

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350983

研究課題名(和文) 生物発光共鳴エネルギー移動機構を利用した低分子化合物の光イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of bioluminescent probe for small compound based on BRET

## 研究代表者

呉 純 (WU, CHUN)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：90415646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生物発光共鳴エネルギー移動機構とファージディスプレイ技術を利用した低分子代謝産物の光プローブの創製ならびにその測定法の開発を行った。まず、低分子化合物S-アデノシル-L-ホモシステインに結合する二つのペプチドの探索を行った。次に、2つのペプチドをつなぐリンカー配列が選定され、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質の間に挿入したDNAコンストラクトを調製した。さらに、融合タンパク質の生物発光共鳴エネルギー移動を利用したSAHの観察を試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop an optical probe for imaging small molecule by using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) method and phage display technique. First, two peptides which have affinity for S-adenosyl-homocysteine were selected from phage library. Then the linker peptide between the selected peptides were optimized. The DNA coding the selected peptide was inserted to the DNA construct containing *gaussia luciferase* and *green fluorescent protein* genes. Finally the detection of SAH was examined by monitoring of the BRET signal of the fusion protein.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：発光プローブ ペプチド ファージ 生物発光共エネルギー移動 ルシフェラーゼ 蛍光タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において細胞、組織や個体内の生体分子の可視化に対するニーズが高まっている。蛍光タンパク質やルシフェラーゼは遺伝子工学手法によって目的タンパク質に容易に融合できるので、細胞中のタンパク質の可視化プローブとして広く利用されるようになった。また、発光クラゲで見られるような生物発光共鳴エネルギー移動機構現象すなわち青い発光タンパク質と緑色蛍光タンパク質を距離的に近づけると、青い発光タンパク質の発光エネルギーが緑色蛍光タンパク質を励起し、緑色の発光が生じることを利用して、光学フィルターを備えた高感度 CCD カメラやスペクトルメーターによって、タンパク質間の相互作用を観察することができるようになった。このように蛍光タンパク質やルシフェラーゼはタンパク質やタンパク質間の相互作用を可視化するのに欠かせないツールとなっている。

### 2. 研究の目的

従来、細胞や組織をすり潰して生体分子を定量する分析手法は、生体分子の機能を十分に解明することができなかつたが、近年蛍光タンパク質やルシフェラーゼの登場によって生きた細胞においてもタンパク質を標的とする生体分子動態や機能の可視化が可能となった。一方、分子量 500 以下いわゆる低分子代謝産物については主に PET イメージング法や MALDI-TOF-MS イメージング法が開発されたものの、主に組織や生体を測定対象とするイメージング手法である。これらのイメージング方法は、生きた細胞での低分子化合物の可視化には適応するのが難しい。このような背景から、新しい細胞レベルでの低分子代謝産物を対象とする光プローブの開発が望まれる。

### 3. 研究の方法

これまで、細胞中にある低分子代謝産物の分析手法としては細胞をすり潰し、目的分子を抽出した後に、LC/MS などの機器分析あるいは抗体による ELISA 法によって行われている。その場合、細胞における化合物の時間・空間の情報を得ることができない。本研究は低分子代謝産物をサンドイッチするペプチドがファージディスプレイ技術によって選定し、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質に融合させ、生物発光共鳴エネルギー移動機構に基づく細胞用の発光イメージングプローブの創製を試みる。

研究の初期段階では、細胞内重要な低分子代謝産物である S-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH) を対象とした。この化合物はメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (SAM) を補因子とする DNA、RNA、タンパク質や低分子化合物のメチル化反応の副生産物であり、ホモシステインとアデノシンの生合成の前駆体である。本研究では、まず化合物

物 SAH のホモシステインのアミノ基を介してマグネットビーズに固相化し、ファージディスプレイ技術を用いて、アデノシル骨格に結合するペプチドの選定を行う(図 1)。また、得られるペプチドをビオチン化し、アビジンビーズに固定化してから、SAH を添加させて複合体を調製する。さらに、ファージライブラリーを用いてその複合体に対するペプチドの選定を行う。これら選定されるファージの DNA 配列が、オーバーラップエクステンション PCR 法によってルシフェラーゼに融合させてから増幅させる。得られる DNA の転写・翻訳は市販の無細胞翻訳キットを用いて行う。さらに、融合タンパク質が SAH に対する親和性を確認する。

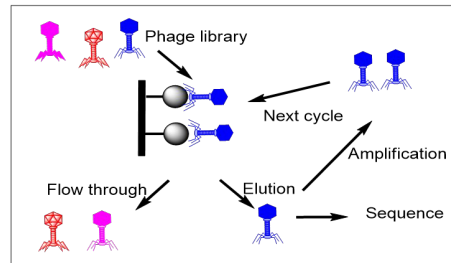
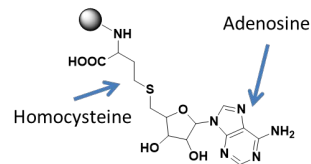


図 1 SAH に対するファージディスプレイによるスクリーニング実験

化合物 SAH の一分子イメージングプローブを構築するため、SAH に対するファージディスプレイによるスクリーニング実験で得られる 2 つのペプチドのリンカー配列の最適化を行う。具体的には、2 つペプチドをコードする DNA 配列の間に 21mer のランダムに合成したオリゴヌクレオチドを繋ぎ、T7 ファージ DNA ベクターに組み込んで大腸菌に感染させることによって得られるファージライブラリーを調製し、再度 SAH に対するスクリーニング実験を行う。

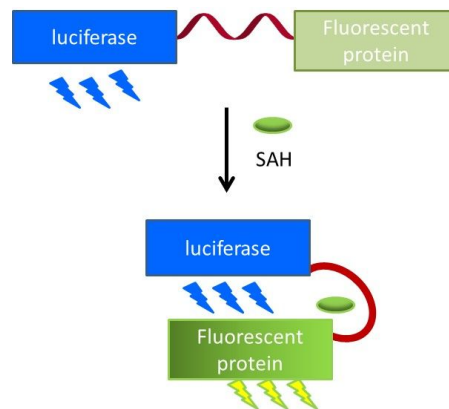


図 2 生物発光共鳴エネルギー移動機構に基づくプローブの作製

以上の方法で得られるペプチド配列を蛍光タンパクとルシフェラーゼの間に挿入した融合タンパク質発現を行い、SAH に依存する生物発光共鳴エネルギー移動機構タイプの光イメージングプローブの構築を行う(図2)

#### 4. 研究成果

(1)まず、ファージディスプレイによるスクリーニング実験を行うため、論文の条件に従ってSAHのアミノ基を介してマグネットビーズに固定化した。つぎに、市販の直鎖状のランダムヘプタペプチドライブラリーを用いてスクリーニング実験を行った。しかし、得られたファージクローンにはコンセンサス配列が見られなかった。一方、二つのシステイン残基のSS結合によって環化されているランダムヘプタアミノ酸配列を提示するPh.D.-C7Cを用いた場合、ファージクローンからCRGATMSCという配列が多数見つかった。さらに、同じアデノシン基を有するアデノシン三リン酸(ATP)の末端リン酸基を介して固相化し、同様にPh.D.-C7Cを用いてファージスクリーニング実験を行った結果、CRGATMSCという配列が含まれたことから、このペプチド配列はアデノシン基に認識する可能性は高いことが強く示唆された。そこで、この配列をCypridina noctiluca ウミホタルルシフェラーゼ(Gluc)に融合した発現ベクターを調製した。無細胞翻訳発現キットを使用して融合タンパク質の発現を試みた。しかし、融合タンパク質のウミホタルルシフェラーゼ活性が殆ど見られなかった。これは、得られたペプチドとGlucとの融合タンパク質には合計で36個のシステイン残基があるため、非天然SS結合を形成して不活性となったためと推定した。これに対して、得られたペプチドと深海コペポータ由来のGaussia princeps ルシフェラーゼ(Gluc)との融合タンパク質は、Glucのみのタンパク質の発現量や発光活性と比べても、大きな活性低下は見られなかった(図3)

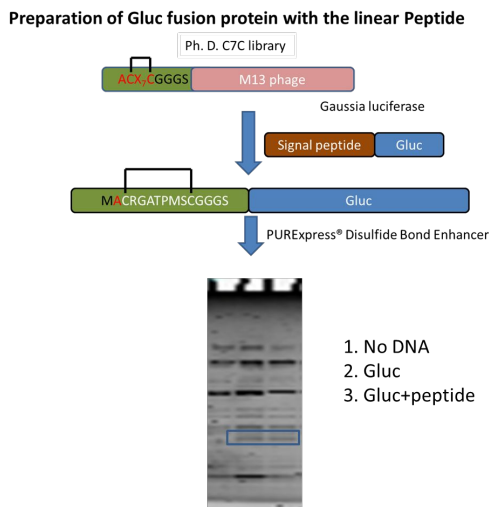


図3、ペプチドとGlucとの融合タンパク質の発現

ガウシアルシフェラーゼには10個システインを持っているが、ペプチド由来の2つのシステインがGlucの天然のSS結合の形成には影響を与えないことが明らかになった。さらに、SAHのアミノ基を介して96ウェルマイクロプレートに固定し、得られた融合タンパク質とSAHの親和性をGlucのルシフェラーゼ活性で評価した。その結果、融合タンパク質がSAHに吸着することを確認した。以上のことから、環状ペプチドが低分子化合物を認識するのに重要であることがわかった。(2)化合物SAHを挟む2つ目のペプチドを得るため、得られたアミノ酸配列情報を基にビオチン化ペプチドを調製した。そのペプチドがストレプトアビジンビーズに固相化され、SAHを添加してペプチドとの複合体を調製した。この複合体に対して再度ファージスクリーニングを行うと同時に、SAHを添加しない条件でのネガティブセレクションを行った。最終ラウンドで得られた16個のファージクローンのDNA配列を解析した結果、重複した配列を除いて新規の7ファージクローンのDNA配列が見つかった。そこで、無細胞翻訳系を用いて7クローンのDNA配列にコードするヘプタペプチドとGlucとの融合タンパク質のハイスループットのタンパク質合成を検討した。無細胞系タンパク質合成用反応液をニッケルカラムにて精製し、融合タンパク質の発光活性を調べた。その結果、すべての融合タンパク質が発光活性を示した。さらに、ビオチンペプチドをストレプトアビジン介して96ウェルマイクロプレートに固定し、SAHの存在下で吸着した融合タンパク質の発光活性を96ウェルプレートルミノメーターによって測定し、調製した融合タンパク質の中で複合体に対する最も親和性が高いペプチドを決定した(図4)

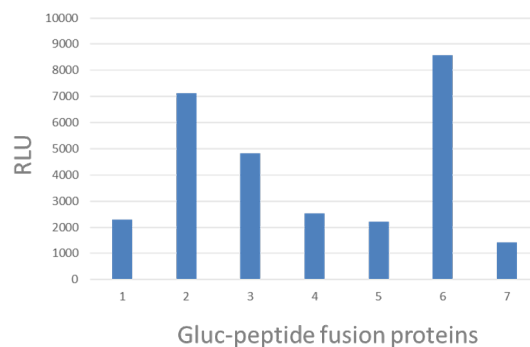


図4、マイクロプレートアッセイによるGLucとペプチドとの融合タンパク質の評価

(3)一分子発光プローブを構築するため、これまで同定した2つの独立したペプチドをコードするDNA配列の間に新たに21merのランダムオリゴヌクレオチドを挿入し、T7ファージDNAベクターに組み込み、大腸菌に感染させることによって得られたファージライブラリーを調製した。その自家製のファージライブラリーを用いて、SAHのジオールを

酸化してヒドロキシアミン・ビオチン・ストレプトアビジンを介して固相化したビーズに対するファージスクリーニング実験を行い、得られたファージクローンの DNA 配列を解析した。解読した複数の DNA 配列を基に、ルシフェラーゼと蛍光タンパク質の DNA 配列の間に同定したファージクローンの配列を挿入したプラスミドを調製し、無細胞翻訳系を用いて融合タンパク質の合成を行った。合成した融合タンパク質がニッケルカラムによって精製された後に、化合物 SAH とインキュベーターし、光学フィルターを備えた 96 ウェルプレートルミノメーターを用いて生物発光共鳴エネルギー移動の観察を行った。しかし、生物発光共鳴エネルギー移動に依存した緑色蛍光のシグナルは弱いため、SAH を応答する最適した配列の同定にはまだ至っていない。

## 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. Wu C, Tzertzinis G. Selection of a mimotope peptide of S-adenosyl-L-homocysteine and its application in immunoassays. *Molecules*. 2013 Oct 18(10):13020-6.

[学会発表](計 1 件)

1. 西宮佳志、森田陽介、呉純、近江谷克裕、扇谷悟、森田直樹：「変異導入による *Cypridina noctiluca* 由来分泌型ルシフェラーゼの発光特性変化」大 5 回日本タンパク質科学会 徳島市 2015 年 6 月 26 日

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/gr/cms-4/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

呉 純 (WU CHUN)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：90415646