

生物活性化合物の標的タンパク質を選択的に蛍光ラベル化する 新しい技術の開発



研究ノート

山口卓男*

Specific Fluorescence Labeling of Target Proteins of Bioactive Small Molecules

Key Words : drug discovery, target protein identification, affinity labeling

1. はじめに

低分子創薬におけるアプローチは、大きく2つに分類することができます (図1)。1つは target-based 創薬で、もう1つは phenotypic 創薬です。前者のアプローチでは、標的タンパク質 (標的分子) をあらかじめ設定し、そのタンパク質の機能を調節する化合物を得て、医薬品の創出を目指していきます。従って、標的タンパク質の構造あるいは機能的特徴を十分に理解した上で合理的に創薬研究を展開できるのが前者のアプローチの利点となります。一方、後者のアプローチでは、表現型に基づいて化合物を選定し、作用機序の解明を経て、医薬品の創出を目指していきます。作用機序の解明には膨大な時間と労力を費やしますが、画期的医薬品 (first-in-class) の創出に繋がりがやすいのが後者のアプローチの利点です。¹

現在、低分子創薬の主流は前者の target-based 創薬となっていますが、新しい創薬標的の枯渇が指摘される昨今、古くから用いられてきた phenotypic 創薬に再び注目が集まっています。先に触れた通り、phenotypic 創薬では作用機序の解明が鍵ステップであり、特に化合物が直接作用している標的タンパク質を本ステップの初期段階で同定することが極めて重要となります。我々は、これまで標的タンパク質を簡便かつ高精度に同定するための新しい化学的

手法の開発に取り組んできました。その結果、生物活性化合物に“小さなタグ”を取り付け、標的タンパク質のみを選択的かつ効率的に蛍光ラベル化する新しい技術の開発に成功しました。本稿では、その内容についてご紹介致します。

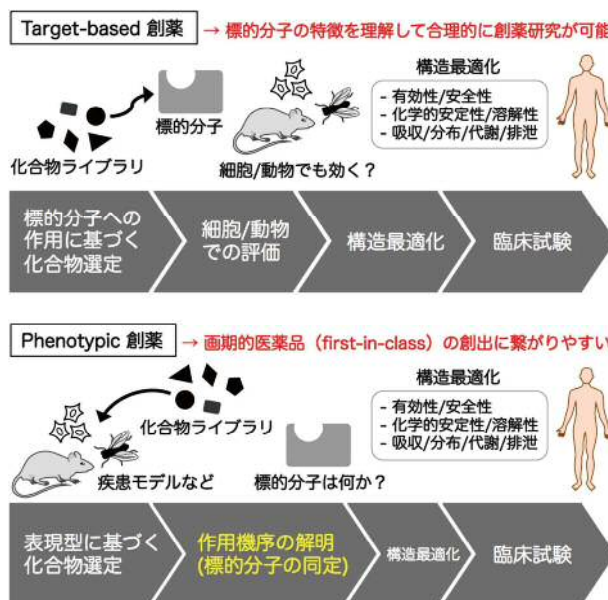


図1 低分子創薬の大まかな流れ (2つのアプローチ)

2. “小さなタグ”をもつプローブ分子の設計

標的タンパク質の直接的な同定法として、アフィニティー精製法とアフィニティーラベル化法が挙げられます (図2)。アフィニティー精製法は、生物活性化合物を固相に担持し、その固相を用いて標的タンパク質を分離/精製していくという手法になります。一方、アフィニティーラベル化法は、生物活性化合物にタグ (化学的な仕掛け) を付けておき、標的タンパク質を選択的にラベル化するという手法になります。後者は、生きた細胞内のありのままの標的タンパク質をも捕らえることができる大変強力



* Takao YAMAGUCHI

1981年1月生
大阪大学大学院 薬学研究科 博士後期課程修了 (2008年)
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 講師 博士 (薬学)
有機合成化学、生物有機化学、創薬化学、核酸化学
TEL : 06-6879-8201
FAX : 06-6879-8204
E-mail : yamaguchi-ta@phs.osaka-u.ac.jp

な手法であり、我々は後者の手法に着目して研究を進めてきました。

通常、アフィニティーラベル化法では生物活性化合物に2つのタグ「標識基 (主に蛍光団) と反応基 (光反応基や求電子性反応基)」を導入したプローブ分子を用いて、標的タンパク質をラベル化します (図3)。ところが、複雑な仕掛けを施したプローブ分子では本来の生物活性化合物の性質 (標的タンパク質への親和性や特異性) が大きく変化しており、標的タンパク質のラベル化が適切に進行しないケースも少なくありません。そこで我々は、生物活性化合物に「標識基と反応基の2役を担う “小さなタグ”」を導入する新たなプローブ分子を設計しました (図4)。²⁻⁵ ここでは設計した3つのプローブ分子の内、*O*-NBD タグと AzPI タグの結果についてご紹介していきます。

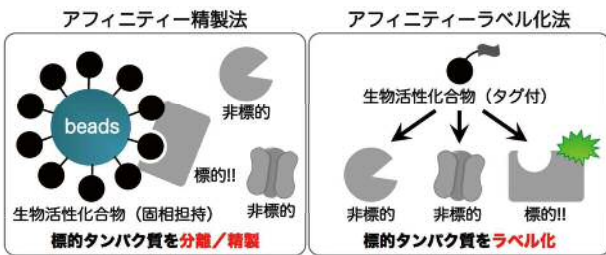


図2 代表的な標的タンパク質同定法

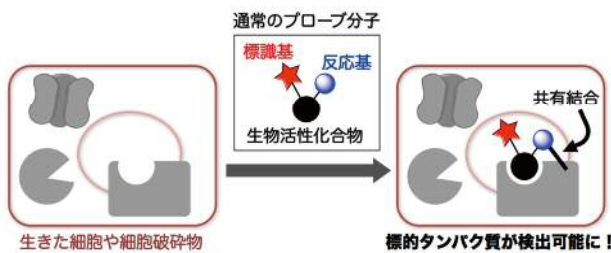


図3 通常のプローブ分子を用いるアフィニティーラベル化法

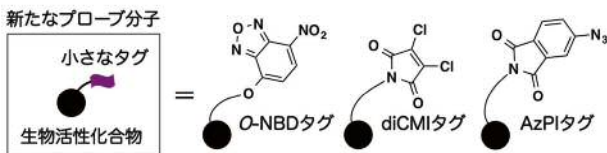


図4 我々が設計したプローブ分子

3. *O*-NBD タグを用いるアフィニティーラベル化法²

O-NBD タグを用いるアフィニティーラベル化法の原理を図5に示しました。*O*-NBD タグは、それ

自体が無蛍光の求電子性反応基であり、生物活性化合物と標的タンパク質の相互作用を駆動力にリガンド結合サイト近傍のリジン残基に蛍光団を付与できる分子設計となっています。まずは、この仕掛けがうまく働くか、ビオチン-アビジンという親和性の高いリガンド-標的タンパク質の組み合わせをモデルとして検証実験を実施しました (図6A)。具体的には、ビオチンに *O*-NBD タグを導入したプローブ分子 **C14EG** を合成し、細胞破砕物とアビジンの混合物に添加しました。その結果、期待通り、多数の非標的タンパク質存在下で標的タンパク質であるアビジンへの選択的な蛍光ラベル化が確認できました。本ラベル化反応は、様々な評価実験から、高収率 (例えば6時間後のラベル化収率は72%) で進行することも分かりました。また、リガンド結合サイト近傍のリジン残基に選択的に蛍光ラベル化が起こっていることも明らかとなりました。以上の結果から、*O*-NBD タグが標的タンパク質の選択的かつ効率的な蛍光ラベル化に有用であることが明らかとなり、また、リガンド結合サイトの推定にも本手法が使えることが証明されました。

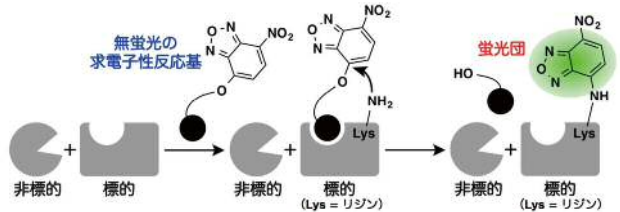


図5 *O*-NBD タグを用いるアフィニティーラベル化法の原理

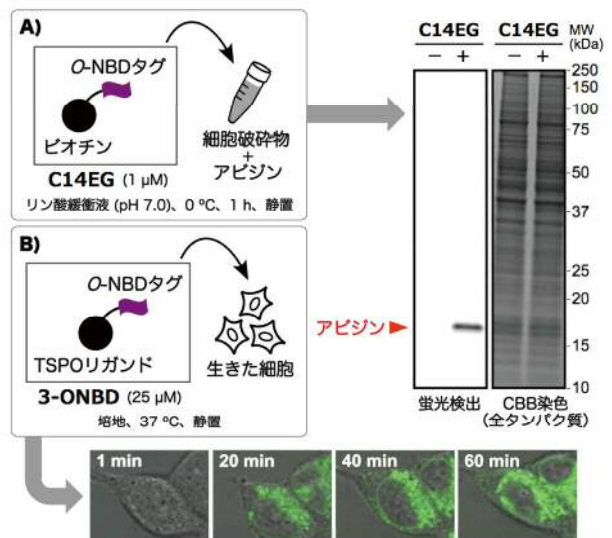


図6 *O*-NBD タグを用いた標的タンパク質の蛍光ラベル化例

さらに、本手法をミトコンドリア2重膜上に発現するTSPO (18 kDa translocator protein) タンパク質複合体に適用した場合には、当該複合体が存在するミトコンドリアに対して選択的に蛍光ラベル化が進行しました (図6B)。ラベル化タンパク質としては、TSPOと複合体を形成するVDAC (voltage-dependent anion channel) が候補として見つかり、O-NBDタグは生細胞内でも機能する有用なタグと考えられます。

4. AzPIタグを用いるアフィニティーラベル化法^{4,5}

O-NBDタグはリジン残基の蛍光ラベル化に適していましたが、未知の標的タンパク質を同定する上では様々なアミノ酸と共有結合を形成できる光反応性をもったタグが有利と考えられます。そこで我々は、光照射によって活性化できるAzPIタグを次に設計しました (図7)。AzPIタグの検証実験では、CA-II (炭酸脱水酵素II) を標的タンパク質のモデルとして、まずはCA-IIリガンドにAzPIタグを導入してプローブ分子P3を合成しました (図8)。続いて、細胞破碎物とCA-IIの混合物にP3を加え、365 nmの光を5分間照射しラベル化反応を行いました。その結果、この場合も標的タンパク質への選択的な蛍光ラベル化が確認できました。このような

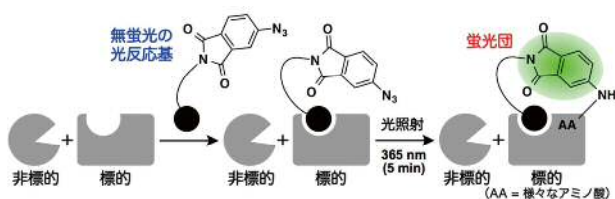


図7 AzPIタグを用いるアフィニティーラベル化法の原理

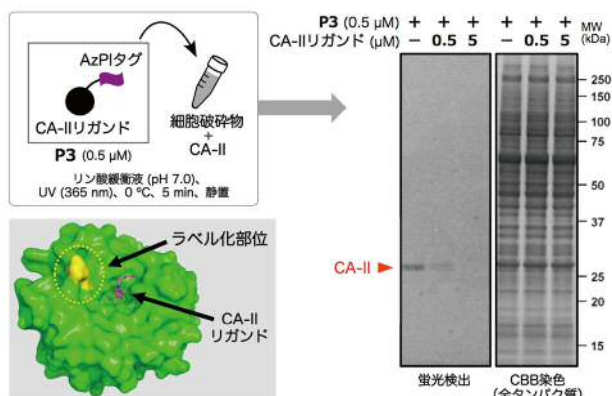


図8 AzPIタグを用いた標的タンパク質の蛍光ラベル化例

CA-IIへの選択的な蛍光ラベル化は、赤血球細胞にP3を処理した場合にも見られました。また、ラベル化収率については他の評価実験から約30%と見積もることができました。以上の結果から、AzPIタグも標的タンパク質の選択的かつ効率的な蛍光ラベル化に有用であることが示されました。また、ラベル化部位に関しては質量分析によりアミノ酸レベルで特定することができており、AzPIタグもリガンド結合サイトの推定に有用となっております。

5. おわりに

今回、いくつかのモデル実験により我々が設計した“小さなタグ”が標的タンパク質の選択的かつ効率的な蛍光ラベル化に有用であることが示されました。これら“小さなタグ”は生物活性化合物に容易に導入することができ、合成の簡便性の観点からも従来のプローブ分子と比べて有用であると考えています。今後、このようなプローブ分子設計によって未知の標的タンパク質が同定されることを期待しております。

末筆になりますが、本研究の遂行にあたっては理化学研究所の袖岡幹子 主任研究員ならびに閻闡孝介 専任研究員に多大なる御指導と御鞭撻を賜りました。また、東京大学分子細胞生物学研究所の橋本祐一 教授ならびに石川 稔 准教授に数々の有益な御助言を賜りました。この場を借りて深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) D. C. Swinney, J. Anthony, *Nature Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 507–519.
- 2) T. Yamaguchi, M. Asanuma, S. Nakanishi, Y. Saito, M. Okazaki, K. Dodo, M. Sodeoka, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1021–1029.
- 3) K. Chiba, Y. Hashimoto, T. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 1647–1653.
- 4) K. Chiba, M. Asanuma, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, K. Dodo, M. Sodeoka, T. Yamaguchi, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 8751–8754.
- 5) K. Chiba, Y. Hashimoto, T. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**, 65, 994–996.