

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15246

研究課題名（和文）酵素変異体-蛍光基質による2価マンガンのシグナル増強型検出法

研究課題名（英文）Signal amplification system to detect divalent manganese with a unique pair of enzyme variant and the fluorescent substrate

研究代表者

高嶋 一平 (Takashima, Ippei)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50769742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本課題ではマンガンを補因子とする酵素変異体と基質分子のペアを合成し、マンガン存在下でのみ駆動する酵素反応を介したシグナル増強型検出法を開発した。本酵素変異体には複数種の金属が配位可能であるが、マンガンのみ μM オーダーで活性化されて酵素反応を駆動できることを確認した。更にマンガンへの選択性や結合能の異なる変異体を検討し、結合サイトに関する知見を得た。また基質として、立体的に嵩高い構造を導入することで生体内因性酵素に反応しない分子構造を見出した。さらに反応後のシグナル分子が近傍のタンパク質に固定化されてシグナル増強されるシステムを検討した。今後は、本分子ツールを用いた細胞内イメージングを行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内マンガンの詳細解析において、選択的なリガンドが皆無であり、マンガンの常磁性に伴う蛍光消光の問題もあって、実用性の高い蛍光プローブはほとんど開発されていない。本研究では、生体内に存在するマンガン選択的な酵素反応に着目し、タンパク質-合成分子ペアによる新たな検出機構を提案すると共に、世界で初めて細胞内小器官内でのマンガンの詳細な局在を可視化する技術を開発できる。

研究成果の概要（英文）：Herein we developed a signal-amplification method to detect manganese via an enzymatic reaction driven by a pair of an enzyme mutant and its substrate. Although the mutant coordinates various metals, only manganese was found to activate the enzymatic reaction at the μM order. Furthermore, several mutants prepared here showed different selectivity and affinity for manganese, giving information beneficial for the design. Sterically bulky substrate synthesized here selectively reacts with the mutant and does not show undesired reaction with endogenous enzymes. We also sought the designed molecule which is immobilized on the neighboring protein after the reaction, resulting in the accumulation of the signal molecules in cells. In the future, we will perform intracellular imaging using these molecular tools.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：シグナル増強 タンパク質工学 酵素-基質ペア マンガン 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

これまでに生理活性を有する金属イオンを解析するために多様な蛍光検出法が開発されてきた。一方でマンガンは、生体内必須元素で多様な生体内機能に関連する元素であるにも関わらず、有効な蛍光検出法は未だ開発されていない。本研究では、新たなアプローチとして、酵素-蛍光基質を用いた 2 価マンガン(Mn(II))の蛍光検出法を開発する。本酵素は Mn(II) が配位すると活性化して脱リン酸化酵素として機能するため、リン酸モノエステルを導入した蛍光基質を併用すれば Mn(II)を蛍光検出可能となる。さらに本手法を応用することで Mn(II)の細胞内挙動を評価して、Mn(II)の細胞輸送経路の解明研究へと展開する。

2. 研究の目的

マンガンは地球上で最も豊富な元素の一つであり、生体内機能において酸化還元状態の制御、脂質代謝やデオキシリボ核酸の生合成に関わる重要な元素である。一方で過剰な摂取はパーキンソン病様な症状を誘導する神経毒性が知られている。マンガンの生体内挙動を明らかにすることは、マンガンの毒性や生体内機能を解明するにあたって必須であるが、今までに簡便な解析手法はない。多種の価数を取りうるマンガニオンは生体内で厳密に識別されており、特に 2 価カチオンはマンガンの細胞内輸送に関わるイオン形態として着目される。そこで本研究では、世界に先駆けて細胞に取り込まれる 2 価マンガン(Mn(II))の簡便な蛍光検出法を開発し、Mn(II)の細胞小器官レベルでの輸送経路を解明することを目指す。

3. 研究の方法

マンガン(Mn(II))を補因子とする酵素と本酵素に特異的な基質分子を開発し、Mn(II)の存在する細胞内局所での酵素反応を介したシグナル増強型のイメージング解析を行うことを指向した。第 1 に Mn(II)選択的な酵素として、好熱菌 *Methanococcus jannaschii* 由来の脱リン酸化酵素 MJ0936 が補因子として数 μM の Mn(II)存在下で活性化することに着目した [Chen, *JBC*, 2004]。本酵素は他の金属種に対する結合能を有し、細胞内夾雑環境では本酵素への Mn(II)の配位に対して他の金属種が競合してしまうことで感度が低下する。そこで Mn(II)配位サイトのアミノ酸を置換した変異体を調製して、それぞれの Mn(II)に対する選択性や酵素活性を評価した。加えて、基質分子には立体的に嵩高い構造を導入して、他の内因性酵素に対する耐性を評価すると共に、本酵素に対する反応性を評価した。加えて、酵素反応後の基質分子由来のシグナル分子が拡散消失しないために近傍のタンパク質へ共有結合して固定化する技術の検討を行った。さらに将来展望として蛍光以外のシグナルとして、電子顕微鏡で観察可能な電子密度の高いタグ分子を本分子に修飾して細胞内組織の更に微細な局所でのマンガン分布を解析する技術も検討した。

4. 研究成果

MJ0936 変異体にて Mn(II)存在下での酵素反応の活性化を確認した。また Ni(II)に対する酵素活性が見られたものの、細胞内には Ni(II)は極微量しか存在しないことから問題ないと判断した。さらに MJ0936 の金属配位サイトで Asp8, Asp36, Asn59, Asn60 のアミノ酸に着目し、Asp と Asn の配置数を変更した 4 種の変異体を設計し、これら変異体の発現プラスミド

を調製した。加えて、リン酸基質部位に立体的に嵩高い構造を導入し、アルカリフォスファターゼ等の内因性酵素に対する耐性を確認した結果、本基質構造で脱リン酸化が顕著に抑制されたことを確認した。さらに脱リン酸化に伴う反応素子の形成によって近傍のタンパク質の有する求核性アミノ酸残基と反応して固定化される分子を設計した。またシグナル分子の固定化技術の確立によって電子顕微鏡(電顕)を介した高解像度での解析が可能と考え、シグナル分子を導入する電顕で観察可能な電子密度の高いタグ構造を検討した。クリック反応の分子ツールの中で細胞固定化後も活性が残る分子を検証し、固定化剤に対する耐性とクリック反応性の高い分子を基質分子を導入した。またタグ構造には定数の金ナノ粒子が会合することで背景ノイズから識別することが必要である。分枝構造のリンカー分子を介して金ナノ粒子を標的分子へ導入する技術を検討して、定数の金ナノ粒子をシグナル分子へ修飾することで背景ノイズとの識別に成功した。今後は、上記分子ツールを用いて細胞内蛍光イメージングおよび電顕イメージングを同時に進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kensuke Okuda, Ippei Takashima, Akira Takagi	4. 巻 72
2. 論文標題 Advances in reaction-based synthetic fluorescent probes for studying the role of zinc and copper ions in living systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.22-92	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高嶋 一平、高木 晃、奥田 健介	4. 巻 12
2. 論文標題 亜鉛触媒反応を応用した細胞内亜鉛イオンの高感度検出プローブの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Zinc Nutritional Therapy（日本亜鉛栄養治療研究会）	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ippei Takashima, Chihiro Ikenaga, Zhimin Yang, Eiji Nakata, Kensuke Okuda, Shin Mizukami
2. 発表標題 AFM/EM imaging of intracellular metals with nanostructures constructed via signal amplification systems
3. 学会等名 The 14th International Symposium of Advanced Energy Science（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木 晃、重松 春花、高嶋 一平、奥田 健介
2. 発表標題 -ケトエステル型ヒドラジン検出蛍光プローブの創製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北西 悟司、高木 晃、高嶋 一平、大橋 憲太郎、奥田 健介
2. 発表標題 がん微小環境を標的とする4-フェニル酪酸バイオアイソスターの創薬化学研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会(名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ippei Takashima, Yusuke Miura, Chinami Morita, Sakino Yata, Akira Takagi, Eiji Nakata, Kensuke Okuda
2. 発表標題 Fluorescent analyses of biomolecules and metals through signal amplification system
3. 学会等名 The 13th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池永 千裕、高木 晃、高嶋 一平、奥田 健介
2. 発表標題 亜鉛触媒反応を応用した亜鉛イオンの ¹⁹ F-MRIプローブ分子の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会(北海道)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高嶋 一平、井上 陽平、松本 信之、高木 晃、奥田 健介
2. 発表標題 亜鉛触媒反応を応用した細胞内亜鉛イオンの高感度検出プローブの開発
3. 学会等名 第22回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ippei Takashima, Yusuke Miura, Eiji Nakata, Akira Takagi, Kensuke Okuda
2. 発表標題 Fluorescent analyses of metals using cephem compound
3. 学会等名 第12回エネルギー工学研究所国際シンポジウム、Institute of Advanced Energy, Kyoto University / The Joint Usage/Research Center for Zero Emission Energy Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高嶋一平、三浦佑介、田島名菜、松本信之、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 生体内金属による触媒回転を応用したシグナル増強型蛍光プローブの開発
3. 学会等名 71 回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021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
---------	---------