

タンパク質表面化学を鍵とした細胞内有機化学への展望

浜地 格^{1,2}

1. 京都大学大学院工学研究科. 2. 戦略的創造研究推進事業 (CREST)

ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

【要約】

細胞に内在する蛋白質を、特異的にラベルする化学的方法を開発した。これは様々な蛋白質を標的にすることができ、細胞破碎液や細胞内だけでなく、生物個体中でただ1種類の蛋白質だけをラベルすることが可能であった。また本手法は、蛋白質の機能を損なうことなく様々な小分子プローブを導入することが出来るので、蛋白質の活性を細胞の中でそのまま解析評価することにも利用される。

【本文】

『細胞で働く蛋白質に目印を付け、直接目で見る』

体内には実に様々な分子が存在し、密に連携をとって機能を発揮している。生体内で機能する分子個々の働きや動きを直接「見る」ことが出来れば、例えば記憶するとき脳で起こっていることを分子レベルで明らかにしたり、病気の原因となるタンパク質の異常な挙動を解析することにより、色々な生命現象の謎解きに貢献するだけでなく、特定の病気の診断や治療にもつながると考えられる。しかし、多くの生体分子はそのままでは見る事ができないので、見たい分子に何か目印をつける必要がある。その目的でこれまで主に使われてきたのは、GFPに代表される蛍光蛋白質を用いた方法である。例えば見たい蛋白質と蛍光蛋白質を遺伝子レベルで融合する方法によって、その蛋白質の細胞内での局在や動きを、直接蛍光で見る事が可能となった^{1,2)}。また、生理活性物質を検出する蛍光蛋白質センサーの開発により、いくつかの分子の細胞内での濃度変化を時空間的に解析することも可能になりつつある³⁻⁵⁾。

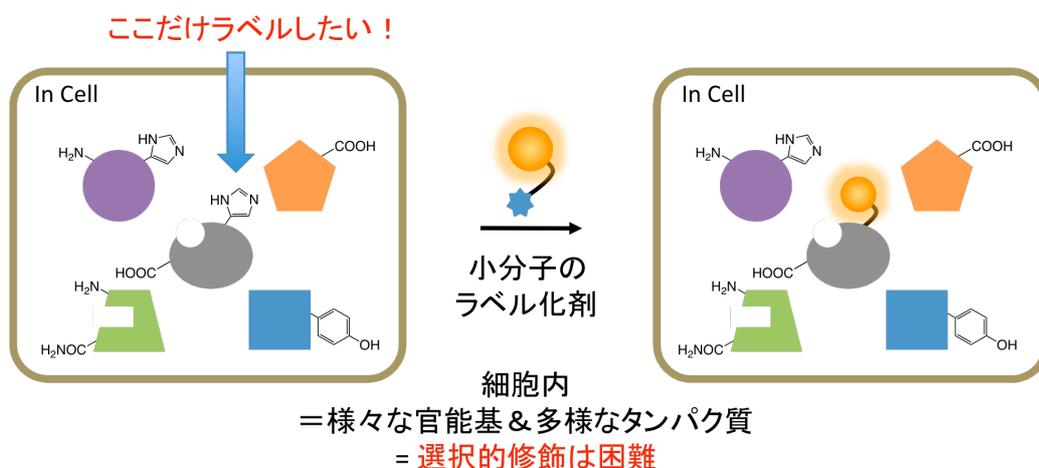


図1. 細胞内蛋白質へのラベル化のイメージ

生体分子を細胞や個体で生きたまま直接「見る」というバイオイメージングの重要性が高まる中、蛍

光蛋白質に替わる新たな標識法の開発が求められるようになった⁶⁾。蛍光蛋白質を用いた手法では、それ自身の分子の大きさや波長・種類に限界があり、また検出も蛍光モードに限られてしまう。それらの問題を解決する手段として小分子プローブが脚光を浴び始めた。利点はいくつかある。まずその分子サイズが小さいため、対象蛋白質の機能を阻害することなく標識化することができる。また、蛍光以外にも様々な検出モードに対応できるため、MRIやPET、PATといったより個体でのイメージングに適したプローブを利用できる。では、このような小分子を蛋白質に修飾するにはどうすればよいか？これは甚だ困難な問題である。蛋白質だけを考えても細胞内には非常に多種類の蛋白質が混在していて、かつそれらはほぼ同じ様に20種類のアミノ酸で構成されている。このような夾雑系で標的の蛋白質の特定部位だけを化学修飾するというのは、現状の有機化学の力量を持ってしても不可能に近い。そこで次善の解決法として、標的となる蛋白質に目印となるタグペプチドを融合して、それに後から小分子プローブを修飾する方法が開発された⁷⁻¹⁰⁾。この方法は現在ではいくつかのバリエーションが報告されており、細胞内蛋白質を様々な小分子でラベル化し可視化することができる様になってきた。

上記で挙げた蛍光蛋白質・タグ配列を融合する方法は一般に、遺伝子を細胞内にトランスフェクションするという作業が必要である。今や分子生物学の技術の飛躍的な進歩に伴って、その導入効率や発現効率は改善されてきているものの、発現量の調整や発現のタイミングを制御するのは難しいのが現状である。また、よく考えると、本来細胞内にある蛋白質自身を見ている訳ではない。その影武者ともいべき融合蛋白質を遺伝子導入によって大量に発現させて、それらを見ているのである。これでは機能異常の蛋白質は見ることができないし、本来存在する蛋白質の定量も不可能である。もともと細胞に内在する蛋白質を標的にして、それを直接見ることはできないものか？今回我々は初めて、その「内在性」蛋白質を化学修飾する方法にたどり着いた。ほぼ自然に近い細胞内や生体内で、ただ1種類の蛋白質にのみ選択的に目印を付けることに成功したのである。

『内在性の蛋白質を修飾するための「リガンド指向型ラベル化法」』

我々が用いたのは、蛋白質が本来持つリガンド認識能を利用する方法である。この「リガンド指向型ラベル化法」は、標的の蛋白質に親和性のあるリガンド分子と、蛋白質と反応しうる反応部位とを、切断や修飾可能な官能基で連結した「ラベル化剤」と我々が呼ぶ分子によって達成される。反応部位には、ラベル化剤が蛋白質に認識され、蛋白質表面と近接したときにだけ反応するような反応基を用いれば、様々な分子が存在する中でも標的蛋白質のみをラベルすることができる。このようなラベル化法自体は「(光)アフィニティーラベル化法」として古くから知られた方法である。しかし従来法では、蛋白質の活性ポケットがリガンドでマスクされているため、その活性を評価したりラベル化蛋白質の機能を利用したりすることは出来ない。そこで我々は、リガンド部位と反応部位をジスルフィド結合、あるいはシッフ塩基結合で連結し、ラベル化後に切断する方法を開発した(それぞれP-PALM、P-ALMと呼ばれる)。ジスルフィドは、還元処理によりリガンド側を除くと同時にチオール基が生じるので、チオール基選択的な反応を用いることで小分子プローブを導入することが出来る(図2-(b))^{11,12)}。シッフ塩基結合は、ヒドラゾン/オキシムの熱力学的な平衡(安定性の差)を利用すれば、リガンド側を除くと同時にプローブを導入することが出来る(図2-(c))^{13,14)}。しかしこれらの方法は、アフィニティーラベル化

の時点では特異的な反応が期待できるが、2段階目のプローブ導入反応において、チオール基やアルデヒド基といった細胞内にもある官能基を反応部位として用いるので、細胞内での応用は困難であった。この問題を解決するために我々が試行錯誤の末に考えついたのは、アフィニティーラベル化に求核置換 (S_N2) 反応を利用するという戦略である。この方法では、ラベル化剤にあらかじめ導入したいプローブ分子を組み込んでおいて、リガンドとプローブとを代表的な求電子剤である「トシル基」で連結する。この新しいラベル化剤を用いれば、親和性に駆動された特異的なラベル化反応の時点でリガンド分子が蛋白質から切り出され、望みにプローブだけが標的蛋白質に共有結合で修飾されることになる。我々はこの方法を、「リガンド指向型トシル化学 (Ligand-directed tosyl chemistry; LDT-chemistry)」と名付けた¹⁵⁾。

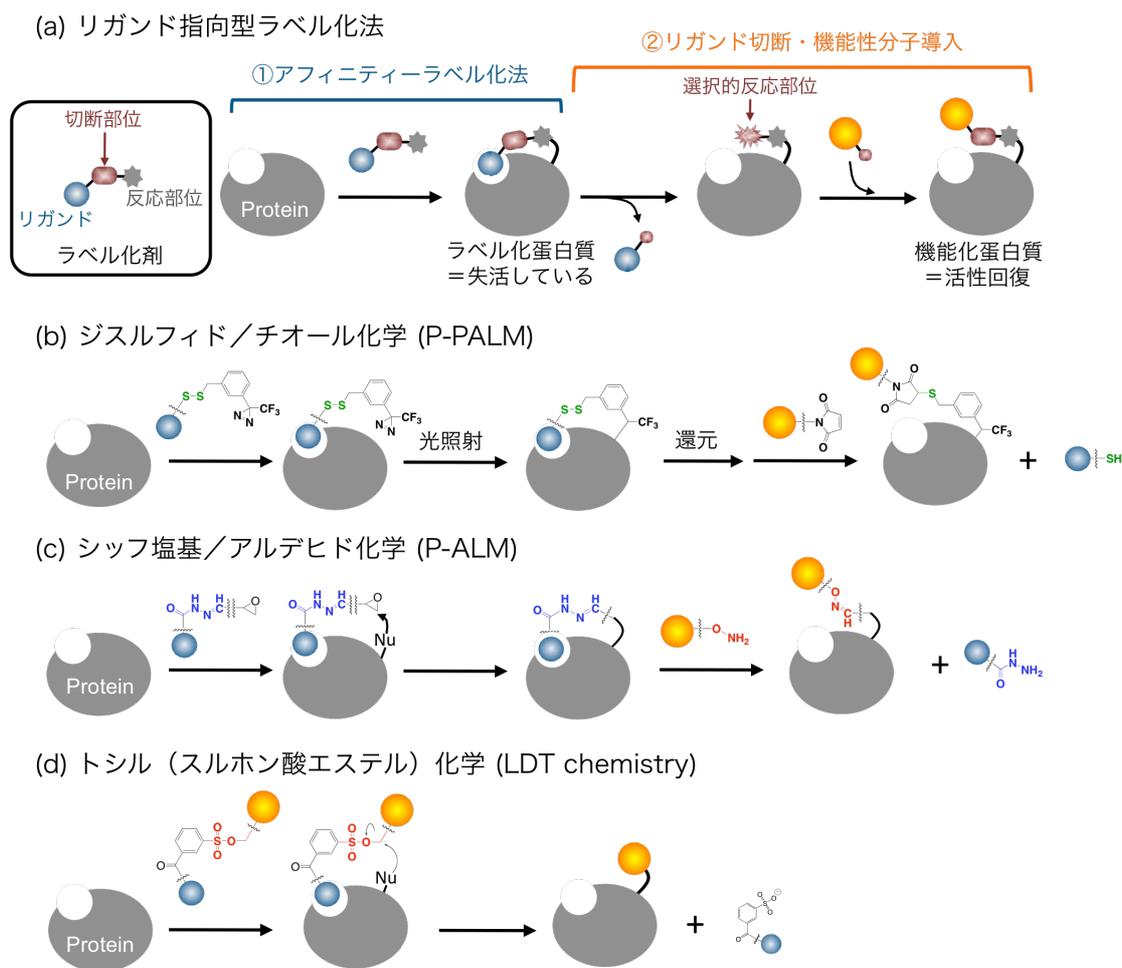


図 2. 蛋白質を化学修飾する方法

(a) リガンド指向型ラベル化法. (b) 光アフィニティーラベル化後修飾法 (P-PALM). (c) アフィニティーラベル化後修飾法 (P-ALM). (d) リガンド指向型トシル化学 (LDT chemistry).

『リガンド指向型トシル化学 (LDT) で細胞内在性蛋白質を化学修飾』

まずこの方法の有効性を実証するために炭酸脱水酵素 (CA) を標的蛋白質として選択した。この酵素は活性中心に亜鉛を含み、スルホンアミド誘導体が強い阻害剤として知られている¹⁶⁾。そこでこの阻害剤と、蛍光プローブであるクマリンを「トシル基」で連結したラベル化剤 **1** を化学合成し、精製された CA との反応をテストチューブで試した (図 3)。 **1** と CA を混和し、一定時間後に SDS-PAGE により

分離して蛍光ゲルイメージャーで観察したところ、蛋白質由来するバンドから蛍光が観察され、クマリンが CA に共有結合でラベル化されていることが明らかとなった (図 3-b)。ラベル化は、リガンド部分が CA に認識されない Boc 基である **2** を用いたり、あるいは強力な阻害剤を共存させると起こらないことなどから、CA がスルホンアミドを認識することによる特異的な反応であると思われた。また、細胞内に高濃度存在する求核種であるグルタチオン (GSH) 共存下でも同様に CA に反応が起こることから、このラベル化剤は CA に認識された時にだけ反応することも示唆された。

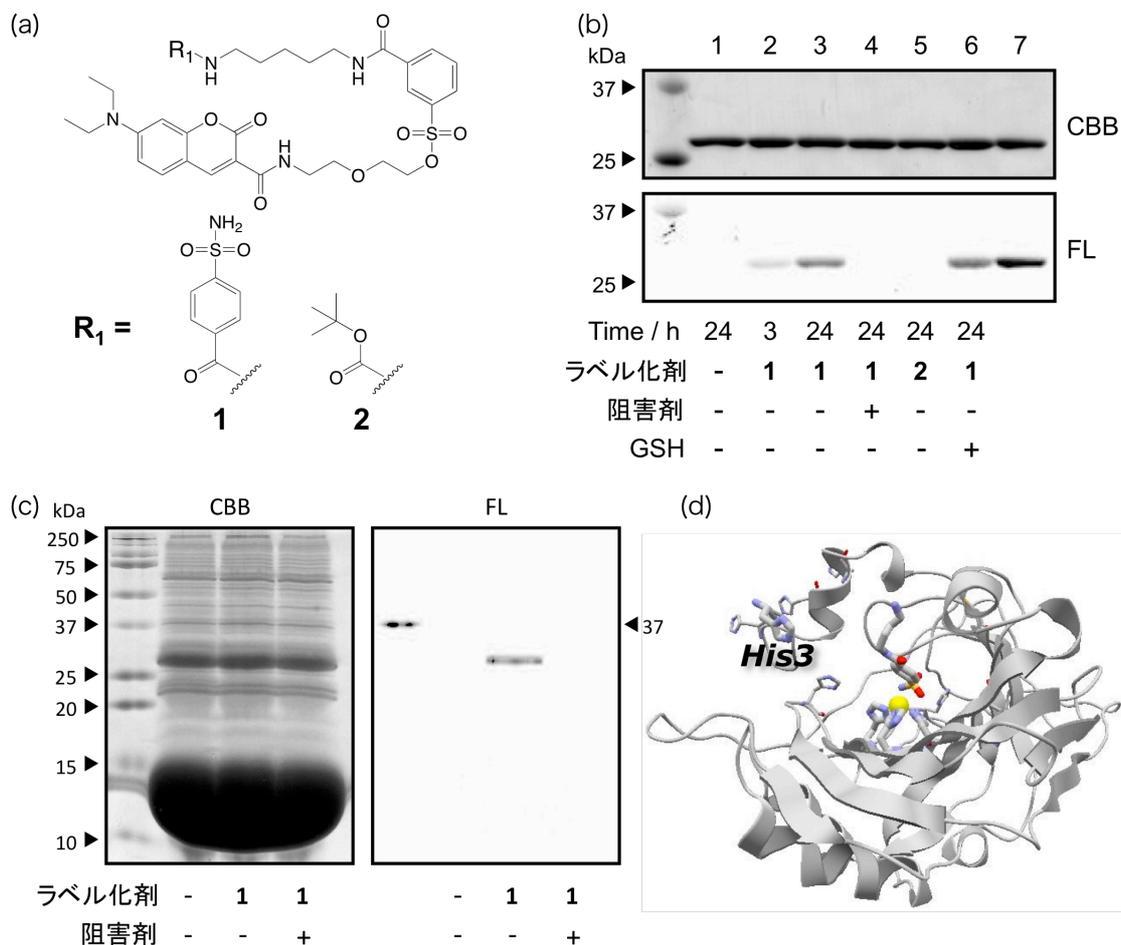


図 3. テストチューブ・赤血球細胞中での CA ラベリング

(a) 本実験で用いたラベル化剤 **1, 2**. (b) テストチューブ内での CA ラベリングの SDS-PAGE 後のゲル画像 (上: CBB 染色画像、下: 蛍光ゲルイメージャー画像*) . (c) 赤血球細胞中での CA ラベリングの SDS-PAGE 後のゲル画像 (左: CBB 染色画像、右: 蛍光ゲルイメージャー画像*) . (d) hCAII の X 線結晶構造解析の結果 (PDB ID: 1OKM). *蛍光画像は 480BP70nm のバンドパスフィルターを使用

これらの試験管実験に勇気づけられて、我々は細胞での実験を行った。CA は体内で特に赤血球中に高濃度で存在する¹⁷⁾。そこで、分離されたヒト赤血球細胞に **1** を添加して、SDS-PAGE と蛍光ゲルイメージャーにより反応を評価した。その結果、赤血球には多種類の蛋白質とその他多数の生体分子が混在しているにも関わらず、CA に由来するバンドからのみ蛍光が観測された。この反応は、テストチューブと同様に強力な阻害剤共存下では起こらないこと、また反応中に細胞が溶血しないことなどから、穏和な条件で非常に特異的に進行することが分かった。

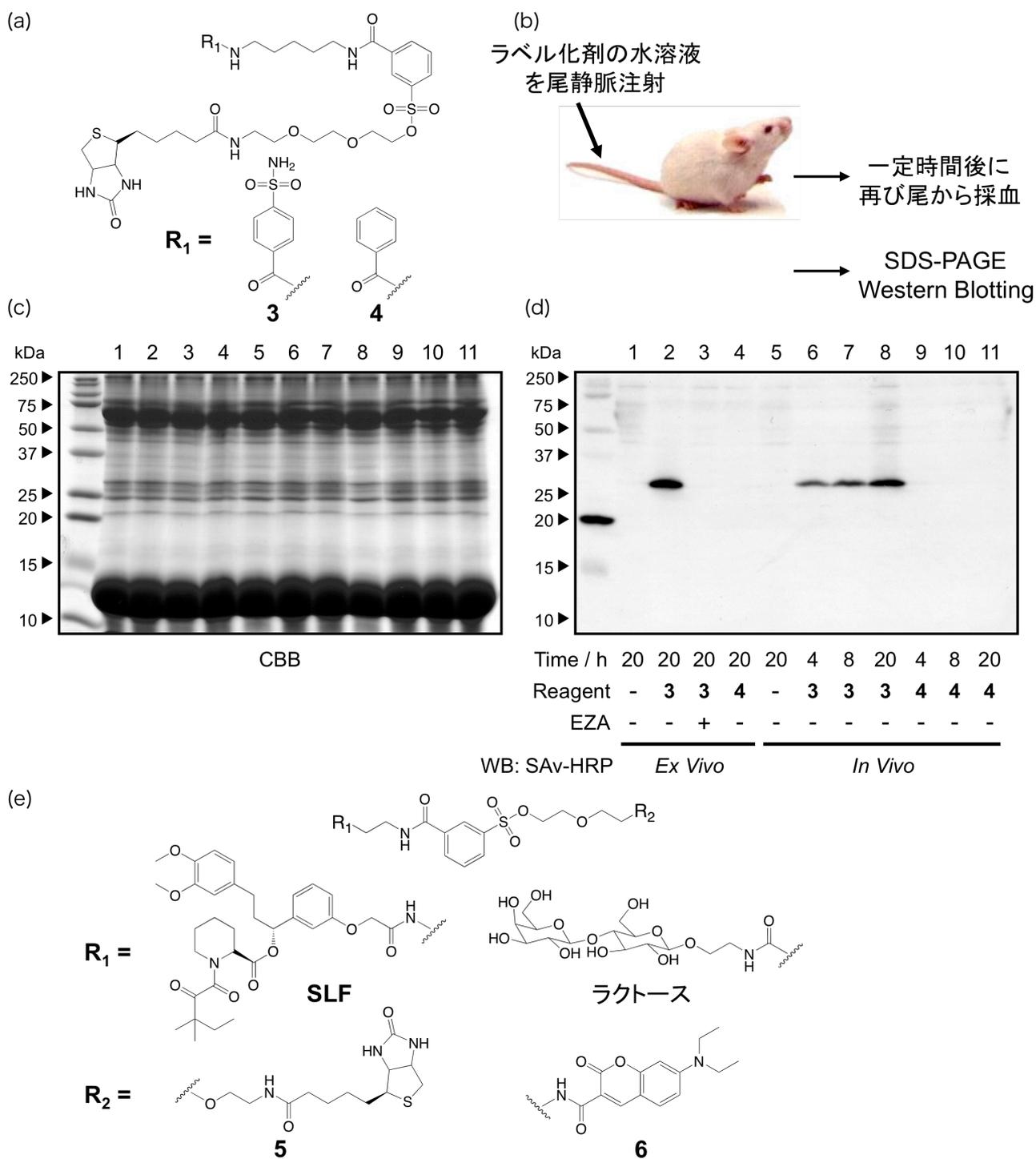


図 4. マウス個体内での CA ラベリング

(a) 本実験で用いたラベル化剤 **3**, **4**. (b) マウス個体内での CA ラベリング実験の様子. (c-d) マウスでの CA ラベリングの結果: (c) CBB 染色画像、(d) HRP 標識ストレプトアビジンを用いた Western-blotting 画像. (e) FKBP12 と CongII に対するラベル化剤 **5**, **6**.

このような特異的な反応であれば、生物個体でも同様に標的蛋白質をラベルできるのではないかと考えた我々は、次にマウスの赤血球内 CA をターゲットにラベル化実験に挑戦した。ここではクマリンの代わりに、低濃度でも検出できるビオチンをプローブ部位としたラベル化剤 **3** を合成して用いた(図

4)。8週齢の実験用マウス（Slc:ICR 系）から採血した血液でラベル化を行ったところ、ヒト赤血球と同様に CA 選択的にビオチンをラベルすることが出来た（*Ex vivo*）。そこで、マウスの尾静脈から **3** の水溶液を打ち込んでマウスの体内でラベル化反応をさせ、一定時間後に採血してその赤血球成分を評価したところ、同様に CA だけをビオチンでラベルすることが出来た（*in vivo*）。この反応は、リガンド部分が CA に認識されない単なるベンゼン環である **4** を用いると起こらなかった。LDT 化学は生物個体内でも試験管内と同様に、標的蛋白質だけにラベルできるほど、非常に特異的な反応であることが示された。

また LDT 化学では、原理的には、リガンド部分を入れ替えれば色々な標的蛋白質に適応できるはずである。実際に、リガンド部分を薬剤類似化合物 SLF¹⁸⁾に変換すると、これを認識する FKBP12 と呼ばれる蛋白質がラベル化された（化合物 **5**）。この蛋白質は、赤血球とは異なり核を有する一般的な実験用細胞の一つである白血球由来の Jurkat 細胞に、極めて低濃度しか存在していない。そのような条件でも **5** を用いれば、FKBP だけをラベルすることが出来た。またリガンドをラクトースに変換すると、これを認識する蛋白質であるコンジェリン II (CongII)¹⁹⁾が標的となる（化合物 **6**）。すなわち、CongII が内在するマアナゴの粘膜に **6** を含む水溶液を垂らすことで、CongII だけをラベルすることに成功した。このように「リガンド指向型トシル化学」は、細胞や組織、さらには生物個体にいたる様々な反応条件でも、そこに内在している蛋白質をラベルすることができる「特異性と一般性」を兼ね備えた有用な方法であることが実証されたことになる。

『細胞内在性の蛋白質をラベルし、その活性を直接見る』

LDT 化学では既存のアフィニティーラベル化と異なり、認識に利用されたリガンド分子は反応と同時に切り離される。つまり、ラベル化後も蛋白質本来の機能や活性を評価できるだけでなく利用することも可能となる。実際 LDT 化学でラベル化した CA を精製後にその酵素活性を評価した所、ラベル前の野生型 CA とほぼ同程度の活性を示した。そこで、細胞に内在する CA をラベルして、その機能を細胞中でそのまま評価・解析することを試みた。ここではクマリンやビオチンに替わり、生体深部でも測定可能な MRI プローブとして注目されている ¹⁹F NMR プローブ^{20,21)}を導入可能な、ラベル化剤 **7** (図 5-a) を用いた。ヒト赤血球細胞に **7** の水溶液を添加したのち *in-cell* ¹⁹F NMR でラベル化反応を追跡した所、プローブがラベルされる挙動をケミカルシフト変化として直接観察することができた (図 5-b)。これは、細胞内に ¹⁹F 源が無いので全くバックグラウンドシグナルなく観察が可能なことと、LDT 化学の高い標的選択性の賜物である。また反応後のケミカルシフトを、テストチューブ実験と比較すると、活性部位が空いた ¹⁹F プローブ修飾蛋白質となっていた。この ¹⁹F 修飾 CA に対して、細胞外からいくつかの阻害剤を添加したところ、添加量に応じて再度ケミカルシフトが変化した。その変化は、阻害剤の親和性と細胞透過性を反映しており^{22,23)}、細胞内で蛋白質が阻害剤を認識する挙動に合致するものである。つまり、*ship-in-a-bottle* 方式で内在性蛋白質をバイオセンサーに改変し、リガンド/蛋白質相互作用を細胞環境の中で直接「見る」ことができたと言える。細胞に内在する蛋白質を細胞内でそのままエンジニアリングし、その活性を細胞が生きた状態でその場観察することができたのは、これが世界初の事例である。

- 2) J. L. Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 444 (2001).
- 3) J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 906 (2002).
- 4) M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano, Y. Umezawa, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 287 (2002).
- 5) K. Hirose, S. Kadowaki, M. Tanabe, H. Takeshima, M. Iino, *Science*, **284**, 1527 (1999).
- 6) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 13 (2005).
- 7) B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science*, **281**, 269 (1999).
- 8) E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 440 (2004).
- 9) A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452 (2006).
- 10) A. Juillerat, T. Gronemeyer, A. Keppler, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Chem. Biol.*, **10**, 313 (2003).
- 11) I. Hamachi, T. Nagase, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12065 (2000).
- 12) E. Nakata, Y. Koshi, E. Koga, Y. Katayama, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13253 (2005).
- 13) Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3273 (2006).
- 14) H. Wakabayashi, M. Miyagawa, Y. Koshi, Y. Takaoka, S. Tsukiji, I. Hamachi, *Chem. Asian J.*, **3**, 1134 (2008).
- 15) S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 341 (2009).
- 16) G. Chen, A. Heim, D. Riether, D. Yee, Y. Milgrom, M. A. Gawinowicz, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8130 (2003).
- 17) J. R. Casey, *et al*, *J. Med. Chem.*, **47**, 2337 (2004).
- 18) T. Clackson, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10437 (1998).
- 19) Y. Koshi, E. Nakata, M. Miyagawa, S. Tsukiji, T. Ogawa, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 245 (2008).
- 20) M. Danielson, J. J. Falke, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **25**, 163 (1996).
- 21) J. X. Yu, V. D. Kodibagkar, W. Cui, R. P. Mason, *Curr. Med. Chem.*, **12**, 819 (2005).
- 22) J. Y. Winum, *et al*, *J. Med. Chem.*, **48**, 2121 (2005).
- 23) D. K. Srivastava, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5528 (2007).