

ペプチドタグ／ナノプローブを用いたタンパク質機能の解析

産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター

川上 隆史

要旨

蛍光タンパク質は細胞内タンパク質イメージング解析において非常に強力な基盤研究ツールであるが[1]、ナノプローブ（量子ドット）に代表される非生体分子プローブを用いることによって、長時間の一分子イメージング等、更に高度なイメージング解析が可能になる[2]。また、その非生体分子プローブを特定タンパク質にラベルするための様々な翻訳後反応ポリペプチドタグ（トランスグルタミナーゼ基質ペプチドタグなど[3]）も報告されてきている。

1. 研究目的と成果

そこで本研究では、人工改変酵素とペプチドタグを用いたタンパク質ラベリング法と、膜障害毒素のストレプトリジンOを用いた量子ドットの細胞内導入法とを組み合わせることにより、細胞内タンパク質の特異的蛍光ラベリングと一分子イメージングを達成することを目的とした。

その成果として、蛍光顕微鏡イメージング解析により、人工改変酵素によるペプチドタグへの量子ドットの特異的蛍光ラベリングを確認することができた。また、量子ドットによりラベリングされたペプチドタグ融合タンパク質の一分子イメージング観察も確認することができた。

2. まとめと今後の課題

人工改変酵素とペプチドタグを用いたタンパク質ラベリング法と、膜障害毒素のストレプトリジンOを用いた量子ドットの細胞内導入法とを組み合わせることにより、細胞内タンパク質の特異的蛍光ラベリングと一分子イメージングに成功した。

近年我々は、数十兆種類（ $\sim 10^{14}$ ）のポリペプチドライブライリーからの超高速スクリーニングを可能にする無細胞系の進化分子工学的手法により[4-5]、タンパク質ラベリング用ポリペプチドタグを開発する新システム（DIVERSE システム：Directed In Vitro Evolution of Reactive peptide-tags via Sequential Enrichment）を構築し、モデル系として、非酵素的・共有結合ラベリング型ペプチドタグの de novo 創製にも成功している（図1）。DIVERSE システムは、新規ペプチドタグの de novo 創製に限らず、数十兆種類のポリペプチドライブライリーからの超高速スクリーニングを介した、既存ポリペプチドタグの配列最適化などに応用することも可能である。

今後は、この DIVERSE システムと組み合わせることによって、より迅速・簡便なペプチドタグとナノプローブを用いた生細胞内タンパク質解析の達成が課題である。

本研究は、2014 年度 ATI 研究助成により実施されました。本研究をご支援頂きました、

公益財団法人新世代研究所に深く御礼申し上げます。

また、産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センターの五島 直樹 研究チーム長と夏目 徹 研究センター長には、本研究の遂行に際し、ご助言、ご協力を賜りました。心より御礼申し上げます。

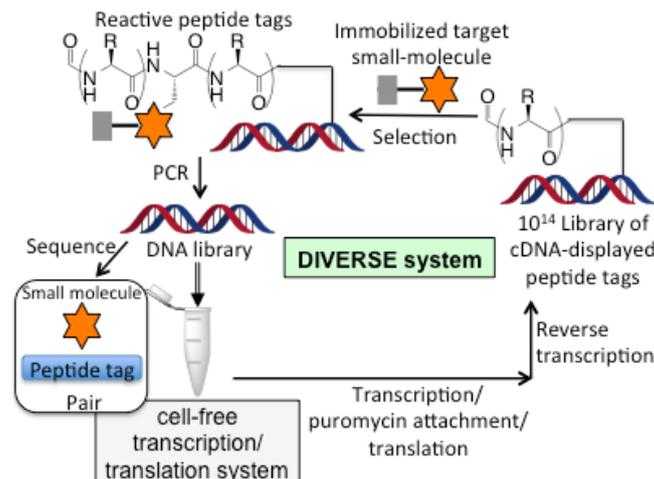


図1. DIVERSE システムを用いたタンパク質ラベリング用ペプチドタグの創製

参考文献

1. Kawakami, T., Cheng, H., Hashiro, S., Nomura, Y., Tsukiji, S., Furuta, T., Nagamune, T., A Caged Phosphopeptide-Based Approach for Photochemical Activation of Kinases in Living Cells. (2008) *ChemBioChem*, **9**, 1583-1586.
2. Jablonski, A. E., Kawakami, T., Ting, A. Y., Payne, C. K., Pyrenebutyrate Leads to Cellular Binding, Not Intracellular Delivery, of Polyarginine-Quantum Dots. (2010) *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 1312-1315.
3. Takagishi, Y., Kawakami, T., Hara, Y., Shinkai, M., Takezawa, T., Nagamune, T., Bone-like tissue formation by three-Dimensional culture of MG63 osteosarcoma cells in gelatin hydrogels using calcium-enriched medium. (2006) *Tissue Eng.*, **12**, 927-937.
4. Kawakami*, T. et al., Incorporation of electrically charged N-alkyl amino acids into ribosomally synthesized peptides via post-translational conversion. (2014) *Chem. Sci.*, **5**, 887-893.
5. Kawakami*, T. et al., Extensive reprogramming of the genetic code for genetically encoded synthesis of highly N-alkylated polycyclic peptidomimetics. (2013) *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12297-12304.

成果発表

Kawakami*, T., Ogawa, K., Goshima, N., Natsume, T., DIVERSE system: de novo creation of non-enzymatically covalent-labeling peptide tags by in vitro evolution for protein imaging inside living cells. (2015) *Chem. Biol.*, accepted.