

## 細胞内タンパク質をラベル化する pH 応答性蛍光プローブの開発

(阪大院工<sup>1</sup>・免疫学フロンティア研究センター<sup>2</sup>) ○門岡 康平<sup>1</sup>・蓑島 維文<sup>1</sup>・菊地 和也<sup>1,2</sup>

Development of pH-responsive fluorescent probe for labeling intracellular protein

(<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>Immunology Frontier Research Center)

○Kohei Kadooka,<sup>1</sup> Masafumi Minoshima,<sup>1</sup> Kazuya Kikuchi<sup>1,2</sup>

pH environmental plays important roles in the maintenance of physiological functions in each organelles<sup>1</sup>). In particular, the pH of the organelles lumen is known to be acidic during protein translocation in endocytosis and autophagy pathways<sup>2</sup>). Thus, detection of pH changes during protein translocation is very important for elucidating these cellular functions.

Fluorescence imaging technology is a useful technique for visualizing protein dynamics and function. We have developed a protein labeling system using a mutant  $\beta$ -lactamase tag<sup>3</sup>). This technique enables highly sensitive real-time observation of protein dynamics by fluorescently labeling of target proteins. In addition, we have recently developed fluorescent probes based on  $\beta$ -lactamase inhibitors bearing diazabicyclooctanes for long-term imaging of target proteins in cells.

In this study, we developed an intracellular protein labeling probe with a pH-responsive fluorescent dye to image pH changes with protein translocation.

**Keywords:** Fluorescence Imaging; pH-responsivity; Protein-labeling;  $\beta$ -lactamase;  $\beta$ -lactamase Inhibitor

細胞内にはさまざまな機能を持つオルガネラがあり、各オルガネラはそれぞれ独自の pH 環境を制御することで生理機能の維持に重要な役割を果たしている<sup>1</sup>)。中でもオートファジー経路などのタンパク質輸送経路に位置するオルガネラ内腔の pH は、酸性であることが知られている<sup>2</sup>)。このようなタンパク質輸送に伴う pH 変化を検出することは、細胞機能を詳細に解明する上で非常に重要である。

生体内のタンパク質の挙動の可視化、機能解明に有用な手法として蛍光イメージング技術がある。我々は、これまでに変異体 $\beta$ -ラクタマーゼをタグとして用いたタンパク質蛍光ラベル化法を開発してきた<sup>3</sup>)。この技術は、蛍光顕微鏡を用いて特異的に蛍光標識された標的タンパク質を観察することで、タンパク質の挙動をリアルタイムで高感度に観察することができる。さらに、最近 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を用いた蛍光プローブを開発し、細胞内の標的タンパク質の長時間イメージングを達成した。

今回、pH 応答性の蛍光色素を導入した新たな蛍光プローブを開発することで、細胞内のタンパク質を標識し、pH 変化のイメージングを行った

1) M. Jeyakumar, R. A. Dwek, T. D. Butters, and F. M. Platt, *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 713.

2) J. R. Casey, S. Grinstein, and J. Orlowski, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *11*, 50.

3) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori and K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016.