

細胞内在性タンパク質の 直接ラベル化とセンシング

Selective Chemical Labeling and Sensing of Endogenous Proteins in Live Cell

浜地 格

(京都大学大学院工学研究科)

Overview

タンパク質・酵素は、生体内でほとんどすべての生化学反応を司るだけでなく、認識や応答、遺伝や増殖など複雑な生命現象の基盤を担う生体高分子である。タンパク質研究は、これまで標的タンパク質の発見を出発点として、単離精製によって構造と機能の解析が行われてきた。ポストゲノム時代を迎えた現代科学では、このような精製・純化されたタンパク質の生化学的・構造生物学的解析に加え、細胞や個体といったより複雑な環境におけるタンパク質の分子としてのふるまいに注目が集まっている。試験管レベルで明らかになったタンパク質分子の特性は、本来それらが活動する舞台である細胞や組織内とどこまで同じで、どの程度異なるのだろうか？ そのためには、対象タンパク質に目印を付けて、その挙動を観察するのが最も直接的である。本章では、遺伝子発現を行うことなく、細胞、組織、あるいは生物個体などの複雑環境下で“内在性の”タンパク質を選択的かつ traceless に化学修飾し、それをセンシング・イメージングすることのできるリガンド指向性化学を概説する。本手法では幅広い化学プローブが導入できるので、各種分光光学プローブや光クロスリンカーによる内在性タンパク質の細胞内での動的構造・相互作用 *in situ* 解析や活性制御など、多様な系へ活用されうるであろう。

■ KEYWORD

- タンパク質ラベリング (protein labeling)
- センシング (sensing)
- 内在性タンパク質 (endogenous protein)
- バイオイメージング (bioimaging)
- リガンド指向性化学 (ligand-directed chemistry)
- 細胞内核磁気共鳴 (in-cell NMR)
- バイオセンサー (biosensor)
- トシル化学 (tosyl chemistry)
- DMAP 触媒 (DMAP catalyst)

はじめに

タンパク質・酵素は、生体内でほとんどすべての生化学反応を司るだけでなく、認識や応答、遺伝や増殖など複雑な生命現象の基盤を担う生体高分子である。タンパク質研究は、これまで標的タンパク質の発見を出発点として、単離精製によって構造と機能の解析が行われてきた。ポストゲノム時代を迎えた現代科学では、このような精製・純化されたタンパク質の生化学的・構造生物学的解析に加え、細胞や個体といったより複雑な環境におけるタンパク質の分子としてのふるまいに注目が集まっている。試験管レベルで明らかになったタンパク質分子の特性は、本来それらが活動する舞台である細胞や組織内とどこまで同じで、どの程度異なるのだろうか？ そのためには、対象タンパク質に目印をつけて、その挙動を観察するのが最も直接的である^[1]。実際にGFPなどの蛍光タンパク質をプローブとして融合し、その細胞内での挙動をリアルタイムにイメージング観察する手法は強力であり、その威力はChap 12で詳述される。最近では、細胞内タンパク質を合成分子プローブで標識するために、SNAPとよばれるタンパク質タグやFIAsHペプチドタグの開発も進んでいる。これらの手法の有用性は言を待たない。しかし、ひとつ忘れてはならないのは、これらは、対象タンパク質の改変体を細胞内に発現させ、それを観察しているという点である。すなわち、対

象タンパク質そのものではなく、その“影武者”を見ていることになる。

では、細胞内にもともと存在する内在性のタンパク質群の機能を *in situ* 解析することはできないのだろうか。そのためには生細胞内の特定の“内在性”タンパク質を選択的に化学修飾・ラベル化することが必要と考えられる。細胞内のように多種多様な生体分子が濃縮された環境下で、特定のタンパク質のみを狙って化学ラベリングすることはかなり困難な挑戦であり、その進歩は決して早くない。筆者らは、10年以上の悪戦苦闘のなか、“タンパク質のアフィニティーラベル化”法を発展させることで、細胞内在性タンパク質の *in situ* 機能解析に展開可能な新規の化学ラベル化法の開発に成功した。本章では、リガンド指向性化学とよばれるこの方法論の原理とそれを用いたバイオセンシングへの応用例に関して概説する。

1 リガンド指向性化学の開発^[2~4]

タンパク質のアフィニティーラベル化は、タンパク質とそのリガンド分子間の特異的な相互作用を利用したタンパク質修飾法であり、“ラベル化剤”とよばれる化合物を用いる。ラベル化剤は、① 標的タンパク質に対して親和性をもつリガンド、② 導入したいプローブ、③ 反応基、の三つのモジュールからなる。まず、ラベル化剤のリガンド部位がその

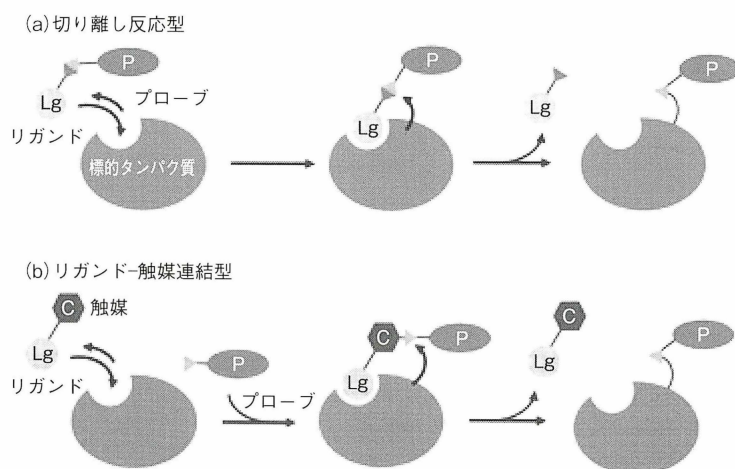


図 9-1 リガンド指向性化学によるタンパク質ラベル化の二つの戦略

タンパク質に認識される。これによって近接効果および濃縮効果が誘起される。ついで、反応基とその近傍の求核性アミノ酸との反応が加速され、ラベル化が達成される。この手法は、(i) 夾雑系においても標的タンパク質選択的な化学修飾が可能、(ii) そのラベル化部位はリガンド結合ポケットの近傍の天然アミノ酸に選択的、(iii) 変異導入していない内在性タンパク質に適用できる、などの利点をもつが、*in situ* 機能解析にとって致命的な欠点をひとつ指摘しないといけない。それは、従来法ではリガンド分子が共有結合的にタンパク質の活性中心ポケットをマスクしてしまい、ラベル化タンパク質は本来の機能を失ってしまうことである。

われわれのグループはこの欠点を克服するために、二つの戦略を提唱した(図9-1)。一つは、ラベル化と同時にリガンドが切り離される反応基を使う方法(LDT 化学)であり、もう一つはリガンドと触媒基をつないだリガンド連結触媒を用いて、プローブを選択的に導入する戦略(AGD 化学)である。

2 リガンド指向性トシル(LDT)化学^[2]

リガンド指向性トシル化学(Ligand-Directed Tosyl Chemistry, LDT 化学)の基本原理を図9-2

示す。この手法では、リガンド分子と導入したい分子プローブを求電子性のトシルエステル基を介して連結したラベル化剤を用いる。LDT 化学の特長は、求核置換(S_N2)反応によるラベル化の際にフェニルスルホン酸が脱離基となるため、ラベル化反応と同時に、リガンド分子が切り離されることである。これによって、標的タンパク質の活性ポケットを共有結合的にマスクすることなく、望みのプローブのみを“tracelessに”化学修飾することが可能となる。

たとえば、炭酸脱水酵素(CA)を標的とした場合、ラベル化剤はCAの阻害剤として知られるベンゼンスルホンアミド誘導体をリガンド分子とし、これと蛍光プローブであるクマリン色素をトシル基で連結した化合物 **1** が分子設計できる。**1** は精製CAを試験管内で良好にラベル化するだけでなく、CAを内在的に発現している赤血球中でのラベル化も可能であった。ヒト赤血球細胞と**1**を混合しインキュベーションすると、赤血球内には多くの種類のタンパク質や膨大な量のヘモグロビンが混在しているにもかかわらず、CAのみへの高選択的なラベル化が確認された。競合阻害条件下では、ラベル化も非特異反応も進行しなかった。興味深いことに、プローブ部分にフッ素核(^{19}F)をもつラベル化剤 **2** を用いて赤

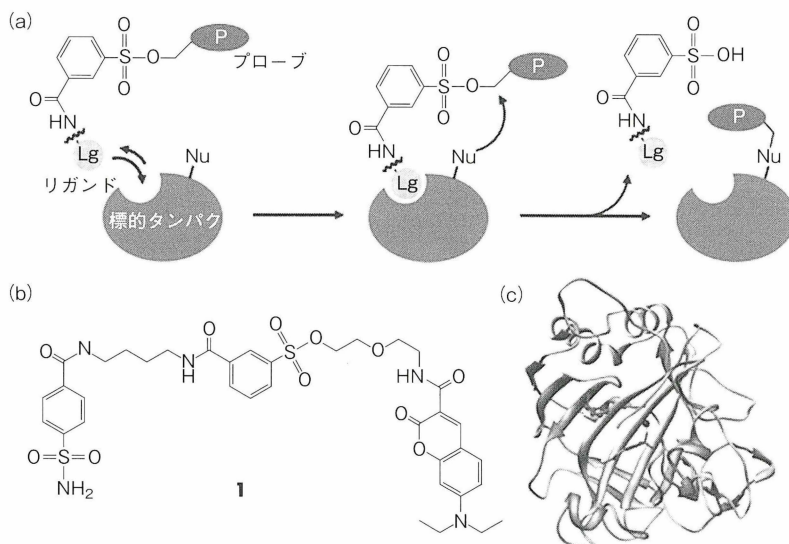
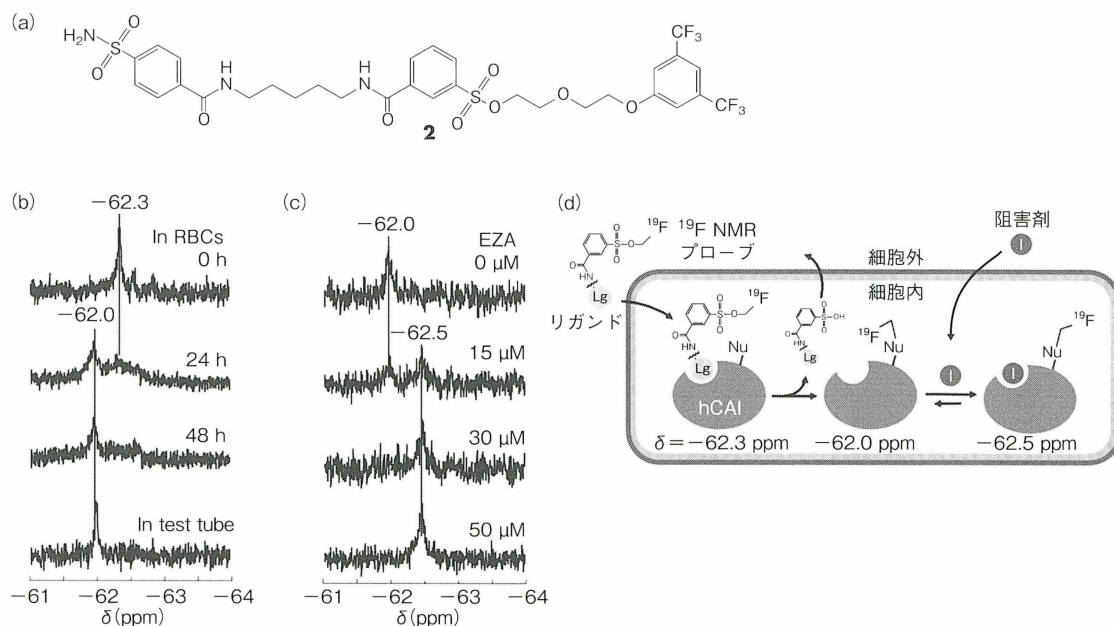


図9-2 LDT化学の基本原則(a), ラベル化剤の例(b), および標的タンパク質の構造(c)

図 9-3 赤血球内での CA ラベル化と in-cell ^{19}F NMR 追跡例

血球内 CA のラベル化を行うと、内在性 CA のラベル化過程を in-cell ^{19}F NMR でリアルタイムモニタリングが可能であった(図 9-3)。さらに ^{19}F プローブが導入された CA では、阻害剤候補化合物の添加によって濃度依存的に ^{19}F NMR シグナルの変化が観測された。このことは、LDT 化学によるラベル化によって、内在性タンパク質が ^{19}F NMR 型バイオセンサーへと変換されたことを意味している。すなわち、内在性タンパク質を基盤として ship-in-a-bottle 型のバイオセンサー構築が可能となった(図 9-3)。

LDT 化学による CA 選択的なラベル化は、生きたマウス個体内でも同様に進行する。8 週齢の実験用マウスを用いた実験では、尾静脈注射により投与されたラベル化剤によって、CA のみに選択的なバイオセンラベリングが確認された。これは、生きた動物個体における内在性タンパク質の選択的ラベル化の初めての成功例である。また、本手法は、ラベル化剤のリガンドモジュールを変更することで、さまざまなタンパク質に適用できる。たとえば、免疫抑制剤 FK506 のアナログをリガンドとすると、白血球系細胞 Jurkat 中の内在性 FKBP12 のみを標

識することが可能であった。薬剤候補のほかに、ラクトースのような糖鎖、ペプチドや天然物がリガンドモジュールとして用いられ、それぞれ標的となるレクチン、リン酸化ペプチド結合タンパク質のラベル化の成功例が報告されてきており、一般性のある手法となりつつある。

3 AGD 化学^[5]

LDT 化学のほかに、われわれは、内在性タンパク質に対する新たなラベル化手法として Affinity-guided DMAP(AGD 化学)を考案した。その概略図を図 9-4 に示す。DMAP(dimethylaminopyridine)は有機化学で汎用されるアシル化反応の触媒であり、AGD 化学はこのアシル化反応を利用したタンパク質ラベル化法である。

標的タンパク質のリガンドを連結させた DMAP は、タンパク質によって認識(アフィニティー駆動)されると、活性中心の近傍に固定される。そこに、プローブ分子をもつチオエステル(アシルドナー)が接近すると、DMAP によってチオエステル基が活性化された中間体形成が起こる。この活性中間体はリガンド-タンパク質間相互作用によってタンパク

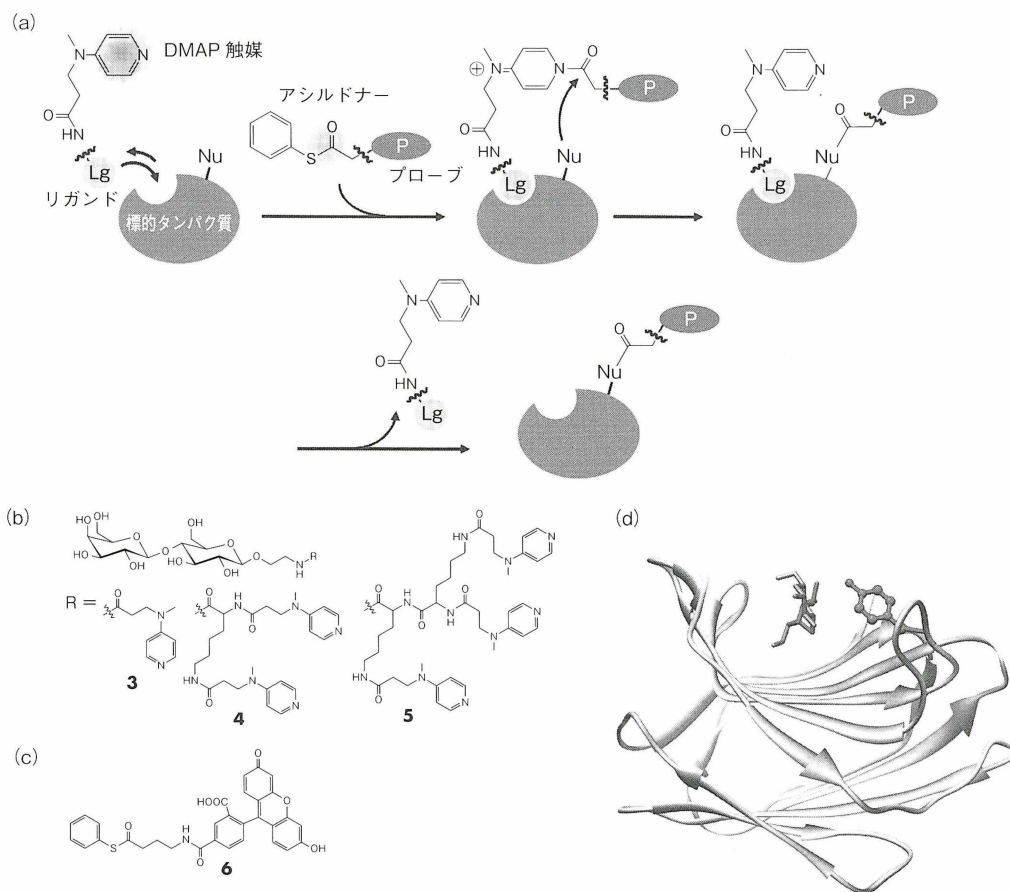


図 9-4 AGD 化学の基本原則 (a), AGD 触媒の例 (b), アシルドナーの例 (c), および標的レクチン (Cong II) の構造 (d)

質表面に固定されているため、近接効果が有効に作用する位置にある求核性アミノ酸残基のみが選択的にアシル化される。LDT 化学では一段階でタンパク質ラベル化が進行するのに対し、AGD 化学は二段階反応でのラベル化である。しかし AGD 法でも、リガンド分子がタンパク質上に修飾されることはないため、タンパク質の機能損失は起こらない。

レクチンの一種である Cong II を標的タンパク質とした場合、リガンド部分にラクトースをもつリガンド連結 DMAP (**3**, **4**, **5**) が用いられる。アシルドナーとしてフルオレセイン型チオエステル化合物 **6** を添加すると、Cong II の蛍光化が進行した。DMAP の数を 1 個から 2 個、3 個と増やしていくと、反応速度は向上し、DMAP 3 個をもつ tri-DMAP ではラベル化反応がほぼ 1 時間以内に終了

した。この速度は LDT 化学によるラベル化と比較して非常に速く、細胞実験などに適した迅速なものであった。同様の多価触媒効果は、SH2 (Src homology 2) domain, FKBP12 を標的とした場合にはより顕著に現れた。ラベル化されるアミノ酸残基を検証したところ、おもに Lys 残基にラベル化されることが明らかとなった。LDT 化学 (His, Tyr, Glu がおもなラベル化アミノ酸) と AGD 化学では、反応機構およびラベルされるアミノ酸残基が異なることから、これらは互いに相補的な手法として標的タンパク質に応じて使い分けられるべきであろう。

AGD 化学は、生細胞表層に局在する細胞膜結合タンパク質のラベル化にも有効である。HEK293 細胞に発現させた G タンパク質共役受容体 (GPCR) ファミリーの一種であるブラジキニン受容体 (B2R)

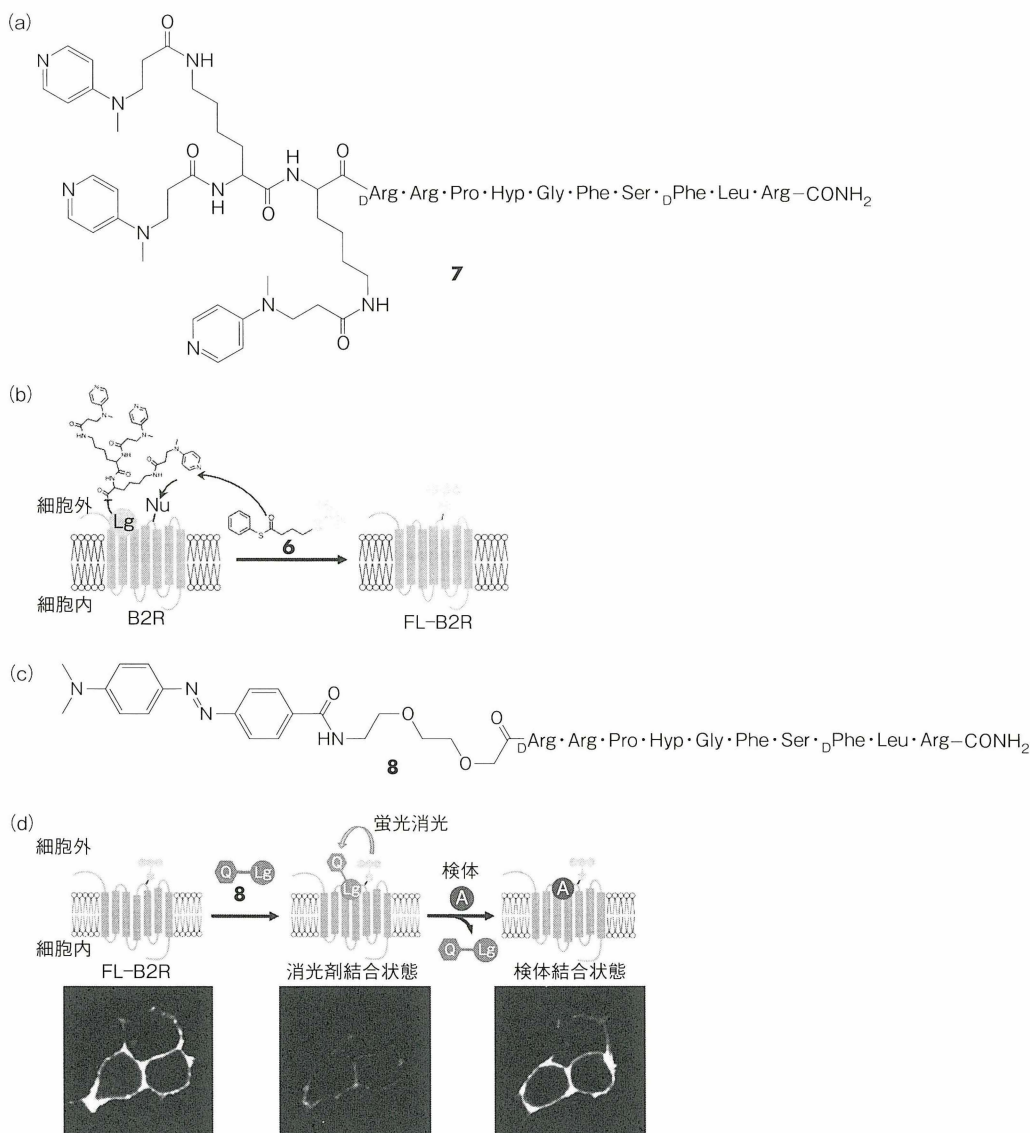


図 9-5 生細胞上での膜タンパク質 GPCR のケミカルラベリングとリガンド結合イメージング

を標的とし、アンタゴニストを連結した tri-DMAP **7** およびアシルドナー **6** を用いてラベル化したところ、細胞上でも 1 時間以内にラベル化反応は完了した。また、B2R のブラジキニン (アゴニストリガンド) に対する応答性は、ラベル化前後で変化なく、ラベル化によってタンパク質の活性は損なわれていない。さらに面白いことには、このようにしてフルオレセイン化した B2R に、リガンドと DABCYL 消光剤を連結した化合物 **8** を添加すると、フルオレセインと DABCYL 間での蛍光共鳴エネルギー移動

(Fluorescence Resonance Energy Transfer : FRET) により、蛍光消光が起こる。そこに B2R のさまざまなリガンドを添加すると、そのリガンドの B2R への親和性の強弱に応じてフルオレセイン蛍光が濃度依存的に回復することが明らかとなった (図 9-5)。このように、AGD 化学を用いると、GPCR のリガンド認識挙動がリアルタイムで、蛍光観察可能な膜タンパク質バイオセンサーが生細胞膜上で簡便に構築できることが実証された。

4 まとめと今後の展望

リガンド指向性化学は、遺伝子発現を行うことなく、細胞、組織、あるいは生物個体などの夾雑環境下で“内在性の”タンパク質を選択的かつ traceless に化学修飾することのできるユニークな手法である。近年では化合物ライブラリーの充実により、タンパク質に対する小分子リガンドも著しく増えており、また、本手法では幅広い合成プローブが導入できるので、各種分光学プローブや光クロスリンカーによる内在性タンパク質の細胞内での動的構造・相互作用 *in situ* 解析や活性制御など、研究者の目的に合わせた多様な実験系の構築に活用されるであろう^[6]。一方、基礎化学の見地からは、タンパク質表面での近接効果や多価反応基の有効性に着目した、(水中での夾雑系)有機化学の拡張もきわめて重要であるとわれわれは考えている^[7]。リガンド指向性化学の誕生は、生体系の内在性タンパク質群の機能をありのままの状態で解析するという生命科学研究の新しい

(いわば究極の)スタイルに向けた小さなしかし確実な第一歩であり、さまざまな研究対象(基礎/応用とも)に適用されていくと期待される。

◆ 文 献 ◆

- [1] K. Johnsson, *Nature Chem. Biol.*, **5**, 63 (2009).
- [2] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nature Chem. Biol.*, **5**, 341 (2009).
- [3] 築地真也, 浜地 格, 蛋白質核酸酵素, **52**, 1581 (2007).
- [4] 築地真也, 浜地 格, 分子ツール(化学フロンティア), **22**, 127 (2010).
- [5] H. Wang, Y. Koshi, D. Minato, H. Nonaka, S. Kiyonaka, Y. Mori, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12220 (2011).
- [6] T. Tamura, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, in press (2012).
- [7] S. Fujishima, R. Yasui, M. Miki, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, in press (2012).