

# 研 究 報 告 書

## 「LA-LDI MS を用いた標的タンパク質の結合位置解析法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研 究 者: 北 将樹

### 1. 研究のねらい

強力な生理活性を有する化合物(リガンド)の標的分子の同定および結合様式の解明は、創薬やケミカルバイオロジーの研究で重要である。標的分子-リガンド複合体の構造は、一般に X 線回折や NMR で解析されることが多いが、その不安定さ・希少さにより適用できない場合も多い。これらの方法を補完する標的分子解析法の一つに、リガンドに反応性官能基と検出基を導入した誘導体(ケミカルプローブ)を用いる手法がある。標的分子がタンパク質の場合、ラベル化後、酵素消化と断片ペプチドの MS 解析あるいはアミノ酸配列分析などにより、標的分子の種類や結合位置を推定できる。一方で、ケミカルプローブを用いる場合、ラベル化反応の効率や検出感度の低さが課題となっており、本手法をより高感度、ハイスループットで実施できる方法の開発が望まれている。そこで本研究では、マトリックスを使用しないラベル支援レーザー脱離イオン化による質量分析法(LA-LDI MS)を用いて、プローブと結合した標的分子由来の断片ペプチドを高選択性かつ高感度で検出できるケミカルプローブを創製し、標的分子におけるリガンド結合部位を高精細に解析する新手法の開発を目指した。

芳香族炭化水素であるピレン基を持つ化合物は LA-LDI MS で選択的に励起、検出される。本研究では、より高感度で検出できるピレン誘導体を開発し、実際にケミカルプローブの検出基として用いて、酵素消化後の反応混合物からラベル化ペプチドの選択的な検出を行うこととした。また、リガンドと検出基の間にラベル化もしくは MS 測定時に切れる結合を導入したりリガンド解離型プローブを開発して、ラベル化ペプチドの検出感度のさらなる向上を目指した。さらに、in vitro (精製した生体高分子) および in situ (培養細胞や組織標本) の系でも標的分子をラベル化して、血液や組織抽出物など様々な混合物から極微量の標的分子や疾患代謝産物を検出・同定すること、および in vivo (動物個体内) でのラベル化と疾患代謝産物の解析にも適用することを目指した。具体的なリガンドとして、細胞骨格タンパク質アクチンとチューブリン間の特異な相互作用を誘導する抗腫瘍性天然物アプリロニン A や、炎症や痛み作用に関わる哺乳動物由来のペプチド神経毒など、標的受容体が未知のもの、もしくはその結合様式が詳しく解明されていないものを選び、本手法での解明を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、芳香族化合物ピレンを持つケミカルプローブとマトリックス不要のレーザー脱離イオン化質量分析法(LA-LDI MS)を用いて、標的タンパク質とリガンドの結合位置を高精細に解析する手法の開発を目指した。

研究テーマ1「LP プローブの設計・合成と機能評価」: LA-LDI MS において、既存のピレン化合物よりも約 1,000 倍検出感度が高い 6-アミドピレン誘導体を開発した。次いで海洋天然物アプリロニン A の光親和性アミドピレンプローブを合成し、アミドピレン基の共存下でも光反応が進行すること、および LA-LDI MS および MS/MS 解析により、その内部構造を決定できることを示した。またアミドピレン基よりも約 100 倍 LA-LDI MS での検出感度が向上した新規ピレン誘導体の創成にも成功した。

研究テーマ2「標的タンパク質のラベル化および LA-LDI MS による検出」: アミドピレンの

NHS エステル誘導体をタンパク質と反応，ついで酵素消化を行い，ピレン標識ペプチドを選択的に LA-LDI MS で検出できることを示した。ついでアプリーニン A にアミドピレン基と NHS 基を導入して標的分子アクチンを高効率かつ選択的にラベル化し，LALDI-MS/MS 解析によりラベル化ペプチドの構造を決定した。また，ビオチンとアミドピレンの間に NHS 基を挟んだリガンド解離型 LP プローブを合成し，アビジンにおける選択的なラベル化を達成した。アビジンは構造が非常に強固なタンパク質であり，酵素消化には高濃度の塩による変性が必要であるが，その脱塩方法が課題であった。検討の結果，ポリスチレン製ゲルろ過樹脂による効率的な脱塩と精製法を開発でき，取り扱いが難しい標的生体分子のラベル化とその結合位置の解析を達成できた。また，リジン残基-プローブ間で共有結合させた中間体に基づく covalent-Dock 計算により，プローブでラベル化されたアミノ酸残基の情報から，もとのリガンドの結合様式を精密に決定する手法を開発した。

研究テーマ3「炎症・痛み作用に関わる，哺乳動物由来のペプチド神経毒の機能解明」：有毒哺乳類ブラリナトガリネズミの顎下腺から微量単離した麻痺性神経毒 BPP1,2 の全アミノ酸一次配列を決定した。配列の相同性からヒトのオピオイドペプチドの前駆体タンパク質であるシンエンケファリンと類似しており，その二次構造と比較することで，BPP 類の3つのジスルフィド結合の結合様式を推定した。精製した BPP2 には Ca チャネル開口活性がみられ，かつこの活性は N 型 Ca チャネル阻害剤  $\omega$ -コトキシンにより阻害されることが分かった。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1「LP プローブの設計・合成と機能評価」

LA-LDI MS では，ピレン基などレーザー光で励起されるクロモフォアをもつ化合物のみが選択的に検出されることが以前から報告されていたが，ピレン化合物自身の検出感度はマイクログル〜ナノモル量と低く，ラベル化産物の解析を行うには実用性に欠けていた。そこで，レーザー波長や蛍光基としての特徴に注目して，ピレンの 6 位に窒素官能基を導入した 6-アミドピレン誘導体を合成し(図1)，これが既存のピレン化合物よりも約 1,000 分の 1 の量で LA-LDI MS で検出できることを発見した。次に，海洋天然物アプリーニン A をリガンド，反応性官能基をジアジリン，検出基をアミドピレンとした LP (LA-LDI MS-applicable pyrene) プローブを合成した。本プローブは天然物が持つ強力な生物活性(がん細胞の増殖阻害活性，アクチン脱重合活性，および紡錘体形成の阻害活性)を保持していた。標的タンパク質のラベル化反応のモデル実験として，このプローブに 365 nm の紫外光を照射して光反応を行い，ジアジリン基が溶媒分子(水，メタノール)と定量的に反応し，紫外光を吸収するアミドピレン基が共存してもラベル化できることを明らかにした。さらに，このアミドピレン基を持つ LP プローブの溶媒との反応物を用いた LA-LDI MS および MS/MS 解析により，アミドピレン基から MS 系内でケテンが脱離して生じるアミノピレン基が，特有のフラグメントイオンを発生させ，ラベル化体の内部構造を詳しく解析することに成功した(主要論文1)。



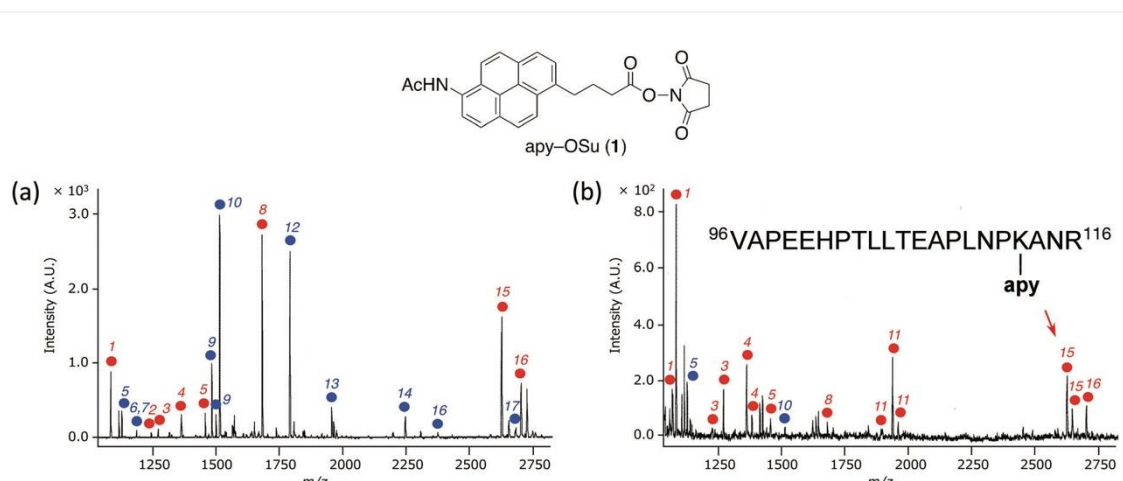


図2 アミドピレンでラベル化されたアクチンの断片ペプチドの(a)MALDI および(b)LA-LDI MS 赤色はアミドピレンが結合したラベル化ペプチド、青色は非ラベル化ペプチドを指す

さらに、リガンドにビオチン、検出基にアミドピレン基を持ち、反応性官能基 NHS を内包したリガンド解離型 LP (LA-LDI MS-applicable pyrene) プローブを合成し、標的タンパク質アビジンのラベル化と酵素消化後のラベル化ペプチドの MS 解析を行った(図3)。結晶構造をもとに NHS 基とリガンド間の距離を適切に設計することで、リジン残基が1箇所のみ特異的かつ高効率で標的分子のラベル化ができる条件を見出した。一方で、アビジンはアクチンとは異なり、構造が非常に強固なタンパク質である。そのため通常の条件では酵素消化は全く進行せず、グアニジン塩酸塩など高濃度の変性剤を加えて酵素消化する必要があるが、この不揮発性の塩を除かないと LDI MS での検出が困難であった。種々の検討により、ポリスチレン製ゲルろ過樹脂 TSK-G3000S を担体に用いて、水からメタノールの割合を増やして溶出させた結果、非ラベル化ペプチドは 25~75% MeOH 画分で主に溶出されるのに対し、ラベル化ペプチドでは 75% MeOH 画分で主に溶出され、MALDI 法でもピレンラベル化ペプチドを基準ピークとして検出できた。また LA-LDI MS についても、高濃度の不揮発性の塩を含まないサンプルに比べると感度は低いものの、350 pmol 量のアビジンから酵素消化したラベル化ペプチドの分子イオンピークの検出に成功した。当初期待していた LA-LDI MS による高感度なアミドピレンラベル化ペプチドの検出には至らなかったが、本脱塩法を組み合わせることで、取り扱いが難しい標的生体分子のラベル化とその結合位置の解析を達成することができた。また、実際にラベル化された Lys135 残基の  $\epsilon$ -アミノ基とプローブの NHS 基との間で共有結合を形成したヘミアセタール中間体の構造に基づく covalent-Dock 計算を検討し、プローブのビオチン基の配座がもとの結晶構造中のリガンドとほぼ一致する(RMSD < 0.4 Å)という結果を得た。これにより、プローブでラベル化されたアミノ酸残基の情報から、もとのリガンドの結合様式を精密に決定する手法を開発できた(主要論文5)。

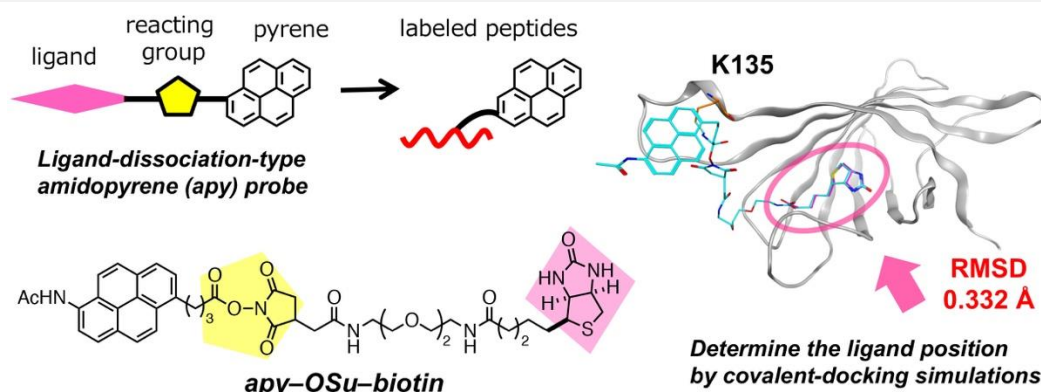


図3 リガンド解離型アミドピレンプローブの構造と分子モデリング計算

### 研究テーマ3「炎症・痛み作用に関わる、哺乳動物由来のペプチド神経毒の機能解明」

哺乳類由来の特異な神経毒の構造および麻痺活性や炎症、痛み作用に関わる特異なメカニズムの解明を目指して研究を行った。有毒哺乳類ブラリナトガリネズミの顎下腺から微量単離した麻痺性神経毒 BPP1,2 (全長 48 aa もしくは 53 aa の一本鎖ポリペプチド) について、トリプシンおよび Glu-C の 2 つの酵素を混合して溶液内消化を行い、断片ペプチドの網羅的な MS/MS 解析によりその全アミノ酸一次配列を決定した。配列の相同性からヒトのオピオイドペプチドの前駆体タンパク質であるシンエンケファリンと類似しており、その二次構造と比較することで、BPP 類の 3 つのジスルフィド結合の結合様式を推定した。

これまでの検討において、トガリネズミの顎下腺抽出物、および単孔目カモノハシの蹴爪に含まれる毒のいずれについても、Ca チャネル発現細胞における細胞内 Ca イオン濃度の上昇作用を見出している。そこで、この麻痺活性物質が作用する標的生体分子を電位依存性イオンチャネルと想定し、今回精製した BPP 類の電気生理学的解析を行った。ヒト神経芽腫細胞 (IMR-32) を BrdU, dbcAMP, Nu-SERUM 添加 DMEM 培地で培養して Ca チャネルを発現誘導した。イオンチャネルの発現は蛍光色素 Fluo-4 AM を用いた細胞内 Ca 濃度の観測、および Ca チャネルのサブタイプ特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。パッチクランプ実験を検討した結果、BPP2 に Ca チャネル開口活性がみられ、かつこの活性は N 型 Ca チャネル阻害剤  $\omega$ -コノトキシンにより阻害されることが分かった。今回用いた IMR-32 細胞では Cav2.1 (P/Q 型)、2.2 (N 型)、および 2.3 (R 型) のいずれも発現していたため、現在、特定のサブタイプの Ca チャネルを発現させた培養細胞を用いた解析、および BPP 類の活性を保持した LP プローブの合成と機能評価に向けて検討を進めている。

### 3. 今後の展開

本研究は、機器分析法の最先端研究をケミカルバイオロジー分野に応用することで、標的分子の結合位置解析法の高度化を目指して実施した。従来の細胞・組織レベルでの解析では困難であった、創薬標的となる機能作用点や代謝経路を解明することで、新たな創薬基盤技術の創出に貢献できる手法の開発を目指してきた。今後は、これまでの in vitro の系から発展させて、in situ ラベル化の手法開発を進めたい。特に、哺乳動物毒ペプチドの未知の標的分子の同定と結合様式を解明するためには、構造活性相関、活性を保持したプローブの合成、および機能評価により構造を最適化するとともに、組織切片や動物個体など、実際の生体での in situ ラベル化による標的分子の同定と機能作用点の解明が重要になると思われる。これまでの知見を統合して、in vivo ラベル化や代謝産物の LA-LDI MS 解析を精密に行い、炎症や痛みに関与する神経毒リガンドの作用メカニズム解明を目指していきたい。



#### 4. 自己評価

研究テーマ1に関しては、通期の研究構想をほぼ達成できた。当初の計画ではアミドピレンに対するモノクローナル抗体を専門業者に委託して作製する予定であったが、新たに開発したピレン誘導体(非公開)が、幸いにも市販のピレン抗体と優れた交叉性を示すことを見出したため実施せず、その分を消耗品費に充てることで、効率よく研究を遂行できた。

研究テーマ2に関しては、標的分子の *in vitro* ラベル化とMS解析、およびモデリング計算を組み合わせるリガンドの結合様式を精密に決定するという、一連のコンセプトを達成できた。当初の計画になかった、ピレン基の高い疎水性を活かした新しいアフィニティー精製法を開発できたことは、関連するケミカルプローブの研究や、標的分子解析法の発展に資すると判断される。一方で、*in vitro* では数時間しか安定に存在できないアプリーロニン A のアクチン・チューブリンとの三元複合体の解析など、従来の方法では解析が困難な系や、標的分子やその相互作用の詳しい様式が不明のものを対象とする研究を、期間内にほとんど進めることができなかったのは反省すべき点と言える。

研究テーマ3に関しては、自然界からごく微量しか得られない、哺乳類由来の神経毒ペプチドの構造を決定した点で高い独自性と学術的意義があると判断されるが、そのプローブ化への誘導や標的受容体との反応、さらには *in vivo* や *in situ* でのラベル化まで志向した研究計画案だったのにも関わらず、十分な検討ができなかったのは反省すべき点と言える。応募者独自の生理活性リガンドに拘らずに、検証可能な系で本課題を遂行すべきだったと思われる。

今後、本研究の成果を科学技術及び社会・経済双方に波及させていくためにも、本 LA-LDI MS 法の汎用化や利便性の向上を図るとともに、標的分子との結合様式に基づく新規なリガンド誘導体の創出を目指して研究を進めていきたい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. K. Yoneda, Y. Hu, M. Kita, and H. Kigoshi: Development of an aplyronine A photoaffinity amidopyrene derivative applicable for label-assisted LDI MS. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 17853 [DOI: 10.1038/srep17853].
2. K. Yoneda, Y. Hu, R. Watanabe, M. Kita, and H. Kigoshi: Binding position analysis of target proteins with the use of amidopyrene probes as LA-LDI enhancing tags. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 8564–8569 (2016).
3. Y. Hirayama, K. Yamagishi, T. Suzuki, H. Kawagishi, M. Kita, and H. Kigoshi: Analysis of the aplyronine A-induced protein-protein interaction between actin and tubulin by surface plasmon resonance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 2809–2814.
4. M. Kita, K. Yamagishi, K. Tsuchiya, Y. Seguchi, H. Nakane, and H. Kigoshi: Development of photoaffinity derivatives of the antitumor macrolide aplyronine A, a PPI-inducer between actin and tubulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25*, 6322–6331.
5. R. Watanabe, Y. Hu, K. Iio, K. Yoneda, A. Hattori, A. Arai, H. Kigoshi, and M. Kita: Specific protein-labeling and ligand-binding position analysis with amidopyrene probes as LDI MS tags. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16*, 7883–7890.

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件(公開前の特許出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 北将樹, 「タンパク質-生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発」, 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム「生物活性と創薬のケミカルバイオロジー」, 2016 年 9 月 25-27 日, 仙台. (招待講演)
2. M. Kita, “PPI-inducing Marine Macrolide.” 8th US-Japan Symposium, 21st Century Innovations in Natural Products, 2016 年, 2016 年 11 月 14-17 日, 米国ハワイ. (招待講演)
3. M. Kita, “Development of the New Analytical Methods for the Binding Modes of Target Proteins Using LA-LDI MS.” The 5th International Symposium on Transformative Bio-Molecules (ISTbM-5), 2017 年 11 月 19-21 日, 名古屋. (招待講演)
4. 北将樹, 「タンパク質-生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発」, 日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会シンポジウム・ケミカルバイオロジー研究の最前線, 2018 年 3 月 15-18 日, 名古屋. (招待講演)
5. 北将樹, 武仲敏子, 別所学, Andres D. Maturana, 木越英夫, 大舘智志, 上村大輔, 「哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究」, 第 60 回天然有機化合物討論会, 2018 年 9 月 26-28 日, 久留米.