

アミノ酸、ペプチドの化学的性質を利用した生体高分子の選択的認識と検出

梅澤直樹*, 秋田昌二, 鴨東美絵, 樋口恒彦

Selective Recognition and Detection of Biomacromolecules Utilizing Chemical Property of Amino Acid or Peptide

Naoki UMEZAWA, Shoji AKITA, Mie KAMOTO, and Tsunehiko HIGUCHI
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori,
Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

(Received July 20, 2007)

Recently, the fluorometric detection of biomacromolecules has attracted much attention. In this paper, we report the development of two new techniques utilizing the chemical properties of amino acids or peptides: 1) a fluorescence assay for serine/threonine kinase activity; and 2) “turn-on” fluorescent probes for protein labeling, which could be useful for bioimaging. To develop the novel kinase assay, we utilized the chemical reactivity of phosphorylated serine or threonine. Phosphorylated peptide on resin was successfully labeled fluorescently *via* base-mediated β -elimination, followed by Michael addition with novel coumarin derivatives. Protein kinase A and casein kinase I activities were detectable with our method. Also, this method was confirmed to be applicable for kinase inhibitor screening. For the development of the novel protein labeling technique, the selective interaction between “His-tag (His₆)” and “metal ion nitrilotriacetic acid (NTA) complex” was utilized. This interaction is useful for protein purification and immobilization. We designed fluorescent probes composed of a fluorophore and Ni²⁺ or Co²⁺-NTA complex. These probes were found to be weakly fluorescent as expected. When His-tag peptide was added, these probes became brightly fluorescent. On the other hand, these probes remained non fluorescent with the addition of angiotensin I (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH). These probes will be powerful tools for the bioimaging of target proteins.

Key words—fluorescence; protein kinase; protein labeling

1. はじめに

近年、分析化学は目覚ましい発展を遂げている。その中で大きな役割を果たしてきたのは、様々な測定機器—ハードウェア—の進歩といえる。だが、より厳密な計測や時空間情報も加えた分析化学を進めるには、最新機器の性能を最大限に活用すると同時にソフトウェアに当たる様々な新規手法の開発が不可欠である。本誌上シンポジウムでは、ソフトウェアとなる「アミノ酸、ペプチドの化学的性質を利用した生体高分子の選択的認識と検出」について紹介したい。具体的には、「新規セリン・トレオニンキナーゼ活性検出法」及び「ペプチドタグ導入タンパク質の発蛍光性蛍光試薬を用いた選択的標識法」の

2つのトピックについて紹介する。われわれが行ってきた研究を中心に、最近報告された新しい「ソフトウェア」についても概観する。今回紹介する2つのトピックの間には、新規検出試薬の開発が研究の中で大きな比重を占めるという共通点はあるものの、直接的な関係はほとんどない。各論的な紹介となってしまうことをご容赦頂きたい。

2. アミノ酸の化学的性質を利用した生体高分子の選択的認識と検出：新規セリン・トレオニンキナーゼ活性検出法の開発

2-1. プロテインキナーゼ 細胞は、細胞外からの情報を受け取ると、その内容を探知し、その情報に応じた対応を行うシステムを有している。このような細胞内でのシグナル伝達において最も重要なメカニズムは、タンパク質のリン酸化であると言われている。リン酸基はサイズも大きく、二価の陰イオンであるため、リン酸化はタンパク質の構造を変化させる有効な方法であると同時に、他のタンパク

名古屋市立大学大学院薬学研究所 (〒467-8693 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

*e-mail: umezawa@phar.nagoya-cu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S11 で発表したものを中心に記述したものである。

質によって認識される標識としても優れている。このリン酸化を行う酵素がプロテインキナーゼであり、標的基質のセリン、トレオニン、チロシン残基をリン酸化することで、細胞活動の幅広い制御を行っている。キナーゼは、Fig. 1 に示すように、ATP を用いて基質タンパク質をリン酸化し、リン酸化タンパク質と ADP を生成する反応を触媒する。この際、ATP の γ 位のリン酸基が基質に取り込まれる。ヒトには 500 種類を超えるキナーゼが存在すると言われており、キナーゼの関与する過程は複雑かつ多様性に富んでいる。これらプロテインキナーゼは細胞内情報伝達系経路において、種々の酵素の活性を制御し、細胞の分化、増殖、細胞死、代謝、運動などを含む細胞の機能発現に重要な役割を果たしているため、細胞内情報伝達におけるキナーゼの役割の解明は、広範な興味を集めている。また、キナーゼの活性異常は、がん、炎症性疾患を始めとする様々な疾病に関与することが明らかになっており、細胞内情報伝達系におけるキナーゼの機能の解明は、生命現象の理解はもとより、疾患の予防や治療においても重要である。プロテインキナーゼの阻害剤は既に医薬品として臨床で用いられているものもあり、キナーゼは医薬品開発の重要なターゲットとしても注目されている。

キナーゼが関与する生命現象の解明や、キナーゼ阻害剤のスクリーニングには、キナーゼ活性を検出する信頼性の高い方法が不可欠である。そのため、

キナーゼ活性の検出法は市販のものを含め、既に相当数が報告されている。¹⁾ 本稿では、代表的な検出法に焦点を絞って、紹介していくこととする。

2-2. 一般的なプロテインキナーゼ活性検出法

キナーゼのアッセイには γ 位のリン酸基を放射性同位体 (RI) ^{32}P で標識した ATP を用いる伝統的な手法がよく用いられている。 γ 位のリン酸基はリン酸化反応により基質タンパク質に取り込まれるため、 ^{32}P 量を定量すればリン酸化反応の進行が定量できる。この手法は、一般性が高いという大きな特徴を有するが、放射性同位体を用いるため安全性に問題がある上に、感度よく検出するためにはある程度の露光時間が必要という問題点もある。

他に、よく用いられている方法として、抗リン酸化アミノ酸抗体を用いる方法が挙げられる。キナーゼによりリン酸化された基質ペプチドあるいはタンパク質に、例えば蛍光標識した抗リン酸化抗体を作用させてリン酸化の有無を検出するというものである。この方法は RI を用いないため安全で、簡便な方法であるが、抗体の特異性に問題があるとの指摘がある。特に、リン酸化セリン、リン酸化トレオニンに対する抗体の特異性に問題があると言われてい

2-3. 新しいプロテインキナーゼ活性検出法

上述したキナーゼ活性検出法は、多くの重要な知見を提供してきたが、それぞれの問題点も明らかになってきている。そのため、最近新たな手法の報告

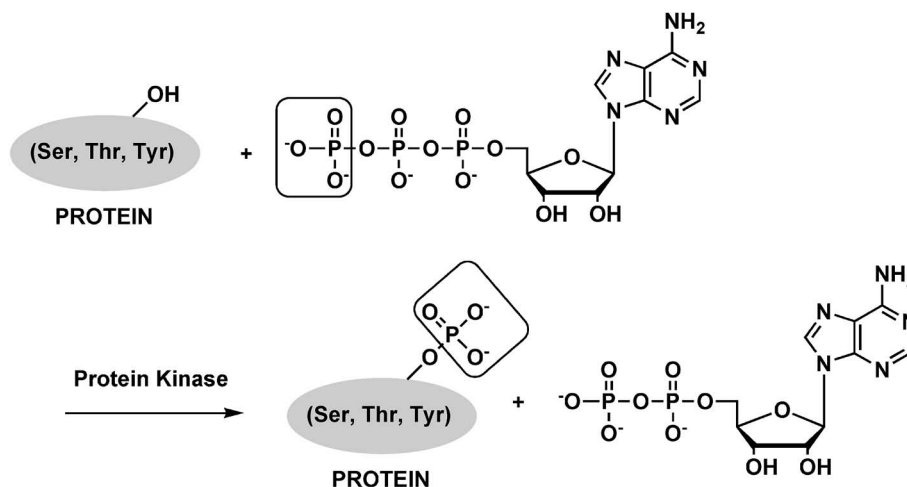


Fig. 1. Protein Phosphorylation Catalyzed by a Protein Kinase

が相次いでいる。代表的なものを以下に挙げる。

2-3-1. リン酸基と選択的に相互作用する金属錯体を用いる手法

Ojida らは、亜鉛の二核ジピコリルアミン錯体がリン酸基と特異的に相互作用することを利用した、蛍光性の人工レセプター分子を報告しており、SDS ポリアクリルアミドゲル上でのリン酸化タンパク質の検出等に成功している。^{2,3)} また、Kinoshita らはリン酸基選択的ホスト分子 Phos-Tag の開発に成功している。⁴⁾ 二核亜鉛錯体であるこの分子にビオチンを付与した誘導體と、基質ペプチドを金表面にアレイしたペプチドを用いて、キナーゼ活性の表面プラズモン共鳴による検出を報告している。⁵⁾ 詳しくは、本誌上シンポジウムの木下らの稿をご参照頂きたい。

2-3-2. 基質ペプチドに蛍光団を導入したキナーゼ活性検出プローブ

Higashi らは環境感受性蛍光団（アクリロタン等）を基質ペプチドに導入し、リン酸化による環境の変化で蛍光強度が変化するプローブを開発し、生細胞内のキナーゼ活性の可視化を行っている。⁶⁾ Yeh らも同様のコンセプトで設計したプローブを用いて、生細胞内のキナーゼ活性の可視化に成功している。⁷⁾ 他に、リン酸基が金属配位能を有することを利用し、金属配位性の蛍光団を導入したプローブも開発されている。基質ペプチドのリン酸化後に、リン酸基と蛍光団がカルシウムやマグネシウムといった金属イオンと相互作用することで、大きく蛍光強度が増大するプローブが、Chen ら⁸⁾ や Shults ら⁹⁾ によって報告されている。

2-3-3. MALDI-TOF MS を用いる手法

MALDI-TOF MS を用いる手法が Min らによって報告されている。チップ上に固定した基質ペプチドにキナーゼを作用させたのち、MALDI-TOF MS で分子量を測定すると、リン酸化された基質ペプチドは、元の分子量より 80 大きい値 (+PO₃H) を示すことを利用してキナーゼ活性を測定する方法である。この手法により種々のキナーゼ活性の検出に成功している。¹⁰⁾

ここで挙げたもの以外にも様々な検出法が開発されているが、多様なキナーゼに適用可能で、一般性の高い検出法の開発は、いまだ困難かつチャレンジングな課題である。

2-4. 新規セリン・トレオニンキナーゼ活性検出法の開発

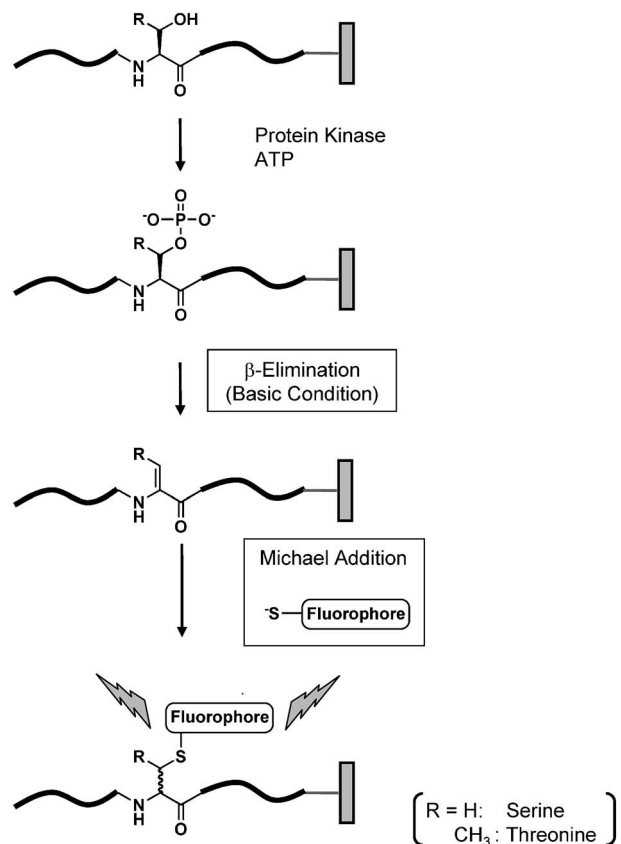
筆者らは上述の検出法とは異なるアプ

ローチでプロテインキナーゼアッセイ法を開発を進めている。リン酸化アミノ酸に特異的な化学反応性を利用し、リン酸化を受けた基質ペプチドを蛍光検出する手法の開発に成功したので、紹介する。¹¹⁾

リン酸化アミノ酸のうち、リン酸化セリン・リン酸化トレオニンは類似した化学反応性を有している。特に、塩基性条件下、リン酸基がβ-脱離するという反応性をいずれも有する。この反応性に着目し、Scheme 1 に示すセリン・トレオニンキナーゼアッセイ法を考案した。

まず、固相に固定したペプチド基質にキナーゼを作用させる。その後、塩基を作用させるとリン酸基がβ-脱離し、炭素-炭素二重結合が生成する。この二重結合は良好なマイケル反応受容部位となるため、SH 基を有する蛍光色素を反応させることで、リン酸化セリン・トレオニンを特異的に蛍光性に変換できると考えた。

本検出法の作業仮説を検証するため、ペプチドを固定する固相として、まずビーズ（レジン）を選択した。これは、Fmoc 固相合成法を用いて、基質と



Scheme 1. Summary of Our Assay

なるペプチドを直接ビーズ上に合成できるため基質ペプチドの固定化が容易な上に、ビーズ上で酵素活性を検出している例がいくつか報告されており、¹²⁾ 検出原理の検討に適していると考えたためである。検出に用いる蛍光色素には Fig. 2(a) に示す分子をデザイン、合成した。蛍光団として、強い蛍光を有し、かつ比較的疎水性が低いクマリンを選択した。疎水性が低いことで、固相との非特異的な相互作用が小さくなることを期待した。このクマリンにマイケル付加反応に適した SH 基を導入した分子をデザインした。まず、合成した化合物でマイケル付加反応が進行するか、反応後に蛍光を有するかを検討した。モデル基質として methyl vinyl ketone を用い、塩基性条件下反応したところ、蛍光色素 **1**, **2** ともに、予想通りマイケル付加反応が進行した。原料 **1** 及び生成物 **3** の蛍光強度を測定した結果、**3** の蛍光強度が **1** と比し 10 倍以上強くなることが確認

された (Fig. 2(b))。ここでは **1** の結果のみを示すが、**2** を用いた場合にも同様の結果が得られた。このように反応後に蛍光強度が増大する性質は予想外であったが、蛍光色素の非特異的吸着に起因する蛍光を相対的に低減できるため、アッセイに適した性質といえる。

次に、ビーズ上に合成したリン酸化ペプチドの検出を試みた。広範な溶媒に適用可能で、酵素アッセイにも適用例がある TentaGel 上に、Protein kinase A (PKA) の基質ペプチド (Kemptide : Ac-LRRASLG) とリン酸化されたペプチド (Ac-LRRApSLG ; pS はリン酸化セリンを表す) を合成し、塩基処理後、蛍光色素を反応させた。蛍光顕微鏡でビーズを観察した結果、リン酸化ペプチドを有するビーズに選択的な強い蛍光が観測され、本検出原理に基づいてリン酸化ペプチドを検出し得ることが示された。また色素 **1** と **2** を比較した場合、**1** を用いた場合の方が

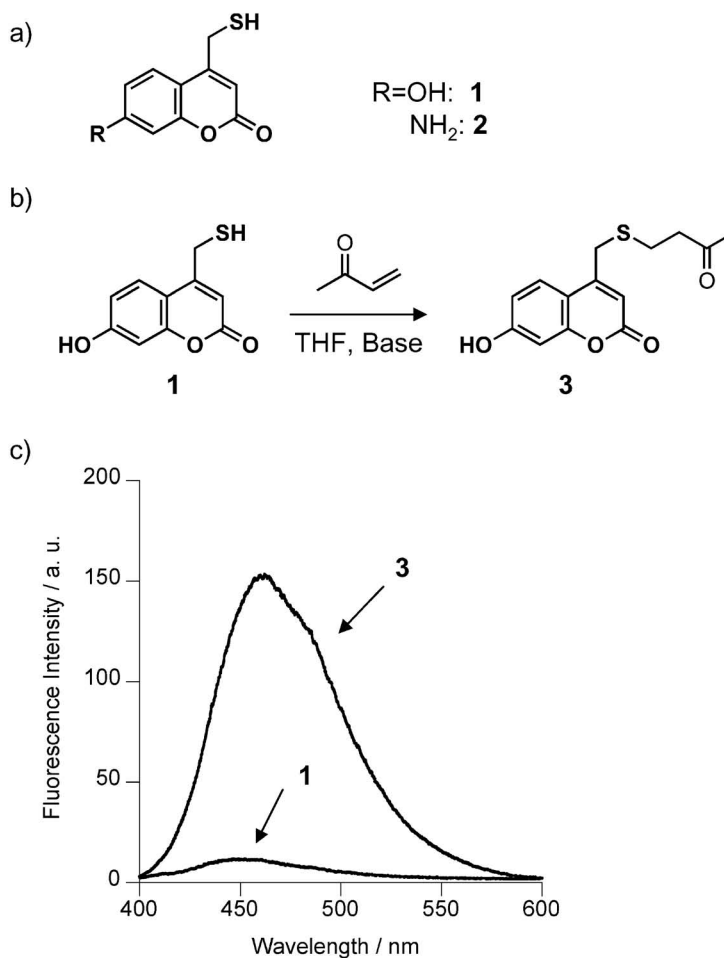


Fig. 2. a) Structure of Fluorescent Molecules Synthesized, b) Reaction of **1** with Methyl Vinyl Ketone, c) Emission Spectra (ex: 360 nm) of **1** and **3** (5 μ M, 0.1% DMSO) in 100 mM Glycine/NaOH Buffer (pH 9.4)

若干ではあるが良好な結果を与えたため、以後色素 1 を用いて検討を進めることとした。

続いて、キナーゼ活性の検出に着手した。Kemptide を固定した TentaGel を用いて PKA の活性検出を試みたが、PKA を作用させたビーズ、作用させなかったビーズともに蛍光はほとんどなく、PKA によるリン酸化反応が進行していないことが示唆された。そこでペプチドを固定するビーズを、より水溶液中での利用に適した PEGA₈₀₀ レジンに変更し、PKA の活性検出を検討したが、TentaGel を用いた場合と同様に PKA を作用させたビーズから蛍光はみられなかった。筆者らは、ビーズ上の基質ペプチドから蛍光が検出されない原因として、ビーズ内部に存在する基質が酵素に認識されず、リン酸化が進行していない可能性を考えた。つまり巨大な分子である酵素はビーズ内に浸透できないため、基質をリン酸化することができないのではないかと考えたのである。用いたレジンの性質を再検討したところ、PEGA は TentaGel よりも水中でよく膨潤するものの、PEGA₈₀₀ は分子量約 35 kDa までの分子しかビーズ内に透過できない性質であることが明らかとなった。¹³⁾用いた PKA の分子量は 40 kDa であり、ビーズ内に浸透できないことでリン酸化が進行しなかったものと推察された。

そこで、より水中で膨潤し、分子量 70 kDa までの分子を透過可能な PEGA₁₉₀₀ レジンを用いて、PKA の活性検出を試みた。その結果、PKA を作用させたビーズに選択的な蛍光がみられた。酵素反応時間を変化させたところ、酵素反応時間依存的な蛍光強度の増大がみられ、ビーズ上で PKA 活性を検出することができた (Fig. 3(a))。次に本アッセイを用いて、キナーゼ阻害剤のスクリーニングができるか検討した。酵素反応時に PKA の阻害剤となるペプチド (Ac-GRTGRRNAI-NH₂) を添加し、同様の検出を行った。ビーズ上の蛍光は阻害剤濃度依存的に減弱し、本検出法がキナーゼ阻害剤のスクリーニングに用い得ることが明らかとなった (Fig. 3(b))。

また PKA 以外のキナーゼの活性も検出できるか試みた。ビーズ上に Casein kinase I (CK I) の基質ペプチド (Ac-IGDDDDAYSDETETEA-NH₂) を合成し、CK I の活性検出に適用したところ、CK I を作用させたビーズのみに蛍光がみられ、キナーゼ

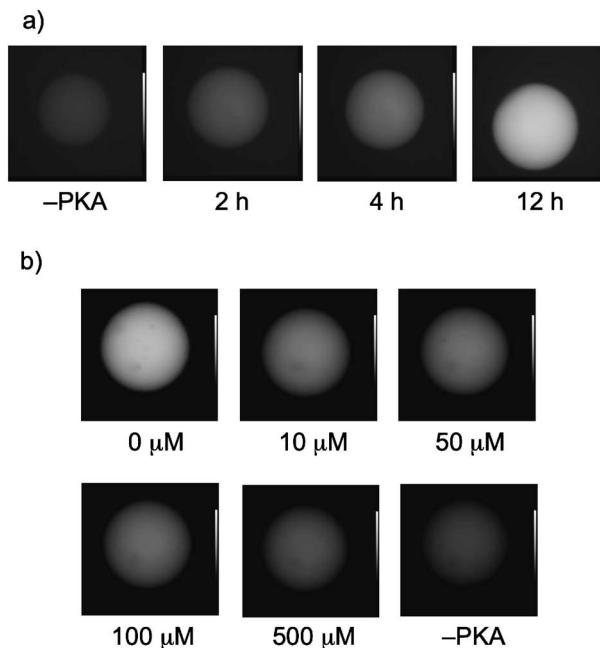


Fig. 3. a) Detection of PKA Activity, b) Effect of Inhibitory Peptide (IP)

a): Beads were incubated with PKA (30 units ml⁻¹) for 2 h, 4 h, or 12 h at RT, then treated with base and 1. b): Beads were incubated with IP (0–500 μM) and PKA (30 units ml⁻¹) then treated with base and 1. All fluorescent images (ex: 360 nm, em: >425 nm) were taken in 100 mM glycine/NaOH buffer.

を作用させなかったビーズ、PKA を作用させたビーズには蛍光はみられなかった。PKA、CK I という基質ペプチド配列が全く異なる (PKA 基質ペプチドは正電荷を帯びているのに対して、CK I 基質ペプチドは負電荷を帯びている) 二種のキナーゼのアッセイに成功し、本検出法が種々のキナーゼ活性検出に適用できることが示された。

以上のようにわれわれはリン酸化アミノ酸の化学反応性に基づき、ビーズ上でキナーゼの活性検出に成功した。だが、ビーズを固相とするアッセイにはいくつかの制限がある。最も大きな問題点は PKA、CK I の活性検出に成功した PEGA₁₉₀₀ レジンであっても、70 kDa 程度までのキナーゼにしか適用できないことである。生体内には多様なキナーゼが存在し、70 kDa 以上のキナーゼも数多く存在すると考えられる。本アッセイ系は、酵素のサイズによってアッセイ対象が限られてしまう可能性が高く、問題である。また、アッセイの効率にも制限がある。ビーズ 1 個 1 個を検出するビーズアッセイでは高い効率が期待できない。現在、これらの問題点の克服を目指し、検出原理をペプチドチップへ適用した研

究を進めている。

3 ペプチドの化学的性質を利用した生体高分子の選択的認識と検出：発蛍光性蛍光試薬を用いたペプチドタグ導入タンパク質の選択的標識

3-1. タンパク質の蛍光イメージング タンパク質は、核酸や糖鎖と並ぶ重要な生体高分子であり、生物の中で起こる化学反応の大半を担っている。多くのタンパク質の機能がまだまだ明らかとなっていないが、その解明は、生命現象の理解、疾病の発症機構解明、創薬ターゲットの発見等につながると考えられる。現在、タンパク質機能の網羅的解析を目指したプロテオーム研究を中心に、多くの重要な知見が得られてきているが、この方法では、個々のタンパク質機能に関する限定された基本情報しか得ることができない。そのため、さらなる機能解析には異なる戦略が必要と考えられる。その重要な戦略の1つに、蛍光イメージング法が挙げられる。^{14,15)}

タンパク質の蛍光イメージングは、生きた細胞内のタンパク質を蛍光性物質でラベル化し、直接観察することで、その局在や挙動を明らかにしようとする手法であり、タンパク質機能を研究する強力な手段となる。しかし、細胞内に存在する数多くのタンパク質の中から「観察したいタンパク質だけを蛍光ラベル化する」ことは、非常に困難である。さらに、目的タンパク質を選択的にラベル化することが望まれる一方で、様々なタンパク質に適用できる一般性も必要であり、そのハードルは高い。

3-2. タンパク質イメージング技術開発の現状

3-2-1. 蛍光性タンパク質を用いた蛍光ラベル化法 現在、タンパク質の蛍光イメージングにおいて最もよく用いられている手法は、Green Fluorescent Protein (GFP) を中心とした蛍光タンパク質を利用した手法^{16,17)}である (Fig. 4(a))。この手法は、標的タンパク質の遺伝子に蛍光タンパク質の遺伝子を付与することで、標的タンパク質のみを蛍光ラベル化するというものである。ラベル化が簡便かつ、特異性が高いという大きな利点を有する。また、最近様々な変異体が開発され、蛍光波長の異なる2種類の蛍光性タンパク質間の FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) により、タンパク質の構造変化を捉えるといった応用例も報告されている。

この方法は非常によく用いられているが、蛍光性

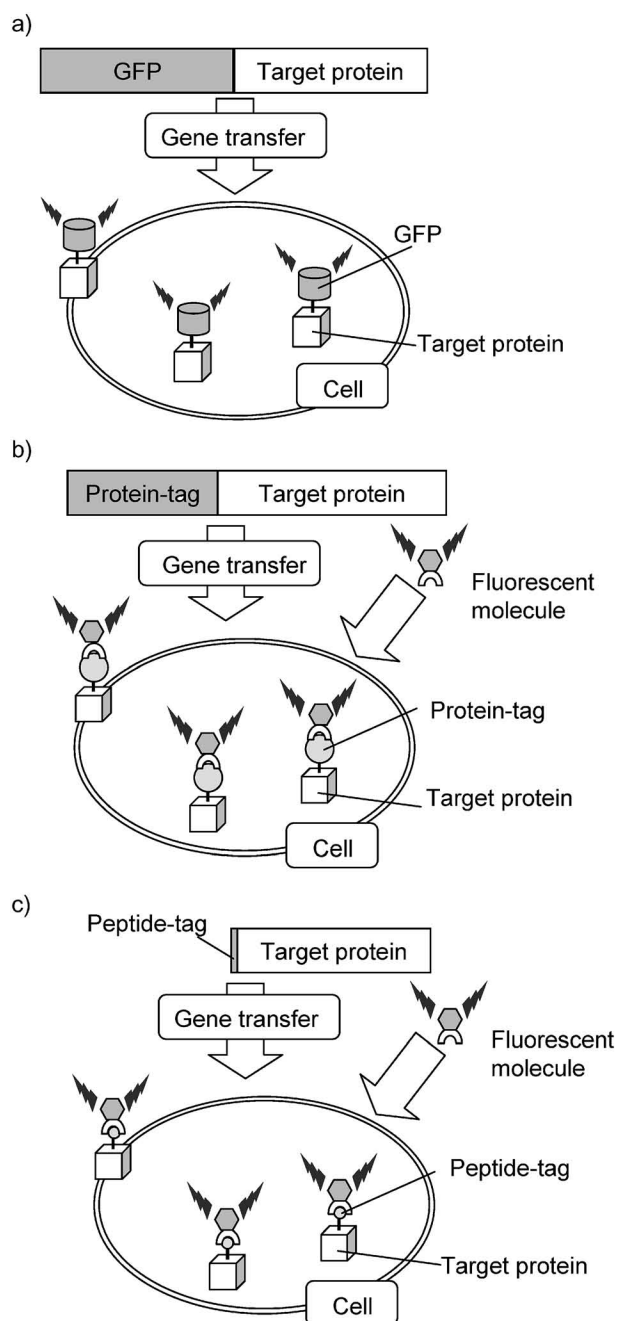


Fig. 4. Fluorescent Labeling by a) GFP, b) Protein Tag-fluorescent Molecule System, c) Peptide Tag-fluorescent Molecule System

タンパク質の分子サイズが約 240 アミノ酸と大きいために、蛍光ラベル化することで、標的タンパク質の構造や機能に影響を及ぼすという問題点が指摘されている。¹⁸⁾また、蛍光波長の異なる様々な変異タンパク質が開発されてはいるものの、その蛍光波長のバリエーションは十分なものとはいえず、マルチカラーラベリングは難しいのが現状である。

3-2-2. タンパク質タグ-蛍光性有機小分子を用いた蛍光ラベル化法 上述のように、蛍光性タンパク質は、分子サイズが大き過ぎるという問題点があった。そこで、タグ部分をもう少し小さいタンパク質に変換し、それと相互作用する蛍光性有機小分子を用いてラベル化する手法がいくつか報告されている (Fig. 4(b)).¹⁹⁾ この手法は、タンパク質タグと蛍光性分子が共有結合するものと、共有結合ではない相互作用するものとに分類できる。

前者は、酵素反応により生成する新たな共有結合を利用したものである。Kepplerらは、ヒト O⁶-アルキルグアニントランスフェラーゼ (hAGT) による自己アルキル化反応を用いたラベル化法²⁰⁾を報告している。具体的には、蛍光団を有する O⁶-アルキルグアニン誘導体を用いて、hAGT タグ (207 アミノ酸) 導入タンパク質を修飾するというものである。また、ホスホパンテチントランスフェラーゼ (PPTase) によるアシルキャリアタンパク質 (ACP) への補酵素 A の転移反応を利用した例²¹⁾では、タンパク質タグのサイズも ACP (77 アミノ酸) まで小さくすることができている。

後者は、タンパク質と基質との特異的な相互作用を利用したものである。Millerらは、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) とメトトレキサートの強い親和性を利用して、蛍光団を有するメトトレキサートを用いて、DHFR (187 アミノ酸) タグ導入タンパク質を蛍光ラベル化²²⁾している。また、Marksらは、免疫抑制剤 FK506 とその結合タンパク質 (FKBP12) の相互作用を利用して、蛍光団を有する FK506 誘導体を用いた FKBP12 タグ (98 アミノ酸) 導入タンパク質のラベル化²³⁾を報告している。

いずれも、タンパク質と反応基質ないしはリガンドとの特異的な相互作用を巧みに利用したものである。しかし、蛍光性タンパク質よりタグサイズが小さくなっているとはいえ、タンパク質タグの大きさは 100-200 アミノ酸と大きく、標的タンパク質の機能への影響が懸念される。また、内在性の相互作用を利用しているため、細胞膜上のタンパク質には適用できるが、細胞内タンパク質をラベル化することは難しいという問題点もある。

3-2-3. ペプチドタグ-蛍光性有機小分子を用いた蛍光ラベル化法 最近注目を集めている手法は、短いペプチドタグを標的タンパク質に導入し、ペプ

チドタグと特異的に結合する蛍光性小分子でラベル化する手法である (Fig. 4(c))。本手法は短いペプチドタグを用いているので、標的タンパク質に与える影響は非常に小さいと考えられる。また、蛍光性有機小分子については、種々の蛍光団を選択し応用可能であるという利点を有する。

この先駆的な例として、テトラスチンモチーフ (-Cys-Cys-X-X-Cys-Cys-) と選択的に結合する FAsH,²⁴⁾ ReAsH²⁵⁾ が挙げられる。FAsH は、フルオレセインにヒ素を導入した化合物で、ペプチドタグ配列中のシステイン残基に結合して標的タンパク質を蛍光ラベル化する。FAsH は蛍光ラベル化の際に、蛍光強度が増大するという優れた特徴を有するが、内在性チオール基との非特異的な相互作用によるバックグラウンドが無視できない。このため、高濃度のエタンジチオールで前処理する必要がある。

他にも、蛍光性小分子と短いペプチド配列との新規な相互作用を見出したという例が数例報告されている。Rozinovらは、ファージディスプレイにより蛍光色素 Texas red と選択的に相互作用するペプチド配列 (13 アミノ酸) を見出すことに成功している。²⁶⁾ また、Ojidaらは、亜鉛の二核ジピコリルアミン錯体とオリゴアスパラギン酸配列との親和性を利用したラベル化法を報告している。²⁷⁾

以上のように、小分子と短いペプチド配列との相互作用が最近報告されているが、最もよく知られている相互作用は、ヒスタグ ((His)₆) と金属-NTA 錯体との相互作用であろう。^{28,29)} この相互作用は、アフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製に広く用いられており、ヒスタグ導入に伴う標的タンパク質の機能変化が少ないことが知られている。この相互作用に着目したタンパク質蛍光ラベル化法も、いくつか報告例がある。³⁰⁻³²⁾ しかし、いずれも NTA 錯体と蛍光団を単に結合させたもので、タグ導入タンパク質と相互作用はするものの、タグ配列と結合後に蛍光強度の増大がみられなかった。すなわち、ラベル化後に洗浄や精製といった煩雑な操作が必要とされ、洗浄操作が可能な膜タンパク質には応用できるものの、細胞内タンパク質のラベル化は困難であった。

筆者らが知る限り、唯一蛍光変化がみられるものとして環境応答性蛍光団である Dansyl 基を導入し

た Soh らの Ni-NTA プローブがある.³³⁾これは、ヒスタグ配列にさらに疎水性アミノ酸残基 ((Trp)₃) を導入することで、ラベル化後に蛍光波長がシフトするようにデザインされており、洗練されたプローブである。

3-2-4. 発蛍光性蛍光試薬を用いたペプチドタグ導入タンパク質の選択的標識 筆者らは、新たな戦略として、タグ配列認識後に蛍光強度が大幅に増大する性質を付与した蛍光プローブの開発を目指し研究を進めている。このような性質を有する分子は、ラベル化反応後の未反応プローブの洗浄操作が必要ないため、細胞内タンパク質のイメージングにも応用できると考えられる。

筆者らの提案する蛍光プローブの蛍光ラベル化機構の概略を Fig. 5 に示す。まず標的タンパク質が存在しないとき、蛍光団は金属イオンに配位し、蛍光は消光している。そこにヒスタグ導入タンパク質を添加すると、蛍光団よりも強く金属イオンに配位するヒスタグ配列が存在するため、金属錯体部位が

標的タンパク質と結合する。それに伴い、蛍光団は遊離し蛍光が回復すると期待した。

上述の作業仮説に基づき、新規蛍光色素を設計、合成した (Fig. 6)。蛍光団としてヒドロキシクマリンを、金属配位部位として NTA を選択した。両者を異なる長さのリンカーで結んだ蛍光色素をデザイン、合成し、リンカーの長さから NTAC-2, 3, 4 と名付けた。蛍光団として選択したヒドロキシクマリンは、金属に配位することで蛍光強度が減弱することが知られているため選択した。

合成した NTAC 類に遷移金属を中心に、約 20 種類の金属イオンを添加して蛍光強度変化を検討した。その結果いずれの蛍光色素についても、ある種の金属イオンの添加により蛍光強度の減弱がみられた。なかでも Co^{2+} 、 Ni^{2+} の添加では、濃度依存的な大幅な蛍光強度の減弱がみられた。Figure 7 に NTAC-4 の結果を示すが、他の NTAC-2 及び NTAC-3 でも同様の結果が得られた。続いて、金属と蛍光色素がどのような錯体を形成しているか確

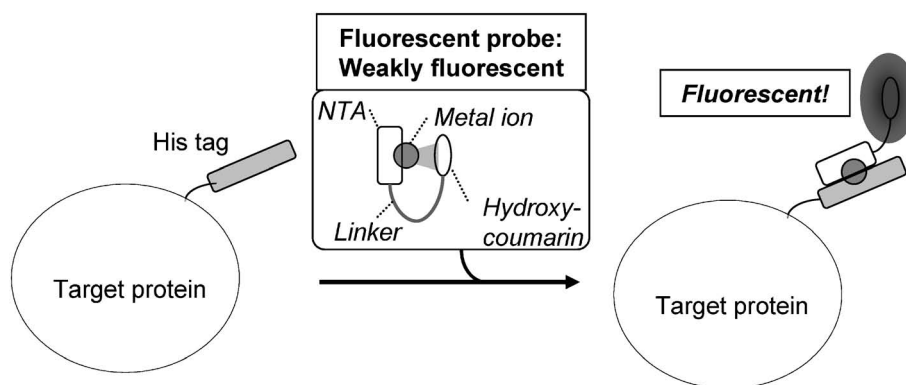


Fig. 5. Overview of Our Strategy

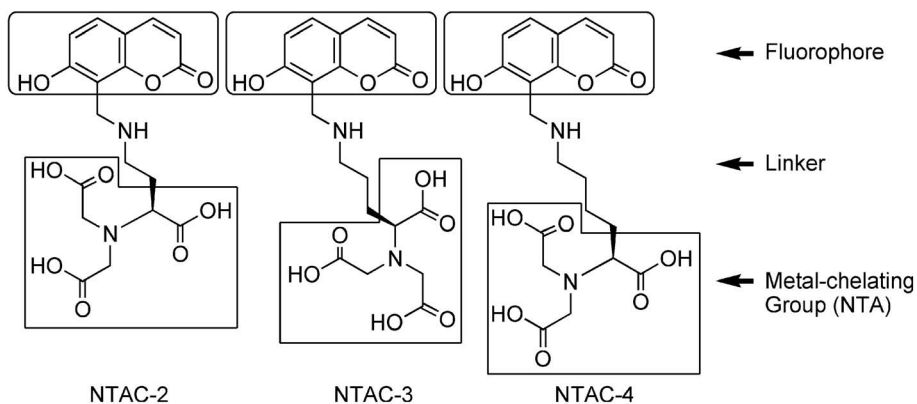


Fig. 6. Structures of NTACs

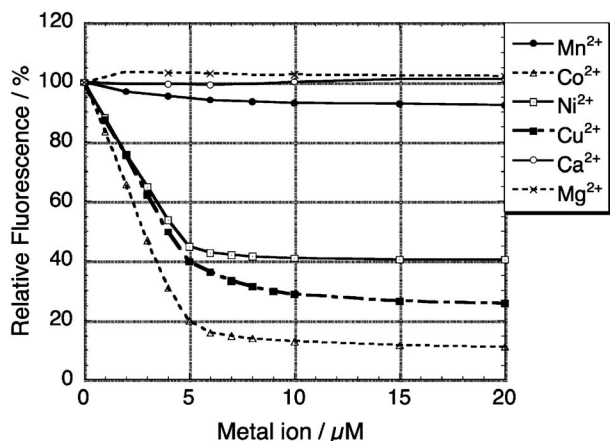


Fig. 7. Relative Fluorescence Intensity of NTAC-4 ($5 \mu\text{M}$) in the Presence of Various Metal Ions (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) in 50 mM Tris-buffer (pH 7.4) Excitation: 365 nm, Emission: 455 nm.

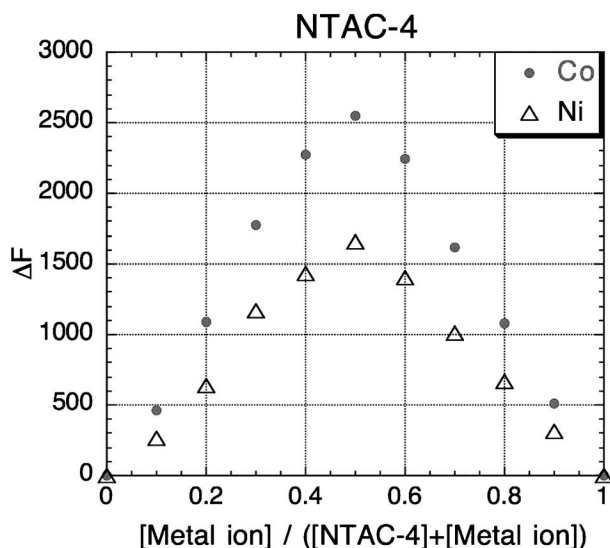


Fig. 8. Job's Plot of the Fluorescence Changes upon Complexation of NTAC-4 with Ni^{2+} or Co^{2+} in 50 mM Tris Buffer (pH 7.4) at 25°C . $[\text{NTAC-4}] + [\text{metal ion}] = 10 \mu\text{M}$. Excitation: 365 nm, emission: 455 nm.

認するため、Job's plot を行ったところ、すべての NTAC 類は金属イオンと 1 対 1 の錯体を形成していることが示唆された。Figure 8 に NTAC-4 の結果を示す。

Co^{2+} -NTA, Ni^{2+} -NTA 錯体は、一般にヒスタグと強く相互作用することが知られている。そこで、ヒスタグ配列を有するモデルペプチド ($\text{H}-(\text{His})_6\text{-Tyr-NH}_2$) を添加して、蛍光強度に変化がみられるか検討した。モデルペプチドには、ヒスタグ配列に加えてチロシンを導入しているが、正確なペプチド

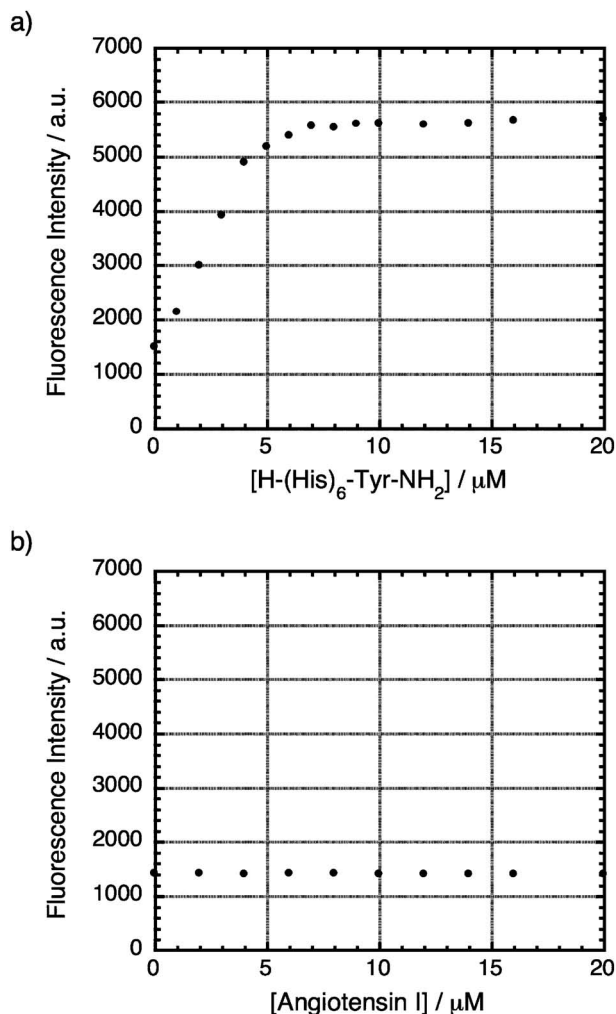


Fig. 9. Fluorescence Intensity of NTAC-4- Co^{2+} ($5 \mu\text{M}$) in the Presence of a) Peptide 1 ($\text{H}-(\text{His})_6\text{-Tyr-NH}_2$), b) Angiotensin I ($\text{H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH}$) in 50 mM Tris-buffer (pH 7.4) at 25°C Excitation: 365 nm, emission: 455 nm.

濃度を吸光度により算出するためである。

Co^{2+} -NTAC 錯体, Ni^{2+} -NTAC 錯体にモデルペプチドを添加したところ、いずれの錯体も大幅な蛍光回復を示すことが明らかとなった。NTAC-4 の結果を Fig. 9(a) に示す。 Ni^{2+} -NTAC 錯体でも蛍光強度の回復はみられたが、 Co^{2+} -NTAC 錯体と比し、蛍光強度変化に時間がかかることが明らかとなり、 Co^{2+} -NTAC 錯体の方が優れたプローブであることが示唆された。また、蛍光変化から、解離定数を求めたところ約 10^{-6} - 10^{-7} M と強い相互作用をすることが明らかとなった。一方、ネガティブコントロールとして、連続したヒスチジン配列を持たないペプチド (Angiotensin I: $\text{H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH}$) を添加したところ、蛍

光強度の回復は全くみられないという結果が得られた (Fig. 9(b)).

今回、ヒスタグ配列を認識し発蛍光するような蛍光プローブの合成を行い、その蛍光特性について検討してきた。ペプチドレベルではあるが、当初予測した通り、ペプチド配列を選択的に認識し大幅な蛍光増大を示すという結果が得られた。現在、タグタンパク質を用いて蛍光変化がみられるか鋭意検討を進めている。

4. おわりに

アミノ酸やペプチドの持つ化学反応性に着目した新たな検出法の開発について、筆者らの研究を中心に述べてきた。いずれの研究も、端緒を開いたばかりといったところである。幸いなことに、今回開発した蛍光色素はいずれも、蛍光団の変換が容易という特徴を持つ。研究を進めるうちに明らかになってきた問題点を解決し、より成熟した方法論を確立したいと考えている。

REFERENCES

- 1) von Ahsen O., Bomer U., *ChemBioChem*, **6**, 481–490 (2005).
- 2) Ojida A., Mito-oka Y., Inoue M., Hamachi I., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6256–6258 (2002).
- 3) Ojida A., Mito-oka Y., Sada K., Hamachi I., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2454–2463 (2004).
- 4) Kinoshita E., Takahashi M., Takeda H., Shiro M., Koike T., *Dalton Trans.*, 1189–1193 (2004).
- 5) Inamori K., Kyo M., Nishiya Y., Inoue Y., Sonoda T., Kinoshita E., Koike T., Katayama Y., *Anal. Chem.*, **77**, 3979–3985 (2005).
- 6) Higashi H., Sato K., Ohtake A., Omori A., Yoshida S., Kudo Y., *FEBS Lett.*, **414**, 55–60 (1997).
- 7) Yeh R.-H., Yan X., Cammer M., Bresnick A. R., Lawrence D. S., *J. Biol. Chem.*, **277**, 11527–11532 (2002).
- 8) Chen C.-A., Yeh R.-H., Lawrence D. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3840–3841 (2002).
- 9) Shults M. D., Imperiali B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14248–14249 (2003).
- 10) Min D.-H., Su J., Mrksich M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5973–5977 (2004).
- 11) Akita S., Umezawa N., Higuchi T., *Org. Lett.*, **7**, 5565–5568 (2005).
- 12) Wu J., Ma Q. N., Lam K. S., *Biochemistry*, **33**, 14825–14833 (1994).
- 13) Basso A., Braiuca P., Ebert C., Gardossi L., Linda P., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 1626–1640 (2006).
- 14) Giepmans B. N. G., Adams S. R., Ellismann M. H., Tsien R. Y., *Science*, **312**, 217–224 (2006).
- 15) Miyawaki A., Sawano A., Kogure T., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, S1–S7 (2003).
- 16) Tsien R. Y., *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509–544 (1998).
- 17) Schwartz J. L., Patterson G. H., *Science*, **300**, 87–91 (2003).
- 18) Zhang J., Campbell R. E., Ting A. Y., Tsien R. Y., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 906–918 (2002).
- 19) Marks K. M., Nolan G. P., *Nat. Methods*, **3**, 591–596 (2006).
- 20) Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Johnsson K., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 86–89 (2003).
- 21) Vivello-Pol L., George N., Krumm H., Johnsson K., Johnsson N., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12770–12771 (2005).
- 22) Miller L. W., Cai Y., Sheetz M. P., Cornish V. W., *Nat. Methods*, **2**, 255–257 (2005).
- 23) Marks K. M., Braun P. D., Nolan G. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9982–9987 (2004).
- 24) Griffin B. A., Adams S. R., Tsien R. Y., *Science*, **281**, 269–272 (1998).
- 25) Adams S. R., Campbell R. E., Gross L. A., Martin B. R., Walkup G. K., Yao Y., Llopis J., Tsien R. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063–6076 (2002).
- 26) Rozinov M. N., Nolan G. P., *Chem. Biol.*, **5**, 713–728 (1998).
- 27) Ojida A., Honda K., Shinmi D., Kiyonaka S., Mori Y., Hamachi I., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452–10459 (2006).
- 28) Hochuli E., Dobeli H., Schacher A., *J. Chromatogr.*, **411**, 177–184 (1987).
- 29) Ueda E. K. M., Gout P. W., Morganti L., *J. Chromatogr., A*, **988**, 1–23 (2003).
- 30) Guignet E. G., Hovius R., Vogel H., *Nat. Biotechnol.*, **22**, 440–444 (2004).
- 31) Goldsmith C. R., Jaworski J., Sheng M., Lippard S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 418–419

-
- (2006).
- 32) Kapanidis A. N., Ebright Y. W., Ebright R. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12123–12125 (2001).
- 33) Soh N., Seto D., Nakano K., Imato T., *Mol. BioSyst.*, **2**, 128–131 (2006).