



## 高蛍光量子収率かつ酸素による消光を受けにくい疎水性色素：アルキニルピレン

### 1. はじめに

タンパク質やDNAといった生体分子を蛍光ラベル化する場合、現在おもに三つの選択肢がある。以下、それぞれの手法の特徴とその問題点に関して概説する。

(i) 本誌読者に最も馴染みのある蛍光タンパク質は、特にラベル化の対象がタンパク質の場合、確立された手法で容易に導入できる<sup>1)</sup>。しかしながら、蛍光タンパク質は巨大分子であるため、観察対象である生体分子が持つ機能への影響も少なくない。またその種類が限定されるため、発光波長を選択することも困難である。

(ii) 最近注目を集めている量子ドット（量子効果の現れる半導体微粒子）は、粒子サイズを調整することで発光波長を変えることができ、光退色しにくいという特長を有する<sup>2)</sup>。一方、微粒子の再現性のある加工法や官能基の化学修飾法の確立、ならびに重元素を含む故の安全性の確認が課題となっている。

(iii) 従来から汎用されている蛍光色素は、低分子量であることから観察対象に与える影響を最小限にとどめることができる<sup>3)</sup>。有機合成によって、様々な色素を設計・合成することが可能であり、化学修飾も容易である。蛍光色素は用途によって使い分けられており、その問題点も用途に応じて異なる。

代表的な蛍光色素の骨格としてピレンがある<sup>4)</sup>。ピレンは疎水性蛍光分子であり、単独ではモノマー発光を、二分子が近接するとエキシマー発光（モノマーに比べて長波長側での発光）を示す。このため、DNA、タンパク質、細胞膜といった生体分子の位置・空間情報を得るための蛍光色素として多用されてきた<sup>5~8)</sup>。しかしながらピレンにも、励起波長（350nm）が比較的短波長、感度が悪い（蛍光量

子収率が低い）、酸素による消光が著しいといった問題点がある。著者らは一連の光化学・超分子化学の研究の過程で、上記欠点を克服した新規ピレン骨格、アルキニルピレンを創製することに成功した<sup>9)</sup>。本稿では、アルキニルピレンの光物性とその生体分子の蛍光ラベル化に関して、他の研究者による成果も一部含めて解説する。

### 2. アルキニルピレンの化学構造と光物性

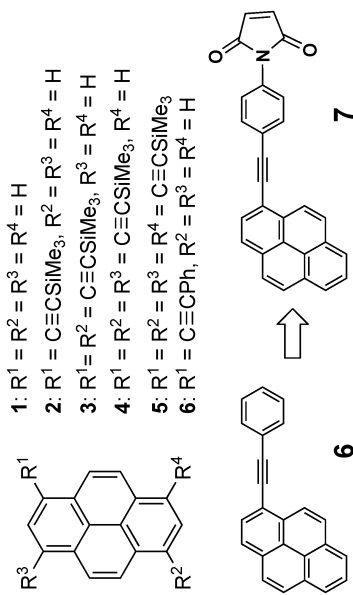
ピレンの欠点を解消し、かつピレンの特異的な光物性（エキシマー発光を示す）を保持する候補構造としてアルキニルピレンを考えた。アルキニルピレンは、母骨格であるピレンの特定の位置にアルキニル基（炭素-炭素三重結合）を導入したものである。この決定は、我々のこれまでの光化学・超分子化学における研究成果と分子軌道計算の予測に基づいている<sup>10~12)</sup>。

表1に、ピレン1ならびに合成したアルキニルピレン2-6の構造式とその光物性を示す。アルキニルピレンでは、ピレン1と比較して、吸収波長において最大で100 nm、発光波長において65nmの長波長シフトが観測された（励起波長の問題の解決）。また高濃度溶液においては、エキシマー発光を示すこともわかった（特異的な光物性を保持）。次に、アルキニルピレンの蛍光量子収率に関して言及する。蛍光量子収率とは、吸収した光子のうちどれだけの光子が蛍光として放出されるかの割合である。蛍光量子収率が1に近いほど、蛍光分子としての能力が高い（感度がよい）ことになる。酸素除去下でのピレンの蛍光量子収率が0.32であるのに対して、同条件下でのアルキニルピレンのそれは0.5以上であり、最も高いものはほぼ1であった（感度の問題の解決）。これらの値は酸素除去下での測定結果であるが、蛍光ラベル化された生体分子を、厳密に酸素（空気）から遮断して観察することは難しい。そこで重要になってくるのは、酸素存在下における蛍光量子収率である。ピレン1の蛍光は、酸素の存在によって著しく弱められることが知られており、実際、その蛍光量子収率は0.019まで下がる。一方アルキニルピレンの蛍光は酸素の影響を受けにくく、たとえば6は酸素存在下でも0.56の高い蛍光量子収率を示した（酸素による消光の解決）。

以上の光物性のデータより、アルキニルピレンは、ピレンの欠点を克服し、かつピレンの特長を保持した蛍光分子であることがわかった。さらなるアルキニルピレンの利点として、その構造への化学修飾の容易さがある。好都合な光物性を持つアルキニルピレン6においては、アルキニル

表1 アルキニルピレンの構造式と光物性

ピレン ならびに アルキニル ピレン誘導体	吸収		発光 (モノマー)		発光 (エキシマー)	
	吸収波長 (nm)	モル吸収係数 ( $\times 10^4$ ) ( $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ )	発光波長 (モノマー) (nm)	蛍光量子収率 (カッコ内は酸素存在下)	発光波長 (エキシマー) (nm)	蛍光波長 (エキシマー) (nm)
1	334	4.63	373	0.32 (0.019)	475	
2	365	5.77	386	0.55	505	
3	390	9.22	399	0.67	523	
4	413	10.0	421	0.80	545	
5	434	13.2	438	>0.99	568	
6	382	4.47	391	0.78 (0.56)	509	



基で連結したベンゼン環を化学修飾することで多彩な蛍光プローブへと誘導できる。ピレン骨格に直接化学修飾する場合と比較して、ベンゼン環の化学修飾は多様性もあり簡便でもある。実際に、次項から用いる蛍光プローブ分子は、6のベンゼン環をさらに化学修飾したものである。

### 3. アルキニルピレンを利用したタンパク質の蛍光ラベル化

タンパク質を蛍光ラベル化するにあたって、アルキニルピレン6にマレイミド基を導入した蛍光ラベル化剤7を設計した<sup>9)</sup>。マレイミド基はチオール基と選択的に反応するため、システイン残基のラベル化に汎用されている。タンパク質のラベル化の前段階として、システインやシステインを含むペプチドをラベル化し、アルキニルピレンの蛍光ラベル化剤としての能力を検証した。

図1aは、7と8（参照分子：市販のピレンマレイミド）そのもの、ならびにL-システインを7と8でラベル化した後のリン酸緩衝溶液中における蛍光発光スペクトルである。ラベル化する前、7と8の発光はほとんど確認できない。この消光の原因はマレイミド基からの光誘起電子移動(photoinduced electron transfer: PET)によるものであるが、本稿においてはその詳細は割愛する<sup>9)</sup>。一方ラベル化されたL-システインは発光を示し、7でラベル化されたシステインの蛍光強度が断然大きいことがわかる。蛍光ラベル化剤7は、蛍光のオン/オフスイッチングによりラベル化反応の成否を判断することができ、かつその蛍光強度も大きいということが判明した。これらを定量的に評価したのが図1aのインセットに示した蛍光量子収率である。L-システインに加えてグルタチオン(Glu-Cys-Gly)の結果も併記している。7と8そのものの蛍光量子収率はほぼ0であるが、7でラベル化されたシステインやグルタチオンの蛍光量子収率は、8の場合と比べて約20倍の値を示した。

図1bには、複数のシステイン残基を含むウシ血清アルブミン(BSA)を7と8でラベル化した後のゲル電気泳動写真を載せている。左側がCoomassie Blueで染色したものの、右側が照射下において蛍光を観察したものである。右側の写真においては、7でラベル化したレーン4においてのみはっきりとBSAのバンドを確認することができた。以上の結果より、アルキニルピレンを基本骨格とする7は、タンパク質のラベル化においても有用な蛍光ラベル化剤であることがわかった。

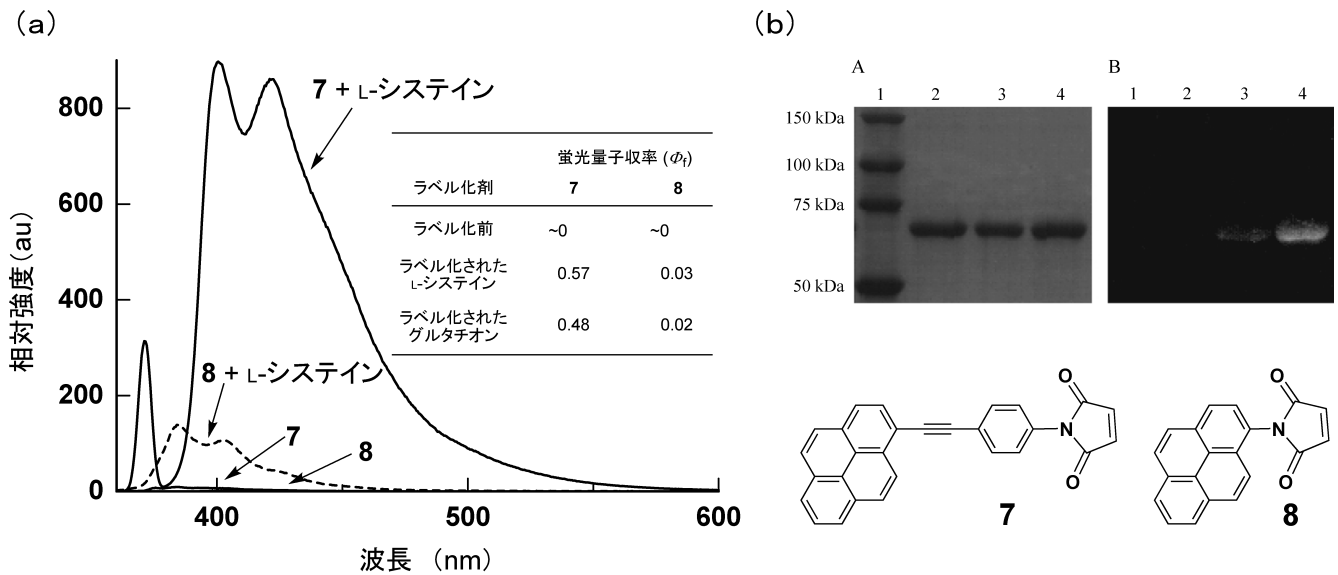


図1 システイン (残基) の蛍光ラベル化剤7と8の比較

(a)ラベル化反応前後の7と8の蛍光発光スペクトル:  $[7] = 1.2 \times 10^{-6} \text{M}$ ,  $[8] = 3.8 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $[7 + \text{L-システイン}] = 9.3 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $[8 + \text{L-システイン}] = 5.7 \times 10^{-7} \text{M}$ .

7に対する励起波長は, 369nm, 8に対する励起波長は 341nm. インセットは, L-システインとグルタチオンを7と8でラベル化した際の蛍光量子収率.

(b)BSAを7と8でラベル化した際のゲル電気泳動写真. (A)Coomassie Blueによる染色, (B)312nmを照射した際の蛍光. レーン1: 分子量マーカー, レーン2: BSAのみ, レーン3: 8でラベル化したBSA, レーン4: 7でラベル化したBSA.

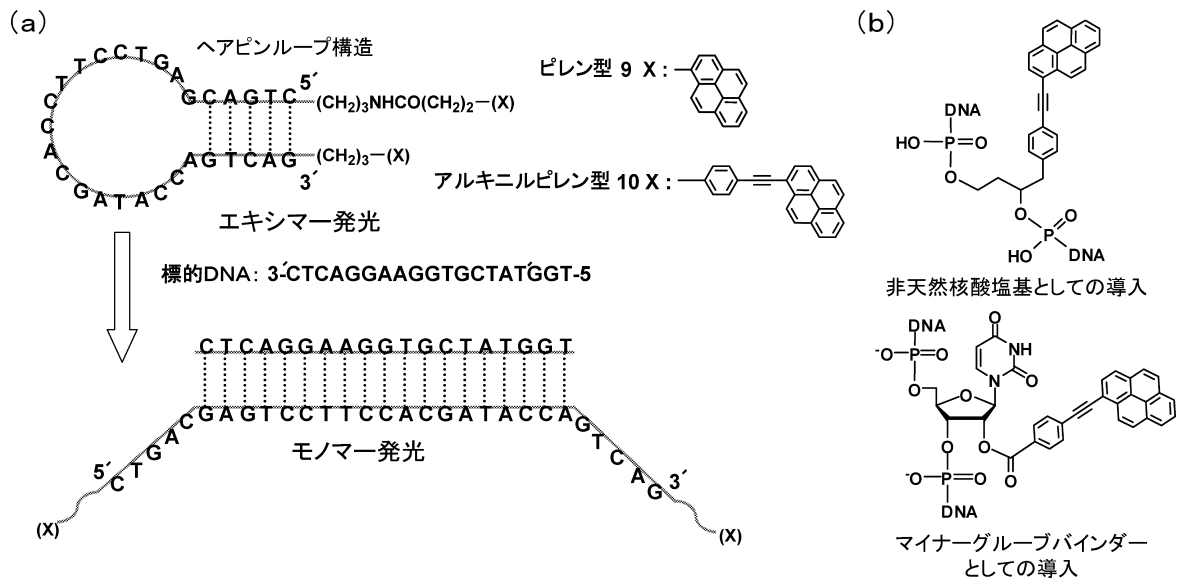


図2 アルキニルピレン骨格を利用したDNAプローブ

(a) 著者らによるピレンならびにアルキニルピレンを導入したDNAプローブ9と10.

(b) KorshunとBerlinらによるアルキニルピレンのDNAへの導入例.

#### 4. アルキニルピレンを利用した DNA の蛍光ラベル化

著者らは以前、ヘアピンループ構造を有する一本鎖 DNA の両末端にピレンを導入した DNA プローブ分子 9 を開発した (図 2a)<sup>12)</sup>。ピレンの有する特異的な光物性であるエキシマー発光特性を利用したもので、エキシマーとモノマーのスイッチングにより DNA 鎖を検出する仕組みである。9 のみで存在する時にはヘアピンループ構造を形成しているため、二枚のピレンが近接しエキシマー発光を生じる。9 のループ領域に相補的な配列を有する DNA が存在すると、ヘアピンループ構造が解消されモノマー発光へと切り替わる。また 9 を用いることで、19 塩基中に一つ塩基多型 (SNP) が存在する DNA 鎖と完全相補鎖とを明確に識別することにも成功した。この DNA プローブの更なる感度向上を目指して、ピレンの代わりにアルキニルピレンを導入した 10 を開発した<sup>9)</sup>。10 の両末端に連結したアルキニルピレンも、6 の基本骨格から容易に誘導されたものである。汎用タイプの蛍光測定装置を用いた場合、9 では検出限界のプローブ分子濃度が  $10^{-8}$ M オーダーであったのに対して、10 では  $10^{-10}$ M オーダーまで向上した。

他の研究グループも、アルキニルピレンを用いた研究を展開している。ロシアの Korshun と Berlin らは、著者らと同時期に異なる戦略で DNA のラベル化にアルキニルピレンを用いた<sup>13,14)</sup>。彼らはアルキニルピレンを、非天然核酸塩基として組み込む、もしくはマイナーグループバインダーとしてリボースに連結するという手法をとっている (図 2b)。アルキニルピレンを組み込んだこれらの DNA プローブは、プローブに対して相補的な配列を有する DNA 鎖を検出できる。最近、彼らは図 2b の上側に示したプローブを用いた SNPs 解析に関する報告も行っている<sup>15)</sup>。

#### 5. おわりに

ここまでアルキニルピレンの光物性について述べてきたが、改善すべき問題点としてその小さいストークスシフト (発光最大波長と吸収最大波長の差) があげられる。生命科学の研究で頻繁に利用される蛍光顕微鏡で観察を行う際、ストークスシフトの小さい蛍光色素を用いると、カットフィルターの使用を余儀なくされる。その結果、検出されるべき発光も一部カットされてしまい検出感度が低下する。表 1 に示したように 6 のストークスシフトは約 10nm と小さく、カットフィルターの使用を避けられない。二つの解決策が考えられ、一つはエキシマー発光のみ発するよ

うに二つのアルキニルピレンを近接させた分子とする手法、もう一つは、次に示すアメリカの Burgess らによる手法である。彼らは、アルキニル基を介してドナーとなる蛍光分子とアクセプターとなる蛍光分子を連結することで、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動効率がよく、大きいストークスシフトを有する蛍光分子を開発した<sup>16)</sup>。6 のアルキニル基にはベンゼン環が連結されており、アクセプターとなる蛍光色素をベンゼン環に導入することで、大きなストークスシフトを有する蛍光色素へと変換することも可能となる。

生命科学への応用には直接関係しないが、アルキニルピレンの光物性を光学材料へと応用する研究も展開されている<sup>17,18)</sup>。生体分子の蛍光標識に好都合な光物性は、有機 EL (electroluminescence) や非線形光学などの光材料科学の分野で要求される分子の特性と重なるところも多い。今後様々な科学・技術分野でアルキニルピレンをキー骨格として用いた研究が行われる可能性がある。本稿が生命科学を専門とする本誌読者の興味を喚起し、アルキニルピレンの新たな応用に結実することがあれば幸いである。

- 1) 唐澤智司, 宮脇敦史 (2004) 実験医学, 22, 2152-2156.
- 2) Smith, A.M., Gao, X., & Nie, S. (2004) *Photochem. & Photobiol.*, 80, 377-385.
- 3) Haugland, R.P. (2002) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 9th ed., Molecular Probes, Inc., Eugene.
- 4) Birks, J.B. (1970) *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley-Interscience, London.
- 5) 齋藤義雄, 岡本晃充, 齋藤 烈 (2006) バイオインダストリー, 23, 56-62.
- 6) Zama, M., Bryan, P.N., Harrington, R.E., Olins, A.L., & Olins, D.E. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42, 31-41.
- 7) Lehrer, S.S. (1995) in *Subcellular Biochemistry*, Vol. 24: Proteins: Structure, Function, and Engineering (Biswas, B.B. & Roy, S. eds.), pp. 115-132, Plenum, New York.
- 8) Wieb van der Meew, B. (1988) in *Subcellular Biochemistry*, Vol. 13: Fluorescence Studies on Biological Membranes (Hilderson, H.J. ed.), pp. 1-53, Plenum, New York.
- 9) Maeda, H., Maeda, T., Mizuno, K., Fujimoto, K., Shimizu, H., & Inouye, M. (2006) *Chem. Eur. J.*, 12, 824-831.
- 10) Inouye, M., Fujimoto, K., Furusyo, M., & Nakazumi, H. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1452-1458.
- 11) Abe, H., Mawatari, Y., Teraoka, H., Fujimoto, K., & Inouye, M. (2004) *J. Org. Chem.*, 69, 495-504.
- 12) Fujimoto, K., Shimizu, H., & Inouye, M. (2004) *J. Org. Chem.*, 69, 3271-3275.
- 13) Dioubanajova, N.N., Malakhov, A.D., Shenkarev, Z.O., & Korshun, V.A. (2004) *Tetrahedron*, 60, 4617-4626.
- 14) Malakhov, A.D., Skorobogatyi, M.V., Prokhorenko, I.A., Gontarev, S.V., Kozhich, D.T., Stetsenko, D.A., Stepanova, I.A.,

- Shenkarev, Z.O., Berlin, Y.A., & Korshun, V.A. (2004) *Eur. J. Org. Chem.*, 1298-1307.
- 15) Prokhorenko, I.A., Malakhov, A.D., Kozlova, A.A., Momyaliev, K., Govorun, V.M., & Korshun, V.A. (2006) *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 599, 144-151.
- 16) Ham, J., Jose, J., Mei, E., & Burgess, K. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1684-1687.
- 17) Goze, C., Ulrich, G., & Ziesel, R. (2007) *J. Org. Chem.*, 72, 313-322.
- 18) Shimizu, H., Fujimoto, K., Furusyo, M., Maeda, H., Nanai, Y., Mizuno, K., & Inouye, M. (2007) *J. Org. Chem.*, 72, 1530-1533.

藤本 和久, 清水 久夫, 井上 将彦  
(富山大学大学院医学薬学研究部薬化学研究室)

Alkynylpyrenes as novel hydrophobic fluorophores having high fluorescence quantum yields under biological conditions

Kazuhisa Fujimoto, Hisao Shimizu, and Masahiko Inouye  
(Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan)

## EGF 受容体下流のプロテオミクスより同定された新規タンパク質の機能解析

### 1. はじめに

様々な生物種におけるゲノム配列が決定され、詳細な遺伝子情報データベースが確立し、また、質量分析装置を用いたタンパク質解析技術の急速な発展に伴い、現在ではそれらを応用することにより、微量なタンパク質からでもそのアミノ酸配列を決定することが可能となった。そして、その技術を用いた様々なタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）が盛んに行われている。ここでは、細胞増殖因子のシグナル伝達機構の包括的理解や、それに起因する疾患原因タンパク質の同定を目指したプロテオミクスに焦点を絞り、我々の最近の研究結果を交え紹介させていただく。

### 2. 細胞増殖因子受容体シグナル伝達に着目したリン酸化プロテオミクス

一般的に、細胞増殖因子受容体は細胞外領域でリガンドと結合すると細胞内領域のタンパク質リン酸化酵素活性が上昇し、受容体自身もしくは他の基質をリン酸化することにより、下流へのシグナル伝達を開始される。EGF (epi-

dermal growth factor: 上皮細胞増殖因子)をはじめとして、細胞増殖因子のシグナル伝達機構は細胞増殖のみならず、細胞の形態変化や運動能獲得、細胞周期進行など、細胞の様々な生理現象に関与する。また、そこで機能するいくつかのタンパク質は、受容体自身を含め、がんや他の疾病との直接的関与が見出され、臨床面からも注目されている。近年、受容体抗体や受容体リン酸化酵素活性阻害剤が分子標的医薬として開発され、がん治療等に利用されている<sup>1)</sup>。そのような背景から、細胞増殖因子やサイトカインシグナル伝達機構をより詳細に理解するために、それらの刺激により細胞内でリン酸化されるすべてのタンパク質を網羅的に明らかにするためのリン酸化プロテオミクスが盛んに行われている。

### 3. リン酸化プロテオミクスの戦略

まず、リン酸化チロシン特異的抗体を用いた方法が挙げられる。アミノ酸側鎖の大きさの影響からか、広範なリン酸化セリン、スレオニン残基を認識する優れた抗体はなかなか作製されていないのが現状であるが、4G10 や PY20 などのモノクローナル抗体は様々なタンパク質のリン酸化チロシン残基を認識し、特異性も高く、細胞内シグナル伝達機構の研究において大変便利なツールとして用いられている。これらの抗体を用いた免疫沈降により、細胞内でチロシンリン酸化されたタンパク質、もしくはそれらに結合する因子を比較的容易に数多く精製することができ、そのサンプルを質量分析装置により網羅的に同定する試みが筆者らのグループも含め行われてきた。2000 年ごろから、この方法によるチロシンリン酸化タンパク質、およびリン酸化部位の同定に関する報告がなされ、ここ数年の質量分析装置の性能向上に伴い、年を追うごとにリン酸化ペプチドの同定数が増加してきた。2005 年には種々のリン酸化抗体を販売する Cell Signaling Technology のグループが、様々な細胞系 (Pervanadate 処理した Jurkat 細胞、活性化型 Src を過剰発現した NIH3T3 細胞、およびリン酸化酵素 ALK が転座し活性化している未分化大細胞型リンパ腫) から 688 種類のチロシンリン酸化ペプチドを取得し、628 箇所チロシンリン酸化部位を同定したことを報告した<sup>2)</sup>。

### 4. セリン・スレオニン残基のリン酸化を含めたリン酸化プロテオミクスの現状

(我々の解析の反省も含め記すと) 細胞内で実際に生じるタンパク質中のリン酸化アミノ酸残基はチロシンに比較してセリン、スレオニンの方が圧倒的に多い。細胞増殖因子