

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19780087	
研究課題名（和文）	光親和性標識と質量分析による発光タンパク活性部位の動的変化解析
研究課題名（英文）	Dynamic analysis of photoprotein by using photoaffinity labeling and mass spectrometric analysis
研究代表者	
久世 雅樹 (KUSE MASAKI)	
名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教	
研究者番号：40335013	

研究成果の概要：発光タンパクが効率よく発光している分子機構を明らかにすることを目的として、イクオリンを光親和性標識した。既に合成したアジド化デヒドロセレンテラジンをを用いてイクオリンを再構成し、発光前後において照射した。トリプシン消化した後、質量分析した結果、システイン残基が特異的に酸化修飾されていることが判明した。この現象はこれまでに報告例が無く、発光前後におけるタンパクの動的変化解析に利用できる手法を確立できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物発光、発光タンパク、光親和性標識、質量分析、アジド基、酸化修飾

## 1. 研究開始当初の背景

タンパクが基質（発光素子）を酸化し発光する反応が生物発光である。これまで、生物発光に関する分子機構研究が多くの研究者により行われてきた。近年、X線結晶構造解析による発光タンパクの活性部位の解明が報告されている。Shimomura（米国）らにより、オワンクラゲ発光タンパク（イクオリン）の構造が報告され、発光素子が過酸化物として安定化されることが判明している（*Nature*, 2000, 405, 372-376）。また、Kato（日本・理研）らにより、ホタルルシフェラーゼの構造が報告され、タンパクによる基質の安定化の度合いと発光色変化についての知見が報

告された（*Nature*, 2006, 440, 372-376）。こうして発現タンパクが結晶化する場合、X線結晶構造解析は強力な解析手段であることは言うまでもないが、難結晶性タンパクでは利用できない欠点がある。

それを補う手法に、X線結晶構造解析とならぶ解析手法である光親和性標識法が挙げられる。光親和性標識法も多くの研究者により発展してきている。しかしながら、こうした光標識タンパクの解析にはラジオアイソトープを用いなくてはならない点、汎用性の低い欠点となっていた。

これまで、トビイカ発光タンパク（シンプレクチン）に関する生物有機化学的研究に従

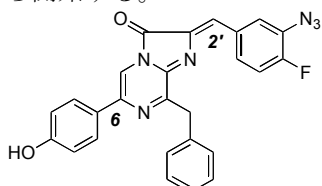
事してきた。シンプレクチン活性中心では、システイン残基と発光素子（デヒドロセレンテラジン：DCT）が結合してクロモフォアを形成している。その活性中心システイン残基を特定するために、システイン残基と強力に結合するフッ素化DCTアナログを合成してきた。フッ素化DCTを取り込ませた再構成シンプレクチンをプロテアーゼ消化し、得られたペプチド断片をLC-MSで解析した結果、活性中心のシステイン残基を含むペプチド断片の単離に成功している。しかしながら、質量分析中に、システインと解離してしまいMS/MS測定による詳細な解析ができなかった。そこで、より安定に解析できるように、シンプレクチン活性中心とDCTとを不可逆的に結合させる必要性が生じた。また、シンプレクチンがどのようにしてDCTを取り込み、効率よく発光反応を行い、その後、活性中心より発光後の分子を排出するのか、発光素子近傍における分子レベルでのタンパクの動的変化を生物有機化学的手法で明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、光親和性標識法を駆使し、トビイカ・ホタルイカ発光タンパクについて、発光素子サイドから活性部位の動的解析を行うことを目的とした。また、ラジオアイソトープを一切使用せず、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析装置を駆使して標識部位を明らかにする手法を確立することも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 光親和性標識のためのプローブとして2'位芳香環にフッ素基とアジド基を持つデヒドロセレンテラジン（Az-F-DCT：下図）を合成し、照射により効率よくニトレンを生成し溶媒付加体を与えることを報告している。6位DCT誘導体を用いて照射ペプチドにビオチン基を導入する前に、2'位芳香環にアジド基を持つAz-F-DCTを用いて、発光タンパクの照射条件と解析条件を確立することから開始する。



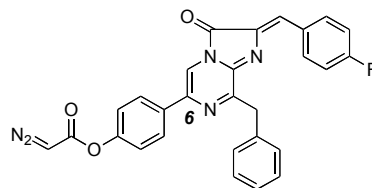
オワンクラゲ発光タンパク（イクオリン）は高純度品が購入できるので、イクオリンとAz-F-DCTの還元体であるAz-F-CTを用いて照射を行う。電気泳動において、高分解能緩衝液（アトー社製）を用いると、分子量数百の差をゲル上で確認できる。そこで、照射したイクオリンを、高分解能緩衝液-電気泳動

にて解析し、照射物は分子量が増えるので、それを切り出し、ゲル内消化酵素でペプチド断片へと分解する。得られた試料を質量分析装置で解析する。非照射のイクオリンも同一条件で解析し、変化のあるペプチド断片を解析する。イクオリンのアミノ酸配列はすでに報告されているので、そのペプチドマップを参考にして解析を進める。生物発光前、発光後についてそれぞれ光標識し、光照射部位の変化を基に、イクオリンの活性部位における動的解析を行う。

(2) イクオリンで一連の解析が終了した後、同じ手法を用いて、トビイカ発光タンパク（シンプレクチン）に適用し、発光前・後における活性部位の動的解析を行う。シンプレクチンのアミノ酸配列についてはすでに質量分析を用いて解析済みであり、ペプチドマップの作成も終了している。

(3) ホタルイカ発光タンパクはこれまで単離されておらず、生物発光機構については未だ不明な点が多い。そこで、ホタルイカ発光器を緩衝液中で粉碎し、得られた上清（発光タンパク粗画分）にAz-F-DCTを加える。得られた溶液に紫外線（350 nm）を照射して、Az-F-DCTとタンパクを結合させる。電気泳動で、照射前のタンパクと変化のあったタンパクを探し、Az-F-DCTに結合したタンパクの分子量を特定する。次に、その分子量のタンパクを、ホタルイカ発光器抽出物からゲル濾過カラムで精製し、生物発光を示すか確認する。これにより、光標識されたタンパクが、発光タンパクであるのか確認する。

(4) 光標識ペプチドの検出を容易に行うために、光標識ペプチドへビオチン基を導入し、アフィニティーカラムにより精製する。そこで、F-DCTの6位水酸基にジアゾアセチル基を導入したAz-F-DCTを合成する（下図）。



これは、DCTより一段階にて合成できる。次に再構成した発光タンパク（イクオリン・シンプレクチン）を照射し、共有結合を形成させる。DCTとタンパクの間にはエステル結合が存在するので、前図で示したビオチン誘導体（1級アミン化合物）を加えるとエステルがアミドに交換するので、容易に照射部位へビオチン基を導入できる。このタンパクをトリプシンなどで消化しペプチド断片へと分解する。照射を受けたペプチドのみがビオチン基を持つので、モノメリックアビジンを用いたアフィニティーカラムにより

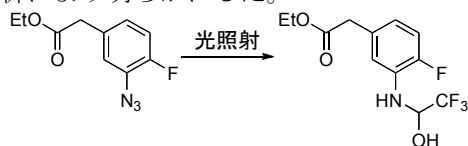
単離する。モノメリックアビジンは、ピオチン化ペプチドを溶出する際のトラブルが少ない利点がある。精製した光標識ペプチドをナノ LC-Q-TOF 型・イオントラップ型質量分析装置にて MS および MS/MS 解析し、イクオリン・シンプレクチンのどのアミノ酸残基が光標識されたのかを解析する。

#### (5) DCT の 8 位誘導体の合成

これまで 6 位にトリフラートを導入したアミノピラジン誘導体から DCT の 6 位誘導体を種々合成してきた。DCT の 8 位に直接芳香環を導入してもシンプレクチンは活性を保持していた上、発光波長が青色から黄緑色へ長波長シフトした (未発表データ)。そこで、8 位にトリフラートを導入したアミノピラジン誘導体を合成し、DCT の 8 位誘導体を種々合成することとする。パラジウム触媒を用いた Suzuki-Miyaura 反応を利用して、様々な芳香環を DCT の 8 位に導入する。芳香環上の置換基 (R) を電子吸引基から電子供与基まで変化させて、発光波長の変化を調べる。

#### 4. 研究成果

(1) アジド基の光照射生成物について詳細に検討したところ、イミダゾピラジノン骨格を持たない芳香族化合物では、生成物の構造が異なることが明らかになった。Az-F-CT では OH 結合に挿入していたが、フェニル酢酸誘導体では、CH 結合に挿入反応していた。これらの構造は重水素交換を用いた ESI 型質量分析により明らかにした。

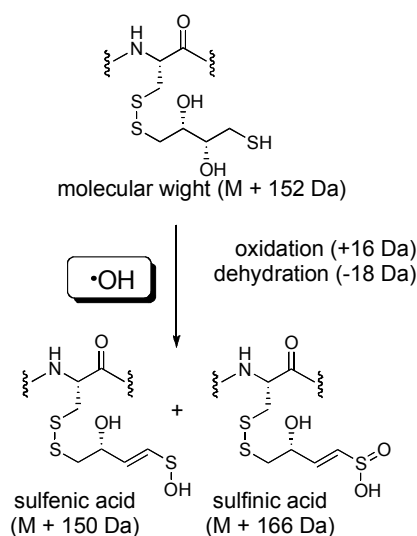


溶質の溶媒和の構造の違いにより光照射物が異なる最初の報告となった。

(2) フッ素基を 2 個導入した DCT を用いて、シンプレクチン活性部位のシステイン残基を 390 番目であることを突き止めた。2 種類の DCT 誘導体を合成して活性を測定したところ、フッ素基の置換位置によって、活性に大きな差が生じることが明らかになった。その原因について種々検討した結果、システイン残基との反応性が大きく異なることが明らかになった。反応性が大きすぎる場合、活性のあるクロモフォアを形成できなくなるために、発光活性が低下することが明らかになった。

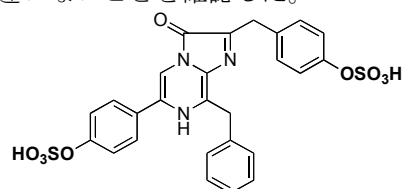
(3) Az-F-DCT を用いてイクオリンを再構成し、発光前後において光照射した。その照射物をトリプシンで消化した後、ESI 型質量分析した結果、システイン残基が特異的に酸化修飾されていることが判明した (下図)。この現象はこれまでに報告例が無く、発光前後

におけるタンパクの動的変化解析に利用できる手法を確立できた。



(4) DCT で発光するタンパクとして、二枚貝発光タンパク質フォラシンも見いだした。これは、これまで 120 年間発光基質が不明であった。基質構造が決まったので、今後様々な臨床研究において利用されることが期待される。

(5) ホタルイカルシフェリンの構造に関する研究を展開した。硫酸化、リン酸化ルシフェリンをそれぞれ合成し、天然物と詳細に比較した結果、硫酸化セレンテラジン (下図) で間違いないことを確認した。



重水素交換を用いた質量分析が効果的な分析手法であった。一方、リン酸化セレンテラジンは発光を阻害する作用があることが判明し、今後この阻害機構について詳細に検討する必要性が生じた。

#### 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 10 件)

- Doi, I.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. Selective oxidation by the hydroperoxide in the photoprotein, aequorin. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3399-3404. (査読有り)
- Doi, I.; Kuse, M.; Nakashima, Y.; Tani, N.; Isobe, M. Differentiation of coelenteramide sulfate from phosphate by hydrogen/ deuterium exchange

- coupled with ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2009**, *57*, 89-95. (査読有り)
3. Makarasin, A.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. Substituent effect of imino-O-arenesulfonates, a coupling partner in Suzuki-Miyaura Reaction for substitution of the Pyrazine Ring: A Study for the Synthesis of Coelenterazine Analogs. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, in press. (査読有り)
  4. Sydnes, M. O.; Kuse, M.; Doi, I.; Isobe, M. <sup>1</sup>H NMR Aided Elucidation of Products Derived from Photodegradation of Ethyl 3-azido-4,6-difluorobenzoate in 2,2,2-Trifluoroethanol. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 3863-3870. (査読有り)
  5. Nakashima, Y.; Kongjinda, V.; Tani, N.; Kuse, M.; Isobe, M. Chemistry for biology of symplectin bioluminescence with fluoro-dehydrocoelenterazine. *Chemiluminescence and Bioluminescence* **2009**, *51-54*. (査読有り)
  6. Kuse, M.; Tanaka, E.; Nishikawa, T. Pholasin luminescence is enhanced by addition of dehydrocoelenterazine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5657-5659. (査読有り)
  7. Isobe, M.; Kuse, M.; Tani, N.; Fujii, T.; Matsuda, T. Cysteine-390 is the binding site of luminous substance with symplectin, a photoprotein from Okinawan squid, *Symplectoteuthis oualaniensis*. *Proc. Japan Acad. Ser. B.* **2008**, *84*, 386-392. (査読有り)
  8. Sydnes, M. O.; Doi, I.; Ohishi, A.; Kuse, M.; Isobe, M. Determination of Solvent-Trapped Products Derived from Photolysis of Aryl Azides in 2,2,2-Trifluoroethanol. *Chemistry - An Asian J.* **2008**, *3*, 102-112. (査読有り)
  9. Sydnes, M. O.; Kuse, M.; Kurono, M.; Shimomura, A.; Ohinata, H.; Takai, A.; Isobe, M. Protein Phosphatase Inhibitory Activity of Tautomycin Photoaffinity Probes Evaluated at Femto-molar Level. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1747-1755. (査読有り)
  10. Sydnes, M. O.; Kuse, M.; Isobe, M. Reductive monoalkylation of nitro aryls in one-pot. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6406-6414. (査読有り)
1. 田中瑛子、土井一生、久世雅樹、西川俊夫：ヒカリカモメガイ発光タンパク (pholasin) の有機分子に関する研究。日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡、2009 年 3 月 28 日。
  2. 中島陽介、久世雅樹、谷 直紀、西川 俊夫、磯部 稔：ジフルオロデヒドロセレンテラジンをを用いた symplectin 発光機構の動的解析。日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡、2009 年 3 月 28 日。
  3. 土井一生、Magne Olav Sydnes、久世雅樹、西川俊夫、磯部 稔：H/D 交換質量分析を用いたニトレンの溶媒挿入付加物の解析。日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡、2009 年 3 月 28 日。
  4. Kongjinda, V.; Nakashima, Y.; Tani, N.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. : Study of di-fluoro-dehydrocoelenterazine analogs in bioluminescence of symplectin。日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡、2009 年 3 月 28 日。
  5. Masaki Kuse. Marine bioluminescence with coelenterate compounds. The 8<sup>th</sup> Joint Seminar JSPS-NRCT Core University Program. Bangkok, February 3-4, **2009**. (招待講演)
  6. 土井一生、久世雅樹、西川俊夫、磯部 稔：オワンクラゲ生物発光機構に関する生物有機化学的研究。第 50 回天然物有機化合物討論会、福岡、2008 年 10 月 2 日。
  7. 中島陽介、久世雅樹、西川俊夫、磯部 稔：化学合成発光素子によるトビイカ発光タンパク symplectin の生物有機化学的研究。日本農芸化学会 第 153 回 中部支部例会、名古屋、2008 年 11 月 1 日。
  8. 田中瑛子、久世雅樹、西川俊夫：二枚貝発光タンパク (pholasin) の有機基質に関する研究。日本農芸化学会 第 153 回 中部支部例会、名古屋、2008 年 11 月 1 日
  9. Doi, I.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. Molecular Mechanism of jellyfish bioluminescence by means of photolysis of aequorin. 15<sup>TH</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLUMINESCENCE & CHEMILUMINESCENCE, Shanghai (China), May 15, 2008.
  10. Nakashima, Y.; Kongjinda, V.; Tani, N.; Kuse, M.; Isobe, M. Chemistry for biology of symplectin bioluminescence with fluoro-dehydrocoelenterazine. 15<sup>TH</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLUMINESCENCE & CHEMILUMINESCENCE, Shanghai (China), May 15, 2008.

[学会発表] (計 20 件)

11. 大石亜矢子、Makarassen, Arthit、久世雅樹、磯部 稔：光親和性標識によるデプシペプチドへの官能基導入。日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、2008 年 3 月 27 日。
12. 土井一生、久世雅樹、磯部 稔：オワンクラゲ発光機構に関する生物有機化学的研究。日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、2008 年 3 月 27 日。
13. 中島陽介、久世雅樹、磯部 稔：ジフルオロデヒドロセレンテラジンを用いたトビイカ短寿命発光中間体に関する立体過程。日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、2008 年 3 月 27 日。
14. 谷 直紀、長瀬さやか、中島陽介、久世雅樹、磯部 稔：トビイカ発光タンパク質シンプレクチンの発光素子結合部位の探索。日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋、2008 年 3 月 27 日。
15. Kuse, M. ; Nakashima, Y. ; Tani, N. ; Doi, I. ; Isobe, M. FLUORO-DEHYDROCOELENTERAZINE: CHEMICAL BIOLOGY OF SYMPLECTIN. Princess Congress VI, Bangkok, Thailand, November 24-29, 2007.
16. Doi, I. ; Kuse, M. ; Isobe, M. Photoaffinity labeling of Aequorin with an Azide-coelenterazine. Princess Congress VI, Bangkok, Thailand, November 24-29, 2007.
17. 中島陽介、久世雅樹、磯部 稔：ジフルオロデヒドロセレンテラジンを用いたトビイカ短寿命発光中間体に関する立体過程。日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会、名古屋、2007. 9. 22.
18. 大石亜矢子、Arthit Makarassen、久世雅樹、磯部 稔：K<sup>+</sup>選択的イオノフォア機能解析のためのフォトプローブ分子設計。日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会、名古屋、2007. 9. 22.
19. Kuse, M. ; Nakashima, Y. ; Tani, N. ; Doi, I. ; Isobe, M. Fluoro-Dehydrocoelenterazines: Chemical Biology of Symplectin Bioluminescence. 2<sup>nd</sup> International Conference of Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia. Pusan, Korea, September 2-6, 2007.
20. 中島陽介、久世雅樹、磯部 稔：フッ素 2 置換デヒドロセレンテラジンの物性と生物発光。日本農芸化学会 2007 年度大会、東京、2007 年 3 月 26 日。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cic.nagoya-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久世 雅樹 (KUSE MASAKI)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教

研究者番号：40335013