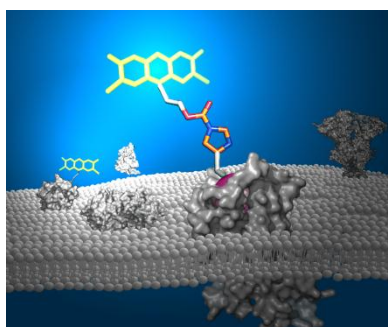


平成 26 年 8 月 14 日  
京 都 大 学  
Tel : 075-753-2071 (広報室)  
科学技術振興機構 (JST)  
Tel : 03-5214-8404 (広報室)



## 天然に存在する蛋白質の可視化・寿命解析手法の開発に成功

-蛋白質の寿命に関わる疾病のメカニズムの解明に期待-



### 概要

JST 課題達成型基礎研究 (クレスト「分子技術」) の一環として、京都大学 大学院工学研究科の浜地格教授らは、天然に存在する膜蛋白質に蛍光色素等の目印を付けるための分子ツールを開発しました。特に、実際に生きた細胞の膜表層に存在する蛋白質に、遺伝子操作などの余分は処理を施す事なく目印をつけることで、極めて天然に近い環境下で、蛋白質のイメージング (可視化) や、寿命、分解過程を解析することに成功しました。

これまで、細胞に存在する蛋白質を可視化し観察するための手法として、GFP (緑色蛍光蛋白質) を使った遺伝子工学的な手法を用いる必要がありました。この手法は、人為的に設計し作製された遺伝子を細胞内に導入し、観察したい蛋白質に似た『モデル蛋白質』を観察するものです。従って、もともと細胞に存在している蛋白質をそのまま観察することは不可能で、本来の蛋白質の挙動を観察できる技術が待ち望まれていました。

これまで本研究グループは、天然に存在している蛋白質そのものを、遺伝子工学を用いずに有機化学によって蛍光色素等で目印をつける『LDAI ラベル化法』の開発を行ってきました。これは、ラベル化剤と呼ばれる分子を細胞にかけるだけで、特定の狙った蛋白質のみに目印を付けて可視化を可能とし、解析する手法です。本発表では、LDAI ラベル化法がガンやその他の疾病に深く関連するため創薬の標的として注目されている様々な膜蛋白質に広く適用でき、天然に存在する膜蛋白質を可視化 (イメージング) し動態を観察できるだけでなく、それぞれの膜蛋白質の寿命やその分解過程を解析することのできるツールであることを実証することに成功しました。従来手法に比べて簡便で、極めてナチュラルな条件で蛋白質の解析ができるため、膜蛋白質の細胞内での挙動や分解と深く関わる疾病のメカニズムの解明に役立つと期待されます。

本研究成果は、2014年8月14日正午 (アメリカ東部時間 EST) に米国セル出版「Chemistry & Biology」のオンライン速報版で公開されます。

## 1. 背景

細胞には何万種類もの蛋白質が存在し、極めて複雑な環境のなかでそれぞれが働いたり、不要になったら分解されたりしています。その中で特定の1つの蛋白質を可視化する主な手法は、GFP(緑色蛍光蛋白質)を利用した方法です。これは、観察対象の蛋白質とGFPとを融合した蛋白質の遺伝子を細胞内に組み込み、細胞内で融合タンパク質の発現を行い、これを観察する手法です(図1-a)。ノーベル化学賞を受賞する程の極めて有用な方法であり、極めて多くの蛋白質の挙動や機能の解析に利用され、生理現象のメカニズムの解明に役立ってきました。しかし、この手法で観察している蛋白質は、人為的に設計されたいわば『モデル蛋白質』であり、天然に存在する蛋白質そのものではありません。従ってGFPを使った『モデル蛋白質』が本来の蛋白質の動きをそのまま反映しているとは限りません。そのため、天然に存在する蛋白質をそのまま可視化し観察することは、よりリアルな正確な情報が得られると期待されています。しかし、これを達成する技術は皆無でした。そこで、我々は遺伝子工学の技術を使用せずに、天然に存在する蛋白質を有機化学的な方法で標識化(ラベル化)する技術の開発に取り組んできました。その一つに蛋白質と小分子リガンド(特定の蛋白質と接着する分子)との高選択的な結合・接着を利用したラベル化手法『LDAIラベル化法』があります(図1-b)。この手法は、リガンドとタグ分子(蛍光色素等)をアシルイミダゾールと呼ばれる反応基で連結した一分子の化合物を用います。この化合物はラベル化剤と呼ばれ、細胞にふりかけると、ラベル化剤は自動的に観察対象の蛋白質を選んでくっ付き、タグ部位がラベル化剤から蛋白質表面へと有機化学反応(アシル転移反応)により乗り移ります(図2)。この反応後に、細胞を洗浄すると蛋白質に接着した反応後のラベル化剤は除去することができ、タグで標識化された蛋白質が得られます。この手法により、天然に存在する蛋白質に蛍光色素等のタグで選択的に目印をつけることができるようになります。

## 2. 研究手法・成果

LDAIラベル化法が、特にガンやその他の疾病に深く関連するため創薬の標的として注目されている様々な膜蛋白質に目印を付けるための一般性のある手法であることを実証しました。具体的には、サイズ・形状・機能の全く異なる膜蛋白質4種類(炭酸脱水酵素、ブラジキニン受容体、NMDA受容体、葉酸受容体)をモデルとして、それぞれに対してリガンド部位の異なるラベル化剤を設計・合成しました。この中で、炭酸脱水酵素と葉酸受容体は特定のガン細胞表層で過剰発現している事が知られているパーカータンパク質であり、ブラジキニン受容体は、GPCRと呼ばれるとても重要な膜蛋白質群の一つ(2012年にノーベル化学賞を受賞)であり、またNMDR受容体は脳において記憶や学習を司る鍵タンパク質です、実際にラベル化剤を細胞に添加したところ、選択的にそれぞれの蛋白質をラベル化することが確認され、LDAI化学が一般性のあるラベル化手法であることが実証されました。

天然に存在する蛋白質は細胞内で固有の寿命をもっており、生合成と分解によって細胞機能が維持されています。この蛋白質の合成と分解の速度とバランスによって蛋白質の量に変化し、細胞の機能に影響することがこれまでの研究で明らかとなっています。そこで我々は次に、LDAIラベル化反応を蛋白質の寿命解析として利用することを試みました。その結果、ラベル化した蛋白質の量を経時的に測定することによって、蛋白質の分解速度を正確に見積もることができ、蛋白質の寿命の解析に成功しました(図3-a)。また同時に、顕微鏡観察によってラベル化蛋白質の細胞内での動きが判り、蛋白質がいつ何処で分解されたかをリアルタイムで観察することができました(図3-b)。このような蛋白質の寿命の測定と

観察は異なる4つの蛋白質に対して行うことができ、蛋白質の種類によって寿命やその分解経路の違いが明確にわかりました。具体的には、炭酸脱水酵素・ブラジキニン受容体・NMDA受容体の寿命は共に半減期が約8時間であり、細胞内のリソソーム中で分解されることが判りました。対照的に葉酸受容体は半減期が24時間以上であり、細胞膜上で切断されて細胞外に分泌される過程をたどることが示されました(図4)。

このように、本研究ではLDAIラベル化法が膜蛋白質に対して一般性のある手法であり、かつ蛋白質の寿命・分解経路の解析に有用であることが実証されました。

### 3. 波及効果

蛋白質の寿命と分解経路は、様々な疾病に関わることが知られています。これらの研究において、より自然に近い環境下で蛋白質の寿命や分解経路が解析されれば、発病のメカニズムの解明や予防、治療への新たなアプローチが見いだされると期待されます。

### 4. 今後の予定

本研究では、細胞単位での実験にとどまり、実際に組織や生きた個体(vivo)での適用はまだ行えていません。このような更に複雑な条件下での適用を目指して、ラベル化手法の改良を行う予定です。

### <参考図>

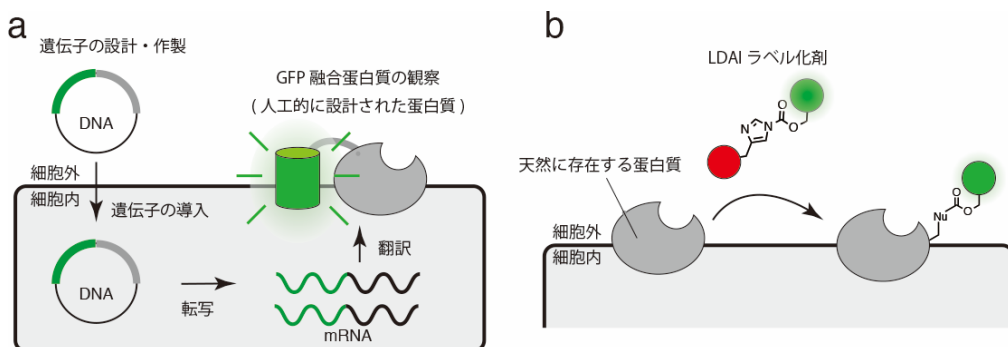


図1 蛋白質の可視化技術の模式図

a: 遺伝子工学的手法を用いた、GFP融合蛋白質の作製と観察

b: 天然に存在する蛋白質を可視化するLDAI化学

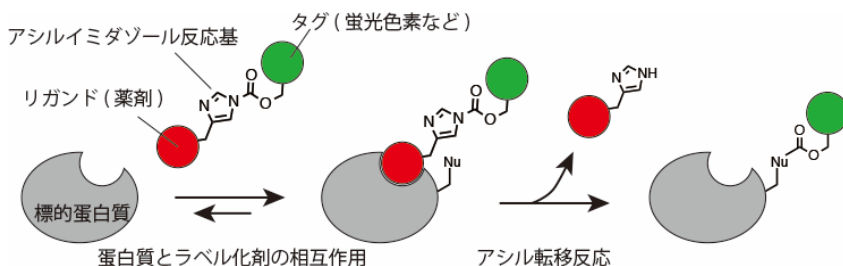


図2 LDAI化学による蛋白質のラベル化反応のメカニズム

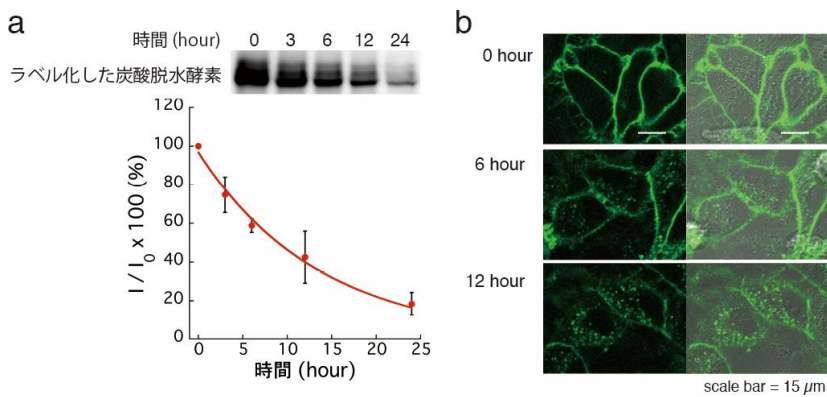


図3 ラベル化した天然の炭酸脱水酵素の寿命・分解経路の解析

a: ラベル化蛋白質の定量を行った電気泳動の写真とそのプロット（ラベル化蛋白質は細胞内の分解経路によって分解され、その減少量を知ることで、蛋白質の寿命がわかる。）

b: 膜に存在する炭酸脱水酵素が細胞内に移行し、分解されている写真（膜上で機能していた炭酸脱水酵素が徐々に細胞内に移行し、最終的にリソソーム内に局在する。そこで蛋白質は分解される。）

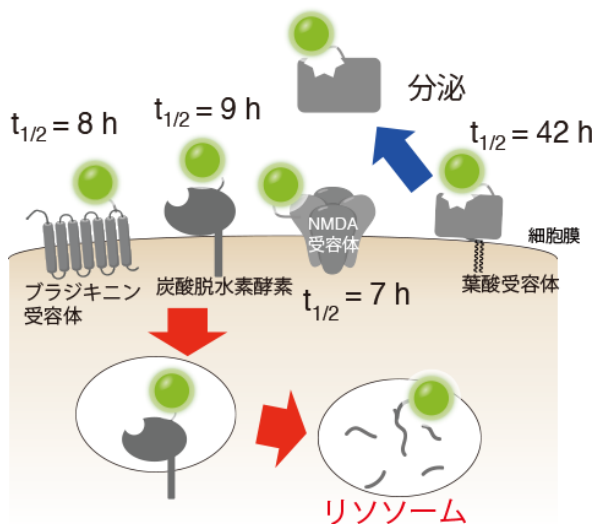


図4 本件研究で明らかとなった蛋白質の寿命と分解経路

### <用語解説>

#### ・アシル転移反応

アミン(-NH<sub>2</sub>)等の求核基がカルボニル基(-CO-)と結合し、同時にカルボニル基に元々結合していた部位が脱離する反応。本研究では、蛋白質表面上のアミノ酸(主にリジン残基)が、ラベル化剤のカルボニル基に求核攻撃をし、イミダゾールが脱離する反応である。

#### ・炭酸脱水酵素

二酸化炭素の加水分解を触媒し、炭酸イオンを発生させる酵素である。様々な種類の炭酸脱水酵素が知られているが、本研究で標的にしている炭酸脱水酵素12はがん細胞で特に多いことが知られる。

#### ・ブラジキニン受容体

薬剤の主なターゲットとされる GPCR(G 蛋白質共役受容体)の一種であり、痛みを感じる受容体とし

て知られ、組織の損傷や炎症に深く関わる分子である。

- ・ NMDA 受容体

四量体を形成し、イオンチャネルの働きをする。神経系などにおいて記憶や学習に深く関わることが知られる。

- ・ 葉酸受容体

細胞外で葉酸と結合し、細胞内に栄養源である葉酸（ビタミン B9）を取り込む働きをしている。また、特定のがん細胞において、過剰に存在していることが知られている。