

氏名 もりもと しょうた
森本 正大

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 168 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 多重差別化戦略に基づいた光アフィニティーラベル法に関する研究

論文審査委員

(主査)	教授	井上 将彦
(副査)	教授	水口 峰之
(副査)	准教授	友廣 岳則 (指導教員)

論文内容の要旨

生物活性小分子は生物学的現象を解明する研究ツールとして、さらに疾患診断・治療のための医薬品化学及び創薬に必要不可欠である。これら小分子は生物システムを変えことなく特定のタンパク質機能を過渡的に制御するため、生物学研究において遺伝子学的手法とは異なる方法論を提供する。従って、生物活性小分子の合成やその標的タンパク質の同定は、特に細胞または生体機能ネットワーク解析に向けたケミカルバイオロジー研究の重要な課題になっている。方法論として、分子可視化などによる機能解析からのアプローチでは直接的な標的の同定は困難だが、これら小分子の標的の同定に基づいた相互作用分子解析は有効である。それ故、膨大で複雑な細胞内生体分子混合物から1つまたはいくつかの標的を同定するための効果的な方法が求められている。しかし、多様な系に対応できる汎用法はほとんどない。

生物活性分子を介してその相互作用部位にタグを導入し、標的タンパク質を解析するアフィニティーラベル法は、弱い相互作用系を含め、汎用アフィニティー精製法では対応困難なタンパク質を同定し、その結合部位を解析できる、極めて有力な方法である。通常、ラベル法による標的探索では、相互作用タンパク質を特異的にラベルし、高純度精製等を経て同定が進められる。特に光ラベル法は非特異的ラベルが少なく操作性が高いことから注目されてきた。しかし収率が低いため、多くの場合で極微量ラベル体の高純度精製操作が煩雑化し、解析効率は極めて低かった。その対処法として反応基の機能化が進められ、ビオチンが導入された光反応基が開発された。これによりアビジン固定担体を利用して高感度検出と高純度精製が簡便化され、標的タンパク質の解析効率が向上した。しかしラベルペプチド配列解析による標的の同定やラベル部位の同定は、ラベルペプチド精製がその物性に大きく影響されるため依然として膨大な時間を必要とした。

最近、標的タンパク質の蛍光イメージング剤として *o*-ヒドロキシ桂皮酸型ジアジリン誘導体が開発された。この反応では2段階の光照射により、リガンドの切断と共にクマリン蛍光基が結合ドメインのクロスリンク部位に構築される (Figure 1)。本研究ではこれを標的差別化技術として利用することで、従来法のボトルネックであった極微量ラベルペプチドの煩雑な高純度精製を回避可能と考えた。つまり、この切断機能と発蛍光機能を、先のビオチン化法による微量ラベルタンパク質の選択的濃縮とラベルペプチドの選択的検出の2段階の標的差別化技術として検証することにした。

本研究では、微量標的の高純度精製を基本とする従来解析概念を刷新し、明瞭な標的絞り込みによる大幅な解析時間短縮と微量化を目的とした。この達成のため、標的の同定に特化した光反応基ユニットの多機能化を図り、汎用的な標的の同定技術として、効率性と簡便性、操作性に優れた高性能光アフィニティー同定法を開発した。

第1章. クマリン形成反応を利用したラベル部位解析法基盤の確立¹⁾

大豆タンパク質 vacuolar sorting receptor (VSR) とそのシグナルペプチドを用いて、標的タンパク質の光クロスリンク、タンパク質上での蛍光基形成、アビジン担体を利用した精製、及び蛍光特性による標的差別化を検証し、操作効率を評価した。VSRは液胞にタンパク質を輸送・貯蔵する膜受容体であり、貯蔵タンパク質C末端のシグナル配列 SSILRAFY を認識することが明らかにされている。このペプチドN末端にビオチンを導入し、さらに光クロスリンカーを導入したプローブ (DIA-K(biotin)SSILRAFY, Figure 2) を作製した。認識部位はVSR 膜外ドメインに存在することから、その部分の発現タンパク質 (GmVSR) を用いた。まずプローブの光特性を検討した。ジアジリンの光分解は0°Cで容易に起こり、光E-Z異性化による分子内環化は37°Cで進行したことから、2つの光反応は温度制御可能であることが示唆された。事実GmVSR光ラベルでは、0°Cでは照射時間依存的にビオチン化GmVSRが増加し (化学発光検出)、37°Cではビオチン切断と同時にクマリン化 (蛍光検出) されることを確認した。次にビオチン化GmVSRをアビジン担体に捕捉した後、37°Cで光照射を行った。ラベル量の約60%をクマリン化GmVSRとして、精製担体から回収できた。さらにこの上清を酵素消化しHPLC解析したところ、2つの蛍光ピークが明瞭に検出された。MS解析によりこの2つのピークはクマリン化ペプチドと判明し、続くMS/MS解析によりその配列及びラベル部位同定を達成した。大きなリガンドとビオチンが切除され、小さく安定なクマリン (240 u) のみが付与されたことで、より狭い測定範囲でMS/MS解析できた。これは高分解能の維持という観点からも有意であった。1回の光ラベル/配列解析操作に要したGmVSRは11 µgであった。

以上、ラベルペプチドの高純度単離・精製を省くことで、従来法では失敗の多かったラベル部位同定に成功した。しかしこれは精製タンパク質であり、1次配列情報からペプチド同定は容易であった。それでもMS/MSはやや複雑化し、配列解析に数週間を要した。極めて複雑なプロテオームにおいて、未特定の微量標的タンパク質を蛍光特性のみで区別することは難しいと予想されたことから、定量プロテオミクスに汎用されている同位体法、つまりラベルMSピークの多重化戦略を本桂皮酸型光クロスリンカーに組み込むことにした。

第2章. タンパク質混合系を用いた同位体導入型蛍光ラベル法の検証²⁾

一般に多機能化は反応基構造の肥大化をもたらし、基質親和性を利用したアフィニティーラベル法の原理に相反する。本反応基は基本骨格に二重結合を1つ加えた構造であり、これ自体が蛍光団に変化するため、立体的な影響が最小限に抑えられている。本研究ではジアジリン基のクロスリンクに影響の少ないカルボニルα位にエチル基及び重水素化エチル基 (質量差5 u) を導入した。このクロスリンカーを導入したビオチンプローブを用いて、アビジン、炭酸脱水酵素、トランスフェリン、BSA のタンパク質混合系 (各50 ng) で解析効率を評価した。この光反応産物をそのまま消化し、HPLC解析したところ2つの蛍光ピークが明瞭に検出された。これらピークのMS解析では、多くの非ラベルペプチドを含むことが判明したが、質量差5 uの二重化ピークはノイズレベルでも容易に区別できた。さらにMS/MSにおいてもラベルされたアミノ酸残基

をもつイオン種は二重化されるため、それらを追跡することでアミノ酸配列が容易に判明し、光照射から僅か2日間で、アビジンにおけるビオチン結合ドメインの2つのラベルアミノ酸残基が同定された。従来法では多様な対照実験を繰り返し、その差異から標的ペプチドを特定する。しかし、極微量ラベルペプチドの操作では、僅かな非特異的吸着でも致命的であり、ラベルペプチドの特定に長時間を費やす。蛍光と同位体特性を利用した LC と MS における連続的な多重差別化戦略は、対照実験を省略した標的特定が可能であり、解析時間・量の削減と共に操作の著しい簡略化に繋がることを確認した。しかし4種混合系で見られた各蛍光ピークにおける MS 複雑化は、膨大なプロテオームから極微量の標的を捉える、実際の標的探索において問題となる。そこでビオチンによるラベルタンパク質の高度濃縮・精製を組み込み、HeLa 細胞ライセートを用いてその有効性を検証することにした。

第3章. 多機能光アフィニティーラベルによる標的特定法の確立²⁾

第2章で作製したビオチンプローブのビオチン基はリガンドであると共に精製タグとして利用可能である。このプローブを用いて、HeLa 細胞ライセートからカルボキシラーゼ等、ビオチンを補酵素とする酵素群を標的としてその光捕捉、濃縮を行い、総合的な解析効率を検証した。HeLa 細胞ライセート(総タンパク質量: 2 mg) とビオチンプローブをインキュベート後、0 °C で光照射し、還元アルキル化後、限外ろ過でアルキル化剤などの小分子を除去した。その後、アビジン担体に捕捉し、洗浄後、37 °C で光照射した。この上清をトリプシン消化し HPLC 解析したところ、いくつかの蛍光ピークを確認した。この内、ビオチン添加による阻害実験でピーク量の減少が見られた2つを MS 解析した。各ラベルペプチドのアミノ酸配列から、それぞれピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) とアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) が特定され、さらに PC の結晶構造からビオチン結合部位近傍をラベルしたことが判明した。一方、ACC の X 線結晶構造は報告されていないが、その一次配列情報から PC ラベル部位に相当する部分がラベルされたことを確認した。

本法では、比較検討による煩雑なラベルタンパク質やラベルペプチドの特定、及びその高純度精製・単離操作を必要しない。光反応基を高性能化することで、3段階の差別化による連続的な標的絞り込みを達成し、標的探索・同定操作を著しく単純化した (Figure 3)。また明瞭かつ高感度な標的の判別は、解析に必要な量と時間の飛躍的な削減をもたらした。最終的にプロテオーム系で実証し、標的タンパク質の同定及びその結合部位解析を目的とした、実用的な光アフィニティーラベル法を確立した。

参考文献: 本要旨内容は以下の論文にて公表済みである。

- 1) S. Morimoto, T. Tomohiro, N. Maruyama, Y. Hatanaka, Photoaffinity casting of a coumarin flag for rapid identification of ligand-binding sites within protein. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 1811–1813.
- 2) T. Tomohiro, S. Morimoto, T. Shima, J. Chiba, Y. Hatanaka, An Isotope-Coded Fluorogenic Cross-Linker for High-Performance Target Identification Based on Photoaffinity Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 13502–13505.

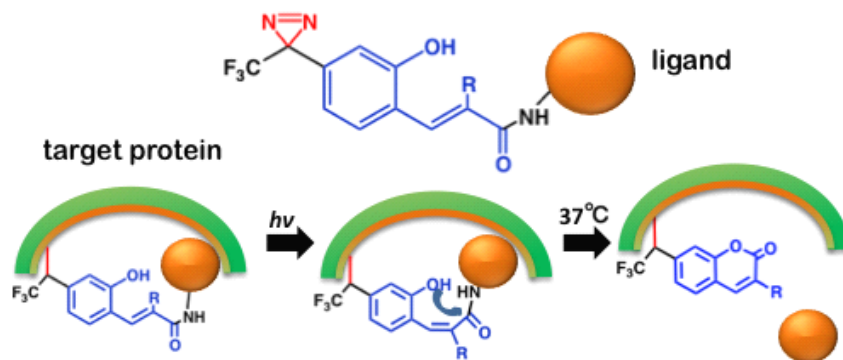


Figure 1. Mechanism of photochemical coumarin labeling on target protein.

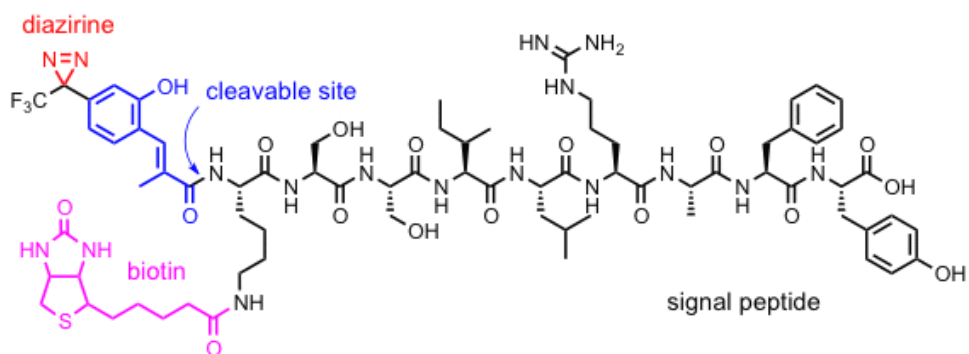


Figure 2. Structure of photoactivatable peptide probe bearing a biotin.

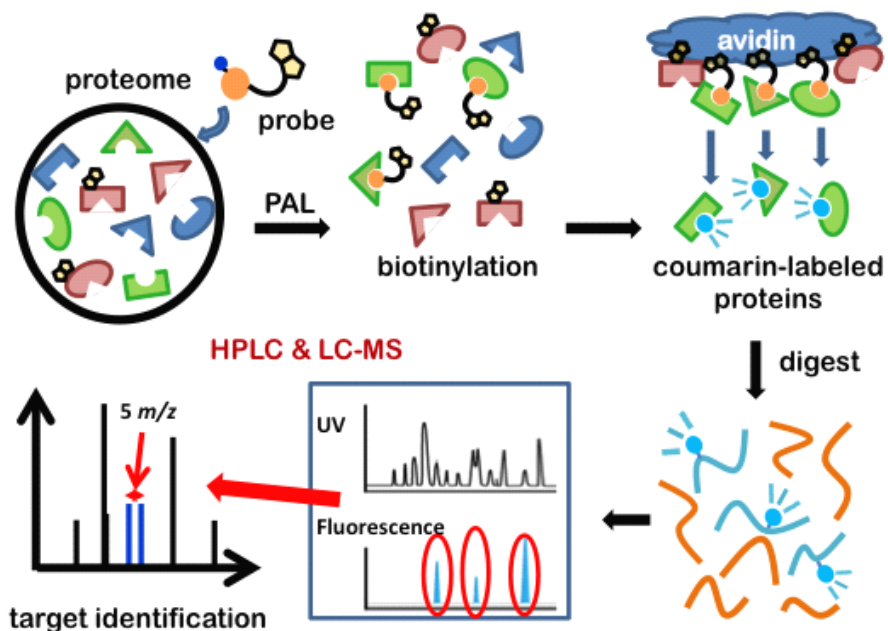


Figure 3. Strategy for PAL-based target identification with isotope-coded coumarin tag.

学位論文審査の要旨

生物活性小分子の標的タンパク質同定は生命科学研究あるいは創薬に必要不可欠であり、そのため、複雑な細胞内生体分子混合物から1つまたはいくつかの標的を特定するための効果的な方法が求められる。光アフィニティーラベル法は多様な系に対応する数少ない方法論の1つであり、通常、光反応によりリガンド結合部位特異的に導入されたタグを目印にして解析が進められる。この標的同定では、特にラベルされた部分ペプチド配列情報からのタンパク質特定が重要であり、しかもラベル位置から相互作用部位の直接的な構造情報が得られる点で有意である。しかし、従来法ではこの極微量ラベルペプチドの特定および精製操作がボトルネックであり、その煩雑化により、多くの場合で解析に膨大な時間と試料量を必要とした。

本研究はこの解決を目的として、微量ラベルペプチドの高純度精製を基本とする解析概念を刷新し、多段階での明瞭な標的絞り込みを通した繰り返し操作を回避する戦略により、大幅な解析時間短縮と微量化を推進した。この達成のため、標的同定に特化した光反応基ユニットの多機能化を図り、後述の3つの解析段階においてその効率や操作性を評価し、高性能光アフィニティーラベル法を完成させた。

1. クマリン形成反応を利用したラベル部位解析法基盤の確立

蛍光イメージング試薬として開発された桂皮酸型光反応基は、光照射により相互作用タンパク質に蛍光基クマリンを標識する。本研究では、この光異性化を介した分子内環化（クマリン化）反応を切断機能として捉え、ビオチン-アビジンシステムを利用した微量ラベル標的タンパク質の高度濃縮と選択的溶出技術として確立した。さらにリガンド結合部位に導入されたクマリンを、そのままHPLCによるラベルペプチドの高感度差別化技術として利用することで、化学処理による夾雑物混入もなく、比較対照実験を最小限に抑えた。ラベルタンパク質の濃縮とラベルペプチドの蛍光差別化による直接的かつ連続的な解析戦略は大幅な解析時間短縮をもたらし、発現精製タンパク質においてその効率化が実証された。同定されたラベル部位から、未解明の膜受容体のシグナルペプチド結合部位情報を得ることに成功した。

2. タンパク質混合系を用いた同位体導入型蛍光ラベル法の検証

プロテオームではビオチンによる高度濃縮法でも微量夾雑物の影響は大きく、最終同定段階である質量解析においてラベルペプチドの判別を煩雑化させる。その解決に、定量プロテオミクスで利用される同位体評価法を取り入れ、重水素を組み込んだ多機能桂皮酸クロスリンカーを合成した。夾雑物が混在する系において、LCにより蛍光ピークに含まれる夾雑ペプチドがある程度絞り込まれれば、新機能として追加したMSピークの二重線化により、

続くMS分析で明瞭に標的を特定できることを示した。また適切に考慮された質量差は、MS/MS分析において、配列解析およびラベルアミノ酸特定を極めて容易にした。蛍光特性と質量差特性をLC-MS解析に適用した戦略は、タンパク質混合系での解析において、極めて効果的であることを証明した。

3. 多機能性光アフィニティーラベルによる標的同定法の確立

プロテオームでの標的同定において、1) ビオチン-アビジンによるラベルタンパク質の釣り上げ濃縮と選択的光切断溶出、2) 光蛍光付加によるラベルペプチドのLCでの高選択的/高感度識別、3) 質量差MSピークによる解析データの識別の3段階における連続的なラベル物質の明瞭な絞り込みにより、細胞ライセートから2種類のカルボキシラーゼが同定された。ラベルアミノ酸残基も特定され、そのアロステリック構造変化を示唆する情報が得られた。従来法では多くの場合でラベル部位特定に失敗したことを考慮すると、解離定数 μM オーダーの相互作用系において、総タンパク質量2 mgのライセートから数週間で複数標的を特定できたことは飛躍的な効率向上であり、本戦略の実用性を示したものと評価できる。

以上のように、光クロスリンク、光切断、発蛍光性、同位体、リガンド導入など標的同定に有効な5つの機能を集約させた高性能反応基を開発し、多重差別化戦略に基づく新たな光アフィニティー法を推進することで、その技術を実用レベルに進展させた。基盤技術の特性を十分に理解し、応用に繋げた研究推進力と成果は十分に評価できる。この申請者の研究は、相互作用標的分子の同定および機能構造解析において画期的な方法論であり、生物活性小分子作用に基づく機能プロテオミクス手法への展開が期待されることから意義がある。

主査および副査は、申請者森本正大氏に面接試験ならびに博士論文内容に関する審査を行い、博士(薬科学)の学位授与に値すると判定した。

1. Morimoto, S., Tomohiro, T., Maruyama, N., Hatanaka, Y. Photoaffinity casting of a coumarin flag for rapid identification of ligand-binding sites within protein. *Chem. Commun.*, **49**, 1811–1813, 2013.
2. Tomohiro, T., Morimoto, S., Shima, T., Chiba, J., Hatanaka, Y. An Isotope-Coded Fluorogenic Cross-Linker for High-Performance Target Identification Based on Photoaffinity Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 13502–13505, 2014.