光標識法には、蛍光タンパク質、タグタンパク質（HaloTag、SNAP-tag）を用いた手法等がある。

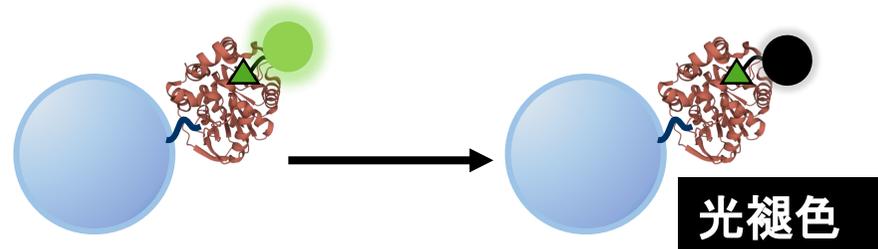
いずれも非可逆的な標識のため、入れ替わりができない。

一度蛍光色素が褪色すると回復しない。その結果、観察時間の制限が生じる。

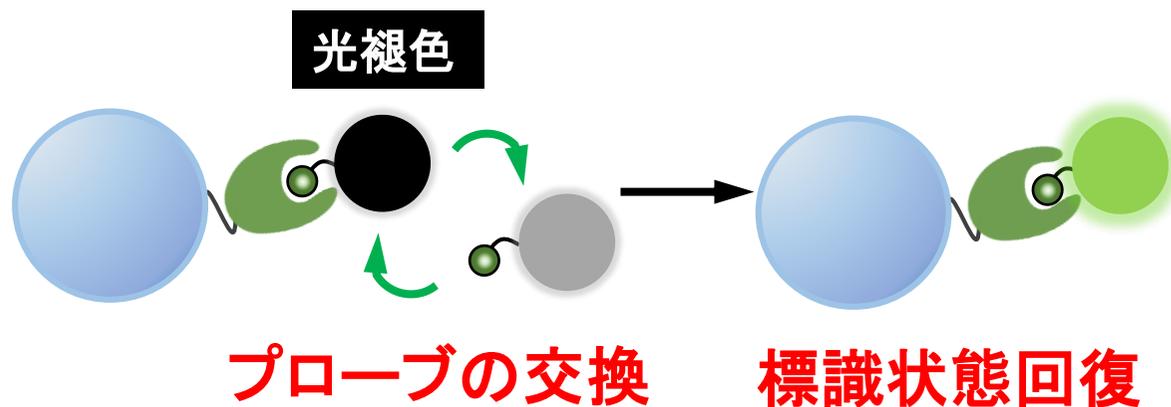
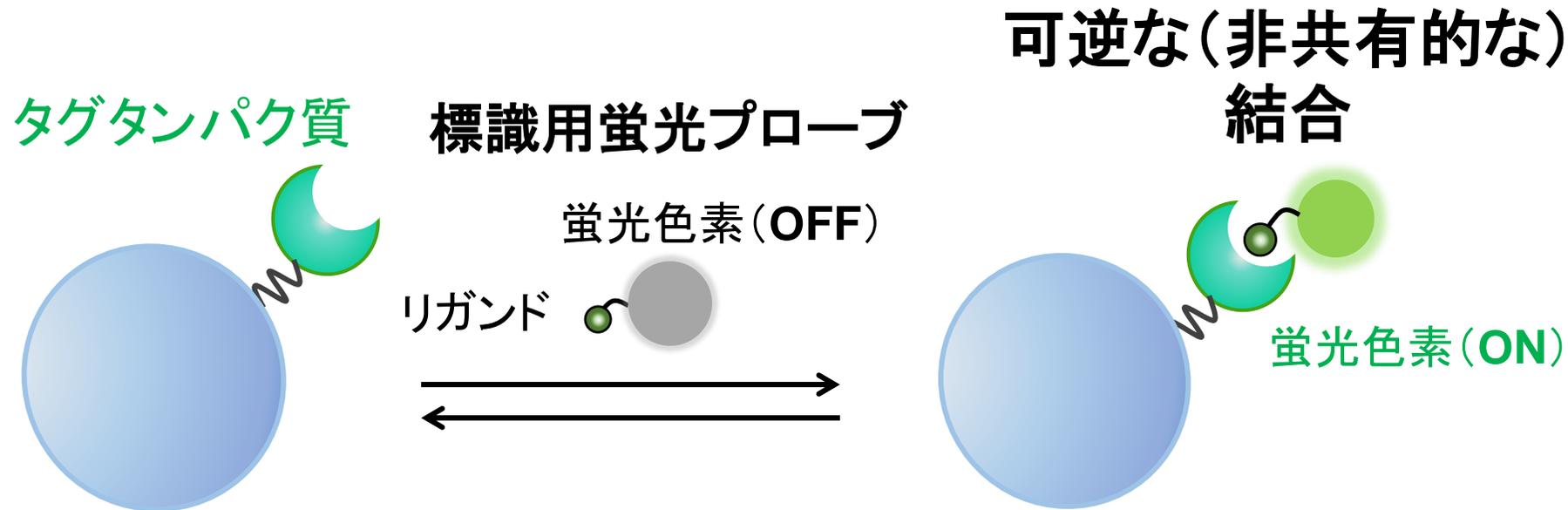
蛍光タンパク質による標識



タグタンパク質による非可逆的な標識

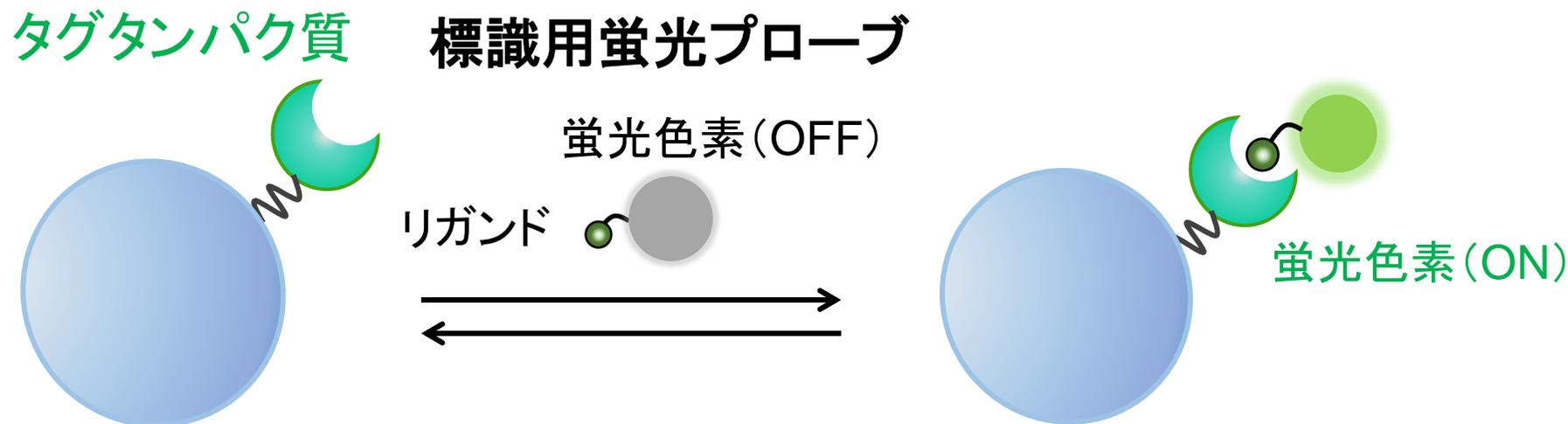


入れ替わり可能なタンパク質の化学標識法

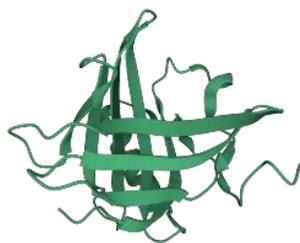


結合時に光る
素早く入れ替わる

入れ替わり可能なタンパク質の化学標識法 (OBPタグ標識法)



OBP (Odorant Binding Protein) ⇒ タグとして利用



PDB: 4RUN

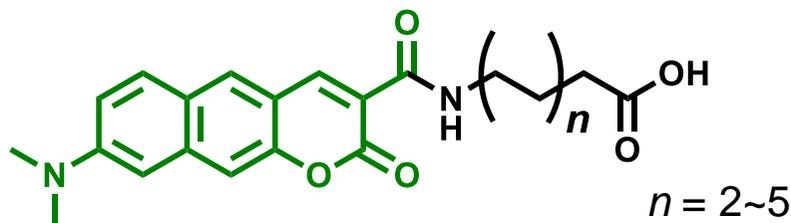
- 鼻粘膜に存在するタンパク質、匂い物質の運搬に関与
- 疎水性、揮発性の匂い物質を取り込む

(sub- μ M to μ Mの結合定数)

L. Briand *et al. Biochemistry*, **2002**, 41, 7241.
A. Schiefner *et al. Proteins*, **2015**, 83, 1180.

標識用蛍光プローブの設計

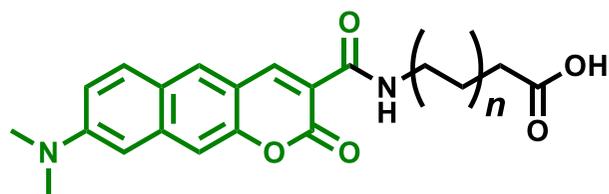
クマリン誘導体
DMABC
(環境感受性色素)



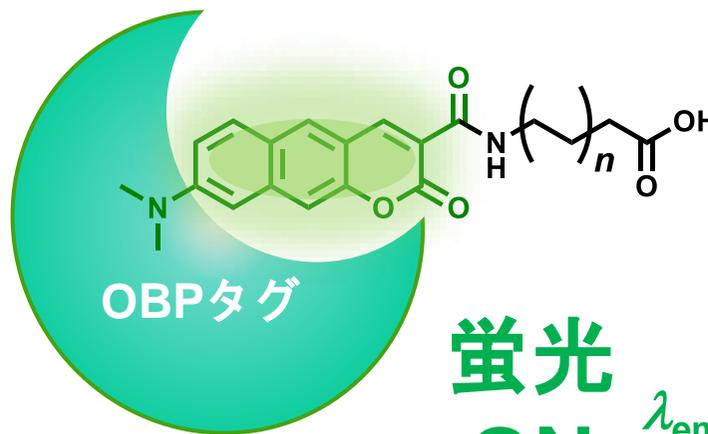
脂肪酸
(OBPタグリガンド)

水溶液中

OBPタグ結合



蛍光
OFF

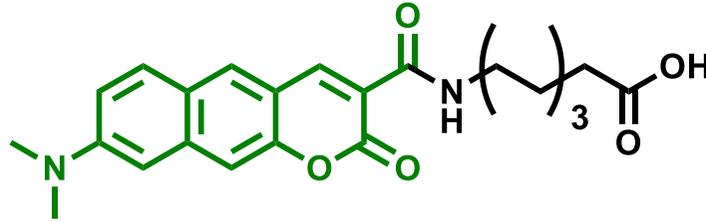


蛍光
ON $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$

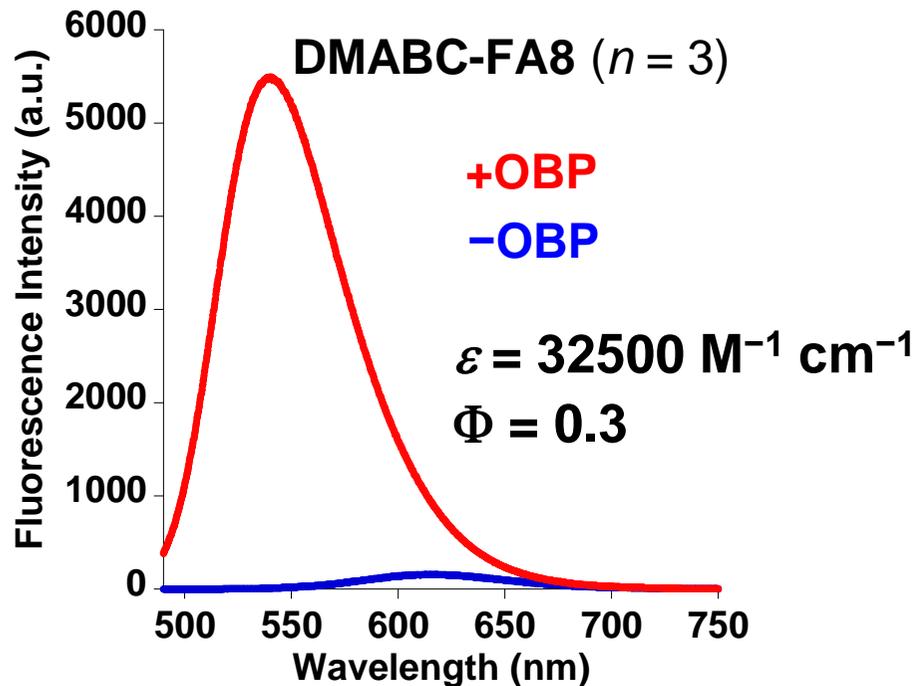
緑色に加えて青色、赤色蛍光を有するプローブも開発

プローブの光学特性・結合特性

蛍光プローブ
(DMABC-FA8)

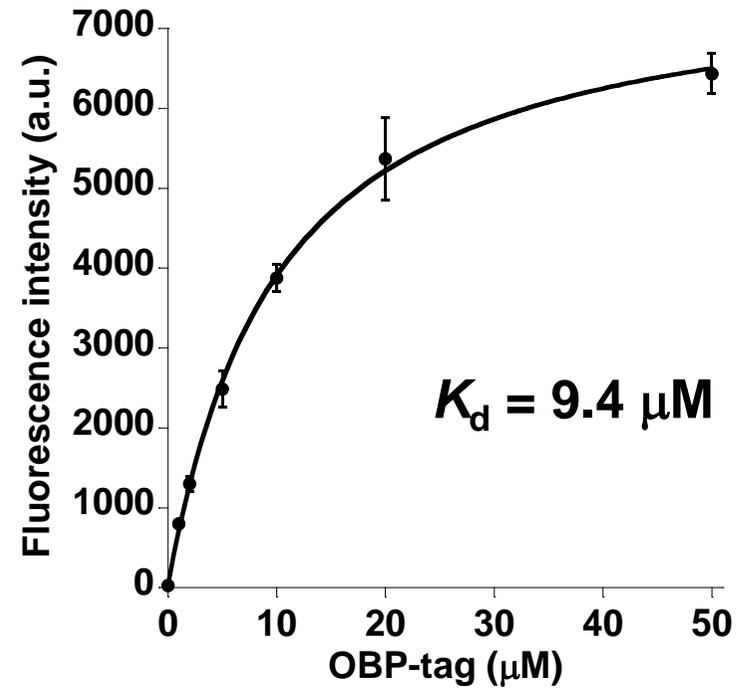


蛍光スペクトル

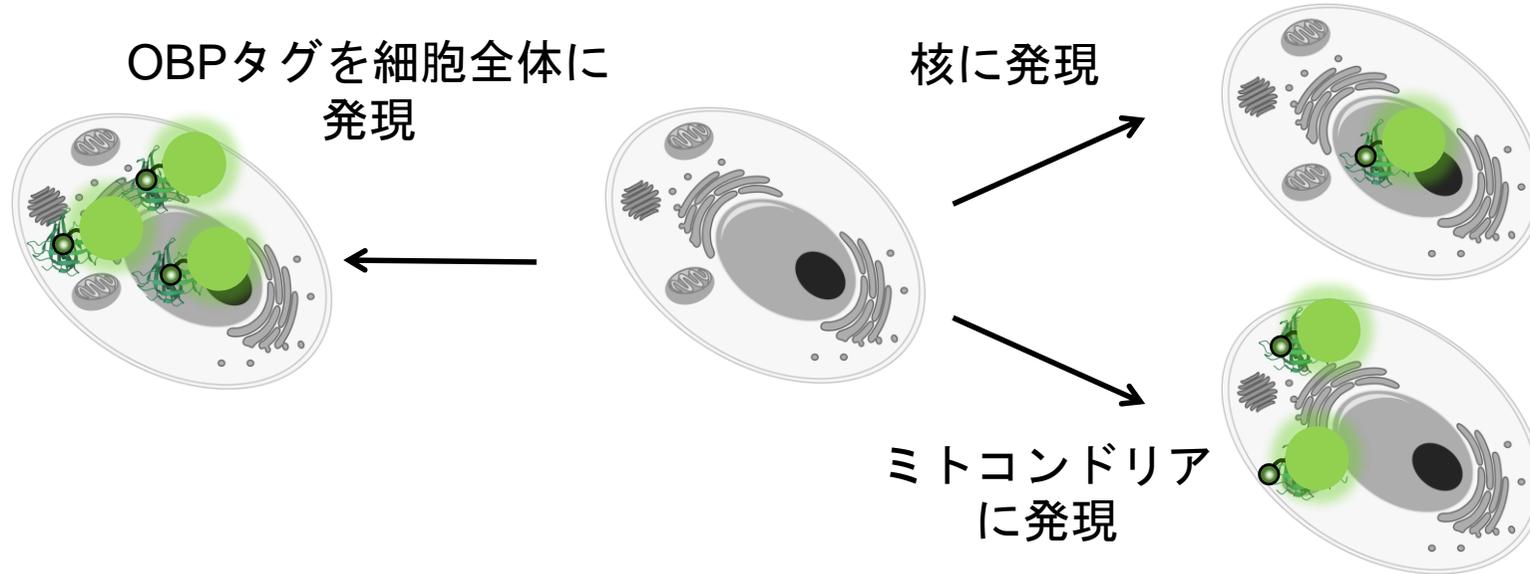


1.0 μM probe (DMABC-FA8) (0.2% DMSO), 50 μM OBP, $\lambda_{\text{ex}} = 467 \text{ nm}$

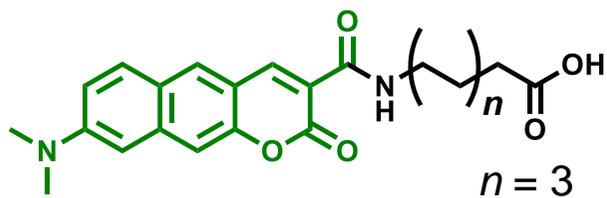
蛍光滴定による解離定数の算出



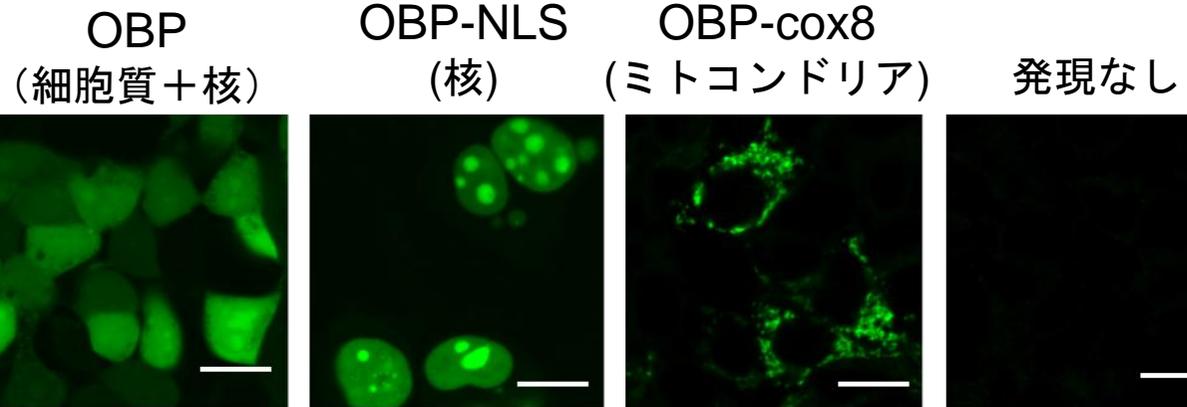
細胞イメージング実験



蛍光顕微鏡観察

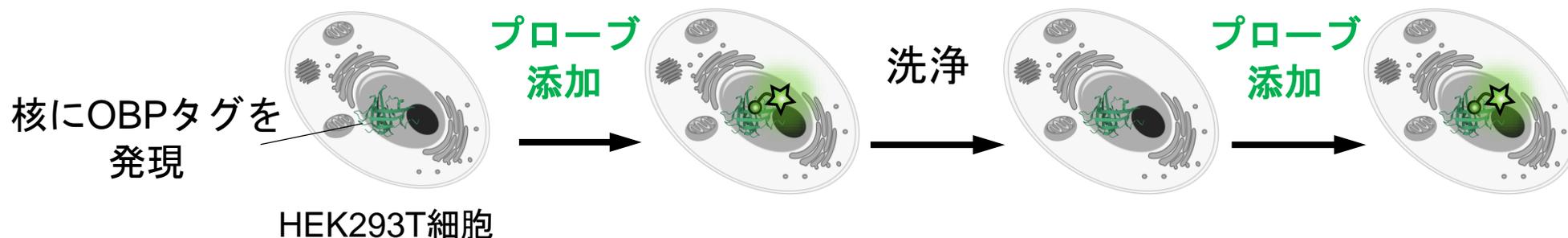


DMABC-FA8

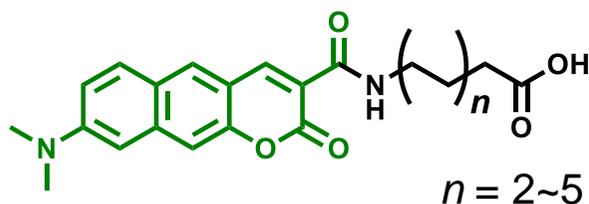


HEK293T cells, 1.0 μM DMABC-FA8 (0.2% DMSO) $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}540 \text{ nm}$, scale bar: 20 μm .

細胞イメージングによる可逆性の確認



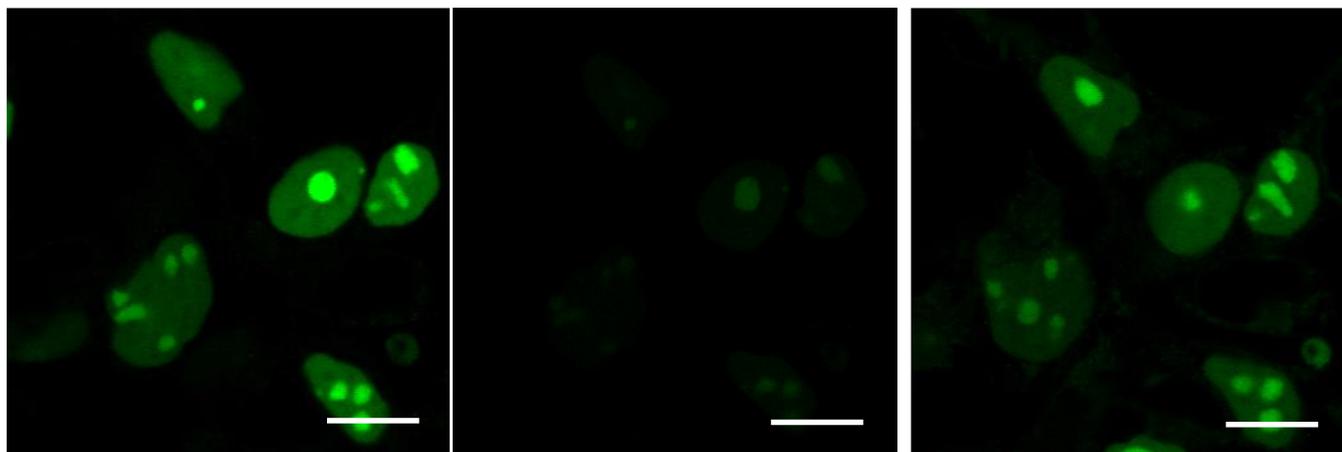
蛍光顕微鏡観察



プローブ添加
(1回目)

洗浄後

プローブ添加
(2回目)



HEK293T cells, 1.0 μM DMABC-FA (0.2% DMSO) $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}540 \text{ nm}$, scale bar: 20 μm .

本標識法を利用した タンパク質間相互作用の検出

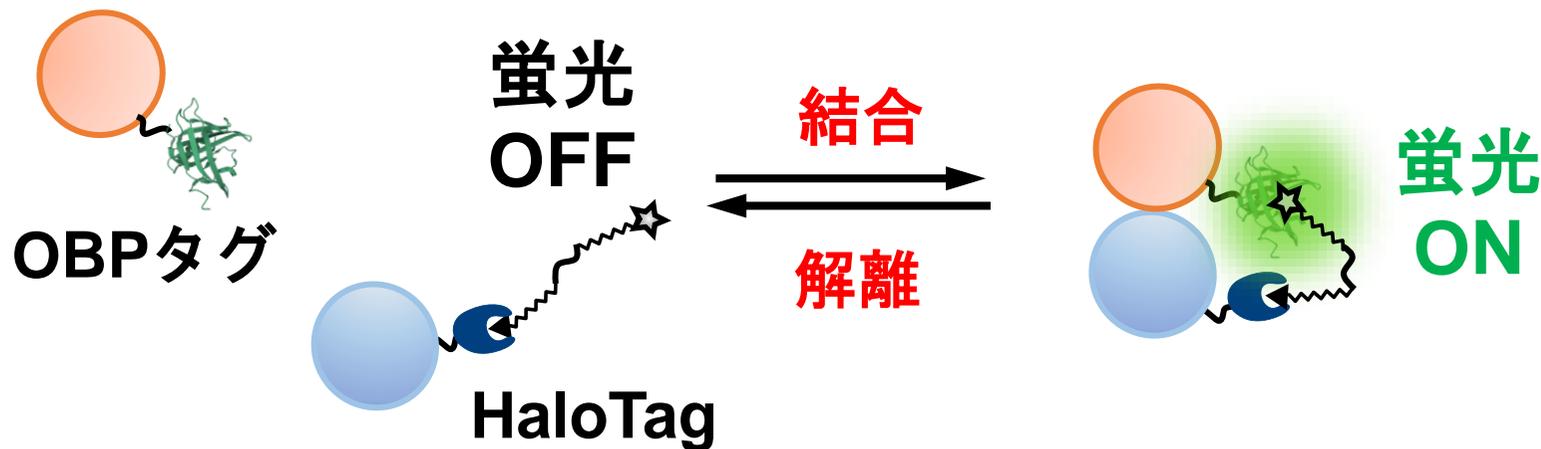
タンパク質間相互作用：細胞内のシグナル伝達、
高次構造体形成において重要

OBPタグ結合性
蛍光プローブ
(可逆標識, 発蛍光性)

HaloTag
リガンド
(非可逆的に標識)

相互作用がない時

相互作用がある時



タンパク質間相互作用の検出 (従来技術との比較)

従来技術では蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) や分割した蛍光タンパク質の再構成 (BiFC) を利用する手法が行われている。

前者は蛍光シグナルの重なるの影響、後者は自発的な再構成に由来する蛍光シグナルの影響により、タンパク質相互作用を正確に検出できない。

本技術では1波長の蛍光シグナルで検出可能であり、プローブの蛍光は相互作用のある時に限定して増大するため、**タンパク質間の結合、解離のプロセスを正確に観察可能と考える。**

本標識法を利用した タンパク質間相互作用の検出

OBPタグ結合性
蛍光プローブ
(可逆標識, 発蛍光性)



HaloTag
リガンド
(非可逆的に標識)

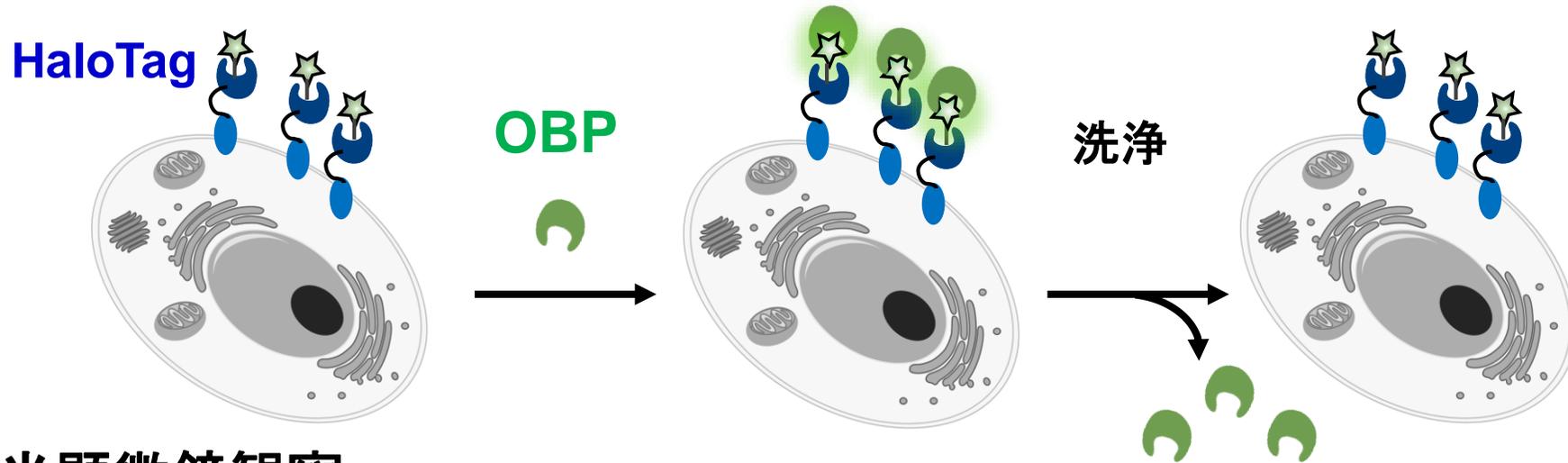
蛍光プローブの設計



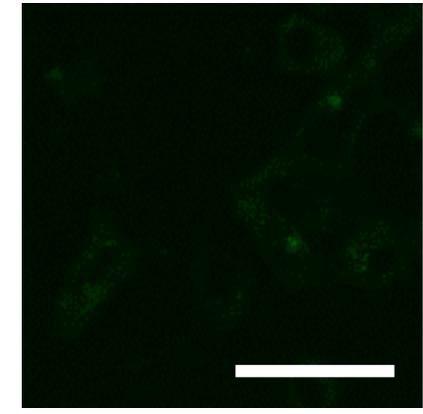
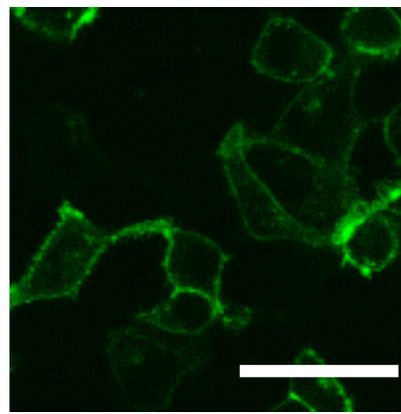
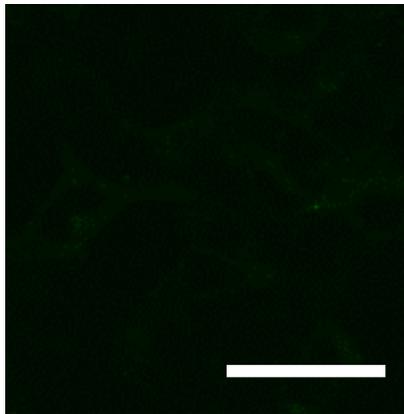
リンカー長の異なるプローブを合成
細胞膜透過性の付与、蛍光色素の多色化も可能

生細胞におけるタンパク質間相互作用検出

(細胞膜に発現)



蛍光顕微鏡観察



HEK293T cells expressing Halo-EGFR, 0.5 μ M probe (DMEM containing 0.05% DMSO).
10 μ M recombinant OBP. Temperature: 37 °C. λ_{ex} :473 nm. λ_{em} :490~540 nm. Scale bar: 40 μ m.

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術が持たない、**標識用蛍光プローブの素早い交換を実現した。**
- 従来法では標識用の蛍光プローブが入れ替わらないため、**蛍光プローブの褪色によって観察時間が制限されていたが、本手法は原理的には時間制限なく観察が可能である。**
- タンパク質間相互作用においても、従来法と比べ**結合、解離のプロセスを正確に観察可能と考える。**

想定される用途

- 本技術は試験管内、生細胞内においてタンパク質検出・イメージング用のツールとして、**バイオ研究の場面で利用できる**と考えられる。
- また、タンパク質間相互作用の検出にも利用できるため、**タンパク質間相互作用を標的とした創薬や医療分野にも展開が期待**できる。
- 今回のデータでは示していないが、OBPの元々の役割から**匂い物質の蛍光センサーとしての応用も**考えられる。

実用化に向けた課題

- 現在、蛍光標識法を用いた生細胞イメージング、標識可逆性を実証済み。長時間観察については未実証である。
- 今後、生細胞イメージング実験により、長時間のイメージングによるタンパク質動態解析に適用する場合の条件設定を行っていく。
- 汎用化に向けて、蛍光プローブのさらなる多色化、明るさの向上、標識選択性の改変を予定。

企業への期待

- 性能向上については、蛍光プローブ開発およびタグ変異体の作製により克服できると考えている。
- バイオ研究ツールの技術を持つ、あるいはタンパク質あるいはその相互作用の検出法を開発中の企業との共同研究を希望。
- 匂いセンサーに興味を持つ企業には、本技術の導入が有効と思われる。

企業への貢献、PRポイント

- 本格導入にあたる場合は蛍光プローブ合成、タンパク質調製等の技術指導を進めたい。
- 匂いセンサーに関しては、用途に応じて必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：タンパク質を蛍光標識する手法
 - 出願番号：特願2023-34762
 - 出願人：大阪大学
 - 発明者：蓑島維文、飯嶋航平、Reja Shahi Imam、菊地和也
-
- 発明の名称：タンパク質間相互作用を可視化する方法
 - 出願番号：特願2024-31686
 - 出願人：大阪大学
 - 発明者：蓑島維文、李嘉童、菊地和也

お問い合わせ先

大阪大学

共創機構 イノベーション戦略部門 知的財産室

<TEL> 06-6879-4861

<e-mail> tenjikai@uic.osaka-u.ac.jp