

トピックス

新しいnon-RI光親和性標識法の開発と標的タンパク質探索

Identification of Target Proteins by Novel Radioisotope-free Photoaffinity Labeling

細谷 孝充

Takamitsu HOSOYA

Abstract

Photoaffinity labeling (PAL) is a useful technique to explore target biomolecules of bioactive compounds. Photoaffinity probe consist of two functional groups: a photoreactive group to form a new covalent bond between the probe and its target biomolecule, and a detectable tag to distinguish the photolabeled biomolecule from unlabeled ones. These groups are required to be introduced to the original compound without diminishing its bioactivity. We have established a novel protocol for radioisotope (RI)-free PAL based on the use of bioorthogonal groups such as azido or ethynyl group. In this scheme, these groups, relatively photo-stable under the photoreactive conditions of aryl azide and trifluoromethyldiazirine, is used as a post-modifiable group to introduce a detectable tag by azido-targeting reactions such as Staudinger-Bertozzi ligation and click chemistry. Indeed, diazido-functionalized cerivastatin analogue, photovastatin CAA1, and diazidobenzylated dantrolene derivative, GIF-0430, have worked efficiently as photoaffinity probes and resulted in successful fluorescent detection and direct analyses of their target proteins. We have also developed azidodifluoromethyl-diazirynyl group as an all-in-one-type PAL group as well as a facile preparative method of biaryl-type PAL probes by Suzuki-Miyaura coupling using 3-azido-5-(azidomethyl)phenylboronic acid pinacol ester as a common intermediate. These results will contribute to drug discovery researches by providing new target biomolecules.

Key Words : photoaffinity labeling, radioisotope-free, azido group, bioorthogonal, target protein

1. はじめに

近年、「分子標的薬」と称される薬剤開発が盛んである。これは、分子設計の段階から特定の標的分子（多くは疾患関連タンパク質）に狙いを定めて開発された薬のことである。古くから類似の方法が試みられてきたが、先に化合物の薬効が見出され、後になって（本当の）標的タンパク質が明らかになったケースも多い。疾患発症の原因に関する生物学的理解の蓄積と創薬研究手法の進歩に伴い、タンパク質をはじめとする疾患関連生体分子の機能を厳密に制御しようとする戦略が、近代創薬研究の主流となりつつある。しかし、実際には薬剤や天然物など、多くの生物活性物質については、毒性などの副作用を含

め、その活性発現の分子機構は不明である。それらは生体内においてタンパク質などの生体分子に直接作用することで情報シグナルに影響を及ぼしているはずであるが、その標的分子が分かっていないことが多いのである。

本稿では、生物活性低分子化合物の標的タンパク質を簡便に同定する方法の確立を目指して我々が新たに開発した非放射性（non-RI）光親和性標識法について紹介する。

2. 光親和性標識法とは

光親和性標識法（photoaffinity labeling）とは、生物活性化合物が標的とするタンパク質と可逆的に相互作用することを利用し、両者を混合して光を照射し、光化学反応により生物活性化合物と標的タンパク質とを不可逆的な共有結合でクロスリンク（架橋）させ、標識化（ラベル化）する化学修飾法の一つである（図1）¹⁾。多くのタンパク質が混在する系中から標的タンパク質を特定することができ、原理的には結合部位をアミノ酸残基レベ

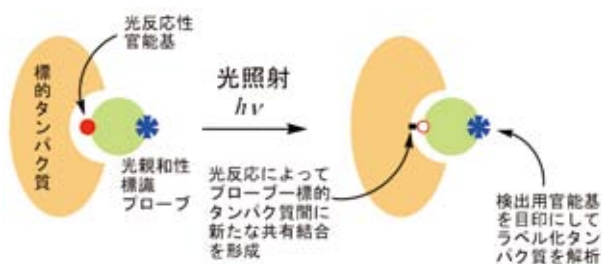


図1 光親和性標識法

ルで同定可能である。本手法で用いられる光親和性標識プローブ (photoaffinity probe) の条件は、1) 標的タンパク質と特異的に相互作用する (生物活性を有すること)、2) 光反応性官能基を有すること、3) 光ラベル化タンパク質を他のラベル化されていない多くのタンパク質と区別するための検出用官能基を有すること、である。すなわち、ある生物活性化合物を光親和性標識プローブ化するには、もとの活性を損なわないように光反応性官能基および検出用官能基を導入する必要がある。

代表的な光反応性官能基は、芳香族アジド、ジアジリン、ベンゾフェノンなどで、それぞれ照射によりナイトレン、カルベン、励起カルボニルなどの高反応性化学種を生じる。一方、検出用官能基には、トリチウム (^3H)、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、などの放射性同位元素 (RI) がこれまでよく用いられてきた。RI標識プローブは検出感度が高いものの、プローブ自体が分解しやすく、特別な実験施設と実験者の被曝対策が必要であり、その上、捕獲タンパク質の直接的解析や精製が困難である、など多くの制約がある。RIを用いない (non-RI) 光親和性標識法としては、ビオチンに対する (ストレプト) アビジンの高親和性を利用して捕獲タンパク質の検出や直接精製が可能なビオチン修飾プローブを用いる方法 (photoaffinity biotinylation) が知られている。しかし、プローブ構造内に比較的大きく高極性なビオチンユニットを導入するため、もとの生物活性が損なわれる恐れがあり、とくに低極性かつ低分子化合物のプローブ化には必ずしも有効な方法ではない。

3. 新しいnon-RI光親和性標識法の考案

我々は、生物活性の保持に重点をおいた、より一般性の高いnon-RI光親和性標識法の開発を目指し、光反応性

官能基の他に、脂肪族アジド基またはエチニル基などの bioorthogonal (天然の生体分子中には存在しない) 官能基を有する生物活性物質を光親和性標識プローブとして用いる新たな手法を考案した (図2)²⁾。すなわち、脂肪族アジド基やエチニル基が光に対して比較的安定であると期待し、これが標的タンパク質の光ラベル化 (第一段階) 後に残存すれば、Staudinger-Bertozzi ligationやHuisgen 1,3-dipolar cycloaddition (click反応) により、後から蛍光試薬やbiotinなど任意の検出用官能基を導入 (第二段階) できると考えた。本手法の特徴は、RIを用いないために光ラベル化タンパク質を直接解析できると、プローブ化の際に、光反応性官能基以外には小さく低極性なアジドメチル基 ($-\text{CH}_2\text{N}_3$) またはエチニル基 ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) を導入するだけでよいから、プローブ化に伴う生物活性の低下を最小限に抑えられることである。

モデル化合物を用いた各種検討の結果、第一段階の反応条件、すなわち、芳香族アジド基およびトリフルオロメチルジアジリニル基の光反応条件下ではアジドメチル基やエチニル基が未反応のまま残存し、検出用官能基導入のためのタグとして利用できることが示唆された (図3)。

4. 新しいnon-RI光親和性標識法による標的タンパク質の同定

考案したnon-RI光親和性標識法の有効性を確かめるために、高脂血症治療薬として臨床使用されていた cerivastatin を光親和性標識プローブ化し、その標的タンパク質であることが分かっている HMG-CoA還元酵素が光ラベル化できるかどうかを検討した。まず、cerivastatin のメトキシ部分に二官能性ジアジドユニットを導入した photovastatin CAA1 を設計・合成し (図4 A)、阻害活性が保持されていることを確認した。このプローブを HMG-CoA還元酵素に作用させ照射した後、Staudinger-Bertozzi ligationにより蛍光性官能基を導入した結果、期待どおりに光ラベル化が進行し、蛍光シグナルを指標に同酵素を検出することができた。さらに、結合部位の同定を目的に、プローブで光ラベル化・蛍光修飾した HMG-CoA還元酵素を消化酵素で処理後、蛍光性ペプチド断片のアミノ酸配列解析を行ったところ、酵素のC末端領域に対応する配列であることが分かり、こ

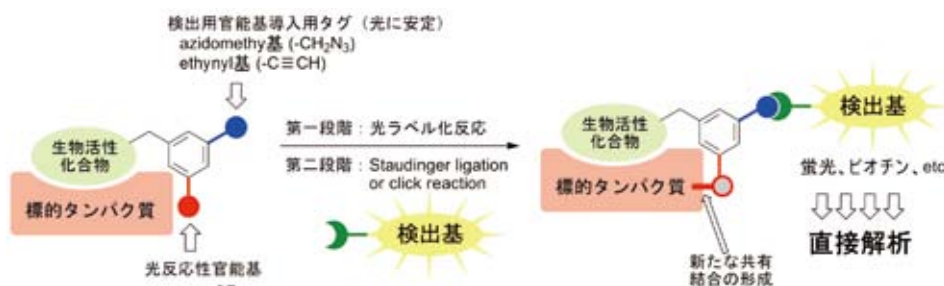


図2 non-RI光親和性標識法

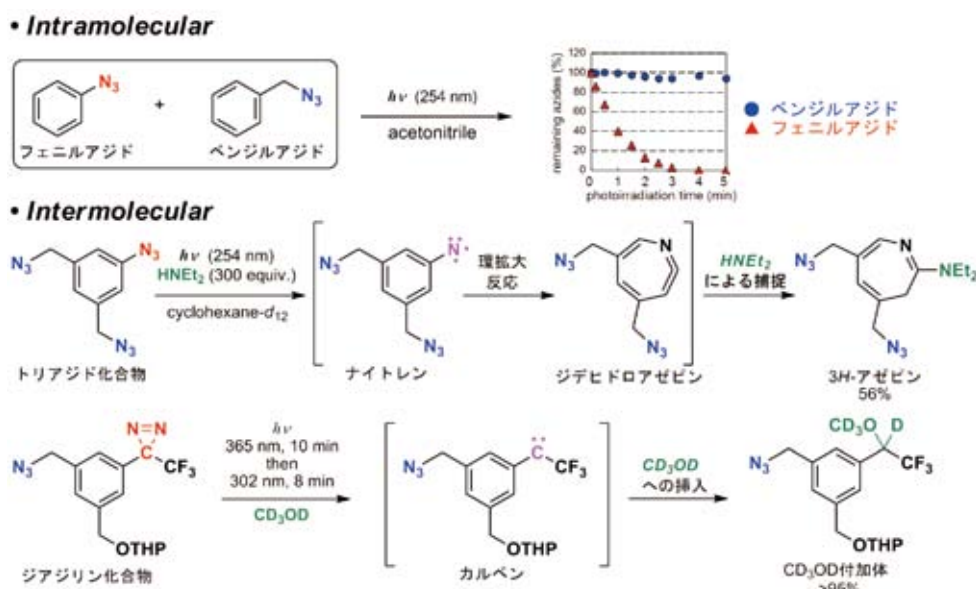


図3 芳香族アジドと脂肪族アジドの光反応性の差異

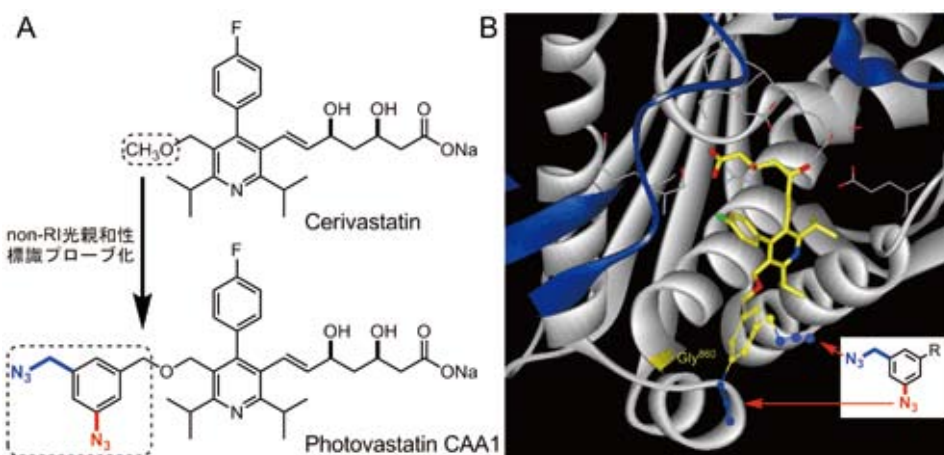


図4 Cerivastatinのnon-RI光親和性標識プローブ化と結合部位の同定

これはcerivastatinとHMG-CoA還元酵素複合体のX線共結晶構造からの予測と良く一致した (図4 B)。

次に、以前から行っていた骨格筋の興奮収縮連関過程における細胞内への Ca^{2+} 動員の分子機構解明研究に関連して³⁻⁵⁾, 筋弛緩薬であるダントロレンのnon-RI光親和性標識プローブ化を行った。その結果, 筋小胞体からの生理的な Ca^{2+} 放出を特異的に抑制する二官能性プローブGIF-0430の開発に成功した (図5 A)⁶⁾。これとウサギの骨格筋SR膜画分標本を用いた光ラベル化・蛍光修飾の結果, RIプローブを用いた場合と同じ分子量約23 kDaのタンパク質が特異的にラベル化された (図5 B)。この結果は, 多くのタンパク質が混在した標本を対象とした実験においても我々の考案したnon-RI光親和性標識法が有効であることを示している。その後, この23 kDaタンパク質がマウスsk-NSP11 (ヒトRTN2-C) であることが分かり, 最近, ノックアウトマウスを用いた検討の結果, このタンパク質が運動 (筋収縮) による4型グルコーストランスポーター (GLUT4) の細胞膜へのトランスロケーションを制御し, 細胞内への糖取り込みを調節してい

ることが明らかとなった⁷⁾。このタンパク質は, 血糖調節, すなわち糖尿病等の治療薬開発の新規ターゲットとして期待されている。

5. 高機能non-RI光親和性標識プローブの簡便合成に向けて

関連して我々は, 光反応効率が高いジアジリル基および脂肪族アジド基の両方を芳香環上の同一部位に配したコンパクトな検出用タグ型体の官能基としてアジドジフルオロメチルジアジリル基を設計, 合成に成功し, その反応特性を検証した (図6 A)⁸⁾。また最近, 生物活性化合物によく見られるビアリール型構造を有する化合物を簡便にnon-RI光親和性標識プローブ化するために, ジアジド官能基を有するフェニルボロン酸ピナコールエステルを共通中間体として用いた鈴木—宮浦反応によるジアジドビアリール化合物の合成法を確立した (図6 B)⁹⁾。今後, これらの成果を応用した効率的なプローブ開発と標的タンパク質同定研究を行っていく予定である。

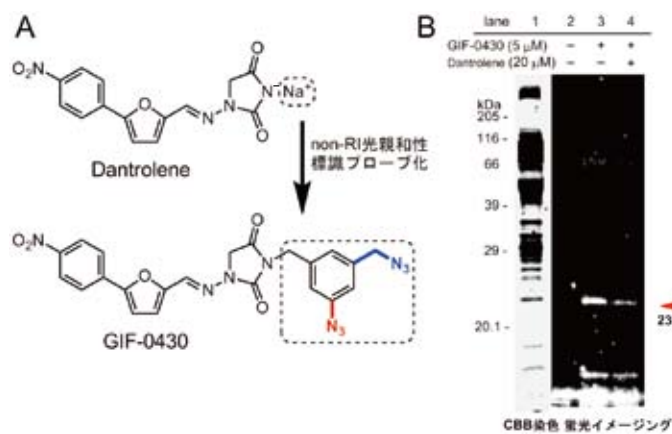


図5 ダントロレンの標的タンパク質探索

6. おわりに

はじめに述べたように、今後の創薬戦略においては、疾患に関与する標的分子の設定が鍵であり、そのためには未知の標的分子の同定は重要な課題である。新規創薬ターゲット分子の発見は全く新しい機序に基づく薬剤、いわゆる「ピカ新」の開発にもつながりやすい。そのような創薬新戦略の一助になるよう、今後も本稿で紹介した標的タンパク質探索法に磨きをかけていきたいと考えている。

謝辭

本稿で紹介した研究は、引用文献に記されている多くの方々とともに得た成果であり、全ての共同研究者に深く感謝いたします。

文献

- 1) Dormán G. in Bioorganic Chemistry of Biological Signal Transduction (Topics in Current Chemistry 211; Ed.: Waldmann H), Springer-Verlag: Berlin, pp 169–225, 2001.
- 2) Hosoya T, Hiramatsu T, Ikemoto T, Nakanishi M, Aoyama H, Hosoya A, Iwata T, Maruyama K, Endo M, Suzuki M. Novel bifunctional probe for radioisotope-free photoaffinity labeling: compact structure comprised of photospecific ligand ligation and detectable tag anchoring units. Org. Biomol. Chem. 2 (5): 637–641, 2004.
- 3) Ikemoto T, Hosoya T, Aoyama H, Kihara Y, Suzuki M, Endo M. Effects of dantrolene and its derivatives on the Ca^{2+} release in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Br. J. Pharmacol. 134 (4): 729–736, 2001.
- 4) Hosoya T, Aoyama H, Ikemoto T, Hiramatsu T, Kihara Y, Endo M, Suzuki M. [^{125}I]-*N*-[(3-Azido-5-iodo)benzyl]dantrolene and [^{125}I]-*N*-[3-iodo-5-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)]benzyl]dantrolene:

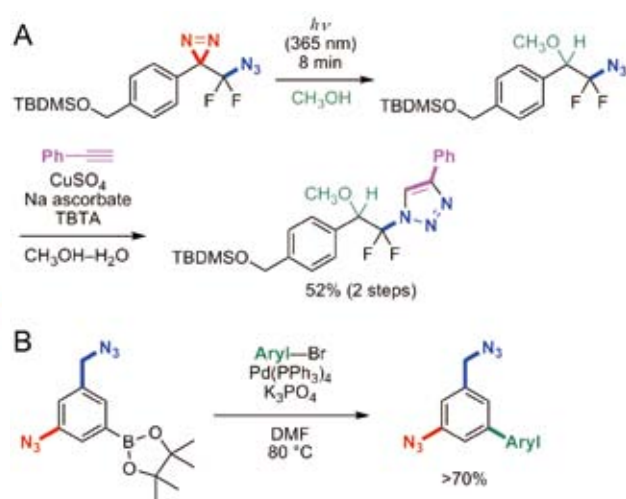


図6 高機能プローブの簡便合成に向けて

Photoaffinity Probes Specific for the Physiological Ca^{2+} Release from Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (22): 3263-3265, 2002.

- 5) Hosoya T, Aoyama H, Ikemoto T, Kihara Y, Hiramatsu T, Endo M, Suzuki M. Dantrolene Analogues Revisited: General Synthesis and Specific Functions Capable of Discriminating Two Kinds of Ca^{2+} Release from Sarcoplasmic Reticulum of Mouse Skeletal Muscle. *Bioorg. Med. Chem.* 11 (5): 663–673, 2003.
- 6) Hosoya T, Hiramatsu T, Ikemoto T, Aoyama H, Ohmae T, Endo M, Suzuki M. Design of dantrolene-derived probes for radioisotope-free photoaffinity labeling of proteins involved in the physiological Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (5): 1289–1294, 2005.
- 7) Ikemoto T, Hosoya T, Takata K, Aoyama H, Hiramatsu T, Onoe H, Suzuki M, Endo M. Functional role of NSP-like 1 protein in membrane translocation of glucose transporter 4. *Diabetes*. 58 (12): 2802–2812, 2009.
- 8) Hiramatsu T, Guo Y, Hosoya T. 3-Azidodifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl group as an all-in-one functional group for radioisotope-free photoaffinity labeling. *Org. Biomol. Chem.* 5 (18): 2916–2919, 2007.
- 9) Hosoya T, Inoue A, Hiramatsu T, Aoyama H, Ikemoto T, Suzuki M. Facile synthesis of diazido-functionalized biaryl compounds as radioisotope-free photoaffinity probes by Suzuki–Miyaura coupling. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (6): 2490–2496, 2009.