

令和元年5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05490

研究課題名(和文) ナノメートル単位での触媒的反応空間制御と細胞内のタンパク質構造解析への応用

研究課題名(英文) Catalytic protein labeling on nano meter scale and its application to the analysis of intracellular protein structure

研究代表者

佐藤 伸一 (Shinichi, Sato)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：20633134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：触媒を用いたラジカル反応によるタンパク質ラベル化において、タンパク質ラベル化反応を触媒周辺の数nm～数十nmの範囲内で制御することを目標とした。Peroxidaseを触媒とした手法、光レドックス触媒を用いた方法の2つのアプローチにより、ラジカル反応でタンパク質をラベル化できる低分子のラベル化剤を開発した。また、ラベル化剤のラジカル特性を精査しつつ触媒からのラベル化有効距離を評価することで、ナノメートル単位での触媒的反応空間を制御し、タンパク質の会合状態やリガンドタンパク質間相互作用を解析できる基盤技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質を基盤としたバイオマテリアル、創薬において近年タンパク質部位特異的な化学修飾技術が求められている。また、タンパク質間相互作用は生命現象の理解や創薬開発において、重要な研究対象であり、新たな解析手法の開発が望まれている。

タンパク質1分子の大きさはおよそ5～10 nmであり、ナノメートル単位で反応部位を制御することができるタンパク質ラベル化手法は、“タンパク質の部位特異的ラベル化”や“タンパク質の会合状態を検出する方法”に直結する基盤技術である。そのような研究背景の中で、本研究では、触媒周辺の数nmから数十nmでタンパク質ラベル化を制御できる手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The chemical labeling of proteins with synthetic small compound is a key technique in chemical biology, protein-based therapy, and material science. In this study, the novel methodologies were developed based on oxidative tyrosine labeling, which has been inspired by single-electron transfer reaction in biological systems. The tyrosine residue in close proximity to the redox catalyst was labeled with small compounds. These methods were applied to target- and site-selective protein modification.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質ラベリング 反応空間制御 触媒 近接標識 部位特異的修飾 タンパク質複合体解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質 1 分子の大きさはおよそ 5 ~ 10 nm であり、タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) におけるタンパク質間の距離を考慮すると、触媒から数 nm の距離で完結する反応は“タンパク質の部位特異的ラベル化”に応用できる。また、触媒から数十 nm 以上の反応有効距離を制御することで、“タンパク質の会合状態”を検出する方法になりうる。

化学反応によるタンパク質ラベル化を用いて、タンパク質の会合状態を検出する手法としては、horseradish peroxidase (HRP) 修飾抗体を使って、抗原の近傍 ~ 300 nm 以内の範囲内で起きる化学反応 (EMARS 法、Honke K. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**) や細胞内環境でも機能する peroxidase の周辺 20 nm 以内の距離で完結するラベル化反応 (APEX 法、Ting A. Y. et al. *Science* **2013**) などが挙げられる。

一方、我々は Ru (ルテニウム) 光触媒を一電子酸化触媒として用いたラジカル的な反応に着目し、芳香族アミノ酸残基の一つであるチロシン (Tyr) 残基を標的としたラベル化反応の開発に成功していた (Sato S., Nakamura H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**) 。

2. 研究の目的

触媒を用いたラジカル反応によるタンパク質ラベル化において、タンパク質ラベル化反応を触媒周辺の数 nm ~ 数十 nm の範囲内で制御することを目標とした。Peroxidase を触媒とした手法、光レドックス触媒を用いた方法の 2 つのアプローチにより、ラジカル反応でタンパク質をラベル化できるラベル化剤の創製を目指した。また、ラベル化剤のラジカル特性を精査しつつ触媒からのラベル化有効距離を評価することで、ナノメートル単位での触媒の反応空間を制御し、タンパク質の会合状態やリガンド-タンパク質間相互作用を解析できる基盤技術確立することを目指した。

3. 研究の方法

以下 2 つのアプローチによって、ラジカル反応を用いる新規タンパク質ラベル化法を開発し、ナノメートル単位での触媒的反応空間の制御を可能にする方法へと展開した。

- (1) ヘム、peroxidase を触媒としたタンパク質ラベル化法の開発
- (2) 光レドックス触媒を利用したタンパク質ラベル化法の開発

(1 - 1 : ヘムを触媒としたタンパク質ラベル化法の開発)

まず初めに、生体内に存在する遊離ヘム (hemin) を触媒とした反応開発を行った。ウエスタンプロティング法のシグナル検出や犯罪捜査の血液痕判定にも用いられる化学発光反応であるルミノール発光反応に着目した。環状 diazodicarbonyl 構造 (CO-N=N-CO) を有する 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) がチロシン残基に対するラベル化剤として報告されていること (Barbas C. F. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**) と、ルミノール発光反応でも同様の構造の中間体やラジカル種 (CO-NH-N · -CO) が短寿命の活性種として生じることから、ルミノールの類縁体から heimin を触媒して活性化されるチロシン残基修飾剤が創出できると考えた。

(1 - 2 : peroxidase を触媒としたタンパク質ラベル化法の開発と応用)

1 - 1 で開発した手法が、hemin の酸化活性状態であるオキシフェリルポルフィリン π-カチオンラジカルを介したメカニズムであることに着目し、peroxidase を触媒として用いた効率的、実用的なタンパク質チロシン残基のラベル化法を開発した。また、この手法を抗体の部位選択的機能化法や、peroxidase タグ周辺環境にあるタンパク質のラベル化による免疫染色のシグナル増幅法へと応用した。

(2 - 1 : ルテニウム光触媒-分子定規を使った触媒近接ラベル化剤の開発)

Ru(bpy)₃ 錯体は可視光で励起可能な光レドックス触媒であり、生じる活性種である Ru(III) は peroxidase と同程度の酸化電位 (1.1 V (vs Ag/AgCl)) を有する (図 1)。Tyr 残基が Ru 光触媒と近接する環境・

基質のモデルとして Ru(bpy)₃ 錯体とチロシンを直接連結した分子を使って種々のラベル化剤による反応効率を検討し、触媒の近接環境で選択的に機能するラベル化剤を探索した。

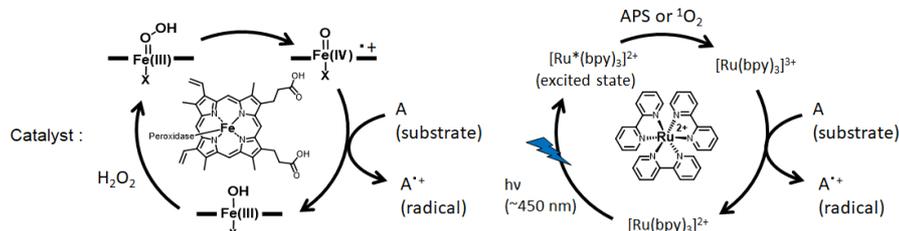


図 1 : peroxidase、Ru 光触媒によるチロシン残基ラベル化機構

(2 - 2 : 触媒近接ラベル化によるタンパク質部位特異的修飾)

2 - 1 で見出したラベル化剤 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) は Ru 光触媒から数 nm の範囲内で選択的にチロシン残基をラベル化することが分かった。そこで、リガンド連結型の Ru 触媒を用いて、標的タンパク質のリガンド結合部位特異的なラベル化を行った。

(2 - 3 : アフィニティービーズ上での触媒近接ラベル化への応用)

アフィニティービーズの固相表面上にタンパク質ラベリングの反応場を構築し、MAUra によるタンパク質ラベル化反応が触媒近接から数 nm の距離で限定されることを利用した以下の応用を行った。抗体 Fc 領域に結合するリガンドを結合させたアフィニティービーズ表面上数 nm の反応場における反応を行い、抗体 (大きさ 10 nm) の部位選択的な機能化を行った。糖鎖を結合させたアフィニティービーズ表面上で、糖鎖に結合するタンパク質を選択的にラベル化することで、従来法では解析できないような親和性の低いレクチンをラベル化した。

4 . 研究成果

(1 - 1) 種々のルミノール類縁体入手・合成し、hemin 存在下、過酸化水素刺激によるチロシン残基のラベル化特性を評価した。リード化合物であるルミノール自体にも僅かながら、チロシン残基と結合を形成する活性が確認されたが、同反応条件においては発光反応が優先するため、そのチロシン残基ラベル化活性は弱いものであった。窒素原子上にメチル基を導入したルミノール誘導体では脱窒素化反応が抑制されるため、発光特性は示さないが、その代わりに効率的にチロシン残基と共有結合を形成することを見出した (ACS Chem. Biol. 2015)。

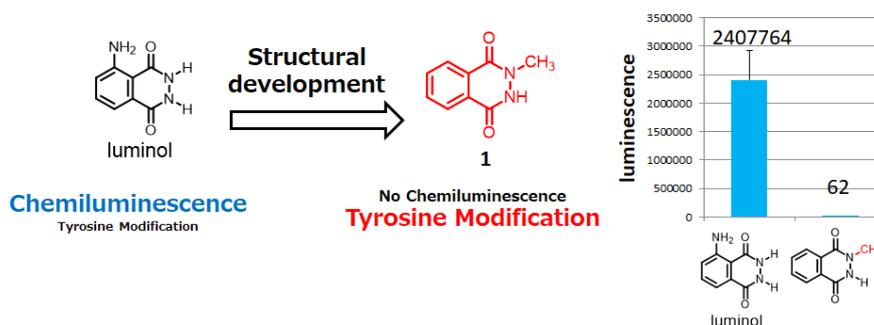


図 2 : ルミノール誘導化によるチロシン残基ラベル化剤創成

(1 - 2) 種々のヘムタンパク質を触媒として検討したところ、horseradish peroxidase (HRP) が効率的に本反応を触媒することを見出した。Hemin を触媒とした方法に比べ、HRP の場合では、触媒量を 1/1000、使用する過酸化水素の量を 1/10 に低減させつつ、高効率なラベル化を達成した。これにより、基質タンパク質の酸化的損傷を抑えつつ、機能化することが可能となった (図 3 、 ChemBioChem 2017)。

また、この方法ではタンパク質表面に露出したチロシン残基が選択的にラベル化されることに着目し、機能性タンパク質の部位特異的チロシン残基修飾へと応用した。抗体の

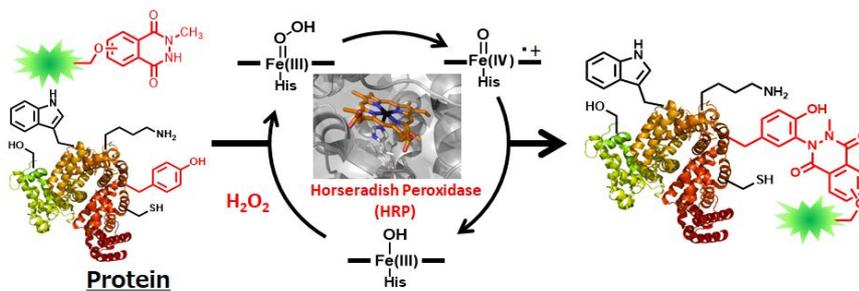


図 3 : HRP を触媒としたチロシン残基特異的ラベル化

チロシン残基をラベル化することで、抗体構造中のタンパク質表面に露出したチロシン残基を選択的に機能化する手法を見出した (図 3)。

また、ルミノール誘導体以外にも、HRP を触媒として、N'-acyl-N-methylphenylenediamine がタンパク質ラベル化剤として機能することを見出した。本手法では HRP により活性化されたラベル化剤のラジカル活性種 HRP 周辺 (~ 数十 nm) に存在するタンパク質をラベル化する。一方で、HRP は生物学分野の研究ツールではレポーター分子として汎用されている。そこで、本研究により見出した HRP 周辺環境におけるタンパク質ラベル化を免疫染色のシグナル増幅技術へと応用した。その結果、N'-acyl-N-methylphenylenediamine が優れたシグナル増幅効果を示すことを明らかにした (Bioorg. Med. Chem. 2019)。

(2 - 1) Tyr 残基が Ru 光触媒と近接する環境・基質のモデルとして図 4 に示す 2a のような Ru(bpy)₃ 錯体とチロシンを直接連結した分子を使って種々のラベル化剤による反応効率を検討した。種々のレドックス活性を示す化合物群を評価したところ、1-methyl-4-arylurazole (MAUra) 誘導体 3 (図 4A) によって効率的に 2a がラベル化された。3 は 2a と効率的に反応し、4, 5 に示す結合様式でチロシン残基を修飾した (図 4B)。また、2a の Ru(bpy)₃ 錯体と Tyr の間に剛直な polyPro リンカーを挟んだ 2b-f では修飾反応効率が

低下することが分かった (図 4C)。すなわち、ラベル化剤 3 は触媒からごく近接した環境で選択的に機能する修飾剤として機能することが分かった。

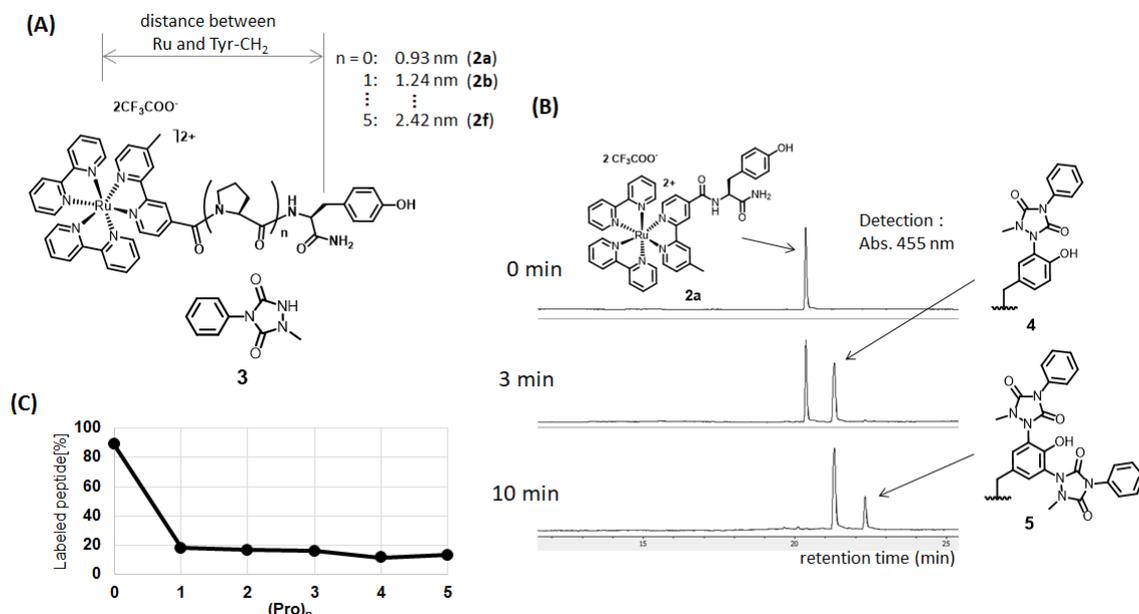


図 4 : Ru 光触媒の近接環境で機能するラベル化剤

(2-2) ラベル化剤 3 は Ru 光触媒の近接環境選択的にタンパク質のチロシン残基をラベル化する。そこで、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase, CA) を標的に、そのリガンドであるベンゼンスルホンアミドを連結した Ru 錯体 6 を用いて、細胞破碎液中に添加した CA を選択的にラベル化した。ラベル化剤としては、検出タグ兼精製タグとして機能するである desthiobiotin とラベル化剤 3 を連結した 7 を合成し、用いた。6 はタンパク質混在系の中でも標的タンパク質である CA に選択的に結合し、そのタンパク質表面において局所的なラジカル反応によるラベル化を触媒することが分かった。また、ラベル化されたタンパク質を精製し、結合部位を質量分析で同定したところ、6 の結合サイトに最も近接したチロシン残基が選択的にラベル化されることを明らかにした (*Chem. Commun.* 2018)。

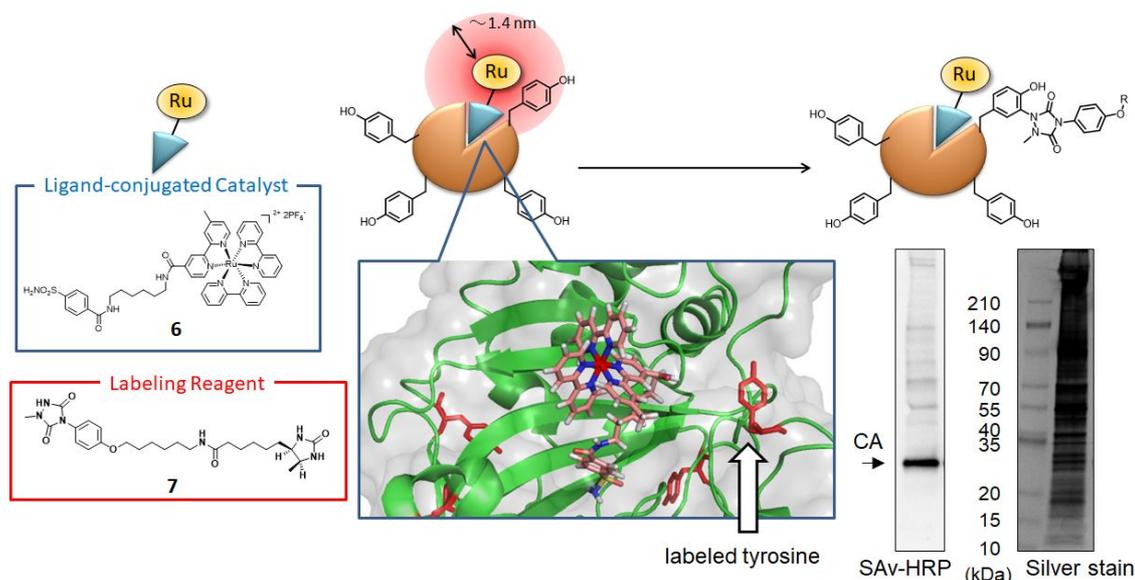


図 5 : 標的タンパク質表面上での局所的ラジカル反応によるラベル化

(2-3) 2-2 では、Ru 光触媒とリガンドを直接共役させた分子を用いて触媒の近接環境によるラベル化を行ったが、別のアプローチとして、アフィニティー精製用磁気ビーズに Ru 光触媒とリガンドを同時に担持させて、ビーズ上に触媒とリガンド結合分子が強制的に近接する反応場を構築した (*Chem. Commun.* 2017)。触媒近接環境で選択的に起きる反応を使うことで、ビーズに結合するタンパク質選択的、リガンド結合部位選択的にラベル化を制御できる。この概念を以下のように応用した。

抗体 Fc 領域に結合するリガンドと Ru 光触媒を結合させたアフィニティービーズを作成した。この表面で、触媒近接環境選択的なラベル化を行うことで、大きさ 10 nm の抗体に対して、ピ

ーズ表面上数 nm の反応空間を利用し、抗体の Fc 領域を選択的に機能化した。

糖鎖と Ru 光触媒を結合させたアフィニティービーズを作成した。一般的に糖鎖を認識するレクチンの結合親和性は弱く、従来法のアフィニティー精製では検出が困難である。ビーズ上でラベル化を行うことで、低親和性のレクチンを選択的にラベル化することに成功した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

Shinichi Sato, Kosuke Nakamura, Hiroyuki Nakamura, Tyrosine-Specific Chemical Modification with in situ Hemin-Activated Luminol Derivatives, ACS Chem. Biol, 2015, 10, 2633-2640 (査読有) .

Shinichi Sato, Kosuke Nakamura, Hiroyuki Nakamura, HorseRadish-Peroxidase-Catalyzed Tyrosine Click Reaction, ChemBioChem, 2017, 18, 475-478 (査読有) .

Michihiko Tsushima, Shinichi Sato, Hiroyuki Nakamura, Selective Purification and Chemical Labeling of Target Protein on Ruthenium Photocatalyst-Immobilized Affinity Beads, Chem. Commun, 2017, 53, 4838-4841 (査読有) .

Shinichi Sato, Satomu Ishii, Hiroyuki Nakamura, Development of Albumin close Dodecaborate Conjugates as Boron Carriers for Neutron Capture Therapy by Ru(bpy)₃ Photocatalyzed Modification of Tyrosine, Eur. J. Inorg. 2017, 38-39, 4406-4410 (査読有)

Shinichi Sato, Michihiko Tsushima, Kensuke Hatano, Hiroyuki Nakamura, Development and Application of Catalytic Tyrosine Modification, Yakugaku Zasshi, 2018, 138, 39-46 (査読有) .

Shinichi Sato, Kensuke Hatano, Michihiko Tsushima, Hiroyuki Nakamura, 1-Methyl-4-aryl-urazole (MAUra) Labels Tyrosine in Proximity to Ruthenium Photocatalyst, Chem. Commun. 2018, 53, 5871-5874 (査読有) .

Shinichi Sato, Michihiko Tsushima, Hiroyuki Nakamura, Target-Protein-Selective Inactivation and Labelling Using Oxidative Catalyst, Org. Biomol. Chem. 2018, 16, 6168-6179 (査読有) .

Shinichi Sato, Masaki Yoshida, Kensuke Hatano, Masaki Matsumura, Hiroyuki Nakamura, *N'*-acyl-*N*-methylphenylenediamine as a novel proximity labeling agent for signal amplification in immunohistochemistry, Bioorg. Med. Chem. 2019, 27, 1110-1118 (査読有) .
その他 10 件

〔学会発表〕(計 76 件)

S. Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, Heme-Catalyzed Click Reaction with Luminol Derivatives, 1st Asian Conference on Chemosensor & Imaging Probes (Seoul, Korea) 2015 年 11 月 16 日 ~ 2015 年 11 月 18 日

佐藤伸一、タンパク質チロシン残基の触媒的化学修飾法の開発、理研シンポジウム第 11 回有機合成化学のフロンティア (理化学研究所、埼玉) 2016 年 6 月 24 日

佐藤伸一、中村公亮、中村浩之、生体内へムの鉄酸化状態変化を利用したタンパク質ラベリング、第 89 回日本生化学会大会 (宮城) 2016 年 9 月 25 日 ~ 27 日

佐藤伸一、タンパク質の触媒的化学修飾法の開発と応用、徳島大学薬学部第 3 回 BRIGHT symposium (徳島大学、徳島) 2017 年 3 月 7 日

佐藤伸一、對馬理彦、中村公亮、中村浩之、触媒的チロシン残基修飾法の応用、日本薬学会第 137 年会 (東北大学、宮城) 2017 年 3 月 24 日 ~ 2017 年 3 月 27 日

佐藤伸一、タンパク質チロシン残基の触媒的ラベル化法の開発、有機合成化学協会平成 29 年度若手研究者のためのセミナー (東京) 2017 年 7 月 8 日

S. Sato, M. Tsushima, K. Hatano H. Nakamura, Proximity-Dependent Tyrosine Chemical Labeling, International Congress on Pure and Applied Chemistry (ICPAC) (シエムリアップ、カンボジア) 2018 年 3 月 7 日 ~ 2018 年 3 月 10 日

S. Sato, Development and Application of Catalytic Protein Labeling Based on Radical Reactions, 日本化学会第 98 春季年会 (日本大学、千葉) 2018 年 3 月 20 日 ~ 2018 年 3 月 23 日

S. Sato, H. Nakamura, DEVELOPMENT AND APPLICATION OF TYROSINE CLICK REACTION, The 7th International Chemical Biology Society (ICBS) Annual Conference (バンクーバー、カナダ) 2018 年 10 月 24 日 ~ 2018 年 10 月 27 日

他 67 件

〔図書〕(計 3 件)

佐藤伸一、中村浩之、タンパク質の部位特異的な機能修飾 N 末端修飾法の開発、月刊「化学」最新のトピックス欄、化学同人、2015、Vol170、2 ページ
他 2 件

〔産業財産権〕

出願状況（計 6 件）

名称：蛍光標識抗体又は抗体断片
発明者：佐藤伸一、中村浩之、上田宏
権利者：佐藤伸一、中村浩之、上田宏
種類：特許
番号：特願 2018-142089
出願年：2018 年 7 月 30 日
国内外の別： 国内

名称：電気化学的手法による修飾タンパク質の製造方法
発明者：佐藤伸一、中村浩之
権利者：佐藤伸一、中村浩之
種類：特許
番号：特願 2018-124834
出願年：2018 年 6 月 29 日出願
国内外の別： 国内

名称：METHOD FOR MEASURING TYROSINE PHOSPHATASE AND TYROSINE KINASE
ACTIVITY
発明者：佐藤伸一、中村浩之、中野洋文
権利者：佐藤伸一、中村浩之、中野洋文
種類：特許
番号：PCT/JP2016/078224
出願年月日：平成 28 年 9 月 26 日
国内外の別： 国外

その他 3 件

取得状況（計 0 件）

6．研究組織

(1)研究分担者

なし