

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550092

研究課題名（和文） レセプター分子との複合体における糖鎖の高精度選択的検出法の開発

研究課題名（英文） Developments of selective detection methods of oligosaccharides bound to receptor molecule

研究代表者

田代 充（TASHIRO MITSURU）

明星大学・理工学部・准教授

研究者番号：40315750

研究成果の概要（和文）：核磁気共鳴(NMR)法によるタンパク質-リガンド複合体の分子間相互作用の検出方法の開発を行った。従来は、重水溶媒(100% D₂O)での測定例が多かったが、試料調製の効率化の観点から軽水溶液(95% H₂O+5% D₂O)での試料溶液に対して、容易に測定できる手法の開発を行った。また、汎用性と実践面を考慮し、水シグナル近傍のリガンドシグナルの検出も可能となる、要請度が高いと思われる測定方法の開発に取り組んできた。

研究成果の概要（英文）： Various new methods to detect interactions of the protein-ligand complex have been developed. Although sample solutions containing 100% D₂O were generally used in the previous studies, new methods, which can handle 95% H₂O and 5% D₂O, were required on the point of easy sample preparation with avoiding sample loss. Effective and sensitive detection of ligand signals, resonating close to water, was also performed in this research project. These methods are expected to be useful in the chemical and pharmaceutical fields.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生物学的分析、高精度選択的分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 医薬品の開発過程において有効なスクリーニング系の確立は不可欠であり、特に *in vitro* でのスクリーニング系として簡便、廉価な方法が望まれていた。当時、核磁気共鳴(NMR)法の薬剤スクリーニングへの応用が試みられ、新規なスクリーニング法として注目され始めた。

(2) 当初は、レセプターとなるタンパク

質を ¹⁵N などの安定同位体で標識し、そのタンパク質と結合するリガンド(薬剤などに相当)との分子間相互作用を2次元NMRで観測することにより、高親和性のリガンドを探索する手法が代表的なものであった。この方法では20-30分程度の短時間で結果を得られる長所があるが、安定同位体などのコストがかかることや測定可能なタンパク質の分子量に制限があることが短所として挙げられて

いた。

その後、Saturation Transfer Difference (STD) 法や water-ligand observed via gradient spectroscopy (WaterLOGSY) 法などが考案された。STD 法では、試料溶液が 100% D₂O での測定結果が論文に示されていたが、試料調製の観点からは、タンパク質の場合、溶媒交換の操作により貴重なタンパク質を損失することが多々あり、また、低分子化合物において一般的に用いられる凍結乾燥法では、溶解時にタンパク質が凝集を起こすことがあり、元のスペクトルパターンを示さないことがある。

WaterLOGSY 法は元来、軽水溶液(95% H₂O+5% D₂O)での測定方法として考案された手法であるが、水近傍のリガンドシグナルを検出するには不十分な測定法であった。これらの点を考慮すると、溶媒交換を必要とせず、水近傍のリガンドシグナルを検出できる手法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 現在までに考案されている数種類の測定法の長所・短所を踏まえ、軽水溶液(95% H₂O+5% D₂O)として測定可能であり、レセプターであるタンパク質と結合するリガンドを選択的・高感度に検出できる測定方法の開発を目的とした。

(2) 水シグナル近傍のリガンドシグナルの検出が可能なパルスシーケンスの開発も目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデルシステムとして使用した複合体

リガンド-レセプター複合体のモデルシステムとして、卵白リゾチーム-グルコースおよびヒト血清アルブミン-トリプトファンを使用した。卵白リゾチームおよびヒト血清アルブミンは、共に市販品であり入手可能である。オリゴ糖としては、3糖であるマルトトリオースおよびその誘導体である 1,6-アンヒドロ糖を使用した。

モデル化合物として実際に使用したタンパク質関連の試料溶液は以下の3種類である。

- ① 50 mM グルコース+0.4 mM リゾチーム (10 mM リン酸緩衝液 pH7.5)
- ② 2.0 mM トリプトファン+0.1 mM ヒト血清アルブミン
- ③ 2.0 mM トリプトファン+0.1 mM ヒト血清アルブミン+2.0 mM グルコース

使用した NMR は、Varian Inova-500 (¹H 観測周波数：500 MHz)である。

(2) NMR パルスシーケンス

NMR 測定法として、STD 法および Water-

LOGSY 法の2種類が、高親和性のリガンドに対しても適用可能との報告があったため、本研究では STD 法をベースに高感度化・高精度化を目指した。

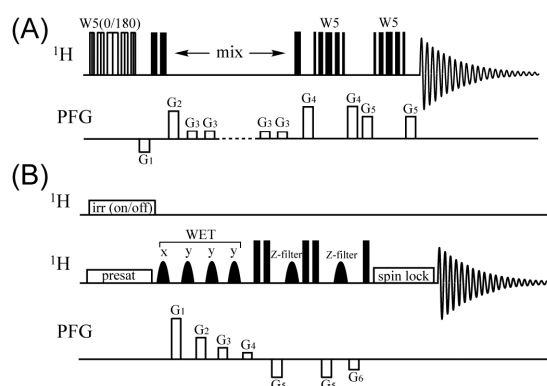


図 1. (A) Water-LOGSY, (B) STD パルスシーケンス (*Anal. Sci.* 2010, **26**, 1107-1110)

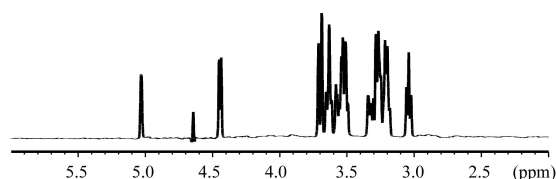


図 2. Pre-saturation および Z-filter を用いた水シグナル(4.75ppm)の消去。試料は卵白リゾチーム-グルコース複合体。

4. 研究成果

(1) Water-LOGSY および STD 法パルスシーケンス

ここ数年主流となっている STD 法および Water-LOGSY 法をベースに高感度化・高精度化の開発を行った。申請者らがこれまでに開発を行ってきた Water-LOGSY および STD 法のパルスシーケンスを図 1 に示す。

Water-LOGSY 法 (図 1 (A)) では、WATERGATE W5 シーケンスを用いて、水シグナルを選択的に励起せずに残し、この選択的に残った水シグナルを利用して、水⇒レセプター⇒リガンドへの磁化を移動させて、リガンドシグナルの選択的検出を行った。

(2) 水シグナルの消去方法の確立

水シグナル近傍のリガンドシグナルを検出するため、巨大な水シグナルを効率的に消去するパルステクニックを開発し、実際のパルスシーケンスに取り入れた。検討の結果、Z-filter を 2 回繰り返したところ、良

好な結果が得られた(図 2)。

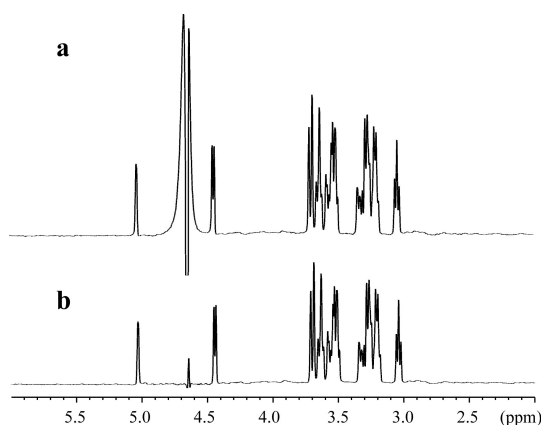


図 3. リゾチーム+グルコース複合体スペクトル。(a) preset-WET 法を取り入れた STD, (b) preset-WET-Z-filter 法を取り入れた STD パルスシーケンス

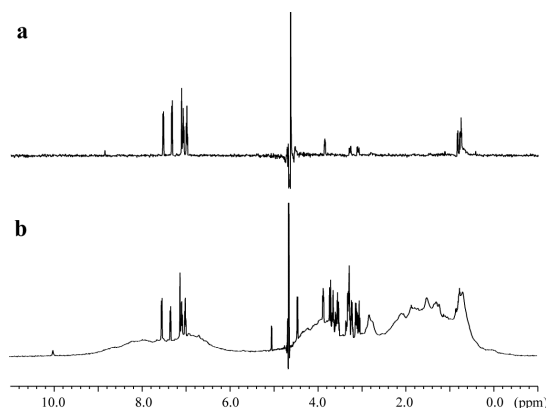


図 4. ヒト血清アルブミン-トリプトファン複合体。(a) preset-WET-Z-filter 法を取り入れた STD, (b) 通常の ^1H スペクトル。結合しないグルコースも試料溶液に添加してある。

(3) リガンドシグナルの選択的検出

① リゾチーム+グルコース複合体への応用

図 3 にリゾチーム+グルコース複合体におけるリガンド (グルコース) シグナルの検出結果を示す。preset-WET-Z-filter 法を取り入れた STD パルスシーケンスにおいて、効果的に水シグナルの消去が可能になった。

② ヒト血清アルブミン-トリプトファン複合体への応用

図 4 にヒト血清アルブミン+トリプトファン複合体におけるリガンド (トリプトファン) シグナルの検出結果を示す。(b) は通常の ^1H スペクトルであり、巨大な水シグナルが

線幅の細いシグナルとして観測され、水シグナルの近傍にあるグルコースの 1 位のシグナルも鮮明に観測されている。

(4) 総括

3 年間の研究期間を通して、水シグナルの効率的な消去方法の開発を行い、そのパルステクニックを WaterLOGSY 法および STD 法に取り入れて、リガンドシグナルの選択的検出を可能にした。ヒト血清アルブミン-トリプトファン複合体においては、結合に関与しないグルコース存在下であっても、リガンドであるトリプトファンの選択的検出を行った。他の実践的な複合体への応用を試み、本法の有用性を実証していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件) 全て査読あり

(1) 研究代表者・田代 充

1. “Demonstration of three dopamine molecules bound to α -synuclein: Implication of oligomerization at the initial stage” S. Shimotakahara, Y. Shiroyama, T. Fujimoto, M. Akai, T. Onoue, H. Seki, S. Kado, T. Machinami, Y. Shibusawa, K. Ueda and Mitsuru Tashiro, *J. Biophys. Chem.* (in press)
2. “Characterization of the complex formation of 1,6-anhydro- β -maltose and potassium ions using NMR spectroscopy and single-crystal X-ray crystallography” T. Fujimoto, T. Kato, Y. Usui, O. Kamo, K. Furihata, K. Tsubono, T. Kato, T. Machinami and M. Tashiro, *Carbohydr. Res.* 2011, **346**, 1991-1996.
3. “Selective J -resolved-HMQC-1 and -2, new methods for measuring proton-proton coupling constants in strongly coupled spin systems” K. Furihata and M. Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2011, **49**, 459-463.
4. “BIRD- J -resolved HMBC and BIRD-high resolution-HMBC pulse sequences for measuring heteronuclear long range coupling constants and proton-proton spin coupling constants in the complicated spin systems” Kazuo Furihata, M. Tashiro and H. Seto, *Magn. Reson. Chem.* 2011, **49**, 53-58.
- 5.” An effective pulse Sequence for detecting a ligand binding with a protein receptor using a WET Sequence and the repeated Z-filters”

- K. Furihata, S. Shimotakahara, Y. Shibusawa and M. Tashiro, *Anal. Sci.* 2010, **26**, 1107-1110.
6. "Identification of a discrete peroxide dianion, O_2^{2-} , in a two sodium-(1,6-anhydro- β -maltose)₂-peroxide complex" T. Kato, T. Fujimoto, A. Tsutsui, M. Tashiro, Y. Mitsutsuka, and T. Machinami, *Chem. Lett.* 2010, **39**, 136-137.
 7. "High resolution-HMBC (HR-HMBC), a new method for measuring heteronuclear long range coupling constants" K. Furihata, M. Tashiro and H. Seto, *Magn. Reson. Chem.* 2010, **48**, 179-183.
 8. "Selective *J*-resolved-HMBC, an efficient method for measuring heteronuclear long range coupling constants" K. Furihata, M. Tashiro and H. Seto, *Magn. Reson. Chem.* 2009, **47**, 814-818.
 9. "Application of WET sequence for detection of the ligand signals resonating close to water" K. Furihata, S. Shimotakahara, Y. Shibusawa and M. Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2009, **47**, 971-976.
 10. "Characterization of the complex formation of 1,6-anhydro- β -maltotriose with potassium using 1H and ^{39}K NMR spectroscopy" T. Kato, K. Tsubono, O. Kamo, T. Kato, K. Furihata, T. Fujimoto, T. Machinami and M. Tashiro, *Magn. Reson. Chem.* 2009, **47**, 948-952.
- (2) 研究分担者・吉村悦郎
1. "The binding of aluminum to mugineic acid and related compounds as studied by potentiometric titration" E. Yoshimura, H. Kohde, S. Mori, R.C. Hider, *Biometals*, 2011, **24**, 723-727.
 2. "Synechocystis ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase is capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction in the absence or presence of free flavin" J. Sato, K. Takeda, R. Nishiyama, T. Watanabe, M. Abo, E. Yoshimura, J. Nakagawa, A. Abe, S. Kawasaki, Y. Niimura, *Biometals*, 2011, **24**, 311-321.
 3. "Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase" S. Ogawa, T. Yoshidomi, E. Yoshimura, *J. Inorg. Biochem.* 2011, **105**, 111-117.
 4. "Micro total bioassay system for ingested substances: assessment of intestinal absorption, hepatic metabolism, and bioactivity" Y. Imura, K. Sato, E. Yoshimura, *Anal. Chem.* 2010, **82**, 9983-9988.
 5. "Aluminum stress increases carbon-centered radicals in soybean roots" M. Abo, H. Yonehara, E. Yoshimura, *J. Plant Physiol.* 2010, **167**, 1316-1319.
 6. "Determination of thermodynamic parameters of cadmium(II) association to glutathione using the fluorescent reagent FluoZin-1" S. Ogawa, E. Yoshimura, *Anal. Biochem.* 2010, **402**, 200-202.
 7. "A microfluidic system to evaluate intestinal absorption" Y. Imura, Y. Asano, K. Sato, E. Yoshimura, *Anal. Sci.* 2009, **25**, 1403-1407.
 8. "Revision of analytical conditions for determining ligand molecules specific to soft metal ions using dequenching of copper(I)-bathocuproine disulfonate as a detection system" S. Ogawa, R. Ichiki, M. Abo, E. Yoshimura, *Anal. Chem.* 2009, **81**, 9199-9200.
 9. "Characterization of phytochelatin synthase produced by the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*" Y. Osaki, T. Shirabe, H. Nakanishi, T. Wakagi, E. Yoshimura, *Metallomics*, 2009, **1**, 353-358.
- [学会発表] (計 4 件)
1. 田代 充、吉村悦郎「Complex formation of the sugar 1,6-anhydro- β -maltose with sodium ions as probed by NMR spectroscopy」3rd International Symposium on Metallomics, Munster, Germany, 2011 年 6 月 14-19 日
 2. 田代 充、下高原櫻子、降旗一夫、「An effective pulse Sequence for detecting a ligand binding with a protein receptor using a WET Sequence and the repeated Z-filters」52th Experimental NMR Conference, CA, USA, 2011 年 4 月 11-15 日
 3. 田代 充、町並 智也、藤本 崇、加藤 隆之「Characterization of the complex formation of 1,6-anhydro sugars with potassium using 1H and ^{39}K NMR

spectroscopy」 The 2010 International
Chemical Congress of Pacific Basin Societies
(PACIFICHEM 2010) (Honolulu, USA)
2010年12月16-20日

4. 田代 充、吉村悦郎 「Characterization of
gold nanoparticles conjugated with
2-mercaptoethanol using NMR spectroscopy」
Challenges in Inorganic and Materials
Chemistry (ISACS3), (香港、中国) 2010
年7月20-23日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 充 (TASHIRO MITSURU)
明星大学・理工学部・准教授
研究者番号：40315750

(2) 研究分担者

吉村 悦郎 (YOSHIMURA ETSURO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教
授
研究者番号：10130303