

99. 論理ゲート型プロテオミクスのための基盤技術の創出

重永 章

福山大学 薬学部 薬学科 生体有機化学研究室

Key words : 共役付加, シアンヒドリン, タンパク質化学修飾, プロテオミクス, ラベル化

結 言

生体内には多くの物質が存在し、様々な化学反応を起こしている。これら物質や反応の生理的意義を解明するうえで、細胞や生体内において当該物質周辺や反応点近傍に存在するタンパク質の網羅的解析が重要となる。このような、特定環境下のタンパク質のみを網羅的に解析するアプローチは、コンディショナルプロテオミクスと呼ばれている。コンディショナルプロテオミクス研究では、対象とする物質や反応を認識・検知して近傍のタンパク質をラベル化する試薬が必要となる。このようなラベル化試薬は、現在までにいくつか報告されている。しかし、特定の物質（イオン）をトリガーとしてラベル化を惹起するよう設計されているため、汎用性に難があった。すなわち、新たな物質や反応をトリガーとするにはラベル化試薬を一から設計しなおす必要があり、この煩雑さがコンディショナルプロテオミクスの発展を阻害していた。そこで著者は、保護基（PG）を置換するのみで様々な物質・反応をトリガーとしたラベル化を可能とする、新たな高汎用性ラベル化試薬を開発することとした。なお、本報告書で用いる用語「論理ゲート型プロテオミクス」とはコンディショナルプロテオミクスのことであり、特定の環境下にあるタンパク質のみを対象とした、すなわち“特定の環境”と“タンパク質の有無”をANDゲートとしたプロテオミクスを意味する。

方 法

生体内には多くの物質が存在し、様々な化学反応を起こしている。これら物質や反応の生理的意義を解明するには、細胞や生体内において当該物質周辺や反応点近傍に存在するタンパク質の網羅的解析が必須となる。これを実現するには、対象とする物質や反応を認識・検知して近傍のタンパク質をラベル化する試薬が必要となる。例えば京都大学の浜地格教授らは、亜鉛イオンのキレートトリガーとして活性化されるラベル化試薬を開発し、細胞内の亜鉛イオン近傍に存在するタンパク質を追跡することに成功するとともに、その生理機能を明らかにしている [1]。このようなアプローチはコンディショナルプロテオミクスと呼ばれるが、この基盤となる従来のラベル化試薬は特定の物質（イオン）をトリガーとしてラベル化を起こすよう設計されているため、汎用性に難があった [1~4]。すなわち、新たな物質や反応をトリガーとするにはラベル化試薬を一から設計しなおす必要があり、このことがコンディショナルプロテオミクスの発展を阻害する要因の一つであると考えた。そこで著者は、PGを置換するのみで様々な物質・反応をトリガーとしたラベル化を可能とする、新たな高汎用性ラベル化試薬を開発することとした。

これまで著者らは、PGを置換するのみで様々な環境に応答しペプチド・タンパク質主鎖の切断を誘起する環境応答型アミノ酸の開発を行ってきた (図1) [5~7]。本研究ではこの際の知見を活かし、コンディショナルプロテオミクスのための新たなラベル化試薬を設計した (図2)。ラベル化試薬1は三重結合を挟み、一方にラベルを、他方にPGにより保護された水酸基を有する。この試薬は求電子性を持たないため、タンパク質のラベル化は起こさない。しかし、特定環境下でPGが除去されると生じた中間体が分解され、アレノン2を生じる。アレノンは求電子性が高いため、近傍に存在するタンパク質の求核性部位による共役付加反応を受ける。この結果、特定環境下にあるタンパク質のみが網羅的にラベル化される設計である。本ラベル化試薬は従来のラベル化試薬と異なり、PG部分を置換するのみで様々な環境下でのタンパク質ラベル化を可能とすることから、これからのコンディショナルプロテオミクス発展のための基盤

技術になるものと考え研究を開始した。

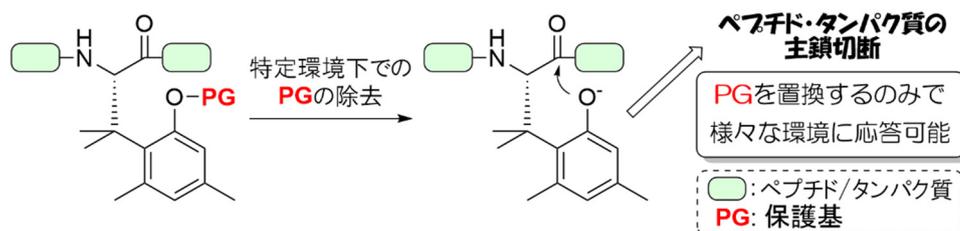


図1. 環境応答型アミノ酸の概要 (著者らのこれまでの研究成果)

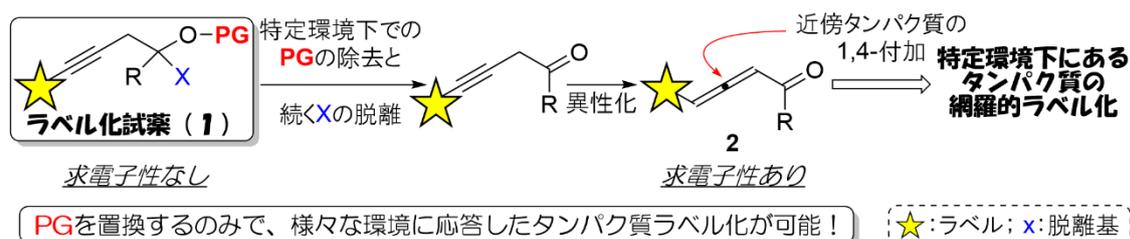


図2. 論理ゲート型プロテオミクスのための高汎用性ラベル化試薬の分子設計

結果

具体的分子設計について説明する (図3)。本研究ではまず、ラベル化試薬の反応性精査を目指し、PG部分は生体内環境ではなくフッ化物イオン処理で容易に除去可能な *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基とした。また合成の容易さを考慮し、ラベル化試薬1 (図2) のXにはシアノ基を、Rには水素原子を導入することとした。さらに、クリックケミストリーを利用してラベル部分に多様性を持たせることを可能とし、かつ紫外線吸収を指標とした HPLC による追跡を容易にするため、アルキン末端をベンジルアジド誘導体としたラベル化試薬3を設計した。

ラベル化試薬3は以下に従って合成した (図4A)。ベンジルブロミド4を出発原料とし、グリオキシル酸エステルとの Barbier 反応に付すことでアルコール5を得た。生じた水酸基をTBS基で保護し6を得たのち、エステル部分をアミドへと変換後、用事調製した Burgess 試薬により7を脱水しニトリル8とした。続いて、パラジウムカップリングによりアルキン末端へベンジルアルコールを導入し、得られた9のベンジル位水酸基を、二段階を経てアジドとすることで、目的とするラベル化試薬3を得ることに成功した。本ラベル化試薬の求核剤との反応を検証するため、まずはタンパク質のモデルとして、全ての典型的な側鎖官能基を有するモデルペプチド10との反応を試みることにした。なお、ペプチド10は一般的な Fmoc 固相ペプチド合成法に従って調製した (図4B)。

得られたラベル化試薬3およびモデルペプチド10を用い、反応性の検証を行った (図5)。両化合物をアセトニトリル/中性リン酸緩衝液に溶解したのち、テトラブチルアンモニウムフルオリドを加えて 37°Cでインキュベートした。得られた反応液を HPLC で解析したところ、複数のピークが観測された。さらに溶出液の質量分析を行った結果、いくつかのピークにおいて、ペプチド10にラベル化試薬が付加した目的物11と一致する質量が観測された。

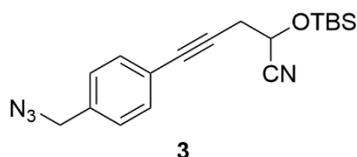


図3. 本研究で開発したラベル化試薬

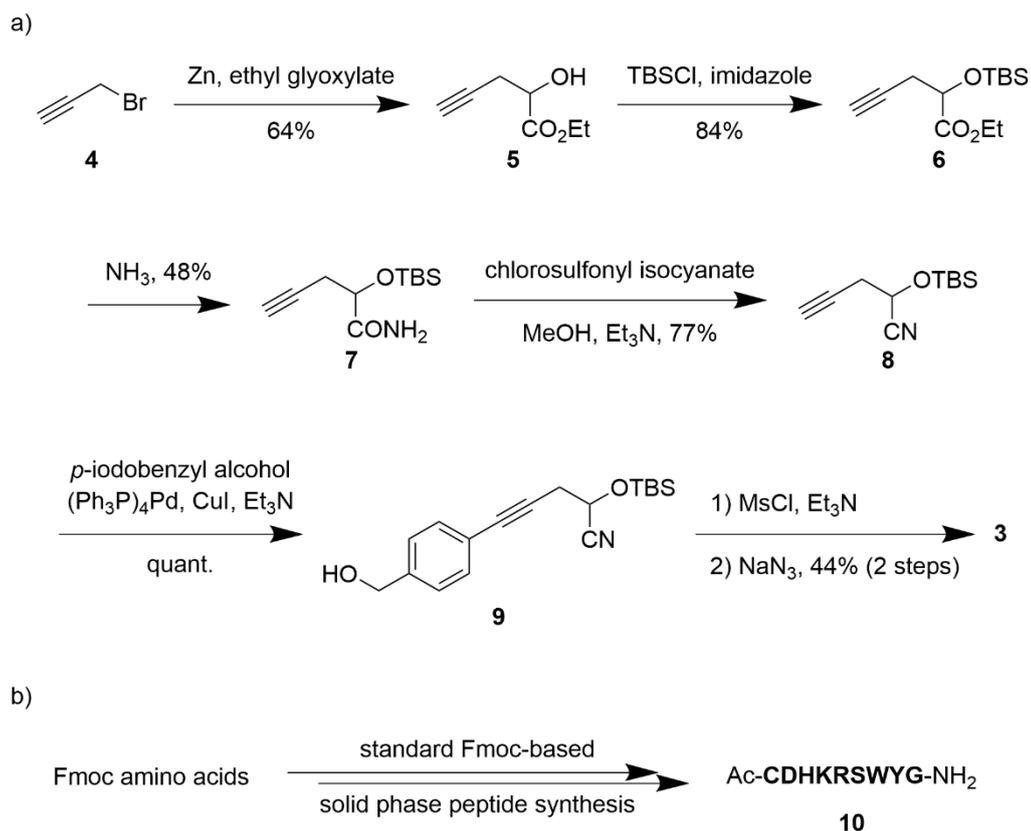


図 4. ラベル化試薬およびモデルペプチドの合成

- a) ラベル化試薬 3 の合成。
b) モデルペプチド 10 の合成。

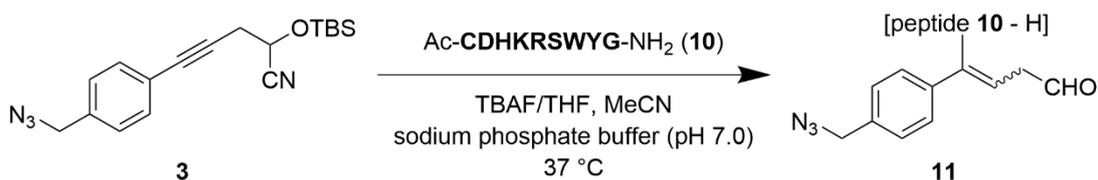


図 5. モデルペプチドのラベル化実験

考 察

本研究では、論理ゲート型ラベル化試薬 3 の合成法を確立することに成功した。さらに当初の設計通り、PG の除去をトリガーとして求核剤と結合することが明らかとなった。なお、ラベル化実験では目的とするラベル化ペプチド 11 に一致する質量を検出できたものの、構造不明の副生成物も多く観測された。この結果、目的物の純度が低下したこともあり、ペプチド中のいずれのアミノ酸がラベル化されたかの同定には現時点で至っていない。この原因は、ラベル化試薬の反応性が高すぎることにありと著者は考えている。そこで今後は、ラベル化試薬 1 (図 2) の R 部分を種々変更し、ラベル化試薬の求電子性を調節することで副反応の抑制を試み、コンディショナルプロテオミクスのための真に実用的な論理ゲート型ラベル化試薬の開発を進める計画である。

共同研究者・謝辞

本研究を立ち上げるにあたり、多大なるご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心よりお礼申し上げます。あわせて、本研究の共同研究者である国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部の山本武範室長、および本研究遂行にご協力、ご助言いただいた福山大学薬学部生体有機化学研究室の喜屋武龍二助教および同研究室所属学生諸氏に感謝いたします。

文献

- 1) Miki T, Awa M, Nishikawa Y, Kiyonaka S, Wakabayashi M, Ishihama Y, Hamachi I. A conditional proteomics approach to identify proteins involved in zinc homeostasis. *Nat Methods*. 2016 Nov;13(11):931-937. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27617391 DOI: 10.1038/nmeth.3998
- 2) Nishikawa Y, Miki T, Awa M, Kuwata K, Tamura T, Hamachi I. Development of a nitric oxide-responsive labeling reagent for proteome analysis of live cells. *ACS Chem. Biol.* 2019 Mar 15;14(3):397-404. Epub 2019 Feb 14. PMID 30715847 DOI: 10.1021/acscchembio.8b01021
- 3) Lee S, Chung C Y-S, Liu P, Craciun L, Nishikawa Y, Bruemmer K J, Hamachi I, Saijo K, Miller E W, Chang C J. Activity-based sensing with a metal-directed acyl imidazole strategy reveals cell type-dependent pools of labile brain copper. *J Am Chem Soc.* 2020 Sep 2;142(35):14993-15003. Epub 2020 Aug 20. PMID 32815370 DOI 10.1021/jacs.0c05727
- 4) Zhu H, Tamura T, Fujisawa A, Nishikawa Y, Cheng R, Takao M, Hamachi I. Imaging and profiling of proteins under oxidative conditions in cells and tissues by hydrogen-peroxide-responsive labeling. *J Am Chem Soc.* 2020 Sep 16;142(37):15711-15721. Epub 2020 Sep 3. PMID 32822179 DOI 10.1021/jacs.0c02547
- 5) Shigenaga A, Yamamoto J, Kohiki T, Inokuma T, Otaka, A. Invention of stimulus-responsive peptide-bond-cleaving residue (Spr) and its application to chemical biology tools. *J Pept Sci.* 2017 Jul;23(7-8):505-513. Epub 2017 Jan 19. PMID 28105728 DOI 10.1002/psc.2961
- 6) Shigenaga A, Tsuji D, Nishioka N, Tsuda S, Itoh K, Otaka A. Synthesis of a stimulus-responsive processing device and its application to a nucleocytoplasmic shuttle peptide. *Chembiochem.* 2007 Nov 5;8(16):1929-31. PMID 17899557 DOI 10.1002/cbic.200700442
- 7) Shigenaga A. Development of chemical biology tools focusing on peptide/amide bond cleavage reaction. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2019;67(11):1171-1178. PMID 31685746 DOI 10.1248/cpb.c19-00285