

# Selective fluorescence reaction of particular peptides using 1,2-dihydroxybenzene analogues and its application to collagen assay (1,2-Dihydroxybenzene 類縁体を用いる特定ペプチドに選択的な蛍光反応とコラーゲンアッセイへの応用)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Hasina Yasmin

## [目的]

ペプチドは、様々な生理的プロセスで中心的な役割を担っており、選択的かつ高感度なペプチドの検出は、生理学的・病理学的研究において重要な情報を提供する。蛍光誘導体化は、簡便な操作で標的分子を高感度に検出できる手法であり、これまでに *o*-フタルアルデヒド、フルオレッサミン、塩化ダンシルなどの試薬が、生体サンプル中のペプチドの蛍光検出に応用されている。しかし、これらの試薬は、アミノ基など特定の官能基と反応するため配列選択性に乏しく、さらに他の生体成分と反応して蛍光を与えるという問題点を有する。故に、ペプチドの配列を選択的に認識できる蛍光誘導体化反応の開発が望まれている。

最近、当研究室では、1,2-dihydroxybenzene (1,2-DHB) を発蛍光試薬として用いる、ペプチド選択的蛍光反応を開発している (Fig. 1)。この反応は、Leu、Ala、又は Phe を N 末端に有するペプチドに対して強い蛍光を与えるという、特徴的な配列選択性を示す。本研究では、1,2-DHB 反応を基にペプチド配列選択的な新規蛍光反応の探索を行い、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DHPAA)、3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA)、1,2-dihydroxy-4-chlorobenzene (1,2-DHCB) の 3 種の 1,2-DHB 誘導体が、穏和な条件下で特定のペプチド配列をより選択的に蛍光誘導体化できることを見出した。

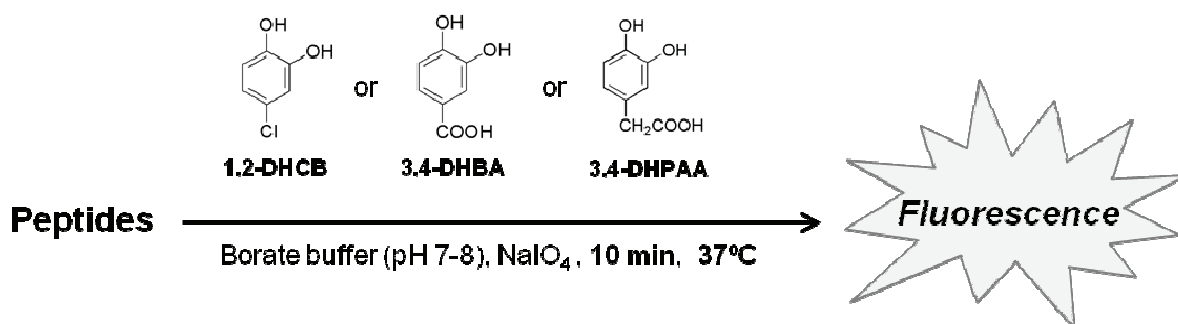


Fig. 1. Novel fluorescence (FL) reactions for peptides with 1,2-DHB analogues.

## [結果及び考察]

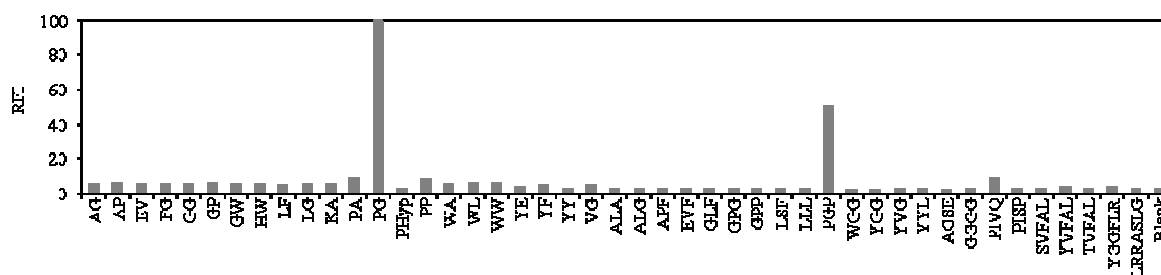
### ペプチド配列選択的な蛍光反応の開発

3,4-DHBA、1,2-DHCB、3,4-DHPAA を用いて、ペプチドに対する最適な反応条件と配列選択性を評価したところ、これらの試薬は、過ヨウ素酸ナトリウムの存在下、ホウ酸緩衝液中で 37°C にて反応を行うことにより、ペプチドの N 末端側のアミノ酸残基を選択的に認識して蛍光を与えることが分かった。3,4-DHBA は、pH7.0 の緩衝液が最も強い蛍光を与え、N 末端にプロリン-グリシンを有する短鎖ペプチドに対して高い選択性を示した (Fig. 2A)。1,2-DHCB は、pH8.0 の緩衝液を用いた際に最も強い蛍光を生じ、N 末端にプロリン-グリシンを有する短鎖ペプチドだけでな

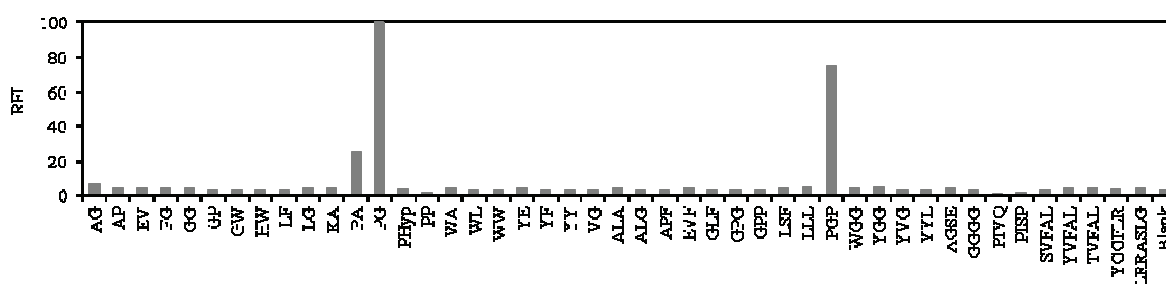
く、プロリン-アラニンに対しても蛍光性を示した (Fig. 2B)。これらの反応によって生成した蛍光体は、いずれも 450 nm と 535 nm にそれぞれ最大励起波長と最大蛍光波長を示し、検出下限はどちらも 1.0  $\mu\text{M}$  であった。

一方、3,4-DHPAA は、N 末端にグリシンを有する短鎖ペプチドに対して選択性を示し、特に N 末端にグリシン-プロリンを持つペプチドに高い蛍光を与えることを見出した (Fig. 2C)。この反応は、pH8.0 のホウ酸緩衝液を必要とし、蛍光体の最大励起および蛍光波長はそれぞれ 370 nm、465 nm であった。また、ジペプチドであるグリシン-プロリンおよびトリペプチドであるグリシン-プロリン-プロリンを用いて検出感度を調べたところ、どちらも 0.25  $\mu\text{M}$  の濃度まで検出できることが分かった。

A) 3,4-DHBA



B) 1,2-DHCB



C) 3,4-DHPAA

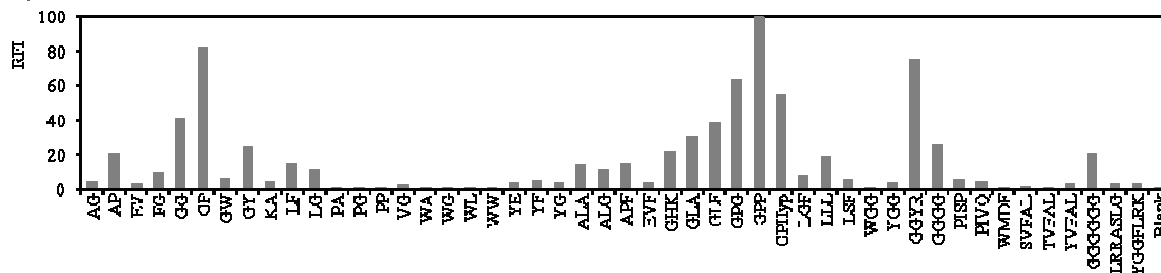


Fig. 2. Relative FL intensity (RFI) yielded from various peptides using (A) 3,4-DHBA, (B) 1,2-DHCB and (C) 3,4-DHPAA.

### 3,4-DHPAA を用いたコラーゲン定量法の開発

コラーゲンは、細胞外マトリックスや結合組織を構成する主要な構造タンパク質で、哺乳動物の全タンパク質の約 30% を占める。コラーゲンの過剰な蓄積や分解は疾病に深く関与しており、線維症などでは過剰のコラーゲンが、関節炎などではコラーゲンの減少が、それぞれ認められる。従って、微量の生体サンプルを用いて簡便かつ正確にコラーゲンを定量する技術の開発が望まれている。コラーゲンは、グリシン-X-Y というトリペプチドの繰り返し配列を多く含み、細菌由来コラーゲナーゼは、コラーゲンを分解して N 末端にグリシンを持つペプチドフラグメントを生

成することが知られている。そこで、本研究では、コラーゲンの酵素分解と 3,4-DHPAA 反応を組み合わせ、コラーゲンの蛍光定量法の開発を試みた (Fig. 3)。

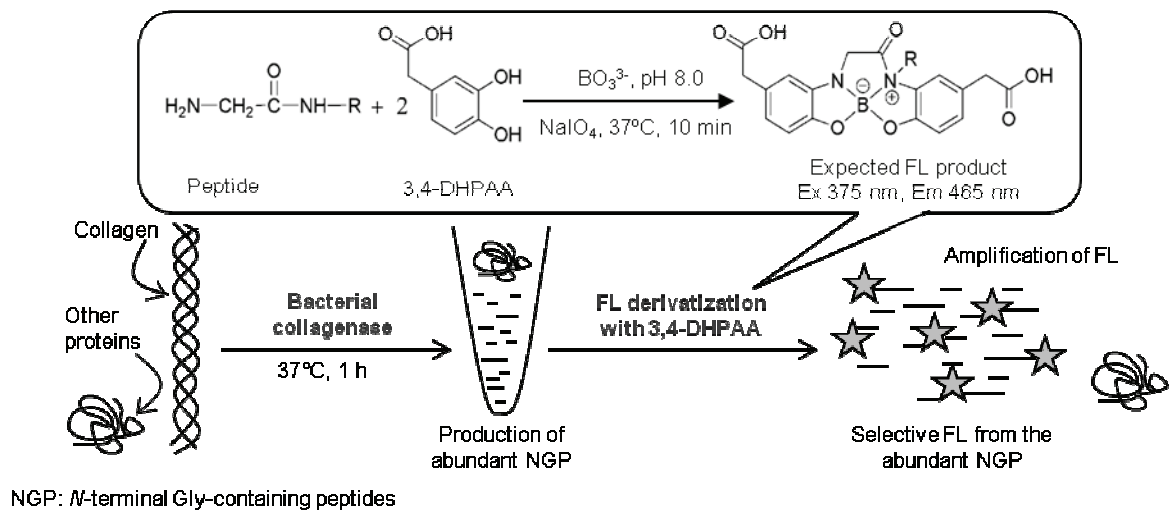


Fig. 3. Schematic protocol of the amplified collagen assay using 3,4-DHPAA.

酵素反応と蛍光誘導体化反応を最適化した結果、コラーゲン濃度と蛍光強度の間に良好な直線関係が得られた。本手法によるコラーゲンの検出下限は  $0.18 \mu\text{g/mL}$  であり、 $12 \mu\text{g/mL}$  まで定量的にコラーゲンを検出できることが分かった。本手法は、コラーゲンに対して高い特異性を示し、非コラーゲン性タンパク質には全く蛍光を示さなかった (Fig. 4A)。また、HeLa 細胞や頬粘膜細胞の溶解液を用いて、精製操作などの前処理を必要とせずコラーゲンを検出できた (Fig. 4B)。既知の色素法や免疫測定法と比較して選択性および感度において優れていたことから、本手法は簡便なコラーゲン定量法として有用であると考えられる。

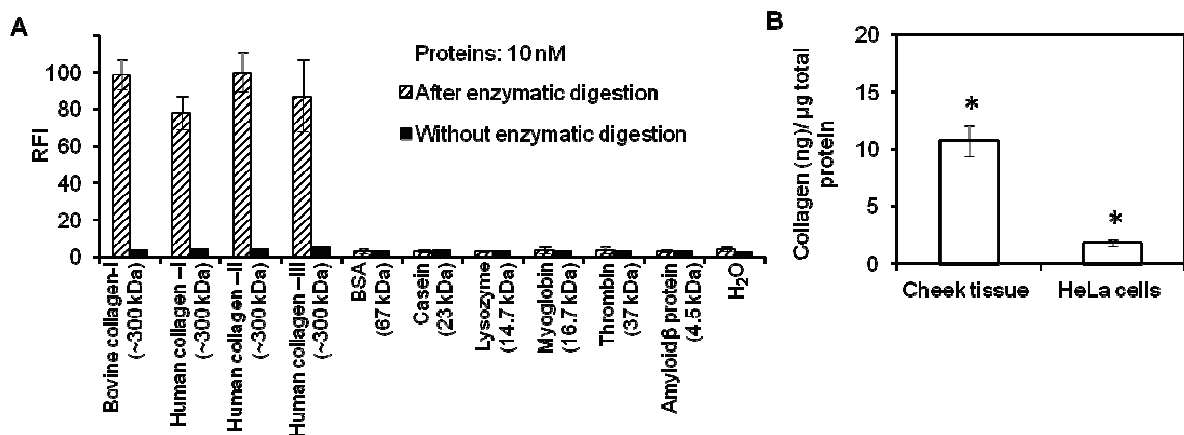


Fig. 4. Specificity of the 3,4-DHPAA method for collagen detection. (A) Comparison of RFIs obtained from different collagenous and non-collagenous proteins. (B) Determination of collagen in cheek tissue and HeLa cell. \* $P < 0.01$ .

[基礎となった学術論文]

1. Yasmin H., Shibata T., Rahman M.S., Kabashima T., Kai M.: Selective and sensitive determination of peptides using 3,4-dihydroxyphenylacetic acid as a fluorogenic reagent. *Anal. Chim. Acta* **721**, 162-166 (2012).