

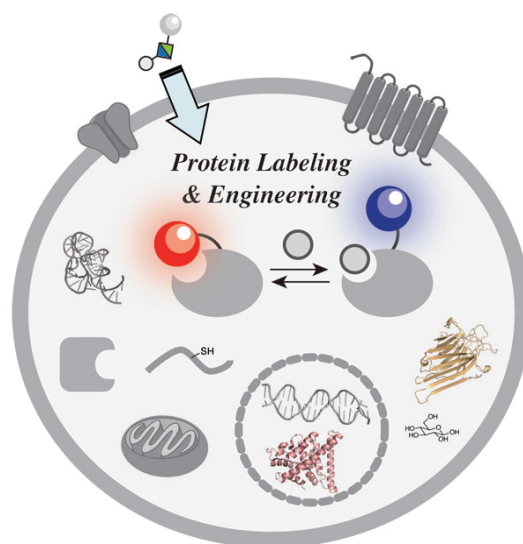
# 分子夾雑系のタンパク質有機化学

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高純度の溶媒中で混合し、狙った化学変換を実現して高収率で目的生成物を得る。この際、原料や溶媒に含まれる不純物（水分や酸素なども含めて）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、電子材料となる機能分子も様々な材料と複合化されて機能を発揮する。では、そのような夾雑系での物質変換を含めた有機化学を分子（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、究極の分子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や組織できれば *in vivo* で選択的に修飾・改変する化学的アプローチの構築を目指して、悪戦苦闘している。本講演では、我々の試みのいくつかを最近の例を中心にご紹介させて頂きたい。



## 2. 生細胞におけるタンパク質のラベル化(分子夾雑の有機化学)

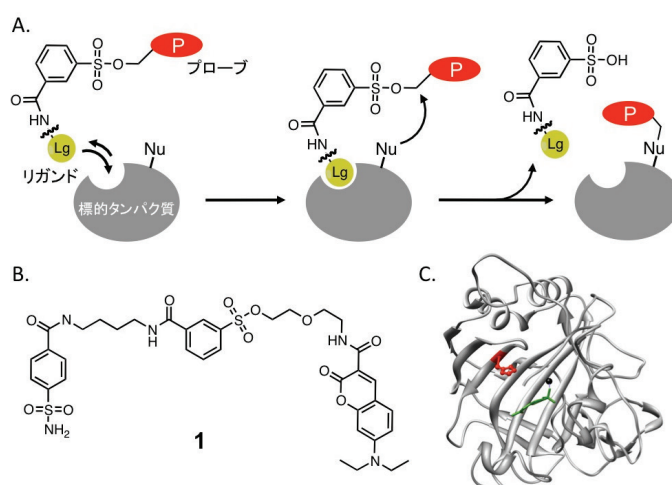
タンパク質の構造と機能解析は、これまで精製されたタンパク質を用いて希釈された試験管中で行われることが多かった。しかし、このような精製系では、必ずしもタンパク質の真の姿が評価できるわけではない。細胞には目的タンパク質以外にも多くのタンパク質や、種々のイオン、アミノ酸、核酸、糖鎖、脂質など多様な分子が混在し、複雑な相互作用ネットワークの中でその構造と機能が調整されるので、タンパク質が本来ある生細胞系でそのま

ま解析することが望まれるようになってきた。分子夾雑な細胞系でのタンパク質解析のためには、選択的なタグ付け(ラベル化)が必要となる。このタグを目印にすればごちゃ混ぜの環境下でも標的タンパク質が区別できるようになる。現在主として用いられるのは、ご存知の方も多い蛍光タンパク質 GFP 融合法に代表される遺伝子工学的手法である。これに対して、化学を基盤とした分子技術は貧弱と言わざるを得ない。例えば、蛍光シグナル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。蛍光有機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不都合な影響が小さい。また化学的手法では、蛍光シグナルに限らず様々な検出モードの分子を導入できる利点も期待できる。しかしタンパク質は、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担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。色々と課題山積ではあるが、挑戦がいのある基盤的な研究テーマでもある。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。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化学修飾が実現しつつある。

### 3. 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、分子夾雑環境でのラベル化が可能となりうる。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、タンパク質の機能が阻害されてしまう。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-PALM や P-ALM 法を開発したが、まだ多段階の処理が必要で、生体内での選択性 (生体直交性: bioorthogonality) は不十分であった。その後の試行錯誤の後、切り離し型反応基を活用したリガンド指向型トシル化



法を開発した。その後の試行錯誤の後、切り離し型反応基を活用したリガンド指向型トシル化

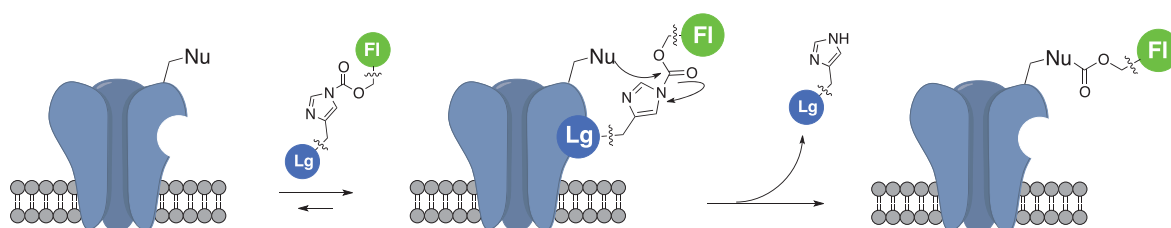
学(Ligand Directed Tosyl Chemistry - LDT 化学)を開発し、遺伝子操作を用いることなく、タンパク質修飾において十分な bioorthogonality を実証した。リガンド指向性化学では3つのモジュールからなるラベル化剤を用いる。(i)特定のタンパク質に親和性を有するリガンド、(ii)アミノ酸残基と反応する切り離し型反応(トシル)基、(iii)タンパク質に修飾したいプローブである。トシル基は SN2 反応の良い脱離基であり、図のようなラベル化機構が期待された。

①リガンドがタンパク質の活性ポケットに結合、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、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、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。

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 の阻害剤として知られるベンゼンスルホンアミド(SA)をリガンドとしたラベル化剤 **1** を設計し有機合成した。このラベル化反応は、試験管内の精製 CA だけでなく、様々なタンパク質や小分子が存在するヒト赤血球内や、マウス体内でも内在する CA 選択的に進行した。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。

#### 4.Ligand Directed Acyl Imidazole Chemistry (LDAI 化学)

LDT 化学は幾つものタンパク質に適用され、詳細な生成物解析からラベル化可能なアミノ酸の種類が、His, Glu, Asp, Tyr, Cys であることが分かってきた。逆に言うと、LDT 化学でのラベル化に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。また反応速度が遅いという課題も明らかになった。様々なタンパク質を標的とするためには、ラベル化反応の拡充が必須である。リガンド指向性化学の第二弾として、トシルの代わりにアシルイミダゾールを使った Ligand Directed Acyl Imidazole Chemistry:LDAI 化学を開発した<sup>9)</sup>。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、ここでは求核的アシル置換反応が進行し、リガンド切断と同時にウレタンあるいは炭酸結合が形成される。



例えば、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設計合成すると、ガン細胞

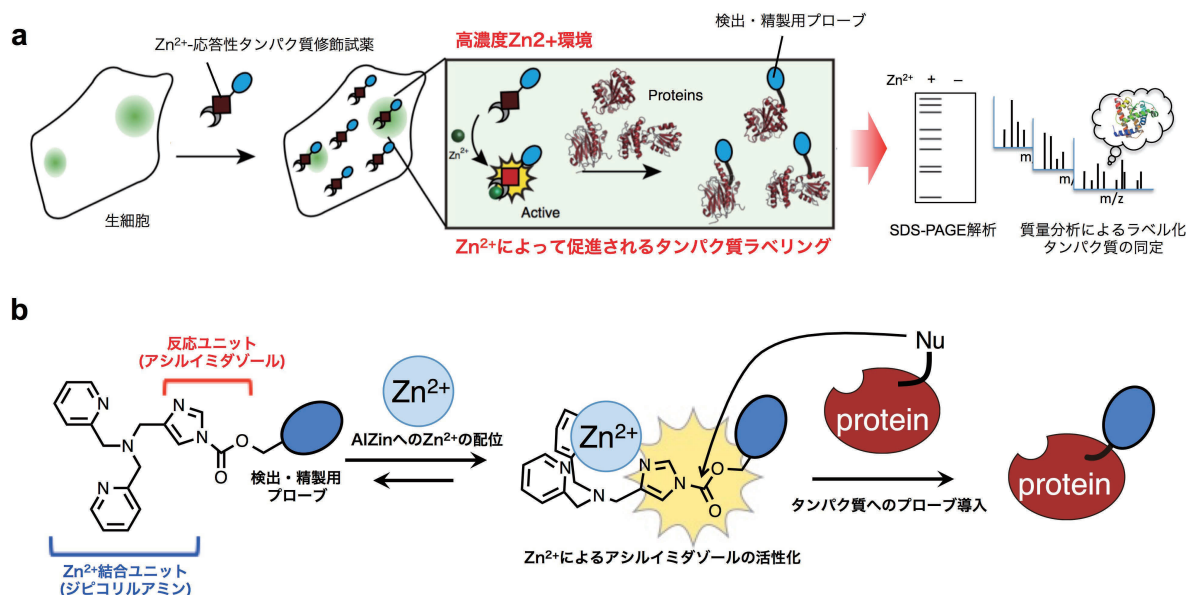
に過剰発現している葉酸受容体(FR)のラベル化が良好に進行し、生細胞での FR の動態イメージングやリガンド結合挙動の生物物理学的解析が可能となった。またLDAI化学では、Lys, Ser, Tyrといったアミノ酸に反応種が拡張されることを詳細なラベル化部位解析から明らかにした。ごく最近では、LDAI化学が脂質修飾型や一回膜貫通型の比較的構造の単純な膜タンパク質だけでなく、GPCR やチャネル型受容体（多量体）など構造と機能が複雑な膜タンパク質に関して幅広く、優れたラベル化特性を持つことを実証することができた。例えば、興奮性神経伝達物質一つであるグルタミン酸の受容体タンパク質：AMPA や mGluR1 の構造解析データとそれらと相互作用する小分子の medicinal chemistry 情報を基に、LDAI 型のラベル化剤を設計すると、これらはモデル細胞に過剰発現した膜受容体タンパク質だけでなく、神経細胞内に内在的に発現しているグルタミン酸受容体を、その機能を失うことなく高い選択性でラベル化しその局在や動態をイメージングできることが分かった。喜ばしいことに、この手法は、初代培養神経細胞だけでなく脳スライスのようなさらに複雑な夾雑系でも実際に使えるレベルであることが明らかになりつつあり、神経科学・脳研究の新しい分子技術となると期待されている。またこのような生細胞系でのケミカルラベル化は膜タンパク質の寿命解析や、標的タンパク質に結合する小分子（競合阻害剤だけでなく allosteric modulators など見つかってきている）の生細胞ベースでの High-throughput screening 系の構築などにも展開できることが実証された。

## 5.環境応答性タンパク質ラベリング：conditional proteomics

細胞のような分子夾雑環境でのタンパク質ラベリングでは、タンパク質の種類選択性だけでなく、タンパク質が局在する部位・環境も重要な要素となる。なぜならタンパク質の局在情報自体が、その構造や機能と密接に関係するからである。例えば、特定のオルガネラには固有のタンパク質群の偏在が見られ、また pH、カルシウムや鉄、亜鉛などの金属イオンの局所濃度の上昇が、タンパク質群の機能や寿命とカップリングする例が知られている。我々はLDAI骨格を基に、亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )によって反応活性が大幅に向上するラベル化剤を設計し、高濃度の  $Zn^{2+}$ 環境に局在するタンパク質の網羅的解析を試みた。最近の研究から、生体内における  $Zn^{2+}$ 動態は、生理応答や細胞内・外の環境変化に依存して劇的に変動することが明らかとなっている。例えば、 $Zn^{2+}$ は神経細胞のシナプス小胞からグルタミン酸とともに放出され、後シナプスに位置する NMDAR など複

数の受容体タンパク質の活性に影響を及ぼす。このことから  $Zn^{2+}$ シグナリングは、記憶・学習といった高次脳機能に重要であると考えられている。さらに、脳虚血、アルツハイマー病、てんかんといった種々の神経症患者の脳組織において  $Zn^{2+}$ 濃度の上昇が確認されており、これら脳疾患と  $Zn^{2+}$ ホメオスタシス異常の関連性が示唆されている。

分子設計された  $Zn^{2+}$ 応答性タンパク質ラベル化剤：AIZin は、下図の通りである。この分子は  $Zn^{2+}$ に選択的に結合するジピコリルアミン配位子と、アシルイミダゾール (AI) 反応基を有している。これら2つのモジュールは、イミダゾール部位が  $Zn^{2+}$ 錯体形成に参与し得るように連結されている。この分子にルイス酸性度の強い  $Zn^{2+}$ が配位すると、イミダゾール環の電子密度が低下し、反応点であるアシル基の反応性が大幅に向上する。この活性化メカニズムによって高濃度  $Zn^{2+}$ の周辺に存在するタンパク質に対するラベル化反応が大きく加速された。高濃度  $Zn^{2+}$ 環境選択的な化学的タンパク質修飾と、細胞イメージング実験や定量質量分析装置を組み合わせた分析によって、 $Zn^{2+}$ 環境選択的なプロテオミクスが可能となり、 $Zn^{2+}$ 恒常性が破綻した神経細胞モデルで、 $Zn^{2+}$ を一時的に格納するベシクルの正体が明らかになった。



## 6.結びにかえて

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有機化学を紹介した。幾つかの成功例は手にしたものの、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てきた。タンパク質をそのままラベル化し、その挙動を様々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。

なお、浜地研では細胞の分子夾雑を手本にして、多成分夾雑な自己組織化材料:ヒドロゲルを中心としたソフトマテリアルの合成化学・超分子化学も展開中です。詳細は、下記参考文献の一部をご参照ください。

## 参考文献

- (a). Hayashi, T.; Hamachi, I. *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1460-1469 (2012).
- (b) Takaoka, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Angew. Chem. Int Ed.*, **52**, (review) 4088-4106 (2013).
- (c) Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12065-12067 (2000).
- (d) Nonaka, H.; Ojida, A.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15777-15779 (2007).
- (e) Koshi, Y.; Nakata, E.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15777-15779 (2007).
- (f) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. *Nature ChemBio.*, **5**, 341-343 (2009)
- (g) Tsukiji, S.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9046-9052 (2009).
- (h) Tamura, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. et.al. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6782-6785 (2013).
- (i) Takaoka, Y.; Sakamoto, T.; Hamachi, I. et.al., *Nature Chem.*, **1**, 557-561 (2009).
- (j) Mizusawa, K.; Takaoka, Y.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7291-7293 (2010).
- (k) Takaoka, Y.; T.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11725-11731 (2011).
- (l) Mizusawa, K.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13386-13395 (2012).
- (m) Yoshii, T.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 16635-16642 (2014).
- (n) Hayashi, T.; Yasueda, Y.; Hamachi, I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 5372-5380 (2015).
- (o) Kiyonaka, S.; Kubota, R.; Hamachi, I. et.al., *Nature Chem.*, **8**, 958-967 (2016).
- (p) Yamaura, K.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., *Nature ChemBio.*, **12**, 822-830 (2016).
- (q) Miki, T.; Hamachi, I. et.al., *Nature Methods*, **13**, 931-937 (2016).
- (r) Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., *Nature Commun.*, **8**, 14850 (2017).
- (s) Kiyonaka, S.; Sugiyasu, K.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10954-10955 (2002).
- (t) Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., *Nature Mater.*, **3**, 57-64 (2004).
- (u) Tamaru, H.; Hamachi, I. et.al., *Nature Commun.*, **1**, 20 (2010).
- (v) Ikeda, M.; Hamachi, I. et.al., *Nature Chem.*, **6**, 511-518 (2014).
- (w) Onogi, S.; Shigemitsu, H.; Hamachi, I. et.al., *Nature Chem.*, **8**, 743-752 (2016).
- (x). Shigemitsu H.; Hamachi, I. *Acc. Chem. Res.*, **50**, 740-750 (2017).
- (y). Shigemitsu, H.; Kubota, R Hamachi, I. et.al., *Nature Nanotech.*, **13**, 165-175 (2018)など。