

生細胞分子化学

理化学研究所 & ERATO/CREST-JST 袖岡 幹子

1. はじめに

低分子化合物を鍵とするケミカルバイオロジー研究において、鍵となる化合物の細胞内局在を明らかにし、標的タンパク質やその結合部位を同定する事は、研究の出発点としてたいへん重要である。しかし化合物や標的タンパク質の性質によっては、なかなかうまくいかない場合も多い。実際、複雑系である生細胞に適用できる真に有用な手法はまだ限られている。そこでケミカルバイオロジー研究の為に新しい化学的手法の開発をめざし、JST-ERATO 生細胞分子化学プロジェクトを立ちあげ、研究に取り組んできた。本講演では、その成果の一部についてお話したい。

2. アルキンをタグとして用いるラマンイメージング

細胞内局在を調べるには、通常はリガンドとなる低分子化合物に蛍光タグをつけたものを合成し、蛍光顕微鏡を用いて局在を観察する。しかし大きな蛍光団の導入により、生物活性が低下したり局在が変わってしまったりという事をしばしば経験する。我々はこの問題を解決する新しいアプローチとして、蛍光団を使わず、細胞内の低分子化合物を小さなアルキンをタグとして直接可視化する新しいアプローチ、alkyne-tag Raman imaging (ATRI) にとりこんでいる。分子振動を検出可能なラマン顕微鏡は、チトクロームCや脂質などに特徴的なピークを検出する事により、これらの生体分子を直接イメージングする事が可能である。¹⁾アルキンは、生体成分による強いピークが現れないサイレント領域 ($1800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) にピークを示す事から、アルキンをタグとして用いる低分子化合物のラマンイメージングが可能であると考えた。種々検討を行った結果、概念実証実験として、細胞増殖プローブとして開発された EdU が核 DNA に取り込まれる様子のイメージングを行う事に成功した。²⁾

さらに様々な構造のアルキンのラマンシフトとラマン強度を調べた。³⁾ラマン散乱の強さは、用いるレーザー波長などの測定条件によって変化する事から、強度は EdU を 1 としたときの相対強度 (RIE) で評価した。アルキンの置換基によってラマンシフトと強度は大きく変わり、芳香環が置換したアルキンや共役ジインでより強いシグナルが観測された。また、EdU も含めて末端アルキンは比較的低波数側にラマンピークを示すのに対し、内部アルキンや共役ジインはより高波数側にピークを示した。この事は、適切なアルキンの組み合わせを用いると、原理的には同時に複数の化合物のイメージングを行える可能性を示唆している。実際にジインを側鎖に組み込んだユビキノ誘導体と EdU で細胞を同時に処理し、ふたつの化合物の異なる局在をイメージングする事にも成功した。³⁻⁵⁾

さらにアルキンだけでなく、ニトリルもサイレント領域に比較的強いピークを示し、やはり置換基や分子の状態によってラマンシフトが変化する事が分かった。この性質を利用し、アンカップラー (脱共役剤) として知られる FCCP (carbocyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) のプロトン型と脱プロトン型の分子の生細胞内の分布の違いをイメージングする事にも成功した。⁶⁾

3. アルキントグ分子の濃縮法

低分子化合物の標的タンパク質を同定するためには、低分子化合物を固相担体に固定して直接結合タンパク質を釣り上げるアフィニティーゲル法とならんで、求電子性官能基や光反応性官能基を用いて選択的に標的タンパク質と共有結合を生成させるアフィニティーラベル化法が用いられている。後者は、標的タンパク質が膜タンパク質複合体などの場合には特に重要な手法となる。結合したタンパク質の同定のためには、複雑な混合物の中から、ラベル化されたタンパク質やその酵素消化断片を濃縮・精製するステップが鍵となる。低分子化合物に蛍光団を導入し、蛍光をたよりに電気泳動や液体クロマトグラフィーによって分画、精製するか、あるいは化合物にビオチンを導入し、ビオチン-アビジンの結合能を利用して検出ならびに濃縮・精製する手法が広く用いられている。しかし、やはり大きな蛍光団やビオチンの導入により活性が低下するという問題点は残されている。

近年この問題を解決する方法として、Click 反応（特に Huisgen 環化反応）が広く用いられるようになって来た。すなわち、小さなアルキンをタグとして化合物に導入し、標的タンパク質との共有結合を形成させた後で、Click 反応によりビオチンを導入し、アビジンを用いて濃縮を行う方法である。タンパク質の段階で Click 反応を行った場合、通常反応後に過剰の試薬を除去するためにゲル濾過や再沈殿を行う必要がある。さらに二次元電気泳動などで分離し、酵素消化後、ビオチンでラベルされたペプチドをアビジンで捕まえて (catch)、ビオチンでラベルされていないペプチドを洗い流した後で、目的とするペプチドを溶出 (release) するという操作により、目的とするペプチド断片を濃縮する。しかし多段階の操作によってサンプルをロスしてしまい、実際に質量分析で化合物が結合したペプチド断片の検出までたどり着く事が難しい場合も多い。そこで我々は、Click 反応を使わずに、アルキントグが結合した分子を、混合物の中から直接濃縮できる新しい手法の開発を目指す事とした。

コバルトカルボニル錯体は、アルキンと安定な複核錯体を形成する事が知られている。そこで、固相に担持したコバルトカルボニル錯体を用いてアルキントグ分子を選択的に濃縮 (catch) できるのではないかと考えた。溶出 (release) 後に、ペプチド断片を質量分析により解析する事を想定すると、強い酸化剤などを用いずに錯体からリガンドを切り出す条件を見いだす事が必要とされた。そこで、プロパルギルカーバメートをタグとして用い、コバルトカルボニル錯体が隣接位のカチオンを安定化する性質を利用して、酸性条件下、水との置換反応 (Nicholas 反応) を進行させ、脱炭酸をへてアミンとして分子を回収する事を計画した。

ペプチドの解析を想定して、まず、希釈されたバッファー水溶液中で、期待するようなコバルトカルボニル錯体の形成と脱炭酸を伴う溶出が実際に可能かどうかを、モデル化合物を用いて検討した。その結果、期待通りプロパルギルカーバメートタグがついた分子を catch & release してアミンとして回収できる条件を見いだす事ができた。さらに、大過剰のペプチド混合物の中から、500 pmol というごく微量のタグのついた化合物を濃縮する事にも成功した。^{7,8)}

4. 標的タンパク質蛍光アフィニティーラベル化法

アフィニティーラベル化法は、上記のように標的タンパク質や結合部位の同定に威力を発揮するだけでなく、生細胞イメージング法にも利用しうる。すなわち、生きた細胞中の機能を維持した状態の標的タンパク質を選択的にラベルできれば、例

えば標的タンパク質が何らかの刺激に反応して局在が変化するような“動き”を追いかける事も可能であろう。しかし実際には、細胞内という複雑な環境下、無数のタンパク質が存在する中で、目的とするタンパク質だけを選択的にラベル化できる優れたプローブは限られている。そこで NBD ユニット (NBD: nitrobenzoxadiazole) を用いた新しいアフィニティーラベル化法を開発する事を計画した。⁹⁾

アミノ基が置換した NBD (*N*-NBD) は、蛍光性を示し、古くから蛍光団として利用されてきた。一方、アルコキシ基などの酸素官能基が置換した NBD (*O*-NBD) は無蛍光であるが、1級アミンと置換反応を起こし、*N*-NBD に変換されるという報告があった。そこでリガンドと NBD ユニットの適切な反応性をもつ酸素官能基でつなげば、標的タンパク質と選択的に反応し、Turn-ON 型の蛍光ラベル化が可能ではないかと考えた。モデルとしてビオチン-アビジンの系を用いて、このアイデアを検証する事とした。アビジンには合計 9 つのリジン残基が存在するが、X 線結晶構造解析の結果から、ビオチンの結合部位から 12-19Å の距離に K₁₁₁ が位置している事がわかる。

そこでまず、ビオチンに様々な長さのリンカーを介して *O*-NBD を導入した化合物を合成した。*O*-NBD 化合物は、市販のフッ素置換体 NBD-F と対応するアルコールを反応させる事で、容易に合成する事ができ、蛍光を示さない事も確認した。これらの化合物とアビジンを中性のバッファー水溶液中 0 °C で混合したところ、12Å 以上の長さのリンカーをもつ化合物は速やかにアビジンと反応し、アビジンが蛍光を発するようになる事 (Turn-ON) が確認された。一方、短いリンカーをもつ化合物の場合は、反応効率が極めて低かった。また、最も高いラベル効率を示した化合物を用い、UV 吸収の変化により反応を定量的に解析した実験では、室温 1 時間および 12 時間後のラベル効率はそれぞれ 41%、76%であった。また、アビジンと無数のタンパク質を含む HL-60 細胞の細胞抽出液を混合し、ラベル化を行ったところ、高い選択性でアビジンのラベル化が観測された。

さらにラベル化されたアビジンをトリプシン消化し、LC-MS で解析したところ、蛍光を示すペプチド断片は 1 本のみであり、本ラベル化が非常に高い選択性で進行している事を示した。MS-MS 解析の結果、K₁₁₁ がラベル化されている事が確認され、本ラベル化がビオチンとアビジンの特異的な相互作用に基づくものである事が明らかとなった。

さらに本手法を膜タンパク質複合体の解析に応用した。Translocator protein (TSPO) は、古くは peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) として知られていた膜タンパク質であり、ミトコンドリア膜上で、voltage-dependent anion channel (VDAC) や adenine nucleotide translocase (ANT) と複合体を形成すると考えられている。TSPO リガンドとして最近報告された PIGA に着目し、そのプローブ分子、PIGA-*O*-NBD を合成した。マウス腎臓のミトコンドリアと反応させ解析したところ、直接の結合タンパク質として報告されている TSPO のラベル化は認められず、VDAC が主にラベルされた。おそらく TSPO には適切な位置にリジンが存在せず、PIGA-*O*-NBD は、TSPO ではなく複合体の相手であり多数のリジン残基を含む VDAC をラベルしたのではないかと推定している。このように、*O*-NBD ユニットの極めて高いリジン選択性は、構造未知の標的タンパク質のラベル化には弱点ともなるが、逆に複合体をモニターできるユニークなプローブになる可能性も秘めている。実際 PIGA-*O*-NBD を用いて、生細胞中でミトコンドリアを選択的に Turn-ON 蛍光ラベル化する事に成功した。

5. おわりに

汎用されている蛍光団やビオチンを用いる方法に加えて、ラマン分光や遷移金属化学というこれまであまりケミカルバイオロジー研究に使われてこなかった手法を用いる事によって、可能性は大きく広がると考えている。まだまだ課題は残るものの、より優れた手法の開発とその応用にチャレンジしていきたい。

<参考文献>

1. Okada, M.; Smith, N.I.; Palonpon, A.F.; Endo, H.; Kawata, S.; Sodeoka, M.; Fujita, K. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 28-32.
2. Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Okada, M.; Ando, J.; Palonpon, A.; Fujita, K.; Kawata, S.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6102-6105.
3. Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Palonpon, A.; Ando, J.; Fujita, K.; Kawata, S.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20681-20689.
4. Palonpon, A.; Ando, J.; Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Sodeoka, M.; Kawata, S.; Fujita, K. *Nature Protocol*, **2013**, *8*, 677-692.
5. Palonpon, A.F.; Sodeoka, M.; Fujita, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 708-715.
6. Yamakoshi, H.; Palonpon, A.F.; Dodo, K.; Ando, J.; Kawata, S.; Fujita, K.; Sodeoka, M. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1341-1343.
7. Egami, H.; Kamisuki, S.; Dodo, K.; Asanuma, M.; Hamashima, Y.; Sodeoka, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7667-7670.
8. Miyazaki, A.; Asanuma, M.; Dodo, K.; Egami, E.; Sodeoka, M. *Chem. Eur. J.* in press.
9. Yamaguchi, T.; Asanuma, M.; Nakanishi, S.; Saito, Y.; Okazaki, M.; Dodo, K.; Sodeoka, M. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1021-1029.