

の解明が進むことにより、製造工程において老香を制御できるような技術につながることを期待したい。

- 1) 高橋康次郎：醸協，75, 463 (1980).
- 2) A. Isogai *et al.* : *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4118 (2005).
- 3) 磯谷敦子ら：醸協，101, 125 (2006).
- 4) 宇都宮仁ら：醸協，105, 106 (2010).
- 5) 佐藤 信ら：醸協，70, 588 (1975).

- 6) A. Isogai *et al.* : *J. Agric. Food Chem.*, 57, 189 (2009).
- 7) R. Kubec *et al.* : *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4334 (1998).
- 8) H. Ashida *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 959 (2008).
- 9) 奥田将生ら：醸協，104, 131 (2009).
- 10) 金井宗良ら：平成 20 年度日本醸造学会講演要旨集 (2008).

(磯谷敦子，(独)酒類総合研究所)

内在性タンパク質に対する選択的ケミカルラベリングの新手法 リガンド指向型トシル化学によるラベル化の可能性

GFP に代表される蛍光タンパク質プローブは、生細胞内におけるタンパク質の動態を可視化解析するためのツールとして、細胞生物学においていまや必要不可欠なものとなっている。さらに最近では、細胞内でのタンパク質の活性や生体分子との相互作用を検出できる蛍光タンパク質センサーも開発されており、その有用性は計り知れない⁽¹⁾。しかしその一方、蛍光タンパク質は標識タグとしては分子サイズが大きすぎる点や、蛍光特性、波長などの点で限界があることが指摘されており、バイオイメージングの重要性が高まるにつれて、蛍光タンパク質に替わる新たなタンパク質標識法が求められるようになっている⁽²⁾。

そこで近年注目され始めたのが、合成分子プローブを用いた化学修飾法である。合成プローブは分子サイズが小さいため、蛍光タンパク質を用いた手法に比べて対象タンパク質の機能への影響は格段に少ない。さらに合成蛍光色素や、MRI プローブ、光クロスリンカーなど、多種多様な機能をもつ合成分子をタンパク質に導入することができるため、それらの機能とタンパク質本来の機能との融合によって、生命研究にとってきわめて強力な分子ツールを創製することが可能であると期待される。現在、そのためのアプローチの一つとして、タグとなるペプチドやタンパク質を標的タンパク質の末端に遺伝子レベルで融合し、そのタグと相互作用するようにデザインした合成プローブを用いて特異的にラベル化するという戦略が盛んに行なわれている⁽³⁾。しかし蛍光タンパク質法と同様、タグ融合タンパク質の遺伝子発現が必要なこの手法は、必然的に対象タンパク質が過剰発現された、いわば人工的に改変された細胞内環境を用いざるを得ない。また、このような手法は培養細胞レベルでは比較的容易に実現できるが、トランスフェクションの難しさから、生体個体内での適用を考えた場合まだまだ大きな制

約があるのが現状である。

以上のような背景から、筆者らは遺伝子操作を行なうことなく、細胞内、さらには生きた動物個体内に存在する「内在性タンパク質」を、そのまま化学修飾することのできる手法の開発を目指してきた。その際、研究の足がかりとして「アフィニティーラベル化法」に着目した。この手法では、特定のタンパク質と相互作用するリガンドと求電子性反応基を連結した化合物をラベル化剤として用いる。ラベル化剤はまずリガンド部位が標的タンパク質に認識され、その後さらに近接効果によって反応基がタンパク質の活性中心近傍のアミノ酸と共有結合を形成する。その結果、様々なタンパク質が存在する夾雑系においても、標的タンパク質選択的かつ、反応部位特異的なラベリングが可能である。ところが、アフィニティーラベル化法を細胞内タンパク質の化学修飾や機能化に用いるには致命的な欠点があった。それは従来の手法では、ラベル化剤のリガンドが共有結合的にタンパク質の活性ポケットをマスクしてしまい、ラベル化後のタンパク質は失活するというものである。これでは、活性をもったタンパク質のイメージングや、タンパク質本来の活性を生かした機能化は不可能である。

そこで筆者らは、アフィニティーラベルの反応基としてフェニルスルホン酸エステル（トシルエステル）を用いることで上記の問題を克服することを試みた。今回新しく考案したタンパク質化学修飾法である「リガンド指向型トシル化学 (LDT chemistry)⁽⁴⁾」ではタンパク質-リガンド相互作用の後、タンパク質表面のアミノ酸からトシルエステルへの求核置換 (S_N2) 反応が進行し、ラベル化と同時にリガンド部位が切り離される仕組みとなっている (図 1-A)。そのためタンパク質本来の機能を損なうことなく、標的タンパク質選択的かつ部位特異的なラベル化を達成することが可能であると考えられる。

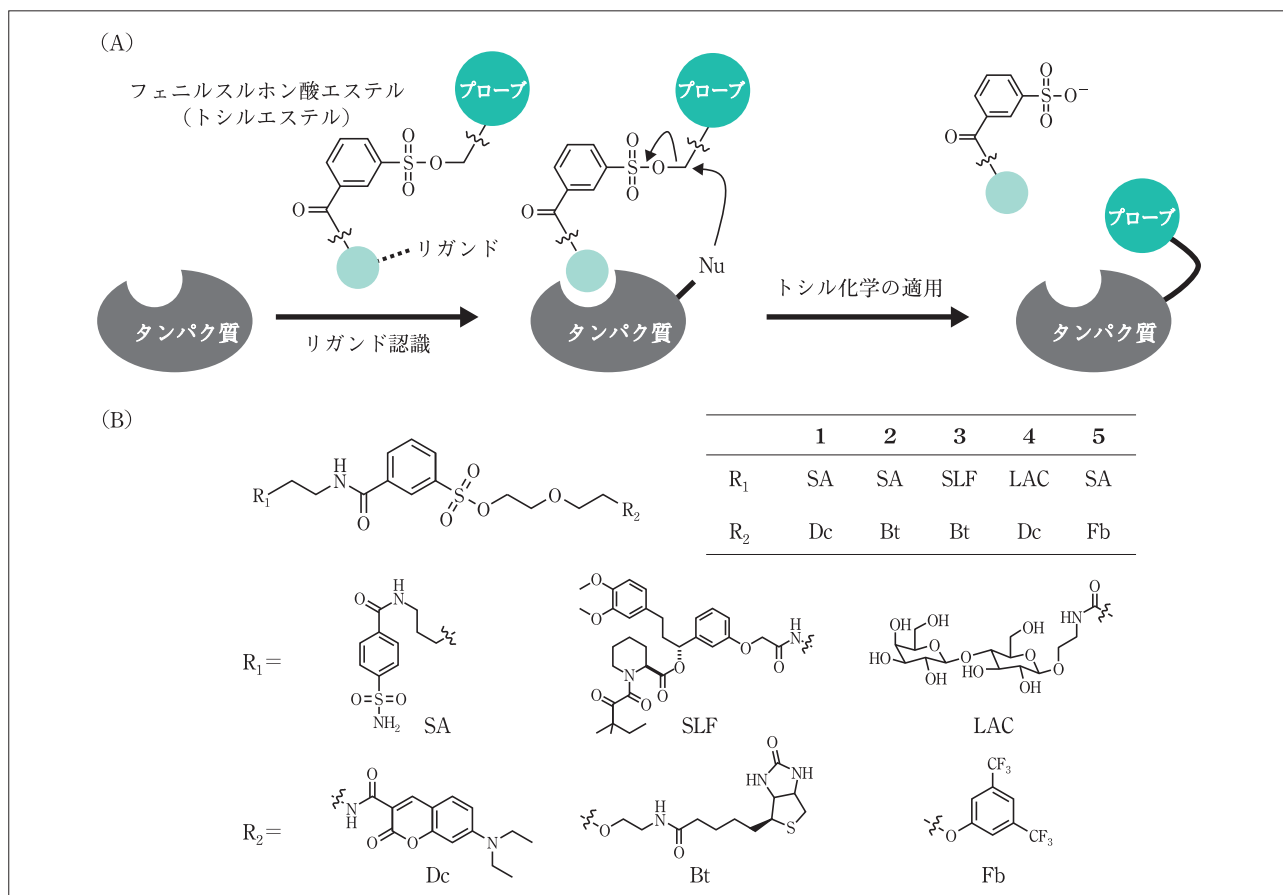


図1 ■ リガンド指向型トシル化学 (Ligand Directed Tosyl Chemistry : LDT Chemistry)

(A) 概念図. (B) LDT 化学ラベル化剤. SA: benzenesulfonamide, SLF: synthetic ligand of FKBP, LAC: lactose, Dc: 7-diethylaminocoumarin, Bt: biotin, Fb: bis(trifluoromethyl)benzene

筆者らはまず、炭酸脱水酵素 (CA) を標的タンパク質として選び、LDT 化学の有効性を実証した。CA はスルホンアミド誘導体が強い阻害剤として知られている。そこで、ベンゼンスルホンアミドと蛍光色素であるクマリンを「トシル基」で連結したラベル化剤 1 を合成し、精製された CA の蛍光ラベリングを試験管内で検討した。その結果、1 を用いることで CAII 中の活性中心近傍に存在する 3 番目の His 残基を特異的にラベル化できることが確認された。また酵素活性を測定すると、ラベル化後も CA 本来の活性は損なわれていないことがわかった。

次に、赤血球細胞内で内在的に発現している CA の選択的なラベル化を試みた。1 をヒト赤血球細胞に添加し、反応後の細胞破碎液を SDS-PAGE により解析したところ、多種多様な生体分子やタンパク質が高濃度に存在す

る赤血球細胞内においても、標的である CA のみを選択的に蛍光修飾することが可能であった。さらに、プローブとしてビオチンを導入したラベル化剤 2 を生きたマウスに尾静脈注射し、マウス体内でのラベル化反応を試みたところ、マウス赤血球中の CA のみをビオチン修飾することができた。この結果は、生きた動物個体内における内在性タンパク質の化学修飾の初めての例となった。

また、本手法はラベル化剤のリガンド部分の構造を変えることにより、原理的にはどのようなタンパク質にも適用可能である。実際にリガンド部分を薬剤類似化合物 SLF に変換すると (ラベル化剤 3)、白血球系培養細胞である Jurkat 細胞において SLF を認識する FKBP12 と呼ばれるタンパク質のみがラベル化され、リガンドをラクトースに変えると (ラベル化剤 4)、マナゴ粘膜組織中においてラクトースを認識する CongII と呼ばれるレ

クチタンパク質のみをラベル化することが可能であった。このように LDT 化学は、細胞や組織、さらには生物個体に至る様々な環境下で、狙ったタンパク質だけをラベルできるきわめて選択性、一般性の高い手法であることが示された。

さらに筆者らは、「タンパク質の活性を保ったまま活性中心近傍に機能性分子を導入できる」という LDT 化学の特徴を生かして、赤血球細胞内に存在する CA を細胞内で直接、 ^{19}F -NMR をベースとしたバイオセンサーへと改変することを検討した。 ^{19}F -NMR プローブは、生体深部でも測定可能な MRI プローブとして近年脚光を浴びている⁽⁵⁾。まず、 ^{19}F -NMR プローブを有するラベル化剤 **5** をヒト赤血球に添加し、*in-cell* ^{19}F -NMR でラベル化反応をモニタリングすると、ラベル化反応の過程をケミカルシフト変化として直接観測することができた。この ^{19}F 修飾 CA に対して細胞外から様々な阻害剤を添加すると、添加量に応じて再度ケミカルシフトが変化した。この変化の挙動は阻害剤の CA に対する「親和性」に加え、「細胞透過性」を反映しており、細胞内でタンパク質が阻害剤を認識する挙動に合致するものである。このように、本手法を用いた ^{19}F -NMR バイオセン

サーは、阻害剤-タンパク質相互作用を天然の状態にきわめて近い細胞環境の中で直接観察することが可能であり、薬剤スクリーニングなどへの応用が期待される。

以上のように、筆者らは内在性タンパク質に対する新しい化学修飾法として LDT 化学を開発し、遺伝子的な細工を施すことなく細胞、組織、生体個体内において標的タンパク質選択的な化学修飾に成功した。本手法はラベル化剤のリガンド部分を変えることで様々なタンパク質に適用でき、さらに種々の機能性プローブをタンパク質に導入することができるため、今後、内在性タンパク質の強力なラベル化法および機能解析ツールとしての展開が期待される。

- 1) H. Wang, E. Nakata & I. Hamachi: *Chem. Bio. Chem.*, **10**, 2560 (2009).
- 2) K. Johnsson: *Nature Chem. Biol.*, **5**, 63 (2009).
- 3) B. A. Griffin, S. R. Adams & R. Y. Tsien: *Science*, **281**, 269 (1998).
- 4) S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura & I. Hamachi: *Nature Chem. Biol.*, **5**, 341 (2009).
- 5) J. X. Yu, V. D. Kodibagkar, W. Cui & R. P. Mason: *Curr. Med. Chem.*, **12**, 819 (2005).

(田村朋則, 浜地 格, 京都大学大学院工学研究科)