

# Selective fluorescence reaction for *N*-terminal Ser-containing peptides and its application to caspase assay

## (*N*末端セリン含有ペプチドに選択的な蛍光反応とカスパーゼアッセイへの応用)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Mohammed Shafikur Rahman

### [目的]

ペプチドは、ホルモンや神経伝達物質などとして様々な生理的プロセスを調節している。従って、選択的かつ高感度なペプチドの検出法は、生理学的あるいは病理学的研究において重要な情報を提供する。これまでのペプチドの高感度な蛍光誘導体化試薬は、ペプチド以外の生体成分と反応して蛍光を発生し、ブランク値が高く、さらに、配列に対する選択性が低い欠点を有していた。

そこで、当研究室では、1,2-dihydroxybenzene (1,2-DHB)、および、その類縁体試薬によるペプチド配列の選択的な蛍光誘導体化反応を開発している。本研究では、まず、1,2-DHB 試薬と 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid (HEPES)を共存させることによって、*N*末端にセリンを含むペプチドを選択的に蛍光体を形成できる反応条件を見出した。次に、この蛍光反応を基に、カスパーゼの新規活性測定法を開発した。

### [結果及び考察]

#### *N*末端セリン含有ペプチドに選択的な蛍光誘導体化反応の開発

*N*末端セリン含有ペプチドと 1,2-DHB は、過ヨウ素酸ナトリウム存在下、HEPES buffer (pH 7.5)中で加熱すると、370 nm と 500 nm にそれぞれ最大励起波長と最大蛍光波長を有する蛍光体を生成することが分かった(Fig. 1A)。反応時間や反応温度、pH、試薬の濃度などの反応条件を検討したのち、様々なペプチドを用いて反応を行ったところ、この蛍光反応は、*N*末端セリン含有ペプチドに極めて高い選択性を示した(Fig. 1B)。このとき、HPLCを用いた *N*末端セリン含有ペプチド蛍光体の検出下限は約 0.1  $\mu$ M であった。

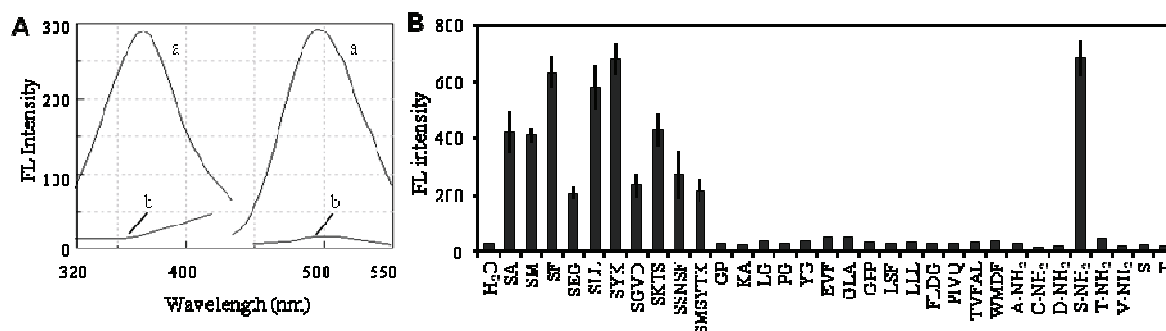


Fig. 1. (A) Fluorescence (FL) spectra obtained by the reaction of (a) 16.7  $\mu$ M SGVD and (b) water. (B) Selective preference of the proposed reaction towards *N*-terminal Ser-containing peptides. Peptides and amino acid amides at the concentration of 16.7  $\mu$ M were reacted with HEPES (pH 7.5), 1,2-DHB and NaIO<sub>4</sub> under optimized conditions for the FL derivatization. The results are means  $\pm$  SD of three separate experiments.

上述の反応条件でアミノ酸、タンパク質、糖、核酸など他の生体成分と反応させた場合、蛍光は観察されなかった。これらの結果は、1,2-DHB と HEPES を用いた本蛍光反応が、N 末端セリン含有ペプチドを選択的に蛍光誘導体化することを示している。なお、HEPES を用いない場合は、主に 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性を与える。

### 新規蛍光反応を用いたカスパーゼ活性測定法の開発

カスパーゼは、基質となるタンパク質中のアスパラギン酸残基の C 末側を切断するシステインプロテアーゼである。現在、哺乳動物において、14 種類のカスパーゼが報告されており、これらはカスパーゼファミリーと総称されている。カスパーゼは、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路を構成しており、他のカスパーゼを切断し活性化するカスケードの形で機能している。また、カスパーゼは、サイトカインの活性化を介して免疫系の調節にも関与している。従って、カスパーゼの高感度かつ選択的な新規活性測定法は、アポトーシスの評価だけでなく、病気の診断や創薬において極めて注目されている。

本研究では、上述した N 末端セリン含有ペプチドに選択的な蛍光反応を用い、カスパーゼの新規活性測定法を開発した。研究には、モデル酵素としてカスパーゼ-3 とカスパーゼ-8 を、それらの酵素に対する基質として Ac-DRVDSKTS (Sub-3) と Ac-YVADSSNSF (Sub-8) をそれぞれ用いた。本測定法の原理は、酵素分解によって生成した N 末端セリン含有ペプチドを蛍光誘導体化したのち、HPLC によって蛍光検出するものであり、大量に残存する基質や酵素分解された N 末側のアセチル化ペプチドは蛍光検出されない(Fig. 2)。

開発した手法では、それぞれの酵素と基質を 37°C、30 分間反応し、蛍光誘導体化後、逆相 HPLC によって、生成される N 末端セリン含有ペプチドを一斉に解析したところ、2 U (4.3 nM) カスパーゼ-3、2.5 U (3.3 nM) カスパーゼ-8 の酵素活性をそれぞれ検出することができた。

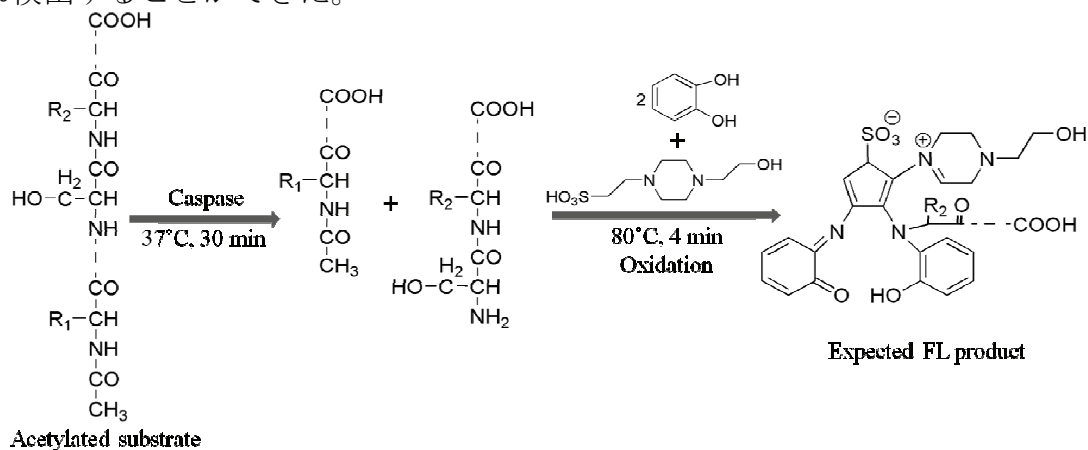


Fig. 2. Schematic representation of assay for caspase activity based on a specific and novel FL reaction for N-terminal Ser-containing peptides.

次に、本測定法を用いて、カスパーゼ活性によって生成されるペプチド分子種が選択的に検出されているか否かを調べた。両酵素を、Sub-3 または Sub-8 単独、あるいは、両基質を同時に、それぞれ反応させた場合、Sub-3 および Sub-8 から、それぞれ酵素反応生成物、SKTS および SSNSF に由来する各単一の蛍光ピークが検出された(Fig. 3A, B)。また、両基質を同時に用いた場合でも、SKTS と SSNSF に由来する

蛍光ピークが検出された(Fig. 3C)。一方、酵素や基質を使用しなかった場合には、これらのピークは検出されなかった。これらの結果は、それぞれの基質が、対応するカスパーゼによって、それぞれ選択的に分解されたことを示しており、本活性測定法は、複数の基質を使用することで、一回の HPLC 検出によってカスパーゼ分子種をそれぞれ選択的に同定できることが明らかになった。

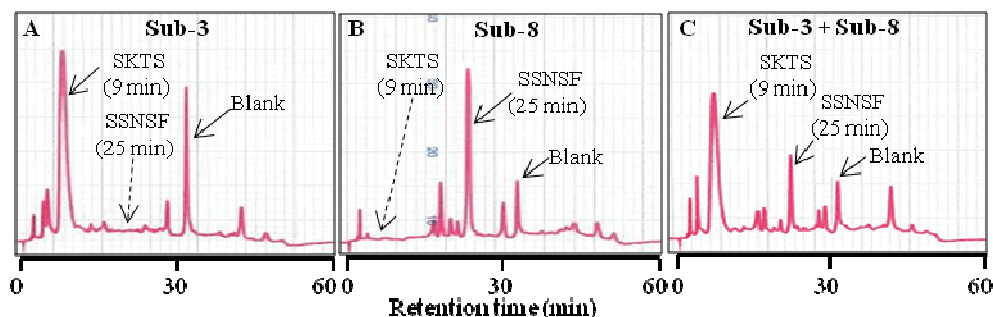


Fig. 3. Production of SKTS from Sub-3 and SSNSF from Sub-8 by caspases-3 and -8, respectively. Enzymatic reactions were carried out using (A) Sub-3, (B) Sub-8, and (C) Sub-3 and Sub-8 in the reaction mixtures containing both caspases-3 and -8.

Fig. 4は、本法によって、細胞中のカスパーゼ-3およびカスパーゼ-8の活性を測定したものである。飢餓条件下で細胞を培養すると、アポトーシスが誘導されることが知られている。そこで、飢餓または通常の条件下で HeLa 細胞を培養し、それぞれの細胞中のカスパーゼ活性を比較した。その結果、アポトーシスを誘導した細胞では、カスパーゼ-3 と-8 の両方の活性が増加していることが確認できた。本法は、蛍光や色素標識した基質を必要とせず、使用する試薬も安価であり、操作も簡便である。さらに、複数の基質を使用することで、細胞中の各種カスパーゼ活性を一斉に検出できることから、発生や癌におけるアポトーシス研究において有用であると考える。

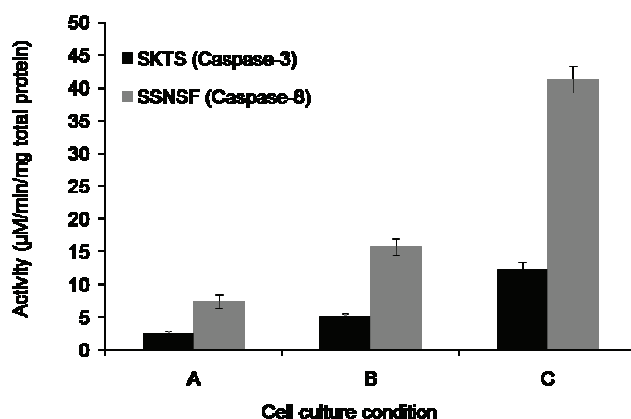


Fig. 4. Measurement of caspases-3 and -8 activity in HeLa cells. Cells were cultured under three different conditions and harvested after 3 days. Group A: Medium was replaced every 24 h. Group B: Medium was replaced every 24 h but FBS was not added on day 3. Group C: Medium was not changed.

[基礎となった学術論文]

1. Rahman M.S., Kabashima T., Yasmin H., Shibata T., Kai M.: A novel fluorescence reaction for N-terminal Ser-containing peptides and its application to assay caspase activity. *Anal. Biochem.* **433**, 79-85 (2013).

[参考論文]

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).

2. Kabashima T., Yu Z., Tang C., Nakagawa Y., Okumura K., Shibata T., Lu J., Kai M.: A selective fluorescence reaction for peptides and chromatographic analysis. *Peptides* **29**, 356-363 (2008).