

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05319

研究課題名(和文) ターンオン蛍光を伴う部位特異的リジン修飾、クロスリンク形成と蛋白質研究への応用

研究課題名(英文) Turn-on fluorescent labeling of target protein at a specific lysine residue and formation of protein cross-link with fluorescence for their application to protein studies

研究代表者

麻生 真理子 (Aso, Mariko)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：30201891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の相互作用検出への応用を目的に、標的蛋白質のリジン残基を、周囲の環境をモニターする蛍光基に変換する修飾分子の開発を行った。核酸部を結合したリジン修飾分子を用いて、核酸結合性標的蛋白質のリジン残基の蛍光基への変換に成功した。核酸の結合の有無により、蛍光強度の変化がみられることを確認した。蛍光基の構造修飾を行い、安定性が向上した蛍光分子を得た。また、新規有用蛋白質創出を目指し蛍光と有用な機能を同時に蛋白質に導入する分子の開発を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したリジン修飾分子は蛋白質親和性の核酸部をもち、標的蛋白質に結合し、緩やかな条件でリジン残基を環境応答型蛍光基に変換することができた。修飾蛋白質は核酸の結合の有無により、蛍光強度の変化がみられることが分かり、蛋白質相互作用の検出する分子設計の妥当性を示した。また安定性が向上した蛍光分子や異なる物性を持つ蛍光分子を見出し、これらを生成する修飾分子の合成法を確立した。これらの成果により本手法を用いた蛋白質修飾の更なる展開が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We investigated new molecules which convert lysine residue in target protein into environment sensitive fluorophore and provide fluorescent-labeled proteins to monitor protein interaction. Fluorescent labeling of nucleic acid binding protein proceeded with the molecule carrying nucleic acid. Difference in fluorescence intensities was observed between modified proteins in the free and DNA bound forms. Introduction of substituents into fluorophore provided new molecules and fluorophore more stable than the original compound was obtained. We also studied molecules which convert lysine into fluorophore with other functions.

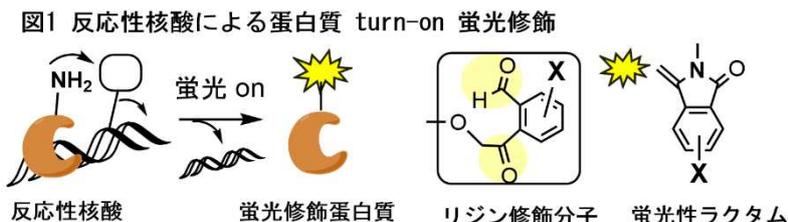
研究分野：生体分子関連化学

キーワード：リジン修飾 環境応答型蛍光 反応性核酸

### 1. 研究開始当初の背景

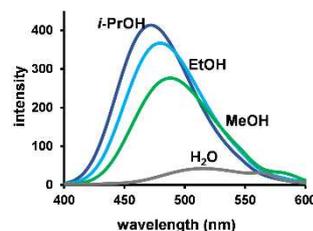
環境応答型蛍光基による蛋白質修飾は蛍光の変化を指標として、蛋白質の相互作用検出、阻害剤探索を可能にする。リジン残基は修飾に適した高い反応性を持つが、不均一で選択性のない修飾は有用な情報を得にくい。そのため、標的蛋白質中の特定のリジン残基の環境応答型蛍光基による修飾は重要な課題であった。また高い修飾確率を期待してリジン修飾による蛋白質間、DNA-蛋白質クロスリンク形成が注目され、分子間相互作用研究に活用されていた。特定のリジン残基に蛍光を伴いクロスリンク形成できれば、クロスリンク形成の検出、相互作用検出など多くの利点を持つと考えた。

我々はリジン残基を蛍光性ラクタム、3-メチレンイソインドリン-1-オンに変換する修飾分子を開発し、これを核酸分子に結合した反応性核酸を用いて、核酸配列に結合する標的蛋白質中、近接するリジン残基を蛍光基に効率よく変換することに成功していた (図1)。



この修飾反応は緩やかな条件で進行し天然の蛋白質への応用が可能であり、無蛍光の反応性核酸との反応で生成する修飾蛋白質だけが蛍光を持つターンオン蛍光修飾という利点があった。また修飾に伴い核酸部分が脱離するという特徴を持つ。3-メチレンイソインドリン-1-オンはペプチド、核酸などの蛍光修飾に用いられるフタルイミドの炭素同族体であり、フタルイミドと類似の蛍光性を持ち、加水分解されにくい長所があることを見出した。導入する置換基により環境応答型蛍光基となり (図2)、標的蛋白質の環境応答型蛍光基による修飾に応用可能であった。そこでリジン修飾により蛍光応答型 3-メチレンイソインドリン-1-オンを生成する修飾分子の合成を行い、蛋白質修飾への応用を計画した。また構造修飾により導入した置換基への結合を介して、リジン修飾分子また、蛍光分子に蛋白質や DNA、有用な機能の導入が可能であると予想した。蛋白質間、DNA-蛋白質クロスリンク形成と蛍光修飾を同時に達成するリジン修飾への応用が期待できた。

**図2 誘導体の環境応答型蛍光**



### 2. 研究の目的

リジン残基の新規環境応答型蛍光基への変換を利用した、ターンオン蛍光を伴う部位特異的リジン修飾と修飾蛋白質を用いた蛋白質相互作用検出、リジン修飾による蛍光を伴うクロスリンク形成反応の開発と蛋白質研究への応用を目的とする。リジン残基を3-メチレンイソインドリン-1-オンに変換する修飾分子を合成し、これを蛋白質結合配列を持つ核酸に結合し、反応性核酸とする。これを用いて標的蛋白質の蛍光修飾を行う。リジン残基は溶バトクロミック蛍光、またESIPT (Excited state intramolecular proton transfer、励起状態分子内プロトン移動) により環境に応じて蛍光が変化する3-メチレンイソインドリン-1-オンへの変換を行う。大腸菌 DNA 複製開始に関わる蛋白質、DnaAの結合配列を持つ核酸を修飾分子に結合し、これをDnaAのDNA結合ドメイン、DnaAと反応する。これにより、反応性核酸結合部位に近接するリジン残基の修飾を行う。導入した蛍光分子の蛍光の変化により蛋白質の相互作用が検出可能か検討し (図3)、本手法による蛋白質蛍光修飾、相互作用検出のための蛍光分子の設計を評価する。構造修飾により3-メチレンイソインドリン-1-オンにさらに置換基を導入し、蛍光修飾と同時に有用な機能を導入可能なリジン修飾分子を開発する。蛋白質間、DNA-蛋白質クロスリンク形成 (図4) に応用する。

**図3 蛍光変化による蛍光修飾蛋白質の相互作用検出**



**図4 蛍光性DNA-蛋白質クロスリンク**



### 3. 研究の方法

#### 1) 環境応答型蛍光基を用いた蛋白質修飾と蛍光による蛋白質相互作用検出

先行研究の手法を用いて、リジン残基を環境応答型蛍光を示す 3-メチレンイソインドリン-1-オンに変換する修飾分子を合成する。中性条件下、リジン残基のモデルとなるアミン分子の修飾反応を行い、蛍光性 3-メチレンイソインドリン-1-オンの生成効率を調べる。リジン修飾分子の

オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) への導入、合成した反応性核酸のアミン修飾効率を調べた後、反応性核酸を用いた標的蛋白質、DnaA の DNA 結合ドメイン、DnaA の修飾を行う。質量分析を用いて、修飾蛋白質の修飾部位、修飾効率を決定する。修飾蛋白質の蛍光を測定し、蛍光特性を調べ、また相互作用する分子との結合により蛍光が変化するか調査する。

## 2) 蛍光を伴うクロスリンク形成反応の開発

DNA-蛋白質クロスリンク、蛋白質-蛋白質クロスリンク形成に用いるリジン修飾分子の合成を行う。DNA や蛋白質への接続のための置換基をリジン修飾分子のベンゼン部分に導入する。中性条件下、アミン分子との反応を行い、蛍光性 3-メチレンイソインドリン-1-オンの生成及びその生成効率を調べる。また、リンカー部を持つ生成物の蛍光性、安定性など物性を調べ、先行研究で蛋白質修飾に用いた蛍光分子と比較する。その後、DNA-蛋白質クロスリンクへの応用のため、リジン修飾分子への核酸部の導入、蛋白質修飾への応用を検討する。

## 4. 研究成果

### 1) リジン残基をソルバトクロミック蛍光基に変換する修飾分子と反応性核酸の合成と反応性評価

アミン分子をソルバトクロミック蛍光を示す 3-メチレンイソインドリン-1-オンに変換する修飾分子を合成し、有機溶媒を含む中性の緩衝液中アミンとの反応を検討した。期待した蛍光生成物が 60%程度の収率で得られた。次に、修飾分子をオリゴデオキシヌクレオチドに導入した反応性核酸を合成した。モデル反応として反応性核酸に導入した修飾分子と接近可能な位置にアミノ基を導入した相補鎖と反応性核酸との反応を行ったところ、アミノ基を導入した相補鎖の消失に伴い、蛍光性核酸が新たに生成した。質量分析により、相補鎖に導入したアミノ基が 3-メチレンイソインドリン-1-オンに変換されたことが示唆された。また蛍光性核酸の蛍光スペクトルは中性付近のバッファー中 500 nm 付近に蛍光極大を示した。これらの結果はリジン修飾分子に近接するアミノ基の蛍光修飾が期待通り進行することを示唆した。

### 2) 標的蛋白質の蛍光修飾

大腸菌 DNA 複製開始に関わる蛋白質、DnaA の結合配列をもつ核酸を修飾分子に結合した反応性核酸を合成し、二本鎖を形成したのち、DnaA の DNA 結合ドメインとの反応を行った。反応液を 362 nm で励起し、蛍光スペクトルを測定したところ 500 nm 付近の蛍光強度の増加がみられ、リジン残基の蛍光修飾が示唆された (図 5)。

修飾蛋白質は脱離した核酸との結合型、非結合型の両方で存在する可能性があったため、反応液に DNase を加え、核酸を分解したところ、蛍光強度がさらに増加し、核酸非結合型の修飾蛋白質のほうが強い蛍光を示す可能性が示唆された。

蛍光変化を精査するため、修飾蛋白質の精製、単離を検討したが、今のところ成功していない。また LC-MS を用いた未精製の修飾蛋白質の構造解析、修飾蛋白質の酵素消化により生成する蛍光性ペプチドを用いた修飾部位、修飾効率の決定も困難であった。修飾に用いた蛍光分子の安定性が高くないことが修飾蛋白質研究を困難にする要因の一つと考えた。低分子アミンから合成した蛍光分子を用いて、pH 6, 7, 8 の緩衝液中 25 °C、37 °C で安定性を評価したところ、徐々に無蛍光の分子に変化することが分かった。酸性条件、また温度が高いほうが無蛍光分子への変化が速いことが分かった。これらの結果から蛍光分子の構造修飾を行い、安定性を向上した誘導体の合成を検討した (研究成果 5))。

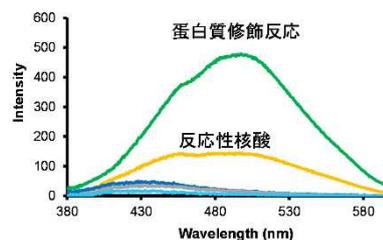
### 3) その他のリジン修飾分子

ESIPT を介して環境応答型蛍光を示す 3-メチレンイソインドリン-1-オンにリジン残基を変換する修飾分子の合成は成功したが、1) で用いた反応条件では蛍光分子の生成収率が低くリジン修飾への応用は今のところ行っていない。1) で検討したソルバトクロミック蛍光を示す分子の生成についても用いる有機溶媒によって収率が変わることが最近明らかになった。ESIPT 蛍光分子の生成についても収率改善を検討する必要がある。また今回用いたものとは異なるソルバトクロミック蛍光を示す 3-メチレンイソインドリン-1-オンを生成する修飾分子の合成は検討の途上である。

### 4) 反応性核酸を用いた蛍光を伴うクロスリンク形成反応の開発

2) の蛋白質蛍光修飾に用いた蛍光基にクロスリンク形成のためのリンカー部としてヒドロキシメチル基をベンゼン環に導入した誘導体を考案し、この誘導体をアミンとの反応により生成する修飾分子の合成を行った。リジン修飾分子の合成に成功し、これを用いて中性条件下アミンとの反応を行ったところ、リンカー部をもつ蛍光分子が得られた。アミンとの反応効率はリンカー部のないものと同程度であった。生成した分子の蛍光を測定したところ、測定溶媒により蛍光の変化が見られた。極性の低い非プロトン性溶媒中では蛍光強度はリンカー部のないものと同程度であったが、水、アルコールといったプロトン性溶媒中での蛍光は弱かった。水中での励

図 5 蛋白質蛍光修飾反応の蛍光スペクトル



起状態の最安定構造を計算したところ、TICT (twisted intramolecular charge transfer) が起こるような構造を取ることが示唆された。TICT が起こると蛍光が弱まるという先行研究 (Zuら、*J. Am. Chem. Soc.*, 2016) があり、今回の分子では TICT が起こりやすいことが弱い蛍光につながったと考えている。リンカー部の導入位置の変更に加え、置換基の変更で水中での蛍光が増強できる可能性も計算により示唆された。ベンゼン環以外へのリンカー部の導入についても検討が可能である (研究成果 5)。

#### 5) 新たな 3-メチレンイソインドリン-1-オン誘導体、リジン修飾分子の合成と評価

2) の蛋白質修飾に用いたソルバトクロミック蛍光基はオレフィン構造を持ち、水和により無蛍光の化合物への変換が予想された。そこでオレフィン部に置換基を導入した化合物を合成し、その蛍光性の精査、安定性の評価を行った。メチル基を導入した化合物の蛍光は蛋白質修飾に用いた蛍光基と同等の強度、類似の溶媒依存性を維持し、プロトン性溶媒中では溶媒の誘電率と蛍光極大波長との間には正の相関が、溶媒の誘電率と蛍光強度との間には負の相関がみられた。また安定性評価では安定性が向上していることが分かった。pH 6 の緩衝液中 37 °C で約 3 日間インキュベートしても化合物の 80%程度が残存しており、pH 7, 8 の条件はさらに多くが残存していた。次に、メチル置換体を生成する修飾分子の合成を行い、先行研究の修飾分子と同程度の効率でアミン修飾反応が進行することを確認した。これらの結果は、リジン残基のメチル置換体への変換により、安定な蛍光修飾蛋白質が得られる可能性を示した。修飾蛋白質の安定性の向上が構造解析の成功につながることを期待している。

フェニル基を導入した 3-メチレンイソインドリン-1-オンを合成し、蛍光性、物性を評価した。先行研究の蛍光基に比べてフェニル置換体の蛍光は弱いものであったが、プロトン性溶媒中溶媒の誘電率と蛍光極大波長は正の相関を示すという類似の蛍光性を示した。一方、蛍光強度も溶媒の誘電率と正の相関を示し、水中で最も強い蛍光を示すという異なる蛍光性を示した。フェニル体の蛍光についての情報を得るため、計算を行っている。pH 6, 7, 8 の緩衝液中の安定性評価では、オレフィン部への水和は観測されなかったが、上記の研究が進んだ段階でフェニル置換体は含水溶媒中非遮光条件で幾何異性化が進行することが分かった。異性化はクロロホルム、メタノールなどの溶媒中で遅く、また含水溶媒中でも遮光条件では進行しないことが分かった。フェニル置換体の物性研究についてはまだ途上であるが、スチルベン、アゾベンゼンなどの光応答性分子を参考に進め、応用について検討したい。またアミンと反応し、フェニル置換体を生成する修飾分子の合成も行い、先行研究の修飾分子と同程度の効率で修飾反応が進行することを確認した。

リジン修飾分子の合成を種々検討し、オレフィン部を修飾した 3-メチレンイソインドリン-1-オンの合成が可能となった。特徴ある蛍光や物性を持つ新規分子の創出につながると考えている。またオレフィン部の修飾は 4) のクロスリンク形成に必要なリンカー部の導入についても応用可能である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimoda Kazuma, Mitsuoka Takahiro, Ueda Kenta, Suemune Hiroshi, Hirai Go, Aso Mariko	4. 巻 59
2. 論文標題 Synthesis of dendritic bisphosphonates as bone targeting ligands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 4528 ~ 4531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2018.11.028	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 Takeru Araki, Yasufumi Fuchi, Shuhei Murayama, RyomaShiraishi, Tokimi Oyama, Mariko Aso, Ichio Aoki, Shigeki Kobayashi, Ken-Ichi Yamada, Satoru Karasawa	4. 巻 8
2. 論文標題 Fluorescence Tumor-Imaging Using a Thermo-Responsive Molecule with an Emissive Aminoquinoline Derivative	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 782-791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano8100782	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 麻生 真理子, 劉 怡萱, 阿部 由紀子, 田畑 香織
2. 発表標題 リジン残基をソルバトクロミック蛍光基へ変換する標的親和性ベンズアルデヒド誘導体の合成と評価
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 麻生真理子, 劉 怡萱, 堂園拓真, 田畑香織, 阿部由紀子
2. 発表標題 反応性核酸を用いた蛋白質ソルバトクロミック蛍光修飾-蛍光基の物性、修飾反応に及ぼす置換基の影響
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 麻生 真理子, 田畑 香織, 阿部 由紀子, 谷口 陽祐, 佐々木 茂貴
2. 発表標題 環境応答型solvatochromic蛍光分子で修飾したDNA結合性蛋白質の評価
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉怡萱, 阿部由紀子, 麻生真理子
2. 発表標題 反応性核酸を用いた蛋白質蛍光修飾法の開発-構造、物性、反応性相関の検討-
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堂園拓真, 金城綾香, 阿部由紀子, 麻生真理子
2. 発表標題 DNA-蛋白質クロスリンク形成に応用可能な反応性核酸の開発
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部 由紀子, 劉 怡萱, 麻生 真理子
2. 発表標題 反応性核酸を用いた蛋白質のTurn-on型蛍光修飾法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 麻生 真理子, 金城 綾香, 田畑 香織, 阿部 由紀子, 谷口 陽祐, 佐々木 茂貴
2. 発表標題 反応性核酸を用いた環境応答型solvatochromic蛍光分子の蛋白質への導入と修飾蛋白質の評価
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 麻生真理子、金城 綾香、阿部 由紀子、谷口 陽祐、佐々木 茂貴
2. 発表標題 反応性核酸を用いた、ターンオン蛍光を伴う部位特異的リジン修飾
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Aso, Ayaka Kinjo, Yukiko Abe, Yosuke Taniguchi, Shigeki Sasaki
2. 発表標題 Labeling of DNA-interacting protein using oligodeoxynucleotides that induce solvatochromic fluorophore
3. 学会等名 The 46 th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Aso, A. Kinjo, Y. Abe, Y. Taniguchi, S. Sasaki
2. 発表標題 Synthesis and Reaction of Oligodeoxynucleotides that Induce Solvatochromic Fluorescent Lactam by Lysine Modification
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Aso, C. Gatanaga, C. Ota, G. Hirai, Y. Taniguchi, S. Sasaki
2. 発表標題 Synthesis of Oligodeoxynucleotides for Lysine Modification to Induce Solvatochromism
3. 学会等名 The 45th International symposium on nucleic acids chemistry
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関