

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007~2008
 課題番号：19750135
 研究課題名（和文） 細胞内情報伝達物質サイクリック ADP リボースに対する蛍光プローブの構築
 研究課題名（英文） Construction of a fluorescent probe for cyclic ADP-ribose, an intracellular signaling molecule
 研究代表者
 山内 晶世 (YAMAUCHI AKIYO)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：70361110

研究成果の概要：細胞内のカルシウム (Ca^{2+}) 濃度を調節する重要な情報伝達物質であるサイクリック ADP リボース (cADPR) に対して、水溶液中で相互作用して蛍光強度変化を示す、初の蛍光プローブを構築した。このプローブは cADPR のアデニン環と相互作用する芳香環と、cADPR のリボースと結合するフェニルボロン酸をもち、これらの官能基が cADPR を挟み込むような構造をしている。このプローブは、より高性能な cADPR 蛍光プローブを開発するための分子設計指針を与えるものである。

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：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

1. 研究開始当初の背景

(1) サイクリック ADP-リボース (cyclic ADP-ribose, cADPR) は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) から作られる環状分子で、1987 年にウニ卵の Ca^{2+} 動員を引き起こす分子として発見された。哺乳動物における cADPR の生理学的な役割は不明であったが、1993 年に、膵 β 細胞において、グルコース刺激によってイノシトール三リン酸 (IP_3) では見られない細胞内 Ca^{2+} 遊離とインスリン分泌が cADPR によって引き起こされることが見いだされた。さらに、細胞膜表面抗原 CD38 が、cADPR を合成する活性

と加水分解する活性を有しており、細胞内 cADPR 濃度を調節していることがわかった。その後、生体内では、細胞種によって、または生理的条件や病態に応じて、 IP_3 系と CD38-cADPR 系の二つの細胞内 Ca^{2+} 情報伝達系が、使い分けられていることが明らかとなった。このように、cADPR は IP_3 に匹敵する新しい細胞内情報伝達物質として注目されているが、cADPR の濃度測定が困難であるため、機能は未解明な部分が多い。これまで cADPR の定量には、HPLC やラジオイムノアッセイ (RIA) が用いられてきたが、これらの方法は操作が煩雑で、特に RIA では cADPR

特異的な抗体が必要であり、簡便ではない。最近、酵素反応に基づいた間接的な蛍光測定法が開発されたが、直接 cADPR の濃度を測定することのできる蛍光プローブの構築が望まれている。

(2) cADPR は免疫抑制剤 FK506 結合蛋白質 12.6 (FKBP12.6) のリガンドであることが明らかとなっているが、結合部位は不明である。蛋白質の cADPR 結合部位を利用した蛍光プローブを開発するには、かなりの行程が必要であるため、化学合成によりプローブを構築することは有用である。水中では、水和によってイオン・分子と蛍光プローブとの相互作用が阻害されるため、有機溶媒中と比較して、プローブの構築は難しく、多点相互作用を利用するなどの工夫が必要である。cADPR は芳香環であるアデニン環、糖であるリボース、アニオン性官能基であるリン酸基をもつ環状分子である。したがって、それらの官能基に対する良い認識部位を探索する必要がある。申請者は水溶性ピレン誘導体が水中で、疎水性の巨大な π 平面として、 π - π 相互作用や CH- π 相互作用の有効な π ドナーとして機能する可能性を示してきた。また、リン酸基のようなアニオン性官能基に対しては、静電相互作用するカチオン性のグアニジウム基を用いることができると考えられる。したがって、ピレンのような π ドナーとなる蛍光色素とグアニジウム基を組み合わせることで、cADPR に対する蛍光プローブが構築できると考えられる。また、リボースと相互作用しうる官能基としては、フェニルボロン酸が挙げられる。フェニルボロン酸は水中で単糖のジオールと共有結合することが知られている。フェニルボロン酸と親和性が高い単糖はフルクトースである。しかし、申請者は、フェニルボロン酸修飾シクロデキストリンとスチリルピリジニウム色素の複合体からなる蛍光プローブが、通常のフェニルボロン酸とは異なり、リボースやグルコースに対して良く応答することを見いだしている。このような選択性が発現する機構を解明する必要があるが、この事実は、フェニルボロン酸誘導体が条件によっては cADPR のリボースの認識に利用できる可能性を示唆している。したがって、フェニルボロン酸をプローブに組み込むことも有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する重要なセカンドメッセンジャーである cADPR に水溶液中で結合して、蛍光強度が変化する蛍光プローブを構築することを目的とする。cADPR のアデニン環、リン酸、リボースの

認識部位を cADPR の立体構造に合わせて三次元的に配置することが必要であると予想されるが、これまで cADPR に対する人工レセプターの報告例はなく、どのような構造のプローブが有効なのかは全く不明である。そこで、まず、cADPR と相互作用して蛍光応答を示す分子構造を明らかにすることを目的とする。そのために、2種類の認識部位によって環状の cADPR を挟み込むような構造をもつピンセット型のプローブを合成して、cADPR に対する蛍光応答を評価する。

3. 研究の方法

cADPR のアデニン環、リン酸、リボースの認識部位を cADPR の立体構造に合わせて三次元的に配置したプローブを合成することは困難であるので、2種類の認識部位を適当なスペーサーを介して連結したプローブを合成し、機能を評価した。また、プローブの合成に先立ち、大きな π 平面をもつピレン環が水中でアデニン環と実際に π - π 相互作用することを確認した。また、通常のフェニルボロン酸の選択性とは異なる選択性を示す、フェニルボロン酸修飾シクロデキストリンとスチリルピリジニウム色素の複合体からなる蛍光プローブについて、単糖認識機構の解析を行った。

(1) ピレン環とアデニン環が実際に π - π 相互作用することを確認するためには、ピレン蛍光の消光の観測に加えて、2つの官能基が接近していることを確認する必要がある。そのためには、分子内のプロトンの環境を反映する核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの測定が有用である。しかし、大きな π 平面をもつプローブは、水溶性が低く、高濃度の試料が必要な NMR による解析は困難である。そこで、モデル化合物として、水溶性の高いシクロデキストリンに、ピレニルプロピルアンモニウムを修飾した蛍光プローブを合成し、水中におけるアデニンヌクレオチドに対する相互作用を、蛍光強度変化と NMR によって解析した。

(2) フェニルボロン酸修飾シクロデキストリンとスチリルピリジニウム色素の複合体からなる蛍光プローブについて、糖濃度と pH を変化させて蛍光強度を測定し、フェニルボロン酸の酸解離も含めた平衡解析を行うことで、単糖に対する認識機構を解析した。

(3) リン酸イオンとアデニンの認識部位を連結した、cADPR を挟み込むような形のピンセット型プローブを合成した。具体的には、イソフタル酸の一方のカルボン酸にアデニン環の認識部位としてアミノピレンを結合

し、他方のカルボン酸にリン酸イオン認識部位としてグアニジウム基を、プロピルアミンを介して連結した。このプローブの cADPR および、類似化合物に対する蛍光応答を評価した。また、フェニルボロン酸をナフトールに修飾し、これを 2-メチルプロピレンを用いて 2 個連結したビス型の蛍光プローブについても、cADPR および類似化合物に対する蛍光応答を評価した。

4. 研究成果

(1) シクロデキストリンにピレンルプロピルアンモニウムを修飾した蛍光プローブは、水中でアデニンヌクレオチドと結合し、蛍光強度の減少を示した。また、NMR スペクトル測定から、アデニン環のプロトンがプローブとの結合によって高磁場シフトすることを確認し、水中でピレン環がアデニン環と π - π 相互作用していることを明らかにした。したがって、アデニンヌクレオチドによるピレン蛍光の消光は、 π - π 相互作用によっておこることが明らかとなった。この結果より、cADPR 蛍光プローブにピレン環のような π 平面を導入することが有用であると期待された。また、プロピルアンモニウム基の正電荷がリン酸基の認識に関与しており、 π 平面とカチオン性官能基の協同的な作用によって cADPR を認識できる可能性が示唆された。

(2) スチリルピリジニウム色素は、カチオン性の蛍光色素で、単独では水中でほとんど蛍光を発しないが、シクロデキストリンに包接されると、分子内の結合の回転が抑制されて強い蛍光を発するようになる。申請者はこれまで、フェニルボロン酸修飾シクロデキストリンとスチリルピリジニウム色素の複合体蛍光プローブが、中性水溶液中 (pH 7.2) で、単糖の添加に伴い蛍光強度の増大を示すことを見いだしている。これは、単糖がフェニルボロン酸に結合することで生じた負電荷と静電相互作用することで、スチリルピリジニウム色素がシクロデキストリンに包接されやすくなるためである。通常フェニルボロン酸型蛍光プローブが良く応答するフルクトースに対しては、蛍光応答は小さく、蛍光強度の増加はグルコースで最大だった。今回、フェニルボロン酸が解離するアルカリ性条件下 (pH 9.6) で、単糖を添加すると、蛍光強度が減少することを見いだした。減少の割合は、グルコースで最小だった。中性条件下 (pH 7.2) の 30 mM の糖存在下と糖不在下での、スチリルピリジニウム色素とフェニルボロン酸修飾シクロデキストリンの結合定数も求めたところ、どの糖でもアルカリ性で糖不在下の結合定数よりも小さかった。中性条件下では、グルコース存在下における結合定数が他

の糖 (フルクトース、ガラクトース、マンノース) 存在下および糖不在下に比べて有為に大きかった。このことは、単糖とフェニルボロン酸の結合で生じた負電荷と相互作用することで、スチリルピリジニウム色素がシクロデキストリンに包接されやすくなり蛍光強度が増大するが、同時にフェニルボロン酸に糖が結合すると立体障害が生じて包接の障害もおこり、グルコースが最もその立体障害が小さい構造を与える糖であることを示唆している。このように、フェニルボロン酸と糖の錯体の立体構造が蛍光色素との相互作用を制御し、従来のフェニルボロン酸単独では応答の小さかった糖に対しても応答するという機構が明らかとなった。

(3) ピレンとグアニジウム基をイソフタル酸に修飾したピンセット型の蛍光プローブは、リン酸緩衝液中ではほとんど蛍光を発しなかったが、ジメチルスルホキシドやエタノールなどの有機溶媒とリン酸緩衝液の混合溶液中では、弱い蛍光が観測された。しかし、ここに cADPR を添加しても蛍光強度の変化は見られなかった。そこで、種々の有機溶媒/水混合系や界面活性剤を用いて、より強い蛍光を観測できる溶媒系を検討したところ、カチオン性界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム $\square\square\square\square$ のミセル溶液中では比較的強い蛍光が観測された。この蛍光プローブ/CTAB ミセル溶液に $\square\square\square\square$ を添加すると蛍光強度が増大した。しかし、 $\square\square\square\square$ の加水分解物である $\square\square$ リボス $\square\square\square\square$ や、 $\square\square\square\square$ の前駆体である $\square\square$ を添加したときにも、同程度の変化を示した。したがって、蛍光強度の増大は、アニオン性の $\square\square\square\square$ が $\square\square\square\square$ の表面に集積することでミセル内の蛍光プローブの微視的環境が変化したためで、プローブは $\square\square\square\square$ と他の類似分子の構造を区別できないと考えられた。そこで別のピンセット型蛍光プローブ、すなわち、フェニルボロン酸を修飾したナフトール残基 2 個を 2-メチルプロピレンを用いて連結したビス型蛍光プローブの、cADPR に対する応答を調べた。このプローブは、エタノールとリン酸緩衝液の 1:1 混合溶液中ではあるが、cADPR 添加に対して蛍光強度の減少を示し、ナフトールが cADPR のアデニン環と π - π 相互作用していることを示唆した。さらに、 $\square\square\square\square$ や、 $\square\square$ に対する応答は cADPR に対する応答に比べて小さく、ビス型蛍光プローブは cADPR の立体構造と、 $\square\square\square\square$ や $\square\square$ の立体構造とを区別していると考えられた。エタノールを含む溶媒系であるため cADPR の溶解度が低く、プローブと cADPR の結合定数を求めることはできなかったが、このビス型蛍光プローブは、cADPR に対して蛍光

応答を示した初めてのプローブである。この結果から、cADPR に対する蛍光プローブの構造としては、アデニン環を2つの蛍光色素の π 平面で挟み込み、蛍光色素の先についたフェニルボロン酸で2つのリボースを結合するという構造が有効であることが明らかとなった。今後、スパーサーの構造や他の蛍光色素との組み合わせを検討して、選択性と感度を向上させ、また、親水基の導入により水溶性を改善することにより、完全水中で機能する cADPR 蛍光プローブが完成できると期待される。

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 1 件)

① Iwao Suzuki, Akiyo Yamauchi, Y. Sakashita, K. Hirose, T. Miura, T. Hayashita, Fluorescence Response Mechanism of D-Glucose Selectivity for Supramolecular Probes Composed of Phenylboronic-acid-modified β -Cyclodextrin and Styrylpyridinium Dyes, *Analytical Sciences*, **23**, 1167-1171, 2007 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 晶世 (YAMAUCHI AKIYO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70361110

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし