

細胞内ホスファチジルイノシトール 4-リン酸を可視化する新規遺伝子コード型蛍光プローブの開発

(名工大院工¹・新潟大院医歯²) ○阿喰 萌香¹・吉川 優¹・中津 史²・築地 真也¹
Development of novel genetically encoded fluorescent probes for visualizing phosphatidylinositol 4-phosphate in living cells (¹*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*, ²*Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University*)
○Moeka Ajiki,¹ Masaru Yoshikawa,¹ Fubito Nakatsu,² Shinya Tsukiji¹

Phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) plays essential roles in regulating various cellular functions including membrane dynamics, membrane contact formation, and GPCR signaling. However, how PI4P regulates cellular physiology in a spatiotemporal manner has yet to be fully understood. Fluorescent probes that allow the visualization of PI4P distribution in live cells are required to investigate the dynamics and functions of PI4P. However, existing probes based on P4M-SidM and OSBP-PH have limitations such as weak affinity and biased specificity to Golgi PI4P. In this work, we aimed to develop practically useful genetically encoded fluorescent PI4P probes by utilizing the PH domain of the ORP9 protein. The design, characterization, and application of our novel fluorescent PI4P probes will be presented.

Keywords: *phosphatidylinositol 4-phosphate; fluorescent probe; oxysterol-binding protein-related protein 9; pleckstrin-homology domain; plasma membrane*

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) はイノシトールリン脂質の一種であり、細胞内では主に細胞膜とゴルジ体膜に分布している¹⁾。古くは、細胞膜 PI4P はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸[PI(4,5)P₂]の前駆体として考えられてきた。しかし近年、PI4P が膜ダイナミクス²⁾、小胞体 (ER) と他のオルガネラ膜とのコンタクト形成³⁾、損傷リソソームの修復⁴⁾、GPCR シグナリング⁵⁾など、実にさまざまな細胞生理機能に関与していることが明らかになってきた。このように PI4P の重要性が再認識されつつある一方、PI4P の細胞内分布やその動態、さらには PI4P がどのようにして細胞生理機能を制御しているのかについては未だ不明な点が多い。これらの解明のためには、生きた細胞内の PI4P の分布や量の変化を高精度に検出できるプローブが必要である。既存の PI4P プローブとしては、P4M-SidM⁶⁾ や OSBP-PH⁷⁾などの PI4P 結合ドメインに蛍光タンパク質を融合したもののものが報告されている。しかし、P4M-SidM は PI4P への結合が弱く、また OSBP-PH はゴルジ体膜上の PI4P に優先的に結合してしまう (そのため細胞膜 PI4P はほとんど検出できない) という欠点があり、より実用的で汎用的な PI4P プローブの開発が待たれている。

そこで本研究では、ORP9 タンパク質の PH ドメイン⁸⁾に着目し、これを利用した新規 PI4P 蛍光プローブの開発に取り組んだ。本発表では、今回新たに開発した新規 PI4P プローブの設計・基本特性、多色化、さらに細胞内 PI4P 動態の可視化への応用について報告する。

1) F. Nakatsu et al., *J. Cell Biol.* **2012**, 199, 1003. 2) F. Nakatsu et al., *Front Cell Dev. Biol.* **2021**, 9, 664788. 3) E. J. Dickson et al., *J. Cell Biol.*, **2016**, 213, 338. 4) J. X. Tan, T. Finkel, *Nature* **2022**, 609, 815. 5) L. Zhang et al., *Cell* **2013**, 153, 216. 6) G. R.V. Hammond et al., *J. Cell Biol.* **2014**, 205, 113. 7) A. Balla et al., *Mol. Biol. Cell.* **2005**, 16, 1282. 8) M. Ngo et al. *Mol. Biol. Cell.* **2009**, 20, 1388.