

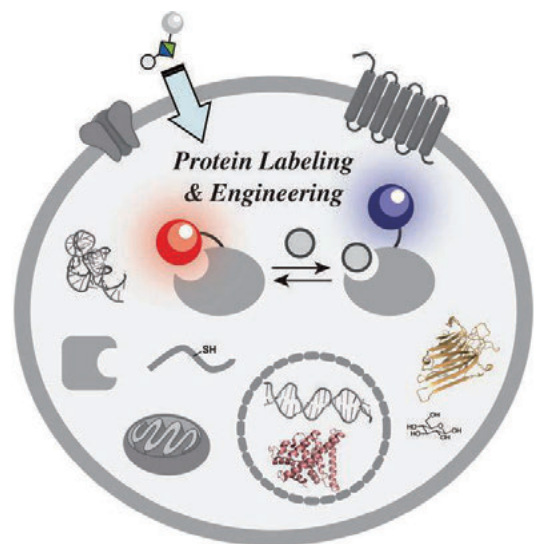
天然タンパク質を基質とした生細胞有機化学

京都大学 工学研究科合成・生物化学専攻

浜地 格

1. はじめに

一般に有機合成化学では、精製された出発原料を高性能の触媒と純度の高い溶媒中で混合し、狙った化学変換を行って高純度の目的生成物を得る。この際、原料や溶媒に含まれる不純物は、反応を阻害するだけでなく、副生成物を生じさせる厄介ものである。ところが、合成された有用物質は様々な物質や材料の混在する夾雑系で使われることも多い。例えば、創薬研究によって有機合成された小分子は生物体内でその効果を発揮することが求められるし、電子材料に含まれる機能分子も同様である。では、そのような夾雑系での物質変換を、有機化学の精度で、設計・制御できないだろうか？我々のグループでは、究極の夾雑系の一つである生細胞での有機化学に取り組んでいる。具体的な標的を、生命現象の中心を担う生体高分子であるタンパク質と定め、それが機能する生細胞環境下で選択的に修飾・改変する化学的アプローチの構築である。本講演では、そのような試みのいくつかをご紹介しますので頂きたい。



1. 生細胞におけるタンパク質のラベル化

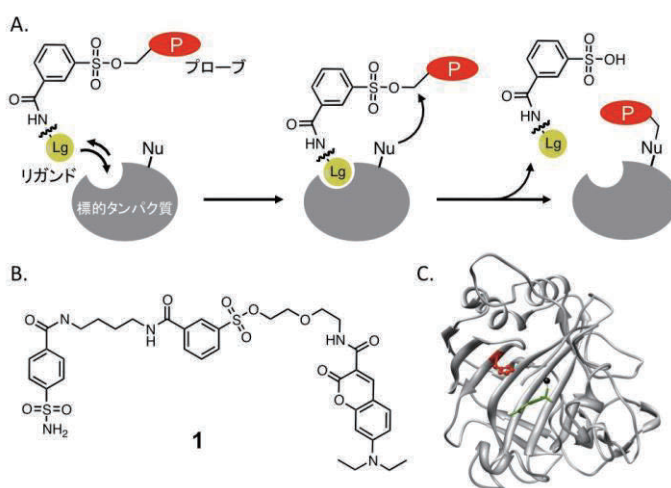
タンパク質の構造と機能解析は主に精製タンパク質を用いた試験管中で評価されてきた。しかし、このような精製系では、必ずしもタンパク質の真の姿が評価できるわけではない。分子生物学の進歩に伴って、タンパク質が存在する生細胞系でそのまま解析することが望まれるようになってきた。主として用いられるのは蛍光タンパク質 GFP の融合に代表される遺伝子工学的技術である。これに対して、化学を基盤とした技術はほとんどなかった。例えば、蛍光分子を目的のタンパク質に「ラベル化」する化学を考えてみよう^{1,2)}。蛍光分子は蛍光タンパク質と比較して遥かに小さいため、タンパク質の構造や機能に与える影響が小さい。ま

た化学的手法では、蛍光に限らず様々な検出モードの分子を導入できるはずである。しかし、細胞には目的タンパク質以外にも、イオン、アミノ酸、核酸など多様な分子が存在する。またタンパク質は、どれも 20 種類のアミノ酸から構成されているという点では似ており、細胞で特定のタンパク質に対する選択性を確保することは極めて難しい。さらに細胞系におけるラベル化反応、つまり特定アミノ酸残基との共有結合形成は、多くの有機合成化学が苦手としてきた水中で行なう必要がある。私の研究室では、認識と反応の組み合わせが鍵ではないかと考えた。実際に、これを基軸とした近接効果の活用によって生細胞系でのタンパク質選択的なケミカルラベリングが実現し始めた。

2. Ligand Directed Tosyl Chemistry (LDT 化学)

タンパク質と親和性を示す小分子をリガンドと呼ぶ。認識をこのリガンドに委ねて、タンパク質表面アミノ酸と反応可能な反応基を組み込んだ分子を合成することで、夾雑系におけるラベル化が可能となる¹⁾。しかし、単純に反応基とリガンドを連結しただけでは、残ったリガンドによってタンパク質の活性ポケットがラベル化後もマスクされてしまい、タンパク質の活性が阻害される。そこで我々は、ラベル化後にリガンド部位を切り出すことができる P-PALM³⁾や P-ALM⁴⁾法を以前開発した。しかし、これらは多段階の処理が必要で、また生体内での選択性 (生体直交性:bioorthogonality)の低さから、試験管中での精製タンパク質にしか適用できなかった。その後の悪戦苦闘ののち、我々はリガンド指向型トシル化学 (Ligand Directed Tosyl Chemistry - LDT 化学)を開発し、その問題点を克服した⁵⁾。ここで用いるラベル化剤は、3つのモジュールからなる。(1)特定のタンパク質に親和性を有するリガンド、(2)アミノ酸残基と反応する反応(トシル)基、(3)タンパク質に修飾したいプローブである。トシル基は有機化学では SN2 反応の(古典的な)良い脱離基であり、以下のようなラベル

化機構が期待された。①リガンドがタンパク質の活性ポケットに結合する②リガンド結合によってトシル基とタンパク質表面のアミノ酸残基が近接し配向がある程度固定化される③アミノ酸残基の求核攻撃によって、プローブがアミノ酸残基と共有結合でラベル化される④ラベル



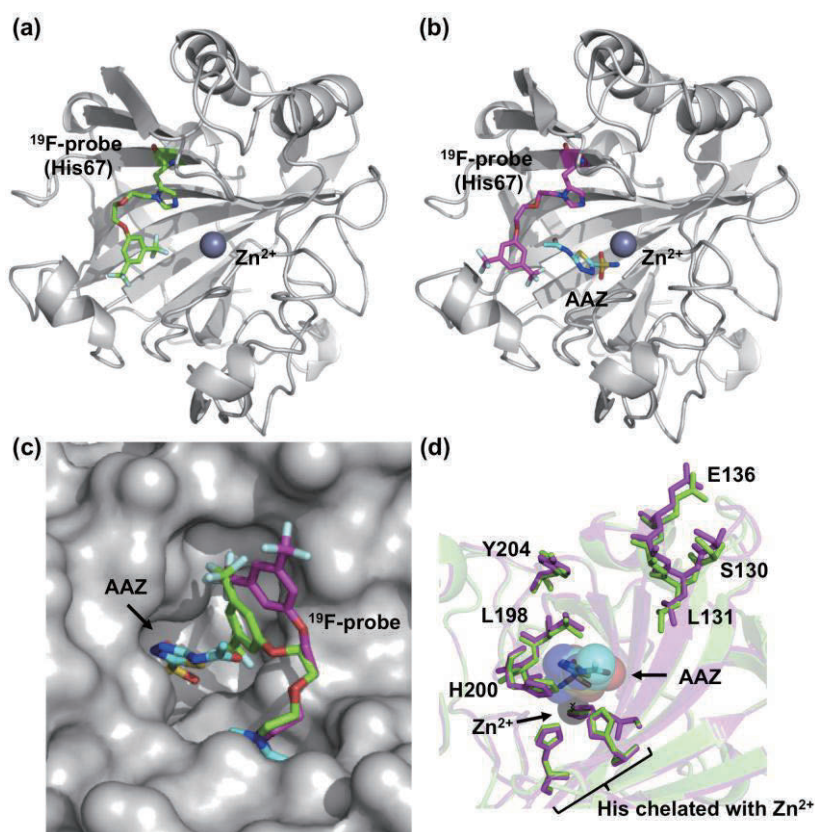
化と同時にリガンドがプローブから切り離される(図 1a)。

LDT 化学の有効性はヒト炭酸脱水素酵素(CA)のラベル化によって実証された。CA のリガンドとしては、ベンゼンスルホンアミド(SA)が知られている。試験管内での実験ではラベル化剤 1 を用いることでリガンド認識駆動によって、CA 選択的に蛍光性のクマリンをラベル化することが可能であった。特筆すべきことは、ラベル化されたタンパク質は本来の酵素活性を保持していることである。このラベル化反応はヒト赤血球内でも CA 選択的に進行した。赤血球には様々なタンパク質や小分子が存在するが、LDT 化学はこのような夾雑系でも優れた反応選択性を示した。さらにビオチンをプローブとしたラベル化剤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能を検討した。一定時間後に採血し、ウェスタンブロッティングを行なったところ、*in vivo* でも CA 選択的なラベル化の進行が確認できた。これは生きた生体でのタンパク質選択的なラベル化に成功した初めての例であり、LDT 化学の高い生体直交性を示す結果である。

3. LDT 化学による検出モード、ターゲットの拡張^{5,6,7,8,10,11,12,13}

LDT 化学によって様々な検出モードのプローブの特定タンパク質への導入が可能となった。¹⁹F 核は生体にほとんど存在せず、NMR プローブとして、生体のバックグラウンドを低く抑えられる。我々は ¹⁹F プ

ローブをもったラベル化剤と in-cell NMR という手法を併用する事で、CA 活性ポケット近傍の環境変化を敏感にとらえることに成功した。ラベル化された CA を含む赤血球に、そのまま阻害剤である EZA (ethoxzolamide) を添加すると、EZA の結合に由来する新たな NMR ピークの出現し、それは追跡可能であった。すなわち赤血球



中で内在性の CA は活性を保持したまま、細胞内で直接バイオセンサーへ変換されたと言

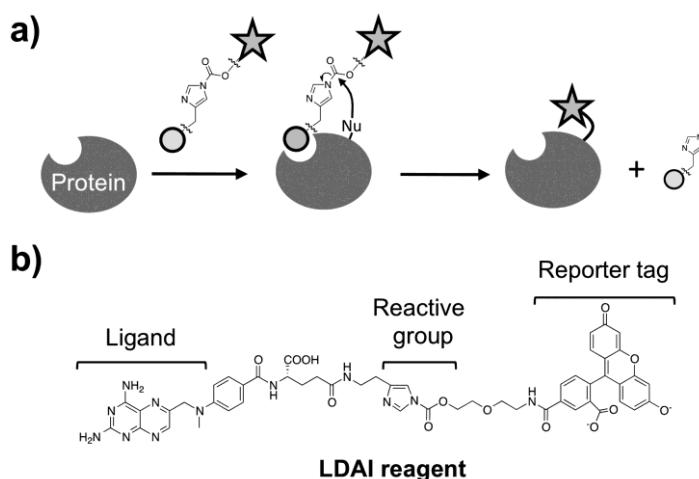
える。最近では、NMR として EXSY を細胞内でも測定して、CA のダイナミックな揺らぎの挙動を細胞内と試験管中で比較することも可能となりつつある。

LDT 化学はリガンド部位を変更すると、様々なタンパク質にそのターゲットを拡張することができるはずである。例えば免疫抑制剤として知られる FK506 に結合するタンパク質 FKBP12 (FK506 binding protein 12) に対するリガンドである SLF をリガンドとしたラベル化剤を合成すると、Jurkat 細胞の内在性 FKBP12 がラベル化できる^{7,8)}。この際、FKBP12 の他に分子量の異なるタンパク質のラベル化が確認された。これは SLF という FK506 類似の小分子リガンドの off target タンパク質である可能性があり、現在解析を進めている。この偶然の知見は、細胞内での共有結合形成を伴うこのような有機化学が、薬剤 off target の評価などに応用できる事を示唆している。さらに光クロスリンカー(ジアジリン)と呼ばれる紫外光の照射によって活性化する反応基を FKBP12 に導入することで、FKBP12 と相互作用するタンパク質を FKBP12 との架橋体として細胞内検出することも実現した。

4. Ligand Directed Acyl Imidazole Chemistry (LDAI 化学)

LDT 化学でラベル化されるアミノ酸残基として、これまで His, Glu, Asp, Tyr を同定した。逆に言うと、ラベル化反応ではこれらのアミノ酸が適当な位置に存在する必要がある。また LDT 化学は反応速度が遅いという課題もある。様々なタンパク質を標的とするためには、明らかにラベル化反応のバラエティーが不足しており、その拡充が求められる。

ごく最近、その一つとして、リガンド指向型アシルイミダゾール化学(Ligand Directed Acyl Imidazole Chemistry - LDAI 化学)を開発した⁹⁾。リガンド認識に駆動された反応基とアミノ酸残基の近接効果は LDT と同様であるが、ここでは SN2 反応ではなく求核的アシル置換反応が進行し、リガンドが切り離さ、ウレタンあるいは炭酸結合が形成される(図 3a)。リガンドとしてメトトレキサート(MTX)を持つラベル化剤を用いて、葉酸受容体(FR)やジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)のラベル化を検討すると、試験管中において LDAI 型では Lys 残基選択的に 84% の高いラベル化率を示した。膜蛋白質である FR を発現している生きた KB 細胞



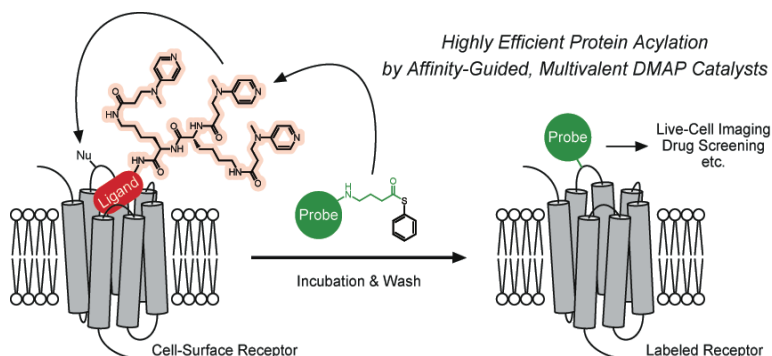
そのままを LDAI 化学によってラベル化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ラベル化後には細胞膜表層から蛍光が観察されたが、興味深いことに、葉酸の添加によって膜に存在した蛍光の一部が次第に細胞内へと移行する様子が観測された。これはラベル化された FR がリガンド刺激によって、細胞内移行(internalization)していることを示している。また LDAI ラベル化剤でフルオレセインを標識した場合、葉酸類縁体の添加によって、細胞膜上の蛍光が明るくなった。この蛍光強度の増大は添加したリガンドの種類や濃度に依存し、各リガンドの添加に伴う蛍光の時間変化から、リガンド結合の速度論的パラメーターの算出が可能であった。生細胞で内在性タンパク質(葉酸受容体はガンマーカマー蛋白質でもある)¹⁴⁾をそのままラベル化することによって、リガンド小分子と受容体との相互作用をより自然(生きたまま)な状態での精密解析ができることを示す先駆的な例である。

5. Affinity Guided DMAP Chemistry (AGD 化学)

リガンドの痕跡を残さない別のラベル化戦略として、触媒連結リガンドを使う戦略も考案した(Affinity Guided DMAP 化学)^{15),16)}。このラベル化法では、リガンドを連結した DMAP がタンパク質の活性ポケットに結合し、これがタンパク質表面でプローブ部位をつないだアシルドナーを活性化する。次に近傍アミノ酸残基が求核攻撃をすることで、アシル転移反応が起こる。プローブ部位はリガンド連結 DMAP からタンパク質上のアミノ酸残基に転移しラベル化されるが、リガンドは除去される。興味深い事に、AGD 法では DMAP 数を増やすことでラベル化の効率が飛躍的に向上し、LDT や LDAI 化学より高速ラベル化が可能である。これは DMAP の多価効果によって、効率よくアシルドナーが活性化されるとともに、DMAP が塩基としても作用しているためと推測している。

HEK293 細胞で GPCR の一種であるブラジキニン B₂ 受容体(B₂R)に対し、ペプチドアンタゴニストを連結した DMAP 触媒およびフルオレセインをもつチオエステル型アシルドナーを用いてラベル化を行なった。ラベル化は 30 分で完結し、細胞膜表層のみからフルオレセイン由来の蛍光が観察された。

この細胞膜上の蛍光は消光基である Dabsyl 基を連結したアンタゴニストを添加すると、大きく減少した。ここに様々



なアンタゴニスト候補分子を添加したところ、B₂R と結合できる場合にのみ Dabsy 基の追出しが起こり、蛍光が回復していく様子が観察された(図 4c)。DMAP 化学によって B₂R が生細胞膜表面で turn-on 型の蛍光センサーへと変換され、アンタゴニスト候補のスクリーニングができることを意味している。GPCR は創薬標的として注目されているタンパク質であり、簡便な手法での生細胞そのままで機能評価系の構築は極めて意義深い。

6.まとめ

細胞夾雑系において、特定のタンパク質に選択的にプローブを導入できる化学的手法を紹介した。幾つかの成功例はでてきたものの、まだその化学が未熟で発展途上なのは一目瞭然であろう。一方、測定機器の発展によって、化学者の精度で、複雑な生体分子を取り扱えるようになったことも事実である。タンパク質をそのままラベル化し、その挙動をいろいろな角度から解析する(化学を開発してそれを実行する)ことで、タンパク質の関与する複雑な生命現象の解明や創薬開発に分子からの新しい視点が加えられると信じている。

参考文献

1. Hayashi, T.; Hamachi, I. *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1460–1469 (2012).
2. Takaoka, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, Review 4088–4106 (2013).
3. Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12065–12067 (2000).
4. Takaoka, Y.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Nakata, E.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3273 (2006).
5. Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. *Nature ChemBio.* **5**, 341–343 (2009)
6. Tsukiji, S.; Wang, H-x.; Miyagawa, M.; Tamura, T.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9046–9052 (2009).
7. Tamura, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 2216–2226 (2012).
8. Tamura, T.; Kioi, Y.; Miki, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, (2013) in press.
9. Fujishima, S.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3961–3964 (2012).
10. Takahashi, M.; Kawamura, A.; Kato, N.; Nishi, T.; Hamachi, I.; Ohkanda, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 594–596 (2012).
11. Takaoka, Y.; Sakamoto, T.; Tsukiji, S.; Narazaki, M.; Matsuda, T.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Hamachi, I. *Nature Chem.* **1**, 557–561 (2009)
12. Mizusawa, K.; Ishida, Y.; Takaoka, Y.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7291–7293 (2010).
13. Takaoka, Y.; Kiminami, K.; Mizusawa, K.; Matsuo, K.; Narazaki, M.; Matsuda, T.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11725–11731 (2011).
14. Mizusawa, K.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13386–11395 (2012).
15. Koshi, Y.; Nakata, E.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Ogawa, T.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 245 (2008).
16. Wang, H-x.; Koshi, Y.; Minato, D.; Nonaka, H.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12220–12228 (2011).