

研究課題別評価書

1. 研究課題名

超分子化学に基づく修飾タンパク質の蛍光分析法の開発

2. 氏名

林田 修

3. 研究のねらい

細胞核内のヒストンは DNA を巻き付ける役目を担う塩基性の球状タンパク質であるが、その表面のリジン残基はメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受け易いことが知られている。これらの翻訳後修飾は癌関連遺伝子の発現を調節するなどの重要な役割を果たすことから、これらを特異的に認識して検出できる新規な蛍光分析法の開発が切望されている。そこで、本研究では有機合成化学および超分子化学の手法に基づいて、ヒストンならびにその翻訳後修飾を特異的に認識・検出できる蛍光性人工ホストを開発することを目標に掲げた。すなわち、ヒストンが表面に塩基性アミノ酸残基を高密かつ大量に有する特徴的なタンパク質であることに鑑み、静電相互作用が期待できるアニオン性のレゾルシナレン誘導体(R1)を結合ユニットとして採用し、これを組み込んだ種々の人工ホストを開発することでヒストンならびに修飾ヒストンに対する特異的な認識を目指した。さらに、蛍光基を導入した人工ホストも独自に分子設計し開発することによりこれらヒストンに対する蛍光検出を目指した。

4. 研究成果

4-1. クラスター効果を利用した人工ホストによるヒストン認識

生体系ではレセプターとリガンド間の個々の相互作用力は弱いけれども、多価にクラスタリングすることによって極めて強い結合親和性と分子認識を発現するいわゆるクラスター効果が知られている(後述)。そこで、このクラスター効果を人工ホストに利用することとして、多数の結合ユニットを有するレゾルシナレンテトラマー(R4)およびレゾルシナレンドデカマー(R12)を分子設計し、合成した(図1)。本研究で合成した全ての新規化合物は元素分析により純度を確認した。ヒストンへの結合挙動は SPR 法(Biacore)を用いて検討した。レゾルシナレン単量体 R1 はヒストンへの結合力が弱いのにに対して、テトラマーやドデカマーではクラスター効果を発揮して結合定数(K)に著しい増大が認められた(図2)。一方、参照実験として同程度の負電荷を有するポリアクリル酸ではほとんど結合しないことから、ヒストン結合にはレゾルシナレンの剛直な環状構造が重要であることも示された。さらに、ヒストンへの結合特異性に関して、リゾチームやオボアルブミンなどその他のタンパク質に対しては有意な結合力を示さないことから、ヒストンに特有の塩基性表面を認識することにも成功した。また、人工ホスト R4 および R12 が蛍光性ゲストを取り込むことが可能なシクロファン部位を有していることを利用して、ヒストンへのゲストデリバリーによる蛍光検出も行った。すなわち、人工ホストと蛍光性ゲストからなるホスト-ゲスト複合体(超分子)に対してヒストンを添

加し蛍光スペクトルの変化を追跡したところ、蛍光強度にして約 20 %の応答が観測され、ヒストンを蛍光検出できることが示された。

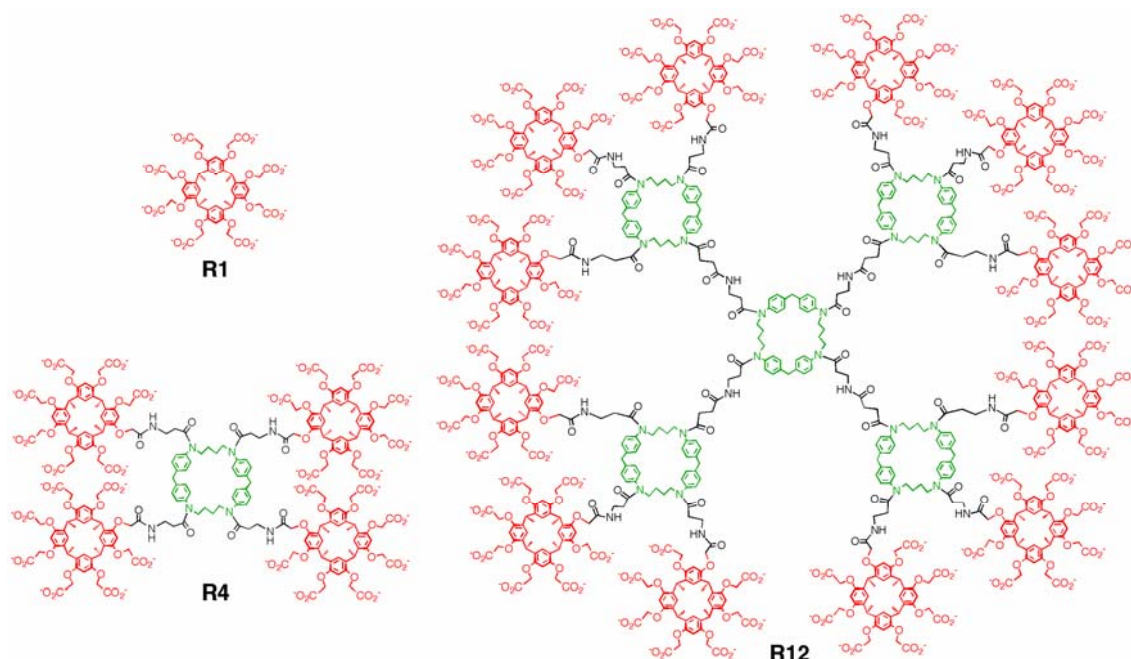


図1. レゾルシナレン(R1)とレゾルシナレンtetramer(R4)およびドデカマー(R12)

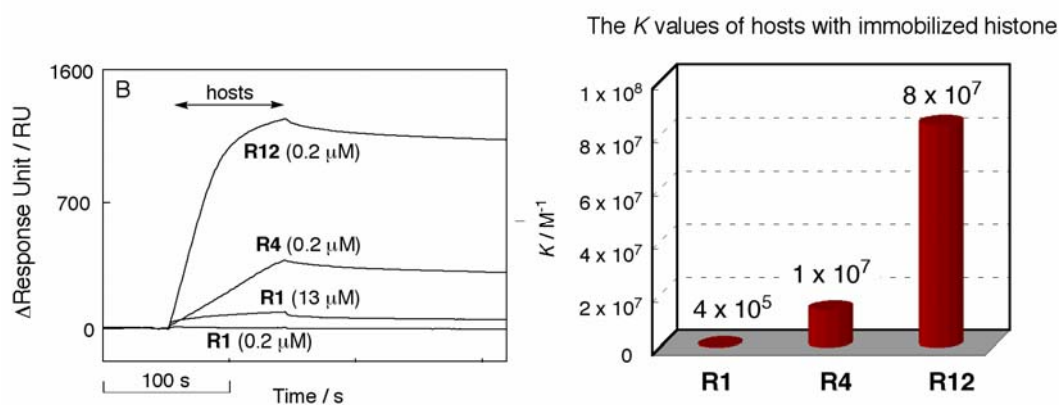


図2. ヒストンとの結合挙動における SPR センサーグラム(左)と結合定数(右)

4-2. 蛍光基を有する人工ホストによるヒストン検出

蛍光分光法によるヒストン検出のために、蛍光基としてダンシル部位を導入したレゾルシナレンオリゴマー R3Dを合成した(図3)。人工ホストR3Dの水溶液にヒストンを添加したところ、R3Dの蛍光スペクトルは蛍光極大波長の短波長シフトを伴って蛍光強度が増大した(図4)。ヒストンの滴定における蛍光強度の応答は典型的な複合体形成を示す飽和挙動を与えたことから、結合定数が $2.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と算出され、十分に実用レベルであることがわかった。一方、参照実験としてレゾルシナレンの結合ユニットを欠いた蛍光性ホストの場合には、このような特有の蛍光スペクトル変化

は観測されなかった。また、塩基性タンパク質であるリゾチームや、アルブミン、コンカナバリンAなどに対する蛍光滴定実験を同様に行ったところ、ヒストンでみられたような顕著な蛍光応答を示すことはなかった(図4)。また、化学的手法によりアセチル化したヒストンに対してホストR3Dは蛍光応答を全く示さず、ヒストンのアセチル化を識別できることも見出した。化学的修飾であるが、ヒストンとアセチル化ヒストンの違いを厳密に識別し、蛍光応答した初めての例と言える。これらの結果から、ホストR3Dはヒストンの表面に密に配置した塩基性アミノ酸残基を認識し、結合にともなう微視的環境の変化を蛍光スペクトルの変化として検出できることがわかった。

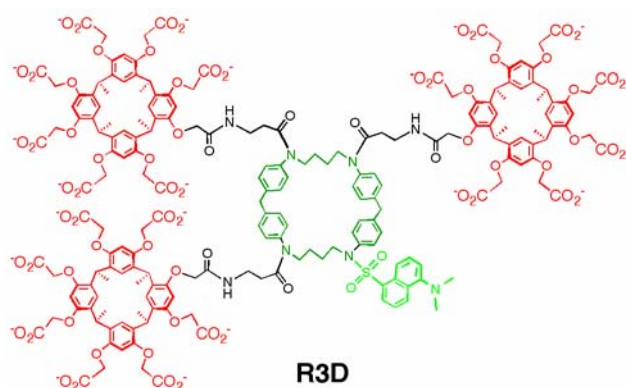


図3. 蛍光基を有する自己ホスト(R3D)

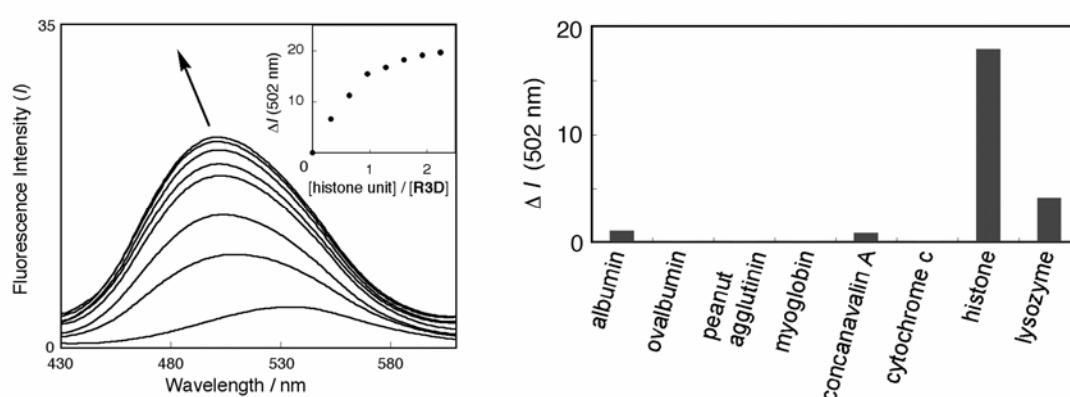


図4. ヒストン滴定における R3D (0.5 μM)の蛍光スペクトル変化(左)およびヒストン特異性(右)

4-3. 人工ホストを用いたクラスター効果の定量的解析

本研究においてクラスター効果は、ヒストンならびに修飾ヒストンに対する優れた人工ホストを開発する上で最も重要な分子設計の理念である。しかしながら、細胞表層レセプターとリガンドとのあいだで認められるクララスター効果は、生体系の複雑さや不安定さのために定量的な解析はこれまで一切なされていなかった。本研究では、結合ユニットをいくつ連結すれば十分な結合力が得られるのかを予め把握する必要があったので、その機能モデルとしてシクロファン(C1)を基体としたシクロファンオリゴマーを系統的に合成し、ゲスト分子への結合能におけるクラスター効果を定量的に評価した。具体的には、シクロファンを2つ、3つ、5つ連結したシクロファンオリゴマー

(C2, C3, C5)を合成した(図5)。さらに17個のシクロファンを連結したシクロファンヘプタデカマー(C17)も合成した。これらシクロファンオリゴマーの蛍光性ゲスト(TNS)に対する結合能を蛍光滴定法および SPR 法を用いて定量的な評価を行った。その結果として TNS に対する結合定数を比較したところ、C2, C3, C5 はそれぞれ C1 の13倍、24倍、1200倍に増大することがわかった(図6)。ホスト C17 では、更にゲスト結合力が1600倍に向上することも見出した。速度論的な解析から、結合と解離に伴う速度定数がシクロファンの連結数が増えるに従って大きく変化することも明らかにした。これらの結果はヒストンなどへの結合能を向上させるための人工ホストの分子設計指針にフィードバックし、重要な成果を得ることができた。

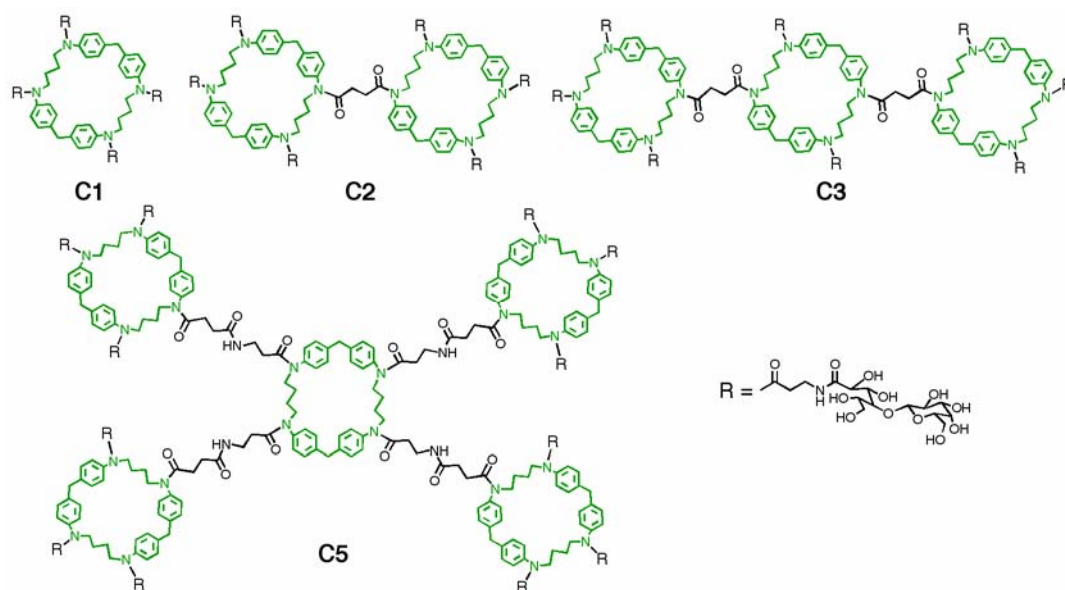


図5. シクロファン(C1)とシクロファンオリゴマー(C2, C3, C5)

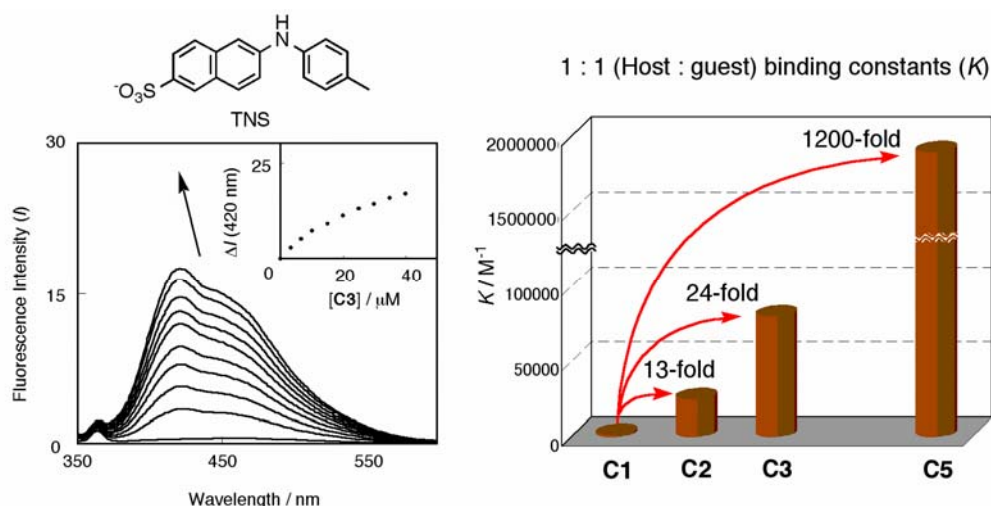


図6. シクロファンオリゴマーのゲスト捕捉におけるクラスター効果:
ホスト C3 添加における TNS (1 μ M) の蛍光スペクトル変化(左)および結合定数(右)

5. 自己評価

遺伝子の発現調節に係わるヒストンに対して特異的に結合できる人工ホストの合成に成功した。人工ホストによるヒストンの認識においては、結合ユニットのクラスター化と剛直な環状構造が重要であることを実証できた。人工ホストと蛍光性ゲストからなる超分子を用いてヒストンを蛍光検出できることも示した。また、蛍光基を導入した人工ホストも合成し、ヒストンの特異的な蛍光検出のみならず、ヒストンのアセチル化を識別することにも成功した。一方、ヒストンのメチル化に対する蛍光検出に関しては、当初計画とおりに進行せず研究期間内で公開できる成果までには至らなかったのが残念である。本研究で得られた成果は、修飾ヒストンなどの標的タンパク質の表面を認識し検出するための新規人工ホストの分子設計と開発に関して重要な指針を与えるものと考えられる。

6. 研究総括の見解

塩基性球状タンパク質であるヒストンはメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けやすい。ヒストンおよびその翻訳後修飾を特異的に認識する人工ホストを開発することを目的とした提案で、多種の人工ホスト化合物を合成し、ゲストであるヒストンに対する特性を調べている。主たる成果は次の3点である。

- ① レゾルシナレンオリゴマーのクラスター効果を利用してヒストンの認識を可能とした。また、人工ホストを用いてゲストをヒストン表面までデリバリーできることも示した。
- ② 蛍光ラベルしたホストを合成し、ヒストンの特異的蛍光検出も可能とした。同じ蛍光性ホストを用いてヒストンの酵素によるアセチル化反応の追跡にも成功した。
- ③ 最新の成果として、ロタキサン型の蛍光ホストを合成し、ヒストン認識と蛍光検出に成功している。

研究成果は 11 篇の原著論文、5 件の学会招待講演にまとめられている。

研究者はヒストンに結合するホスト分子合成に多大の努力を費やしており、興味ある多くの成果をあげている。当初の課題であったメチル化ヒストンの検出も今後可能になると期待できる。大腸癌などの疾患に関わっているとされるヒストンの異常メチル化などに対する分析法として期待されるときに、超分子化学を駆使した基礎研究として学術的にも高く評価できる。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ O. Hayashida, A. Kitaura, "Synthesis of Water-soluble Tris(cyclophane) Hosts and Surface Plasmon Resonance Study on Guest-binding Interaction with Immobilized Guest", Chem. Lett., 35, 808-809 (2006).
- ・ O. Hayashida, M. Uchiyama, "Cyclophane-based Tetra(resorcinarene) as A Host for Both

Histone and Hydrophobic Molecular Guest”, Tetrahedron Lett., 47, 4091–4094 (2006).

- ・ O. Hayashida, N. Ogawa, M. Uchiyama, “Surface Recognition and Fluorescence Sensing of Histone by Dansyl-Appended Cyclophane-based Resorcinarene Trimer”, J. Am. Chem. Soc., 129, 13698–13705 (2007).
- ・ O. Hayashida, M. Uchiyama, “Multivalent Macrocyclic Hosts: Histone-surface Recognition, Guest Binding, and Delivery by Cyclophane-based Resorcinarene Oligomers”, J. Org. Chem., 72, 610–616 (2007).
- ・ O. Hayashida, D. Sato, “Preparation and Multivalently Enhanced Guest-binding Affinity of Water-soluble Cyclophane Heptadecamers”, J. Org. Chem. Soc., in press.

(2)特許出願 なし

(3)著書

- ・ O. Hayashida, “Syntheses and Functionalization of Nano-sized Water-soluble Azacyclophanes, “*Bottom-up Nanofabrication: Supramolecules, Self-assemblies, and Organized Films,*” ”, ed by K. Ariga, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, in press.

(4)学会発表

ポスター発表(国際)

- ・ Osamu Hayashida, Masaki Uchiyama, “Cyclophane-based Multi(resorcinarene) as a Guest-carrier for Histone”, Post-IUPAC Symposium of ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference (The Fukuoka Symposium), 2006
- ・ O. Hayashida, M. Uchiyama and N. Ogawa, “Histone-surface Recognition by Multivalent Macrocyclic Hosts”, 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 2007
- ・ O. Hayashida, A. Kitaura and D. Sato, “Surface Plasmon Resonance Study on Guest-binding Interaction with Immobilized Guests”, 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 2007
- ・ O. Hayashida, A. Kitaura, and D. Sato, “Synthesis of Water-soluble Polytopic Cyclophanes and Multivalency Effects in Macrocycles”, The 2nd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis Core Research Institutions, 2007
- ・ O. Hayashida, D. Sato, N. Ogawa, M. Uchiyama, “Design and Properties of Functionalized Cyclophanes as a Multivalent Host”, Singapore International Chemistry Conference 5 (SICC-5), 2007.

(5)招待講演

招待講演(国際)

- ・ O. Hayashida, “Synthesis and Properties of Functionalized Cyclophanes as a Multivalent Host and Carrier”, International Symposium on Biotechnology, Metal Complexes and Catalysis, 2006
- ・ O. Hayashida, “Guest-binding, Delivery, and Protein Surface Recognition by Functionalized Cyclophanes”, The 2nd International Symposium on Functional Innovation of Molecular Informatics, 2006
- ・ O. Hayashida, “Guest-capturing, Delivering, and Protein Surface Recognition by Functionalized Cyclophanes”, 3rd International Forum: New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials, 2006
- ・ O. Hayashida, M. Uchiyama, N. Ogawa, “Synthesis and Characterization of Functionalized Cyclophanes as a Multivalent Host and Carrier”, Post ISNA-12 Symposium on Physical Organic Chemistry in Fukuoka, 2007

(B) その他の主な成果

なし