

細胞内蛋白質工学のための革新的プローブラベリングシステムの開発

Development of Innovative Probe Labeling System for *In-Cell* Protein Engineering

(日本化学会推薦)

代表研究者	長岡技術科学大学	築地 真也	Nagaoka University of Technology	Shinya TSUKIJI
協同研究者	京都大学	浜地 格	Kyoto University	Itaru HAMACHI
	京都大学	田村 朋則	Kyoto University	Tomonori TAMURA
	長岡技術科学大学	石田 学	Nagaoka University of Technology	Manabu ISHIDA
	長岡技術科学大学	菊地 環	Nagaoka University of Technology	Tamaki KIKUCHI

Chemical protein modification (labeling) is a key approach in protein engineering and chemical biology. In particular, the ability to modify target proteins with small-molecule chemical probes, such as fluorescent dyes, NMR probes, and cross-linkers, in living cells will provide powerful tools for the study and control of biological systems. To this end, we have recently developed a technique, termed the ligand-directed tosyl (LDT) chemistry, which allows selective chemical labeling of specific (native) proteins in cells and in vivo. However, the LDT chemistry is still at the beginning stage, and thus its full potential has yet to be exploited. In this work, we first attempted to apply the LDT chemistry as a novel tool for *live-cell* fluorescence imaging of endogenous proteins. Using a newly-designed LDT reagent (**1**), we were able to selectively label endogenous FKBP12 with an organic fluorescent dye, Oregon Green (OG), in living mammalian cells. It was also possible to visualize the rapamycin-mediated complexation of the OG-labeled FKBP12 and mCherry-fused FRB inside of the cells by FRET imaging. Furthermore, in this work, we demonstrated that the chemical labeling efficiency could be significantly improved by combining the LDT chemistry with the site-directed mutagenesis technique.

研究目的

近年、生きた細胞内の特定の対象蛋白質に蛍光色素、NMRプローブ、光架橋剤などの「合成小分子プローブ」を選択的に修飾・ラベル化する手法が求められている。このようなプローブラベリング技術は、既存の蛍光蛋白質テクノロジーやその他の分子生物学的手法では実現できないさまざまな“化学的アプローチによる生体機能解析”を可能にするため、生命科学の次世代基盤技術として大きな注目を集めている^[1]。これまでに細胞内蛋白質へのプローブラベリング法として、SNAP-tag や HaloTag に代表される「タグ蛋白質」を利用した手法が開発されている^[2]。この手法では、任意の対象蛋白質にタグ蛋白質を融合したものを細胞内に発現させ、そのタグ蛋白質と特異的に結合するように設計したプローブ分子を用

いることで標的蛋白質を修飾する。このタグラベリ
化法は、細胞内蛋白質の選択的な合成プローブラ
ベリング技術として一早く発展し、最近ではさま
ざまな細胞生物学研究、特に合成蛍光プローブ
を用いた細胞内蛋白質の蛍光イメージング研究
に実践応用されるようになってきた^[1]。一方、
この手法には2つの大きな限界がある。一つ目
かつ最大の限界は、タグラベリ化法で修飾する
のはあくまでも対象蛋白質とタグ蛋白質の融
合蛋白質だということである。すなわち、細胞
内にもともと内在する本来の対象蛋白質ではな
く、細胞に人工的に過剰発現させたタグ融合
蛋白質をラベル化し、その機能を解析すること
になる。タグ融合蛋白質は真の内在性
の対象蛋白質と本当に同じ機能や活性レベルを
持っているのだろうか。タグラベリ化法が有
するもう一つのテクニカル

な限界は、そのプローブ導入部位である。タグラベル化法では、タグとなる蛋白質を遺伝子レベルで対象蛋白質に融合する必要があるため、その導入部位は基本的に対象蛋白質のN末端かC末端に限定される。蛋白質の末端へのプローブラベリングの有用性について疑う余地はない。しかし、合成プローブラベリングのポテンシャルを最大限に発揮するためには、明らかに末端修飾法だけでは不十分である。例えば、環境応答性蛍光色素を用いてバイオセンサーを構築したり、対象蛋白質に光架橋剤を導入してその相互作用の相手を光クロスリンクしようとする場合、プローブ分子は対象蛋白質の末端よりもむしろ蛋白質“本体”の特定部位へ修飾することが望ましい。しかし、生細胞内で使用でき、対象蛋白質の機能を損なわずにその蛋白質の本体の特定部位へ合成プローブをラベル化可能な手法というのはこれまで存在しなかった。

我々は、有機化学的アプローチをもとにこの難題に取り組み、「リガンド指向型トシル (LDT) 化学」と命名した新規の蛋白質ラベル化技術を考案・開発することに成功した^[3]。LDT 化学では、標的蛋白質に特異的に結合するリガンドと任意の合成プローブを求電子性フェニルスルホン酸エステル基（通称トシル基）によって連結した化合物をラベル化剤として用いる（図 1）。このラベル化剤は、標的蛋白質に選択的に結合し、そのリガンド結合部位近傍の求核性アミノ酸とトシル基が（近接効果を利用して）反応することでプローブ分子が標的蛋白質に転移する。この S_N2 型反応と同時に、リガンド部位はラベル化剤骨格から切り離される。そのため、標的蛋白質の活性・機能は保持される（標的蛋白質は不活性化しない）。すなわち、LDT 化学は、標的蛋白質の機能を損なわず、その蛋白質本体への部位特異的なプロ

ーブラベリングを実現する世界初の手法である。そして、本手法の最大の特徴は、特異的リガンドさえあれば、細胞内在性の標的蛋白質をラベル化できる点にある。これまでに我々は、本手法を用いることで、赤血球内の内在性炭酸脱水酵素に ^{19}F NMR プローブを導入し、その細胞内での蛋白質と阻害剤との結合を *in-cell* ^{19}F NMR によって検出することなどに成功している^[3,4]。

一方、LDT 化学はまだ誕生して間もなく、その応用についてはまだ十分検討されていない^[3-6]。そこで本研究では、LDT 化学をより実用的かつ革新的な細胞内蛋白質ラベリング・エンジニアリングツールとして飛躍的に発展させることを目的とした。具体的にはまず、「① LDT 化学の蛍光イメージングへの応用」を検討した。（上述のように）現在の蛍光イメージングでは、対象蛋白質に蛍光蛋白質もしくはタグ蛋白質を融合したものを観察するしかなく、内在性蛋白質を蛍光可視化することのできる技術というのはまだほとんど開発されていない。そこで本研究では、内在性蛋白質の選択的化学修飾が可能な LDT 化学を応用し、生細胞“内在性”蛋白質の蛍光ラベリングと *live-cell* 蛍光イメージングに挑戦した。

更に本研究では、「② LDT 化学と遺伝子工学を融合した新しい細胞内蛋白質ラベリング法の開発」に取り組んだ。プロトタイプ（内在性蛋白質を対象とした）LDT 化学では、ラベル化の成否や効率が標的蛋白質に大きく依存し、ラベル化速度も遅い（多くの場合、10 時間以上）という大きな欠点がある。例えば、高親和性リガンドをもとにラベル化剤を作っても、標的蛋白質によってはラベル化がほとんど進行しないという場合もある。これは、標的蛋白質のリガンド結合ポケット周辺の求核性アミノ酸の有無、種類、またその空間分布が標的蛋白質によって

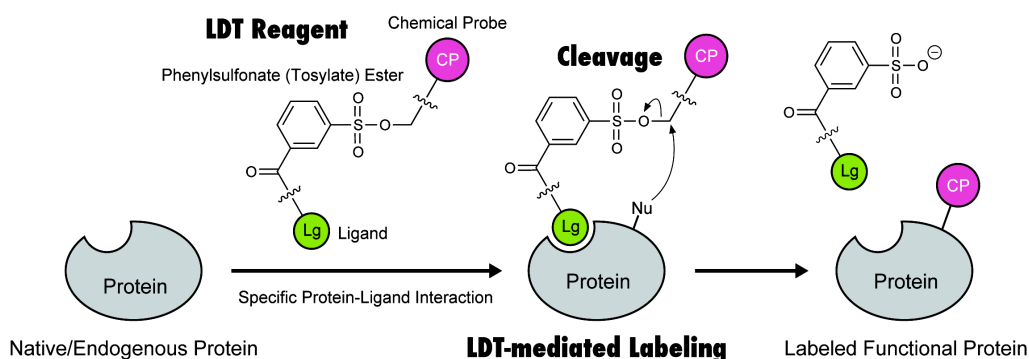


Fig. 1 Principle of the LDT chemistry

異なるためである。したがって、遺伝子工学的手法を用いて対象蛋白質のリガンド結合ポケットの周辺に高求核性アミノ酸を導入すれば、さまざまな標的蛋白質を高効率かつ高速にラベル化できるようになる可能性がある。そこで本研究では、遺伝子工学的に改変した蛋白質に対する LDT 化学を展開し、汎用的かつ高効率な細胞内蛋白質ラベリング法の開発に挑戦した。

研究経過

① LDT 化学を用いた細胞内在性蛋白質の蛍光ラベリングと *live-cell* 蛍光イメージング

本研究では、LDT 化学を用いて細胞内在性の蛋白質に小分子蛍光色素をラベル化し、その蛍光ラベル化内在性蛋白質と他の蛋白質との相互作用を生細胞内でそのまま蛍光イメージングにより可視化することに挑戦した。具体的には、本研究では概念実証を目指し、イムノフィリンの一種である「FKBP12」をモデル標的蛋白質とした。FKBP12 に特異的に結合する小分子 SLF をリガンドとし、緑色蛍光色素である Oregon Green (OG) をプローブとして持つ LDT ラベル化剤 **1** (図 2) を設計・合成した。なお、**1** の設計の際には、我々が以前に見出したピペラジン骨格をリガンドとトシル基間のスペーサーとして採用した (FKBP12 のラベル化においては、ピペラジンスペーサーを持つ LDT ラベル化剤が最も高いラベル化効率を示すことを以前報告している)^[6]。

まず *in vitro* 系において、**1** による天然 FKBP12 のラベル化を評価した。pH 8.0 のバッファー水溶液中、FKBP12 と **1** (いずれも 11 μ M) を混合し、37°C でラベル化反応を行った。MALDI-TOF-MS による解析の結果、FKBP12 のラベル化 (OG 修飾) が経時的に進

行し、反応 18 時間後には 56%、24 時間後には 70% の収率で OG ラベル化 FKBP12 が得られることが確認された。一方、リガンド部位を持たない化合物 **2** (図 2) では FKBP12 のラベル化は全く進行せず、**1** による FKBP12 のラベル化は“蛋白質-リガンド相互作用” (FKBP12 とラベル化剤 **1** との相互作用) によって駆動されていることが示された。また、ペプチドマッピングの結果、FKBP12 のリガンド結合ポケットの入り口に存在する 55 番目のグルタミン酸 (Glu55) が部位特異的に修飾されていることが明らかとなった。

続いて、細胞内在性 FKBP12 のラベル化に取り組んだ。実験には、FKBP12 の内在発現が確認されているヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 A549 を用いた。細胞培養液に **1** (4 μ M) を加え、37°C で 18 時間静置した。その後、細胞をライセートにし、SDS-PAGE による分離後、FKBP12 抗体およびフルオレセイン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った (フルオレセイン抗体は OG も認識する)。その結果、他の蛋白質への非特異反応が若干あるものの、内在性 FKBP12 に高選択的に OG 色素がラベル化されていることが確認された。

上記の結果を踏まえ、我々は次に、細胞内に構築した OG ラベル化内在性 FKBP12 (OG-FKBP12) と他の蛋白質との相互作用を FRET イメージングによって可視化することを試みた。FKBP12 は免疫抑制剤である小分子ラパマイシンの存在下、FRB という蛋白質ドメインとヘテロ二量体を形成することが知られている^[7]。そこで本研究では、FRB に赤色蛍光蛋白質 DsRed を融合した蛋白質 (FRB-DsRed) をあらかじめ発現させた A549 細胞を用いることにした。なお、DsRed は OG 色素に対する FRET アクセプターとなる。先と同様の条件下、FRB-DsRed 発現細胞中の内在性 FKBP12 を **1** により蛍光ラベル化 (OG 標識) した。その後、ラパマイシン添加前後での蛍光イメージングを行い、OG 励起時における OG 由来の蛍光強度 (F_{OG}) と DsRed 由来の蛍光強度 (F_{DsRed}) の比 (F_{DsRed}/F_{OG} : R 値とする) に基づいたレシオ画像を取得した。その結果、ラパマイシンの添加によって R 値が顕著に増加し、OG から DsRed への FRET 効率が増加していることが明らかとなった (図 3 上段)。また、FKBP12 と FRB の二量化を誘導しない FK506 や DMSO を添加した場合、R 値の増加は見られなかった (図 3 下段)。以上の結果より、ラパマイ

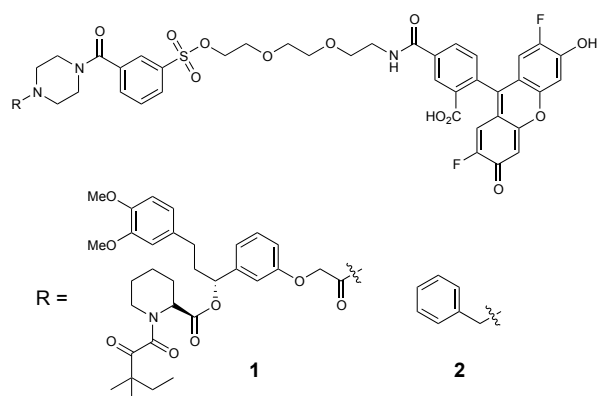


Fig. 2 Structures of LDT reagents **1** and **2**

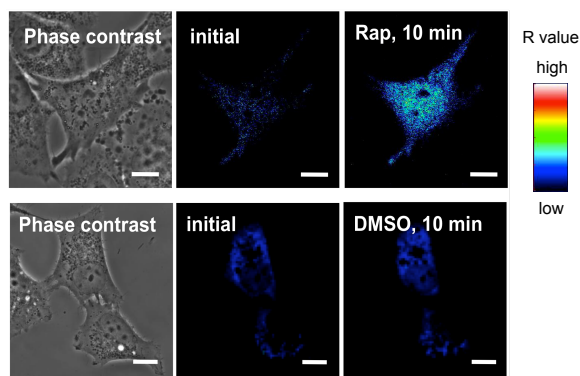


Fig. 3 FRET imaging of the rapamycin-mediated interaction of OG-FKBP12 and FRB-mCherry in living A549 cells. Scale bar, 10 μ m.

シンによる OG-FKBP12 と FRB-DsRed との複合体形成（相互作用）を生細胞 FRET イメージングにより可視化することに成功した。

② LDT 化学と遺伝子工学を融合した新しい細胞内蛋白質ラベリング法の開発

本研究では、LDT 化学と遺伝子工学（部位特異的アミノ酸変異法）を融合することで、より汎用的かつ高速・高効率な細胞内蛋白質ラベリング法の開発を目指した。まず、この背景となる実験結果について説明する。

我々は以前に、FKBP12 に対するラベル化剤として化合物 **3** (図@) を設計・合成した。**3** は、リガンドとトシル基間のスペーサーとしてエチレンジアミンを持ち、それ以外の部分は上記のラベル化剤 **1** とほぼ同一である。まず、**3** を用いた天然 FKBP12 のラベル化を評価した（以下、全て *in vitro* 系での実験）。pH 8.0 のバッファー水溶液中、FKBP12 と **3** (いずれも 15 μ M) を混合し、37°C でラベル化反応を行った。MALDI-TOF-MS による解析を行った結果、FKBP12 のラベル化が経時的に進行し、反応 24 時間後にはおよそ 20% の収率でラベル化 FKBP12 が得られることが確認された。このラベル化収率は、FKBP12 を **1** でラベル化したとき (①参照) と比べて顕著に低い。

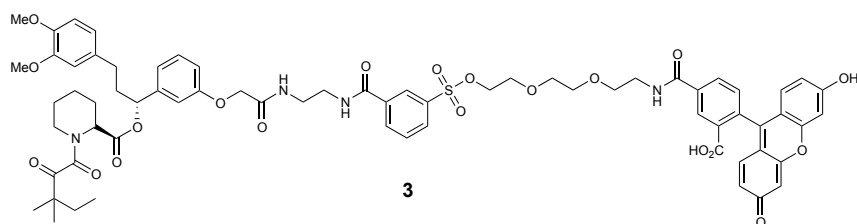


Fig. 4 Structure of LDT reagent **3**

この結果は、天然蛋白質を標的とした LDT 化学では、ラベル化の成否および効率がリガンドとトシル基間のスペーサー構造に大きく依存することを示している。したがって、このプロトタイプの LDT 化学だけでは限界がある。そこで本研究では、標的蛋白質のリガンド結合部位の周辺に人為的に高求核性アミノ酸「システイン (Cys)」を変異導入し、その Cys 導入蛋白質に対する LDT 化学を展開するという新しいアプローチを検討することにした。このように標的蛋白質に Cys を導入することで、1) 天然蛋白質に対してはラベル化効率の低いラベル化剤でも高効率なラベル化が可能になること（ラベル化剤の最適化のための試行錯誤の必要がなくなる）、2) より高速なラベル化が実現できること、3) Cys の導入位置を選ぶことで、蛋白質へのプローブ導入部位も人為的に選べるようになること、などを期待した。

上記の Cys 導入アプローチの有用性を検討するために、FKBP12 のさまざまな部位のアミノ酸を Cys に置換することにした。具体的には、FKBP12 と SLF リガンドの複合体の結晶構造 (PDB code: 1FKG) を基に、リガンド結合ポケット周辺の Lys48、Glu55、Tyr83、Thr86、Gly87、His88、Gly90、Ile91、およびこれらよりも離れた位置にあるアミノ酸を含め、計 30 種類の変異体を作成した。pH 8.0 のバッファー水溶液中、それぞれの変異体と **3** (いずれも 15 μ M) を混合し、37°C でラベル化反応を行った。ゲル電気泳動と *in-gel* 蛍光検出によるラベル化の評価を行い、天然型 FKBP12 に対するそれぞれの変異体の相対的なラベル化効率を比較検討した。その結果、ほとんどの変異体は天然型と同程度もしくはそれよりも低いラベル化効率しか示さなかった。一方、Thr86 を Cys に置換した FKBP12 だけは天然型よりも顕著に高いラベル化効率を示すことが明らかとなった。そこで、MALDI-TOF-MS を用いてより定量的な解析を行ったところ、T86C 変異体は天然型よりもおよそ 6 倍大きなラベル化反応初速度を示し、反応 12 時間後のラベル化収率は 80%（天然型の 4 倍）にも及ぶこ

とが明らかとなった。すなわち、変異導入部位の最適化が必要ではあるものの、LDT 化学と Cys 変異導入を融合するというアプローチによってたしかにラベル化の効率や速度を向上させられることを実証した。

現在、得られた T86C 変異型 FKBP12 と **3** との細胞内でのラベル化特性について評価する準備を進めている。

考察

本研究では、申請者オリジナルの LDT 化学をより実用的かつ革新的な細胞内蛋白質ラベリング・エンジニアリングツールとして発展させることを目的とした。プロジェクト①では、LDT 化学を用いて細胞内在性の蛋白質 (FKBP12) に小分子蛍光色素をラベル化し、その蛍光ラベル化内在性蛋白質と他の蛋白質 (FRB-mCherry) との相互作用を生細胞内でそのまま蛍光 FRET イメージングにより可視化することに成功した。この成果は、LDT 化学が内在性蛋白質の *live-cell* 蛍光イメージングに適用できることを実証したものであり、今後、さまざまな内在性蛋白質の機能解析への道が開かれたことになる。また、プロジェクト②では、LDT 化学と遺伝子工学 (標的蛋白質への Cys 変異導入) を融合することで、より汎用的かつ高速・高効率な細胞内蛋白質ラベリング法の開発を目指した。多くの変異体 (FKBP12) を試した結果、単に Cys を導入するだけではラベル化の高効率化が実現できるわけではなく、その導入部位も適切に選ばなければならないということが明らかとなった。一方、Cys の導入部位さえ適切であれば、同一のラベル化剤で天然型よりも高効率かつ高速なラベル化が達成できることを実証した。したがって、LDT 化学と遺伝子工学を融合したアプローチは、LDT 化学の有用性と適用範囲を確実に拡張するものである。今後更なる発展が期待される。

参考文献

1. S. Tsukiji, I. Hamachi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* in

press.

2. M. J. Hinner, K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2010, **21**, 766–776.
3. S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.*, 2009, **5**, 341–343.
4. Y. Takaoka, Y. Sun, S. Tsukiji, I. Hamachi, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 511–520.
5. S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9046–9054.
6. T. Tamura, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 2216–2226.
7. A. Fegan, B. White, J. C. T. Carlson, C. R. Wagner, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 3315–3336.

研究の発表

口頭発表

1. 築地真也「リガンド分子細工による新しいケミカルバイオロジー方法論の開拓」(若い世代の特別講演会)、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 23 日、立命館大学
2. 築地真也「細胞システムを解析・制御する新しいリガンド分子テクノロジー」、九州工業大学第 29 回歯工学連携講演会、2014 年 5 月 9 日、九州工業大学

誌上発表

1. T. Tamura, Y. Kioi, T. Miki, S. Tsukiji, I. Hamachi: Fluorophore labeling of native FKBP12 by ligand-directed tosyl chemistry allows detection of its molecular interactions in vitro and in living cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6782–6785, 2013.