

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (1994) 39(14):2322-2334.

蛍光標識生物活性物質 ライフサイエンス研究への新展開

平塚寿章

蛍光標識生物活性物質

——ライフサイエンス研究への新展開——

平塚寿章

生物活性物質の本来の生物活性を損なわないようにして、有用な蛍光団で標識した分子が蛍光標識生物活性物質 (FLBC) である。FLBC を使うと、生体系を生かしたままでも生体反応を追跡できるので、天然の生物活性物質を使った場合には得られないような多種多様な情報が得られる。これまでは見ることでできなかった生体のリアルタイムの挙動を、高感度で見ることも可能である。FLBC を使うと何がわかるのか、最近の展開について解説する。

Key words 【蛍光標識】【生物活性物質】【生体イメージング】

はじめに 酵素に結合する基質や補酵素、蛋白質に結合する各種調節因子、そしてレセプターに結合するホルモン、神経伝達物質、薬物、毒素、ペプチドなど、生体内では蛋白質とこれより低分子の化合物の相互作用が重要な生体反応を起こす引き金となる場合が多い。この相互作用は無秩序なものではなく、一定の強さをもつ特異性のある相互作用で、“結合”と定義される。結合する低分子化合物をリガンドと言うならば、リガンドの結合により蛋白質が受ける物理的刺激はより高次の生体系へと伝達され、生物の生命活動にも大きくかわってくる。

そこでライフサイエンス分野の研究者たちからは次のような要望がだされる。あるリガンドと特異的に結合する蛋白質を細胞内で見つけたり、そのリガンドが結合したときに蛋白質が受ける変化を検出することはできないだろうか。さらに、細胞や生体系が生きている状態で、リガンドと蛋白質の結合をリアルタイムで“見る”ことができないだろうか。蛍光標識生物活性物質 (fluorescence-labeled bio-active compounds;

FLBC) が使えるとこれが可能になる。

FLBC とは筆者の造語であるが、生物活性物質である蛋白質やリガンドがもつ本来の生物活性を損なわないようにして、その一部に有用な蛍光団を化学結合させた化合物であると定義してよい。感度の高い化学分析などを目的とした蛍光性誘導体は、それがどんなに強い蛍光を発しても、蛍光標識により本来の生物活性が失われたり変えられたりしたものはもはや FLBC ではない。理想的な FLBC というのは、その母体化合物である非蛍光標識の蛋白質やリガンドとともに生体系に入れられたときに、生体反応では容易には両者が区別されないほど巧妙に生体系をだませる蛍光標識化合物のことである。

本稿では、さまざまな生物活性物質を母体化合物としてデザインされた FLBC をうまく利用すると、ライフサイエンスの研究を進めるうえでどのような情報が得られるのか、最近の話題を中心にして考察してみたい。

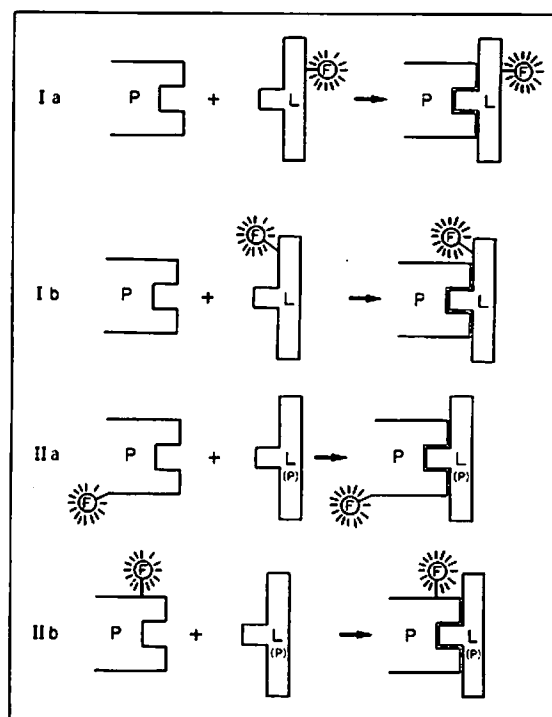


図1 FLBCのデザインと蛍光標識法
P: 蛋白質, L: リガンド, ⊙: 蛍光団。凹と凸はそれぞれの結合部位を表す。

1. FLBCのデザインと調製

1. 蛍光標識の方法

蛋白質とリガンドの結合に関する情報を、FLBCにつけられている蛍光団の蛍光を手がかりとして検出するための標識方法は、次の2つに大別される(図1)。第一の方法では、リガンドの生物活性発現に関与している部位から遠く離れたところに蛍光団を化学結合させる(Ia)。しかしこの方法では、蛋白質のリガンド結合部位で起きる構造変化を追跡するためには、蛍光団が遠くに離れているので感度が低い。そこで、蛍光団を蛋白質との結合部位の近くにもってくる(Ib)。この方法は、蛍光団がリガンドの生物活性を阻害するおそれがあるので、Iaの方法に比べ、生物活性を損なわないようにデザインするのが難しい。しかし、うまくできると非常に有用なFLBCとなる。IaとIbのどちらの方法を使っても、問題とするリガンドに結合する蛋白質は、結合しているFLBCの蛍光を目印にして同定

される。

第二の方法は、蛋白質に蛍光標識するものである。この場合も、IIaとIIbの2とおりがある。IIaに関しては、リガンドに標識する場合(Ia)よりは、分子量が大きい分だけ元の生物活性を損なうおそれがあるに少ない。しかしIIbに関しては、Ibと同じ困難さがある。どちらの方法を使うにせよ、これらのFLBCを使うとこの蛋白質と結合するリガンドまたは蛋白質を同定したりその結合様式などを知ることができる。

IとIIのどちらの方法を使うにしても、標識される部位に反応基がなければならない。蛋白質の場合は、-SH, -NH₂, -COOH, -OH基などを利用するのが普通である。リガンドに標識する場合もこれらの基や-NH(R)基があれば利用できるが、ない場合には新たに導入することになる。どんな場合でも、生物活性の発現に関与している反応基は利用できない。

2. 蛍光団の選び方

次に標識に使う蛍光団を選ばなければならない。新規蛍光団の開発を目的としないのなら、標識される部位の反応基にあわせて、市販されている蛍光標識試薬のなかから選択するのがよいだろう。利用する蛍光団の望ましい性質としては次の項目があげられる。

- (1) 光安定性や化学安定性が高いこと。
- (2) 励起波長が360 nmより長波長側にあること。
- (3) 蛍光波長が410 nmより長波長側にあること。
- (4) 分子吸光係数が大きく蛍光も強いこと。
- (5) 分子サイズがあまり大きくないこと。

さらに補足すると、(2)については、得られたFLBCを蛍光顕微鏡などを使った実験に用いる場合、短波長の光を長時間サンプルに照射すると生体系を損傷してしまうおそれがある。また、300 nmより短波長の光で励起すると、蛋白質中のTrp残基も励起され、FLBCの蛍光スペクトルの解釈が複雑になってくる。(3)については、蛍光顕微鏡やUVランプによる照射で観察する場合、これより短波長の蛍光ではFLBCとバックグラウンドの区別が困難になり、人間の眼を疲れさせる。しかし長波長の蛍光がよいといっても、その波長が600 nmにもなると、これを受ける蛍光分光光度計のホトマルの感度が急激に落ちてしまうことも考慮しなければならない。(4)については、より高い検出感度を得るためである。

一般に小さなサイズの蛍光団で、強い蛍光を発するものはほとんどないといっているが、IbやIIbの方法を使ってFLBCを得る場合、とりわけ考慮しなければならない点は(5)であろう。アデノシンデアミナーゼを使った実験では、アデノシンの糖部分にナフタレン環を含む蛍光団を結合させた誘導体はもはやこの酵素の基質とはならないが、ベンゼン環1個ならば基質として使える¹⁾。これからも明かなように、大きな蛍光団を標識すると生体反応におけるパーターベーションの原因となり、生物活性の失われた誘導体となるおそれがある。100種以上もの蛍光団を検索した筆者の経験によると、小さな蛍光団を標識したFLBCのほうがより多くの生体系で使用可能である。アントラニロイル基(Ant基)やN-メチルアントラニロイル基(Mant基)はベンゼン環1個を骨格にもつ蛍光団であるが、例外的に強い蛍光を発する²⁻⁷⁾(図2)。これらを標識したヌクレオチドは、さまざまな生体反応系でほとんど元のヌクレオチドと同じように受け入れられる。

3. 蛍光団のタイプ

利用される蛍光団の蛍光特性を考えてみると、蛍光団の蛍光スペクトルのタイプは次のどれかにあてはまる。

(1) 蛍光強度が比較的大で、その蛍光特性が外的因子により影響されないもの。

(2) 蛍光特性が外的因子により影響されるもの。これはさらに次の3つに区別される。①蛍光強度が大きく変化するもの。②蛍光波長(色調)が変化するもの。③蛍光強度と蛍光波長がともに変化するもの。

さらに蛍光団について、目的別に考えてみる。IaやIIaの方法によってデザインされるFLBCには、(1)のタイプの蛍光団が適している。このタイプの蛍光団は、FLBCが生体系でどんな相手に結合しても、どんな環境に運ばれても、ほぼ一定の強い蛍光を発し続けてその存在を知らせてくれる。さまざまなFLBCを使った実験例を調べてみると、フルオレセインやテトラメチルローグミンを利用した場合、このような目的の研究に成功していることが多い。フルオレセインは、光で退色することと中性pHより酸性側では蛍光強度が急激に落ちることが欠点である。しかしその蛍光の強さや肉眼による識別のしやすさは、これらの欠点を補ってあまりある。

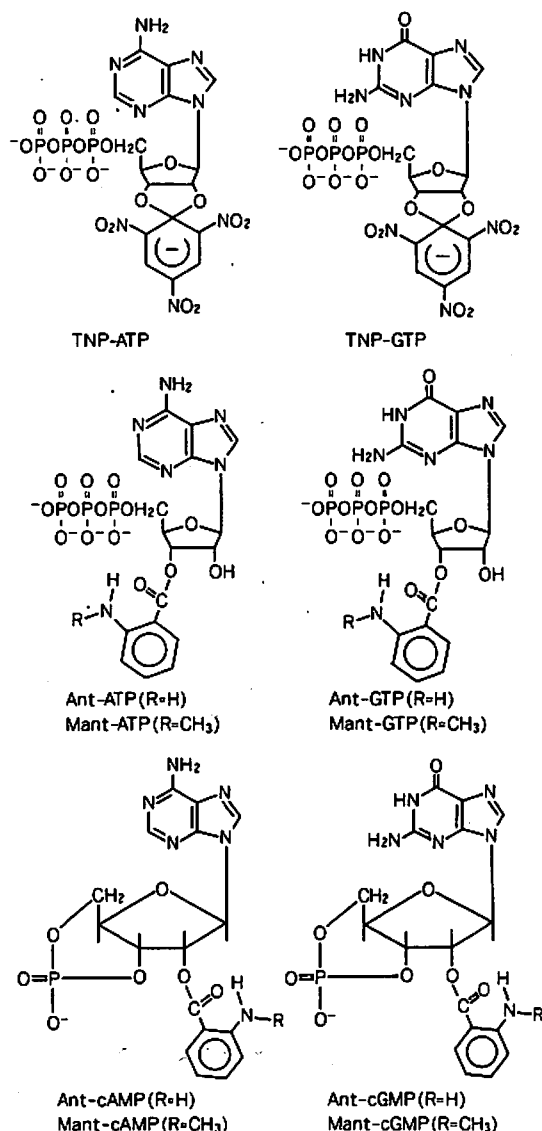


図2 ヌクレオチドを母体としたFLBC

TNP-ヌクレオチド、2',3'-O-(2,4,6-トリニトロシクロヘキサジエニリデン)-ヌクレオチド。中性、アクリ性pHにおける構造。Ant: アントラニロイル, Mant: N-メチルアントラニロイル。ATPとGTPのAnt-およびMant-標識物では、より安定な3'-O-標識物の構造のみ示してある。溶液中では、2'-O-と3'-O-標識物の平衡混合物である。cAMPとcGMPのFLBCは、2'-O-標識物の一種のみが存在する。

IbやIIbの方法でデザインされるFLBCには、(2)のタイプの蛍光団が望ましい。とりわけ細胞中などで結合の瞬間を見るためには、(2)の②の特性が好都合である。ピレンは蛍光波長が380~420 nmと少し短波

長すぎるが、光安定性も良好で、細胞内で結合部位の環境の違いに応じてその色調を変えてくれる。①や③の特性をもつ蛍光団は、蛋白質とリガンド（蛋白質）の結合や酵素による分解などを追跡するのに最適であろう。先述した Mant 基などは①の特性をもっていてこの目的によくあっているが、光安定性で劣るので、蛍光顕微鏡を使った実験には適さない。4-ニトロ-2,1,3-ベンゾキシアゾール（NBD）基は光安定性が良好なのに加え③の特性ももっている。Mant 基も NBD 基も分子サイズが小さいので、さまざまな生体系でのパーターベーションを最小限に抑えられる。

4. FLBC の検定

標識反応後、FLBC を未反応の母体化合物や蛍光標識試薬などと分離する精製操作が必要となる。母体化合物がペプチドや多糖類や蛋白質などの場合は分子ふるいやイオン交換体などを使ったカラムクロマトグラフィーが、リガンドの場合はこれらに加え HPLC や薄層クロマトグラフィー（TLC）が精製手段となる。最近では TLC は下火となっているようだが、リガンドを母体とした FLBC デザインの予備実験の場合、大変早く多種類の実験結果が明らかになり、非常によい方法である。紫外吸収物質が検出可能なプレートを用いると、1枚のプレートで異なった蛍光団を標識した数種類の FLBC の生成を同時に検出できる。この点で HPLC より優れている。このとき、蛍光標識試薬も対照として同時に展開し、暗室で UV ランプを照射して観察すると、もう展開中に標識反応の成否がわかってしまう。展開終了後クロマトグラムから生成物をかき取って抽出したものを使って、生体系で生物活性のチェックもできるし、蛍光スペクトルも測定できる。目的物が得られているようならば、適当なカラムクロマトグラフィーを行ない、FLBC を大量に調製して本実験に移る。

5. 望ましい FLBC

FLBC はその性質上、大量に調製しても長期間保存できないものが少なくない。実験するときに調製しなければならないことが多くなるので、標識反応と精製はそれぞれ1ステップだけで FLBC が調製できるように、最初からデザインを工夫することが望ましい。後述する TNP-ヌクレオチド、Ant-および Mant-ヌクレ

オチドの調製は非常に簡単である。調製が簡単なことも、FLBC を使った研究を発展させるための重要な要素である。

II. FLBC 開発の歴史

1. TNP-ATP の出現

1973 年～1976 年にかけて筆者が蛍光標識 ATP である TNP-ATP^{8,9)}（図 2）の開発と生体系への応用を報告したときは、ほとんどの研究者たちはこれが何の役に立つのかということさえ考えなかった。当時は蛍光団や発色団を酵素などの蛋白質に標識することが全盛の時代で、リガンドである ATP を蛍光標識する発想自身奇異な眼でみられた。その背景には、TNP-ATP に先立って開発された ATP の蛍光性誘導体 (ϵ ATP)¹⁰⁾ が、発表当時の華やかさとは裏腹に、使用可能な生体系の範囲が思ったより狭かったという事実があった。 ϵ ATP の適用が制限される理由は、ATP の生物活性発現に重要な役割を担っているアデニン環の構造を大きく変えたことにある。TNP-ATP はもっと広い生体系で使える FLBC を目的としてデザインされた。その根本にあるのは、できるだけ元の生物活性を温存したまままで有用な蛍光団を ATP に標識する、という発想である。

TNP-ATP は ϵ ATP と違って、その塩基部分は完全に保存されており、蛍光団は糖部分についている。ATP の塩基部分に対して厳密な特異性をもつ酵素や蛋白質にも使えるので、広く使われるようになった^{1,6,7,11)}。のちになって、TNP-GTP の開発にも結びつき¹²⁾、さらに糖部分が蛍光標識された Ant-および Mant-ヌクレオチドの開発にも結びついた^{2,3)}（図 2）。これらのヌクレオチドは、対応する非標識ヌクレオチドの代わりとしてさまざまな生体系で使える¹⁻⁷⁾。この 10 年間でこれらの蛍光標識ヌクレオチドが使われた論文は筆者の知るかぎりでも 150 報を越えている。

2. さまざまな FLBC の開発

蛍光標識法のライフサイエンス研究への応用といえ、それまでは酵素や蛋白質の重要アミノ酸残基の同定や、生体物質の分析を最終目的として、その検出感度を上げるためにだけ使われることが多かった。しかしすでに述べたように、工夫しさえすればヌクレオチ

ドに蛍光標識されたものでも、天然のヌクレオチドの代わりとして広い範囲の生体系で使えることがわかったので、その他のさまざまなリガンドや蛋白質のFLBCを開発する試みも盛んになってきた。この点において蛍光標識ヌクレオチド、とりわけTNP-ATPが研究者たちに与えた影響は大きい。

以下にヌクレオチドを含むさまざまなFLBCについて述べていきたい。誌面の都合で、できるだけ最近の研究のうち、とくに斬新な応用例のみを紹介することにする。ヌクレオチドを母体としたFLBCを、基質やリガンドとしてのみ使った通常の応用例については、1984年までの文献が紹介されている他の総説^{1,6,7,11,13)}を参照していただきたい。

III. リガンドを母体としたFLBC

1. ヌクレオチド

最も広く使われている蛍光標識ヌクレオチドはTNP-ヌクレオチドであろう。これは橙色のFLBCで、408 nmと470 nmにかなり大きな吸収極大をもち、560 nm付近に蛍光を発する^{8,9,14)}。このFLBCが広く使われる理由としては、さまざまな蛋白質に結合するとき、対応する天然のヌクレオチドと同程度かそれ以上の強さで結合すること、結合に伴って非常に大きな蛍光増大が起きることなどがあげられる^{1,6-9,11,12,14)}。TNP-GTPはTNP-ATPより10年以上も遅れて登場した¹²⁾。その分光学的特性はTNP-ATPとほとんど変わらない。

TNP-ヌクレオチドが蛋白質に結合すると、大きなものでは37倍もの蛍光増大が観察される¹⁵⁾。しかし蛋白質に結合していない状態での蛍光はかなり弱い¹⁴⁾。さまざまなヌクレオチドを母体としたTNP-ヌクレオチドをデザインしようとしても、糖部分に2'-と3'-の両水酸基をもつヌクレオチドにしか適用できない。また、塩基部分も標識されたFLBCが生成される、という難点がある^{7,12)}。Ant-およびMant-ヌクレオチドは以上のようなTNP-ヌクレオチドの短所を補うために開発された²⁻⁴⁾。

Ant-およびMant-ヌクレオチドはTNP-ヌクレオチドと同様、ベンゼン環1個を骨格とする蛍光団がヌクレオチドの糖部分に標識されている。しかしTNP-ヌクレオチドの場合とは異なり、塩基部分の構造に無関係に、その糖部分に水酸基をもつヌクレオチドであれ

ばすべてに適用できるので、デオキシヌクレオチド⁴⁾はもちろん、cAMPやcGMP²⁾のFLBCも得ることができる。さらに、水溶液中でも430~450 nmに強い蛍光を発しその量子収率はTNP-ヌクレオチドの700~1,100倍と大きく、蛋白質に結合すると数倍程度の蛍光増大も起きる。そのうえ、対応する非標識ヌクレオチドの代わりとして多くの生体系で受け入れられるので、TNP-ヌクレオチドよりあとに生まれたにもかかわらず、最近ではその先輩に負けないほど使われるようになった。以下に、TNP-ヌクレオチドとAnt-およびMant-ヌクレオチドの最近の応用例について紹介したい。

A. 置換実験による非標識リガンドの結合測定

TNP-ヌクレオチドやAnt-およびMant-ヌクレオチドが蛋白質に結合したときに観察される吸収スペクトルや蛍光スペクトルの変化を利用すると、これらのFLBCの結合部位の数や結合の強さを知ることができる^{1,6-9,11,12)}。これはFLBCを使った研究のうち最も基本的なものである。しかし一度このパラメーターが得られると、これと競争的に結合する非蛍光標識リガンドすべてについて、その結合数や結合の強さも求めることができる。つまり、これらのFLBCが結合している蛋白質に測定したいリガンドを加えていく。その時FLBCが競争的に新しいリガンドに置換されるのをスペクトル変化から知るのである。

TNP-ATPを利用した置換実験により、DNAポリメラーゼIのヌクレオチド結合部位を含む50残基の合成ペプチドに、実際にdGTP、dATP、TTP、DNAなどが強く結合することが証明された¹⁶⁾。この結果からLeu(Val)-Ile-Tyr-Glyが、基質や鋳型プライマーの結合に必須なアミノ酸配列であることが明らかになった。

TNP-ATPはHIV逆転写酵素のヘテロ2量体あたりに1モル結合し、その解離定数は21 μM であった¹⁶⁾。大変面白いことに、このFLBCはデオキシヌクレオシド三リン酸の結合部位に結合せず、鋳型結合部位に結合した。結合しているTNP-ATPは、種々のオリゴヌクレオチドで置換され、プライマーの長さが増すと結合の強さも増大することが明らかになった。

Ant-dATPは酵母のグリセリン酸3-リン酸キナーゼのヒンジ領域に強く結合するが、グリセリン酸3-リン酸などの真のリガンドで置換される¹⁷⁾。リガンドの結合により誘起される蛋白質ドメインの動きがヌクレオチド結合部位にも伝播していくことが示された。

Ant-ATP はチューブリンのヘテロ 2 量体あたりに 1 モル結合する¹⁹⁾。この FLBC が ATP や GTP で完全に置換されることから、GTP 結合部位のうちの交換可能な部位 (E サイト) に結合することがわかった。

B. 酵素活性の連続測定

Ant-および Mant-ヌクレオチドは、対応する天然のヌクレオチドとほとんど変わらない生物活性を示すことがさまざまな生体系で明らかになっている。たとえばミオシン ATPase に対しては、Mant-ATP は真の基質である ATP と同じように作用し³⁻⁶⁾、詳細な反応機構の研究から求められた各反応ステップにおける速度定数も大きくても 3 倍程度になるだけである^{19,20)}。また、ATP と同じ程度に筋肉を収縮させることもできる²¹⁾。

モーター蛋白質であるキネシンやダイニンの ATPase は、基質 ATP に対して非常に厳密な特異性をもつが、Ant-ATP や Mant-ATP なら十分に ATP の代役となれる^{22,23)}。塩基部分を変えた εATP はどちらの基質にもならない。

まったく同じことが Mant-GTP についてもあてはまる。たとえば p21 GTPase は、Mant-GTP をほとんど GTP と変わりなく加水分解する²⁴⁾。各反応ステップの速度定数は、GTP を加水分解する場合に比べても、2 倍以内の差しかない。

Mant-ヌクレオチドのもう一つの長所は、環境変化を敏感に反映してその蛍光特性を変える点にある。この性質を利用すると、Mant-GTP が p21 GTPase によって加水分解されるのを蛍光変化で追跡できる^{24,25)}。遊離する無機リン酸を定量しなくても、Mant-GTP の蛍光変化をモニターするだけで活性の連続測定が可能になった。これは、先に述べたように、Mant-GTP が GTP 本来の生物活性をほとんどそのまま受け継いでいるから可能なのである。

同じ応用が、ホスホジエステラーゼの系でも報告されている²⁶⁾。この酵素は、Mant-cGMP を真の基質である cGMP とほとんど区別することなく加水分解する²⁾。加水分解に伴って蛍光強度が約半分にも減少するので、これを利用して酵素活性の連続測定も可能になった²⁶⁾。

C. 変異型蛋白質の検定

前述したように、一度ある生体系で FLBC とこれに対応する非標識生物活性物質の比較実験を行ない、両者間にそれほど大きな差がないことがわかったら、それ以降はすべて FLBC を使っても研究を進められる。最

近遺伝子操作により、ある蛋白質の特定アミノ酸残基を改変し、得られた変異型蛋白質の機能を調べることが盛んになってきている。ヌクレオチドをリガンドとする蛋白質の変異型の検定にも FLBC が使われるようになった。

Ant-dATP は dATP の代わりに、炭疽菌のカルモジュリン活性型アデニル酸シクラーゼに結合する²⁷⁾。この酵素の Lys-346 を Gln に変えた変異型酵素を調べると、立体構造やカルモジュリンを結合する性質などは野生型と変異型でほとんど差はなかった。しかし、Ant-dATP の結合を調べてみると、この Lys 残基がヌクレオチドを活性部位に強く結合させるのに不可欠であることがわかった。

TNP-ATP はミトコンドリアの F_0F_1 -ATPase のヌクレオチド結合部位に結合する^{1,5,7)}。この酵素は、多くのヌクレオチド結合蛋白質によく保存されている Gly-X₂-Gly-X-Gly-Lys-Thr 疎列をもつ。1 番目と 4 番目の Gly をそれぞれ Val と Arg に変えたものやこの領域がまったく欠けている変異型酵素を使い、TNP-ATP の結合について調べた²⁸⁾。この領域はヌクレオチド結合に重要な役割を担っているが、他の領域、たとえば Arg-X₃-Gly-X₃-H₄-A_{sp} (H は疎水性アミノ酸) のペプチド領域などもヌクレオチドの結合に寄与していることが明らかになった。

D. ヌクレオチド結合部位と重要部位間の距離の測定

TNP-ヌクレオチドは 380~520 nm にかけて、Mant-ヌクレオチドは 300~400 nm にかけて吸収帯をもつので、エネルギー供与体となる適当な蛍光団と組み合わせると、励起エネルギー移動の測定によりヌクレオチド結合部位と他の重要部位間の距離の測定が可能になる^{6,7)}。

ミトコンドリアの F_1 -ATPase の必須 Lys 残基 (Lys-β162) を NBD 基で化学修飾したものに TNP-ATP を結合させて解析したところ、この Lys 残基は結合している TNP-ATP の末端リン酸のすぐ隣に位置していることがわかった²⁹⁾。また、Mant-ヌクレオチドを Trp 残基の蛍光エネルギー受容体として利用すると、この酵素のヌクレオチド結合部位から 11~13 Å 離れたところに 1 モルの Trp 残基が位置していることがわかり、この残基がヌクレオチドの結合に重要な役割を担っていることが示唆された³⁰⁾。一方、TNP-ヌクレオチドが Mant-ヌクレオチドによる蛍光のよい受容体になるこ

とを利用すると、この酵素の触媒部位と非触媒部位に結合しているそれぞれのヌクレオチド間の距離を測定できる³¹⁾。求められた距離は17.5Åで、2つのヌクレオチド結合部位がアデニル酸キナーゼなどにみられるのと同じように、きわめて近くに位置していることが明らかになった。

2. ヌクレオチド以外の生物活性物質

天然物や合成物の生物活性物質のなかにははじめから蛍光性のものである³²⁾。また蛋白質などの場合、Tyr残基をTrp残基に改変して、生物活性を残したままで蛍光性にするという方法³³⁾もある。しかしこれをFLBCとして使うには、その蛍光が弱すぎるなどの不便さがある。やはり、ヌクレオチドを母体としたFLBCのように、本来の生物活性を残すように工夫して、有用な蛍光团をつけるしかない。

デザインや応用については、大部分ヌクレオチドの項で述べたことがあてはまる。これらのFLBCの特筆すべき利点の一つとして、蛍光抗体法を使わなくても、細胞中で問題とするリガンドのレセプターや結合相手の蛋白質を同定できることがあげられる。アクチンに特異的に結合する毒ペプチドのファロイジンを母体としたローグミンファロイジンの例³⁴⁾などはこれの代表格である。

図3に、さまざまなFLBCの構造を示した。どれもが標識する部位を吟味し、工夫を凝らして標識前の生物活性をかなり残している。ここに示すのは、報告されているなかのほんの一部にすぎない。リン脂質³⁵⁾、ホルモン³⁶⁾、脂肪酸³⁷⁾については、それぞれの総説を参照してほしい。

A. ペプチド

ヒトの好中球の走化性ペプチドを母体としたFLBC (I)は活性発現に不可欠なN-ホルミル基を避けて、反対側のC末端Lys残基に蛍光团を標識している³⁸⁾。このFLBCを使うと、好中球にペプチドが取り込まれる様子を蛍光顕微鏡を使ってリアルタイムで観察できる。ペプチドのN末端側に標識すると、活性のまったくないFLBCが得られる。小さなペプチドを母体とした場合でも、標識する部位を工夫しさえすれば有用なFLBCが得られる好例である。

脳下垂体ホルモンのリジンバソプレッシンのFLBC (II)の標識蛍光团の分子サイズと生物活性の間には、

興味深い相関性がみられる³⁹⁾。蛍光团の分子サイズが大きくなるにつれて元の生物活性も落ちてくる。やはり小さな蛍光团を標識したFLBCの活性が最も高い。

B. 神経伝達物質

アセチルコリンを母体としたFLBC (III)はコリンエステラーゼの基質とはならないが、母体化合物と同じように神経・筋接合部に特異的に結合する⁴⁰⁾。標識に使われているピレンの蛍光寿命は92ナノ秒と、他の多くの蛍光团の寿命よりも長いので、アセチルコリンレセプター(AChR)の回転運動などを測定するための有用なプローブとなる。

C. 毒素

AChRの研究には別のタイプのFLBCも使われている。 α -ブングアロトキシンはアマガサヘビの毒素で、AChRに結合する。この毒素を母体としたFLBCを用いて蛍光光退色回復法(FPR法)を使った興味深い研究⁴¹⁾が報告されている。

FPR法では、まずある対象の微小領域に通常の千倍から一万倍もの強い光を照射して、蛍光性分子の蛍光強度を約半分程度に光退色させる。蛍光性分子が動き回っている場合、領域内外で分子の出入りがあり、再び蛍光を発する分子が集まってくるので蛍光強度が回復してくる。この回復の過程から蛍光性分子の並進拡散運動の速さが、回復の最終値から動ける分子の割合が求められる。また直線偏光を照射すると回転運動の測定が可能になる。

FLBCを用い、直線偏光を照射した実験から、クラスターをつくっていないAChRのほとんどが1ミリ秒以下から0.1秒の時間スケールで回転していることがわかった⁴¹⁾。この研究から、FPR法は広い時間スケールで生体分子の回転運動をカバーできる有効な方法であることがわかる。

フグの毒素として知られているテトロドトキシンは、Naチャンネルの同定試薬としての利用価値も高い。これを母体としたFLBC (IV)も開発されている⁴²⁾。これらのFLBCの膜Na孔への結合力は元のテトロドトキシンの約半分程度に落ちるが、その最大生物活性はほとんど変わらない。標識蛍光团の蛍光スペクトルを解析すると、Naチャンネルのテトロドトキシン結合部位は非常に親水性の高い環境にあることがわかった。

D. 発癌プロモーター

皮膚発癌の強力なプロモーターであるホルボールエ

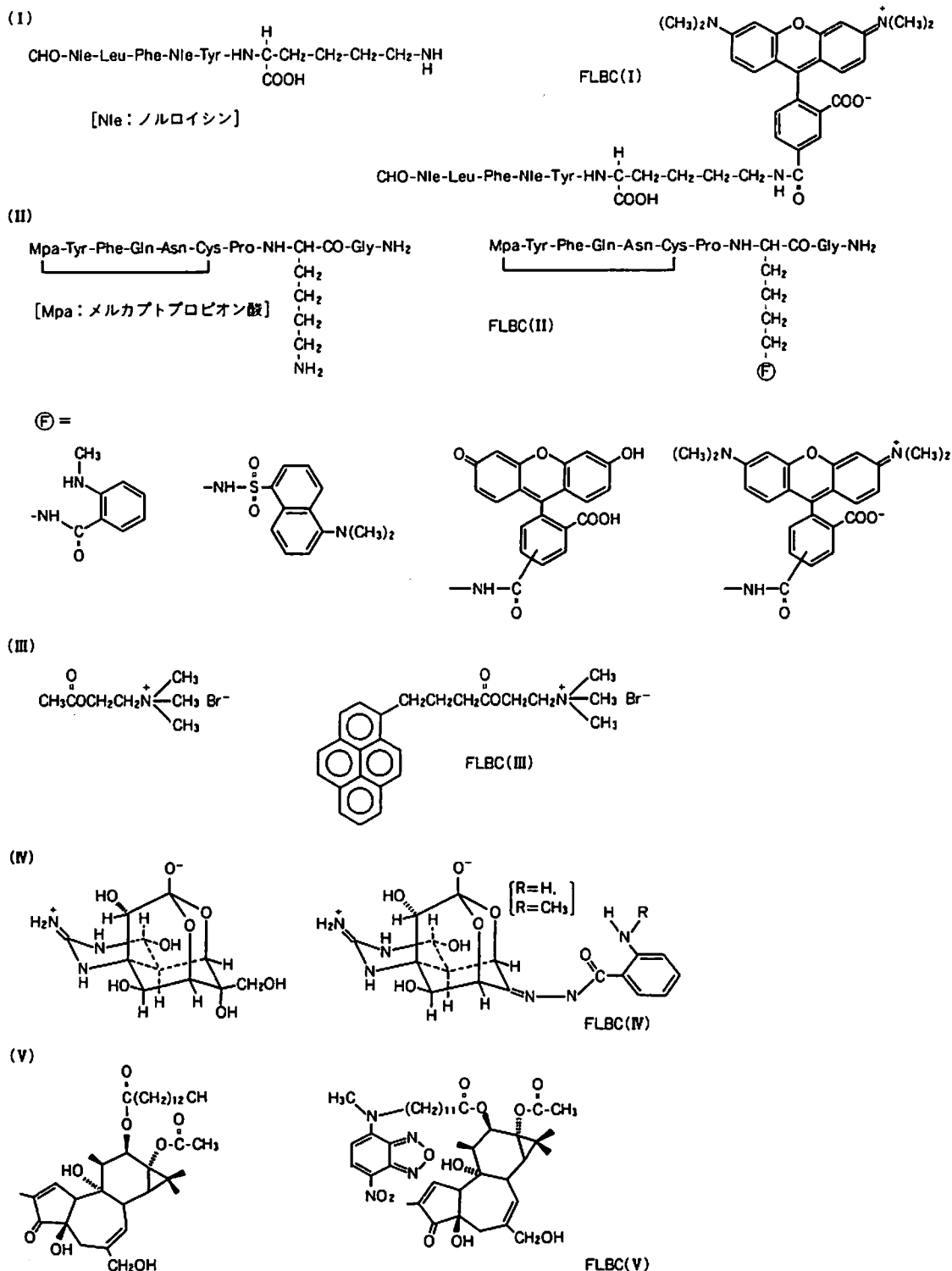


図 3 さまざまな生物活性物質を母体とした FLBC

母体化合物と対応する FLBC の構造を示してある。(I), (II) については, Lys 残基のみ全構造を示してある。

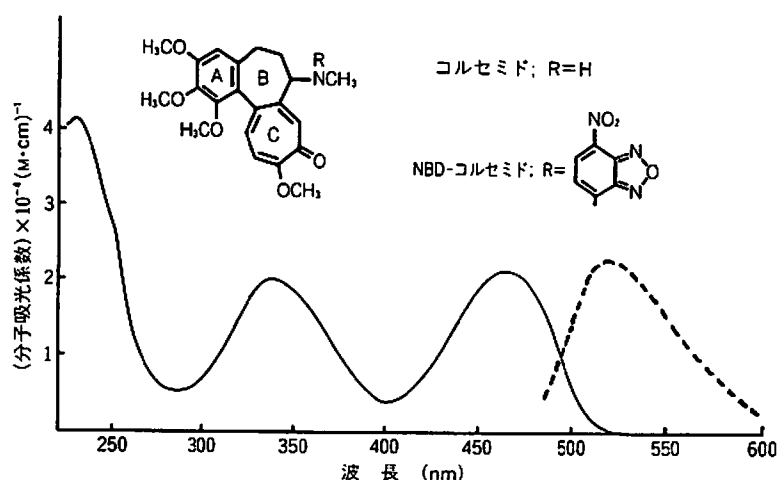


図4 エタノール中におけるNBD-コルセミドの吸収スペクトル(—)と蛍光スペクトル(---)

励起波長, 470 nm。挿入図: コルセミドとNBD-コルセミドの構造。

ステルを母体としたFLBC(V)は、母体化合物とまったく変わらない生物活性をもつだけでなく、プロテインキナーゼC(PKC)に対する結合の強さも両者間でほとんど差はみられない⁴³⁾。このFLBCの蛍光は細胞内のレセプターに結合すると20倍も強くなるので、結合していないFLBCがあっても、そのままレセプターの所在を観察できる。

しかしさらに詳しく調べてみると、このFLBCはPKC以外の蛋白質にも非特異的に結合することが明らかになり、細胞中のPKCの存在を確認する試薬として使うには問題がある。この報告は、どんなFLBCを使うに

せよ、常にその使用限界を念頭に置いて実験を行なわなければならないことを教えてくれる。

E. コルヒチン類似物

コルセミドは微小管機能を制御するアルカロイドであるコルヒチンの類似物で、チューブリンに可逆的に結合する。A環とC環は活性発現に関与するので、筆者らはB環のメチルアミノ基に蛍光団を標識したNBD-コルセミドを開発した⁴⁴⁾(図4)。このFLBCは400~500 nmに吸収帯をもち、500~600 nmに蛍光を発する。

生物活性は元のコルセミドと

ほとんど変わらず、チューブリンのヘテロ2量体あたり1モルが 10^6 M程度の結合定数で結合する。チューブリン以外の蛋白質とはほとんど結合しないので、蛍光団による疎水性非特異的結合の心配はない⁴⁵⁾。

NBD-コルセミドの蛍光はチューブリンに結合すると非常に強くなるので、結合していないものがあってもそのまま、ウシ脳の微小管のネットワークを蛍光顕微鏡によって観察することができた⁴⁴⁾(図5)。

IV. 蛋白質を母体としたFLBC

蛋白質を母体としたFLBCのデザインは、分子量が大きい分だけ標識する部位の数や反応基の標識が多くなり、この意味でリガンドを母体としたFLBCよりはデザインや調製が簡単である。こうして得られたFLBCは、マイクロインジェクションなどの手法によって細胞内に入れることも可能で、母体の蛋白質と結合する他の蛋白質や細胞内の同じ蛋白質の同定などに非常に有効に使われている。これについては他の総説⁴⁶⁾を参照してもらうことにして、以下にはこれ以外の興味深い応用例について紹介したい。

1. “生きている”FLBC

蛋白質を母体としたFLBCのなかには、生物を生かしたまま蛍光標識した、生きているFLBCというユ

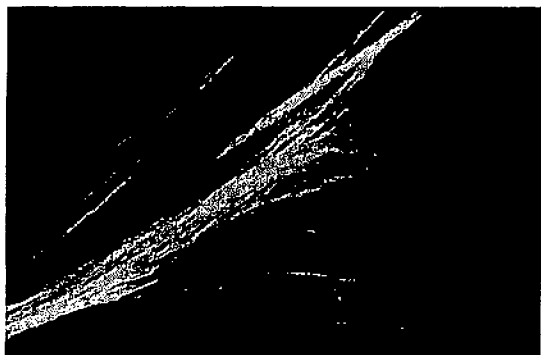


図5 NBD-コルセミドの結合により可視化されたウシ脳微小管

微小管(25 μ m)にNBD-コルセミド(0.5 μ m)を加え、ただちに蛍光顕微鏡で観察した。500倍。

ニークなものも報告されている。

腹膜炎を起こしたマウスの大食細胞の食作用を調べるために、バクテリアを蛋白質の蛍光修飾試薬であるフルオレセインイソチオシアナートで標識し、この“生きた” FLBC を大食細胞に食べさせるという応用例⁴⁷⁾がある。この実験では、食作用後に臭化エチジウムをさらに加えると細胞外に残されているバクテリアの蛍光は消光されて赤橙色に変わるが、細胞内に取り込まれているものは消光されないで緑色蛍光を発したままであることを巧みに利用している。この“光るバクテリア”は凍結乾燥すると半年程度は保存が可能で、必要に応じて水に溶かすと生き返って蛍光を発するという⁴⁸⁾。

これとは少し違い、生物の体表を非化学結合的に蛍光標識する報告もある。コムギ胚凝集素(WGA)はN-アセチルグルコサミンなどと特異的に結合する蛋白質である。この活性を保持したままでフルオレセインを化学的に標識した蛍光性 WGA は、体表にキチンオリゴ糖などをもつ動植物に結合できる。この結合は化学結合とは異なって生体にあまりダメージを与えないので、フィラリアなどの寄生虫を生かしたままで蛍光性に行ける⁴⁹⁾。このような“蛍光性の服”を着た寄生虫を

生きている FLBC として他の実験にも応用できる。

2. バイオセンサーとしての FLBC

蛋白質を母体とした FLBC を一種のバイオセンサーのように使うと、特定の生体物質を感度よく定量できる。筆者はミオシン頭部の ATPase (S-1) の活性部位の近くに、酵素活性を残したままで蛍光団のアンスロイル基 (AN 基) を標識することに成功した⁵⁰⁾ (図 6)。得られた FLBC (AN-S-1) の 470 nm における蛍光強度は ATP を結合すると約 30% 減少し、ATP が加水分解されるとさらに 20% 減少する^{51,52)}。ATP が ADP に加水分解されるときに蛍光変化の半値時間 ($T_{1/2}$) と ATP の濃度は直線関係にあるので (図 6 挿入図)、逆に $T_{1/2}$ がわかれば試料中の ATP 濃度を知ることができる。S-1 は ATP 以外のヌクレオシド三リン酸 (NTP) も基質とするので、生体試料を使うと NTP 全部を分析することになる。S-1 を凍結乾燥して保存することも可能である。蛍光光度計の感度をさらに上げると、 10^{-7} ~ 10^{-3} M の広いレンジで NTP を分析できる。

V. 新しいタイプの FLBC

最後に、新しいタイプの FLBC について考えてみたい。これまでみてきたように、あるリガンドの活性を保持したままでその一部に蛍光団を標識した FLBC は非常に有用であることは明らかである。しかし Mant-ATP を例に考えてみると、これを使って酵素のアデノシン結合部位の構造だけを探ることはできない。仮にこの蛍光団を ATP やアデノシンの塩基部分に標識できたとしても、このような FLBC では塩基部分の特異性が壊されているので、もはや問題とする酵素の ATP 結合部位に正しく入ってくれない。塩基部分を邪魔しないようにアームを伸ばし、その先に蛍光団

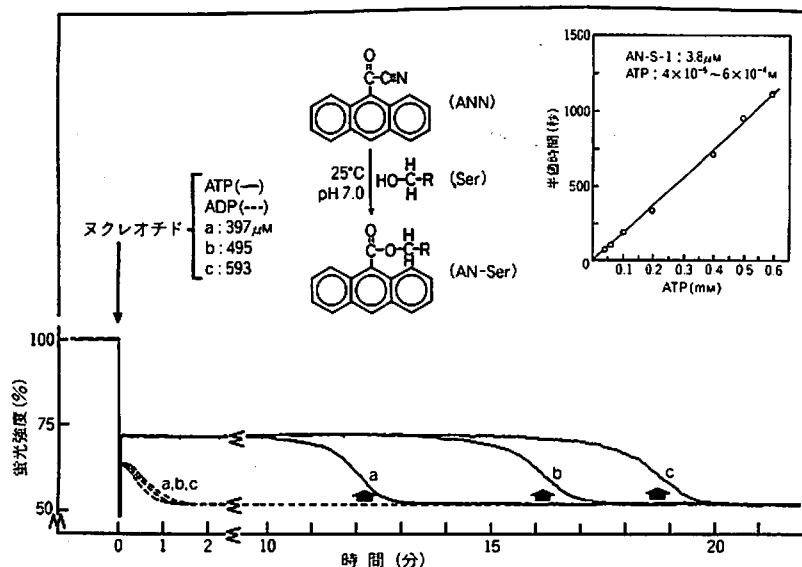


図 6 9-アンスロイルニトリル (ANN) により蛍光標識されたミオシン頭部 (S-1) を使った ATP の分析

挿入図 (左): ANN とセリンの反応式、挿入図 (右): 蛍光強度変化の半値時間と ATP 濃度の関係。標識 S-1 濃度: 3.8 μM, ↑: 半値時間。

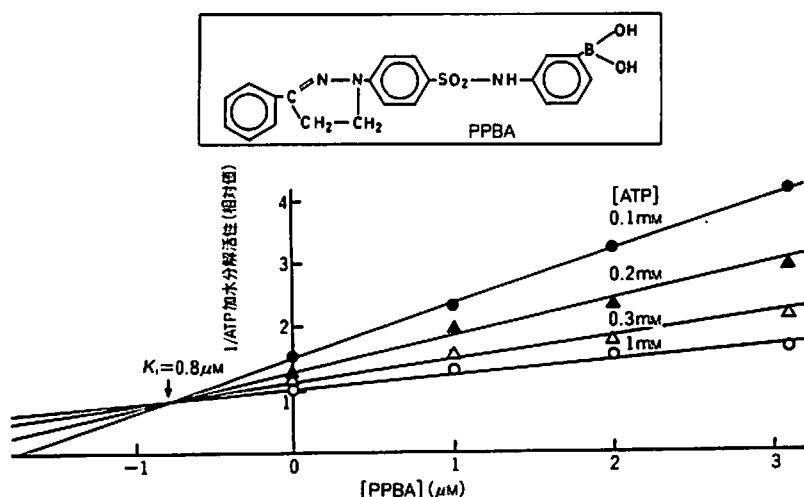


図7 PPBAの構造(上)とPPBAによるミオシン頭部(S-1) Ca^{2+} -ATPase 活性の阻害のDixonプロット(下)

PPBA: 3-[4-(3-フェニル-2-ピラゾリン-1-イル)ベンゼン-1-スルホニルアミド]フェニルホウ酸。各プロットは横軸の1点で交わり、ATPとPPBAがS-1に競争的に結合することを示している。

をぶらさげるとする方法もあるが、このようなFLBCはもはやアデノシン結合部位から遠く離れたところの情報しか知らせてくれない。結論としていえることは、まったく新しい発想が必要であるということだ。

生体反応は緻密なようで、時として思いがけずルーズな面もみせてくれる。もっとも現在のところそのメカニズムを説明できないので、人間の方がルーズだと思っただけかもしれない。たとえば、さまざまな蛋白質や酵素が、一見ヌクレオチドとは似ても似つかない構造の蛍光色素をそのヌクレオチド結合部

によつてはヌクレオチドの塩基結合部位の構造を探る有用なプローブとして利用できる。

筆者はこの発想に基づいて、60以上の蛍光色素について検索した。その結果、一見ATPとは似ても似つかない蛍光色素(PPBA; 図7)がS-1に1モル結合し、その結合はATPと競争的であることを見いだした⁵⁸⁾。非常に面白いことにPPBAの結合ポケットはヌクレオチドが結合するとより強固なものに変えられ、その解離定数は $0.8 \mu\text{M}$ にもなる。これは、ヌクレオチドの結合により、アデノシン結合部位に結合しているPPBA

が、疎水性アミノ酸残基に取り囲まれるような構造変化を受けるからと考えられる。いままでのFLBCでは、蛍光団とATPが同時にS-1に結合するのでこのような実験は不可能であった。

疎水性アデノシン結合ポケットにはまり込んだPPBAについて調べると、このポケットはATPを加水分解しているときだけ閉じているかまたは固くなるような構造変化を

表1 さまざまなリガンドの存在下におけるPPBA・S-1複合体の蛍光スペクトルの極大波長、アクリルアミドによる消光定数および解離定数

	蛍光極大波長 (nm)	消光定数 (M^{-1})	解離定数 (μM)
PPBA (S-1不在下)	452	6.1 ± 0.3	—
PPBA・S-1			
—リガンド	438	1.3 ± 0.1	26
+アクチン	426	1.1 ± 0.1	4.6
+ADP	419	1.3 ± 0.1	3.3
+AMP-PNP	419	1.2 ± 0.1	2.6
+ATP (加水分解中)	419	0.48 ± 0.02	0.80

ATP加水分解中のS-1に結合しているPPBAだけが際立って強く結合し、消光定数も小さく、短波長側に蛍光極大を示すことがわかる。これらの結果から、S-1のATP結合ポケットは、ATP加水分解中は閉じているか固くなった疎水性の高い構造をとると考えられる。

起こすことが示唆された(表1)。ミオシンがATPを加水分解して得た化学エネルギーを筋収縮という力学エネルギーに変換するときの鍵となる重要な構造変化が、PPBAによって検出されたのかもしれない。

おわりに 生物活性が十分に残されたFLBCをライフサイエンスの研究に巧みに使うと、元の生物活性物質を使った場合には得られないような多種多様な情報が感度よく得られる。しかし使用にあたって常に忘れてならないことは、FLBCはあくまでも“本物”ではなく、生体系をうまくだましている“ニセ物”にすぎないことである。FLBCを使う研究者は、自分の使っているニセ物が生体系でうまく結合しても、これが本物を加えると追い出されるか否か、必ず一度は検定しなければならない。この検定をパスできたならば、90%以上の成功が約束されたと思ってよい。

本稿を読んで、一人でも多くの研究者が、自分の研究分野でもFLBCを使ってみようかなと思ったなら、それは筆者の望外の喜びである。

本稿に記した筆者の研究を進めるにあたり、三菱財団自然科学研究助成金、文部省科学研究費補助金(一般研究(B)、一般研究(C)、重点領域研究)を使わせていただきました。ここに記して感謝いたします。

文 献

(文献番号を太字にしたものはとくに重要であることを示す)

- 1) 平塚寿章：化学と生物，22，42-56 (1984)
- 2) Hiratsuka, T.: *J. Biol. Chem.*, 257, 13354-13358 (1982)
- 3) Hiratsuka, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 742, 496-508 (1983)
- 4) Hiratsuka, T.: *J. Biochem.*, 96, 147-154 (1984)
- 5) Hiratsuka, T.: *J. Biochem.*, 96, 155-162 (1984)
- 6) 平塚寿章：生物物理，25，17-25 (1985)
- 7) 平塚寿章：和光純薬時報，53，27-35 (1985)
- 8) Hiratsuka, T., Uchida, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 320, 635-647 (1973)
- 9) Hiratsuka, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 293-297 (1976)
- 10) Secrist, J.A., Barrio, J.R., Leonard, N.J., Weber, G.: *Biochemistry*, 11, 3499-3506 (1972)
- 11) 平塚寿章：生化学，50，1036-1050 (1978)
- 12) Hiratsuka, T.: *J. Biol. Chem.*, 260, 4784-4790 (1985)
- 13) Leonard, N.J.: *CRC Critical Rev. Biochem.*, 15, 125-199 (1984)
- 14) Hiratsuka, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 719, 509-517 (1982)
- 15) Mullen, G.P., Shenbagamurthi, P., Mildvan, A. S.: *J. Biol. Chem.*, 264, 19637-19647 (1989)
- 16) Delahunty, M.D., Wilson, S.H., Karpel, R.L.: *J. Mol. Biol.*, 236, 469-479 (1994)
- 17) Pineda, T., Kwon, O.-S., Serpersu, E.H., Churchill, J.E.: *Eur. J. Biochem.*, 212, 719-726 (1993)
- 18) Rai, S.S., Kasturi, S.R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 306, 133-138 (1993)
- 19) Woodward, S.K.A., Eccleston, J.F., Geeves, M. A.: *Biochemistry*, 30, 422-430 (1991)
- 20) Ritchie, M.D., Geeves, M.A., Woodward, S.K.A., Manstein, D.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8619-8623 (1993)
- 21) Ferenczi, M.A., Woodward, S.K.A., Eccleston, J.F.: *Biophys. J.*, 55, 441a (1989)
- 22) Sadhu, A., Taylor, E.W.: *J. Biol. Chem.*, 267, 11352-11359 (1992)
- 23) Inaba, K., Okuno, M., Mohri, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 209-215 (1989)
- 24) Neal, S.E., Eccleston, J.F., Webb, M.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3562-3565 (1990)
- 25) Moore, K.J.M., Webb, M.R., Eccleston, J.F.: *Biochemistry*, 32, 7451-7459 (1993)
- 26) Johnson, J.D., Walters, J.D., Mills, J.S.: *Anal. Biochem.*, 162, 291-295 (1987)
- 27) Labruyère, E., Mock, M., Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., Rose, T., Munier, H., Sarfati, R.S., Bârzu, O.: *Biochemistry*, 30, 2619-2624 (1991)
- 28) Garboczi, D.N., Thomas, P.J., Pedersen, P.L.: *J. Biol. Chem.*, 265, 14632-14637 (1990)
- 29) Wu, J.C., Wang, J.H.: *Biochemistry*, 25, 7991-7995 (1986)
- 30) Falson, P., Penin, F., Divita, G., Laverigne, J.-P., Pietro, A.D., Goody, R.S., Gautheron, D.C.: *Biochemistry*, 32, 10387-10397 (1993)
- 31) Divita, G., Goody, R.S., Gautheron, D.C., Pietro, A.D.: *J. Biol. Chem.*, 268, 13178-13186 (1993)
- 32) Bell, D.H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 949, 132-137 (1988)
- 33) Ohta, N., Burke, G.T., Katsoyannis, P.G.: *J. Prot. Chem.*, 7, 55-65 (1988)
- 34) Amato, P.A., Unanue, E.R., Taylor, D.L.: *J. Cell Biol.*, 96, 750-761 (1983)
- 35) Pagano, R.E., Longmuir, K.J.: *TIBS*, 8, 157-161 (1983)
- 36) Schroeder, F.: *Prog. Lipid Res.*, 23, 97-113 (1984)

- 37] Lentz, B.R. : *Chem. Phys. Lipids*, **64**, 99-116 (1993)
- 38] Nidel, J.E., Kahane, I., Cuatrecasas, P. : *Science*, **205**, 1412-1414 (1979)
- 39] Lutz, W.H., Londowski, J.M., Kumar, R. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 4657-4663 (1990)
- 40] Barrantes, F.J., Sakmann, B., Bonner, R., Eibl, H., Jovin, T.M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3097-3101 (1975)
- 41] Velez, M., Barald, K.F., Axelrod, D. : *J. Cell Biol.*, **110**, 2049-2059 (1990)
- 42] Angelides, K.J. : *Biochemistry*, **20**, 4107-4118 (1981)
- 43] Balázs, M., Szöllösi, J., Lee, W.C., Haugland, R.P., Guzikowski, A.P., Fulwyler, M.J., Damjanovich, S., Feuerstein, B.G., Pershadsingh, H. A. : *J. Cell. Biochem.*, **46**, 266-276 (1991)
- 44] Hiratsuka, T., Kato, T. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 6318-6322 (1987)
- 45] Sengupta, S., Puri, K.D., Surolia, A., Roy, S., Bhattacharyya, B. : *Eur. J. Biochem.*, **212**, 387-393 (1993)
- 46] Kreis, T.E., Birchmeier, W. : *Int. Rev. Cytol.*, **75**, 209-227 (1982)
- 47] Drevets, D., Campbell, P.A. : *J. Immunol. Methods*, **142**, 31-38 (1991)
- 48] Sherr, B.F., Sherr, E.B., Fallon, R.D. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 958-965 (1987)
- 49] Rao, U.R., Lowrie, R.C., Vickery, A.C., Kwa, B.H., Nayar, J.K. : *Int. J. Parasitol.*, **20**, 1099-1103 (1990)
- 50] Hiratsuka, T. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 18188-18194 (1989)
- 51] Hiratsuka, T. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 18786-18790 (1990)
- 52] Hiratsuka, T. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 18791-18796 (1990)
- 53] Brand, L., Gohlke, J.R., Rao, D.S. : *Biochemistry*, **6**, 3510-3518 (1967)
- 54] Madsen, N.B., Shechosky, S., Fletterick, R.J. : *Biochemistry*, **22**, 4460-4465 (1983)
- 55] Dryden, D.T.F., Varley, P.G., Pain, R.H. : *Eur. J. Biochem.*, **208**, 115-123 (1992)
- 56] Larsson-Raźnikiewicz, M., Wiksell, E. : *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 94-100 (1978)
- 57] Einarsson, R., Eklund, H., Zeppezauer, E., Boiwe, T., Brändén, C.-I. : *Eur. J. Biochem.*, **49**, 41-47 (1974)
- 58] Hiratsuka, T. : *J. Biol. Chem.*, 印刷中 (1994)

お知らせ

大阪大学蛋白質研究所セミナー 生体系における分子キラリテ

日 時：平成6年11月14日(月) 13:00~17:40, 15日(火) 9:30~15:40

場 所：大阪大学蛋白質研究所講堂

所長挨拶 中川八郎(阪大・蛋白研)
Optical Activity of Biopolymers: A Historical Perspective R.W.Woody(コロラド州立大)

キラル有機化合物のCDと絶対立体化学

原田宜之(東北大・反応研)

アキラなホスト-ゲスト錯形成のCDによる検討：キラ

ルな溶媒の利用 青山安宏(長岡技科大・工)

結晶場の不斉認識 戸田美三夫(愛媛大・工)

キラル蛍光色素の設計と応用 目黒 照(東北大・農)

花の色素と円二色性 近藤忠雄(名大・分析セ)

多糖類誘導体によるキラル識別 岡本佳男(名大・工)

金属錯体のキラル異性化とCD 安井隆次(高知大・理)

放射光を用いた磁気円二色性および円二色性の研究

宮原恒晃(高エネルギー研)

円偏光分散計に関する2,3の話題 高桑 堯(日本分光)

Recent Development in the Theory of Biopolymer

Circular Dichroism R.W.Woody(コロラド大)

ストップドフローCDによる蛋白質折れ畳み課程の解析

桑島邦博(東大・理)

円二色性を用いたポリペプチドβ構造の研究

前田 悠(九大・理)

ポリペプチド吸収帯のCDスペクトルとコンホメーシヨ

ン：電気直線二色性スペクトルとの実験的比較

山岡 究(広大・理)

ポリペプチド溶液の電場による旋光度変化

松本光弘(徳島大・総合科学)

ヘモグロビンの構造と機能に関する研究とCD

長井雅子(金沢大・医短)

非天然芳香族アミノ酸を含むポリペプチドのCD

矢野昌彦(岡山大・工)

蛍光検知CD-蛋白質中の芳香族側鎖について

児玉高志(阪大・蛋白研)

誘起CDを用いたDNA-ポルフィリン相互作用の研究

黒田玲子(東大・教養)

分子軌道法による合成リボヌクレオチド-キナクリン複合

体の誘起CD 谷 誠次・久保田幸雄・今村 詮

(山口大・理, 広大・理)

分子振動光学活性分光法(赤外VCD・ラマンROA)の

現状と展望 菅田 宏(阪大・蛋白研)

世話人：山岡 究(広大・理), 原田宜之(東北大・反応

研), 矢野昌彦(岡山大・工), 菅田宏(阪大・

蛋白研), 京極好正(阪大・蛋白研)

連絡先：菅田 宏・京極好正(阪大・蛋白研)

Tel.06-879-8598 FAX 06-879-8599