

論文の内容の要旨

論文題目 チロシンリン酸化を選択的に検出する希土類錯体の開発

氏名 秋葉 宏樹

1. 序論

タンパク質中のチロシン (Tyr) のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達において大変重要な役割を果たしている。そして、タンパク質リン酸化全体のわずか 0.05% を占めるものではない Tyr のリン酸化について、がんなど多くの疾患との関連性が指摘されており、近年では数多くの分子標的薬がこれを制御する酵素をターゲットとしている。

リン酸化 Tyr (pTyr) に対しては、今までに様々な検出法が開発されてきた。しかしながら、汎用性という面ではまだ課題が多く、化学的手法による新規の検出法が望まれてきた。より一般的にタンパク質のリン酸化については、Pro-Q Diamond、Phos-tag といった金属錯体ベースの検出・認識分子が開発され、用いられている。しかしながら、どのアミノ酸がリン酸化されているかを区別することのできる化学プローブは未だ開発されていなかった。

そこで我々が着目したのがテルビウムイオン (Tb(III)) の発光特性である。Tb(III) は直接励起によって発光を得るのが難しい一方で、近傍に光を吸収しエネルギーを伝える原子団 (アンテナ) が存在すると、アンテナから Tb(III) にエネルギーが伝えられ、可視光領域に発光が生じる。このメカニズムを利用することとした。すなわち、Tyr がリン酸化されると、負電荷をもつ pTyr と正電荷を持つ Tb(III) とが相互作用する。

pTyr はアンテナとなりうるフェノール環を有しているため、紫外光によって励起すると、pTyr が吸収したエネルギーが Tb(III) に伝わる。そして、Tb(III) による可視光領域の発光が観測される。このようにして、pTyr に対しては Tb(III) 発光応答が得られる (Figure 1a)。一方で、リン酸化されていない Tyr や他のアミノ酸がリン酸化された場合には、このようなエネルギー伝達メカニズムに基づいた発光応答が起こらない (Figure 1b,c)。そのた

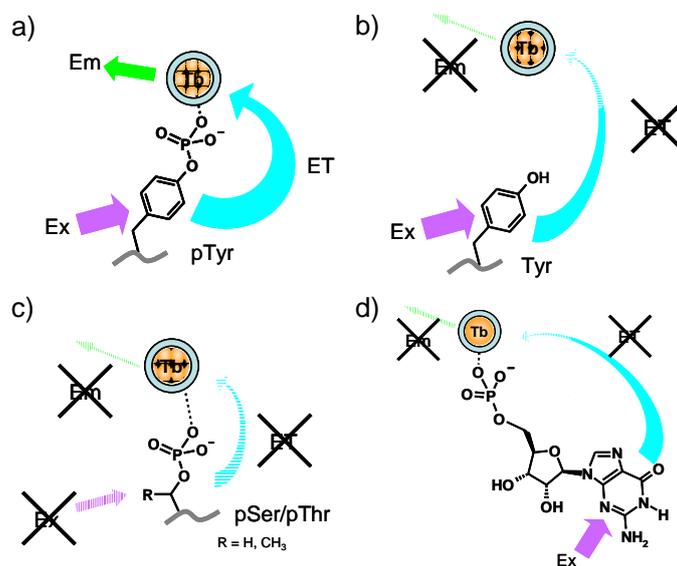
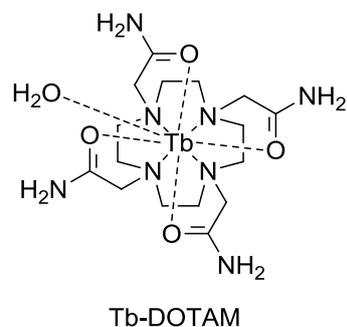


Figure 1. この系のモデル図。a) pTyr が Tb(III) 錯体と相互作用すると、エネルギー伝達で Tb(III) は発光するが、b) リン酸化されていない Tyr では Tb(III) 錯体と相互作用しないために、c) 他のアミノ酸のリン酸化ではアンテナがないために、発光応答は生じない。また、d) 適切な配位子を用いることで、ヌクレオチドに対する発光応答を防ぐことができる。

めに、このシステムでは pTyr を選択的な発光応答によって検出できる。

本研究ではさらに、Tb(III)に対して配位する配位子を適切に選択することによって、発光応答の選択性をさらに高める試みを行った。ヌクレオチド、とくに GMP は Tb(III)に対して配位し強い発光応答をもたらすことが知られている。配位子によってこれを妨げることが、選択性を得る上では大変重要であるためである (Figure 1d)。



2. 結果

(1) 単核錯体の探索

上記のような配位子として様々なものを試したところ、配位子 DOTAM を用いた錯体である Tb-DOTAM が pTyr に対し

て選択的な応答を示すことが明らかとなった (Figure 2)。この錯体は Tb(III)に対して 8 配位し、かつ錯体全体として正電荷を有しているために、pTyr との静電的な相互作用を保ちながらも、ヌクレオチドの配位を妨げることで選択的応答を実現する。

Tb-DOTAM と、pTyr のモデル物質であるフェニルリン酸 (PhOP) との相互作用

について詳細な解析を行ったところ、

PhOP は Tb-DOTAM に直接配位しておらず、静電相互作用に基づきながら、脱水和を駆動力として水素結合的に相互作用しているということが明らかになった。

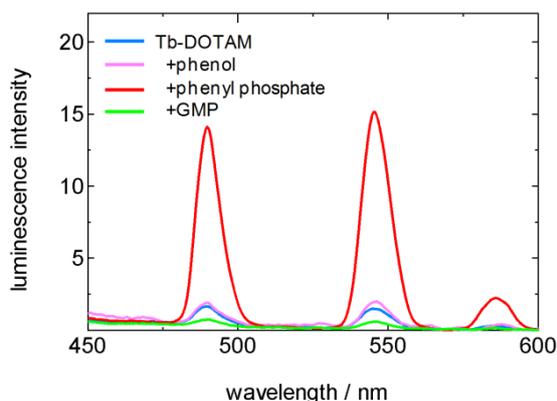
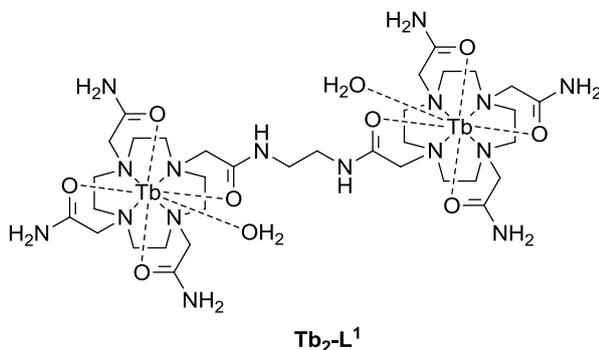


Figure 2. Tb-DOTAM に対して、PhOP、フェノール (リン酸化されていない Tyr のモデル)、GMP を加えた時の発光応答。PhOP に対してのみ、強い発光が観測される。

(2) 複核錯体の探索

Tb-DOTAM と PhOP との相互作用は、解離定数が 3.1 mM と、それほど強いものではなかった。これをより強くするために、複核錯体を数種類合成した。なかでも Tb₂-L¹ は、PhOP との相互作用が 29 μM



であり、より強力な相互作用を実現した。また Tb₂-L¹ は、Tb-DOTAM と同様に pTyr に対して選択性の高い応答を示した (Figure 3)。さらに、相互作用についての解析からは、Tb-DOTAM 同様に PhOP の直接配位ではないことが示唆された。

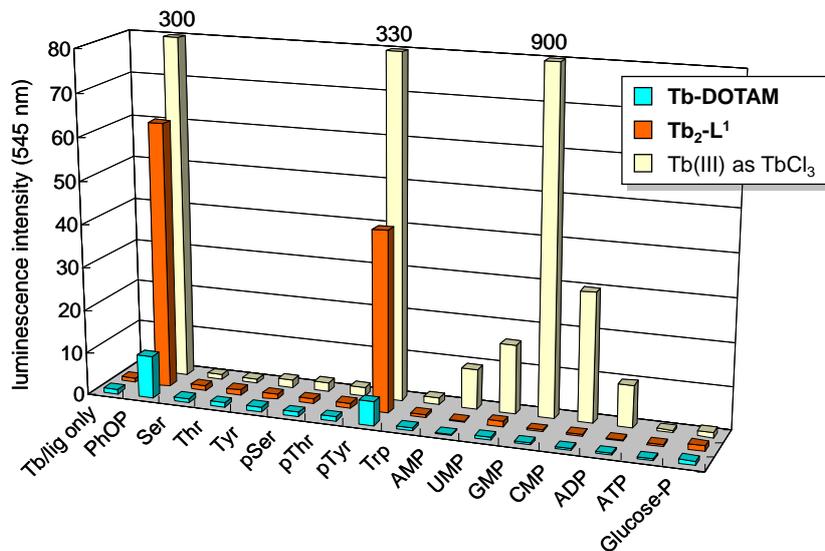


Figure 3. Tb-DOTAM、Tb₂-L¹ に対して様々な物質を加えた時の発光応答。PhOP、pTyr 以外のアミノ酸やヌクレオチドなど、他の分子では全く応答がない。

強い結合が実現されたので、発光特性についての詳細な解析を行った。その結果、発光量子収率は0.004程度と非常に低いことが明らかとなった。これは PhOP から Tb(III)へのエネルギー伝達効率が0.3%以下でしかないことに起因する。また、このエネルギー伝達効率より、Tb(III)–PhOP 間距離を求めたところ、PhOP が Tb(III)に対して、水1分子を介した水素結合によって相互作用していることが示唆された (Figure 4)。

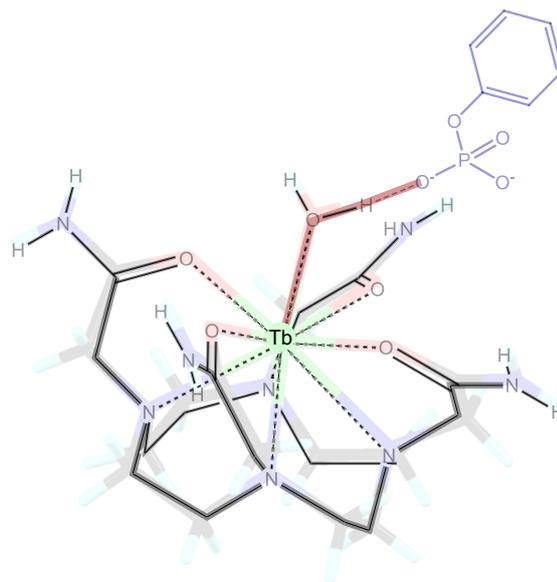


Figure 4. Tb-DOTAM と PhOP の相互作用モデル。

(3) 酵素反応の可視化

Tb₂-L¹ を用いた pTyr 検出では、溶液中で、pTyr の存在量を発光という指標によって定量することが可能である。したがって、酵素的なリン酸化・脱リン酸化反応

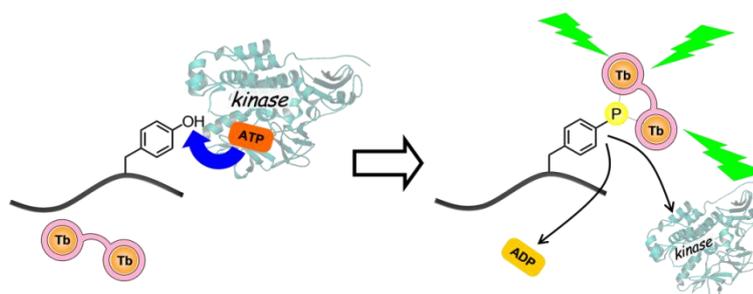


Figure 5. Tb₂-L¹ を用いて酵素反応を発光によって可視化する。

をリアルタイムに可視化することが可能である (Figure 5)。

本研究では実際に、Src、Fyn、EGFR という3つのチロシンキナーゼ (リン酸化酵素) ならびにチロシンフォスファターゼ (脱リン酸化酵素) の PTP1B の反応を可視化することができた (Figure 6)。さらに、医薬品としても使われる、これらの酵素に対する阻害剤の効果を定量することにも成功した (Figure 7)。

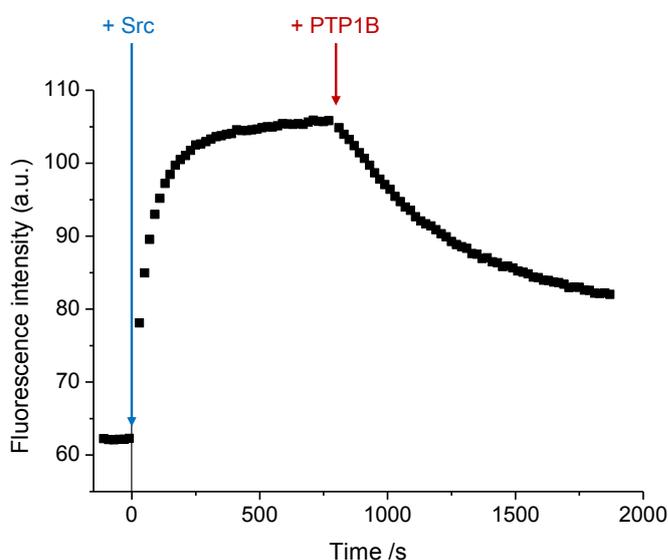


Figure 6. Tb₂-L¹によって、Src によるリン酸化→PTP1B による脱リン酸化をリアルタイムに可視化することができた。

3. 結論

本研究では、チロシンリン酸化を発光という指標によって選択的に検出するために、適切な Tb(III)錯体の探索と、その評価を行った。単核錯体 Tb-DOTAM は選択的な応答を示し、複核錯体はより高い応答を示し、酵素反応の可視化にも成功した。このように、

Tyr リン酸化にかかわる様々な現象について、発光という指標によって可視化することができる本手法は、さまざまな将来展開が期待されるということを明確に示したのが本研究の意義である。

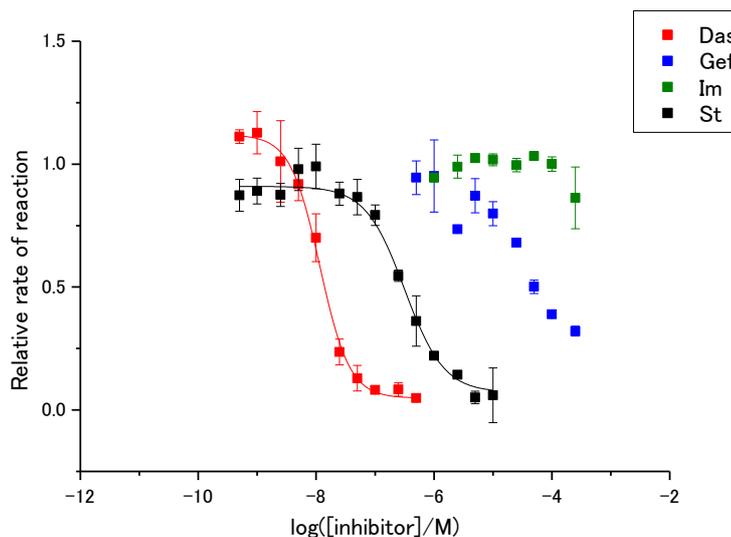


Figure 7. 4つの化合物の、Src に対する阻害効果を、発光強度の上昇を指標として定量することに成功した。Das: dasatinib; Gef: gefitinib; Im: imatinib; St: staurosporine。