

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 3 月 30 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21550049
 研究課題名（和文）フォトクロミック分子導入による光機能性タンパク質の開発と機能メカニズムの解明
 研究課題名（英文）Development of photo-functional proteins using photochromic molecules
 研究代表者
 稲田 妙子（TAEKO INADA）
 北里大学・理学部・講師
 研究者番号：60286375

研究成果の概要（和文）：モデルタンパク質としてニワトリ卵白リゾチームを選び、位置選択的にジアリールエテン誘導体を導入した光応答性リゾチームを合成し、ジアリールエテン部分のフォトクロミズムに伴って酵素活性が可逆的に変調できることを明らかにした。そして、酵素活性の変化に応じて蛍光が変化する系を設計した。さらに、酵素活性と立体構造の相関、反応の素過程のダイナミクスに対する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Hen egg white lysozyme was modified at specific position with diarylethene and it was shown that the enzymatic kinetics were modulated reversibly according to photochromism of diarylethene moiety. Fluorescence switching systems in response to enzyme activity were designed. It was also studied structure-activity relationship and reaction dynamics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,800,000	540,000	2,340,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：フォトクロミック分子，機能性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、機能性タンパク質をはじめとした多種多様な生体関連分子の立体構造や反応機

構が解明され、その情報を利用した機能変換や新規機能の付加などが注目されている。酵素タンパク質の反応の特徴は、触媒反応の効

率・選択性の高さであるが、このような理想的な特質は基質特異性に基づくものであり、酵素・基質双方の結合部位の立体構造が重要な役割を担っている。この相互作用は特異的であるために、反応は複雑な混合系にあっても選択性は極めて高い。したがって、酵素タンパク質の特性を活かせば、多機能型の機能性材料や複合反応系の構築が可能であると考えられる。

一方、アゾベンゼンやジアリールエテンなどのフォトクロミック化合物は、光照射によって可逆的に分子構造を変化させ、それに応じて、様々な物性や他の物質との相互作用が可逆的に変化する。このような性質は、物質の機能制御に有効であるため、様々な光スイッチや光メモリなどフォトニクスデバイスへの応用が報告されている。また、光を利用した制御は光応答基を導入した部位に特異的に作用できるなどの長所から、抗原抗体反応などの生体機能分子の関与する反応系の制御の点からも注目されている。

このような背景から、本研究で着目したフォトクロミズムと機能性タンパク質の特質を活かした新規光機能性材料は、生体関連物質の機能を有効に利用できるだけでなく、反応のメカニズムを解明する有効な手段ともなり、複雑な生体内反応機構の解明につながることも期待される。

2. 研究の目的

フォトクロミズムと機能性タンパク質の特性をいかした材料の開発を目指し、本研究では、(1)モデルタンパク質のターゲットのアミノ酸残基 (Lys, あるいは Asp) に位置選択的に機能性部位を導入する方法の確立、(2) タンパク質とリガンド双方の立体構造

に着目することにより、フォトクロミズムに伴う酵素活性の可逆的制御とそれに応じた蛍光スイッチング、(3) 光励起直後からの反応素過程のダイナミクスを測定し、反応のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

モデルタンパク質には、立体構造と酵素反応のメカニズムが解明されている酵素タンパク質のひとつであるニワトリ卵白リゾチーム (EC 3.2.1.17) を用いた。導入するフォトクロミック部位には、代表的なフォトクロミック化合物のひとつであるジアリールエテン誘導体を、蛍光体にはピレン、ペリレンなどの芳香族分子を用いた。

3. 研究の方法

機能性タンパク質の活性の発現には、タンパク質とリガンド両方の立体構造が重要な役割を担っている。そこで、まず、タンパク質の立体構造に関するデータベースを利用し、導入する光応答基の分子設計と導入位置の検討を行った。その結果、本研究では、活性中心近傍の Lys33、疎水性のアミノ酸残基と両親媒性のヘリックスを形成する Asp 87 をフォトクロミック分子の導入位置のターゲットとした。

次に、ジアリールエテン誘導体を合成し、ターゲットアミノ酸への位置選択的な導入法を検討した。得られた修飾タンパク質は、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーを用いて粗分画後、ODS を用いた HPLC で単離精製した。修飾位置は質量分析および等電点キャピラリー電気泳動により決定した。

次に、修飾タンパク質の光反応と、フォトクロミズムに伴う酵素反応の動力学パラメ

ータを調べた。また、蛍光体としてピレン誘導体などの芳香族分子を用い、フォトクロミズムに伴う蛍光体との相互作用を検討した。さらに、NMR スペクトル、円偏光 (CD) スペクトル、蛍光スペクトル、時間分解スペクトルの測定等から立体構造の相関と反応のメカニズムを検討した。

4. 研究成果

本研究では、まず、チオフェン環の5位の位置にカルボキシル基を有するジアリールエテン (DAE) を合成し、モデルタンパク質であるリゾチームへの位置選択的導入法を検討した。脱水縮合剤、溶媒、モル比などの反応条件を精査した結果、活性中心近傍の Lys 33 に位置選択的にアミド結合の形でジアリールエテンを導入した光応答性リゾチーム (daeL33) を 18% の収率で得ることができた。なお、反応条件 (例えば 37°C, 過剰ジアリールエテン誘導体存在下) によっては、Lys 33 と Lys 116 の2カ所が DAE 修飾されたリゾチームが高収率で得られた。

次に、チオフェン環の5位の位置にアミノ基を有する DAE を合成し、疎水性のアミノ酸残基と両親媒性のヘリックスを形成している Asp 87 にアミド結合の形で導入した。最適な反応条件下では、Asp87 にアミド結合の形で導入した光応答性リゾチーム (daeL87) を 22% の収率で得た。

合成した光応答性リゾチーム, daeL33, および daeL87 は水溶液中でフォトクロミズムを示し、紫外光照射によって開環体から閉環体へ、可視光照射によって閉環体から開環体に光異性化した。

そこで、これらの光応答性リゾチームについて、フォトクロミズムに伴う酵素反応を検討

した。基質には *micrococcus lysodeikticus* を用い、ミカエリスメンテンモデルによって解析した。また基質アナログのひとつである N-acetyl- glucosamine trimer に対する結合定数を測定した。daeL33 の場合は、フォトクロミズムに伴い酵素と基質親和性が大きく変化し、その結果、閉環体の触媒定数は開環体と比較して 1/10 に抑制された。また基質アナログとの親和性は 1/4 に抑制されることがわかった。一方、Lys 33 と Lys 116 の2カ所が DAE 修飾されたリゾチームの場合は、酵素反応の動力学パラメータは、daeL33 と同程度であった。そこで、Lys 116 のみに DAE を導入したリゾチームを (daeL116) 合成し、その酵素反応をあわせて検討した。daeL116 もフォトクロミズムを示したが、開環体と閉環体の酵素活性には顕著な違いはみられなかった。

また、daeL87 の場合は、フォトクロミズムに応じて、閉環体の触媒定数が開環体の触媒定数の 1/5 に抑制されることがわかった。なお、基質アナログとの親和性については、フォトクロミズムに応じた顕著な変化はみられなかった。以上のことから、ジアリールエテン導入リゾチームの立体構造から予測されるよりも、酵素活性の制御に関与する領域は局所的であることが示唆された。

次に、酵素活性と立体構造の相関を調べるために、円偏光 (CD) スペクトル、NMR スペクトル、蛍光スペクトル、時間分解スペクトルを測定した。その結果、ジアリールエテン部位のフォトクロミズムに応じて、DAE 導入位置近傍の局所的なタンパク質の立体構造変化が誘起され、酵素活性が変調できること、daeL87 の場合、立体構造予測から考えられるよりも、DAE はタンパク質から離れているこ

とがわかった。(論文投稿中)

さらに、酵素反応のダイナミクスに対応した蛍光スイッチを設計することを目的とし、分子設計を行った。そして、適切なスペーサーを入れることによって daeL33 と同様の酵素反応を示す蛍光性ジアリールエテンを合成することができた。この系では閉環体では、分子内エネルギー移動反応が競争するので、フォトクロミズムによって制御された酵素反応に応じて蛍光スイッチングが観測できることを確認した。(論文投稿中)

また、リゾチームとの相互作用が知られている機能性ペプチドの一つである卵白アルブミンの酵素分解ペプチドに対する相互作用を検討した。機能性ペプチドは、卵白アルブミンをトリプシン消化後、ゲル濾過を用いたオープンカラムクロマトグラフィーで粗分画後、HPLCで単離精製した。

daeL33, daeL87 とも DAE 部分のフォトクロミズムに応じて、機能性ペプチドとの相互作用を可逆的に変調できた。そこで、この相互作用を利用した蛍光スイッチングを目指し、機能性ペプチドに蛍光体分子を導入し、その蛍光消光反応の反応収量を調べた。その結果、フォトクロミズムに応じて、蛍光消光反応の反応収量を変調できた。今後、タンパク質の立体構造と反応の素過程のダイナミクスを調べることにより、メカニズムの詳細を検討し系統的な知見を得る予定である。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Enzymatic Characterization and Spectroscopic Studies of Diarylethene Modified Lysozymes, Taeko Inada, Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, 2012 年 2 月 27 日
- (2) Enzymatic Properties of photoresponsive Hen Egg White Lysozyme, Taeko Inada, Ayuri Kamei, and Koichi Kikuchi, Biophysical Society 55th Annual Meeting, Bortimore, 2011 年 3 月 6 日
- (3) Photocontrol of Lysozyme Activity using Diarylethene, Taeko Inada, and Koichi Kikuchi, XXIIIth IUPAC Symposium on Photochemistry, Ferrara, 2010 年 7 月 14 日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 稲田 妙子 (TAEKO INADA)
北里大学・理学部・講師
研究者番号：60286375
- (2) 研究分担者 無し
- (3) 連携研究者 無し