

(6) サブテーマ4：光変換を読み出し信号とするバイオセンシングシステムの構築

九州大学 浜地 格

① 研究概要

生体内に存在する微量な生理活性物質（たとえば金属イオンやグルコースといった糖類などの特定物質）に対する定量的なセンシングを光吸収や発光シグナルの変化として読み出すために必要となる新規な手法や光センシング分子システムの構築を目指して、委託研究を行った。特に糖類を蛍光センシングすることのできる蛍光タンパク質を作成する化学手法を新規に開発することに成功した。ここで調製された凍結合成タンパク質はグルコース、マンノース、分岐型トリマンノシドなど生理的に重要な糖類を蛍光強度、波長の変化を検出シグナルとして簡便にセンシングできる。この発明に関して特許を申請・取得した。また、遷移金属イオンに対して高い親和性をもった非天然アミノ酸の大量合成を確立し、 α ヘリックス性ペプチド内にそれを組み込むことによって銅イオンの濃度を円偏光変化としてセンシングできる分子システムの構築に成功した。

② フェーズ I の取り組み（H9年11月～H12年3月）

②-1 目的及び目標

人の生体内に存在する微量な生理活性物質は、細胞、組織、人体の状態を敏感に反映する分子マーカーであり、これらの物質の存在量、濃度変化などを定量的にセンシングすることは健康管理、病気の早期診断など様々な面できわめて重要である。ところが一般にこれらの定量的なセンシングは困難であり、また、煩雑な操作・高価な設備を必要とする場合が多く、簡便な検出法が強く求められている。本サブテーマでは、生体内に存在する特定の微量な生理活性物質（たとえば金属イオンやグルコースといった糖類などの特定物質）に対する定量的なセンシングを光吸収や発光シグナルの変化として読み出すために必要となる新規な手法や光センシング分子システムの構築を目指した。光読み出し手法は、核磁気共鳴法（MRI）などと比較すると高価な設備を必要とせず、簡便で多くの献体を迅速に評価することが出来ると期待されている。

②-2 研究方法及び結果

ペプチドやタンパク質が本来持っている分子認識能の高い感度の選択性という特徴を、バイオセンサーとして利用するためには、分子認識と読み出しをうまくカップリングさせる化学手法が必要不可欠である。そこで本研究では、特定の糖類や金属イオンを結合できるペプチドやタンパク質を分子認識基盤として、その特定部位に（蛍光）色素類を修飾し、分子認識現象を光吸収・蛍光変化とをカップリングさせて、生体内微量物質に対する光センシング

を可能にすること新規なシステム構築の方法論を開発した。

糖結合タンパク質（レクチン）への部位特異的な蛍光色素ラベル化法を開発するために、糖結合タンパク質（レクチン）への部位特異的な蛍光色素ラベルに有効と考えられるアフィニティラベル化分子の合成に成功した。得られたラベル試薬を実際にコンカナバリンというレクチンと混合し、弱い光を照射することによって光親和性ラベル

Saccharide ligand

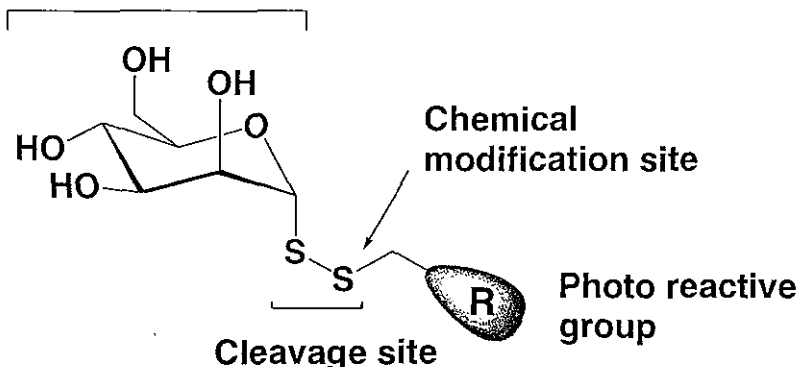
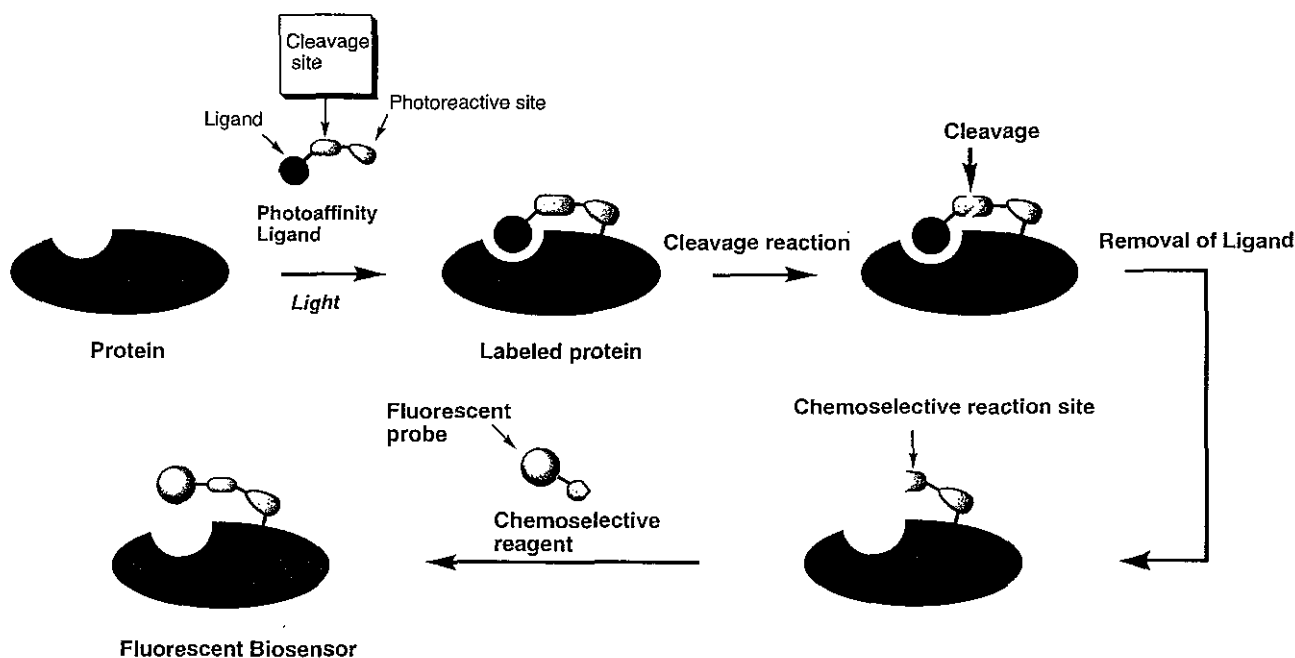


図 6 - 1 P - P A L M 試薬

化を行った。このラベル化タンパク質を還元処理して、糖リガンド部位を除去し、さらに還元末端のチオール基を蛍光色素で特異的に化学修飾することによって蛍光性のレクチンタンパク質の作成に成功した。この手法は我々が初めて開発した（光アフィニティラベル化後修飾：P - P A L M）ものであり、特許出願を行った。



スキーム 6 - 1 P - P A L M

ついでレクチンを基体とした糖センサーのセンサー挙動を検討した。基体として用いたコンカナバリンというレクチンはグルコース、マンノースに対して親和性を示すが、ラクトースに対しては全く結合性を持たないことが知られている。我々が調製した蛍光性コンカナバリンは、グルコース、マンノース型の糖鎖に対して蛍光変化を示す一方で、ガラクトースに対しては蛍光変化を示さず、分子認識挙動と蛍光読み出しとのカップリングが完全に一致することが明らかとなった。

すなわちP-PALMによって非蛍光性のレクチンを蛍光化するだけでなく、蛍光性バイオセンサーとして機能改変することが可能となった。

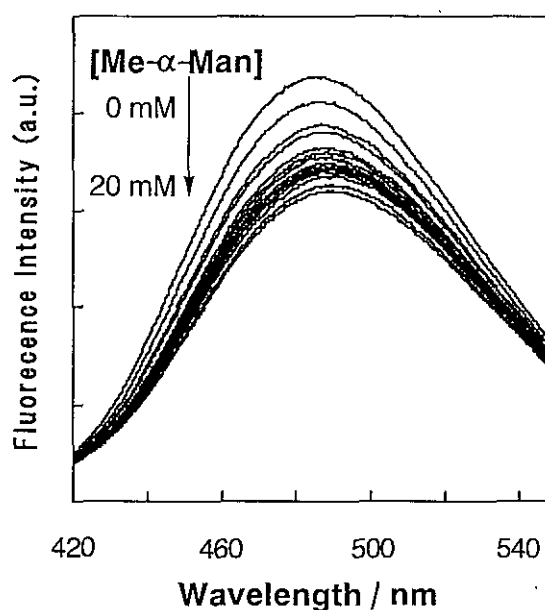


図6-2 糖添加による蛍光変化

一方、金属イオンをセンシングすることの出来るバイオセンサーとしては、ペプチドの螺旋構造を分子認識モチーフとして利用することを考案した。ただし、天然アミノ酸の組み合わせでは、選択性や親和性を制御することが困難なので、金属イオン結合能を持った非天然アミノ酸をペプチド骨格に導入するシステムを作った。まず遷移金属イオンに高い結合能を持った非天然アミノ酸の分子設計および大量合成法の検討を行い、鉄や銅などの遷移金属に高い結合能力をもったイミノ二酢酸型非天然アミノ酸の大量合成法を天然アミノ酸であるリジン为原料に確立した。ついで、これを適当な保護基で修飾して、自動合成装置を用いた非天然アミノ酸のペプチド鎖への導入に対応できるように種々の条件検討を行った結果、市販の自動合成装置で10種類以上のペプチドに導入できることを確認した。ここで得られたペプチドを用いて、特定の金属イオンを結合することによって立体構造が変化するペプチド配列の検索を行い、合成ペプチドのひとつに、銅イオンとの結合によって螺旋状の構造を取るものがあることを円偏光二色性スペクトルによるスクリーニングから見つけた。

②-3 考 察

予備的ではあるがP-PALM法を開発し、当初のアイデアがかなり実現可能になってきたので、選択性の検討や改良および他のレクチンタンパク質への適用を確かめるなどの一般化が必要と思われる。この糖タンパク質を基体としたレクチン型糖質センサーに関しては、浜地がJST先がけ21研究員に選ばれて後、人工レセプターとのハイブリッドによって糖

類に対する選択性が向上することを発見し、さらに展開中である。

また、ここで発見したペプチド型センサーについては、蛍光色素のペプチド側鎖への導入、および円偏光で見られた構造変化をもっと簡便な光読み出し手法である蛍光変化につなげることが課題である。

参考文献

- 1) 浜地格、特許の名称「蛍光性糖センサー用タンパク質とその製造方法」(1999年出願)
- 2) 浜地格、特許の名称「特定ペプチドを選択的に識別する金属錯体レセプター」(2000年出願)
- 3) I. HAMACHI, T. NAGASE, S. SHINKAI,
A General Semisynthetic Method for Fluorescent Saccharide-Biosensors Based on a Lectin,
J. Am. Chem. Soc., 122, 12065-12066 (2000).
- 4) T. NAGASE, S. SHINKAI, I. HAMACHI,
Post-Photoaffinity Labeling Modification Using Aldehyde Chemistry to Produce a Fluorescent Lectin toward Saccharide-Biosensors,
Chem. Commun., 229-230 (2001).