

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550149

研究課題名（和文） センサーキナーゼを利用する新しいバイオセンシング機構の構築

研究課題名（英文） A novel biosensing mechanism using sensor kinase activity

研究代表者

中島 洋（NAKAJIMA HIROSHI）

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00283151

研究成果の概要（和文）：これまでに我々が開発したシグナル変換の仕組みをセンサーキナーゼタンパク質と組み合わせ、新奇なバイオセンシング機構の創出を目指した。センサーキナーゼとは、分子や光などの刺激を高感度、高選択的に感知するタンパク質である。刺激に応答して特定タンパク質をリン酸化するが、このリン酸化過程を電気的なシグナルへと変換するのが本研究の目的である。助成期間の研究では、センサーキナーゼの代わりに遺伝子転写調節因子を用いることで、当初の目的を達成しつつある。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to produce a novel bio-sensing mechanism constituted by sensor-kinase and signal transduction system that we proposed in previous works. Sensor-kinase is a protein which senses an external stimulus such as a simple molecule or light to phosphorylate a particular protein and regulate its activity. In this study, we attempted to transform the output of sensor-kinase to an electronic signal. We have almost achieved the initial objective by using a transcriptional regulator in place of sensor-kinase as a sensory moiety.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能材料、シグナル変換、バイオセンシング

1. 研究開始当初の背景

細胞が生きてゆくためには、様々な生育環境の変化（ストレス）を感知し、適応する必要がある。当初の研究対象であるセンサーキナーゼとは、そうしたストレスを感知し、適応に必要な様々な生体分子の合成に対し、ON/OFF 命令を下すタンパク質の一種である。感知の対象には、分子やイオンなどの物

質のほか、光、熱、浸透圧といった物理量の変化も含まれ、高感度・高選択性が特徴である。ストレスに対応したキナーゼ活性（図1）の ON/OFF が細胞内シグナルとして利用され、ストレス適応のきっかけとなる。つまりセンサーキナーゼは、細胞におけるストレス応答の起点であり、従来からその機能制御は、創薬などのターゲットとして、ライフサイエ

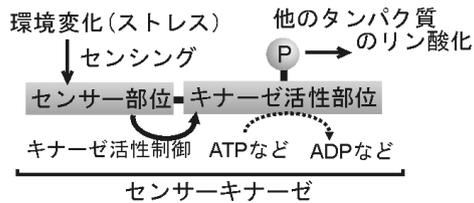


図 1. センサーキナーゼの基本構造と作用機構 キナーゼ活性部位は、ATP など核酸の加水分解と生成するリン酸基 (P) による他のタンパク質のリン酸化を触媒する(キナーゼ活性)。センサー部位は、ストレスに対応して、キナーゼ活性の ON/OFF 制御をおこなう。

ンス分野を中心に研究が盛んであった。他方、センサーキナーゼの多様で高感度・高選択的なセンシング能力は、生体由来のセンサー材料の観点からも魅力的である。しかし、センサーキナーゼをバイオセンシングに利用する試みは、研究開始当初、基礎、応用研究のいずれについても、国内外を問わず例がなかった。その理由の一つに、センサーキナーゼの出力であるキナーゼ活性の ON/OFF を、検出・処理が容易な電気的な信号へと簡便に変換することの難しさが挙げられる。従来の活性測定では、基質である核酸にリン放射性同位体 (^{32}P) を導入し、反応に伴う放射線量の変化を計測することが一般的である。最近では、 ^{32}P の代わりに蛍光物質を利用する手法もみられるが、いずれにしても放射線や蛍光を最終的に電気的な信号へと変換する機材と ^{32}P 、蛍光分子でラベル化された基質核酸が必要である。したがって、センサーキナーゼをバイオセンシングに利用するには、これまでとは異なる発想で、キナーゼ活性の ON/OFF を検出・処理が容易な電気的なシグナルへと直接変換する仕組みが必要であった。

2. 研究の目的

1 で述べた研究背景をもとに、本研究では、センサーキナーゼを一組の電子伝達タンパク質と組み合わせ、センサーキナーゼが発生するセンシング情報 (キナーゼ活性の変化) を電子伝達タンパク質間の電子伝達速度の変化へと動的に変換する仕組み (シグナル変換機構) の構築を目指した。この仕組みにより、センサーキナーゼのセンサー活性を容易に電気的なシグナルとして検出・計測することを可能にする。この研究は、酸化還元酵素の電子授受を利用する現在のバイオセンシングとは異なる、新たなバイオセンサーの提案とプロトタイプづくりを目指すものである。

3. 研究の方法

センサーキナーゼのシグナル変換には、我々が最近開発した一組の電子伝達タンパ

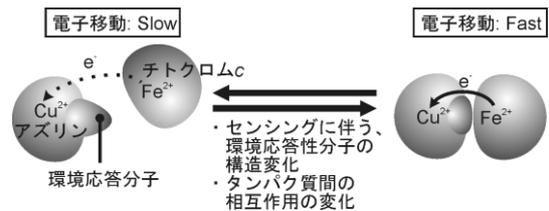


図 2. シグナル変換の基本原則 電子移動タンパク質間の相互作用を一つの高次構造と捉え、「環境応答分子の構造変化→相互作用の変化→電子移動速度の変化」の過程により、シグナル変換を行う。

ク質で構成する仕組みを利用することとした (図 2)。タンパク質間での電子伝達では、まずタンパク質が互いの特定部位を認識し、一時的な会合体を形成することが知られている。我々は、一方の電子伝達タンパク質 (本研究では銅タンパク質アズリンを利用) の会合体形成面近くに環境応答性分子 (特に構造変化を伴うもの) を組み込むことで、「環境変化依存的な構造変化→電子伝達タンパク質間の相互作用変化→タンパク質間電子移動速度の変化」で構成されるシグナル伝達・変換のカスケードを以前の研究で実現した。本研究におけるセンサーキナーゼのシグナル変換では、環境応答性分子の代わりにセンサーキナーゼによって認識され、リン酸化を

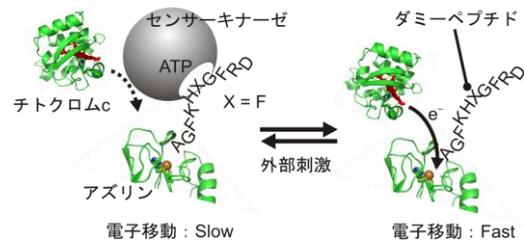


図 3. 本研究が当初目指したセンサーキナーゼシグナル変換機構の概要。

受けるオリゴペプチド鎖を導入することにした (図 3)。リン酸化を受けるアミノ酸残基 (主にヒスチジン残基) をリン酸化されない残基 (フェニルアラニン) に置換したダミーペプチドとすることで、外部刺激に応答したセンサーキナーゼのリン酸化能の ON/OFF をダミーペプチドに対する結合能の ON/OFF (結合/解離) に変換する。センサーキナーゼの結合/解離に伴い、アズリン上方 (タンパク質間相互作用面近傍) の立体障害が変化し、電子伝達タンパク質間の会合体形成能・電子伝達速度が変化する。本研究の最終目標は、タンパク質間の電子伝達速度の変化を、計測とその後のデータ加工が容易な電流値の変化として計測することである。この目標は、アズリンタンパク質を

電極に集積することで実現可能と考えた。

4. 研究成果

研究の初段階で3で述べたダミーペプチドのアズリンへの導入に成功した。その後、外部刺激依存的なセンサーキナーゼのダミーペプチドへの結合/解離の実現を目指したが、助成期間内では、それを実現することができなかった。その理由として、1) ダミーペプチド鎖が思いのほか柔軟であり、固定したアズリタンパク質表面にペプチド鎖が横たわってしまう(センサーキナーゼがペプチド鎖に接近できない)。あるいは2) ペプチド鎖末端-タンパク質表面のリンカー領域が短く、センサーキナーゼがペプチドに結合する際、アズリン自身が立体障害となってしまうを念頭にリンカー領域まで含めたダミーペプチド鎖の構造最適化を試みたが、いまのところ、研究計画で述べた結果を得るに至っていない。そこで、センサーキナーゼと同様に細胞内でセンサータンパク質として機能する遺伝子転写制御タンパク質に着目し、センサーキナーゼの代わりとして利用する研究を昨年度より開始した。

遺伝子転写制御因子(転写制御因子)とは、細胞内外の刺激に応答して、特定遺伝子からのメッセンジャーRNA合成(したがって遺伝子にコードされたタンパク質の発現)を制御するタンパク質である。センサーキナーゼでは外部刺激依存的にリン酸化能が変化するのに対し、転写調節因子では、特定のDNA配列への結合能が変化する。したがって、センサーキナーゼにおけるダミーペプチドの代わりに転写調節因子によって認識されるオリゴDNA(ターゲットDNA)をアズリンに導入すれば、転写制御因子-電子伝達タンパク質の組み合わせで当初の研究計画を遂行できると考えた。分子設計の概略を図4に

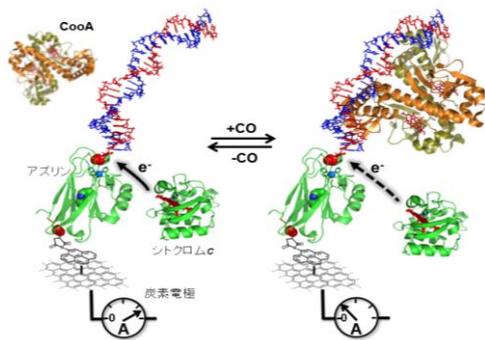
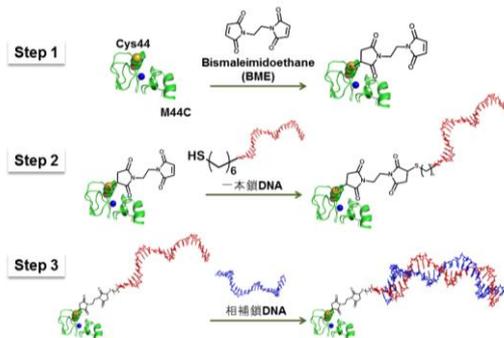


図4. 転写制御因子の出力変換機構。DNAを導入したアズリンを電極に固定し、ここに転写調節因子が結合/解離することで、シトクロムcからアズリンへの電子移動速度が変化。この変化を電極電流の変化として計測する。



スキーム 1. アズリン Cys44 への2本鎖DNAの導入手順。反応性の低いCys44への導入を効率よく行うため、BMEを用いて反応点をタンパク質表面から露出させる。

示す。今回の研究では、実験系の構築のしやすさを考慮し、CooAと呼ばれる一酸化炭素(CO)依存型転写制御因子をセンサータンパク質に用いることにした。

ペプチド鎖(分子量約1200)とは異なりターゲットDNA(分子量約20000)は大きく、アズリンへの導入法確立に時間を要したが、スキーム1に示す手法により実現した。予備実験の段階ではあるが、調製したターゲットDNA-アズリン複合体に対するシトクロムcへの電子伝達速度をCooA存在下で計測したところ、CO有($2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)無($0.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)となり、CooAがターゲットDNAに結合する条件下で速度の低下が見られた。このことは、COを感知したCooAがアズリン上のターゲットDNAに結合し、その立体障害によって電子伝達が阻害され

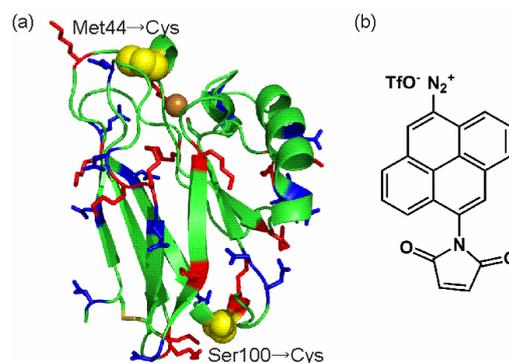


図5. (a) アズリン表面にはアミノ基、カルボキシル基、フェノール基(スティック状)が複数存在する。試行錯誤の結果、Met44, Ser100をCysに置換したM44C/S100Cでは、Cys44がタンパク質の中にやや埋没するため反応性が低く、Cys100, 44の順に逐次修飾が可能であることが分かった。(b) 電極固定用に調製した分子。マレイミド基でCys100に結合し、ジアゾニウム基の還元に伴うラジカルの発生でグラファイト電極に対し共有

たことを示唆する結果と考えられる。

図4に示した仕組みの完成をめざし、アズリンの電極への集積に関する研究も別途進めた。試行錯誤の結果、図5aに示す二重変異体 (Met44Cys/Ser100Cys, 以後M44C/S100C) に対し、図5bで示すピレンマレイミドジアゾニウム分子は、Cys100と選択的に反応すること、したがってCys44は、Cys100にピレン誘導体を導入した後、スキーム1で示す方法で選択的にターゲットDNAと反応可能であることを見出した。Cys100に導入したピレン誘導体のジアゾニ

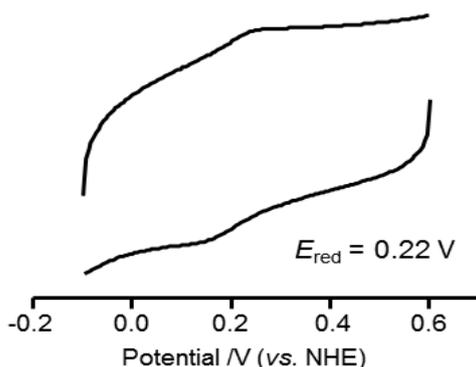


図6. グラファイト電極に固定したアズリンの酸化還元応答。アズリン Cu(II/I)に対応した酸化還元波が観測される。銅イオン - 電極間の電子移動速度は、 290 s^{-1} であった。

ウム基は、電気化学的還元反応によって、グラファイト電極に共有結合させることが可能であることも見出した。この手法で電極に固定したアズリン変異体の銅イオンは、電極を介して良好な電気化学的応答を示す(図6)。

以上のように、当初計画していた「センサーキナーゼのバイオセンシングへの利用」については、良好な結果が得られなかったものの、もう一つのセンサータンパク質である転写制御因子を利用するバイオセンシングについては、格段の進展がみられた。3年間の助成期間を経て、研究計画の遂行に必要な要素技術の開発はほぼ終えることができた。今後は、調製したアズリン修飾電極を用いてCooA存在下、COの有無を電極電流の変化として計測することを実現し、本申請研究の当初目標を早期に達成する。

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. Rabindra KB., Nakajima, H., Jitumani R., Watanabe, Y., Mazumdar, S., "Thermodynamic effects of the alteration of the axial ligand on the unfolding of the thermostable cytochrome *c*"

Biochemistry 2013, 52, 1373-1384.

DOI: 10.1021/bi300982v, 査読あり

2. Ibrahim, Sk. Md., Nakajima, H., Ramanathan, K., Takatani, N., Ohta, T., Naruta, Y., Watanabe, Y., "Cytochrome *c*₅₅₂ from *Thermus Thermophilus* Engineered for Facile Conversion of the Prosthetic Group" *Biochemistry* 2011, 50, 9826-9835.

DOI: 10.1021/bi201048e, 査読あり

3. Tokita, Y., Yamada, S., Luo, W., Goto, Y., Ford, N., Nakajima, H., Watanabe, Y., "Protein Photoconductors and Photodiodes" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 11663-11666.

DOI:10.1002/anie.201103341, 査読あり

[学会発表] (計6件)

1. H. Nakajima, "Dynamic Control of Inter-proteins Interaction for Protein Based Signal Transduction System", Collaborative Conference on Materials Research 2013, Jeju, Korea, June 2013, 招待講演。
2. H. Nakajima, "An artificial Signal Transduction System Consisting of Electron Transfer Proteins", Campus Asia 3rd Meeting, Nanjing, China, Mar. 2013, 招待講演。
3. 中島 洋, 「金属タンパク質のダイナミクスを利用する機能の創出」分子研研究会「生体配位化学の最前線と展望」岡崎、2013年2月。依頼公演。
4. 中島 洋, 「シグナルトランスデューサーの化学—機能解明と応用—」, 分子研研究会「生物物質科学の展望」、岡崎、2013年1月。招待講演。
5. 中島 洋, "A Signal Transduction Mechanism Inspired by Natural Sensor Protein", JST 日印バイオ医学研究 ワークショップ、東京、2012年2月。招待講演。
6. H. Nakajima, "Engineering of Cytochrome *c*₅₅₂ from a Thermophile", Nagoya University Global COE in Chemistry, 4th Annual Symposium, Nagoya, Nov. 2011, 依頼講演。
7. H. Nakajima, "Protein Engineering of Cytochrome *c*₅₅₂ from a thermophile – A scaffold for artificial peroxidase –", 10th IRTG joint symposium, Munster, Germany, Nov. 2010, 依頼講演。
8. H. Nakajima, "Signal Transduction System Consisting of Electron Transfer Proteins", ICBIC15, Vancouver, Canada July 2011.
9. 中島 洋, 「電子伝達タンパク質—環境応答性分子複合体を用いた、シグナル変換の

試み」、第 20 回金属の関与する生体関連
反応シンポジウム、徳島、2010 年 6 月。

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 洋 (NAKAJIMA HIROSHI)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00283151

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし