

113. 生物活性分子の網羅的な結合タンパク質同定法の開発

佐藤 伸一

東北大学 学際科学フロンティア研究所

Key words : チロシン残基修飾, タンパク質熱変性, 生物活性分子, 標的同定, laccase

緒言

生物活性分子の標的タンパク質同定は、生体関連化学分野における最も重要な研究課題の一つであり、多くの研究者の共通の研究対象である。従来の標的タンパク質同定研究では、生物活性分子のプローブ分子を作製し、そのプローブ分子を用いて結合タンパク質を同定するという研究手法がとられてきた。しかし、生物活性分子のプローブ化には、リンカー構造、リンカー導入部位、標識官能基の種類、等の検討が必要である。多くの場合はトライアンドエラーを繰り返し、標的同定の成功確率も高いものとは言えない。よって、「生物活性分子のプローブ化を必要とせずに、分子の結合タンパク質を同定できる手法」は、生化学者およびケミカルバイオロジー分野の研究者の長年の理想であり、創薬科学、生体関連化学分野の研究を効率化する技術になると期待できる。

近年、生物活性分子のプローブ化を必要とせず、細胞内の任意のタンパク質とスクリーニングヒット化合物の結合を確認する手法として、Cellular Thermal Shift Assay (CETSA) という手法が注目されている。CETSA は化合物の結合により結合タンパク質の熱変性に対する抵抗性が向上するという原理を利用した手法である [1]。本研究では、タンパク質の熱変性過程を高感度に検出する手法を開発することを目指した。研究開始以前より、我々はタンパク質の疎水性アミノ酸残基の一つであるチロシン残基を化学標識する手法を開発していた。本研究では、本来タンパク質の内部に埋もれているチロシン残基が熱変性によってタンパク質表面に露出するという現象 [2] に着目し、タンパク質表面に露出するチロシン残基を選択的に標識する技術を開発することを目指した。タンパク質の熱変性過程を効率的に可視化する技術を開発することによって、生物活性分子の結合タンパク質を網羅的に同定できる手法を開発することを目指した。

方法

1. CETSA 法の課題・本研究の着想

緒言で述べた CETSA 法はプローブ化が不要という大きなメリットがあるものの、現状は未知の標的を同定できるような精度の用途で用いることは困難である。近年になって、プロテオミクス技術の応用によって、適用用途が広がっているものの [3]、多くの使用例においては、あらかじめ標的を絞って、その標的に対する抗体を使ったウエスタンブロットティングによって検出するという手法がとられている。CETSA 法では、タンパク質を加熱し、熱変性させ、凝集・沈殿して残ったタンパク質を遠心分離によって除去し、残った可溶性画分のタンパク質の量を測定するという原理である。

そこで、本研究では、タンパク質熱変性過程で起きる特徴的な現象を補足することによって、より高感度にタンパク質熱変性を可視化する手法が開発できるのではないかと考えた。タンパク質のチロシン残基は熱変性の過程でタンパク質表面に露出することが知られている [1]。また、我々はタンパク質の表面に露出している数少ないチロシン残基を選択的に修飾することで、タンパク質の部位選択的な化学修飾に成功している [4]。そこで、熱変性過程のタンパク質にチロシン残基修飾を適用することで、熱変性度に応じてタンパク質の修飾効率が向上する修飾法が開発できると考えた。この目標を達成するためには、タンパク質が熱変性するような反応条件でも適用できるチロシン残基修飾法を開発する

必要があった。そこで、以下2つの新たなアプローチを本研究で試行した。

- ・ Urazole radical を使ったチロシン残基選択的修飾
- ・ 熱耐性 laccase を使ったチロシン残基選択的修飾

2. Urazole radical を使ったチロシン残基選択的修飾

本研究での検討により、以下の図1で示す一般式1の urazole radical がチロシン残基と共有結合することを見出した。そこで、R¹、R²の構造を種々検討し、より効率的にチロシン残基を標識できる修飾剤構造を探索することとした。

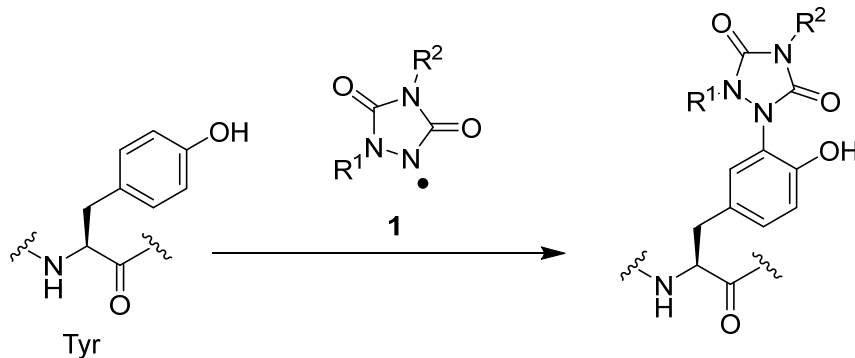


図1. Urazole radical によるチロシン残基修飾反応

チロシン残基を含むペプチド、タンパク質の溶液に、一般式1で示される urazole radical を添加すると、瞬時にチロシン残基修飾反応が進行する。

また、最適化した修飾剤とモデルタンパク質 bovine carbonic anhydrase II (CAII) を含む数種類のタンパク質と反応させ、修飾反応のチロシン残基選択性を質量分析によって評価した。CAIIに関しては、熱変性と被修飾効率との相関関係を評価した。また、CAIIに対する既存のリガンド brinzolamide によるCAIIの熱変性抵抗性獲得をタンパク質夾雑系において評価した。

3. 熱耐性 laccase を使ったチロシン残基修飾

Laccase は高い熱耐性を持つことが知られている一電子酸化酵素であり、我々も laccase を触媒として用いたチロシン残基修飾反応を開発している [5]。そこで、laccase を触媒した修飾法の改良を目指し、修飾剤構造の検討を行った。市販のレドックス活性化化合物ライブラリー167種に加え、独自のレドックス活性化化合物20種類を新たな修飾剤候補化合物として、反応性をスクリーニングによって評価した。具体的には、チロシン残基を含むペプチド angiotensin II (配列: DRVYIHPF) に対して、修飾剤候補化合物と laccase を加え、反応の駆動力となる酸素分子が反応系中に取り込まれるように、チューブのふたを開けた状態かつ、37°Cで浸透した。一定時間経過後の angiotensin II の修飾効率を MALDI-TOF-MS によって評価した。

スクリーニングによって得られた修飾剤を使った反応条件を種々の基質 (ペプチド、タンパク質) に適用し、本手法が従来の手法よりも優れたチロシン残基修飾法であることを示した。さらに、上記の研究項目と同様に、タンパク質の熱変性と被修飾効率との相関関係を評価した。

結果および考察

1. Urazole radical 構造を持つチロシン残基選択的タンパク質修飾剤の開発

種々の修飾剤構造を検討した結果、新たなチロシン残基選択的修飾剤として、図2に示す修飾剤2、3を見出した。従来のチロシン残基修飾剤4はチロシン残基を修飾できるものの、水中で脱窒素、脱一酸化炭素反応が進行し、生じる求電子性の isocyanate 構造が、求核性のリジン残基とも反応してしまうという副反応が課題であった。一方で、修飾剤2、3においてはそのような副反応は確認されず、高いチロシン残基選択性を有する手法を開発できた。牛血清アル

ブミン (BSA) と反応させ、修飾効率と修飾部位を評価した結果を図 2 に示す。修飾効率は修飾剤 2~4 の間で大きな違いはなかった。修飾剤 4 はチロシン残基に加えてリジン残基との反応も確認された一方で、修飾剤 2、3 はチロシン残基を選択的に修飾することが示唆された。

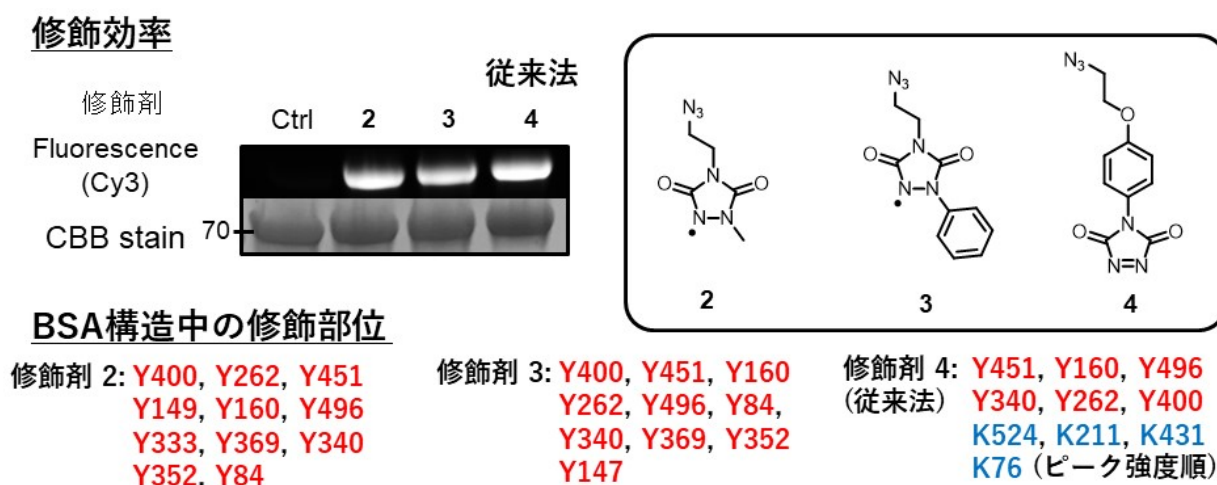


図 2. Urazole radical 構造を持つチロシン残基修飾剤

修飾剤 2~4 を BSA と反応させ、アジド基と dibenzocyclooctyne (DBCO) -Cy3 とのクリック反応により、蛍光標識した (図左上)。また、修飾 BSA のアジド化されたアミノ酸残基は in gel trypsin 消化し、nanoLC-MS/MS によって修飾部位を同定した。

また、CA II に対する既存のリガンド brinzolamide による CA II の熱変性抵抗性獲得をタンパク質夾雑系において評価したが、これらの修飾剤を用いた解析においては、熱変性度の違いを反映した修飾効率の変化が観測できなかった。これらの修飾剤はタンパク質溶液と混合することによって瞬時に修飾反応が進行するため、加熱条件下でタンパク質に添加するという反応条件によって、タンパク質を修飾することを試みた。タンパク質の変性と同時に凝集、沈殿が起こるために、これらの修飾剤を加えた段階で、変性段階のタンパク質は既に修飾剤と反応できないような構造に変化してしまっているのではないかと考察した。

2. 熱耐性 laccase を使ったチロシン残基修飾の反応特性

そこで、次にタンパク質の熱変性とチロシン残基の修飾法がほぼ同時の時間軸で起きるような反応を開発する必要があったと考えた。そのためには、チロシン残基修飾剤を活性型ではなく、前駆体の形で反応系に共存させ、反応系の加熱操作と同時のタイミングで反応を開始させるような手法が必要である。また、反応速度も数時間スケールの反応時間では遅く、修飾反応の前にタンパク質が凝集、沈殿してしまうため、数分スケールの反応時間で効率的に進行する反応の開発が求められる。

Laccase を用いた反応のスクリーニングによって、効率的な反応性を示す修飾剤 5 を見出すことに成功した。基質の濃度変化と反応速度の解析によって、修飾剤 5 が laccase によって一電子酸化され、ラジカル種を生じ、これがチロシン残基と反応するメカニズムが提唱された。また、反応速度定数も $7.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と算出され、従来のチロシン残基修飾反応と比較して極めて反応効率が高く、速い反応であることが示唆された (図 3)。

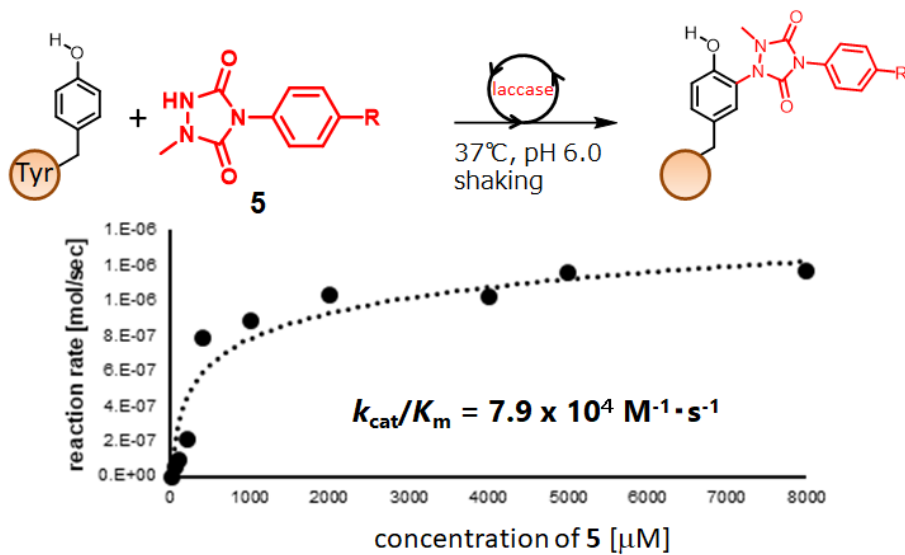


図3. Laccase を用いたチロシン残基の反応速度

チロシン残基を含むペプチドを基質として、修飾剤 **5**、laccase の濃度を種々検討した。ペプチドの修飾効率を各条件で求め、反応速度定数を算出した。

3. モデルタンパク質の熱変性度の変化の検出

Laccase を使った反応条件がモデルタンパク質の変性度を可視化できるかを評価した。HEK293 FT 細胞の破碎液に CA II を添加したタンパク質混在系でタンパク質を熱変性させると同時に laccase によってチロシン残基を標識し、クリック反応による蛍光団の導入と二次元電気泳動ゲル状での蛍光スポットの検出によって、標識効率を評価した。

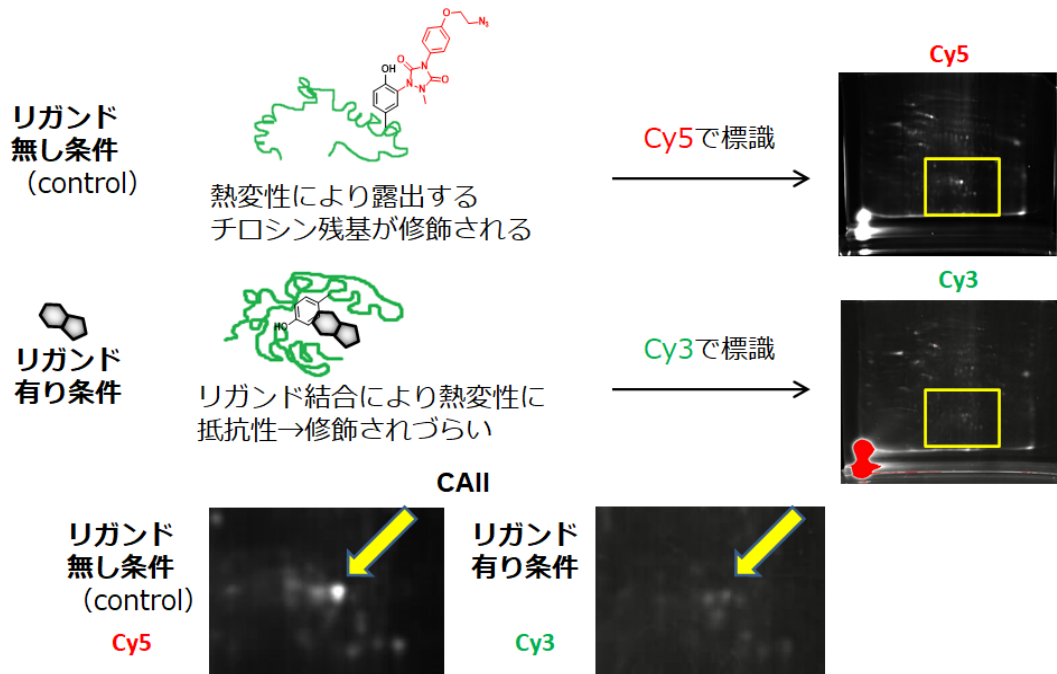


図4. laccase を用いたチロシン残基修飾による CAII の熱変性の可視化

CAII のリガンド分子 brinzolamide の有無による同温度 (55°C) での CAII の変性度の可視化。アジド修飾後に Cy5 もしくは Cy3 とのクリック反応により蛍光団を導入し、同一ゲルでの二次元電気泳動により修飾効率を比較した。

CAIIのリガンドの添加によって、CAIIは熱変性抵抗性を獲得することが報告されている [6]。そこで、CAIIリガンド brinzolamide の未添加、添加条件での CAII の熱変性度の比較が、laccase を使ったチロシン残基修飾で出力できるかを検討した (図 4)。その結果、リガンドの添加によって、熱変性が抑制され、チロシン残基修飾の効率に差が生じることが示唆された。リガンド結合の依存性等、今後詳細な検討が必要であると考えている。

本研究支援によって、2 種類の新規チロシン残基修飾法を開発することができた。本研究ではタンパク質への熱変性に着目した展開で研究を行ったが、チロシン残基は変性時に露出する疎水性アミノ酸残基という特徴以外にも、リン酸化シグナル、タンパク質間相互作用の結合界面への寄与も大きいアミノ酸残基である。これらの生命現象解明のためのツールとして、本支援により開発したチロシン残基修飾反応を活用した研究を展開していきたい。

共同研究者・謝辞

本研究は東北大学大学院生命科学研究科の中根啓太修士、宮野翔伍修士の協力のもと行われた。また、質量分析においては、東北大学学際科学フロンティア研究所の藤村千鶴氏、東北大学生命科学研究科の半澤栄子氏にご協力頂いた。研究の進め方については東北大学生命科学研究科の石川稔教授、友重秀介助教にご助言頂いた。

文 献

- 1) Martinez Molina D, Jafari R, Ignatushchenko M, Seki T, Larsson EA, Dan C, Sreekumar L, Cao Y, Nordlund P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*. 2013 Jul 5;341(6141):84-7. doi: 10.1126/science.1233606. PMID: 23828940.
- 2) Melo EP, Aires-Barros MR, Costa SM, Cabral JM. Thermal unfolding of proteins at high pH range studied by UV absorbance. *J Biochem Biophys Methods*. 1997 Feb 1;34(1):45-59. doi: 10.1016/s0165-022x(97)01202-5. PMID: 9089383.
- 3) Tan CSH, Go KD, Bisteau X, Dai L, Yong CH, Prabhu N, Ozturk MB, Lim YT, Sreekumar L, Lengqvist J, Tergaonkar V, Kaldis P, Sobota RM, Nordlund P. Thermal proximity coaggregation for system-wide profiling of protein complex dynamics in cells. *Science*. 2018 Mar 9;359(6380):1170-1177. doi: 10.1126/science.aan0346. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29439025.
- 4) Sato S, Matsumura M, Kadonosono T, Abe S, Ueno T, Ueda H, Nakamura H. Site-Selective Protein Chemical Modification of Exposed Tyrosine Residues Using Tyrosine Click Reaction. *Bioconjug Chem*. 2020 May 20;31(5):1417-1424. doi: 10.1021/acs.bioconjugchem.0c00120. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32223219.
- 5) Sato S, Nakane K, Nakamura H. A laccase-catalysed tyrosine click reaction. *Org Biomol Chem*. 2020 May 20;18(19):3664-3668. doi: 10.1039/d0ob00650e. PMID: 32356542.
- 6) Rogez-Florent T, Duhamel L, Goossens L, Six P, Drucbert AS, Depreux P, Danzé PM, Landy D, Goossens JF, Foulon C. Label-free characterization of carbonic anhydrase-novel inhibitor interactions using surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry and fluorescence-based thermal shift assays. *J Mol Recognit*. 2014 Jan;27(1):46-56. doi: 10.1002/jmr.2330. PMID: 24375583