

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19350084

研究課題名 (和文) タンパク質の一分子計測を目指した新しいプローブ分子の開発

研究課題名 (英文) Development of novel probes for single-molecule imaging of proteins

研究代表者

山本 行男 (YAMAMOTO YUKIO)

京都大学・高等教育研究開発推進センター・教授

研究者番号： 90109059

研究成果の概要：

本研究課題では筋収縮弛緩機構の解明を目指し、トロポニンCの一分子計測を可能とする新規なプローブ分子の開発を進めてきた。まず、二官能性蛍光ラベル剤の開発については、二官能基型蛍光ラベル剤 BRho および Bros を設計・合成した。HPLC や $^1\text{H-NMR}$ の解析から BRho ではカルボキシ基の向きにより水素結合様式が変化するため、物性の異なる2つのラベル化タンパク質が生成することがわかった。一方、Bros ではタンパク質結合後に一様なコンフォメーションをとることがわかり、蛍光ラベル化剤としてより優れた性質を有することがわかった。次に、タンパク質希土類蛍光ラベル剤の開発を行った。まず、非天然のアミノ酸配列 (ペプチドタグ) を特異的に認識する希土類錯体を合成した。本錯体は亜鉛イオンを介してポリアスパラギン酸と錯形成し、ペプチドタグ中のトリプトファン側鎖から希土類中心へのエネルギー移動が効率よく進行することで、希土類の発光が遅延蛍光成分として観測されることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
20年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：生体認識・機能化学、センサー

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析が終了し、昨今の生命化学分野においては、プロテオーム解析、すなわち生体内に含まれるすべてのタンパク質の構造と機能を網羅的に明らかにすることが最も重要な研究課題となっている。プロテオミクス

研究において、究極かつ本質的な情報をもたらす手法に、個々のタンパク質について動的挙動を観察する一分子計測がある。細胞内外におけるタンパク質の時間的・空間的構造変化やタンパク質間の相互作用を「分子全体の平均」としてではなく、「一分子レベル」で

解析することで、これまで予想もされてこなかった新たな情報や知見がすでに得られており、生命活動におけるタンパク質の本質的な機能が解明されつつある。このような一分子計測を達成するためには、既存の技術や化合物のみならず、何を測定対象とし、どのような手法を用いるかなど、測定の目的に応じたプローブ分子のテーラーメイド的な設計・合成が重要となってくる。これに加えて、分子プローブの特性を最大限に生かすための測定技術や手法の開発も必要となり、有機合成化学・生化学・生物物理学などの分野の垣根を越えた総合的な研究が求められる。

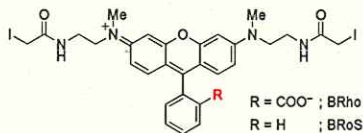
2. 研究の目的

タンパク質機能の本質を探るには、結晶構造情報を踏まえ、蛍光顕微鏡や ESR スペクトルで動的挙動を追跡することが重要である。この時、蛍光顕微鏡や ESR 測定で用いられるプローブ分子がそれぞれ蛍光ラベル剤およびスピントラベル剤である。そこで本研究では、タンパク質の一分子計測を目指した新しいプローブ分子を開発し、さらに筋収縮弛緩機構の解明へと応用することを目的とする。具体的には一分子計測用の分子プローブの具体的な例として (1) 二官能基性蛍光ラベル剤 (2) 金ナノプローブ (3) 希土類蛍光ラベル剤の開発に及ぶ。

3. 研究の方法

(1) 新規二官能基性蛍光ラベル剤の開発と TnC の一分子解析

二官能基性蛍光ラベル剤 BRho は、筋収縮弛緩機構におけるカルシウム結合ドメイントロポニン C (TnC) を効率よく蛍光ラベル化できることをこれまでの研究により示している。しかしながら、タンパク質結合時のカルボキシ基の配向の違いで分離不可能な 2 種類の構造異性体が生じてしまう問題があった。そこで本研究では、ラベル化タンパク質中における BRho の構造の詳細について検討すると共に、構造異性体が生じない、すなわちタンパク質ラベル化後のコンフォメーションが一樣となるような新規な二官能基性蛍光ラベル剤 BRos を開発し、その機能評価を行った。

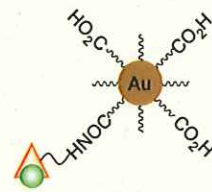


(2) Ni-NTA 修飾一官能基性金ナノプローブの新規合成手法の開拓

Ni-NTA 修飾一官能基性金ナノクラスターを合成するため、固相合成法を用いた種々の反応経路を探った。まず、一般的な固相合成でヘキサヒスチジン (His₆) を担持した樹脂を作成し、リンカーとなる NTA-Lys をニック

ルイオンを介した錯形成により結合させた。

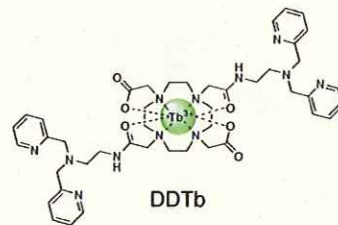
次に、金クラスターを Lys のアミノ基とカップリングさせ、一官能基性金ナノクラスターを得ようとした。



Ni-NTA一官能基性金クラスター

(3) 希土類蛍光ラベル剤の開発

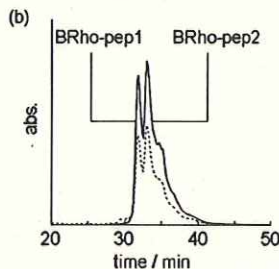
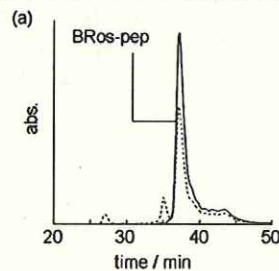
希土類イオンに対して強い錯形成を示す DOTA を骨格とし、これにタンパク質認識・結合部位として 2 つの DPA 基を導入した DDTb を合成した。次に、光を捕集し Tb³⁺ 中心にエネルギー移動させるためのアンテナ部位として、トリプトファンを挿入した新たなペプチドタグを探った。各タグ分子を固相法により合成後、HPLC で単離・精製し、MALDI-TOF により目的物の確認を行った。タグ分子と希土類錯体との錯形成の様子は、等温滴定カロリメトリー (ITC) および蛍光スペクトルで追跡し、それぞれの滴定から結合定数を決定した。



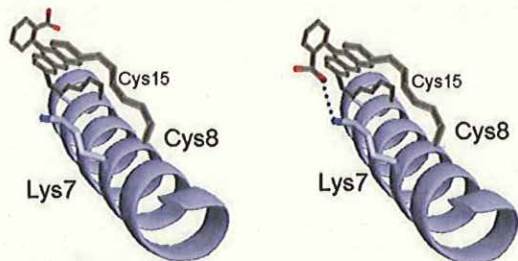
4. 研究成果

(1) 新規二官能基性蛍光ラベル剤の開発と TnC の一分子解析

TnC のモデルペプチドを用いることで、ラベル化部位のみに焦点を当て検討することが出来た。まず、BRho をラベル化したものでは、HPLC において分子量が全く同じである 2 本のピークを与え、この違いがカルボキシ基の配向の違いによるものであることを明らかにした。すなわち、ラベル化部位近傍に存在するリシン側鎖とカルボキシ基の水素結合の有無が、ラベル化タンパク質の蛍光特性や物性に大きな影響を与えることを初めて明らかにすることができた。この点を踏まえ、分子内にカルボキシ基を有していない新規二官能基性蛍光ラベル剤 BRos の開発に着手した。BRos を用いて同様の検討を行ったところ、ラベル化後

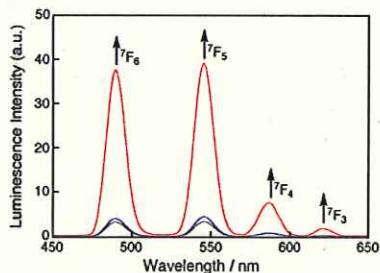


のモデルペプチドはHPLCにおいて一本のピークのみを与え、予想通り一様のコンフォメーションをとっていることが判明した。そこで次にBRosを用いてTnCの蛍光ラベル化を行った。ラベル化の確認はMALDI-TOF MSによって行った。すなわちBRosはタンパク質の二官能基性蛍光ラベル化剤としてより優れた性質を持つことがわかった。

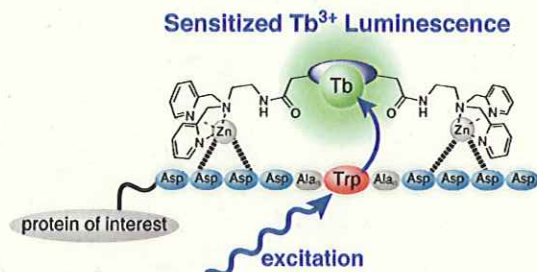


(2) Ni-NTA 修飾一官能基性金ナノプローブの新規合成手法の開拓
 上記研究手法に従って一官能基性金ナノプローブを合成しようとしたが、残念ながら成功には至らなかった。そこで、NTA 部位を含むチオールとトリエチレングリコールを含むチオールを適度な混合比で混ぜ合わせ、これを用いて金ナノ粒子の作成を行った。その結果、1つの粒子に対して7つのNTA 部位を持つ金ナノプローブが効率よく得られた。これを用いてニッケルイオンを介したトロポニンタンパク質のラベル化を行い、その様子を電子顕微鏡にて観察することに成功した。

(3) 希土類蛍光ラベル剤の開発
 DDTb は亜鉛イオンを介して、ポリアスパラギン酸を含むペプチドタグと強く錯形成することがITC測定および蛍光スペクトルを用いた滴定から明らかにした。Tb³⁺の発光強度は、Tb³⁺中心とアンテナとしてのインドール環との距離だけでなく、トリプトファン残基の周辺環境も大きく依存していることがわかった。これを確認するため、軽水中と重水中におけるTb³⁺の蛍光寿命を測定し、Tb³⁺中心に配位している水分子の数を算出した。その結果、DDDDAAWAADDDD というアミノ酸配列がDDTbに対応するペプチドタグとして最も良好な値を示すことがわかった。次に、設計したタグ配列をグルタチオントランスフェラーゼ(GST)に融合し、タグ融合タンパク質の特異的な認識が可能かどうか検討した。その結果、タグ配列を有していない細



胞破碎溶液では、希土類錯体添加時においても大きな系蛍光増大は認められなかったのに対し、タグ融合タンパク質が含まれている細胞破碎溶液では、希土類イオンの強い発光が観測された。すなわち、希土類蛍光ラベル剤へのエネルギー移動は、タグ中のトリプトファンからのみ起こっていることがわかった。



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7件)

- ① Tasuku Hirayama, Syohei Iyoshi, Masayasu Taki, Yuichiro Maeda, Yukio Yamamoto, Synthesis of a new bifunctionalised fluorescent label and physical properties of the bound form on model peptide of troponin C, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5**, 2040-2045 (2007), 査読有
- ② Shohei Iyoshi, Masayasu Taki, Yukio Yamamoto, A Rosamine-based Fluorescent Chemosensor for Selective Detection of Silver(I) in Aqueous Solution, *Inorganic Chemistry*, **47**, 3946-3948 (2008), 査読有
- ③ Masayasu Taki, Yoshiaki Kawashima, Naoko Sakai, Tasuku Hirayama, Yukio Yamamoto, Effects on Heteroatom Substitution on the Structures, Physicochemical Properties, and Redox Behavior of Nickel(II) Complexes with Pyridine-Containing Macrocyclic Ligands, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **81**, 590-597 (2008), 査読有
- ④ Tasuku Hirayama, Masayasu Taki, Yukiyasu Kashiwagi, Masami Nakamoto, Atsushi Kunishita, Shinobu Itoh, Yukio Yamamoto, Colorimetric Response to Mercury-induced Abstraction of Triethylene Glycol Ligand from Gold Nanoparticle Surface, *Dalton Transactions*, 4705-4707 (2008), 査読有
- ⑤ Masayasu Taki, Mika Desaki, Akio Ojida, Shohei Iyoshi, Tasuku Hirayama, Itaru Hamachi, Yukio Yamamoto, Fluorescence Imaging of Intracellular Cadmium Using a Dual-Excitation Ratiometric Chemosensor, *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 12564-12565 (2008), 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. 平山祐・多喜正泰・山本行男
新しいペプチドタグ結合性希土類錯体の開発
第 22 回生体機能関連化学シンポジウム,
東北大学, 2007 年 9 月 28 日
2. Tasuku Hirayama, Masayasu Taki, Yukio Yamamoto
Development of New Lanthanide Complexes
Binding to Peptide Tag
Biomimetics Conference, Doshisha, Kyoto, Japan, 2007 年 12 月 20 日
3. 平山祐・多喜正泰・山本行男
希土類錯体を用いたペプチドタグ蛍光認識システムの開発
第 21 回配位化合物の光化学討論会, 北里大学, 2008 年 8 月 4 日
4. 平山祐・多喜正泰・山本行男
蛍光性希土類錯体を用いた新しいペプチドタグプローブシステムの開発
第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム,
東京工業大学, 2008 年 9 月 20 日
5. Tasuku Hirayama, Masayasu Taki, Yukio Yamamoto
Artificial Peptide Tag Recognition by
Dinuclear Zinc Complex and Luminescence
Switching with Lanthanide Complex
The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Jeju, Korea, 2008 年 11 月 10-13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 行男 (YAMAMOTO YUKIO)
京都大学・高等教育研究開発推進センター・教授
研究者番号: 90109059

(2) 研究分担者

多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)
京都大学・大学院地球環境学堂・助教
研究者番号: 70378850