

金ナノ粒子の光学的特性を利用した標的タンパク質標識技術の開発

東京農工大学 大学院工学研究院生命工学専攻

櫻井 香里*

1. はじめに

天然生理活性分子(天然物)は、がんや感染症を克服する低分子医薬品および抗体薬物複合体の基盤分子として、また生命科学研究のツールとして役割がますます重要視されている。多くの天然物は、複数の細胞タンパク質と相互作用して複合的に薬理活性を発現することが知られている。特に中分子サイズの化合物の場合は、コンフォメーション変化にもとづく動的な分子構造を有し、異なる標的分子への結合特性や細胞内局在特性を示すと考えられる。したがって、標的タンパク質の解明は天然物の特異な作用機序を理解するための重要な第一歩である。その上で標的タンパク質が局在する細胞内の標的部位や標的経路を解読する必要がある。しかし、天然物の標的タンパク質を発見するための技術の開発は遅れている。天然物を効果的に利用し、多様化する医療ニーズに答えるためには、標的特定のための合理的な基盤技術を確立し、天然物の作用機構解明と応用のルーチン化が急務である。

標的タンパク質を多くの細胞内タンパク質の中から直接探索するための強力な方法として、最近ではリガンドを種々の機能を有するタグで誘導化したケミカルプローブ法が用いられている¹⁾⁻³⁾。ケミカルプローブによる標的特定法には、大きく分けて2つのアプローチがある。プローブ分子を用いて標的タンパク質を捕捉する際に、プローブとの間に共有結合を形成するか否かで区別される。非共有結合理型プローブは、目的の化合物とビオチン基などの精製タグから構成される。一方、共有結合理型プローブは、精製タグと光反応基などのタンパク質を標識するためのラベル基から構成され、親和性依存的にリガンドとその標的との間の不可逆的に架橋反応を促進する。これらのアプローチは、ケミカルプローブとタンパク質の直接的な相互作用を利用し、親和性を指標として標的タンパク質の発見を可能にする。広く使用されているにもかかわらず、ケミカルプローブによる標的特定研究は、非特異的タンパク質の共精製や、目的の標的タンパク質の精製効率の低さといった技術的な問題によってしばしば妨げられている。これらの問題を解決するため、プローブの新規設計による標的タンパク質の探索機能の向上が求められている。本研究は、天然物の作用機構解明の迅速化を目的として、効率的な標的タンパク質標識を可能にする金ナノ粒子プローブを設計した。

2. 金ナノ粒子プローブによる標的タンパク質標識法

代表的な非共有結合理型プローブであるビオチンプローブを用いるアフィニティー精製法は、簡便であるために古くより標的タンパク質の特定研究において頻用されてきたが、1.で述べた技術的な問題点のため、低親和性タンパク質や低発現タンパク質、膜タンパク質などの探索には適していない。共有結合理型プローブは、特に天然物とタンパク質との結

合相互作用が一過性で不安定な場合に、それを解決する補完的な方法を提供する。フォトアフィニティーラベリング(PAL)は、光反応基と検出基を有する生物活性分子のプロープを用いて、これに結合する標的タンパク質を、PAL による共有結合で不可逆的に捕捉し質量分析により同定できる最も直接的で有効な手法である。フォトアフィニティープロープは、PAL により標的タンパク質を直接標識することで、その網羅的な発見および検証を可能とする。このため、生体内における医薬品の相互作用解析法および検証法として期待され、近年高感度質量分析法と組み合わせて用いられている。一方で、克服すべき課題として、(1)プロープ合成の難しさ、(2)標的タンパク質の標識効率の低さ、(3)標的タンパク質の精製効率の低さ、があげられる。私たちの研究グループでは、これらの問題を一体的に解決すべく、PAL 反応を高効率化し、精製担体として機能する金ナノ粒子を用いた画期的なプロープを世界で初めて開発した⁴⁾。本プロープは、ナノ粒子表面上に化合物と光反応基を高密度に近接させることで、標的タンパク質と低濃度($\sim$ nM)で強く結合し効率的かつ選択的に反応でき、また金の高比重性を利用して遠心濃縮により精製できる。粒径 5-20 nm の金ナノ粒子は 300-10 万個の分子を自在に表面修飾することが可能であることから、提示する分子構造の変更や多機能化が容易である。しかし、上述の課題(2)はさらなる改良が望まれる。そこで、タンパク質表面残基に対して、従来型のラベル基よりも高反応性を示す官能基を探索することで、金ナノ粒子プロープを用いた標的タンパク質標識法のさらなる効率化が可能となると考えた。

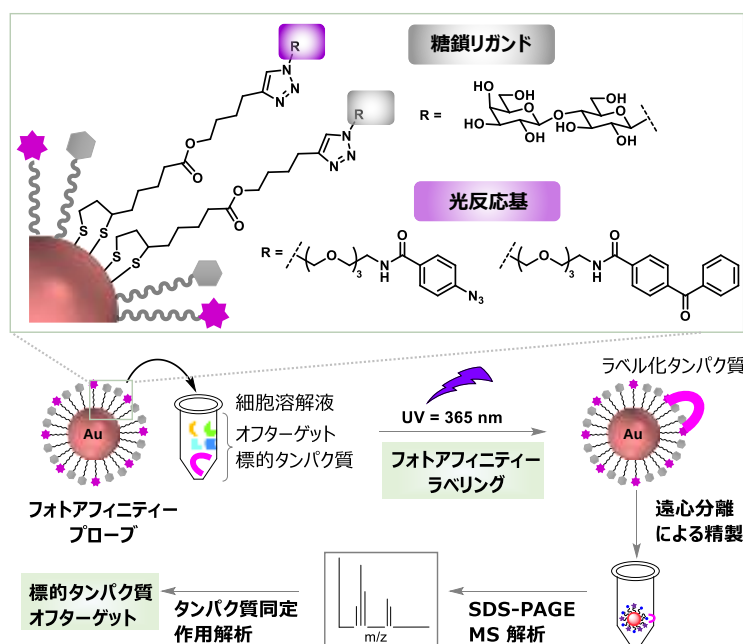


図 1. 金ナノ粒子プロープを用いた標的タンパク質探索法

3. 金ナノ粒子プロープを用いた新規標的タンパク質標識法

本研究では、これまでに申請者が開発した金ナノ粒子プローブを標的タンパク質網羅同定のための基盤技術として発展させるため、以下の(1)と(2)の2つの新規方法論を検討した。

(1)新規求電子基を利用した標的タンパク質標識法

(2)光駆動型反応基を利用した標的タンパク質標識法

(1)新規求電子基を利用した標的タンパク質標識法

私たちはこれまでに、リガンドと求電子基を多数・高密度に修飾した金ナノ粒子プローブを開発し、アリールスルホニルフロリド基を有望なラベル基として見出した⁵⁾⁻⁶⁾。本研究では、さらに広範な種類の求電子基を探索すべく、タンパク質と反応させた報告例があり、標的アミノ酸残基や反応機構が異なる官能基を選定した⁷⁾。ジアリールホスホラミドは、その中心原子である P(V)でセリン(Ser)およびスレオニン(Thr)と反応することが報告されている。ジクロロトリアジンは、主に SNAr 反応によってリジン(Lys)およびチロシン(Tyr)と反応する。アリールイソオキサゾールは従来型の求電子基ではないが、302nmの光照射により求電子性のイミノニトリル中間体を生成する。この求電子性中間体がアスパラギン酸(Asp)やグルタミン酸(Glu)のカルボン酸部分と反応してジアシル化ヒドラジンを生成する。エポキシドは S_N2 反応によって Cys、Lys、ヒスチジン(His)と反応する。また、S(VI)中心への求核付加を介して Lys、Tyr、Cys、His、Ser および Thr と反応するアリールスルホニルフルオリドをポジティブコントロールとして採用した。

これらの異なるラベル基の反応性を比較評価するため、モデル系リガンドであるラクトースと、5種類の求電子基と2:1の提示比率で導入した金ナノ粒子プローブを設計した(図2)。修飾金ナノ粒子は分散性の保持が主要な課題であるため、次の2点を考慮した。先行研究において、親水性分子であるラクトースと疎水性が高い光反応基を共修飾した金ナノ粒子において、2:1の混合比において分散性および反応性が最適であった⁵⁾。またリガンドや求電子基と金ナノ粒子固定化部位を有するリポ酸をつなぐリンカーとして、比較的長いポリエチレングリコール(PEG)を採用した。リガンドおよびラベル基のそれぞれを配したビルディングブロックはリポ酸誘導体として合成した。先行研究に準じて、直径13nmの金ナノ粒子を用い、リガンドとラベル基から成るビルディングブロックを2段階のリガンド交換法により金ナノ粒子に修飾した。金ナノ粒子の修飾化と水分散性は、UV-VIS分光法、動的光散乱法、アガロースゲル電気泳動、MALDI-MS解析により検証した。

ラクトースのみを修飾した金ナノ粒子プローブを別途合成し、これを用いてモデル系標的タンパク質に対する結合親和性を評価した。ピーナッツアグルチニン(PNA)に対するプルダウンアッセイを行った結果、ラクトースプローブはPNAと高い親和性を示し、K_d値は6nMであった。PNAは単量体のラクトース分子とK_d=0.4mMで結合することから、金ナノ粒子上に多数のリガンド分子を高密度に修飾したことによるクラスター効果が得られていることが確認できた。

次に、5種類の異なるラベル基を有する金ナノ粒子プローブについて、PNAに対する標識効率および選択性を評価した。プローブを50nMの濃度でPNAと4°Cで2時間反応させた後、反応混合物はSDS-PAGEで分離し、プローブで標識されたタンパク質をゲルイメージングで解析した。アリールイソオキサゾールプローブは、4°Cで2時間インキュベートした後、UV照射下で30分間反応させた。その結果、すべてのプローブは19-36%の効率でPNAと共有結合を形成した。この中で、アリールイソオキサゾール基およびアリ

ールスルホニル基を有するプローブが特に高い効率を示した。PNA と 5 倍過剰量の非標的タンパク質 BSA の混合溶液を用いて反応を行ったところ、ジクロロトリアジンプローブが、他の 4 種のラベル基よりも PNA に対して高い反応効率を与えた。一方、アリールイソオキサゾールプローブおよびアリールスルホニルプローブは非標的タンパク質存在下では PNA に対する反応性が低下することが示唆された。

また、ジクロロトリアジンプローブについて、PNA における標識部位を LC-MS/MS 法を用いて解析したところ、4 つのアミノ酸残基、Ser、Thr、Asn、Asp が反応残基であることが明らかになった。ジクロロトリアジンはこれまでに主に Lys や Tyr と反応することが報告されている⁸⁾。本研究の結果より、ジクロロトリアジンはタンパク質表面に多く発現することが知られる多様なアミノ酸残基を標識することが可能であり、標的タンパク質の効率的な補足に適した官能基であることを示唆している。

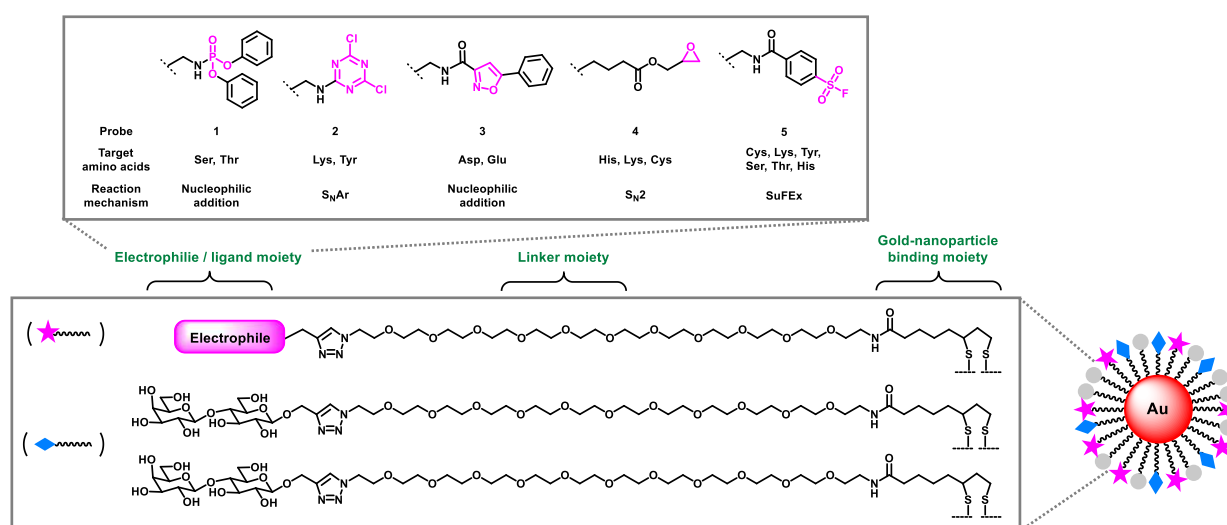


図 2. 求電子性金ナノ粒子プローブの構造

(2) 光駆動型反応基を利用した標的タンパク質標識法

本研究では、光照射条件を利用した標的タンパク質標識を可能とするための金ナノ粒子プローブを設計し、合成した。上記(1)の研究でも用いたラクトースの他に、抗がん活性天然物であるタキソールおよびジゴキシンをモデル系リガンドとして取り上げた(図3)。上述の通り、修飾金ナノ粒子は水分散性の保持が最重要であるため、様々な天然物への応用を検討すべく、既知標的タンパクを持つ疎水性のリガンドも含めて選定し、分散性の高いプローブの設計を目指した。ラベル基は、主要な官能基としてよく用いられるベンゾフェノン、アリールアジド、アリルトリフルオロメチルジアジリンに加え、求電子基としてアリールスルホニルフロリド、エポキシド、アリールイソオキサゾールおよびアリールテトラゾール基を採用した。リガンドやラベル基と、PEG鎖末端にアジド基またはアミノ基を有するリポ酸誘導体とカップリングしたビルディングブロックを合成し、その後に金ナノ粒子へ修飾することとした。タキソールは、構造活性相関データに基づいて、C7位をリンカー部位とした活性型リガンド、またC2'位をリンカー部位とした不活性型リガンドを設計した。C7位およびC2'位をスクシニル化した後、リポ酸誘導体のアミノ基末端とカッ

プリングした。一方ジゴキシンは、山口エステル法による C4''' 位選択的なエステル化でアルキン基を導入し、click chemistry を用いてアジド基を有するリポ酸誘導体とカップリングした。

次に、リガンドと異なる種類の光反応基を金ナノ粒子へ修飾したプローブを、(1)で既述のリガンド交換法を用いて作成した。ラクトース以外のリガンドは、リガンド：光反応基：PEG スペーサーの比率を様々に変えて作成した。UV-VIS 分光法、動的光散乱法、アガロース電気泳動による解析の結果、リガンド：ジアジリン基：PEG スペーサー=1:1:8 およびスペーサーの比率がより高いケースにおいて、分散性が保持できることが分かった。

作成したラクトースプローブを用いて、既知の標的タンパク質 PNA と各ラベル基に適した光照射条件下で反応させたところ、ベンゾフェノンプローブとアリアルテトラゾールプローブが高い反応性を示した。また、非特異的タンパク質として BSA を共存させた条件下では、アリアルテトラゾールプローブにおいて、高い反応性及び選択性が確認された。アリアルテトラゾール基は、アリアルイソオキサゾール基と同様に、光照射により求電子性反応中間体を生じる光駆動型反応基として、比較的最近になってタンパク質のラベリングに利用されるようになったラベル基である。本研究は主要な従来型の光反応基との比較解析を通してアリアルテトラゾール基の優位性を初めて明らかにした。従来法では、PAL 反応の効率や選択性が低いため標的分子の同定が困難な場合が多くあったが、本技術はそのようなケースにおいても有効であると考えられる。

さらに、アリアルアジド、アリアルスフホニルフロリド、エポキシドのそれぞれと共修飾したラクトースプローブを用いて、緑色光照射下での PAL 反応を検討した。金ナノ粒子は、粒径に依存した可視・近赤外光の吸収により、表面プラズモン共鳴 (SPR) を起こし発熱する固有のフォトサーマル効果を示す⁹⁾。本研究で用いた直径 13 nm の金ナノ粒子は、UV-VIS スペクトルにおいて 520 nm 付近に SPR による吸収ピークを示す。フォトサーマル効果による局所的な昇温により、室温付近では反応性の低いラベル基が活性化され、タンパク質とのアフィニティーラベリングが促進されることを期待した。各プローブを PNA と混合して、光照射条件下に付したところ、いずれのプローブにおいても 5 分間の反応時間でタンパク質の標識が確認できた。しかしネガティブコントロールとして、ラクトースのみ修飾したプローブを同様の反応条件下に付したところ、PNA の捕捉が認められた。このことから、金ナノ粒子自体との非選択的な結合形成を起こす可能性が示唆された。そこでアリアルスフホニルフロリドプローブおよびラクトースプローブを用いた反応において、照射光の強度を減弱し、反応時間を 2 分間に短縮したところ、アリアルスフホニルフロリドプローブでは優位に PNA の標識化が進行した。この結果より、金ナノ粒子およびラベル基の活性化条件を最適化することで、プローブに結合したタンパク質を選択的に標識可能であることが示唆された。

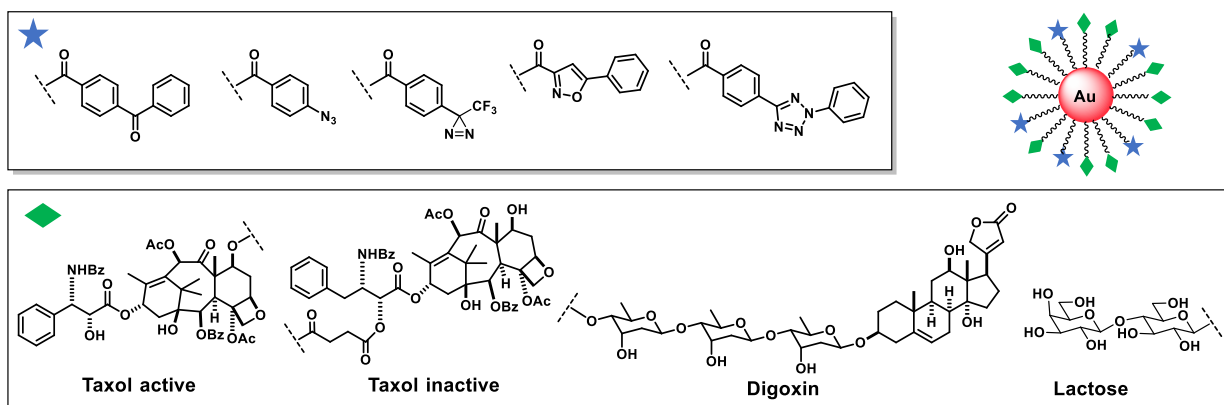


図 3. 天然物と光反応基を修飾した金ナノ粒子プローブの構造

4. まとめ

標的タンパク質は、医薬品資源として重要な天然物の作用機序を理解する上で極めて重要だが、直接同定するための従来法は煩雑で、合理的な基盤技術の確立が急務である。本研究では、独自技術である金ナノ粒子プローブの設計を発展させ、汎用性の高い網羅的な標的タンパク質同定技術の開発を目指した。様々なリガンド分子へ適用可能なプローブ設計と簡便な合成方法を応用し、天然物と求電子基および光駆動型反応基を修飾した金ナノ粒子を作成し、新たに有効なラベル基を見出した。また、金ナノ粒子のフォトサーマル効果を用いたアフィニティーラベリング反応を検討し、簡便かつ迅速な標的タンパク質の捕捉に成功した。本研究成果は、アフィニティーラベリングによる天然物の標的網羅同定のための新規基盤技術を創出し、標的同定の飛躍的な加速化および一般化に貢献する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、天野工業技術研究所から貴重なご支援を頂きました。ここに深い感謝の意を示します。また、本研究を共に進めてきた学生の皆様にも心よりお礼申し上げます。

参考文献

- 1) G. M. Simon, M. J. Niphakis, B. F. Cravatt, Nat. Chem. Biol. 2013, 9, 200.
- 2) M. Schürmann, P. Janning, S. Ziegler, H. Waldmann, 2016, Cell Chem. Biol. 23, 435.
- 3) M. H. Wright, S. A. Sieber, Nat Prod. Rep. 2016, 33, 681.
- 4) K. Sakurai, Y. Hatai, A. Okada, Chem. Sci. 2016, 7, 702.
- 5) N. Suto, S. Kamoshita, S. Hosoya, K. Sakurai, Angew. Chem. Int. Ed. 2021, 60, 17080.
- 6) S. Kamoshita, S. Matsui, N. Suto, K. Sakurai, ChemBioChem 2021, 23, e202100388.

- 7) A. Tsuruno, S. Kamoshita, S. Hosoya, K. Sakurai, *Org. Biomol. Chem.* 2024, 22, 7659.
- 8) D. A. Shannon, R. Banerjee, E. R. Webster, D. W. Bak, C. Wang, E. Weerapana, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 3330.
- 9) S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, *Langmuir* 2011, 27, 14621.