

平成 26 年度

博士論文

タンパク質の動的挙動に基づく修飾分子の機能スイッチング

およびタンパク質表面における分子配向

藤井 亮

奈良先端科学技術大学院大学

物質創成科学研究科

超分子集合体科学研究室

# 目次

## 1 章：序論

1-1. 非天然タンパク質・非天然酵素の構築	1
1-2. 分子の動的挙動を利用した機能化学	8
1-3. タンパク質・酵素の構造変化	12
1-4. 動的挙動に着目した非天然タンパク質・非天然酵素構築のアプローチ	14
1-5. タンパク質表面上の修飾分子間相互作用	17
1-6. 本研究の目的	22

## 2 章：

アデニル酸キナーゼの触媒サイクルに伴う構造変化を基盤とした発光特性のスイッチング機構の構築

2-1. 研究目的	28
2-2. ピレン修飾アデニル酸キナーゼ (C1-Adk <sub>tm</sub> ) の キャラクターゼーション	29
2-3. 阻害剤および基質添加による C1-Adk <sub>tm</sub> の 蛍光スペクトル変化	33
2-4. 触媒サイクルに伴うピレンモノマー/エキシマー発光の 双方向スイッチング	39
2-5. まとめ	41
2-6. 実験項	42

## 3 章：

CLOSED 状態のアデニル酸キナーゼ表面におけるピレンのエキシマー発光挙動及びピレンスタッキングモードの評価

3-1. 研究目的	50
3-2. ピレン修飾アデニル酸キナーゼ (C2-Adk <sub>tm</sub> , C3-Adk <sub>tm</sub> ) の キャラクターゼーション	51
3-3. 基質及び阻害剤添加による蛍光スペクトル変化	53
3-4. 阻害剤添加による定常状態スペクトル変化	58
3-5. C1-Adk <sub>tm</sub> の CLOSED 状態における結晶構造	64
3-6. C1- C3-Adk <sub>tm</sub> の蛍光寿命	67

3-7. C1-C3-Adk <sub>tm</sub> 表面におけるピレン分子の スタッキングモード	72
3-8. ピレン修飾 Adk <sub>tm</sub> の分光学的特性における Mg <sup>2+</sup> 効果	74
3-9. まとめ	81
3-10. 実験項	82
4 章：結論と展望	96
謝辞	98
発表論文	99
参考文献	100
付録	108

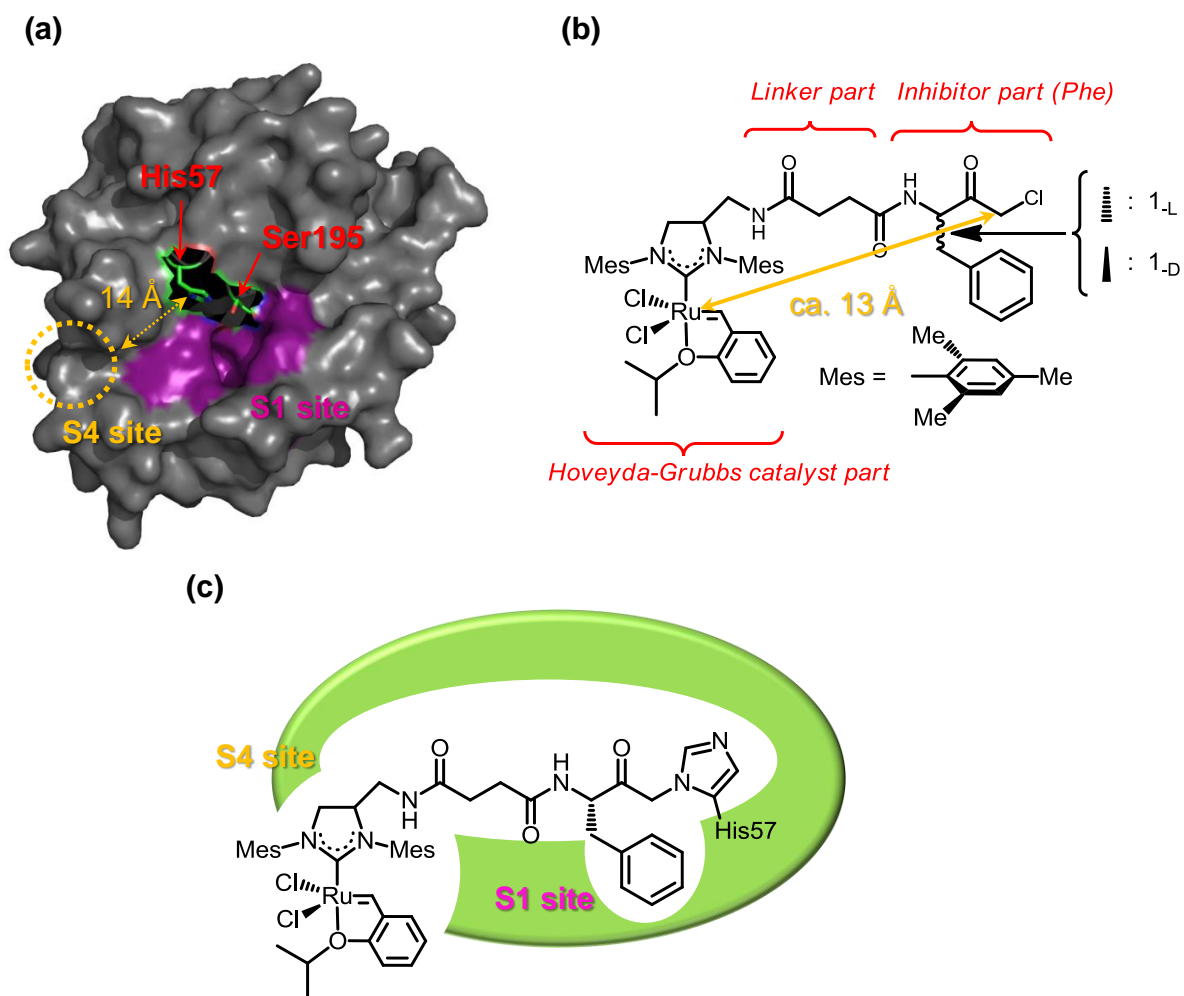
## 1 章: 序論

### 1-1. 非天然タンパク質・非天然酵素の構築

タンパク質は 20 種類のアミノ酸から構成される生体高分子であり、適切なアミノ酸配列、 $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートのような事前組織化された 2 次構造の組み合わせにより、タンパク質内部のアミノ酸の空間的距離や配向を制御することで正しい分子認識や効率的な触媒反応を行う。この様に高度に制御されたタンパク質の構造に着目し、合成分子の修飾、遺伝子工学的変異導入等のアプローチにより非天然タンパク質・非天然酵素が構築されてきた<sup>1,2</sup>。以下にタンパク質の化学修飾、遺伝子操作によるタンパク質機能改変の研究例を示す。

#### 1-1-1. 化学修飾によるタンパク質機能の改変

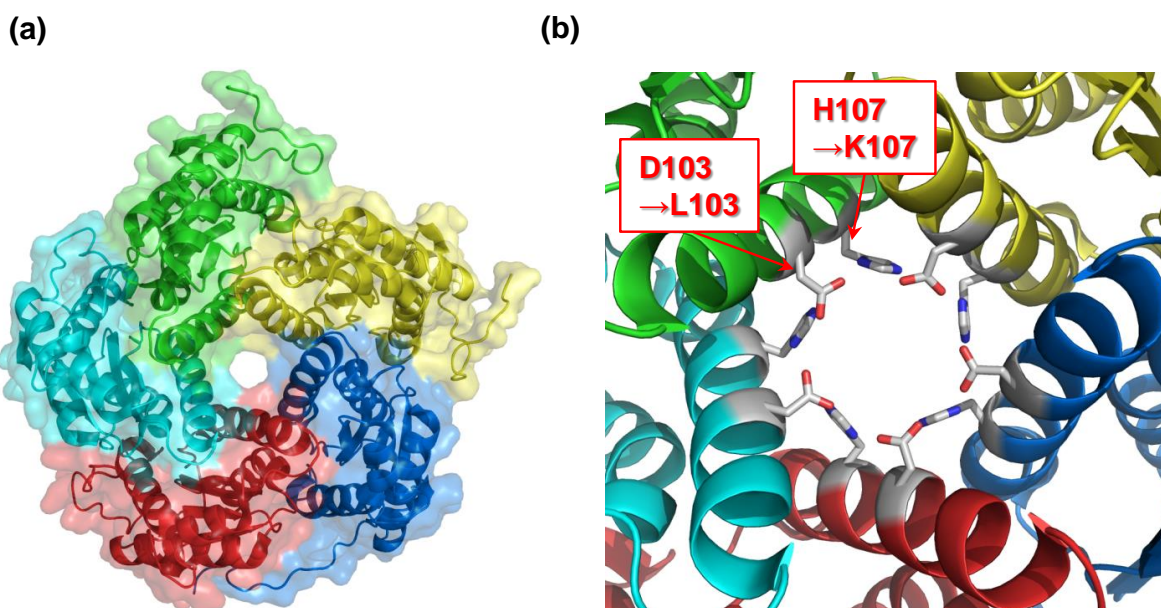
加水分解酵素である  $\alpha$ -キモトリプシンに対し、ホベイダ-グラブス触媒を導入することで、天然にはないユニークな C-C 結合形成を触媒する非天然金属酵素が構築されている<sup>3</sup>(**Figure 1-1**)。 $\alpha$ -キモトリプシンは基質認識部位として S1 サイトを有し、そこに His57 が近接した位置関係をとる (**Figure 1-1 (a)**)。ホベイダ-グラブス触媒 **1** の末端部分には inhibitor part がデザインされており (**Figure 1-1 (b)**)、L-フェニルアラニン部位が S1 サイトに認識されグラブス触媒 **1<sub>L</sub>** が共有結合的に His57 に結合されるように設計されている。また、 $\alpha$ -キモトリプシンは活性部位の Ser195-His57-Asp102 が水素結合することにより効率的な加水分解活性を示すが、グラブス触媒 **1<sub>L</sub>** による修飾後、 $\alpha$ -キモトリプシンの加水分解活性は大幅に抑制されていた。一方、立体が反転した D-フェニルアラニンを inhibitor part に持つ **1<sub>D</sub>** を修飾した場合、加水分解活性が保持されていた。この結果は、S1 サイトが inhibitor part を認識し、His57 にグラブス触媒 **1<sub>L</sub>** が導入されることで酵素活性が抑制されていることを示唆しており、タンパク質の分子認識を巧みに利用し、金属錯体がタンパク質に導入されたことを示している。また、このホベイダ-グラブス触媒は linker part を有している (**Figure 1-1 (b)**)。これによりグラブス触媒 **1<sub>L</sub>** の inhibitor part と触媒部位間の距離は  $\alpha$ -キモトリプシンの His57-S4 サイト間の距離と類似しており、 $\alpha$ -キモトリプシン構造の溝にグラブス触媒 **1<sub>L</sub>** が沿うように設計されている。グラブス触媒 **1<sub>L</sub>** が導入された  $\alpha$ -キモトリプシンは、グラブス触媒の吸収領域に CD シグナルが誘起されていた。この結果は修飾されたグラブス触媒は単に溶液中に露出しているのではなく  $\alpha$ -キモトリプシン構造の溝に沿うような形で存在していることを示唆している (**Figure 1-1 (c)**)。これは、適切な分子設計および、基盤となるタンパク質の分子認識能を利用することで、金属錯体を位置選択的にタンパク質に導入し、望みの非天然タンパク質・非天然酵素の構築が可能であることを示している。



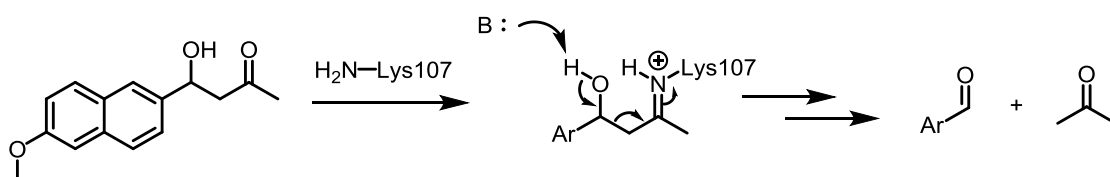
**Figure 1-1.** ホベイダ-グラブス触媒含有  $\alpha$ -キモトリプシンの構築<sup>3</sup>. (a)  $\alpha$ -キモトリプシンの結晶構造 (PDB: 4CHA). (b) Linker part、inhibitor part を有するホベイダ-グラブス触媒 (**1-L**, **1-D**). (c) 推定されるホベイダ-グラブス触媒修飾型  $\alpha$ -キモトリプシンの模式図.

### 1-1-2. 遺伝子操作によるタンパク質機能の改変

遺伝子工学的手法によるアプローチによって、*Saccharomyces cerevisiae* lumazine synthase (ScLS) の環状構造部位に変異が導入された (D103L/H107K)(Figure 1-2 (b))。<sup>4</sup>。遺伝子操作により導入された疎水性アミノ酸の Leu がタンパク質に対する基質の親和性を向上させ、近傍の Lys がイミン中間体の形成および求核反応を行う (Scheme 1-1)。この非天然酵素が触媒するレトロアルドール反応は、天然に存在するアルドラーゼよりも反応効率は高くないものの、この研究は触媒機能を持たない天然タンパク質に対して、遺伝子工学的に新たな機能をタンパク質に付与できることを示している。



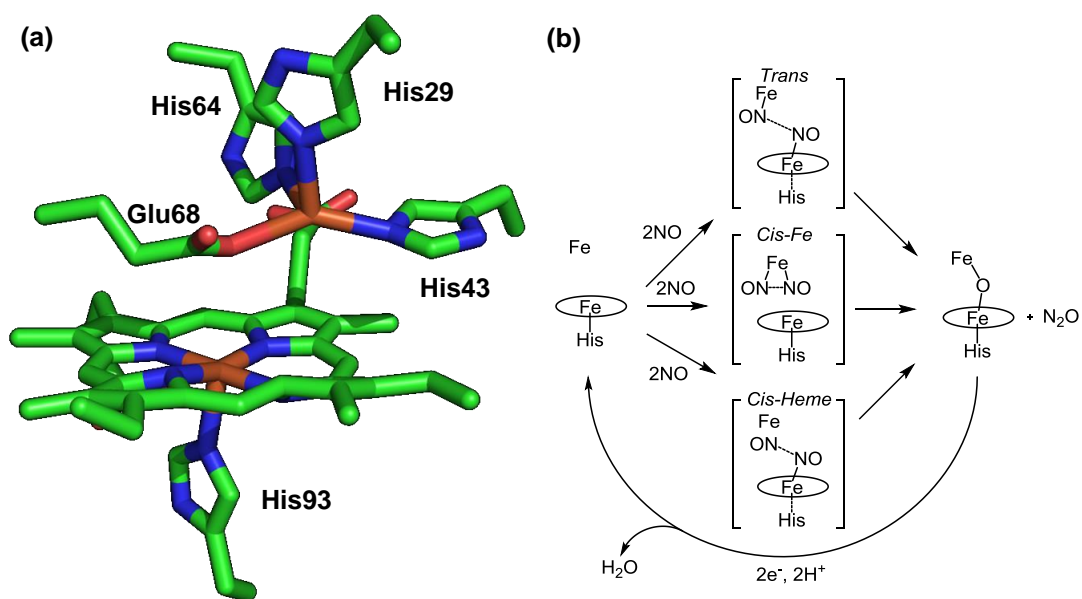
**Figure 1-2.** 遺伝子工学的手法によるレトロアルドール反応を触媒する非天然酵素の構築<sup>4</sup>。(a) *Saccharomyces cerevisiae* lumazine synthase (ScLS) の結晶構造 (PDB: 1EJB)。 (b) 環状構造中のアミノ酸への変異導入。



**Scheme 1-1.** ScLS 変異体 (E99A/D103L/H107K) によるレトロアルドール反応。

### 1-1-3. 遺伝子操作による金属錯体形成

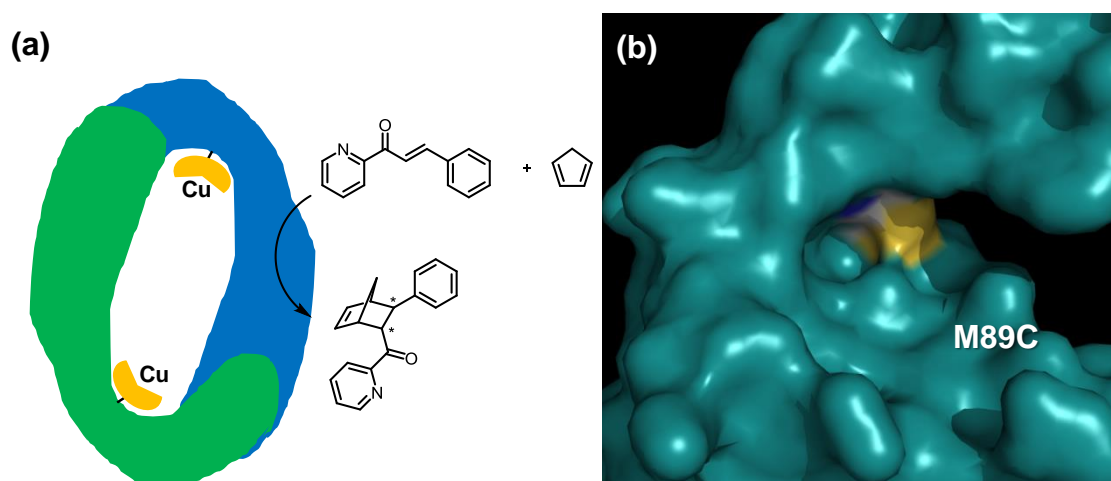
遺伝子工学的な手法により、タンパク質の機能を改変するもう一つの例として、sperm whale 由来ミオグロビン (Mb) の結晶構造 (PDB: 1JP6) を基に適切な位置に変異を導入し (L29H/F43H/V68E)、それらのアミノ酸側鎖を配位子として金属錯体を構築することで、一酸化窒素還元機能を持つ酵素が構築された<sup>5</sup>(Figure 1-3)。また、Fe 原子間距離は約 4.8 Å で、天然の一酸化窒素還元酵素と類似の位置関係である。これは、遺伝子操作により適切な空間配置を有する金属錯体の構築が可能であることを示している。



**Figure 1-3.** 変異導入したアミノ酸側鎖を配位子とする金属錯体構築<sup>5</sup>。(a) 一酸化窒素還元機能を有する Mb 変異体 (L29H/F43H/V68E) (PDB: 3KQZ)。(b) 提唱されている一酸化窒素還元反応機構<sup>6</sup>。

#### 1-1-4. タンパク質の二量体界面における、化学修飾、遺伝子操作を用いた金属錯体構築

Lactococcal multidrug resistance Regulator (LmrR) の変異体M89C二量体の界面にフェナントロリンCu (II) 錯体を導入し、水中におけるディールスアルダー反応を行うと生成物のエナンチオマー選択性が上昇した<sup>7</sup>(Figure 1-4(a))。この立体選択性は二量体界面の限定的な空間に起因している (Figure 1-4 (b))。また、疎水性の基質を用いてディールスアルダー反応を行うと、フェナントロリンCu (II)-LmrRはタンパク質に導入していないフェナントロリンCu (II) を用いた条件よりも高い反応効率を示した。これは二量体界面が疎水的空間であるため、疎水性基質が効率的にタンパク質内部のフェナントロリンCu (II) 錯体に接近することが原因と考えられる。



**Figure 1-4.** タンパク質界面に導入されたフェナントロリン Cu (II) によるディールスアルダー反応<sup>7</sup>. (a) Lactococcal multidrug resistance Regulator (LmrR) の変異体 M89C 二量体の界面に導入されたフェナントロリン Cu (II) 錯体によるディールスアルダー反応の模式図. (b) LmrR の結晶構造 (PDB: 3F8B) を基にした M89C 周辺の疎水的界面.



### 1-1-5. Dual anchoring 型の金属錯体形成による触媒反応の立体制御

ストレプトアビジン-ビオチンの強いリガンド結合と、タンパク質内部の複数のアミノ酸側鎖による配位結合を利用した dual anchoring 型金属錯体をストレプトアビジンに修飾することで、基質のアクセスする方向が制御され、イミンの水素化反応の立体選択性が発現した<sup>8</sup>(Figure 1-5 (a))。さらに変異導入により金属錯体と相互作用するアミノ酸の位置を変化させることで、その立体選択性を反転させることも可能になる (Figure 1-5 (b))。

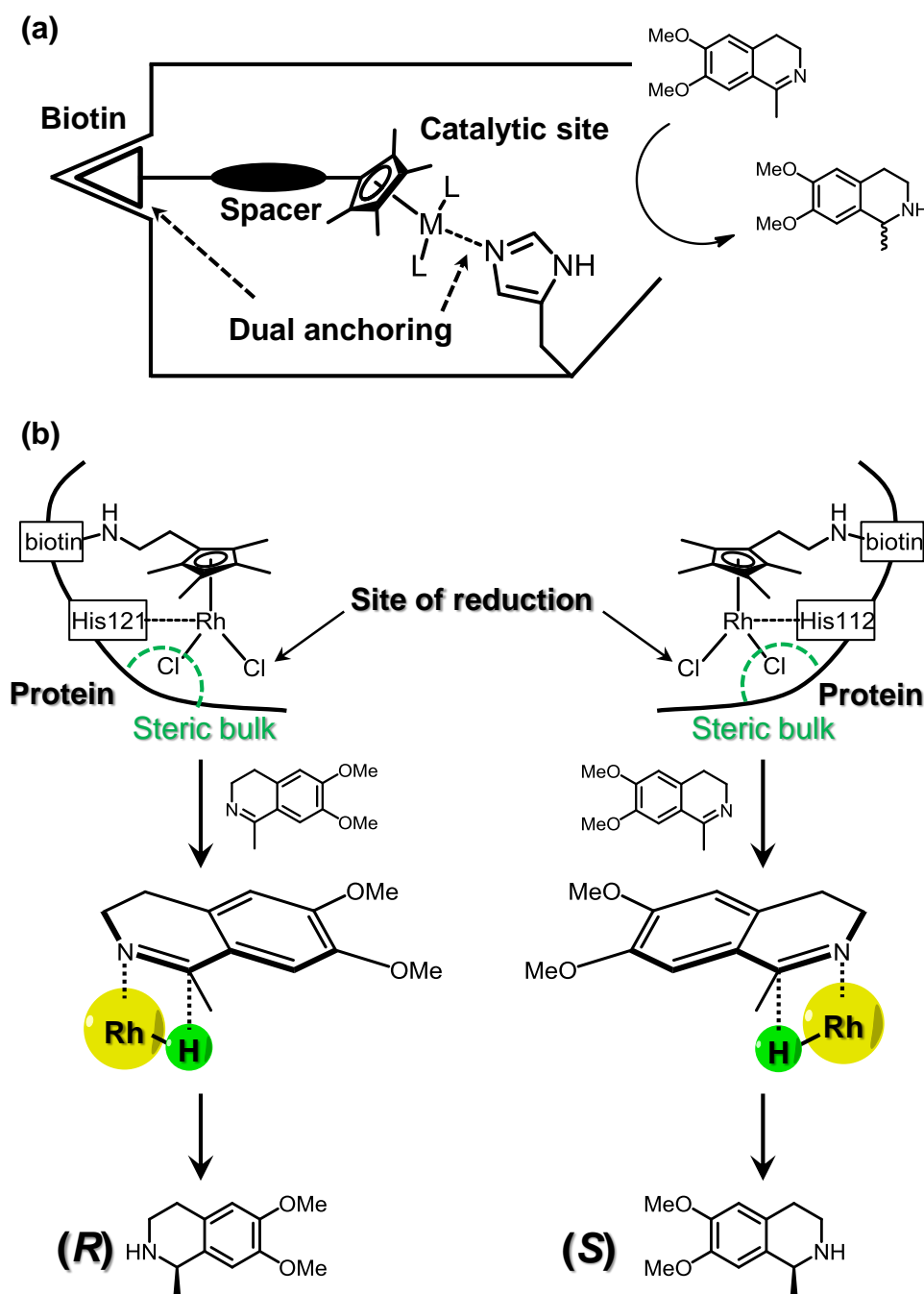
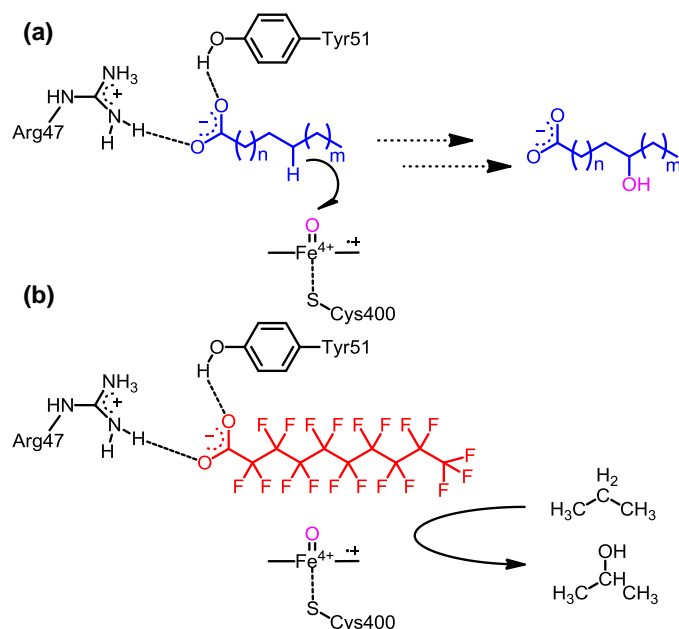


Figure 1-5. Dual anchoring アプローチによる触媒反応の立体選択性制御<sup>8</sup>. (a) Dual anchoring アプローチ. (b) His 変異導入箇所による Rh 錯体のイミン水素化反応の立体選択性の制御.

### 1-1-6. 基質結合様式に基づき設計されたデコイ分子を用いた酵素反応の拡張

タンパク質内部のアミノ酸側鎖の配向は高度に制御され、基質やリガンドに対して選択性を示すが、その基質特異性が原因で、有機合成に酵素触媒反応を応用する際基質の構造に制限が生じる。その一例として、過酸化水素駆動型のシトクロム P450 である Cytochrome P450<sub>BM3</sub> によるアルキル鎖のヒドロキシル化は水中における C-H 結合の活性化の観点から有用である。しかし、この反応の初期段階においては、Cytochrome P450<sub>BM3</sub> と基質の結合により、へム鉄に配位している水分子が解離し、その後、過酸化水素の活性化により高酸化活性を有するフェリルオキシ種 (Fe(IV)=O 種) が生成する必要がある。そこで、基質結合に関与する Arg47 と Tyr51 に結合するが、ヒドロキシル化は進行しないデコイ分子であるパーフルオロカルボン酸を作用させることで、疑似的に基質結合状態を作り出し、様々な炭化水素をヒドロキシル化するアプローチが報告されている<sup>9</sup>(Figure 1-6)。



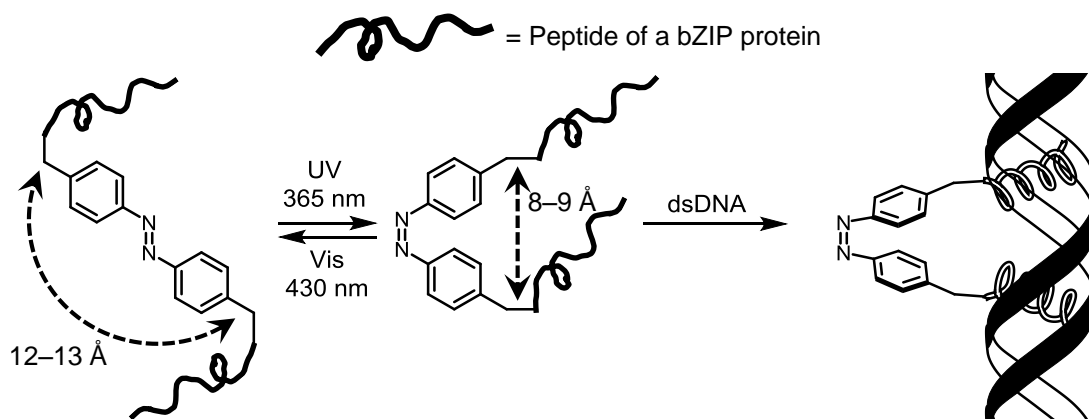
**Figure 1-6.** デコイ分子を利用した cytochrome P450<sub>BM3</sub> の炭化水素のヒドロキシル化反応<sup>9</sup>. (a) 基質脂肪酸のヒドロキシル化反応. (b) あらかじめパーフルオロカルボン酸 (デコイ分子) を作用させ基質結合状態を作り出すことにより、進行するプロパンのヒドロキシル化反応.

タンパク質内部空間を金属錯体による触媒反応のための「反応場」として用いることにより、タンパク質内部での金属錯体構築および触媒反応の立体選択性の発現や、水中反応における疎水効果を利用した触媒反応の促進が期待できる。これらは、タンパク質の高度に制御されたアミノ酸側鎖の配向を巧みに利用することで、目的の機能を有する非天然タンパク質・非天然酵素を構築する有力なアプローチである。この様にタンパク質構造を金属触媒の反応場として捉えたケースは、「タンパク質構造の静的特徴」に着目したアプローチと言える。

## 1-2. 分子の動的挙動を利用した機能化学

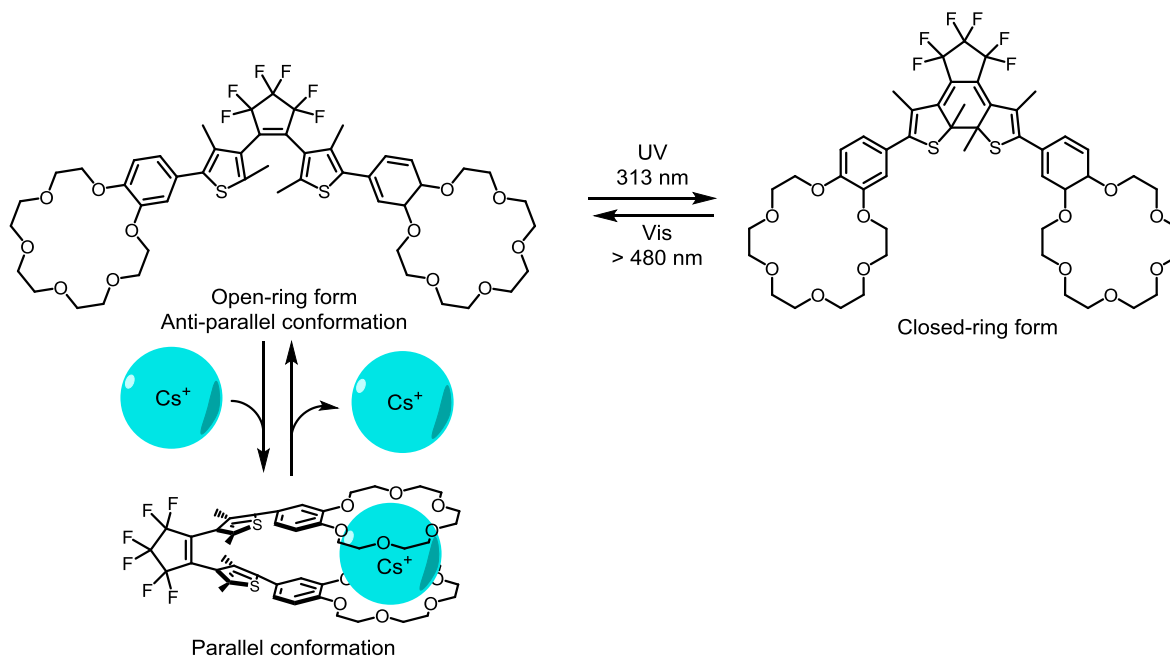
### 1-2-1. 光異性化により構造変化を示す分子

外部刺激に応答して動的挙動を示す化合物を利用して分子機能を制御する研究が報告されている。例として、紫外光/可視光により *trans/cis* 光異性化を示すアゾベンゼンの末端に DNA 結合ペプチドを修飾し、光照射によって特定の塩基配列を有する DNA 二重鎖への親和性をコントロールする研究が報告されている<sup>10</sup>(Scheme 1-2)。



Scheme 1-2. アゾベンゼン骨格を有する DNA 結合ペプチドの光照射による DNA 親和性の制御<sup>10</sup>。

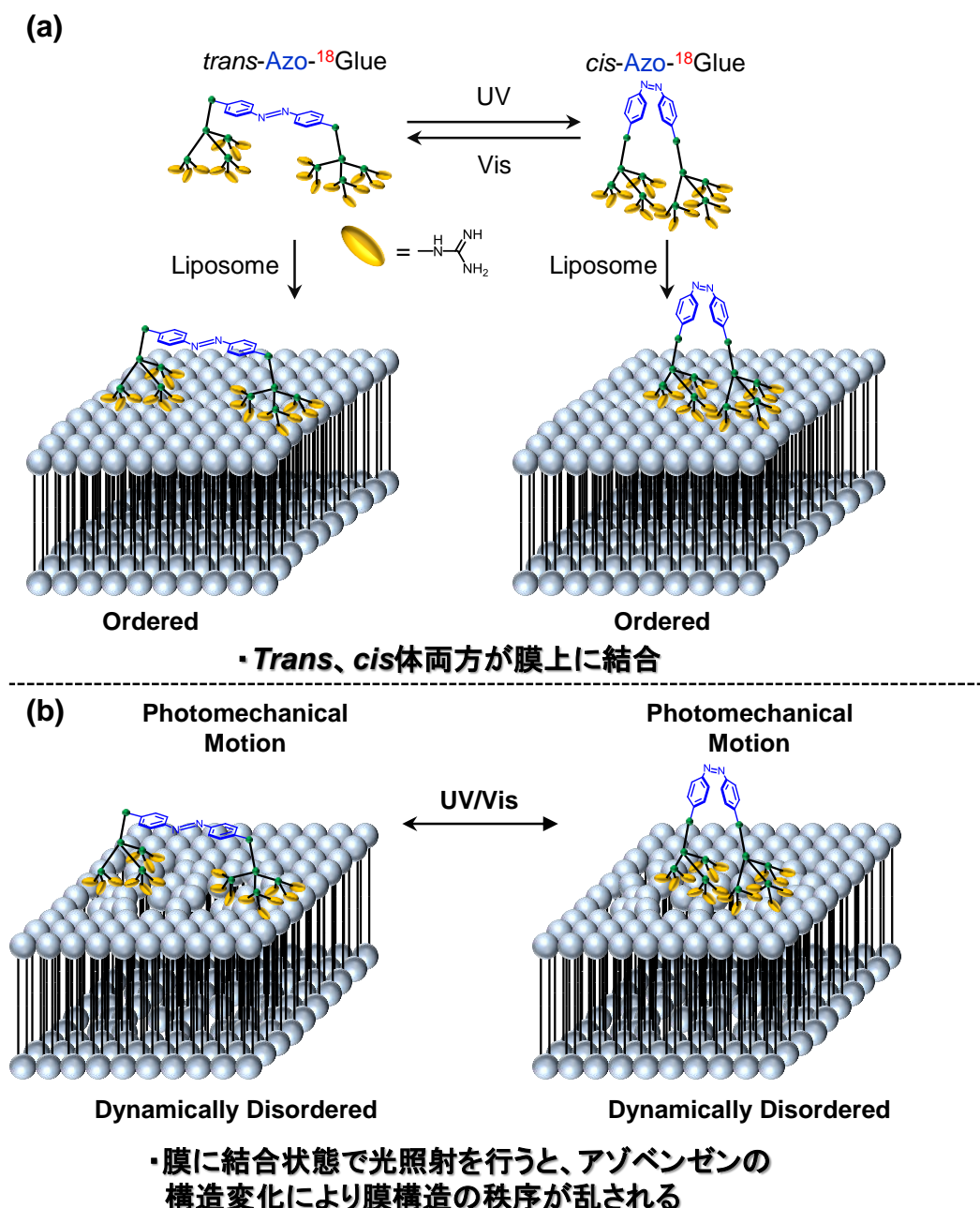
また、ジチエニルエテンは紫外光/可視光照射により open-ring form と closed-ring form を形成し、open-ring form では分子の末端部分がフレキシブルに動くことができるが closed-ring form では光環化により分子の自由度が減少する。この特徴より、光照射によってアルカリ金属イオンのキレート能の制御が可能になる<sup>11</sup>(Scheme 1-3)。



Scheme 1-3. 光異性化に伴うジチエニルエテンの open-ring form、closed-ring form の構造を利用したアルカリ金属イオンセンシング<sup>11</sup>。

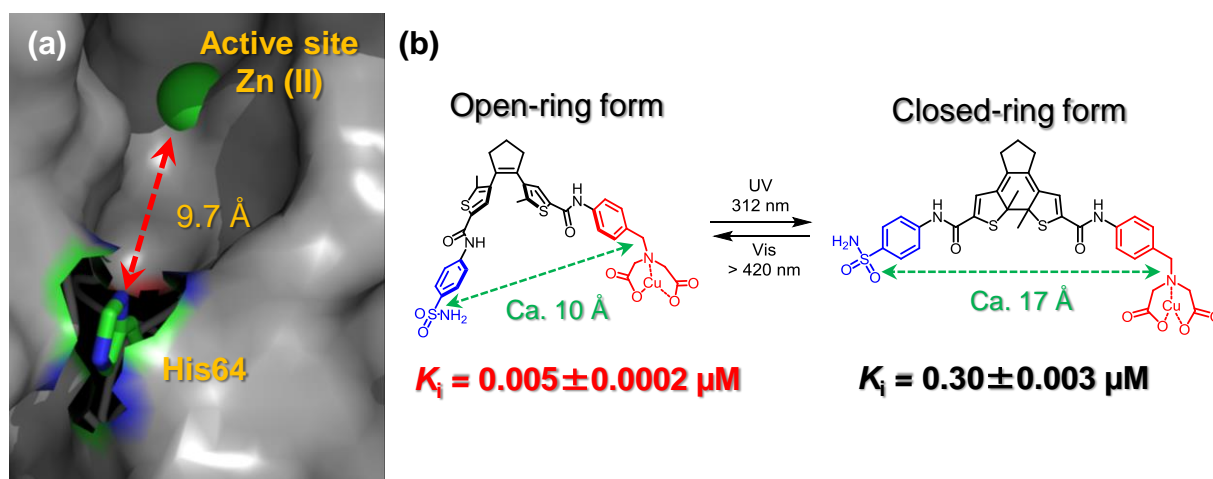
## 1-2-2. 光異性化による構造変化を示す分子による生体分子機能の制御

外部刺激に応答する構造変化は、生体反応の制御の可能性を示している。リン脂質2重膜に静電的に接着するグアニジウムイオンを末端に有する dendritic 型のアゾベンゼンは、膜上に結合した状態で、光照射による *trans/cis* 異性化を行うと、その構造変化により膜構造の秩序が崩れ、その部分を介して OH<sup>-</sup>イオンが流入する<sup>12</sup>(Figure 1-7)。



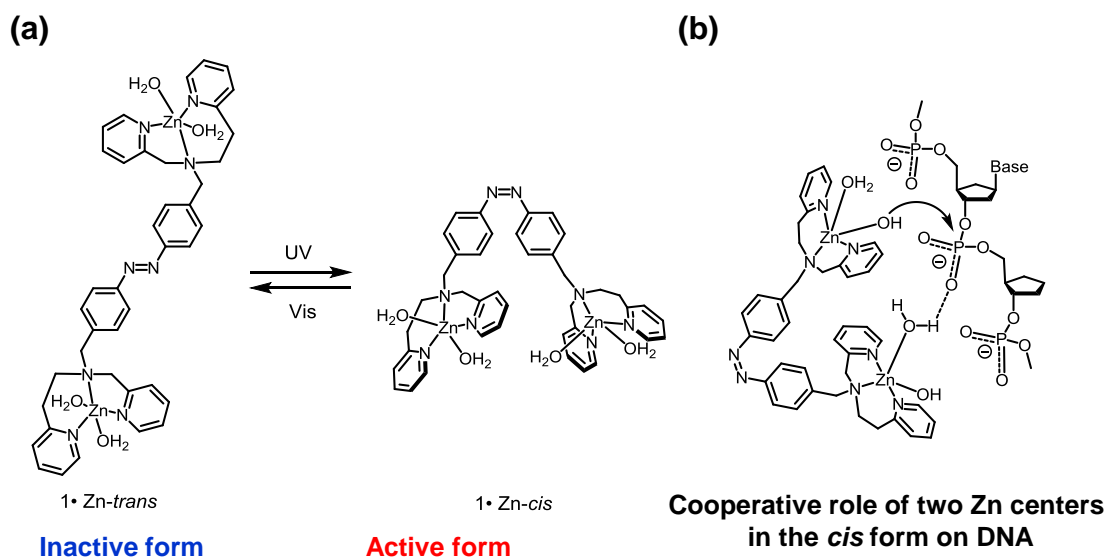
**Figure 1-7.** 光照射に伴うアゾベンゼンの *trans/cis* 異性化による構造変化を利用したイオンの膜間移動の制御<sup>12</sup>. (a) *trans*-Azo-<sup>18</sup>Glue と *cis*-Azo-<sup>18</sup>Glue がそれぞれ膜上に接着した模式図. (b) 膜上に接着した Azo-<sup>18</sup>Glue の *trans/cis* 異性化に伴う構造変化がリン脂質の秩序を乱すことでイオンの膜間移動が促進される.

光異性化による分子構造変化は酵素活性の制御にも利用されている<sup>13-14</sup>。Human carbonic anhydrase I (hCAI) の阻害剤であるスルホンアミドと銅錯体を適切な長さのリンカーで架橋することで、スルホンアミドが活性部位に、銅錯体が活性部位周辺の His と結合することで高い阻害活性を示す<sup>15</sup>。これは阻害剤部位に加え、銅錯体が His と結合することで、スルホンアミドよりも低い解離定数を示すことに起因する。この特徴を基盤とし、スルホンアミドと銅錯体をジエチルエテンに結合させた分子が hCAI の阻害剤として構築された (Figure 1 – 8)。活性部位と近接した His64 間の距離は 9.7 Å であり、フレキシブルな open-ring form ではスルホンアミドが活性部位に、銅錯体が His64 に結合することで高い阻害定数を示す。一方、closed-ring form では光環化により分子の構造が剛直になることで、closed-ring form のジエチルエテン骨格の阻害剤は活性部位および His64 との結合に適した構造を取ることができない。その結果、closed-ring form はスルホンアミドと同じ解離定数を示した。この様に、タンパク質内部の活性部位や特定のアミノ酸に着目し分子設計を行うことで、光異性化に伴う分子の動的挙動を基盤とした生体分子機能の制御が可能となる。



**Figure 1 – 8.** ジエチルエテン骨格を有する阻害剤による human carbonic anhydrase (hCAI) の酵素活性の制御<sup>14</sup>。(a) 活性部位および近接した His64 の距離 (PDB: 3CAJ)。(b) 光異性化に伴うジエチルエテン骨格を有する阻害剤の構造変化。

アゾベンゼンの末端に Zn(II)錯体を 2 分子導入した二核 Zn(II)錯体が構築されている<sup>16</sup>(Scheme 1-4)。光照射による *trans/cis* 異性化によって錯体間距離が変化するこの錯体 (Scheme 1-4 (a)) は、*cis form* において DNA の加水分解が促進される現象が観測された。*cis form* において、Zn 錯体に配位している水分子が phosphate と相互作用し、もう一方の Zn 錯体に配位しているヒドロキシルイオンが phosphate に求核攻撃するメカニズムが推定されている (Scheme 1-4 (b))。この様に外部刺激に応答する構造変化を用いることによって「金属錯体の協奏効果」を制御することが可能となる。

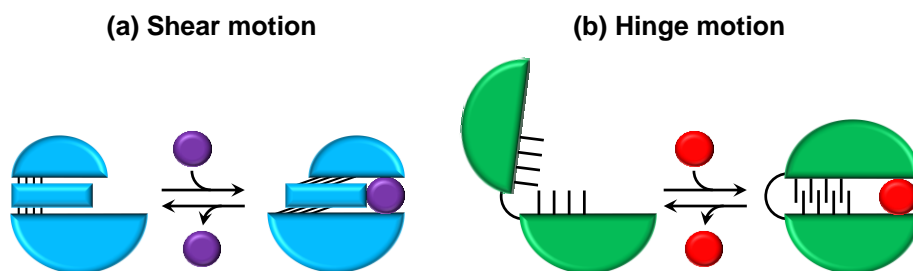


**Scheme 1-4.** アゾベンゼン骨格を有する二核 Zn(II)錯体<sup>16</sup>. (a) 光異性化による二核 Zn 錯体の構造変化. (b) DNA 加水分解反応における Zn(II)錯体の協奏的効果.



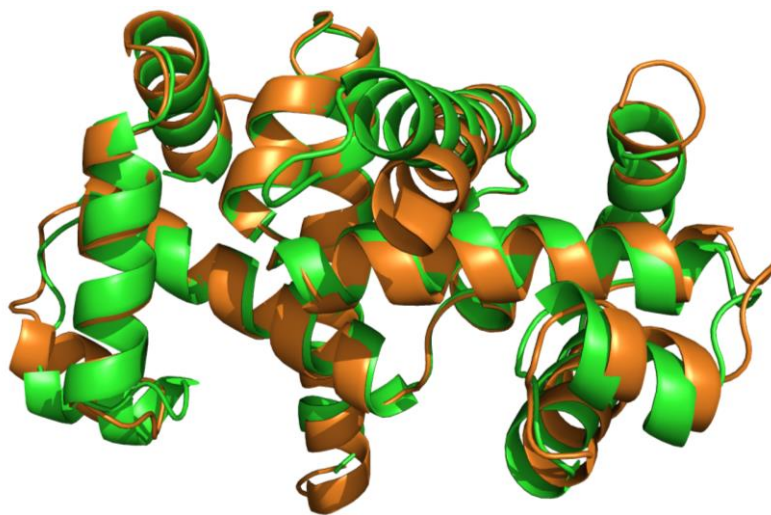
### 1-3. タンパク質・酵素の構造変化

タンパク質・酵素の中には基質もしくはリガンドと結合することで構造変化を示すものが知られている<sup>17-18</sup>。その構造変化は主に2種類あり、ドメインがスライド状に構造変化する shear motion (**Figure 1-9 (a)**) とドメインが開閉するように構造変化する hinge motion (**Figure 1-9 (b)**) がある。



**Figure 1-9.** 基質/リガンド結合に伴うタンパク質の構造変化.

Shear motion を示すタンパク質として、トリプトファンリプレッサーがある<sup>19</sup>。このタンパク質はトリプトファンと結合し、コンフォメーション変化を経てオペレーター DNA に結合しトリプトファンの生合成を抑制する。大腸菌由来トリプトファンリプレッサーはアポ体、ホロ体の結晶構造が既に解かれている (apo, PDB: 3SSW<sup>20</sup>, holo, PDB: 1TRO<sup>21</sup>)(**Figure 1-10**)。しかし、shear motion を示すタンパク質の構造変化は一般的に小さい。



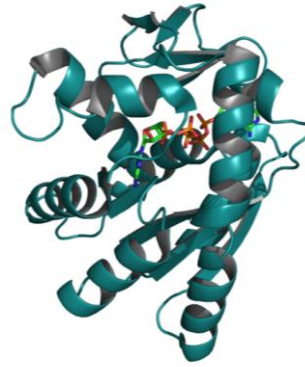
**Figure 1-10.** トリプトファンリプレッサーのアポ体 (green, PDB: 3SSW<sup>20</sup>)、ホロ体の結晶構造 (orange, PDB: 1TRO<sup>21</sup>).

一方、hinge motion を示すタンパク質は大きな構造変化を示す<sup>22-25</sup>(Figure 1 – 11)。

(a) Adenylate kinase from *E. coli*

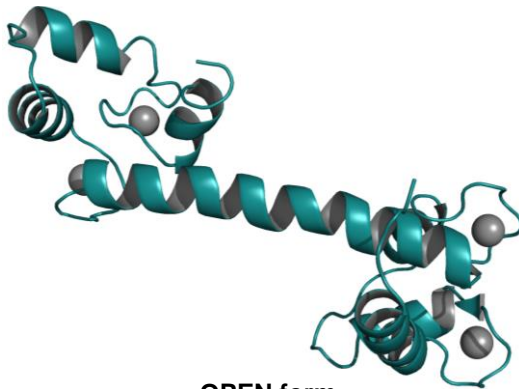


OPEN form  
(PDB: 4AKE)

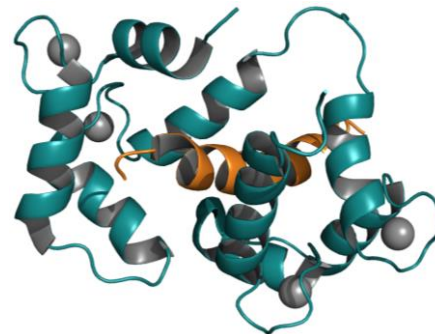


CLOSED form  
in complex with Ap<sub>5</sub>A  
(PDB: 1AKE)

(b) Calmodulin from *Drosophila melanogaster*



OPEN form  
(PDB: 2BBM)



CLOSED form  
in complex with 26-residue peptide  
of skeletal muscle myosin light  
chain kinase(PDB: 4CLN)

**Figure 1 – 11.** Hinge motion を示すタンパク質. (a) アデニル酸キナーゼ (Adk) (PDB: 4AKE<sup>22</sup> (OPEN), 1AKE<sup>23</sup> (CLOSED)). (b) カルモジュリン (CaM) (PDB: 2BBM<sup>24</sup> (OPEN), 4CLN<sup>25</sup> (CLOSED)).

アデニル酸キナーゼ (Adk) は  $Mg^{2+}$  の存在下、リン酸転移反応を可逆的に触媒する酵素である<sup>26</sup>( $MgADP + ADP \rightleftharpoons AMP + MgATP$ )( $K_m$ (ミカエリス定数):  $AMP < ATP < ADP$ <sup>27-30</sup>)。細胞中 AMP 濃度が上昇すると ADP を生成する反応が進行し ( $AMP + MgATP \rightarrow MgADP + ADP$ : forward reaction)、生成された ADP は酸化的リン酸化、光リン酸化などで ATP 合成に使われる。一方、ATP 消費が速く ADP レベルが上昇すると逆反応 ( $MgADP + ADP \rightarrow MgATP + AMP$ : backward reaction) が進行する。このリン酸転移反応において、基質の加水分解の進行を防ぐため、アデニル酸キナーゼは基質を包み込むような大きな構造変化を経て CLOSED form を形成する。

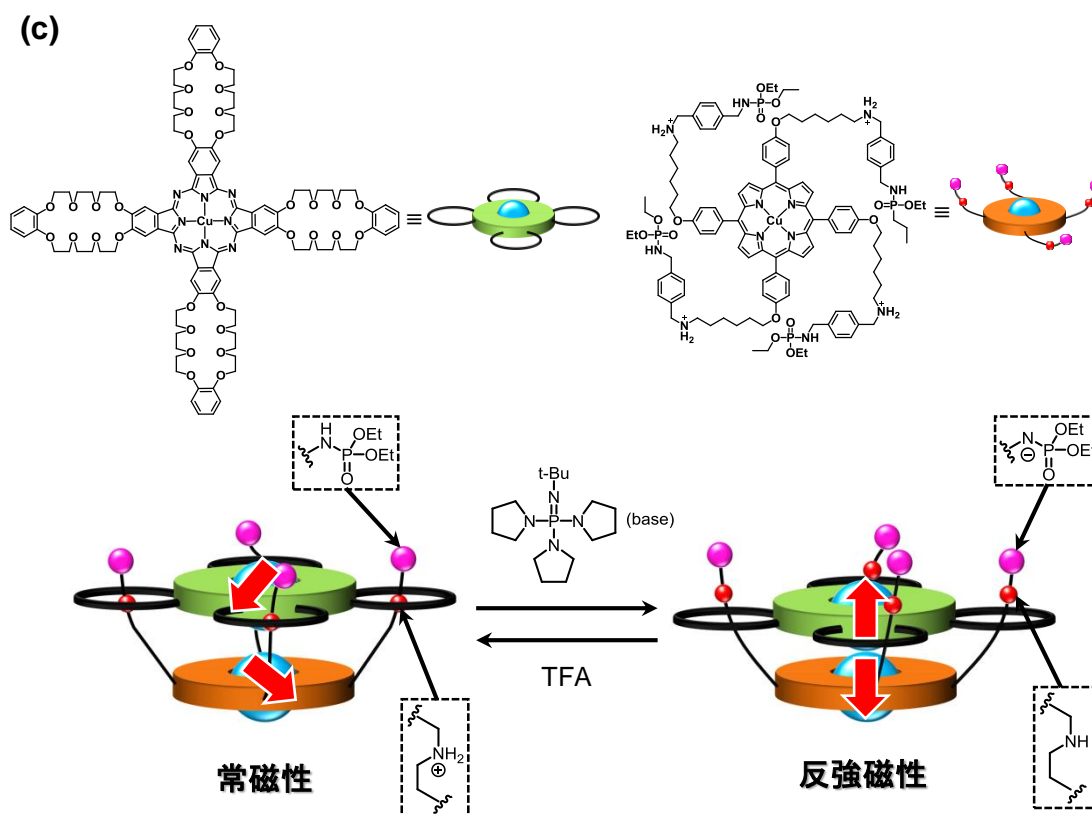
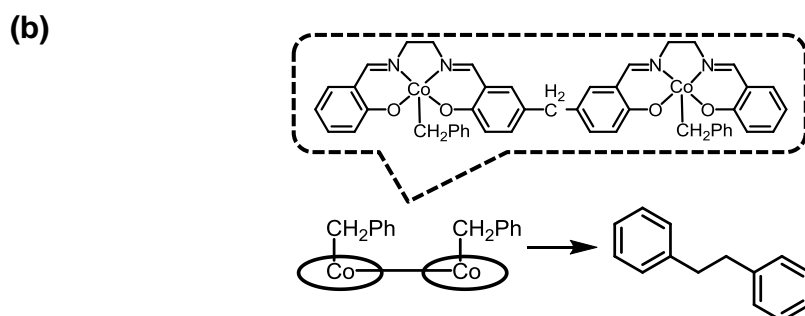
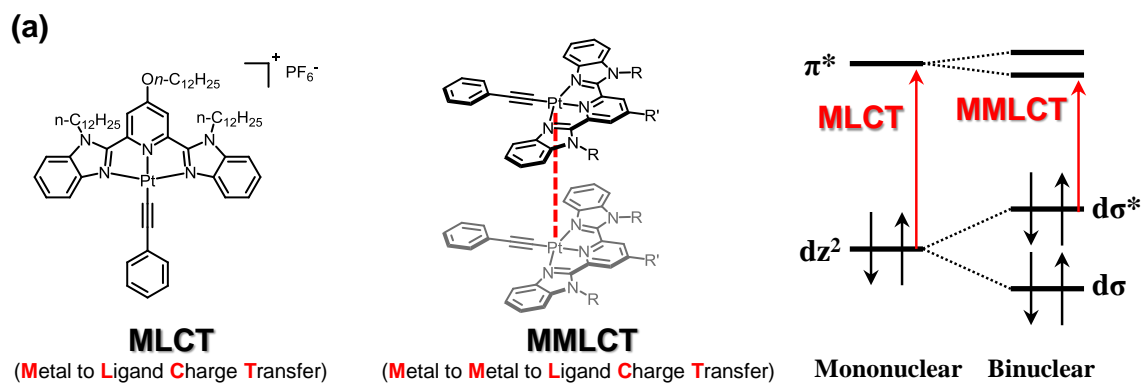


真核細胞に広く分布するカルモジュリン (CaM) は、様々な細胞の調節に関与する  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質で、両末端に球状ドメインを持ち、他のタンパク質のドメインと相互作用し大きな構造変化を示す<sup>25</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  が CaM に結合するとコンフォメーションが変化し、疎水面が露出する<sup>31-32</sup>。その疎水領域が他のプロテインキナーゼの自己阻害ドメインとの結合に関与する<sup>33</sup>。CaM が自己阻害ドメインを引き剥がすことで、プロテインキナーゼの活性部位が空き、プロテインキナーゼが酵素活性を示す。この時、自己阻害ドメインとの結合に伴い、OPEN CaM の真ん中の長い  $\alpha$ -ヘリックスが曲がり大きな構造変化を経て CLOSED form になる。

#### 1-4. 動的挙動に着目した非天然タンパク質・非天然酵素構築のアプローチ

1-1 に示す様な「タンパク質構造の静的特徴」とは対照的に、基質特異的なタンパク質・酵素の構造変化は、「タンパク質構造の動的挙動」を利用した非天然タンパク質・非天然酵素構築のアプローチとして期待できる。タンパク質の大きな構造変化を利用した例として、構造変化を示すタンパク質を組み込んだハイドロゲルが報告されている<sup>34-35</sup>。このシステムは基質結合に伴うタンパク質構造変化によりハイドロゲルが収縮し、それによりゲル内に包摂された薬剤が放出される機能を有する。これはタンパク質の「構造変化」がハイドロゲルの「構造変化」として発現している例である。そこで機能のアウトプットを「構造変化」以外の様々な機能 (分光特性、触媒反応 etc.) に変換する手法が構築できれば「タンパク質構造の動的挙動」を利用した有用なアプローチの1つとなる。

1-2 に示す様な合成分子の光異性化による構造変化により、生体分子機能を制御する研究例が報告されている。これらは合成分子の光異性化による構造変化をトリガーとし、生体分子の機能を調節する手法をとっている<sup>10, 12-14, 16</sup>。これとは対照的に、距離依存的な機能を有する合成分子を、構造変化を示すタンパク質表面に修飾すれば、生体反応を駆動力として合成分子の機能を制御することが可能であり、これは合成分子機能とタンパク質本来の機能を利用した非天然タンパク質・非天然酵素構築の手法となる。また、光異性化により金属錯体機能の協奏的效果をコントロールしている研究例が報告されている<sup>16</sup>。金属錯体には単核構造と複核構造で機能が変わるものが知られており、平面構造を有する白金(II)錯体は、分子同士が接近することで白金錯体(II)の分子軌道の相互作用により MMLCT からの長波長発光を示す<sup>36-37</sup> (**Figure 1 - 12 (a)**)。また、アルキル Co(III)錯体は単核状態では還元反応を行うが、錯体同士が接近している際は C-C 結合を形成する<sup>38</sup> (**Figure 1 - 12 (b)**)。Cu(II)錯体は常磁性の錯体であるが、錯体同士が接近しスタックすると磁性がスイッチする<sup>39</sup> (**Figure 1 - 12 (c)**)。



**Figure 1 – 12.** 距離依存的な機能を示す金属錯体. (a) 距離依存的な発光特性を示す Pt(II)錯体<sup>36</sup>と発光メカニズム. 接近した Pt(II)錯体の分子軌道が相互作用することで MMLCT (Metal to Metal to ligand charge transfer) 発光を示す. (b) 二核状態でカップリング反応を行う Coアルキル錯体<sup>38</sup>. 単核状態ではトルエンが生成される. (c) 分子間のスタッキングにより磁性をスイッチする Cu(II)錯体<sup>39</sup>. ロタキサン構造を有し、酸、塩基の添加により Cu(II)錯体間距離が変化する.

この様な距離依存的な機能を有する金属錯体とタンパク質の動的挙動を組み合わせることで、「タンパク質の動的挙動に基づく金属錯体機能のスイッチング」が期待できる。Figure 1 – 13 にその概略図を示す。

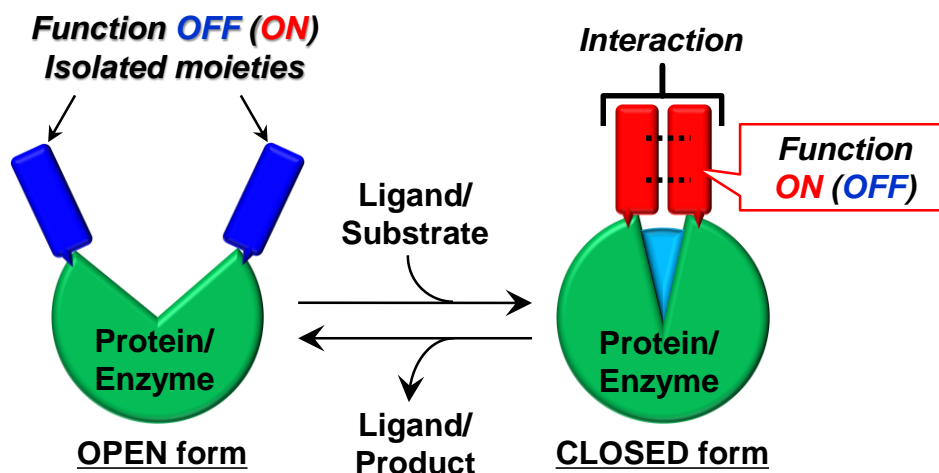


Figure 1 – 13. タンパク質・酵素の構造変化を利用した修飾分子の機能スイッチング.

タンパク質の構造変化により、距離が大きく変化する部位に合成分子を修飾する。基質/リガンド非存在下、OPEN 状態では導入された分子同士は離れており、各修飾分子はモノマーとしての機能を示す。その後、基質/リガンド結合に伴うタンパク質・酵素の構造変化により CLOSED 状態を形成し、修飾分子同士が接近することで、分子機能に変化する。さらに、触媒反応の生成物/リガンドが解離することで、タンパク質・酵素が再び OPEN 状態を形成することで修飾分子間距離が離れモノマーとしての機能が回復する。タンパク質・酵素の動的挙動に着目することで、この様な修飾分子の機能スイッチング機構の構築が期待される。

### 1-5. タンパク質表面上の修飾分子間相互作用

タンパク質の構造や構造変化を研究する上で、スペクトルが分子間距離に鋭敏に反映される蛍光プローブは魅力的な研究ツールである。フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) は蛍光プローブ分子間でエネルギー移動が生じる現象であり、タンパク質のドメイン間の距離を調べる上で有用である<sup>40-42</sup>。FRET 効率は蛍光分子間の距離の6乗とともに減少するため、両分子間距離を FRET 効率から見積もることができる。一方、プローブ分子間距離が接近している場合、プローブ分子同士が接近しており、構造変化の有無にかかわらず FRET による蛍光が観測されるため<sup>43</sup>、感度が障害となる。その場合、ピレン分子がプローブとして用いられる。

ピレン分子は平面構造を有する  $\pi$  共役系分子であり、340 nm 付近の光照射によって 380–400 nm にモノマー蛍光を発するが、高濃度条件等によりピレン分子同士が相互作用すると 480 nm 付近にエキシマー発光を示す<sup>44-45</sup>。ピレン分子間相互作用は  $\pi$ - $\pi$  スタッキング (一般的に面間距離が 4 Å 以内) によるものであるため、ピレンは上記の様に FRET の感度が問題となる様な微小な空間内の構造変化をモニターする際のプローブとして機能する<sup>46</sup>。分子間相互作用によりエキシマー発光を示す性質から、ピレン分子はバイオプローブとして用いられ<sup>47-50</sup>、また、DNA や RNA を基盤としたモлекуラービーコン<sup>51-54</sup> (Figure 1-14) や、ピレン分子のエキシマー発光をインジケーターとしたケモセンサーが開発されている<sup>55-57</sup>。

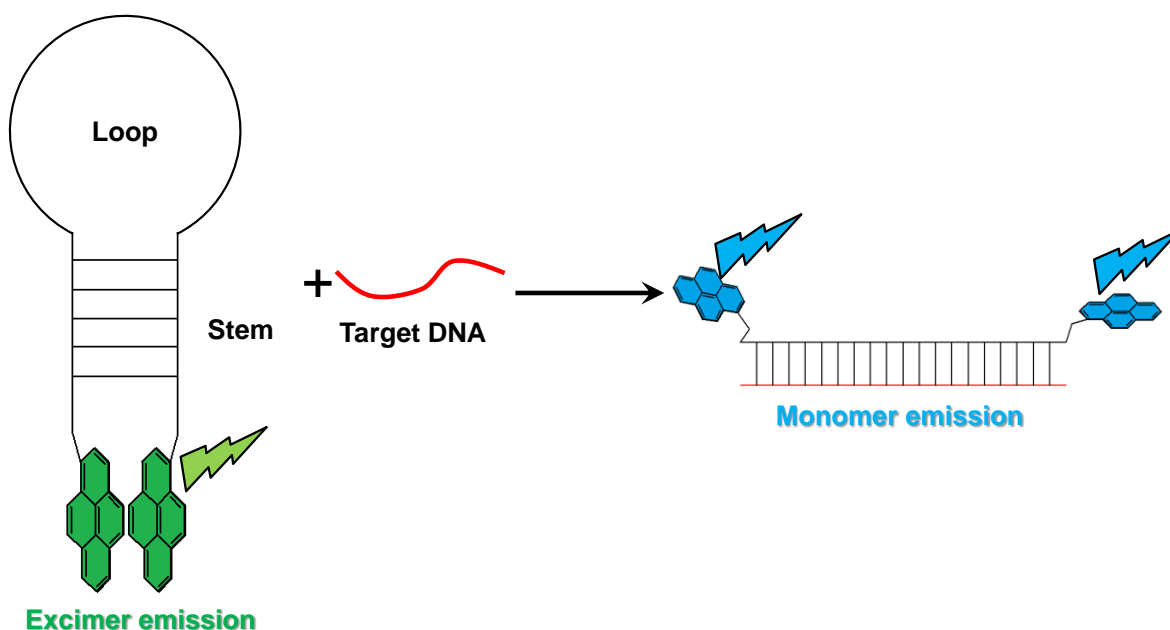
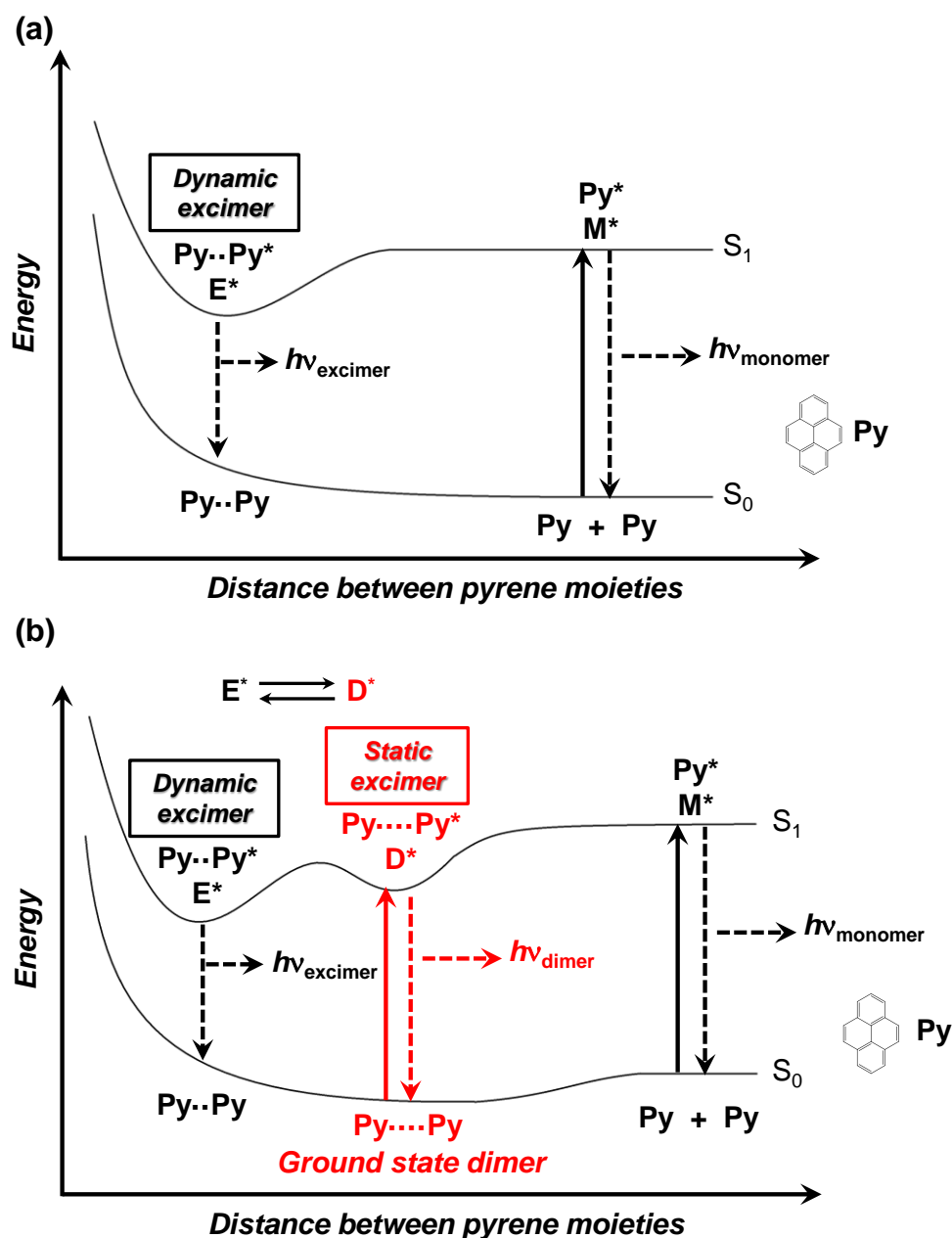


Figure 1-14. ピレンモノマー/エキシマー発光を利用したモлекуラービーコン<sup>51</sup>.

高濃度条件において、励起状態のピレン分子が会合し励起状態が安定化することでエキシマー発光が観測される<sup>45</sup>。この過程は Birks によって定義された dynamic excimer 形成である(**Figure 1 – 15 (a)**)。一方、あらかじめピレン同士が近接している場合、ピレンが基底状態で相互作用しダイマーを形成しているケースがある (**Figure 1 – 15(b)**)。この過程は static excimer 形成として知られている<sup>58-61</sup>。

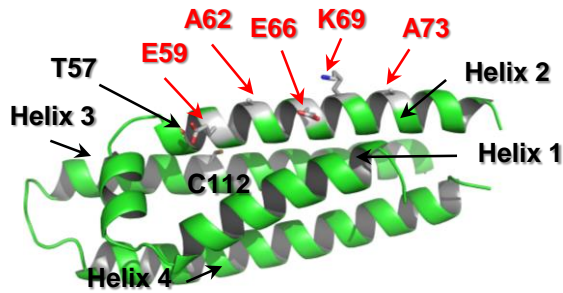


**Figure 1 – 15.** ピレンエキシマー形成におけるエネルギーダイアグラムの模式図。(a) Birks によって示されたクラシックなエキシマー形成<sup>45</sup>。(b) 基底状態で形成されるピレンダイマーを考慮したエキシマー形成<sup>58</sup>。

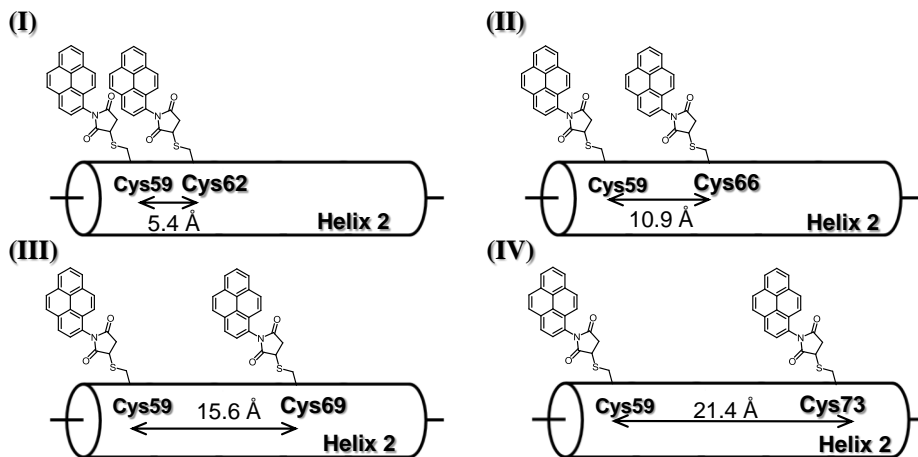
これら2種類のエキシマーは、ピレン分子のスタッキング様式が関係しており、UV-Vis スペクトル、励起スペクトル、CD スペクトルおよび時間分解的蛍光測定を行うことでピレン分子の基底状態、励起状態での会合状態を考察することができる。基底状態でピレンダイマーが形成されている場合、UV-Vis スペクトルや励起スペクトルにおいてスペクトルがブロード化することが知られている<sup>58,60,62</sup>。また、シクロデキストリン内に包摂されたピレンダイマーの配向はCD シグナルを示し、そのスペクトルからピレンの配向を推定することができる<sup>63</sup>。dynamic excimer と static excimer でピレン分子間の距離が異なるため、static excimer としての発光はブルーシフトするが、分子の揺らぎが原因で2つのエキシマーには平衡があるため、定常状態蛍光スペクトルのみから、エキシマー発光がdynamic excimer 形成によるものかstatic excimer 形成によるものを判別することは困難である。従って蛍光減衰測定を行う必要がある。dynamic excimer はピレンモノマーが励起後に形成されるため、エキシマー発光における蛍光減衰を測定すると、パルス光照射後、蛍光の立ち上がりが見られる。しかし static excimer の場合、あらかじめ基底状態でピレン同士が相互作用しているため、そのような蛍光の立ち上がりは見られない。従って蛍光減衰測定は、dynamic excimer と static excimer を見分ける手段の1つである<sup>64</sup>。一方、カリックスアレーンとピレンが結合したケモセンサーにおいて、ゲストとの結合によりピレンの揺らぎが固定化されている特殊な系ではstatic excimer が定常状態蛍光スペクトルで観測されている<sup>60</sup>。このようなピレンスタッキングに関する分光学的特徴は有機小分子や、合成高分子の系で検討されている。

一方、タンパク質ドメインにピレンプローブを応用する場合、主に定常状態における蛍光スペクトルのエキシマーとモノマー発光比率から、そのドメインの接近が評価される<sup>48</sup>。例として、アポリポプロテイン E3 (apoE3) の Helix 2 上に、ピレン分子がそれぞれ任意の距離関係を取る様に修飾された<sup>47</sup>(Figure 1 – 16)。

**(a) Apolipoprotein E3 (apoE3) (PDB: 1NFN)**

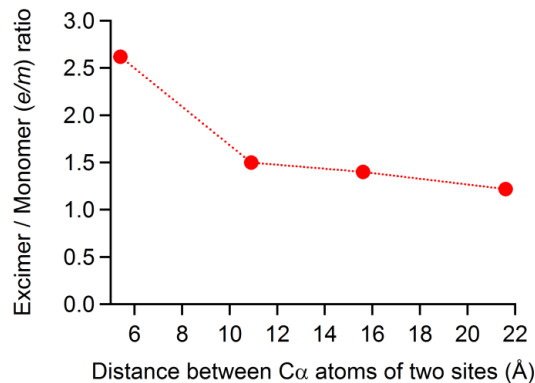


**(b) Placement of pyrene molecules along a helix**



**Figure 1 – 16.** apoE3 の表面上におけるピレン修飾<sup>47</sup>. (a) apoE3 の結晶構造 (PDB: 1NFN<sup>65</sup>). (b) 各ピレン分子間距離の異なるピレン修飾 apoE3 変異体. (I) apoE3 mutant (C112S/ E59C/A62C). (II) apoE3 mutant (C112S/ E59C/E66C). (III) apoE3 mutant (C112S/ E59C/K69C). (IV) apoE3 mutant (C112S/ E59C/A73C).

修飾ピレン間距離が離れることで、エキシマー/モノマー発光強度が低下した (**Figure 1 – 17**)。この相関に基づき、T57C (helix 2)、C112 (helix 3) に修飾されたピレンのエキシマーから溶液中の2つのアミノ酸間距離が評価されている。



**Figure 1 – 17.** ピレンが修飾されているアミノ酸の C $\alpha$  間距離と観測されたエキシマー/モノマー発光強度比率のプロット。

しかし、結晶構造上ではピレン分子同士が接近しない位置関係の E59C、A73C にピレンが修飾された apoE3 (21.4 Å) においてもエキシマー発光が観測されている。ここでは、ピレンが修飾されている部位はフレキシブルなヘリックス構造であり、 $\alpha$ -ヘリックスの折れ曲がりや、揺らぎが原因で、距離的に離れているピレンが相互作用していると説明されている。また、50%グリセロール存在下、溶液の粘度が上昇することでピレンの運動性が低下し、エキシマー発光が減少する挙動が観測されている。従って、ピレンプローブの運動の自由度や、ピレンのオリエンテーションもエキシマー発光に影響を与えることを示唆している。

この様にピレンプローブを用いてドメインの挙動を調べる際、例えば、(i) 蛍光減衰測定を行うことで、パルス光照射後、エキシマー発光の上昇が見られる場合、そのエキシマー形成は **dynamic excimer** による機構であるため、ピレン修飾の足場であるヘリックス構造は全体的にフレキシブルであることが予想され、逆に発光の立ち上がりが観測されない場合、そのエキシマー形成は **static excimer** による機構であると考えられるため、ヘリックス構造が折れ曲がり、基底状態であらかじめ修飾ピレンが近接していることが予想される。また、蛍光寿命から発光成分を求めることで、励起状態において修飾ピレン同士が十分にスタックしているか否かの情報が得られる。例えば **dynamic excimer** が観測され、修飾ピレンが十分にスタックしていない場合、ヘリックス構造の揺らぎが大きいことが考えられ、一方 **static excimer** が観測されているにもかかわらず十分なピレンスタッキングが観測されない場合、修飾ピレン同士は十分にスタッキングするには不利な位置関係を有するという空間情報が得られる。また、(ii) UV-Vis、励起スペクトルにおけるスペクトルのブロード化より、基底状態における修飾ピレンの相互作用に関する情報が得られる。さらに (iii) CD スペクトルより励起子相互作用が観測される場合、修飾ピレン同士の基底状態における顕著な相互作用を示す。従って、定常状態蛍光スペクトルに加え、様々な定常状態、時間分解測定をフルセットで行うことによって、ピレンを修飾しているドメインのより詳細な空間情報が得られることが期待される。

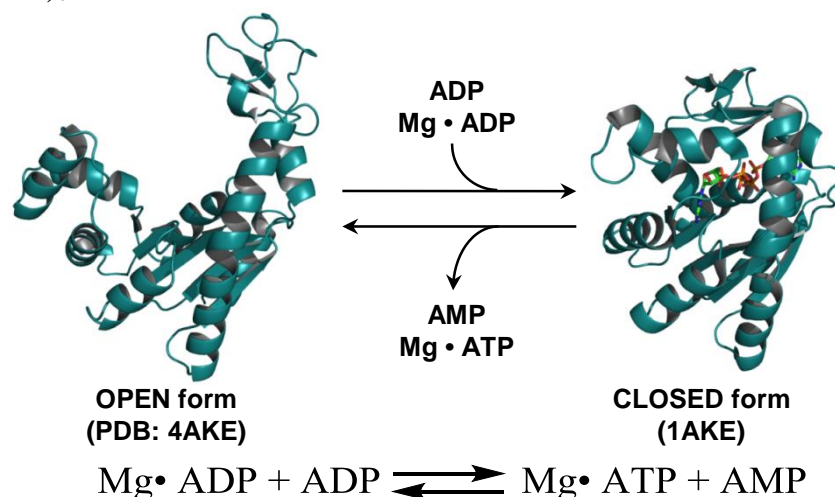
また、ピレンのエキシマー発光は足場となるタンパク質のフレキシビリティに加え、ピレンプローブ分子自体の運動性の自由度が影響していることが示唆されている。従って、ピレン分子を用いてタンパク質ドメインの空間配置を調べる際、定常状態蛍光スペクトルのみでの評価は時に誤った解釈を得る可能性があるため、ピレンの発光挙動における分子の構造や、それに起因するフレキシビリティの影響を考慮することはタンパク質プローブとしてピレン分子を用いる場合に重要であると考えられる。さらに、定常状態、時間分解測定との組み合わせにより得られたピレンの発光挙動とフレキシビリティの知見に基づきプローブ分子構造の最適化を行うことで、ドメインのより詳細な空間情報が得られることが期待される。



## 1-6. 本研究の目的

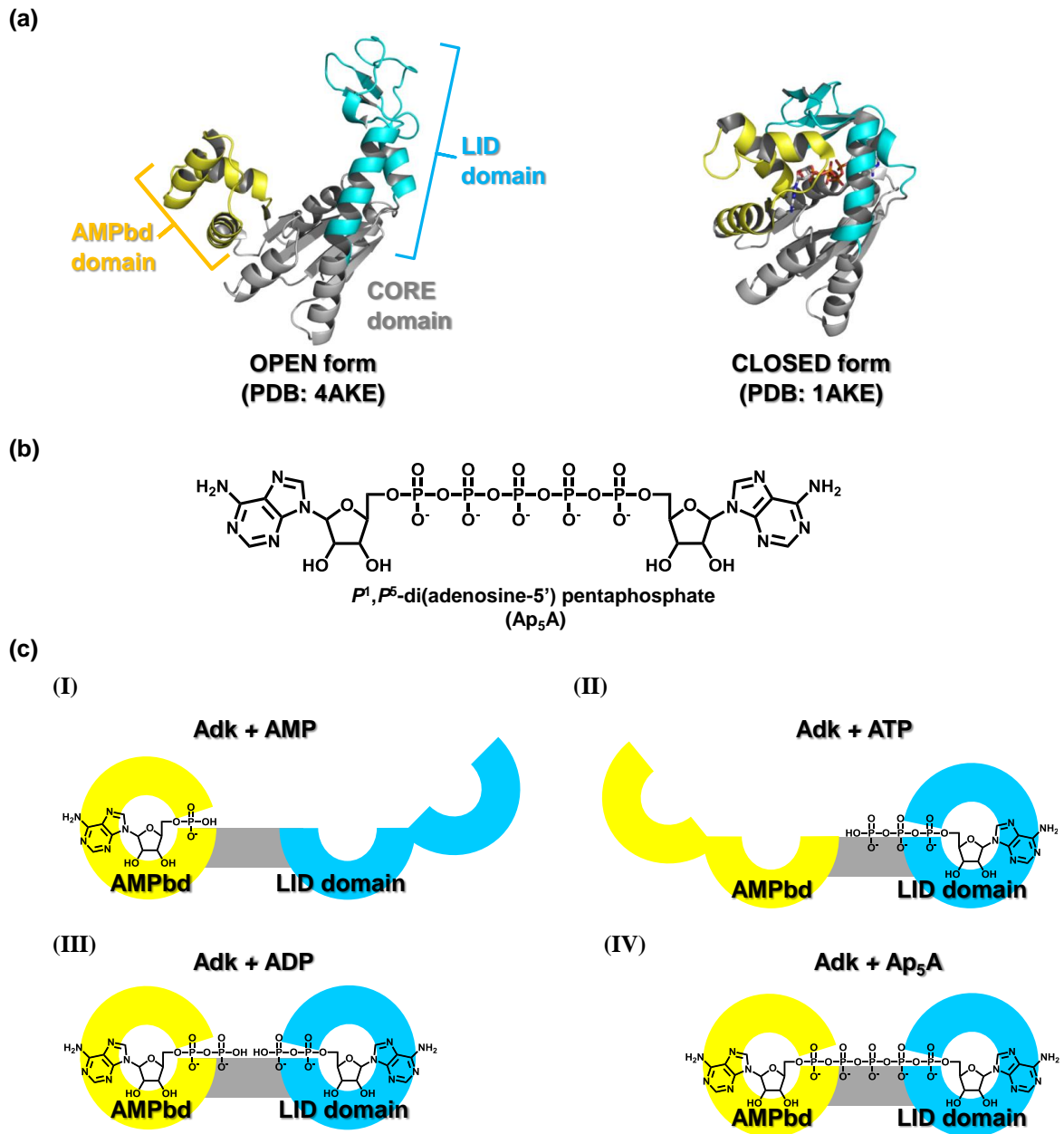
### 1-6-1. アデニル酸キナーゼの触媒サイクルに伴う構造変化を基盤とした発光特性のスイッチング機構の構築

1-4における「動的挙動に着目した非天然タンパク質・非天然酵素構築のアプローチ」の手法として、距離依存的な機能を有する合成分子を、構造変化を示すタンパク質に導入することで、タンパク質の構造変化に基づく修飾分子の機能スイッチング機構の構築が期待される。しかし、構造変化を示すタンパク質の応用は主に機能性ハイドロゲル<sup>34-35</sup>に挙げられるように、Åスケールのタンパク質構造変化をハイドロゲル体積変化の巨視的な現象に変換されている。従って、タンパク質スケールとしては大きな数十Åの構造変化を用いて修飾分子2分子の相互作用をスイッチした研究例は報告されていないため、第2章では、**Figure 1-13**に示すタンパク質の動的挙動による修飾分子機能のスイッチング機構の構築が可能であることを示すことを目的とした。基盤となるタンパク質として大腸菌由来アデニル酸キナーゼ ( $Adk_e$ )<sup>22-23</sup>を採用した(**Figure 1-18**)。



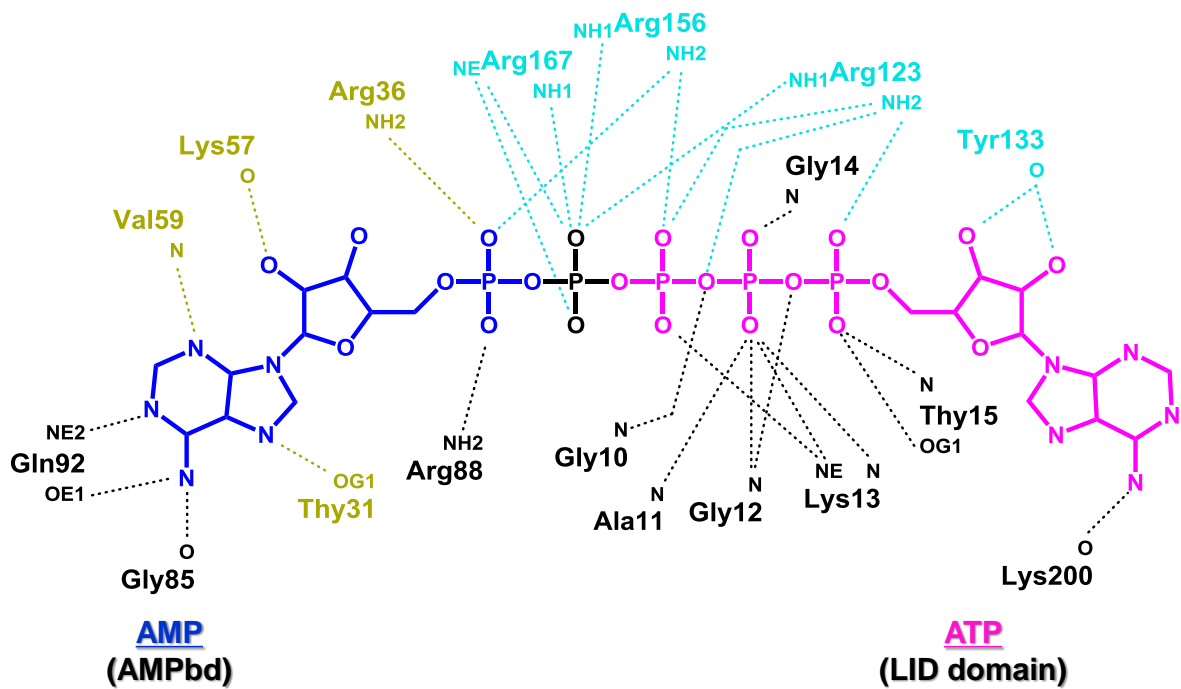
**Figure 1-18.** リン酸転移反応に伴い、大きな構造変化を示す  $Adk_e$ .

アデニル酸キナーゼは  $Mg^{2+}$  存在下リン酸転移反応を触媒する酵素である<sup>26</sup>。このリン酸転移反応において、アデニル酸キナーゼは2分子の基質を結合する。アデニル酸キナーゼは AMPbd (28-72 残基)、LID domain (113-176 残基)、CORE ドメインを有し (**Figure 1-19 (a)**)、AMP が AMPbd へ、ATP が LID domain へ結合する<sup>23, 66-68</sup> (**Figure 1-19 (c-I), (c-II)**)。一方、ADP は両ドメインへ結合する (**Figure 1-19 (c-III)**)。また、基質2分子がリン酸エステルで架橋された構造の阻害剤  $P^1, P^5$ -di(adenosine-5') pentaphosphate ( $Ap_5A$ ) (**Figure 1-19 (b)**) は1分子でアデニル酸キナーゼと結合する (**Figure 1-19 (c-IV)**)。



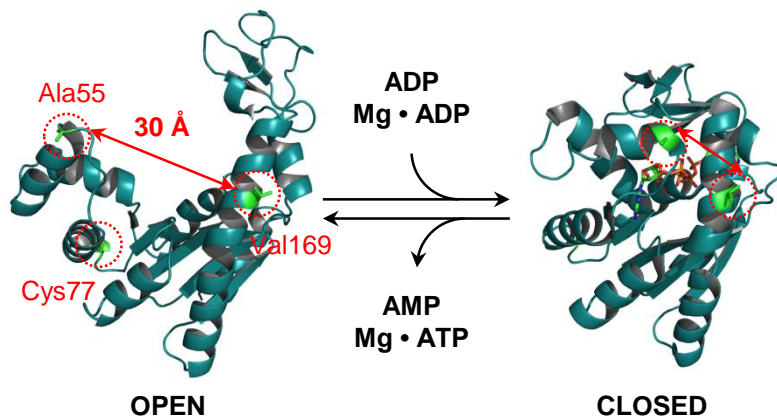
**Figure 1 – 19.** アデニル酸キナーゼの基質結合ドメインと基質結合様式. (a) アデニル酸キナーゼ構造中の AMPbd (28–72 残基、黄色) と LID domain (113–176 残基、シアン). (b)  $P^1, P^5$ -di(adenosine-5') pentaphosphate ( $Ap_5A$ ) の構造. (c) アデニル酸キナーゼの基質結合様式.

基質とアデニル酸キナーゼの結合は水素結合によるものであり、CORE ドメインに加え AMPbd、LID domain に属するアミノ酸が基質結合に関与しているため、アデニル酸キナーゼは基質を取り込むことで構造変化を伴い CLOSED 状態を形成する (Figure 1 – 20)。



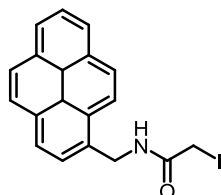
**Figure 1-20.** CLOSURE Adk<sub>e</sub>の結晶構造 (PDB: 1AKE) に見られる Ap<sub>5</sub>A とアミノ酸の相互作用. 黒字で表されているアミノ酸: CORE ドメインに属するアミノ酸残基. 山吹色で表されているアミノ酸: AMPbdに属するアミノ酸残基. シアンで表されているアミノ酸: LID domainに属するアミノ酸残基. 青色: AP<sub>5</sub>A 構造における AMP に対応する部分. ピンク色: AP<sub>5</sub>A 構造における ATP に対応する部分.

この様にリン酸転移反応において構造変化を示すアデニル酸キナーゼの構造中、AMPbdに属する Ala55 と LID domain に属する Val169 間の距離が OPEN 状態 (30 Å) と CLOSED 状態 (12 Å) で大きく変化することから、これらのアミノ酸部位に修飾分子を導入するため、遺伝子工学的に Cys に変換した。また、Adk<sub>e</sub> は本来 Cys77 を有している。合成分子の導入により Cys77 が修飾されるのを防ぐため、Ser に変換した変異体 Adk<sub>m</sub> (A55C/C77S/V169C) をデザインした (Figure 1-21)。



**Figure 1-21.** アデニル酸キナーゼ 3 変異体 Adk<sub>m</sub> (A55C/C77S/V169C) の作製.

Adk<sub>tm</sub> に導入する分子としてピレン分子 C1-pyrene-IAA を選択した (Figure 1 – 22)。ピレンは 1 – 5 に示す様に距離依存的な発光特性を有している。この性質を利用することで、タンパク質の構造変化によって修飾ピレン分子の発光特性がスイッチされることが期待され、これより Figure 1 – 13 に示すスイッチング機構の構築が可能であるかを評価することができる。また、末端に Cys チオールと効率的に反応するヨードアセトアミドを有する分子設計とした<sup>69-70</sup>。



C1-pyrene-IAA

Figure 1 – 22. 末端にヨードアセトアミドを有するピレン分子 C1-pyrene-IAA.

この C1-pyrene-IAA を Adk<sub>tm</sub> に 2 分子導入することでピレン分子修飾型 Adk<sub>tm</sub> (C1-Adk<sub>tm</sub>) を構築し、アデニル酸キナーゼの酵素反応に連動し、修飾ピレンのモノマー/エキシマー発光のスイッチング機構の構築を目指した (Figure 1 – 23)。

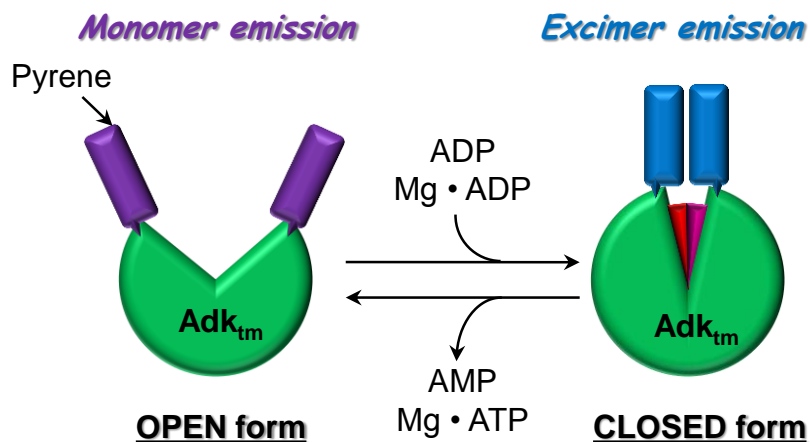


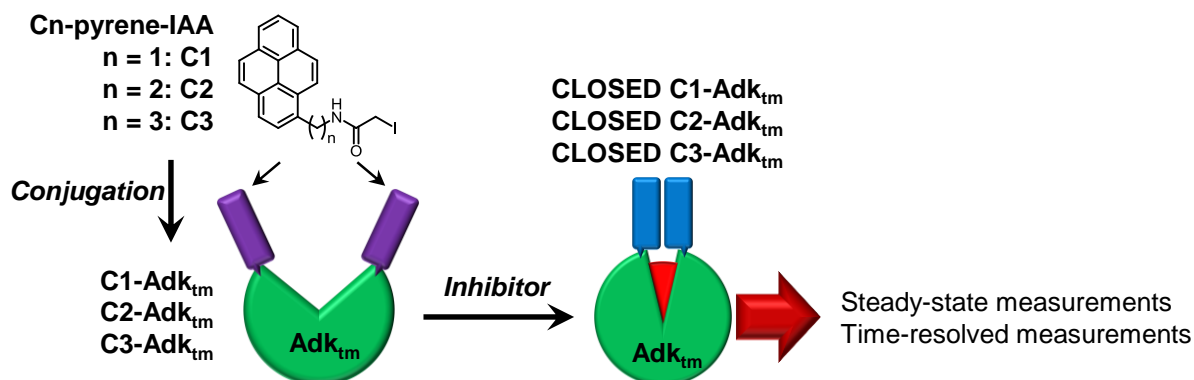
Figure 1 – 23. Adk<sub>tm</sub> の構造変化に基づくピレン分子のモノマー/エキシマー発光のスイッチング機構の構築.

## 1-6-2. CLOSED 状態のアデニル酸キナーゼ表面におけるピレンのエキシマー発光挙動及びピレンスタッキングモードの評価

Figure 1-13 に示す様なスイッチング機構を構築する際、タンパク質の構造変化後、修飾分子同士が適切に相互作用する必要がある、修飾分子の空間情報（距離、配向等）を得ることが機能性分子デザインの指針となる。1-5 に示すように、ピレンは分子間距離に依存的なエキシマー発光を示す特徴から、モレキュラービーコン<sup>51-54</sup>やケモセンサー<sup>55-57</sup>、タンパク質プローブ<sup>47-50</sup>として応用されている。また、ピレンは基底状態の相互作用の有無によりエキシマー形成過程が異なり、基底状態や励起状態でのピレンスタッキングの情報は様々な定常状態分光測定および時間分解分光測定より得られる<sup>58,60,62-63</sup>。この様な現象はピレン修飾型ポリマーやピレン包摂型シクロデキストリン、ピレン修飾 RNA の分野において研究されている。

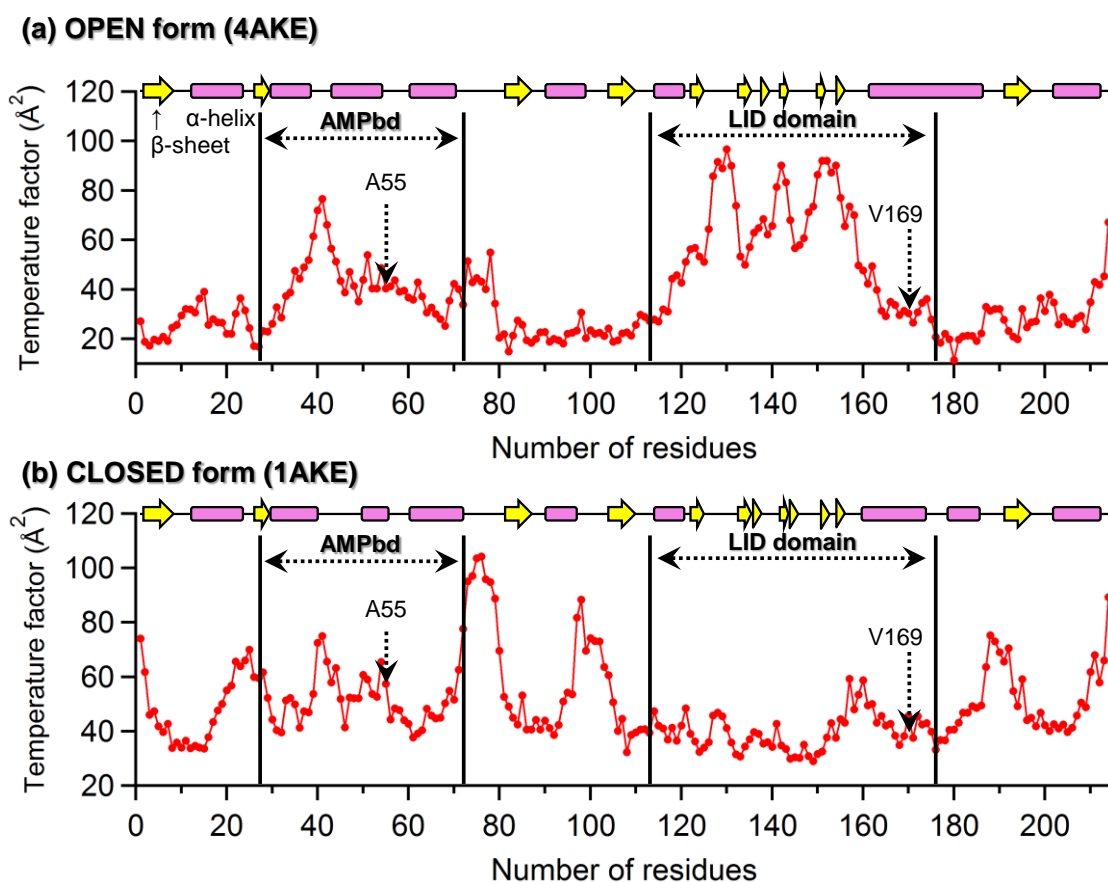
一方で、タンパク質プローブとしてピレン分子を用いる場合、主に定常状態蛍光スペクトルにおけるエキシマー/モノマー発光強度比率で評価されている<sup>47-48</sup>。また、ピレン分子が導入されている足場の揺らぎに加えピレンのフレキシビリティ、オリエンテーションがエキシマー発光強度に影響を与えていることが示唆されている<sup>47</sup>。従って、定常状態蛍光スペクトルに加え、様々な定常状態分光測定および時間分解分光測定を行うことにより、タンパク質に導入されたピレンの基底状態、励起状態におけるより詳細な空間情報を得ることが期待される。さらに、エキシマー発光におけるピレンプローブの構造およびフレキシビリティの影響を調べることは、タンパク質プローブとしてピレンを用いる際に誤ったスペクトル解釈を回避することに繋がる点で重要な課題であり、得られた知見を基に最適なプローブ構造の設計に貢献することが期待される。

第3章では、エキシマー発光とピレン分子構造に起因するピレンスタッキングモードを調べ、タンパク質プローブとしてピレンを用いる際には、定常状態、時間分解分光測定をフルセットで行い、ピレンプローブのスタッキングモードを考慮することの重要性を示すことを目的とし、CLOSED 状態の Adk<sub>tm</sub> 表面上に異なるメチレンリンカー鎖長を有するピレン分子を導入し (Figure 1-24)、それらの発光特性とタンパク質表面上におけるピレン分子のスタッキングモードを検討した。



**Figure 1-24.** 鎖長の異なるピレン分子による Adk<sub>tm</sub> 表面修飾と CLOSED Adk<sub>tm</sub> の定常状態、時間分解分光測定.

第2章で C1-pyrene-IAA を導入するアミノ酸部位 (A55C, V169C) は  $\alpha$ -ヘリックス上に位置し、CLOSED 状態の Adk<sub>e</sub> の結晶構造におけるアミノ酸主鎖部分の温度因子 (Figure 1-25 (b)) より、ピレン修飾部位は比較的にリジッドな足場であると考えられる。従って、C1 - C3 プロブ分子の構造に起因するピレンスタッキングモードの違いがスペクトルに反映されることが期待されるため、基盤となるタンパク質として Adk<sub>tm</sub> を選択した。



**Figure 1-25.** Adk<sub>e</sub> の各アミノ酸における主鎖構造の温度因子. (a) OPENform (PDB: 4AKE) の温度因子. (b) CLOSED form (PDB: 1AKE) の温度因子.

## 2章: アデニル酸キナーゼの触媒サイクルに伴う構造変化を基盤とした発光特性のスイッチング機構の構築

### 2-1. 研究目的

距離依存的な機能を有する合成分子を、構造変化を示すタンパク質表面に修飾することで、生体反応を駆動力として合成分子の機能を制御することが期待できる。本章における研究目的は、タンパク質の基質特異的な動的挙動に伴い修飾分子の機能スイッチング機構の構築が可能であることを示すことである。基盤となるタンパク質としてリン酸転移反応を触媒する大腸菌由来アデニル酸キナーゼ ( $Adk_e$ )<sup>22-23</sup> を採用した。構造変化に伴い距離が大きく変化する Ala55 と Val169 を Cys に変異させ、Cys77 をアミノ酸側鎖の長さが同じでチオールの代わりに水酸基を有する Ser に変換した変異体  $Adk_{tm}$  (A55C/C77S/V169C) を設計した。分子同士が接近することでエキシマー発光を示す C1-pyrene-IAA を修飾することで(Figure 2-1)、リン酸転移反応に伴うピレンのモノマー/エキシマー発光のスイッチング機構の構築を検討した。

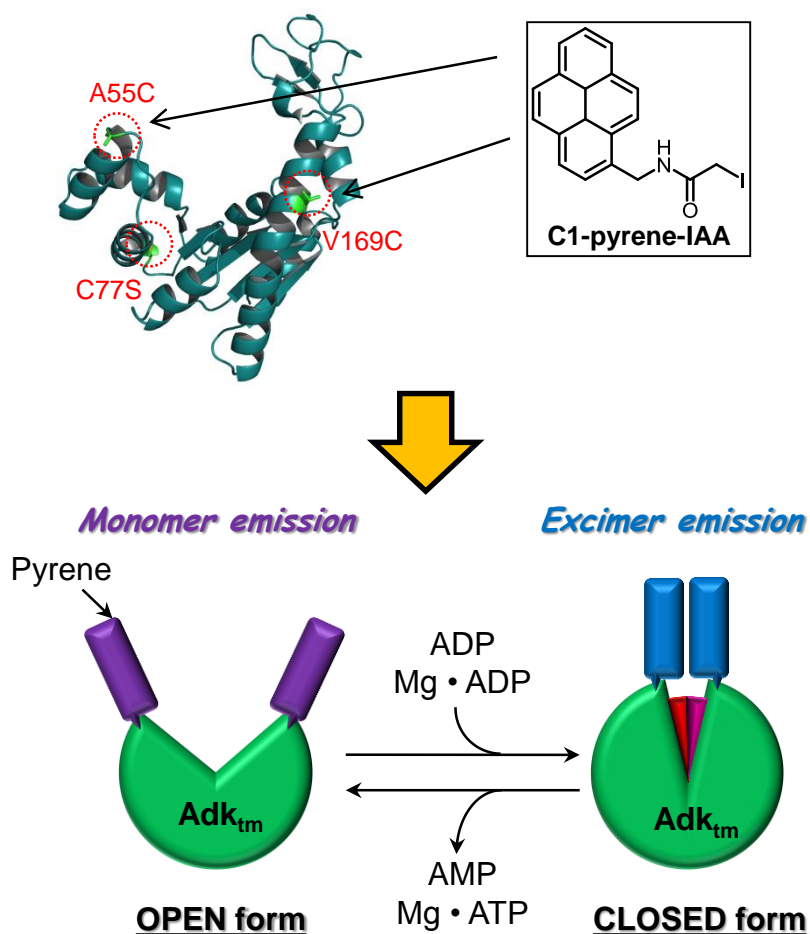


Figure 2-1. C1-Adk<sub>tm</sub>の構築およびリン酸転移反応における修飾ピレンのモノマー/エキシマー発光スイッチング機構の模式図.



## 2-2. ピレン修飾アデニル酸キナーゼ (C1-Adk<sub>tm</sub>) のキャラクタリゼーション

### 2-2-1. C1-Adk<sub>tm</sub> の MALDI-TOF-MS スペクトル

Mono Q カラム (陰イオン交換カラム、GE Healthcare) による精製後 (2-6, 実験項に記載)、MALDI-TOF-MS による質量分析測定を行ったところ、C1-pyrene-IAA が 2 分子導入された分子量 ( $m/z = 24149$ ,  $[M + H]^+$ ) が観測された (Figure 2-2-I)。このことから、Adk<sub>tm</sub> 表面にピレンが 2 分子修飾された C1-Adk<sub>tm</sub> が構築されたことを確認した。

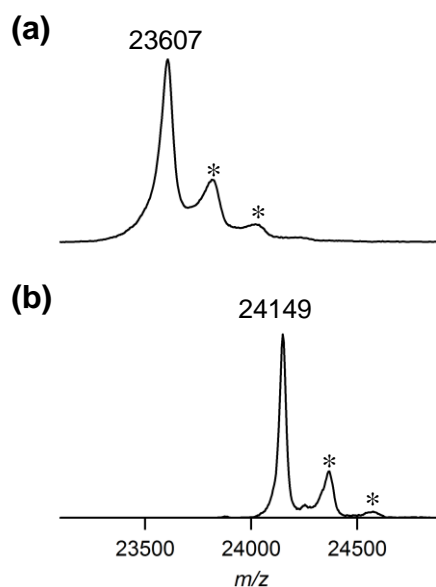
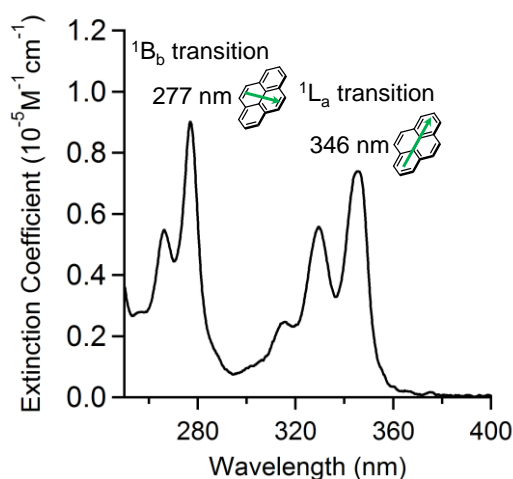


Figure 2-2-I. C1-Adk<sub>tm</sub> の MALDI-TOF-MS スペクトル. (a) Adk<sub>tm</sub>. (b) C1-Adk<sub>tm</sub>. \*ピーク：マトリックス (シナピン酸) 付加物.

### 2-2-2. C1-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis, CD スペクトル

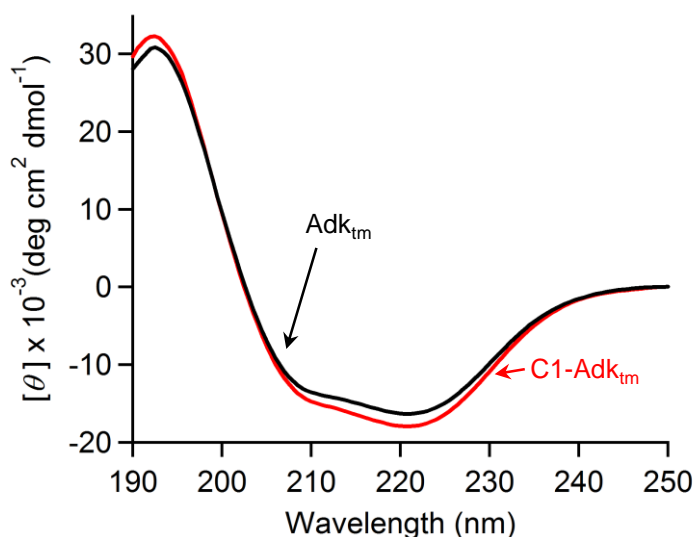
ピレンの吸収帯は既に帰属されており<sup>71-73</sup>、340 nm 付近にピレンの長軸方向<sup>1</sup>L<sub>a</sub>遷移の 0-0 バンドに由来するピークが、280 nm 付近に短軸方向<sup>1</sup>B<sub>b</sub>遷移の 0-0 バンドに由来するピークが観測される。C1-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis スペクトルでは、ピレンに典型的な吸収スペクトルが観測された (Figure 2-2-II)。このことから MALDI-TOF-MS スペクトルの結果と合わせ、Adk<sub>tm</sub> にピレンが導入されていることが示された。





**Figure 2-2-II.** C1-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis スペクトル. 条件: [C1-Adk<sub>tm</sub>] = 5 μM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C.

C1-Adk<sub>tm</sub> は未修飾 Adk<sub>tm</sub> と類似の CD スペクトルを示した (**Figure 2-2-III**)。この結果より、C1-Adk<sub>tm</sub> の立体構造は保持されていることが示された。

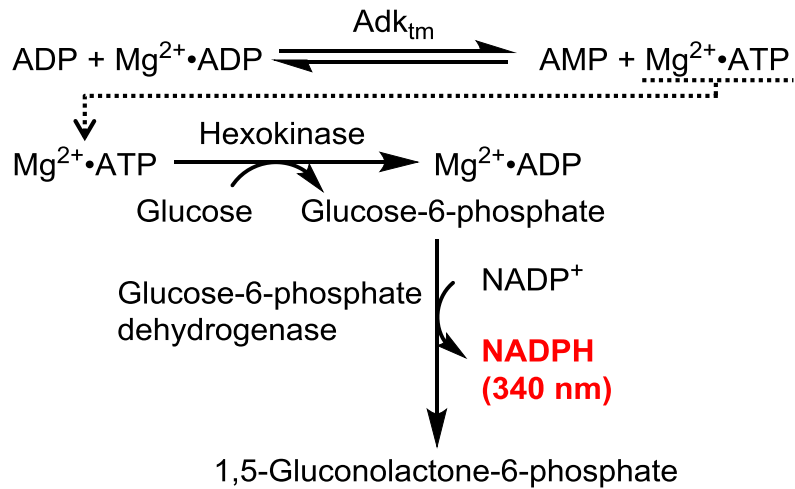


**Figure 2-2-III.** C1-Adk<sub>tm</sub> の CD スペクトル. (→) Adk<sub>tm</sub>, (←) C1-Adk<sub>tm</sub>. 条件: [protein] = 7 μM in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) at 25 °C.

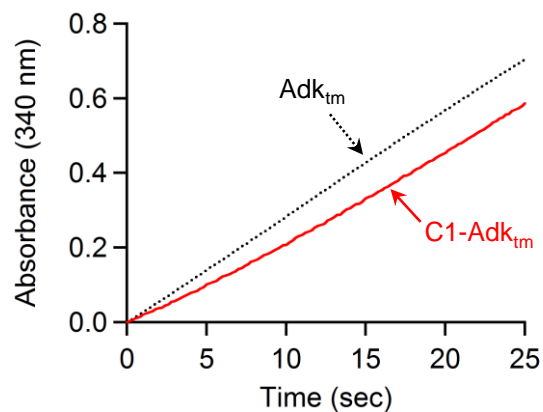
### 2-2-3. C1-Adk<sub>tm</sub> の Adk 活性の確認

構築した C1-Adk<sub>tm</sub> の Adk 活性を確認するため、ヘキソキナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの共役反応を行った<sup>74</sup>。この共役反応による進行により生成する NADPH を 340 nm の吸収で確認することで Adk 活性を確認することができる (**Scheme 2-2-I**)。C1-Adk<sub>tm</sub> の酵素活性は未修飾 Adk<sub>tm</sub> と比較し 20% 程度抑制されていた (**Figure 2-2-IV**)。Adk のリン酸転移反応において、反応後、各基質ドメインが開く過程が律速段階である<sup>75</sup> ( $k_{\text{opening domain}} = 44 \pm 20 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}} = 30 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ )<sup>76</sup>。従って Adk<sub>tm</sub> 表面に修飾されているピレン同士の  $\pi$ - $\pi$  相互作用が基質放出過程に影響を与えている

と考えられる。Adk 活性は低下しているが、C1-Adk<sub>tm</sub> は Adk としての活性を保持していることが確認された。



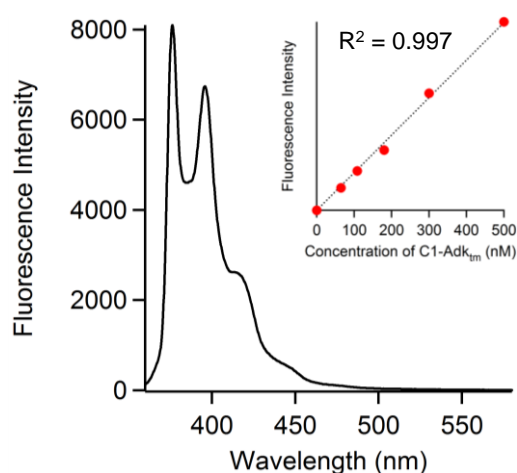
**Scheme 2-2-I.** ヘキソキナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの共役反応。



**Figure 2-2-IV.** C1-Adk<sub>tm</sub> の酵素活性測定. (···) Adk<sub>tm</sub>, (—) C1-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [proteins] = 44 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C, [ADP] = 2 mM, [NADP<sup>+</sup>] = 2.3 mM, [glucose] = 5 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase = 25 unit / 4 mL.

#### 2-2-4. C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル

C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル測定では 376 nm に極大蛍光波長を示すスペクトルが観測された (Figure 2-2-V)。これはピレンモノマーの蛍光を示しており<sup>44-45</sup>、ピレンエキシマー発光波長領域の蛍光強度と比較しモノマー発光強度が十分に高いことが示された ( $I_{376\text{ nm}} / I_{485\text{ nm}} \approx 120$ )。また、蛍光スペクトルは希釈溶液条件 ([C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM) で測定されおり、480 nm 付近の長波長領域に顕著な蛍光が観測されない。また、376 nm の蛍光強度は濃度に比例することから、この濃度領域ではタンパク質分子間相互作用は生じていないと考えられる。



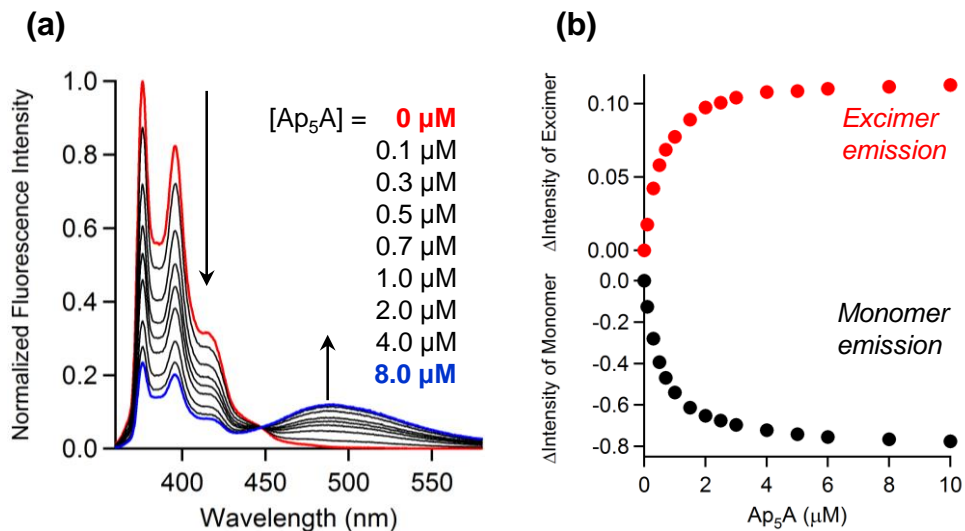
**Figure 2-2-V.** C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル. 条件: [C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C.  $\lambda_{\text{ex}} = 346\text{ nm}$ .

これらの結果より、調製された C1-Adk<sub>tm</sub> はアデニル酸キナーゼとしての酵素活性を保持し、基質非存在下における OPEN 構造では、修飾されたピレン二分子は十分に離れていることが示された。

## 2-3. 阻害剤および基質添加による C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化

### 2-3-1. 阻害剤添加による蛍光スペクトル変化

阻害剤  $P^1, P^5$ -di(adenosine-5') pentaphosphate (Ap<sub>5</sub>A) 存在下における C1-Adk<sub>tm</sub> のモノマー/エキシマー発光スイッチングを検討した。希釈溶液条件下 ([C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM)、Ap<sub>5</sub>A 存在下においてモノマー発光 (376 nm) の減少、エキシマー発光の上昇 (485 nm) が観測された (Figure 2-3-I)。

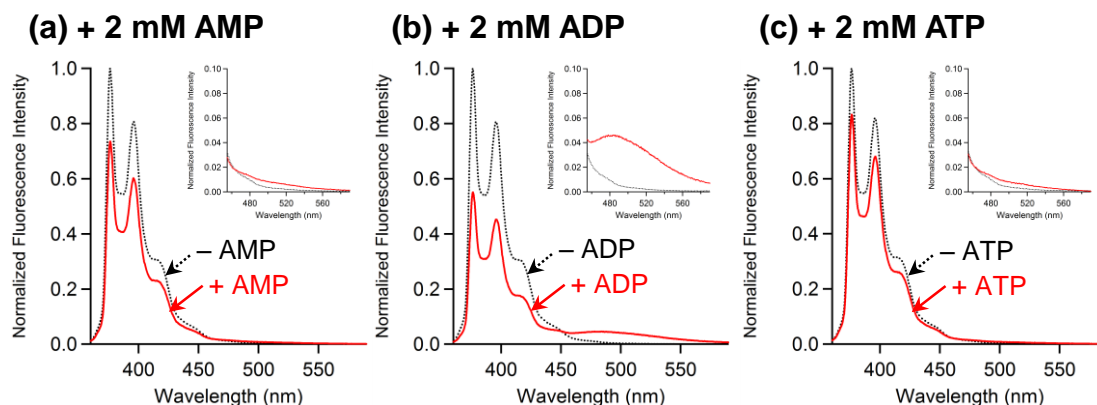


**Figure 2-3-I.** (a) Ap<sub>5</sub>A 添加による C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化. (b) Ap<sub>5</sub>A 濃度に対する C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光強度変化. ●: エキシマー発光強度, ●: モノマー発光強度. 条件: [C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C, [Ap<sub>5</sub>A] = 0 to 10 μM. λ<sub>ex</sub> = 346 nm.

希釈条件、基質非存在下においてエキシマー発光は観測されない (Figure 2-2-V) ことから、基質結合に伴う Adk<sub>tm</sub> の構造変化によりピレン環がスタックし、タンパク質分子内エキシマー発光が観測されたと考えられる。

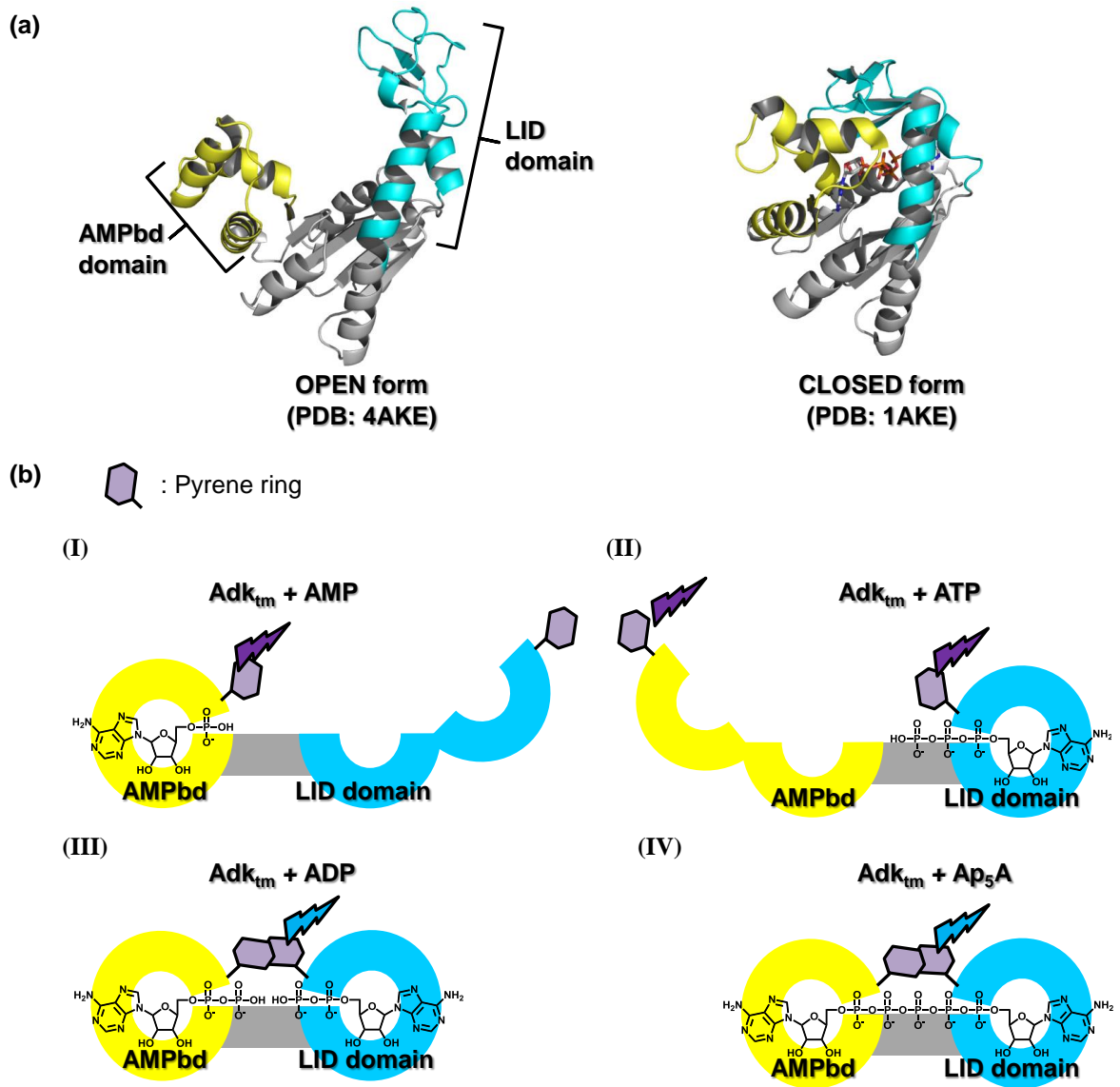
## 2-3-2. 基質添加による蛍光スペクトル変化

基質 (AMP, ADP, ATP) 存在下における C1-Adk<sub>tm</sub> のモノマー/エキシマー発光スイッチングを検討した。希釈溶液条件下 ( $[C1-Adk_{tm}] = 180 \text{ nM}$ )、基質を添加することによって、モノマー発光 (376 nm) の減少、エキシマー発光の上昇 (485 nm) が観測された (Figure 2-3-II)。



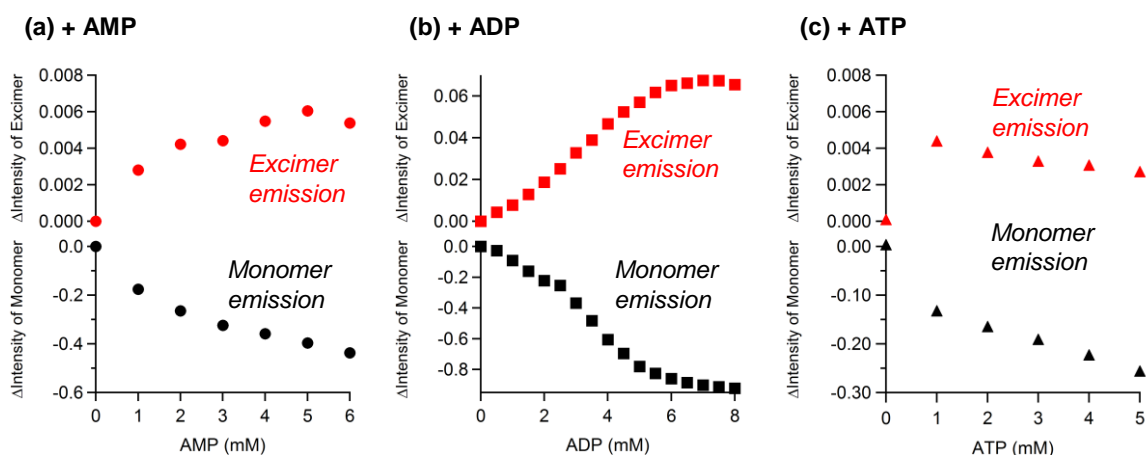
**Figure 2-3-II.** 基質添加による C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化. (···) 基質非存在下, (—) 基質存在下. (a) + AMP, (b) + ADP, (c) + ATP. 条件:  $[C1-Adk_{tm}] = 180 \text{ nM}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C.  $[substrate] = 0$  or 2 mM.  $\lambda_{ex} = 346 \text{ nm}$ .

ADP 存在下における蛍光スペクトルは AMP、ATP 存在下条件と比較し高いエキシマー発光を示した (Figure 2-3-II (b))。アデニル酸キナーゼは構造中に AMP 結合ドメイン (AMPbd, 28-72 残基)、ATP 結合ドメイン (LID domain, 113-176 残基) と CORE ドメインを有し、AMP が AMPbd に、ATP が LID domain にそれぞれ結合する<sup>23, 66-68</sup>(Figure 2-3-III (a))。本研究におけるピレンのモノマー/エキシマー発光スイッチングシステムは、アデニル酸キナーゼが Ap<sub>5</sub>A と結合した CLOSED 構造 (PDB code: 1AKE) に基づきデザインされている(Figure 2-3-III (b-IV))。AMP、ATP 存在下、アデニル酸キナーゼは片方の基質結合ドメインが CLOSED 状態になる一方で、ADP 存在下では両方の基質結合ドメインが CLOSED 状態になることから (Figure 2-3-III (b-I, II, III)、両ドメインに結合する ADP 存在下において最も高いエキシマー発光を示したと考えられる。



**Figure 2-3-III.** アデニル酸キナーゼの基質結合ドメインと基質結合様式. (a) アデニル酸キナーゼ構造中のAMPbd (黄色) とLID domain (シアン). (b) アデニル酸キナーゼの基質結合様式及び推定されるピレンの発光特性の関連.

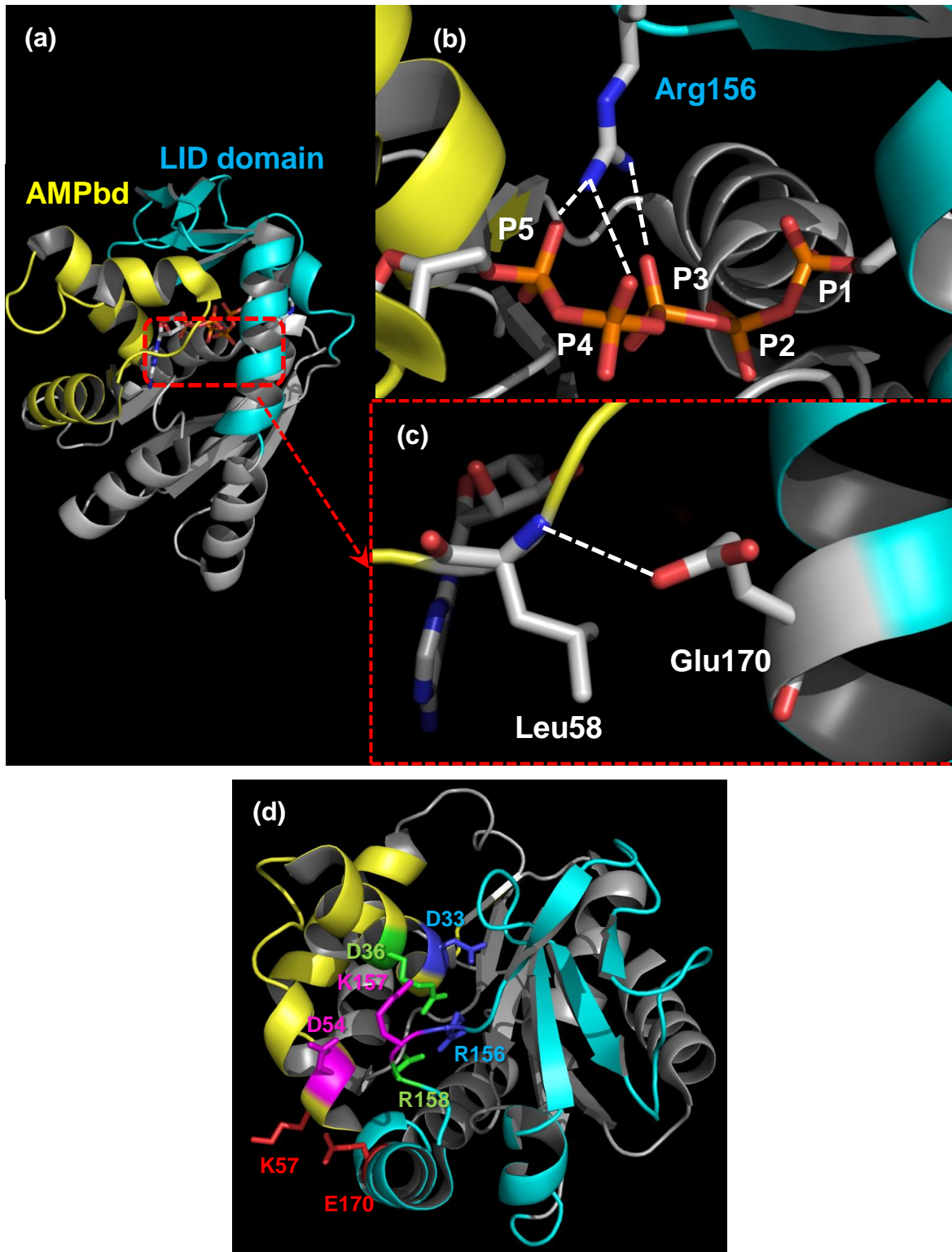
基質添加に伴う C1-Adk<sub>tm</sub> のモノマー、エキシマー発光の強度変化を基質濃度に対しプロットすると、ADP 存在下条件において顕著な蛍光強度変化が観測された (Figure 2-3-IV)。



**Figure 2-3-IV.** 基質濃度に対する C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光強度変化. (a) + AMP. ●: エキシマー発光強度, ●: モノマー発光強度. (b) + ADP. ■: エキシマー発光強度, ■: モノマー発光強度. (c) + ATP. ▲: エキシマー発光強度, ▲: モノマー発光強度. 条件: [C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [AMP] = 0 to 6 mM. [ADP] = 0 to 8 mM. [ATP] = 0 to 5 mM.  $\lambda_{ex}$  = 346 nm.

ADP の蛍光プロファイルはシグモイド型の曲線を示した。阻害剤 AP<sub>5</sub>A とのコンプレックスを形成した CLOSED 状態のアデニル酸キナーゼの結晶構造 (PDB code: 1AKE) より、LID domain に属する Arg156 は ATP の  $\gamma$ -phosphate (P3) と AMP の  $\alpha$ -phosphate (P5) もしくは AMPbd に結合している ADP の  $\alpha$ -phosphate (P5)、 $\beta$ -phosphate (P4) と水素結合し (Figure 2-3-V (b))、AMPbd に属する Leu58 の主鎖アミドと LID domain に属する Glu170 の側鎖カルボニルと水素結合している<sup>23</sup> (Figure 2-3-V (c))。すなわち、基質と結合した LID domain は AMPbd に結合する基質とも相互作用する。NMR を用いたアデニル酸キナーゼの構造変化を調べた研究においても、基質の LID domain への結合は、もう一方の基質 - AMPbd の結合に影響を与えることが報告されている<sup>66</sup>。また、AMPbd、LID domain のヒンジモーションはフレキシブルであり<sup>67</sup>、基質非存在下においても溶液中、ある瞬間には CLOSED 状態に近い構造をとることが MD による研究によって報告されている<sup>77</sup>。その CLOSED 状態の安定化には AMPbd、LID domain に属する電荷を帯びたアミノ酸の塩橋形成 (R156 - D33, K157 - D54, D158 - R36, E170 - K57) が寄与している (Figure 2-3-V (d))。この様な相互作用より、AMPbd、LID domain に結合する ADP 存在下における C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化はアロステリック様の挙動を示している。



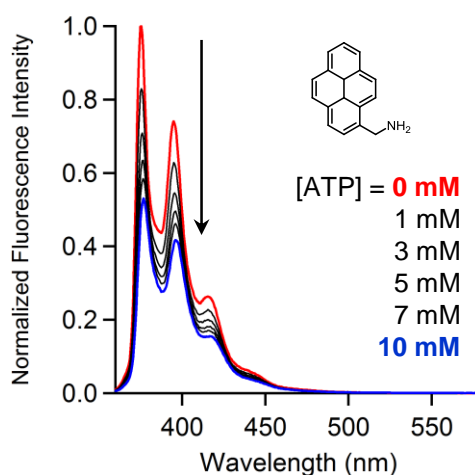


**Figure 2-3-V.**  $Ap_5A$  結合状態の CLOSED 状態アデニル酸キナーゼの結晶構造 (PDB: 1AKE) から推測される  $Adk_{tm}$  構造中のアミノ酸 - 基質相互作用, ドメイン間の相互作用の一例. (a) アデニル酸キナーゼ構造中の AMPbd (黄色) と LID domain (シアン). (b) LID domain に属する Arg156 とリン酸エステルの水素結合. (c) LID domain に属する Glu170 のカルボニル側鎖と AMPbd に属する Leu58 の主鎖アミドとの水素結合. (d) CLOSED 状態の安定化に寄与しているアミノ酸の塩橋形成 (R156 - D33, K157 - D54, D158 - R36, E170 - K57)<sup>77</sup>.



しかし、一方のドメインに結合する AMP、ATP 存在下条件においても、弱いながらエキシマー発光が観測され、AMP と ATP 添加条件の間にもエキシマー発光強度には差異が見られた。AMP は LID domain に対しても非特異的に結合し、AMP 過剰な条件では酵素活性が低下することが報告されている<sup>66, 78-80</sup>。これにより AMP 存在下においても修飾ピレンが互いに接近しエキシマー発光が観測されたと解釈できる。しかし、AMP の LID domain に対する解離定数  $K_d$  は  $1700 \pm 400 \mu\text{M}$  程度<sup>66</sup>であるため、両ドメインが CLOSED 状態の ADP 存在下条件と同等な蛍光スペクトル変化が見られなかったと考えられる。NMR の研究より、ATP は AMPbd に対して一定の  $K_d$  値を示すが、AMPbd に変異を導入し (R88A)、基質への親和性を低下させた場合においても ATP の AMPbd への  $K_d$  値は変化しない<sup>66</sup>。これは LID domain に結合した ATP が、基質と結合していないフレキシブルな AMPbd の挙動に影響を与えており、AMP が LID domain に非特異的に結合する一方、ATP は主として AMPbd に結合しないことを示している。以上のことから ATP 存在下では基本的に LID domain のみが CLOSED 状態となり C1-Adk<sub>tm</sub> が適切な CLOSED 構造を形成できないため、AMP 存在下条件よりも蛍光スペクトル変化が小さいと解釈できる。

AMP、ATP 添加条件では、基質添加濃度が上昇するにつれてエキシマー発光強度の減少が見られた。これはピレン環とアデニン環との相互作用により蛍光が消光していることを示唆している。1-aminomethylpyrene を用いた実験では、ATP 添加に伴い蛍光の消光が観測された (Figure 2-3-VI)。このことより、CLOSED 状態でエキシマーのポピュレーションが小さい ATP 添加の場合、タンパク質の構造変化が伴わない条件においてピレン環と ATP が相互作用し蛍光が消光したと考えられる。



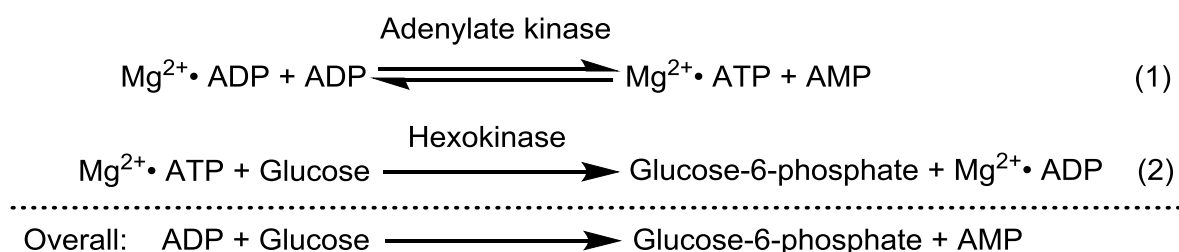
**Figure 2-3-VI.** ATP 添加による 1-aminomethylpyrene の蛍光スペクトル変化. 条件: [1-aminomethylpyrene] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5v/v% DMSO at 25 °C. [ATP] = 0 to 10 mM.  $\lambda_{\text{ex}} = 341 \text{ nm}$ .

以上より基質、阻害剤との結合により C1-Adk<sub>tm</sub> が CLOSED 構造を形成し、タンパク質表面のピレンが互いに接近することでエキシマー発光が観測された。また、エ

キシマー発光は基質結合により無秩序に観測されるのではなく、基盤となるアデニル酸キナーゼ本来の各基質結合ドメインの挙動に則り形成されていることが示された。

## 2-4. 触媒サイクルに伴うピレンモノマー/エキシマー発光の双方向スイッチング

2-3では基質結合により C1-Adk<sub>tm</sub> が CLOSED 構造を形成することでエキシマー発光の増大が観測された。次にリン酸エステル転移反応の進行により系中の基質を消費することによって C1-Adk<sub>tm</sub> が再び OPEN 構造を形成しエキシマー発光が消光するかを検討した。アデニル酸キナーゼによるリン酸転移反応は可逆的である。従ってその平衡反応を生成物側へシフトさせ CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> を OPEN 状態へ遷移させるため、ヘキソキナーゼとの共役反応を利用した (Scheme 2-4-I)。



Scheme 2-4-I. アデニル酸キナーゼとヘキソキナーゼの共役反応。

希釈溶液条件下 ([C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM)、1 mM ADP を添加することで C1-Adk<sub>tm</sub> はエキシマー発光を示した。その後、C1-Adk<sub>tm</sub> によるリン酸転移反応 (Scheme 2-4-I の(1)式)、ヘキソキナーゼによるグルコースのリン酸化 (Scheme 2-4-I の(2)式)が進行することでエキシマー発光の減少、モノマー発光の増大が観測された (Figure 2-4-I)。

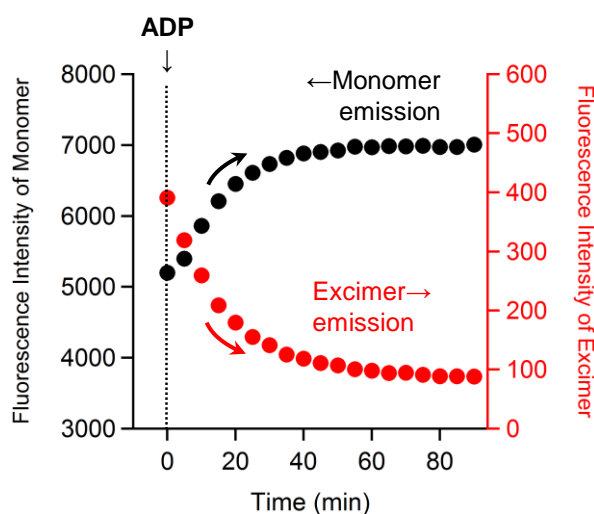
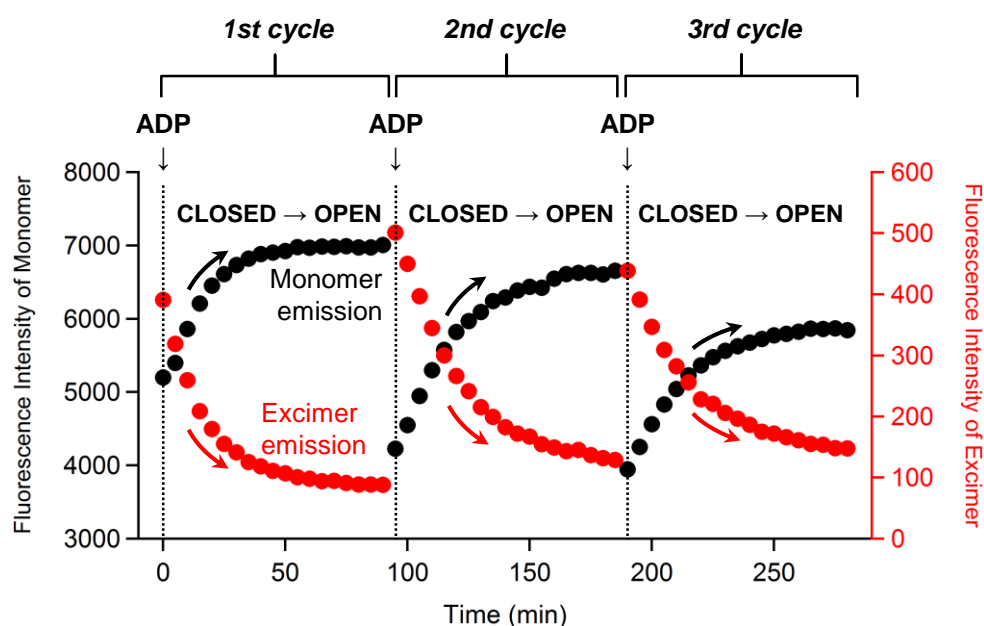


Figure 2-4-I. ヘキソキナーゼとの共役反応による C1-Adk<sub>tm</sub> のモノマー、エキシマー発光強度の時間変化. 条件: [C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C, [ADP] = 1 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, [Hexokinase] = 25 unit / 4 mL. λ<sub>ex</sub> = 346 nm.

この結果より、C1-Adk<sub>tm</sub>の発光特性は酵素反応における基質結合、生成物放出によって可逆的にスイッチングすることが可能であることが示された。

次に、この可逆的な発光特性のスイッチングが繰り返し行うことができるか検討した。リン酸転移反応の進行によりエキシマー発光が減少した後、再度 ADP を添加することでエキシマー発光が増大した。その後リン酸転移反応によりエキシマー発光強度が再び減少した (Figure 2-4-II)。この様な繰り返しスイッチングは少なくとも3サイクル観測された。



**Figure 2-4-II.** リン酸転移反応に伴う C1-Adk<sub>tm</sub> の発光特性の繰り返しスイッチング. 条件: [C1-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C, [ADP] = 1 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, [Hexokinase] = 25 unit / 4 mL.  $\lambda_{ex}$  = 346 nm.

可逆的なモノマー/エキシマー発光スイッチングを繰り返すことで、各サイクル終盤でのエキシマー発光強度が増大していく現象が見られた。今回の実験では、リン酸転移反応の進行により ADP が AMP、ATP に変換されていく過程で、ATP はヘキソキナーゼにより変換されるが AMP はスイッチング 1 サイクルで約 1 mM 系中に残存する。各基質存在下における C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化にも見られたように、AMP が LID domain にも非特異的に結合するため、スイッチングのサイクルを経るごとに系中の AMP 濃度が上昇することで、各サイクル終盤でエキシマー発光が増大したと考えられる。

## 2-5. まとめ

本章では、基質結合/生成物放出に伴うタンパク質の動的挙動に基づき修飾分子の距離依存的な機能をスイッチングする機構の構築が可能であることを示すため、分子間相互作用によりエキシマー発光を示す C1-pyrene-IAA を 2 分子 Adk<sub>tm</sub> (A55C/C77S/C169C) 表面に修飾した。

基質 (AMP, ADP, ATP) および阻害剤 Ap<sub>5</sub>A 存在下、C1-Adk<sub>tm</sub> はエキシマー発光を示した。希釈溶液条件下で実験を行っていることから、観測されたエキシマー発光はタンパク質分子内で形成されたピレンダイマーによるものであると解釈できる。基質添加により観測されるエキシマー発光は、単なる基質-酵素の結合によるものではなく、基盤となる Adk 本来の基質結合ドメイン AMPbd、LID domain の挙動に基づきスイッチされており、両ドメインに結合する ADP を添加した際、そのスペクトル変化はアロステリックな挙動を示した。

基質 ADP を段階的に添加していくことで、モノマー/エキシマー発光スイッチングが可逆的に繰り返し観測された。従ってタンパク質の動的挙動に基づく修飾分子の機能スイッチング機構の構築が可能であることが示された。この結果は、タンパク質の外部刺激に対する動的挙動を基盤とした非天然タンパク質・非天然酵素構築の手法に貢献することができる。

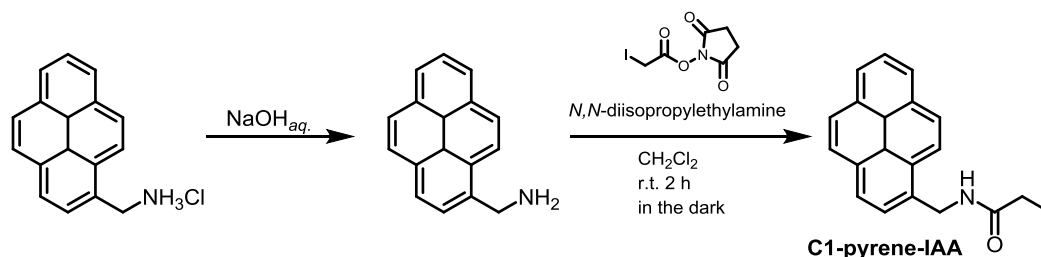
## 2 – 6. 実験項

### 2 – 6 – 1. Materials and Instruments

All Chemicals were obtained from conventional commercial source and used as received unless otherwise noted. The plasmid pEAK91 harboring Adk<sub>tm</sub> (A55C/C77S/V169C) was prepared from the plasmid coding the double mutant of *E. coli* Adk (A55C/C77S) (gifted by Prof. E. Haas, Bar-Ilan Univ., Israel) by site-directed mutagenesis using inverse PCR method. Primers for PCR were purchased from Invitrogen (Forward primer : ACGTTTACGTAC-CGTCTCTTCCTGATC, Reverse primer : CTGTGTGAATACCATCAGATGACAGCA). A kit for plasmid extraction (QIAprep Spin Miniprep Kit) was purchased from QIAGEN. KOD-plus-Mutagenesis Kit for inverse PCR was purchased from TOYOBO. *E. coli*. HB101 competent cell was purchased from TaKaRa. Hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from baker's yeast were purchased from Sigma as a mixed material (catalog code : H8629 – 500UN). <sup>1</sup>H NMR spectrum was collected on a JEOL JNM-EC 400 spectrometer. Protein purification was conducted using ÄKTA FPLC chromatography system in a chromatochamber (4 °C). DEAE Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow, Blue Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow, HiLoad<sup>TM</sup> 26/600 Superdex<sup>TM</sup> 75 pg, PD-10 Desalting Column and HiTrap Desalting Column (5 mL) were purchased from GE Healthcare. ESI-MS analysis was carried out using a JEOL JMS-T100LC mass spectrometer. MALDI-TOF-MS analyses were conducted using a Bruker Autoflex II mass spectrometer. Pyrene-modified Adk<sub>tm</sub> was purified using BIO-RAD

BioLogic DuoFlow liquid chromatography system. Mono Q 5/50 GL for purification of Pyrene-modified Adk<sub>tm</sub> was purchased from GE Healthcare. UV-Vis spectra were measured using a Shimadzu UV-2550 double beam spectrometer. CD (circular dichroism) spectra were collected using a JASCO J-725 circular dichroism spectropolarimeter. Fluorescence spectra were measured using a JASCO FP-8300 fluorescence spectrometer.

## 2 – 6 – 2. Synthesis of C1-pyrene-IAA (Scheme 2 – 6 – I)



**Scheme 2 – 6 – I.** Synthetic route of C1-pyrene-IAA.

1-Aminomethylpyrene hydrochloride (30 mg, 0.12 mmol) was suspended in 30 mL of 3 M NaOH<sub>aq</sub> and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated to yield the free base form of 1-aminomethylpyrene as white solid (24 mg, yield 93%). In a 50 mL round-bottom flask, 1-aminomethylpyrene (17 mg, 0.074 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (6.6 mg, 0.052 mmol) were dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under a N<sub>2</sub> atmosphere. After the addition of *N*-iodoacetic succinimide (25 mg, 0.088 mmol) to the solution, the reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature in the dark after the solvent was evaporated, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). The firstly eluted fraction was collected, and the solvent was evaporated to yield C1-pyrene-IAA as white solid (23 mg, yield 78%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ = 8.25–8.16 (m, 5H, pyrene), 8.11–7.98 (m, 4H, pyrene), 6.31 (s, 1H, NH), 5.19 (d, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>I). ESI-HRMS (positive mode) calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>INO<sup>+</sup> 399.0120; found 399.0121.

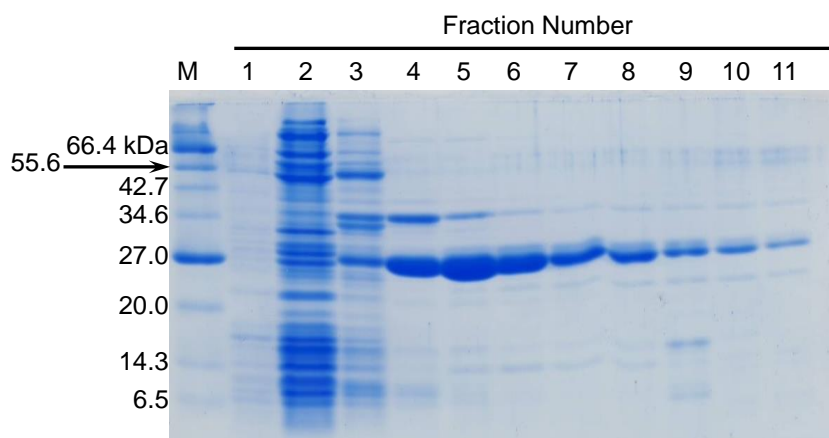
### 2 – 6 – 3. Preparation of adenylate kinase triple mutant ( $Adk_{tm}$ , A55C/C77S/V169C)<sup>34</sup>.

67

The plasmid pEAK91 harboring  $Adk_{tm}$  (A55C/C77S/V169C) was prepared from the plasmid coding the double mutant of *E. coli* Adk (A55C/C77S) (gifted by Prof. E. Haas, Bar-Ilan Univ., Israel) by site-directed mutagenesis using inverse PCR method. *E. coli* HB101 transformed by the pEAK91 plasmid was grown in LB medium (5 mL) with ampicillin (100  $\mu$ g / mL) at 37 °C, 250 rpm for 9 h. After the medium was added to a 2 L of LB medium with ampicillin (scale up), cultivation was continued at 37 °C, 130 rpm for 16 h. The microbes were collected by centrifugation (7000 G, 10 min) and suspended in 50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl (pH 7.5) (buffer 2 mL / bacteria yield 1 g). After freeze-thaw 3 times, the suspension was sonicated. (total 6 min, 1 sec : ON, 1 sec : OFF). The cell extract was centrifuged at 28000 G for 1 h, and the supernatant was dialyzed against 50 mM Tris-HCl containing 1 mM TCEP (*tris*(2-carboxyethyl)phosphine) (pH 7.5).

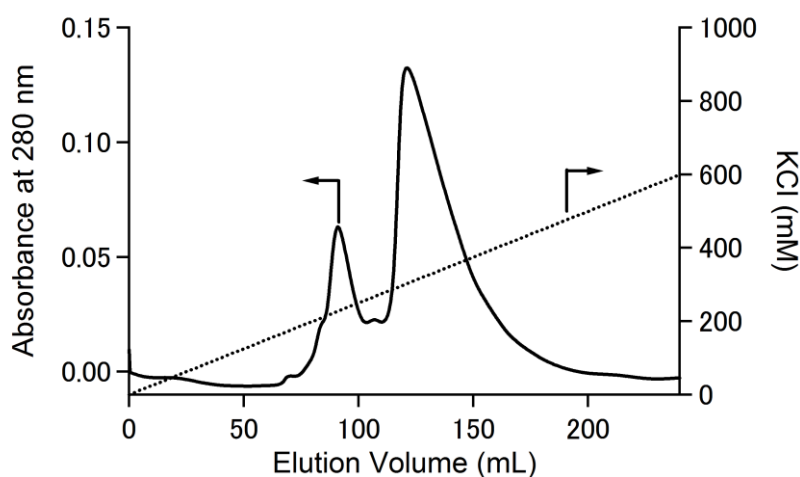
The protein solution concentrated by ultra-filtration was passed through a DEAE sepharose column (GE Healthcare)(2.5 x 8 cm) with elution of 50 mM Tris-HCl containing 1 mM TCEP (pH 7.5) (flow rate = 1 mL/min). The eluted proteins were collected by 11 fractions (40 mL/1fraction). The purity was checked by 15% SDS-PAGE (**Figure 2 – 6 – I**).





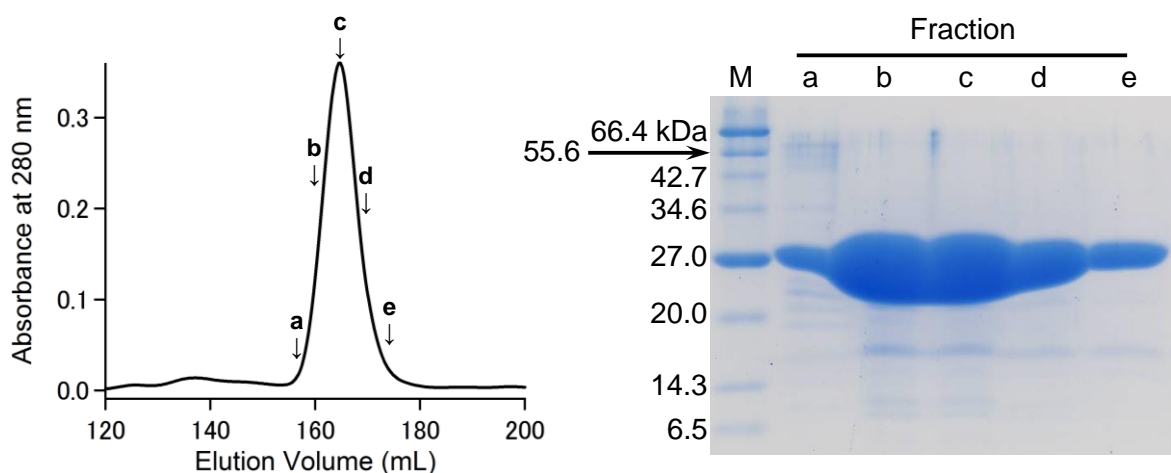
**Figure 2 – 6 – I.** 15% SDS-PAGE after purification by a DEAE sepharose column chromatography. M: protein marker (NEW ENGLAND BioLabs).

Fractions containing Adk<sub>tm</sub> (3 – 11) were collected and concentrated to 5 mL by ultra-filtration. The concentrated solution was loaded to a Blue sepharose column (GE Healthcare)(2 x 20 cm) and washed with 50 mM Tris-HCl containing 1 mM TCEP (pH 7.5) until the absorbance at 280 nm became stable (flow rate = 0.5 mL/min). The bound proteins were eluted with a linear gradient of KCl (0 – 600 mM over 240 mL) (**Figure 2 – 6 – II**).



**Figure 2 – 6 – II.** Chromatogram of purification by Blue sepharose column with a linear gradient of KCl (0 – 600 mM over 240 mL). Flow rate = 0.5 mL/min. Each fraction contains 5 mL solution.

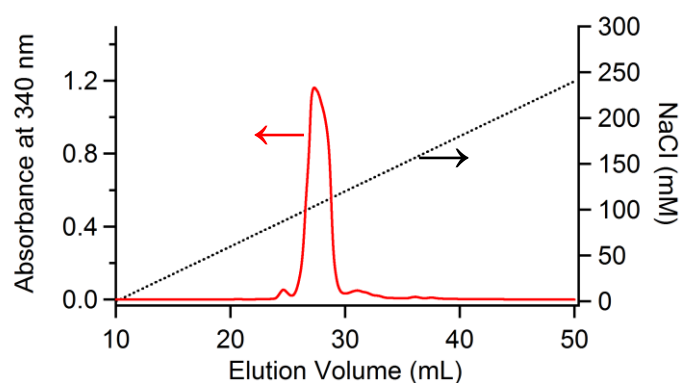
The fractions eluted at 120 – 200 mL were collected and concentrated to 5 mL. The concentrated sample was loaded to a HiLoad 26/600 Superdex 75pg column (GE Healthcare) and eluted with 50 mM Tris-HCl containing 1 mM TCEP (pH 7.5) (flow rate = 0.8 mL/min) (**Figure 2 – 6 – III (a)**). Eluent from 150 – 180 mL was collected and checked purity by 15% SDS-PAGE (**Figure 2 – 6 – III (b)**). The protein samples were stored as solutions in 40 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 50% glycerol (v/v), 0.1 M NaCl, 2 mM EDTA and 2 mM DTT at – 20 °C.



**Figure 2 – 6 – III.** Purification of Adktm by HiLoad 26/600 Superdex 75 pg column. **(a)** Chromatogram of purification. Flow rate = 0.8mL/min. Fractions at **a – e** were used to check the purity by 15% SDS-PAGE. **(b)** 15% SDS-PAGE after purification by HiLoad 26/600 Superdex 75pg column. M: protein marker. Each fraction contains 1 mL solution.

#### 2 – 6 – 4. Bio-conjugation of Adk<sub>tm</sub> with C1-pyrene-IAA<sup>81</sup>

A stock solution of protein was passed through a PD-10 desalting column (GE Healthcare) with elution of 50 mM HEPES (pH 8.0), 2 mM EDTA to remove glycerol and DTT, immediately before use. C1-pyrene-IAA (50 eq. for Adk<sub>tm</sub>) was dissolved in DMSO (2 mM). The solution was added to a solution of Adk<sub>tm</sub> (2.0 μM) with adjusting 5v/v% of DMSO in final. The mixture was gently stirred at 25 °C for 24 h in the dark. After the centrifugation to remove precipitated materials, supernatant was dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), and then the sample was concentrated to 500 μL. The conjugated sample was loaded to a Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare) to separate from the unmodified and partially modified Adk<sub>tm</sub> (flow rate = 0.5 mL/min). Double modified Adk<sub>tm</sub> was eluted with linear gradient of NaCl from 0 to 300 mM for 60 mL (**Figure 2 – 6 – IV**). The fractions eluted at 26 – 30 mL were collected, desalted using a HiTrap Desalting column (GE Healthcare), and lyophilized. The protein with two molecules of pyrene was kept at –80 °C.



**Figure 2 – 6 – IV.** Elution curve of purification by Mono Q column with linear gradient of NaCl (0 – 300 mM over 60 mL). Flow rate = 0.5 mL/min.

### **2 – 6 – 5. Adk activity of Adk<sub>tm</sub><sup>74</sup>**

The phosphoryl transfer activities of Adk<sub>tm</sub>s were measured by monitoring the formation of NADPH (the increase in absorbance at 340 nm) produced by the Adk<sub>tm</sub>–hexokinase–glucose-6-phosphate dehydrogenase tandem reaction in 50 mM Tris-HCl (pH = 7.5) at 25 °C. The measurement conditions: [Adk<sub>tm</sub>] = 44 nM, [ADP] = 2 mM, [NADP<sup>+</sup>] = 2.3 mM, [glucose] = 10 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, and hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase = 25 unit.

### **2 – 6 – 6. Measurements of UV-vis, CD spectra and steady-state fluorescence.**

All UV–vis, steady-state fluorescence and CD spectra were collected in a 1-cm quartz cell at 25 °C. The wavelength resolution in UV-vis spectra was 0.5 nm. CD spectra were obtained by accumulation of five scans with 1 nm-resolution. Steady-state fluorescence spectra were collected at the excitation wavelength of 346 nm and recorded at 1 nm-resolution.

### 3 章: CLOSED 状態のアデニル酸キナーゼ表面におけるピレンのエキシマー発光挙動及びピレンスタッキングモードの評価

#### 3-1. 研究目的

タンパク質プローブとしてピレン分子を用いる場合、主に定常状態蛍光スペクトルにおけるエキシマー/モノマー発光強度比率で評価されている<sup>47-48</sup>。従って、定常状態蛍光スペクトルに加え、様々な定常状態分光測定および時間分解分光測定を行うことにより、タンパク質に導入されたピレンの基底状態、励起状態におけるより詳細な空間情報を得ることが期待される。さらに、エキシマー発光におけるピレンプローブの構造およびフレキシビリティの影響を調べることは、タンパク質プローブとしてピレンを用いる際に誤ったスペクトル解釈を回避することに繋がる点で重要な課題であり、そこで得られた知見に基づくプローブ構造の最適化に貢献することが期待される。

本章はタンパク質プローブとしてピレンを用いる際には、定常状態、時間分解分光測定をフルセットで行い、ピレンプローブのスタッキングモードを考慮することの重要性を示すことを目的とし、CLOSED 状態の Adk<sub>tm</sub> 表面上に異なるメチレンリンカー鎖長を有するピレン分子を導入し (Figure 3-1)、それらの発光特性とタンパク質表面上におけるピレン分子のスタッキングモードを検討した。

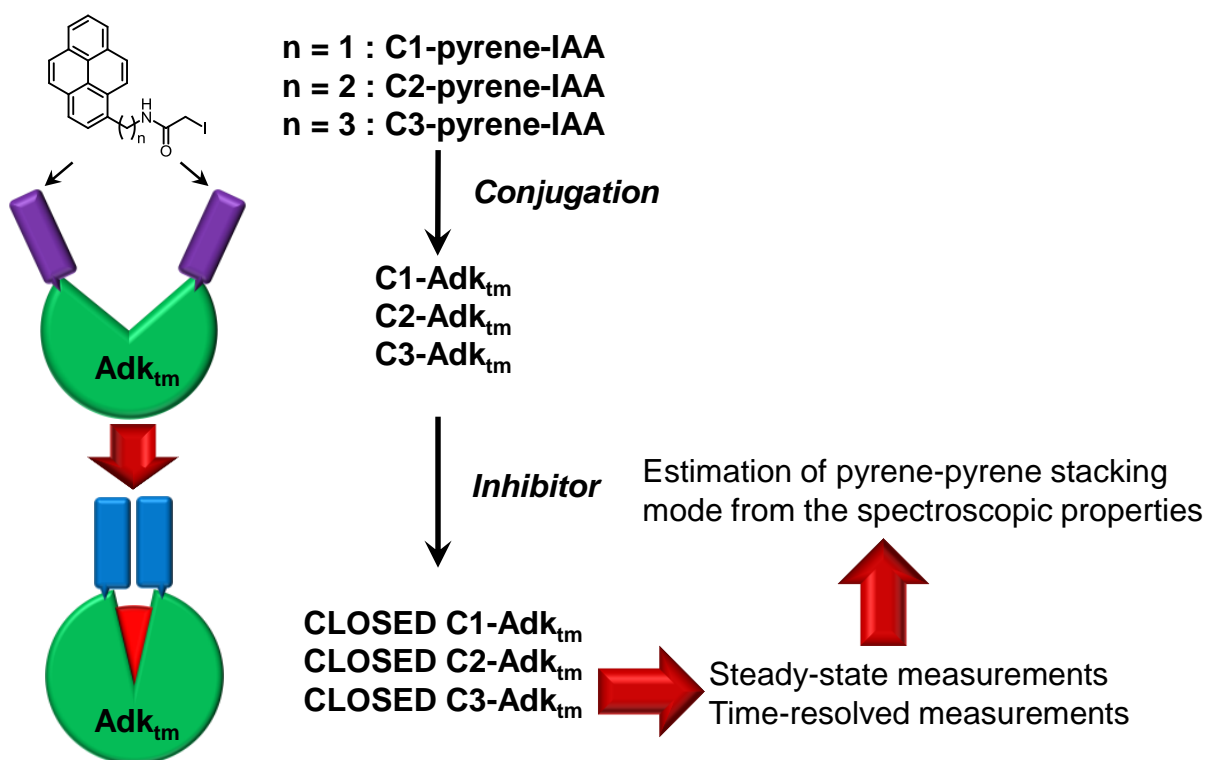


Figure 3-1. 鎖長の異なるピレン分子による Adk<sub>tm</sub> 表面修飾と CLOSED Adk<sub>tm</sub> の定常状態、時間分解分光測定.

### 3-2. ピレン修飾アデニル酸キナーゼ (C2-Adk<sub>tm</sub>, C3-Adk<sub>tm</sub>) のキャラクタリゼーション

#### 3-2-1. MALDI-TOF-MS スペクトル

第2章における C1-Adk<sub>tm</sub> と同様の調製法で C2, C3-pyrene-IAA を Adk<sub>tm</sub> に導入し、Mono Q カラム (陰イオン交換カラム、GE Healthcare) による精製後、MALDI-TOF-MS による質量分析測定を行ったところ、C2, C3-pyrene-IAA がそれぞれ二分子導入された分子量が観測された (Figure 3-2-I)。このことから、Adk<sub>tm</sub> 表面にピレンが2分子修飾された目的の C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> が生成されたことを確認した。

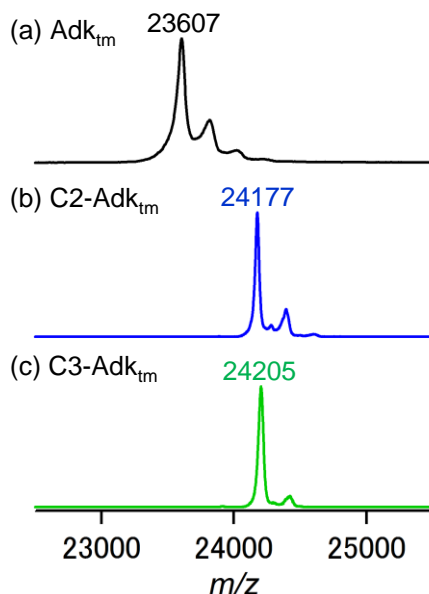


Figure 3-2-I. C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の MALDI-TOF-MS スペクトル. (a) 未修飾 Adk<sub>tm</sub>, (b) C2-Adk<sub>tm</sub>, (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. \*ピーク : マトリックス (シナピン酸) 付加物.

#### 3-2-2. C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis, CD スペクトル

C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis スペクトルでは、ピレンに典型的な吸収スペクトルが観測された (Figure 3-2-II)。このことから MALDI-TOF-MS スペクトルの結果と合わせ、Adk<sub>tm</sub> に C2、C3 ピレンがそれぞれ導入されていることが示された。

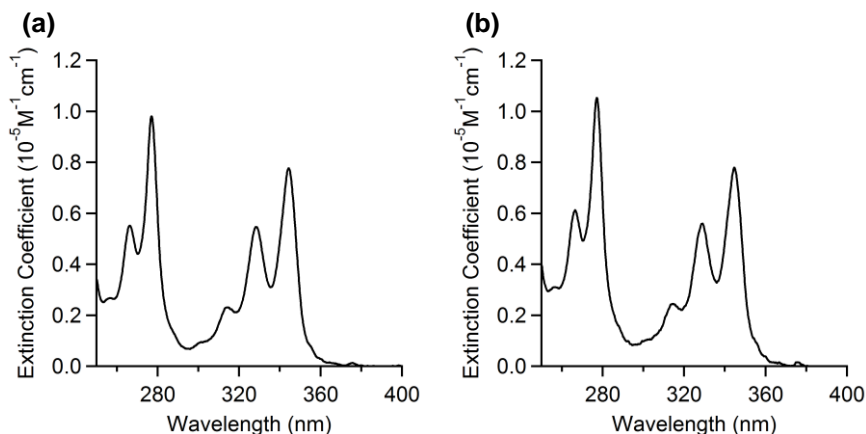
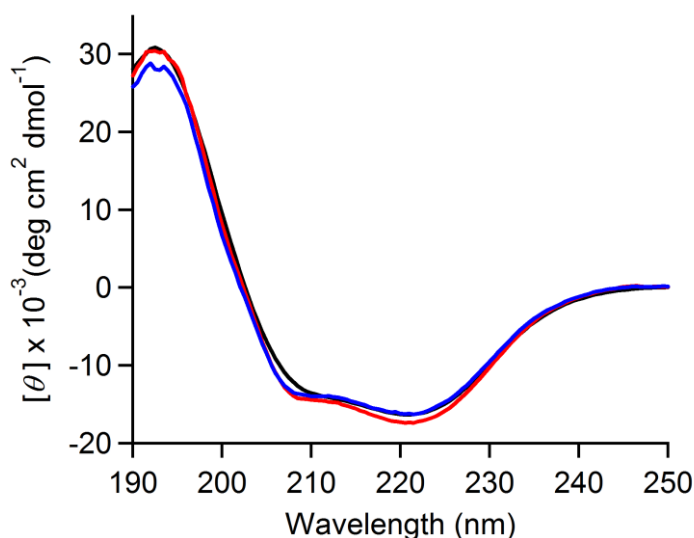


Figure 3-2-II. ピレン修飾 Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis スペクトル. (a) C2-Adk<sub>tm</sub>. (b) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [C2, C3-Adk<sub>tm</sub>] = 5  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}$ C.

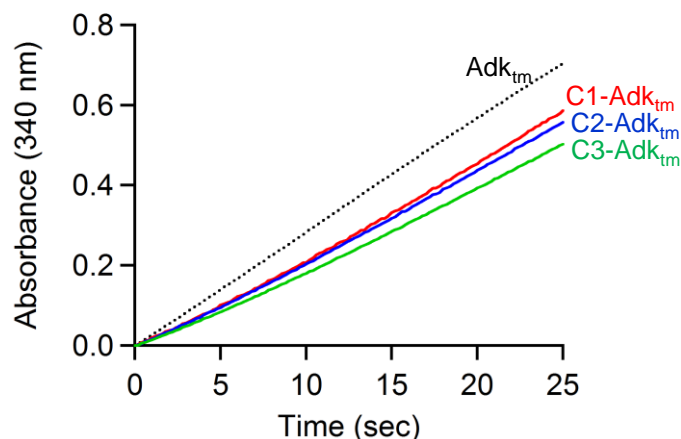
C2、C3-Adk<sub>tm</sub>は未修飾 Adk<sub>tm</sub>と類似の CD スペクトルを示した (Figure 3-2-III)。この結果より、各ピレン修飾 Adk<sub>tm</sub> の 3 次元構造は大きく崩れていないことが示された。



**Figure 3-2-III.** C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の CD スペクトル. (—) Adk<sub>tm</sub>, (—) C2-Adk<sub>tm</sub>, (—) C3-Adk<sub>tm</sub>.  
条件 : [protein] = 7 μM in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), at 25 °C.

### 3-2-3. C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の Adk 活性の確認

ヘキソキナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの共役反応を利用した活性測定では、C2, C3-Adk<sub>tm</sub>は C1-Adk<sub>tm</sub>と類似の酵素活性を示し、アデニル酸キナーゼとしての活性を保っていることが確認された(C2-Adk<sub>tm</sub>: 80%活性を保持、C3-Adk<sub>tm</sub>: 71%活性を保持) (Figure 3-2-IV)。

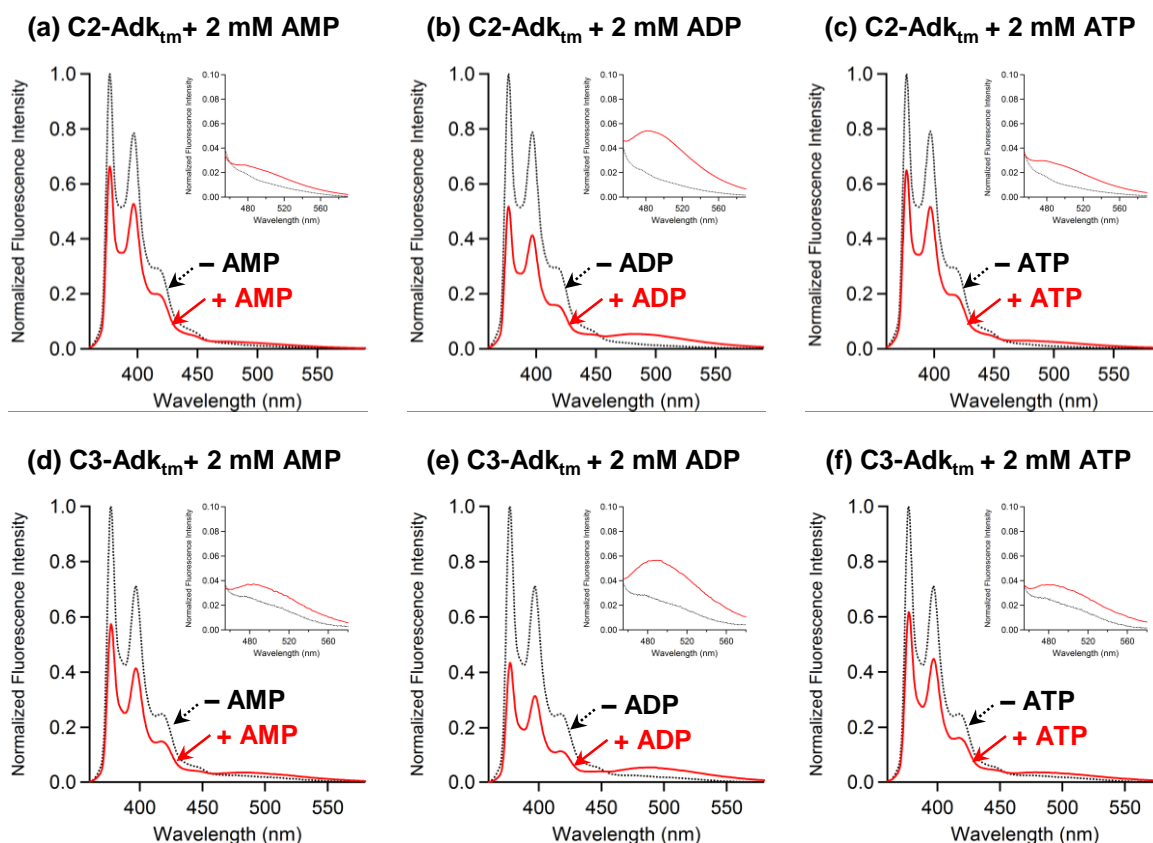


**Figure 3-2-IV.** C1 - C3-Adk<sub>tm</sub> の酵素活性. (···) Adk<sub>tm</sub>, (—) C1-Adk<sub>tm</sub>, (—) C2-Adk<sub>tm</sub>, (—) C3-Adk<sub>tm</sub>.  
条件 : [Adk<sub>tm</sub>, C1 - C3-Adk<sub>tm</sub>] = 44 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), [ADP] = 2 mM, [NADP<sup>+</sup>] = 2.3 mM, [glucose] = 10 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase = 25 unit/4 mL at 25 °C.



### 3-3. 基質および阻害剤添加による蛍光スペクトル変化

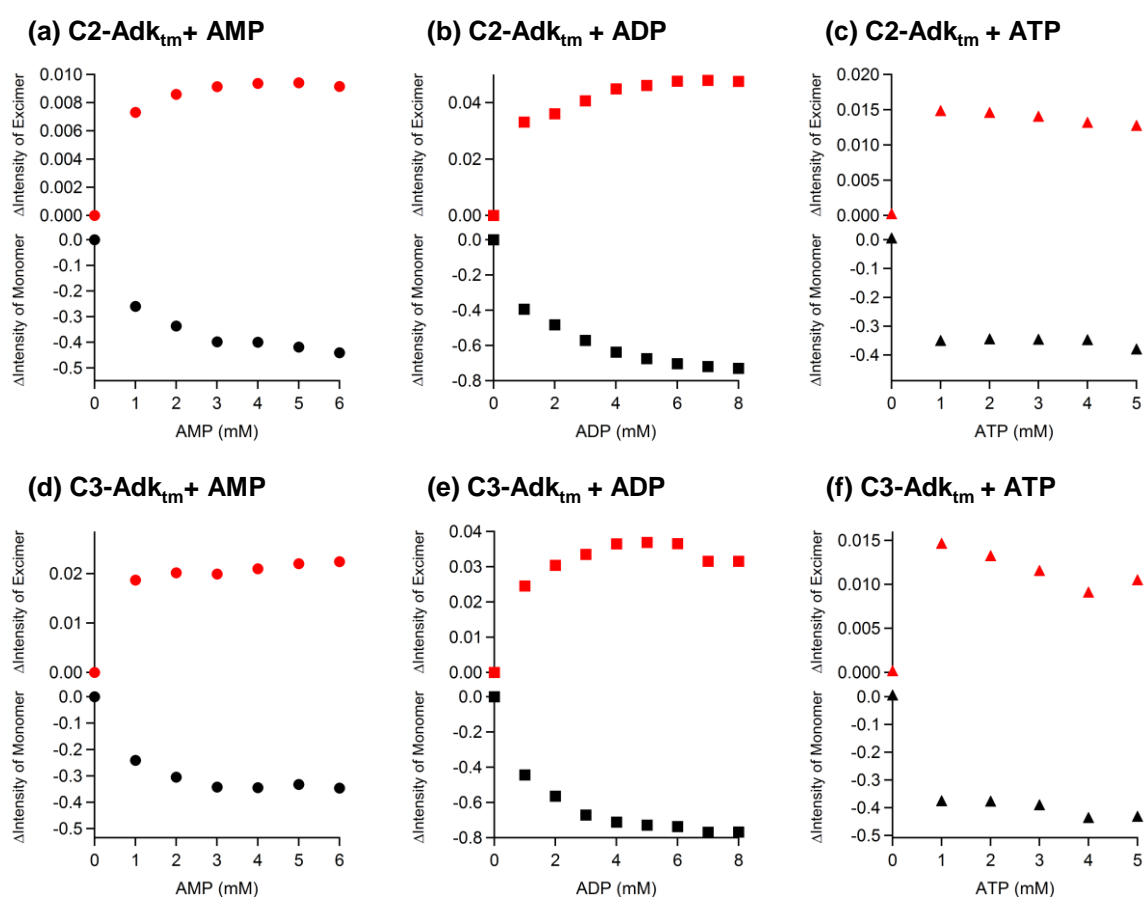
基質 (AMP, ADP, ATP) 及び阻害剤 Ap<sub>5</sub>A 存在下における C2-Adk<sub>tm</sub>, C3-Adk<sub>tm</sub> のモノマー/エキシマー発光変化を検討した。希釈溶液条件下 ([C2, C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM)、基質を添加することによって、モノマー発光 (377 nm) の減少、エキシマー発光の上昇 (485 nm) が観測された (Figure 3-3-I)。このことから、C1-Adk<sub>tm</sub> 同様、メチレンリンカーを伸長したピレン分子を有する C2-Adk<sub>tm</sub>, C3-Adk<sub>tm</sub> の発光特性はアデニル酸キナーゼの基質結合ドメインの挙動を反映していることが示された。



**Figure 3-3-I.** 基質添加による C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化. (···) 基質非存在下, (—) 基質存在下. (a) C2-Adk<sub>tm</sub> + AMP. (b) C2-Adk<sub>tm</sub> + ADP. (c) C2-Adk<sub>tm</sub> + ATP. (d) C3-Adk<sub>tm</sub> + AMP. (e) C3-Adk<sub>tm</sub> + ADP. (f) C3-Adk<sub>tm</sub> + ATP. 条件: [C2, C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [substrates] = 0 or 2 mM.  $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ .

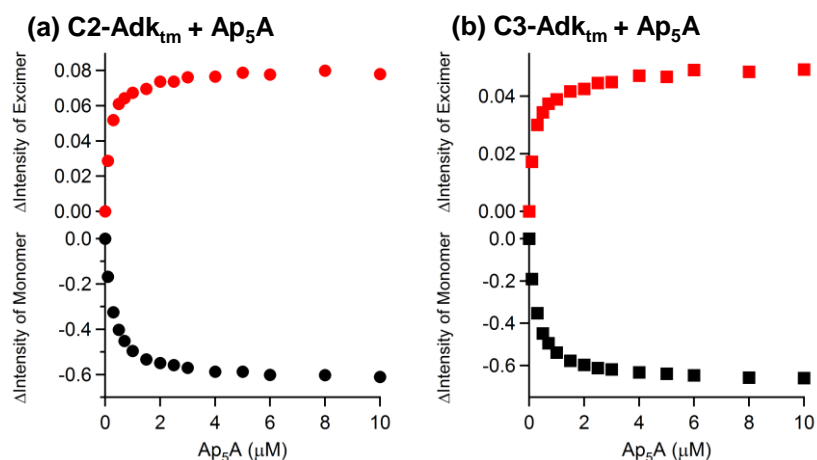
各基質濃度に対する C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化をプロットした場合にも、C1-Adk<sub>tm</sub> 同様、ADP 存在下条件で大きなエキシマー発光が観測された (Figure 3-3-II)。AMP 存在下条件における C2, C3-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光の増大 (Figure 3-3-II (a), (d)) は、C1-Adk<sub>tm</sub> (Figure 2-3-IV (a)) よりも大きい。AMP の LID domain への結合は非特異的であるが、メチレンリンカーの伸長により、Cys55、Cys169 に結合しているピレン分子同士がお互いに接近し、AMP 存在下条件において C2, C3-Adk<sub>tm</sub> はリンカー鎖長の短い C1-Adk<sub>tm</sub> よりも高いエキシマー発光を示したと考えられる。ま

た、ADP 存在下条件において C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化はシグモイド型の曲線を示したが (Figure 2 – 3 – IV (b))、C2, C3-Adk<sub>tm</sub> はその様な挙動を示さなかった。前述したメチレンリンカーの伸長による効果により、片側の基質ドメインが CLOSED 状態を形成している場合 (ADP 低濃度領域) でもピレン同士が接近しているポピュレーションが上昇しエキシマー発光を示すため、C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光強度変化はアロステリック挙動を示さなかったと推測される。また、もう一つの理由として、アデニル酸キナーゼ表面にトリプトファンを変異導入した場合、 $K_m$  値が上昇することが報告されている<sup>67</sup> ことから C2 ピレンもしくは C3 ピレンを導入した場合、各ドメインの基質親和性に影響を与え、アロステリックな挙動が見られなかったと考えられる。

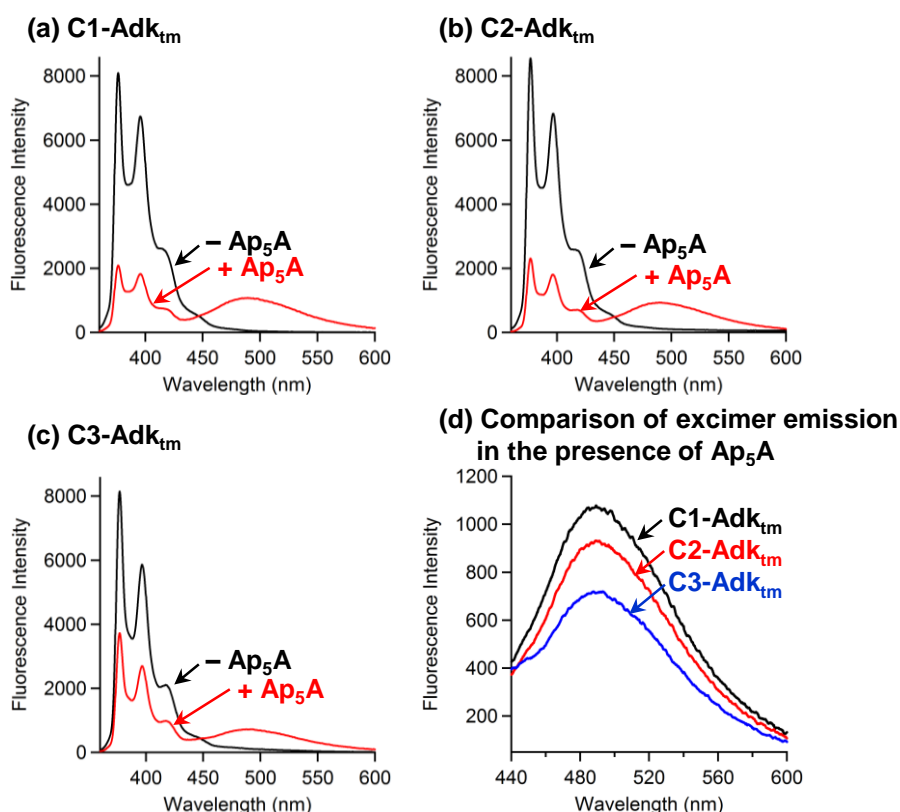


**Figure 3 – 3 – II.** 基質濃度に対する C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光強度変化. (a) C2-Adk<sub>tm</sub> + AMP, ● : エキシマー発光強度, ● : モノマー発光強度. (b) C2-Adk<sub>tm</sub> + ADP, ■ : エキシマー発光強度, ■ : モノマー発光強度. (c) C2-Adk<sub>tm</sub> + ATP, ▲ : エキシマー発光強度. (d) C3-Adk<sub>tm</sub> + AMP, ● : エキシマー発光強度, ● : モノマー発光強度. (e) C3-Adk<sub>tm</sub> + ADP, ■ : エキシマー発光強度, ■ : モノマー発光強度. (f) C3-Adk<sub>tm</sub> + ATP, ▲ : エキシマー発光強度, ▲ : モノマー発光強度. 条件 : [C2, C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [AMP] = 0 to 6 mM. [ADP] = 0 to 8 mM. [ATP] = 0 to 5 mM.  $\lambda_{ex}$  = 345 nm.

C2, C3-Adk<sub>tm</sub> は Ap<sub>5</sub>A 存在下条件においてもエキシマー発光を示し、Ap<sub>5</sub>A が約 10 μM でスペクトル変化が飽和した (Figure 3-3-III)。しかし、10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下における C1-C3-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光強度に違いが見られた (Figure 3-3-IV)。



**Figure 3-3-III.** Ap<sub>5</sub>A 濃度に対する C2, C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光強度変化. (a) C2-Adk<sub>tm</sub> + Ap<sub>5</sub>A, ● : エキシマー発光強度, ● : モノマー発光強度. (b) C3-Adk<sub>tm</sub> + Ap<sub>5</sub>A, ■ : エキシマー発光強度, ■ : モノマー発光強度. 条件: [C2, C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 0 to 10 μM. λ<sub>ex</sub> = 345 nm.



**Figure 3-3-IV.** Ap<sub>5</sub>A 添加による C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (-) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (-) 10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (-) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (-) 10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. (-) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (-) 10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下. (d) C1-C3-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光強度の比較. 条件: [C1-C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 0 or 10 μM. λ<sub>ex</sub> = 346 nm for C1-Adk<sub>tm</sub>, 345 nm for C2-Adk<sub>tm</sub> and C3-Adk<sub>tm</sub>.

発光強度が異なる原因の一つとして、メチレンリンカーが伸長することによってピレン分子のフレキシビリティが上昇し、無輻射失活の寄与が大きくなることが考えられる。9,10-diphenylanthracene を基準とした CLOSED 状態の C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の相対蛍光量子収率を計算したところ、リンカーが伸長することによって蛍光量子収率が僅かに低下したが顕著な違いは見られなかった (**Table 3 – 3 – I**)。一方、モノマー発光に対するエキシマー発光の強度比  $I_R$  はリンカーの伸長に伴い顕著な違いが見られた。

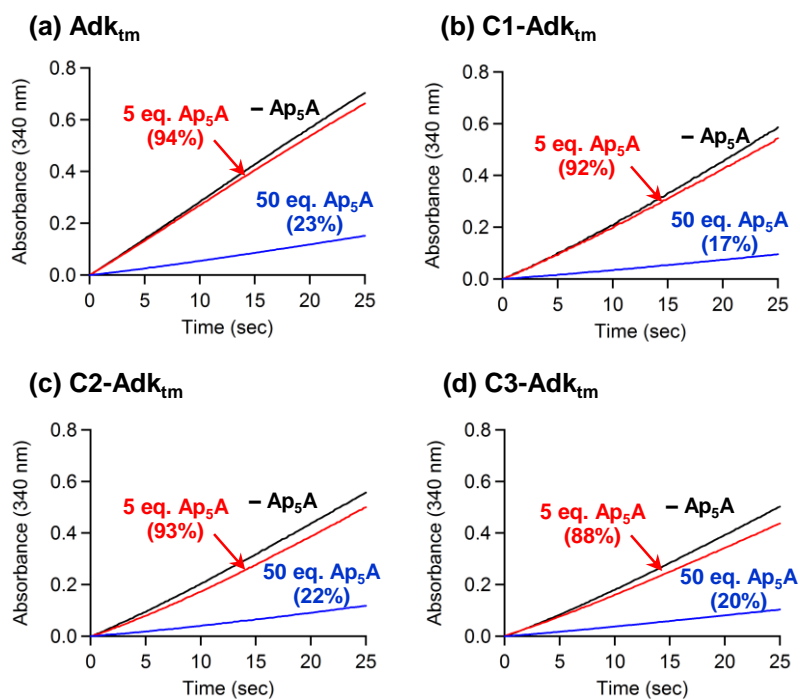
**Table 3 – 3 – I.** Ap<sub>5</sub>A存在下におけるCLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光量子収率  $\phi_F$ およびモノマー発光とエキシマー発光強度の比率 $I_R$

Protein	$\phi_F$ [a]	$I_R$ [b]
C1-Adk <sub>tm</sub> + Ap <sub>5</sub> A	0.25	0.52
C2-Adk <sub>tm</sub> + Ap <sub>5</sub> A	0.21	0.40
C3-Adk <sub>tm</sub> + Ap <sub>5</sub> A	0.23	0.19

[a] 9,10-diphenylanthraceneを基準とした相対蛍光量子収率.

[b]  $I_R = I_{\text{excimer}} / I_{\text{monomer}}$ .

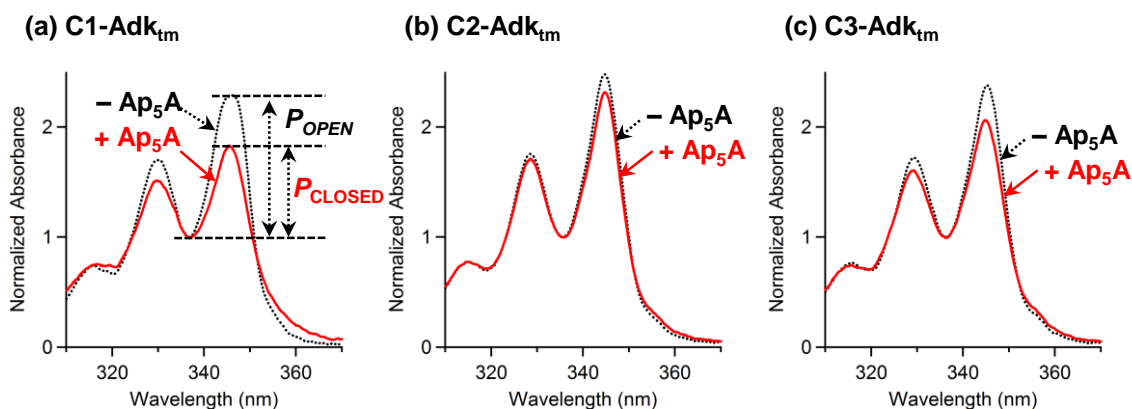
Adk<sub>tm</sub>、C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の酵素活性において、Ap<sub>5</sub>A を添加するといずれも類似な酵素活性の抑制が見られた (**Figure 3 – 3 – V**)。この結果は、C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> は同様の CLOSED 構造を形成しており、Cys55 と Cys169 間の距離は各ピレン修飾 Adk<sub>tm</sub> で大きな差異はないことを示している。従って、C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光比率の違いは、各修飾ピレン分子の構造に伴うピレンの分子間相互作用 (基底状態、励起状態におけるピレンスタッキング) に起因していると考えられる。



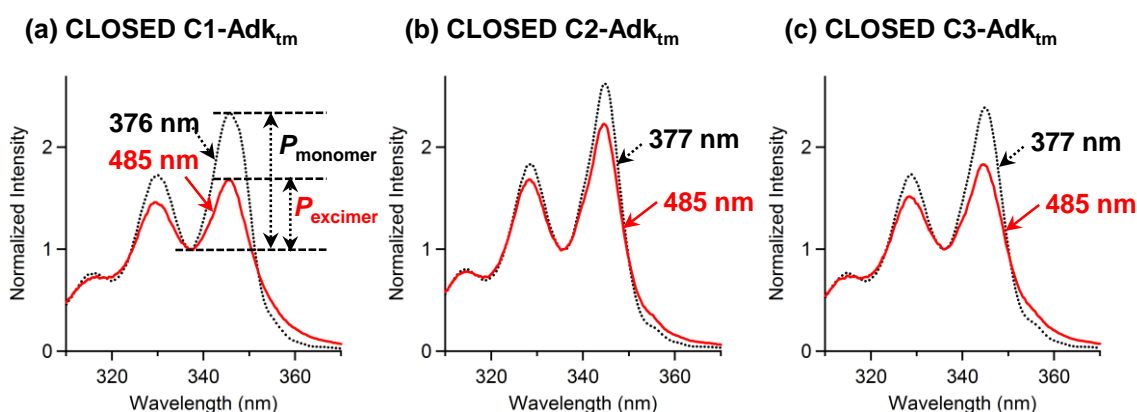
**Figure 3 – 3 – V.** Ap<sub>5</sub>A 存在下における Adk<sub>tm</sub>、C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の酵素活性. (a) Adk<sub>tm</sub>. (–) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (–) 5 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下, (–) 50 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下. (b) C1-Adk<sub>tm</sub>. (–) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (–) 5 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下, (–) 50 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下. (c) C2-Adk<sub>tm</sub>. (–) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (–) 5 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下, (–) 50 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下. (d) C3-Adk<sub>tm</sub>. (–) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (–) 5 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下, (–) 50 eq. Ap<sub>5</sub>A 存在下. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 44 nM, [ADP] = 2 mM, [NADP<sup>+</sup>] = 2.3 mM, [glucose] = 10 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase = 25 unit/4 mL.

### 3-4. 阻害剤添加による定常状態スペクトル変化

Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン分子の基底状態における相互作用様式を調べるため、阻害剤 Ap<sub>5</sub>A 存在下における UV-Vis スペクトルおよび励起スペクトル測定を行った (Figure 3-4-I, II)。



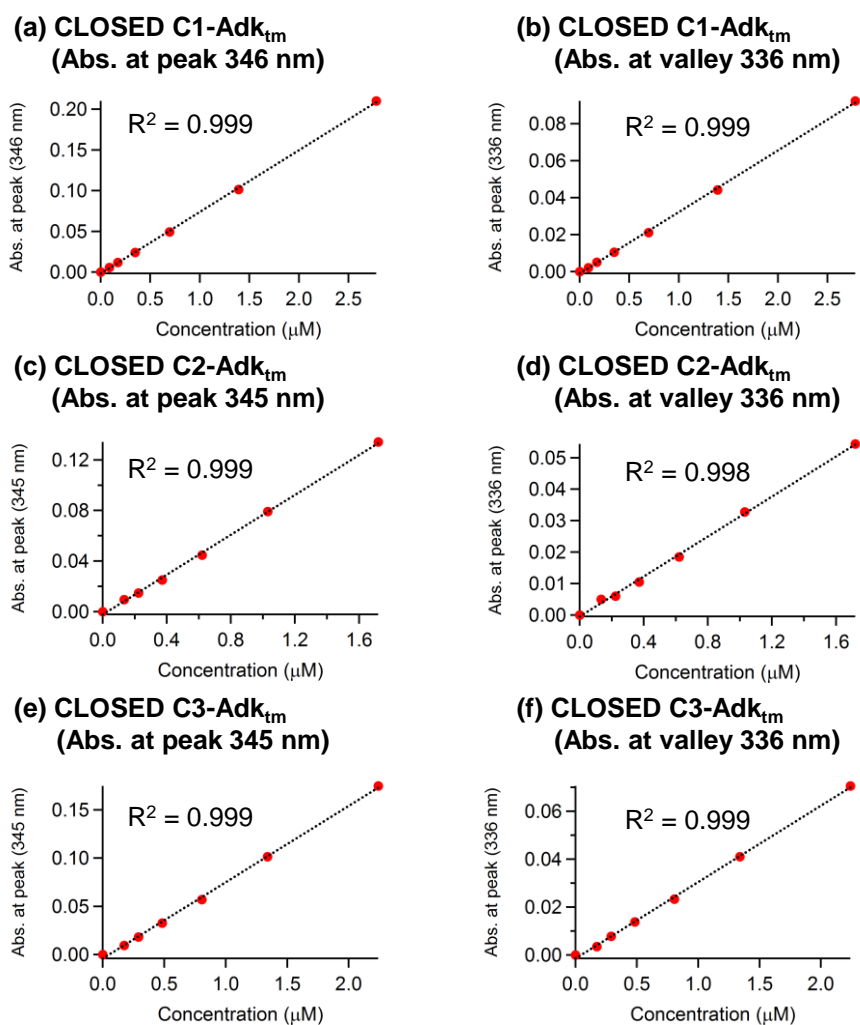
**Figure 3-4-I.** Ap<sub>5</sub>A 存在下における C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis スペクトル変化. スペクトルは谷部分 (336 nm) の吸光度で規格化. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (···) Ap<sub>5</sub>A 非存在以下, (-) Ap<sub>5</sub>A 存在下. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (···) Ap<sub>5</sub>A 非存在以下, (-) Ap<sub>5</sub>A 存在下. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. (···) Ap<sub>5</sub>A 非存在以下, (-) Ap<sub>5</sub>A 存在下. 条件: [C1-C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1 μM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 0 or 50 μM.



**Figure 3-4-II.** Ap<sub>5</sub>A 存在下における CLOSED C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の励起スペクトル. スペクトルは谷部分 (336 nm) の強度で規格化. (a) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>. (···) モノマー発光波長 (376 nm) でモニター, (-) エキシマー発光波長 (485 nm) でモニター. (b) CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub>. (···) モノマー発光波長 (377 nm) でモニター, (-) エキシマー発光波長 (485 nm) でモニター. (c) CLOSED C3-Adk<sub>tm</sub>. (···) モノマー発光波長 (377 nm) でモニター, (-) エキシマー発光波長 (485 nm) でモニター. 条件: [C1-C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 10 μM.

UV-Vis スペクトルおよび励起スペクトル測定において、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> は顕著なブロードニングを示した。この効果は天然では DNA 塩基のスタッキングに見られ<sup>82-85</sup>、また、ピレンを導入したポリマー<sup>58</sup>やピレン挿入型 RNA<sup>59</sup>の研究においても報告されている。このことから、このブロードニングは基底状態におけるピレン分子

同士のスタッキングによるものと考えられる。また、UV-Vis スペクトルおよび励起スペクトル測定におけるタンパク質濃度 (180 nM, 1  $\mu$ M) 範囲において OPEN C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の吸光度をプロットすると、吸光度変化は Lambert-Beer の法則に従っており、ブロードニングは見られない (Figure 3 – 4 – III)。従って今回観測されたブロードニングはタンパク質分子間ではなく、1 分子の CLOSED Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレンがスタッキングしていることを示している。



**Figure 3 – 4 – III.** 各濃度における OPEN C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の <sup>1</sup>L<sub>a</sub> 遷移由来の吸光度 (345 or 346 nm) および 336 nm の吸光度変化のプロット. (a) C1-Adk<sub>tm</sub> における 346 nm の吸光度変化. (b) C1-Adk<sub>tm</sub> における 336 nm の吸光度変化. (c) C2-Adk<sub>tm</sub> における 345 nm の吸光度変化. (d) C2-Adk<sub>tm</sub> における 336 nm の吸光度変化. (e) C3-Adk<sub>tm</sub> における 345 nm の吸光度変化. (f) C3-Adk<sub>tm</sub> における 336 nm の吸光度変化. 条件 : C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C.



一方、C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> は C1-Adk<sub>tm</sub> と比較し小さなブロードニングを示した (Table 3-4-I, II)。この結果は、CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> 表面上の基底状態ピレンダイマーのポピュレーションは C1-Adk<sub>tm</sub> よりも低いことを示している。しかし、得られた  $\Delta P_{\text{abs}}$ 、 $\Delta P_{\text{excit}}$  の数値より、メチレンリンカーの伸長により単純にブロードニングが小さくなっているわけではない (C1-Adk<sub>tm</sub> > C3-Adk<sub>tm</sub> > C2-Adk<sub>tm</sub>)。スペクトル測定結果より、基底状態においては、C3-Adk<sub>tm</sub> 表面のピレン分子は C2-Adk<sub>tm</sub> よりも基底状態におけるダイマーを形成しているポピュレーションが高いことが示された。

**Table 3-4-I.**

Ap<sub>5</sub>A添加によるUV-Visスペクトルのブロードニング

Protein	$P_{\text{OPEN}}$ [a]	$P_{\text{CLOSED}}$ [b]	$\Delta P_{\text{abs}}$ [c]
C1-Adk <sub>tm</sub>	2.29	1.82	0.47
C2-Adk <sub>tm</sub>	2.48	2.31	0.17
C3-Adk <sub>tm</sub>	2.38	2.06	0.32

$$[a] P_{\text{OPEN}} = \text{Abs}_{\text{peak(OPEN)}} / \text{Abs}_{\text{valley(OPEN)}}$$

$$[b] P_{\text{CLOSED}} = \text{Abs}_{\text{peak(CLOSED)}} / \text{Abs}_{\text{valley(CLOSED)}}$$

$$[c] \Delta P_{\text{abs}} = P_{\text{OPEN}} - P_{\text{CLOSED}}.$$

**Table 3-4-II.**

CLOSED C1-C3-Adk<sub>tm</sub>が示す励起スペクトルのブロードニング

Protein	$P_{\text{monomer}}$ [a]	$P_{\text{excimer}}$ [b]	$\Delta P_{\text{excit}}$ [c]
C1-Adk <sub>tm</sub>	2.34	1.69	0.65
C2-Adk <sub>tm</sub>	2.63	2.23	0.40
C3-Adk <sub>tm</sub>	2.39	1.84	0.55

$$[a] P_{\text{monomer}} = I_{\text{peak(OPEN)}} / I_{\text{valley(OPEN)}}$$

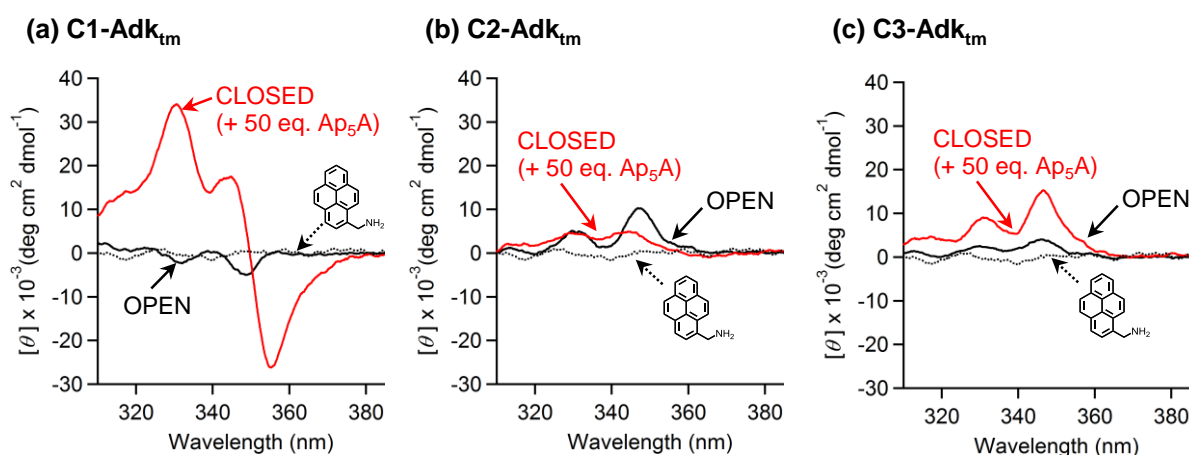
$$[b] P_{\text{excimer}} = I_{\text{peak(CLOSED)}} / I_{\text{valley(CLOSED)}}$$

$$[c] \Delta P_{\text{excit}} = P_{\text{monomer}} - P_{\text{excimer}}.$$

しかし、一般的に基底状態で芳香環が相互作用している場合、ブロードニングと共に長波長シフトの観測が予想される。UV-Vis スペクトルにおけるブロードニングは、発色団の励起子の共鳴によって生じる発色団間の距離の3乗に反比例して現れる現象である<sup>45, 58, 85</sup>。そのブロードニングが観測されるが長波長シフトが見られない原因として、各発色団間の遷移モーメントのカップリングが十分に大きくないことが考えら

れる<sup>85-86</sup>。RNA 内に組み込まれたピレン<sup>59</sup>やピレノファン<sup>87</sup>の様分子構造中でピレン分子間の距離があらかじめ接近しており、かつ剛直な分子構造内でピレンが固定されている系では大きな長波長シフトを示すが、水溶性ポリマーの系<sup>58</sup>ではスペクトルのブロードニングは見られる一方、長波長シフトは大きくない。これはピレンが分子構造中で固定されておらず、ピレン分子の揺らぎによって遷移モーメントのカップリングが弱まっていることが予想される。今回のスペクトルのブロードニングが見られた C1-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub>においても顕著な長波長シフトが見られないことから、Adk<sub>tm</sub>表面上のピレンダイマーのオリエンテーションは固定されているわけではなく、ピレン分子の揺らぎが存在することを示している。

基底状態でピレンが相互作用している場合、励起子相互作用が観測される。従って UV-Vis、励起スペクトルに加え修飾ピレンの基底状態での相互作用を検討するため、C1-C3-Adk<sub>tm</sub>の CD スペクトルを測定した (figure 3-4-IV)。



**Figure 3-4-IV.** Ap<sub>5</sub>A 添加による C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の CD スペクトル変化 (310-390 nm). (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (—) Ap<sub>5</sub>A 存在下, (—) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (···) 1-aminomethylpyrene. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (—) Ap<sub>5</sub>A 存在下, (—) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (···) 1-aminomethylpyrene. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. (—) Ap<sub>5</sub>A 存在下, (—) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (···) 1-aminomethylpyrene. (d) Ap<sub>5</sub>A 存在下における C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の CD スペクトルの比較. 条件: [protein] = 35 μM in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 0 or 1.5 mM. [1-aminomethylpyrene] = 57 μM in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and DMSO (5v/v%).

まず、Ap<sub>5</sub>A 非存在下における OPEN 状態の C1-C3-Adk<sub>tm</sub> は CD シグナルを示した。タンパク質に修飾されていない 1-aminomethylpyrene は顕著な CD シグナルを示さないことから、観測された CD シグナルはタンパク質表面に修飾されることによって誘起されたものであると考えられる<sup>88-91</sup>。またシグナルの符号を比較すると、C1-Adk<sub>tm</sub> は負のコットン効果を示す一方で、リンカーの伸長により C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> は正のコットン効果を示した。このことから、C1 ピレンからリンカーが 1 もしくは 2 増炭することでタンパク質表面におけるピレンの空間配置が異なることが示された。

Ap<sub>5</sub>A 存在下における CLOSED 状態では、C1-Adk<sub>tm</sub> において顕著な CD シグナルが観測された。このシグナルの形状は、シクロデキストリンに内包されているピレン分子の系においても観測されており、ピレンの励起子相互作用を示している<sup>63</sup>。同一発色団が励起子相互作用している場合、CD スペクトルが分裂する現象が見られる<sup>90</sup>(Figure 3-4-V)。

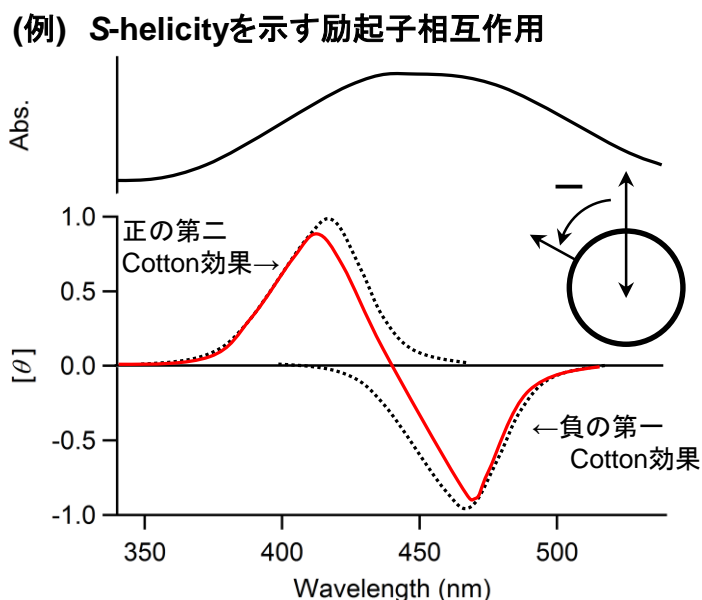
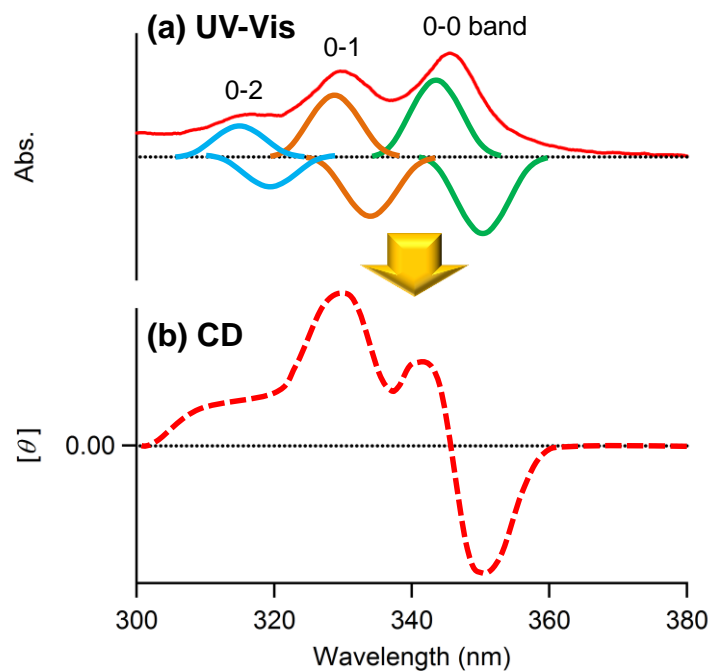


Figure 3-4-V. 励起子相互作用系の UV-Vis スペクトルと CD スペクトル。

しかし、ピレンの <sup>1</sup>La 遷移領域には 346 nm (0-0 band) と各振動バンド (0-1 band, 0-2 band) があるため、Figure 3-4-V に示す様なシンプルなシグナル形状ではない。そこで C1-Adk<sub>tm</sub> の UV-Vis スペクトルを基に、Figure 3-4-VI に示す CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の CD シグナルのモデルを検討した。ピレン同士が励起子相互作用すると各振動バンドが分裂するため (Figure 3-4-VI (a)), 複雑な CD シグナルを示したと考えられる。また、長波長側に負の第一コットン効果が見られていることから、C1 ピレンは負の第一コットン効果、正の第二コットン効果を示す S-helicity の配向を取っていることを示している。

一方、C2-Adk<sub>tm</sub> は顕著な励起子相互作用を示さなかった。この結果は、C2-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン分子は基底状態では相互作用していないことを示している。C3-Adk<sub>tm</sub> は CLOSED 状態をとることで CD シグナルが増大しているが励起子相互作用は見られない。従って、CLOSED C3-Adk<sub>tm</sub> は C1-Adk<sub>tm</sub> と比較し、修飾ピレン同士の基底状態における相互作用は弱い、CD シグナルは見られているため、周辺のアミノ酸の影響により、Adk<sub>tm</sub> 表面上の C3 ピレン環の運動が摂動を受けていることが考えられる。



**Figure 3 – 4 – VI.** C1-Adk<sub>tm</sub>のUV-Vis スペクトルに基づく、励起子相互作用のモデル. **(a)** CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>のUV-Vis スペクトル及び想定される各振動バンドの励起子相互作用に伴うスペクトル分裂. **(b)** 想定されるCLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>の複雑なCD スペクトル.

### 3-5. C1-Adk<sub>tm</sub> の CLOSED 状態における結晶構造解析

定常状態におけるスペクトル測定より、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン分子は基底状態でダイマーを形成していることが示された。タンパク質表面上におけるピレン分子の相互作用を構造的に確認するため、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造解析を検討した。Figure 3-5-I に分解能 2.8 Å における CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造を示す。

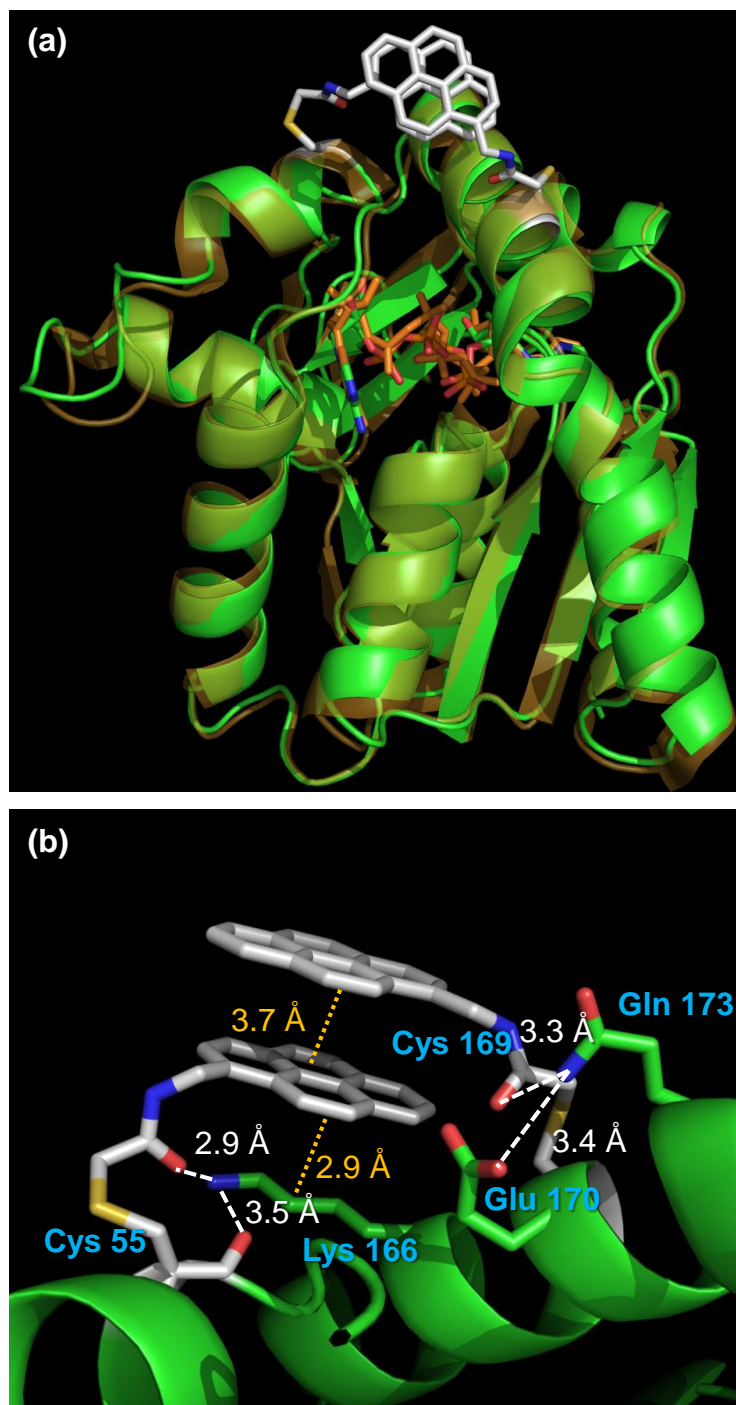


Figure 3-5-I. CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造 (分解能 2.8 Å). (a) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> (green) と CLOSED wild-type Adk (PDB: 1AKE, orange) の重ね合わせ構造. (b) 修飾ピレン周辺の拡大図.

CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> と CLOSED wild-type Adk (PDB: 1AKE) を重ね合わせると、root-mean-square (RMS) は 0.56 Å であり 2つの構造は類似していた。修飾ピレンはタンパク質構造内に埋もれることなくタンパク質表面上にピレン環同士が平行して存在する。また、ピレン分子間距離は 3.7 Å であり、Adk<sub>tm</sub> 表面上でピレン分子は互いにスタッキングしていることが構造的に確認された。

修飾ピレン周辺の拡大図 (Figure 3-5-I (b)) では、Cys55 に修飾されているピレン分子アミドのカルボニル酸素と Lys166 の側鎖アミン、Cys55 の主鎖カルボニルが水素結合し、Cys169 に修飾されているピレン分子アミドのカルボニルと Gln173 の側鎖アミン、Glu170 の側鎖カルボニルが水素結合している。また、Cys55 に修飾されたピレンの近傍に Lys166 の側鎖が存在し、ピレン環との距離は 2.9 Å で CH- $\pi$  相互作用があると思われる。これらの相互作用がタンパク質表面上でのピレン環同士のスタックに影響していると考えられる。結晶構造より C1 ピレンの配向は大きく捻じれていない。これは CD スペクトル結果と一見矛盾しているが、2.8 Å の分解能においてピレンの配向を詳細に議論することは難しい。また、実際に結晶構造において C1 ピレン配向が捻じれていないとしても、溶液中では分子の揺らぎがあるため CD スペクトルでは C1 ピレンは S-helicity を示したと考えられる。

Figure 3-5-II にピレン分子が修飾されている AMPbd (51-58)、LID domain (162-174) の温度因子を示した。各アミノ酸について、温度因子が高いほどそのアミノ酸の運動性が高く、温度因子が低いほど運動性が低いことを示している。

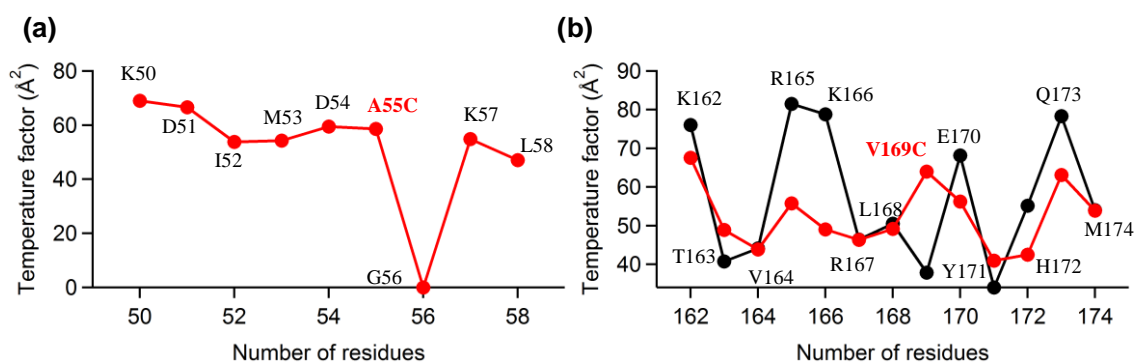
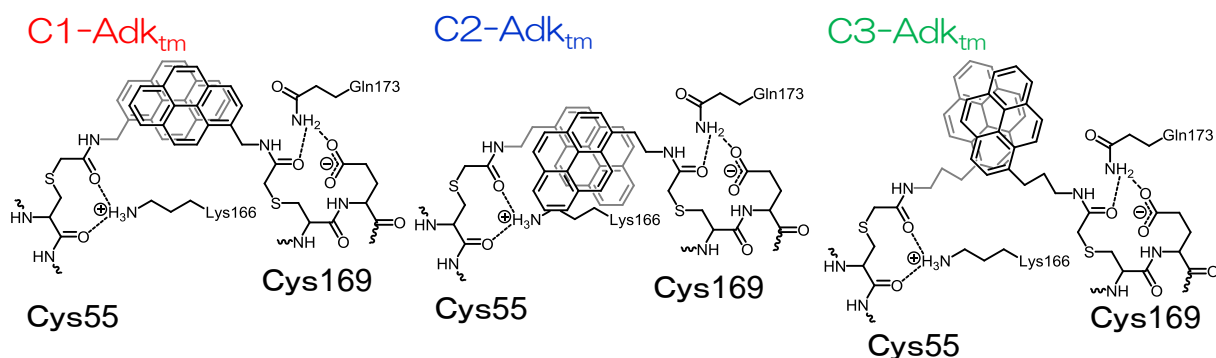


Figure 3-5-II. C1-Adk<sub>tm</sub>、wild type Adk の温度因子. (a) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の AMPbd (51-58) に属するアミノ酸側鎖部分の温度因子. (b) LID domain (162-174) に属するアミノ酸側鎖部分の温度因子. (-) wild type Adk (PDB: 1AKE), (—) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>.

AMPbd のアミノ酸側鎖の温度因子において、各アミノ酸側鎖の温度因子に顕著な違いは見られなかった (**Figure 3-5-II (a)**)。これは、A55C に導入されているピレン分子のフレキシビリティは、**Figure 3-5-I (b)** に示す C1 ピレンのアミドと他のアミノ酸側鎖の水素結合によって抑制されていることが原因の一つであると考えられる。LID domain のアミノ酸側鎖の温度因子において、V169C の側鎖の温度因子は他のアミノ酸と比較し多少増大している。この原因として V169C に導入された C1 ピレンのフレキシビリティが影響していると考えられる。wild typ Adk (PDB: 1AKE) おけるアミノ酸残基 R165, K166, E170, Q173 は比較的高い温度因子を示した一方、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> ではそれらのアミノ酸は他のアミノ酸の温度因子と顕著な違いは見られない。R165 は wild typ Adk と CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> において、空間配置が大きく変化しておらず、水素結合しているアミノ酸の数も変化していないため、R165 の温度因子の低下の原因は明らかではない。しかし K166, E170, Q173 は C1 ピレンのアミドとの水素結合に関与しているアミノ酸であり、この水素結合に伴うアミノ酸側鎖の固定化がこれらのアミノ酸の温度因子の抑制に寄与していると考えられる。

UV-Vis および励起スペクトルと、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造を基に溶液中の C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン分子の配向を推測すると (**Figure 3-5-III**)、効率よくピレンスタッキングを示す C1-Adk<sub>tm</sub> からメチレンリンカーを 1 増炭した 2-Adk<sub>tm</sub> では、ピレンスタッキングがずれ、さらにメチレンリンカーが伸長した C3-Adk<sub>tm</sub> では、C1-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン環の向き (ピレン環が横向きでスタック) が反転し (ピレン環が縦向きでスタック) ピレン環同士が弱く相互作用しているモデルが考えられる。

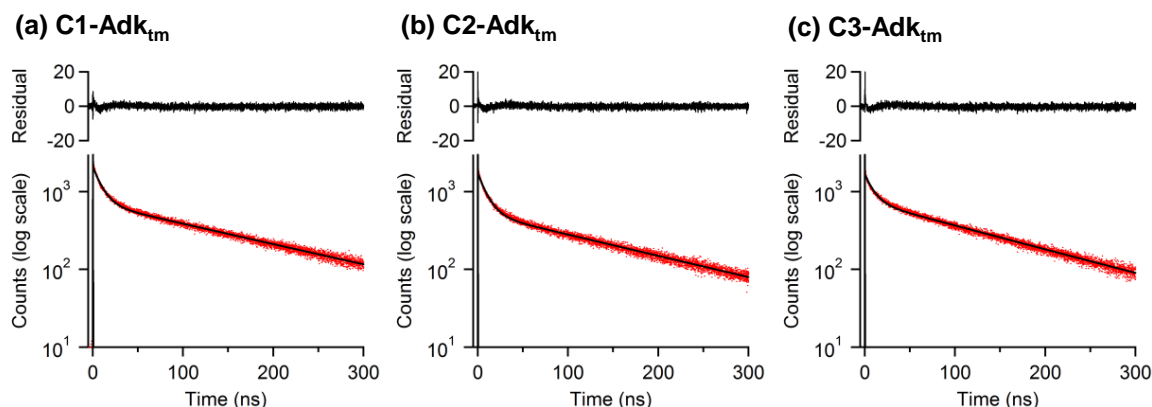


**Figure 3-5-III.** UV-Vis、励起スペクトルおよび CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶を基に推測される溶液中の C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレンスタッキング. (a) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造から得られたピレンスタッキング. (b) C2-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレンスタッキング. (c) C3-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレンスタッキング.



### 3-6. C1-C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命

Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン分子のスタッキングモードの観点よりピレンの発光を評価するため、時間相関単一光子計測法 (time-correlated single photon counting, TCSPC) を用いて蛍光減衰測定を行った。OPEN C1-C3-Adk<sub>tm</sub>のモノマー発光 (396 nm) の減衰を **Figure 3-6-I** に示す。**Table 3-6-I** に減衰曲線から求めた蛍光寿命を示す。



**Figure 3-6-I.** OPEN C1-C3-Adk<sub>tm</sub>の396 nmにおける蛍光減衰曲線。(a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件:[C1-C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1 μM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. λ<sub>ex</sub> = 375 nm with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.

**Table 3-6-I.** OPEN C1-C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命 (396 nmでモニター)

Protein	$\tau_1$ (OPEN) (ns)	$\tau_2$ (OPEN) (ns)	$\chi^2$
C1-Adk <sub>tm</sub>	9.93 (0.67)	163 (0.33)	1.04
C2-Adk <sub>tm</sub>	10.0 (0.67)	159 (0.33)	1.02
C3-Adk <sub>tm</sub>	9.83 (0.55)	140 (0.45)	1.10

条件 : [C1-C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1 μM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定の平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

OPEN C1-C3-Adk<sub>tm</sub>の396 nmにおける蛍光減衰は double exponential でフィッティングされ、ピレン特有の長寿命成分 ( $\tau_2$ ) が得られた<sup>52, 92</sup>。また、リンカーの伸長により  $\tau_2$  が減少する傾向が見られた (C1-Adk<sub>tm</sub> > C2-Adk<sub>tm</sub> > C3-Adk<sub>tm</sub>)。この原因の一つとして、ピレン分子構造のフレキシビリティーの上昇に伴う無輻射失活による蛍光のクエンチが影響していると考えられる。また、OPEN C1-C3-Adk<sub>tm</sub>において短寿命成分  $\tau_1$  が観測された。モノマー発光において二成分の蛍光が観測された原因として、Cys55 と Cys169 周辺に正電荷を帯びたアミノ酸が存在しており、ピレン環と側鎖アミノ基の電荷の相互作用によるクエンチが考えられる<sup>93</sup>(**Figure 3-6-II**)。



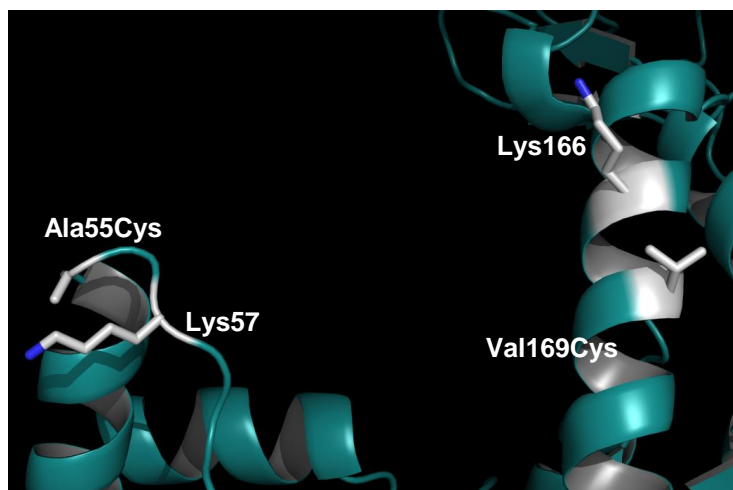


Figure 3 – 6 – II. Cys55 周辺の Lys57. Cys169 周辺の Lys166.

CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光 (485 nm) の減衰を Figure 3 – 6 – III に示す。Table 3 – 6 – II に減衰曲線から求めた蛍光寿命を示す。

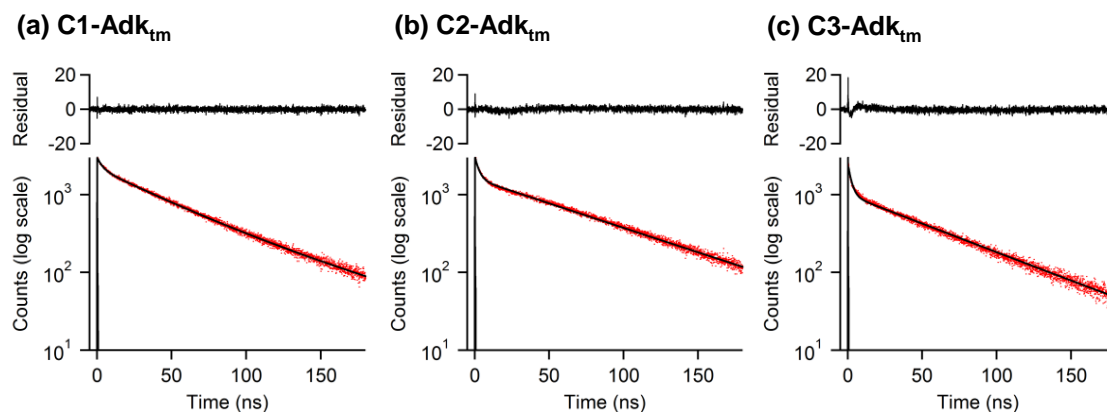


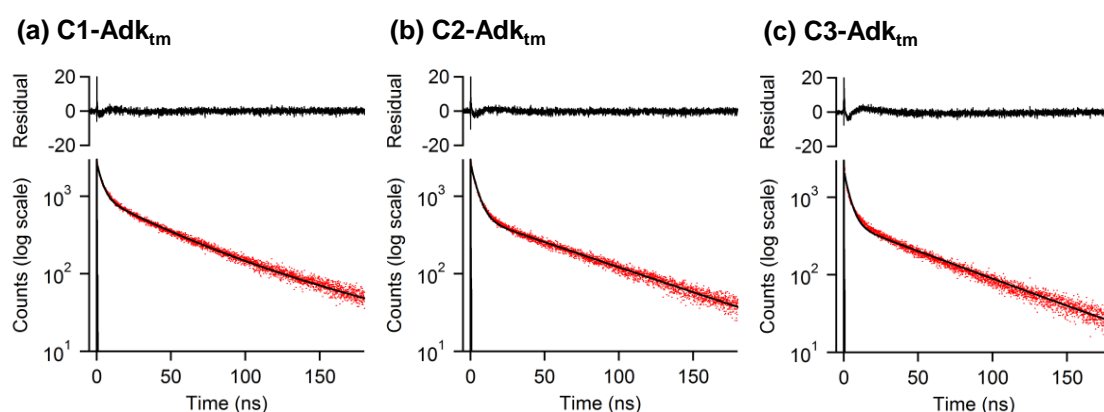
Figure 3 – 6 – III. CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の 485 nm における蛍光減衰曲線. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}$ C. [Ap<sub>5</sub>A] = 50  $\mu$ M.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 375 nm with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.

Table 3 – 6 – II. CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光寿命 (485 nm でモニター)

Protein	$\tau_1$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2'$ (CLOSED) (ns)	$\tau_3$ (CLOSED) (ns)	$\chi^2$
C1-Adk <sub>tm</sub>	3.41 (0.27)	40.4 (0.53)	81.3 (0.20)		0.92
C2-Adk <sub>tm</sub>	2.81 (0.49)			68.9 (0.51)	0.92
C3-Adk <sub>tm</sub>	2.35 (0.60)			58.2 (0.40)	1.01

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}$ C with 50  $\mu$ M Ap<sub>5</sub>A under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定の平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光減衰は triple exponential、C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub> は double exponential でフィッティングされた。C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> は短寿命成分 ( $\tau_1$ )、長寿命成分 ( $\tau_2, \tau_2', \tau_3$ ) を示した。ここで見られる長寿命と短寿命成分は、過去のピレン修飾ポリマーやピレン修飾 RNA の系に見られるように、長寿命成分は sandwich 型のピレンダイマーからの発光、短寿命成分は partially stacking 型のダイマーからの発光に起因すると考えられる<sup>58-59, 94-95</sup>。485 nm における短寿命成分は、OPEN 状態の 396 nm の蛍光寿命に見られた短寿命成分のような周辺のアミノ酸 (Lys55, Lys166) との相互作用の影響も含まれている可能性がある。しかし、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造より Lys166 はピレンのアミド部位と水素結合し、溶液中の CLOSED 構造において、Lys57 と Glu170 が塩橋を形成していることが報告されている<sup>77</sup>。従って 485 nm (CLOSED 状態) の短寿命成分は主に partially stacking 型エキシマーによるものであると考えられる。partially stacking 型のエキシマーは sandwich 型エキシマーと比較し、短波長側に発光極大を有する<sup>58, 96</sup>。そこで 450 nm の蛍光減衰 (Figure 3 – 6 – IV) から蛍光寿命を求めると (Table 3 – 6 – III)、450 nm における  $\tau_1$  の割合は、485 nm の蛍光 (Table 3 – 6 – II) よりも増大していた。従って 485 nm、450 nm における短寿命成分 ( $\tau_1$ ) は partially stacking 型のブルーシフトエキシマーからの発光が支配的であることが考えられる。



**Figure 3 – 6 – IV.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の 450 nm における蛍光減衰曲線. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}$ C. [Ap<sub>5</sub>A] = 50  $\mu$ M.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 375 nm with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.

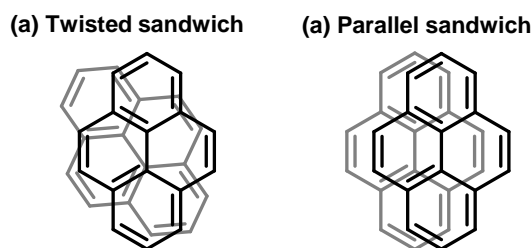
**Table 3 – 6 – III.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命 (450 nmでモニター)

Protein	$\tau_1$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2'$ (CLOSED) (ns)	$\tau_3$ (CLOSED) (ns)	$\chi^2$
C1-Adk <sub>tm</sub>	3.60 (0.63)	36.5 (0.26)	92.0 (0.11)		0.90
C2-Adk <sub>tm</sub>	4.36 (0.79)			66.4 (0.21)	0.81
C3-Adk <sub>tm</sub>	3.85 (0.79)			60.2 (0.21)	0.98

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C with 50  $\mu$ M Ap<sub>5</sub>A under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定 of 平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

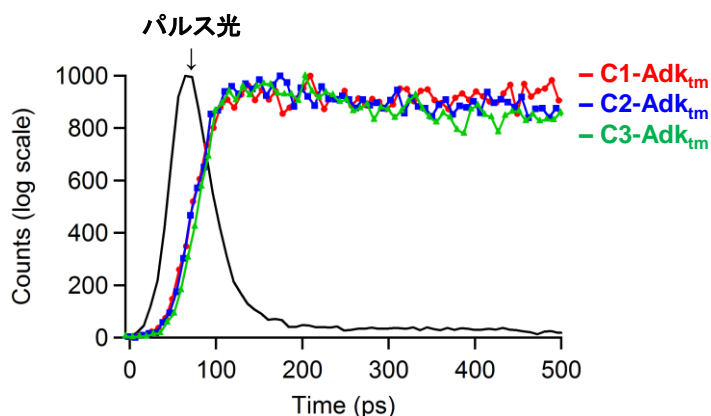
メチレンリンカーの伸長により、 $\tau_1$ の成分比率の上昇 (C1-Adk<sub>tm</sub> (0.27) < C2-Adk<sub>tm</sub> (0.49) < C3-Adk<sub>tm</sub> (0.60)) が見られた。この結果は、C1 – C3 ピレンの構造的要因が sandwich 型エキシマーの形成に影響を与えていることを示唆している。その一つとして、OPEN C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命  $\tau_2$ の変化および CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光量子収率 (Table 3 – 3 – I) の結果から予想されるピレン分子のフレキシビリティが考えられる。

長寿命成分に着目すると、C1-Adk<sub>tm</sub>は少なくとも2成分 ( $\tau_2, \tau_2'$ ) 存在することを示した。時定数に大きな違いはないが、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>の485 nmの蛍光減衰を double exponential でフィッティングを試みると、短時間領域の偏差が増大し、良好なフィッティング曲線が得られない ( $\chi^2 > 1.1$ )。従って triple exponential でのフィッティングが妥当である。これら2つの成分は Figure 3 – 6 – V に示すような twisted sandwich 型および parallel sandwich 型のエキシマーが観測されていると考えられる<sup>97</sup>。一方 C2-Adk<sub>tm</sub>、C3-Adk<sub>tm</sub>の長寿命成分 ( $\tau_3$ ) は1成分でフィッティングされた。この原因の一つとして上述のリンカーの伸長によるピレン分子のフレキシビリティが上昇し、本来2成分の長寿命成分が存在していたとしても、1成分の蛍光成分として平均化されていることが考えられる。



**Figure 3 – 6 – V.** ピレンスタッキングの配向. (a) twisted sandwich型エキシマー. (b) parallel sandwich型エキシマー.

UV-Vis、励起スペクトルおよび CD スペクトルより、C2-Adk<sub>tm</sub> 表面のピレン分子は基底状態でスタッキングしていないことを示しており、また蛍光寿命からピレン分子のフレキシビリティに關与する partially stacking 型エキシマーの寄与が大きくなる。これらの結果は C2-Adk<sub>tm</sub> のエキシマーにおいて dynamic excimer の寄与が増大することを示している。dynamic excimer は蛍光減衰においてパルス光照射後エキシマー発光の立ち上がりが見られる。しかし C2-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光においてそのような蛍光の立ち上がりは見られなかった (**Figure 3 – 6 – VI**)。ピレン修飾ポリマーの系では dynamic excimer が観測されているが<sup>64</sup>、ポリマー主鎖のフレキシビリティの關与も dynamic excimer の形成に寄与していると考えられる。しかし、本系ではリジッドな  $\alpha$ -ヘリックス上にピレンプローブが修飾されており、またあらかじめ接近したアミノ酸部位にピレンが修飾されているため、エキシマー形成が非常に早く、今回の蛍光減衰の分解能では観測できなかつたと考えられる。



**Figure 3 – 6 – VI.** 短時間領域における蛍光減衰曲線. 条件: [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 50  $\mu$ M.  $\lambda_{ex}$  = 375 nm with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.

メチレンリンカーの伸長により partially stacking 型エキシマーの寄与が大きくなることから、C3 ピレンのフレキシビリティの上昇により、partially stacking 型エキシマーからピレンモノマーへの解離が促進するため、定常状態蛍光スペクトルにおいてメチレンリンカーの伸長に伴いエキシマー発光強度が低下すると解釈される。

### 3-7. C1-C3-Adk<sub>tm</sub> 表面におけるピレン分子のスタッキングモード

#### ・C1-Adk<sub>tm</sub>

CLOSED 状態のピレン修飾型 Adk<sub>tm</sub> 中、C1-Adk<sub>tm</sub> において最も高いエキシマー発光強度が観測された (Figure 3-3-IV)。これは Ap<sub>5</sub>A との結合により、C1-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレンが最も効率的にダイマーを形成していることを示している。CLOSED C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の定常状態スペクトル測定において、C1-Adk<sub>tm</sub> が最も大きな  $\Delta P_{\text{abs}}$  (Table 3-4-I)、 $\Delta P_{\text{excit}}$  (Table 3-4-II) を示し、CD スペクトル (Figure 3-4-IV) において励起子相互作用を示したことから、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> 表面のピレン分子は基底状態で相互作用していることを示している。また、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造 (Figure 3-5-I) よりタンパク質表面上でピレン環同士がスタックしていた。しかし、UV-Vis、励起スペクトルにおいて <sup>1</sup>La 遷移に由来する吸収バンドの長波長シフトが見られないことから、ピレノファンや RNA 導入ピレンの様に、C1 ピレンの動きが完全に固定されているわけではなくピレン分子の揺らぎがあることを示している。C1-Adk<sub>tm</sub> の 485 nm の蛍光寿命より、partially stacking 型ダイマーに起因する  $\tau_1$  が得られ、分子の揺らぎに起因する 2 つの sandwich 型エキシマー ( $\tau_2, \tau_2'$ ) が観測されたことから (Table 3-6-III)、溶液中においてピレン分子の揺らぎがあることを示している。しかし、CD スペクトルで励起子相互作用が見られたことから基底状態でピレンが相互作用しており、蛍光寿命においてピレンが良好にスタックしている sandwich 型エキシマーが支配的であることが示されたことから、C1 ピレンのエキシマー発光は「static excimer」<sup>58-59, 62</sup> 形成の寄与が大きいことが示された。

#### ・C2-Adk<sub>tm</sub>

CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub> は UV-Vis および励起スペクトル (Table 3-4-I, II) において最も小さなブロードニングを示したことから、基底状態におけるピレンダイマーのポピュレーションは低いと解釈できる。また、CD スペクトルにおいて CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub> は弱いシグナルを示した (Figure 3-4-IV)。従って、メチレンリンカーの伸長によるフレキシビリティ等の構造的要因が効率的な基底状態ピレンダイマーの形成を抑制していると考えられる。485 nm の蛍光減衰曲線から、短寿命成分  $\tau_1$  の比率はメチレンリンカーの伸長に伴い上昇しており (C1-Adk<sub>tm</sub> < C2-Adk<sub>tm</sub> < C3-Adk<sub>tm</sub>) (Table 3-6-II)、これは partially stacking 型のエキシマーが増大していることを示している。OPEN C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の 396 nm の発光において、メチレンリンカーの伸長に伴い時定数  $\tau_2$  が減少し (Table 3-6-I)、CLOSED C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光量子収率において、C2-Adk<sub>tm</sub> の量子収率が C1-Adk<sub>tm</sub> と比較し低いことから (Table 3-3-I)、メチレンリンカーを伸長したピレン分子のフレキシビリティが partially stacking 型エキシマー形成の原因の一つと考えられる。基底状態のピレンダイマーの形成が抑制されていることから、特に C2-Adk<sub>tm</sub> に見られるエキシマー発光は「dynamic excimer」形成の寄与

が大きくなっているとみなすことができる。しかし 485 nm の蛍光減衰曲線からは、エキシマー発光に典型的な蛍光の立ち上がりは観測されなかった。これは CLOSED 状態におけるピレン分子間距離 (Cys55 – Cys169) が十分に接近しているため、パルス光の半値幅 64 ps 以内の早い時間スケールでエキシマーが形成されていることが考えられる。

#### ・C3-Adk<sub>tm</sub>

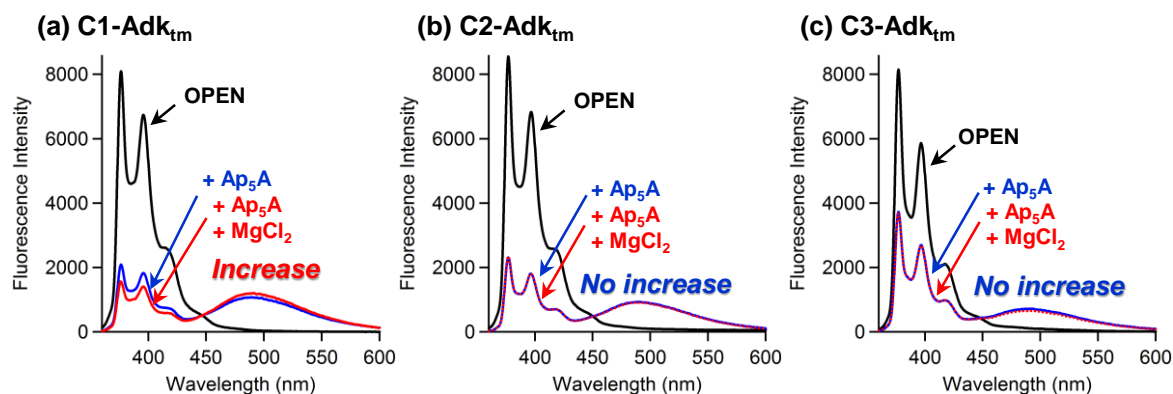
C2 ピレンからさらに 1 増炭した C3 ピレンを有する C3-Adk<sub>tm</sub> は、複雑な分光学的挙動を示した。UV-Vis および励起スペクトルにおいて CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> と比較し小さなブロードニングを示したが、CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub> よりも大きなブロードニングが見られた (Table 3 – 4 – I, II)。従って、C3 ピレンは C2 ピレンと比較し基底状態ピレンダイマーのポピュレーションが高いことが考えられるが、ブロードニングのみではその相互作用が強いものかどうかは不明瞭である。しかし、<sup>1</sup>La 遷移に由来する吸収バンドの長波長シフトが見られないことから、ピレン-ピレン相互作用は弱いと予測される。CD スペクトルでは CLOSED C3-Adk<sub>tm</sub> は C2-Adk<sub>tm</sub> よりも大きなシグナル強度を示した (Figure 3 – 4 – IV)。従って基底状態では、C3 ピレンの運動が摂動を受けていることが考えられる。しかし顕著な励起子相互作用が見られないため、UV-Vis、励起スペクトルの結果と合わせ、C3 ピレンの基底状態におけるスタッキングは C1 ピレンよりも弱いと解釈できる。

485 nm の蛍光減衰曲線からは partially stacking 型エキシマー ( $\tau_1$ ) の寄与がピレン修飾型 Adk<sub>tm</sub> の中で最も大きい。また、396 nm の蛍光減衰曲線から得られる蛍光寿命  $\tau_2$  が C1-Adk<sub>tm</sub>、C2-Adk<sub>tm</sub> と比較し減少していることから、励起状態では C3 ピレンのフレキシビリティが大きいと推測される。この結果は、UV-Vis、励起スペクトルから得られたブロードニングの順列と異なる (C1-Adk<sub>tm</sub> > C3-Adk<sub>tm</sub> > C2-Adk<sub>tm</sub>)。しかし基底状態における C3 ピレンのスタッキングは弱いことから、励起状態では C3 ピレンのフレキシビリティの効果が強調して現れていると考えられる。

2 次構造 (Figure 3 – 2 – III)、活性測定 (Figure 3 – 2 – IV)、酵素活性における Ap<sub>5</sub>A による阻害挙動 (Figure 3 – 3 – V) より、C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> は類似の CLOSED 構造を形成しているが、そのエキシマー発光強度および発光挙動はピレン分子構造により大きく変化した。従ってピレンプローブのエキシマー発光を利用し、タンパク質のドメイン間距離もしくはタンパク質ダイナミクスによるドメインの接近を評価する際、定常状態のエキシマー発光強度のみでなく、定常状態および時間分解分光測定をフルセットで行い基底状態および励起状態におけるピレンスタッキングを考慮することが重要である。

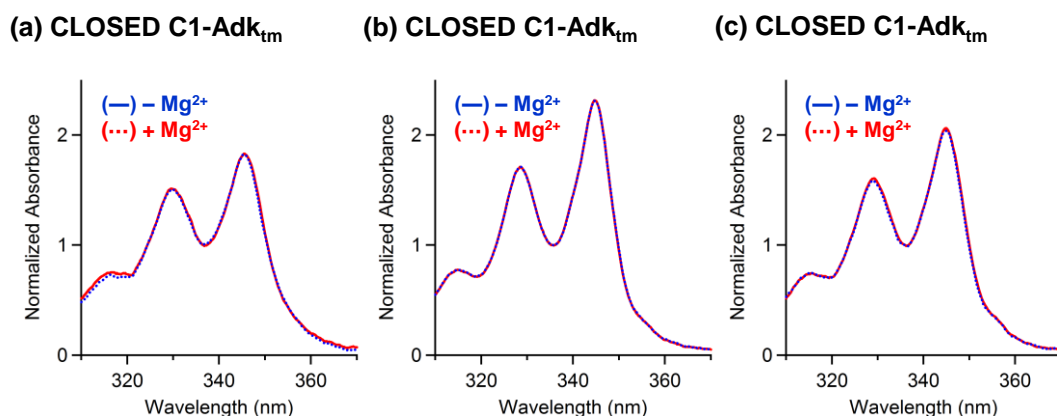
### 3-8. ピレン修飾 Adk<sub>tm</sub> の分光学的特性における Mg<sup>2+</sup>効果

アデニル酸キナーゼはリン酸転移反応を触媒するが、酵素反応が Mg<sup>2+</sup>濃度に依存することから実際には補因子である Mg<sup>2+</sup>が必要である<sup>80</sup>。反応過程では AMP が ATP に求核攻撃を行うが、Mg<sup>2+</sup>が ATP の β-及び γ-phosphate に結合し、転移する phosphate の電子的反発を和らげる<sup>98-99</sup>。Mg<sup>2+</sup>存在下、酵素反応の遷移状態に近い条件では C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトルの挙動に違いが見られた (Figure 3-8-I)。

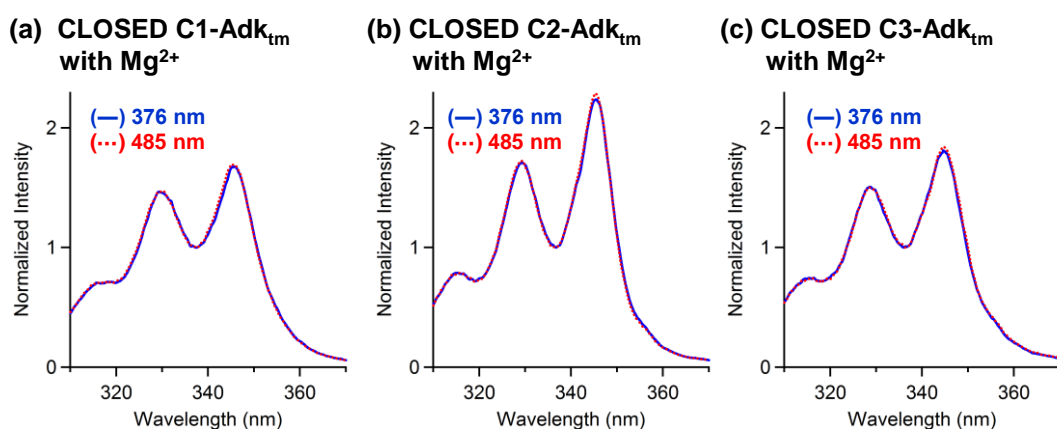


**Figure 3-8-I** Ap<sub>5</sub>A, MgCl<sub>2</sub> 添加による C1-C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトル変化. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (-) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (—) 10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下, (---) 10 μM Ap<sub>5</sub>A, MgCl<sub>2</sub> 存在下. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (-) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (—) 10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下, (---) 10 μM Ap<sub>5</sub>A, MgCl<sub>2</sub> 存在下. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. (-) Ap<sub>5</sub>A 非存在下, (—) 10 μM Ap<sub>5</sub>A 存在下, (---) 10 μM Ap<sub>5</sub>A, MgCl<sub>2</sub> 存在下. 条件: [C1-C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 0 or 10 μM. [MgCl<sub>2</sub>] = 0 or 5 mM. λ<sub>ex</sub> = 346 nm for C1-Adk<sub>tm</sub>, 345 nm for C2-Adk<sub>tm</sub> and C3-Adk<sub>tm</sub>.

Mg<sup>2+</sup>存在下、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> は更なるエキシマー発光強度の増大を示した。この原因の一つとして Mg<sup>2+</sup>の有無によってピレン環の配向が変化していることが考えられる。しかし、UV-Vis および励起スペクトルでは、Mg<sup>2+</sup>の有無によってスペクトルはほとんど変化を示さなかった (Figure 3 – 8 – II, III)。



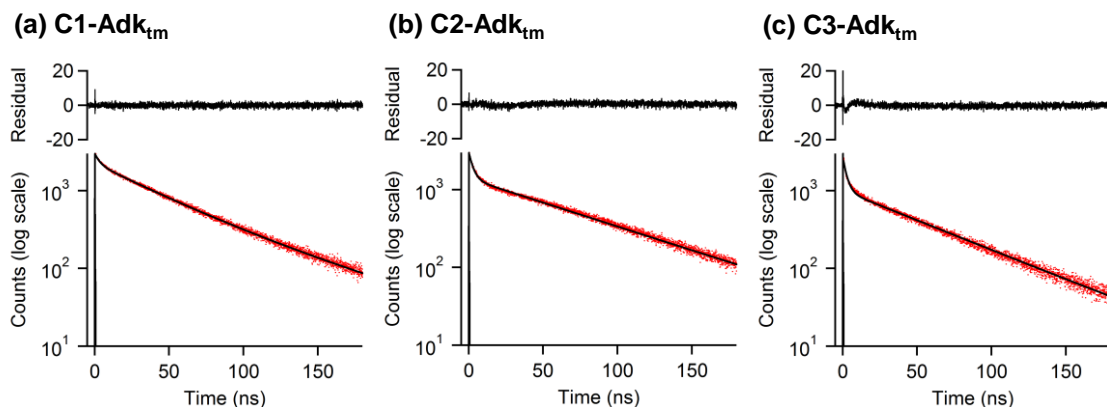
**Figure 3 – 8 – II.** MgCl<sub>2</sub>存在下におけるCLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>のUV-Visスペクトル変化. スペクトルは谷部分 (336 nm) の吸光度で規格化. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>, (–) Mg<sup>2+</sup>非存在下, (⋯) Mg<sup>2+</sup>存在下. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>, (–) Mg<sup>2+</sup>非存在下, (⋯) Mg<sup>2+</sup>存在下. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>, (–) Mg<sup>2+</sup>非存在下, (⋯) Mg<sup>2+</sup>存在下. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1 μM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 50 μM. [MgCl<sub>2</sub>] = 0 or 5 mM.



**Figure 3 – 8 – III.** MgCl<sub>2</sub>存在下におけるCLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の励起スペクトル. (a) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> with MgCl<sub>2</sub>, (–) モノマー発光波長 (376 nm) でモニター, (⋯) エキシマー発光波長 (485 nm) でモニター. (b) CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub> with MgCl<sub>2</sub>, (–) モノマー発光波長 (377 nm) でモニター, (⋯) エキシマー発光波長 (485 nm) でモニター. (c) CLOSED C3-Adk<sub>tm</sub> with MgCl<sub>2</sub>, (–) モノマー発光波長 (377 nm) でモニター, (⋯) エキシマー発光波長 (485 nm) でモニター. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 180 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 10 μM. [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM.

この結果より、Mg<sup>2+</sup>存在下においても、基底状態のピレンダイマー形成の比率が変化していないと考えられる。Mg<sup>2+</sup>存在下における485 nmの蛍光減衰曲線から得られる蛍光寿命も、Mg<sup>2+</sup>非存在下における時定数およびその比率と比較しほとんど変化していない (Figure 3 – 8 – IV)(Table 3 – 8 – I)。





**Figure 3 – 8 – IV.**  $\text{MgCl}_2$  存在下における CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の 485 nm における蛍光減衰曲線. (a) CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> with  $\text{MgCl}_2$ . (b) CLOSED C2-Adk<sub>tm</sub> with  $\text{MgCl}_2$ . (c) CLOSED C3-Adk<sub>tm</sub> with  $\text{MgCl}_2$ . 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [ $\text{Ap}_5\text{A}$ ] = 50  $\mu\text{M}$ . [ $\text{MgCl}_2$ ] = 5 mM.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 375 nm with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.

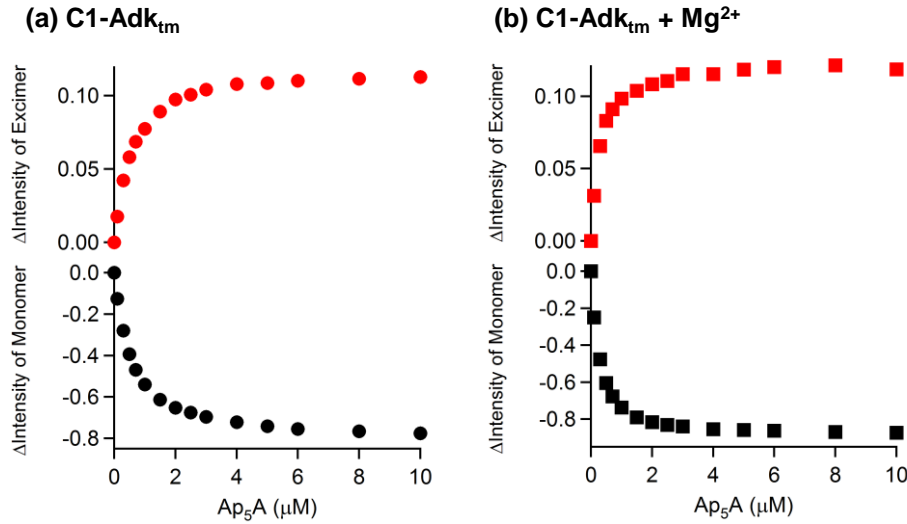
**Table 3 – 8 – I.**  $\text{Mg}^{2+}$  存在下における CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の蛍光寿命 (485 nm でモニター)

Protein	$\tau_1$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2'$ (CLOSED) (ns)	$\tau_3$ (CLOSED) (ns)	$\chi^2$
<b>C1-Adk<sub>tm</sub></b>	<b>Without <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	3.41 (0.27)	40.4 (0.53)	81.3 (0.20)	0.92
	<b>With <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	3.20 (0.25)	40.0 (0.54)	79.9 (0.21)	0.88
<b>C2-Adk<sub>tm</sub></b>	<b>Without <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	2.81 (0.49)		68.9 (0.51)	0.92
	<b>With <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	2.92 (0.54)		69.5 (0.46)	0.96
<b>C3-Adk<sub>tm</sub></b>	<b>Without <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	2.35 (0.60)		58.2 (0.40)	1.01
	<b>With <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	2.68 (0.62)		56.7 (0.38)	0.97

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C with 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ap}_5\text{A}$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$  under a  $\text{N}_2$  atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定 of 平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

これらの結果より、C1-Adk<sub>tm</sub> の蛍光スペクトルに見られた  $\text{Mg}^{2+}$  の効果は、修飾ピレンのスタッキングモードに起因する蛍光成分比率を顕著に変化させるものではなかった。

$Mg^{2+}$ 非存在下、存在下における  $Ap_5A$  添加に伴う  $C1-Adk_{tm}$  のモノマーおよびエキシマー発光強度を  $Ap_5A$  濃度に対してプロットした (Figure 3-8-V)。  $Mg^{2+}$ 存在下においても  $Ap_5A$  濃度の上昇に伴って  $C1-Adk_{tm}$  はエキシマー発光を示した。



**Figure 3-8-V.**  $Mg^{2+}$ 非存在下、存在下における  $Ap_5A$  濃度に対する  $C1-Adk_{tm}$  の蛍光強度変化. (a)  $C1-Adk_{tm} + Ap_5A$ , ● : エキシマー発光強度変化, ● : モノマー発光強度変化. (b)  $C1-Adk_{tm} + Ap_5A + MgCl_2$ , ■ : エキシマー発光強度変化, ■ : モノマー発光強度変化. 条件 :  $[C1-Adk_{tm}] = 180 \text{ nM}$  in  $50 \text{ mM Tris-HCl (pH 7.5)}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $[Ap_5A] = 0 \text{ to } 10 \text{ } \mu\text{M}$ .  $[MgCl_2] = 0 \text{ or } 5 \text{ mM}$ .  $\lambda_{ex} = 346 \text{ nm}$ .

これらのプロファイルから、 $Mg^{2+}$ 存在下/非存在下における  $Ap_5A$  の解離定数  $K_d$  を求めた。 $C1-Adk_{tm}$  濃度を  $[P]$ 、 $Ap_5A$  濃度を  $[L]$  とし、 $Ap_5A$  と結合し CLOSED 状態を形成している  $C1-Adk_{tm}$  濃度を  $[PL]$  とすると、解離定数  $K_d$  は次のように表される。

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (1)$$

ここで、 $C1-Adk_{tm}$  と  $Ap_5A$  の初期濃度  $[P]_0$ 、 $[L]_0$  は

$$[P]_0 = [P] + [PL] \quad (2)$$

$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad (3)$$

となる。ある濃度  $[PL]$  におけるエキシマー発光を  $F_{excimer}$ 、全ての  $C1-Adk_{tm}$  が  $Ap_5A$  と結合した場合、つまり  $[PL] = [P]_0$  の時のエキシマー発光を  $F_{max}$  としたときそれらの関係は

$$\frac{F_{excimer}}{F_{max}} = \frac{[PL]}{[P]_0} \quad (4)$$

で表され、これを変換すると、 $[PL]$  は

$$[PL] = \frac{F_{excimer}}{F_{max}} [P]_0 \quad (5)$$

と表される。

(2)式を(5)式に代入すると、[P]は

$$[P] = \frac{F_{\max} - F_{\text{excimer}}}{F_{\max}} [P]_0 \quad (6)$$

と表される。(3)式を(5)式に代入すると、[L]は

$$[L] = [L]_0 - \frac{F_{\text{excimer}}}{F_{\max}} [P]_0 \quad (7)$$

となる。(1)式を変換し

$$\frac{[P]}{[PL]} = \frac{K_d}{[L]} \quad (8)$$

(5)、(6)、(7)式を代入し、

$$\frac{F_{\max} - F_{\text{excimer}}}{F_{\text{excimer}}} = \frac{K_d}{[L]_0 - \alpha [P]_0} \quad (9)$$

$(\alpha = F_{\text{excimer}} / F_{\max})$

[L]に対して、[P] / [PL]をプロットすると直線関係が得られた (Figure 3 – 8 – VI (a), (c))。モノマー発光も同様に直線関係が得られた (Figure 3 – 8 – VI (b), (d))。その傾きから  $K_d$  を見積もった。

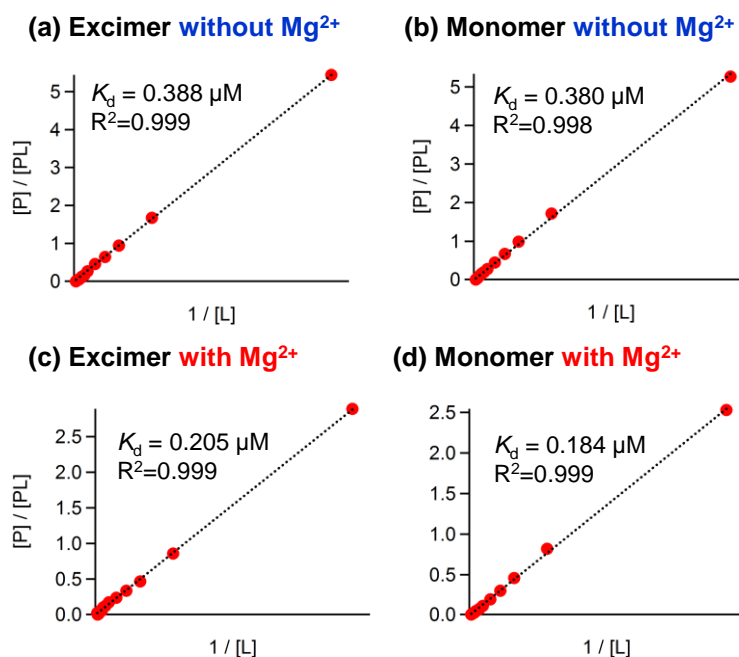
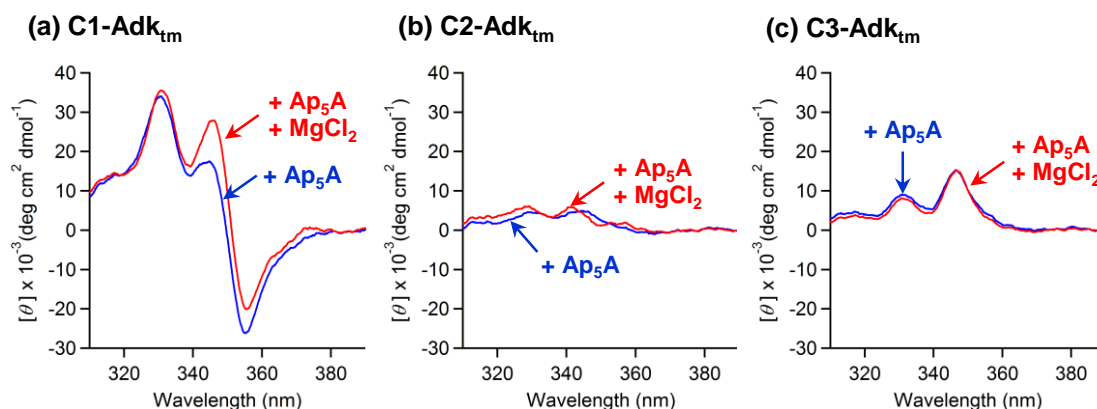


Figure 3 – 8 – VI.  $Ap_5A$  濃度に対する  $C1-Adk_{tm}$  の蛍光強度変化から求めた解離定数  $K_d$ .

$Mg^{2+}$ 存在下、 $K_d$  は  $Mg^{2+}$ 非存在下と比較し約 2 倍減少している。これは  $Mg^{2+}$ が  $Ap_5A$  とコンプレックスを形成することによって  $C1-Adk_{tm}$  との結合が強くなっていることが原因と考えられる。このことから、 $Mg^{2+}$ の有無によって  $Adk_{tm}$  と  $Ap_5A$  との親和性が上昇していることが考えられるが、 $C1 - C3-Adk_{tm}$  の CLOSED 状態のスペクト

ルは、スペクトル変化が飽和する濃度の  $\text{Ap}_5\text{A}$  を用いていることから、エキシマー発光強度の変化は CLOSED 状態のポピュレーションシフトが主な原因であるとは考えづらい。

$\text{Ap}_5\text{A}$  存在下、CLOSED C1 – C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の CD スペクトルにおいて、 $\text{Mg}^{2+}$  を添加することで C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  は顕著なスペクトルの変化を示した (Figure 3 – 8 – VII)。



**Figure 3 – 8 – VII.**  $\text{MgCl}_2$  添加による CLOSED C1 – C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の CD スペクトル変化 (310 – 390 nm). (a) C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ . (–)  $\text{Ap}_5\text{A}$  存在下, (–)  $\text{Ap}_5\text{A}$ ,  $\text{MgCl}_2$  存在下. (b) C2- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ . (–)  $\text{Ap}_5\text{A}$  存在下, (–)  $\text{Ap}_5\text{A}$ ,  $\text{MgCl}_2$  存在下. (c) C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ . (–)  $\text{Ap}_5\text{A}$  存在下, (–)  $\text{Ap}_5\text{A}$ ,  $\text{MgCl}_2$  存在下. 条件:  $[\text{protein}] = 35 \mu\text{M}$  in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), at 25 °C.  $[\text{Ap}_5\text{A}] = 1.5 \text{ mM}$ .  $[\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ .

この結果は、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下において CLOSED 状態のタンパク質表面のピレン分子の配向が変化していることを示している。励起子相互作用はピレン分子の遷移モーメントの相互作用によって生じるため、遷移モーメントの相互作用の変化がエキシマー発光強度に影響を与えていると考えられる。この CD スペクトルの結果は、基質結合状態と ( $\text{Ap}_5\text{A}$  存在下) 酵素反応における遷移状態 ( $\text{Ap}_5\text{A}$ ,  $\text{MgCl}_2$  存在下) におけるアデニル酸キナーゼは異なる CLOSED 構造を形成していると解釈できる。 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ap}_5\text{A}$  とコンプレックスを形成した *B. stearothermophilus* アデニル酸キナーゼの結晶構造 (PDB: 1ZIO) では、 $\text{Mg}^{2+}$  は  $\text{Ap}_5\text{A}$  の、ATP に対応する  $\beta$ -及び  $\gamma$ -phosphate と結合し、 $\text{Mg}^{2+}$  に配位している水分子が Asp84 と水素結合を形成している。今回用いている大腸菌由来アデニル酸キナーゼ (PDB: 1AKE) の研究においても、 $\text{Mg}^{2+}$  に配位している水分子が Asp84 と水素結合を形成することを示唆しており<sup>98</sup>(Figure 3 – 8 – VIII)、 $\text{Mg}^{2+}$  に配位している水分子と水素結合しているアミノ酸に変異を施すと酵素活性が低下する<sup>100</sup>。また、NMR 分析よりその変異体は  $\text{Mg}^{2+}$  存在下においても局所的な構造的摂動を示さない<sup>101</sup>。つまり、 $\text{Mg}^{2+}$  と相互作用するアミノ酸は酵素活性に重要な役割を果たしている。今回 C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の蛍光スペクトルおよび CD スペクトルにおいて見られた  $\text{Mg}^{2+}$  効果は、タンパク質内部の局所的な摂動を反映していると考えられる。従って、タンパク質表面上で効率よくエキシマー発光を示す C1 ピレンは、タンパク質の微小な構

造の変化をスペクトルに反映するのに適したプローブであると解釈できる。

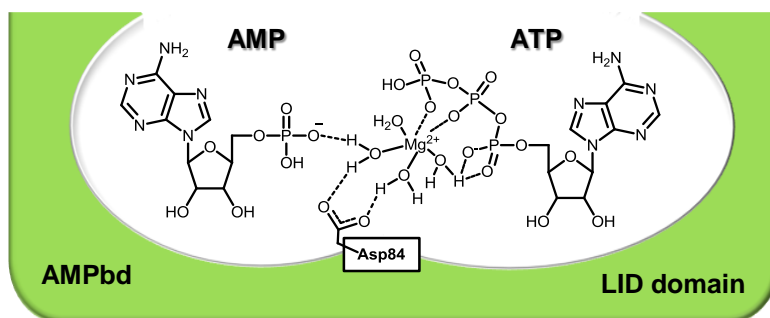


Figure 3 – 8 – VIII. 基質結合状態のアデニル酸キナーゼ構造中における  $Mg^{2+}$  の配位結合様式<sup>98</sup>.

### 3-9. まとめ

本章では、エキシマー発光とピレン分子構造に起因するピレンスタッキングモードを調べ、タンパク質プローブとしてピレンを用いる際には、定常状態、時間分解分光測定をフルセットで行い、ピレンプローブのスタッキングモードを考慮することの重要性を示すことを目的とし、炭素数の異なるメチレンカーを有するピレン分子 (C1-C3-pyrene-IAA) をそれぞれ Adk<sub>tm</sub> (A55C/C77S/C169V) に修飾し、その定常状態、時間分解的分光測定を行い基底状態、励起状態におけるピレンスタッキングを評価した。

定常状態の蛍光スペクトルにおいて、阻害剤 Ap<sub>5</sub>A 存在下、C1-C3-Adk<sub>tm</sub> は異なるエキシマー発光強度を示した (C1-Adk<sub>tm</sub> > C2-Adk<sub>tm</sub> > C3-Adk<sub>tm</sub>)。UV-Vis、励起スペクトル及び CD スペクトルより、CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> 表面上のピレン分子は基底状態でスタックしていることを示し、実際に CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> の結晶構造より、タンパク質表面でピレンがスタックしていることが構造的に確認された。また、485 nm の蛍光減衰曲線より、C1-Adk<sub>tm</sub> のエキシマー発光成分は sandwich 型エキシマーが支配的であることが示された。これらの結果より、C1-Adk<sub>tm</sub> において観測されたエキシマー発光は「static excimer」形成の寄与が大きい。

一方、メチレンリンカーの炭素鎖を 1 増炭した C2-Adk<sub>tm</sub>、2 増炭した C3-Adk<sub>tm</sub> では定常状態分光測定より、基底状態ピレンダイマーのポピュレーションが C1-Adk<sub>tm</sub> と比較し小さくなっており、485 nm の蛍光減衰曲線より partially stacking 型エキシマーの比率が上昇した (C1-Adk<sub>tm</sub> < C2-Adk<sub>tm</sub> < C3-Adk<sub>tm</sub>)。これは励起状態において、ピレン分子のフレキシビリティがピレンスタッキングに影響を与えていると解釈できる。

基底状態でピレンダイマーを効率的に形成する CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub> において、Mg<sup>2+</sup>存在下、蛍光スペクトルではエキシマー発光強度の上昇、CD スペクトルではピレン分子の配向の変化が観測された。これは酵素反応における遷移状態において、Mg<sup>2+</sup>が基質とタンパク質内部のアミノ酸と結合することによる局所的摂動を示している。

この様に定常状態、時間分解的分光測定および結晶構造を組み合わせることで、定常状態蛍光スペクトルにおけるエキシマー発光強度がピレンスタッキング様式により変化することが示された。従って、タンパク質ドメイン間の相互作用を調べる場合、定常状態と時間分解的分光測定を組み合わせることでプローブ間の相互作用 (距離、配向、基底状態および励起状態における相互作用) を考慮することがスペクトルの解釈において重要である。また、適切な構造を有するプローブを選択することでタンパク質の微小な構造揺らぎを検出できる可能性が示された。

### 3 – 10. 実験項

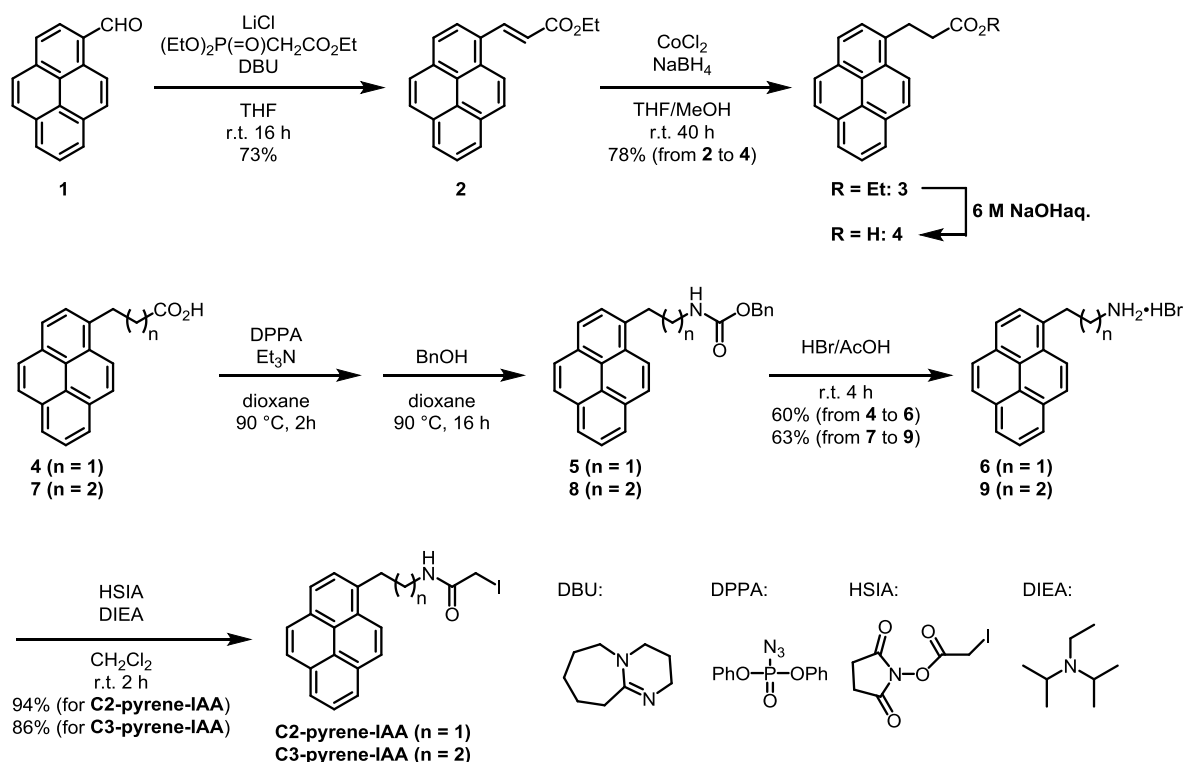
#### 3 – 10 – 1. Materials and Instruments

All Chemicals were obtained from conventional commercial source and used as received unless otherwise noted. The plasmid pEAK91 harboring Adk<sub>tm</sub> (A55C/C77S/V169C) was prepared from the plasmid coding the double mutant of *E. coli* Adk (A55C/C77S) (gifted by Prof. E. Haas, Bar-Ilan Univ., Israel) by site-directed mutagenesis using inverse PCR method. Primers for PCR were purchased from Invitrogen (Forward primer : ACGTTTACGTAC-CGTCTCTTCCTGATC, Reverse primer : CTGTGTGAATACCATCAGATGACAGCA). A kit for plasmid extraction (QIAprep Spin Miniprep Kit) was purchased from QIAGEN. KOD-plus-Mutagenesis Kit for inverse PCR was purchased from TOYOBO. *E. coli*. HB101 competent cell was purchased from TaKaRa. Hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from baker's yeast were purchased from Sigma as a mixed material (catalog code : H8629 – 500UN). NMR spectra were collected on a JEOL JNM-ECP400 spectrometer. The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts are reported in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) or the residual solvent protons. Protein purification was conducted using ÄKTA FPLC chromatography system in a chromatochamber (4 °C). DEAE Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow, Blue Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow, HiLoad<sup>TM</sup> 26/600 Superdex<sup>TM</sup> 75 pg, PD-10 Desalting Column and HiTrap Desalting Column (5 mL) were purchased from GE Healthcare. ESI-MS analysis was carried out using a JEOL JMS-T100LC mass spectrometer. MALDI-TOF-MS analyses were

conducted using a Bruker Autoflex II mass spectrometer. Pyrene-modified Adk<sub>tm</sub> was purified using BIO-RAD BioLogic DuoFlow liquid chromatography system. Mono Q 5/50 GL for purification of Pyrene-modified Adk<sub>tm</sub> was purchased from GE Healthcare. UV-Vis spectra were measured using a Shimadzu UV-2550 double beam spectrometer. CD (circular dichroism) spectra were collected using a JASCO J-725 circular dichroism spectropolarimeter. Fluorescence spectra were measured using a JASCO FP-8300 fluorescence spectrometer. Fluorescence lifetimes were measured by the time-correlated single photon counting (TCSPC) method using a FluoTime 200 (PicoQuant) TCSPC spectrophotometer with a picosecond laser system (LDH-P-C-375 and PDL-200B, PicoQuant).



### 3 – 10 – 2. Synthesis of C2-pyrene-IAA and C3-pyrene-IAA (Scheme 3 – 10 – I)



**Scheme 3 – 10 – I.** Synthetic route of C2-pyrene-IAA and C3-pyrene-IAA.

### Procedure for synthesis of pyrenyl iodoacetamide C2-pyrene-IAA

#### Preparation of ethyl (1-pyrenyl)acrylate **2**<sup>102</sup>

In a 200-mL round bottom flask, 1-pyrenecarbaldehyde (**1**, 2.30 g, 10 mmol) and LiCl (42 mg, 1 mmol) were dissolved in THF (40 mL). To the solution were added ethyl diethylphosphonoacetate (2.46 g, 1.1 mmol) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU, 1.67 g, 11 mmol). The solution was stirred at room temperature for 16 h. After neutralization with 1 M HCl, the solution was poured into ice. The product was extracted with toluene three times and the organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated to afford

yellow oil. The addition of MeOH gave yellow solid, which was collected by filtration. After dried *in vacuo*, compound **2** was obtained as yellow powder (2.2 g, yield 73%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 8.81 (1H, d,  $J$  = 15.8 Hz, pyrene- $\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{Et}$ ), 8.46 (1H, d, 9.3 Hz, 6-pyrene-H), 8.26–8.00 (8H, m, pyrene-H other than 6-pyrene-H), 6.69 (1H, d,  $J$  = 15.8 Hz, pyrene- $\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{Et}$ ), 4.36 (2H, q,  $J$  = 7.1 Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.41 (3H, t,  $J$  = 7.1 Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 167.2, 141.4, 132.7, 131.3, 130.7, 129.7, 128.59, 128.56, 128.3, 127.4, 126.3, 126.0, 125.8, 125.1, 124.9, 124.7, 124.2, 122.3, 120.4, 60.66, 14.44.

### *Preparation of ethyl (1-pyrenyl)propionate 3*

In a 200 mL-round bottom flask equipped with a  $\text{CaCl}_2$ -tube, compound **2** (1.15g, 3.8 mmol) was dissolved in mixed solvent of MeOH (20 mL) / THF (10 mL). To the solution was added  $\text{CoCl}_2$  (0.179 g, 1.38 mmol). The solution became dark green in color. To the solution was dropwise  $\text{NaBH}_4$  (0.294 g, 7.78 mmol). During the addition, gas evolution was observed. The reaction mixture was stirred at room temperature for 40 h to become yellowish brown in color. After the solvent was evaporated, the residue was treated with 1 M  $\text{HCl}$  aq. (50 mL). The product was extracted with toluene twice, and the organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After the solvent was evaporated, the residue was treated with cold MeOH. The formed solid was collected by filtration to obtain compound **3** as yellow powder. The material was used for

the next reaction without further purification.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 8.30–7.90 (9H, m, pyrene-H), 4.16 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.70 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ), 2.86 (2H, t,  $J$  = 7.8 Hz, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ), 1.24 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 172.98, 134.6, 131.4, 130.8, 130.2, 128.6, 127.6, 127.5, 127.1, 126.9, 125.9, 125.1, 125.0, 124.94, 124.91, 124.89, 123.0, 60.58, 36.11, 28.68, 14.23.

#### *Preparation of (1-pyrenyl)propionic acid 4*

In a 200 mL-round bottom flask, compound **3** obtained above was dissolved in THF (10 mL), and 6 M NaOH<sub>aq</sub>. (3 mL) was added dropwise. The yellow solution became dark brown in color. After the solution was stirred at room temperature for 16 h, yellow solid was formed. The solvent was evaporated and 0.1 M HCl was added. The formed solid was collected by filtration and rinsed with cold water. The solid was dissolved in mixed solvent of THF and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and the solution was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After the solvent was evaporated, the solid was recrystallized from AcOEt-hexane. Compound **4** was obtained as yellowish solid (0.82 g, yield 78% through 2 steps).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 8.30–7.90 (9H, m, pyrene protons), 4.16 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.68 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ), 2.85 (2H, t,  $J$  = 7.8 Hz, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ), 1.24 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

*Preparation of N-benzyloxycarbonyl (1-pyrenyl)ethyleneamine 5*

In a 100 mL-two necked flask equipped with a condenser and a three-way cock, compound **4** (0.802 g, 2.9 mmol) was dissolved in dry dioxane (10 mL) under a N<sub>2</sub> atmosphere to prepare a red solution. To the red solution was added Et<sub>3</sub>N (0.356 g, 3.5 mmol, dried over NaOH) and diphenylphosphoryl azide (DPPA, 0.969 g, 3.5 mmol) using syringes. The solution was stirred at 90–100 °C for 2 h under a N<sub>2</sub> atmosphere. After cooling, the formation of an isocyanate species was confirmed on TLC (*R<sub>f</sub>* ~ 0.68, silica gel, hexane/AcOEt = 4/1). To the reaction mixture was added benzyl alcohol (0.381 g, 3.5 mmol) under N<sub>2</sub> stream. The reaction solution was stirred at 90 °C for 15 h. After cooled to room temperature, the solution was diluted with toluene (50 mL). The solution was washed with 5% citric acid twice and brine. The organic phase dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> before the solvent was evaporated to yield red oily residue. The product was purified by silica gel chromatography with elution of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The fractions with *R<sub>f</sub>* ~ 0.68 on TLC (silica gel, hexane/AcOEt = 4/1) were collected and the solvent was evaporated to yield orange oily residue. The addition of hexane afforded compound **5** as pale yellow solid, which was directly used for the next reaction. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ = 8.30–7.98 (9H, m, pyrene protons), 7.85 (1H, br, -NH), 7.35 (5H, m, phenyl protons), 5.13 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>-) 3.67 (2H, m, pyrene-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.60 (2H, m, pyrene-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ = 178.3, 134.0, 131.4, 130.8, 130.2, 128.6, 127.8, 127.5, 127.0, 126.9, 126.0, 125.1, 125.0, 124.97, 124.95, 124.93, 122.8,

35.65, 28.34.

#### *Preparation of (1-pyrenyl)ethyleneamine hydrobromide 6*

In a 100-mL round bottom flask, compound **5** obtained above was dissolved in THF (7 mL) and 25% HBr in AcOH (5 mL) was added. After 5 min, white solid was formed. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, and ether was added. The formed solid was collected by filtration and rinsed with ether. The solid was dried *in vacuo* to yield compound **6** as greenish solid (0.57 g, yield 60% through 2 steps). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO *d*-6)  $\delta$  = 8.44 (1H, d, pyrene proton,  $J$  = 8.0 Hz), 8.33–8.27 (4H, m, pyrene protons), 8.17–8.00 (6H, m, 4 pyrene protons and amine protons), 3.66 (2H, t, pyrene–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–,  $J$  = 8.0 Hz), 3.26–3.18 (2H, m, pyrene–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO-*d*6, residual proton from DMSO)  $\delta$  = 131.5, 130.82, 130.34, 130.04, 128.51, 127.94, 127.82, 127.40, 127.07, 126.35, 125.32, 125.15, 125.12, 124.25, 124.0, 123.06, 40.2, 30.65.

#### *Preparation of C2-pyrene-IAA*

In a 50 mL-round bottom flask, compound **6** (10 mg, 0.031 mmol) and *N,N'*-diisopropylamine (8.0 mg, 0.062 mmol) were dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). After *N*-hydroxysuccinimidyl iodoacetate (HSIA, 11 mg, 0.037 mmol) was added to the solution, the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h in the dark. The solution was

washed with water three times and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was evaporated to afford compound **C2** as white solid (12 mg, yield 94%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 8.33 (1H, d, pyrene proton,  $J$  = 9.16 Hz), 8.21–8.14 (4H, m, pyrene protons), 8.06–8.00 (3H, m, pyrene protons), 7.90 (1H, d, pyrene proton,  $J$  = 8 Hz), 3.77 (2H, m, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ), 3.66 (2H, s,  $-\text{CH}_2\text{I}$ ) 3.60 (2H, t,  $J$  = 7.06 Hz, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 166.83, 132.42, 131.39, 130.85, 130.45, 129.15, 127.95, 127.78, 127.44, 127.14, 126.05, 125.21, 125.15, 125.06, 124.95, 124.89, 123.0, 41.89, 32.97, -0.48. ESI-HRMS (positive mode) calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{INO}^+$  413.0277; found 413.0279.

### **Procedure for synthesis of pyrenyl iodoacetamide C3-pyrene-IAA**

#### *Preparation of N-benzyloxycarbonyl (1-pyrenyl)-propylamine 8*

In a 100 mL-two necked flask equipped with a condenser and a three-way cock, (1-pyrenyl)butyric acid (**7**, 288 mg, 1.0 mmol) was dissolved in dry dioxane (5 mL) under a  $\text{N}_2$  atmosphere. To the solution was added  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.121 g, 1.2 mmol, dried over NaOH) and diphenylphosphoryl azide (DPPA, 0.330 mg, 1.2 mmol) using syringes. The solution was stirred at 90–100 °C for 1 h under a  $\text{N}_2$  atmosphere. After cooling, the formation of an isocyanate species was confirmed on TLC ( $R_f$  ~ 0.3, silica gel, hexane/AcOEt = 4/1). To the reaction mixture was added benzyl alcohol (0.130 g, 1.2 mmol) under a  $\text{N}_2$  stream. The reaction solution was stirred at 80 °C for 12 h. After cooled to room temperature, the solution

was concentrated. The resultant oily residue was subjected to silica gel column chromatography with elution of hexane/AcOEt = 1/1. The fractions with  $R_f \sim 0.4$  on TLC were collected and the solvent was evaporated to yield compound **8** as yellow solid. The material was directly used for the next reaction. 8.27–7.97 (9H, m, pyrene protons), 7.41–7.23 (5H, m, phenyl protons), 5.11 (2H, s, phenyl- $\underline{\text{CH}_2}$ -), 3.42–3.34 (4H, m, pyrene- $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{NH}$ -), 2.13–2.04 (2H, m, pyrene- $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{NH}$ -).

#### *Preparation of (1-pyrenyl)propylamine hydrobromide 9*

Compound **9** was prepared by the same manner as the preparation of **6** and obtained as pale yellow solid (63% through 2 steps).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  = 8.32 (1H, d, pyrene proton,  $J$  = 9.6 Hz), 8.25–8.14 (4H, m, pyrene protons), 8.10–8.00 (3H, m, pyrene protons), 7.92 (1H, d, pyrene proton,  $J$  = 8.00 Hz), 3.33 (2H, t, pyrene- $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{CH}_2$ -,  $J$  = 7.6 Hz), 2.92 (2H, t, pyrene- $\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}$ -), 2.00 (2H, dt, pyrene- $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2$ -,  $J$  = 7.6 Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ , residual proton from DMSO)  $\delta$  = 136.03, 131.41, 130.92, 130.02, 128.64, 127.97, 127.93, 127.91, 127.24, 126.78, 125.63, 125.56, 125.47, 124.78, 124.62, 123.95, 39.30, 30.05, 29.76.

#### *Preparation of C3-pyrene-IAA*

Compound **C3** was prepared from (1-pyrenyl)propylamine hydrobromide **9** (20 mg, 0.068

mmol) in the same manner as the preparation of **C2**. Compound **C3** was obtained with 86% yield (25 mg).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 8.27 (d, 1H,  $J$  = 9.24 Hz, pyrene), 8.19–8.12 (m, 4H, pyrene), 8.04–7.98 (m, 3H, pyrene), 7.88 (d, 1H,  $J$  = 7.76 Hz, pyrene), 3.65 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{I}$ ), 3.46–3.40 (m, 4H, pyrene– $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ), 2.16–2.09 (m, 2H, pyrene– $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 166.65, 135.33, 131.42, 130.85, 130.07, 128.58, 127.57, 127.48, 127.19, 126.83, 125.94, 125.16, 125.06, 124.98, 124.93, 124.87, 123.07, 40.33, 31.16, 30.79, –0.36. ESI-HRMS (positive mode) calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{INO}^+$  427.0433; found 427.0431.

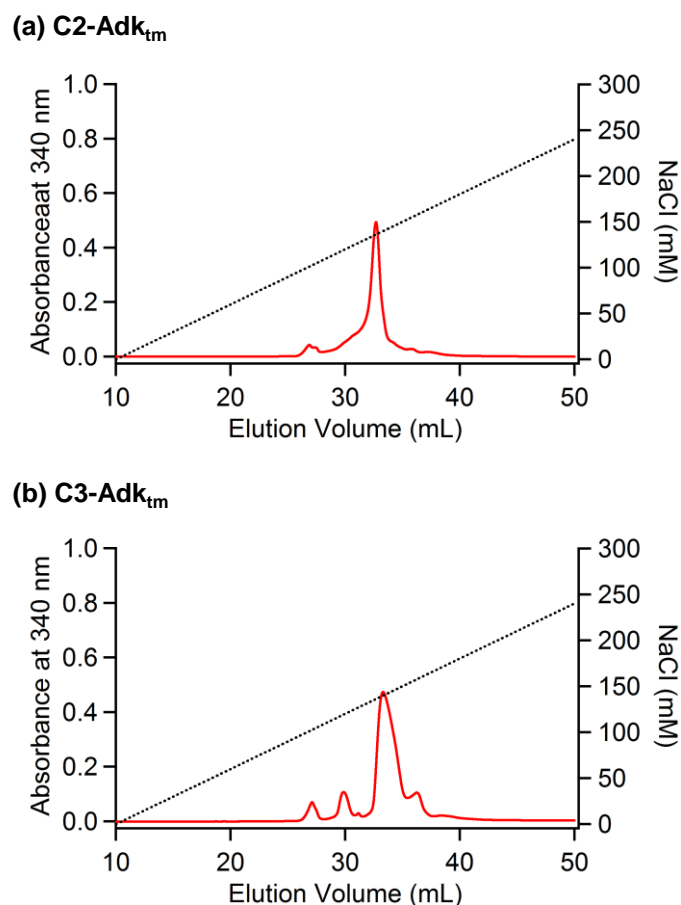
### **3 – 10 – 3. Preparation of adenylate kinase triple mutant ( $\text{Adk}_{\text{tm}}$ , A55C/C77S/V169C)**

$\text{Adk}_{\text{tm}}$  was prepared using same procedure in chapter 2.

### **3 – 10 – 4. Bio-conjugation of $\text{Adk}_{\text{tm}}$ with C2-pyrene-IAA and C3-pyrene-IAA**

Preparation and purification of pyrene-conjugated  $\text{Adk}_{\text{tm}}$  with C2-pyrene-IAA or C3-pyrene-IAA were conducted using same procedure in chapter 2. The pyrene-conjugated protein was eluted at the elution volume of 31–34 mL (for C2- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ ) and 32–35 mL for (C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ ) in the chromatograph of purification by MonoQ (**Figure 3 – 10 – I**). The collected protein solution was desalted using a HiTrap desalting column (5 mL, GE healthcare), lyophilized and kept at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .





**Figure 3 – 10 – I.** Elution curve of purification by Mono Q column with linear gradient of NaCl (0 – 300 mM over 60 mL). Flow rate = 0.5 mL/min. (a) C2-Adk<sub>tm</sub>. (b) C3-Adk<sub>tm</sub>.

### 3 – 10 – 5. Adk activity of Adk<sub>tm</sub>

The phosphoryl transfer activities of C2, C3-Adk<sub>tm</sub>s were confirmed by same protocol in chapter 2.

### 3 – 10 – 6. Measurements of UV-vis, CD spectra and steady-state fluorescence.

All UV-vis, steady-state fluorescence and CD spectra were measured by same condition in chapter 2.

### 3 – 10 – 7. Measurements of fluorescence quantum yields.

The relative fluorescence quantum yields of a pyrene-conjugated Adk<sub>tm</sub> ( $\Phi_F$ s) were determined using the quantum yield of 9,10-diphenylanthracene ( $\Phi_{st} = 0.95$ ) in ethanol as a reference<sup>52</sup>. The value of  $\Phi_F$  was calculated with the following equation<sup>103</sup>:

$$\phi_F = \phi_{st} \frac{\int I_P A_{st} Ri_W^2}{\int I_{st} A_P Ri_E^2} \quad (\text{Eq.1})$$

where  $\int I_P$  is the integrated fluorescence intensity of a C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> under N<sub>2</sub> atmosphere,  $\int I_{st}$  is the integrated fluorescence intensity of the standard sample under N<sub>2</sub> atmosphere,  $A_{st}$  and  $A_P$  is the absorbance of the standard sample and the protein samples at the excitation wavelength (340 nm), respectively.  $Ri_W$  and  $Ri_E$  are refractive indexes of water and ethanol, respectively ( $Ri_W = 1.333$  and  $Ri_E = 1.362$ ).

### 3 – 10 – 8. Measurements of fluorescence lifetimes.

Protein samples for TCSPC fluorescence lifetime measurements were anaerobically prepared and sealed with a septum to avoid air contact. After the sample solution was excited at 375 nm by a laser pulse with full width at a half maximum (FWHM) of 64 ps, the fluorescence decays at 396 nm (for OPEN-form proteins), 450 nm and 485 nm (for CLOSED-form proteins) were monitored at 25 °C with a time-resolution of 64 ps. The excitation wavelength was selected in order to avoid the complexity caused by the excitation of pyrene to higher energy levels than S<sub>1</sub>-state. The obtained fluorescence decay was analyzed by (Eq. 2):

$$I(t) = \int_{-\infty}^t F_{IR}(t') \sum_{i=1}^n A_i \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau_i}\right) dt' \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $I(t)$  is the observed fluorescence decay,  $F_{IR}(t')$  is the instrument response function of

excitation pulse,  $A_i$  is a fraction of decay component  $i$ , and  $\tau_i$  is a fluorescence relaxation time (life-time) of decay component  $i$ .

### **3 – 10 – 9. Crystallization and X-ray diffraction collection of the CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>.**

To a concentrated solution of purified C1-Adk<sub>tm</sub> sample in 50 mM Tris-HCl (pH = 7.5, 8.5 mg/mL) was added MgCl<sub>2</sub> and Ap<sub>5</sub>A in water (2 mM in final). The C1-Adk<sub>tm</sub> crystals used for X-ray diffraction were prepared by hanging-drop vapor-diffusion method at 20 °C. The crystals were grown in 0.2  $\mu$ L solutions that contained 0.1  $\mu$ L of C1-Adk<sub>tm</sub> solution and 0.1  $\mu$ L of reservoir solution (0.1 M HEPES sodium pH = 7.5, and 0.8 M potassium sodium tartrate tetrahydrate), equilibrated against 50  $\mu$ L of the reservoir solution. Crystals were each mounted into a loop and then flash-frozen in a stream of N<sub>2</sub> at 100 K. Diffraction data were collected at 100 K synchrotron radiation at the SPring-8 BL32XU (Japan). The diffraction data sets were processed using HKL2000<sup>104</sup>.

### **3 – 10 – 10. Structure determination and refinement of C1-Adk<sub>tm</sub> crystal.**

The crystal structure of C1-Adk<sub>tm</sub> was solved by molecular replacement with the program Molrep, using the wild-type Adk in complex with Ap<sub>5</sub>A (protein data bank (PDB) ID: 1AKE) as a search model. Model refinement was using CNS<sup>105</sup>, with manual inspection and modification in conjunction with the CCP4 program COOT<sup>106</sup>. NCS averaging between two

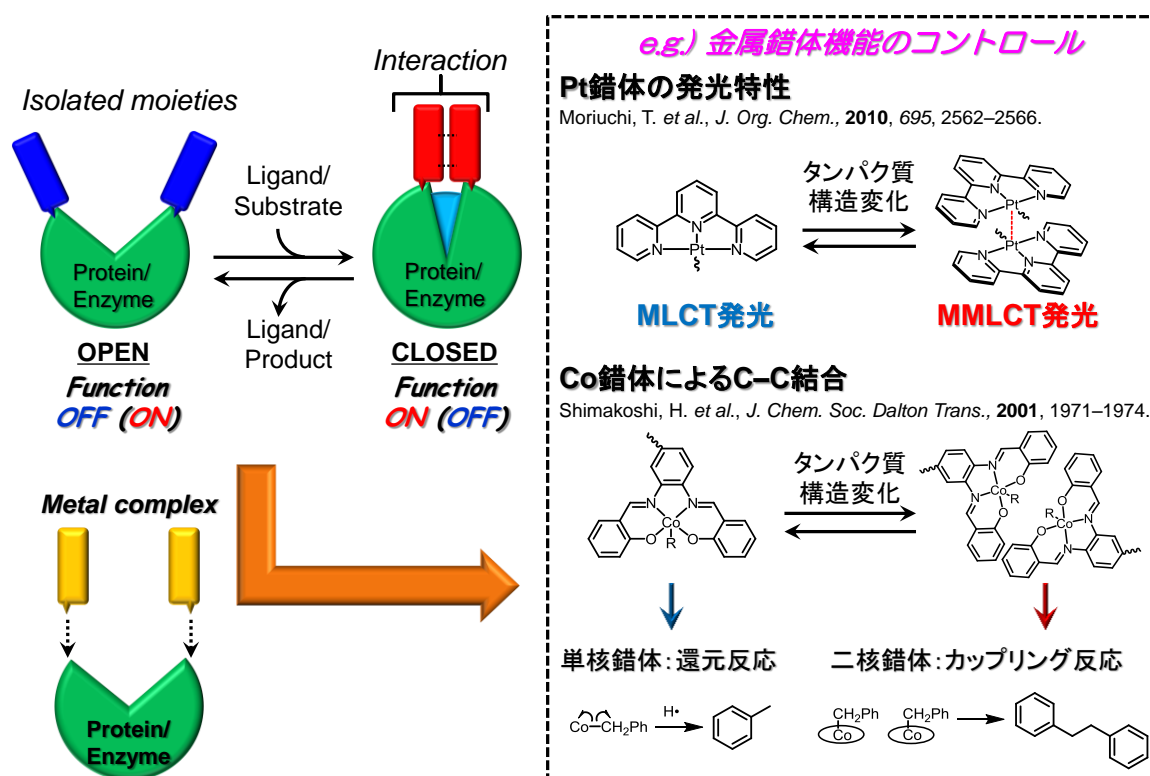
monomers within the dimer was attempted but did not improve the calculated electron density maps; thus, no NCS restraints were applied. The  $\varphi$ - $\phi$  angles of >90% of the residues in the C1-Adk<sub>tm</sub> structure are in the most favored regions of the Ramachandran plot as assessed by Molprobit. Phasing and refinement statistics are given in **Table 3 – 10 – I**. Figures were prepared using Pymol ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

**Table 3 – 10 – I.** Data collection and refinement statistics in X-ray crystallographic analysis of CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub>.

<b>Data set</b>	<b>CLOSED C1-Adk<sub>tm</sub></b>
X-ray Source	SPring-8 BL32XU
Wavelength (Å)	1.0
Temperature (K)	100
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters	
<i>a</i> (Å)	60.11
<i>b</i> (Å)	58.99
<i>c</i> (Å)	118.31
Resolution range (Å)	39.67-2.8 (2.85-2.80) <sup>[a]</sup>
Total reflections	33272
Unique reflections	11218
Completeness (%)	97.1 (95.9)
R <sub>merge</sub> (%) <sup>[b]</sup>	9.1 (32.3)
I/σ	11.1 (1.6)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	39.67-2.8
Reflections (work/test)	10422/548
R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub> (%)	0.207/0.256
No. atoms	
Protein	3512
Ligand	114
Water	27
R.m.s. deviation <sup>[c]</sup>	
Bond length (Å)	0.009
Bond angles (°)	1.4
Ramachandran (%)	
Allowed	95.5
Favored	87.9
Disallowed	4.5

## 4 章：結論と展望

距離依存的な発光特性を示すピレンを  $\text{Adk}_{\text{tm}}$  表面に 2 分子導入し、酵素反応に伴う  $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の動的挙動に連動したピレン分子のモノマー/エキシマー発光のスイッチング機構が構築された。修飾ピレンは  $\text{Adk}_{\text{tm}}$  が **CLOSED** 状態になることで単にエキシマー発光を示すのみでなく、基盤となる  $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の基質結合ドメインの挙動をエキシマー発光強度に反映した。また、基質を段階的に添加していくことで、**C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$**  の繰り返しモノマー/エキシマー発光スイッチが観測された。これはアデニル酸キナーゼのリン酸転移反応に伴い修飾ピレン分子の接近/解離が制御されていることを示している。以上のことから、基質特異的なタンパク質の動的挙動に基づく修飾分子の機能スイッチング機構の構築が可能であることが示された。このコンセプトに基づきタンパク質の動的挙動に伴う金属錯体等の機能スイッチングへの応用が期待される (**Figure 4-1**)。



**Figure 4-1.** タンパク質の動的挙動に基づく金属体の機能スイッチングへの応用

プローブ分子はタンパク質ドメイン間の空間情報を得る上で有用なツールであるが、溶液中におけるプローブ間の距離を推定するには、プローブ分子のフレキシビリティを考慮する必要がある<sup>67</sup>。例えばフェルスター共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) はタンパク質ドメイン間距離を推定する

ために利用されているが、FRET 効率はプローブ分子の配向に依存するため、ドナー、アクセプター分子の双極子配向因子  $k^2$  を加味し、FRET 効率からプローブ間距離を計算する。プローブ分子が自由に回転運動する場合、 $k^2 = 2/3$  と仮定されるが、タンパク質構造の立体により分子運動が制限されている場合、 $k^2$  値は変動する<sup>107</sup>。この様に、プローブ間相互作用により得られるスペクトル情報は、分子間相互作用の配向を考慮する必要がある。第3章では、メチレンリンカー鎖長の異なるピレン分子を Adk<sub>tm</sub> 表面に修飾した際、そのエキシマー発光挙動やエキシマー形成様式、基底状態および励起状態のピレンスタッキングが異なることが示された。これらの結果は1つの分光測定ではなく、様々な分光測定を組み合わせることで得られた。従ってタンパク質プローブとしてピレンを用いる際にも、ピレンプローブのフレキシビリティおよび基底状態、励起状態におけるピレンの相互作用を考慮することが重要であることが示された (Figure 4-2)。

また、本章で得られた知見を基に、最も効率良くエキシマーを形成する C1 ピレンを用いた際、アデニル酸キナーゼの基質結合状態と遷移状態における微少な構造変化がスペクトルに反映された。従って、本章で得られた知見は、プローブ分子構造の最適化にも貢献することが期待できる。

本研究は、適切なピレン分子を設計しタンパク質表面上におけるピレン分子間相互作用を検討することが、タンパク質ドメイン間の空間情報の適切な解釈や、タンパク質に導入する合成分子をデザインする上で重要であることを示唆している。さらに適切な構造の合成分子とタンパク質の基質特異的な動的挙動の組み合わせが、生体分子機能をトリガーとして表面修飾分子機能を制御する機構の構築に貢献することが期待される。

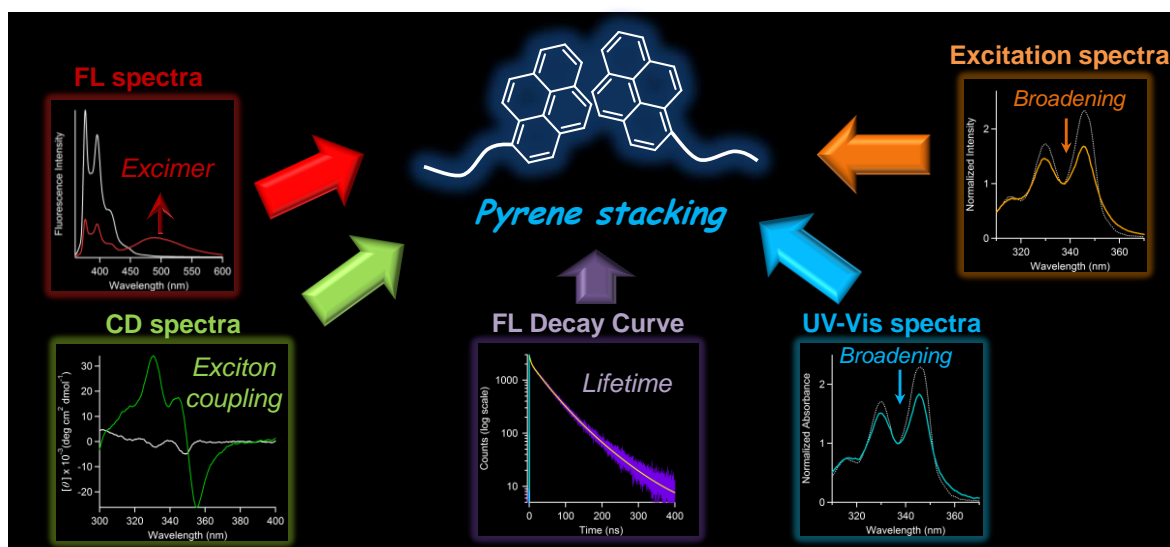


Figure 4-2. 様々な測定を組み合わせ推定されるピレンスタッキングモード。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、円滑に実験が行える恵まれた環境と多くの議論の場を与えてくれた廣田俊教授に厚く御礼申し上げます。

そして、自分にとって初めての生化学系の実験や錯体合成について、また、研究を進める上で必要な書類作成など、日々アドバイスや多くの議論をして頂きました松尾貴史准教授に深く御礼申し上げます。また、変異体作製や菌体培養等の実験において多くの助言を頂きました長尾聡助教、山中優助教に深く感謝いたします。さらに、研究生生活を送る上で日頃お世話になりました手島薫秘書に深く感謝いたします。

中間審査において研究についてのアドバイスを与えて下さった垣内喜代三教授、池田篤志教授、上久保裕生准教授に御礼申し上げます。

大腸菌由来アデニル酸キナーゼのダブルミュータント (A55C/C77S) を提供していただいた Bar-Ilan 大学の Elisha Haas 教授に謹んで感謝の意を申し上げます。また、ピレン修飾アデニル酸キナーゼの結晶化および構造解析において非常にお世話になりました大阪大学の井上豪教授、松村浩由准教授に厚く御礼申し上げます。本研究においてタンパク質表面上のピレン分子がスタックしている非常に重要な結果を得ることができました。さらに、タンパク質表面におけるピレンの時間分解蛍光測定において、国立交通大学の鐘文聖教授に深く感謝いたします。ピレンの蛍光成分を検討する上で重要な知見を得ることができました。C1 - C3-pyrene-IAA の ESI-MS においてお世話になりました西川嘉子技術職員に感謝いたします。

5年間の研究において、異なる研究テーマを持ちながらも深く議論し合い、アドバイスをいただいた同期、研究室の皆さんに感謝いたします。

最後に、研究生生活を影ながら支えてくれた母に感謝いたします。

## 発表論文

本研究の基礎となる公表論文は次のとおりである。

1. Reversible Switching of Fluorophore Property Based on Intrinsic Conformational Transition of Adenylate Kinase during Its Catalytic Cycle.  
Akira Fujii, Shun Hirota, Takashi Matsuo.  
*Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1218–1225.
2. Excimer Emission Properties on Pyrene-Labeled Protein Surface: Correlation Between Emission Spectra, Ring Stacking Modes, and Flexibilities of Pyrene Probes.  
Akira Fujii, Yutaka Sekiguchi, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Wen-Sheng Chung, Shun Hirota, Takashi Matsuo.  
*Bioconjugate Chem.* in press. (DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00026)

参考論文を以下に示す。

1. Effect of Added Salt on Ring-Closing Metathesis Catalyzed by a Water-Soluble Hoveyda-Grubbs Type Complex To Form *N*-Containing Heterocycles in Aqueous Media.  
Takashi Matsuo, Takefumi Yoshida, Akira Fujii, Keiya Kawahara, Shun Hirota.  
*Organometallics* **2013**, *32*, 5313–5319.



## 参考文献

1. Matsuo, T.; Hirota, S., Artificial enzymes with protein scaffolds: structural design and modification. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 5638–5656.
2. Yu, F.; Cangelosi, V. M.; Zastrow, M. L.; Tegoni, M.; Plegaria, J. S.; Tebo, A. G.; Mocny, C. S.; Ruckthong, L.; Qayyum, H.; Pecoraro, V. L., Protein design: toward functional metalloenzymes. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 3495–3578.
3. Matsuo, T.; Imai, C.; Yoshida, T.; Saito, T.; Hayashi, T.; Hirota, S., Creation of an artificial metalloprotein with a Hoveyda-Grubbs catalyst moiety through the intrinsic inhibition mechanism of alpha-chymotrypsin. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 1662–1664.
4. Wörsdörfer, B.; Henning, L. M.; Obexer, R.; Hilvert, D., Harnessing Protein Symmetry for Enzyme Design. *ACS Catal.*, **2012**, *2*, 982–985.
5. Yeung, N.; Lin, Y.-W.; Gao, Y.-G.; Zhao, X.; Russell, B. S.; Lei, L.; Miner, K. D.; Robinson, H.; Lu, Y., Rational design of a structural and functional nitric oxide reductase. *Nature*, **2009**, *462*, 1079–1082.
6. Berto, T. C.; Xu, N.; Lee, S. R.; McNeil, A. J.; Alp, E. E.; Zhao, J.; Richter-Addo, G. B.; Lehnert, N., Characterization of the Bridged Hyponitrite Complex  $\{[\text{Fe}(\text{OEP})]_2(\mu\text{-N}_2\text{O}_2)\}$ : Reactivity of Hyponitrite Complexes and Biological Relevance. *Inorg. Chem.*, **2014**, *53*, 6398–6414.
7. Bos, J.; Fusetti, F.; Driessen, A. J.; Roelfes, G., Enantioselective artificial metalloenzymes by creation of a novel active site at the protein dimer interface. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 7472–7475.
8. Zimbron, J. M.; Heinisch, T.; Schmid, M.; Hamels, D.; Nogueira, E. S.; Schirmer, T.; Ward, T. R., A Dual Anchoring Strategy for the Localization and Activation of Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin–Streptavidin Technology. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 5384–5388.
9. Kawakami, N.; Shoji, O.; Watanabe, Y., Use of Perfluorocarboxylic Acids To Trick Cytochrome P450BM3 into Initiating the Hydroxylation of Gaseous Alkanes. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50*, 5315–5318.
10. Caamaño, A. M.; Vázquez, M. E.; Martínez-Costas, J.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L., A Light-Modulated Sequence-Specific DNA-Binding Peptide. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**, *39*, 3104–3107.
11. Takeshita, M.; Irie, M., Photoresponsive cesium ion tweezers with a photochromic dithienylethene. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 613–616.
12. Suzuki, Y.; Okuro, K.; Takeuchi, T.; Aida, T., Friction-Mediated Dynamic Disordering of Phospholipid Membrane by Mechanical Motions of Photoresponsive Molecular Glue: Activation of Ion Permeation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 15273–15276.
13. Westmark, P. R.; Kelly, J. P.; Smith, B. D., Photoregulation of enzyme activity.

- Photochromic, transition-state-analog inhibitors of cysteine and serine proteases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3416–3419.
14. Vomasta, D.; Hogner, C.; Branda, N. R.; Konig, B., Regulation of human carbonic anhydrase I (hCAI) activity by using a photochromic inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 7644–7647.
  15. Banerjee, A. L.; Eiler, D.; Roy, B. C.; Jia, X.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K., Spacer-Based Selectivity in the Binding of “Two-Prong” Ligands to Recombinant Human Carbonic Anhydrase I. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 3211–3224.
  16. Panja, A.; Matsuo, T.; Nagao, S.; Hirota, S., DNA cleavage by the photocontrolled cooperation of Zn<sup>II</sup> centers in an azobenzene-linked dizinc complex. *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 11437–11445.
  17. Gerstein, M.; Krebs, W., A database of macromolecular motions. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 4280–4290.
  18. Alexandrov, V.; Lehnert, U.; Echols, N.; Milburn, D.; Engelman, D.; Gerstein, M., Normal modes for predicting protein motions: A comprehensive database assessment and associated Web tool. *Protein Sci.*, **2005**, *14*, 633–643.
  19. Tsapakos, M. J.; Haydock, P. V.; Hermodson, M.; Somerville, R. L., Ligand-mediated conformational changes in Trp repressor protein of *Escherichia coli* probed through limited proteolysis and the use of specific antibodies. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 16383–16394.
  20. Carey, J.; Benoff, B.; Harish, B.; Yuan, L.; Lawson, C. L., Environment-dependent long-range structural distortion in a temperature-sensitive point mutant. *Protein Sci.*, **2012**, *21*, 63–74.
  21. Otwinowski, Z.; Schevitz, R. W.; Zhang, R. G.; Lawson, C. L.; Joachimiak, A.; Marmorstein, R. Q.; Luisi, B. F.; Sigler, P. B., Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature*, **1988**, *335*, 321–329.
  22. Müller, C. W.; Schlauderer, G. J.; Reinstein, J.; Schulz, G. E., Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure*, **1996**, *4*, 147–156.
  23. Muller, C. W.; Schulz, G. E., Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap<sub>5</sub>A refined at 1.9 Å resolution. A model for a catalytic transition state. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *224*, 159–177.
  24. Taylor, D. A.; Sack, J. S.; Maune, J. F.; Beckingham, K.; Quioco, F. A., Structure of a recombinant calmodulin from *Drosophila melanogaster* refined at 2.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 21375–21380.
  25. Ikura, M.; Clore, G.; Gronenborn, A.; Zhu, G.; Klee, C.; Bax, A., Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science*, **1992**, *256*, 632–638.
  26. Noda, L., *The Enzyme* (Boyer, P. D., Ed.). *Academic press, New York.*, **1973**, *Vol. 8*, 279–

305.

27. Reinstein, J.; Vetter, I. R.; Schlichting, I.; Roesch, P.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S., Fluorescence and NMR investigations on the ligand binding properties of adenylate kinases. *Biochemistry*, **1990**, *29*, 7440–7450.
28. Reinstein, J.; Brune, M.; Wittinghofer, A., Mutations in the nucleotide binding loop of adenylate kinase of Escherichia coli. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 4712–4720.
29. Rose, T.; Brune, M.; Wittinghofer, A.; Le Blay, K.; Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Bârză, O.; Gilles, A. M., Structural and catalytic properties of a deletion derivative ( $\Delta$  133-157) of Escherichia coli adenylate kinase. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 10781–10786.
30. Rose, T.; Glaser, P.; Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Reinstein, J.; Le Blay, K.; Gilles, A. M.; Bârză, O., Structural and functional consequences of amino acid substitutions in the second conserved loop of Escherichia coli adenylate kinase. *J Biol Chem.*, **1991**, *266*, 23654–23659.
31. LaPorte, D. C.; Wierman, B. M.; Storm, D. R., Calcium-Induced Exposure of a Hydrophobic Surface on Calmodulin. *Biochemistry*, **1980**, *19*, 3814–3819.
32. Tanaka, T.; Hidaka, H., Hydrophobic Regions Function in Calmodulin-Enzyme(s) Interactions. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 11078–11080.
33. Crivici, A.; Ikura, M., Molecular and Structural Basis of Target Recognition by Calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1995**, *24*, 85–116.
34. Yuan, W.-W.; Yang, J.; Kopečková, P.; Kopeček, J., Smart Hydrogels Containing Adenylate Kinase: Translating Substrate Recognition into Macroscopic Motion. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 15760–15761.
35. King, W. J.; Pytel, N. J.; Ng, K.; Murphy, W. L., Triggered drug release from dynamic microspheres via a protein conformational change. *Macromol. Biosci.*, **2010**, *10*, 580–584.
36. Tam, A. Y.-Y.; Wong, K. M.-C.; Yam, V. W.-W., Unusual Luminescence Enhancement of Metallogels of Alkynylplatinum(II) 2,6-Bis(N-alkylbenzimidazol-2'-yl)pyridine Complexes upon a Gel-to-Sol Phase Transition at Elevated Temperatures. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6253–6260.
37. Moriuchi, T.; Yamada, M.; Yoshii, K.; Hirao, T., Controlled emission of platinum(II) terpyridyl complexes with poly-L-glutamic acid. *J. Org. Chem.*, **2010**, *695*, 2562–2566.
38. Shimakoshi, H.; Ninomiya, W.; Hisaeda, Y., Reductive coupling of benzyl bromide catalyzed by a novel dicobalt complex having two salen units. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2001**, 1971–1974.
39. Yamada, Y.; Okamoto, M.; Furukawa, K.; Kato, T.; Tanaka, K., Switchable intermolecular communication in a four-fold rotaxane. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, *51*, 709–713.
40. Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M., FRET imaging. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 1387–1395.
41. Kajihara, D.; Abe, R.; Iijima, I.; Komiyama, C.; Sisido, M.; Hohsaka, T., FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids. *Nat. Methods*, **2006**, *3*, 923–929.

42. Sinev, M.; Landsmann, P.; Sineva, E.; Ittah, V.; Haas, E., Design consideration and probes for fluorescence resonance energy transfer studies. *Bioconjug Chem.*, **2000**, *11*, 352–362.
43. Chen, S.; Fahmi, N. E.; Wang, L.; Bhattacharya, C.; Benkovic, S. J.; Hecht, S. M., Detection of Dihydrofolate Reductase Conformational Change by FRET Using Two Fluorescent Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12924–12927.
44. Förster, T., Excimers. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1969**, *8*, 333–343.
45. Birks, J. B., Excimers. *Rep. Prog. Phys.*, **1975**, *38*, 903–974.
46. Chen, S.; Wang, L.; Fahmi, N. E.; Benkovic, S. J.; Hecht, S. M., Two pyrenylalanines in dihydrofolate reductase form an excimer enabling the study of protein dynamics. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18883–18885.
47. Bains, G. K.; Kim, S. H.; Sorin, E. J.; Narayanaswami, V., The Extent of Pyrene Excimer Fluorescence Emission is a Reflector of Distance and Flexibility: Analysis of the Segment Linking the LDL Receptor-Binding and Tetramerization Domains of Apolipoprotein E3. *Biochemistry*, **2012**, *51*, 6207–6219.
48. Bains, G.; Patel, A. B.; Narayanaswami, V., Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes. *Molecules*, **2011**, *16*, 7909–7935.
49. Wang, Z.; Gergely, J.; Tao, T., Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-triggered conformational transition in troponin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1992**, *89*, 11814–11817.
50. Tcherkasskaya, O.; Davidson, E. A.; Schmerr, M. J.; Orser, C. S., Conformational biosensor for diagnosis of prion diseases. *Biotechnol. Lett.*, **2005**, *27*, 671–675.
51. Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M., Unambiguous detection of target DNAs by excimer-monomer switching molecular beacons. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 3271–3275.
52. Conlon, P.; Yang, C. J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Martinez, K.; Kim, Y.; Stevens, N.; Marti, A. A.; Jockusch, S.; Turro, N. J.; Tan, W., Pyrene excimer signaling molecular beacons for probing nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 336–342.
53. Fujimoto, K.; Yamada, S.; Inouye, M., Synthesis of versatile fluorescent sensors based on Click chemistry: detection of unsaturated fatty acids by their pyrene-emission switching. *Chem. Commun.*, **2009**, (46), 7164–7166.
54. Qing, Z.; He, X.; Huang, J.; Wang, K.; Zou, Z.; Qing, T.; Mao, Z.; Shi, H.; He, D., Target-Catalyzed Dynamic Assembly-Based Pyrene Excimer Switching for Enzyme-Free Nucleic Acid Amplified Detection. *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 4934–4939.
55. Hung, H.-C.; Cheng, C.-W.; Wang, Y.-Y.; Chen, Y.-J.; Chung, W.-S., Highly Selective Fluorescent Sensors for Hg<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup> Based on Bis-triazole-Coupled Polyoxyethylenes in MeOH Solution. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, *2009*, 6360–6366.
56. Ma, B.; Zeng, F.; Li, X.; Wu, S., A facile approach for sensitive, reversible and ratiometric detection of biothiols based on thymine-mediated excimer-monomer transformation. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 6007–6009.
57. Cho, J.; Pradhan, T.; Kim, J. S.; Kim, S., Bimodal Calix[2]triazole[2]arene Fluorescent Ionophore. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 4058–4061.

58. Winnik, F. M., Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 587–614.
59. Nakamura, M.; Fukuda, M.; Takada, T.; Yamana, K., Highly ordered pyrene  $\pi$ -stacks on an RNA duplex display static excimer fluorescence. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 9620–9626.
60. Yang, J.-S.; Lin, C.-S.; Hwang, C.-Y., Cu<sup>2+</sup>-Induced Blue Shift of the Pyrene Excimer Emission: A New Signal Transduction Mode of Pyrene Probes. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 889–892.
61. Choi, J. K.; Kim, S. H.; Yoon, J.; Lee, K. H.; Bartsch, R. A.; Kim, J. S., A PCT-based, pyrene-armed calix[4]crown fluoroionophore. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 8011–8015.
62. Ho, I.-T.; Chu, J.-H.; Chung, W.-S., Calix[4]arene with Lower-Rim  $\beta$ -Amino  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ketones Containing Bis-Chelating Sites as a Highly Selective Fluorescence Turn-On Chemosensor for Two Copper(II) Ions. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *2011*, 1472–1481.
63. Ueno, A.; Suzuki, I.; Osa, T., Association Dimers, Excimers, and Inclusion Complexes of Pyrene-Appended  $\gamma$ -Cyclodextrins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6391–6397.
64. Kaushlendra, K.; Asha, S. K., H-Bonding vs Non-H-Bonding in 100% Pyrene Methacrylate Comb Polymers: Self-Assembly Probed by Time-Resolved Emission Spectra and Temperature Dependent Fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 4951–4962.
65. Dong, L. M.; Parkin, S.; Trakhanov, S. D.; Rupp, B.; Simmons, T.; Arnold, K. S.; Newhouse, Y. M.; Innerarity, T. L.; Weisgraber, K. H., Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinnemia. *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *8*, 718–722.
66. Ádén, J.; Wolf-Watz, M., NMR Identification of Transient Complexes Critical to Adenylate Kinase Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 14003–14012.
67. Sinev, M. A.; Sineva, E. V.; Ittah, V.; Haas, E., Domain Closure in Adenylate Kinase. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 6425–6437.
68. Berry, M. B.; Meador, B.; Bilderback, T.; Liang, P.; Glaser, M.; Phillips, G. N., Jr., The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. **1994**, *19*, 183–198.
69. Smythe, C. V., THE REACTION OF IODOACETATE AND OF IODOACETAMIDE WITH VARIOUS SULFHYDRYL GROUPS, WITH UREASE, AND WITH YEAST PREPARATIONS. *J. Biol. Chem.*, **1936**, *114*, 601–612.
70. Anson, M. L., THE REACTIONS OF IODINE AND IODOACETAMIDE WITH NATIVE EGG ALBUMIN. *J. Gen. Physiol.*, **1940**, *23*, 321–331.
71. Hochstrasser, R. M., Polarization of the First Two Electronic Transitions of Pyrene. *J. Chem. Phys.*, **1960**, *33*, 459–463.
72. Saeva, F. D.; Sharpe, P. E.; Olin, G. R., Cholesteric liquid crystal induced circular

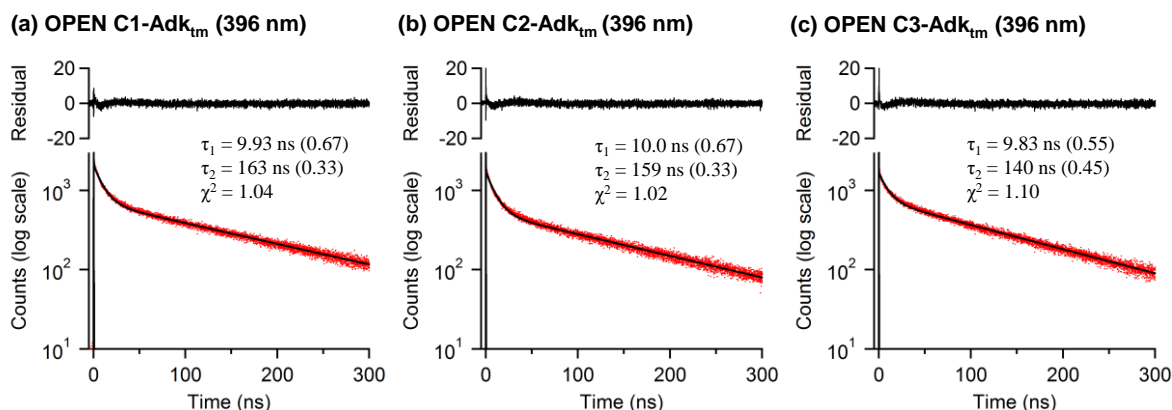
- dichroism (LCICD). V. Mechanistic aspects of LCICD. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 7656–7659.
73. Wang, C.; Xu, J.; Weiss, R. G., Factors Influencing Orientations of Covalently-Attached and Doped Aromatic Groups in Stretched Polyethylene Films. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 7015–7025.
  74. Kunst, A.; Draeger, B.; Ziegenhorn, J., UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase In *Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 6, 3rd ed.* Bergmeyer HU, Ed. Weinheim, Germany, Verlag Chemie, **1984**, 163–172.
  75. Hanson, J. A.; Duderstadt, K.; Watkins, L. P.; Bhattacharyya, S.; Brokaw, J.; Chu, J.-W.; Yang, H., Illuminating the mechanistic roles of enzyme conformational dynamics. *PNAS*, **2007**, *104*, 18055–18060.
  76. Wolf-Watz, M.; Thai, V.; Henzler-Wildman, K. A.; Hadjipavlou, G.; Eisenmesser, E. Z.; Kern, D., Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 945–949.
  77. Beckstein, O.; Denning, E. J.; Perilla, J. R.; Woolf, T. B., Zipping and Unzipping of Adenylate Kinase: Atomistic Insights into the Ensemble of Open ↔ Closed Transitions. *J. Mol. Biol.*, **2009**, *394*, 160–176.
  78. Sinev, M. A.; Sineva, E. V.; Ittah, V.; Haas, E., Towards a mechanism of AMP-substrate inhibition in adenylate kinase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **1996**, *397*, 273–276.
  79. Aden, J.; Weise, C. F.; Brannstrom, K.; Olofsson, A.; Wolf-Watz, M., Structural topology and activation of an initial adenylate kinase-substrate complex. *Biochemistry*, **2013**, *52*, 1055–1061.
  80. Sheng, X. R.; Li, X.; Pan, X. M., An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 22238–22242.
  81. Ratner, V.; Kahana, E.; Eichler, M.; Haas, E., A general strategy for site-specific double labeling of globular proteins for kinetic FRET studies. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 1163–1170.
  82. Bolton, H. C.; Weiss, J. J., Hypochromism in the Ultra-Violet Absorption of Nucleic Acids and Related Structures. *Nature*, **1962**, *195*, 666–668.
  83. DeVoe, H., THE THEORY OF HYPOCHROMISM OF BIOPOLYMERS: CALCULATED SPECTRA FOR DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1969**, *158*, 298–307.
  84. Thomas, G. J., Jr.; Kyogoku, Y., Hypochromism Accompanying Purine-Pyrimidine Association Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 4170–4175.
  85. Tinoco, I. J., Hypochromism in Polynucleotide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4785–4790.
  86. Simpson, W. T.; Peterson, D. L., Coupling Strength for Resonance Force Transfer of Electronic Energy in Van der Waals Solids. *J. Chem. Phys.*, **1957**, *26*, 588–593.
  87. Kawashima, T.; OTSUBO, T.; Sakata, Y.; Misumi, S., SYNTHESSES OF THREE [2.2] PYRENOPHANES AS AN EXCIMER MODEL. *Tetrahedron, Lett.*, **1978**, *19*, 5115–5118.
  88. Allenmark, S., Induced Circular Dichroism by Chiral Molecular Interaction. *Chirality*,

- 2003**, *15*, 409–422.
89. Chakrabartty, A.; Kortemme, T.; Padmanabhan, S.; Baldwin, R. L., Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 5560–5565.
  90. Zsila, F., A new ligand for an old lipocalin: induced circular dichroism spectra reveal binding of bilirubin to bovine beta-lactoglobulin. *FEBS Lett.*, **2003**, *539*, 85–90.
  91. Mizutani, T.; Ema, T.; Yoshida, T.; Renne, T.; Ogoshi, H., Mechanism of Induced Circular Dichroism of Amino Acid Ester-Porphyrin Supramolecular Systems. Implications to the Origin of the Circular Dichroism of Hemoprotein. *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 3558–3566.
  92. Birks, J. B.; Dyson, D. J.; Munro, I. H., 'Excimer' Fluorescence. II. Lifetime Studies of Pyrene Solutions. *Proc. Roy. Sci.*, **1963**, *275*, 575–588.
  93. Weltman, J. K.; Szaro, R. P.; Frackelton, A. R., Jr.; Dowben, R. M.; Bunting, J. R.; Cathou, B. E., N-(3-pyrene)maleimide: a long lifetime fluorescent sulfhydryl reagent. *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 3173–3177.
  94. Yamazaki, I.; Tamai, N.; Yamazaki, T., Picosecond fluorescence spectroscopy on excimer formation and excitation energy transfer of pyrene in Langmuir-Blodgett monolayer films. *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 3572–3577.
  95. Matsui, J.; Mitsuishi, M.; Miyashita, T., A Study on Fluorescence Behavior of Pyrene at the Interface of Polymer Langmuir-Blodgett Films. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 2468–2473.
  96. Winnik, F. M.; Tamai, N.; Yonezawa, J.; Nishimura, Y.; Yamazaki, I., Temperature-induced phase transition of pyrene-labeled (hydroxypropyl) cellulose in water: picosecond fluorescence studies. *J. Phys. Chem.*, **1992**, *96*, 1967–1972.
  97. Costa, T.; Seixas de Melo, J.; Burrows, H. D., Fluorescence behavior of a pyrene-end-capped poly(ethylene oxide) in organic solvents and in dioxane-water mixtures. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 618–626.
  98. Krishnamurthy, H.; Lou, H.; Kimple, A.; Vieille, C.; Cukier, R. I., Associative mechanism for phosphoryl transfer: A molecular dynamics simulation of Escherichia coli adenylate kinase complexed with its substrates. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, **2005**, *58*, 88–100.
  99. Berry, M. B.; Phillips, G. N., Crystal structures of Bacillus stearothermophilus adenylate kinase with bound Ap<sub>5</sub>A, Mg<sup>2+</sup> Ap<sub>5</sub>A, and Mn<sup>2+</sup> Ap<sub>5</sub>A reveal an intermediate lid position and six coordinate octahedral geometry for bound Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **1998**, *32*, 276–288.
  100. Rose, T.; Glaser, P.; Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Reinstein, J.; Le Blay, K.; Gilles, A. M.; Barzu, O., Structural and functional consequences of amino acid substitutions in the second conserved loop of Escherichia coli adenylate kinase. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 23654–23659.
  101. Yan, H.; Tsai, M. D., Mechanism of adenylate kinase. Demonstration of a functional

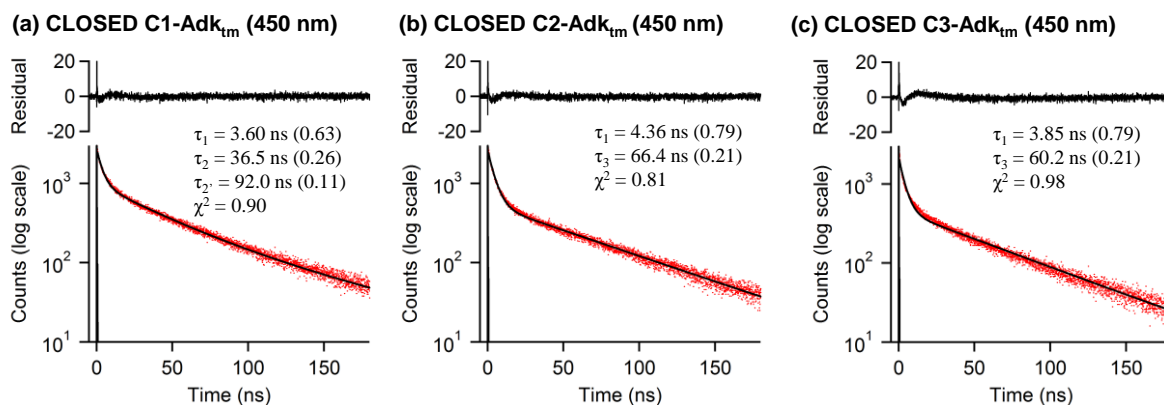
- relationship between aspartate 93 and Mg<sup>2+</sup> by site-directed mutagenesis and proton, phosphorus-31, and magnesium-25 NMR. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 5539–5546.
102. Blanchette, M. A.; Choy, W.; Davis, J. T.; Essendorf, A. P.; Masamune, S.; Roush, W. R.; Sakai, T., Horner-wadsworth-emmons reaction: Use of lithium chloride and an amine for base-sensitive compounds. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 2183–2186.
103. Morris, J. V.; Mahaney, M. A.; Huber, J. R., Fluorescence quantum yield determinations. 9,10-Diphenylanthracene as a reference standard in different solvents. *J. Phys. Chem.*, **1976**, *80*, 969–974.
104. Otwinowski, Z., In *Data Collection and Processing: Proceeding of the CCP4 study Weekend: Data Collection and Processing*, (Ed. L. Sawyer, N. Isaacs and S. Bailey), Daresbury Laboratory, Warrington, U. K. **1993**, 56–62.
105. Brünger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J.-S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren, G. L., Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Crystallogr. D, Biol. Crystallogr.*, **1998**, *54*, 905–921.
106. Emsley, P.; Cowtan, K., *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D, Biol. Crystallogr.*, **2004**, *60*, 2126–2132.
107. Wu, P.; Brand, L., Orientation factor in steady-state and time-resolved resonance energy transfer measurements. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 7939–7947.



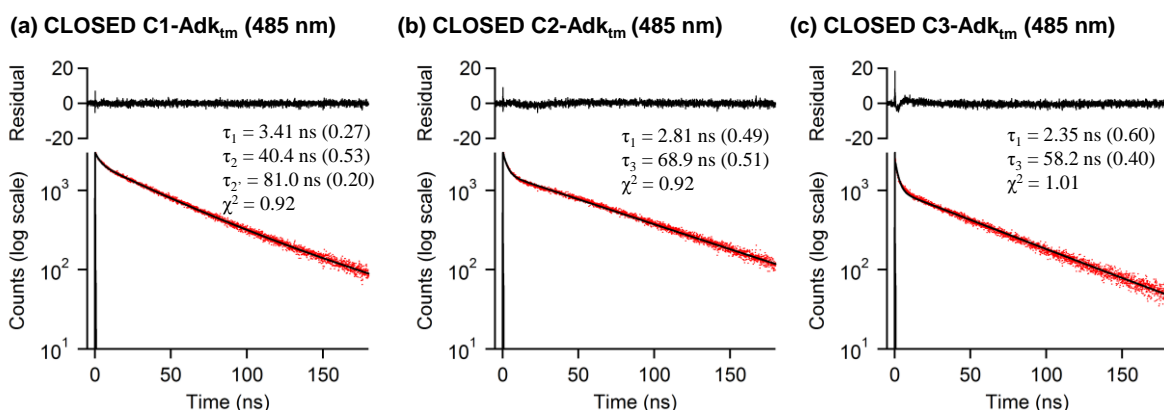
## 付録



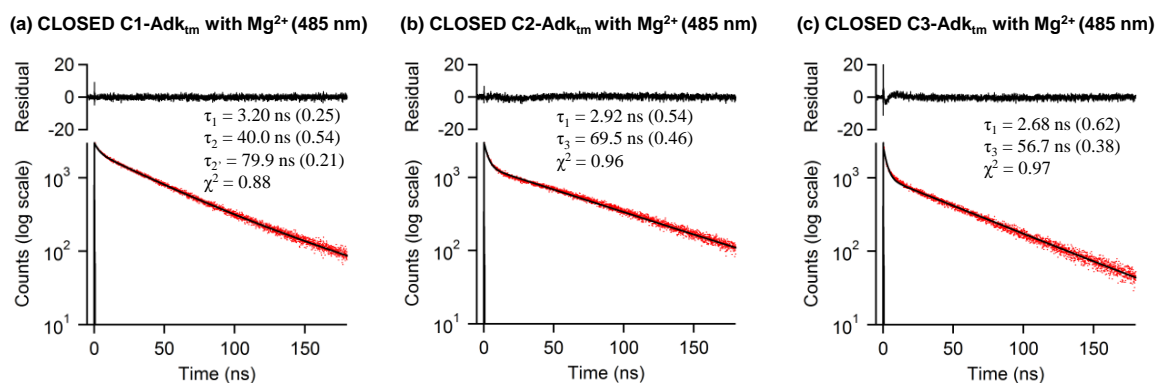
**Figure 1.** OPEN C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の 396 nm における蛍光減衰曲線. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C.  $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$  with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.



**Figure 2.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の 450 nm における蛍光減衰曲線. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 50  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$  with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.



**Figure 3.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub> の 485 nm における蛍光減衰曲線. (a) C1-Adk<sub>tm</sub>. (b) C2-Adk<sub>tm</sub>. (c) C3-Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C. [Ap<sub>5</sub>A] = 50  $\mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$  with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.



**Figure 4.**  $\text{MgCl}_2$  存在下における CLOSED C1 – C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の 485 nm における蛍光減衰曲線. (a) CLOSED C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  with  $\text{MgCl}_2$ . (b) CLOSED C2- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  with  $\text{MgCl}_2$ . (c) CLOSED C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  with  $\text{MgCl}_2$ . 条件 : [C1 – C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ ] = 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}\text{C}$ . [ $\text{Ap}_5\text{A}$ ] = 50  $\mu\text{M}$ . [ $\text{MgCl}_2$ ] = 5 mM.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 375 nm with pulsed laser with full width at half maximum (FWHM) of 64 ps.

**Table 1.**  $\text{Ap}_5\text{A}$  存在下における CLOSED C1 – C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$  の蛍光量子収率  $\Phi_{\text{F}}$  およびモノマー発光とエキシマー発光強度の比率  $I_{\text{R}}$

Protein	$\Phi_{\text{F}}$ [a]	$I_{\text{R}}$ [b]
C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ + $\text{Ap}_5\text{A}$	0.25	0.52
C2- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ + $\text{Ap}_5\text{A}$	0.21	0.40
C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$ + $\text{Ap}_5\text{A}$	0.23	0.19

[a] 9,10-diphenylanthracene を基準とした相対蛍光量子収率.

[b]  $I_{\text{R}} = I_{\text{excimer}} / I_{\text{monomer}}$ .

**Table 2.**  $\text{Ap}_5\text{A}$  添加による UV-Vis スペクトルのブロードニング

Protein	$P_{\text{OPEN}}$ [a]	$P_{\text{CLOSED}}$ [b]	$\Delta P_{\text{abs}}$ [c]
C1- $\text{Adk}_{\text{tm}}$	2.29	1.82	0.47
C2- $\text{Adk}_{\text{tm}}$	2.48	2.31	0.17
C3- $\text{Adk}_{\text{tm}}$	2.38	2.06	0.32

[a]  $P_{\text{OPEN}} = \text{Abs}_{\text{peak}(\text{OPEN})} / \text{Abs}_{\text{valley}(\text{OPEN})}$

[b]  $P_{\text{CLOSED}} = \text{Abs}_{\text{peak}(\text{CLOSED})} / \text{Abs}_{\text{valley}(\text{CLOSED})}$

[c]  $\Delta P_{\text{abs}} = P_{\text{OPEN}} - P_{\text{CLOSED}}$ .

**Table 3.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>が示す励起スペクトルのブロードニング

Protein	$P_{\text{monomer}}$ [a]	$P_{\text{excimer}}$ [b]	$\Delta P_{\text{excit}}$ [c]
C1-Adk <sub>tm</sub>	2.34	1.69	0.65
C2-Adk <sub>tm</sub>	2.63	2.23	0.40
C3-Adk <sub>tm</sub>	2.39	1.84	0.55

[a]  $P_{\text{monomer}} = I_{\text{peak(OPEN)}} / I_{\text{valley(OPEN)}}$ [b]  $P_{\text{excimer}} = I_{\text{peak(CLOSED)}} / I_{\text{valley(CLOSED)}}$ [c]  $\Delta P_{\text{excit}} = P_{\text{monomer}} - P_{\text{excimer}}$ .**Table 4.** OPEN C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命 (396 nmでモニター)

Protein	$\tau_1$ (OPEN) (ns)	$\tau_2$ (OPEN) (ns)	$\chi^2$
<b>C1-Adk<sub>tm</sub></b>	9.93 (0.67)	163 (0.33)	1.04
<b>C2-Adk<sub>tm</sub></b>	10.0 (0.67)	159 (0.33)	1.02
<b>C3-Adk<sub>tm</sub></b>	9.83 (0.55)	140 (0.45)	1.10

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}$ C under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定 of 平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

**Table 5.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命 (450 nmでモニター)

Protein	$\tau_1$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2'$ (CLOSED) (ns)	$\tau_3$ (CLOSED) (ns)	$\chi^2$
<b>C1-Adk<sub>tm</sub></b>	3.60 (0.63)	36.5 (0.26)	92.0 (0.11)		0.90
<b>C2-Adk<sub>tm</sub></b>	4.36 (0.79)			66.4 (0.21)	0.81
<b>C3-Adk<sub>tm</sub></b>	3.85 (0.79)			60.2 (0.21)	0.98

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25  $^{\circ}$ C with 50  $\mu$ M Ap<sub>5</sub>A under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定 of 平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

**Table 6.** CLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命 (485 nmでモニター)

Protein	$\tau_1$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2'$ (CLOSED) (ns)	$\tau_3$ (CLOSED) (ns)	$\chi^2$
C1-Adk <sub>tm</sub>	3.41 (0.27)	40.4 (0.53)	81.3 (0.20)		0.92
C2-Adk <sub>tm</sub>	2.81 (0.49)			68.9 (0.51)	0.92
C3-Adk <sub>tm</sub>	2.35 (0.60)			58.2 (0.40)	1.01

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C with 50  $\mu$ M Ap<sub>5</sub>A under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定の平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.

**Table 7.** Mg<sup>2+</sup>存在下におけるCLOSED C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>の蛍光寿命 (485 nmでモニター)

Protein		$\tau_1$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2$ (CLOSED) (ns)	$\tau_2'$ (CLOSED) (ns)	$\tau_3$ (CLOSED) (ns)	$\chi^2$
C1-Adk <sub>tm</sub>	Without Mg <sup>2+</sup>	3.41 (0.27)	40.4 (0.53)	81.3 (0.20)		0.92
	With Mg <sup>2+</sup>	3.20 (0.25)	40.0 (0.54)	79.9 (0.21)		0.88
C2-Adk <sub>tm</sub>	Without Mg <sup>2+</sup>	2.81 (0.49)			68.9 (0.51)	0.92
	With Mg <sup>2+</sup>	2.92 (0.54)			69.5 (0.46)	0.96
C3-Adk <sub>tm</sub>	Without Mg <sup>2+</sup>	2.35 (0.60)			58.2 (0.40)	1.01
	With Mg <sup>2+</sup>	2.68 (0.62)			56.7 (0.38)	0.97

条件 : [C1 – C3-Adk<sub>tm</sub>] = 1  $\mu$ M in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 25 °C with 50  $\mu$ M Ap<sub>5</sub>A, 5 mM MgCl<sub>2</sub> under a N<sub>2</sub> atmosphere. 蛍光寿命 : 3回測定の平均値. 括弧内の数値は規格化した頻度因子.