

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17884

研究課題名(和文)細胞内在性蛋白質間相互作用のイメージング解析を指向した新規蛋白質ラベル化法の開発

研究課題名(英文)Development of novel protein chemical modification method for imaging analysis of endogenous protein-protein interaction in live cells

研究代表者

田村 朋則 (Tamura, Tomonori)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：10746639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内に内在的に発現している蛋白質を化学修飾によって選択的に標識する手法を開発した。具体的には、「N-acyl-N-alkylsulfonamide (NASA)」を反応基として有するリガンド指向性ラベル化剤の開発を行った。NASA型ラベル化剤は従来のリガンド指向性化学と比較して標的蛋白質をより迅速かつ高効率に化学修飾可能であった。また、FKBP12、eDHFR、Hsp90といった細胞内在性蛋白質を、反応時間1hで高効率に化学修飾することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel chemical method to selectively label proteins expressed endogenously in live cells. Specifically, ligand-directed labeling reagents consisting of "N-acyl-N-alkylsulfonamide (NASA)" as a reactive group were developed. The NASA type labeling reagents were able to covalently modify the target protein more rapidly and efficiently than the conventional ligand directed chemistry. In addition, we successfully demonstrated that this method can selectively modify intracellular endogenous proteins, such as FKBP 12, eDHFR and Hsp90, with high efficiency.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質化学修飾

1. 研究開始当初の背景

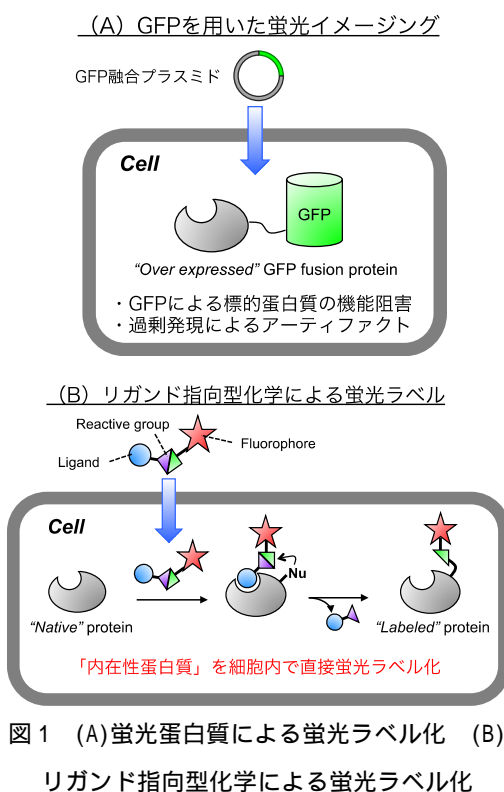
細胞内では、蛋白質の多くが他の蛋白質と相互作用し、ダイナミックに離合集散を繰り返すことで複雑な細胞機能を制御している。従って、蛋白質-蛋白質相互作用が、いつ、どこで、どの程度生じているのかを定量的に解析することは、生命現象を理解する上で重要な課題となっている。現在、蛋白質の動態や相互作用を生細胞内で直接観測するための手段としては、GFP などの蛍光蛋白質を用いたバイオイメージングが最も一般的である。標的となる蛋白質に蛍光蛋白質を融合するこの手法は、最も有用で汎用性の高い蛍光標識技術として世界中の研究室で利用されている。しかし一方で、近年ではいくつかの問題が指摘されている。例えば、蛍光蛋白質自身のサイズ(約 28 kDa)や凝集特性は、標的蛋白質本来の機能を阻害する可能性がある。加えて、遺伝子発現を必要とするこの手法では融合蛋白質が過剰に発現されるため、天然の細胞内環境下での観察ができないという制約がある。これは蛋白質間相互作用イベントを解析する際には、特に重大な問題となりうる。なぜなら、蛋白質間相互作用は関連する蛋白質の量論比によって厳密に制御されているので、発現レベルを人工的に改変した場合、そこから得られる情報は細胞内で起こっている真の姿を必ずしも反映しないためである。従って、実際に生体内で起こっている相互作用イベントをより正確に理解するためには、遺伝子操作を行うことなく、可能な限り小さな蛍光分子で、細胞内に存在している内在性蛋白質をラベル化するための手法が必要不可欠である。

このような背景の中、我々は細胞内の内在性蛋白質を選択的に化学修飾する方法として、「リガンド指向型トシル化学(LDT 化学)」を開発した(*Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5, 341)(図 1)。

この手法では、アフィニティーラベル化剤の反応基として新たにフェニルスルホン酸エステル(トシルエステル)を採用することで、蛋白質本来の機能を損なうことなく、標的選択的に蛍光小分子を標識することが可能である。さらに申請者は、LDT 化学を細胞内の内在性 FKBP12(FK506 Binding Protein 12)に適用し、一過的に発現させた相互作用ペアである FRB 蛋白質との複合体形成を蛍光イメージングにより検出することに成功した。しかしながら、その研究過程において LDT 化学の限界がいくつか浮き彫りとなった。一つめは、反応基の加水分解による失活と、それに起因する低いラベル化効率である(細胞内条件下で 20~30%程度)。二つめはラベル化剤分子の低い細胞膜透過能である。LDT ラベル化剤は分子内にリガンド、反応基、蛍光色素を有し、それぞれがスペーサーで連結されている。その結果分子量は多くの場合 1000 を越え、化合物の物性によっては細胞膜を透過できないため、適用可能な蛋白質に限りがある。三つめの問題点は蛍光イメージング時の低いシグナルノイズ比(S/N 比)である。たとえラベル化剤をうまく細胞内に導入できても、常時蛍光を発する余剰のラベル化剤や加水分解産物がバックグラウンドとなるため、標的の蛋白質を感度良くイメージングすることが極めて困難であった。これらの要因により、LDT 化学では未だ内在性蛋白質同士の相互作用イメージングは達成できていない。そこで申請者は、上述の問題を解決するためには、LDT 化学に代わる新しい蛋白質化学修飾技術を開発することが重要であると考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内における内在性蛋白質間の相互作用を定量的に解析することを目的として、化学的方法論に基づいた新しい蛍光ラベル化技術の確立を目指す。具体的には、水中において安定な α -ケト酸、アリールボロン酸を反応基質とする Petasis 反応(*J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 445)を利用して、蛋白質中のアミノ基を標的とした三成分縮合反応によるラベル化を試みる(図 2)。いくつかのモデル蛋白質を用いて試験管内にてラベル化を行い、反応速度・効率などの観点からラベル化剤構造を最適化する。得られた知見をもとに、細胞内の内在性 FKBP12 を蛍光ラベルし、生化学的な解析により反応選択性やラベル化効率を評価する。また、ラベル化に伴って蛍光強度が上昇する発蛍光型ラベル化システムを構築することで、より S/N 比の高いイメージングを目指す。さらに、蛍光相関分光法を用いて、薬剤によって誘導



される mTOR やカルシニューリンとの複合体形成を解析する。以上の実験系により本手法の確立を行った後、他の蛋白質（転写因子や核内受容体など）へと展開し、内在性蛋白質が関与する動的な蛋白質間相互作用を解析するための新しい分子ツールとしての有用性を実証する。

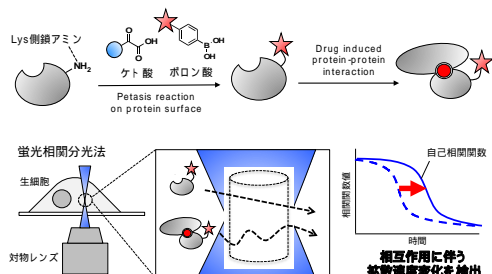


図2 新規蛋白質ラベル化法による蛋白質間相互作用解析

蛋白質間相互作用は従来、細胞を破碎して生化学的に解析されるか、蛍光蛋白質を融合した過剰発現系で解析されてきた。そのため、生きた細胞内に本来発現している「内在性蛋白質」が実際どのくらい動的に相互作用しているのか、ほとんど明らかになっていないのが現状である。これに対して本研究は、内在性蛋白質を細胞内で直接蛍光ラベルし、限りなく天然に近い生理条件下での相互作用解析を可能にするという点に大きな特色がある。これが達成されれば、本来の生体内で起こっている生命現象を解明するための、より理想的な基盤技術になり得ると期待される。

また本研究で計画している蛍光相関分光法による解析では、蛋白質の拡散定数や分子数といった動的な情報を得ることも可能である。これを利用すれば、細胞内のような分子クラウディング環境における蛋白質の動的特性を、物理化学的な視点から考察することができる。このようにして得られる内在性蛋白質に関するパラメーターは、今後基礎研究のみならず創薬も含めた様々な研究分野に有益な知見を与えると予想される。

以上のように本研究は、有機化学的アプローチにより従来の生化学や遺伝子工学では研究対象にできなかった細胞内在性蛋白質の機能解析を実現するものであり、化学と生物学の境界領域の進歩をより一層促進するものと期待される。

3. 研究の方法

細胞内において効率のかつ S/N 比の高い蛍光ラベリングを実現するためには、次の3つの課題に取り組む必要がある。

- (1) 反応機構上、加水分解による失活のおそれが無い新しいラベル化反応様式の確立。

- (2) ラベル化剤の低分子量化による細胞膜透過性の改善。
- (3) ラベル化に伴って蛍光強度が増大する発蛍光型システムの導入。

これらの課題を達成するために、リガンド指向型ラベル化法の新たな反応様式として Petasis 反応を採用した。Petasis 反応は基質として水中で安定な α -ケト酸、アリールボロン酸、アミンを用いる三成分縮合反応であり、水中・室温・中性条件下で反応が進行することが知られている (*J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 11798) (図3)。本研究では、リガンドと連結した α -ケト酸および蛍光色素のボロン酸誘導体をラベル化剤として、蛋白質のリジン残基側鎖のアミノ基に対する部位特異的なラベル化を行う。

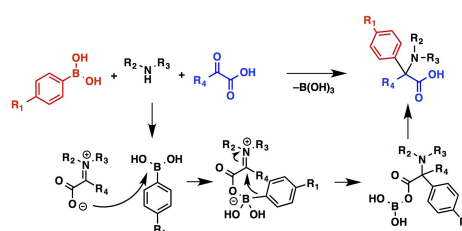


図3 Petasis 反応の反応機構

4. 研究成果

平成27年度においては、当初予定していた

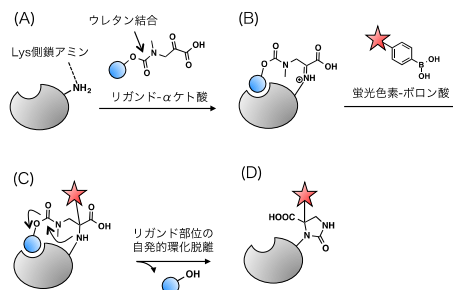


図4 Petasis 反応による新規リガンド指向型蛋白質ラベル化法

「Petasis 反応」を利用したラベル化法に加えて、「N-acyl-N-alkylsulfonamide (NASA)」を反応基として有するリガンド指向性ラベル化剤の開発を行った。精製蛋白質を用いた試験管内実験によって、NASA 型ラベル化剤は従来のリガンド指向性化学と比較して標的蛋白質をより迅速かつ高効率に化学修飾可能であることが示された。特筆すべきことに、細胞内在性 FKBP12 を標的としたラベル化においては、反応時間 1h で細胞内 FKBP12 の 80% を修飾することに成功した。さらに別の標的蛋白質として、大腸菌ジヒドロ葉酸レダクタ

ーゼ (eDHFR)、熱ショック蛋白質 90 (Hsp90) などの細胞内ラベリングも可能であることを実証した。また、消光団を NASA 型ラベル化剤に組み込むことで、ラベル化に伴い蛍光を発する「発蛍光型ラベル化剤」の開発に成功した。

平成 28 年度においては、前年度に開発した NASA を反応基として有するリガンド指向性ラベル化剤の更なる最適化と細胞内在性タンパク質ラベルの詳細な評価を行った。精製タンパク質を用いた試験管内実験によって、NASA 型ラベル化剤は従来のリガンド指向性化学と比較して標的タンパク質を迅速かつ高効率に化学修飾可能であることが示された。また、詳細な速度論解析を実施し、リガンド指向性化学における反応二次速度定数を算出した。このラベル化手法のバイオロジカルアプリケーションとして、細胞内在性 Hsp90 の阻害剤を評価するためのスクリーニングアッセイ系の構築に成功し、実際に Hsp90 に結合する新規化合物を同定することに成功した。

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 4 件)

Yuki Yasueda, Tomonori Tamura, Keiko Kuwata, Yousuke Takaoka, Itaru Hamachi, Biomembrane-embedded catalysts for membrane-associated protein labeling on red blood cells, *Chem. Lett.*, 44, 1673-1675 (2015), 査読有り

Yuki Yasueda, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi, Nucleus-selective Chemical Proteomics Using Hoechst-tagged Reactive Molecules, *Chem. Lett.*, 45, 265-267 (2016), 査読有り

Yuki Yasueda, Tomonori Tamura, Alma Fujisawa, Keiko Kuwata, Shinya Tsukiji, Shigeki Kiyonaka, Itaru Hamachi, A set of organelle-localizable reactive molecules for mitochondrial chemical proteomics in living cells and brain tissues, *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 7592-7602 (2016), 査読有り

西川 雄貴, 田村 朋則, 浜地 格, タンパク質有機化学の進歩と生細胞への展開, 有機合成化学協会誌, 74, 521-531 (2016), 査読有り

[学会発表](計 20 件)

西川 雄貴, 阿波 諒, 三木 卓幸, 田村 朋則, 浜地 格, NO 応答性ラベル化剤の開発とプロテオーム解析への展開, 日本化学会第

97 春季年会 (慶應義塾大学・日吉キャンパス)

藤沢 有磨, 田村 朋則, 浜地 格, オルガネラプロテオミクスのための化学ツール (1): 小胞体局在性修飾試薬の開発, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学・日吉キャンパス)

田村 朋則, 浜地 格, オルガネラプロテオミクスのための化学ツール (2): 時間分解能の付与, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学・日吉キャンパス)

上田 毅, 月館 拓, 後藤 大輝, 田村 朋則, 浜地 格, リガンド指向性 NASA 化学 (1): 速度論解析と生細胞タンパク質ラベリング, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学・日吉キャンパス)

後藤 大輝, 月館 拓, 上田 毅, 田村 朋則, 浜地 格, リガンド指向性 NASA 化学 (2): リガンド親和性と反応性の相関, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学・日吉キャンパス)

Kazuma Amaike, Zhining Song, Shin Ri, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi, New method for affinity-guided protein labeling, 日本化学会第 97 春季年会 (慶應義塾大学・日吉キャンパス)

田村 朋則, 安枝 裕貴, 清中 茂樹, 浜地 格, オルガネラ局在性ラベル化試薬によるミトコンドリアプロテオミクス, 第 1 回京都生体質量分析研究会シンポジウム (京都大学・芝蘭会館)

田村 朋則, 安枝 裕貴, 藤沢 有磨, 清中 茂樹, 浜地 格, オルガネラ局在性修飾試薬によるミトコンドリアプロテオーム解析, 第 89 回日本生化学会大会 (仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス)

藤沢 有磨, 安枝 裕貴, 田村 朋則, 清中 茂樹, 浜地 格, オルガネラ局在性修飾試薬による蛋白質動態の定量解析, 第 89 回日本生化学会大会 (仙台国際センター / 東北大学川内北キャンパス)

増田 真理恵, 西川 雄貴, 鹿又 喬平, 松尾 和哉, 田村 朋則, 浜地 格, LDSP 化学の反応性制御と迅速なタンパク質ラベリング, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (石川県立音楽堂 / もてなしドーム地下イベント広場)

上田 毅, 月館 拓, 田村 朋則, 浜地 格, リガンド指向性 N-acyl-N-alkyl-sulfonamide 化学による細

胞内蛋白質の挙動解析、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム (石川県立音楽堂 / もてなしドーム地下イベント広場)

田村 朋則、安枝 裕貴、藤沢 有磨、清中 茂樹、浜地 格、オルガネラ局在性修飾試薬によるミトコンドリアプロテオミクス、生体機能関連化学部会若手の会第 28 回サマースクール (西浦温泉ホテル たつき)

藤沢 有磨、安枝 裕貴、田村 朋則、浜地 格、オルガネラ局在性修飾試薬によるタンパク質の網羅的解析、生体機能関連化学部会若手の会第 28 回サマースクール (西浦温泉ホテル たつき)

上田 毅、月館 拓、田村 朋則、浜地 格、細胞内タンパク質の選択的かつ迅速ラベルによる寿命解析、生体機能関連化学部会若手の会第 28 回サマースクール (西浦温泉ホテル たつき)

Tomonori Tamura, Yuki Yasueda, Shigeki Kiyonaka, Itaru Hamachi, Organelle-selective chemical proteomics(1): Mitochondrial proteome analysis with mitochondria-localizable reactive molecules, 日本化学会第 96 春季年会 (同志社大学・京田辺キャンパス)

増田 真理恵、西川 雄貴、鹿又 喬平、松尾 和哉、田村 朋則、浜地 格、リガンド指向性化学によるタンパク質ラベリング(1): LDSP 化学における反応性とラベル化効率の定量的評価、日本化学会第 96 春季年会 (同志社大学・京田辺キャンパス)

藤沢 有磨、安枝 裕貴、田村 朋則、清中 茂樹、浜地 格、オルガネラ選択的ケミカルプロテオミクス(2): 細胞核タンパク質のプロファイリング、日本化学会第 96 春季年会 (同志社大学・京田辺キャンパス)

西川 雄貴、増田 真理恵、松尾 和哉、田村 朋則、浜地 格、リガンド指向性化学によるタンパク質ラベリング(2): LDSP 化学による内在性タンパク質の FRET センサー化、日本化学会第 96 春季年会 (同志社大学・京田辺キャンパス)

李 伸、田村 朋則、浜地 格、リガンド指向性化学によるタンパク質ラベリング(5): アシル転移反応を促進する二官能性触媒、日本化学会第 96 春季年会 (同志社大学・京田辺キャンパス)

月館 拓、田村 朋則、浜地 格、リガンド指向性化学によるタンパク質ラベリング(4): N アシル N アルキルスルホンア

ミド化学によるタンパク質ラベル、日本化学会第 96 春季年会 (同志社大学・京田辺キャンパス)

〔図書〕(計 1 件)

Tomonori Tamura, Itaru Hamachi, Labeling proteins by affinity-guided DMAP chemistry, *Method in Molecular Biology*, 1266, 229-242 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/index.php?hamachi-lab>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

田村 朋則 (TAMURA, Tomonori)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 10746639

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者 ()