

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006～2009

課題番号：18205020

研究課題名（和文）細胞複雑系での適用をめざしたタンパク質有機化学の新手法開発

研究課題名（英文）Development of New Chemistry-based Methods for Protein Modification and Engineering That can be Applied under Crude Cellular Conditions

研究代表者

浜地 格 (HAMACHI ITARU)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90202259

研究成果の概要（和文）：

生きた細胞のような様々な生理活性物質が共存している複雑なシステムにおいて、特定のタンパク質だけを選択的に標識（ラベル化）することは、そのタンパク質の働きを理解し、またコントロールする上で非常に重要である。本研究では、特定のタンパク質を識別／認識する機能と、温和な条件で選択的な反応を起こす官能基を探索選択する事によって組み合わせることで、それを可能にするような（有機）化学的な手法を新しく開発する事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Chemistry-based selective labeling of an intended target protein under very complicated crude systems like cell, tissues or in vivo is an important and challenging project in chemical biology for understanding and controlling the protein functions under such really working conditions. However, it is absolutely difficult because of many obstacles. My group in this research grant successful developed three distinct and new methods to label and modify a protein of interest under crude conditions like cell lysates, live cell or in vivo by elaborately combining the sophisticated molecular recognition events with orthogonal and selective organic reactions applicable even in aqueous medium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2007 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2008 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2009 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
総計	38,600,000	11,580,000	50,180,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：細目表・生物有機化学、細目表以外・ケミカルバイオロジー

### 1. 研究開始当初の背景

生きた細胞のような様々な生理活性物質が共存している複雑なシステムにおいて、特定のタンパク質だけを選択的に標識（ラベル化）することは、そのタンパク質の働きを理解し、またコントロールする上で非常に重要である。実際に、研究対象としたいタンパク質の細胞や生体内挙動解析には、GFP に代表される蛍光タンパク質を蛍光マーカー（タグ）として融合させた実験系が、細胞生物学をはじめとする多くの生物学研究のスタンダードになっている。これらは、遺伝子レベルでのタンパク質融合操作を必要とするので、マーカータンパク質の分子サイズの大きさや、蛍光以外のモードが使用できないなどの、欠点もある。またより本質的には、これらおよび類似の方法論では、内在性のタンパク質の挙動そのものを評価する事ができない。従って、最近では、内在性タンパク質そのままをラベル化して、その挙動を評価する手法の開発が望まれてきている。また、化学の視点からすると、このような生物応用だけでなく、反応対象を、タンパク質のような巨大高分子とし、かつ水中温和な条件で、選択的な反応系を構築する事は、研究開始当時から現在まで、非常に困難であり、きわめてチャレンジングで、興味深い。そのような背景から、本研究プロジェクトを提案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞のような夾雑系でも、狙ったタンパク質に対して選択的に、特定の人工機能分子を化学修飾できるような有機化学、すなわち化学を基盤としたタンパク質ラベル化手法の開発を目的とした。そのために、分子認識と化学反応を協同的に組み合わせることを、基本アイデアとした。具体的には、特定のタンパク質を識別／認識する機能の検索と、温和な条件で選択的な反応を起こす官能基を探索選択する事によって組み合わせることで、それを可能にするような（有機）化学的な手法を新しく開発する事に成功した。

### 3. 研究の方法

細胞のような夾雑系で適用できるタンパク質有機化学の開拓のために、我々は、まず、タンパク質が存在する水溶液中で、タンパク質表面を認識できる人工分子認識システムの開発と、タンパク質表面を化学修飾できる有機化学反応の開発／探索を行う事とした。基本的には、幾つかの仮説をもとに設計した分子を、有機合成および錯体化学によって化

学合成し、その機能評価を、この二つの観点から、独立にあるいは、組み合わせて行い、研究を進め、その結果をもとに分子設計にもどって改良するサイクルをとった。

その上で、水中で良好な成果を挙げた認識システムや反応を、より細胞に近い夾雑系での評価に進め、複数のタンパク質が混在する系、細胞破碎液、生きた細胞系、さらには組織や生物個体での実験へと、徐々に展開した。認識特性に関しては、蛍光変化を起こすプローブでは蛍光滴定や等温熱滴定によって、結合親和性を定量的に評価した。また、タンパク質表面での化学反応に関しては、定法に従って、質量分析 (MALDI-Tof mass)、ペプチドマッピング、電気泳動 (SDS-PAGE)、ウエスタンブロッティングに、細胞系での蛍光イメージング実験を行い、タンパク質中のアミノ酸や部位選択性の定量解析から、夾雑系でのタンパク質選択性の評価などを行った。

### 4. 研究成果

新しい化学ラベル化手法として、大きく3つの方法論を開発する事に成功した。以下にその概略を述べる。

#### (1) リガンド連結 DMAP 触媒を用いたアシル転移反応の開発

DMAP (ジメチルアミノピリジン) は、主として有機溶媒中で種々の求核剤のアシル化を触媒することが知られている。我々は、この反応を、タンパク質に認識されるリガンドと DMAP を繋いだ分子を設計することにより、タンパク質表面で行った。その結果、これまで不可能と思われていた、水中での効率よいアシル化反応を実現し、かつタンパク質表面でかなり部位選択性の高いラベル化が起こる事を初めて、実証した。具体的には、糖鎖を結合する事が知られているレクチンタンパク質を標的として、それに対応する糖鎖をリガンドとしたリガンド連結 DMAP を合成し、対応するレクチンに対して、アシル転移反応が選択的に起こる事、またこれは、複数のタンパク質を混合した水溶液だけでなく、細胞破碎液などのより複雑な溶液系でも可能である事を明らかにした。

#### (2) リガンド指向性トシル化学の創成

ベンゼンスルホン酸エステルは、求核置換反応において良い脱離基となることが知られている。我々は、これをタンパク質リガンドと結合させて、タンパク質表面の求核性残基との SN2 反応を行わせる事を試みた。その結果、大変興味深い事に、リガンドを連結し

た場合のみ、SN2反応が起こり、特に表面のヒスチジン残基とC-N結合を形成する事が見いだした。この、リガンド指向性トシル化学は、標的タンパク質を、赤血球中に内在する炭酸脱水酵素 (hCA) とすると、赤血球破碎液中でもhCA選択的なラベル化が可能であった。もっとも興味深い事には、この反応は、赤血球そのものを用いても、良好な選択性で進行し、さらには、生きたマウス体内に、この分子を、尾静脈から打ち込んだ反応においても、マウス赤血球中のCAを選択的にラベル化できた。これは、狙った内在性タンパク質を、生きた生物個体内で化学ラベル化する事の出来た最初の成功例である。

### (3)リアクティブタグシステム

上記二つの、インタクトなタンパク質をそのままラベル化する方法論とは少し、異なるが、短いペプチドタグとそれと共有結合反応する化学種との組み合わせも、タンパク質ラベル化の方法として、重要である。今のところ、R.Tsienが開発した、テトラシステインループを用いたFLAsHタグ、ヒスタグを用いた系、の2つしかなかったが、我々は、独自に開発したテトアスパラギン酸と複核亜鉛錯体との選択的な分子認識システムに、システインとクロロアセチル基という温和な反応を組み合わせる事により、Reactive Tagと呼ぶべきタンパク質ラベル化手法の開発に成功した。

この系では、ペプチドレベルで反応速度の最適化を行い、ついでタンパク質へタグとして導入し、クロロアセチル基との反応性を、選択性も含めて評価した。その結果、細胞破碎液レベルの夾雑系においても、狙ったタンパク質だけを共有結合によってラベル化する事が出来、蛍光官能基だけでなく、ビオチンなどの親和性官能基や、ポリエチレングリコールのようなタンパク質安定化のための高分子の導入なども可能である事を実証した。この系は、現在、細胞表層の受容体タンパク質のラベル化が可能かどうかの検討を鋭意続行中である。

### 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 18 件)

1. S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi  
Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo  
Nature Chemical Biology 査読有 5, 2009  
341-343

2. S. Uchinomiya, H. Nonaka, S. Fujishima, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi  
Site-Specific Covalent Labeling of His-tag Fused Proteins with a Reactive Ni(II)-NTA Probe  
Chem. Commun. 査読有 39, 2009, 5880-5882

3. S. Kiyonaka, K. Kato, M. Nishida, K. Mio, T. Numaga, Y. Sawaguchi, T. Yoshida, M. Wakamori, E. Mori, T. Numata, M. Ishii, H. Takemoto, A. Ojida, K. Watanabe, A. Uemura, H. Kurose, T. Morii, T. Kobayashi, Y. Sata, C. Sato, I. Hamachi, Y. Mori  
Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有 106, 2009, 5400-5405

4. S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi  
Quenched Ligand-Directed Tosylate Reagents for One-Step Construction of Turn-On Fluorescent Biosensors  
J. Am. Chem. Soc. 査読有 131, 2009, 9046-9054

5. Y. Ishida, M. Inoue, T. Inoue, A. Ojida, I. Hamachi  
Sequence Selective Dual-Emission Detection of (i, i+1) Bis-Phosphorylated Peptide Using Diazastilbene-Type Zn(II)-Dpa Chemosensor  
Chem. Commun. 査読有 2009, 2848-2850

6. T. Sakamoto, M. Inoue, A. Ojida, I. Hamachi  
Real-Time Fluorescence Monitoring of GSK3 $\beta$ -Catalyzed Phosphorylation by Use of a BODIPY-Based Zn(II)-Dpa Chemosensor  
Bio. Med. Chem. Lett. 査読有 19, 2009, 4175-4177

7. K. Kato, S. Kiyonaka, Y. Sawaguchi, M. Tohnishi, T. Masaki, N. Yasokawa, Y. Mizuno, E. Mori, K. Inoue, I. Hamachi, H. Takeshima, Y. Mori  
Molecular Characterization of Flubendiamide Sensitivity in the Lepidopterous Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Release Channel  
Biochemistry 査読有 48, 2009, 10342-10352

8. T. Sakamoto, A. Ojida, I. Hamachi  
Molecular Recognition, Fluorescence Sensing, and Biological Assay of Phosphate Anion Derivatives Using Artificial Zn(II)-Dpa Complexes  
Chem. Commun., Feature Article 査読有 2009, 141-152
9. H. Wakabayashi, M. Miyagawa, Y. Koshi, Y. Takaoka, S. Tsukiji, I. Hamachi  
Affinity Labeling-Based Introduction of a Reactive Handle for Natural Protein Modification  
Chem.-An Asian J. 査読有 3, 2008, 1134-1139
10. Y. Koshi, E. Nakata, M. Miyagawa, S. Tsukiji, T. Ogawa, I. Hamachi  
Target-Specific Chemical Acylation of Lectins by Ligand-Tethered DMAP Catalysts  
J. Am. Chem. Soc. 査読有 130, 2008, 245-251
11. T. Kohira, K. Honda, A. Ojida, I. Hamachi  
Artificial Receptors Designed for Intracellular Delivery of Anionic Phosphate Derivatives  
ChemBioChem 査読有 9, 2008, 698-701
12. H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi  
Non-enzymatic Covalent Protein Labeling Using a Reactive Tag  
J. Am. Chem. Soc. 査読有 129, 2007, 15777-15779
13. K. Honda, S. Fujishima, A. Ojida, I. Hamachi  
Pyrene Excimer Based Dual-Emission detection of a Oligoaspartate Tag Fused Protein Using Zn(II)-DpaTyr Probe  
Chem Bio Chem 査読有 8, 12, 2007, 1370-1372
14. A. Ojida, I. Hamachi  
Design and Synthesis of Bis(Zn(II)Dipicolylamine)-Based Fluorescent Artificial Chemosensors for Phosphorylated Proteins/Peptides  
Bull. Chem. Soc. Japan 査読有 1, 2006, 35-46
15. A. Ojida, M. Inoue, Y. Mito-oka, H. Tsutsumi, K. Sada, I. Hamachi  
Effective Disruption of Phosphoprotein-Protein Surface Interaction Using Zn(II) Dipicolylamine-Based Artificial Receptors via Two-Point Interaction  
J. Am. Chem. Soc. 査読有 128, 2006, 2052-2058
16. Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi  
One-pot and Sequential Organic Chemistry on an Enzyme Surface to Tether a Fluorescent Probe at the Proximity of the Active Site with Restoring Enzyme Activity  
J. Am. Chem. Soc. 査読有 128, 2006, 3273-3280
17. A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi  
Oligo-Asp Tag/Zn(II)-Complex Probe as a New Pair for Labeling and Fluorescence Imaging of Proteins  
J. Am. Chem. Soc. 査読有 128, 2006, 10452-10459
18. K. Honda, E. Nakata, A. Ojida, I. Hamachi  
Ratiometric fluorescence detection of a tag fused protein using the dual-emission artificial molecular probe  
Chem. Commun. 査読有 38, 2006, 4024-4026
- [学会発表] (計 74 件)
1. Itaru Hamachi  
Selective Chemical Labeling and Engineering of Endogenous Proteins in Test Tube, in Cell and in Vivo  
International Symposium of Joint Research Network on Advanced Materials and Devices "Chou"  
2010/3/25-26, Hotel-Nidom, Hokkaido
2. 浜地 格  
細胞内有機化学を目指した試行錯誤  
第3回名古屋大学化学系G-COEセミナー  
2009年11月30日-12月1日, 名古屋大学
3. Itaru Hamachi  
Organic Chemistry toward Protein Surface: in Test Tube and in Cell  
2009 China-Japan Symposium on Advanced Organic Chemistry  
2009/11/27-29, Shanghai, CHINA

4. Itaru Hamachi

Chemistry-based Protein Engineering in Test Tube, Cell Lysate, Cell and In vivo  
5th iCeMS International Symposium  
2009/7/27-28 Kyoto, JAPAN

5. 浜地 格

タンパク質選択的ケミカルラベリングの  
新手法：レクチンを中心に  
糖質科学フォーラム，2008年12月3日，品川

6. 浜地 格

夾雑系の有機化学：細胞有機化学を目指した  
悪戦苦闘  
東大化学生命専攻 ChemBio ハイブリッドレクチャー，2008年11月8日，東京大学

7. Itaru Hamachi

Chemistry-based Protein Labeling  
22th Naito Conference  
2008/9/8-12, Sapporo

8. 浜地 格

細胞内分子解析のための化学ツールの創製  
日本化学会第88春季年会  
2008年3月26-30日 立教大学（東京）

9. 浜地 格

人工小分子によるタンパク質認識と反応  
第3回バイオミメティクスシンポジウム  
(BMRC)  
2007年12月8日 京都

10. Itaru Hamachi

Novel Biosensors for Analyzing Substrates  
of Biological Significance  
2007 Material Research Society (MRS) Fall  
meeting, 2007/11/25-30, Boston (USA)

11. 浜地 格

生体機能を探るナノバイオセンサー  
第56回分析科学討論会  
2007年9月19-21日 徳島

12. Itaru Hamachi

Chemistry-based Protein Labeling  
1st Japan -Swiss Chemical Biology  
Symposium  
2007/6/24-25, Lausanne (Swiss)

13. 浜地 格

タンパク質認識と変換のための有機化学  
万有仙台シンポジウム  
2007年6月23日 仙台

14. Itaru Hamachi

Molecular Recognition to Anionic Species  
of Biological Significance  
2nd Korean-Japan Summit 2007/6/16-19, Toya  
(Japan)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜地 格 (HAMACHI ITARU)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：90202259

(2) 研究分担者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)  
京都大学・大学院工学研究科・講師  
研究者番号：10343328