



高選択的 Cys-His タグケミカルラベリングのイメージング応用 Application of a High Selective Cys-His tag Chemical Labeling to Protein Imaging

善明直輝¹、得丸祥貴¹、内之宮祥平¹、田畑栄一²、王子田彰夫¹(九大院薬¹、IST Austria²)

タンパク質は生体内において重要な役割を担っており、化学修飾を用いてタンパク質機能を解析・制御することは非常に有効であり、これまでも様々なラベル化法が報告されている。当研究室では、ペプチドタグ/金属錯体プローブによる標的タンパク質特異的ラベル化法「リアクティブタグシステム」の開発を行ってきた (Fig. 1)。本手法は特定の配列を持つペプチドタグと金属錯体プローブが配位結合に基づく特異的相互作用により近接することで、タグ上の Cys 残基とプローブの反応基の共有結合ラベル化が誘起されることを利用している。これまでに開発した Asp 連続配列を有する Asp-rich タグ/Zn(II)錯体プローブペアと直交性を持つタグ・プローブペアによって、同一細胞表層上の異なるタンパク質のマルチカラーイメージングが可能になる。そのため今回新たに His 連続配列を持つ Cys-His タグ/Ni(II)-NTA 錯体プローブペアの開発を行った。

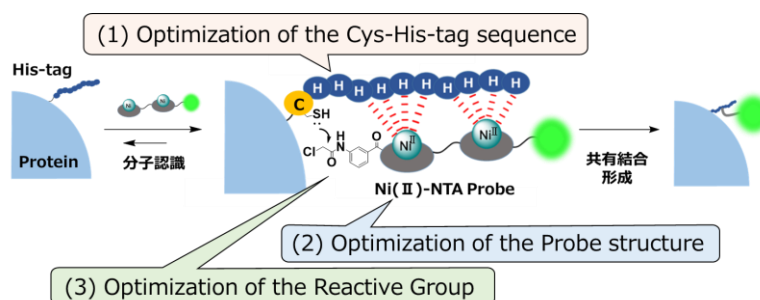


Fig. 1 Reactive tag system.

Cys-His タグを利用したタンパク質ラベル化法はこれまでも研究が行われてきたが、ペプチドタグ配列の最適化や、非特異反応を抑制するための反応基部位のチューニングがほとんど行われてこなかった。そこで演者らは、(1)Cys-His タグの配列探索と(2)Ni(II)-NTA 錯体プローブの詳細な構造最適化、(3)反応基の探索を行い、高いラベル化速度と高いラベル化選択性の両方を有するタグ・プローブペアを見出すことを目指した。反応速度は、Cys-His タグを有する MBP タンパク質に対して蛍光色素を持つ Ni(II)-NTA プローブを反応させ、蛍光ゲル解析によりラベル化速度を算出して評価した。その結果、H5CH5 の配列を持つ Cys-His タグと DabC4 プローブが、最も速い反応速度を示す最適なタグ/プローブペアであることを明らかにした(Fig. 2)。さらに、大腸菌ライセート中での Cys-His タグ融合 MBP のラベル化によりプローブの非特異反応性の評価を行った。これにより十分なラベル化速度と高いラベル化選択の両立を可能とするプローブとして、4-(ジメチルアミノ)クロトン酸アミド(DMAC)を導入する芳香環のオルト位に CF₃基を導入した、MACF₃型のプローブを見出した。また、このペアを用いて細胞表層に発現させたタグ融合受容体タンパク質の蛍光イメージングを行い、従来の Asp-rich タグ/Zn(II)錯体プローブとの直交性が示されたため、併せて報告する。

Cys-His-tag sequence

CH6 tag : C H H H H H H H

CH10 tag : C H H H H H H H H H H H

H5CH5 tag : H H H H H C H H H H H H

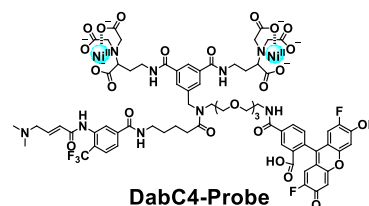


Fig. 2 Optimization of the tag sequence and the probe structure.

<参考文献>

1) N. Zenmyo, A. Ojida *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2019**, in press

発表者紹介

氏名 善明直輝 (ぜんみょうなおき)

所属 九州大学大学院薬学府創薬科学専攻

学年 博士後期課程 1 年

研究室 創薬ケミカルバイオロジー分野 (王子田研究室)

