

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310138

研究課題名（和文） タンパク質機能ポケットへの二波長光反応性蛍光トランスファー技術の開発

研究課題名（英文） Development of wavelength-dependent fluorolabel transfer method to functional domain of target protein

研究代表者

友廣 岳則 (TOMOHIRO TAKENORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：70357581

研究成果の概要（和文）：蛍光可視化は高い空間的分解能を持つためタンパク質の挙動解析に多用されるが、シグナル解析等に有効な機能部位への蛍光化法は少ない。今回、光照射のみで標的タンパク質を捕捉し、さらに切断と同時に機能部位に蛍光基を形成する、新しい光アフィニティーラベル化法を開発した。小分子からタンパク質に至る生体分子相互作用系で実証し、さらにその蛍光ラベルタンパク質を用いた基質結合解析に成功した。

研究成果の概要（英文）：Although fluorescence-based visualization has been primarily applied to investigate the behavior of target protein in a cell, there are few methods for fluorescent labeling at the interacting site. Here, a simple and unique construction of a fluorophore at the binding domain of target protein has been achieved by sequential photoreactions using a non-fluorescent ligand molecule. The labeled protein can be used for the fluorescence-based substrate binding analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：光クロスリンク、ジアジリン、蛍光ラベル、光シフトトランス異性化、生体分子相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質単体や複合体の動き、機能を時空間的に追跡し解析することは、タンパク質3000プロジェクトなどのタンパク質構造解析とならび、ポストゲノムにおける生命物質科学分野の重要課題である。その中でも、動きを直接観察でき空間分解能が高い蛍光可視化は解析技術として最も汎用されている。

標的タンパク質の蛍光化では、リシン残基

など表面官能基への非選択的な化学的手法や、蛍光標識抗体を利用した間接的な方法が知られる。in situ 蛍光化では遺伝子工学的手法による末端ラベル化（蛍光タンパク質の付加、酵素反応による蛍光タグ化など）、あるいは代謝機構を利用して導入した特殊官能基に選択的な bioorthogonal ラベル化などが報告されている。しかし、そのほとんどは既知タンパク質の末端や表面官能基へのラベ

ル化であり、目的タンパク質の細胞・組織内分布や分子複合体の検出に絞られる。リガンド分子が直接関与するタンパク質結合ドメインへの蛍光ラベル化は、その方法論自体の数が限られる。

タンパク質結合ドメインへの選択的蛍光ラベル化では、ポイントミューテーションによるポストラベル法が知られる。ただし、これはドメイン構造が明らかなタンパク質に限られる。未知タンパク質を含めた系では、リガンド分子の親和性を利用した化学的手法が有効である。中でも光アフィニティーラベル法は原理的に *in situ* に対応可能な方法として位置づけられる。これを利用して蛍光化リガンドをそのままラベルする方法があるが、プローブ合成や親和性に問題があり、その後の機能解析も困難である。次に切断性リガンドプローブを用いたポスト蛍光ラベル法が開発されたが、タンパク質の SH 基を事前にマスクするなど、ラベル前後で化学的処理が必要である。

これまで代表者等は光反応基ジアジリン誘導体の多機能化を図ることで、多様な生体系への適用と煩雑な解析ステップの簡略化を達成してきた。さらに切断性プローブを利用したポストラベルや阻害剤スクリーニング法を開発してきた。このような研究背景を踏まえ、ポストゲノムにおける上記課題達成に貢献するため、結合ドメインの簡便な蛍光ラベル化法に特化して、独自の光化学的手法論を考案するに至った。

2. 研究の目的

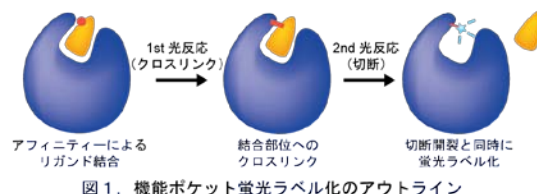
本研究では、生体分子の相互作用解析を効果的に行える光蛍光ラベル技術開発を目的として、結合に直接関与するドメインを選択的に蛍光化する独自の光アフィニティーラベル法の開発を行う。ラベル化では、蛍光基を相互作用部位選択的に導入すること、未特定タンパク質にも対応すること、リガンド分子は解離させること、さらに特別な操作や処理をせず簡便に達成することを目標としてその最適化を行い、技術基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究の中核技術は、光照射によりリガンド分子から結合タンパク質へ蛍光基をトランスファーするユニークなラベル化法にある。光反応ユニットには二種類の光反応を組み込んでおり、それぞれを二段階の光照射で順次行うことで達成する。具体的には、ユニット構造内に、光分解により活性種カルベンを生じるジアジリン基と、光 *E-Z* 異性化を行う *o*-ヒドロキシ桂皮酸骨格を含有する。後者はさらに分子内環化反応を引き起こし、クマリン環を形成することが報告されている。

光反応ユニットを搭載したリガンドプロ

ーブを作成し、それを標的タンパク質とインキュベートした後に光照射することで、まず結合部位にリガンド分子をクロスリンクさせる。次の光異性化反応に連続してリガンド分子を解離し、同時に結合部位に蛍光基クマリンを構築する (図 1)。

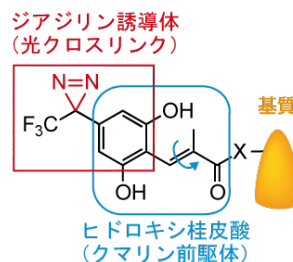


解析を目的としたラベル化では、ラベル部位の信頼性が最も重要である。光クロスリンカーには、安定性や反応性、選択性など生体系でのラベル化剤として高く評価されているジアジリン基を採用した。代表者等は豊富なジアジリン誘導体を所有する。3つの生体分子相互作用系を利用し、下記項目の研究を進めることで、本手法の最適化を行い、汎用性を評価した。さらに、ラベルタンパク質の精製、リガンド結合解析へと展開し、手法論としての評価を行った。

- (1) 光反応ユニットの設計と合成、評価
- (2) 光反応性リガンドプローブの合成、結合タンパク質のラベル化と蛍光特性の検証
 - ① ATP と結合タンパク質
 - ② 白金損傷 DNA と結合タンパク質
 - ③ リゾチームとその抗体
- (3) 蛍光ラベルタンパク質の精製とリガンド分子結合解析への応用

4. 研究成果

光反応ユニットの合成効率、クロスリンク効率、環化効率、蛍光特性などの評価を分子設計にフィードバックしながら開発を進めた。目的とするタンパク質結合部位への蛍光ラベル化およびその応用について、その研究成果を記載する。



- (1) 光反応ユニットの設計と合成、評価

本技術開発の基盤化合物である光反応ユニットは、光クロスリンカーで多用されるトリフルオロメチルフェニルジアジリンに二重結合が追加したのみのコンパクトな化合物であり、構造中に桂皮酸骨格を含む (図 2)。このユニットのカルボン酸基を利用してリ

グンド分子に導入しプローブを作成する。従ってこの化合物は2つの光反応、つまりジアジリン基の光分解と桂皮酸二重結合の *E-Z* 光異性化を起こす。前者は 360 nm 付近に $n-\pi^*$ 遷移に由来する吸収、後者は 280 nm 付近に $\pi-\pi^*$ 遷移に由来する吸収を示す。また、二重結合に対してベンゼン環オルト位に2つのヒドロキシ基を導入した。これにより、光異性化により生成した *Z* 体では、このヒドロキシ基が空間的にカルボニル基に近づくため、求核反応、つまり分子内環化反応が極めて起こり易くなる。以上、光照射波長を変えて2つの光反応を順次行うことにより、ジアジリン基側（クロスリンク側）にクマリン環が形成され、カルボン酸基に導入したリガンド分子は解離するように分子設計した。

この化合物は、既存のフェニルジアジリン化合物の合成ルートを利用して合成した。最終的にヒドロキシ基オルト位にホルミル基を導入し、Wittig 反応により桂皮酸誘導体に変換した。続いてカルボン酸を活性エステルにしてアミノ基指向性化合物に誘導した。

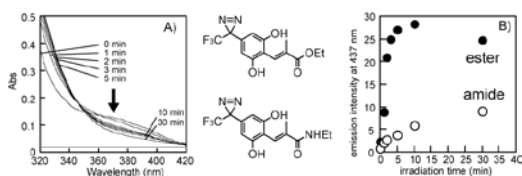


図3. A) 0°C, 360 nm 光照射による 380 nm 吸収の減少、
B) 0°C, 315 nm 光照射によるクマリン由来蛍光の減少

まず、合成した光反応ユニットの光反応性と形成する蛍光特性を検討した。エステル誘導体に 0°C で 360 nm 光照射を行うと、UV 吸収スペクトルではジアジリン基の $n-\pi^*$ 遷移に基づく 380 nm 付近の吸収が減少し 10 分間で一定値になった (図 3 A)。別途、0°C で 315 nm 光照射を行ったところ、やや長波長の 437 nm に極大を示す蛍光 (励起波長 320 nm) が観測された。この値は照射時間で増加し、ほぼ 10 分間の照射で最大値に達した (図 3 B)。別途合成したクマリン誘導体の蛍光強度から、クマリン形成は収率 40% 程度と算出した。さらにアミド誘導体を合成し、同様に光反応性を検討したところ、ジアジリン光分解ではエステル誘導体と同様な結果が得られたが、クマリン形成速度は遅く、初期反応速度は 1/19 に減少した。しかし、一般に求核反応には安定なアミド結合においてもこの分子内環化反応が進行することが判明し、この反応は熱反応であることから反応温度を上げたところ、その速度は大きく増加した。これにより、リガンド分子はアミド結合で導入可能であることがわかった。別途、 ^1H , ^{19}F -NMR による詳細な検討により、*E-Z* 光異性化反応は 300 nm から 380 nm の光照射 (バンドパスフィルターを使用) で起こり、照射波長ではジアジリンの光分解と区別できないことが判明した。しかし、続く環化反応についてはア

ミド化合物では反応温度により制御できたことから、この2つの光反応を順次行うことが可能と判断した。

(2) 光反応性リガンドプローブの合成、結合タンパク質のラベル化と蛍光特性の検証

各リガンドプローブを設計、合成し、各々の結合タンパク質への蛍光移植システムを評価した。

① ATP と結合タンパク質

ATP 結合によるリン酸化や構造変化は細胞内シグナルのドライビングフォースとなるため、その結合解析や核酸受容体のプロテオミクスの解析を行うことは重要である。リン酸化酵素の阻害剤である γ -S-ATP を用いて、その γ 位への光反応ユニット導入を行った。しかし、形成した P-S 結合がやや不安定だったので、次により安定性を向上させたリン酸アミド型 ATP プローブを作成した。エチレンジアミンの両端に、それぞれ光反応ユニットと ATP をカップリングさせてプローブを作成した (図 4)。

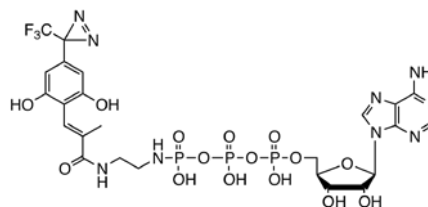


図4. 光反応性ATPプローブの構造

作成したプローブについて光照射によるクマリン形成を確認した。光照射時間を変えて蛍光強度を測定した。反応温度 0°C ではほとんど変化が見られなかったが、37°C に上げたところ蛍光強度の急激な上昇を観測した。続いて ATP 結合タンパク質であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) のラベル化を行った。ATP は GDH の GTP 結合部位に競合的に結合することが知られている。ATP プローブと GDH をインキュベートした後、0°C で 360 nm 光照射を行いクロスリンクした。このクロスリンク産物は ATP 付加されていることから、Fe 錯体形成を利用した IMAC 精製で反応を確認した。さらに反応温度を上げて分子内環化反応を進めたところ、SDS-PAGE において GDH 分子量付近にクマリン由来の蛍光が観測された。この発光量はクロスリンク照射時間依存的に増加した。また、競合剤として ATP を加えた系では、ATP 量依存的に蛍光強度が減少した (図 5)。他の競合阻害実験も併せて

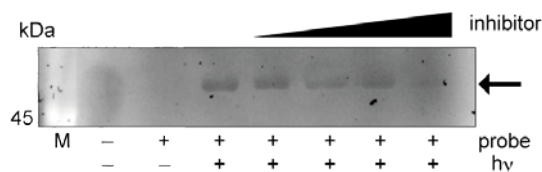


図5. ATP プローブによる GDH 蛍光化 (蛍光検出)。
阻害剤として ATP を加えると、発光が減少する

このプローブは結合部位特異的に結合すると判断した。別途モノヒドロキシ型 ATP プローブを作成したところ、ラベル効率が増加したので、このプローブを用いて他の ATP 結合タンパク質へのラベル化を行った。その結果、ATP 加水分解酵素であるヒートショックタンパク質 HSP90、チロシンキナーゼである EGFR の蛍光ラベル化に成功した。さらにタンパク質複合体であるアクチンミオシンでは、その構成成分であるトロポミオシンのラベル化が確認された。以上、本プローブを用いることで多様な ATP 結合物質を蛍光化できたことから、その汎用性が実証された。

② 白金損傷 DNA と結合タンパク質

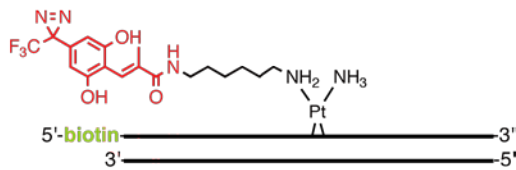
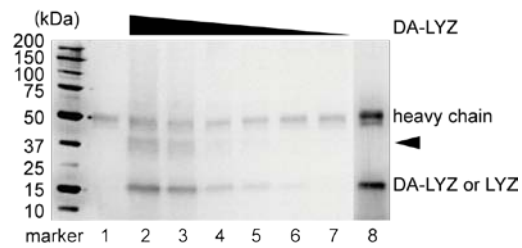


図6. Pt-DNA プローブ

DNA 損傷に関わるタンパク質複合体解析を目的とする。まず、既報でスペーサーとして最も妥当と考えられるヘキサエチレンジアミンを光反応ユニットに連結させ、それをリガンド交換反応により、DNA 損傷剤である抗癌剤シスプラチンに導入した。この白金化合物を DNA に結合させて損傷 DNA プローブを作成した。さらにこの DNA 末端には検出/精製のタグであるビオチンを導入した (図6)。この DNA プローブについて、光シストランス異性化によるクマリン形成を検討したところ、ATP と同様に光照射と反応温度で制御できることを確認した。そこで DNA 損傷部位に親和性の高い HMGB (高速移動群) タンパク質の蛍光ラベル化を行った。まず、第一段階の光クロスリンクによる複合体形成を、ビオチン基を利用した化学発光法により評価した。光産物を SDS-PAGE で分離し、PDVF 膜にブロット後アビジン-HRP を用いて化学発光検出した。この発光量は光照射時間依存的に増加し、シスプラチン-DNA を競合剤として加えることで減少したことからプローブの親和性を確認した。さらに二段階目の光照射を 37°C で行った。その結果、化学発光量は照射時間依存的に減少し、逆に HMGB バンドの蛍光量が増加した。以上の結果から、白金錯体を介して損傷 DNA 認識タンパク質である HMGB が蛍光ラベルされ、リガンド分子である DNA は同時に切断されることが証明された。

③ リゾチームとその抗体

タンパク質間相互作用系の結合評価を目的とする。前述のアミン指向性誘導体を用いてリゾチーム表面に存在するリシン残基に導入し、光反応性リゾチームプローブ (DA-LYZ) を作製した。まず相互作用分子としてリゾチーム抗体を用いて光クロスリンクを検討した。検出はリゾチーム抗体を用い



た Western Blot で行った。つまり、クロスリンク産物の他に、反応で用いた抗体の重鎖と未反応リゾチームが検出される。結果、軽鎖+リゾチームの分子量に相当するバンドに発光を確認した。その量はプローブ量依存的に増加し (図7レーン2-4)、競合剤として通常のリゾチームを加えると減少した。さらに二段階目の光照射を行い、その光産物を SDS-PAGE で分離し、軽鎖に相当するバンドを切り抜きゲルから抽出したところ、クマリン由来と思われる蛍光を確認した。相互作用タンパク質間での蛍光基移植を確認できたので、次に B 細胞を用いて細胞膜表面に発現したリゾチーム抗体へのラベル化を評価した。光クロスリンクを 0°C で行った後では細胞は無蛍光性であったが、照射波長を変更し 37°C にしたところ、B 細胞のみからクマリン由来の蛍光の増加が確認された。以上、細胞膜タンパク質の特異的蛍光ラベルを、細胞レベルで達成した (図8)。

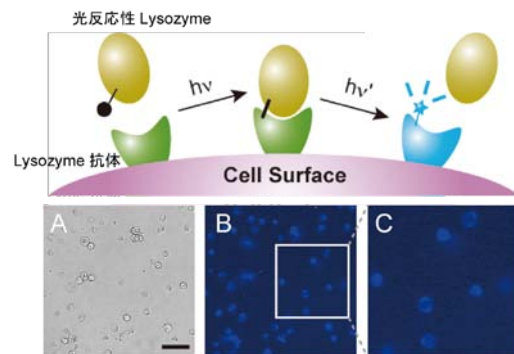


図8. B cells の可視化: 細胞膜上の anti-Lysozyme のクマリンラベル

(3) 蛍光ラベルタンパク質の精製とリガンド分子結合解析への応用

白金損傷 DNA-HMGB の相互作用系を用いて、蛍光ラベルタンパク質の精製、およびそれを用いた結合解析を行うことにより、本システムを評価した。光反応性白金錯体を導入した DNA プローブにはビオチンが導入されている。光クロスリンクした HMGB タンパク質を、まずビオチン-アビジン系を利用して担体に選択的に捕捉し、洗浄した。これに 37°C で第二段階の光照射をすることで蛍光化 HMGB の精製を担体より切断した (図9)。この溶液中には、小分子のクマリン誘導体を含むため、さらにゲルろ過を行ったところ、タンパク質の溶出画分にクマリン由来の蛍光を確認した。別途、白金結合部位近傍に FITC を導入

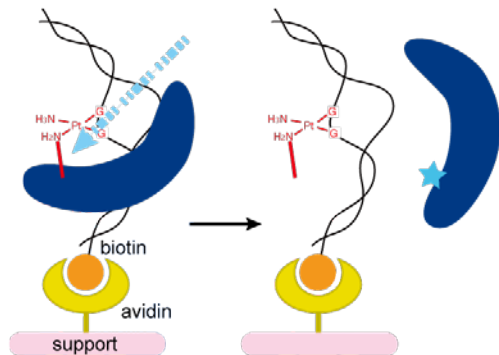


図9. ビオチンを利用した蛍光化タンパク質の精製した Fluorescein-Pt-DNA プローブを作成し、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) による結合解析を行った (図10)。Pt-DNA と HMGB の解離定数に基づいて濃度調整を行い、励起波長は 320 nm、発光は 240-600 nm で検出した。塩濃度を変えながら蛍光強度の変化を追跡し、DNA と HMGB の結合/解離を評価したところ、別法で求めた結果に近似する結果を得た。これらの結果より、二段階目の光照射では HMGB のクマリンラベル化と同時に、精製担体

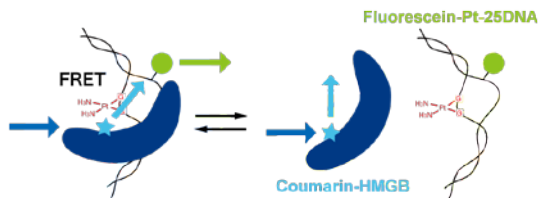


図10. 蛍光化タンパク質を用いたFRETによる結合解析

から選択的に、かつ簡便・温和に切断し溶出することに成功したと評価できる。今回形成したクマリン誘導体の蛍光波長および強度が十分ではなくフルオレセインとの FRET 効率が低かった。*in vivo* で蛍光による可視化や結合解析を行うには蛍光特性の改良が今後の課題になる。

以上、簡便で他に類を見ない、タンパク質機能ポケットへの光化学的蛍光化技術の基盤を確立し、その最適化を行い、多様な生体分子相互作用系で汎用性を実証した。さらに蛍光ラベル化した標的タンパク質の精製やそれを使った結合解析への可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

- ① Tomohiro, T., Kato, K., Masuda, S., Kishi, H., Hatanaka, Y.: Photochemical Construction of Coumarin Fluorophore on Affinity-Anchored Protein, *Bioconjug. Chem.*, 査読有, **22**: 315-318, 2011.
- ② Masuda, S., Tomohiro, T., Hatanaka Y.: Rapidly photoactivatable ATP probes for specific labeling of tropomyosin within the actomyosin protein complex, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, **21**: 2252-2254, 2011.

- ③ Tomohiro, T., Kato, K., and Hatanaka, Y.: Novel fluorophore tagging of protein at the interacting site by photocross-linking. *Photomed. Photobiol.*, 査読無, **33**: 1-2, 2011.
- ④ Kashiwayama, Y., Tomohiro T., Narita K., Suzumura M., Glumoff T., Hiltunen J. K., Van Veldhoven P. P., Hatanaka Y., and Imanaka T.: Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative, *J. Biol. Chem.*, 査読有, **285**: 26315-26325, 2010.
- ⑤ Hashimoto M., Furukawa K., Tomohiro T., and Hatanaka Y.: Synthesis and properties of diazirinyl organo-platinum compounds for manipulations of photoaffinity labeled components, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, **58**: 405-407, 2010.
- ⑥ Tomohiro, T., Ohi, M., Hatanaka, Y.: Synthesis and applications of novel photoactivatable platinum cross-linker. *Photomed. Photobiol.*, 査読無, **32**, 23-24, 2010.
- ⑦ Martikkala E., Lehmusto M., Lilja M., Rozwandowicz-Jansen A., Lunden J., Tomohiro T., Hanninen P., Petaja-Repo U., and Harma H.: Cell-based beta2-adrenergic receptor-ligand binding assay using synthesized europium-labeled ligands and time-resolved fluorescence. *Anal. Biochem.*, 査読有, **392**: 103-109, 2009.
- ⑧ Tomohiro, T., Kato, K., Hatanaka, Y.: Synthesis and application of novel multifunctional cross-linker, *Photomed. Photobiol.*, 査読無, **31**: 11-12, 2009.

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ① 猪ノ口裕二, 山本章人, 大井睦美, 千葉順哉, 友廣岳則, 畑中保丸: ω -ヒドロキシ桂皮酸型ジアジリン誘導体の合成と光反応. 日本薬学会北陸支部第 123 総会年会, 2011, 11, 27, 金沢.
- ② 友廣岳則, 畑中保丸: 光クロスリンクを利用した相互作用部位への新規蛍光タグ化. 第 33 回日本光医学・光生物学会, 2011, 7, 22-23, 大阪.
- ③ 猪ノ口裕二, 増田宗太, 友廣岳則, 畑中保丸: 光化学的蛍光ラベル化を目的とした発蛍光性 ATP プローブの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会, 2011, 5, 23-25, 東京.
- ④ Tomohiro T., and Hatanaka Y.: Synthesis of multifunctional diazirine probes and

their application in the chemical biology. 5th International Symposium of Aliphatic Compounds, 2011, 6, 7-8, St. Petersburg, Russia.

- ⑤ 森本正太, 友廣岳則, 丸山伸之, 畑中保丸: 発蛍光性アフィニティーラベルによるシグナルペプチドと膜タンパク質 VSR の相互作用解析, 日本薬学会北陸支部第 122 回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
- ⑥ Tomohiro T., Ohi M., and Hatanaka Y., Photochemical fluorophore construction at the interacting site of Pt-DNA binding protein, 5th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference: AsBIC-V, 2010, 11, 1-5, Kaohsiung, Taiwan.
- ⑦ 増田宗太, 加藤健一, 友廣岳則, 畑中保丸: 二段階光反応を利用した細胞の新蛍光標識法, 日本ケミカルバイオロジー学会第 5 回年会, 2010, 5, 18-19, 東京.
- ⑧ 大井睦美, 友廣岳則, 畑中保丸: 光化学的手法による DNA 結合タンパク質蛍光の開発. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- ⑨ 猪ノ口裕二, 増田宗太, 友廣岳則, 畑中保丸: 発蛍光性ジアジリンとこれを導入した新規 ATP プローブの開発. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- ⑩ 友廣岳則, 大井睦美, 畑中保丸: 桂皮酸型光反応性 Pt 錯体による DNA 結合タンパク質の蛍光ラベル化. 日本薬学会北陸支部第 121 総会年会, 2009, 12, 6, 富山.

[その他]

- (1) 友廣岳則: 第 32 回日本光医学・光生物学会 奨励賞 (生物・化学領域) 「連続光反応による DNA 結合タンパク質相互作用部位への蛍光ラベル化」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友廣 岳則 (TAKENORI TOMOHIRO)
富山大学大学院・医学薬学研究部(薬学)・
准教授
研究者番号: 70357581

(2) 研究分担者

畑中 保丸 (HATANAKA YASUMARU)
富山大学大学院・医学薬学研究部(薬学)・
教授
研究者番号: 30111181

(3) 連携研究者

該当なし