

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410044

研究課題名(和文) 新世代の蛍光検出CDによる実用的タンパク質立体構造解析法の開発

研究課題名(英文) Study toward a practical method for protein structure analysis using an artifact-free fluorescence-detected circular dichroism

研究代表者

根平 達夫 (Nehira, Tatsuo)

広島大学・総合科学研究科・准教授

研究者番号：60321692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 蛍光検出CDによるタンパク質立体構造解析法の実用化を目指して、蛍光性アミノ酸残基であるTrpを含むオリゴペプチドのライブラリーにより、構造・スペクトル相関を調べた。Trpに長さの異なる棒状のオリゴプロリン鎖を伸長させた単純なTrp含有ペプチドを系統的に合成し、FDGDスペクトルを解析した。C末端側を伸長させると、Trpの近傍のペプチド結合との相互作用と、Trpへのエネルギー移動を示すPhe周辺の相互作用、という2つの構造情報を反映することが示唆された。一方、N末端側を伸長させると前者だけ沈黙することを示す結果も得られた。また、従来の1/10量の試料溶液に対応した小型セルを開発した。

研究成果の概要(英文)： Aiming at a practical protein structure analysis with fluorescence-detected CD, structure-spectrum relationship was investigated by using a synthetic library of oligopeptides that contain Trp as a fluorescent amino acid. Trp was derivatized systematically with a variety of oligoprolines as rigid spacers. As a result of careful comparison among those FDGD spectra, it was inferred from the expansion at Trp C-terminal that observable are two interactions, the coupling of Trp with neighboring peptides and the energy transfer from Phe to Trp over the spacer. On the other hand, the expansion at Trp N-terminal implied that the coupling with neighboring peptides would be suppressed. A micro-scale cell that requires only a tenth of volumes was also developed.

研究分野：構造有機化学

キーワード：タンパク質 円二色性 蛍光

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造解析法はライフサイエンスの発展において不可欠であるにも関わらず、誰でも普通の実験室でできる方法となると選択肢は限られる。信頼性の点で際立つ X 線法も、計算機のサポートにより顕著に高精度化している NMR 法も、誰にでも気軽に扱える方法ではなく、何より測定装置が高価で大型である。これまでも他に相補的な手法が広く探求されてきたが、溶液中で実際に反応途中のタンパク質の構造変化を測定することは、簡便かつ迅速な方法として実用化するのは相当困難である。

タンパク質の構造解析手法として長く評価されている方法の一つに、円二色性 (CD) 法がある。CD 法は、試料を選ばず迅速な測定が可能であり、特に二次構造の分析に有用である。ただし、CD 法は三次および四次構造の解析としては確実性が乏しく、得られる二次構造情報もタンパク質溶液全体の平均値となることなど、広く構造解析に利用するためには、まだ改良の余地がある。

本研究で注目するのは、CD 測定において透過光を検出する代わりに蛍光を検出する蛍光検出円二色性 (FDCD) である。FDCD では、タンパク質全体の二次構造ではなく、観測しようとする蛍光物質が結合した部位周辺の高次構造をピンポイントで抽出することが原理的に可能である。つまりタンパク質の混合溶液中であっても、迅速かつ選択的にシグナルを検出できる可能性が高い。

FDCD は新しい方法ではないが、測定装置が実用的レベルになったのは研究代表者らが 2005 年に開発した FDCD 測定装置より後である。従来の FDCD 装置では、蛍光の偏光度が大きい試料では「にせ FDCD 信号」の発生が見られ、信頼できる信号を得ることが困難であったが、新世代 FDCD 測定装置ではこの「にせ FDCD 信号」の問題を原理的に解消されている。

最近、この新世代の装置によりタンパク質 (カルモジュリン、ミオグロビン) の FDCD を測定した実験から、CD が主に二次構造の変化を反映するのに対して FDCD ならば三次構造の変化を観測できること、夾雑物が含まれた試料であっても目的分子のみをピンポイントで観察可能であることが示された。

2. 研究の目的

新世代の FDCD 装置は 2005 年以降、汎用の CD 測定装置のアタッチメントとして市販化され、特別な調整がなくても誰にでも使えるようになった。現在のところ、有用性を示す報告例が少ないこともあり、多く一般に普及しているとは言えないため本研究では、FDCD 分光法を溶液中の狙ったタンパク質から必

要な立体情報を選択して取り出す「ピンポイント解析法」としての可能性を考慮しながら、タンパク質のどのような立体情報を観測することができるのかを明らかにすることを目標とした。

FDCD は 1976 年に発表された論文で、分子内であっても局所構造をピンポイントで観測できると、理論的に予測されている。そこで、タンパク質の立体構造と FDCD スペクトルの波形とを完全に関連づけるため、FDCD スペクトルの観測原理を反映した適当なモデルペプチドのライブラリーを設計し、それらの FDCD スペクトルを解析した。

また、実用化のためのもう一つの視点として、特にタンパク質の場合には多くの場合に入手できる試料が限られるため、より少量でも測定可能とする必要があると考えた。この問題を少しでも改善するため、「にせ FDCD 信号」の発生を原理的に解消するという新世代の FDCD 測定装置の特長をそのまま生かしながら、セルの少量化を進めた。

3. 研究の方法

本研究では FDCD の観測原理を考慮した適当なペプチドライブラリーを合成して新世代の FDCD 測定装置によってスペクトルを測定する一方、その測定装置の特長をそのまま生かしながら試料の少量化を実現するために、従来比 1/10 の試料量でも測定可能な小型セルを試作し、二度の改良を行った。

タンパク質の FDCD スペクトルと立体構造の相関を調べるため、モデルペプチドのライブラリーのスペクトルを測定し解析した。タンパク質の FDCD を代表させるモデルとして、蛍光性アミノ酸である Trp とそれと相互作用するベンゼン環を有した Phe を持つペプチドを基本骨格とした。それらの間を連結するスペーサーとして、棒状のオリゴプロリン鎖を組み入れライブラリーとした。このとき、ペプチドの長さを系統的に制御するため、Trp の C 末端側を伸長させた WPnF (現在までに $n = 0, 1, 2, 3, 6, 12$) 系と、N 末端側を伸長させた FPnW (現在までに $n = 0, 2, 3, 6$) 系をペプチド固相合成法によって合成した。

小型セルは、「にせ FDCD 信号」の影響を受けない楕円鏡型の測定装置を、光学系の再調整をせずにそのまま利用できるように配慮して設計した。元の円筒型セルの受光面を 1/10 に縮小すると同時に試料の注入口を単純化し、注入口周辺の陰の部分は偏光調整と兼用のマスクにより覆って偏光解消と集光効率の向上を両立させた。また、測定中は集光レンズを利用して小型セルに効率よく励起光を集中させた。

4. 研究成果

タンパク質の FDCD を代表させるペプチドモデルは、Trp と Phe を持つペプチドを基本骨格とした。蛍光性の Trp は、ペプチドにならなくても FDCD スペクトルで 235 nm にピークを示し、このピークは Trp が C 末端または N 末端で他のアミノ酸とペプチド結合を形成すると強度が変化する。また、芳香族アミノ酸である Phe とペプチド結合すると 215 nm に新たなピークが見られた。これは Trp ではなく Phe が吸収をもつ波長領域であることから、FDCD では Phe が吸収したエネルギーが Trp へのエネルギー移動を経て観測されると説明できる。これを踏まえてさらに、Trp と Phe を長さの異なる Pro 鎖 (オリゴプロリン) で連結させたペプチドとし、Pro 鎖の長さを変えたライブラリーの FDCD スペクトルを測定して 215 および 235 nm での強度を評価した。

Trp の C 末端側でオリゴプロリン (Pro 鎖) を伸長させて Phe との相互作用を解析した結果を図 1 に示す。Phe がないとき (左上、WP_n系、n = 0, 1, 2) と、Trp そのものは 235 nm に明瞭な正のピークを示すが、Pro にはそのようなピークがないこと、および Trp の C 末端側に Pro を伸長すると、n の増加につれて 235 nm の正のピークが強くなること分かった。すなわち 235 nm の FDCD ピークは Trp に由来し、Trp の近傍にあるペプチド結合との相互作用を反映すると考えられる。

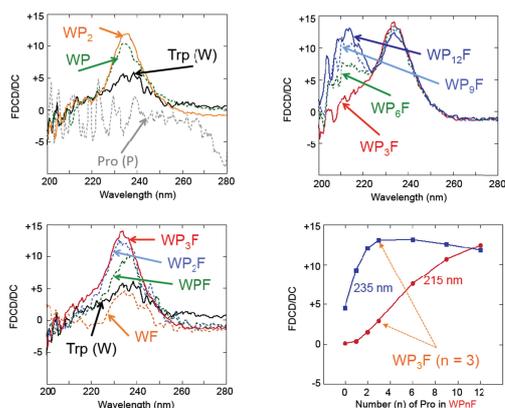


図 1 WP_nF 系の FDCD スペクトル

次に C 末端側に Phe を導入し、Trp と Phe の間に Pro 鎖を入れて Trp と Phe の距離を変化させながら 235 nm の FDCD ピーク強度を追跡した (WP_nF 系) と、n ≤ 3 のとき、この正のピークは強度が増大した (図 1、左下)。一方、n > 3 では (図 1、右上) このピークは徐々に減退し、このとき 215 nm に n が大きくなるに連れて増大する別のピークが現われた。

この WP_nF 系のペプチドモデルで FDCD スペクトルの 215 および 235 nm のピークに注目して n との関係を追跡する (図 1、右下) と、215 と 235 nm のピークは互いに独立に変化し

ていることが分かった。すなわち Trp 含有ペプチドの FDCD スペクトルは少なくとも 2 つの相互作用を観測している。

次に Trp の N 末端側を伸長させたペプチドを用いて、同様の解析をした結果を図 2 に示す。

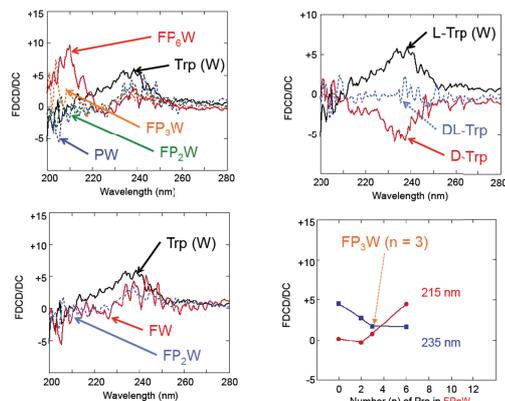


図 2 FP_nW 系の FDCD スペクトル

驚いたことに、Trp の N 末端に Pro 鎖を伸長させた (図 2、左上) と、末端に Phe を持つかどうかに関わらず、235 nm の正の FDCD ピークは減退した。ただし 215 nm の正のピークは n = 3 で現われ始め、n = 6 でさらに増大した。Trp の C 末端にペプチド結合があると 235 nm の正のピークが弱くなる現象は、Pro だけでなく Phe でも見られた (左下)。235 nm に見られる Trp の正の FDCD ピークは Trp の異性体では符合が逆になりラセミ体では消失する (右上) ことから、一連の変化は「にせ FDCD 信号」によるものではない。また、この FP_nW 系でも WP_nF 系と同様に、215 と 235 nm のピーク強度の変化は互いに独立 (右下) であり、何らかの原因で 235 nm のピークのみが消失することも分かった。現在までのところ、Pro 鎖の長さは限定されているが、引き続き系統的なライブラリーによる解析を継続する予定である。

セルの小型化については、従来のセルと比較して 1/10 量の試料で測定可能なセルを開発した。ただその後、二度の改良を行った現在でも、試料の出し入れやスペクトルの再現性に改善の余地が残っているため、セル形状の再検討を継続している。

本研究では、研究代表者が開発した新世代 FDCD 測定装置をより少量の試料に対応させるためにセルを改良する一方、タンパク質の立体構造と FDCD スペクトルの波形との関連づけを検討してきた。上に示したように、Trp 含有ペプチドのライブラリーを用いた解析から、FDCD で観測できる相互作用には少なくとも 2 種類あることが示唆された。蛍光基が Trp の場合には、Trp と周辺ペプチドとの相

相互作用が 235 nm に FDCD ピークとして現われ、分子内に Phe があれば Phe の周辺ペプチドとの相互作用が Trp へのエネルギー移動を經由して 215 nm に FDCD ピークとして独立に現われると考えている。今後は本研究をさらに発展させ、現在のペプチドライブラリーをさらに拡充すること、理論計算も含めて合理的な説明を模索すること、実用化の観点から Trp 以外の蛍光基の場合にどうなるかを検討することを計画している。

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 15 件)

1. Kohei Kazuma, Yuka Isobe, Haruka Asahina, Tatsuo Nehira, Motoyoshi Satake, Katsuhiko Konno, Crataegusins A and B, new flavanocoumarins from the dried fruits of Crataegus pinnatifida var. major (Rosacea), Natural Product Communications, 査読有り, 2016, in press.
2. Atsushi Ito, Ikuya Kumagai, Miku Maruyama, Hayato Maeda, Akio Tonouchi, Tatsuo Nehira, Ken-ichi Kimura, Masaru Hashimoto, Homopetasinic acid isolated from Diaporthe sp. strain 1308-05, Tetrahedron Letters, 査読有り, 57, 2016, 1117-1119, 10.1016/j.tetlet.2016.01.095.
3. Yuna Honmura, Shota Uesugi, Hayato Maeda, Kazuaki Tanaka, Tatsuo Nehira, Ken-ichi Kimura, Masaaki Okazaki, Masaru Hashimoto, Isolation, Absolute Structures, and Biological Properties of Cyclohelminthols I-IV from Helminthosporium velutinum yone96, Tetrahedron, 査読有り, 72, 2016, 1400-1405, 10.1016/j.tet.2016.01.036.
4. Miki Arayama, Shota Uesugi, Kazuaki Tanaka, Hayato Maeda, Tatsuo Nehira, Ken-ichi Kimura, Masaru Hashimoto, Homojesterones: Vinylogous analogues of Jesterone from Helminthosporium velutinum TS28, Tetrahedron, 査読有り, 72, 2016, 1031-1035, 10.1016/j.tet.2015.12.077.
5. Sayuri Kamikawa, Shiori Oshimo, Emi Ohta, Tatsuo Nehira, Hisashi Omura, Shinji Ohta, Cassane diterpenoids from the roots of Caesalpinia decapetala var. japonica and structure revision of caesaljapin, Phytochemistry, 査読有り, 121, 2016, 50-57, 10.1016/j.phytochem.2015.10.001.
6. Sayuri Kamikawa, Emi Ohta, Tatsuo Nehira, Hisashi Omura, Shinji Ohta, Structure Revision of Caesalpinista A and Caesalpinista B and Isolation of a New Furanoditerpenoid from the Cotyledons of Caesalpinia decapetala var. japonica, Helvetica Chimica Acta, 査読有り, 99, 2016, 133-137, 10.1002/hlca.201500171.
7. Ippei Kagiya, Hikaru Kato, Tatsuo Nehira, Jens C. Frisvad, David H. Sharman, Robert M. Williams, Sachiko Tsukamoto, Taichunamides: Unprecedented Prenylated Indole Alkaloids from Aspergillus taichungensis (IBT 19404), Angewandte Chemie International Edition, 査読有り, 55, 2015 1128-1132, 10.1002/anie.201509462.
8. Miki Arayama, Hayato Maeda, Kazuaki Tanaka, Noboru Takada, Tatsuo Nehira, Masaru Hashimoto, Achaetolide-II isolated from Helminthosporium velutinum TS28, Tetrahedron, 査読有り, 71, 2015, 7900-7905, 10.1016/j.tet.2015.08.013.
9. Miki Arayama, Tatsuo Nehira, Hayato Maeda, Kazuaki Tanaka, Hisashi Miyagawa, Tamio Ueno, Seiji Hosokawa, Masaru Hashimoto, Isolation, ECD-Assisted Structure Analyses, Biosynthetic Discussions, and Biological Activities of epi-Cochlioquinones D and Its Derivatives, Tetrahedron, 査読有り, 29, 2015, 4788-4794, 10.1016/j.tet.2015.05.044.
10. Hikaru Kato, Tatsuo Nehira, Koichi Matsuo, Tetsuo Kawabata, Yoshihiko Kobashigawa, Hiroshi Morioka, Fitji Losung, Remy E. P. Mangindaan, Nicole J. de Voogd, Hideyoshi Yokosawa, Sachiko Tsukamoto, Niphateolide A, Isolation from the marine sponge Niphates olemda and determination of its absolute configuration by an ECD analysis, Tetrahedron, 査読有り, 71, 2015, 6956-6960, 10.1016/j.tet.2015.07.009.
11. Yuna Honmura, Hiroto Takekawa, Kazuaki Tanaka, Maeta Hayato, Tatsuo Nehira, Warren Hehre, Masaru Hashimoto, Computation-assisted Structure Elucidation of Epoxyroussoeone and Epoxyroussoedione isolated from Roussoella hysterioides KT1651, Journal of Natural Products, 査読有

- り , 78, 2015, 1505-1510, 10.1021/np500924n.
12. Hisashi Ômura, Taro Noguchi, Tatsuo Nehira, Novel himachalene-type sesquiterpenes from male adults of Chinese Windmill butterfly, *Byasa alcinous alcinous*, *Natural Products Researches*, 査読有り, 29, 2015, 406-411, 10.1080/14786419.2015.1019352.
 13. Ryo Katoono, Keiichi Kusaka, Shunsuke Kawai, Yuki Tanaka, Keisuke Hanada, Tatsuo Nehira, Kenshu Fujiwara, Takunori Suzuki, Chiroptical molecular propeller based on hexakis(phenylethyl)benzene through the complexation-induced intramolecular transmission of local point chirality, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 査読有り, 12, 2014, 9532-9538, 10.1039/c4ob01601g.
 14. Tetsuro Ito, Tatsuo Nehira, Dehydroxylation of stilbenoid oligomers: absolute configuration determination via comparison of experimental and theoretical electronic circular dichroic spectra, *Tetrahedron Letters*, 査読有り, 55, 2014, 314-318.10.1016/j.tet.2014.06.074
 15. Akane Hirose, Hayato Maeda, Akio Tonouchi, Tatsuo Nehira, Masaru Hashimoto, Neomacrophorin I, II, and III, Novel Trimethyl Cyclohexane with Hydroxylated Butanoates from *Trichoderma* sp. 1212-03, *Tetrahedron*, 査読有り, 70, 2014, 1458-1463, 10.1016/j.tet.2013.12.087.

[学会発表](計 6 件)

1. Tatsuo Nehira, Kaoru Ishihara, Hirone Ito, Keiko Masuda, Kazuyoshi Ukena, Koichi Matsuo, Shunsuke Izumi, Takeshi Yamazaki, Atsuhiko Ishida, Protein conformational analysis by fluorescence-detected circular dichroism (FDCCD), *Pacificchem 2015*, 15-20 Dec 2015, Honolulu U.S.A.
2. Tatsuo Nehira, Hirone Ito, Kaoru Ishihara, Keiko Masuda, Kazuyoshi Ukena, Koichi Matsuo, Shunsuke Izumi, Takeshi Yamazaki, Atsuhiko Ishida, Potential for protein conformational analysis provided by fluorescence-detected circular dichroism (FDCCD), *CD2015*, 30 Aug -3 Sep 2015, Sapporo Japan.
3. Masayuki Watanabe, Ettore Castiglioni,

- Takunori Harada, Tatsuo Nehira, Chirality Measurement Systems for Excited Molecules, *Chirality 2015* (The 27th International Symposium on Chiral Discrimination), 28 Jun -1 Jul 2015, Boston U.S.A.
4. Masayuki Watanabe, Ettore Castiglioni, Takunori Harada, Tatsuo Nehira, Chirality Measurement Systems for Excited Molecules, *MC2015* (Symposium on Molecular Chirality), 12-13 Jun 2015, Tokyo Japan.
 5. 伊藤弘音, 根平達夫, 石原郁, 益田恵子, 浮穴和義, 松尾光一, 泉俊輔, 山崎岳, 石田敦彦, 蛍光検出円二色性 (FDCCD) 分光法が可能にするタンパク質立体構造の観測, 第 56 回 日本生化学会 中国・四国支部例会, 2015 年 5 月 29 日, 松江.
 6. 根平達夫, 松尾光一, 加藤光, 塚本佐知子, 伊藤哲朗, 橋本勝, パソコンでできる ECD スペクトルシミュレーションによる有機化合物の絶対配置決定, 第 56 回 天然有機化合物討論会, 2014 年 10 月 15-17 日, 高知.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根平 達夫 (NEHIRA TATSUO)

広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
研究者番号: 60321692

(3) 連携研究者

石田 敦彦 (ISHIDA ATSUHIKO)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号: 90212886

山崎 岳 (YAMAZAKI TAKESHI)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号: 30192397