

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19350085

研究課題名(和文) 生体内リン酸アニオン種の機能解明を目指した蛍光プローブ群の創製

研究課題名(英文) Developments of Fluorescent Probes for Elucidation of Biological Functions of Phosphate Species

研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

京都大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：10343328

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内に存在するリン酸アニオン種の機能解明を目指した新規な蛍光プローブとして、1) リン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドを検出するタンパク質ハイブリッド型蛍光バイオセンサー、2) アルツハイマー病脳内に蓄積するリン酸化タウタンパク質凝集体を検出する蛍光プローブ、3) 細胞内 ATP を OFF/ON 型の蛍光応答でセンシングする蛍光プローブの開発を行った。いずれの研究においても、当初に設定した目標をほぼ達成する研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have developed the new fluorescent probes, which are useful for elucidation of biological functions of various biological phosphate species. We especially focused on the developments of the three types of the fluorescent probes, including 1) protein-based hybrid-type biosensor for phosphorylated protein/peptide, 2) molecular probe for aggregation of phosphorylated tau protein existing in brain of Alzheimer's disease, and 3) molecular probe for intracellular ATP with a OFF/ON-type fluorescence sensing mode. As the results, we have successfully achieved the probes with the desirable functions in each of the three themes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

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：蛍光プローブ、バイオセンサー、バイオイメーjing、リン酸アニオン、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、生きたままの細胞を直接可視化解析するバイオイメーjingが有用な研究手

法として注目されており、プローブ分子はこれに用いることのできる有用な分子ツールである。例えば、これまでに細胞内カルシウ

ムをはじめとして亜鉛、マグネシウムなど生体内カチオンについては実用的なレベルで有用な低分子蛍光プローブが数多く開発され可視化解析へと用いられている。一方、細胞内アニオン種に対する蛍光プローブは、カチオンセンシングと比較すると極めて未発達の状態にある。例えば、本研究をスタートした時点で、生体内で重要な役割を果たす様々なリン酸アニオン種に対する低分子型蛍光プローブを、細胞内可視化解析あるいは試験管内での酵素反応等に応用した報告例はわずか数例にすぎない状態であった。この未発達の要因の一つは、リン酸をはじめとするアニオン種を水中で強く結合可能な認識モチーフや、結合に伴って蛍光応答する蛍光センシングモードが長い間開発されなかったことにある。このような状況において我々は、リン酸アニオン種に対する新しい結合モチーフとして二核のジピコリルアミン亜鉛錯体(Dpa-Zn(II))が有効に機能することを見出した。さらに我々は、この知見を基にしてリン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドあるいはATPなどのヌクレオシドリン酸に対する蛍光プローブの開発を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では、我々のこれまで得てきた研究の知見をさらに応用的に発展させ、蛍光イメージングによるリン酸アニオン種の可視化解析を目指した高機能な新規蛍光プローブ群の開発を目指した。具体的には、1) リン酸化タンパク質・ペプチドを検出するタンパク質ハイブリッド型蛍光バイオセンサー、2) アルツハイマー病脳内に蓄積するリン酸化タウタンパク質凝集体を検出する蛍光プローブ、3) 細胞内ATPをOFF/ON型の蛍光応答でセンシングする蛍光プローブの開発、の3つの研究目標を設定した。

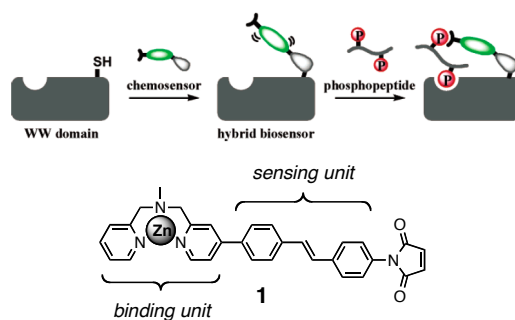
3. 研究の方法

それぞれの3つの研究テーマにおける研究の方法を以下に記述する。

1) リン酸化タンパク質・ペプチドを検出するタンパク質ハイブリッド型蛍光バイオセンサーの開発

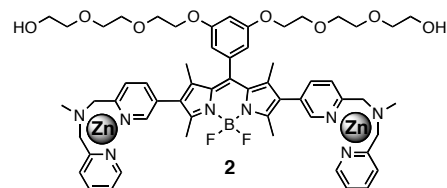
本研究では、天然タンパク質由来のリン酸化タンパク質認識ドメイン上に亜鉛錯体型の蛍光プローブを導入したハイブリッド型バイオセンサーを構築した。リン酸化タンパク質認識ドメインとしては、Pin1タンパク質由来のWWドメイン(34アミノ酸)を選択した。15番目のメチオニンをシステインに変換した変異WWドメインに対してZn(II)-Dpa亜鉛錯体ユニットを有する蛍光プローブ1を導入してハイブリッド型バイオセンサーを得た。このバイオセンサーの各種リン酸アニオン種に対する蛍光センシング機能や認識選択性を蛍光滴定などを用いて評価した。

ン種に対する蛍光センシング機能や認識選択性を蛍光滴定などを用いて評価した。



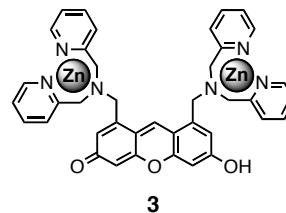
2) アルツハイマー病脳内に蓄積するリン酸化タウタンパク質凝集体を検出する蛍光プローブの開発

新たに分子デザインした二つのZn(II)-Dpa亜鉛錯体ユニットを有するBODIPY型の蛍光プローブ2を合成した。2のリン酸化タウタンパク質凝集体に対する親和性や選択性を、発現タンパク質より人工的に調整したリン酸化タウタンパク質凝集体、アルツハイマー病の組織切片などを用いて、蛍光滴定や蛍光顕微鏡によるイメージングなどにより評価を行った。



3) 細胞内ATPをOFF/ON型の蛍光応答でセンシングする蛍光プローブの開発

新たに分子デザインした二つのZn(II)-Dpa亜鉛錯体ユニットを有するキサンテン型の蛍光プローブ3を合成した。3のATPなどのヌクレオチドポリリン酸に対するセンシング機能を蛍光滴定などにより評価した。また、蛍光OFF/ON型のセンシングメカニズムについて、UV吸収分光法、蛍光分光法、X線結晶解析法などを用いて詳細に検討した。



4. 研究成果

それぞれの3つの研究テーマにおける研究の成果を以下に記述する。

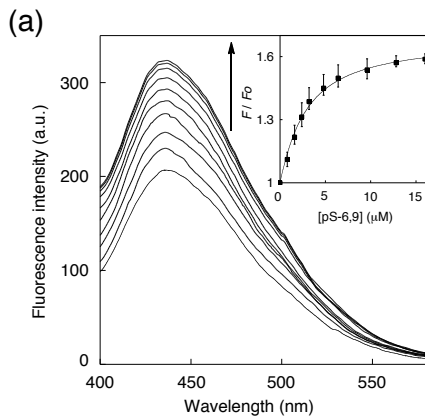
1) リン酸化タンパク質・ペプチドを検出するタンパク質ハイブリッド型蛍光バイオセンサーの開発

ハイブリッド型蛍光バイオセンサーに対してニリン酸化ペプチド pS-6,9 を添加すると、WWドメイン上の蛍光プローブ **1** 由来の蛍光の上昇が観察され(下図 a)、その結合定数(K_{app})は $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と算出された。この値はWWドメインと pS-6,9 ペプチド間の親和性よりも約 10 倍程度大きい値であった。またハイブリッド型バイオセンサーの pS-6 ペプチドに対する結合定数(K_{app})は $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であり、ニリン酸化ペプチドである pS-6,9 の場合に比較して約 40 倍小さな値となった。

pS-6,9 : Thr-Ser-Pro-Ser-Tyr-pSer-Pro-Thr-pSer-Pro-Ser

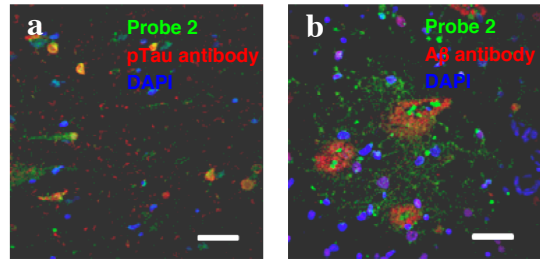
pS-6 : Thr-Ser-Pro-Ser-Tyr-pSer-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser

以上の結果は、WWドメインとプローブ **1** の Dpa-Zn(II)錯体部位が協同的に働き pS-6,9 ペプチドの二つのリン酸基と相互作用することで強い親和性を獲得している事を強く示唆する(下図 b)。本研究の結果は、天然のタンパク質ドメインと人工プローブとを組み合わせが、人工プローブのみでは難しかったリン酸化タンパク質・ペプチドに対する高い認識選択性とセンシング能を獲得するための一つの有効な戦略であることを明確に示すものである。また本研究では、多種多様な細胞内リン酸化タンパク質の中から、特定のリン酸化タンパク質を特異的に認識するために有用な新たなハイブリッド戦略を提案したものである。得られた研究成果は、これを明確に実証するものであり、この意味において本研究成果は重要である。

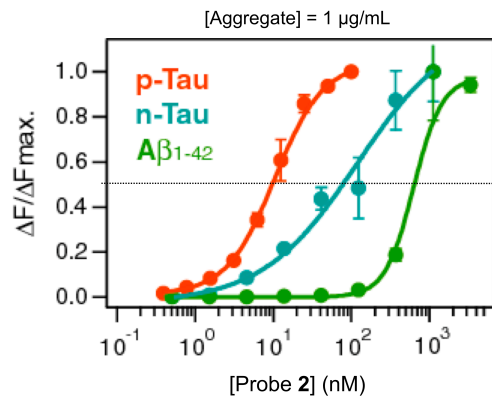


2) アルツハイマー病脳内に蓄積するリン酸化タウタンパク質凝集体を検出する蛍光プローブの開発

アルツハイマー病患者の脳組織切片に対して BODIPY 型亜鉛錯体 **2** を用いて染色実験を行ったところ、組織内に蛍光性の顆粒が検出された。リン酸化タウタンパク質 (pTau) に対する抗体を用いて、同じく脳組織切片を蛍光染色したところ、多くの場所において **2** と抗体の蛍光イメージが一致した(下図 a)。また、アルツハイマー病を発症していない脳組織切片では、**2** の顆粒状蛍光は観測されなかった。以上の結果から **2** は、ハイパーリン酸化されたタウタンパク質凝集体 (NFT) を選択的に染色可能であることが明らかとなった。興味あることに **2** は、アルツハイマー病脳に存在するアミロイドベータ凝集体 ($A\beta$) には結合せず、NFT のみを選択的に蛍光染色していることが、 $A\beta$ に対する抗体染色との比較から明らかとなった(下図 b)。



2 の NFT に対する染色能についてさらに知見を得るため、in vitro にて調製した pTau および $A\beta$ 凝集体との相互作用を調べ、親和性について定量的に評価した。その結果 **2** は、pTau 凝集体に対し EC_{50} にして 9 nM と非常に強い親和性を示すことが明らかとなった。一

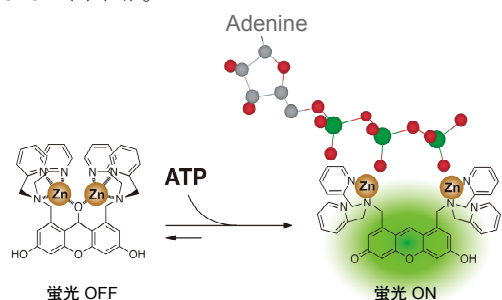


方、 $A\beta$ あるいは非リン酸化 tau (nTau) 凝集体に対する EC_{50} はそれぞれ 650 nM および 80 nM であった。以上の結果から **2** と pTau 凝集体との結合は、 $A\beta$ 凝集体と比較して約 70 倍、nTau 凝集体と比較して約 9 倍の高い選択性を持つことが明らかとなり、この違いが脳組織切片における NFT の選択的検出に反映されていることが示唆された。NFT のみを $A\beta$ と区

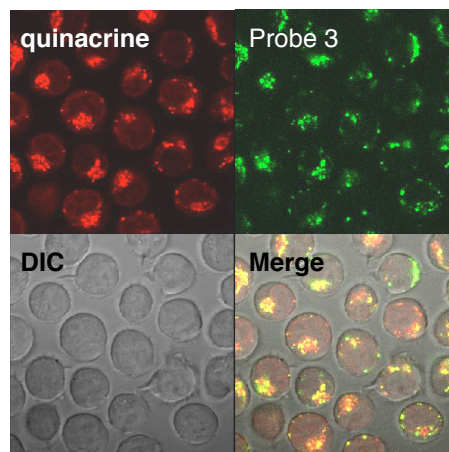
別して蛍光染色可能な蛍光プローブはこれまでにほとんど報告されていないことから、今回開発された **2** は、アルツハイマー病を含めた様々な神経変性疾患の病理診断におけるツールとして活用できる可能性を有する。

3) 細胞内 ATP を OFF/ON 型の蛍光応答でセンシングする蛍光プローブの開発

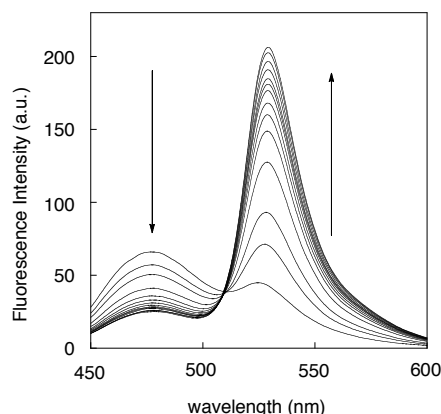
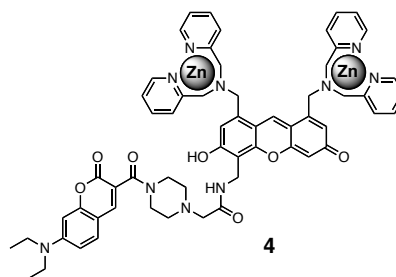
申請者がすでに見出しているキサントゲン型蛍光プローブ **3** の ATP などのポリリン酸種ニ対する OFF/ON 型の蛍光センシングメカニズムの解明について検討を行った。その結果、X 線結晶構造解析をはじめとして、UV および蛍光分光測定による詳細な解析を行い、ほぼ完全に本メカニズムを明らかとすることができた。すなわち **3** は、初期状態において亜鉛イオン上の配位水がキサントゲン環上の 9 位と C-O 結合を形成してキサントゲン環の共役構造を失っており蛍光 OFF 状態にあるが、ATP などのヌクレオシドポリリン酸との相互作用により C-O 結合の切断とキサントゲン共役構造の回復が起こるため蛍光 ON の状態となる（下図）。



キサントゲン型プローブの生物分析への応用として、いくつかの検討を行った。まず、in vitro における応用例として酵素反応の蛍光によるリアルタイムモニタリングを試みた。具体的には、糖転移酵素による糖鎖形成反応および Nudix Hydrolase によるジアドノシンテトラリン酸の加水分解反応について検討し、いずれにおいても酵素反応を **3** の蛍光上昇により簡便に読み出すことに成功した。また、蛍光変化から酵素速度論解析を行うことも可能であった。次に、細胞内に存在する ATP 顆粒の蛍光可視化について検討した。**3** を Jurkat 細胞に導入して蛍光顕微鏡にて可視化すると、細胞内に明るい顆粒が観察された。この **3** の顆粒状蛍光は、ATP 顆粒を染色するキナクリンと呼ばれ蛍光プローブの蛍光像と非常によく一致を示す事などから、**2** が ATP 顆粒を特異的に染色できる事が明らかとなった。このようにポリリン酸種に対する小分子蛍光プローブを、細胞系でのイメージングに応用した例はこれまでにほとんど知られておらず、この点において本研究成果は重要なものであるといえる。

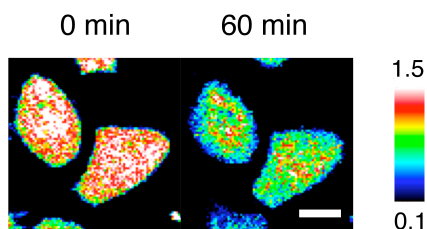


本研究では、さらに **3** を改良し、新たに FRET 二波長変化のセンシングモードを有する蛍光プローブの開発および細胞内 ATP のレシオ検出への応用について検討した。**3** に FRET ドナーとしてクマリンを導入した蛍光プローブ **4** は、ATP などのヌクレオシドポリリン酸と相互作用することにより、FRET に伴うクマリン蛍光に減少とキサントゲン蛍光の増大の二波長変化を起こすことが明らかとなった（下図）。



4 を細胞内に導入し、細胞内 ATP を人工的に枯渇させると、二波長レシオ値(キサントゲン蛍光/クマリン蛍光)の減少が観察された（下図）。様々なコントロール実験などから、この変化は細胞内 ATP 濃度の低下を蛍光レシオ変化で読み出している可能性が強く示唆された。これまでに二波長変化で ATP を読み出せる小分子蛍光プローブは数例しか報告

されていない事から、本プローブの新規性は高い。また、小分子プローブを細胞内 ATP 濃度変化の検出に応用できた例についても、これまでに報告は全く無く、この意味において本研究成果は重要な意義を持つと考えられる。



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. Real-time fluorescence monitoring of GSK3b-catalyzed phosphorylation by use of a BODIPY-based Zn(II)-Dpa chemosensor

T. SAKAMOTO, M. INOUE, A. OJIDA, I. HAMACHI

Bioorg. Med. Chem. Lett., 19, 4175-4177 (2009). 査読あり

2. Sequence Selective Dual-Emission Detection of (*i*, *i*+1) Bis-Phosphorylated Peptide Using Deazastilbene-Type Zn(II)-Dpa Chemosensor

Y. ISHIDA, M. INOUE, T. INOUE, A. OJIDA, I. HAMACHI

Chem. Commun., 2848-2830 (2009). 査読あり

3. Fluorescent BODIPY-Based Zn(II)-Complex as a Molecular Probe for Selective Detection of Neurofibrillary Tangles in the Brains of Alzheimer's Disease Patients

A. OJIDA, T. SAKAMOTO, M. INOUE, S. FUJISHIMA, G. LIPPENS, I. HAMACHI

J. Am. Chem. Soc., 131, 6543-6548 (2009). 査読あり

4. Molecular recognition, fluorescence sensing, and biological assay of phosphate anion derivatives using artificial Zn(II)-Dpa complexes

T. SAKAMOTO, A. OJIDA, I. HAMACHI

Chem. Commun., 141 - 152 (2009). 査読あり

5. Real-time Off/On-mode Fluorescence Assay for Enzyme Reactions Involving Nucleoside Polyphosphates by Use of a Xanthene Zn(II)-Dpa Chemosensor

T., KOHIRA, I. TAKASHIMA, H. NONAKA, A. OJIDA, I. HAMACHI

Chem. Lett., 37, 1164-1165 (2008). 査読あり

6. Turn-on Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates Using a Xanthene-Based Zn(II) Complex Chemosensor

A. OJIDA, I. TAKASHIMA, T. KOHIRA, H. NONAKA, I. HAMACHI

J. Am. Chem. Soc., 130, 12095-12101 (2008).

査読あり

7. Design of a Hybrid Biosensor for Enhanced Phosphopeptide Recognition Based on a Phosphoprotein Binding Domain Coupled with a Fluorescent Chemosensor

T. ANAI, E. NAKATA, Y. KOSHI, A. OJIDA, I. HAMACHI

J. Am. Chem. Soc. 129, 6232-6239 (2007). 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 王子田 彰夫、生体機能を解き明かすツールとしての小分子プローブの開発、生体関連化学 若手の会、2009. 7.13、京都。

2. 王子田 彰夫、生体機能解析に使いたくなる蛍光プローブの開発、有機合成化学講演会、2009. 5.22、九州大学。

3. 王子田彰夫、生体機能を探る金属錯体蛍光プローブ、第一回瀬戸薬セミナー、2007.12. 05、松山大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

京都大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：10343328

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし