

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03119

研究課題名(和文) 多点光ラベル解析による膜タンパク質機能構造のモニタリング

研究課題名(英文) Structural analysis of membrane protein based on multi-labeled sites

研究代表者

友廣 岳則 (TOMOHIRO, Takenori)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70357581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：切断性および発蛍光性を含む光クロスリンカーの更なる多機能化によりラベル部位解析効率を向上し、従来法では限界であった1カ所のラベル解析から複数の微量ラベルの同時解析を達成した。結合ドメインにおける複数ラベル部位のラベル量変化から、基質や補因子等の結合によるタンパク質のアロステリック構造変化を詳細に追跡する新たな手法論を開発した。

研究成果の概要(英文)：Multifunctionalization of photocross-linker including fluorogenicity and cleavability has improved efficiency of labeled site analysis and enabled simultaneous analysis of multiple trace amount labels. We have developed a new methodology to monitor the allosteric structural change of protein due to binding of substrates based on label amount change of each labeled amino acid within the ligand-binding domain.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：化学プローブ 光アフィニティーラベル 結合部位解析 分子認識 標的同定

1. 研究開始当初の背景

精密で多様なシグナル制御においてリガンド結合等によるタンパク質構造の過渡的変化の解明は医療面、学術面から重要な課題である。タンパク質発現や結晶化技術の向上はアドレナリン受容体や GABA 受容体などの膜受容体構造解析に繋がり、核磁気共鳴法やクライオ電子顕微鏡法等の著しい進歩は複雑な生体分子相互作用構造解析に革新的な展開をもたらしている。しかし、現状ではその条件は限られており、その動的な構造変化の解析は困難である。また通常の分光学的手法は蛍光基などを組み込む必要があり、その導入は研究者により特定位置に限定される。

一方、タンパク質に結合する物質を介してタンパク質を標識し解析する光アフィニティーラベル法 (PAL) は、上記法では対応困難なタンパク質や弱い相互作用系等を含め、薬物結合状態を細胞内でも直接解析できる、原理的に極めて有力な方法である。しかしこの解析効率は極めて低く煩雑であり、得られる情報も少なかった。代表者は PAL 解析効率を向上するため光クロスリンカーの多機能化を推進してきた。最近独自に蛍光基クマリンに変化する桂皮酸型ジアジリンを開発し、細胞膜タンパク質ラベルを介した細胞の蛍光セレクション等に应用した。一方、本反応基が有する光切断性と蛍光特性を高感度差別化技術として微量ラベルタンパク質精製に利用し、さらに安定同位体法を取り入れることで煩雑な MS シグナル解析も簡略化した結果、操作を繰り返すことなく一気にラベルペプチドを絞り込むことが可能になり、数ヶ月～数年必要としたラベル解析期間を飛躍的に短縮した。

2. 研究の目的

本研究では、基質等の結合に起因するタンパク質のダイナミックな構造変化をモニターする、新しい構造解析基盤技術を確立することを目的とした。具体的には、独自蛍光ラベル法の更なる高性能化を図ることで、リガンド結合ポケットにおいて1カ所のラベル解析が限界であった従来法を刷新し、複数の極微量ラベル部位の同時解析を可能にする。得られたタンパク質表面複数部位の位置情報とそれらのラベル量情報に基づいてそのタンパク質構造変化を3次元的にモニターする、革新的なラベル構造解析法に展開する。

3. 研究の方法

本研究の中核技術は光照射により構造が蛍光基に変化しつつ、その蛍光基のみを結合タンパク質へ移すユニークな蛍光ラベル法にある。光反応ユニットには2種類の光反応を組み込んであり、ジアジリン基光反応でタンパク質と架橋し、続く光 E-Z 異性化でリガンド分子を切除しつつ蛍光基クマリン環を形成する (図1)。

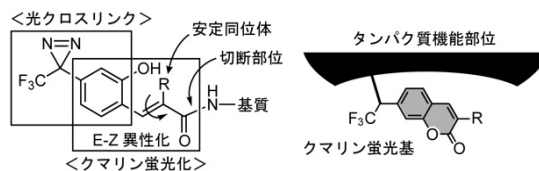


図1. 切断性光アフィニティー蛍光ラベル法の概略

ジアジリン基の光分解により生成するカルベンは瞬時に (サブナノ秒以下) 近傍分子と反応することから過渡的な構造を捕捉することが可能である。複数のラベルアミノ酸を決定できれば、対応する蛍光ピークの面積はラベル量を反映することから、各蛍光ピークの変化量からタンパク質構造変化を追跡することができる (図2)。結晶構造解析等が適応困難な膜タンパク質や複合体、アロステリック酵素におけるトランジットな構造変化のモニタリングを目標とした。以下に示す3項目で光ラベル解析の効率化を評価した。

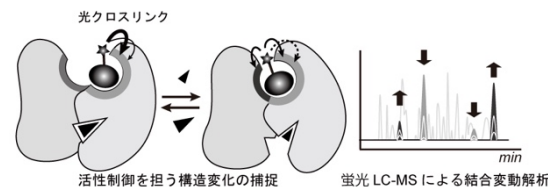


図2. 光蛍光ラベルによるモニタリング

(1) 光反応基の機能化: プロテオミクスでのタンパク質同定は通常 LC-MS 解析により進められる。プロテオームに対応した解析効率化を達成するため、光切断と発蛍光機能の他に濃縮等の機能を付与する。

(2) アロステリック酵素の解析: アロステリック酵素のリガンド依存的な構造変化を複数ラベルポイントで解析する。

(3) 膜タンパク質の解析: 項目1で作製したプローブを用いて細胞等を用いた膜タンパク質構造解析を行い、手法論を評価する。

4. 研究成果

(1) 光反応基の機能化

①濃縮機能の評価

プロトタイプである桂皮酸型クロスリンカーを導入したビオチンプローブを用いて、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞ライセートから相互作用タンパク質同定を行った。このプローブによるアビジンタンパク質ラベルでは、既にその結合ポケット周辺2カ所のラベルアミノ酸同定に成功している。細胞ライセートの光照射産物をアビジン固定担体に捕捉し、光照射により切断溶出されたタンパク質を LC-MS/MS 解析した。ラベルペプチド配列から計4種類のタンパク質がリストアップされ、その内2種はビオチンを補因子とするカルボキシラーゼであった。これらカルボキシラーゼは4量体の巨大タンパク質であり、ピルビン酸カルボキシラーゼの結晶構造が一部欠損体として報告されている。この結晶構造では、ラベルされたアミノ酸はビオチン結合部位からやや離れた場所に位置していた。

ジアジリン光反応は水分子とも反応することから、ジアジリン基に近接したアミノ酸残基のみをクロスリンクする。本データはラベルアミノ酸を含む部分構造がビオチン結合部位に近接していることを示している。この事実はアロステリック構造変化を論じた既存報告を明瞭に支持し、酵素反応時でのトランジット状態を捕捉したことを示すものであった。もう1つのアセチル CoA カルボキシラーゼも対応する部分構造をラベルしたことから、本ラベル解析はライセートレベルで信頼性が高い方法であることが実証された。本解析は1回あたりわずか2 mLの細胞抽出液を用いて行い、基本的な解析は1ヶ月程度で終了した。ビオチン-アビジン系による濃縮および光切断による選択的溶出は極めて有効であることが示された。

②切断機能の改善とタグ変換機能の付与

解析効率向上のため切断効率の改善を図った。光 *E-Z* 異性化反応は平衡反応であり、特に精製担体上でのタンパク質切断は比較的長い照射時間を必要とし、回収率も約40%に止まった。そこでリガンド分子との結合をアミドからスルホンアミドに変更した。このリンカーはペプチド固相合成に用いられており、中性では脱プロトン化して極めて安定だが、一旦 *N*-アルキル化されると容易に加水分解する。さらに、このリンカーはチオ酸とスルホンアジドの生体直交性反応（スルホクリック反応）で形成できるため、プローブ合成も容易になる（図3）。

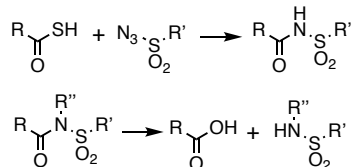


図3. スルホクリック反応によるアシルスルホンアミド形成と *N*-アルキル化による加水分解

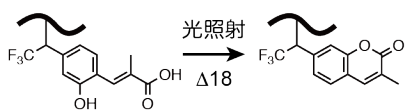


図4. 光クマリン化によるラベルペプチドのタグ変換

側鎖にスルホンアジド基を有するアミノ酸誘導体を合成し、それを阻害剤ペプチドに自動合成機で組み入れた。これに別途合成した桂皮酸型光反応基チオールエステル誘導体を混合して無保護でペプチドプローブを作製し、標的のタンパク質キナーゼの光ラベルで評価した。スルホンアミドリンカーは37°Cで光切断せず、質量分析前処理として還元 *S*-アルキル化に使用されるヨードアセトアミド (IAA) で容易に加水分解した。以上、光クロスリンクと切断反応を明瞭に区別し、しかも還元アルキル化を兼ねることで操作を簡素化することに成功した。一方、*N*-アルキル化による加水分解ではラベルペプチドには桂皮酸誘導体が付与される。光照射により

容易にクマリン環化することから、水1分子の質量差 ($\Delta m=18 \text{ u}$) が生じる (図4)。従って $\Delta 18$ 異なる MS パターンを示す特殊タグとなり、微小 MS/MS シグナル解析で絶えず問題となる偽陽性シグナルとの差別化に極めて有用であることがわかった。

③光電子移動 (PeT) 制御型光反応基の開発
別途、新しいコンセプトに基づく切断性蛍光ラベル剤の開発を進めた。以前に作製したジアジリン化クマリン誘導体ではジアジリン基への PeT によるクマリン蛍光の消光が観測された。そこで光切断性保護基として有機合成に使用される4位置換型クマリン誘導体にジアジリン基を導入した化合物を作製した。照射波長と温度、pH を最適化することで迅速に切断させることに成功し、ジアジリン基でタンパク質をクロスリンクした後に、クマリン光励起状態から切断反応を進行させることに成功した (図5)。タンパク質ラベルを通して解析操作を最適化し、ラベル解析が十分可能であることを示した。この成果については特許申請を行った。

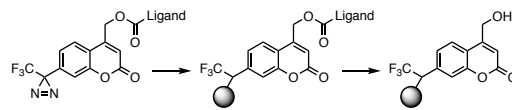


図5. PeT 制御型切断性蛍光クロスリンカー

(2) アロステリック酵素の解析

アロステリック構造変化をするタンパク質として、核酸系因子による高度なアロステリック機能調整を行うグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) を選択し、そのリガンド依存的な構造変化のモニタリングに挑んだ。GDH は6量体で構成され、単量体同士の接合部分に形成されるアロステリック部位に ADP や NADH などの補因子が結合して酵素反応を制御する。複合体結晶構造に基づいて末端リン酸基にスペーサーを介してクロスリンカーを導入した ADP および ATP 光プローブを作製した。これらプローブは GDH をラベルし、ラベルアミノ酸はアデニン認識部位を起点として合理的な位置であり、結果、ATP がアロステリック部位に結合することを初めて証明した。一方、消化ペプチドの HPLC では同時に複数の微量蛍光ピークが確認され、各種阻害剤・基質添加により蛍光ピークの増減が観測された (図6)。

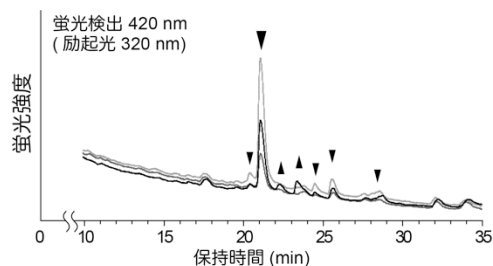


図6. ATP プローブによる GDH の多点ラベルと補因子等の添加によるラベル変動

マイナーラベルの解析を進めるため、同位体を導入した ATP プローブを作製した。これらラベルペプチドは同じ保持時間で溶出され、ラベルされたペプチドは質量差 $\Delta m=4u$ が生じる。他の夾雑物ピーク存在中でのノイズレベルの微小 MS ピーク解析において、ラベルペプチドピークと偽陽性ピークの区別を可能とし、信頼性の高いラベルペプチド同定が可能になった。ATP 添加で面積が減少した複数ピークの内、4カ所のラベルアミノ酸を決定した。主要ラベルアミノ酸はアロステリックポケット入口に位置しているが、新たに判明した3カ所のマイナーラベルアミノ酸残基は、アロステリック部位と酵素活性中心を隔てている構造部分を構成する C 末端ヘリックスと N 末端ヘリックスの接合面に位置していることが判明した。C 末端ヘリックスはタンパク質表面に存在し N 末端ヘリックスの外側に位置している。N 末端ヘリックスは変異解析等で酵素機能への影響が指摘されているヘリックス構造に直接繋がっている。フェニルジアジリン基によるラベルはタンパク質表面で起こることを考慮すると、ATP 結合によりこれらの末端構造のパッキングが緩み、酵素活性中心構造に影響を与える可能性が示唆された。

以上、複数のラベル部位とラベル量に基づいた本構造解析法は、結晶構造解析では難しい動的状態を解析可能であり、汎用電気泳動法や分光学的方法による on/off 解析に比べ解像度が高く情報量の多いタンパク質構造解析法になり得ることを実証した。

(3) 膜タンパク質の解析

操作が煩雑な膜タンパク質を標的としたプロテオームラベル解析を実施した。対象は GABA 受容体と容積感受性クロライドイオンチャンネルとした。前者では桂皮酸 β 位にアミノメチル基を導入し、GABA_B アゴニスト Baclofen 構造に類似した複数の化合物誘導体を作製したがいずれも活性が弱かった。一方、後者ではチャンネル機能を選択的に阻害する DCPIB を採用した。リガンドと光反応基の間にビオチン基を導入して光切断反応により除去される構造とし、また PEG 型リンカーを介することで溶解性を大きく改善した。パッチクランプ法を用いたプローブの細胞容積調整阻害解析では、応答は遅いものの十分な阻害効果が示された。一連の阻害評価よりプローブ濃度およびインキュベーション時間を決定した。培養 KB 細胞にプローブを添加し光を照射して、ホモジナイズ後、膜画分を回収した。しかしながら通常の洗浄条件では膜画分の微量精製は困難であったため、脱脂質や各種界面活性剤による可溶化、および各種アビジン担体などを用いた濃縮洗浄など消化前処理条件を最適化した。結果、2% SDS を含む溶液による 37°C 振とう攪拌で多くの非特異的タンパク質を除去でき、ビオチン化タンパク質はほぼ溶出されないことを

発光検出レベルで確認した。各種ラベル条件でデータを比較解析したところ、容積感受性クロライドイオンチャンネルの構成成分として 2014 年に Science と Cell に同時報告された LRRC8 のファミリータンパク質を含む複数のイオンチャンネル関連タンパク質が候補として同定された。このクロライドイオンチャンネルの分子実体の全容は未だ不明であり、候補の一部は連携研究者により機能解析段階に移行している。極めて解析困難な膜タンパク質、しかも未解明タンパク質の初期評価を展開できたことは大変意義深く、特殊物性に基づく多重差別化は質量分析における微量解析の効率化に十分に機能したと考えられる。しかし、生細胞における極微量タンパク質を対象とする場合、最大数%という低いラベル収率では同位体含有プローブを用いてもデータの再現性は高くなく、特に膨大な夾雑物存在下でラベルペプチドをモニタリングするには本反応基の蛍光強度では不十分であった。本技術を in situ で展開するには MS 解析効率向上と共に蛍光特性の改善が課題である。そこでイメージングに用いられるクマリン誘導体を形成するような光反応基を2種類作製したところ、いずれも蛍光強度が 100 倍程度向上した。予備的だが、その内1つはラベル収率も 10 倍以上向上し、これらの特性は汎用化に有意と考えられる。

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)

- ① 友廣岳則, 葉の標的を同定し結合部位を解析する光技術, *光アライアンス*, **29**, 12-16, 2018. ISSN 0917-026X, 査読無
- ② Tomohiro, T. Tag-Creation Approaches for Highly Efficient Profiling of Interacting Proteins and Domains. *Photoaffinity Labeling for Structural Probing within Protein eds. Y. Hatanaka, M. Hashimoto*, Chapter 4, Springer International Publishing, 13-43, 2017. DOI: 10.1007/978-4-431-56569-7_2, 査読無
- ③ Aswad, M., Chiba, J., Tomohiro, T., Hatanaka, Y. Simple Synthesis of Sulfonyl Amidine-Containing Glucosidase Inhibitors by a Chemoselective Coupling Reaction Between D-Gluconothiolactam and Sulfonyl Azides. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.*, **14**, 1-8, 2017. DOI: 10.9734/IRJPAC/2017/34259, 査読有
- ④ Yasui, S., Morimoto, S., Chiba, J., Hatanaka, Y., Tomohiro, T. Design and preparation of a compact multifunctional diazirine-based photocross-linker, *Photomed.*

- Photobiol.*, **38**, 7-8, 2016. ISSN 0912-232X, 査読無
- ⑤ Tomohiro, T., Nakabayashi, M., Sugita, Y., Morimoto, S.: Kinetic controlled affinity labeling of target enzyme with thioester chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 3336-3341, 2016. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.05.059, 査読有
- ⑥ Aswad, M., Chiba, J., Tomohiro, T., Hatanaka, Y. Evaluation of dipole moment and electrophilicity on the nature of click-type coupling reaction between thioamide and sulfonyl azide. *Tetrahedron Lett.*, **57**, 1313-1316, 2016. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.02.028, 査読有
- ⑦ Masuda, S., Tomohiro, T., Yamaguchi, S., Morimoto, S., Hatanaka, Y.: Structure-assisted ligand-binding analysis using fluorogenic photoaffinity labeling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 1675-1678, 2015. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.03.008, 査読有
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 林龍二, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則, アシルスルホンアミド型光反応基によるラベルタンパク質解析の効率化, 日本薬学会第 138 年会; 2018 Mar 16-28; 金沢.
- ② Tomohiro, T., Yamaguchi, R., Morimoto, S., Chiba, J., Hatanaka, Y. PAL-based fluorogenic tagging for structural analysis of ligand binding state within target protein. 26th French-Japanese Symposium on Medicinal&Fine Chemistry; 2017 Sep 19-20; Strasbourg.
- ③ 林龍二, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. スルホクリック反応を利用した光反応性プローブの簡便合成と標的タンパク質同定の効率化. 日本プロテオーム学会 2017 年大会; 2017 Jul 26-28; 大阪.
- ④ 金子司, 堀田侑佑, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. 標的タンパク質同定を目的とする切断性蛍光ラベル法の開発. 第 39 回日本光医学・光生物学会; 2017 Jul 21-22; 名古屋.
- ⑤ 山口麗央奈, 山口昇太, 増田宗太, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. 発蛍光性光アフィニティーラベル法を用いた ATP 結合構造解析. 日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会; 2017 Jun 7-9; 札幌.
- ⑥ 林龍二, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. クリック反応を利用した光反応性プローブ作成の簡略化と標的蛍光ラベルへの応用. 日本薬学会第 137 年会; 2017 Mar 24-27; 仙台.
- ⑦ 金子司, 堀田侑佑, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. 光切断性クマリン型光クロスリンカーを用いた標的タンパク質同定戦略. 日本薬学会第 137 年会; 2017 Mar 24-27; 仙台.
- ⑧ Yamamoto, K., Aswad, M., Chiba, J., Hatanaka, Y., Tomohiro, T. A novel coupling reaction between thioamides and sulfonyl azides, The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama.
- ⑨ Kaneko, T., Hotta, Y., Morimoto, S., Chiba, J., Hatanaka, Y., Tomohiro, T. PeT-based photochemical fluorophore labelling for target identification, The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama.
- ⑩ Aswad, M., Chiba, J., Hatanaka, Y., Tomohiro, T. Novel click-type coupling reaction of thioamides with sulfonyl azides: scope, mechanism and application, The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama.
- ⑪ 安井翔, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. 発蛍光性光ラベルのための小分子ユニットの開発. 第 38 回日本光医学・光生物学会; 2016 Jul 22-23; 京都.
- ⑫ 金子司, 堀田侑佑, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. PeT を利用した光アフィニティー蛍光ラベル法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会; 2016 Jun 15-17; 京都.
- ⑬ 山本恭子, 千葉順哉, ムハマド・アスワド, 高橋惇, 畑中保丸, 友廣岳則. チオアミドとスルホニルアジドを用いる新規クリック型反応. 日本薬学会第 136 年会; 2016 Mar 26-29; 横浜.
- ⑭ 堀田侑佑, 山本章人, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. 光切断特性を有する光クロスリンカーの開発と標的タンパク質蛍光ラベル化への応用. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会; 2015 Nov 15; 富山.
- ⑮ 堀田侑佑, 山本章人, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則. 光切断特性を有する発蛍光性光クロスリンカーの開発. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム; 2015 Sep 10-12; 熊本.
- ⑯ 友廣岳則, 森本正大, 千葉順哉, 畑中保丸. 多機能光アフィニティーラベル法による高速標的の同定. 日本プロテオーム学会 2015 年会; 2015 Jul 23-24; 熊本.
- ⑰ 森本正大, 嶋 俊弥, 千葉順哉, 畑中保丸, 友廣岳則, 光化学的蛍光性質量差タグ導入による高速標的の同定. 第 81 回北陸質量分析談話会; 2015 Jun 6; 福井.
- ⑱ Aswad, M., Chiba, J., Hatanaka, Y.,

Tomohiro, T. A click-type coupling reaction between thioamides and sulfonyl azides as a versatile approach to generate new pharmacologically active compounds, The 2nd International Current Breakthrough (ICB)-Pharma Symposium 2015; 2015 Oct 31; Solo, Indonesia.

- ⑱ (Invited) Tomohiro, T. Photoaffinity labelling-based target identification of bioactive molecules, The 2nd International Current Breakthrough (ICB)-Pharma Symposium 2015; 2015 Oct 31; Solo, Indonesia.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：光切断性蛍光標識プローブ
発明者：友廣岳則，堀田侑佑
権利者：国立大学法人富山大学
種類：特許権
番号：特願 2015-167367
出願年月日：2015 年 8 月 27 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：蛍光性質量標識プローブ
発明者：友廣岳則，畑中保丸
権利者：国立大学法人富山大学
種類：特許権
番号：特許 6145742
取得年月日：2017 年 5 月 26 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友廣 岳則 (TOMOHIRO, Takenori)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
教授
研究者番号：70357581

(2) 研究分担者

千葉 順哉 (CHIBA, Junya)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
助教
研究者番号：50436789

(3) 連携研究者

清水 貴浩 (SHIMIZU, Takahiro)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
准教授

研究者番号：40353437

松永 茂 (MATSUNAGA, Shigeru)
浜松ホトニクス株式会社・中央研究所・専
任部員
研究者番号：40391198