

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21121005

研究課題名(和文) 準安定状態の動態を分子レベルで可視化する1分子観測技術の開発

研究課題名(英文) Development of chemical methods for analyzing protein molecules function in their natural habitat

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) 90,900,000円、(間接経費) 27,270,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は生命現象を担う中心的な分子であり、その構造と機能の解析が精力的に進められている。特に最近、その解析を単離精製した状態だけでなく、タンパク質が本来存在する細胞系で評価する重要性が認識されてきている。本研究では、複数のタンパク質から構成される過渡的な準安定複合体を分光学的手法により特異的に検出するために、特定のタンパク質を、生きた細胞環境で、選択的にラベル化・可視化・ラベル化できるオリジナルな新手法/技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Protein is one of the central biomolecules that is involved in almost all biological events and thus its quantitative analysis has been actively conducted for many years. Recently, it is now regarded that protein analysis in natural habitats (living systems is ideal) should be crucial, in addition to the analysis in the purified test tube systems. In this research project, we successfully developed several original methods (or synthetic small molecules) based on chemistry that allow for selective labeling and imaging target proteins under nearly natural conditions. These methods may contribute to analyzing protein structure and functions in living cells.

研究分野：化学/生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学/生物科学・構造生物学

キーワード：タンパク質 小分子プローブ ラベル化 有機化学 イメージング

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生命現象を担う中心的な分子であり、その構造と機能の解析が精力的に進められている。特に最近、その解析を単離精製した状態だけでなく、タンパク質が本来存在する細胞系で評価する重要性が認識されてきている。特に複数のタンパク質から構成される過渡的な準安定複合体を分光学的手法により特異的に検出するためには、種々の分光学的シグナルを発信するプローブ分子を特定のタンパクへ部位選択的にラベル化する技術が必須となる。ところが生化学的な方法論の発展と比較して、化学的手法の開発は大きく遅れており、プローブ導入などにおいて自由度の高い化学的方法論の進展が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、特定のタンパク質を選択的に小分子プローブなどで可視化・ラベル化する新手法/技術を開発し、様々な分光学的手法の活用を可能にすることによってタンパク質機能解析を行う新しい方法論の確立である。とりわけタンパク質の真の構造と機能を明らかにするために、標的タンパク質が本来存在する生細胞環境あるいはそれに可能な限り近い環境でのプローブ導入を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、ラベル化や可視化を可能とする分子(化合物)を、まず分子設計しその後有機合成によって得た。その後、幾つかのモデルタンパク質や標的分子を用いたインビトロ実験を行い、設計した分子の性能評価を試験管レベルで実施した。その時点で十分な性能を発揮しない場合は分子設計を改善し、また優れた性能を発揮した場合には細胞破碎液/生細胞系での実験を行い、その機能をより詳細に検討し、これまでにない独特の手法/分子の開発に繋げた。

4. 研究成果

(1) 自己組織化ナノプローブによるタンパク質オフオンイメージング

我々は、同領域3班の白川教授のグループとの共同研究で、特定のタンパク質の存在を¹⁹F-NMR/MRIを用いて検出しイメージングできる新しい検出原理の創製に成功した。これは、自己組織性のナノプローブが、タンパク質に認識されることによって、会合体の崩壊を起こすことによるものであり、細胞系でも特定の内在性タンパク質の検出が可能であることを実証した。また、¹⁹F-NMRプローブを赤血球細胞中で選択的にラベル化した炭酸脱水酵素のリガンド認識に関わる動的挙動が、赤血球内と単離精製した試験管中とは、明らかに異なる事を発見した。

(2) 新規ペプチドタグによる膜蛋白質のケ

ミカルラベル化とイメージング

膜タンパク質の生細胞での新しいラベル化手法として、短いペプチド鎖(Asp 4連続配列)を標的タンパク質に予め融合し、哺乳類細胞で発現後にそのタグ選択的にプローブ導入する独自の手法(D4-reactive tag法)を開発した。特に、膜タンパク質であるGPCR(m1RやB2R)を生細胞でこのタグプローブで蛍光プローブやビオチンラベル化することに成功し、internalizationなどの動的挙動の可視化が可能となることを明らかにした。

(3) 内在性タンパク質のケミカルラベル化新手法の開発

我々が、独自に開発してきた細胞内タンパク質を選択的にケミカルラベル化できるリガンド指向性トシル化学(LDT)を活用して、生細胞内に内在するFKBP12への蛍光団や光クロスリンク機能分子の導入が可能なる事を実証した。詳細なラベル化機構の検討から、ラベル化効率や修飾されるアミノ酸部位を支配する因子としてスペーサー長だけでなく配向/剛直性が重要であることを明らかにするとともに、ラパマイシンなどの小分子添加によって誘導されるタンパク質-タンパク質相互作用を光架橋によって生細胞系で同定できることを示した。また、LDT法と既存のGFP融合法とを同時に用いて、生きた1細胞中での小分子駆動によるタンパク質-タンパク質相互作用のイメージングおよびそのリガンド滴定に成功した。これらの成功事例を基に、リガンド指向性化学の潜在力を強力に実証することに成功した。

次いで、LDTとは異なる新しいリガンド指向性化学として、アルコキシアシルイミダゾールを用いたリガンド指向性アシルイミダゾール化学(LDAI)の開発に成功した。これはトシル化学と異なる反応特性を示し、反応するアミノ酸選択性が異なるだけでなく形成される化学結合も炭酸エステルやウレタン結合であり、またジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)や葉酸受容体(FR)への適用において、LDTよりも速いラベル化反応であることを明らかとした。さらに、生細胞(KB細胞)表層に発現しているFRを標的としたラベル化すると、フルオレセインラベル化FRが葉酸やその誘導體リガンドを結合することによって蛍光強度が増強するセンサー機能を発現することを見出し、生細胞環境下で、内在性タンパク質と種々のリガンドとの結合に関する平衡論と速度論的な解析を初めて実現した。このことは、内在性蛋白質を細胞環境でそのまま修飾できるケミカルラベル化法の特長を端的に示すものである。

(4) 生細胞で活用できる蛍光プローブの創出

この他に、生細胞系で特定のオルガネラのATP濃度変化を動的にイメージング可能な局

在型小分子プローブ、細胞内オルガネラの温度変化を可視化できるプローブ、またタンパク質局在をオルガネラ選択的に制御できるオルガネラ局在型合成リガンドを世界に先駆けて開発した。

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 25 件)

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

T. Hayashi, Y. Sun, T. Tamura, K. Kuwata, Z. Song, Y. Takaoka, I. Hamachi, Semisynthetic Lectin-Dimethylaminopyridine Conjugates for Labeling and Profiling Glycoproteins on Live Cell Surfaces, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 135, 12252-12258, 2013, DOI:10.1021/ja4043214

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

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, Chemical Science, 査読有, 4, 2573-2580, 2013, DOI:10.1039/c3sc50560j

Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, I. Hamachi, Organelle-Localizable Fluorescent Chemosensors for Site-Specific Multicolor Imaging of Nucleoside Polyphosphate Dynamics in Living Cells, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 134, 18779-18789, 2012, DOI:10.1021/ja308754g

S. Fujishima, R. Yasui, T. Miki, A. Ojida, I. Hamachi, Ligand-directed Acyl Imidazole Chemistry for Labeling of Membrane-bound Proteins on

Live Cells, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 134, 3961-3964, 2012, DOI:10.1021/ja2108855

T. Tamura, S. Tsukiji, I. Hamachi, Native FKBP12 Engineering by Ligand-Directed Tosyl Chemistry: Labeling Properties and Application to Photo-Cross-Linking of Protein Complexes in Vitro and in Living Cells, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 134, 2216-2226, 2012, DOI:10.1021/ja209641t

H. Wang, Y. Koshi, D. Minato, H. Nonaka, S. Kiyonaka, Y. Mori, S. Tsukiji, I. Hamachi, Chemical Cell-Surface Receptor Engineering Using Affinity-Guided, Multivalent Organocatalysts, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 133, 12220-12228, 2011, DOI:10.1021/ja204422r

H. Nonaka, S. Fujishima, S. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, Selective Covalent Labeling of Tag-Fused GPCR Proteins on Live Cell Surface with a Synthetic Probe for Their Functional Analysis, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 132, 9301-9309, 2010, DOI:10.1021/ja910703v

Y. Takaoka, T. Sakamoto, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, H. Tochio, M. Shirakawa, I. Hamachi, Self-assembling nano-probes displaying off/on ¹⁹F NMR signals for protein detection and imaging, Nature Chemistry, 査読有, 1, 557-561, 2009, DOI:10.1038/NCHEM.365

〔学会発表〕(計 35 件)

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ラ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ジング学会学術集会, 2013/9/15, 東京大学

Itaru Hamachi, Selective Chemical Labeling and Imaging of Endogenous Protein in Live Cells, 23rd American Peptide Symposium, 2013/6/22-27, Hilton Waikoloa Village, Hawaii

浜地 格, 蛋白質ケミカルラベリングを基盤とした細胞有機化学, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013/6/12-14, とりぎん文化会館

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,蛋白質ケミカルラベリングを基軸とした細胞有機化学,第30回メディシナルケミストリーシンポジウム,2012/11/28-30,タワーホール船堀

浜地 格,タンパク質ラベリングを基盤とする生細胞化学,日本化学会第92春季年会,2012/3/25-28,慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス

Itaru Hamachi,Protein labeling and engineering in live cell systems, CIPSM - Fest of Chemical Biology, 2011/9/15-16, Buchner Lecture Hall, Ludwig Maximilians University Munich

Itaru Hamachi, Chemical Labeling and Imaging of Protein in Live Cells,UPAC International Congress on Analytical Science 2011, 2011/5/23-25, Kyoto International Conference Center

Itaru Hamachi,A Chemistry-Based Method for Labeling membrane- Bound Proteins on Live Cell Surface, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2011/3/3-4, The Takeda Hall, The University of Tokyo

Itaru Hamachi,Chemistry-based protein labeling and imaging in cell and in vivo, 5th International Peptide Symposium, 2010/12/4-9, Kyoto International Conference Center

Itaru Hamachi,Chemistry-Based Methods for Selective Lectin Labeling, ICS2010, 2010/8/1-6, Makuhari Messe International Convention Complex

浜地 格,内在性蛋白質の選択的ラベル化とイメージング,日本化学会第90春季年会,2010/3/26-29,近畿大学

〔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

(2)研究分担者

王子田 彰夫 (OJIDA, Akio)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10343328