

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790115

研究課題名(和文) タンパク質の部位特異的蛍光修飾法の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of site specific fluorescent labeling of proteins

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(和文)：研究代表者が開発した「発蛍光型のヒスタグ((His)₆)標識蛍光試薬」の問題点を解明／克服し、実用的なタンパク質蛍光標識法の確立をめざして研究を進めた。最大の問題点である「N末端に存在しないヒスタグとの結合が弱い」という問題点は、ヒスタグ認識部位である金属錯体の性質に起因することを明らかとした。より優れた認識部位を探索し、N末端以外に存在するヒスタグを認識する金属錯体を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have developed “turn-on” fluorescent probes for labeling of His-tag ((His)₆), which later turned out to have some problems. The purpose of this research is the clarification and solution of these problems, to develop useful methodology for fluorescently label proteins. The main problem of our probes is the weak binding to His-tag without N-terminal primary amino group. We determined the problem is mainly due to the His-tag recognition site, a metal complex. We explored the better His-tag recognition site and identified a metal-complex, which can bind to His-tag at any position.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子機能学, 生体機能関連化学, 蛍光標識, ペプチド, タンパク質, 蛍光色素, 金属錯体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の蛍光標識技術は、生物学研究に必須の基盤技術である。蛍光標識し、タンパク質を可視化することで初めて明らかにできる生命現象は数多く、代表的標識法であ

る蛍光タンパク質は2008年度のノーベル化学賞の対象となっている。だが、蛍光タンパク質の分子量が大きいことに起因する様々な問題も指摘されており、目的とするタンパク質を蛍光標識できる汎用的手法の開発は

タンパク質研究の最重要課題の1つといえる。

ある種の金属錯体は、タンパク質中の特定の配列と特異的かつ強固な結合をする。この結合を利用したアフィニティークロマトグラフィー（IMAC: Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography）はタンパク質やペプチドの精製に非常に良く用いられている。代表的な相互作用に、ヒスタグ（His）₆とNi²⁺錯体やCo²⁺錯体との相互作用が挙げられ、選択性、親和性ともに高い。この相互作用を利用したタンパク質蛍光標識法が活発に研究されている（図1）。ペプチドタグは分子量が小さく、蛍光タンパク質が持つ巨大な分子量という欠点の克服が期待できる。だが、現在までに報告されている蛍光プローブのほとんどが、タンパク質との結合前後で蛍光強度変化が見られない。そのため、高いバックグラウンド蛍光等の問題があり、その用途は限定されていた。タンパク質との結合により蛍光特性が変化する例も少数ながら存在するが、目的タンパク質の性質、環境に依存した蛍光変化を示す可能性があり、その一般性が懸念される。

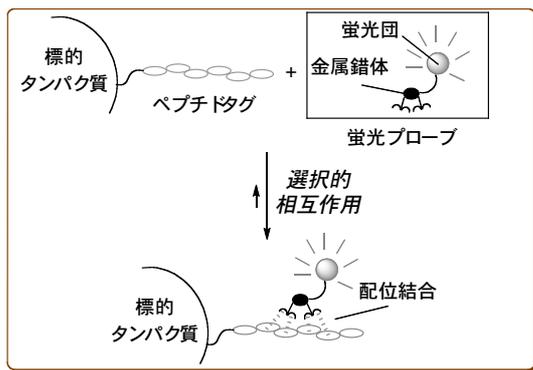


図1 金属錯体含有プローブによるタンパク質の蛍光標識

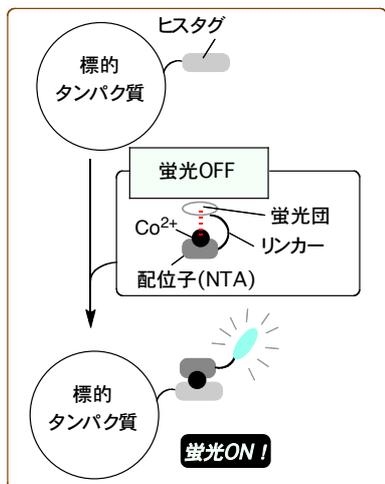


図2 申請者が開発した蛍光ラベル化法

申請者は、「分子内蛍光団置換戦略」を利用し、ヒスタグと選択的に結合する蛍光強度増大型プローブの開発に成功している（図2）。ヒスタグはヒスチジン6残基からなるペプチドタグで、発現タンパク質の精製用にしばしば導入される。ヒスタグの分子量は小さいため、ヒスタグ導入によるタンパク質機能の変化はほとんどおきないことが知られている。これらの特徴は、ヒスタグが蛍光標識用のタグとして適していることを意味する。

ヒドロキシクマリンやフルオレセインといった蛍光団は、そのOH基に金属が配位すると蛍光消光することが知られている。そこで、これら蛍光団とCo²⁺-NTA（nitrilotriacetic acid）錯体を併せ持つ蛍光プローブNTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類を開発した（図3）。蛍光プローブ自身は、蛍光団がCo²⁺に配位しているため蛍光消光している。ヒスタグは蛍光団よりも強くCo²⁺に配位するため、Co²⁺錯体部位が目的タンパク質と結合すると、蛍光団は置換され、発蛍光するという戦略である。この戦略に基づき開発した分子は、期待した選択性と蛍光増大を示した。「分子内蛍光団置換戦略」を用いて複数の蛍光プローブを開発できていることは、この戦略の一般性を示す。だが、幾つかの問題点も明らかとなりつつあった。

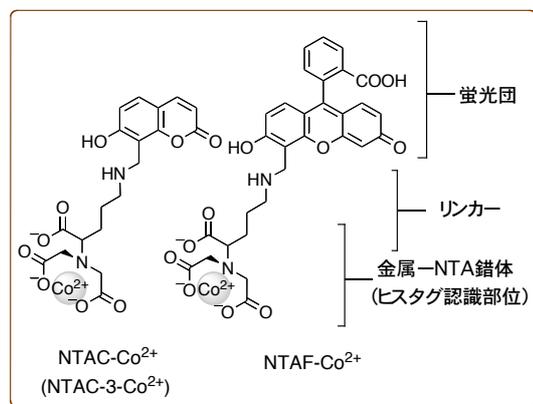


図3 筆者が開発した蛍光試薬の一例

2. 研究の目的

筆者は、発蛍光型のヒスタグ結合蛍光試薬を開発し、生命科学に供することができる、実用的なタンパク質蛍光標識法の確立をめざしている。本研究では、上記目標に向け、①申請者らが開発したNTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類の問題点を明確にし、②その問題点を解決すること、を目的とした。

3. 研究の方法

①NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類の問題点の解明
様々なアミノ酸配列のペプチドを合成し、

その選択性、結合強度、蛍光上昇に必要な時間を検討した。NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類がもつ問題点が何に起因するか検討するため、これらプローブ類の部分構造を合成した。その部分構造と標的ペプチドとの相互作用を、ITC（等温滴定型熱量計）を用いて検討した。

②NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類の問題点の解決

NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類がもつ問題点は、ヒスタグ認識に関わる金属錯体部位に起因すると考えられた。そこで、様々な配位子を化学合成して金属錯体を種々調製し、ITCを用いてモデルヒスタグペプチド1及び2（図4）との結合強度を検討した。

蛍光団を導入した配位子の合成が容易である場合、蛍光団を導入した配位子を化学合成し、金属イオンと配位形成させることで、蛍光団をもつ金属錯体を調製した。その場合、モデルペプチドとの結合は、蛍光強度変化及びITCを測定することで評価した。

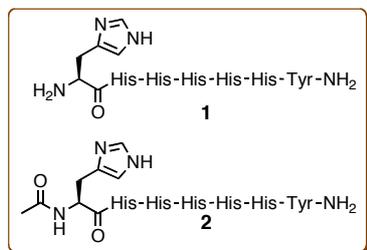


図4 モデルヒスタグペプチド

4. 研究成果

①NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類の問題点の解明

NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類が様々なペプチドに対しても選択性、結合強度を検討したところ、以下の2つの問題点を持つことが明らかとなった。

- 1) N末端に存在するヒスタグとは強い結合 ($K_d=0.06-2 \mu\text{M}$) を示すが、N末端に存在しないヒスタグ (N末側にアセチル基あるいは他のアミノ酸が結合している) との結合は非常に弱い。
- 2) ヒスタグとの結合が可逆な配位結合であるため、脱標識が起きうる。

このうち、より大きな問題点は、前者である。この問題点は、NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類の汎用性を制限する。一方、後者の問題点は、NTAC-Co²⁺類・NTAF-Co²⁺類の適用範囲を一部制限するものの、多くの用途（たとえば、電気泳動ゲルの染色など）では大きな問題とならず、現時点では致命的な問題点とは言え

ない。そこで、本研究では、前者の問題点の解決に焦点を絞って、研究を進めた。

さらに、この問題点が、何に起因するかを検討する目的で、ヒスタグ認識部位であるNTA-Co²⁺錯体を調製し（図5a）、モデルペプチド1及び2と結合するか、ITCを用いて検討した。その結果、NTA-Co²⁺錯体は、モデルペプチド1とは強く結合するが、2とはほとんど結合しないことが明らかとなった。すなわち、この問題点は、ヒスタグ認識に関わる金属錯体部位に起因することが明らかとなった。

②NTAC-Co²⁺類、NTAF-Co²⁺類の問題点の解決

モデルペプチド1及び2の双方と強く結合する金属錯体を見出す目的で、様々な金属錯体を調製し、モデルヒスタグペプチドとの相互作用を、ITCを用いて検討した。その結果、N末にヒスタグが存在しないモデルペプチド2と強く (μM オーダーの K_d で) 結合する金属錯体を1種見出すことに成功した。モデルペプチド2と強く結合する金属錯体は非常に少なく、筆者が検討した多くの金属錯体の中で、唯一結合を示した金属錯体は、NTA-Ni²⁺であった（図5b）。

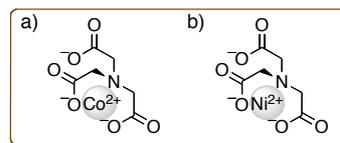


図5 NTA-Ni²⁺錯体

NTA-Ni²⁺は、ヒスタグ導入タンパク質を精製するIMACにおいて、最も良く用いられている金属錯体であり、この結果は至極当然と言える。だが、市販されているヒスタグ精製用IMACに用いられている金属錯体であっても、モデルペプチド2と十分な相互作用を示さない金属錯体もあり、N末に存在しないヒスタグの認識は困難であることが明らかとなった。一方、N末に存在するヒスタグペプチド1と相互作用する金属錯体は複数見出すことができた（図6）。

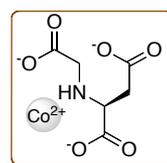


図6 ペプチド1と結合するが、ペプチド2とは結合しない金属錯体の例

タンパク質精製に用いるIMACでは、ヒスタグは、タンパク質の構造・機能に応じて任

意の位置に導入でき、ヒスタグの存在位置によって精製効率に大きな差異が生じることはない。類似の原理を用いている IMAC では問題とならないことが、本法で問題となる理由は現時点では不明であるが、任意の位置に導入されたヒスタグを蛍光標識できるのが理想である。そこで、NTA-Ni²⁺は構造をもつ発蛍光型蛍光プローブの開発を進めることとした。

NTA は、NTAC や NTAF が有する配位子である。NTAC 及び NTAF の Ni²⁺錯体は、蛍光消光状態にあり、ヒスタグペプチド **1** と相互作用することで、蛍光強度が増大する。だが、ヒスタグペプチドと蛍光団の配位子交換に時間がかかり、蛍光強度が増大するまでに室温で 2-3 時間程度必要であることが明らかとなっている。今後、蛍光団とヒスタグとの配位子交換速度を高めた試薬を開発していく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Naoki Umezawa, Nobuyoshi Matsumoto, Shinsuke Iwama, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, *Bioorg. Med. Chem.*, 18(17), 6340-6350 (2010)
- ② Shinya Mimasu, Naoki Umezawa, Shin Sato, Tsunehiko Higuchi, Takashi Umehara, and Shigeyuki Yokoyama, *Biochemistry*, 49(30), 6494-6503 (2010)
- ③ Mie Kamoto, Naoki Umezawa, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19(8), 2285-2288 (2009)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 梅澤直樹、日本薬学会第 131 年会(静岡)、S31-6

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：抗マラリア活性化合物及び抗マラリア薬

発明者：樋口恒彦、梅澤直樹、加藤信樹

権利者：名古屋市立大学/株セラバリュース

種類：特許

番号：特願 2010-198651

出願年月日：2010 年 9 月 6 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：キナーゼ活性検出法

発明者：梅澤直樹、秋田昌二、樋口恒彦

権利者：名古屋市立大学

種類：特許

番号：特許第 4679870 号

取得年月日：2011 年 2 月 10 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysk/index.html>

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：