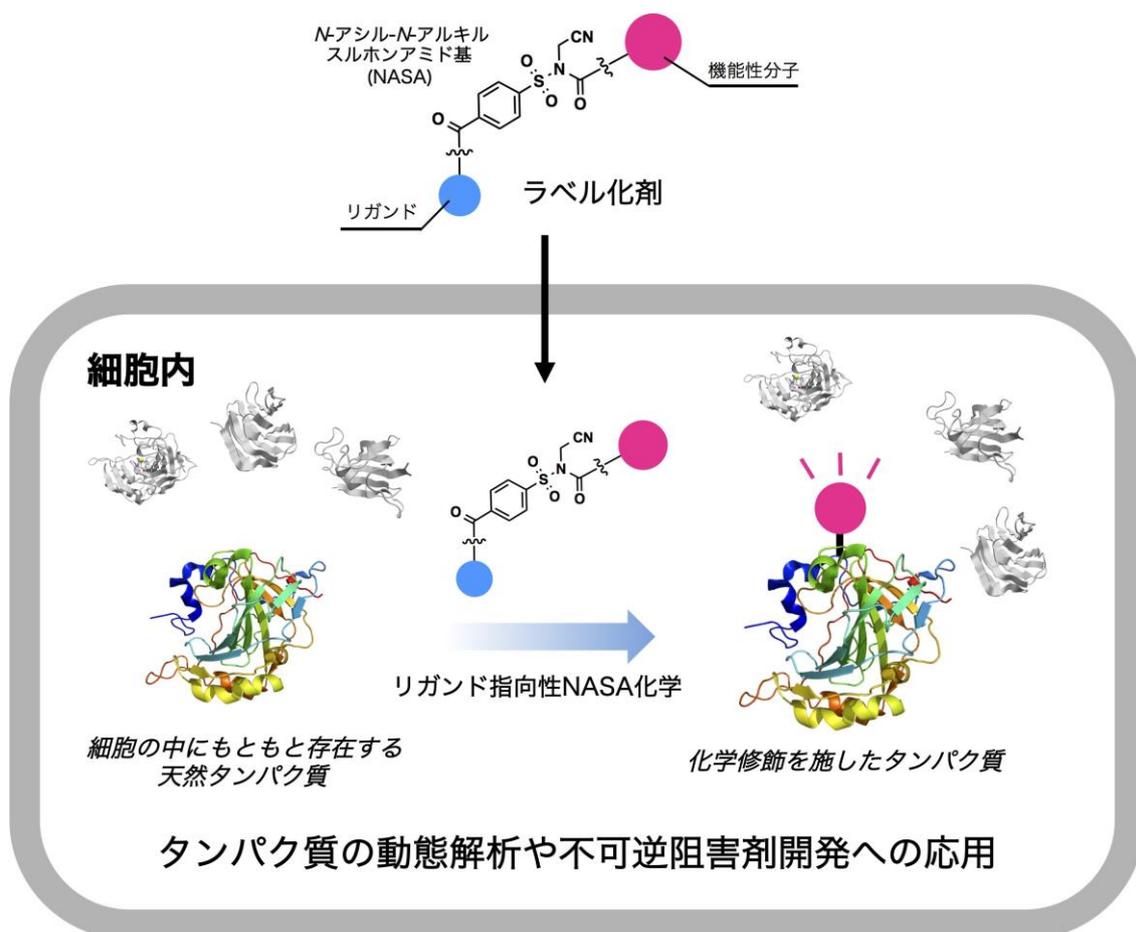


細胞内の狙った天然タンパク質を迅速に化学修飾する分子技術を開発 —不可逆阻害剤開発のための新しい戦略—

概要

京都大学大学院工学研究科の浜地 格 教授、田村 朋則 助教らは、生きた細胞内の狙った天然タンパク質を高速かつ高選択的に化学修飾可能な新たな手法を開発しました。

緑色蛍光タンパク質の応用でも明らかになったように、タンパク質を色々な分子で修飾することは、生命現象を解明するための強力な方法となります。しかし、ゲノム編集技術の発達した遺伝子工学とは対照的に、種々雑多な生体分子が高濃度に存在する細胞内で、狙ったタンパク質だけを選択的に修飾することは現在の化学技術をもってしても極めて困難です。本研究グループはこの課題に対して、「リガンド指向性化学」と呼ばれる独自の戦略を開発し、細胞内タンパク質の選択的な化学修飾を実現してきました。しかしこれまでのリガンド指向性化学は修飾反応に数時間から数日の時間を要するため使い勝手が悪く、応用が限定されてしまうという大きな問題がありました。



このような背景のもと、本研究グループは新たに、酵素反応に匹敵するくらい高速の化学修飾が可能な「リガンド指向性 *N*-アシル-*N*-アルキルスルホンアミド (NASA) 化学」を開発しました。詳細な解析の結果、この NASA 化学は、従来法より数十倍から数千倍以上速く反応が進行し、タンパク質表面のリジン残基を選択的

に修飾できることがわかりました。さらに本手法は、標的タンパク質の活性のコントロールにも応用可能でした。具体的には、ガンの創薬ターゲットである熱ショックタンパク質 90 (Hsp90) の不可逆阻害剤の開発に、NASA 化学によって世界で初めて成功しました。NASA 化学は分子設計次第で他の様々な種類のタンパク質へと適用可能であり、今後、不可逆阻害剤開発のための一般性の高い戦略として創薬研究を加速することが期待されます。

本研究成果は、2018 年 5 月 14 日に国際学術誌「Nature Communications」でオンライン公開されました。

1. 背景

合成小分子を用いたタンパク質の化学修飾は、生命研究や医薬品開発の基盤となる分子技術として期待されています。例えば、細胞内の目的タンパク質にだけ蛍光色素を化学修飾し目印をつけられれば、そのタンパク質の細胞内動態を可視化（イメージング）することができます。また、化学修飾を介してタンパク質の機能をコントロールする不可逆阻害剤は、通常の阻害剤と比較して高い薬効持続性を示すことが知られています。しかしながら、細胞内のように様々な分子種が存在する夾雑環境においては、狙ったタンパク質を選択的に化学修飾することは容易ではなく、現在のケミカルバイオロジー分野において極めて大きな課題となっています。これまでに遺伝子工学技術を駆使することで、細胞内環境でも使えるタンパク質化学修飾法が数多く開発されてきました。しかしこれらは、本来解析したい内在性（天然型）タンパク質を修飾できないという大きな制約がありました。

そのような中、本研究グループは細胞内に存在する内在性タンパク質を直接化学修飾するための独自の手法である「リガンド指向性化学」を開発してきました。この手法では、タンパク質に対して強い親和性を有するリガンドと、機能性プローブとの間に反応基を導入したラベル化剤分子を用います（図 1）。リガンド部分がタンパク質に認識されると、タンパク質上の反応性アミノ酸とラベル化剤の反応基が近接するため、修飾反応が促進される仕組みです。本手法によって細胞内タンパク質の選択的な化学修飾が可能になってきていましたが、従来用いていたラベル化剤は反応速度が遅く（数時間～数日を要する）反応効率も低いため、修飾したタンパク質の機能解析は限られたものであり、活性のコントロールは実現していませんでした。

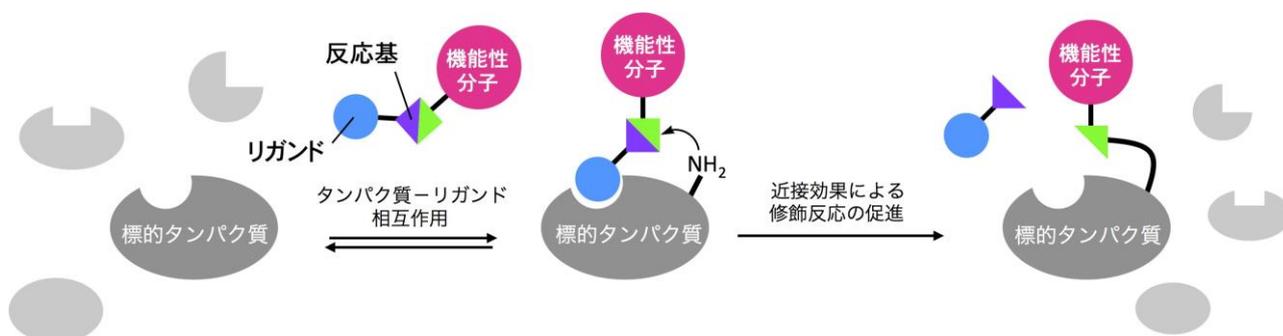


図1 リガンド指向性化学の概略図

2. 研究手法・成果

本研究では、より高速かつ高効率なタンパク質化学修飾の開発に取り組み、新たに *N*-アシル-*N*-アルキルス

ルホンアミド (NASA) 構造を反応基とする「リガンド指向性 NASA 化学」を発見しました。まず、結晶構造やリガンド分子に関する知見が豊富な FKBP12 タンパク質をモデルとして、NASA 反応基を有するラベル化剤 **1** を分子設計し化学合成しました(図 2 a)。これを FKBP12 タンパク質と試験管内で混ぜて修飾反応を評価したところ、ラベル化剤 **1** はわずか 15 分の反応時間で、FKBP12 をほぼ 100%修飾できることがわかりました。また質量分析によって、修飾されるアミノ酸はリガンド結合ポケット近傍のリジン残基であることが確認されました。これまで、タンパク質表面のこのようなリジン残基は反応性が低く効率的な修飾は難しいとされてきましたが、近接効果をうまく利用すればタンパク質表面の特定のリジン残基に対する修飾も可能であることが今回明らかになりました。

続いて今回開発したリガンド指向性 NASA 化学の反応速度を詳細に解析したところ、NASA 化学は従来のリガンド指向性化学よりも数十倍から数千倍以上早い反応特性をもつことがわかりました(図 2b)。また、遺伝子操作が必要な他の修飾法とも比較したところ、本手法は現在最も高速とされる逆電子要請型 Diels-Alder 反応や酵素タグシステムに匹敵することが示されました。次に、細胞内に発現する内在性 FKBP12 の化学修飾を行いました。その結果、細胞内環境下でも FKBP12 に対して選択的かつ迅速な化学

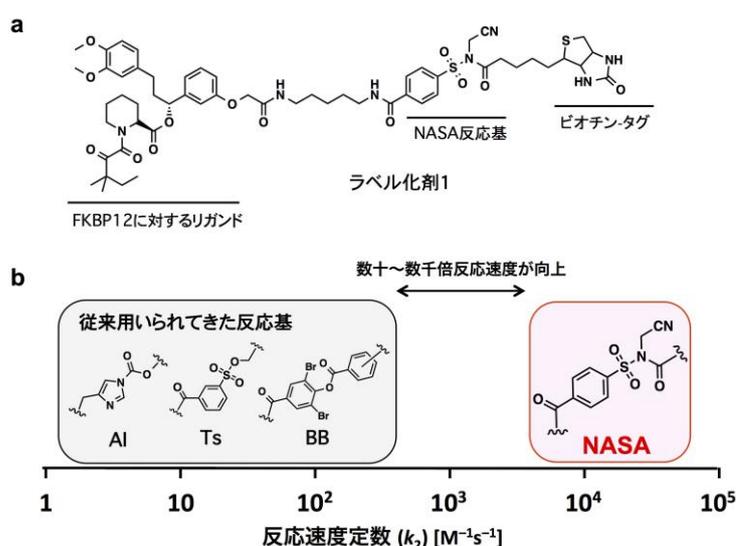


図 2 (a)ラベル化剤 **1** の分子構造 (b)従来法との反応速度比較

修飾が進行しました。また、ガン細胞に過剰発現する膜タンパク質である葉酸受容体を標的にラベル化剤を分子設計して使うと、高速かつ高選択的なガン細胞の蛍光標識が可能でした。以上のように、本手法は細胞内外でタンパク質の種類を問わず化学修飾が可能な一般性・汎用性の高い手法であることが実証されました。

ここまでの例では、タンパク質にプローブ分子を修飾するようにラベル化剤を設計していました。これとは逆に、リガンド部位をタンパク質に修飾するように設計すれば、そのラベル化剤分子は不可逆阻害剤として機能すると期待されます(図 3)。そこで、標的タンパク質として熱ショックタンパク質 90 (Hsp90) を狙って、NASA 化学を新規不可逆阻害剤の開発に展開しました。Hsp90 は他のタンパク質の立体構造形成(フォールディング)を促進する分子シャペロンであり、その活性がガン細胞の生存・増殖に必須であるため、近年有望な創薬ターゲットとして注目を集めています。まず、結晶構造による知見に基づいて PU-H71 と呼ばれる Hsp90 のリガンドに NASA 反応基を連結した化合物 **2** を合成しました。精製 Hsp90 を用いた評価から、化合物 **2** は Hsp90 のリガンド認識ポケット近傍のリジン残基と反応することが確かめられました。続いて化合物 **2** をガン細胞に作用させたところ、化合物 **2** は通常の可逆的阻害剤と比較して強い増殖阻害活性を示しました。この原因を確かめるために、Hsp90 によって安定化される基質タンパク質の発現量を調べました。すると、化合物 **2** を処置した細胞では、Hsp90 の主要な基質タンパク質が著しく不安定化していることがわかり

ました。これは Hsp90 の活性が長時間阻害されることに起因します。一方、同条件において可逆的阻害剤は Hsp90 を長時間阻害することができないため、基質タンパク質はほとんど減少しませんでした。以上の結果は化合物 2 が細胞内 Hsp90 に対する不可逆的な阻害活性を有することを示しており、NASA 反応基が不可逆阻害剤の反応基として適用可能であることが実証されました。

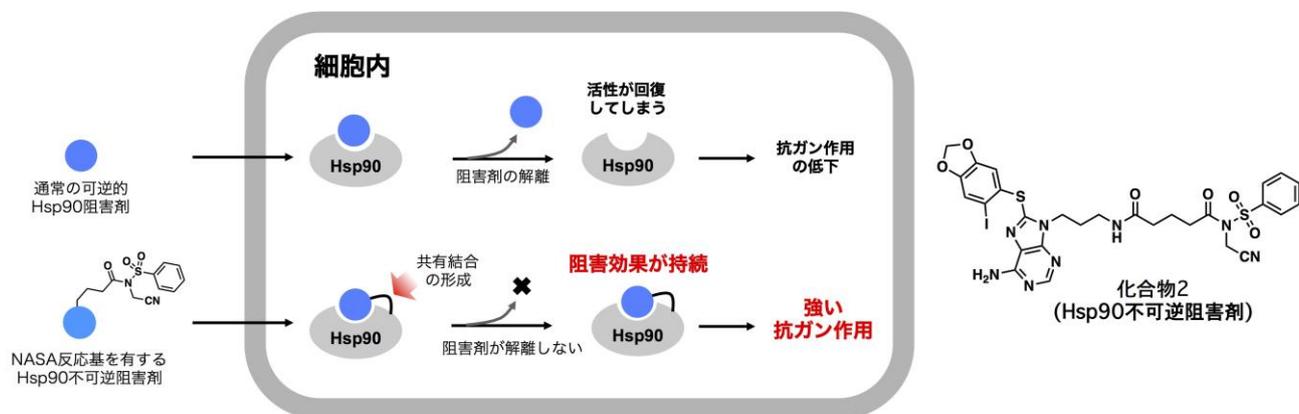


図3 NASA 化学による Hsp90 不可逆阻害剤

3. 波及効果、今後の予定

従来の不可逆阻害剤の幾つかは制ガン剤として用いられ始めていますが、これらはシステイン残基と反応するものに限られており、リジン残基とは反応できないものがほとんどです。この理由から、不可逆阻害剤は期待されているものの、その標的タンパク質はとても限定されていました。一方、今回開発した NASA 反応基はリジン残基を効率的かつ迅速に修飾することができるため、不可逆阻害剤開発の対象となるタンパク質のバリエーションが大きく広がることが期待されます。実際に、本研究グループは世界初となる Hsp90 不可逆阻害剤を開発することでこれを実証しました。特に、本手法はリガンド部位の設計次第で様々なタンパク質へと展開可能であることから、不可逆阻害剤開発のための一般性の高い戦略として創薬研究を加速することが期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、以下の事業の支援を受けて行われました。

- 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)
研究領域：「新機能創出を目指した分子技術の構築」(研究総括：山本 尚 中部大学 教授)
研究課題名：「生細胞有機化学を基軸としたタンパク質その場解析のための分子技術」
- 文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究
研究領域：「分子夾雑の生命化学」(領域代表者：浜地 格 京都大学 教授)
研究課題名：「分子夾雑下での生命分子の直接修飾/機能解析を実現する有機化学」

<用語解説>

リガンド：特定の受容体と結合する化学物質の総称。

FKBP12：免疫抑制剤の一種 FK506 に結合するタンパク質。

リジン：タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖にアミノ基を有する。

逆電子要請型 Diels-Alder 反応：電子不足のジエンと電子豊富なジエノフィルの間で起こる付加環化反応。

酵素タグシステム：SNAP タグや Halo タグと呼ばれる酵素を目的のタンパク質に融合して化学標識する手法。

分子シャペロン：他のタンパク質が正しく折りたたまれるのを助けるタンパク質の総称。

システイン：タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつ。側鎖に高反応性のチオール基を有する。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Rapid labelling and covalent inhibition of intracellular native proteins using ligand-directed
N-acyl-*N*-alkyl sulfonamide

著者：田村朋則、上田毅、後藤大輝、月館拓、Yonatan Shapira、西川雄貴、藤沢有磨、浜地格

掲載誌：Nature Communications DOI：10.1038/s41467-018-04343-0