

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670058

研究課題名(和文)デュアルエフェクト応答型タンパク質ラベル化試薬の開発

研究課題名(英文)Development of highly efficient labelling reagents for protein

研究代表者

大高 章 (OTAKA, Akira)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20201973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リガンド依存的タンパク質ラベル化は、創薬、ケミカルバイオロジー研究に不可欠である。これに用いる従来型試薬は、リガンド-タンパク質相互作用に依存した“濃縮効果”応答性のみが試薬に付与されていた。本研究では、チオエステル前駆体として開発したN-sulfanylethylanilide (SEAlide)の酸塩基触媒依存的活性化とタンパク質を巨大酸塩基触媒と見なすことを基盤とし、“濃縮効果”と“活性化効果”の両者に応答可能な「デュアルエフェクト応答型ラベル化試薬」の開発を目指し研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In cell labeling of proteins is an essential technology for elucidating the function of proteins in living cells. Among various strategies, an affinity labeling with the use of protein ligands and electrophilic moieties has been widely used. Achievement of an affinity labeling requires the tuning of reactivity of an electrophilic moiety to prevent non-specific labeling. Recently, we reported the N-sulfanylethylanilide (SEAlide) as a tunable electrophilic moiety. Although the SEAlide, an anilide compound, almost remains intact, addition of phosphate salts as acid-based catalyst induces conversion of the stable anilide linkage to the the electrophilic thioester via N-S acyl transfer. On the basis of this interesting feature of the SEAlide, we developed highly efficient labelling reagents for proteins with practical application of labelling of model proteins using SEAlide based reagents.

研究分野：医薬品化学 ペプチド化学

キーワード：タンパク質 ラベル化 標的タンパク質 N-Sアシル転移

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能解明研究では、細胞内などから特定タンパク質情報を抽出し、機能解析に役立てる手法が汎用されつつある。欠かせない技術の一つが、タンパク質選択的ラベル化である。蛍光色素とタンパク質特異的リガンドを内蔵するラベル化試薬が利用されるが、試薬設計指針は、タンパク質に対し、活性化ラベル化試薬を、リガンドを利用してタンパク質近傍に近接させるという“濃縮効果”を基盤としている。活性化された試薬では、標的以外の非特異的ラベル化が避けられない。そこで、“濃縮効果”以外の効果が必要である。申請者はチオエステル前駆体である SEALide ユニットが本問題解決の一助となると考えた。SEALide は通常アミド型として不活性型であるが、酸塩基触媒により、チオエステル型に活性化されることを見出した。すなわち、タンパク質を酸塩基触媒と見なせば、SEALide 構造内蔵試薬は、タンパク質近傍に濃縮されると“活性化効果”を受け得る理想的なラベル化試薬となるとの着想に至り、この SEALide 構造体を利用した従来にないタンパク質ラベル化試薬の開発を行うことにした。

2. 研究の目的

リガンド依存的タンパク質ラベル化は、創薬、ケミカルバイオロジー研究に不可欠である。これに用いる従来型試薬は、リガンド-タンパク質相互作用に依存した“濃縮効果”応答性のみが試薬に付与されていた。本研究では、チオエステル前駆体として開発した *N*-sulfanylethylanilide (SEALide) の酸塩基触媒依存的活性化とタンパク質を巨大酸塩基触媒と見なすことを基盤とし、“濃縮効果”と“活性化効果”の両者に応答可能な「デュアルエフェクト応答型ラベル化試薬」の開発を行うことを目的とした。活性化効果応答性を付与することによる、ラベル化試薬のタンパク質選択性向上が期待できる。本試薬設計概念は、我々の従来研究に立脚した独創性の高いものであり、その成果は創薬、ケミカルバイオロジー研究の発展に大きく資するものである。

3. 研究の方法

新規高選択的タンパク質ラベル化試薬の開発という研究目的を達成するため「SEALide ユニット含有デュアルエフェクト応答型ラベル化試薬の合成」、「シクロオキシゲナーゼ-1(COX-1)および炭酸脱水素酵素(CA)のラベル化の検討」、「ラベル化部位の確定」、「細胞内タンパク質ラベル化への展開」、「活性化効果応答性の検証」の各目標を年次計画に従って検討を進めた。また、研究の進捗状況に応じて、標的未知リガンドの標的タンパク質探索への展開を図った。なお、全体の研究計画は有機化学的実験、生化学的実験からなるが、研究代表者である大高および徳島大学

薬学部内の生物系研究室の協力を得て実施した。

4. 研究成果

(1) ラベル化試薬の合成

我々はこれまで、SEALide ペプチドの開発を行ってきた。SEALide ペプチドは、ペプチドチオエステル前駆体であるが、不活性なアニリド型から活性なチオエステル型への変換反応が中性条件下リン酸塩の添加により著しく促進されることを見出した。すなわち、リン酸塩が両者の変換で酸塩基触媒として機能していると推定した。さて、タンパク質はアミン、カルボン酸、イミダゾールなどの官能基が集積しており、その表面はリン酸塩と同様に一種の巨大な酸塩基触媒の反応場と見なせる。そこで SEALide をラベル化試薬反応部位として導入することで、始めは不活性型(アミド型)であるがタンパク質と相互作用する事をトリガーとして活性型(チオエステル型)に変化するラベル化試薬が開発できると考え、SEAL-tag を設計した。さらに有機化学に関する特別な知識を持たない科学者でも合成が可能なラベル化試薬の開発を目指し、当該ラベル化試薬はペプチド合成に汎用される Fmoc 固相合成法を用いる合成法を確立した。固相担体樹脂として NovaSyn TGR[®] resin を用いた Fmoc 固相合成法 (Fmoc SPPS) により、側鎖アミノ基を ivDde 基で保護したリジンおよび mini-PEG を diisopropylcarbodiimide (DIC) を縮合剤として用いて樹脂上に導入した。その後、SEALide を *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphate (HATU) を縮合剤として用いて縮合し、さらに mini-PEG を導入した。続いて、タグとして用いる biotin もしくは FTC を導入後、リジン側鎖 ivDde 基を 2% (v/v) ヒドラジン-水和物-DMF で除去した。生成したアミノ基に対して COX-1 のリガンドである indomethacin を縮合後、得られた樹脂を最終脱保護反応に付すことで SEAL-tag の合成を達成した。

(2) Cyclooxygenase-1 (COX-1) ラベル化実験

SEAL-tag の合成が完了したので、続いてモデルタンパク質として COX-1 を用いたラベル化実験を行った。COX-1 と indomethacin の相互作用を利用した研究は過去に報告されており、また COX-1 および indomethacin は容易に入手可能であったことから、これらを選択した。まず SEAL-tag を用いた COX-1 ラベル化における SEAL-tag の構造及びラベル化時間の最適化を行った。タンパク質求核性官能基と SEAL-tag 反応部位間距離が重要であると考え、リンカーとして用いる mini-PEG の数を変化させた SEAL-tag を用いてラベル化実験を行った。またラベル化効率は、電気泳動と western blotting により観察されるバンドの濃淡より比較した。この結果、mini-PEG が 0 もしくは 2 個導入した SEAL-tag を用いた場

合に濃いバンドが観察された。本結果より、これらを用いた場合のラベル化効率が高いと判断しており、これは mini-PEG を 0 もしくは 2 個導入することでタンパク質求核性官能基と SEAL-tag 反応部位間距離が適度に接近するためであると考察している。本仮説を証明するため、現在ラベル化部位アミノ酸の同定を行っている。続いてラベル化時間について検討を行った。本検討では 24 h、48 h、72 h について検討した。また、ラベル化効率は上記と同様の方法により観察した。この結果、24 h と比較し 48 h ではラベル化された COX-1 のバンドは濃くなっており、48 h と 72 h においてはバンドの濃さに変化は観察されなかった。これは、48 h までに SEAL-tag がホモダイマーを形成してしまいラベル化能を失うためであると考察しており、最適ラベル化時間は 48 h であると判断している。続いて細胞抽出液中の COX-1 のラベル化について検討を行った。本実験では、全タンパク質に対して 3.30% から 0.33 % (v/v) になるように COX-1 を添加した STO 細胞抽出液中でのラベル化を行った。この結果、全タンパク質に対して COX-1 が 0.33% 含まれる系においても COX-1 選択的ラベル化を確認した。

(3) Human carbonic anhydrase 1 (hCA1) ラベル化実験

次に SEAL-tag の基質汎用性を検証するため human carbonic anhydrase 1 (hCA 1) のラベル化を行った。本実験では、hCA1 のリガンドとして過去に報告がある benzensulfonamide をリガンド部位に導入した SEAL-tag を用いて行った。精製 hCA 1 と SEAL-tag を 50 mM HEPES buffer 中、37 °C で 72 h インキュベートしたところ hCA1 のラベル化が観察された。また、タンパク質 (hCA1、ovalbumin、enolase、glutathion S-transferase (GST)) および SEAL-tag を 50 mM HEPES buffer 中において 37 °C、48 h インキュベートしたところ hCA 1 選択的なラベル化を確認した。

以上のような実験を通じて、COX-1 および hCA 1 ラベル化実験の結果より SEAL-tag に導入するリガンドの変更により様々なタンパク質のラベル化に適用可能であることが示唆された。

なお、現在標的未知のリガンドに対するラベル化実験を各種リガンド分子を誘導体化している。

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7件)すべて査読有

Aihara, K.; Inokuma, T.; Komiya, C.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Synthesis of lactam-bridged cyclic peptides by using olefin metathesis and diimide reduction" *Tetrahedron in press.* 2015. (doi: 10.1016/j.tet.2015.04.093)

Yamamoto, J.; Maeda, N.; Komiya, C.; Tanaka, T.; Denda, M.; Ebisuno, K.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Development of a fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker" *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5122-5127.

(doi: 10.1016/j.tet.2014.05.110).

Yamamoto, J.; Denda, M.; Maeda, N.; Kita, M.; Komiya, C.; Tanaka, T.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Development of a traceable linker containing a thiol-responsive amino acid for the enrichment and selective labelling of target proteins" *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3821-3826.

(doi: 10.1039/C4OB00622D).

Ebisuno, K.; Denda, M.; Ogura, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Development of caged non-hydrolyzable phosphoamino acids and application to photo-control of binding affinity of phosphopeptide mimetic to phosphopeptide-recognizing protein" *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2984-2991.

(doi: 10.1016/j.bmc.2014.04.002).

重永 章、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」化学工業 (特集 ペプチド化学の新潮流 (1)) **2014**, *65*, 849-856.

Nakamura, T.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Tsuda, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. "Examination of native chemical ligation using peptidyl prolyl thioester" *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 58-60.

(doi: 10.1039/C3CC47228K)

Sato, K.; Shigenaga, A.; Kitakaze, K.; Sakamoto, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. "Chemical synthesis of biologically active monoglycosylated GM2-activator protein analog using *N*-sulfanylethylamide peptide" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7855-7859.

(doi: 10.1002/anie.201303390).

[学会発表](計2件)

大高 章、重永 章「インテインに学ぶ標的タンパク質研究手法の開発」日本薬学会第134回年会、熊本大学(熊本県・熊本市) 2014年3月27-30日

大高 章「ペプチド・タンパク質を基盤とする創薬展開への化学基盤の開拓」創薬懇話会 2013、定山溪ビューホテル(北海道・札幌市)2013年7月4日

[図書](計1件)

重永 章、山本 純、大高 章「生物活性小分子の結合パートナータンパク質を知りたい - リンカー分子を用いたタンパク質精製法 - 」実験医学増刊号 驚愕の代謝システム~メタボロームの階層から解

き明かす疾患研究の新たなステージ～(末松 誠、杉浦悠毅 編)、羊土社、204 (150-156)、2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

研究室ウェブサイト:

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab/otaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大高 章 (OTAKA, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号: 20201973