

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750188
 研究課題名（和文）細胞内在性タンパク質活性の時空間的光制御を目指した新規化学修飾法の開発
 研究課題名（英文）Development of Chemical Protein Labeling method for Spatiotemporal Modulation of Endogenous Protein Activity in Cells
 研究代表者
 高岡 洋輔（TAKAOKA YOUSUKE）
 京都大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：80599762

研究成果の概要（和文）：いくつかのタンパク質化学修飾法を試行して、タンパク質の活性を光で可逆的に制御する方法論を確立した。モデル酵素として炭酸脱水酵素（CAI）を選択し、CAI リガンドと、CAI 表面に疎水性相互作用で結合する 19F 分子とを、ケージド基で構成するアシルイミダゾール結合で連結したラベル化剤を用いることで、酵素活性の 100% オフオンスイッチングを達成した。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel method for one-step construction of caged enzymes using carbonic anhydrase I (CAI) as a model enzyme. This method is simple and based on the transient tethering of an inhibitor with moderate activity that is directed to the active site on an enzyme surface. We successfully showed that the activity of the caged CAI was almost completely suppressed by Ligand-directed acyl imidazole (LDAI) based labeling and fully recovered by photoirradiation in the crude conditions as well as in test tube settings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：タンパク質・ケミカルバイオロジー・化学修飾・酵素

1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質を標的に融合し細胞で発現させることで、タンパク質の動態を詳細に解析できるようになったことは疑う余地もない。しかし内在性のタンパク質が同じ挙動を示すかについては現在も議論の対象であり、「内在性タンパク質」の機能を直接解析する技術が求められている。タンパク質を機能解析する上で、その遺伝子を選択的にノックアウトする技術は非常に有効である。一方で多くの病態原因遺伝子は発生や分化においても重要であり、事実 15% の遺伝子は胚形成において致死に至るといわれ、この方法で

網羅できない。このような背景のもと、タンパク質活性を任意のタイミングで制御する技術が注目を集めている。不安定なドメインや蛍光タンパク質を標的に融合し、化合物刺激や光刺激で標的の分解を時空間制御するものである (L. A. Banaszynski, *et al*, *Cell*, **2006**, *126*, 995、T. Tanabe, *et al*, *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 503 など)。ただしこれらは内在性タンパク質を機能制御できない点で、遺伝子ノックアウト技術に代わるものではない。内在性タンパク質の機能を光制御する方法として、色素を化学修飾した抗体を用いる CALI 法がある (D. G. Jay, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 5454)。これは細胞表層タンパク質には有効であるものの、抗体の性質上、細胞内での適用は難しい。CALI 法に用いる色素を細胞内タンパク質に化学修飾できれば、内在性タンパク質の機能を任意のタイミングで光制御できると考えられた。

我々はこれまでに、細胞内在性タンパク質を化学修飾する方法として、「リガンド指向型トシル化学」を開発してきた(S. Tsukiji *et al*, Nat. Chem. Biol., 2009, 5, 341)。この方法はリガンド認識を利用したタンパク質特異性に加え、求核置換反応を用いるため認識に利用したリガンドが切り離され、活性を保持したまま機能性分子をラベルできる。この方法は申請当初、細胞内在性タンパク質を、活性を保持したまま化学修飾した唯一の例であった。また、分光学的なプローブの導入だけでなく、様々な機能性分子を導入することも利点の一つである。さらにその修飾位置はタンパク質の活性中心近傍であるため、タンパク質の活性制御を効率よく行うことが期待される。そこで申請者は、このリガンド指向型ラベル化法と CALI 法を組み合わせることで、「内在性タンパク質を光活性制御」できるのではないかと考え、本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

細胞内の内在性タンパク質を化学修飾によって機能化し、その機能を選択的にノックダウンする方法を開発する事を目的とした。そのために、迅速かつ特異的なタンパク質ラベル化法を開発し、効率的に標的タンパク質のみを不活性化する技術を構築する事を目指した。

3. 研究の方法

まずは、標的タンパク質の迅速かつ特異的な方法を開発する事にし、近年開発されたリガンド指向型化学を駆使して、モデルタンパク質の部位特異的なラベル化法として確立した。リガンド指向型トシル化学を用いて構築された ^{19}F バイオセンサーの X 線結晶構造解析を行ない、小分子プローブのタンパク質機能への影響を詳細に解析する事とした。また、これを用いてタンパク質のリガンド結合/解離の速度論的解析を ^{19}F -NMR で行い、試験管、細胞系ともに可能な限り定量的な評価を実施した。この研究は、細胞内の本来のタンパク質の活性を調べる上で強力なツールとなる事が示されると考えられる。

近年所属研究室で新たに開発された、リガンド指向型アシルイミダゾール化学では、ラベル化においてセリンやリジン等のアミノ酸に炭酸エステル結合で連結される。この特徴的な結合を上手く利用して、ケージド基で

構成する反応基で連結したラベル化剤を用いる事で、タンパク質に阻害剤を共有結合することで活性を失わせることを試みた。さらにその後、光照射によって阻害剤を解離させて活性を基に戻す方法論を開発することとした。本系も前述の通り、夾雑系においてもタンパク質選択的な反応であるため、細胞系での内在性タンパク質の活性制御が可能となる事が期待される。

4. 研究成果

(1) リガンド指向型トシル化学で構築した ^{19}F バイオセンサーの詳細な機能/構造解析 (Y. Takaoka *et al*, Chem. Commun., 2013)

タンパク質は本来、細胞内という特別な環境で機能発現しており、希薄水溶液中と性能が大きく異なる事が報告されつつある。このような“真のタンパク質”の姿を正確に捉えるためには、その動的挙動を細胞内でそのまま解析する事が望ましい。我々は今回、タンパク質の選択的な化学修飾法を駆使して、細胞内在性タンパク質の動的挙動を ^{19}F -NMR によって解析する事に成功した。

具体的には、我々が以前に開発した「リガンド指向型トシル (LDT) 化学」を用い、赤血球内在性の炭酸脱水酵素 (hCAI) を ^{19}F ラベルする事で、阻害剤バイオセンサーを構築した。本バイオセンサーは阻害剤認識を ^{19}F -NMR のケミカルシフト変化で読み出す事ができ、そのセンシング機構は X 線結晶構造解析によって明らかとした (Figure 1)。

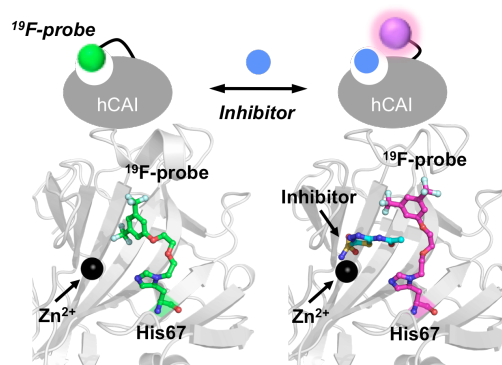


Figure 1. Crystal structures of ^{19}F -labeled hCAI without (left) or with (right) inhibitor.

さらに ^{19}F -EXSY 測定によって、タンパク質-阻害剤間の結合/解離の交換速度を試験管と赤血球中で比較した結果、驚くべき事に細胞内では交換速度が 1.6 倍促進されていた。種々の解析の結果、この速度の増大は分子クラウディングや細胞骨格の影響である事が

示唆された。さらに、この交換速度の温度依存性を評価し、細胞内タンパク質のリガンド結合／解離に伴う活性化エネルギーを算出する事にも成功した (Figure 2)。細胞内でのタンパク質揺らぎに対する熱力学的な考察は他に例が無く、今後タンパク質工学や薬剤開発など多くの研究に有用な知見を与えるものと期待される。

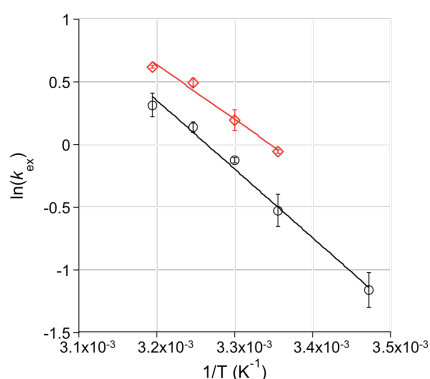


Figure 2. Arrhenius plots of $\ln(k_{ex})$ vs $1/T$ for the ¹⁹F-labeled hCAI with or without inhibitor cross peak in vitro (black circle) and in RBCs (red diamond).

(2) リガンド指向型アシルイミダゾール化学を用いた酵素活性の Turn-on 制御法の開発 (K. Matsuo et al, Chem. Sci., 2013)

モデルタンパク質として炭酸脱水酵素 (CAI) を選択し、その阻害剤をリガンドに、CAI 表面に疎水性相互作用で結合する ¹⁹F 分子をバインダーとして、リガンド指向型アシルイミダゾール化学によって活性中心近傍のただ 1 つのアミノ酸だけを化学修飾する事に成功した。さらに、反応基をケージド基で構成させる事によって、リガンドを共有結合で連結させ、ほぼ完全に活性を失わせ、光照射によって完全にリガンドを切り離す事で活性をもとに戻す事にも成功した (Figure 3)。このラベル化法は夾雑系にも適用され、赤血球ライセートに内在的に存在する CAI の酵素活性も、100% オフオンで制御出来る事を示した (Figure 4)。

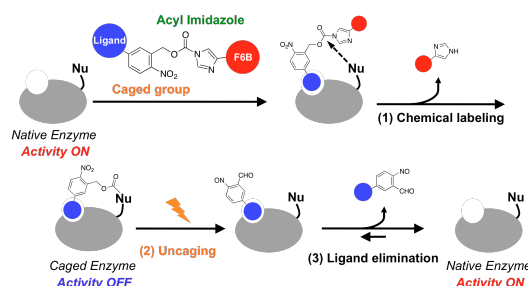


Figure 3. One-step construction of caged enzyme by LDAI chemistry.

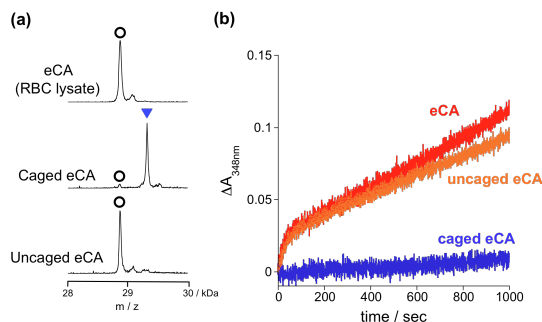


Figure 4. (a) MALDI-TOF mass analyses of eCA (from red blood cells) labeling by LDAI reagent and uncaging in RBC lysate. (b) Enzyme activities of eCA, caged eCA and uncaged eCA

このような内在性タンパク質の光活性制御に成功した例は他に無く、世界に先駆けた成果となった。またこの成果は、化学修飾というケミカルバイオロジー研究が、バイオロジーに有用なツールを与えることを明確に示す点で、意義深い研究成果であると考えられる。

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) 高岡 洋輔、浜地 格、「動的な自己集合性ナノ粒子によるタンパク質活性のシグナル OFF/ON イメージング」 高分子、62 巻、315-317 (2013)。 (査読無)

(2) K. Matsuo, Y. Kioi, R. Yasui, Y. Takaoka, T. Miki, S. Fujishima, I. Hamachi, “One-step construction of caged carbonic anhydrase I using ligand-directed acyl imidazole-based protein labeling method” *Chem. Sci.* **4**, 2573-2580 (2013)。 (査読有)

(3) Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, “Protein Organic Chemistry and Applications for Labeling and Engineering in Live-Cell Systems” *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 4088-4106 (2013)。 (査読有)

(4) Y. Takaoka, Y. Kioi, A. Morito, J. Otani, K. Arita, E. Ashihara, M. Ariyoshi, H. Tochio, M. Shirakawa, I. Hamachi, “Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and in vitro by in-cell ¹⁹F-NMR” *Chem. Commun.*, **49**, 2801-2803 (2013)。 (査読有)

(5) K. Mizusawa, Y. Takaoka, I. Hamachi, "Specific Cell Surface Protein Imaging by Extended Self-Assembling Fluorescent Turn-on Nanoprobes" *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13386-13395 (2012). (査読有)

(6) Y. Takaoka, K. Kiminami, K. Mizusawa, K. Matsuo, M. Narazaki, T. Matsuda, I. Hamachi, "Systematic Study of Protein Detection Mechanism of Self-Assembling 19F NMR/MRI nanoprobes toward Rational Design and Improved Sensitivity" *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11725-11731 (2011). (査読有)

(7) Y. Sun, Y. Takaoka, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, I. Hamachi, Construction of 19F-labeled lectin using ligand-tethered DMAP chemistry for a 19F-NMR based saccharide biosensor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 4393-4396 (2011). (査読有)

[学会発表] (計41件)

(1) 高岡 洋輔、「天然タンパク質表面の部位特異的なケミカルラベリング法の開発」新学術領域研究 天然物ケミカルバイオロジー、第4回公開シンポジウム、2013年5月29日(つくば国際会議場)

(2) 水澤 圭吾、高岡 洋輔、浜地 格、「革新的ケミカルプローブによるバイオセンシング(2):自己集合性ナノプローブによる細胞内タンパク質イメージング」日本化学会第93春季年会、2013年3月22日(立命館大学びわこ・くさつキャンパス)

(3) Yousuke Takaoka, Itaru Hamachi, "Quantitative Comparison of Protein Dynamics in Live Cells and in vitro by In-Cell 19F-NMR" International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012年11月28日(Kyoto Research Park, Japan).

(4) 高岡 洋輔、鬼迫 芳行、森戸 昭等、大谷 淳二、有田 恭平、芦原 英司、有吉真理子、朽尾 豪人、白川 昌宏、浜地 格 「細胞内在性タンパク質の効率的化学修飾法と機能化」、新学術領域 天然物ケミカルバイオロジー 第2回若手研究者ワークショップ、2012年10月30日(大阪大学中之島センター)

(5) 高岡 洋輔、鬼迫 芳行、森戸 昭等、大谷 淳二、有田 恭平、芦原 英司、有吉真理子、朽尾 豪人、白川 昌宏、浜地 格

「細胞内在性タンパク質の19Fラベリングとダイナミクス解析」第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月6日(北海道大学)

(6) 高岡 洋輔、鬼迫 芳行、森戸 昭等、朽尾 豪人、白川 昌宏、浜地 格 LDT化学による蛋白質工学(2):19F-ラベルによる細胞内蛋白質ダイナミクスの定量解析、日本化学会第92春季年会、2012年3月28日(慶応義塾大学) 優秀講演賞(学術)

(7) 高岡 洋輔、木南 啓司、水澤 圭吾、松尾 和哉、檜崎 美智子、松田 哲也、浜地 格 Turn-On型蛋白質検出19F MRIプローブの検出メカニズム解明と高感度化、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月13日(つくば国際会議場)

[図書] (計1件)

(1) 高岡 洋輔、浜地 格、「生体分子および生体反応のイメージング」最先端材料システム One Point 10 イメージング、共立出版、第2章、21-53 (2012)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[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

高岡 洋輔 (TAKAOKA YOUSUKE)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 80599762