

## ピペラジン誘導体と HaloTag-緑色蛍光タンパク質(GFP)融合タンパク質を用いた二酸化炭素検出蛍光バイオセンサーの開発

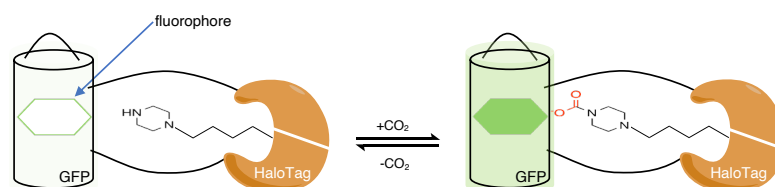
(東大院理<sup>1</sup>・Alberta 大院理<sup>2</sup>) ○柳町 拓海<sup>1</sup>・Kelvin Tsao<sup>1</sup>・Wenchao Zhu<sup>1</sup>・寺井 琢也<sup>1</sup>・Robert E. Campbell<sup>1,2</sup>

Development of a fluorescent chemi-genetic biosensor for carbon dioxide using piperazine as a sensing moiety (<sup>1</sup>*Graduate School of Science, The University of Tokyo*, <sup>2</sup>*Graduate School of Science, University of Alberta*) ○Takumi Yanagimachi<sup>1</sup>, Kelvin Tsao<sup>1</sup>, Wenchao Zhu<sup>1</sup>, Takuya Terai<sup>1</sup>, Robert E. Campbell<sup>1,2</sup>

Many organisms have been observed to concentrate, sense, and use carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), which is a prevalent atmospheric gas molecule of increasing importance in today's climate. One chemically-reasonable mechanism by which biological systems may sense and interact with CO<sub>2</sub> is via carboxylation of lysine amine acid residues as a form of post translational covalent protein modification<sup>1</sup>. Therefore, a tool to visualize CO<sub>2</sub> in cells would be beneficial. Here, we report progress towards a chemi-genetic fluorescent CO<sub>2</sub> sensor based on a combination of green fluorescent protein (GFP), HaloTag<sup>2</sup>, and a piperazine that is known to reversibly bind to CO<sub>2</sub> covalently<sup>3</sup>. HaloTag anchors the CO<sub>2</sub>-capturing piperazine near the GFP chromophore to induce a CO<sub>2</sub>-dependent fluorescence change (Figure 1). So far, we have identified variants that exhibit only modest fluorescence responses when incubated with CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, but <sup>13</sup>C NMR analysis has confirmed that the piperazine ligand does indeed bind to <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> upon incubation with NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub>. Accordingly, further efforts will be directed towards improving the CO<sub>2</sub>-dependent response of the sensor prototype using protein engineering.

**Keywords:** *Chemi-genetic Biosensor; Fluorescence; Proteins; Carbon Dioxide*

二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)は生物学的に重要な分子であり、最近の研究ではタンパク質への翻訳後修飾によりシグナル伝達にも関与することが示唆されている<sup>1</sup>。そのため CO<sub>2</sub> を標的とした細胞イメージング用の蛍光センサーは生物学的に有用である一方で、そのようなセンサーの開発は未だに達成されていない。本研究では、緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した HaloTag(クロロアルカンを持つリガンドと共有結合する改変酵素タグ<sup>2</sup>)と、CO<sub>2</sub> と可逆的に共有結合することが知られているピペラジン<sup>3</sup>を導入した HaloTag リガンドとを組み合わせた化学遺伝子(Chemi-genetic)センサーの開発を目指している(Figure 1)。これまでに、変化の程度は小さいながらもリガンド依存的に CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 存在下で蛍光上昇を示す変異体を同定した。また、ピペラジン誘導体リガンドを NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> 溶液下で反応させることで、<sup>13</sup>C NMR によりリガンドが CO<sub>2</sub> に対する結合性を持つことを確認した。現在は、タンパク質の改変による CO<sub>2</sub> 応答性の改善を目指して研究を進めている。



**Figure 1** Schematic view of chemi-genetic CO<sub>2</sub> sensor.

- 1) Chen, Y *et al. Science*. **2000**, 289 (5479), 625–628.
- 2) Los, G. V *et al. ACS Chem. Biol.* **2008**, 3 (6), 373–382.
- 3) Bishnoi, S *et al. Chem. Eng. Sci.* **2000**, 55 (22), 5531–5543.