

生細胞イメージングのための新規非共有結合型発蛍光プローブラベリングシステムの開発

(名工大院工) ○伊東 駿・筒井 啓太・阿喰 萌香・吉川 優・深谷 菜摘・築地 真也
Development of a novel noncovalent fluorogenic probe labeling system for live-cell imaging
(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) ○Shun Ito, Keita Tsutsui,
Moeka Ajiki, Masaru Yoshikawa, Natsumi Fukaya, Shinya Tsukiji

Live-cell protein labeling using a protein tag and a synthetic fluorescent probe is a valuable approach for visualizing protein localization and biological processes. Several fluorogenic probes for protein tags, such as SNAP-tag and HaloTag, have been recently developed. They enable high signal-to-noise imaging of target (tag-fused) proteins even without washing steps. However, these covalent probe labeling systems suffer from the issue of photobleaching because a fluorescent probe cannot be replaced once it is bleached. In this study, we aimed to overcome this limitation by developing a novel noncovalent labeling system that can exchange bound fluorescent probes with new intact ones and reduce photobleaching. In this presentation, we report our recent efforts to generate a noncovalent fluorogenic probe labeling system using an *E. coli* dihydrofolate reductase tag and small-molecule trimethoprim ligand pair.

Keywords: *fluorogenic probe, Escherichia coli dihydrofolate reductase, trimethoprim, intramolecular spirocyclization reaction, noncovalent labeling*

タグタンパク質に有機小分子蛍光プローブを特異的に結合させることでその融合タンパク質を可視化するタグラベリング技術は、生命現象や疾患の作用機序解明において非常に有用な研究ツールとなる。タグラベリングの分野においてはこれまで、SNAP-tag¹⁾ や HaloTag²⁾ のような共有結合型のタグタンパク質が最も汎用的に使用されてきた。最近では、蛍光プローブの洗浄操作なしでこれらのタグタンパク質を高い S/N 比で標識できる発蛍光 (turn-on 型) プローブの開発も進展を見せている^{3,4)}。一方、共有結合型のタグタンパク質では、標識した蛍光プローブが一度褪色してしまうとその分子はもう観察できない。そこで我々は、この光褪色の問題を解決するアプローチとして、非共有結合型の発蛍光タグラベリングシステムの開発に着手することにした。非共有結合型発蛍光ラベリングシステムでは、タグタンパク質に結合した蛍光プローブが光褪色してもインタクトな蛍光プローブとの可逆的な交換が起こるため、見かけ上の光安定性が飛躍的に向上するものと期待される。そこで本研究では、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) とそのリガンドであるトリメトプリム (TMP) のペアを用いた新規非共有結合型発蛍光プローブラベリングシステムの開発を行った。具体的には、TMP に様々な構造のリンカーを介してテトラメチルローダミン、Max Plank 555³⁾、Janelia Fluor 526⁴⁾ を連結した蛍光プローブを計 9 種類設計・合成した。これらを用いた蛍光イメージング実験を行うことで、eDHFR を無洗浄で高い S/N 比で蛍光標識可能な発蛍光プローブを見出すことに成功した。本発表では、今回開発した一連の蛍光プローブ群の *in vitro* 蛍光特性や無洗浄生細胞イメージングにおける蛍光標識特性などについて報告する。

1) A. Keppler et al., *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 86. 2) G. V. Los et al., *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373. 3) L. Wang et al., *Nat. Chem.* **2020**, 12, 165. 4) Q. Zheng et al., *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5, 1602.