

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510276

研究課題名(和文)希土類錯体を用いたチロシンリン酸化のリアルタイム検出

研究課題名(英文)Real-time detection of tyrosine phosphorylation by using lanthanide complexes

研究代表者

須磨岡 淳(SUMAOKA, JUN)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10280934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したテルビウム(III)複核錯体を用いて、タンパク質チロシンリン酸化酵素(PTK)およびタンパク質チロシン脱リン酸化酵素(PTP)による、オリゴペプチド中のチロシン残基のリン酸化/脱リン酸化状態をリアルタイムで検出することに成功した。また、この錯体は、PTKとPTPが共存するような複雑な系にも有効であった。さらに、PTKおよびPTPの阻害剤のスクリーニングにも応用することが可能であることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We developed a binuclear Terbium(III) complex which selectively responded to phosphotyrosine (pTyr) and emitted luminescence. With the use of the complex, phosphorylation of tyrosine and dephosphorylation of phosphotyrosine in peptides by protein tyrosine kinase(PTK) and by protein tyrosine phosphatase(PTP), respectively, were monitored in real-time. Furthermore, highly complicated systems, where a PTK and a PTP coexisted together, were analyzed by the present system. A straightforward and visual method to assess inhibitors on these enzymes was also developed.

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：希土類錯体 リン酸化 シグナル伝達 イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質のリン酸化は細胞機能の重要な調節機構であり、タンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)の変異などにより様々な病態が引き起こされることが知られている。キナーゼは、アミノ酸残基の中で、主にセリン、トレオニン、チロシンをリン酸化する。また、リン酸化される残基の99%以上はセリン/トレオニンで、チロシンのリン酸化は0.1%以下と極めて少量である。しかし、チロシンのリン酸化はシグナル伝達において重要な位置を占めており、タンパク質チロシンキナーゼ(PTK)の異常はガンなどに関わることが多く、特に注目されている。

タンパク質のリン酸化検出法は、質量分析装置を用いた手法が確立されつつあるが、装置が高価であるため、現状では蛍光標識抗体(あるいはリン酸基に特異的に結合する蛍光性試薬)などを用いる手法が一般的である。しかし、抗体はその安定性やコストに問題を抱えている。一方、リン酸基部分を認識する蛍光試薬では、リン酸化部位が未知のタンパク質に対して、セリン/トレオニン残基とチロシン残基のいずれがリン酸化されているかを容易に判断することは困難である。このように、現状のリン酸化検出法は、多くの改善すべき点があり、より簡便かつ精度の高い検出法の開発が強く望まれていた。

(2) 申請者らは、ある種のテルビウム()錯体が、セリン、トレオニン、チロシンおよびそれらのリン酸化アミノ酸の中で、リン酸化チロシンのみに応答して発光が増大することを見出した。さらに本系を用いて、Srcキナーゼの基質となるオリゴペプチド中のチロシン残基のリン酸化反応をリアルタイムに検出することにも成功していた。

2. 研究の目的

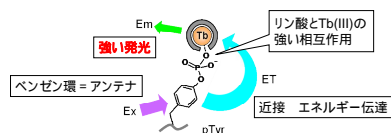
本研究では、希土類錯体の特徴を活用して、「セリン/スレオニン残基のリン酸化」と「チロシン残基のリン酸化」とを区別し、チロシン残基がリン酸化されている場合のみリアルタイムに応答するシステムを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

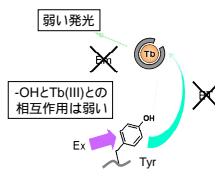
テルビウム()からの発光の特徴の一つである、「強い発光には近傍にアンテナとなる分子が必要である」という点を活用することで、我々の開発したテルビウム()錯体は、リン酸化されたチロシンにのみに応答する(図1)。すなわち、リン酸化されていないチロシン残基の場合は、フェノール性のOH基とテルビウム()錯体との相互作用が弱

いため発光が見られず(図1b) また、リン酸化されているセリン/トレオニン残基の場合には、リン酸基とテルビウム()錯体との相互作用自体は生じるが、アンテナとなるベンゼン環が近傍に存在しないため発光が見られない(図1c)。「リン酸基」と「ベンゼン環」の両方が近傍に存在する時のみテルビウム()錯体からの強い発光が観測されるわけである(図1a)。本研究では、様々なオリゴペプチド中のチロシン残基に対して(特にチロシン残基の周囲の電荷に着目)、PTKを添加してその発光応答を観測する。また、リン酸化チロシン残基のタンパク質脱リン酸化酵素(PTP)による脱リン酸化反応についても同様の検討を行う。さらに、PTKの阻害剤が、抗がん剤などの医薬品として有望であることから、本錯体を用いて、これらの阻害剤をスクリーニングすることが可能かどうかについても検討を行う。こうして、我々の開発したテルビウム()錯体の有用性を明らかにする。

(a) リン酸化チロシンの場合(強い発光)



(b) チロシンの場合(弱い発光)



(c) セリン/トレオニンの場合(弱い発光)

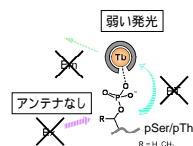


図1 テルビウム()錯体によるリン酸化チロシン検出の模式図。

4. 研究成果

(1) テルビウム()複核錯体(Tb₂-L¹)による、ペプチド中のチロシン残基のリン酸化並びに脱リン酸のリアルタイム検出

種々の単核および複核のテルビウム()錯体を合成し、リン酸化チロシンに対しての発光応答を観測した。その結果、テルビウム()複核錯体(Tb₂-L¹)(図2)の応答がもっとも優れていることが明らかになった。

そこで、Tb₂-L¹存在下、v-Srcの基質として報告されているペプチドP1(Ac-Glu-Glu-

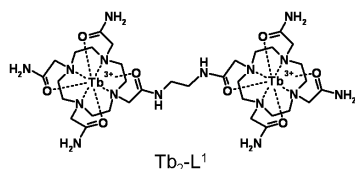


図2 Tb₂-L¹の構造

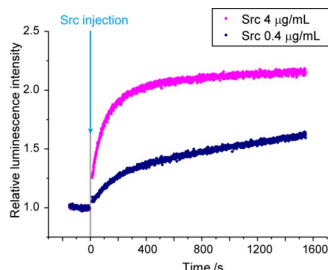


図3 SrcによるP1ペプチド中のチロシン残基のリン酸化反応に対するTb₂-L¹の発光応答。 $\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

Glu-Ile-Tyr-Glu-Glu-Asp-CONH₂)に対して、Srcによるチロシン残基のリン酸化を行った(図3)。PTKであるSrcを添加すると、錯体からの発光強度が時間の経過とともに増大した。また、加えるSrcの濃度に応じて、発光の増大速度が変化した。他のPTK(FynおよびEGFR)の場合もSrcと同様に、発光強度の増大が確認された。

次に、チロシン残基をリン酸化したP1ペプチド(P1-pY)を化学的に合成し、これを基質としてPTPであるShp-1による脱リン酸化反応を行った。図4に示すように、Shp-1の添加により、発光強度の減少が確認された。また、他のPTP(PTP1B)に対してもTb₂-L¹からの発光は同様の応答を示した。

さらに、正電荷を有するP2ペプチド(Ac-Ser-Ala-Ala-Pro-Tyr-Leu-Lys-Thr-Lys-CONH₂)、および、そのチロシン残基をリン酸化したペプチドの発光への影響を測定した(図5)。チロシン残基のリン酸化により発光強度の増大は観測されたもの、その変化はP1ペプチドと比較して小さなものであった。

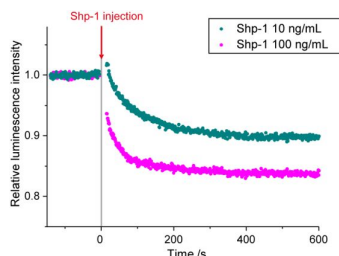


図4 チロシン残基がリン酸化されたP1ペプチドのShp-1による脱リン酸化反応に対するTb₂-L¹の発光応答。

$\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

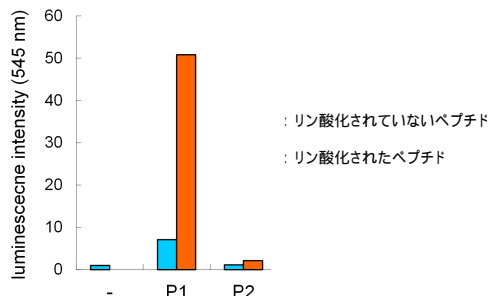


図5 P1ペプチドおよびP2ペプチドとそれらのチロシン残基がリン酸化されたペプチドの存在下でのTb₂-L¹からの発光。

$\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

以上のことから、Tb₂-L¹は、チロシン残基の周囲のアミノ酸残基が正電荷を持たないペプチドの場合には、そのリン酸化の状態を発光強度によりリアルタイムに観測することが可能であることが明らかになった。

(2) テルビウム()複核錯体(Tb₂-L¹)のペプチドへのコンジュゲーションと、オリゴペプチド中のチロシン残基のリン酸化反応のリアルタイム観測

チロシン残基周辺に正電荷を有する基質ペプチドに対して、Tb₂-L¹の発光応答が低かったのは、錯体自身の正電荷とチロシン残基周辺の正電荷との静電的な反発によるものと推定される。そこで、基質ペプチドとTb₂-L¹を共有結合によりコンジュゲート化することで、高い発光応答が得られることを期待して、以下の検討を行った。

複核錯体Tb₂-L¹の二つのTb(III)の間を結合するリンカー部分にアルキンを導入したTb₂-L¹yne、および、システイン残基との反応部位を有するアジド化合物ALを合成した(図6)。PTKであるAblの基質ペプチドのN末側にシステインを含む3残基を付加したcggAペプチド(Ac-Cys-Gly-Gly-Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys-Lys-CONH₂)をリン酸化基質として用いた。まず、cggAとALを反応させ、ペプチドのN末側にアジド基を導入し、さらにこれとTb₂-L¹yneを反応させることで、複核錯体-ペプチドコンジュゲートを得た。

複核錯体-ペプチドコンジュゲートに対して、AblおよびSrcを加えたところ、いずれも発光強度が増大した。また、発光強度変化は、コンジュゲート化していない錯体と比べて大きく、リン酸化の前後で約10倍もの変化となった。さらに酵素によるリン酸化反応をミカエリス・メンテン型として解析することも可能であった。

以上の結果から、正電荷を有する基質ペプチド中のチロシン残基リン酸化反応をテルビウム(III)錯体を用いてリアルタイム観測するためには、錯体を基質ペプチドとコンジュゲート化することが有効であることが明らかになった。

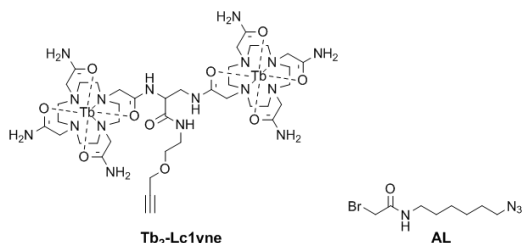


図6 Tb₂-L1yne および AL の構造。

(3) テルビウム(III) 複核錯体 (Tb₂-L¹) を用いた酵素反応阻害剤のスクリーニング

(1) に記載のように、Tb₂-L¹ を用いるとペプチド中のリン酸化状態を錯体の発光強度からリアルタイムに観測することが出来ることが明らかになった。したがって、酵素濃度および基質濃度が一定の条件で、化合物添加による発光強度の増加(あるいは減少)速度の変化を観測することにより、当該化合物の酵素反応に対する阻害効果を見積もることが出来ると予想される。また、希土類からの発光は、その発光寿命が生体分子や一般的な有機化合物と比べて長い事が知られているため、蛍光を発するような化合物(阻害物質)存在下でも高感度での検出が可能である。

Src、Fyn、EGFR の3種類のPTK、既知の阻害剤4種(図8)の組み合わせに対して、Tb₂-L¹ を用いて阻害効果を定量的に見積もることを試みた。結果の一例として、EGFR に対して、阻害剤 Gefitinib の濃度を变化させた場合の Tb₂-L¹ からの発光強度の時間変化をプロットしたグラフを示す(図9)。Gefitinib 濃度が 25 nM で発光強度の増加速度が約半分となった。このことは、酵素活性が

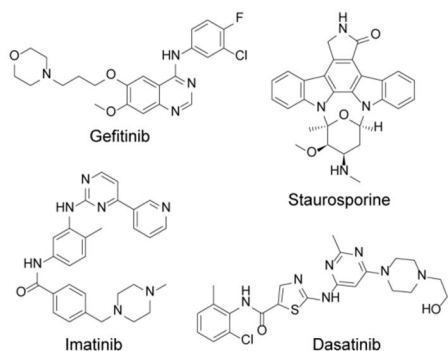


図8 実験に用いた PTK 阻害剤。

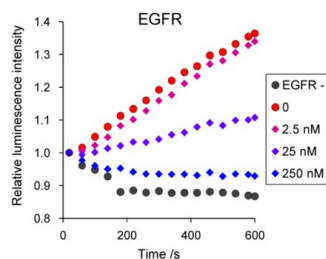


図9 EGFR に対する Gefitinib の添加に伴う Tb₂-L¹ からの発光強度の減少
 $\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

Gefitinib により効率的に阻害されていることを示している。Src および Fyn 対しても同様の実験を行ったところ、EGFR で発光強度の増加速度が半減した Gefitinib 濃度 25 nM では、ほとんど発光強度の増加速度が減少しなかった。Gefitinib は EGFR を標的にした阻害剤として報告されており、Tb₂-L¹ を用いた阻害剤の評価は過去の知見と良く合致することが明らかになった。

さらに、他の阻害剤についても、Tb₂-L¹ からの発光の阻害剤濃度依存性を測定し、発光強度の変化速度を各阻害剤の濃度に対してプロットした(図10)。

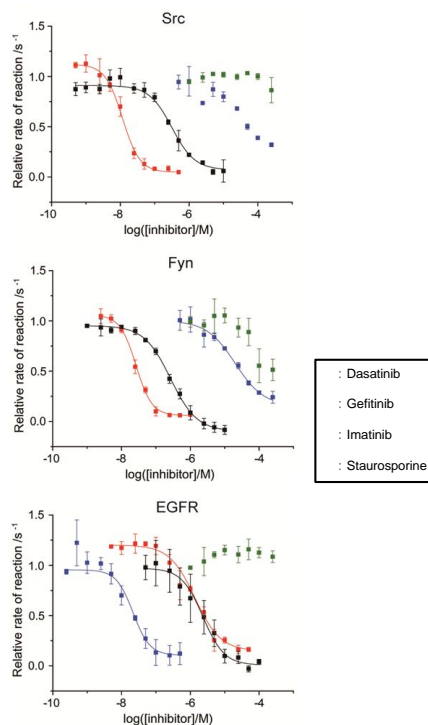


図10 Src、Fyn、EGFR の Try リン酸化反応に対する Dasatinib、Gefitinib、Imatinib、Staurosporine の阻害効果。ただし、反応速度は Tb₂-L¹ からの発光強度から算出。 $\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

表 1 Tb₂-L¹ からの発光から見積もった各阻害剤の各 PTK に対する IC₅₀ の値

IC ₅₀ (nM)	Dasatinib	Gefitinib	Imatinib	Staurosporine
Src	12 ± 0.96	>5000 ^a	- ^b	310 ± 28
Fyn	26 ± 2.2	>2000 ^a	>10000 ^a	260 ± 19
EGFR	1400 ± 110	22 ± 2.4	- ^b	2300 ± 820

Gefitinib の EGFR に対する曲線と同様に、それぞれの阻害剤が標的としている酵素に関しては、明確なシグモイド曲線が得られ、それをフッティングすることで IC₅₀ 算出した (表 1)。得られた IC₅₀ の値は、これまでに他の実験系で得られている値と極めて良く相関した。すなわち本錯体を用いることにより、阻害剤の活性を定量的に見積もることが可能であることが明らかになった。

次に、2 種類の PTP (Shp-1 および PTP1B) に関して、図 11 に示す 2 種類の阻害剤をそれぞれ添加して、Tb₂-L¹ からの発光を測定した。その結果、PTK の場合と同様に、阻害剤の添加に伴い、発光強度の減少速度の減少が観測された (Shp-1 と Na₃VO₄ の系を図 12 に示す)。

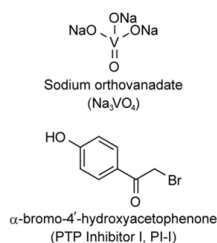


図 11 本研究で用いた PTP 阻害剤。

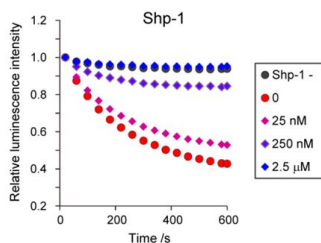


図 12 Shp-1 に対する Na₃VO₄ の添加に伴う Tb₂-L¹ からの発光強度の減少。

$\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

さらに、他の組み合わせについても、発光強度の阻害剤濃度依存性を測定し、発光強度の変化速度を各阻害剤の濃度に対してプロットした (図 13)。得られたシグモイド曲線から、IC₅₀ を算出することが可能であった (表 2)。以上より、PTP に対しても、PTK の場合と全く同様の手法で、定量的な解析が可能であることが明らかになった。

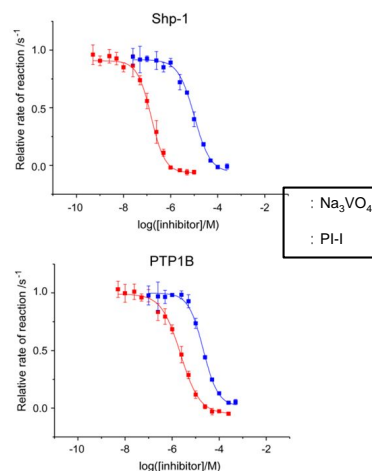


図 13 Shp-1 および PTP1B の Try 脱リン酸化反応に対する Na₃VO₄ および PI-I の阻害効果。ただし、反応速度は Tb₂-L¹ からの発光強度から算出。 $\lambda_{ex} = 262.5 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$ 。

表 2 Tb₂-L¹ からの発光から見積もった各阻害剤の各 PTP に対する IC₅₀ の値

IC ₅₀ (μM)	Na ₃ VO ₄	PI-I
PTP1B	2.3 ± 0.16	21 ± 0.77
Shp-1	0.14 ± 0.012	10 ± 0.57

(4) テルビウム () 複核錯体 (Tb₂-L¹) を用いた、PTK および PTP による一連の酵素反応のリアルタイム観測

(1) および (3) で、PTK および PTP によって引き起こされるそれぞれの反応に関して、Tb₂-L¹ からの発光により、チロシン残基のリン酸化状態がリアルタイムで観測可能であることが明らかになった。しかし、実際の細胞においては、両酵素が共存し、チロシン残基のリン酸化状態を可逆的に制御することで、細胞機能を厳密に制御している。そこで、図 14 に示すように、Src ならびに Shp-1 を連続して P1 ペプチドに作用させ、Tb₂-L¹ からの発光を観測した。Src を添加すると、P1 ペプチドがリン酸化されるため、発光強度の増大が観察された。一定の時間が経過した後、さらに Shp-1 を添加すると、発光強度が減少に転じた。これは、PTP によるチロシン残基の脱リン酸化反応が、リン酸化反応を上回って進行している状況を反映している。さらに、ここへ PTP 阻害剤 (Na₃VO₄) および Src を添加すると、脱リン酸化反応が阻害されてリン酸化反応が再び優勢となり、発光強度の増大が観測された。この一連のチロシン残基のリン酸化 - 脱リン酸化 - リン酸化反応に対して、Tb₂-L¹ は最初に一度添加すればよく、あとは発光強度を経時的に測定するだけという非常に簡便な手法である。

本研究により、 Tb_2-L^1 がペプチド中のチロシン残基のリン酸化状態を観測するための非常に良いプローブとなることが実証できた。

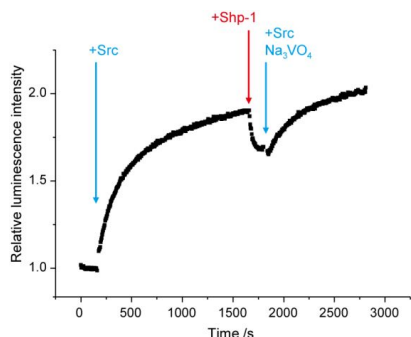


図 14 Src および Shp-1 による P1 ペプチド中のリン酸化チロシン残基のリン酸化ならびに脱リン酸化反応に対する Tb_2-L^1 の発光応答。 $\text{ex} = 262.5 \text{ nm}$ 、 $\text{em} = 545 \text{ nm}$ 。

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1件)

Hiroki Akiba, Jun Sumaoka, Takao Hamakubo, Makoto Komiyama, Conjugation-free, visual, and quantitative evaluation of inhibitors on protein kinases and phosphatases with a luminescent Tb(III) complex, 406, 2014, 3957-2964, 査読有
DOI: DOI 10.1007/s00216-014-7707-x

[学会発表](計7件)

秋葉宏樹、須磨岡淳、浜窪隆雄、津本浩平、小宮山眞、希土類錯体によるペプチド・蛋白質のチロシンリン酸化検出法の構築、第7回バイオ関連化学シンポジウム、2013年9月29日、名古屋大学(名古屋)。

須磨岡淳、秋葉宏樹、小宮山眞、チロシン残基リン酸化に発光応答する Tb(III) 錯体の構築とその応用、第30回希土類討論会、2013年5月23日、北九州国際会議場(小倉)。

須磨岡淳、秋葉宏樹、小宮山眞、テルビウム(III)錯体を用いたチロシン残基リン酸化のリアルタイム検出、第61回高分子討論会、2012年9月19日、名古屋工業大学(名古屋)。

秋葉宏樹、須磨岡淳、津本浩平、浜窪隆雄、小宮山眞、Tb(III)錯体によるチロシンキナーゼ阻害剤評価法の確立、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学(札幌)。

秋葉宏樹、須磨岡淳、小宮山眞、チロシン残基リン酸化を検出する Tb(III) 錯体 アミノ酸からペプチド・蛋白質まで -、第29回希土類討論会、2012年5月15日、北海道大学(札幌)。

秋葉宏樹、須磨岡淳、小宮山眞、Tb(III) 錯体のコンジュゲーションによるタンパク質上の特定 Try 残基リン酸化の検出、日本化学会第92春季年会、2012年3月28日、慶応義塾大学日吉キャンパス(横浜)。

秋葉宏樹、須磨岡淳、小宮山眞、Tb(III) 錯体によるリン酸化 Tyr 犬種てようにおけるリン酸認識メカニズム、第28回希土類討論会、2011年5月12日、タワーホール船堀(東京)。

[その他]

研究室ホームページ等

<http://www.tara.tsukuba.ac.jp/project/project09.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須磨岡 淳 (SUMAOKA, JUN)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10280934