

機関番号：13201

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390032

研究課題名 (和文) 光アフィニティーキャプチャーによるナノモルタンパク質の機能部位解析法開発

研究課題名 (英文) Photoaffinity capture for the identification of functional site within proteins of nano-mol amount

研究代表者

畑中 保丸 (HATANAKA, Yasumaru)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：30111181

研究成果の概要 (和文)：創薬技術の進歩により、現在ではコンピューター画像でタンパク質の構造を描き出し、その中枢部にうまくフィットするように設計した薬物 (分子標的治療薬) を合理的に開発することが可能となっている。本研究では、この薬物設計のポイントとなる鋳型タンパク質の構造を明らかにする上で、化学的方法ではこれまで困難とされていた痕跡量の試料に適用できる新光反応性試薬を開発し、その適用により代謝系酵素の解析に成功した。

研究成果の概要 (英文)：Recent progress in the drug developments enables the computer aided design of new medicines which are often called as “molecular target drugs.” The present research developed several novel photo-activatable probes that are effective for the analysis trace amount proteins. The application of this probe was successful for solving important binding-site within a metabolic enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：創薬基礎技術、薬物結合部位、質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

学術的背景

【タンパク質機能解析における課題】我が国におけるタンパク質 3000 プロジェクトに代表されるように、タンパク質の構造研究は結晶解析や NMR 法などにより急速に解析が進んでいる。一方で、膜タンパク質などの分光学的方法の適用が難しいタンパク質も数多くあり、これらの機能構造解析をどのように進めるかは、プロテオミクスや創薬を推進する上で解決すべき重要課題の一つであった。

【化学的手法による課題解決】結晶解析や NMR 法等の分光学的な方法論以外では、従来から化学修飾法が有効な選択肢の一つとなってきた。代表者は、世界に先駆けて光アフィニティー法の改良を進めてきた過程で、この有力な化学修飾法が直面する現状の問題点と、そのブレークスルーが分光学的方法論の適用困難な諸課題解決へ有力な手法を提供する可能性に、かねてより着目していた。

【研究開始当初での解決すべき技術的課題】結晶解析やNMR法は、解析を進めるのに多量の精製タンパク質を必要とする。このため、まずタンパク質を確保するタンパク質発現研究が先行する。タンパク質3000プロジェクトの結果、多くのタンパク質に発現の目処がしたが、結晶化の困難さや測定条件下での不安定性等が原因で、構造解析に至らなかったタンパク質も数多く、これらは基本的に化学修飾法の適用が有力な解決策となる。すでに代表者は、機能部位を特異的に化学修飾法できる光アフィニティー法の改良を進め、ラベルペプチドをつり上げる効率法を開発して、機能部位の解析に有効であることを示した(J. Am. Chem. Soc., 120, 453-454 (1998))。しかし配列解析に至るには、マイクロモル量の多量タンパク質が必要であり、発現タンパク質を有効に利用するために、少ない量でも解析可能な方法を開発する必要があった。

## 2. 研究の目的

現在の質量分析ではフェムトモル量で十分にペプチドの配列解析が可能であり、一般的な発現タンパク質の量で十分対応可能の量である。仮にタンパク質1mg(分子量10万で10nmol =  $10^{-8}$  mol)から始めると、質量分析の必要量を100fmol =  $10^{-13}$ としても $10^5$ の量的余裕がある。しかし、残念ながら既存の方法は極めて精製ロスが多く、ナノモルレベルでの効率法はいまだに存在しない。

一方、前述のように1mg以上の発現に成功して解析に至らないタンパク質は少なくないと考えられ、ナノモルで可能な光アフィニティー法を開発することで、タンパク質の機能構造解析をさらに前進させることが可能である。すでに代表者は、固相への光アフィニティーキャプチャー法の開拓を進めており、ナノモルレベルに近いところまで技術水準を上げてきている。この原理を適用することにより課題解決に取り組むことを本研究の目的とし、具体的な到達目標を設定した。

【研究期間内の到達目標】既存法の問題点は、光アフィニティーラベル後の精製過程で、多くの解析試料が失われることに原因がある。代表者のこれまでの研究で、その多くは断片化後のペプチドをハンドリングする過程で生じることが判明している。このため、かねてより操作性に優れた固相法の導入が解析過程を効率化する鍵になると考え、その技術的蓄積に努めてきた。この経験を生かし、本研究では目標をナノモル量のタンパク質におき、その解析技術の確立に焦点を絞って、以下を検討する。

1) ナノモル量のタンパク質を効率よく固相上に捕捉する、光アフィニティーキャプチャー

一法を確立する。

2) 固相上に抜き出したピコモル量の機能部位ペプチドフラグメントを、効率良く固相から遊離させ質量分析に供する技術を確立する。

3) これらを集約し、タンパク質の機能部位解析に応用する。

## 3. 研究の方法

1) アシルスルホンアミド基を利用する切断性光アフィニティーキャプチャー法：アシルスルホンアミド基は安定な結合であるが、アルキル化すると緩和な条件で切断可能となる。この性質をビオチンと組み合わせると、光ラベル後にビオチン-アビジン系でラベル体のみを釣り上げ精製(キャプチャー)し、ついで、強固で解離困難なビオチン-アビジン結合系から緩和に切断遊離させることが可能となる(図1)。

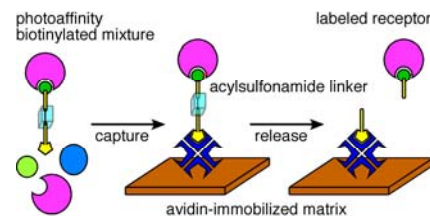


図1

この考えの基に、まずラベルタンパク質を選択的にキャプチャーする方針で、ビオチン-アシルスルホンアミド系の機能を利用する釣り上げ-切断遊離の実施に向けて、新しいアシルスルホンアミド型光プローブの合成と、タンパク質レベルでの検証を行った。

2) 固相上へのペプチドフラグメントのキャプチャーと質量分析：断片化後のペプチドにおいては、しばしば不溶化する等タンパク質レベルでは生じなかった問題に遭遇し、ハンドリング上の困難等で解析を阻まれる場合がしばしば存在する。この解決のため、ペプチド試料を固相上にキャプチャーし、そのまま質量分析に移行できる、ハンドリングロスの少ない効率系の構築を計画した。

3) 光アフィニティーキャプチャーによるナノモルタンパク質の機能部位解析：本研究では、難結晶性で安定性が十分でないタンパク質にも適用可能な方法論開発を念頭に、細胞膜上での発現系の実際の上限とされる、ナノモル量のタンパク質から出発して、当該タンパク質の機能部位解析を達成する方法の確立をゴールとして設定した。

この実現のため、本学薬学部の今中教授と協力してペルオキシソーム膜関連タンパク質の光アフィニティーラベリングを実施した。この研究で見いだされた、脂質代謝系のタンパク質に的を絞り、本研究で開発したビ

オチンタグを利用する光アフィニティーキャプチャー解析を推進した。

#### 4. 研究成果

1) 光反応性の新規酸性アミノ酸プローブによる光アフィニティーキャプチャー：アシルスルホンアミド基は、上述（3-1）の切断性に加え、生理的条件下では結合内のNH基が解離してアニオンとなる。

従って、アシルスルホンアミド基を側鎖に導入したアミノ酸は、酸性アミノ酸類似体として機能することが期待される。さらに、アシル基上に光反応基を導入すると、これまで例がなかったアニオン部位近傍に光反応基ジアジリンを有する新規プローブを開発することができる（図2）。

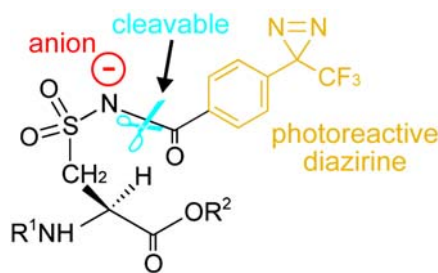


図2

このような原理に基づき、光反応性・切断性・アニオン性・ビオチンタグの多機能をコンパクトな構造中に内蔵した新しいプローブの開発を行った（図3）。

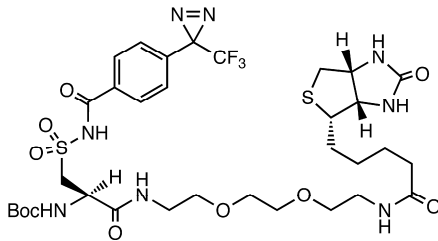


図3

ついで、酸性アミノ酸を認識するV8プロテアーゼへの光ラベルを実施し、プローブの評価を行った。ドットプロット（図4-A）SDS-PAGE—プロット（図4-B）のいずれにおいても、ラベルで特異的に取り込まれたビオチンタグが化学発光で検出された（aまたは1）。ビオチンの切断操作でこのシグナルが消失することから（bまたは2）、目的通りの光反応性・切断性・アニオン性・ビオチンタグの特色を併せ持つ、多機能型の新規プローブが得られたことを確認した。

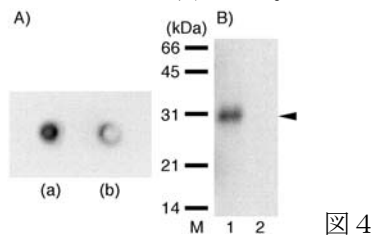


図4

本プローブはV8のみならず、酸性アミノ酸を認識する種々の酵素の光ラベルにも有効であったので、これらの中からグルタミン酸脱水素酵素（GDH）を選択し、ラベルタンパク質の釣り上げ精製とその酵素消化物のMS解析へと検討を進めた（図5）。

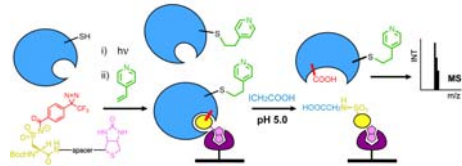


図5

図3のプローブを用いてGDHタンパク質の光アフィニティーキャプチャー解析を実施した。ビオチンタグは目的タンパク質の特異的ラベル化と釣り上げに有効であった。また、プローブ中のアシルスルホンアミドの切断能を利用して、アビジン上にキャプチャー濃縮したラベルタンパクのみを再遊離させることもできた。さらに、精製したラベルGDHの酵素消化物（図6上）とGDH標品の酵素消化物（図6下）の質量分析結果を比較することで、ラベルペプチドの候補（図6上矢印）を容易に同定できる新技術を開拓した。

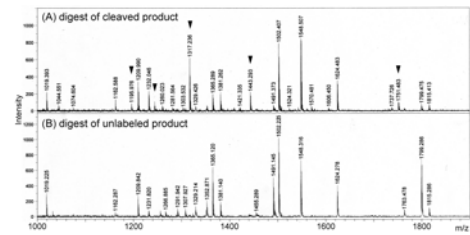


図6

この方法で、実際にナノから数十ナノモルレベルのタンパク質を効率よく釣り上げ精製することが可能となり、本課題の目的であるナノモルタンパク質の機能部位解析に有用な方法論確立への重要な知見を得た。

2) 金膜固相上へのペプチドキャプチャーと質量分析：前述（4-1）の切断系と組み合わせ、キャプチャー—切断遊離—質量分析の方針で、金膜基盤上でキャプチャー解析する可能性について実験を追加し検討した。まず、光反応性のジアジリン型素子を用意し、金膜コーティングした特殊質量分析用基盤（ターゲット）上にこれを塗布・吸着させた光反応性固相デバイスを構築した（図7）。

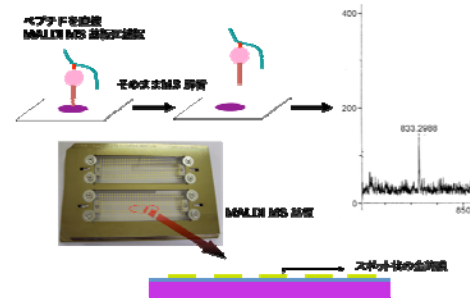


図7

このデバイスはペプチド試料の光キャプチャーに有効であり、キャプチャーされたペプチドを、質量分析によりこのデバイス上で直接検出可能であった (図7-右上)。

この結果は、ペプチド試料を金膜から構成される固相上に直接キャプチャーすることで、キャプチャーから質量分析までを一貫して同一固相上で実施できることを示す。さらに、チオール基により金膜固相に固定した試料が、質量分析操作の際のレーザー照射により金膜基盤から脱離検出されるという新知見が得られた。金膜固相を用いるキャプチャー系はハンドリングロスが少なく、解析サンプルが特に微量の際に有用であり、本課題の目的実現に新たな選択肢を加える上で重要な新知見を得た。

3) ペルオキシソーム系  $\beta$ -酸化酵素 MFE2 タンパク質の機能部位解析：まずビオチンを導入した多機能型パルミチン酸光プローブを合成した (図8)。

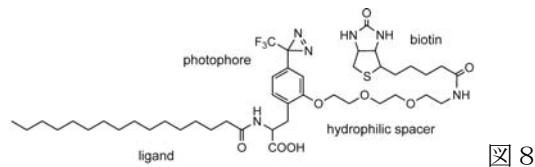


図 8

この新規光反応性脂質プローブが、 $\beta$  酸化酵素 peroxisomal multifunctional enzyme type2 (MFE2) を特異的にラベルする事を見いだした (図9)。

UV irradiation (min)    0   5   30

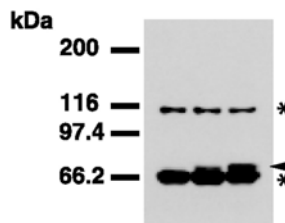


図 9

次に、発現 MFE2 タンパク質 (80 kDa) 100  $\mu$ g (1.25 nmol) から出発し、その機能部位解析する段階へと研究を進めた。ついで、プローブ構造中のビオチンを利用して、光ラベル後の試料混合物中から、ラベルタンパク質をアビジン固相上へとキャプチャーすることで選択的な釣り上げ精製を達成した。

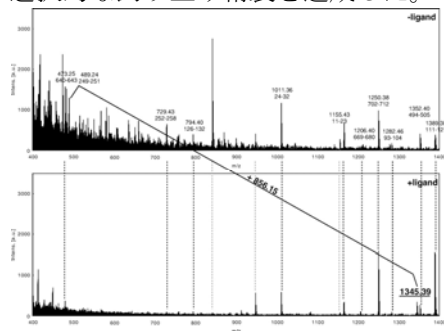


図 10

この精製ラベルタンパク質を、酵素消化後に MALDI-TOF 質量分析することによって、Trp249 – Arg251 の機能部位ペプチド配列の同定に成功した (図10)。

同定部位から、本酵素の機能発現に関連すると想定されるいくつかのアミノ酸に対し、部位特異的変異実験を実施した (図11)。これらの結果を基に、3次元グラフィックスによる構造解析を行ったところ (図12)、本研究で同定に成功したペプチド部分は、これまで明らかでなかった MFE2 の機能について、その詳細を浮き彫りにすることができた。

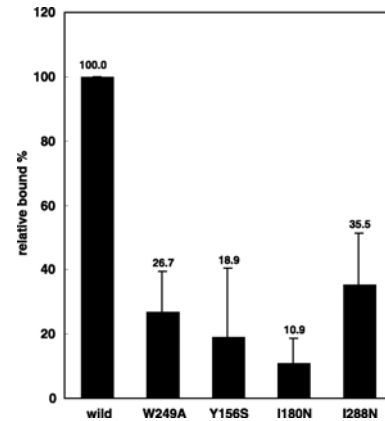


図 11

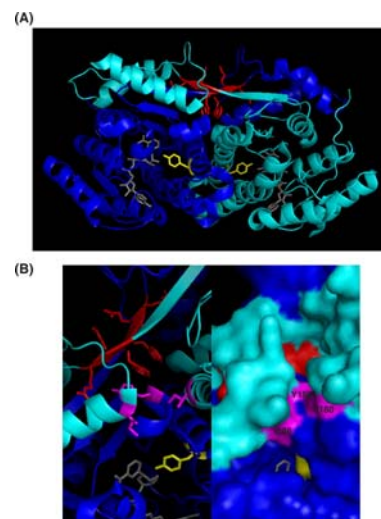


図 12

この結果、本研究の目的である“ナノモル量のタンパク質から出発し、その機能部位を解析する方法”の開発に成功した。さらに、このキャプチャー型ビオチンプローブの設計方針を応用し、新規 ATP プローブ開発へと発展させた。

## 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 6 件)

(1) Souta Masuda, Takenori Tomohiro, Yasumaru Hatanaka, Rapidly

- photoactivatable ATP probes for specific labeling of tropomyosin within the actomyosin protein complex, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, vol. 21, pp. 2252–2254 (2011).
- (2) Yoshinori Kashiwayama, Takeori Tomohiro, Kotomi Narita, Miyuki Suzumura, Tuomo Glumoff, J. Kalervo Hiltunen, Paul P. Van Veldhoven, Yasumaru Hatanaka, and Tsuneo Imanaka, Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative, *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 285, pp. 26315-26325 (2010).
- (3) Nlandu B. Bongo, Takeori Tomohiro, and Yasumaru Hatanaka, Efficient approach for profiling photoaffinity labeled peptides with a cleavable biotinyl photoprobe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, vol. 20, pp. 1834-1836 (2010).
- (4) Katsuyoshi Masuda, Ayako Koizumi, Takumi Misaka, Yasumaru Hatanaka, Keiko Abe, Takaharu Tanaka, Masaji Ishiguro, and Makoto Hashimoto, Photoactive ligands probing the sweet taste receptor. Design and synthesis of highly potent diazirinyl D-phenylalanine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, vol. 20, pp. 1081-1083 (2010).
- (5) Nlandu B. Bongo, Takeori Tomohiro, and Yasumaru Hatanaka, Synthesis and Evaluation of Novel Photoreactive  $\alpha$ -Amino Acid Analog Carrying Acidic and Cleavable Functions, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, vol. 19, pp. 80-82 (2009).
- (6) Makoto Hahimoto and Yasumaru Hatanaka, Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling, *Eur. J. Org. Chem.*, 査読有, vol. 2008, pp. 2513–2523 (2008).

[学会発表] (計 11 件)

- (1) Hatanaka Y., “Chemical Approach for Identifying Drug Binding Site within Proteins,” Kongres Ilmiah XVIII dan Rakernas 2010 Ikatan Apoteker Indonesia (Scientific Congress XVIII and Annual Meeting of Indonesian Pharmacist Association), 2010, 12, 12, Makassar, Indonesia.
- (2) Tomohiro T., Bongo N.B., Hatanaka Y., Photoaffinity Labeling with Novel Cleavable Biotinyl Probe, 21st French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, 2010, 5, 9-12, Kyoto.
- (3) 森本正大, 友廣岳則, 丸山伸之, 畑中保丸, 新規ジアジリン導入シグナルペプチドプローブの開発, 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- (4) 猪ノ口裕二, 増田宗太, 友廣岳則, 畑中保丸, 発蛍光性ジアジリンとこれを導入した新規 ATP プローブの開発, 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- (5) 橋本 誠, 畑中保丸, 味覚関連アミノ酸およびペプチド用光アフィニティーラベル試薬合成, 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- (6) Hatanaka Y., “A Rapid and Efficient Method for Identifying Photoaffinity Labeled Sites within Proteins”, Symposium for Medicinal Chemistry Division: Direct Approaches for Identifying All of the Cellular Targets of Small Molecule Drugs, and Mapping their Binding Cavities, the 239th National ACS Meeting, 2010, 3, 22, San Francisco, California, USA.
- (7) 橋本 誠, 村重 諒, 村井勇太, 畑中保丸, 芳香族アミノ酸側鎖構造活性相関解析用光アフィニティーラベル試薬の立体選択的合成, 日本薬学会第 129 年会, 2009, 3, 26-28, 京都.
- (8) 増田宗太, 友廣岳則, 畑中保丸, 新 ATP/ADP プローブによるアクトミオシン複合体の光アフィニティー解析, 日本薬学会第 129 年会, 2009, 3, 26-28, 京都.
- (9) 吉田幸司, 友廣岳則, 畑中保丸, 小林弘幸, Bouvier M.,  $\beta$  アドレナリン受容体に特異的なジアジリン型新規光プローブの開発, 日本薬学会第 129 年会, 2009, 3, 26-28, 京都.
- (10) 谷下充佳, 友廣岳則, 畑中保丸, 脂質、糖鎖、核酸等を一段階で光反応性プローブに誘導する効率的方法の開発, 日本薬学会第 129 年会, 2009, 3, 26-28, 京都.
- (11) Tomohiro, T., Sugai, A., Hatanaka, Y., Photoaffinity-Based Binding Analysis of Pt-Damaged DNA and Nuclear Protein, the 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008, 11, 10-13, Jeju, Korea.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/anachem/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 保丸 (HATANAKA YASUMARU)

富山大学大学院・医学薬学研究部（薬学）・  
教授  
研究者番号：30111181

(2)研究分担者  
友廣 岳則 (TOMOHIRO TAKENORI)  
富山大学大学院・医学薬学研究部（薬学）・  
准教授  
研究者番号：70357581

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：