

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560403

研究課題名(和文) 光受容蛋白質を利用した光活性化小分子の開発と生物応用

研究課題名(英文) Development of photoactivatable molecule using photoreceptor protein and its application

研究代表者

堀 雄一郎 (Hori, Yuichiro)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00444563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ケージド化合物は、生理活性物質を光制御することのできる有用な機能性分子である。一方、照射する光が紫外光である場合や、合成過程で光分解を起こしやすいなどの問題がある。そこで、この問題を解決することを目的として、本研究では、光受容タンパク質であるPYPとその新規リガンドである2,4-ジヒドロキシ桂皮酸の異性化反応を利用して、リガンドがPYPに結合したとき、光構造変換が促進されるシステムを構築する。

研究成果の概要(英文)：Caged compounds are useful functional molecules that can control its bioactivity. On the other hand, there are some problems that some of the compounds require UV irradiation or undergoes photodegradation during syntheses. Herein, to overcome these problems, we create a novel photoconversion system using a photoreceptor protein, PYP, and its newly found ligand, 2,4-dihydroxycinnamic acid. In this system, the ligand binds to PYP and induces photoisomerization and the subsequent structural change upon irradiation with visible light.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：光受容タンパク質 PYP 光構造変換

1. 研究開始当初の背景

光照射により構造変換する分子は、生体機能を解析する化学ツールとして極めて魅力的である。特に、ケージド化合物は、光分解保護基を生理活性分子に組み込むことで、その分子機能を高い時空間分解能で光制御できることから、生命科学研究において広く応用されている。今日、ニトロベンジル系及びクマリン系のケージド化合物は、小分子化合物からタンパク質のような高分子に至る種々の分子の活性部位の光制御に用いられている。しかしながら、これらの化合物のように汎用されているものの多くは紫外線(紫光)(300~400 nm)照射を必要とし、細胞損傷や組織の光透過性が低いなどの問題があり、より長波長の光で構造変換できる分子が求められている。一方、近年、長波長光で光分解するケージド化合物が開発されつつある。しかしながら、可視光により光分解する化合物は、光分解効率が高いものほど、できる限り暗所で合成・使用する必要があり、このことは、実験を行ううえでの制限になる。このため、通常は安定で、特定のタイミングにおいてのみ光分解しやすいといった性質を持つ化合物が望ましいものの、これは相反する性質を同時に達成する必要があるという問題点がある。そこで、本研究では、この問題を解決するために、作用部位に到達するまでは、光分解が起こりにくく、作用部位に到達して初めて可視光により、分解する新たなコンセプトを持ったケージドシステムを開発する。

報告者は、紅色硫黄細菌由来の光受容タンパク質である **photoactive yellow protein (PYP)** をタグタンパク質として用いて、標的タンパク質を合成蛍光プローブにより標識・イメージングする技術を開発してきた。PYP タグは、125 アミノ酸からなる小タンパク質であり、リガンドである桂皮酸やクマリンの誘導体と 69 番目の Cys を介してチオエステル交換反応により特異的に結合することが知られている。これまでに、遊離状態では非蛍光性であり、PYP タグと結合することで、蛍光強度を上昇させる所謂発蛍光プローブを開発してきた。この発蛍光プローブにより、細胞膜上や細胞内のタンパク質を細胞の洗浄操作を行うことなく、迅速かつ特異的に標識・イメージングしてきた。本研究では、PYP タグのリガンドの一つである、4-ヒドロキシ桂皮酸が PYP タグと結合した時の特徴的な性質を応用することで、光照射により、構造変換する分子システムの開発を行った。

2. 研究の目的

これまで主に紫外光で光分解するケージド化合物が汎用されているものきたが、生物学的損傷を回避する観点や、厚みのある組織での応用を考慮したとき、より長波長の光により分解する化合物の開発が望まれている。一方、化合物調整の観点から、作用部位

でのみ、可視光分解する化合物の開発ニーズが高まっている。本研究では、この新たなニーズを満たし、既存のケージド化合物の問題点を解決することを目的として、タンパク質に結合したときのみ可視光を吸収し、それにより構造変換する新規分子システムを構築する。この目的を達成するために、光受容タンパク質の一種である PYP を利用し、PYP のリガンドである 4-ヒドロキシ桂皮酸の光学的性質に着目した。

本研究では、4-ヒドロキシ桂皮酸の特徴を精査し、PYP と結合したとき可視光を吸収し、その分子構造を変換する分子システムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

PYP のバクテリア内における本来の役割は、青色光 (446 nm) をバクテリアが受けた時、PYP と結合した 4-ヒドロキシ桂皮酸が **cis-trans** 異性化反応を引き起こし、タンパク質の構造変化が起こり、それがシグナルとして、最終的に細菌の光走化性反応に繋げていくことである。この現象において、報告者は、以下の3点について着目した。

- ・リガンドである 4-ヒドロキシ桂皮酸は、遊離の状態では紫外光を吸収するのに対し、PYP の Cys69 とチオエステル結合し PYP 内部に取り込まれるとその吸収スペクトルが大きく変化し、青色光を吸収ようになる。この青色光の吸収後、**cis-trans** 異性化反応を引き起こす。

- ・リガンド結合部位周辺のアミノ酸に変異を導入すると、変異させるアミノ酸の種類によって、桂皮酸の吸収波長が更に長波長化する。

- ・化合物としての 4-ヒドロキシ桂皮酸エステルは、2 位にヒドロキシ基を有するとき、光照射により **cis-trans** 異性化が起こるだけでなく、その後に環化反応が起こりエステルが分解しクマリン環が生成する。

このことから、2 位にヒドロキシ基を有する桂皮酸を PYP リガンドとして設計することで、リガンドが PYP に結合したとき青色光で励起され、異性化反応後、リガンドと PYP のチオエステル結合が切断されクマリンが生成し、PYP から解離すると考えた (図 1)。更に、変異体を利用することで、PYP に結合した分子の更なる長波長光励起が期待できる。

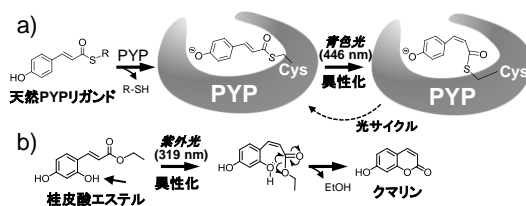


図 1. a) PYP に結合した 4-ヒドロキシ桂皮酸の青色光による異性化反応。b) 2,4-ジヒドロキシ桂皮酸の光環化反応。

PYP のリガンド合成は、WSCD HCl、HOBt、TEA を用い、2,4-ジヒドロキシ桂皮酸とチオフェノールを DMF 中で縮合させた。反応物を酢酸エチルで抽出後、ブライン及び Na₂SO₄ で処理し、溶媒除去後、高速液体クロマトグラフィーにて精製した。得られた化合物を DHCA と命名した。DHCA は、¹H-NMR、¹³C-NMR 及び高分解能質量分析法 (CI) にて同定した。

PYP 変異体である PYP E46Q は、Quikchange (アジレントテクノロジー社) により、プライマーとして 5' -ACAACGCCGCGCGCAGGGCGACATCAC-3' 及び 5' -GTGATGTCGCCCTGCGCGCGGTTGT-3' を、テンプレート DNA として pET21b-His-PYPwt を用い、作成した。また、PYP R52A に関しては、プライマーとして 5' -GGCGACATCACCGCGCGGACCCGAAGCAG-3' 及び 5' -CCGCTGTAGTGGCCGCGCTGGGCTTCGTC-3' を用い、E46Q 変異体と同様の方法で作成した。また、PYPwt 及び PYP E46Q のタンパク質は、大腸菌 BL21 (DE3) において発現させた。まず、それぞれの遺伝子で大腸菌をトランスフォームし、37°C で培養後、100 µM IPTG を添加し、発現誘導を行った。このとき、培養温度を 20°C に低下させ、オーバーナイトで培養した。その後、遠心操作により大腸菌を回収後、超音波により破碎した。破碎液を遠心し、可溶性画分を回収した。次に、可溶性画分を Ni 錯体が固定された樹脂 (ノバジェンまたはロシュ) に添加し、タンパク質を吸着後、イミダゾール溶液により溶出し、ゲル濾過 (Superdex 75) により精製を行った。

DHCA と PYP の結合反応は、紫外可視分光光度計 (UV-2450、島津製作所) を用いて観測した。また、光照射実験は、キセノン光源 (MAX-302、朝日分光社) を用いて行った。環化反応の形成は、蛍光分光計 (F-4500、日立ハイテクサイエンス社) を用いて、蛍光強度の上昇により確認した。

4. 研究成果

(1) DHCA と PYPwt 及び各種変異体の結合反応に関する検討

DHCA と PYPwt の結合反応を吸収スペクトルを測定することにより確認した。4-ヒドロキシ桂皮酸は PYPwt に結合するとき、446 nm に極大を持つ吸収ピークを示すことが知られている。このため、4-ヒドロキシ桂皮酸誘導体である DHCA も PYPwt に結合すると同様の波長領域に吸収ピークを示すと考えた。まず、DHCA 単独の吸収スペクトルを 37°C で測定したところ、360 nm 付近に大きな吸収ピークを示した。次に、DHCA と PYPwt を 37°C で反応させ、吸収スペクトルを測定したところ、4-ヒドロキシ桂皮酸の時に比べ、レッドシフトした 455 nm 付近に吸収極大を持つピークが時間の経過とともに出現した。これに対し、DHCA 単独のときには、そのような吸収ピークは確認されなかった。一方、DHCA 単独では、経時的に 360 nm 付近のピークが減少することが確認された。このピークの減少は、温度

を 37°C から 25°C に低下させると、抑制された。このことは、37°C では、桂皮酸の二重結合部分が熱異性化していることが示唆された。

次に、PYP のリガンド近傍にある Glue46 を Gln に変異した E46Q 変異体に関して検討した。E46Q の変異は、4-ヒドロキシ桂皮酸が PYP に結合した時の吸収極大波長を 15 nm レッドシフトさせることが報告されている。そこで、DHCA に関しても、PYP E46Q に結合した時、同様に吸収波長の長波長化が起こると考えた。DHCA と PYP E46Q を反応させて、吸収スペクトルを測定したところ、463 nm に吸収極大波長が観測された。このことから、変異体を用いることで、波長の長波長化が起こることが示された。一方で、その吸収ピークは時間の経過とともに消失し、短波長側 (<380 nm) の吸光度が増大することが示された。このことから、E46Q の変異は、吸収スペクトルの長波長化をもたらすものの、PYP タグとの結合後に熱異性化を促進していることが考えられた。

次に、リガンド結合部位の周辺に存在する 52 番目の Arg に着目した。R52A 変異の吸収スペクトルへの影響を検討した。DHCA と PYP R52A を反応させ、吸収スペクトルを測定したところ、E46Q に比べ、より長波長の 465 nm に吸収極大を持つピークを観測した。一方、E46Q のときのように、その吸収ピークの減少は観測されなかった。このことから、R52A の変異導入により、熱異性化を促進することなくリガンドの吸収波長の長波長化が可能であることが示された。

(2) DHCA の光環化反応に関する検討

DHCA は、光環化反応を引き起こすと、7-ヒドロキシマリリンが生成する。7-ヒドロキシマリリンは、蛍光性であるため、光照射後に蛍光測定を行うことで、光環化反応を観測することができる。

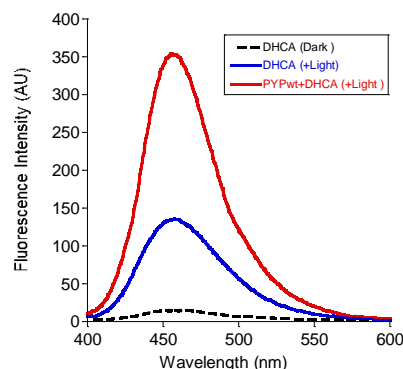


図 2. DHCA の光環化反応の蛍光スペクトルによる観測。

そこで、DHCA と PYPwt を反応させ、450 nm の光を照射し、蛍光測定を行った (図 2)。その結果、455 nm 付近に蛍光極大を持つピーク

クが観測された。この結果と前述の吸収スペクトルの実験結果から、DHCA と PYPwt は結合し、光環化反応を引き起こしたと考えられる。一方、DHCA 単独の状態に、同様に光照射したところ、蛍光強度の増大が観測された。DHCA 単独の吸収ピークは、360 nm 付近にあるが、その吸収が大きく 450 nm 付近にも若干の吸収を示す。この光吸収の結果、光環化反応が起こったと考えられる。しかしながら、その蛍光強度の増大度は、PYPwt 存在下の時に比べ小さく、PYPwt は、DHCA の光環化反応を促進したといえる。

(3) 結論

報告者は、光受容タンパク質とそのリガンドを利用することで、光構造変換を引き起こす化合物 DHCA を開発した。この技術のコンセプトは、タンパク質と反応した時、光構造変換が加速されるという新規なものである。PYP への変異導入によって、DHCA の吸収波長の長波長化が確認されており、今後変異導入の最適化により、更なる長波長化が期待できる。また、変異導入による更なる長波長化により、DHCA 単独の吸収とのオーバーラップをなくすことで、DHCA 単独での光構造変換を防ぐことができると考えられる。

本システムは、分子の構造をタンパク質との結合と光照射によって制御できるものであり、生理活性物質のより高い時空間制御が可能であり、種々の生命現象への解明に有用なツールを提供する。

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 3 件)

① Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi. “Protein Labeling with Fluorogenic Probes for No-Wash Live-Cell Imaging of Proteins” *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 644-650 (2013) DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.05.015. (査読有)

② Yuichiro Hori, Tomoya Norinobu, Motoki Sato, Kyohei Arita, Masahiro Shirakawa, Kazuya Kikuchi. “Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins” *J. Am. Chem. Soc.* 135, 12360-12365 (2013) DOI: 10.1021/ja405745v. (査読有)

③ 堀 雄一郎、菊地 和也 「PYP タグと発蛍光プローブを用いた生細胞タンパク質イメージング法の開発と応用」 *バイオサイエンスとインダストリー「トピックス」*、72、188-189 (2014) (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

① Yuichiro Hori, Shinya Hirayama, Motoki Sato, Norimichi Otomura, Yuko Kamikawa, Kazuya Kikuchi. “Development of Fluorogenic Probes for Labeling Photoactive Yellow Protein (PYP) Tag and No-wash Live-Cell Imaging” ICSG2013-SLS, 2013/7/30, KEIO PLAZA HOTEL SAPPORO (Sapporo・Hokkaido)

② Yuko Kamikawa, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi. “Development of Novel Photoactive Yellow Protein Tag Mutants for Improved Labeling Rate and Application to Live Cell Imaging” The 27th Annual Symposium of the Protein Society, 2013/7/20, Boston (USA)

③ 平山 真也、堀 雄一郎、菊地 和也、 「Photoactive yellow protein (PYP) タグと長波長蛍光プローブを利用した蛋白質のマルチカラーイメージング技術の開発」、日本分子イメージング学会第 8 回学会総会・学術集会、2013/5/31、横浜赤レンガ倉庫 1 号館 (神奈川・横浜)

④ 佐藤 基、堀 雄一郎、菊地 和也、「アニオン性蛍光プローブのラベル化速度を向上させたタグ蛋白質 PYP 変異体の開発」、日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会、2013/6/21、東京医科歯科大学 (東京・文京区)

⑤ 堀 雄一郎、佐藤 基、菊地 和也、「環境応答性発蛍光プローブと PYP タグを利用した細胞内蛋白質高速イメージング技術の開発と生物応用」、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013/9/27、名古屋大学 (愛知・名古屋)

⑥ 平山 真也、堀 雄一郎、菊地 和也、「PYP タグと長波長蛍光プローブを利用した蛋白質マルチカラーイメージング技術の開発、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム」、2013/9/27、名古屋大学 (愛知・名古屋)

⑦ Yuichiro Hori, Motoki Sato, Kazuya Kikuchi. “Development of PYP-tag mutants and fluorogenic probes for rapid imaging of intracellular proteins” EMBO/EMBL symposium, Seeing is Believing - Imaging the Process of Life, 2013/10/3-6, Heidelberg (Germany)

⑧ Shinya Hirayama, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi. “Development of Multicolor Protein Imaging Method Utilizing PYP-tag and Its Long-wavelength Fluorescent Probes, EMBO/EMBL symposium” Seeing is Believing - Imaging the Process of Life, 2013/10/3-6, Heidelberg (Germany)

⑨ Yuko Kamikawa, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi. “Development of PYP-tag mutants for protein labeling with fluorogenic probe” The 2nd Annual Conference of the International Chemical Biology Society, 2013/10/8, Shirankaikan (Kyoto・Kyoto)

⑩ Yuichiro Hori. “Development of Small Molecules with Fluorogenic Switches for Visualizing Protein Function and Localization” iCeMS-RIKEN Joint Symposium on Mesoscopic Chemical Biology Integrated Chemical-Physical Systems Towards Cell Control, 2014/2/7, Kyoto University (Kyoto, Kyoto)

⑪ 平山 真也、堀 雄一郎、菊地 和也、「PYP タグをラベル化する長波長発蛍光プローブの開発と応用に関する研究」、日本化学会第 94 春季年会 (2014)、2014/3/28、名古屋大学 (愛知・名古屋)

⑫ 平山 真也、堀 雄一郎、菊地 和也、「PYP タグをラベル化する長波長発蛍光プローブの再設計と蛋白質生細胞イメージングへの応用」、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014/9/12、岡山大学 (岡山・岡山)

⑬ Yuichiro Hori, Norimichi Otomura, Kazuya Kikuchi. “Development of Fluorogenic PYP-tag Probes for Quick Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins” EPFL-OU workshop, 2014/9/30, Lossanne (Switzerland)

⑭ Yuichiro Hori, Norimichi Otomura, Reisuke Baba, Kazuya Kikuchi, “Development of Chemical Tools for Imaging Protein Localization and Epigenetic Phenomena” Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014, 2014/10/2-3, Bern (Switzerland)

⑮ Zsolt Benedek, Yuichiro Hori, Shinya Hirayama, Kazuya Kikuchi, “Redesign of PYP-tag probes for fluorogenic protein labeling” 日本化学会第 94 春季年会、2015/3/26、日本大学 (千葉・船橋)

⑯ 平山 真也、堀 雄一郎、菊地 和也、「蛍光 OFF/ON 比を向上させた長波長 PYP タグ標識プローブの開発」、日本化学会第 94 春季年会、2015/3/26、日本大学 (千葉・船橋)

⑰ Yuichiro Hori. “Fluorescent probes for in vivo imaging and epigenetic analysis” 日本化学会第 94 春季年会 アジア国際シンポジウム、2015/3/27、日本大学 (千葉・船橋)

[その他]
ホームページ等
<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 雄一郎 (HORI YUICHIRO)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：00444563