

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05854

研究課題名(和文) 疾病関連タンパク質検出のための誘導適合off/on型蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of Induced Fit Off/On Type Fluorescent Probes for the Detection of Disease Related Protein

研究代表者

河合 靖 (Kawai, Yasushi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：20240830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドーシスとして多くの難病の原因とされている、タンパク質のアミロイド線維化の過程が検出できる分子の開発が望まれている。本研究課題において、ジアミノプテリジン系フルオロフォアとした、環境変化により蛍光強度や蛍光色が敏感に変化する接近/乖離型と共役拡張型の蛍光プローブを新たに開発することができた。そしてタンパク質の構造変化により蛍光特性が変化する新規な蛍光プローブを見出し、タンパク質のアミロイド線維化の過程が蛍光検出できるプローブの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のアミロイド線維形成メカニズムの解明は、アミロイドーシスなどの多くの難病の機構解明につながることから、喫緊の課題である。本研究において、ジアミノプテリジン系を蛍光団として、接近/乖離型と共役拡張型の蛍光分子を新たに開発した。これらは環境変化により蛍光強度や波長が敏感に変化する新しいタイプの蛍光分子である。そしてタンパク質の構造変化により蛍光特性が変化する分子を見出し、アミロイド線維化の過程が蛍光検出できる分子の開発に成功した。このような革新的な蛍光分子の開発により、アミロイド線維形成の発症メカニズムの解明に大いに寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is desired to develop molecules that can detect the process of amyloid fibrillation of proteins. In this research, novel fluorescent probes with diaminopteridine as a fluorophore have been developed. These are "contact/separation" and "conjugation expansion" type probes, and fluorescence intensity and wavelength are changed sensitively depending on environmental changes. We have found novel fluorescent probes whose fluorescent properties change depending on the conformational change or denaturation of the protein, and have succeeded in developing fluorescent probes that can detect the amyloid fibrillation process of proteins.

研究分野：生物有機化学

キーワード：蛍光プローブ off/onスイッチング 蛍光色の変化 分子イメージング タンパク質の構造変化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が変性しアミロイド線維形成による沈着を伴う疾患には、アルツハイマー病やパーキンソン病など深刻な疾病が多く、その発症メカニズムの解明が急務とされている(*Amyloid*, 7, 19-22, 2000)。一方で、蛍光プローブを利用したバイオイメージング技術の開発が盛んに研究されているが、その中でも光誘起電子移動(PET)を巧みに利用した off/on スwitching 機能を有する蛍光プローブの開発がトピックスとなっている(*J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12021-12030, 2011)。申請者は量子化学計算によって蛍光の off/on switching が容易に設計できる新たな蛍光プローブを、アミロイド線維形成に伴うタンパク質の構造変化を引き金とした蛍光switching や、プテリン結合タンパク質への結合に適用し、蛍光の off/on でこれらのタンパク質やその構造変化が検出可能な革新的な蛍光プローブの開発を検討した。

2. 研究の目的

プテリンが蛍光物質であることは古くから知られているが、蛍光プローブのフルオロフォアとして利用された例はこれまでに無い。申請者はプテリンに芳香族置換基を導入することで、容易に化学変化による off/on switching ができる蛍光プローブとして利用できることを見出し、幾つかの新規蛍光プローブを開発してきた。本研究ではこれを化学変化から柔軟な構造変化による off/on switching へと展開し、アルツハイマー病の発症に関わるアミロイド線維の構造変化の検出や、葉酸関連酵素の阻害剤(抗がん剤や抗生物質)探索に利用可能な革新的な蛍光プローブの開発を目指す。即ち、蛍光分子が水溶液中に単独で存在しているときは光誘起電子移動により消光しているが、アミロイド線維のようなクロスシート構造が誘起されたり、プテリン結合タンパク質が存在する場合に蛍光プローブがそれらに結合して構造変化を起こし、強い蛍光を発することでこれらの検出が可能になる新しい蛍光プローブである。このような構造変化による off/on switching 機能を有した革新的な蛍光プローブの開発により、アミロイド線維形成の発症メカニズムの解明に大いに寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

本研究の目的は、構造変化によって蛍光の off/on が制御可能な蛍光プローブを開発し、そのクロスシート構造に対する機能評価を行うことである。これまでの研究により葉酸誘導体の蛍光発光・消光のメカニズムは量子化学計算により解析可能で、蛍光の off/on の分子設計が可能であることを明らかにしているため、以下の5点について検討した。(1) 葉酸誘導体の PET による蛍光発光・消光原理に基づき、量子化学計算で構造変化によって off/on 制御可能な蛍光プローブを設計した。(2) 理論的に設計された蛍光プローブを実際に化学合成し、その蛍光特性を明らかにした。(3) 合成した蛍光プローブのホストゲストケミストリーやクロスシート構造のモデル環境による蛍光特性を評価した。(4) アミロイド凝集体の蛍光検出が可能かどうかを評価した。(5) プテリン結合タンパク質の蛍光検出が可能かどうかを評価した。

4. 研究成果

(1) off/on 型蛍光プローブの理論設計：プテリンをフルオロフォアとし、その蛍光制御部位としてフェニル基を連結させた分子を設計した。本研究では2種の蛍光制御機構が異なる分子について検討した。一つ目はそれらの連結にトリエチレングリコールをリンカーとして用いた「接近/乖離型蛍光プローブ」で、二つ目は連結にオレフィンリンカーとして用いた「共役拡張型蛍光プローブ」である。接近/乖離型蛍光プローブに関しては、密度汎関数を用いた量子化学計算を駆使する事で、目的とする蛍光プローブの接近型での最適化構造に関する分子軌道及び励起エネルギーを計算し、構造変化による蛍光の off/on 状態が変化可能な化合物を数多く見出した。水中でのフルオロフォアと蛍光制御部位であるフェニル基が接近した状態で蛍光を off に制御するためには、フェニル基にはニトロ基の様な電子求引基が必要である事が明らかになった。また、共役拡張型蛍光プローブに関しても同様の理論計算を行い、クロスシート構造に結合した際の吸収極大波長を見積もった。

(2) 蛍光プローブの合成と蛍光特性の評価：上記の(1)で設計された接近/乖離型と共役拡張型のプローブを実際に合成した。基本骨格としてはフルオロフォア(ジアミノプテリジン)と蛍光制御部位(フェニル基)を2種のリンカーで連結させた化合物である。接近/乖離型蛍光プローブは、ハロゲン脱離基を利用して、求核置換反応によりジアミノプテリジンとトリエチレングリコールリンカーとフェニル基を連結させて合成した。共役拡張型蛍光プローブはハロゲン化したジアミノプテリジンとフェニル基を有するアルデヒドとの Wittig 反応によって合成した。合成した化合物は全て新規化合物であるので構造決定し、吸収スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。接近/乖離型蛍光プローブにおいては、全ての化合物が水溶液中でジアミノプテリジンとフェニル基部位の疎水性相互作用などによる接近構造に起因した消光状態であることを確認した。また、共役拡張型蛍光プローブも水溶液中では消光していることを確認した。フルオロフォアのジアミノプテリジンの場合は水中で強く発光しているのに対し、オレフィンリンカーを介

してフェニル基を導入した共役拡張型のジアミノプテリジンが消光する理由はまだ明らかになっていないが、水中でタンパク質の構造変化を off/on スwitchングにより検出する蛍光プローブの開発において、水中で消光していることは必須の条件であるので、大きな発見であった。(3) 蛍光プローブのホストゲストケミストリーやクロス シート構造のモデル環境による蛍光特性の評価：上記の(2)で合成し、水中で消光していることを確認した幾つかの接近/乖離型と共役拡張型のプローブを用いて、クロス シート構造の疎水性環境のモデル実験として、水中でのシクロデキストリン共存下や疎水性有機溶媒中での蛍光特性を評価した。シクロデキストリンは環状のデキストリンで、水に溶けやすいが環の内部は比較的疎水的で、水中で疎水性の化合物を取り込むホストゲストケミストリーが良く知られた化合物である。接近/乖離型の蛍光プローブで蛍光制御部位がパラニトロフェニル基の場合に、7つのグルコースが環状になったシクロデキストリンを水中で加えていくと、蛍光強度が増大することを確認した。この事は水中でプローブのフルオロフォアと蛍光制御部位が接近してPETにより消光し、シクロデキストリンの空孔内にプローブが結合することで、フルオロフォアと蛍光制御部位が乖離しPETが起きなくなる事で発光していることを示している。このホストゲストケミストリーを用いたモデル実験によって、本研究計画で開発した新たな接近/乖離型蛍光プローブが、フルオロフォアと蛍光制御部位の接近により消光し、それらの乖離によって発光するという全く新しいタイプの off/on 制御蛍光プローブであることを明らかにした。次に、タンパク質のクロス シート構造の内部は比較的疎水的な環境にあるとされていることから、疎水性の異なる様々な有機溶媒中での蛍光特性を評価した。接近/乖離型と共役拡張型の何れの蛍光プローブも水中では消光していたが、溶媒を疎水性にすることで、蛍光が on になることが明らかになった。接近/乖離型の蛍光プローブでは蛍光制御部位がパラニトロフェニル基の場合に、水中からメタノール、エタノールとアルカノールのアルキル基をデカノールまで伸ばして疎水性にしていくと、蛍光強度が増大していく事を確認した。また、共役拡張型の蛍光プローブではフェニル基が無置換の場合に、溶媒の極性の指標として広く使われている $\epsilon_r(30)$ と蛍光強度の間に負の相関があることが分かった。この事は、水中で消光しているこのプローブが疎水的な環境になればなるほど蛍光強度が増大していく事を示している。また、同じ共役拡張型の蛍光プローブでもフェニル基がパラニトロ置換の場合には、蛍光強度だけでなく蛍光極大波長も大きく変化することを見出した。この事で、水中で消光しているこのプローブが疎水的な環境になると溶媒の種類により青白色、緑色、黄緑色、橙色など様々な蛍光色に変化するという興味深い機能を有する事を明らかにした。以上の多くのモデル実験から、本研究計画で開発した接近/乖離型や共役拡張型のプローブは、環境変化により蛍光強度や蛍光色が敏感に変化する新しいタイプの蛍光プローブであることを明らかにすることができた。

(4) アミロイド 凝集体の蛍光検出評価：上記の(3)で明らかにした疎水環境の検出が可能な蛍光プローブを用いて、タンパク質の構造変化を蛍光検出できるかどうか、種々のタンパク質のアミロイド線維化による蛍光スペクトルを測定した。タンパク質としてはアミロイド生成のモデルタンパク質として広く用いられている BSA、リゾチーム、インスリンを選択した。変性前の正常なタンパク質溶液と、加熱により変性しアミロイド線維化したタンパク質溶液の蛍光スペクトルを、各種の蛍光プローブ存在下で比較したところ、共役拡張型の2種の化合物で蛍光スペクトルの変化を確認した。フェニル基が無置換とパラクロロ置換のプローブ2種で、これらのプローブは正常タンパク質中ではほぼ消光していたが、タンパク質が変性してアミロイド線維化するにつれて蛍光極大波長が長波長化し蛍光強度も増大し、タンパク質がアミロイド線維化する過程を蛍光検出できることが明らかになった。最終的には弱い青白い蛍光がクロス シート構造のアミロイド線維中では緑色に強く発光することを確認した。これによりタンパク質の構造変化により蛍光特性が変化する新規な蛍光プローブの開発に成功した。

(5) プテリン結合タンパク質の蛍光検出評価：プテリン結合タンパク質の中でもジヒドロ葉酸還元酵素(hDHFR)は葉酸代謝拮抗薬のメインターゲットであり、抗がん剤など多くの薬が開発されている。接近/乖離型蛍光プローブのいくつかを hDHFR による酵素反応に加えて阻害実験を行ったところ、500 μM の濃度で 50~60%程度の阻害活性が確認できた。これにより、ポジティブコントロールのメトトレキサート(MTX)と比べると結合力は弱いですが、ジアミノプテリジン構造を有する本プローブは hDHFR に結合していることが明らかになった。しかし、残念ながら蛍光強度の測定では、発光による hDHFR の検出ができるほどの蛍光強度の増加は検出できなかった。今後、蛍光プローブの構造などのファインチューニングを行い、プテリン結合タンパク質の蛍光検出可能なプローブの開発につなげたい。

本研究計画において、ジアミノプテリジンをフルオロフォアとしリンカーで蛍光制御部位であるフェニル基を連結した、接近/乖離型と共役拡張型の蛍光プローブを新たに開発することができた。接近/乖離型の蛍光プローブは、フルオロフォアと蛍光制御部位の接近により消光し、それらの乖離によって発光するという全く新しいタイプの off/on 制御蛍光プローブである。また開発した接近/乖離型や共役拡張型のプローブは、環境変化により蛍光強度や蛍光色が敏感に

変化する新しいタイプの蛍光プローブである。そしてこれらの中から、タンパク質の構造変化により蛍光特性が変化する新規な蛍光プローブを見出し、アミロイドーシスとして多くの難病の原因とされているタンパク質のアミロイド線維化の過程が蛍光検出できるプローブの開発に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村なつみ、河合 靖
2. 発表標題 プテリン誘導体の蛍光プローブへの応用
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田紗樹、室井敏輝、河合 靖
2. 発表標題 新規プテリン型蛍光ソルバトクロミックプローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村彩瑛、北山 隆、河合 靖
2. 発表標題 生理活性機構解明のためのクリッカブルゼレンボンの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤優実、河合 靖
2. 発表標題 接近 / 乖離によるoff/on型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村彩瑛、北山 隆、河合 靖
2. 発表標題 ゼルンボンの生理活性機構解明のためのクリック反応可能なアジドゼルンボンの開発
3. 学会等名 第63回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤優実、河合 靖
2. 発表標題 Comparison of off/on characteristics of fluorescent probes by contact/separation of donor and acceptor
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------