

平成 21 年 5 月 18 日現在

| | |
|--------------|--|
| 研究種目： | 若手研究 (B) |
| 研究期間： | 2007 ~ 2008 |
| 課題番号： | 1 9 7 1 0 1 8 5 |
| 研究課題名 (和文) | タンパク質のリン酸化・脱リン酸化を検出する蛍光プローブの開発とその応用研究 |
| 研究課題名 (英文) | Development of fluorescent probes that detect protein phosphorylation /dephosphorylation and their application |
| 研究代表者 | |
| | 水上 進 (MIZUKAMI SHIN) |
| | 大阪大学・大学院工学研究科・助教 |
| | 研究者番号： 3 0 4 2 0 4 3 3 |

研究成果の概要： 分子内水素結合による水酸基の pK_a シフトを利用して、脂肪族リン酸モノエステルの脱リン酸化を検出する新規スイッチ機構を考案し、その原理によるレシオ蛍光プローブを複数合成した。これらの化合物を含む 100 mM HEPES buffer (pH 7.4) に、acid phosphatase (ACP) を加え励起スペクトルを測定したところ、励起スペクトル変化が観測された。種々のホスファターゼに対する選択性を調べた結果、全てのプローブが酸性ホスファターゼに対して高い選択性を持つことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 0 | 1,900,000 |
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 420,000 | 3,720,000 |

研究分野： 複合新領域

科研費の分科・細目： 生物分子科学

キーワード： 生体機能関連物質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は細胞内シグナル伝達の調節に関わっており、ガンを始めとする多くの疾病でその異常が報告されている。このリン酸化・脱リン酸化過程はプロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼと呼ばれる一群の酵素によって触媒されており、それらの活性制御が創薬上の重要なターゲットとなりつつある。ヒトには数百ものプロテインキナーゼ・ホスファターゼがあるとされているが、それらの多くの細胞内機能は未だ十分に解明されていない。それ故、特定のキナーゼ・ホスファター

ゼの活性を時空間的に可視化する蛍光プローブは、その機能解明に向けて大きな役割を果たすと考えられる。しかしながら、現段階ではリン酸化検出プローブの開発は極めて困難であり、僅かに報告はあるものの汎用的な原理・手法は未だ開発されていない。また脱リン酸化の検出に関してもチロシンホスファターゼの蛍光プローブは開発されているものの、セリン・スレオニンホスファターゼの蛍光プローブに関しては実用的なものは存在しない。

2. 研究の目的

これまでに、チロシンホスファターゼの活性を検出する蛍光プローブが開発されている。これらはウンベリフェロンなどの水酸基を有する蛍光物質がモノリン酸エステル化された構造をしており、脱リン酸化によって化合物の蛍光が回復する。これらのプローブ分子はリン酸化チロシンと構造が似ている為、チロシンホスファターゼが基質として認識・加水分解する。しかしながら、それらの蛍光基質はリン酸化セリン/スレオニンとは構造が大きく異なる為、セリン/スレオニンホスファターゼには認識されにくい。そこで、リン酸化セリン/スレオニンに構造が似た脂肪族モノリン酸を有する蛍光基質を開発する必要がある。この場合、どのようにして酵素反応の前後で蛍光特性を変化させるかという問題が生じる。蛍光化合物に直接付いた芳香族水酸基はリン酸エステルの有無でその化合物特性が大きく変化し、蛍光特性の変化につなげることが可能であるが、脂肪族水酸基の場合はリン酸エステルの有無を蛍光特性の変化につなげることは極めて難しい。

申請者らは最近、7-ヒドロキシクマリンの8位の置換基の種類によって7-OH基の pK_a ならびに化合物の蛍光特性に大きな影響を与える興味深い現象を見出した。本研究では、この原理を応用して、セリン/スレオニンホスファターゼの蛍光プローブ開発に取り組む。

3. 研究の方法

7-ヒドロキシクマリンの8位の置換基にアニオン性官能基を導入すると、7位水酸基の pK_a が増大する。この現象を利用することによって、溶液のpHを適当に選べばアニオン性官能基の有無で、クマリンの水酸基のプロトン化の制御が可能となる。この水酸基のプロトン化はクマリンの蛍光強度に大きな影響を与えることが知られており、実際にpH=7.4の緩衝液中ではアニオン性官能基がオルト位に存在すると蛍光強度が極めて弱いものに対し、中性の官能基では蛍光が回復することを確認している。7-ヒドロキシクマリンのオルト位にセリン・スレオニンホスファターゼに認識される官能基を修飾し、ホスファターゼによって加水分解されたときに7-水酸基の脱プロトン化が起こり大きな蛍光上昇を示すと考えられる。そこで、アニオン性官能基部分および蛍光化合物の構造を変化させたものを合成し、各種セリン/スレオニンホスファターゼによる脱リン酸化により蛍光特性がどのように変化するかを調べ、リンカー構造の最適化を行った。また、開発したプローブ分子が、他の様々なセリン/スレオニンホスファターゼの基質として機能するかどうかを調べ、反応速度論パラメーターの算出を行った。また、チロシンホスファターゼについても検

討を行なった。

4. 研究成果

脂肪族リン酸モノエステルの脱リン酸化によってスペクトル変化を引き起こす新規スイッチ機構を考案し、脂肪族リン酸モノエステル構造を有する phosphatase 蛍光プローブの開発に取り組んだ。我々はこれまでに7-ヒドロキシクマリンの水酸基近傍にホスホネート基などのアニオン性残基を修飾した化合物(図1の化合物1)では、アニオン性官能基が無いコントロール化合物と比較して励起スペクトルがシフトすることを見出していた。これは分子内水素結合により、水酸基の pK_a がシフトし、水酸基のプロトン化の割合が変化するためであった。この現象に基づき phosphatase 活性を検出するプローブ化合物 3a、4a、および 5a をデザイン、合成した(図1)。

| Compound | X | Y |
|----------|---|---|
| 1 | CH ₂ PO ₃ H ₂ | H |
| 2 | CH ₂ OPO ₃ H ₂ | H |
| 3a | CH ₂ CH ₂ OPO ₃ H ₂ | H |
| 3b | CH ₂ CH ₂ OH | H |
| 4a | H | CH ₂ CH ₂ OPO ₃ H ₂ |
| 4b | H | CH ₂ CH ₂ OH |
| 5a | CH ₂ CH ₂ CH ₂ OPO ₃ H ₂ | H |
| 5b | CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH | H |

図1. デザイン・合成した化合物の構造。

これらの化合物の7-ヒドロキシル基の pK_a は、脱リン酸化を受けた後に生成すると予想される化合物と比較して、より大きな値を示した。従ってこれらの化合物は酵素により脱リン酸化を受けると pK_a がシフトし、励起スペクトルが変化するプローブとして機能することが予想された。実際に10 μ Mの3a、4a、および5aを含む100 mM HEPES buffer (pH 7.4)に、酸性ホスファターゼ(acid phosphatase: ACP)を加えたところ、励起スペクトル変化が観測された(図2)。これらの励起スペクトルは、酵素反応前後で2波長の蛍光強度の比が変化することから、その比を測定するレシオ蛍光測定が可能なプローブであることが示された。

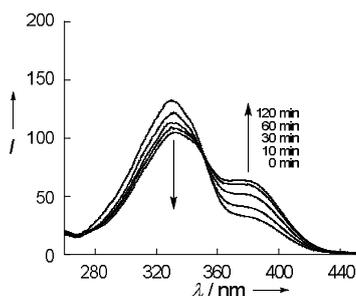


図2. 化合物5aに酸性ホスファターゼを添加したときの励起スペクトル変化。

続いて、化合物 **3a**、**4a**、および **5a** について、様々なホスファターゼに対する選択性を調べた。その結果、全てのプローブに関して、酸性ホスファターゼに対して高い選択性を持つことが判明した。また、セリン/スレオニンホスファターゼおよびチロシンホスファターゼには全く認識されなかった。開発したプローブの酸性ホスファターゼに対する反応速度論パラメータを表 1 に示す。

表 1 . 化合物 **3a**、**4a**、および **5a** の酸性ホスファターゼに対する反応速度論パラメータ。

| Compound | K_m (μM) | $V_{\max} \times 10^9$ ($\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) | V_{\max}/K_m (min^{-1}) |
|-----------|-------------------------|---|--------------------------------------|
| 3a | 54 ± 18 | 4.7 ± 0.3 | 8.7×10^{-5} |
| 4a | 107 ± 27 | 53 ± 3 | 5.0×10^{-4} |
| 5a | 32 ± 12 | 17 ± 2 | 5.3×10^{-4} |
| DiFMUP | 41 ± 19 | 31 ± 9 | 7.6×10^{-4} |

続いて、セリン/スレオニンに選択的に加水分解されるプローブ開発を目的として新たにリン酸化セリンを分子内に有する化合物をデザインし、合成を行った。こちらの化合物に関しても、各種ホスファターゼによるアッセイを行なったところ、予想に反して酸性ホスファターゼのみに認識・切断された。次に、各 pH における新規プローブの蛍光強度をプロットし、このプローブの pK_a を調べた。プローブの原理上、 pK_a の前後において酵素反応による蛍光強度変化が最も大きくなる。新たに開発したプローブの pK_a は前年度に開発したプローブの pK_a よりも約 0.5 だけ酸性側にシフトしていた。すなわち、酸性ホスファターゼに適した pH である弱酸性領域において、最も強度変化の大きいプローブであった。本プローブを用いた測定結果より、7-ヒドロキシル基の近傍にアミノ基を修飾することによって、プローブの至適 pH を酸性側にシフトできることが分かった。これにより、更なるプローブ改良の設計指針が得られた。本研究で開発した一連のプローブは、酸性ホスファターゼに高い選択性を有しており、骨転移癌などで活性化する酸性ホスファターゼのイメージング、あるいは阻害剤のスクリーニングなどに有用であると予想される。

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 5 件)

Shin Mizukami, Shuji Watanabe, and Kazuya Kikuchi*; Development of Ratiometric Fluorescent Probes for Phosphatases Using pK_a -Switching

Mechanism; *ChemBioChem*, in press (2009). (査読有)

Shin Mizukami, Rika Takikawa, Fuminori Sugihara, Masahiro Shirakawa, and Kazuya Kikuchi*; Dual-Function Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ^{19}F MRI; *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3641-3643 (2009). (査読有)

Shin Mizukami, Shuji Watanabe, Yuichiro Hori, and Kazuya Kikuchi*; Covalent Protein Labeling Based on Noncatalytic γ -Lactamase and a Designed FRET Substrate; *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5016-5017 (2009). (査読有)

Shin Mizukami, Kazuhiro Tonai, Masahiro Kaneko, and Kazuya Kikuchi*; Lanthanide-based Protease Activity Sensors for Time-resolved Fluorescence Measurements; *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14376-14377 (2008). (査読有)

Shin Mizukami, Rika Takikawa, Fuminori Sugihara, Yuichiro Hori, Hidehito Tochio, Markus Wälchli, Masahiro Shirakawa,* and Kazuya Kikuchi*; Paramagnetic Relaxation-Based ^{19}F MRI Probe to Detect Protease Activity; *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 794-795 (2008). (査読有)

[学会発表](計 12 件)

水上進、遺伝子発現を検出する ^{19}F MRI プローブの開発、日本薬学会第 129 年会、2009.3.27、京都。

水上進、発蛍光型タンパク質ラベル化法の開発、日本薬学会第 129 年会、2009.3.27、京都。

水上進、遺伝子発現を検出する ^{19}F MRI プローブ、第 89 回日本化学会春季年会、2009.3.29、船橋。

Shin Mizukami、Sensing of Biological Molecules by Designed Visualization Probe、第 7 回ライフサイエンスシンポジウム、2009.1.29、東京。

水上進、生体内分子を可視化するナノセンサ分子開発、第三回ナノバイオテクノロジー連携施策群成果報告会、2009.1.28、東京。

水上進、酵素活性を検出する MRI プローブの開発、第 3 回バイオ関連合同シンポジウム、2008.9.18、東京。

Shin Mizukami、 ^{19}F MRI Probe to Detect Enzyme Activity Using Paramagnetic Relaxation Enhancement, World Molecular Imaging Congress 2008, 2008.9.13, Nice, France.

水上進、分子内常磁性効果を利用した酵素活性検出用 ^{19}F MRI プローブの開発、第 25 回希土類討論会、2008.5.29、東京。

水上進、プロテアーゼ活性を検出する ^{19}F

MRI プローブの開発、第3回日本ケミカルバイオロジー研究会、2008.5.19、東京。

水上進、生体分子可視化プローブの開発、第7回界面ナノアーキテクトニクスワークショップ、2007.12.13、つくば。

渡辺修司、水上進、菊地和也、新規スイッチ機構を用いた phosphatase レシオ蛍光プローブの開発、第22回生体関連化学シンポジウム、2007.9.29、仙台。

Shin Mizukami, Functional long-time luminescence probes for protease activity detection, Gordon Research Conference - Bioorganic Chemistry, 2007.6.13, Andover, NH, USA

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：希土類発光プローブ

発明者：水上進他

権利者：国立大学法人大阪大学他

種類：特許

番号：特願 2008-61320

出願年月日：2008年3月11日

国内外の別：国内

名称：タンパク質ラベル化システム

発明者：水上進他

権利者：国立大学法人大阪大学他

種類：特許

番号：特願 2008-273182

出願年月日：2008年10月23日

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI SHIN)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30420433

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者