

# 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

林田 修

九州大学先導物質化学研究所

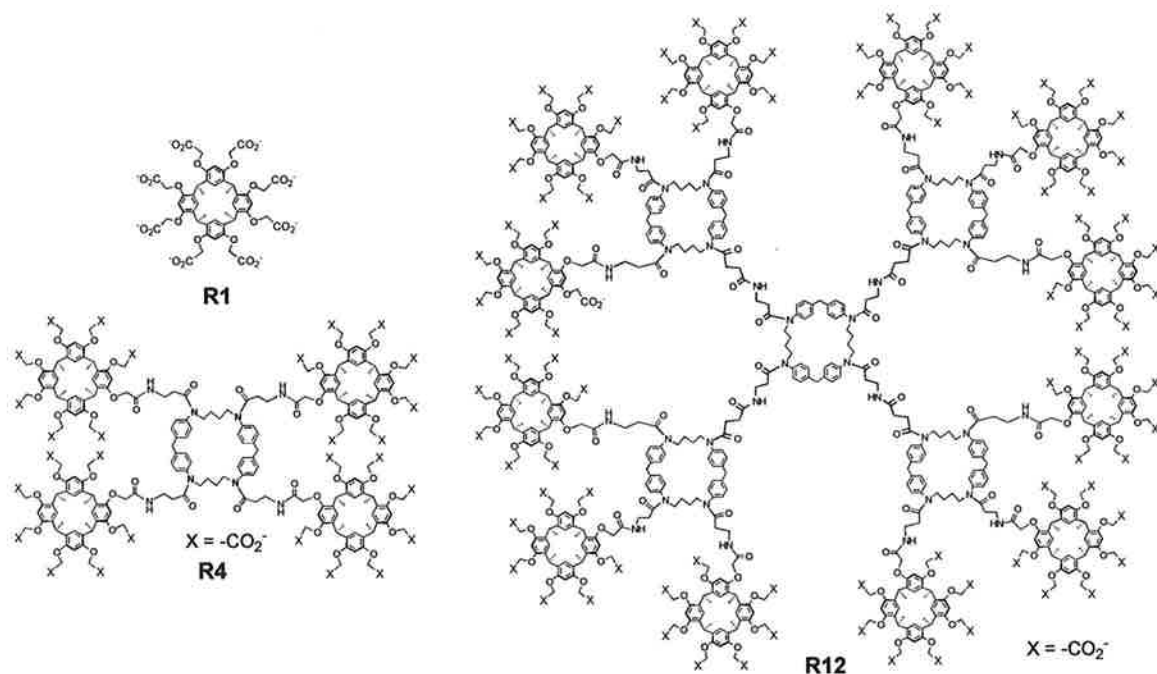
## 1. 研究のねらい

細胞核内のクロマチンを構成するヒストンは、DNA を巻き付けてコンパクトにする役目を担う塩基性の球状タンパク質であるが、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、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、ヒストンの翻訳後修飾を特異的に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。具体的には、ヒストンが塩基性タンパク質であることに鑑み、効果的な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着目し、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を蛍光検出することを目指した。

## 2. 研究成果

### 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能を発現するいわゆるクラスター効果が知られている。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、合成することに成功した。ヒストンとの結合挙動は 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対して、テトラマーやドデカマーはクラスター効果を反映して結合定数 ( $K$ ) に著しい増大が認められた。一方、コントロール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骨格の剛直性が重要であることも示された。さらに、ヒストンへの特異性



に関して、リゾチームやオボアルブミンなどの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、クラスター効果を発揮してヒストンへの特異性を発現させることにも成功した。

#### 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、蛍光基を導入したレゾルシナレンオリゴマー R3Dを合成した。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。ヒストンの滴定における蛍光強度の応答は典型的なホスト・ゲスト結合を示す飽和挙動を与え、 $K$ は  $2.1 \times 10^6$  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結合部位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。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。これらの結果から、ホスト R3D はヒストンの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を実証した。

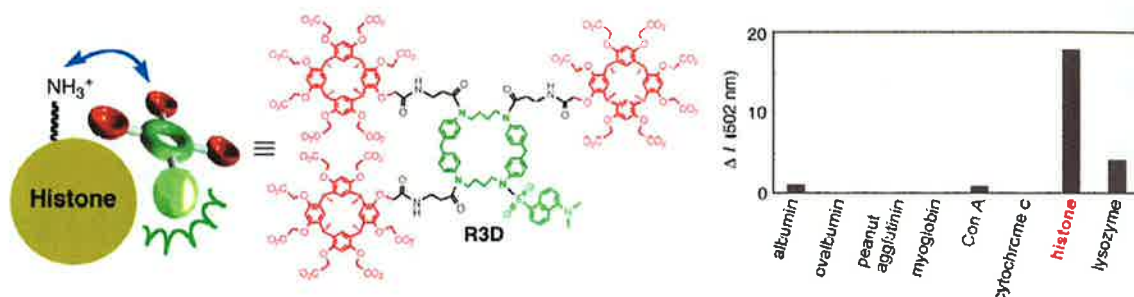


図1. 人工ホスト R3D とヒストンに対する蛍光応答

### 3. 主な発表

#### 論文

- Osamu Hayashida, Noyuki Ogawa, Masaki Uchiyama, "Surface Recognition and Fluorescence Sensing of Histone by Dansyl-Appended Cyclophane-Based Resorcinarene Trimer" *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
- Osamu Hayashida, Masaki Uchiyama, "Multivalent Macrocyclic Hosts: Histone-Surface Recognition, Guest Binding, and Delivery by Cyclophane-Based Resorcinarene Oligomers" *J. Org. Chem.*, Vol. 72, No. 7, 610-616 (2007).
- Osamu Hayashida, Atsushi Kitaura, "Synthesis of Water-Soluble Tris(cyclophane) Hosts and Surface Plasmon Resonance Study on Guest-Binding Interaction with Immobilized Guests" *Chem. Lett.*, Vol. 35, No. 7, 808-809 (2006).
- Osamu Hayashida, Masaki Uchiyama, "Cyclophane-Based Tetra(resorcinarene) as a Host for Both Histone and Hydrophobic Molecular Guests" *Tetrahedron Lett.*, Vol. 47, No. 24, 4091-4094 (2006).
- Osamu Hayashida, "Synthesis of Water-Soluble Azacyclophane Hosts as a Guest-Delivering Carrier" *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, Vol. 64, No. 10, 1041-1048 (2006).
- Osamu Hayashida, Yousuke Takaoka, Itaru Hamachi, "Synthesis and Guest-Binding Study of Polytopic Multi(cyclophane) Hosts" *Tetrahedron Lett.*, Vol. 46, 6589-6592 (2005).

#### 招待講演

- Osamu Hayashida, "Guest-Binding, Delivery, and Protein Surface Recognition by Functionalized Cyclophanes" The 21 COE International Symposium on Molecular Informatics, Fukuoka, 2006.
- Osamu Hayashida, "Synthesis and Properties of Functionalized Cyclophanes" 8<sup>th</sup> International Symposium on Biotechnology Metal Complexes, Haiko, China, 2006.
- Osamu Hayashida, "Guest-Delivery and Protein Surface Recognition by Cyclophanes" The 3rd New Waves in Supramolecular and Superstructured Materials, Kumamoto, 2006.