

生細胞での標的タンパク質の選択的ラベル化と機能解析

内之宮祥平

生体で多様な働きをするタンパク質の機能を解析することは、生命現象の解明に必須である。タンパク質の機能解析は細胞を破碎して行われることが多いが、この場合、細胞本来の環境が解析結果に反映されにくい。またタンパク質が、細胞のどこで、いつ機能するかを知ることができない。

そこで、生細胞でタンパク質機能を解析する手法が開発されてきた。代表例に、GFPなどの蛍光タンパク質を遺伝子工学的に標的タンパク質へ導入する手法があり、これまでに多くのタンパク質機能が解析された。ただし、本法では蛍光による解析に限られるため、NMRなど、より多様な解析を可能とする人工小分子（プローブ）で、生細胞中のタンパク質を化学修飾（ラベル化）する技術が求められていた。だが、細胞には多様な生体分子が存在するため、標的タンパク質特異的なラベル化は難しかった。そこで、標的タンパク質に目印となるタグを遺伝子工学的に導入し、そのタグ選択的にプローブをラベル化する手法が開発された¹⁾。この手法は、①タンパク質タグ、②酵素基質タグ、③ペプチドタグ/プローブ相互作用ペアに大別される（図1）。以下にそれぞれの特徴を述べる。

タンパク質タグでは、反応部位をもつプローブと特異的に共有結合反応するよう機能改変されたタンパク質（酵素）をタグとして用いる。たとえば、Haloタグではプローブに導入された塩化アルキルが、Haloタグの活性中心にあるアスパラギン酸とエステル結合を形成する。Haloタグは、このエステル結合が加水分解しないよう機能改変されているため、結果的にプローブは標的タンパク質に安定に共有結合ラベルされる²⁾。このようなタンパク質タグは、細胞で標的タンパク質特異的なラベル化や、蛍光イメージングなどの解析を可能とする。しかし、タグのサイズが大きい（分子量約10～30 kDa）ため、タグ導入による標的タンパク質の動態変化が懸念される。

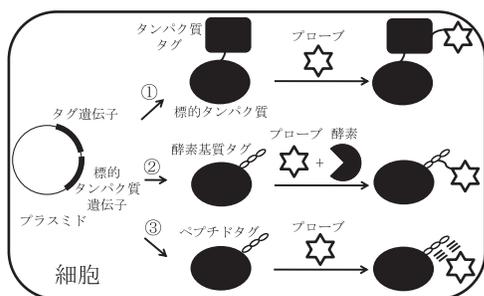


図1. 生細胞での標的タンパク質の選択的ラベル化。①タンパク質タグ、②酵素基質タグ、③ペプチドタグ/プローブ相互作用ペア。

酵素基質タグは、特定のペプチドをタグとして標的タンパク質に導入し、酵素反応によって基質となる小分子プローブをタグに共有結合でラベル化する方法である。導入するペプチドのサイズが小さい（数kDa）ため、標的タンパク質機能への影響は少ないが、ラベル化反応に酵素を用いるのでラベル化可能な条件やプローブ構造に制限がある。たとえば、細胞内環境はラベル化条件に適さないため、大半の酵素基質タグは細胞表層での使用に限られる。また、A. Y. Tingらが細胞内で使用可能な酵素基質タグを開発した³⁾が、ラベル化可能なプローブは蛍光色素であるクマリン類縁体に限られる。

一方、ペプチドタグ/プローブ相互作用ペアでは、サイズの小さいペプチドタグに、多様な小分子プローブをさまざまな条件下でラベル化することができる。これは、本手法ではペプチドタグと自発的かつ選択的に相互作用する部位（金属錯体など）を有するプローブを用いるためである。たとえば、R. Y. Tsienらが開発したFIAsHタグでは、タグであるTetraCystein配列（CCXXCC）と、プローブ中のヒ素との相互作用を利用する⁴⁾。本手法により、蛍光色素のラベル化によるイメージングだけでなく、カルシウムセンシングプローブをイオンチャンネルにラベル化することで、生細胞内におけるイオンチャンネル近傍でのカルシウムイオンの流入をモニタリングすることに成功した⁵⁾。また、浜地らはタグとプローブ双方に反応部位を導入し、ペア間の相互作用に伴い不可逆的にプローブをラベル化する手法を開発した⁶⁾。不可逆的なラベル化では、タグからプローブが解離しないため、ラベル化タンパク質の電気泳動や長時間の蛍光イメージングなどの解析が可能となる。この手法を用いて、細胞表層でのGタンパク質共役受容体のラベル化と、薬剤刺激に伴う局在変化の蛍光イメージングに成功している⁷⁾。しかし、ペプチドタグ/プローブ相互作用ペアでは、ラベル化の選択性や反応速度に、改良の余地がある。

これまでに、タグを利用したさまざまなタンパク質ラベル化法が開発されてきた。これらにはそれぞれ長所と短所があるが、互いを補完し合うよう利用することで、さらに多くの生命現象の解明に貢献することが期待される。

- 1) Johnsson, K *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**, 766 (2010).
- 2) Wood, K. V. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **6**, 373 (2008).
- 3) Ting, A. Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10914 (2010).
- 4) Tsien, R. Y. *et al.*: *Science*, **281**, 269 (1998).
- 5) Tsien, R. Y. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 423 (2007).
- 6) Hamachi, I. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15777 (2007).
- 7) Hamachi, I. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9301 (2010).