2版

様 式 C−19、F−19、Z−19 （共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号： ３２６６１
研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2012～2014
課題番号： ２４５５０１９５
研究課題名（和文） 細胞内の微量タンパク質を高感度に単離精製するための新手法

研究課題名（英文） Development of a new efficient methodology to isolate trace amounts of proteins in cells

研究代表者
渡邊　総一郎（WATANABE, Soichiro）

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：１０２８７５５０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,200,000円

研究成果の概要（和文）：微量タンパク質を高感度に単離精製する方法の開発を目指し、３種類のビーズ表面を、光分解基を含む化合物で修飾し、クリックケミストリーにより可溶性分子を捕捉した。また、モデルタンパク質のビーズへの結合と光照射による溶出の検討をおこなった。
ビーズ表面の固相合成には従来法を用いた。モデル化合物を用いたビーズ表面でのクリックケミストリーの進行も確認できたが、この反応に用いる銅イオンがタンパク質の非特異的吸着に関与する可能性が示唆された。ビーズ表面に結合したモデルタンパク質の光照射による溶出実験では、溶出が確認できたが定量的評価は今後の課題である。モデル化合物を用いた光分解反応生成物の同定も検討中である。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we have been trying to develop a new efficient methodology to isolate trace amounts of proteins in cells. The surface of three kinds of beads were modified by compounds having photolabile groups and afforded to react with soluble molecules by Click Chemistry. Capture and photorelease of model proteins on modified beads were also examined. Modification of the surface of beads was conducted by conventional solid phase peptide synthesis. Although Click Chemistry on the beads was confirmed, copper ion, which is catalyst for Click Chemistry, might promote nonspecific absorption of proteins upon beads surface. Model proteins bound on beads surface were released upon irradiation, but quantitative evaluation will be needed. Identification of photoproducts using model compounds was also underway.

研究分野：有機化学

キーワード：生体機能関連化学　タンパク質の単離精製　光分解　クリックケミストリー

１．研究開始当初の背景

ゲノム解析以降、トランスクリプトーム (mRNA)、プロテオーム（タンパク質）といった、生体中でとりわけ重要な分子の網羅的な機能解析が急速に進展している。中でもタンパク質は、生体の構造や、代謝反応等に必須の生命活動の中心となる分子であり、ポストゲノムへと進展する生命科学における最重要解析対象となっている。しかし、生体内で実際に機能しているタンパク質の取得解析は、その少量多種、多様な機能のため取得条件が定まらず、特に微量タンパク質において困難を極めている。

機能解析のために生体からタンパク質を単離精製する方法としては、タンパク質と他の分子との特異的相互作用を利用するアフィニティー精製法が一般的である。この方法は、タンパク―タンパク、タンパク―リガンド相互作用を利用し、細胞抽出液などから標的タンパク質を得るものである。特異的相互作用が分かっていれば、汎用性があり、効率的であるが、標的タンパク質が微量になるほど、非特異的相互作用によるノイズが相対的に大きくなり、S/N 比が悪くなるという難点がある。このため、微量タンパク質の機能解析は困難であり、その解決が望まれている。

２．研究の目的

従来のアフィニティー精製法（図１(a)）で S/N 比低下の原因となるのは、ビーズ（固相担体）に標的タンパク質を結合させる段階、および結合したタンパク質をビーズから溶出させる段階である。ビーズへの結合は、ビーズ表面に固定化したリガンドとタンパク質との分子間結合を用いる。標的タンパク質量が少ないほどビーズ上のリガンドへの結合効率は低下し、ビーズ表面の空きが多くなり、ビーズ表面への非特異的吸着タンパク質量は多くなる。タンパク質溶出条件は、界面活性剤、塩濃度等が非特異的吸着タンパク質も溶出しやすい条件であり、微量タンパク質の場合、非常に精製度が低くなる。本研究では、（１）可溶性の修飾リガンドを用いることでリガンド結合効率を高め、（２）リガンド結合標的タンパク質の捕捉にクリックケミストリーを用い高効率にビーズ上に結合させる。（３）ビーズと標的タンパク質をつなぐ架橋部に光分解性の結合を導入することで、光照射で標的タンパク質だけを直接ビーズから解離させる。以上により非特異的吸着問題を解決することを目的とした（図１(b)）。

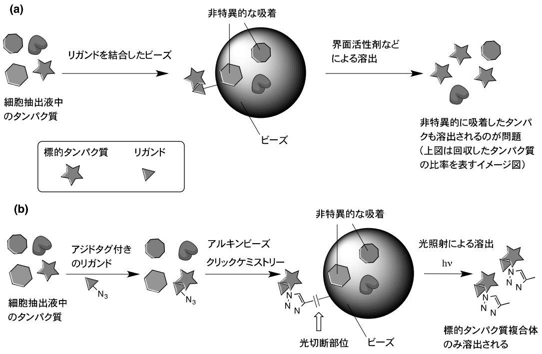

図１（a）従来のアフィニティー精製法の模式図。（b）今回用いる光開裂部位をもつビーズによる精製法の模式図。

３．研究の方法

（１）アフィニティビーズを用いた検討

タンパク質精製に実績があるアフィニティビーズ（住友ベークライト社製）の表面に光分基を導入し、さらに蛍光物質を結合させた。ビーズ表面の光分解基の分解効率を、蛍光分子に由来する蛍光量をフローサイトメーターで測定することにより見積もった。

（２）磁気ビーズを用いた検討

磁石により回収できるため取り扱いが容易な磁気ビーズ（Dynabeads）の表面に光分解基を導入し、さらに蛍光物質を結合させた。ビーズ表面の状態をフローサイトメーター等で測定した。

（３）光感受性ビーズを用いた検討

表面にあらかじめ光分解基が導入されている Photolabile Resin（Advanced ChemTech 社製）にビオチンを導入し、蛍光標識した Streptavidin（モデルタンパク質として利用）と混合して、ビーズ表面の蛍光量を蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで測定した。また、光照射により光分解が進んでいることを確かめた。また、光分解反応の詳細を調べるために、ビーズを含まないモデル化合物を合成し、その光分解反応について調べた。

４．研究成果

（１）アフィニティビーズを用いた検討

アフィニティビーズ（住友ベークライト社製）の表面はアミンと反応するように活性化されているので、光分解基を介して色素分子を結合したアミノ末端をもつ化合物を合成した（図２）。

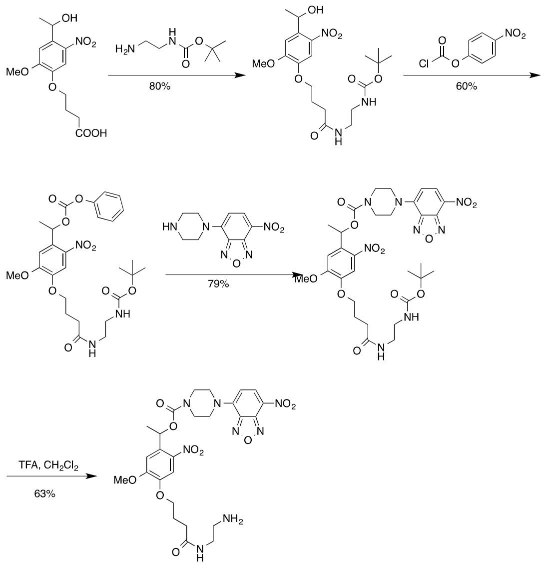

図２　アフニティービーズ表面修飾用化合物の合成経路

合成した化合物をアフィニティビーズと反応させたのちフローサイトメーターで測定すると、蛍光強度の増大が観測された。これは、ビーズ表面を不活性化処理後に同じ化合物を反応させても蛍光の増大が見られないことと対照的であった。

蛍光標識されたビーズに光照射すると、ビーズ表面の蛍光量が減少することが確認できたが、色素の放出量はわずかしか観測されず、分解効率の向上が必要であることが分かった。

（２）磁気ビーズを用いた検討

Dynabeads の表面に導入する部分（末端アルキンおよび光分解基を含む）の合成は図３のようにおこない、このアミノ基と Dynabeads 表面のカルボキシ基との縮合反応によりアルキン修飾ビーズを合成した。ここに、アジド基を持つビオチンや色素分子をクリックケミストリーを用いて導入した。

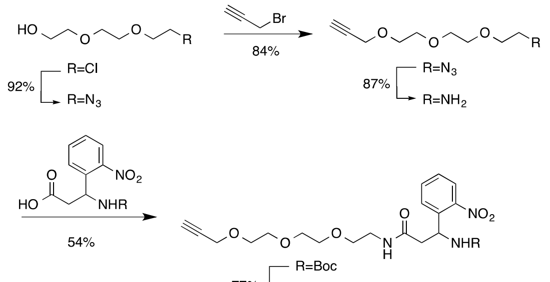

図３　磁気ビーズ表面修飾用化合物の合成経路

銅イオンを用いたクリックケミストリーにより表面に色素分子を結合させたビーズをフローサイトメーターで測定すると、銅イオンを加えずにおこなった対照実験に比べ、ビーズ表面の蛍光強度の増大が確認できた。このことから、ビーズ表面でのクリックケミストリーは問題なく進行していると考えられた。

続いて、タンパク質を結合したリガンド分子とビーズ表面の官能基とのクリックケミストリーの検討をおこなった。事前に FITC-Avidin とアジド基を導入したビオチンを混合し、表面をアルキンで修飾したビーズとクリックケミストリーの条件で反応させた。銅イオン共存下および非共存下で反応をおこなったが、色素分子を用いた実験の結果と異なり、反応後のビーズに有意な蛍光強度の差が見られなかった。反応後のビーズ表面の洗浄方法なども検討したが、大きな改善は見られず、銅イオン共存下でタンパク質が非特異的にビーズに吸着する可能性が示唆された。

（３）光感受性ビーズを用いた検討

これまでの、アフィニティビーズおよび Dynabeads での検討から、ビーズ表面でのクリックケミストリーが可能であることや、ビーズ表面を蛍光分析する方法が有効であることが明らかとなった。一方、ビーズ表面での反応を調べるまでの有機合成の段階で時間がかかり、最も検討を行いたいビーズ表面での反応について十分に検討が進まない現実が見えてきた。そこで、あらかじめ表面に光分解基が導入されている Photolabile Resin （Advanced ChemTech 社製）を利用することで、合成ルートの短縮と研究のスピードアップが可能かを検討した。

まず、ビーズ表面でのタンパクーリガンド相互作用によるタンパク質の捕捉と、光照射によるタンパク質の溶出が可能かを検討した。Photolabile Resin の表面の Fmoc 基を脱保護したのち、ビーズ表面のアミノ基とビオチンのカルボキシ基と縮合反応によりビーズ表面にビオチンを導入した。このビーズに蛍光標識した Streptavidin を結合させ蛍光顕微鏡でビーズ表面を観察すると、ビオチンを導入していないビーズで同様の操作をおこなった場合に比べて蛍光強度が有意に高かった。また、蛍光標識した Streptavidin を結合させたビーズに紫外線照射をおこない、十分に表面を洗浄してから再度蛍光顕微鏡観察をおこなうと、蛍光強度は減少した。また、洗浄液からは蛍光標識した Streptavidin に由来する蛍光が観測された。蛍光顕微鏡の露光時間を指標に、光照射時間とビーズ表面の蛍光強度をグラフにプロットすると、光照射時間が増すにつれて蛍光強度が減少することが分かった（図４）。これは、定性的にではあるが、ビーズ表面に捕捉したタンパク質を光照射により溶出できることを示している。溶出されたタンパク質量など、今後定量的な評価をおこなう必要がある。

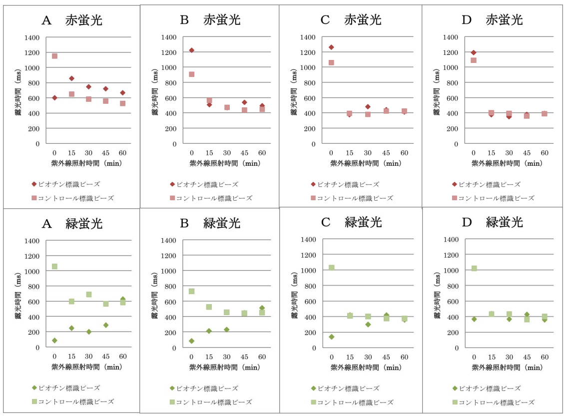

図４　ビーズ表面の蛍光量の経時変化。ビオチンで表面修飾したビーズと表面を不活性化処理したコントロールビーズに蛍光標識した Streptavidin を結合させ、紫外線照射をおこなった後に洗浄し、蛍光顕微鏡で Streptavidin を標識している緑蛍光を観察した。縦軸の露光時間は長いほど蛍光強度が弱いことを示している。赤蛍光は標識とは無関係の対照実験。A～D はビーズ表面の官能基量に対する蛍光標識 Streptavidin 量が異なる（ビーズ表面の官能基量に対する蛍光標識 Streptavidin 量は、A:1.9×10^{-3}, B: 1.9×10^{-4}, C: 1.9×10^{-5}, D は C と濃度条件は同一だが 1/10 スケールでおこなった）。

ビーズ表面での光反応の詳細を調べるために、モデル化合物を用いた光反応をおこない、光反応生成物の同定を試みた。モデル化合物の合成は図５に示すルートでおこなった。

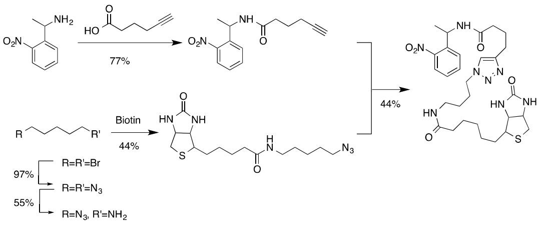

図５　モデル化合物の合成経路

合成したモデル化合物に紫外線照射をおこない、^{1}H NMR スペクトルで反応を追跡したところ、原料が分解していることが観察された。オルトニトロベンジル型の光分解基はベンジル位で結合の開裂が起こることが知られており、非常に多くの報告例がある。今回のモデル化合物でも図６に示す反応が進行していることが予想された。

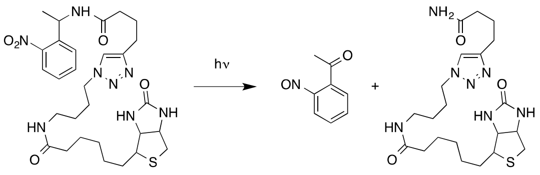

図６　モデル化合物の光反応での推定生成物

そこでビオチンを含む生成物を同定するために、別途、予想される生成物を合成し、それらのスペクトルを比較した。ところが、光分解生成物は、予想した生成物とは異なることが分かった。そこで、生成した化合物がさらに光反応を起こす可能性や、共存している他の化学種と副反応を起こす可能性を検証したが、どれも当てはまる結果を与えなかった。そのため、生成物を同定し反応の詳細を明らかにするには至っていない。

（４）今後の展望

複数のビーズを用いて、タンパク質を高感度に分離精製する方法を確立するための要素技術の検討をおこなった。ビーズの表面修飾や表面官能基を用いたクリックケミストリー、ビーズ表面の光分解基の結合開裂にともなう表面タンパク質の溶出など、幾つかの技術要素において、予想を裏付ける結果を得た。しかし、いずれも定性的な結果であり、定量的な結果を得ることが今後の課題である。また、１つ１つの要素技術を確立したのちに、それらを組み合わせて、有効なシステムとして機能させるために、さらなる検討が必要である。

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　０　件）

〔学会発表〕（計　２　件）

1.　浅面里美・深澤愛・岸本利彦・渡邊総一郎、光分解基を有するビオチン修飾ビーズによるタンパク質の捕捉と光溶出、日本化学会第 95 春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス（千葉県船橋市）、2015 年 3 月 27 日
2.　松島智也・別井真吾・花神彩香・岸本利彦・影近弘之・渡邊総一郎、クリックケミストリーと光分解性リンカー修飾ビーズを用いたタンパク質精製系の構築と評価、日本化学会第 93 春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス（滋賀県草津市）、2013 年 3 月 22 日

〔図書〕（計　０　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
渡邊　総一郎（WATANABE Soichiro）
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：10287550

(2)研究分担者
岸本　利彦（KISHIMOTO Toshihiko）
東邦大学・理学部・教授
研究者番号：90339200

(3)連携研究者
なし