

97. 共有結合形成を基にした蛋白質間相互作用制御

高岡 洋輔

東北大学 大学院理学研究科 化学専攻 有機化学第一研究室

Key words : 蛋白質, ケミカルバイオロジー, 天然物, 蛋白質間相互作用

緒言

細胞の中には無数の蛋白質がひしめき合い、それらが複雑に相互作用しあって細胞外のシグナルを内側へと正確に伝えていく。すなわち、蛋白質間相互作用は、細胞内シグナル伝達の根幹をなすものであり、これを制御／解析する技術は生命現象を理解する上で必要不可欠である。細胞の中の1種類の蛋白質を化学的に見分けるのは極めて困難であるが、特異的に化学修飾する方法論として、アフィニティーラベル化が挙げられる。これは、蛋白質に認識される小分子リガンドに反応基を導入した「アフィニティーラベル化剤」と呼ばれる試薬を用いる戦略で、細胞の中でラベル化剤が蛋白質に特異的に認識されることで、反応基が蛋白質と近接することによって効率的なラベル化が達成される¹⁾。ただし、従来のラベル化剤の分子設計では、効率的なラベル化には分子構造や反応基の細かい最適化が必須であった。本研究ではこのアフィニティーラベル化の新規分子設計指針として、反応基組込型ラベル化剤を開発した²⁾。本ラベル化剤は、反応基をリガンド結合ポケット内部に向けることで、顕著な近接効果と迅速な反応性を併せ持ち、細胞に内在的に発現するごく微量の蛋白質を、特異的かつ効率的にラベルできることが明らかとなった。詳細を下記に示す。

方法

前述の通り、アフィニティーラベル化法は強力な蛋白質ラベル化戦略であるものの、標的蛋白質によっては試行錯誤が必要であり、ユニバーサルに活用できない点が問題と考えられた。具体的には従来の設計指針では、詳細な構造活性相関から、リガンドと蛋白質の相互作用には関与しない部分に反応基を導入するのが通例(図1a)であり、必然的に反応基は蛋白質の表面もしくはバルクに露呈されることになる。そのため、蛋白質によっては反応基周辺に反応性アミノ酸が存在しない場合があり、これが効率を低下させる要因になりうる。特に標的未知の蛋白質に対してこれらの問題は致命的であり、より一般性に富んだ方法論が必要と考えられた。

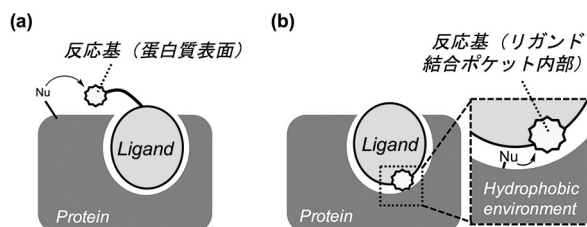


図1. アフィニティーラベル化法の比較

(a) 従来のアフィニティーラベル化剤の設計指針と、(b) 反応基組込型アフィニティーラベル化剤。

一方で、反応場を蛋白質表面からリガンド認識ポケット内部に変更できれば、この環境は疎水性環境であることが多いため、有機反応効率が高まるだけでなく、反応基と蛋白質間の距離は極めて近く顕著な近接効果が期待できる(図

1b)。そこで本研究では、モデル蛋白質と天然物アナログリガンドを用いて、積極的にリガンド認識ポケット内部をラベル化する、反応基組込型ラベル化剤を設計／合成した（図2）。具体的には、免疫抑制剤 FK506（化合物 1）の標的蛋白質の一つである FKBP12 をターゲットとして、これに結合する FK506 アナログ（SLF、化合物 2）を用いて検証を行った。FK506 と FKBP12 との共結晶構造を基に、反応基としてコンパクトかつ汎用性の高いとされるエポキシドを選択し、これを疎水性サブポケット（化合物 3）、FKBP12 の酵素活性中心（化合物 4）、蛋白質表面に向けたラベル化剤（化合物 5）の 3 種を合成した。特に酵素活性中心については、FKBP12 の酵素活性（プロリンイソメラーゼ活性）の中心となる、SLF のプロリン類縁体部分に直接エポキシドを導入することで、反応基をリガンド結合ポケット内部に向けることができると考えた。

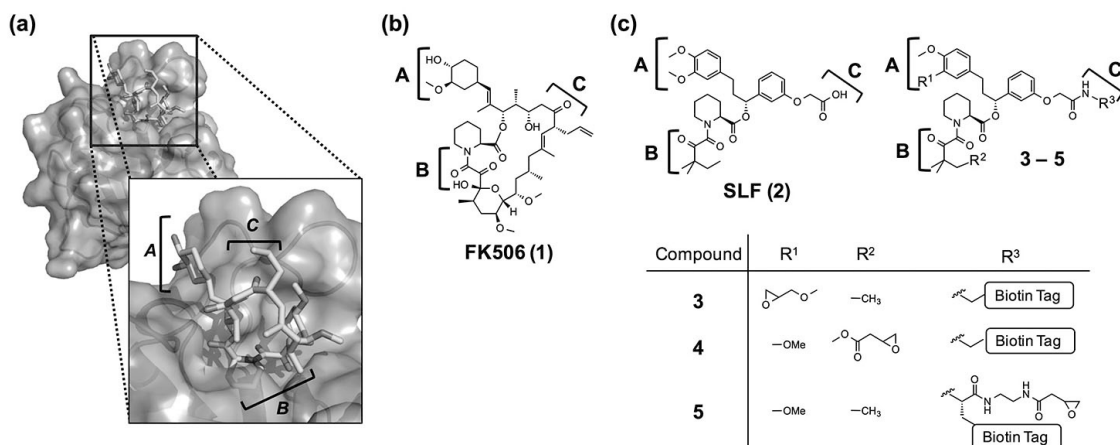


図2. FKBP12 を標的としたアフィニティーラベル化剤の分子設計

(a) FKBP12 と FK506 との共結晶構造の詳細。(b) FK506 の化学構造式。

(c) 今回開発した各種ラベル化剤の化学構造式。

結果および考察

合成した各種ラベル化剤を用いて、試験管内にて精製 FKBP12 に対するラベル化実験を検討した。なお、ラベル化剤にはあらかじめビオチンを導入し、ウェスタンブロットティングによってラベル化反応の検出を行った。またラベル化効率を比較する対象として、FKBP12 を細胞内外で効率的に化学修飾できることがすでに報告されている「リガンド指向型ラベル化試薬 (Ligand-directed tosyl 化学型ラベル化剤、図中 LDT)」を用いた^{3,4)}。この LDT 型ラベル化剤は、反応基にベンゼンスルフォネートを有し、反応場は蛋白質リガンド結合ポケット内部ではなく、その周辺のアミノ酸であることが報告されている。実験の結果、LDT 型も今回用意した 3 種のエポキシド型ラベル化剤も、いずれも FKBP12 を中程度の収率でラベル化できることが確認された（図 3a）。同時に、FK506 を添加するとこれらのラベル化はすべて阻害された。すなわち新たに設計した、反応基を活性ポケット内部に向けた「反応基組込型ラベル化剤（化合物 4）」も、親和性を落とすことなく FKBP12 に認識されてラベルできることが示された。ただし、試験管レベルでは蛋白質表面に反応基を向けた従来型ラベル化剤（化合物 5）と大差なく、当初の予想に反して反応基の位置による効率の変化はほとんど認められなかった（図 3b にはそれぞれの反応の経時変化を記載した）。

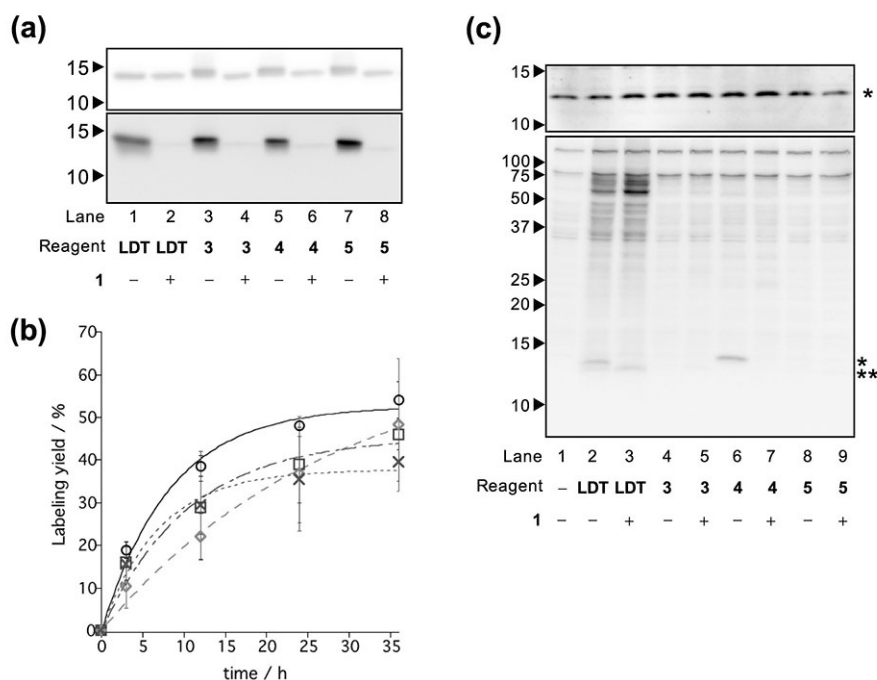


図3. FKBP12を標的としたアフィニティーラベル化の実験結果

(a, b) 試験管中における精製 FKBP12 のラベル化実験のウエスタンブロットング図 (a; 上: anti-FKBP12、下: Biotin blotting) と、反応の経時変化 (b)。(c) HeLa 細胞中における内在性 FKBP12 のラベル化実験のウエスタンブロットング図 (上: anti-FKBP12、下: Biotin blotting)。

そこで次に、FKBP12を内在的に発現する HeLa 細胞にて、同様のラベル化を検討した。まず従来の LDT 型ラベル化剤は、報告通り FKBP12 を選択的にラベルできることが示された。一方で、今回設計したラベル化剤 3 種のうち、驚くべきことに化合物 4 のみが FKBP12 を選択的にラベル化でき、その他 2 種は全くラベル化バンドが確認されなかった (図 3c)。化合物 4 (反応基組込型ラベル化剤) の FKBP12 への選択性は、LDT 型と同等かそれ以上であり、FK506 添加によって完全にラベル化が阻害されることから、生細胞系においても、リガンド認識駆動での特異的なラベル化が達成された。さらに興味深いことに、化合物 4 の細胞内でのラベル化はおよそ 30 分程度で完了した。このラベル化速度は LDT 型のおよそ 4 倍以上であり、当初期待していた「標的蛋白質の特異的かつ効率的なラベル化」が実現した。ただし試験管の実験とは大きくラベル化効率の結果が異なっていることに興味を持たれた。試験管と細胞内とで異なる条件の一つとして、細胞内は多くの蛋白質がひしめき合う分子クラウディング環境であることが挙げられる⁵⁾。そこで、分子クラウディング環境を模倣した試験管実験 (高濃度の非反応性ポリマーや、高濃度のアルブミン蛋白質存在下) を行ってみたところ、化合物 4 は希薄条件では 3 や 5 とラベル化効率が変わらないものの、クラウディング環境では圧倒的に 4 の方がラベル化効率が高いことが判明した。

過去の in-cell NMR による細胞内蛋白質の構造解析に関する報告によると、リガンド結合部位は試験管内と同様構造が規定されているものの、蛋白質表面は細胞内では適度に揺らいでおり、この要因の一つに分子クラウディング環境が挙げられている^{6,7)}。これらの事実と今回の結果を照らし合わせると、蛋白質表面に反応基を向けた従来のラベル化剤は、細胞内では反応場 (蛋白質表面) が揺らいでいるために近接効果が得られにくくラベル化効率が低くなる一方、細胞内でも揺らぎの少ない蛋白質内部に反応基を向けた反応基組込型ラベル化剤は、近接効果がうまく働き効率の良いラベル化が達成できたのではないかと考えられる。FKBP12 は、FK506 (1) などの天然物を介して蛋白質間相互作用を引き起こすことが知られており、今回用いた反応基組込型ラベル化剤 4 は FK506 アナログを基にした設計であるため、FKBP12 を介した蛋白質間相互作用の制御にもつながるものと期待される。また、アフィニティーラベル化剤の設計指針の一つとして、反応基を活性中心内部に向ける本戦略は、標的未知の蛋白質に対する高効率なラベル化法につながることを期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院理学研究科の上田実、および糠塚祐希である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Takaoka Y, Ojida A, Hamachi I. Protein organic chemistry and applications for labeling and engineering in live-cell systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013;52(15):4088-106. PMID: 23426903.
- 2) Takaoka Y, Nukadzuka Y, Ueda M. Reactive group-embedded affinity labeling reagent for efficient intracellular protein labeling. *Bioorg. Med. Chem.* In press. PMID: 28283334.
- 3) Tsukiji S, Miyagawa M, Takaoka Y, Tamura T, Hamachi I. Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo. *Nat. Chem. Biol.* 2009;5(5):341-3. PMID: 19330012.
- 4) Tamura T, Tsukiji S, Hamachi I. 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.* 2012;134(4):2216-2226. PMID: 22220821.
- 5) Zhou H-X, Rivas G, Minton AP. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.* 2008;37:375-397. PMID: 18573087.
- 6) Inomata K, et al., High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, 2009;458(7234):106-9. PMID: 19262675.
- 7) Takaoka Y, et al. Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and in vitro by in-cell ¹⁹F-NMR. *Chem. Commun.* 2013;49(27):2801-2803. PMID: 23440262.