

タンパク質認識と変換のための有機化学

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 浜地 格

はじめに

細胞生物学やケミカルバイオロジーにおいてバイオイメージングの重要性が高まるにつれて、蛋白質を合成蛍光色素で標識するための新しい手法が求められるようになった¹⁾。蛍光蛋白質を用いた手法では、分子サイズ、蛍光特性、種類などの点で限界があり、それらを克服できる自由度を有する合成蛍光色素は大変魅力的である。分子サイズが小さいので対象蛋白質の機能への影響を最小限に抑える事ができるし、またマイクロ環境応答性や pH 応答性という蛍光蛋白質にはないような特性を持つ蛍光色素も数多くあり、それらの機能と蛋白質が持つ高い分子認識能を融合することで、単にタンパク質に蛍光タグをつけるだけでなく、さまざまな生体機能分子に対する半合成蛍光バイオセンサーの創製にもつながるものと期待される。蛍光バイオセンサーは細胞内イメージングだけでなく薬剤探索などにも使用することができ、ケミカルバイオロジー研究を促進する重要な分子ツールとしても貢献するであろう。

しかしながら現在の(有機)化学の力量では、特定の蛋白質中の特定部位を狙って蛍光色素を導入するというのは容易なことではない。特に細胞内のように多様な蛋白質が濃縮された環境下ではなおさら難しく、システイン残基のマレイミド修飾に代表されるような古典的な蛋白質修飾法のほとんどが使用できないと考えた方がよい。これは、これまでの蛋白質化学が主に *in vitro* で発展してきたことに起因し、細胞内のような夾雑系で使用可能な化学修飾法を考案すること自体が大変萌芽的で難易度の高い課題である。そこではタンパク質選択性とタンパク質内での部位特異性という二つの選択性を満たさなければならない。もちろん反応は水中である。そのような背景のもと、筆者らを含めた内外のいくつかのグループによって、細胞内を指向した新しい蛋白質有機化学の開発が進められている。ここでは筆者らの研究成果を中心にこのチャレンジングな研究分野の一端を紹介したい。

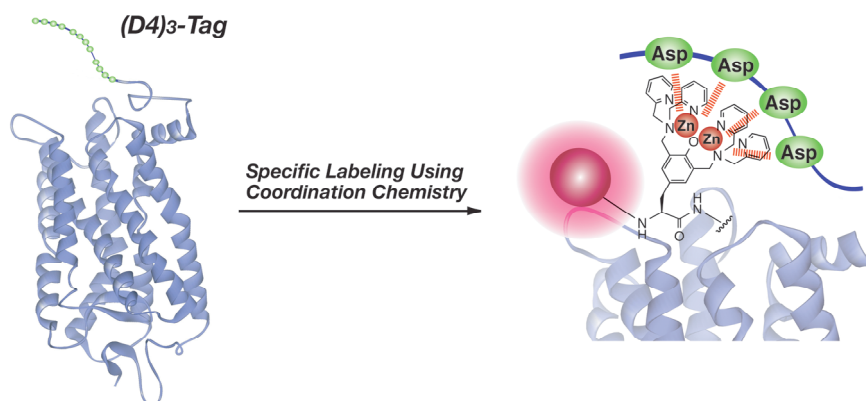
I : ペプチドタグ／蛍光性人工小分子ペア

細胞のようなさまざまな蛋白質が混在した中で、特定の蛋白質のみに蛍光色素を反応させるというのはほぼ不可能に近い。そこで標的蛋白質にタグとなる配列を融合したものを発現させ、抗原抗体反応やタンパク質／リガンド認識を利用してそのタグ配列特異的に蛍光ラベル化するという生物学的な戦略が考案された¹⁾。この戦略を用いることで、標的蛋白質を合成色素によって光らせ、その細胞内動態や相互作用をイメージング解析できるようになりつつある。

最近、天然には存在しない短いペプチド配列をタグとして用いるという斬新な提案がなされた。実際には、短いペプチド配列とそれに特異的に相互作用する人工小

分子プローブのペアを創製することは大変難しい挑戦だが、これまでに3つほど画期的な手法が報告されている²⁻⁴⁾。

最も先駆的な例は、Tsien らが開発した「テトラシステインタグ (CCPGCC) / FIAsh」ペアである (図 2A)²⁾。FIAsh は緑色蛍光色素のフルオレセイン誘導体であり、分子内のヒ素がペプチドタグ配列中の4つの Cys 残基と強固な配位結合を形成する。彼らはこれらを用いることで、細胞—細胞間のギャップジャンクションを形成するコネキシン 43 のダイナミックな細胞内分布の変化を可視化することに成功した。同様の戦略で、従来、発現蛋白質の精製や固定化に使用されてきた「His タグ / Ni-NTA」ペアを蛋白質の蛍光ラベル化へ応用した例が報告されている (図 2B)。Vogel らは、細胞膜上に発現させたイオンチャネル型セロトニン受容体や G 蛋白質共役型受容体の蛍光イメージングに適用可能であることを実証した³⁾。His タグを狙った認識イメージング化学は我々も同時進行で研究していたが、彼らに先を越されたためにこのアイデアは捨てる事にした。



幸いな事に もう一つ別に進めていたアイデアは出し抜かれることなく昨年発表する事が出来た。即ち、蛋白質表面を認識可能な人工小分子の開発を進める過程の中で、テトラアスパラギン酸配列が二核亜鉛錯体 (Zn-BDT) と強く相互作用することを発見し、新しい「D4 タグ / Zn-BDT」ペアを提案した (図 1)⁴⁾。このペアは D4 タグ配列中の Asp 残基と Zn-BDT が多点相互作用することによって高い親和性 (結合定数 $10^6 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$) が達成された。これに勇気づけられて、D4 タグの3回繰り返し配列を融合したムスカリン感受性アセチルコリン受容体 (mAChR) を CHO 細胞に発現させ、この細胞を Cy5 連結型 Zn-BDT ダイマーで染色すると細胞膜上の mAChR を選択的に蛍光標識できることを実証した。またこの蛍光ラベル化法は、細胞増殖能やアゴニスト刺激に伴う受容体下流のシグナル伝達経路にも影響を与えず、標識蛋白質の機能を大きく阻害しない手法であることも確認された。大変面白いことに、Zn-BDT 錯体と His タグ配列、また Ni-NTA 錯体と D4 タグ配列は互いに相互作用せず、「His タグ / Ni-NTA」ペアと「D4 タグ / Zn-BDT」ペアは高い直交性を有していることが判明した。このことは、タグ配列を使い分けることで同一細胞上に発現させた異種の蛋白質をそれぞれ別の蛍光色素で染色できることを示しており、細胞内での蛋白質—蛋白質間相互作用の解析などへの応用が期待される。

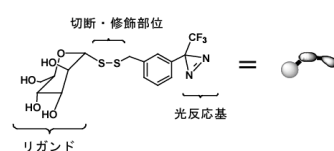
1.1 : 天然蛋白質のアフィニティラベル化後修飾法

タグ融合蛋白質の蛍光ラベル化法の開発によって、さまざまな蛍光色素を蛋白質の機能解析に使用できる可能性が広がった。一方、この手法は蛍光蛋白質法と同様、細胞内での遺伝子発現を要するため、必然的に対象蛋白質が人工的に過剰発現された環境となる。遺伝子上で細工を施した蛋白質ではなく、細胞内に存在する天然蛋白質そのものに特異的に蛍光色素を導入する手法を開発することは化学者の究極の目標の一つであろう。そこまでは辿り着く道程はまだ遙かかもしれないが、筆者らはアフィニティラベルの化学を展開することで、究極のラベル化法への足がかりを見つけ始めている。

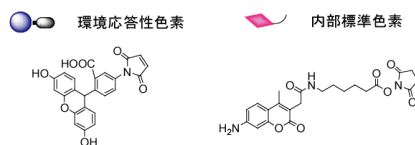
1 : レクチンの光アフィニティラベル化後修飾法

蛋白質のアフィニティラベル化では、特定の蛋白質に対して親和性を有するリガンドと反応基が連結した化合物をラベル化剤として用いる。ラベル化剤は標的蛋白質の存在下、まずリガンド部位が標的蛋白質に認識され、それに伴った近接効果によって反応基がその近傍のアミノ酸と共有結合を形成する。この手法の大きな特徴は、標的蛋白質そのものとの親和性を利用した修飾法であることと、リガンド結合部位の近傍で化学修飾が達成されることにある。これらの特徴を利用すれば、夾雑系で天然蛋白質をラベル化するための新しい手法が開発できるかも知れない。しかし、通常のアフィニティラベル化では、ラベル化蛋白質の活性中心ポケットはリガンド分子によってマスクされ、その蛋白質の活性や機能は完全に消失する。そこで筆者らは、ラベル化剤のリガンド部位と反応基を切断可能でその後に化学修飾が行えるような共有結合を介して連結することを考えた。こうすることで、標的蛋白質のアフィニティラベル化後にリガンド分子を切り離すことができ、標的蛋白質の活性を回復させることができる。更にリガンド除去によって生成した新しい反応点にさまざまな蛍光色素を導入することができる (図 2)。

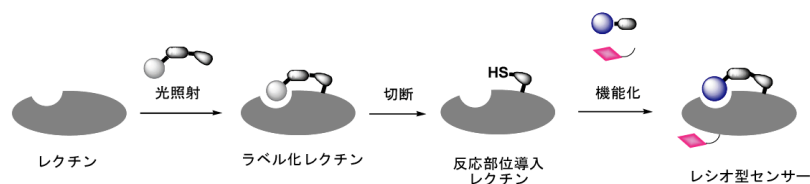
P-PALM 試薬



導入する機能性分子



P-PALM スキーム



筆者らは、糖結合蛋白質 (レクチン) であるコンカナバリン A (ConA) を標的蛋

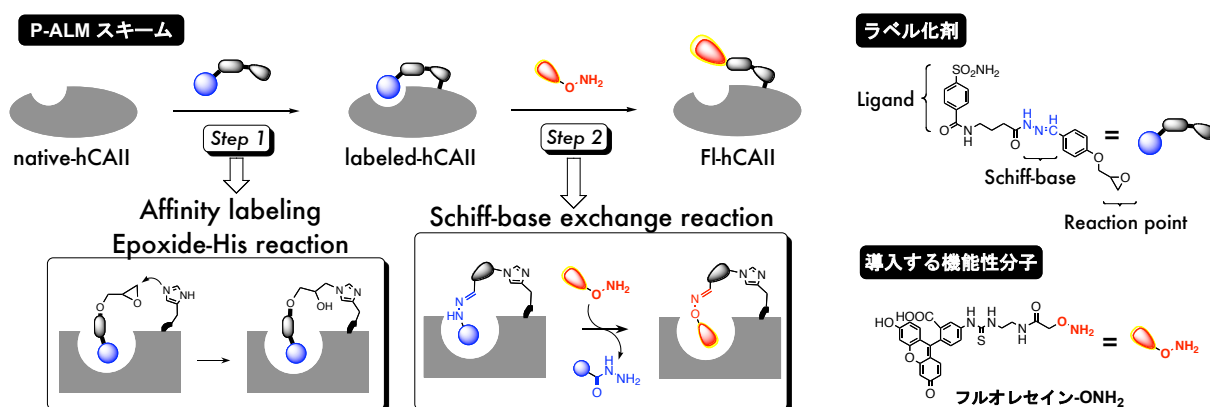
白質として選び、光アフィニティラベル化を用いてこのアイデアを検証した⁵⁾。その概要を以下に述べる。設計合成したラベル化剤は、**ConA** に対して親和性の高い α -D-マンノシド基と光架橋基であるトリフルオロメチルフェニルジアジリン基がジスルフィド結合を介して連結されている。ラベル化剤の存在下、UV 光照射によって **ConA** をラベル化できることが確認され、ラベル化反応はリガンド結合部位近傍の 100 番目の **Tyr** 残基に特異的であることが判明した。その後、ラベル化剤のジスルフィド結合を還元処理によって切断することによって生成したチオール基に対してさまざまな蛍光色素が導入された。中でもマイクロ環境感受性の蛍光色素を導入した **IAEDANS-ConA** は、糖質の結合を蛍光強度の変化として読み出すことが可能であり、半合成蛍光グリコセンサーとなった。糖質に対する選択性も天然 **ConA** のものと変わらなかった。このように本手法は、天然蛋白質をそのまま蛍光ラベル化するだけでなく、更にその活性を生かしたままバイオセンサーへと変換することのできる大変有用な手法であることが示された。筆者らはこの手法を「光アフィニティラベル化後修飾 (P-PALM) 法」と呼んでいる。

この P-PALM 法と選択的アシル化反応を組み合わせると、二種類の蛍光色素 (**AMCA** と **FI**) を同一 **ConA** 上に導入した二重標識グリコセンサー **AMCA-FI-ConA** を創製することも可能であった⁶⁾。この **AMCA-FI-ConA** は、選択的アシル化反応によって導入した **AMCA** 色素が内部標準として機能するため、**ConA** への糖質の結合をレシオメトリックに検出することができる。実際に **AMCA-FI-ConA** を用いることで、ヒト乳癌細胞 **MCF-7** の表層に過剰提示されているハイマンノース型糖鎖や、固定化させたヒト肝癌細胞 **HepG2** 内のグルコース濃度の変化をレシオ蛍光イメージングすることも確認した。細胞機能やその異常化における糖質の重要性が次第に明らかになる一方、それらを検出することのできる蛍光センサーはまだほとんど開発されていない。P-PALM 法によるレクチンの蛍光バイオセンサー化はグリコバイオロジーにおける重要な手法となるものと期待される。

2 : 酵素の One-Pot アフィニティラベル化後修飾法

P-PALM 法では、リガンドの除去とその後の修飾反応にチオール化学を用いていた。したがってもともと **Cys** 残基を持つ蛋白質には適用することができない。またリガンドの除去後には精製を行なう必要があり、操作上の煩雑さなどが問題点として残された。そこで筆者らは、アフィニティラベル化から蛍光色素の導入までをすべてワンポットで行なうことのできる「アフィニティラベル化後修飾 (P-ALM) 法」を考案し、ヒト炭酸脱水酵素 (**hCAII**) に対して適用した (図 3)⁷⁾。ラベル化剤として合成した小分子化合物は、**hCAII** 特異的な阻害剤であるベンゼンスルホンアミド基と求電子性反応基であるエポキシド基がヒドラゾン結合を介して連結されている。これは温和な条件で、**hCAII** 中の 3 番目もしくは 4 番目の **His** 残基を特異的にラベル化できた。その後、フルオレセインのヒドロキシアミン誘導体をそのまま系中へ添加するとシッフ塩基結合がヒドラゾン型からより熱力学的に安定なオキシム型に

置換され、リガンドの切り出しと蛍光ラベル化が同時に達成された。このようにして調製した FI-hCAII は種々のリガンドに応答し、hCAII の阻害剤スクリーニングに使用可能な蛍光バイオセンサーとして機能した。最近では、本手法を用いて、赤血球ライセート中に存在する内在性 hCAII を蛍光標識できることを確認しており、生きた細胞内で天然蛋白質を直接ラベル化することが視野に入ってきている。



分子の視点から細胞機能を解明するためには、細胞を構成するそれぞれの生体分子の量、相互作用、細胞内分布、活性などのパラメーターを時空間的な情報とともに解析していくことが不可欠である。特に蛋白質の蛍光ラベル化法の開発や蛍光バイオセンサーの創製はわれわれ化学者に課せられた大きな課題の一つであろう。ここで紹介した新しい蛋白質標識法を用いることで、蛍光色素に限らず、アフィニティタグ、ケージド化合物、光クロスリンカー、分光光学プローブなどのさまざまな合成分子プローブを蛋白質中へ導入することが可能である。そのような合成分子プローブを導入した蛋白質は、今後、細胞や組織、個体の機能解析や制御のための重要なケミカルバイオロジーツールとしての応用が期待される。

おわりに

このように述べてくるとあたかも生物学に役に立つ分子ツール作りを目標に研究をやっていると誤解されるかもしれないが、我々のグループの真の意味での **motivation** は別の所にある。実際は、水中でかつごちゃごちゃした夾雑系で（生体）高分子を高選択的に変換できる有機化学の開拓が今世紀の新しい化学の進展に寄与することを信じての悪戦苦闘である。

文献

- 1) 総説として (a) Tsien, R.Y.: *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509–544 (1998); (b) Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 906–918 (2002) (c) Miller, L.W., Cornish, V.W.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 56–61 (2005)
- 2) (a) Griffin, B.A., Adams, S.R., Tsien, R.Y.: *Science*, **281**, 269–272 (1998); (b)

- Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J., Tsien, R.Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063–6076 (2002); (c) Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H.: *Science*, **296**, 503–507 (2002)
- 3) Guignet, E.G., Hovius, R., Vogel, H.: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 440–444 (2004)
- 4) Ojida, A., Honda, K., Shinmi, D., Kiyonaka, S., Mori, Y., Hamachi, I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452–10459 (2006)
- 5) (a) Hamachi, I., Nagase, T., Shinkai, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12065–12066 (2000); (b) Nagase, T., Nakata, E., Shinkai, S., Hamachi, I.: *Chem. Eur. J.*, **9**, 3660–3669 (2003); (c) Nakata, E., Nagase, T., Shinkai, S., Hamachi, I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 490–495 (2004)
- 6) Nakata, E., Koshi, Y., Koga, E., Katayama, Y., Hamachi, I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13253–13261 (2005)
- 7) Takaoka, Y., Tsutsumi, H., Kasagi, N., Nakata, E., Hamachi, I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3273–3280 (2006)