

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05559

研究課題名(和文) 低発現量タンパク質の探索を可能とするフォトアフィニティーセレクション法の開発

研究課題名(英文) Development of photoaffinity selection system for identification of low abundance proteins

研究代表者

櫻井 香里 (Kaori, Sakurai)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50447512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：有望な生物活性を示す天然物や医薬品候補化合物において、結合タンパク質の合理的な探索同定法の開発は、新規薬剤の開発や生物機構の解明に向けて重要な未解決課題である。本研究では、金ナノ粒子基盤の特性を利用し、結合タンパク質をワンポットでラベル化反応と濃縮精製を行うキャッチ・リリース型タンパク質探索法の確立を目指した。糖鎖リガンドや、非天然型及び天然生物活性化合物をリガンドとし、種々の光反応基を提示した金ナノ粒子フォトアフィニティープローブの作成方法とタンパク質ラベル化および濃縮精製・同定方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Development of efficient target identification methods is important for accelerating the discovery of new biological pathways and drug targets. We have designed and synthesized gold-nanoparticle based affinity labeling probes, which display bioactive ligands and photoreactive groups for catch and release of binding proteins in one-pot. Gold nanoparticles are suitable as probe scaffolds due to its capability to covalently immobilize organic compounds in a multivalent fashion, the water dispersibility and the high density, which enable facile centrifugal separation. We demonstrated that our gold-nanoparticle probes can crosslink the binding proteins of high μM affinity with high selectivity at nM probe concentration.

研究分野：生物有機化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：フォトアフィニティープローブ 生物活性分子 結合タンパク質 金ナノ粒子 結合タンパク質探索法

1. 研究開始当初の背景

有望な生物活性を示す天然物や医薬品候補化合物において、結合タンパク質の合理的な同定法の開発は、新規薬剤の開発や生物機構の解明に向けて重要な未解決課題である。現在用いられている代表的な標的探索法として、親和性に基づいて結合タンパク質を同定する化学プローブ法が挙げられる。この手法では、生物活性分子をタンパク質ラベル化剤や検出タグで誘導化したプローブを用いて、標的分子を直接的に同定することができることが最大の利点である。しかし、誘導化により活性が低下したり、リガンドや未知の結合タンパク質の性質に探索効率が依存することが知られており、プローブの設計の最適化に試行錯誤を要することが課題である。また、親和性に依存した手法であるため、結合タンパク質が低発現タンパク質や低親和性タンパク質の場合に、その探索同定が困難である。さらに、プローブに結合させたタンパク質をアガロースビーズなどの固相担体を用いて濃縮精製するため、非特異的な吸着によりタンパク質が混入し、誤同定が起こりやすい。したがって、生物活性分子の多様な結合タンパク質を広く開拓するためには、種々のプローブ分子の合成調達が容易で、微量のタンパク質を選択的かつ効率的に濃縮精製するための方法論が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、金ナノ粒子基盤の特性を利用することで、ラベル化剤構造の変更が簡便で、ワンポットでの結合タンパク質のラベル化反応と濃縮精製を可能とするキャッチ・リリース型タンパク質探索法の確立を目指した。

3. 研究の方法

従来法の化学プローブは生物活性分子を提示したりガンド部位、ラベル化剤、検出タグを有し、それぞれの生物活性分子において、3官能基の配置を最適化する必要がある。本研究では、化学プローブを用いた結合タンパク質探索工程を全体的に効率化するため、金ナノ粒子を基盤としたフォトアフィニティープローブを設計し、合成した。金ナノ粒子は、Au-S結合を介して、有機分子をその表面に単層膜として一様に修飾することができる。Au-S結合は、アルカンチオールを金ナノ粒子と水溶液または有機溶媒中で混合するのみで簡便に生成する。この特性を利用することで、末端にチオール基を導入したラベル化剤とリガンドをそれぞれ別個に合成し、望みの組み合わせと比率で金ナノ粒子表面に提示したプローブが得られると考えた。金ナノ粒子表面は有機分子を高密度に提示するため、multivalent effectにより、生物活性分子の見かけの親和性の増大や、ラベル化剤の反応性の向上が期待された。また、金ナノ粒子の高い比重をもつことから、金ナノ粒子自体を固相担体として利用して、遠心分離に

よる効率的な濃縮精製が可能である。ラベル化剤を介して金ナノ粒子上に共有結合で架橋された結合タンパク質は、Au-S結合をmercaptoethanolなどのチオール化合物で切断することで、温和な条件下で簡便に溶出できる。新規プローブの特性を利用し、結合タンパク質をワンポットでフォトアフィニティーラベリング反応と濃縮精製を行う選択的なタンパク質探索法の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) Gold-nanoparticle based multivalent carbohydrate photoaffinity probes の創製：平成 27 年度においては、親和性の弱いリガンドとして糖鎖リガンドをとりあげ、金ナノ粒子フォトアフィニティープローブを作成した(図 1)。金ナノ粒子フォトアフィニティープローブを用いた結合タンパク質探索では、フォトアフィニティーラベリング反応と遠心分離と溶出をワンポットで行い、結合タンパク質の同定を効率化するというスキームを考案した(図 2)。光反応基としては、ラベル化効率が比較的高いが選択性が低いことが知られている phenylazide 基と benzophenone 基を選択した。lactose 誘導体は PNA (Kd = 400 μ M), ECA, RCA などのレクチンに対する弱い結合活性を示すことが既知である。Lipoic acid を共通の金ナノ粒子修飾部位として、lactose および光反応基で誘導化したモノマーをそれぞれ合成し、lactose/光反応基 = 1/1、2/1、4/1 の提示比率で直径 5 nm の金ナノ粒子ヘリガンド交換法により修飾した。プローブ 1-7 における PNA 結合活性を評価したところ、lactose と光反応基の提示比率に依存せず、いずれも 70 nM 程度の高い結合強度を与えた。PNA を用いて光照射下でのラベル化反応を解析したところ、phenylazide 基、benzophenone 基のいずれも lactose/光反応基=2/1 である場合に(2, 5)、最も高い収率で所望のラベル化タンパク質が得られた。このことから、光反応基は提示密度が高いほどラベル化反応の効率が増大する一方、ある密度を超えると、自己反応によりラベル化効率が低下するという示唆を得た。次に、プローブ 2 および 5 を 10 nM の濃度で、PNA を 1% 含有する細胞溶解液中で反応させた後、遠心分離と guanidinium-HCl 水溶液とバッファで洗浄操作を繰り返し、ラベル化タンパク質を SDS-PAGE で解析した(図 3)。光反応を介さない pull-down 操作と比して、プローブは高選択的に PNA のみを濃縮精製したことが認められた。また同様のラベル化反応・濃縮精製後に MALDI-MS を行ったところ、PNA の MS ピークのみが検出された。これらの結果より、糖鎖金ナノ粒子フォトアフィニティープローブを用いて既知の結合タンパク質を高効率、高選択的にラベル化し、濃縮精製することに成功した。

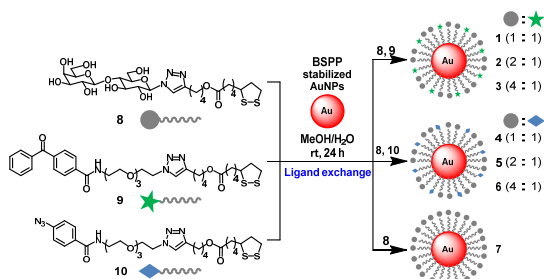


図 1. 糖鎖リガンド(8)と光反応基(9-10)を高密度に提示した金ナノ粒子フォトアフィニティープローブ(1-6).

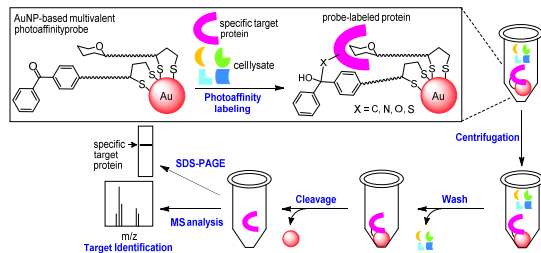


図 2. Gold-nanoparticle photoaffinity probes を用いた新規結合タンパク質探索法.

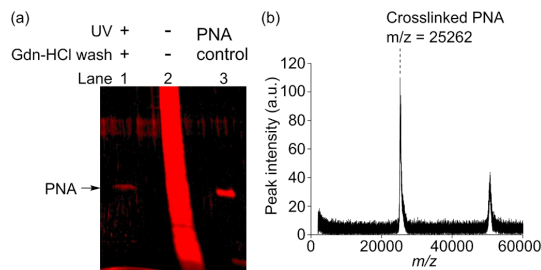


図 3. プローブ 2 による PNA のワンポットラベル化・濃縮精製.(a)SDS-PAGE 解析.(b)MALDI-MS 解析.

(2) 低分子提示型 Gold-nanoparticle photoaffinity probes の創製: 平成 28 年度においては、前年度に開発した糖鎖リガンドとは異なる低分子性生物活性化合物 2 種をリガンドとして用いた金ナノ粒子フォトアフィニティープローブの作成方法を確立した。天然物を含む多くの生物活性分子は、糖鎖リガンドと比べて疎水性が高い。疎水性分子の修飾による金ナノ粒子プローブの安定性への影響を検討するため、分子量の異なる benzenesulfonamide(hCAII 阻害剤)と rapamycin(FKBP 結合性リガンド)をリガンドとして取り上げた(図 4)。われわれは先行研究において、低親和性タンパク質や低発現量タンパク質に対してフォトアフィニティーラベリングを行う場合は、反応効率は低いが高い選択性を示す diazirine 基が有用であることを明らかにした。diazirine 基は phenylazide や benzophenone よりもより疎水性は低いことから、光反応基として用いることとした。低分子リガンドと光反応基の lipolic acid 誘導体を(1)と同様のリガンド交換法により金ナノ粒子への修飾を検討した

ところ、修飾金ナノ粒子の粒子が増大し、沈殿物を生じた。このため、親水性を付与するための PEG を含むSpacer を新たに設計し、合成した。また、リガンド交換反応を水溶液中ではなく、DMF 溶液中で行うことにより沈殿形成を抑制できることを見出した。Benzenesulfonamide/diazirine/spacer = 2/1/0, 1/0/1, 2/0/1, 1/1/1, 2/1/1 の比率で金ナノ粒子プローブ(10-14)を作成したところ、spacer を導入したプローブ(11-14)のみが水溶液中における分散性を保持した。diazirine 基を含むプローブ 10, 13-14 を hCAII と照射下で反応させたところ、それぞれ 8%、11%、7%の収率でラベル化タンパク質を与えた。従来のフォトアフィニティープローブにおける diazirine 基のラベル化収率は<1%であることから、金ナノ粒子プローブでは、multivalent effect によりラベル化効率が向上したことが示唆された。次に、光反応基のラベル化効率を比較解析するため、3 種の異なる光反応基を導入し、ligand/photoreactive group/spacer = 1/1/1 の組成のプローブ(13, 15-19)を合成した。benzenesulfonamide をリガンドとしたプローブ 13, 15-16 を hCAII と反応させたところ、ラベル化効率は phenylazide 基において最も高く、diazirine 基において最も低かった。hCAII を 1%含有率で細胞溶解液に添加した条件下でも同様の結果が得られた。これらのことから、nM の濃度のプローブを用いる反応条件下では、選択性は低いが高反応効率が高い光反応基の方がより結合タンパク質のラベル化に有効であることが示唆された。

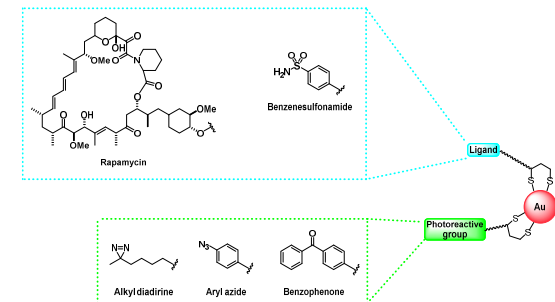


図 4. 低分子を提示した Gold-nanoparticle photoaffinity probes.

(3) 求電子官能基をラベル化剤とした Gold-nanoparticle affinity probes の創製: 金ナノ粒子上ではリガンドや光反応基を高密度で提示することが可能であることから、プローブ自体は nM 程度の低濃度で用いることで、望みのタンパク質の選択的なラベル化と濃縮精製を実現した。(1)-(2)において、低濃度のプローブを用いる反応条件を達成できたことから、反応効率高く選択性が低い光反応基の方がより有効であることが示唆された。また一方で、光反応基によるラベル化は、通常ラベル化の収率が< 10%程度の分子プローブと比して、部分的に効率化できた(< 70%)ものの、原理的にさらなる収

率の向上は困難であることが示唆された。そこで、最終年度では、タンパク質ラベル化剤を光反応基に限定せず、求電子性官能基を導入する金ナノ粒子プローブの開発を検討した(図 5)。親水性を付与するためのSpacerの代わりに、lipic acid とラベル化剤をつなぐPEG鎖を長くしたモノマーを設計した。当初はラベル化剤1種のみを金ナノ粒子に修飾したプローブ 20 を合成した。疎水性のラベル化剤を提示した 20 は、水溶液中では凝集することが認められたため、DMF 中でタンパク質のラベル化反応を検討した。疎水性官能基に非特異的に結合する BSA を用いて、1.3 nM のプローブの濃度条件下でラベル化反応を行ったところ、5%程度でラベル化タンパク質が得られた。今後は spacer を導入してプローブの分散性を向上させ、種々の求電子性ラベル化剤のスクリーニングを検討する。

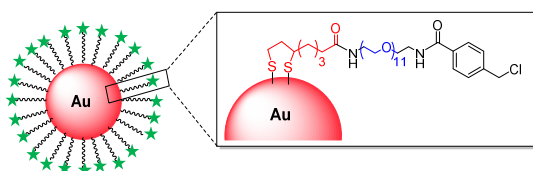


図 5. 求電子性ラベル化剤を提示した Gold-nanoparticle probe.

本研究期間を通して、糖鎖リガンドや、非天然型及び天然生物活性化合物をリガンドとし、種々の光反応基を提示した金ナノ粒子フォトアフィニティプローブの作成方法とタンパク質ラベル化および濃縮精製・同定方法を確立した。今後は金ナノ粒子プローブによるフォトアフィニティラベリングにおいて、結合タンパク質の検出感度、選択性の関係性についてより詳細な解析を行う。また、特異的に検出されたタンパク質のシークエンスを同定し、新規結合タンパク質については相互作用解析を行い結合特性の検証を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Komatsu, R., Yamaguchi, T., Kobayashi, N., Ozeki, Y., Sakurai, K.* “Synthesis of alkyne-tagged and biotin-tagged Sortin1 as novel photoaffinity probes.” *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 28, 1562-1565. 査読あり. DOI:10.1016/j.bmcl.2018.03.060.

Sakurai, K.*, Hiraizumi, M., Isogai, N., Komatsu, R., Shibata, T., Ohta, Y. “Synthesis of a fluorescent photoaffinity probe of OSW-1 by site-selective acylation of an inactive congener and biological

evaluation.” *Chem. Commun.* 2017, 53, 517-520. 査読あり.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.08.053.

Sakurai, K.*, Hatai, Y., Okada, A. “Gold nanoparticle-based multivalent carbohydrate probes: selective photoaffinity labeling of carbohydrate-binding proteins.” *Chem. Sci.* 2016, 7, 702-706. 査読あり. DOI:10.1039/C5SC03275J.

〔学会発表〕(計 7 件)

櫻井香里, “生物活性分子の作用機構解明に向けた標的タンパク質探索法” 日本化学会 第 98 春季年会 女性科学者が拓く生命化学 特別企画公演(招待講演)2018 年 3 月 20 日, 船橋市.

櫻井香里, “生物活性分子の作用機構解明に向けた標的タンパク質探索法” Asian Chemical Probe Research Hub Symposium 天然物有機化学・天然物合成とケミカルバイオロジー(招待講演)2018 年 2 月 13 日, 仙台市.

加藤周, 畑井祐希, 櫻井香里 “天然物標的タンパク質の効率的探索に向けた金ナノ粒子フォトアフィニティプローブの開発” 第 50 回天然物化学談話会, 2016 年 7 月 6 日, 宮城県岩沼市.

櫻井香里, “生物活性分子の作用機序解明に向けた標的タンパク質探索法の開発” 新規素材探索研究会第 16 回セミナー(招待講演)2017 年 6 月 9 日, 新横浜市.

加藤周, 畑井祐希, 櫻井香里 “生物活性分子をリガンドとした金ナノ粒子フォトアフィニティプローブ” 日本化学会 第 96 春季年会, 2017 年 3 月 16 日, 京田辺市.

加藤周, 畑井祐希, 櫻井香里 “低分子結合タンパク質探索に向けた金ナノ粒子フォトアフィニティプローブの開発” 日本化学会 第 95 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 船橋市.

Yuki Hatai, Ayumi Okada, Sakurai, K. “Development of gold nanoparticle-based multivalent carbohydrate probes for selective photoaffinity labeling and enrichment of carbohydrate-binding proteins” 第 34 回日本糖質学会年会 2015 年 8 月 2 日, 東京.

〔その他〕

ホームページ

<http://web.tuat.ac.jp/~sakurai/>

6. 研究組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(1)研究代表者

櫻井香里 (SAKURAI, Kaori)

東京農工大学大学院工学研究院・准教授

研究者番号：50447512