

タグタンパク質 PYP をラベル化する非天然リガンドの開発とイメージング

(阪大院工¹・阪大免フロ²) ○橋本 明莉¹・堀 雄一郎^{1,2}・梅野 真帆¹・菊地 和也^{1,2}

Development of an unnatural ligand for labeling the tag protein PYP and imaging (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Immunology Frontier Research Center, Osaka University,) ○Akari Hashimoto,¹ Yuichiro Hori,^{1,2} Maho Umeno,¹ Kazuya Kikuchi^{1,2}

Proteins are widely involved in various biological phenomena such as metabolism and signal transduction, which are regulated by dynamic protein translocation. It is thus important to clarify their subcellular localization and dynamics in living cells.

We have developed a protein labeling technique using PYP (Photoactive Yellow Protein) tag and its various fluorescent probes¹⁾. PYP tag is a small 125-amino-acid protein derived from *Halorhodospira halophila* and is known to specifically form a covalent bond with a cinnamic acid thioester natural ligand. Fluorescent PYP-tag probes with the ligand are synthetically challenging due to many synthetic steps, limiting creation of their various derivatives. In addition, their large molecular weight and low water solubility make them prone to aggregation.

In this study, we report a unnatural ligand for PYP tag that simplifies the synthesis steps and decreases the molecular size. Various ligand candidates with unnatural reactive groups and substituents were synthesized based on chemical structures similar to the natural ligand. We created PYP-tag probes with different fluorophores using one of the ligands that showed rapid labeling kinetics. Live cell imaging was performed using the probes, allowing specific detection of cytoplasm, nucleus, and cell membrane proteins.

Keywords : *Fluorescent probe, Protein tag, PYP-tag*

タンパク質は代謝やシグナル伝達などの様々な生命現象に広く関わっており、その細胞内局在や動態を明らかにすることは非常に重要である。

我々は PYP (Photoactive Yellow Protein) タグと合成蛍光分子を用いたタンパク質ラベル化法を開発してきた¹⁾。PYP タグは紅色硫黄細菌由来の 125 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質であり、クマリン誘導体や桂皮酸と特異的に共有結合を形成する。しかし、PYP の天然リガンドを有するプローブは、合成ステップ数が多いためプローブの改良や誘導体の作成時に困難を伴うことが多かった。また、分子量が大きく、水溶性が低いため凝集しやすいという問題があった。

そこで、本研究では、合成ステップの簡略化と分子サイズの低減を実現するべく、PYP タグの非天然リガンドを開発した。分子設計は、天然リガンドである桂皮酸に着目し、その化学構造に類似した構造から構造展開した種々のリガンドを合成し、ラベル化速度の比較・検討を行った。最もラベル化速度の速かったリガンドに蛍光色素を連結した複数の PYP タグラベル化プローブを開発した。これらのプローブを用いて生細胞イメージングを行い、細胞質、核及び細胞膜に局在するタンパク質の検出に成功した。

1) S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki, and K. Kikuchi, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 853.