

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08237

研究課題名（和文）垂鉛イオンの特性を利用した不安定リン酸化シグナルの蛍光分析法

研究課題名（英文）Fluorometric analysis of unstable phosphorylated biomolecules

研究代表者

小池 透 (Koike, Tohru)

広島大学・医系科学研究科（薬）・教授

研究者番号：90186586

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）： 蛍光性置換基を有するフォスタグ誘導体と不安定リン酸化基質分子を組み合わせた新しいリン酸化シグナルの簡便な蛍光分析法を開発した。マイクロモル濃度以下のリン酸化生体分子を、生理条件下で選択的に捕捉する低分子垂鉛錯体化合物を用いて、生体機能制御を担う不安定なリン酸化シグナル分子の蛍光分析が可能である。その研究手法は、現在汎用されているリン酸化シグナルの分析法（放射性同位体法やリン酸化分子の抗体を用いる方法）と比較して、高精度かつ迅速な定量解析を可能にし、簡便な操作性や安全性などの利点をもつオリジナルな分析技術である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロモル濃度以下のリン酸化生体分子を生理条件下で選択的に捕捉する低分子垂鉛錯体化合物を用いて、生体機能制御を担う不安定なリン酸化シグナル分子の蛍光分析法を開発した。その研究手法は、現在汎用されているリン酸化シグナルの分析法（放射性同位体法やリン酸化分子の抗体を用いる方法）と比較して、高精度かつ迅速な定量解析を可能にし、簡便な操作性や安全性などの利点をもち、癌やアルツハイマーなどの治療薬や次世代の抗菌薬の開発に役立つオリジナルな分析技術である。

研究成果の概要（英文）： By utilizing an original fluorometric method using Phosphate-capturing molecules, Phos-tag derivatives, we have developed convenient and reliable protocols for high-throughput analysis of phosphorylation status of unstable kinase or phosphatase substrates. We extended the fluorescent Phos-tag dye technology to profiling of histidine kinase inhibitors. A search for new antibacterial targets is essential to combat the increasing development of drug resistance among bacterial pathogens. We believe that our Phos-tag technology will result in great progress in phosphoproteomics and drug development.

研究分野：医薬分子機能科学

キーワード：リン酸化タンパク質 フォスタグ技術 蛍光分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

個々のタンパク質の機能を明らかにし、複雑な生命現象を制御するシグナル分子群の全体像の解明は、次世代の重要な研究課題である。なかでも、可逆的リン酸化をスイッチとするタンパク質の機能解析は、癌やアルツハイマー病などの原因究明、治療薬の開発、個別化診断・治療にとって極めて重要である。プロテインキナーゼ(ヒトでは500種類以上)が触媒となるタンパク質のリン酸化反応は、時間的および空間的に変化する動的な生体機能調節機構である。それゆえに、全てのタンパク質のリン酸化を解析して初めてその全体像が明らかになるのであり、複数の研究法から得た多くの知見から総合的に理解することが重要である。セリン、スレオニン及びチロシンの水酸基がリン酸化されたタンパク質は、ある程度の化学的安定性を持つため、質量分析や電気泳動法などの既存の分析法が適用可能な化学種である。一方、不安定な(抗体を作製しにくい)生体内リン酸化種として、システイン(チオール基)、アルギニン(グアニジン基)、アスパラギン酸(カルボン酸基)、ヒスチジン(イミダゾール基)がリン酸化されたものが知られている。たとえば、アスパラギン酸やヒスチジンがリン酸化されたタンパク質は、細菌の環境変化応答シグナル伝達を担うものであり、次世代の抗菌薬のターゲットとして注目を集めている。それら不安定なリン酸化シグナル分子群の研究には、従来技術である放射性同位体法(同位体元素の放射線を使う方法)などの研究ツールに加え、それらとは異なる視点で信頼性の高い情報が得られる簡便な分析技術が求められている。

研究代表者は、亜鉛を必須とする酵素(亜鉛酵素)がアニオン性の基質を捕捉する機能を持っていることに注目して、低分子亜鉛化合物の機能に関する研究を行ってきた。その研究成果の1つに「脱リン酸化酵素(アルカリフォスファターゼ)の亜鉛二核錯体構造が、基質であるリン酸化化合物を特異的に捕捉するために必須である。」という発見がある。その化学的事実を基礎として、生理条件下(pH 7, 室温)で選択的にリン酸イオンを捕捉するタグ分子(フォスタグ)を開発した。フォスタグ(二核亜鉛錯体)は、カルボン酸イオンに対し10000倍以上のリン酸イオン親和性があり、しかも基質リン酸基の安定化能(加水分解を阻害する性質)を持っている。

国内外において、リン酸化化合物と亜鉛イオンの溶液内相互作用を化学的に追求し、その成果を実用的なリン酸化プロテオーム解析技術へ応用する研究は、研究代表者のグループ以外ではほとんど行われていない。これまでに、5種類のフォスタグ誘導体:リン酸化分子の質量分析増感剤、リン酸親和性アガロースゲル、リン酸化分子の化学発光検出剤、リン酸親和性電気泳動用アクリルアミド、リン酸親和性磁気ビーズを実用化している。それらはリン酸化物質を分解することなく濃縮・分離したり、検出したりできるオリジナルなリン酸化プロテオーム解析用試薬である。たとえば、フォスタグ電気泳動法を用いるとアスパラギン酸やヒスチジンがリン酸化されたタンパク質も分離定量することができる。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光性(または消光性)置換基を有するフォスタグ誘導体と不安定リン酸化基質分子を組み合わせた新しいリン酸化シグナルの簡便な蛍光分析法を開発する。マイクロモル濃度以下のリン酸化生体分子を、生理条件下で選択的に捕捉する低分子亜鉛錯体化合物を用いて、生体機能制御を担う不安定なリン酸化シグナル分子の蛍光分析法の確立を目的とする。その研究手法は、現在汎用されているリン酸化シグナルの分析法(放射性同位体法やリン酸化分子の抗体を用いる方法)と比較して、高精度かつ迅速な定量解析を可能にし、簡便な操作性や安全性などの利点をもち、癌やアルツハイマーなどの治療薬や次世代の抗菌薬の開発に役立つオリジナルな分析技術である。

### 3. 研究の方法

(1) 光安定性が高く、量子収率が大きく、水溶性の高い蛍光性官能基(TAMRA や Cy3 など)をアミド結合でつないだフォスタグ誘導体の合成法を確立するために、新規化合物の最適な合成条件、化学構造、純度、溶解性、蛍光量子収率、蛍光ならびに可視吸収特性、酸解離定数、錯体安定性を検討した。

(2) 新規フォスタグ誘導体と蛍光性リン酸化基質との蛍光応答条件を最適化した後、キナーゼ反応(Abl キナーゼやヒスチジンキナーゼ)に依存したリン酸化量変化の分析条件を検討した。たとえば、5-TAMRA(5-カルボキシテトラメチルローダミン)をフォスタグとリン酸化基質の両方の置換基として選択した場合、それらは、蛍光性を持っているが、近接すると2つのTAMRA間で互いに大きな消光(>90%)が期待されるのでリン酸化シグナルの変化を効率よく測定できる。さらに、それらTAMRA誘導体は、等モル水溶液を調製し易い利点がある。非酵素反応によるリン酸基の加水分解反応も解析する。他の蛍光性官能基の組み合わせも検討した。

(3) 不安定リン酸化サンプルとして、大腸菌のヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレータータンパク質の組み合わせを調製する。大腸菌のタンパク質合成系と研究室所蔵のプラスミドに組み込んだ28種類の遺伝子を使用し、それらの精製タンパク質を用意した。レスポンスレギュレーター(基質)は5-TAMRA-NHSエステルで蛍光標識する。ペプチド基質が利用できるものは、レスポンスレギュレーターのリリン酸化部位(Asp)近傍のペプチドを受託合成し蛍光標識したものを使用した。また、創薬や病態診断分野で注目されているヒスチジンキナー

ゼとその基質を用いたリン酸化シグナル解析の検討も行った。本研究で開発する蛍光分析法により、キナーゼ阻害剤や遺伝子発現制御物質のシーズ探索が可能になると考えて研究を進めた。また、マイクロプレートやマイクロビーズなどの固相に蛍光性リン酸化ペプチド基質を固定化した分析試料を調製することにより、ハイスループットな阻害剤のスクリーニングシステムの構築を目指した。さらに、ゲル内に固定化した、不安定リン酸化タンパク質の蛍光定量分析についても検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 平成 29 年度：可視光領域の蛍光分析が可能なテトラメチルローダミン(TAMRA)をもつリン酸化分子捕捉分子を用いた 2 種類の蛍光分析法の開発に成功した。アルカリホスファターゼ(ALP)は、リン酸化合物の加水分解反応やリン酸基転移反応を促進する生体内機能性分子である。本研究では、ピロリン酸を基質とする ALP 活性の新規蛍光分析法を開発した。リアルタイム分析では、初期蛍光強度変化より ALP 濃度に依存した加水分解速度の増加を確認できた。また、ALP アイソザイム分析では、活性阻害評価によるアイソザイム特異性の分析にも有用であることを明らかにした。次に、リン酸化アスパラギン酸含有不安定リン酸化タンパク質の電気泳動では、泳動後の染色などの処理によりリン酸基が加水分解除去される問題がある。本研究では、生理 pH 条件下数時間程度でリン酸化タンパク質の蛍光染色を可能にする手法を開発し、その手順を公開した。その手法は、蛍光染色分子として TAMRA-Phos-tag を使用し、染色と脱色の 2 つの操作をそれぞれ 1 時間で行うことが可能であり、10  $\mu\text{g}$  以上のリン酸化タンパク質を選択的に定量分析できる。

(2) 平成 30 年度：可視光領域の蛍光分析が可能な励起波長/蛍光波長をもつ 3 種類の新規リン酸化分子捕捉機能を有する機能性分子(Phos-tag Yellow, Phos-tag Magenta, Phos-tag Cyan)を合成した。それら蛍光性 Phos-tag を用いて、短時間でリン酸化タンパク質の蛍光検出を可能にする分析手法(電気泳動ゲル染色と限外濾過膜固定化リン酸化タンパク質の蛍光検出)の開発に成功した。リン酸化アスパラギン酸やリン酸化ヒスチジンを有する不安定リン酸化タンパク質の電気泳動では、泳動後の染色処理によりリン酸基が加水分解除去される問題がある。本研究により、ゲル内に固定化した不安定なリン酸化種も生理 pH かつ 2 時間以内で選択的に検出できる実用的なプロトコルが作成できた。蛍光性 Phos-tag を用いたその手法は、1  $\mu\text{g}$  以上のリン酸化タンパク質を検出できる。3 種類の蛍光性 Phos-tag は、汎用されている蛍光イメージアナライザーが利用可能であり、特殊な分析機器の開発の必要はない。可視領域に吸収や蛍光を有する阻害剤の開発においても、それら 3 種類の蛍光性 Phos-tag があれば十分対応可能と考えている。ただし、新しく開発した蛍光色素は、水溶性が低いので、水溶性の同族色素のデザインについて調査検討を行った。

(3) 平成 31 年度：新規 Phos-tag 誘導体として開発した 3 種類のリン酸基選択的蛍光試薬を用い、実用的な不安定リン酸化種の蛍光分析方法を開発した。新しくデザインした、水溶性の sulfoCy3 色素をつけた Phos-tag 誘導体の合成法を確立した。その蛍光色素は、これまでの蛍光性 Phos-tag よりも格段に水溶性が高く、疎水性メンブレンに固定化したリン酸化タンパク質の染色も適用可能であった。さらに、注目されている病原性微生物の環境応答に関連したヒスチジンリン酸化反応やその下流のアスパラギン酸リン酸化反応の迅速な検出を行うため、His/Asp-リン酸化タンパク質をメンブレン上に固定化した試料を Phos-tag 蛍光試薬でリン酸基選択的に染色する分析プロトコルを作成した。この方法により、ヒスチジンキナーゼ系の阻害剤や遺伝子発現制御物質のシーズ探索が可能になると考えている。また、その手法は、マイクロプレート法やマイクロビーズ法への応用も可能であり、固相に蛍光性リン酸化ペプチド基質を固定化した分析試料を調製することにより、ハイスループットな阻害剤のスクリーニングシステムへ展開できる。今後、このオリジナルな蛍光分析法を様々な不安定リン酸化基質を用いた新しいキナーゼ・フォスファターゼのプロファイリング法としての実用化を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 H. Kusamoto, A. Shiba, M. Tsunehiro, H. Fujioka, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike	4. 巻 47
2. 論文標題 A simple method for determining the ligand affinity toward a zinc-enzyme model by using a TAMRA/TAMRA interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 1841-1847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C7DT04364C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, S. Ueda, Y. Ino, Y. Kimura, H. Hirano, and T. Koike	4. 巻 1867
2. 論文標題 Increase in constitutively active MEK1 species by introduction of MEK1 mutations identified in cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BBA - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 62-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2018.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Shiba, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and Tohru Koike	4. 巻 17
2. 論文標題 TAMRA/TAMRA fluorescence quenching systems for the activity assay of alkaline phosphatase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1877-1888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s17081877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 E. Tianfei Yuan, Y. Ino, M. Kawaguchi, Y. Kimura, H. Hirano, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and Tohru Koike	4. 巻 38
2. 論文標題 A Phos-tag-based micropipette-tip method for rapid and selective enrichment of phosphopeptides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 2447-2455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elps.201700175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草本 寛, 西村 朋世, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透
2. 発表標題 リン酸化タンパク質特異的ゲル蛍光染色
3. 学会等名 日本電位泳動学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草本 寛, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透
2. 発表標題 Phosphorylated protein specific fluorescent gel stain using a TAMRA-Phos-tag
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芝 晃生, 木下恵美子, 木下英司, 小池 透
2. 発表標題 蛍光クエンチングを用いる脱リン酸化酵素活性の新規蛍光分析法の開発
3. 学会等名 日本電気泳動学会第68回総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小池 透
2. 発表標題 金属配位結合を利用したプロテオミクス
3. 学会等名 日本電気泳動学会第68回総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 草本 寛, 芝 晃生, 常弘昌弥, 藤岡晴人, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透
2. 発表標題 亜鉛酵素モデルに対するリガンドの親和性を解析する新規分光分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芝 晃生, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透
2. 発表標題 蛍光クエンチングを用いるアルカリホスファターゼ分析の新規蛍光分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下英司, 木下恵美子, 江口陽子, 五十嵐雅之, 岡島俊英, 内海龍太郎, 小池 透
2. 発表標題 Phos-tag蛍光ゲル染色剤を用いたバクテリア2成分系シグナリングの定量モニタリング
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----