

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790094  
 研究課題名 (和文) タンパク質の特異的蛍光ラベル化法の開発とそのバイオイメージングへの応用  
 研究課題名 (英文) Method for fluorescent labeling of proteins aiming at bio-imaging  
 研究代表者  
 梅澤 直樹 (UMEZAWA NAOKI)  
 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 准教授  
 研究者番号：40347422

研究成果の概要：本研究では、新規タンパク質蛍光ラベル化試薬を開発した。ヒスタグと呼ばれる短いペプチドと金属錯体との選択的かつ強固な結合を利用した。開発した試薬は、タンパク質との結合に伴い、蛍光強度が増大するという特長を持つ。同一の原理に基づき、紫外光励起可能な NTAC 類と可視光励起可能な NTAF 類の 2 群の新規試薬を開発した。これらの試薬は、ヒスタグを持つペプチド/タンパク質と選択的に結合し、蛍光強度が増大した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：蛍光標識、タンパク質、ペプチドタグ、ヒスタグ、蛍光色素

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の蛍光ラベル化技術は、タンパク質研究に必須の基盤技術である。目的とするタンパク質のみを蛍光標識可能で、かつ様々なタンパク質に適用可能な汎用的手法の開発は最重要課題の 1 つといえる。筆者は、「ペプチドタグ/蛍光プローブ」ペアによる標識法に着目した。この方法は、既存の手法の欠点を克服するものであるが、タンパク質との相互作用前後で蛍光強度変化が見られないものがほとんどである。そのた

めタンパク質標識後、未反応プローブの洗浄除去が必要であり、バイオイメージング等への応用は困難であった。

## 2. 研究の目的

ペプチドタグとの結合に伴って、蛍光強度が増大する「発蛍光型試薬」の開発を目的とする。ペプチドタグとして「ヒスタグ ((His)<sub>6</sub>)」を、蛍光プローブとして「Co<sup>2+</sup>-NTA (ニトリロ三酢酸) 部位を有する蛍光プローブ」を用いた。ヒスタグと金属-NTA 錯体との選択的相互作用は、タンパク質の精製や固定

化に汎用されており、信頼性が高いためである。

### 3. 研究の方法

発蛍光型試薬の設計にあたり、金属配位性の蛍光団に着目した。金属配位性の蛍光団には、金属に配位することで、蛍光が消光する分子が知られている。金属配位性の蛍光団と  $\text{Co}^{2+}$ -NTA 錯体構造を併せ持つ分子は、「発蛍光型試薬」となると考えた(図1)。蛍光試薬単独では、蛍光団は  $\text{Co}^{2+}$  に配位しているため蛍光は消光している。そこにヒスタグを持つタンパク質を添加すると、蛍光団よりも強く  $\text{Co}^{2+}$  に配位するヒスタグが存在するため、 $\text{Co}^{2+}$ -NTA 錯体部位が目的タンパク質と結合する。それに伴い、蛍光団は遊離し蛍光が回復することを期待した。

本研究では、金属配位能を持つことが知られている蛍光団2種を用いた試薬を合成し、ヒスタグペプチド/ヒスタグタンパク質に対する蛍光応答を検討した。

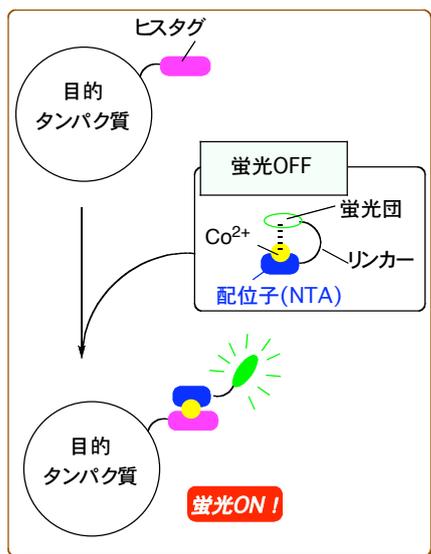


図1 発蛍光型試薬の設計

### 4. 研究成果

紫外光励起可能なヒドロキシマリンを蛍光団とする NTAC 類と、可視光励起可能なフルオレセインを蛍光団とする NTAF 類を設計、合成した(図2)。合成した蛍光試薬 NTAC 及び NTAF は、期待通り、ヒスタグ配列を有するペプチドと  $\mu\text{M}$  オーダーで相互作用し、6-22 倍に蛍光量子収率が增大するという性質を示した(図3)。ヒスタグ配列を持たないペプチド/タンパク質の添加では蛍光変化は起こらず、ヒスタグに対して特異性を持つことが示された。さらにヒスタグ導入タンパク質の蛍光標識にも成功した。これらの結果は、電気泳動ゲルの染色や細胞イメージング等

への応用研究が期待できる結果である。

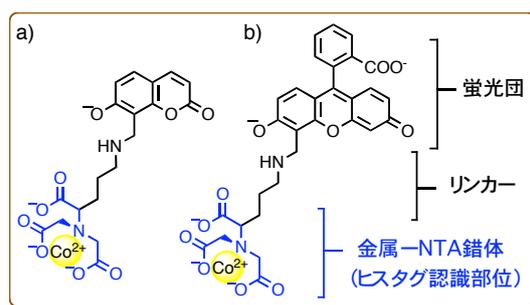


図2 開発した試薬の一例 a) NTAC, b) NTAF

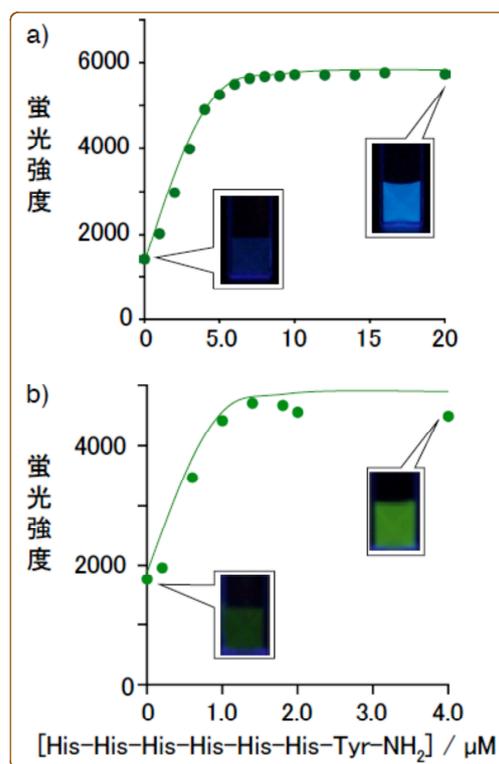


図3 開発した試薬のHisタグ添加時の蛍光変化  
a) NTAC, b) NTAF

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Y. Aoki, N. Umezawa, Y. Asano, K. Hatano, Y. Yano, N. Kato, T. Higuchi, "A versatile strategy for the synthesis of crown ether-bearing heterocycles: discovery of calcium-selective fluoroionophore", *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 7108-7115 (2007), 査読有
- ② T. Yamane, K. Makino, N. Umezawa, N.

Kato, and T. Higuchi, "Extreme rate acceleration by axial thiolate coordination on the isomerization of endoperoxide catalyzed by iron porphyrin: relevance to prostaglandin H<sub>2</sub> isomerase catalysis", T. Yamane, K. Makino, **N. Umezawa**, N. Kato, and T. Higuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 6438-6440 (2008), 査読有

③ S. Akita, **N. Umezawa**, N. Kato, and T. Higuchi, "Array-based fluorescence assay for serine/threonine kinases using specific chemical reaction", *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 7788-7794 (2008), 査読有

④ M. Kamoto, **N. Umezawa**, N. Kato, and T. Higuchi, "Novel probes showing specific fluorescence enhancement on binding to hexahistidine tag", *Chem.-Eur. J.*, 14, 8004-8012 (2008), 査読有

⑤ M. Kamoto, **N. Umezawa**, N. Kato, T. Higuchi, "Turn-on fluorescent probe with visible light excitation for labeling of hexahistidine tagged protein", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 2285-2288 (2009), 査読有

⑥ **梅澤直樹**、樋口恒彦、「キナーゼ活性の蛍光検出」*蛋白質核酸酵素*、52、1601-1607 (2007)、査読無

⑦ **梅澤直樹**、秋田昌二、鴨東美絵、樋口恒彦、「アミノ酸、ペプチドの化学的性質を利用した生体高分子の選択的認識と検出」*薬学雑誌*、127、1915-1925 (2007)、査読無

[学会発表] (計 6 件)

① **N. Umezawa**, "Efficient fluorescence assay for serine/threonine kinases", AIMECS2007, July 10<sup>th</sup>, 2007, Istanbul, Turkey

② **梅澤直樹**、「アミノ酸、ペプチドの化学的性質を利用した生体高分子の選択的認識と検出」、第 4 1 回若手ペプチド夏の勉強会、2008 年 8 月 4 日、京都

③ **Naoki Umezawa**, Shoji Akita, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, "Fluorescence assay for serine/threonine

kinases using specific chemical reaction", 236th ACS National Meeting & Exposition, August 18 & 19, 2008, Philadelphia, USA

④ Mie Kamoto, **Naoki Umezawa**, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, "Novel probes showing specific fluorescence enhancement on binding to hexahistidine tag", 236th ACS National Meeting & Exposition August 19, 2008, Philadelphia, USA

⑤ 鴨東美絵、**梅澤直樹**、加藤信樹、樋口恒彦、「ヒスタグペプチド配列を認識し発蛍光する蛍光試薬の開発」、第 3 回バイオ関連合同シンポジウム、2008 年 9 月 18 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス (神奈川)

⑥ 鴨東美絵、**梅澤直樹**、加藤信樹、樋口恒彦、「ヒスタグ配列を認識する発蛍光型蛍光試薬の開発」、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ペプチド又は蛋白質標識用の蛍光色素

発明者: 梅澤直樹、鴨東美絵、樋口恒彦

権利者: 公立大学法人名古屋市立大学

種類: 特願

番号: 2008-208933

出願年月日: 2008 年 8 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 直樹 (UMEZAWA NAOKI)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：40347422

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：