

社団法人 日本化学会
生体機能関連化学部会

NEWS LETTER

Division of Biofunctional Chemistry
The Chemical Society of Japan

Vol. 28, No.2 (2013. 11. 5)

目 次

◇ 巻頭言

- ・バイオメテイクスの現在・過去・未来……………居城 邦治 1

◇ 研究紹介

- ・RNA を指揮分子としてタンパク質機能を制御する……………遠藤 玉樹 2
- ・PatD-FIT システム：アズリンペプチドの汎用人工合成……………後藤 佑樹 6
- ・PYP タグと発蛍光プローブを用いた
細胞内タンパク質ラベル化技術の開発と応用……………堀 雄一郎 10
- ・ランタニドイオンを活用した常磁性 NMR 法による糖鎖の動的構造解析
……………山口 拓実 14

巻頭言

バイオミメティクスの現在・過去・未来

北海道大学電子科学研究所 居城 邦治

今世紀に入り、バイオミメティクスに注目が集まっています。バイオミメティクスとは生物模倣技術とも呼ばれ、生物の技術体系に学び、持続可能な技術・製品を作り出そうとする手法です。生物は 40 億年間進化を続け、環境に対応した多様性を獲得してきました。それは人類が作り上げてきた技術体系とは異なるものであり、人類の英知を遙かに超えています。モノづくりに行き詰まりを感じる中、欧米を中心に、モノづくりの設計指針を生物に求めたバイオミメティクスが改めて注目され始めました。特にナノテクノロジーの発展も相まって材料分野で著しい成果が出てきました。その代表例は、「蓮の葉に学んだ超撥水材料」、「サメ肌リブレットを真似た低流体摩擦表面や防汚塗装」、「蝶やタマムシの羽に学んだ構造色材料」、「ヤモリの足に学んだ接着材料」、「無反射性を持つモスアイ構造材料」などです。一部はすでに商品化されており、例えば、BASF のセルフクリーニング機能を持つ繊維や帝人の超多層フィルムなどが市販化されています。今年、ルフトハンザ航空はサメ肌リブレット塗装を施した航空機の試験飛行を行っています。日本でのバイオミメティクス研究は欧米に遅れを取っていると言われていたのですが、昨年、科研費新学術領域研究「生物多様性を規範とする革新的材料技術」がスタートして巻き返しを図っています。

実はバイオミメティクスの歴史は古く、1930～1940 年代にかけてナイロン（絹の模倣）や面ファスナー（いわゆるマジックテープ、野生ゴボウの実がヒントになった）の発明に遡ります。1950 年代後半には生物学者によって「バイオミメティクス」の概念が提唱されました。そして、1970～1980 年代にかけて、Biomimetic Chemistry の勃興により分子系バイオミメティクスが進展しました。本部会の源流にあたる「酵素類似様機能をもつ有機化学反応の研究会」はまさに Biomimetic Chemistry を先駆けであり、その当時、酵素触媒機構が解明されたのを機にそのモデル化による人工酵素が注目されました。研究会は本部会へと発展し、私が学生だった 1980 年代後半は人工脂質二分子膜など、酵素以外の生体関連の機能へと舞台が広がりました。その後、本部会が中心になり分子系バイオミメティクスの体系化は進んだものの、実用面では苦戦を強いられたまま今日に至っています。

しかし、最近、分子系バイオミメティクスの出番が期待されています。2011 年に植物の光合成の中核を成す光化学系 II の構造が明らかになり、その後も詳細な解明が進んでいます。その構造をお手本にして、これまで培われてきた超分子化学や DNA 折り紙などの分子技術を駆使することで、バイオミメティックな人工光合成システムを創製できるのでは、との期待が高まります。バイオミメティクスの魅力の一つは、世の中の役に立つモノを新しい視点で作れることです。本部会から持続可能な社会の実現に向けた問題を解決する生物模倣技術が生まれることを切に願います。

研究紹介（講演賞受賞）RNA を指揮分子としてタンパク質機能を制御する

甲南大学 先端生命工学研究所 遠藤 玉樹

1. はじめに

筆者が所属する甲南大学先端生命工学研究所（FIBER）では、セントラルドグマに関わる生命分子を化学的に取り扱い、その機能発現過程における諸性質を定量的に評価してデータベースとして蓄積してきている。同時に、このような研究から得られる知見を基に、新規な機能性分子を設計・構築し、生命反応系に対して人為的にアプローチするという工学的応用研究も展開している。筆者は、セントラルドグマにおける「DNA→RNA→タンパク質」という分子の流れの中でも、その中間に位置する RNA の機能に注目して研究を進めている。本稿では、RNA の分子認識能力を活用したタンパク質機能の制御について紹介させていただく。

2. RNA による分子認識を起点としたタンパク質機能制御システム

RNA は、DNA を鋳型とした転写反応により、細胞内で持続的に産生することができる。また、複雑かつ多彩な高次構造を形成することで触媒活性や特異的な分子認識といった機能を発揮する。さらに、RNA 高次構造の土台となる二次構造やその安定性を予測することが可能であり、配列変異により RNA が示す機能特性を改変しやすい。このような特徴から、RNA は細胞内で働く機能システムを構築するための素材として魅力的な分子である。一方で、分子を構成している要素（A, C, G, U の 4 つのヌクレオチド）が、同じく直鎖状の高分子であるタンパク質の構成要素（20 種類のアミノ酸）と比較して少ないため、タンパク質のように複雑な反応を触媒したり高度な機能を示したりすることは難しい。我々は、最終的にアウトプットされるシステムとしての機能はタンパク質に担わせ、RNA によるインプット分子の認識を介してこれを制御するシステムの構築を試みている。

2.1 RNA を用いてタンパク質が発する光シグナルを制御する

生物発光反応を触媒するルシフェラーゼは、光という高感度で定量的なアウトプットシグナルを発する。そのため、バイオイメージングやバイオセンサーなどの技術に欠かせないものとなっている。そこで、RNA を用いてルシフェラーゼの活性を制御する技術を構築した。我々は、免疫不全ウイルスの Tat タンパク質に由来する RNA 結合ペプチド（Tat ペプチド）に着目した。このペプチドは、同じ免疫不全ウイルスのゲノム RNA 上に存在する transactivation responsive (TAR)-RNA と呼ばれる RNA 領域に特異的に結合する。特筆すべきは、溶液中ではランダムコイル様の状態である Tat ペプチドが、TAR-RNA に結合すると β シート状に折れ曲がった構造を形成する点である（図 1A）。つまり、RNA への結合に伴い、比較的自由度の高い構造状態から特定の構造を形成した状態へと変化する。

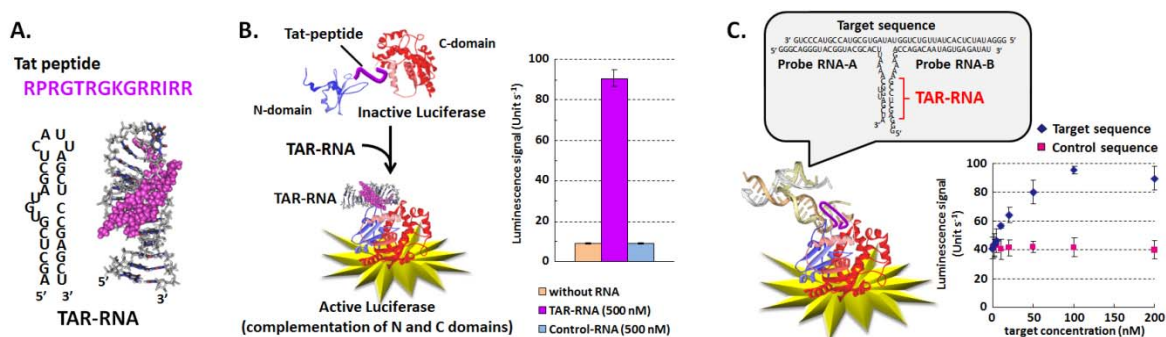


図 1 RNA-タンパク質間相互作用に基づくルシフェラーゼの活性制御。A) TAR-RNA に結合した Tat ペプチドの立体構造。B) 改変型ルシフェラーゼの TAR-RNA への結合に伴う活性回復。C) 改変型ルシフェラーゼの活性回復を利用した任意核酸配列の検出。Probe RNA-A および Probe RNA-B は標的核酸配列に塩基対形成し、TAR-RNA 構造を再構成する。

我々は、ルシフェラーゼの N 末端ドメインと C 末端ドメインの間に Tat ペプチドを挿入した改変型ルシフェラーゼを構築した(図 1B)。この改変型ルシフェラーゼは、挿入された Tat ペプチドが TAR-RNA との結合に伴い折れ曲がった構造を形成する。すると、分断されていた N 末端および C 末端ドメインが近づき、活性型のルシフェラーゼ構造を再構成することで発光シグナルが上昇する(図 1B)。さらに、標的となる核酸配列に塩基対を形成し、TAR-RNA の構造を形成する RNA プローブを設計した。これにより改変型ルシフェラーゼの活性回復を任意の核酸配列の検出にも応用することができた(図 1C)¹。この結果は、特定のインプット分子(任意の核酸配列)で RNA-タンパク質間相互作用を誘起することで、タンパク質が示すアウトプット機能(光シグナル)を制御できることを示している。

2.2 RNA を用いてタンパク質が仲介する遺伝子発現を制御する

RNA は、相補的な核酸配列に塩基対を形成するだけでなく、高次構造に基づいて様々な生体分子と特異的に相互作用することもできる。特定分子に結合する RNA はアプタマーと呼ばれ、任意の標的分子に対するアプタマーを進化分子工学的に取得する技術(SELEX)も確立されている²。そのため、アプタマーと標的分子との結合を起点として RNA-タンパク質間相互作用を制御することにより、様々な標的分子に応答するタンパク質機能の制御システムを構築できると考えられる³。

上述の Tat ペプチドの由来である Tat タンパク質は、部分的に転写伸長された TAR-RNA を認識して結合し、転写伸長反応をトランスに活性化する機能を有する。そこで、アプタマーと標的分子の結合を起点として Tat タンパク質と TAR-RNA の相互作用を制御し、細胞内で機能する転写反応制御システムを構築した。標的分子には喘息薬としても利用されるテオフィリンを選択し、TAR-RNA のループ領域にテオフィリンに結合するアプタマーの塩基配列を挿入した(図 2A)。TAR-RNA のループ領域は、安定なステム構造に置き換えられると Tat タンパク質による転写反応の活性化が弱くなることが報告されていた⁴。そのため、アプタマーとテオフィリンが結合し、その相互作用エネルギーで RNA 構造が安定化されることで転写反応が抑制されるのではないかと考えた(図 2B)。プロモーターの下流に設計した RNA 配列を有するプラスミドベクターを構築し、ヒト由来の細胞株を用いて Tat タンパク質が仲介する転写反応の活性化を評価した。その結果、テオフィリンの濃度に依存してレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)の発現量を抑制することができた(図 2B)⁵。つまり、アプタマーによる分子認識を介した RNA-タンパク質間相互作用の制御が、光シグナルを用いた分子検出だけではなく、細胞内の遺伝子発現制御にも適用できることが明らかとなった。

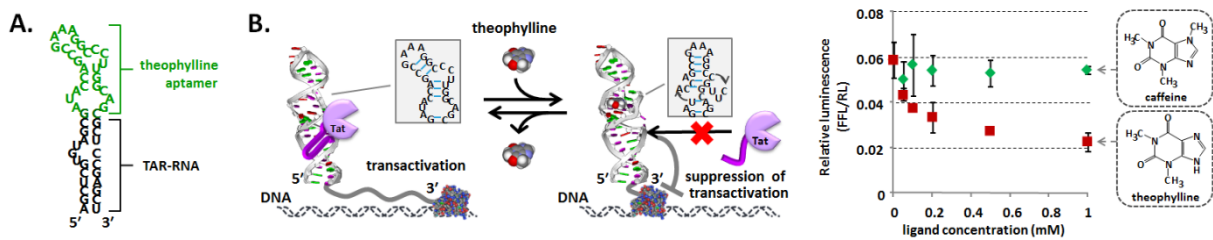


図 2 RNA-タンパク質間相互作用に基づく細胞内遺伝子発現制御。A) テオフィリン認識アプタマーを挿入した TAR-RNA の設計。B) 細胞内でのテオフィリン濃度依存的な遺伝子発現の抑制。テオフィリン非存在下では Tat タンパク質が RNA に結合して転写を活性化する。テオフィリンが RNA に結合すると RNA 構造が変化し、Tat タンパク質の RNA への結合と転写反応の活性化が抑制される。

3. タンパク質の機能制御を可能にする RNA のセレクション

RNA によるインプット分子の認識を起点として、生物発光反応の触媒機能や転写反応の活性化という、タンパク質特有の高度な機能を制御可能であることを示すことができた。この技術を様々なインプット分子に応答するように拡張することで、細胞内で機能するバイオセンサーや遺伝子発現制御技術に活用できると考えられる。インプット分子の認識には既存のアプタマーを利用できると考えられるが、アプタマーとインプット分子との結合で RNA-タンパク質間の相互作用を誘起できる RNA を構築しなくてはならない。しかしながら、そのような RNA を合理的に設計することは難しい。そこで、SELEX を利用し、一部ランダムな塩基配列を有する RNA ライブラリからのセレクションを試みた。

インプット分子としてテオフィリン、およびテトラサイクリン（抗生物質の一種）を選択し、TAR-RNA との組み合わせで図 3A に示すような RNA ライブラリを設計した。具体的には、アプタマー配列のループ領域に TAR-RNA を挿入し、5'側と 3'側の接続点にそれぞれ 5 塩基のランダムな配列を挿入してある。そして、これらの RNA ライブラリと Tat ペプチドを固定化した磁性ビーズを用いて SELEX を行った⁶。具体的には、インプット分子との結合に関係なく Tat ペプチドに結合してしまう RNA をネガティブセクションで取り除き、インプット分子に応じて Tat ペプチドに結合する RNA のみをポジティブセクションで選択するというサイクルを繰り返した(図 3B)。最終的に得られた RNA を用いて、Tat ペプチドとの結合定数をインプット分子の存在下と非存在下とで比較した。その結果、テオフィリンの場合は約 10 倍、テトラサイクリンの場合は約 20 倍、それぞれのインプット分子に応じて Tat ペプチドとの結合定数を上昇させる RNA を獲得することができた(表 1)。また、得られた RNA の再安定な二次構造を予測すると、アプタマーと TAR-RNA の構造は完全に崩れていることが明らかとなった。つまり、アプタマーとインプット分子との結合による相互作用エネルギーが RNA の構造変化に寄与し、TAR-RNA の構造が形成されて Tat ペプチドとの結合定数が上昇したと考えられる (図 3C)。

表 1 セレクション後 RNA が示す 37°C における Tat ペプチドとの結合定数

Input molecule	$K_{obs} / 10^7 M^{-1}$	
	without input molecule	with 3 mM theophylline
theophylline	3.3 ± 0.3	34.7 ± 3.8
tetracycline	1.5 ± 0.4	with 100 μM tetracycline
		33.8 ± 3.5

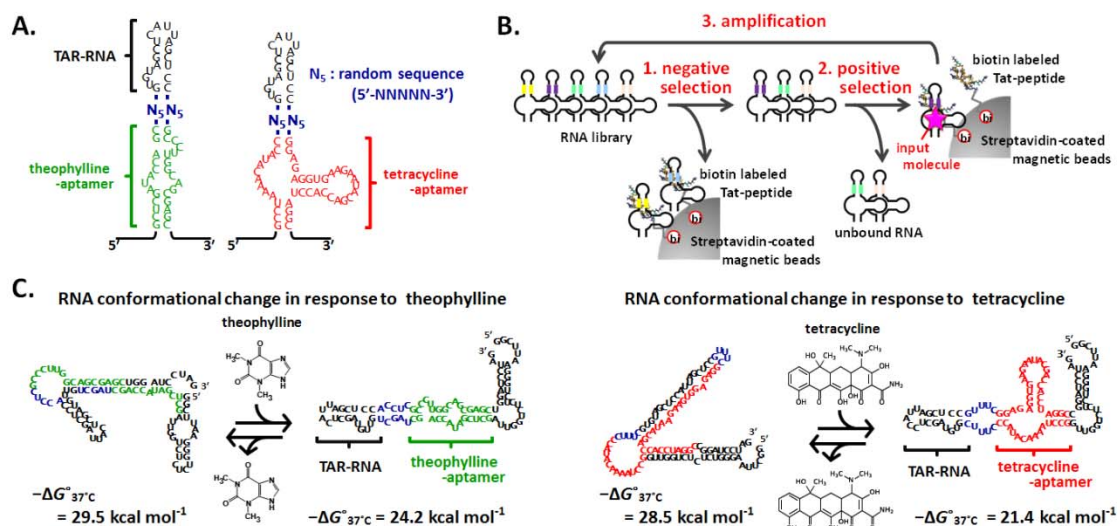


図 3 インプット分子に応じて Tat ペプチドと相互作用する RNA のセレクション。A) アプタマーのループ領域に TAR-RNA を挿入した RNA ライブラリの設計。B) インプット分子に応じて Tat ペプチドに結合する RNA のセレクション。C) セレクションによって獲得された RNA が示すインプット分子に応じた RNA 構造変化。mfold によって予測される RNA 二次構造の熱安定性($-\Delta G^{\circ}_{37}$)を下に示してある。

4. タンパク質の機能制御を可能にするインプット分子の拡張

図 3C に示した RNA の二次構造変化と、それぞれの二次構造における mfold での熱安定性予測結果を見てみると、どちらの RNA ライブラリから選択された RNA でも構造変化の前後で約 5–7 kcal mol⁻¹ 程度の熱安定性の差 ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) がある。このことは、予測される RNA 構造変化の $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ を考慮することにより、効率的に機能する RNA を合理設計できる可能性を示している。そこで、テオフィリン以外の分子に応じてタンパク質の機能制御を可能にする RNA の構築を試みた。具体的には、S-アデノシルメチオニン (SAM)、アデニン (Ade)、チアミンピロリン酸 (TPP) に結合する RNA アプタマーを利用し、アプタマーと TAR-RNA を直列的に接続した RNA (SAM-TAR、Ade-TAR、TPP-TAR) を設計した (図 4A)。紙面の都合上詳細は割愛するが、最終的に $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ の値がそれぞれ 4.8 (SAM-TAR)、9.0 (Ade-TAR)、10.7 (TPP-TAR) kcal mol⁻¹ となるように配列を設計した。そして、転写合成した RNA

を標的分子の存在下で前述の改変型ルシフェラーゼと混合し、ルシフェラーゼが発する光シグナルを制御できるかどうかを評価した(図 4B)。その結果、3種類の RNA 全てで、標的分子の濃度に応じて発光シグナルが上昇することが確認された。また、標的分子以外の分子では全く発光シグナルが変化せず、TAR-RNA の 5'側に配置されているアプタマーの特異的な分子認識能力を活かすことができている。

5. おわりに

我々はこれまでに、mRNA が分子内の構造安定性に基づいて翻訳反応やタンパク質構造を調節し得ることを見出している⁷。また、

天然に存在する RNA による分子認識を介した遺伝子発現調節機構も明らかになりつつある⁸。つまり、本稿で紹介した RNA を基盤としたタンパク質機能の制御技術は、細胞内でも普遍的に機能しうる分子機構であると考えられる。一方で、細胞内は極度に分子密度が高い分子クラウディング環境であり、このような環境下では核酸の構造形成や分子認識も少なからず影響を受ける⁹。FIBER では、分子クラウディング環境を考慮に入れた生命分子の化学的諸性質に関する定量的なデータベースを蓄積してきている。本稿でも紹介したように、核酸の機能は構造安定性などを考慮に入れた合理設計や機能改変も可能である。そのため、FIBER が蓄積してきたデータベースをさらに充実させ、活用することで、細胞内で様々な分子に対して応答する汎用的なタンパク質機能の制御技術を確立できると考えられる。

謝辞 本研究は、科学研究費補助金、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(2009-2014年度)、および甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金からの助成により、FIBER 所長、杉本直己教授の指揮のもとに行われました。また、FIBER 以前の所属研究室での研究成果も交えて紹介させていただきました。経験と知識に乏しい私の意見を尊重し、ご助言・ご指導いただきました、東京工業大学の小畠英理教授、岡山大学の宍戸昌彦教授、大槻高史教授にこの場を借りて感謝いたします。

1. T. Endoh, M. Mie, H. Funabashi, T. Sawasaki, Y. Endo, E. Kobatake, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 956-62; T. Andou, T. Endoh, M. Mie, E. Kobatake, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 661-8.
2. A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-22; C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-10.
3. T. Endoh, R. Shintani, M. Mie, E. Kobatake, T. Ohtsuki, M. Sisido, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2242-6.
4. D. M. Campisi, V. Calabro, A. D. Frankel, *EMBO J.* **2001**, *20*, 178-86.
5. T. Endoh, N. Sugimoto, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1174-8.
6. T. Endoh, N. Sugimoto, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60222.
7. T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5522-6; T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6222-31.
8. A. Serganov, D. J. Patel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 279-86.
9. V. Kumar, T. Endoh, K. Murakami, N. Sugimoto, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9693-5; D. Miyoshi, T. Fujimoto, N. Sugimoto, *Top. Curr. Chem.* **2013**, *330*, 87-110.

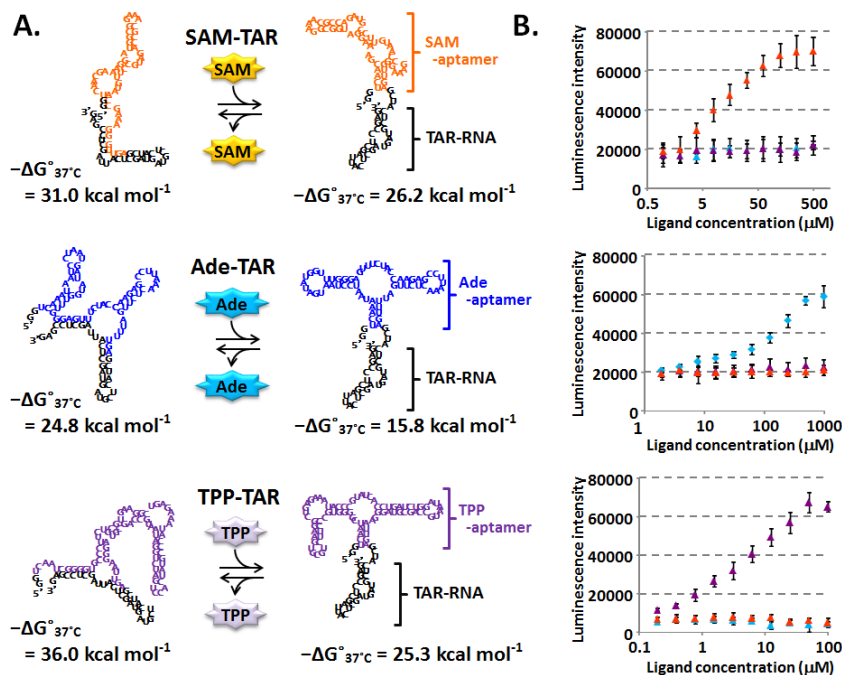


図 4 合理設計した RNA によるインプット分子の発光検出。A) インプット分子 (SAM, Ade, TPP) に応じて構造変化を起こす RNA の設計。mfold によって予測される RNA 二次構造の熱安定性($-\Delta G^{\circ}_{37}$)を下に示してある。B) 改変型ルシフェラーゼによる SAM (橙)、Ade (青)、TPP (紫) の検出。

研究紹介（講演賞受賞）

PatD-FITシステム：アゾリンペプチドの汎用人工合成系

東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻 後藤 佑樹

1. はじめに

ペプチド性天然物の主鎖骨格中には、チアゾリンやオキサゾリンに代表されるヘテロ五員環骨格が多く見受けられる¹ (図1)。通常のタンパク質には存在しない特徴的なモチーフである主鎖ヘテロ環骨格は、配向が固定された水素結合サイトを有しており、ペプチド全体の立体配座の安定化に寄与する。このため、ペプチダーゼによる分解に対する耐性や標的分子への結合において大きな役割を果たし、主鎖ヘテロ骨格は強い生理活性を示すペプチド性天然物の重要な構造モチーフと言える。この様な背景から我々は、主鎖ヘテロ環骨格含有ペプチドを、新規生理活性分子の有望な候補となる化合物群として注目している。

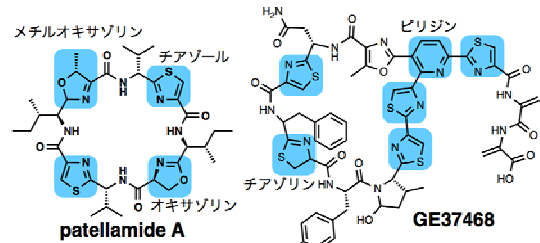


図1 主鎖にヘテロ環骨格を有するペプチド性天然物の例。

主鎖ヘテロ環骨格を含むペプチドの生合成経路としては、非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）によるものがよく知られているが、それ以外にも翻訳後修飾酵素によるペプチド主鎖骨格の変換に頼った経路も存在する²。その一例としては、翻訳合成された前駆体ペプチド中の Cys/Ser/Thr 残基を脱水的に環化し、アゾリン環骨格を形成する脱水ヘテロ環化酵素が挙げられる。本研究では、翻訳修飾型の脱水ヘテロ環化酵素の一つである、シアノバクテリア由来の PatD 酵素³に注目した (図2)。PatD の基質ペプチドは、PatE と呼ばれるシアノバクチンの前駆体ペプチドであり、N 末端には強く保存されたリーダーペプチド (LP) 領域が、その下流にはカセット配列 (CS) と呼ばれる Cys/Ser/Thr リッチな領域が二つ存在する³。CS 領域のみが、選択的に PatD による脱水ヘテロ環化を受け、その後他の酵素 (PatG 及び PatA) による更なる修飾 (アゾール環への酸化・マクロ環状化) を経て、最終的に成熟したシアノバクチンへと変換される。PatD は、ペプチド上の異なるカセット配列を修飾可能、②一つの酵素でチアゾリン・オキサゾリン・メチルオキサゾリンの三種類のアゾリン環を形成可能、といったユニークな特長を有することから、我々は PatD をアゾリン含有ペプチド (アゾリンペプチド) の汎用的な合成ツールとして利用できるのではないかと着目した。

2. PatD-FIT システムの構築

我々はまず、当研究室で以前に開発した改変型再構成無細胞翻訳系 (flexible in vitro translation, FIT システム)⁴と PatD 酵素とを試験管内で組み合わせ、新規人工合成系 (PatD-FIT システム) の確立を目指した。この系では、転写反応・翻訳反応・PatD 修飾反応がワンポットで進行するため、適切にデザインした合成 DNA 断片を用意するだけで、自在に PatE 類縁体を合成し、更に対応するアゾリンペプチドへ

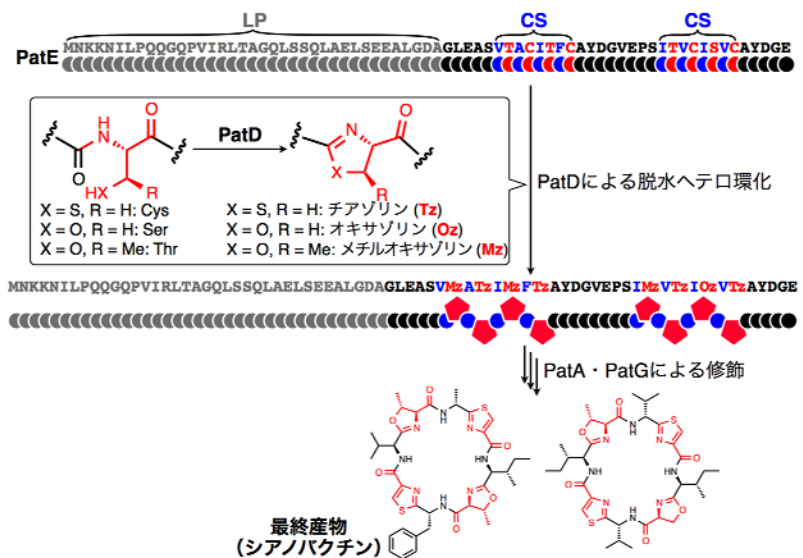


図2 PatDによる基質 PatE ペプチドの脱水ヘテロ環化とシアノバクチン生成。

と変換できる (図 3A)。さらに、FIT システムは、翻訳に用いられる遺伝暗号を人工的に改変することができるため、非天然型のアミノ酸を含む PatE 類縁体も調製可能である。つまり、PatD-FIT システムを確立できれば、アゾリンペプチドの簡便な合成法となるだけでなく、PatD の触媒特性や基質許容性を調査する上で有用な研究ツールとなることが期待される。

まず、PatD-FIT システムの実証のためのモデル実験として、人工の PatE 誘導体の発現を行った。具体的には、CS を一つだけ有する短い PatE 誘導体 (PatE-1CS) をデザインし、これをコードした鋳型 DNA を用意した。PatD を含まない通常の FIT システムにこの DNA を

加え、生成物を質量分析したところ、予想される PatE-1CS に相当する単一のピークが観測された。一方、PatD を含んだ FIT システムで同じ DNA を発現したところ、PatE-1CS と比べて 72 Da 小さな生成物が得られた (図 3B)。72 Da の減少は、4 分子の水の脱水に相当することから、CS 中に存在する合計四つの Cys/Thr が全て脱水ヘテロ環化され、対応するアゾリンへと変換されたアゾリンペプチドが産生したことを意味する。この結果により、DNA を鋳型として対応するアゾリンペプチドを試験管内で合成する PatD-FIT システムが確立された。

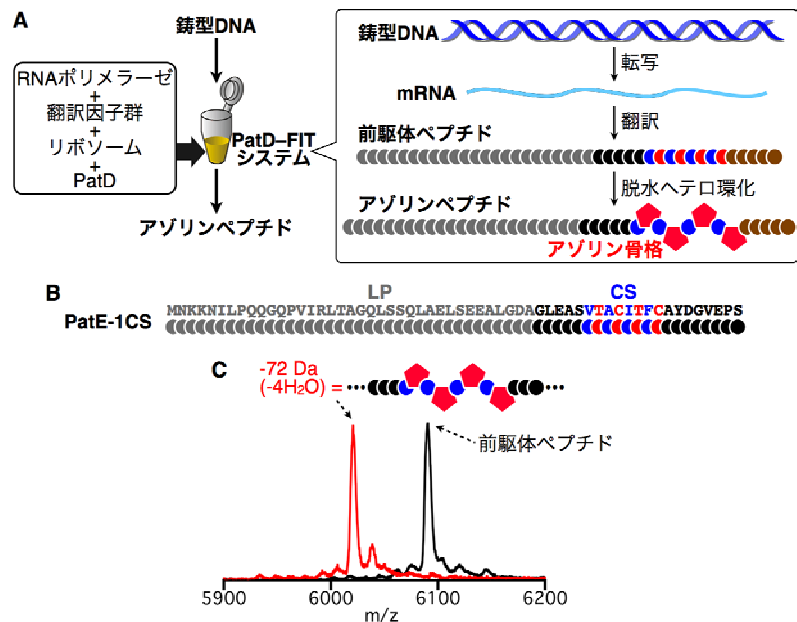


図 3 モデルペプチド配列を用いた PatD-FIT システムの実証。A. PatD-FIT システムの概要。B. 用いたモデルペプチド PatE-1CS の配列。C. PatD-FIT システム生成物の質量分析。PatD 非存在下・存在下での生成物のマスペクトルをそれぞれ黒色・赤色で示した。

3. PatD は様々な人工 CS 配列を修飾する

最近のシアノバクテリアのゲノム解析の結果から、異なる CS 配列を持つ PatE のホモログが天然には複数存在することが分かっている⁵。これら天然の CS 配列には、①CS 領域の長さは、6~8 残基長に限られている、②CS 配列は、主に疎水性及び芳香族性アミノ酸のみで構成される、③連続した Cys/Ser/Thr 残基は修飾されない、といった傾向がある。ある程度のバリエーションの CS 配列が天然に存在することは、PatD が複数種類の CS 配列を修飾できることを示唆しているものの、上記の天然 CS の傾向に合致しない人工 CS 配列を PatD が修飾できるかの知見は存在しなかった。

そこで我々は、PatD の基質許容性を調査するため、様々な人工の CS 配列を有する PatE 誘導体をデザインした。適切に設計した DNA オリゴマーを用いたアセンブリ PCR により

配列名	CS配列	C/S/T 残基数	脱水された数
PatE-1CS (WT)	VTACITFC	4	4
CS-2	VC	1	1
CS-4	VCAC	2	2
CS-14	VCACICFCVC	7	7
CS-16	VCACICFCVCACVCIC	8	8
CS-22	VCACICFCVCACVCICVC FCIC	11	11
CS-36	VCACICFCVCACVCICVC FCICFCACVCICVCFCIC	18	18
CS-allC	VCACICFC	4	4
CS-allT	VTATITFT	4	4, 3, 2
CS-allS	VSASISFS	4	4, 3, 2
CS-I5D	VTACDTFC	4	4
CS-I5N	VTACNTFC	4	4
CS-I5K	VTACKTFC	4	4
CS-14-7R9R	VCACICRCRCACVC	7	7
CS-CC	VFALIMCC	2	2
CS-CCC	VFALICCC	3	3
CS-CCCC	VFALCCCC	4	4

表 1 様々な人工 CS 配列を有する PatE 誘導体の修飾。

調整した PatE 誘導体遺伝子を PatD-FIT システムで発現し、生成物にいくつアズリン環が導入されているかを質量分析により調査した (表 1)。その結果、以下に箇条書きで示す様に、PatD が非常に幅広い基質許容性を示すことが明らかとなった。A. PatD は様々な長さの CS を修飾できる。例えば、Cys を 1 個含む 2 残基長の短い CS や、Cys を 18 個含む 36 残基長の長い CS であっても完全に脱水ヘテロ環化が進行した。B. PatD は Cys/Ser/Thr のいずれも修飾可能であるが、その中でも Cys を一番効率良く脱水ヘテロ環化させる。C. PatD は配列構成要素に依存せず、多様な CS を修飾できる。例えば、親水性アミノ酸を含有する CS の場合でも、効率良くアズリン環が導入された。D. PatD は連続した Cys を修飾し、チアズリンの連続骨格へと変換できる。

以上、人工 CS 配列を持つ PatE 誘導体を用いた実験の結果、PatD が幅広い基質許容性を有しており、PatD-FIT システムを用いて幅広い配列のアズリンペプチドを合成できることが確認された。

4. PatD は非タンパク質性アミノ酸を修飾し、非天然型ヘテロ環を形成しうる

シアノバクチンの生合成経路において、PatD は専ら Cys/Ser/Thr 残基の脱水ヘテロ環化を触媒している。天然の基質ペプチドには、当然のことながら 20 種類のタンパク質性アミノ酸しか存在しないことから、これまで PatD が Cys/Ser/Thr 以外のアミノ酸を修飾可能かどうかはほとんど知見がなかった。そこで我々は、FIT システムによる遺伝暗号のリプログラミング法を活用することで、非タンパク質性アミノ酸を有する PatE 誘導体を合成し、PatD が非天然型アズリン骨格を構築できるかどうかを調査した。

FIT システムでは、特定のアミノ酸の代わりに、非タンパク質性アミノ酸で人工的にアシル化した tRNA を加えることで、自在に翻訳合成に利用される遺伝暗号を改変することができる。本実験では、本来 Cys をコードする UGU コドンに様々な非タンパク質性の Thr 類縁体を人工的に割り当て、CS 領域に Thr 類縁体を含有する PatE 変異体を翻訳合成し、得られた翻訳産物をランボットで PatD と反応させた (図 4A)。その結果、PatD がメチル基を他のアルキル基・アリール基に置き換えた Thr 誘導体を脱水し、対応する置換アズリンへと変換可能であることが明らかとなった (図 4B)。さらに、3 位の立体配座が S 配座になった allo-Thr も、PatD によって効率良く脱水ヘテロ環化された (図 4C)。これらの結果は、PatD が立体配座に関わらず、多種多様な 3 位の置換基を許容することを意味する。

さらに、3 位の求核基をアミノ基に変えた 2,3-ジアミノプロピオン酸 (Dap)、及び求核基の位置を 4 位へと伸ばしたホモシステイン (Hcy) と 4-アミノホモアラニン (Aha) ⁶ で遺伝暗号のリプログラミングを行う実験も行った。その全てにおいて、PatD による脱水ヘテロ環化が確認され (図 4D・E)、天然の系では合成されないアズリ

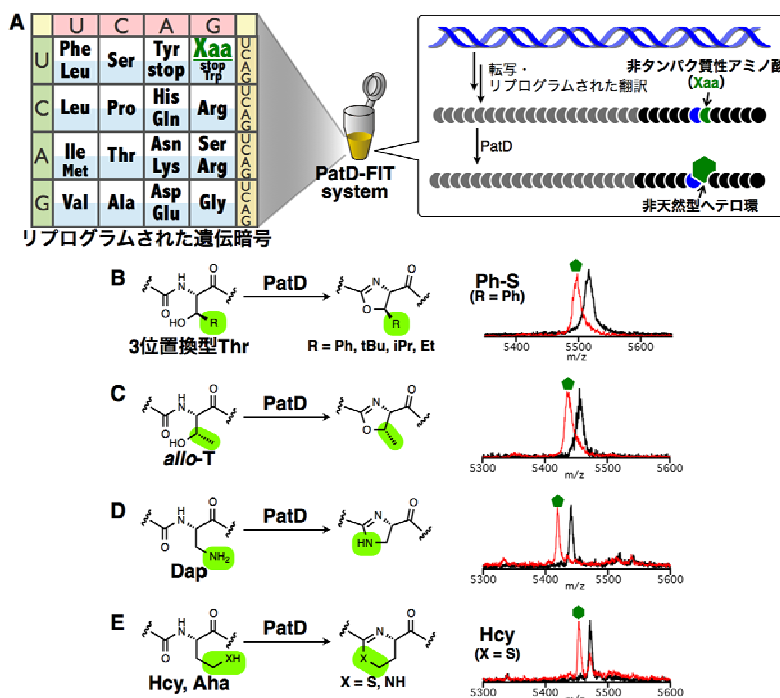


図4 リプログラミングした PatD-FIT システムを用いた非天然型ヘテロ環の合成。A. 本実験で用いた改変遺伝暗号と PatD-FIT システムの概要。B-E. PatD による非タンパク質性アミノ酸の修飾。PatD 非存在下・存在下での生成物のマスペクトルをそれぞれ点線・実線で示した。五角形もしくは六角形のラベルは、目的の非天然型ヘテロ環を含むペプチド産物に相当するピークを意味する。

ン骨格（イミダゾリン）やヘテロ六員環骨格（ジヒドロチアジン・テトラヒドロピリミジン）を PatD が形成できることが確認された。

これら一連の遺伝暗号のリプログラム法を用いた実験は、PatD が天然の系では発揮していない「隠れた」触媒能を有していることを初めて明らかにした。これは、PatD-FIT システムが、多彩な非天然型ヘテロ環を含有するペプチドの合成に適応可能であることも意味している。

5. まとめと展望

本研究の成果により、PatD が類い希な基質許容性を示す、万能ヘテロ環形成酵素であることが明らかとなった。本酵素を組み込んだ人工合成系 PatD-FIT システムは、対応する DNA から迅速かつ簡便にアズリンペプチドを合成可能であることから、様々なアズリンペプチドの汎用合成ツールとしての利用が期待できる。紙面の都合上、本記事では詳細な記述を省略したが、LP 配列を持たないペプチドであっても基質として修飾可能な人工改変 PatD 酵素の開発にも、最近成功している。さらにこの人工改変 PatD 酵素を用いることで、高度に主鎖ヘテロ環が集積した短鎖アズリンペプチドや大環状アズリンペプチドの試験管内合成法も確立した。また、アズリン環の酸化型であるアゾール骨格の合成が可能な人工合成系の構築も鋭意進めている。

当研究室のこれまでの研究で実証されている通り、FIT システムは高多様性ペプチドライブラリーの構築とそれからの生理活性ペプチドの試験管内セレクションに応用することができる⁸。つまり、PatD-FIT システムを活用することで、生理活性分子の候補としてより有望なアズリンペプチドライブラリーの構築が原理的に可能である。今後、新規生理活性アズリンペプチドの創製を目指し、PatD-FIT システムの改良を実施していく予定である。

謝辞

本研究は、東京大学 大学院理学系研究科 菅研究室にて実施しているものです。菅教授には、常日頃から多大なる御支援と御指導をいただき、ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究に関連する実験を進めて頂いた、伊藤悠美氏、角田翔太郎氏、加藤保治氏に心から感謝致します。本研究は JST さきがけ研究（細胞機能の構成的な理解と制御）及び第一三共生命科学研究振興財団からの研究助成のもと行われました。

- (1) (a) Roy, R. S.; Gehring, A. M.; Milne, J. C.; Belshaw, P. J.; Walsh, C. T. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 249. (b) McIntosh, J. A.; Donia, M. S.; Schmidt, E. W. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 537. (c) Melby, J. O.; Nard, N. J.; Mitchell, D. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 369.
- (2) (a) Lee, S. W.; Mitchell, D. A.; Markley, A. L.; Hensler, M. E.; Gonzalez, D.; Wohlrab, A.; Dorrestein, P. C.; Nizet, V.; Dixon, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 5879. (b) Donia, M. S.; Ravel, J.; Schmidt, E. W. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 341.
- (3) Schmidt, E. W.; Nelson, J. T.; Rasko, D. A.; Sudek, S.; Eisen, J. A.; Haygood, M. G.; Ravel, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 7315.
- (4) (a) Murakami, H.; Ohta, A.; Ashigai, H.; Suga, H. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 357. (b) Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, H. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 779. (c) Passioura, T.; Suga, H. *Chemistry* **2013**.
- (5) Donia, M. S.; Hathaway, B. J.; Sudek, S.; Haygood, M. G.; Rosovitz, M. J.; Ravel, J.; Schmidt, E. W. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 729.
- (6) Nakajima, E.; Goto, Y.; Sako, Y.; Murakami, H.; Suga, H. *Chembiochem* **2009**, *10*, 1186.
- (7) Oman, T. J.; van der Donk, W. A. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 9.
- (8) (a) Yamagishi, Y.; Shoji, I.; Miyagawa, S.; Kawakami, T.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1562. (b) Hipolito, C. J.; Suga, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 196.

研究紹介（講演賞受賞）

PYP タグと発蛍光プローブを用いた細胞内タンパク質ラベル化技術の 開発と応用

大阪大学大学院工学研究科、JST さきがけ 堀 雄一郎

1. はじめに

細胞内のタンパク質の局在や機能を明らかにすることは、生命現象を理解するうえで極めて重要である。特に、タンパク質の蛍光ラベル化は、生細胞におけるタンパク質の動態を可視化する技術であり、今日の生命科学研究において必須のものとなっている。この技術の発端となったのは、2008年のノーベル賞受賞対象となった蛍光タンパク質である。1990年代に遺伝子工学により標的タンパク質を可視化する技術が確立してから、蛍光強度・波長・フォトクロミズムなどの観点から優れた性質を持つ蛍光タンパク質が多数報告されている¹⁾。しかしながら、蛍光タンパク質は万能というわけではなく、タンパク質のサイズが大きいことや、蛍光団の成熟に時間を要すること、長波長領域（深赤色から近赤外光）において明るい蛍光タンパク質がないことなどが解決すべき課題として指摘されている。このような状況下で、蛍光タンパク質に代わり、合成蛍光プローブを用いた化学アプローチにより開発された新しいタンパク質蛍光ラベル化技術が注目を集めている。

本稿では、合成蛍光プローブとタグタンパク質を利用した蛍光ラベル化技術を概説し、我々が開発に取り組んでいる蛍光ラベル化技術について紹介する。なお、昨年のニュースレター（Vol. 27, No. 3, 2-5）にもタンパク質ラベル化技術に関する研究紹介を寄稿しているため、我々の技術に関しては、昨年以降の進展について紹介する。

2. 合成蛍光プローブとタグタンパク質を利用したタンパク質ラベル化技術

タグタンパク質とは、合成蛍光プローブと特異的に結合するタンパク質のことであり、通常、プローブは、タグタンパク質の特異的リガンドに蛍光色素をつなぐことにより設計される。まず、標的タンパク質を遺伝子工学によりタグタンパク質と融合させ、生細胞において発現させる。この発現細胞に合成蛍光プローブを添加し、タグタンパク質を蛍光ラベル化することで、標的タンパク質を可視化することができる（図1）。既存のタグタンパク質としては、Halo-Tag、SNAP-tag、TetraCys-tag（Lumio-tag）などがあげられる²⁻⁴⁾。この手法の蛍光タンパク質に対する利点として、次の三点を挙げることができる。一点目は、タグタンパク質の選択によっては、サイズの小さなものが利用できることである。このため、蛍光タンパク質でよく取り上げられるサイズの問題を解決することができると考えられる。二点目は、特定のタイミングでタンパク質をラベル化することができる点である。このことを利用しタンパク質をパルスチェイスラベルすることで、詳細にタンパク質の動態を時空間解析することが可能となるといえる。また、蛍光タンパク質が蛍光団の成熟に時間を要するため、発現直後のタンパク質の動態を視ることができないのに対し、合成蛍光プローブを用いた手法では、そのブラックボックスの時間におけるタンパク質の動態を視ることができる可能性がある。三点目は、蛍光色素部分を取り換えることで、近赤外蛍光色素を含めた様々な色素を蛍光プローブに導入できることである。また、蛍光分子以外の機能性分子の導入も可能であることから、蛍光タンパ

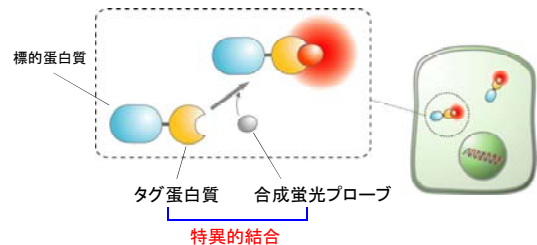


図 1. 合成蛍光プローブとタグタンパク質を利用した蛋白質標識法

ク質にはない応用展開を期待できる。

一方、合成蛍光プローブを用いた手法の問題は、遊離の状態もしくは細胞内成分に非特異結合した状態のプローブが蛍光を発することである。このため、標的タンパク質を高いS/N比で検出するには、このような望ましくない蛍光成分を細胞の洗浄操作で完全に除去する必要がある。しかしながら、プローブによっては、除去が困難な場合や洗浄に時間がかかり迅速なイメージングができないことがあるため、これらの問題を解決する新しい方法の開発が望まれていた。そこで、我々は、その解決策として、遊離の状態では非蛍光性で、タグタンパク質と結合すると蛍光強度を上昇させる「発蛍光プローブ」の開発を行った。この発蛍光プローブを用いることで、遊離プローブを洗浄除去することなく迅速にタンパク質をイメージングできることを期待した。

3. PYP タグと発蛍光プローブによる生細胞内タンパク質イメージング法の開発

我々のグループでは、新しいタグタンパク質として Photoactive yellow protein (PYP) に着目し、ラベル化技術の開発を行っている。PYP タグは、紅色硫黄細菌由来の蛋白質であり、リガンドである桂皮酸やクマリンのチオエステル誘導体と共有結合することが知られている^{5,6)}。そのサイズは 14 kDa と蛍光タンパク質の半分の小ささであり、タグタンパク質として魅力的であるといえる。これまでに、PYP タグをラベル化する二つの発蛍光プローブ (FCTP と FCANB) の開発に成功している^{7,8)}。FCANB は、FCTP に比べ反応速度が 110 倍速く (FCTP: $k_2 = 1.11$ ($M^{-1}s^{-1}$); FCANB: $k_2 = 125$ ($M^{-1}s^{-1}$)) 細胞膜上のタンパク質を細胞洗浄操作無しでイメージングできる。詳細は、昨年度のニューズレター (Vol. 27, No. 3, 2-5) を参照いただきたい。このとき問題となったのは、FCANB が膜非透過性であり、

細胞内のタンパク質をラベル化することができないことであった。そこで、膜透過性であり細胞内タンパク質を無洗浄で迅速にイメージングすることができるプローブの開発が新たな課題となった。

開発にあたり着目したのは、PYP タグのリガンドの分子構造である。現在までに報告されているリガンド分子は、4-ヒドロキシ桂皮酸、4-ジメチルアミノ桂皮酸及び7-ヒドロキシクマリンの誘導体などである^{5,6)}。これらの分子の構造類似性から、7-ジメチルアミノクマリン (DMAC) 誘導体も PYP タグに結合すると予想した。この分子に着目したのは、DMAC は、極性の高い溶媒中では蛍光強度を低下させ、極性の低い溶媒中では蛍光強度を上昇させる環境応答性蛍光色素であるからである。そこで、この性質をタンパク質のラベル化に応用することで、DMAC 誘導体を PYP タグの発蛍光プローブとして利用できるのではないかと考えた (図 2)。なぜならば、プローブは、遊離の状態では極性の高い水中にあるため蛍光強度が低下し、ラベル化されると PYP タグの疎水性ポケットにはまり込むために蛍光強度が上昇すると予想されるからである。DMAC の水溶性向上のため、カチオニックなトリメチルアミノ基またはアニオニックなカルボン酸を導入したプローブ TMBDMA もしくは CMBDMA を設計・合成した。まず、SDS-PAGE の解析により、両プローブとも共有結合により PYP タグと結合することが示された (図 3a)。また、細胞溶解液中でラベル化反応を行ったところ、PYP タグの分子量の位置のみから蛍光バンドが観測されたことから、プローブは PYP タグと特異的に結合することが示された (図 3b)。蛍光スペクトルを測定したところ、プローブの蛍光強度は、遊離状態では低く、PYP タグとの反応により大きく上昇した (図 3c)。このことから、両プローブともに PYP タグをラベル化する発蛍光プローブであることが示された。更に、二次反応速度定数を決定したところ、TMBDMA は $k_2 = 3,950$ ($M^{-1}s^{-1}$)、CMBDMA は $k_2 = 126$ ($M^{-1}s^{-1}$) であり、TMBDMA に関し

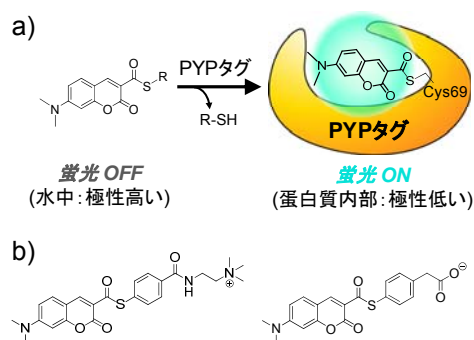


図 2. a) DMAC を利用した PYP タグのラベル化。b) TMBDMA (左) と CMBDMA (右) の化学構造。

では、以前に開発した FCANB に比べ反応速度の大幅な向上 (約 32 倍) がみられた (図 3d)。TMBDMA と CMBDMA で反応速度に違いが生じたのは、電荷と脱離基の pK_a の違いに由来すると考えられる。PYP タグの等電点は 4.3 であり、生理的条件下ではアニオン性状態にある。このため、カチオン性 TMBDMA とは静電引力が作用し、アニオン性 CMBDMA とは静電反発を引き起こした可能性がある。また、プローブは PYP タグと結合する時チオールが脱離するが、TMBDMA の脱離基のチオールの pK_a は CMBDMA のそれに比べ低く、TMBDMA の反応性がより高くなったと考えられる。

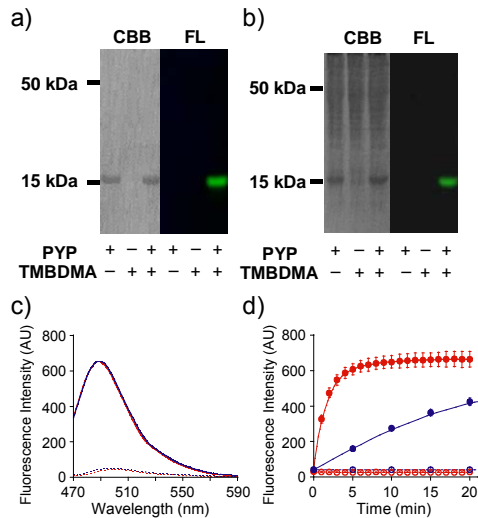


図 3. TMBDMA/CMBDMA による PYP の蛍光ラベル化。(a,b) TMBDMA による PYP のラベル化反応の SDS-PAGE による解析。左図は CBB 染色画像、右図は蛍光画像を示している。(a)は緩衝液中、(b)は細胞溶解液中におけるラベル化反応を示している。(c) ラベル化に伴う蛍光強度変化。赤線と青線は、それぞれ TMBDMA と CMBDMA のスペクトルであり、実線と点線は PYP をラベル化した時と遊離状態の時のプローブのスペクトルを示す。(d) ラベル化反応の時間変化。赤丸と青丸は、TMBDMA と CMBDMA の蛍光強度変化を示し、塗りつぶしもしくは中抜きマークは、PYP 存在下または非存在下におけるプローブの蛍光強度変化を示す。

4. 生細胞蛍光イメージングと DNA メチル化解析

次に、これらのプローブを用いて、生細胞内に発現させた PYP タグをラベル化しイメージングができるかを検討した。まず、マルトース結合タンパク質 MBP と PYP タグの融合遺伝子 MBP-PYP と、PYP タグと核局在化シグナルの融合遺伝子 PYP-NLS を HEK293T 細胞に導入し発現させ、TMBDMA を添加し洗浄操作を行うことなく蛍光観察を行った (図 4a,b)。その結果、MBP-PYP 発現細胞では主に細胞質から、PYP-NLS 発現細胞では核から蛍光が観測された。一方、非発現細胞からは蛍光は観測されなかった。また、CMBDMA についても同様の結果が得られた。これらの蛍光画像は、洗浄操作を行ったときと比較しても大きな違いは確認されなかった。以上の結果から、TMBDMA 及び CMBDMA を用いることで、洗浄操作無しで生細胞内蛋白質をイメージングすることに成功した。さらに、PYP-NLS 発現細胞に TMBDMA を添加しタイムラプスイメージングを行ったところ、約 6 分で核内の蛍光が飽和することが分かった。このことから、TMBDMA を用いることにより、非常に短い時間で細胞内のタンパク質をラベル化しイメージングできることが示された。

最後に、我々は、PYP タグを用いたラベル化技術の応用例として、細胞核内の DNA メチル化の可視化を行った。DNA のメチル化は、遺伝子発現をエピジェネティックに制御する重要な化学修飾である。その修飾反応は DNA メチル転移酵素により触媒され、CpG 配列を持つシトシンの 5 位がメチル化される。DNA メチル化の異常は、癌などの疾患の原因となることから、医学・創薬分野においても大きな注目を集めている。まず、メチル CpG に結合するタンパク質である MBD1 (MethylCpG-binding

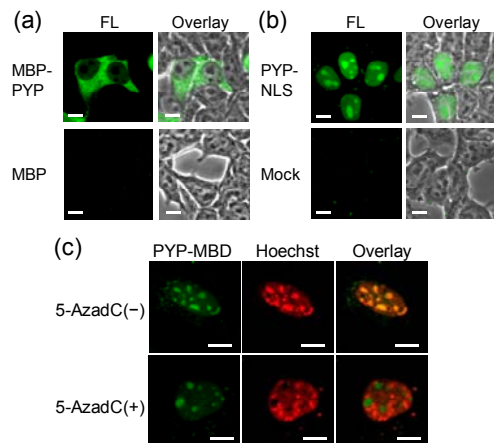


図 4. TMBDMA による無洗浄生細胞蛍光イメージング。a) MBP-PYP 及び b) PYP-NLS の可視化。c) PYP-MBD の 5-AzadC 非存在下 (上部)、存在下 (下部) における可視化。

domain 1) と PYP タグの融合遺伝子 PYP-MBD を NIH3T3 細胞に導入し発現させ、TMBDMA または CMBDMA を添加し洗浄操作を行わずにイメージングを行ったところ、核内からドット状の蛍光が複数観測された (図 4c)。また、その蛍光は、Hoechst の蛍光と局在が重なった。一般に、Hoechst は、核内のヘテロクロマチンと呼ばれる DNA メチル化の亢進した領域を染色することが知られていることから、PYP-MBD は、ヘテロクロマチン領域に局在化していることが示唆された。更に、DNA メチル化阻害剤である 5-AzadC を添加し、イメージング実験を行ったところ、PYP-MBD に結合したプローブの蛍光は、Hoechst 染色部位とは重ならない位置から観測された。このことは、DNA メチル化阻害剤非存在下では、PYP-MBD が DNA メチル化領域に結合しており、DNA メチル化の阻害により、DNA から解離し局在を変化させたと考えられた。このように、本技術は、DNA メチル化解析に応用することができ、DNA メチル化阻害剤の生細胞評価ツールとしても利用できる⁹⁾と期待される。

4. おわりに

本研究では、PYP タグの新規蛍光性リガンドを新たに発掘し、そのリガンドの環境応答性に基づいた発蛍光スイッチを活用することで、生細胞内のタンパク質を迅速かつ高 S/N 比でイメージングする技術を開発した。タグタンパク質をラベル化する発蛍光プローブは、いくつかのグループで開発されているが、多くの場合、生細胞内のタンパク質を洗浄操作無しで特異的に検出するのに数十分から数時間を要する。これに対し、TMBDMA を用いることで数分以内という非常に短い時間で生細胞内タンパク質をイメージングできることは、本技術の大きなアドバンテージである。また、PYP タグのサイズが小さいということも、タンパク質の生細胞イメージングにとって理想的な特長といえる。

今後は、イメージングの更なる高速化・高感度化に取り組むとともに、蛍光以外の機能も併せ持つ分子をプローブに導入することで、生命科学を探索する新しい化学ツールを創製していきたい。

謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科の菊地和也教授の研究室で行われたものであり、菊地先生には研究の立ち上げから現在に至るまで多大なるご指導とご支援を頂いており、ここに厚くお礼申し上げます。また、研究遂行にあたり多くのアドバイスを頂いた菊地研究室の水上進准教授、実験を実施してくれた同研究室の則信智哉氏、佐藤基氏、西浦美也子氏、DNA メチル化に関する共同研究を行って頂いた京都大学の白川昌宏教授と横浜市立大学の有田恭平准教授に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Wiedenmann, J., Oswald, F., Nienhaus, G. U., *IUBMB Life*, **61**, 1029-1042 (2009)
- 2) Los, G. V., Wood, K. *Methods Mol. Biol.*, **356**, 195-208 (2006)
- 3) Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, K. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 86-89 (2003)
- 4) Griffin, B. A., Adams, S. R., Tsien, R. Y., *Science*, **281**, 269-272 (1998)
- 5) Kroon, A. R., Hoff, W. D., Fennema, H. P., Gijzen, J., Koomen, G. J., Verhoeven, J. W., Crielgaard, W., Hellingwerf, K. J. *J. Biol. Chem.* **271**, 31949-31956 (1996)
- 6) van der Horst, M. A., Arents, J. C., Kort, R., Hellingwerf, K. J. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **6**, 571-579 (2007)
- 7) Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S., Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16610-16611 (2009)
- 8) Hori, Y., Nakaki, K., Sato, M., Mizukami, S., Kikuchi, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5611-5614 (2012)
- 9) Hori, Y., Norinobu, T., Sato, M., Arita, K., Shirakawa, M., Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12360-12365 (2013)

研究紹介（講演賞受賞）

ランタニドイオンを活用した常磁性 NMR 法による糖鎖の動的構造解析

自然科学研究機構 分子科学研究所 山口拓実

1. はじめに

糖鎖は、核酸・タンパク質とならぶ第 3 の生命鎖ともよばれ、生命現象の様々な局面で重要な働きをしている。例えば、糖鎖はタンパク質を修飾することにより、安定性の維持や高次機能の制御に寄与している。さらに、分子シャペロンや積荷輸送体としての機能を持つ一連の糖認識タンパク質との相互作用を通じて、それを担うタンパク質のフォールディング・輸送・分解といった運命を決定する機能を果たしていることが明らかになってきた¹⁾。また、細胞膜上に存在する糖脂質は、細胞間接着やシグナル伝達など、細胞間コミュニケーションに密接に関わる一方で、ウイルス感染などを媒介する役割も担っている。

このような糖鎖の生物機能の分子科学的基盤に関する理解を深めるためには、その 3 次元構造について精密な情報を収集することが不可欠である。しかしながら、糖鎖は、内部運動の自由度に富むことに加え、核酸やペプチド鎖にはない複雑な分岐構造を持ち、水溶液中で一定のコンフォメーションをとっていない。そのため、糖鎖に対して分子科学的なアプローチを行うことはこれまで困難であった。私たちはこの問題の解決に向け、核磁気共鳴 (NMR) 法による糖鎖の立体構造・ダイナミクス・相互作用解析のための系統的な方法論の開発に取り組んでいる。

2. 常磁性プローブ導入による糖鎖の立体構造解析法の開発

タンパク質の構造学的研究においては、核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した NMR による立体構造解析法が確立されている。一方、糖鎖はプロトン密度が低いため、近距離にあるプロトン間の距離情報を反映する NOE を観測し、これに基づいて構造解析を行うことは容易ではない。そこで私たちは、長距離にわたる原子配置の情報を与える常磁性効果に着目した。常磁性化合物の NMR 測定では、不対電子と原子核の間の双極子相互作用により、一般的な反磁性分子とは大きく異なった化学シフトや、シグナルの広幅化が観測される。NMR シグナルが受けるこれらの摂動の大きさは、各原子核と常磁性中心との間の距離や角度といった空間配置に依存しており、NOE とは異なる分子構造情報を含有している²⁾。

この性質を応用した糖鎖の NMR 解析法を確立するため、常磁性ランタニドイオンをキレートするエチレンジアミン四酢酸誘導体を新規に合成し、これを、タンパク質を修飾する N 型糖鎖に共通のコア構造であるジアセチルキトビオース (GlcNAc β 1-4GlcNAc) の還元末端へと連結した。プローブとなる金属イオンの位置を固定し常磁性効果の定量的な解析を実現するため、金属配位部位と糖鎖の間には剛直なリンカー構造を導入した。調製した試料に対して 1 当量のランタニドイオンを添加することで常磁性プローブを所定の位置へ導入することに成功し、安定な 1:1 複合体の形成に伴って擬コン

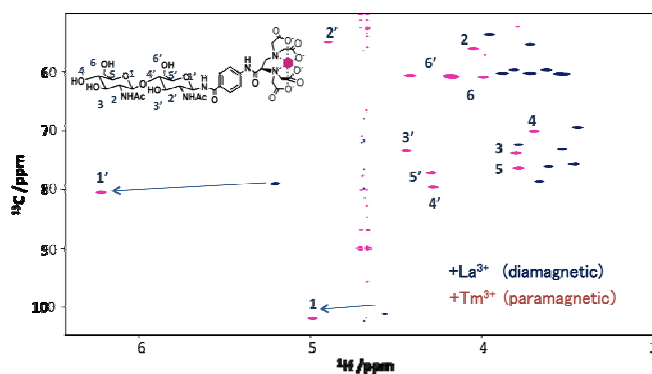


図 1 常磁性プローブの導入によるジアセチルキトビオースの ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルの変化。青色は La^{3+} 添加時、赤色は常磁性ランタニドイオンである Tm^{3+} 添加時のスペクトル。アノマー位のピークの変化を矢印で示した。文献 3 より (permission from John Wiley and Sons)。

タクトシフト (PCS) による NMR スペクトル変化が確認された。そこで、 ^1H - ^{13}C HSQC 測定により、糖鎖の各水素および炭素原子の化学シフト変化を求めた (図 1)。その結果、期待通り、常磁性プローブに近接する還元末端側において最も大きな PCS 値が観測された。さらに詳細な解析を行うために、分子動力学 (MD) 計算により求めたジアセチルキトビオースの安定構造をもとに、PCS の実験値と計算値を比較したところ、両者は非常に良い一致を示した。このことから、ランタニドイオンの導入による糖鎖構造への影響はみとめられず、本方法を用いることで、水溶液中の糖鎖の立体構造情報を新たに取得できることが明らかとなった³⁾。

また、より巨大で複雑な糖鎖の構造解析についての応用を目指し、分泌経路においてタンパク質の品質を提示する役割を担う高マンノース型糖鎖の常磁性 NMR 解析を試みた。私たちは、糖転移酵素および糖分解酵素をコードする遺伝子を欠損させた酵母変異株を用いて、高マンノース型糖鎖を均一かつ大量に調製する方法を開発してきた⁴⁾。この手法を用いて調製した高マンノース型糖鎖 M9 (Man α 1-2Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc) に関して、化学修飾のための反応条件を最適化し、常磁性プローブとなるニトロキシラジカルを導入した。M9 は、マンノース 9 残基を含む 11 糖であり、その非還元末端側にいずれも共通する糖鎖構造 (Man α 1-2Man) を含む 3 本の分岐鎖を有している。得られた M9 について ^1H の緩和時間測定を実施し、各マンノース残基の空間配置に関する情報を反映した常磁性緩和促進効果を観測した (図 2)。解析の結果、3 本の分岐鎖のコンフォメーションは有意に異なっており、一部の枝を還元末端側に向けたフォールドバック構造を取り得ることが示された⁵⁾。このように常磁性プローブを活用した NMR 解析を通じて、糖鎖のコンフォメーションを定量的に捉える道筋を確立することができた。

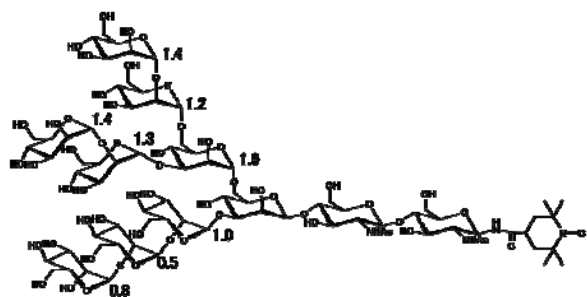


図 2 常磁性プローブを導入した M9 糖鎖の構造およびラジカルクエンチ前後の各マンノース残基の横緩和速度変化の大きさ (s^{-1})。文献 5 より (permission from The Chemical Society of Japan)。

3. 分子シミュレーションと NMR による糖鎖のコンフォメーションダイナミクスの描象

柔軟な生命鎖である糖鎖は、そのコンフォメーションの絶え間ない変化を通じて機能を発揮していると考えられる。したがって、糖鎖の構造解析では、静的な安定構造を求めるだけではなく、溶液中での立体構造の揺らぎを含めた動態を明らかにする必要がある。生体分子の立体構造のダイナミクスを記述する有力な方法の 1 つに MD 計算があげられるが、その計算結果が実際の系の振る舞いを再現しているか否かを検証するためには NMR 法が広く用いられている。私たちは、常磁性 NMR 法を活用することにより、糖鎖立体構造の MD 計算の結果を評価する新規方法の確立を行った。

神経細胞膜上に存在する糖脂質ガングリオシド GM3 の糖鎖構造 (NeuAc α 1-3Gal β 1-4Glc) について、MD 計算と常磁性 NMR 計測を実施し、PCS の理論値と実験値を比較することで MD 計算により得られた構造サンプリングの適切さを評価した。GM3 糖鎖の MD 計算を行ったところ、エネルギー差の小さな複数の安定構造が存在し、その立体構造は水溶液中で揺らいでいることが示唆された。そこで、MD 計算によって得られた複数のコンフォマーを考慮した立体構造のアンサンブルモデルを作成し、PCS の理論値を算出した。一方、化学合成した GM3 糖鎖にランタニドプローブを導入して NMR 計測を行い、糖鎖の各原子の化学シフト変化から PCS 値を求めた。このようにして得られた PCS の理論値と実験値の比較を行った。その結果、主要なコンフォメーションのみならず、存在割合の低い安定構造を考慮することで両者がよりよく一致することが判明し、溶液中での糖鎖のコンフォメーションのダイ

ナミクスを正しく記述することに成功した⁶⁾。

さらに、直鎖型 3 糖である GM3 糖鎖にアセチルガラクトサミン残基 (GalNAc) が連結した分岐構造を有しているガングリオシド GM2 の糖鎖構造についても、常磁性 NMR 法と MD 計算による解析を行い、そのコンフォメーションを求めた。両者の配座空間を比較したところ、シアル酸残基 (NeuAc) のグリコシド結合がとり得るコンフォメーションは、両者の間で有意に異なることが明らかとなった (図 3)。すなわち、GM2 糖鎖のシアル酸残基が限定された配向を示すのに対し、分岐のない GM3 糖鎖では対応する部位の内部運動の自由度が大きいと、より多様な立体構造を示した。さらに GM2 糖鎖の安定構造を詳細に解析したところ、糖残基間の相互作用によってコンフォメーションが制限されることが示唆された⁷⁾。このように、MD 計算と常磁性 NMR 法を用いた動的構造解析によって、糖残基間の相互作用を通じて立体構造の揺らぎが制御されている様子を捉えることができた。

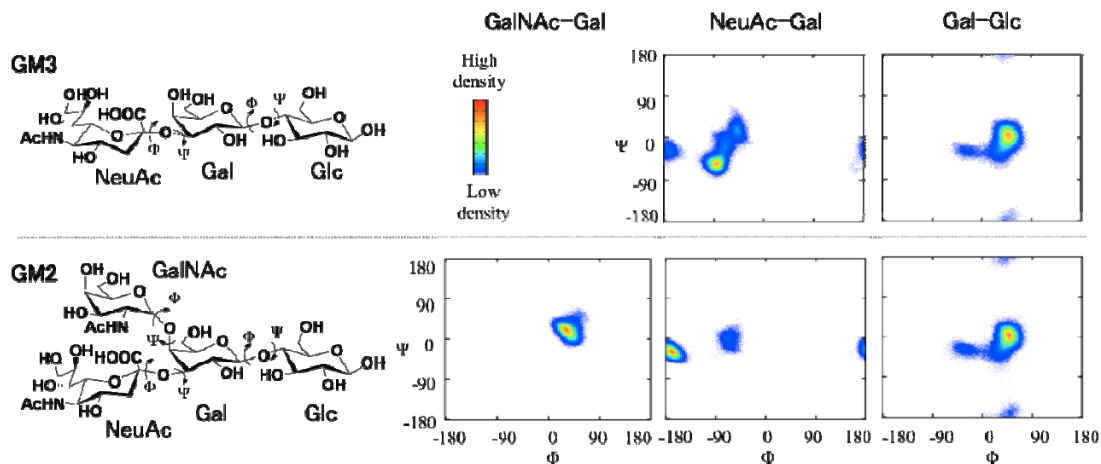


図 3 GM3 (上段) および GM2 糖鎖 (下段) の構造と、MD 計算と NMR 計測によって求めたそれらのコンフォメーション空間。糖残基間の二面角を用いて配座を表した。文献 7 より (permission from MDPI)。

4. 糖脂質含有バイセルを用いた糖鎖クラスターとタンパク質との相互作用解析

細胞膜上の糖鎖は、クラスター化することで超分子構造を形成し、動的な分子認識場として機能している。近年では、細胞表面の糖鎖クラスターが多くの神経変性疾患の発症に密接に関わっていることが見出されつつある。例えば、アルツハイマー病の発症因子の 1 つであるアミロイド β や、パーキンソン病に関わる α -シヌクレイン (α -Syn) などの天然変性タンパク質は、糖脂質の種類に応じた相互作用の特異性を示し、脂質膜との結合を通じて立体構造変化を起こすことが知られている。糖鎖の機能メカニズムを理解するためには、クラスター化した糖鎖の精密解析を行うことも重要な課題である。これを実現するためには、効果的に機能を発現する集積形態と、解析に適したサイズと均一性を両立することが必要となる。そこで、脂質膜モデルであるバイセルに着目した。バイセルは、長鎖および短鎖のリン脂質からなるディスク状集合体で、脂質を適切な比で混合することによって集合体のサイズをコントロールすることが可能である。本稿では、糖脂質含有バイセルを用いた、糖鎖クラスターと α -Syn との相互作用の NMR 解析について紹介する。

糖脂質ガングリオシド GM1、GM2 または GM3 をそれぞれ組込んだ小型バイセルを調製した。これらの糖脂質は単独では水中で巨大な会合体を形成してしまうが、バイセルへ組込むことで、サイズの制御されたクラスターモデルを構築することができた。調製した糖脂質含有バイセルに ^{15}N 標識した α -Syn を添加し NMR 計測を行った結果、 α -Syn の N 末端領域に顕著なスペクトル変化がみられた。GM1 または GM2 含有バイセルを添加した際には α -Syn のスペクトルに変化が観測されたのに対し、GM3 含有バイセル添加時にはスペクトルにほとんど変化が生じなかった (図 4)。一連の結果から、 α -Syn

の N 末端領域は糖鎖構造に依存した結合特性を担っていることが明らかとなった⁸⁾。

ところで、 α -Syn は脂質膜に結合することで、ランダムコイルから α ヘリックスへ構造変化することが知られている。しかし、糖脂質を含有した小型バイセルとの相互作用においては、特定の二次構造が誘起されないことが、NMR や CD 計測の結果から示された。これは、 α -Syn が脂質膜と結合して α ヘリックスへと構造変化を起こすことに先駆けて形成される、過渡的な複合体を反映している可能性が考えられる。サイズ制御による有限で密な相互作用面を創出することによって、このような特異な相互作用様式を捉えることが可能となってきた。

5. おわりに

糖鎖の生物機能に関する研究は、これまで主に巨視的な視点からのみ行われてきた。糖鎖の分子科学的な実体や詳細な機能メカニズムの解明を目指した研究は、未だ十分に進展していない。本稿で紹介したように、有機化学や分子生物学、分子分光学、計算科学といった多面的なアプローチによって、水中で様々なコンフォメーションをとっている糖鎖について、その分子構造情報を定量的に得ることが可能となってきた。また、糖鎖クラスターについても、これまでには得られなかった詳細な構造情報を得ることができるようになりつつある。今後、糖鎖やそのクラスターとタンパク質との複合体の構造ダイナミクスなど、糖鎖の機能メカニズムの構造基盤にさらに迫りたいと考えている。糖鎖の分子科学研究を進展させることを通して、化学と生物学の融合による生体機能関連化学分野の発展に貢献していきたい。

6. 謝辞

本研究は、自然科学研究機構教授 加藤昇一博士の研究室において、多くの方々の協力のもとで行っているものです。同グループの神谷由紀子博士、矢木真穂博士、植草義徳博士、柳浩太郎博士、Zhang Ying 修士、山本さよこ修士、宇野剛修士ならびに、Christian Griesinger 博士(Max Planck Institute)、Máté Erdélyi 博士(University of Gothenburg)、亀田倫史博士、喜多嶋敏彦博士、千葉靖典博士(以上、産総研)、戸谷希一郎博士(成蹊大)、榮慶丈博士、岡本祐幸博士(以上、名大)ら共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。また本研究は、科研費(24249002 および 24750170)の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Y. Kamiya, T. Satoh, K. Kato, *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1820*, 1327-1337.
- 2) Y. Zhang, T. Yamaguchi, K. Kato, *Chem. Lett.* **2013**, in press.
- 3) S. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Erdélyi, C. Griesinger, K. Kato, *Chem. Euro. J.* **2011**, *17*, 9280-9282.
- 4) Y. Kamiya, K. Yanagi, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba, K. Kato, *Biomolecules* **2013**, *3*, 108-123.
- 5) T. Yamaguchi, Y. Kamiya, Y.-M. Choo, S. Yamamoto, K. Kato, *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 544-546.
- 6) S. Yamamoto, Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Kameda, K. Kato, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4752-4754.
- 7) Y. Zhang, S. Yamamoto, T. Yamaguchi, K. Kato, *Molecules*, **2012**, *17*, 6658-6671.
- 8) T. Yamaguchi, T. Uno, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1235-1237.

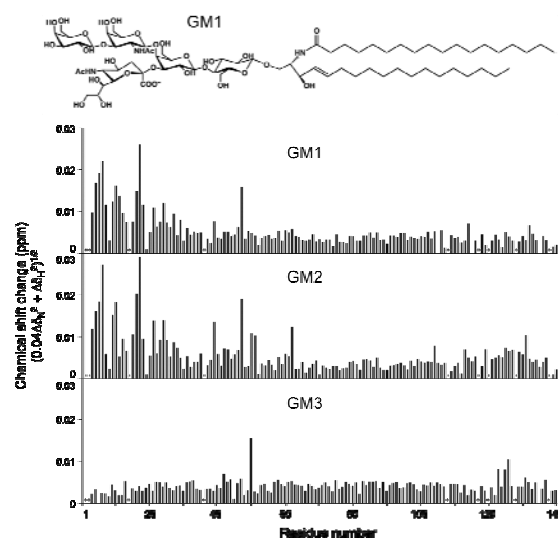


図4 ガングリオシド GM1 の構造および糖脂質含有バイセル添加時の α -シヌクレインの化学シフト変化。文献 8 より (permission from The Royal Society of Chemistry)。

ニュースレター Vol. 28, No. 2 2013年 11月 5日発行

事務局：101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会生体機能関連化学部会

Office of the Secretary : The Chemical Society of Japan, 1-5 Kanda-Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101-8307, Japan

URL: <http://seitai.chemistry.or.jp/> mail to: seitai@chemistry.or.jp

編集委員：高木昌宏、民秋 均、大槻高史、島本啓子