

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651242

研究課題名（和文） 分子内回転の制御を機軸とするタンパク質オン/オフ蛍光プローブの開発

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF ON/OFF FLUORESCENT PROBES FOR PROTEINS BASED ON RESTRICTION OF INTRAMOLECULAR ROTATION

研究代表者

青山 安宏 (AOYAMA YASUHIRO)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：00038093

研究成果の概要（和文）：酵素の阻害剤や基質を置換基として導入したフェニル-BODIPY プローブは対応する酵素（炭酸脱水酵素やカナマイシン修飾酵素）に結合する際、プローブの分子内回転が阻害され、蛍光強度が増大する。高蛍光化（蛍光オン化）したプローブにおいて回転が実際に阻害されていることは $^{19}\text{F-NMR}$ から実証された。本手法は、小分子の捕捉に関わる広範囲のタンパク質（酵素や受容体）に適用可能であり、その意味で汎用性が高いことが特色であろう。

研究成果の概要（英文）：Phenyl-BODIPY probes having an enzyme inhibitor or enzyme substrate moiety as a substituent binds to the corresponding enzyme, thereby undergoing restriction of internal rotation of the probe to result in enhanced fluorescence. $^{19}\text{F-NMR}$ indicates that internal rotation in concern is indeed inhibited in the probes subject to complexation-induced fluorescence enhancement. The present tool is applicable to a wide range of proteins (enzymes and receptors) and that bind to a small molecules and is characteristically versatile in that respect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生体分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光・蛍光センシング・BODIPY・炭酸脱水酵素・カナマイシン・カナマイシン修飾酵素・カナマイシン耐性菌・ $^{19}\text{F-NMR}$

1. 研究開始当初の背景

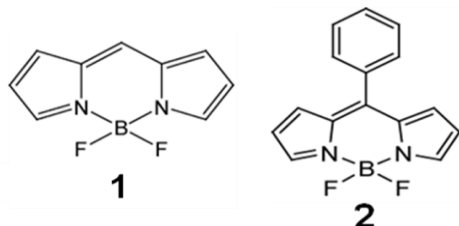
(1) 生体内の特定の物質（特にタンパク質）を“その場観察”するイメージング技術に関心が集まっている。プローブを用いた蛍光法は一般に高感度であり中核的な手法であるが、これを生体のような混雑（夾雑）系に適用する場合、いくつかの基本的な問題がある。生体イメージングにおいては標的に結合していない自由プローブを洗い流す操作が存

在しないため、標的に結合して初めて強蛍光を発する何らかのオン/オフ機能の付与が不可欠である。また、蛍光色素は一般に疎水性部位をもち、多くのタンパク質に非特異的に疎水吸着し、蛍光強度を増す。このような非特異吸着の寄与をいかに抑制するかも重要な課題である。蛍光のオン/オフ制御に関してはFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）やPET（光誘起電子移動）など、様々な工

夫が提案されているが、いずれも一般的な方法とは言いがたい。タンパク質全般に適用可能な汎用法の開発が望まれる所以である。

(2) 蛍光はエネルギー散逸過程であり、分子運動など、他のエネルギー散逸過程と競合する。弱蛍光性の色素も、凍結溶液において、あるいはタンパク質表面に疎水吸着した状態で、分子運動を抑制すれば強い蛍光を発することはよく知られている。特異的なタンパク質との相互作用によりプローブの分子運動を抑制できれば蛍光強度を特異的にオン/オフ制御できるのではないか。これが本研究の基本的な概念であった。

(3) BODIPY (boron-dipyrromethene; **1**)は高輝度(1に近い蛍光量子収率)の蛍光色素であり、かつ、蛍光が溶媒の極性に依存しないというユニークな性質をもっている。一方、フェニル-BODIPY (**2**)は例外的に弱蛍光性である。励起エネルギーがフェニル基とBODIPY骨格を繋ぐ単結合周りの回転運動に消費されるためであるとされている。事実、グリセリンのような高粘度媒体中で、あるいはフェニル基のオルト位に置換基を導入して立体的に、回転運動を抑制すると強蛍光が回復する。そこで、ベンゼン環のパラ位またはメタ位にタンパク質の標的となるような

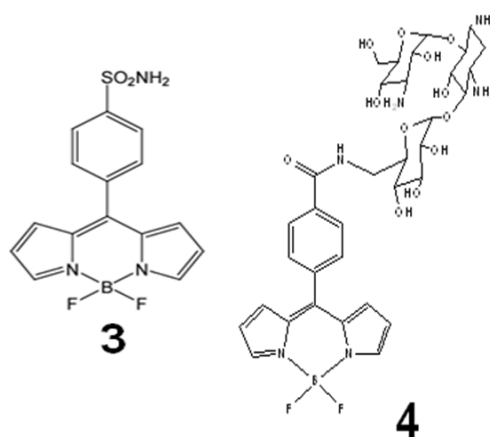


基質あるいは阻害剤部位を導入すれば、対応するタンパク質と特異的に相互作用し、(2)で述べた蛍光のオン/オフ制御が実現するのではないかと考え、研究を始めた。

2. 研究の目的

検討する酵素として炭酸脱水酵素とカナマイシン修飾酵素を選んだ。炭酸脱水酵素(亜鉛酵素)の阻害剤としてベンゼンスルホンアミドが知られている。そこで、ベンゼン環のパラ位にスルホンアミド基を導入した“阻害剤”-置換BODIPYプローブ(**3**)を合成した。カナマイシン修飾酵素はカナマイシン耐性菌が産生する酵素で、カナマイシンを化学修飾(水酸基のリン酸化)することにより抗生物質としてのカナマイシンの機能を喪失せしめる。そこで、カナマイシンをアミド結合を介してベンゼン環のパラ位に導入した“基質”-置換BODIPYプローブ(**4**)を合成した。

本研究の目的は、“阻害剤”-置換プローブ、“基質”-置換プローブがそれぞれ対応



する酵素と特異的に相互作用し、これがプローブの蛍光増強に反映され、結果としてこれら酵素の特異的な蛍光センシングが可能かどうかを検証することである。また、カナマイシンの系は、これをカナマイシン(抗生物質)耐性菌の蛍光検出に応用できるかどうかにも検討する。

オン/オフ型蛍光センシングが可能であっても、これが本当にプローブの分子内運動(分子内回転)の抑制に基づいていることを証明することは実は容易ではない。BODIPYプローブといえ、タンパク質内部の低極性環境が蛍光強度に影響を及ぼす効果を除外できないからである。別の視点からこの問題に光を当てることもこの研究の大きな目的である。

3. 研究の方法

(1) 幾何異性体。阻害剤部位や基質部位をベンゼン環のパラ位に導入した**3, 4**の他にメタ位に導入した幾何異性体プローブをペアとして用いることにした。メタ位はパラ位と比べて、回転を抑制しようとするフェニル-BODIPY単結合により近い位置にあり、したがってより有効に回転を抑制し蛍光を増強すると予想される。この予想の当否に基づき、蛍光増強のメカニズムにより深く立ち入ろうと考えた。

(2) カナマイシン修飾酵素の取得とカナマイシン耐性菌の蛍光センシング。カナマイシン耐性菌は大腸菌をカナマイシン修飾酵素の遺伝子を含むプラスミドで形質転換することにより得た。耐性菌を大量培養し、発現させたタンパク質を精製することによりカナマイシン修飾酵素を得た。耐性菌とカナマイシン置換プローブの相互作用は蛍光顕微鏡を用いて検討した。

(3) 回転阻害と蛍光増強の関係。BODIPYプローブはBODIPY骨格の前後(手前・後ろ)に突き出た2つのF原子をもっている。フェニル-BODIPY単結合が回転していれば、こ

れらは等価であるが、回転が抑制（禁止）されると非等価になる。このような視点から回転障害と蛍光増強の関係を明らかにしようとした。具体的にはオルト位にボロン酸 (B(OH)_2) 部位を有するフェニルボロン酸-BODIPY (**5**) と糖との錯形成を検討し、錯形成に基づく蛍光増強と $^{19}\text{F-NMR}$ における2つの F 原子の非等価性の関係を調べた。



4. 研究成果

(1) 炭酸脱水酵素の蛍光センシング：幾何異性体比傾向センシング。パラ位にスルホンアミド (SO_2NH_2) 基をもつ“阻害剤”—置換 BODIPY プローブ (**3**；ベンゼンスルホンアミドが炭酸脱水酵素 (CA) の阻害剤) は CA に 1 : 1 の化学量論で結合 ($K_d = 0.96 \times 10^{-7} \text{ M}$) し、蛍光強度は 2.6 倍増大する。 SO_2NH_2 の代わりに CO_2H をもつプローブを用いた場合、あるいは酵素として CA の代わりにリゾチームを用いた場合は、蛍光増強が起こらない。したがって、スルホンアミドプローブと CA の相互作用は特異的である。しかし、血中タンパク質であるアルブミンを大量に用いた場合はプローブ **3** はこれと非特異的に結合し、無視できない蛍光増強をもたらす。メタ体プローブ (**3** のメタ異性体) もパラ体同様 CA に強く結合するが、意外なことに蛍光強度は約半分に減少する。一方、アルブミンとの相互作用はパラ体同様の蛍光増強をもたらす。その結果、パラ体プローブの蛍光変化とメタ体プローブの蛍光変化の比 (幾何異性体比) は特異酵素 CA に対しては約 5 であるのに対し、非特異酵素であるアルブミンに対しては約 1 であり、このようにして特異的相互作用と非特異吸着を区別できることが明らかになった。

(2) 蛍光強度の二面角依存性。理論的な考察によれば、フェニル-BODIPY の最安定励起状態は共平面構造 (ベンゼン環と BODIPY 骨格に関し) であり、これが無蛍光的に熱失活するのが弱蛍光の原因である。スルホンアミドプローブの場合、スルホンアミド基は酵素 CA の亜鉛イオンに結合 (配位) する一方、疎水性の BODIPY 骨格は近傍のタンパク質 (CA) の疎水部位に疎水吸着するであろう。すなわち、プローブはスルホンアミド部位と

BODIPY 部位の 2 点で酵素に固定されることになる。その際、ベンゼン環と BODIPY 面の二面角がパラ体とメタ体で異なるのはある意味で当然であろう。パラ体は蛍光性の振れた構造 (大きな二面角) に、メタ体は無蛍光性の共平面構造 (小さな二面角) に固定されるのであろう。一方、アルブミンの場合、プローブのスルホンアミド基はこの非特異タンパク質との相互作用に関与しない。BODIPY 部位とベンゼン環からなる疎水領域の疎水性相互作用がアルブミンへの結合の主要な駆動力であり、その際、ベンゼン環と BODIPY 面の二面角 (したがって蛍光強度) が異性体構造 (パラかメタか) に依存しないのは当然である。いずれにしても非特異吸着は常に蛍光センシングにおける悩ましい問題であり、ここに、これを特異的な相互作用から区別する方法 (幾何異性体比蛍光センシング) が提示されたことになる。

(3) カナマイシン修飾酵素の蛍光センシング。パラ位にカナマイシン部位をもつ“基質”—置換 BODIPY プローブ (**4**) はカナマイシン修飾酵素に 1 : 1 の化学量論で結合 ($K_d = 0.67 \times 10^{-6} \text{ M}$) し、蛍光強度を 10.5 倍に増大する。カナマイシン部位の代わりに同じく抗生物質であるアンピシリン部位をもつプローブを用いた場合、あるいは酵素としてリゾチームを用いた場合は、蛍光増強が起こらない。したがって、ここでもプローブと酵素の相互作用は特異的である。メタ体プローブ (**4** のメタ異性体) もパラ体同様カナマイシン修飾酵素に強く結合するが、蛍光増強は 1.5 倍と小さい。パラ体プローブがメタ体プローブよりも大きな蛍光増強をもたらす点では上記の CA プローブの場合と同じである。

(4) カナマイシン耐性菌の蛍光センシングの試み。カナマイシンプローブ (パラ体) のカナマイシン修飾酵素への結合が大きな (10 倍以上) の蛍光増強をもたらすことから、これを用いたカナマイシン耐性菌 (カナマイシン修飾酵素を産生) の蛍光センシングを検討した。しかし、結果はネガティブだった。この酵素は ATP を用いてカナマイシンの水酸基をリン酸化する。したがって、酵素のカナマイシン結合部位の近傍に ATP 結合サイトが存在する。種々検討した結果、カナマイシンプローブは ATP 不在下では修飾酵素に強く結合し蛍光増強をきたすが、ATP 存在下では酵素に強く結合できないことが判明した。先に酵素に結合した ATP がプローブの BODIPY 部分と立体的に干渉し、プローブの酵素への結合を阻害するためである。このように、共基質としての ATP を含む本系ではうまくゆかなかつたが、共基質を必要としないより単純な酵素の場合には、抗生物質を基質とする

酵素の蛍光センシングを抗生物質耐性菌の蛍光センシングに応用できる可能性は十分に残されているだろう。耐性菌の問題は深刻であり、より簡便で精緻な検出方法の開発が望まれている。

(5) 回転障害と蛍光増強。フェニルボロン酸-BODIPY (5) はオルト位に sp² 混成のボロン酸部位 (B(OH)₂) を有し、ベンゼン環-BODIPY 単結合は束縛自由回転の状態にある (蛍光量子収率、~0.16)。ボロン酸は糖 (例えばフルクトース) を含むジオール類と錯 (ボロン酸エステル) 作成することはよく知られているが、フルクトースと結合すると蛍光強度は約 6 倍増大する (蛍光量子収率、~1)。オルト位に種々の置換基 (ボロン酸エステルを含む) を有する一連のオルト置換フェニル-BODIPY の蛍光強度と ¹⁹F-NMR を検討したところ、ボロン酸エステルのように大きな置換基の場合は蛍光強度が大きく、かつ F-NMR において 2 つの F 原子が非等価であることが判明した。この結果は、置換基が大きいとベンゼン環-BODIPY 単結合の回転が禁止され、2 つの F 原子は一つが置換基と同じ側、他方が反対側と非等価になり、そのような非等価系の蛍光強度が大きいかを示すものである。これにより、回転が障害され蛍光強度が増強するという研究の基本戦略が正しいことが実証された。

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 T. Tsuji, K. Gonda, Y. Aoyama, T. Tokunaga, S. Sando, “Inhibitor-Substituted BODIPY as a Turn-on Fluorescence Probe for Enzymes”, *Chem. Lett.*, **40**, 1275-1277 (2011) (DOI: 10.1246/cl.2011.1275), 査読有。

[学会発表] (計 9 件)

- ① 井出敬一朗・清水康映・山本達望・青山安宏、“抗生物質耐性菌の蛍光センシング”、第 64 回有機合成化学協会関東支部新潟シンポジウム、2012 年 12 月 1 日、長岡技術科学大学、長岡、新潟。
- ② 辻智広・権田勝也・青山安宏・徳永武士・山東信介、“幾何異性体比蛍光センシング—特異的相互作用と非特異吸着の区別—”、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 6 日、北海道大学、札幌。
- ③ 井出敬一朗・清水康映・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質置換 BODIPY

を用いる抗生物質耐性菌の蛍光センシング”、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 7 日、北海道大学、札幌。

- ④ 平井丈士・青山安宏、“BODIPY 色素における内部回転の障害と蛍光増強—糖のセンシングへの応用”、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 7 日、北海道大学、札幌。
- ⑤ 井出敬一朗・清水康映・水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光プローブの開発と応用”、2011 年日本化学会西日本大会、2011 年 11 月 12 日、徳島大学、徳島。
- ⑥ 平井丈士・青山安宏、“BODIPY 色素における内部回転の障害と蛍光増強”、2011 年日本化学会西日本大会、2011 年 11 月 12 日、徳島大学、徳島。
- ⑦ 井出敬一朗・清水康映・水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光プローブの開発と応用 (1)”、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 13 日、つくば国際会議場「エポカルつくば」、筑波、茨城。
- ⑧ 清水康映・井出敬一朗・水上久美・青山安宏・徳永武士・山東信介、“抗生物質部位を有する蛍光プローブの開発と応用 (2)”、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 13 日、つくば国際会議場「エポカルつくば」、筑波、茨城。
- ⑨ 平井丈士・青山安宏、“BODIPY 色素における内部回転の障害と蛍光増強”、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 13 日、つくば国際会議場「エポカルつくば」、筑波、茨城。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 安宏 (AOYAMA YASUHIRO)
同志社大学・理工学部・教授
研究者番号：00038093

