

[最近のトピックス] 口腔生物学系薬理学分野

生きた細胞の標的タンパク質分子をラベルする新しい蛍光標識技術

根津 顕弘

北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野

Akihiro NEZU

Department of Oral Biology, Division of Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

タンパク質の蛍光標識技術は、発現したタンパク質の細胞内分布だけでなく、その細胞内動態や相互作用を解析する研究分野において極めて有用である。現在、このような技術としてGFPをはじめとした種々の蛍光タンパク質が多く分野で使用されている。しかし、蛍光タンパク質は分子量が大きすぎるため(220~250個のアミノ酸)、蛍光標識されたタンパク質が立体障害などによって本来の挙動や機能を示さない可能性がある。1998年にTsienらによって新しい蛍光色素FAsHが報告された(1)。このFAsHは無蛍光性の化合物で高い膜透過性を有し、目的タンパク質に付加したテトラシステイン(Tc)配列に特異的に結合して錯体を形成すると強い蛍光を発する(図1)。このTc配列は構成アミノ酸数が6個と少なく、分子量が蛍光タンパク質と比べて極めて小さいことから蛍光標識による立体障害を大幅に軽減する事が可能である。彼らはこのFAsH標識法により、膜タンパク質の細胞内での挙動のイメージングに成功している(2)。またFAsHは単なる蛍光標識プローブとしてだけでなく、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)技術に応用され、YFPなどに変わる効率の良いアクセプターとしても使用されている(3)。またFAsH技術を応用した色素には、赤い蛍光を放つReAsHがあり、これらは現在市販されている。

最近、Tsienらのグループは、目的タンパク質に付加されたヒスチジンタグ(His₆)配列に特異的に結合する膜非透過性の蛍光色素HisZiFiTを発表した(4)。HisZiFiTはFAsHとは異なり細胞膜を透過しない化合物であるため、細胞膜上に発現する目的タンパク質のみを蛍光標識することが可能である。HisZiFiTは、亜鉛(Zn²⁺)存在下でHis₆配列と特異的に結合する蛍光色素である(図2)。

現在、我々は細胞内のCa²⁺放出あるいは流入機構を明

らかにするため、蛍光タンパク質を付加したイノシトール三リン酸受容体やStim-1などを作成し、これらの分子の動態のリアルタイム観察を行っている。今後、これらのタンパク質だけでなく、プロテインキナーゼCやNa-K-2Cl共輸送体などをFAsHにより蛍光標識し、これらの分子の細胞内動態や分子間の相互作用を調べる予定である。今回紹介した新しい蛍光標識技術は、生きた細胞においてタンパク質の挙動や機能を解析することができる魅力的な実験ツールとなることが期待される。

文献

- 1) Griffin BA, Adams SR, Tsien RY. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281: 269-272, 1998.
- 2) Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296: 503-507, 2002.
- 3) Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilaradaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse MJ. A FAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2(3): 171-176, 2005.
- 4) Hauser CT, Tsien RY. A hexahistidine-Zn²⁺-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(10): 3693-3697, 2007.

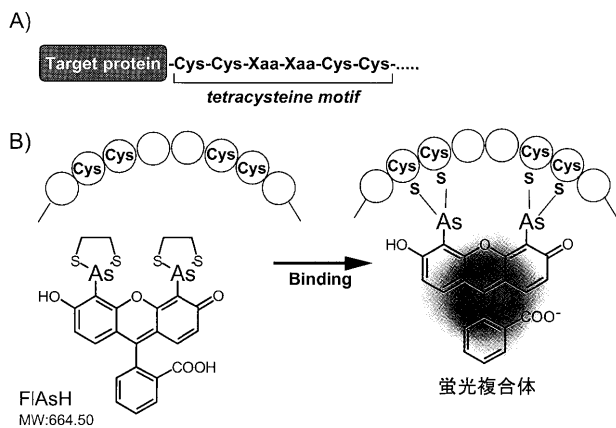


図1 FIAsHによるテトラシステインモチーフの認識機構
A) テトラシステインモチーフ (Tc) 配列. 4つのシステイン (Cys) と2つの任意のアミノ酸 (Xaa) によって構成される.
B) FIAsHを構成するヒ素 (As) が, Cysのもつチオール基 (S基) と特異的に結合し錯体を形成すると強い蛍光を発する. FIAsHは高い細胞膜透過性を有し, Tc配列と結合すると強い蛍光を発する.

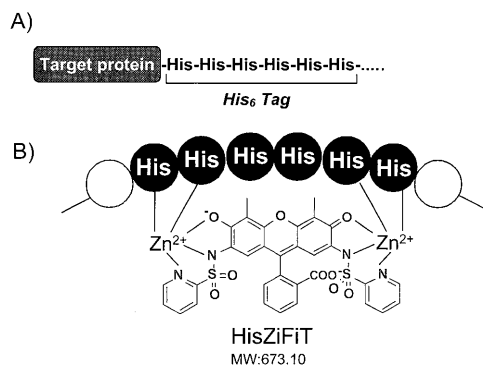


図2 HisZiFiTによるヒスチジンタグ配列の認識機構
A) ヒスチジンタグ配列 (His₆). 6つのヒスチジン (His) によって構成される.
B) HisZiFiT (赤色) は, 亜鉛 (Zn^{2+}) 存在下で His₆配列と特異的に結合し錯体を形成する. HisZiFiTは細胞膜を通過出来ない.