

大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素タグに対する発蛍光プローブの開発

(名工大工¹・名工大院工²) ○伊東 駿¹・筒井 啓太²・鈴木 祥央²・築地 真也^{1,2}
Development of fluorogenic probes for *E. coli* dihydrofolate reductase (eDHFR) tag (¹ Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology, ² Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) ○Shun Ito,¹ Keita Tsutsui,¹ Sachio Suzuki,¹ Shinya Tsukiji^{1,2}

Protein labeling using a protein tag and a tag-specific small-molecule fluorescent probe is a powerful tool for visualizing protein localization and dynamics in living cells. To date, various protein tags have been reported, which include SNAP-tag, HaloTag, and *E. coli* dihydrofolate reductase (eDHFR). However, most of fluorescent probes developed so far suffer from low-to-moderate membrane permeability and non-specific labeling in cells, necessitating a washing procedure. To overcome these problems, novel fluorogenic probes based on JaneliaFluor526 and MaP dyes have been recently developed for SNAP-tag and HaloTag labeling. These probes have high membrane permeability and enable wash-free imaging of SNAP-tag/HaloTag-fusion proteins with high S/N ratios. However, the development of small-molecule fluorescent probes suitable for the eDHFR tag has remained challenging. In this poster, we will report new fluorogenic probes for the eDHFR tag and their photophysical and labeling properties.

Keywords : fluorescence imaging; protein tag; fluorogenic probe; *E. coli* dihydrofolate reductase; trimethoprim

細胞内におけるタンパク質の局在や動態の解析において、タンパク質タグと小分子蛍光プローブのペアを用いたタンパク質蛍光標識技術は極めて重要なツールである。これまでに動物細胞直交性の高いタンパク質タグとして、SNAP-tag¹⁾や HaloTag²⁾に代表される共有結合型タグや、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR)³⁾のような非共有結合型タグが報告されている。一方、これまでに開発されてきた小分子蛍光プローブは、膜透過性が低～中程度であり、細胞内で非特異的な標識を示す傾向があるため、タンパク質標識の際は比較的高濃度の蛍光プローブでの処理と洗浄操作が必要であった。そこで近年、これらの問題点を克服する新たなアプローチとして、分子内スピロ環化平衡を調節した JaneliaFluor526⁴⁾や MaP シリーズ⁵⁾を蛍光母核とする蛍光プローブが開発された。特に、SNAP-tag と HaloTag 用に設計されたこれらの蛍光プローブは、膜透過性に優れ、タンパク質タグに結合することで蛍光強度が増大する発蛍光性を有する(タンパク質タグに結合していない状態ではほとんど光らない)。そのため、低濃度処理かつ洗浄操作を行わずとも、標的タンパク質を高い S/N 比で特異的に可視化することができる。一方、eDHFR に代表される非共有結合型タンパク質タグもタンパク質蛍光標識のためのツールとして大変有用であるが、eDHFR タグを低濃度・洗浄操作なしで高輝度に標識できる発蛍光プローブの開発は遅れている。

そこで本研究では、eDHFR タグの蛍光標識のための新規発蛍光プローブの開発を目指した。そのための基本戦略として、eDHFR のリガンドであるトリメトプリム (TMP) にさまざまな構造のリンカーを介して MaP や JaneliaFluor 色素を連結した蛍光プローブを複数設計・合成した。本発表では、蛍光プローブ群の分子設計・合成、in vitro での吸収・蛍光・発蛍光特性、ならびに細胞膜透過性や細胞内での蛍光標識特性などについて詳細を報告する。

1) A. Keppler et al., *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 86–89. 2) G. V. Los et al., *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373–382. 3) L. W. Miller et al., *Nat. Methods* **2005**, 2, 255–257. 4) Q. Zheng et al., *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5, 1602–1613. 5) L. Wang et al., *Nat. Chem.* **2020**, 12, 165–172.