

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 月 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22350073

研究課題名（和文） タンパク質化学修飾のための新手法の開拓

研究課題名（英文） Development of New Methods for Protein Chemical Modification

研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質を修飾するための化学的手法の開発を試みた。一つ目として我々は、オリゴヒスチジンタグ/Ni(II)-NTA プローブの相互作用ペアを利用したタンパク質の共有結合ラベル化法を開発した。このタンパク質ラベル化法を用いて差異母内に発現させたタグ導入タンパク質のラベル化に成功した。二つ目として我々は、ヘリックス型オリゴアスパラギン酸タグ/Zn(II)-DpaTyr の相互作用ペアを用いた高反応性タグ/プローブペアのデザインに成功した。三つ目として我々は、タンパク質の修飾に有用な新しい蛍光性色素の開発に成功した。この蛍光色素は、それ自身の水と平衡に伴って二波長発光変化を示す特徴を持つことから、今後、タンパク質型の蛍光バイオセンサーへの応用が期待出来る。

研究成果の概要（英文）：In this research, we have attempted to develop several new chemical methods for protein modification. First, we have developed the covalent protein method using the complementary recognition pair of oligo-His tag and Ni(II)-NTA probe. This labeling method was successfully applied to the labeling of the tag-fused proteins in living cells. Second, we have achieved the design of highly reactive tag-probe pair comprising a-helix type oligo-Asp tag and Zn(II)-DpaTyr probe. This pair showed the higher protein labeling selectivity compared to the previously developed method, validating the our design strategy of the reactive tag-probe pair. Third, we have found the new fluorescent dye for protein modification. This fluorescent dye displayed a unique dual-emission change depending on its hydration state, which we expect would be valuable fluorophore to develop protein-based fluorescence biosensors

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：タンパク質、蛍光プローブ、ラベル化、バイオイメージング、ペプチドデザイン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質に対して、蛍光色素をはじめとする様々な人工機能分子を導入することは、

タンパク質の機能解析や機能付与に極めて有効な手法である。近年、細胞や動物個体内でのタンパク質の局在や機能を直接可視化

するバイオイメージングが注目されているが、検出マーカーとなる蛍光色素を特定のタンパク質へ修飾する技術は、バイオイメージングを行う上で必須の基盤技術である。一方、蛍光色素以外の機能性分子をタンパク質へと導入する事により、様々なタンパク質の機能解析や新しい機能の付与が可能となる。例えば、スピンラベル化分子を用いる ESR パルス二重共鳴法、 ^{19}F 含有プローブを用いる ^{19}F -NMR 解析、光スイッチ分子によるタンパク質機能制御、PEG (ポリエチレングリコール) 鎖導入による物性改変、などが挙げられる。これらの多くは、比較的新しいタンパク質機能解析法であり、今後ますますその応用が拡大すると予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質を化学修飾により人工機能化するための様々な新技術の開拓を目指す。本研究では、1) タグ導入タンパク質の特異的ラベル化法の開発、2) タンパク質内有機化学による自発的蛍光修飾法の探索、3) タンパク質ラベル化のための新しい蛍光色素ならびにリンカー分子の開発、の3つの新規な研究テーマを相互に関連させつつ複合的に進める。これにより、既存の手法よりも格段に優れた新しいタンパク質修飾技術や分子ツールを提供し、細胞生物学やタンパク質工学の発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

本申請研究は、上記の3つの研究テーマからなり、それぞれに異なった研究アプローチをとった。1) については、新しいタグ配列と反応性プローブの開発、2) については、ペプチドレベルでの初期検討による反応を起こす配列と反応条件の探索、3) については、プローブやリンカー分子の合成と初期機能評価が中心となる。研究の中盤以降では、タンパク質に対するラベル化について検討を進め、1) および 3) については開発した手法の実用性や有用性を、2) については手法概念を立証する事に重点をおいて研究を行う。また、各テーマにおいて得られた知見は、他の研究テーマでの分子デザインに活用するなど、相互に関連をさせながら全体の研究を進め、複合的かつ効率のよい研究展開を目指す。

4. 研究成果

1) タグ導入タンパク質の特異的ラベル化法の開発についての研究成果：

(I) オリゴヒスチジンタグ/Ni(II)-NTA プローブペアによるタンパク質共有結合ラベル化法の検討；タグ・プローブ間での効率のよい共有結合形成を達成するために、His6 タグ

上に求核反応性の高いシステインを導入したヒスタグ配列 CH6(CHHHHHH)、プローブとして求電子反応性の α -クロロアセチル基を導入した Ni(II)-NTA 型化合物をデザインした。まず、蛍光色素型プローブ 1-2Ni(II) の反応について、CH6 タグを導入した EGFP タンパク質を用いて検討したところ、反応は60分で80%以上の高効率で進行することを見いだした。

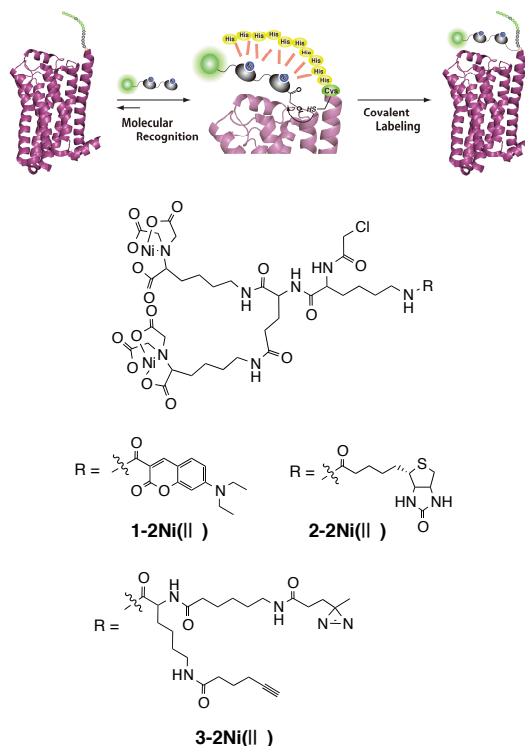


図1. ヒスタグ導入タンパク質の Ni(II)-NTA プローブによる共有結合ラベル化

次に細胞内でのタンパク質ラベル化応用を目指して検討した。Ni(II)-NTA プローブは、それ自体がアニオン性の極性化合物であるため細胞膜透過性を示さない。そこで、Ni(II)-NTA プローブを細胞内へと導入するため、オリゴアルギニン-オリゴヒスチジン配列を持つキャリアーペプチド (HHHHRRRRRRRR) とピレンブチレートの組み合わせから成るデリバリーシステムを考案した。このシステムを応用することで、Ni(II)-NTA プローブを細胞内に移行させることに成功した。次に HeLa 細胞内に発現させた (CH6x2) タグを有する EGFP タンパク質のラベル化をビオチン型プローブ 2-2Ni(II) を用いて行ったところ、プロテオミクス解析において EGFP タンパク質特異的なラベル化の進行を確認することができた。さらに、このラベル化法を用いて、細胞内のタンパク質間相互作用の検出を検討した。細胞内に発現させた (CH6x2) タグを有する FRB タンパク

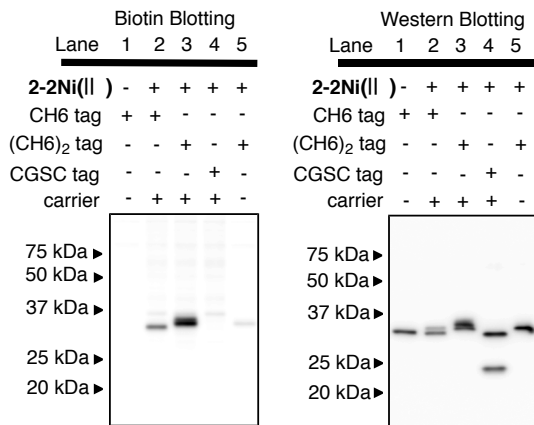


図2. 細胞内に発現させたヒスタグ導入 EGFP の Ni(II)-NTA プローブによる共有結合ラベル化

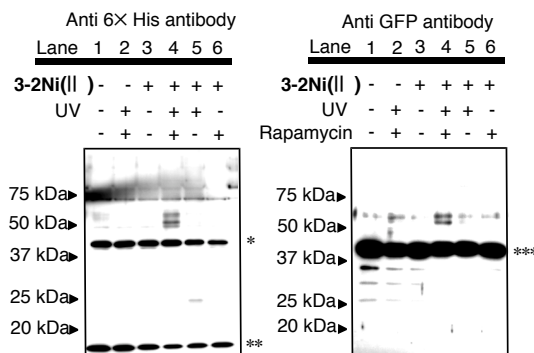


図3. ヒスタグ導入 FRB と FKBP のタンパク質間相互作用の検出

質を光反応性基を有するプローブ 3-2Ni(II) を用いてラベル化した後、ラパマイシン存在下にて照射すると ERB と FKBP12 タンパク質が光架橋された高分子量のバンドをブロットング解析において確認することが出来た。この結果は、本ラベル化法のタンパク質解析における分子ツールとしての有用性を示すものである。

(II) 高反応性ペプチドタグ/プローブペアのデザイン; タンパク質のラベル化において、非特異的ラベル化を軽減し、標的タンパク質に対する選択性を向上させることは非常に重要な課題である。申請者は、ラベル化選択性を向上させるためラベル化プローブの反応性を低減させる一方で、ペプチドタグの反応性を向上させる戦略が有効であると考え、従来よりも高い反応性を示すペプチドタグの人工デザインに取り組んだ。本研究では、まず求核反応にあずかるタグ上のシステイン残基の pKa を低下させ高反応性のチオレートアニオンをペプチド上に発生させることを主なデザイン戦略とした。この目的を達成するため α -ヘリックス型の新たなペプチ

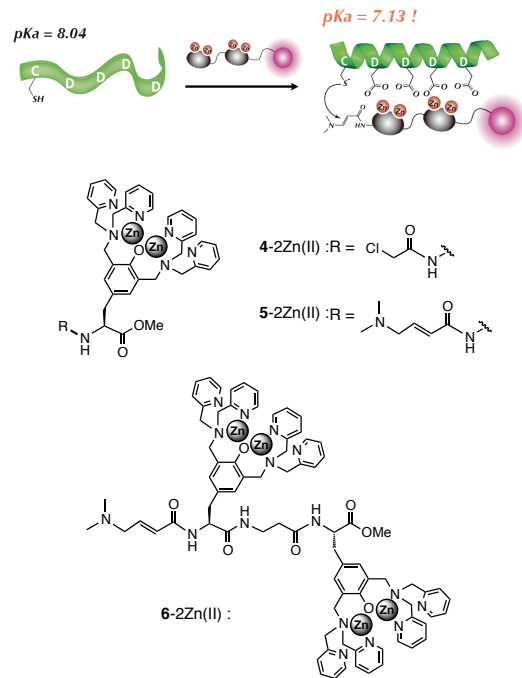


図4. ヘリックス D2 タグ導入タンパク質の Zn(II)-DpaTyr 型プローブによる共有結合ラベル化

ドタグ KKCPYSDAADAAADAAAD をデザインした。本ペプチドは、Zn(II)-DpaTyr のダイマー型亜鉛錯体と K_d にして 20 nM 程度の非常に高い親和性で相互作用する事を蛍光滴定法により明らかとした。さらに、プローブと相互作用した状態でのシステインチオール の pKa は 7.13 となり、通常のシステイン残基の持つ pKa 値 (約 8.5 程度) よりもはるかに低い値となった。この pKa の低下に連動して本ペプチドの反応性は高く、これまでに開発した D4 タグ系のペプチドタグに比べて 6 倍以上の高い反応性を示しことを明らかとした。一方で、ラベル化プローブに関しては、様々な反応性基を有するプローブを合成し、KKCPYSDAADAAADAAAD ペプチドとの反応性を比較したところ、ジメチルアミノ基を有するマイケルアクセプター 5-2Zn(II) (初速度 $V_o = 2.10 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}\text{M}$, $t_{1/2} = 3.98 \text{ hr}$) が、従来の α -クロロアセチル型プローブ 4-2Zn(II) ($V_o = 39.8 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}\text{M}$, $t_{1/2} = 0.2 \text{ hr}$) と比較して穏やかな反応性を示すことを見いだした。以上の検討により見いだした KKCPYSDAADAAADAAAD ペプチドとダイマー型のマイケルアクセプタープローブ 6-2Zn(II) との反応は、円滑に進行し、その反応初速度 $V_o = 2.24 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}\text{M}$, $t_{1/2} = 3.0 \text{ hr}$ であった。

3) タンパク質ラベル化のための新しい蛍光色素ならびにリンカー分子の開発についての成果: タンパク質型の蛍光バイオセンサー

デザインに有用な新しい蛍光プローブとして水と平衡を有する芳香族トリフルオロアセチル基を有する新たなクマリン型蛍光色素 **7** を合成した。**7** が水溶液中において、ケト型およびケタール型の二つの水と平衡状態を持つことは ^1H および ^{19}F -NMR 測定によって確認を行った。また、**7** の分光学的特性について評価を行ったところ、(1) 溶媒の組成の種類など周囲の環境に応じてケト型-ケタール型の比率を変化させる事、(2) ケト型およびケタール型でそれぞれ異なる蛍光波長の発光を示す事を明らかにした。現在、この蛍光色素をタンパク質上に導入するため、システインとの反応性基としてマレイミド基を有するプローブの合成を完了している。今後、この用いたタンパク質のバイオセンサー化について検討を進めて行く予定である。

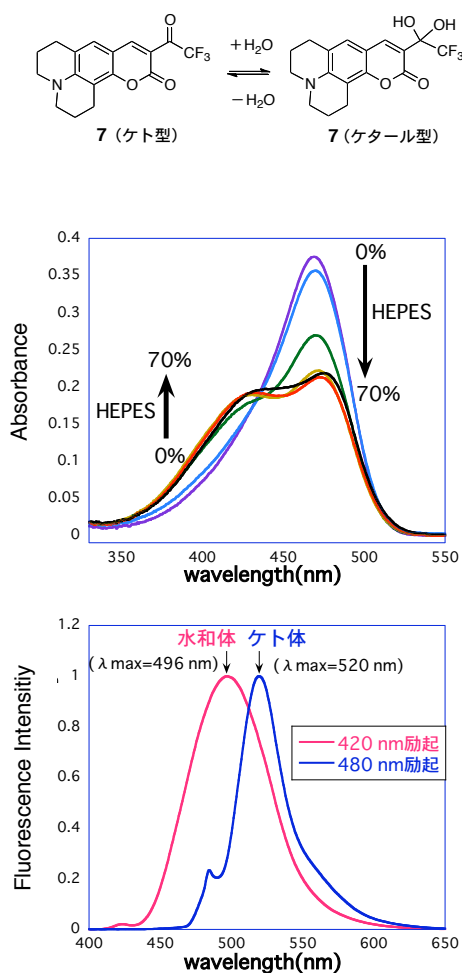


図5. 水と平衡により蛍光特性を変化させるクマリン型蛍光プローブ

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 8 件)

H. Nonaka, S. Fujishima, S. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, Selective Covalent Labeling of Tag-Fused GPCR Proteins on Live Cell Surface with a Synthetic Probe for Their Functional Analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9301-9309 (2010)

王子田 彰夫、野中 洋、浜地 格、小分子プローブを用いたタンパク質ラベル化法の新展開、*バイオサイエンスとインダストリー*、**68**、194-197 (2010)

A. Ojida, S. Fujishima, K. Honda, H. Nonaka, S. Uchinomiya, I. Hamachi, Binuclear Ni(II) complex as a High Affinity Probe for an Oligo-Aspartate Tag Tethered to Proteins, *Chem. Asian J.*, **5**, 877-886 (2010)

王子田 彰夫、小分子プローブによるタンパク質ラベル化法、*ぶんせき*、275-281 (2011)

S. Fujishima, H. Nonaka, S. Uchinomiya, Y. A. Kawase, A. Ojida, I. Hamachi, Design of a multinuclear Zn(II) complex as a new molecular probe for fluorescence imaging of His-tag fused proteins, *Chem. Commun.*, **48**, 594-596 (2012)

M. Bhuyan, E. Katayev, S. Stadlbauer, H. Nonaka, A. Ojida, I. Hamachi, B. König, Rigid Luminescent Bis-Zinc(II)-Bis-Cyclen Complexes for the Detection of Phosphate Anions and Non-Covalent Protein Labeling in Aqueous Solution, *Eur. J. Org. Chem.*, 2807-2817 (2012)

S. Fujishima, R. Yasui, T. Miki, A. Ojida, I. Hamachi, Ligand-Directed Acyl Imidazole Chemistry for Labeling of Membrane-Bound Proteins on Live Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3961-3964 (2012)

S. Uchinomiya, H. Nonaka, S. Wakayama, A. Ojida, I. Hamachi, In Cell Covalent Labeling of Reactive His-tag Fused Proteins, *Chem. Commun.*, *in press*

[学会発表] (計 1 2 件)

王子田 彰夫、タグ・小分子プローブペアを用いたタンパク質の特異的ラベル化、第3回若手ネットワークシンポジウム、平成22年6月4日、名古屋

王子田 彰夫、タグ・小分子プローブペアを用いたタンパク質の特異的ラベル化、九州大学大学院薬学研究院合同セミナー、平成 22 年 7 月 5 日、九州大学

王子田 彰夫、生体機能を解き明かす小分子プローブの開発、九州薬科学研究教育連合主催 平成 22 年度大学院生合宿研修、平成 22 年 7 月 23 日、九州地区国立大学 九重共同研修所

王子田 彰夫、野中 洋、浜地 格、タグ・小分子プローブペアを用いたタンパク質の特異的ラベル化、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、平成 22 年 9 月 24 日、大阪大学豊中キャンパス

王子田 彰夫、生体機能を探る機能性蛍光プローブの開発、第 7 回歯工学連携講演会、平成 22 年 11 月 2 日、九州工業大学(北九州市)

王子田 彰夫、野中 洋、浜地 格、タグ・小分子プローブペアを用いたタンパク質の特異的ラベル化の新展開、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 26 日、神奈川大学横浜キャンパス

王子田 彰夫、小分子プローブによるタンパク質の特異的ラベル化技術の開発、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 29 日、ツインメッセ静岡 (静岡市)

Akio Ojida, Selective Labeling of Cell Proteins Using a New Peptide Tag-Probe Pair, The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, 2011. 10. 28, Kyushu Institute of Technology

王子田 彰夫、タグ・小分子プローブペアを用いた膜タンパク質受容体の特異的ラベル化、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 30 日、北海道大学

王子田 彰夫、タンパク質機能化のためのケミカルバイオロジー研究、九州地区高分子若手研究会・夏の講演会、平成 24 年 6 月 29 日、北九州

Akio Ojida, Coordination Chemistry-Based Selective Labeling of Cell Proteins Using Small Molecular Probes, 錯体化学会第 62 回討論会、平成 24 年 9 月 22 日、富山

王子田 彰夫、タンパク質機能解析のための特異的ラベル化法の開発、第一回バイオイメージングセミナー、平成 24 年 12 月 21 日、九州工業大学 (飯塚)

〔図書〕 (計 1 件)

王子田 彰夫、浜地 格、生命現象を理解する分子ツール 第 6 章 タンパク質機能解析のための特異的タンパク質ラベル化法 (47-53 ページ) (化学同人)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号 : 10343328

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :