

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750061
 研究課題名 (和文) 非可逆的標識を達成する高次機能性タンパク質計測用
 蛍光イメージング試薬の創製
 研究課題名 (英文) Development of highly functionalized fluorescent reagent
 for the imaging of proteins with irreversible labeling
 研究代表者
 宗 伸明 (SOH NOBUAKI)
 九州大学・大学院工学研究院・助教
 研究者番号：90336008

研究成果の概要：蛍光イメージング試薬（蛍光プローブ）は、タンパク質研究における重要なツールとして近年注目を集めている。本研究では、NTA-Ni²⁺錯体部位、光感受性部位、及び蛍光基部位の3つの機能性部位を合わせ持つ新しい蛍光プローブを合成し、その性能を検討した。その結果、本蛍光プローブがヒスチジンタグ (His-tag) を付加したタンパク質を非可逆的に標識できる有用な蛍光プローブであることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：生体分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：タンパク質、蛍光

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生命活動の根幹を成す生体分子であり、ポストゲノム時代を迎えた今日、その作用機序の詳細な理解に対する要望は極めて高まっている。蛍光標識によるタンパク質計測法は、生体内 (*in vivo*) においてタンパク質の動的な挙動を解析する上でも非常に有力な手法であることから、近年注目を集めている。現在、生体内タンパク質の蛍光標識法として広く用いられている手法は、Green Fluorescent Protein (GFP) などの蛍光タンパク質を、計測対象としたタンパク質と融合発現する手法である。しかし、蛍光タンパク質は標識体としては大きすぎるため

(GFP で 27kDa)、蛍光標識されたターゲットタンパク質の本来の挙動に影響を与える場合があることが指摘されている。この問題を克服するため、生物学的、遺伝子工学的手法を巧みに用いて、化学的に合成した小さな蛍光色素分子をタンパク質に標識する試みも行われるようになってきた。この中で、タンパク質計測用蛍光イメージング試薬（蛍光プローブ）とこれに対応するペプチドタグを利用する手法は、タンパク質構造中の様々な位置に蛍光修飾を行うことが可能である、標識操作が簡便である、汎用性が広い、といった理由から、特に有用な手法の一つであると考えられる。

我々は、以前、ダンシル基を修飾した NTA-Ni²⁺錯体構造を有する新規タンパク質計測用蛍光プローブ (dansyl-NTA-Ni²⁺ complex) とこれに対応する新規ペプチドタグ (His-Trp-tag) を用いたレシオ (蛍光強度比) 測定用の蛍光標識法を開発した。しかし、この蛍光プローブを含め、NTA-Ni²⁺錯体構造を利用した蛍光プローブは、汎用性が特に広いといった優れた利点を数多く有するものの、その認識部位であるヒスチジンタグ (His-tag) とのアフィニティー結合はそれほど強くなく原理的には可逆であるため、プローブ-タグ結合の解離や再置換が懸念されるという問題があった。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では非可逆的な標識を達成する高次機能性タンパク質計測用蛍光プローブを開発することを目的とした。より具体的には、選択的なタグ認識のための NTA-Ni²⁺錯体部位に加え、非可逆的な標識を達成するための光感受性部位を有する、新しい高次機能性タンパク質計測用蛍光プローブの開発を目指した。この新規タンパク質

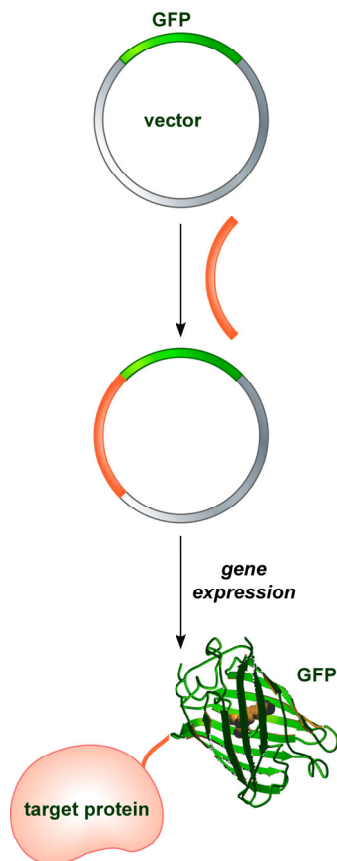


図1 蛍光タンパク質 (GFP) を用いたタンパク質の蛍光標識

質計測用蛍光プローブを、対応するペプチドタグである His-tag を付与したターゲットタンパク質に作用させた場合、蛍光プローブは NTA-Ni²⁺錯体部位とのアフィニティー反応を介してターゲットタンパク質の His-tag 部位に選択的に配位すると考えられる。ここで更に紫外光を照射すれば、光感受性部位の働きにより蛍光プローブを共有結合的にターゲットタンパク質に標識することが可能となると期待される。本研究では、このような汎用的なペプチドタグである His-tag に対する非可逆的な蛍光標識を可能とした新しいタンパク質計測用蛍光プローブを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

蛍光タンパク質を用いた手法では、ターゲットタンパク質との融合発現により蛍光標識を行う (図1) のに対し、本手法では小分子蛍光プローブの光架橋によりターゲットタンパク質の非可逆的な蛍光標識を達成する (図2)。本研究の遂行においては、まず、新しいタンパク質計測用蛍光プローブとして、His-tag 認識のための NTA-Ni²⁺錯体部位、

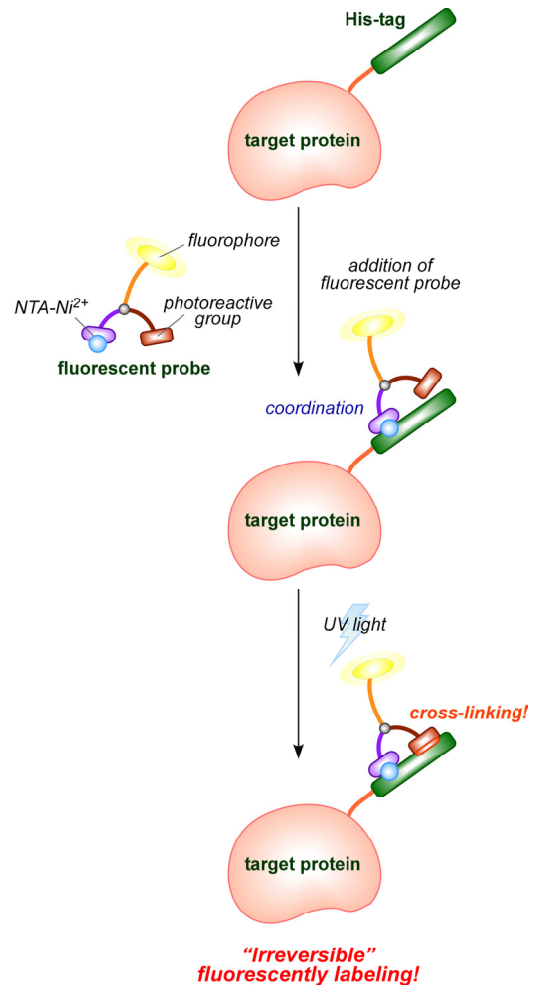


図2 本研究で開発する蛍光プローブを用いたタンパク質の蛍光標識

光結合のための光感受性部位、及び蛍光シグナルを発生する蛍光基部位の3つの機能性部位を備えた蛍光プローブを、有機化学的手法に基づき合成した。この際、生成物の確認は、¹H-NMR測定、質量分析測定等により行った。次に、光感受性部位の光応答特性について調査した。また、蛍光プローブのNTA-Ni²⁺錯体構造に基づくHis-tag配位能について評価した。続いて、蛍光プローブのHis-tagタンパク質への光架橋能を蛍光測定に基づき評価した。

4. 研究成果

(1) 新規蛍光プローブの合成

ベンゼントリカルボニルクロライドにアミノ基を有する光感受性部位を一ユニット結合させ、残りの二つのカルボニルクロライド基をカルボン酸メチル基に変換した。このカルボン酸メチル基の一つをカルボン酸基に変換した後、リンカーを付加した長波長励起可能な蛍光色素と結合した。更に、得られた化合物中のカルボン酸メチル基をカルボン酸基に変換した後、アミノ基を有するNTA誘導体と結合し、最後にNi²⁺錯化する事で、目的とした蛍光プローブを合成することに成功した。

(2) 光感受性部位の光応答性評価

光感受性部位の光応答性を評価するため、10 mMの光感受性部位を含む溶液に対し、350 nmの紫外光を照射した後、吸光スペクトル測定を行った。その結果、照射時間の増加に伴い、330 nm付近の吸光度の減少が観測され、光照射に伴う光感受性部位からのラジカル生成が示唆された(図3)。

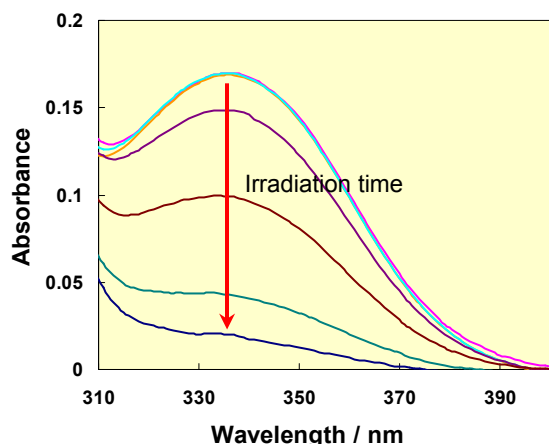


図3 吸光測定による光感受性部位の光応答性評価結果

(3) NTA-Ni²⁺錯体に基づくHis-tag配位評価

本蛍光プローブがNTA-Ni²⁺錯体部位に基づくHis-tag配位能を発現するかについて評価した。トリプトファンを付加したHis-tagを固相合成法により合成し、この溶液に本蛍光

プローブを作用させたところ、蛍光プローブ中の蛍光色素に由来する蛍光が減少した。続いて、この溶液にEDTAを添加したところ、当該蛍光強度の増大が観測された。前者の蛍光強度の減少は、NTA-Ni²⁺錯体部位を有する蛍光プローブがHis-tagに配位することで当該蛍光色素とトリプトファンとが近接して生じる相互作用に基づいていると考えられる。一方、後者の蛍光強度の増大は、EDTAによるNi²⁺の捕捉で蛍光プローブとHis-tag間の配位結合が解離し、蛍光色素とトリプトファンとの距離が増大したことに起因していると考えられる(図4)。トリプトファンを付与しないHis-tagでは上述のような蛍光変化は認められなかった。これらの結果から、本蛍光プローブはHis-tagへの良好な配位能を有していることが示唆された。なお、同様の蛍光測定の結果から、配位金属としてはNi²⁺だけでなく、Zn²⁺等も利用可能であることが確認できた。

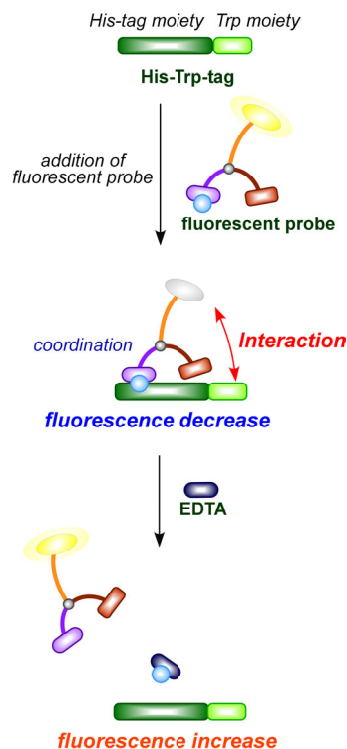


図4 His-Trp-tagを用いたHis-tag配位評価の概念図

(4) 蛍光プローブの光架橋形成能評価

本蛍光プローブの光照射に伴う光架橋形成能について評価した。この際、モデルタンパク質として、His-tagを付加したユビキチンを用いることにした(His-tag付加ユビキチン: 8.5 kDa)。二つのエペンドルフチューブ中でHis-tag付加ユビキチン溶液と蛍光プローブを混合し、一方については紫外光を照射した。各々のサンプル溶液についてマイ

クロコン（ミリポア、分画分子量 3000）を用いて限外濾過を行い、濾物を溶出して蛍光測定を行った（図 5）。その結果、UV 照射を行った場合は、行っていない場合と比較して顕著な蛍光強度の増大が観測され（図 6）、光照射に伴う非可逆的な架橋形成が起こっていることを確認できた。

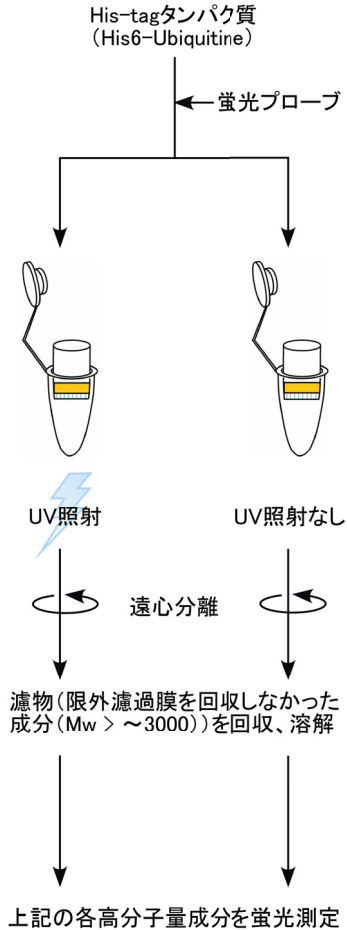


図 5 光架橋形成能評価における実験スキームの概念図

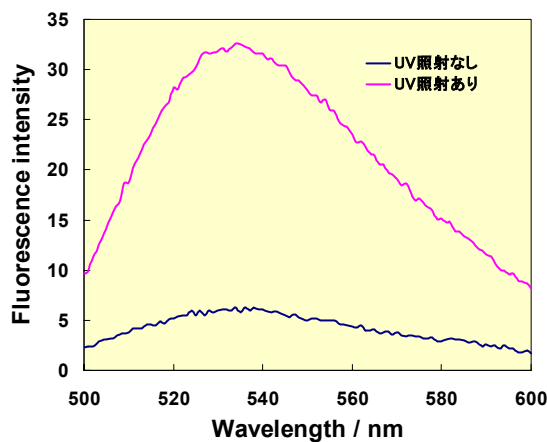


図 6 蛍光測定による光架橋形成能の評価結果

(5)まとめ

NTA-Ni²⁺錯体部位、光感受性部位、蛍光基部位の3つの機能性部位を備えた蛍光プローブを合成した。光感受性部位の光応答性、並びに NTA-Ni²⁺錯体部位に基づく His-tag 配位能を確認した後、本蛍光プローブを His-tag ユビキチンに適用したところ、光照射に伴うプローブ/His-tag 間の光架橋の形成を示唆する結果を得ることができた。従って、本蛍光プローブは、His-tag タンパク質の非可逆的標識を達成する新規蛍光プローブとして有用であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 宗 伸明 “細胞内ネットワークを解析する分子ツールの創製” 九州大学グローバル COE プログラム 生命分子システムユニット会議 ワークショップ 福岡県福岡市 2008 年 12 月 26 日
- ② 宗 伸明、小野華実、瀬戸大輔、中嶋 秀、中野幸二、今任稔彦 “非可逆的標識を達成する新規タンパク質計測用蛍光プローブ” 第 45 回化学関連支部合同九州大会 福岡県北九州市 2008 年 7 月 5 日
- ③ 宗 伸明 “生体分子を可視化計測する機能性蛍光分子” 日本分析化学会北海道支部第 24 回緑陰セミナー 北海道札幌市 2008 年 6 月 29 日
- ④ Nobuaki SOH, “Fluorescent Compounds for Sensing Biomolecules”, The 1st International Workshop on Future Molecular Systems 2008, Fukuoka, Japan, June 3, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗 伸明 (SOH NOBUAKI)
九州大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：90336008

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：

(3) 研究協力者

今任 稔彦 (IMATO TOSHIHIKO)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50117066