

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24245032

研究課題名(和文)細胞夾雑系でも有効なタンパク質そのまま有機化学の開拓

研究課題名(英文) Development of Organic Chemistry-based Method for Endogenous Protein Modification under Live Cells

研究代表者

浜地 格 (HAMACHI, Itaru)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90202259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、種々の生命現象の鍵を握る代表的な生体高分子であるタンパク質を、試験管内だけでなく in cell や in vivo など、より生体そのままの環境でも特異的かつ任意に修飾・変換(ラベル化)できる新規な化学的方法論の構築である。これまで我々が開発したトシル基を用いたLDT化学の他に、今回新しいリガンド指向性化学として膜蛋白質に広く応用できるアルコキシアシルイミダゾール(LDAI)化学、およびオルト置換芳香族安息香酸エステルを反応性の官能基として細胞内タンパク質のかなり迅速なアシル化反応を可能とするLDBB化学の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research project is development of novel chemistry-based methods for selective labeling of endogenous (natural) proteins not only in purified test tube, but also under crude live cell conditions. During the research, I succeeded in developing two of new ligand-directed chemistry, distinct from the previously established ligand-directed tosyl chemistry. The first is based on acyl-imidazole functional group (LDAI) which can be widely applied to membrane-bound proteins in live cells, and the second one exploits ortho-dibromophenyl-aryl ester as a cleavable functional group (termed as LDBB) that enables rapid labeling inside live cells.

研究分野：化学/生物学

キーワード：生命化学 細胞系反応 蛋白質 ラベル化

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代のサイエンス全体において、タンパク質研究の重要性が増している。とりわけ、その真の姿を理解するために、精製タンパク質の機能・構造解析を行う従来型の生化学的手法から、そのタンパク質が本来存在する細胞や組織/個体その場での解析へと研究の焦点が移ってきており、そのための新規な方法論開発が世界中で活発に進められている。その中で、これまで開発された手法は、もっぱら遺伝子操作による融合タンパク質技術に依存しており、化学的手法の貧困さが問題となっている。例えば、タンパク質可視化法として普及した蛍光蛋白質(GFP)の融合技術では、プローブとなる蛍光蛋白質の大きさが観察したい現象を阻害/アーティファクトへと導くことが大きな問題点として指摘される。このような状況下、欧米では化学的手法の拡張を意図して、Tsienらがテトラステインループを用いた特異的修飾に関する先駆的成果を報告し、その後ヒスチジンタグが利用できることが報告された。また、非天然アミノ酸を手がかりとしたタンパク質の化学修飾法として、アジド化学、アセチレン化学が、近年アメリカを中心に開発された。しかしこれらは、あらかじめ非天然官能基を遺伝子レベルで細工してタンパク質に導入しておく必要があり、内在性タンパク質そのままの細胞系でのラベル化・解析に成功した例は、我々のリガンド指向性トシル化学以外には報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、種々の生命現象の鍵を握る代表的な生体高分子であるタンパク質を、試験管内だけでなく *in cell* や *in vivo* などより生体そのままの環境でも特異的かつ任意に修飾・変換(ラベル化)できる新規な化学的方法論の構築、さらに進んで、それを基軸とした生細胞という夾雑系での精密有機・生命化学という新しい研究領域の開拓に資するこ

とである。具体的には(1)認識と反応のカップリングによって水中/温和な条件で進行する有機反応の探索、(2)精製タンパク質を反応基質とした試験管レベルでのラベル化反応の評価と定量的で精密な構造・機能解析、ついで(3)これらを生きた細胞系での標的タンパク質選択的反応へと展開する。さらに、(4)ここで開発した化学ラベリングを基盤としたタンパク質の細胞・生体系での構造・機能解析については人工機能化を行い、単離精製したタンパク質と細胞内タンパク質の構造・機能に関する実験データ獲得し、直接比較できる実験系の確立を目指した。

3. 研究の方法

リガンド指向性トシル化学やアシルイミダゾール化学を活用したラベル化剤の有機合成は通常の方法で行った。この際、最終化合物の安定性は水中での加水分解速度測定で評価した。これらを用いたタンパク質の、試験管内だけでなく *in cell* や *in vivo* など、より生体そのままの環境でのラベル化の評価には、精製系では電気泳動や質量分析器を、また細胞系では主として電気泳動およびウエスタンブロットングを用いて、その反応速度、タンパク質選択性、修飾されるアミノ酸の種類などを精密に分析した。またイメージングやタンパク質寿命測定では、共焦点顕微鏡観察やウエスタンブロットングでの経時変化追跡を行い、定量的に評価した。これらの結果を基に、近接効果による反応加速はどこまで可能か、細胞内ではどのくらい少量のタンパク質までラベル化可能か、試験管と細胞系でラベル化効率ほどの程度異なるか、などについて可能な限りの定量比較を実施した。

4. 研究成果

(1) これまで我々が独自に開発してきたトシル基を用いるリガンド指向性トシル化学によって、細胞内FKBP12に光架橋可能な官能基を導入し、そのまま生細胞内で、蛋白質/蛋

白質相互作用を解析する事ができること、また、この相互作用をGFP法との同時適用によってイメージングできることを実証した。

(2) 新たにリガンド指向性アルコキシアシルイミダゾール(LDAI)化学の開発に成功し、この化学が、生細胞表層の葉酸受容体だけでなく、様々な細胞シグナルの機転となる事が知られている7回膜貫通型膜蛋白質であるGPCRやイオンゲート型グルタミン酸受容体の1種のラベル化にも適用できる事を新たに見出した。またLDAI化学によって蛍光ラベル化した葉酸受容体に関しては、そのリガンド結合の速度論的解析が生細胞でそのまま可能となる事を明らかにした。これは、生細胞系でのケミカルラベルが、単にイメージングだけでなくより内在性タンパク質のリガンド結合特性といった機能解析など色々な方向への応用の可能性を示した重要な成果と考えている。

(3) LDT, LDAI化学とは異なるリガンド指向性ラベル化の化学として、オルト置換芳香族安息香酸エステルが反応性の官能基として細胞内タンパク質のかなり迅速なアシル化反応を可能とすることを新しく見出した(LDBB化学)。特にラベル化の選択性が高かったのは、オルトジブプロモフェニルエステルであり、イメージングプローブとなる蛍光団(フルオレセインやクマリン誘導体)の芳香族部分を直接ジブプロモフェニルエステル化するによって、細胞内に過剰発現した細菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素のラベル化が30分程度で高収率に進行した。またリガンドを炭酸脱水酵素(CA)のリガンドとしたLDBB化学型ラベル化剤を合成しラベル化を行うと細胞内在性のCAの選択的なラベル化だけでなく、蛍光イメージングも容易に実現することが出来た。内在性タンパク質の新しいラベル化手法として期待できる。

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 60件)

Y. Takaoka, Y. Nishikawa, Y. Hashimoto, K. Sasaki, I. Hamachi, Ligand-directed Dibromophenyl Benzoate Chemistry for Rapid and Selective Acylation of Intracellular Natural Proteins, Chem. Sci., 査読有, 6, 3217-3224, 2015, DOI:10.1039/C5SC00190K

Z. Song, Y. Takaoka, Y. Kioi, K. Komatsu, T. Tamura, T. Miki, I. Hamachi, Extended Affinity-guided DMAP Chemistry with Finely-tuned Acyl Donor for Intracellular FKBP12 Labeling, Chem. Lett., 査読有, 44, 333-335, 2015, DOI:10.1246/cl.141065

S. Tsukiji, I. Hamachi, Ligand-Directed Tosyl Chemistry for Selective Native Protein Labeling In Vitro, In Cells, and In Vivo, Methods in Molecular Biology, 査読有, 1266, 243-263, 2015, DOI:10.1007/978-1-4939-2272-7_17

T. Tamura, I. Hamachi, Labeling Proteins by Affinity-guided DMAP Chemistry, Methods in Molecular Biology, 査読有, 1266, 229-242, 2015, DOI:10.1007/978-1-4939-2272-7_16

T. Miki, S. Fujishima, K. Komatsu, K. Kuwata, S. Kiyonaka, I. Hamachi, LDAI-based Chemical Labeling of Intact Membrane Proteins and its Pulse-Chase Analysis under Live Cell Conditions, Chemistry & Biology, 査読有, 21, 1013-1022, 2014, DOI:10.1016/j.chembiol.2014.07.013

I. Takahira, H. Fuchida, S. Tabata, N. Shindo, S. Uchinomiya, I. Hamachi, A. Ojida, Design of a Binuclear Ni(II) - iminodiacetic Acid (IDA) Complex for Selective Recognition and Covalent Labeling of His-tag Fused Proteins, Bioorg. Med. Chem. Lett., 査読有, 24, 2855-2858, 2014, DOI:10.1016/j.bmcl.2014.04.096

T. Tamura, I. Hamachi,
Recent Progress in Design of Protein-based
Fluorescent Biosensors and Their Cellular
Applications,
ACS Chemical Biology, 査読有, 9, 2708-2717,
2014, DOI:10.1021/cb500661v

S. Tsukiji, I. Hamachi,
Ligand-directed Tosyl Chemistry for in
Situ Native Protein Labeling and
Engineering in Living Systems: from Basic
Properties to Applications,
Curr. Opin. Chem. Bio., 査読有, 21, 136-143,
2014, DOI:10.1016/j.cbpa.2014.07.012

S. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi,
Peptide Tag/Probe Pairs Based on
Coordination Chemistry for Protein
Labeling,
Inorg. Chem., 査読有, 53, 1816-1823, 2014,
10.1021/ic401612z

Y. Takaoka, Y. Fukuyama, K. Matsuo, I. Hamachi,
Disassembly-driven Turn-on Sensing of
Enzyme Activity by Using Substrate-based
Fluorescent Nanoprobe,
Chem. Lett., 査読有, 42, 1426-1428, 2013,
DOI:10.1246/cl.13069

M. Ishida, H. Watanabe, K. Takigawa, Y.
Kurishita, C. Oki, A. Nakamura, I. Hamachi,
S. Tsukiji,
Synthetic Self-Localizing Ligands That
Control The Spatial Location of Proteins
in Living Cells,
J. Am. Chem. Soc., 査読有, 135, 12684-12689,
2013, DOI:10.1021/ja4046907

K. Matsuo, Y. Kioi, R. Yasui, Y. Takaoka,
T. Miki, S. Fujishima, I. Hamachi,
One-step Construction of Caged Carbonic
Anhydrase I Using a Ligand-directed Acyl
Imidazole-based Protein Labeling Method,
Chem. Sci., 査読有, 4, 2573 - 2580, 2013,
DOI:10.1039/C3SC50560J

T. Tamura, Y. Kioi, T. Miki, S. Tsukiji,
I. Hamachi,
Fluorophore Labeling of Native FKBP12 by
Ligand-directed Tosyl Chemistry Allows
Detection of Its Molecular Interactions in
Vitro and in Living Cells,
J. Am. Chem. Soc., 査読有, 135, 6782-6785,
2013, DOI:10.1021/ja401956b

Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi,
Protein Organic Chemistry and Application
for Labeling and Engineering in Live-Cell
Systems,
Angewante Chemie International Edition,
査読有, 52, 4088-4106, 2013,
DOI:10.1002/anie.201207089

浜地 格,
細胞内在性タンパク質の直接ラベル化とセ
ンシング,
ここまで進んだバイオセンシング・イメー
ジング-1 分子から細胞, 脳まで-, 化学同人,
査読無, 101-107, 2012,
<http://hdl.handle.net/2433/193721>

〔学会発表〕(計 51 件)

浜地 格,
タンパク質ラベリングを基盤とした生細胞
有機化学,
JST-ERATO 伊藤グライコトリロジープロジェ
クト終了シンポジウム「融合的アプローチに
よる生命現象の探求」, 2015/1/23, 理化学研
究所・大河内記念ホール

Itaru Hamachi,
Ligand-directed Chemistry for Protein
Labeling under Live Conditions,
15th Tetrahedron Symposium -Asian Edition,
2014/10/28-31, Singapore EXPO Convention
and Exhibition Centre, SINGAPORE

Itaru Hamachi,
Protein Organic Chemistry under Live Cell
Conditions,
The Nagoya Medal of Organic Chemistry 2014,
2014/10/27, Noyori Conference Hall,
Nagoya University, JAPAN

浜地 格,
内在性タンパク質のケミカルラベルによる
生細胞での相互作用解析,
第6回薬学の未来を考える京都シンポジウム
「イメージング技術が切り開く創薬・病態研
究の未来」, 2014/8/2, 京都大学・薬学部記
念講堂

Itaru Hamachi,
Chemical Strategies for Labeling and
Manipulating Proteins in Live Cells,
Bioorthogonal Chemistry Meeting of the
Division of Biochemistry, 2014/7/16-18,
Harnack-Haus, Berlin, GERMANY

Itaru Hamachi,
Ligand-directed Chemistry for Endogenous
Protein Labeling under Live Conditions,
15th Tetrahedron Symposium, 2014/6/24-27,
Millennium Gloucester Hotel London
Kensington, UK

浜地 格,
生細胞での化学プローブ / 蛋白質の直接ハ
イブリッド化による機能化,
化学工学会第 45 回秋季大会, 2013/9/16, 岡
山大学

浜地 格,
内在性蛋白質のケミカルレベル化法の開発
とイメージング,
第 22 回日本バイオイメーシング学会学術集
会, 2013/9/15, 東京大学

Itaru Hamachi,
Chemistry for Native Protein Labeling
Under Live Conditions,
The 3rd Annual Symposium "Frontiers at the
Chemistry-Biology Interface", 2013/6/24,
Peking University, CHINA

浜地 格,
細胞夾雑系でのタンパク質合成化学,
日本化学会第93春季年会, 2013/3/22-25, 立
命館大学びわこ・くさつキャンパス

浜地 格,
生命化学の深化を目指した分子技術,
日本化学会第93春季年会, 2013/3/22-25, 立
命館大学びわこ・くさつキャンパス

〔その他〕
ホームページ等
<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