

タンパク質表面の特異的な認識・変換素子の開発

井上 雅晶・浜地 格*

九州大学工学府物質創造工学専攻 ☎ 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

*九州大学先端物質化学研究所 ☎ 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

(2004 年 7 月 2 日受理)

Development of Artificial Molecules for Specific Recognition and Modification of Protein Surfaces

Masa-aki INOUE and Itaru HAMACHI*

Department of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581

*Institute for Materials Chemistry and Engineering (IMCE), Kyushu University, Fukuoka, 812-8581

(Received July 2, 2004)

Proteins and enzymes display many functions such as molecular recognition and catalysis. In addition, protein surface recognition via hydrogen bonding, electrostatic interactions and hydrophobic interactions mediate many biological processes including signal transduction, cell growth, and numerous metabolic pathways. In these processes, protein surface/surface interaction plays a key role. Thus, the development of useful strategies to recognize and modify a specific site of protein surface artificially is quite important not only to understand biological systems, but also to create artificial proteins. Here, we describe several new strategies for specific recognition and modification of protein surfaces.

1. はじめに

生体内において遺伝子および糖鎖と並んで、タンパク質は主な生体高分子の1つとされている。遺伝子が生物情報の担い手であるのに対して、タンパク質はすべての生物の中で起こる認識を含めた化学反応などの様々な機能を司っている。タンパク質は地球上に100億から1兆種類存在しているといわれているが、これらは基本的にわずか20種類のアミノ酸で構成されている。これらのアミノ酸が一本の長い鎖として連結し、折りたたまれることで様々な形態をとり、機能を果たす。また、タンパク質の特定部位が、糖鎖修飾やリン酸化などの翻訳後修飾を受けることで大きな構造的な変化が生じ、機能の調節・制御が起こる。さらに、生体内ではタンパク質単独での機能の他に、複数のタンパク質の表面と表面が水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用などで連結し接触することで様々な情報の受け渡しやネットワーク化が可能となる。このようなタンパク質表面同士の相互作用は、シグナル伝達、細胞成長、代謝等の制御過程において共

通する重要な要素である。そのため、タンパク質同士の表面相互作用は、様々な生命現象を正確に遂行するため一種の‘生体内言語’とみなすことができる(Fig. 1)。また、表面相互作用のやり取りがうまく行われなかった場合、様々な疾病の原因となることも明らかとなってきた。構造あるいは表面相互作用形態が機能に直結しているタンパク質表面を人工的に認識・化学変換できれば、タンパク質の機能変換による人工タンパク質の創製やタンパク質表面構造の変化に伴う相互作用の分断による生体内情報ネットワークの制御が実現すると考えられている。したがって、タンパク質表面の特異的な認識・変換素子やその化学手法の開発は、21世紀の化学が取り組むべき極めて魅力的な課題であり、ポストゲノム時代を迎えたバイオサイエンスとテクノロジーに大きく貢献するものと期待される。

本小論の表題は「タンパク質表面の特異的な認識・変換素子の開発」である。タンパク質表面を認識・化学変換の対象として有機化学的な観点から眺めると、その複雑かつ多様な構造に驚かされる。タンパク質は折りたたまれた状態で、多種多様なアミノ酸残基が反応性の官能基として表面に存在している。しかもタンパク質は機能

E-mail: itarutcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

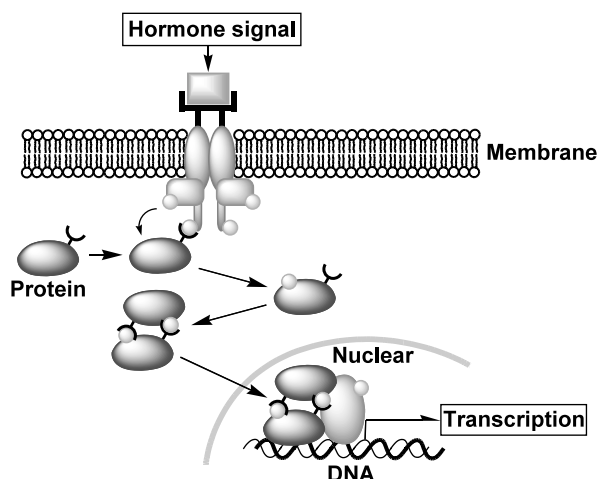


Fig. 1. Schematic representation of intracellular signal transduction mechanism through protein surface interaction and/or modification.

の獲得・制御のためにリン酸化，糖鎖修飾などの表面修飾を受け，さらに多様な官能基が付加されている。また複数のタンパク質が複合体を形成している場合には，1つのアミノ酸残基同士による1:1の相互作用で結合しているわけではなく，タンパク質表面に存在する様々なアミノ酸残基が前述した相互作用をいくつも使用し，非常に広範囲（ >900 ）にわたって表面接触することで安定に，強く結合している。そのため，タンパク質表面の特定アミノ酸残基を位置および官能基選択的に正確に区別し，かつタンパク質同士の表面接触に打ち勝って認識・化学変換することはかなりの困難が予想される。さらに，タンパク質の機能の場は有機化学が苦手とする水中である。タンパク質表面のアミノ酸残基は水分子によって高度に溶媒和され覆われているため，これまで確立された有機化学的なアプローチはほとんど通用しない。このように考えると，タンパク質をそのまま有機化学するには，タンパク質専用の新たな戦略が要求されるといえる。

以下に我々がこれまで行ってきた研究を含めてタンパク質表面の認識・化学変換に関する有機化学的手法の近年の研究例を紹介する。

2. タンパク質表面の選択的な認識

タンパク質表面は，前述したように様々な官能基が複雑に存在しかつそれらが高度に水和されている。そのため，タンパク質表面の分子認識はマクロ疎水場を利用できる核酸塩基のそれと比較して大きく遅れている。Hamiltonらは，オリゴグアニジン型の人工レセプター分子が， α -ヘリックス性ペプチドの $i, i+3, i+6, i+9$ の位置に存在する複数のグルタミン酸を認識することを示

した。このレセプター分子は，ペプチドだけではなくタンパク質上に存在する複数のアニオン性アミノ酸残基（グルタミン酸等）に架橋して結合することが可能であった¹⁾。また，彼らは，環状ペプチドをカリックスアレンという環状フェノールテンプレート上に集積させたホスト分子によって，特定のタンパク質表面の認識に成功している²⁾。

同様の戦略によって，ポルフィリン環を鋳型としたポリアミン集積型レセプター分子が，四量体を形成するカリウムイオンチャンネルにナノモルオーダーの親和性で相互作用し，その機能を阻害することが最近 Trauner らによって報告されている³⁾。この分子は化学的な修飾が容易に行えるため，様々なカリウムイオンチャンネルに適用可能であると期待される。

Tsien らは有機ヒ素化合物とタンパク質上の固有配列を持つチオール基との特異的な反応特性に着目し，細胞内タンパク質のセンシングを可能とする蛍光プローブ分子の開発を行った⁴⁾。フルオロセインやレゾルフィンなどの蛍光色素に2つのヒ素原子を導入した FIAsh-EDT₂ および ReAsH-EDT₂ はタンパク質上に組み込んだテトラシステインループ（-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys-）に選択的かつ高い親和性（解離定数（ K_d ）： $\sim 10^{-11}$ M）で結合し，蛍光強度を大きく増強させる。彼らは，これらの分子のタンパク質表面に導入したタグとの認識を用いて細胞間で低分子輸送や電気的共役を行う膜タンパク質の細胞内での時空間的な可視化を実現した。

我々のグループでは，タンパク質表面に存在するリン酸基を標的とした人工レセプター分子の開発を精力的に展開している。タンパク質のリン酸化は，糖鎖修飾と並ぶ生体内タンパク質の翻訳後修飾の代表例である。すなわち，タンパク質のリン酸化-脱リン酸化は細胞内シグナル伝達において最も普遍的な伝達機構の1つとして位置づけられている。シグナル伝達に関わるタンパク質は，リン酸化による立体構造の大きな変化に伴った触媒活性やSH2などのリン酸化タンパク質結合ドメインを介した他のタンパク質との相互作用制御を受けることが明らかとなっている。このような生体内での役割の重要性のため，タンパク質表面のリン酸基を標的とした認識・変換素子の開発はリン酸化タンパク質表面での有機化学の基礎的発展のためだけではなく，生命科学・バイオテクノロジーの分野においても非常に有用な分子ツールとなりうると考えられる。ところが，これまでにリン酸化タンパク質上のリン酸基を特異的に認識可能な人工低分子などは全く知られていなかった。それどころか，水中でリン酸基と強く（解離定数にしてマイクロモルオーダー以下で）相互作用できる分子さえも非常に限られた例し

か報告がなされていない。

我々が開発したリン酸化タンパク質を認識する人工レセプター分子の代表的な構造を Fig. 2 に示す。これらはいずれも2核の亜鉛-ジピコリルアミン (Dpa) 錯体である。この錯体が水中において金属-配位子相互作用によってリン酸基と強く結合することが明らかになった。この例から示されるように、金属-配位子相互作用は水中においてリン酸基と結合する認識モジュールとして有効である。化合物 1, 2 はリン酸化ペプチド上のモノリン酸基と特異的に相互作用する (Fig. 3)。その親和性はリン酸化アミノ酸周囲のアミノ酸配列に依存するが強いものでは K_d にして 100 nM にまで達した。また、幸いなことにこれらの人工レセプター分子はリン酸基との結合に伴って、アントラセン由来の蛍光強度を増強させることから、リン酸化タンパク質特異的な蛍光センサーとして機能する可能性を偶然発見した⁵⁾。実際にリン酸化タンパク質を用いて蛍光滴定測定を行った結果、タンパク質上のリン酸基数の違いに伴った蛍光強度変化を示した。また、複数のタンパク質の分離・分析に汎用されるゲル電気泳動の染色剤として用いたところ、様々なタンパク質の中でリン酸化タンパク質のみを選択的に染色可

能であった (Fig. 4)⁶⁾。この他にも、これらの人工レセプター分子はホスファターゼによって触媒されるリン酸化ペプチドの脱リン酸化反応を蛍光強度の変化によってモニタリング可能であることを示した⁴⁾。このように基礎的なタンパク質表面での分子認識の知見が様々な応用につながる可能性が出てきている。

一方、化合物 3, 4 はリン酸化タンパク質上の2つのリン酸基に架橋構造を形成して相互作用する (Fig. 3)。また、化合物 4 はリン酸基を認識する際、ピピリジル由来の蛍光強度変化が観測され、ペプチド上の複数のリン酸基を蛍光センシング可能であった⁷⁾。複数のアミノ酸残基が同時にリン酸化を受けるハイパー (高次) リン酸化は、シグナル伝達にかかわるタンパク質でしばしば見られる現象である。化合物 3, 4 はタンパク質表面上に存在するリン酸化アミノ酸間の距離に依存した認識が可能となる。

今後、リン酸化タンパク質に対する認識選択性や親和性をさらに向上させることが課題であるが、われわれが示した成果はリン酸化タンパク質を標的とした表面修飾・化学変換の実現につながると期待される。

3. タンパク質表面の選択的な化学変換

タンパク質表面を選択的に化学変換するためには、タンパク質表面で選択的な修飾反応を行う必要がある。当然、この修飾反応は水中で効率的に進行しなければならない。一般的に、遺伝子工学により部位特異的にシステインを組み込みチオール基の高い求核性を利用してタンパク質上に人工官能基を挿入する手法が古くから用いられてきた。この手法を利用して人工修飾された様々な機能性タンパク質が報告されているが、必ずしもすべてのタンパク質に適用可能なものではない。そこで最近では、非生命系の官能基を部位特異的に導入し、タンパク質を人工修飾する手法が開発されている。中でもアジド基あるいはケトン基を利用した修飾反応が注目を集めている。Bertozzi らは、アジド基とトリアリールホスフィンとの Staudinger 反応をタンパク質表面の選択的修飾に利用している (Fig. 5 (a))⁸⁾。彼らは、タンパク質上に遺伝子工学的に非天然アミノ酸のアジド基を導入し、そのアジド基とアリールホスフィン誘導体を Staudinger 反応させることでタンパク質表面を蛍光色素修飾することに成功している。また、Sharpless らは Cu (I) 触媒によるアジド基とアルキンとの [3 + 2] 環化付加反応がタンパク質表面の選択的修飾に有効であることを示した (Fig. 5 (b))⁹⁾。彼らは、ウイルスのコートタンパク質上に発生させたアジド基にフルオロセインのアルキン誘導体を反応させ、ウイルス表面を高効率で蛍光修飾することに

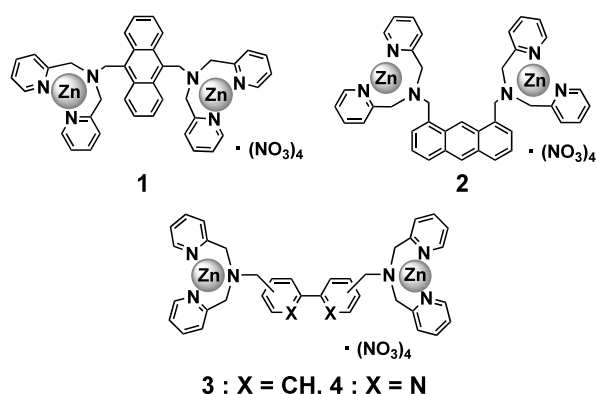


Fig. 2. Molecular structures of artificial receptors.

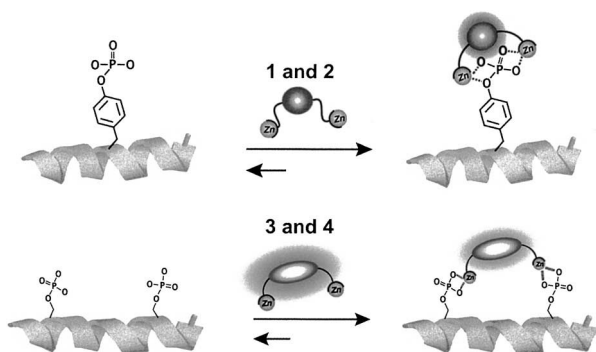


Fig. 3. Schematic representation of phosphorylated peptide recognition with an artificial receptor.

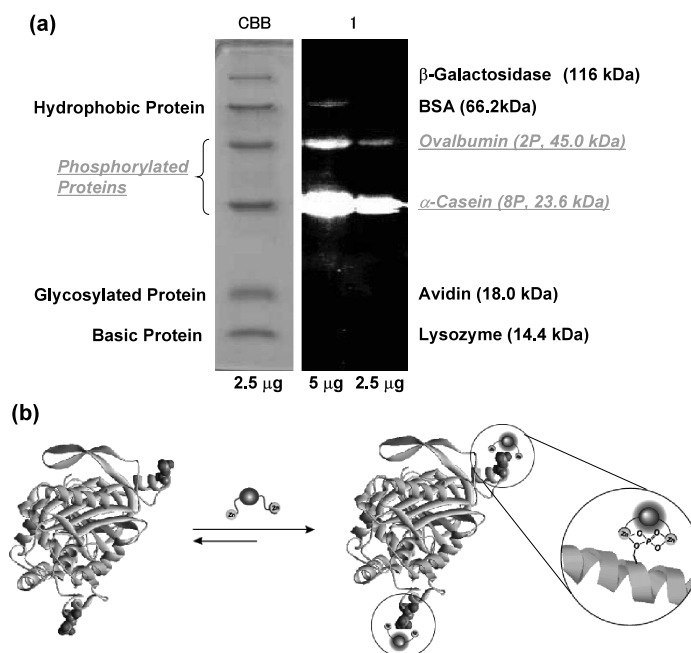


Fig. 4. (a) Phosphoprotein selective detection in SDS-polyacrylamide gels using **1**. Each lane includes two phosphorylated proteins and four nonphosphorylated proteins. Left: CBB staining of the 6 proteins. Right: Detection of the phosphoproteins with UV transilluminator after staining with **1**. (b) Schematic representation of the phosphoprotein recognition with artificial receptor.

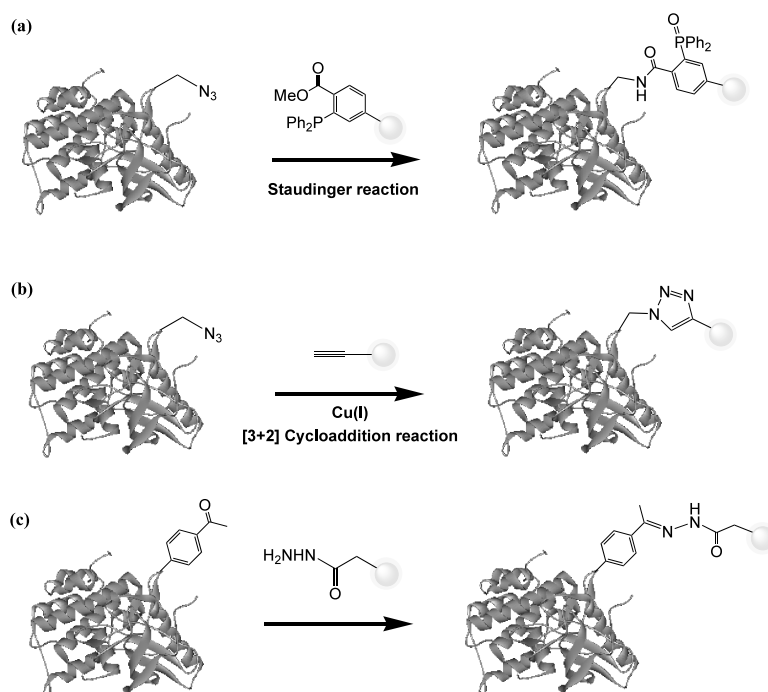


Fig. 5. Specific reactions of protein surfaces using bio-orthogonal functional groups.

成功している。一方、ケトン基は有機合成においては最も頻繁に利用される官能基の1つであるが、通常のタンパク質上には存在しない官能基である。そこで Schultzらは、このようなケトン基の特性に着目してタンパク質上でのカルボニルケミストリーを行っている。彼らは、遺伝子工学的に非天然アミノ酸としてケトン基をタンパク質に組み込み、そこで生じたケトン基とヒドラジドとの特異的な反応を利用することでタンパク質表面の蛍光色素やビオチン修飾に成功した (Fig. 5 (c))⁹⁾。これらの手法はタンパク質表面の修飾反応を簡便かつ選択的に進行させるものである。さらに、非生命系の官能基を用いることで修飾反応の汎用性を拡張するものであり、今後これらの手法は様々なタンパク質の特異的修飾に適用されていくと考えられる。

4. 表面認識と化学変換を組み合わせた機能性タンパク質の創製

タンパク質表面を部位特異的に認識し、その認識に伴った特異的な化学変換が行えれば、タンパク質の機能変換が可能となり、既存のタンパク質を自由自在に人工タンパク質へと作り変えることができる。しかし、これまで述べた通り、タンパク質表面での認識も変換も未成熟な化学であるため、この2つの過程をタンパク質表面で行うことは現時点では非常に困難である。そこで、特異的な認識過程を酵素やタンパク質が持ち合わせている基質認識能を利用することが人工タンパク質創製への1つの近道となると考えられる。すなわち、タンパク質が元々有している基質認識能とタンパク質表面の部位特異的な化学変換法を組み合わせることで人工タンパク質を容易に作り出せることが期待される。

タンパク質表面の部位特異的な化学変換法として光アフィニティーラベル化法に我々は着目した。従来光アフィニティーラベル化法は、タンパク質の基質認識能 (タンパク質-リガンド相互作用) を利用した化学修飾法の1つである。この手法は、タンパク質に親和性があるリガンドに光反応基を導入したラベル化剤を合成すれば、どのようなタンパク質にも活性部位特異的に修飾可能である。そこで我々は、光アフィニティーラベル化法に用いられるラベル化剤にある種の化学的仕掛けを施すことで、タンパク質表面の特異的な修飾および機能性分子導入による蛍光性糖バイオセンサーの開発に成功した¹¹⁾。

レクチンは糖結合性タンパク質の一群で、特定の糖鎖をその結合ポケットで選択的に認識する機能を有している。その糖鎖に対する高い認識能を利用することで、糖鎖リガンドを持つ小分子を用いたアフィニティーラベル化が可能となる。我々は、Fig. 6 に示すようなレクチン

の結合ポケットに認識される小分子を設計し、光アフィニティーラベル化を行った。次にラベル化部位のジスルフィド結合を還元すると、糖部位が切り出されてレクチン表面に反応性の高いチオール基が発生する。このチオール基に様々な人工分子を共有結合によって導入することでレクチンの人工機能化が可能となった。例えば、周囲のミクロ環境に感受性の高い蛍光色素プローブを導入すると、結合ポケットへの糖の結合に伴ってプローブの蛍光強度と蛍光波長が変化することで、糖の蛍光センシングが実現した (Fig. 7)。この蛍光性人工レクチンは、天然のレクチン自体が持っている糖結合能や選択性を保持していることを様々な糖鎖の認識に伴った蛍光変化によって確認した。得られたラベル化レクチンを用いて詳細な構造解析を行った結果、糖結合ポケット近傍の100番目のチロシン残基に位置特異的に修飾反応が進行していることが明らかとなった。すなわち、レクチンの認識

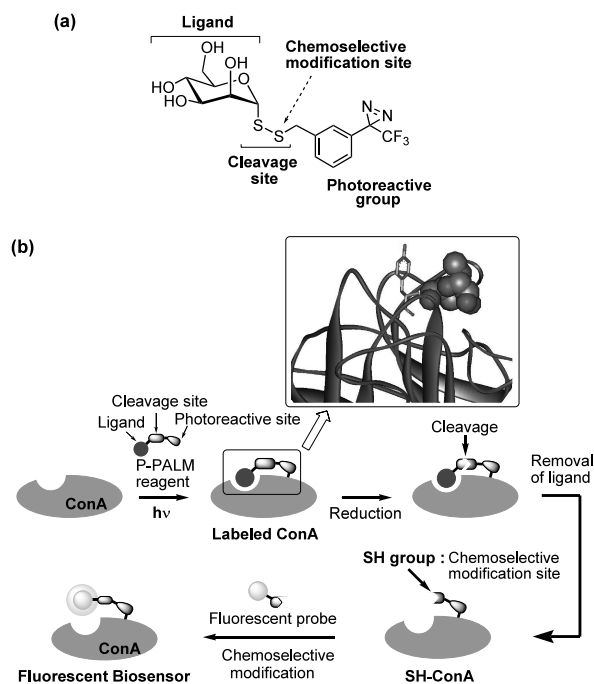


Fig. 6. (a) Molecular structure of a P-PALM reagent. (b) P-PALM scheme for semisynthesis of the fluorescent biosensor.

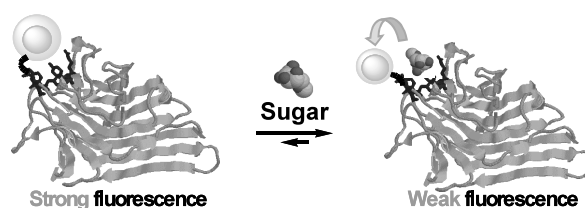


Fig. 7. Schematic illustration of the sensing mode of fluorescent ConA.

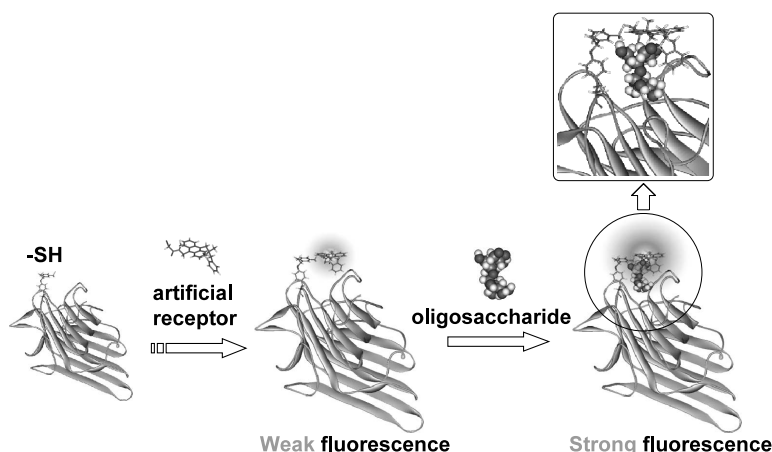


Fig. 8. Schematic illustration of oligosaccharide recognition with fluorescent biosensor introducing phenylboronic acid.

能を利用した結合ポケット近傍での部位特異的な化学変換によって糖鎖バイオセンサーを構築できたことになる。我々は、このタンパク質表面の部位特異的な化学変換法を光アフィニティーラベル化後修飾法（通称：P-PALM 法）と呼んでいる。

また、機能性人工分子をレクチン表面に導入することで、さらに興味深いレクチンの人工機能化が達成される。例えば、人工糖レセプターであるフェニルボロン酸を有する蛍光性分子が同様の手法によってレクチン上に修飾された。この蛍光性レクチンは、天然レクチンの糖認識能とフェニルボロン酸由来の糖選択性が組み合わせられ、特定のオリゴ糖に高い認識選択性を有する新しい糖鎖バイオセンサーとして機能する（Fig. 8）²⁾。

我々が開発した P-PALM 法は、タンパク質の特異的な構造・機能変換を行うための非常に有効な手法となると考えられる。また、ラベル化剤のリガンド部位を構造・機能変換したいタンパク質に応じて変えさえすれば、様々な人工タンパク質を創製可能な一般性も持ち合わせている。

5. おわりに

本小論では、タンパク質表面の特定部位を選択的に認識あるいは化学変換するための手法について紹介した。今回紹介した手法は、構造が複雑で多様なタンパク質表面を認識・構造変換の対象として有機化学の観点から見つめ直すことで、これまで化学者にとって困難とされてきた課題を克服しようとした報告例であり、タンパク質専用の有機化学を実現するための第一歩である。これらは、タンパク質表面を認識・構造変換するための 1 つの手法ではあるが、これからのポストゲノム時代の生命化学研究に対して一石を投じる成果であると考えられる。

タンパク質表面有機化学による認識・構造変換の汎用性の拡張やタンパク質表面有機化学を機能性人工タンパク質創製のための手法に発展させるには、これからの化学者の果敢な挑戦が不可欠であると思われる。

文 献

- 1) a) X. Salvatella, M. Martinella, M. Gairi, M.G. Mateu, M. Feliz and A.D. Hamilton: *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 196 (2004); b) T. Haack, M.W. Pecuh, X. Salvatella, J. S-Quesada, J. de Mendoza, A.D. Hamilton and E. Giralt: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11813 (1999).
- 2) M.A. Blaskovich, Q. Lin, F.L. Delalure, J. Sun, H.S. Park, D. Coppola, A.D. Hamilton and S.M. Sebt: *Nature Biotech.* **18**, 1065 (2000).
- 3) S.F. Gradl, J.P. Felix, E.Y. Isacoff, M.L. Garcia and D. Trauner: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12668 (2003).
- 4) J. Zhang, R.E. Campbell, A.Y. Ting and R.Y. Tsien: *Nature Rev.* **3**, 906 (2002).
- 5) A. Ojida, Y. Mito-oka, K. Sada and I. Hamachi: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2454 (2004).
- 6) A. Ojida, T. Kohira and I. Hamachi: *Chem. Lett.* **33**, 1024 (2004).
- 7) A. Ojida, M. Inoue, Y. Mito-oka and I. Hamachi: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10184 (2003).
- 8) a) E. Saxon, S.J. Luchansky, H.C. Hang, C. Yu, S.C. Lee and C.R. Bertozzi: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14893 (2002); b) G.A. Lemieux, C.L. Graffenried and C.R. Bertozzi: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4708 (2003).
- 9) Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless and M.G. Finn: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3192 (2003).
- 10) L. Wang, Z. Zhang, A. Brock and P.G. Schultz: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 56 (2003).
- 11) T. Nagase, E. Nakata, S. Shinkai and I. Hamachi: *Chem. Eur. J.* **9**, 3660 (2003).
- 12) E. Nakata, T. Nagase, S. Shinkai and I. Hamachi: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 490 (2004).