

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解  
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

## 生細胞でのタンパク質選択的なケミカルラベリングの新手法

松尾和哉, 浜地格

細胞内あるいは生物個体内における特定のタンパク質をイメージングすることは、タンパク質の機能解析を行う上で重要であり、蛍光タンパク質を利用した手法が多用されている。これと相補的な手段として、我々は化学的手法に基づき、蛍光のみではなく任意のプロープ分子を標的タンパク質に修飾可能なラベル化手法を開発した。タグ融合タンパク質のラベル化に関して、ペプチドタグを利用した共有結合型 Reactive tag 法を開発し、細胞膜の GPCR のラベル化へ応用した。また、内在性のタンパク質をラベル化可能な手法として、トシル化学を利用したりガンド指向型トシル化学および DMAP 化学を利用した Ligand tethered DMAP 法をそれぞれ開発し、生細胞・生物個体における選択的ラベル化によって、その有用性を実証した。

### 1. はじめに

生細胞において特定のタンパク質を可視化するためには、GFPをはじめとした蛍光タンパク質<sup>1)</sup>融合法が今や最もスタンダードで強力な手法である。標的タンパク質に GFP を遺伝子レベルで融合し、その細胞内局在や動態をリアルタイムにイメージングすることが盛んに行われている<sup>2)</sup>。また、セカンドメッセンジャーなどの生理活性物質を特異的に検出可能な蛍光タンパク質型のバイオセンサーの開発も行われており、細胞内における種々の現象を蛍光イメージングによって時空間的に解析できるようになりつつある<sup>3)</sup>。

その一方で、蛍光タンパク質は①検出モードが蛍光イメージングに限られてしまう点や、②標的タンパク質に対してサイズが大きすぎる場合、標的タンパク質の機能阻害

が危惧される点、③個体レベルでの解析には、蛍光波長や組織透過性に限界が存在する点など、改善・克服すべき問題点もいくつか指摘されている。

タンパク質単体やその複合体の物性および機能解明において、生体内・生細胞内でのタンパク質イメージングの重要性が増している昨今、蛍光タンパク質と相補的な新しいタンパク質標識法が求められるようになってきた。

そのような状況において、近年注目を集めるのが、合成小分子プロープを用いた化学修飾法である。合成小分子プロープは、蛍光タンパク質に比較してサイズが格段に小さいため、標的タンパク質の機能に与える影響は小さい。また、化学合成した分子を用いるため、蛍光プロープのみならず、MRI プロープや PET/SPECT プロープ、EPR プロープなど、実験系に適した様々な検出モードを利用できるのも大きな魅力の一つである。

しかしながら、これら小分子プロープを標的タンパク質に対して選択的に化学修飾することは甚だ難しい。細胞内あるいは生体内は数多くのタンパク質が存在した英雑系であり、しかもいずれのタンパク質も同じ 20 種類のアミノ酸から構成されるため、標的タンパク質のみを選択的に修飾することは、現在の化学の実力では非常にチャレンジングな課題と言える。

本総説では、これまでに我々が開発してきた、化学的手

京都大学大学院工学研究科 (〒615-8510 京都市西京区  
京都大学桂)

Development of new methods of protein-selective labeling in  
living cells

Kazuya Matsuo and Itaru Hamachi (Department of Synthetic  
Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of  
Engineering, Kyoto University, Kyoto University, Katsura  
campus, Nishikyo-ku, Kyoto, 615-8510, Japan)

法を用いたタンパク質選択的なラベル化法を紹介する。主に①タグ融合タンパク質の共有結合型ラベル化（リアクティブタグシステムを利用した共有結合型ラベル化）、②内在性タンパク質のラベル化（リガンド指向型トシル化学および Ligand tethered DMAP 法）に関して、その開発の経緯から適用例などを中心に概説する。

## 2. タグ融合タンパク質によるラベル化

これまでにタンパク質タグ (cf. SNAP タグ<sup>4)</sup>, Halo タグ<sup>5)</sup> etc.) を標的タンパク質に融合し、そのタグタンパク質の自殺基質ユニットを組み込んだ合成小分子プローブを利用する手法が多数開発されてきた。しかし、タンパク質タグは、GFP 法と同様サイズの大きく、本来のタンパク質の機能を損なう可能性が危惧される。

タンパク質タグよりも格段に小さなペプチドタグを用いた先駆的な手法が R. Y. Tsien らによって報告された。これは、特定のペプチド配列に対して非常に強く相互作用する小分子プローブを用いることによってタンパク質をラベル化する手法である。具体的には、Tsien らは、テトラシステインモチーフと呼ばれるタグ配列 (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) と有機ヒ素型蛍光小分子プローブ (FIAsH など) との非常に強固で、高選択的な相互作用を利用して、コネキシンなどの細胞内外のタンパク質の蛍光イメージングに成功した (図 1-a)<sup>6)</sup>。この報告の後に、His 連続配列である His タグ (His6 など) と Ni(II)-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) 錯体を用いたペプチドタグ-合成小分子プローブペアも報告されている<sup>7)</sup>。しかし、これらの手法はペプチドタグと小分子とが、高い認識選択性をもち、強固な非共有結合で相互作用する必要があるため、細胞環境下で利用可能なレパートリーはまだ限られているのが現状である。

最近、我々は新たなペプチドタグ-小分子ペアを見いだした<sup>8)</sup>。連続アスパラギン酸配列から構成される D4 タグ

(Asp-Asp-Asp-Asp; DDDD) と二核亜鉛錯体プローブ Zn(II)-Dpa (2,2'-dipicolylamine) Tyr のペアである (図 1-b)。これは、Zn(II)-Dpa 錯体と D4 由来のテトラカルボン酸との配位結合を利用したものであり、Zn(II)-DpaTyr と D4 タグとの解離定数は数  $\mu\text{M}$  程度と比較的弱いものであるが、二つの Zn(II)-DpaTyr 連結型プローブと D4 $\times$ 2 タグ配列 (DDDDGDDDD) を用い、多価効果を利用することで、解離定数は数十 nM にまで向上させることができる。

この新規ペプチドタグ-小分子ペアを用いて、細胞表面における G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) であるアセチルコリン受容体を選択的に可視化することが可能であった。しかし、Zn(II)-DpaTyr と D4 タグとの相互作用は可逆的な金属-配位子間相互作用を利用したものであるため、長時間の観察では蛍光が減弱してしまう点やウエスタンブロッティング等のラベル化後解析が困難である点など、その応用には限界があった。

この点を克服する手法として、我々は新規ラベル化法である「リアクティブタグ (Reactive tag) システム」を開発した (図 2-a)<sup>9)</sup>。「リアクティブタグシステム」とは、タグとプローブ分子との非共有結合による近接効果を利用し、タグとプローブ分子の両者に導入した反応基によって共有結合の形成を誘起する戦略である。

D4 タグ配列には Cys を導入し、プローブ分子には  $\alpha$ -クロロアセチル基を導入した Zn(II)-DpaTyr を採用した。タグと Zn(II)-DpaTyr が相互作用し、タグ中の Cys のチオール基とプローブ分子中の  $\alpha$ -クロロアセチル基とが近接した時に初めて、求核置換反応 ( $\text{S}_{\text{N}}2$  反応) することによって、Cys と D4 タグ間で共有結合が形成される。この反応性を詳細に検討した結果、Cys と D4 の間に Ala を六つ導入した (CAAAAADDDDD: CA6D4 タグ) タグを用いた場合に、反応が最も早く進行することが明らかとなり、タグ-プローブ間での分子間相互作用がない場合に比べ、約

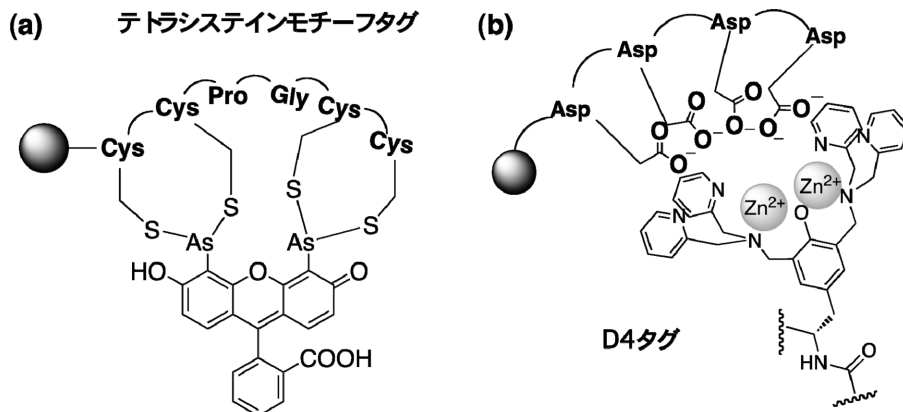


図1 ペプチドタグ-小分子プローブペアによるタンパク質のラベル化法  
(a) テトラシステインモチーフタグと FIAsH によるラベル化  
(b) D4 タグと Zn<sup>II</sup>-DpaTyr によるラベル化

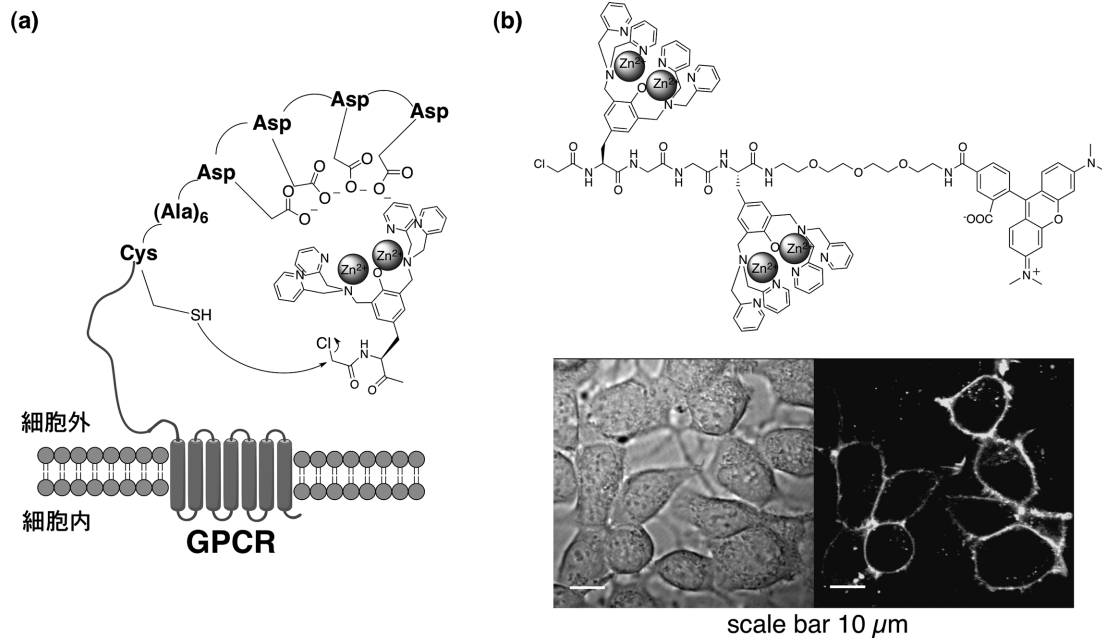


図 2 ペアを利用したリアクティブタグシステム

(a) 概念図

(b) B2R ラベル化プローブとこれを用いたリアクティブタグシステムによる B2R 蛍光イメージング (左: 位相差像, 右: 蛍光像)

1,500 倍の加速が得られた。

このリアクティブタグ (CA6D4GD4 タグ) を, 細胞膜タンパク質の GPCR の一つであるブラジキニン受容体 (Bradykinin B2 Receptor; B2R) の細胞外領域に導入し, HEK293 細胞の細胞表層に発現させ, ラベル化を試みた。プローブ分子として, ローダミン (蛍光色素) にダイマー型 Zn(II)-DpaTyr を連結させた化合物を設計・合成し, ラベル化させた結果, 細胞表層においてもラベル化反応は 30 分程度で迅速に進行し, B2R を選択的にラベル化可能であることが明らかとなった (図 2-b)<sup>10)</sup>。さらに, 「リアクティブタグシステム」でのラベル化は, 共有結合を介するためウエスタンブロットティングなど種々のラベル化後解析も可能であった。

このようなペプチドタグは, タンパク質タグに比較して非常に小分子であることから, ①標的タンパク質の機能阻害を最小限に抑えることが可能である, ②幅広い種類のタンパク質に適応できる, ③タンパク質配列の任意の部位に導入可能であるなどの利点が多い。

### 3. 内在性タンパク質を標的にしたラベル化

タグ融合タンパク質を利用するラベル化は, 柔軟性の高い手法ではあるが, タグ融合タンパク質の遺伝子を細胞内にトランスフェクションすることが必要である。それゆえ, 必然的に標的タンパク質が過剰に発現した系となりやすく, 実際の細胞環境とは異なり, 人工的に改変された細胞環境を用いざるをえない。また, トランスフェクション

による導入効率及び発現効率は近年向上しているものの, やはり専門的な技術が必要である。

タンパク質やその複合体の機能をより天然に近い状態で解析し理解するために, 理想的には遺伝子操作等を必要とせず, 生細胞内あるいは生体内における天然のタンパク質をラベル化することが要求される。すなわち, 細胞内あるいは個体内という極めて複雑性の高い系内において, 特定の内在性タンパク質を選択的に化学修飾することが求められる。この課題の克服を目指して, 我々は最近二つの手法 (①リガンド指向型トシル化学, ②Ligand tethered DMAP 法) を開発した。

#### 3-1-1. リガンド指向型トシル化学 (Ligand Directed Tosyl Chemistry: LDT 化学)<sup>11)</sup>

内在性タンパク質を標的としたラベル化法として, 我々はタンパク質が本来有しているリガンド認識能に基づいた「光アフィニティラベル化法」の原理を応用した (図 3-a)。

「光アフィニティラベル化法」は, 標的タンパク質に親和性を有するリガンド分子と光照射後に高反応性になる反応部位とを連結させたラベル化剤を用いることで達成される。このラベル化剤を添加すると, リガンド部分が標的タンパク質によって認識され, リガンド部位とタンパク質が近接する。そこに光照射することで高反応性基が生成し, 近接したタンパク質の活性中心付近のアミノ酸残基との特異的反応によって, 共有結合を形成する。これによって, 細胞内のような複雑系においても, 内在性の標的タンパク

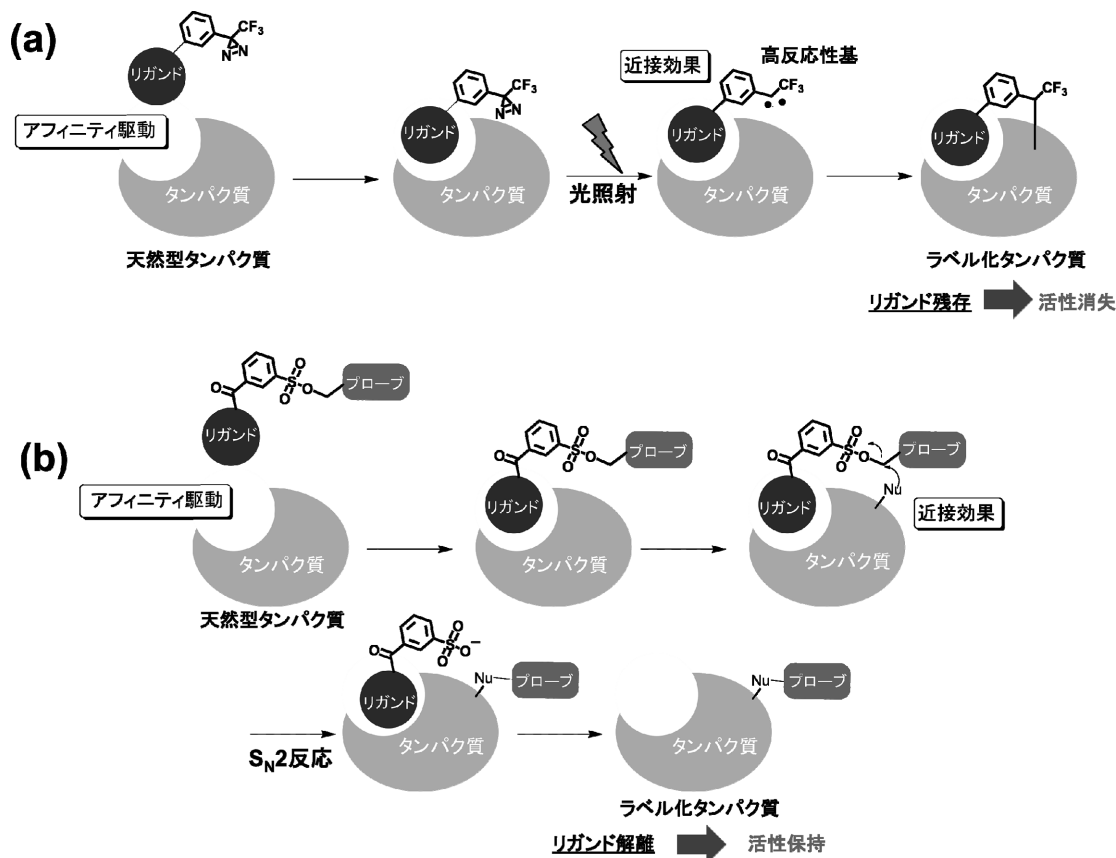


図3 アフィニティラベル化法 (a) とリガンド指向型トシル化学によるラベル化 (b)

質を選択的かつ活性中心近傍に特異的にラベル化することが可能となる。

しかし、従来の「光アフィニティラベル化法」では、ラベル化後もリガンドがタンパク質の活性中心に共有結合を介して残存するため、標的タンパク質の活性中心がマスクされ、ラベル化によって活性を消失するという致命的な欠点があった。このために、活性を保持したままタンパク質をイメージングすることや、ラベル化タンパク質の機能化は不可能であった。

この点を改善するため、トシル化学に基づいた「リガンド指向型トシル化学 (Ligand-Directed Tosyl Chemistry, LDT 化学)」では、プローブ分子とリガンド分子の間に、切断型反応基を導入した。近接した場合にのみ反応するような適度な反応性を有するリンカーを設計すれば、細胞内および個体内のような共雑系でも標的タンパク質のみを選択的にラベル化することが可能になると期待される。我々は、その適度な反応性を有する切断型反応基としてトシル基を見いだした。

LDT 化学の原理を図 3-b に示した。本手法では、フェニルスルホン酸エステル (トシルエステル) と呼ばれる求電子性の官能基を、リガンド分子と蛍光色素などの機能性分子との間に組み込んだラベル化剤を化学合成して用いる。

このようなラベル化剤は、標的タンパク質のリガンド認識に伴い、タンパク質の活性中心近傍の求核性アミノ酸残基がトシルエステル部分と近接し、求核置換反応 ( $S_N2$  反応) が加速される。トシルエステル部分の脱離を伴うラベル化によってリガンド部位は切り離され、タンパク質表面上には機能性分子のみが共有結合 (化学修飾) される。従って、LDT 化学では、標的タンパク質の機能を損なうことなく、選択的に機能性分子をラベル化することが可能になる。

### 3-1-2. LDT 化学によるタンパク質のラベル化

LDT 化学の有用性は、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase, CA) を標的タンパク質として用いて実証された。LDT 型ラベル化剤 1 として、リガンド分子には CA の阻害剤として知られるベンゼンスルホンアミド誘導体を、機能性分子としては蛍光プローブとなるクマリンをそれぞれ選択し、各分子をトシルエステルによって連結した (図 4)。

化学合成したラベル化剤 1 を、精製された CA II と混合し、反応性を評価すると 10 時間程度でラベル化は進行し、CA II の活性中心近傍に存在する 3 番目の His 残基が特異的にラベル化されることが分かった。一方で、リガンド部位を有さない化合物 2 を用いた場合は、CA II へのラベル化反応は全く観測されなかった。また、強力な CA II 阻害

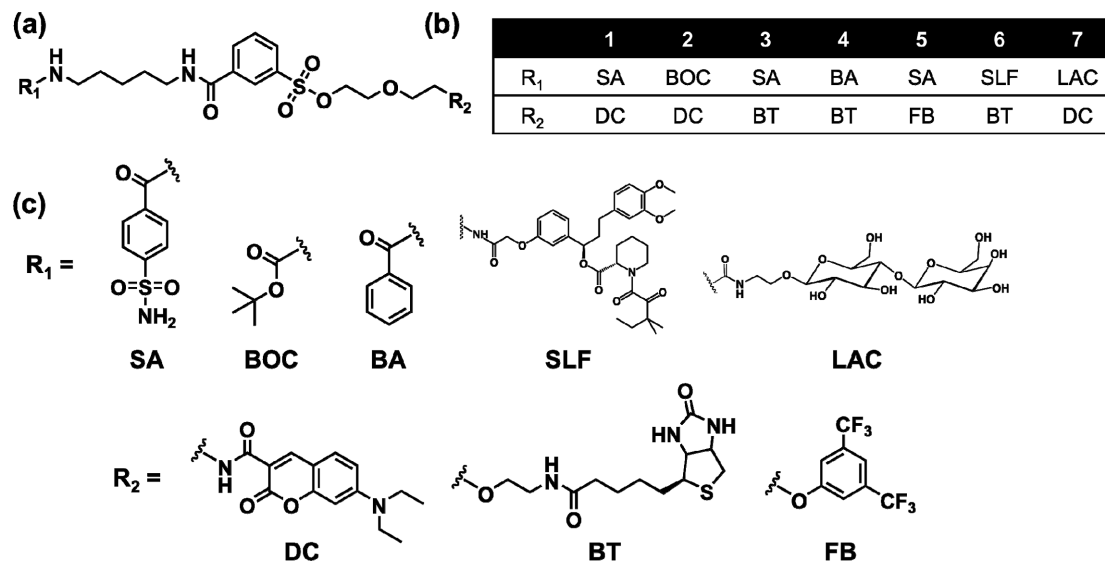


図4 LDTラベル化剤構造

(a) 基本骨格, (b) リガンド (R<sub>1</sub>) とプローブ (R<sub>2</sub>) の組み合わせ, (c) R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> の構造

SA: ベンゼンスルホンアミド, BOC: *t*-ブトキシカルボニル, BA: 安息香酸, SLF: FK506 の合成類似体, LAC: ラクトース, DC: ジエチルアミノクマリン, BT: ビオチン, FB: ビストリフルオロベンゼン

剤 (EZA) をラベル化剤 1 と共存させた場合でもラベル化反応は進行しなかったことから, LDT 化学によるラベル化反応はリガンド-タンパク質間の相互作用が駆動力となって加速されることが示された (図 5-a). また, 化合物 1 でラベル化された CA II の酵素活性を評価したところ, 天然型 CA II と同程度であり, LDT 化学はタンパク質本来の活性を維持できるラベル化法であることも明らかとなった.

CA は赤血球内で高濃度に発現していることが知られている. そこで, ヒト赤血球細胞とラベル化剤 1 を混和し, 37 度 C で数時間インキュベートした. 赤血球内には CA 以外にも多種多様のタンパク質および生体分子が混在しているにも関わらず, 標的タンパク質である CA のみを選択的にクマリン修飾することが可能であり, 阻害剤 EZA の存在下ではラベル化反応は進行しないことが明らかとなった (図 5-b).

さらに, 生きた動物個体内の CA ラベル化は, ビオチン型ラベル化剤 3 を用いて検討した. まず, 8 週齢の実験用マウスから採血した血液を用いてラベル化反応 (*ex vivo*) を行ったところ, ヒト赤血球の場合と同様に CA のみを選択的にラベル化可能であった. そこで, マウスの尾静脈からラベル化剤 3 を投与し, 一定時間後に採血してウエスタンブロッティングにより評価した結果 (*in vivo*), やはり CA のみを選択的にビオチン修飾することに成功した. また, リガンド部位を有していない (ベンゼンスルホンアミドをベンゼンに置き換えた) 化合物 4 では, ラベル化は進行しなかった. LDT 化学は, 細胞内だけではなく, *in vivo* の系でも内在性タンパク質の選択的なラベル化反応が可能

であることが示された (図 5-c). 以上の結果は, 生きた動物個体内の特定の内在性タンパク質を選択的にラベル化した初めての成功例である.

### 3-1-3. LDT 化学による他のタンパク質のラベル化

LDT 化学の原理を考慮すると, リガンドモジュールを変更すれば, 望みの標的タンパク質に対して, 選択的なラベル化を行うことが可能になる.

リガンド部分を SLF (Synthetic ligand of FKBP: 免疫抑制剤 FK506 アナログ) に変更したラベル化剤 6 を新たに設計・合成したところ, 精製 FKBP12 (FK506 binding protein) だけでなく, 白血球系細胞である Jurkat 細胞に低濃度でしか存在していない内在性 FKBP12 を選択的にビオチンラベル化可能であった. また, リガンド部位をラクトースにしたラベル化剤 7 は, マアナゴの表皮粘膜組織中に内在するラクトース結合タンパク質コンジェリン II (Cong II) の選択的ラベル化に成功した. これまでの検討から, LDT 化学によるラベル化が確認されているアミノ酸残基は, His, Glu, Tyr であり, これらのアミノ酸を活性中心近傍に有するタンパク質には, LDT 化学を利用したラベル化が応用可能であることが期待される.

以上より, CA・FKBP12・Cong II といった三つの異なる標的タンパク質へのラベル化が可能であることが示された. これらはいずれも遺伝子導入することなしに, 細胞・組織・個体内の内在性のタンパク質を選択的にラベル化した結果であり, LDT 化学の高い一般性を示している.

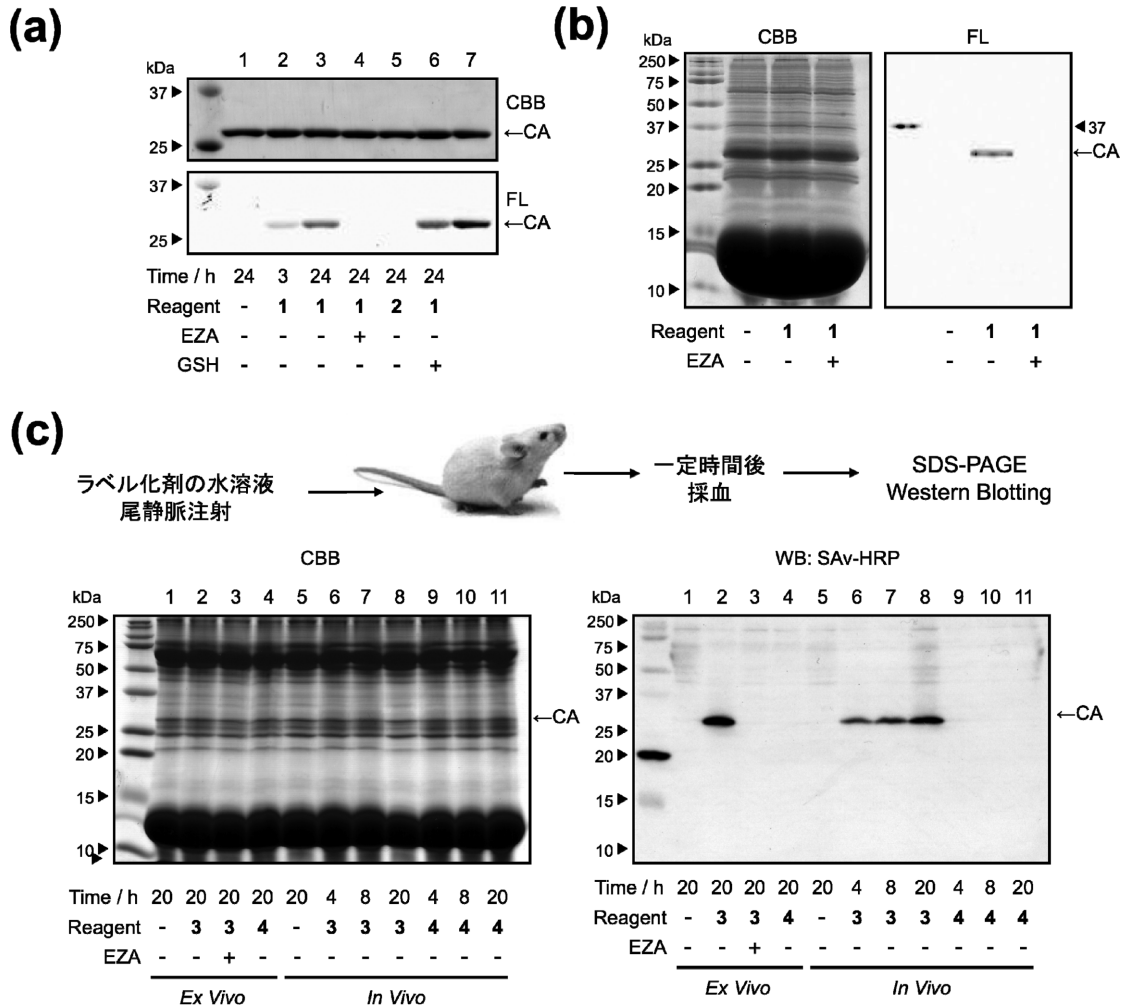


図5 LDTによるCAラベル化

(a) 試験管内でのCAに対するラベル化のSDS-PAGE後のゲル画像（上段：CBB染色画像，下段：蛍光下顕イメージング画像） (b) 赤血球中CAに対するラベル化のSDS-PAGE後のゲル画像 (c) マウス個体中でのCAラベル化のSDS-PAGE後のゲル画像（左：CBB染色画像，右：HRP標識ストレブとアビジンを用いたWestern-Blotting画像）

### 3-1-4. LDT化学によるタンパク質のバイオセンサー化

前述の通り，LDT化学は切断型反応基を用いているため，認識されたりガンド部位はラベル化反応と同時に標的タンパク質から切り離される．これにより，ラベル化前後でタンパク質の活性がほぼ変化しないという従来のアフィニティラベル化法にはない特徴を有している．この特徴を活用すると，細胞内在性のCAをラベル化するだけでなく，細胞内でのCAの機能評価を行うことも可能になる．このために機能性分子として<sup>19</sup>F原子を導入したラベル化剤5を用いて，赤血球内のCAをラベル化した．

生体深部でも観察可能なモダリティの一つにNMR/MRIがある．中でも<sup>19</sup>F-NMR/MRIは生体内に観測可能な<sup>19</sup>F原子が存在しないことから，バックグラウンドシグナルがゼロで，標的のみを可視化することが可能であり，今後の発展が期待されている．赤血球内のCAの<sup>19</sup>Fラベル化を，

in-cell <sup>19</sup>F-NMRによって観測したところ，経時的に化学シフト値が変化し，ラベル化反応を<sup>19</sup>F-NMRシグナル変化としてモニターすることが可能であった．また，赤血球細胞系でラベル化後のCAに阻害剤を添加したところ，阻害剤の添加量に応じてin-cell NMRの化学シフト値が再度変化した．この挙動は用いた阻害剤の赤血球膜透過性およびCAに対する親和性を総合的に反映するものであった．

このようにLDT化学で<sup>19</sup>Fラベル化した内在性CAは細胞内で<sup>19</sup>Fバイオセンサーとして機能し，タンパク質とリガンドとの相互作用を細胞内でそのまま観察できることが示された．

### 3-2-1. Ligand tethered DMAP法<sup>12), 13)</sup>

LDT化学の他に，我々は，内在性タンパク質に対する新たなラベル化手法としてLigand tethered DMAP (LT-

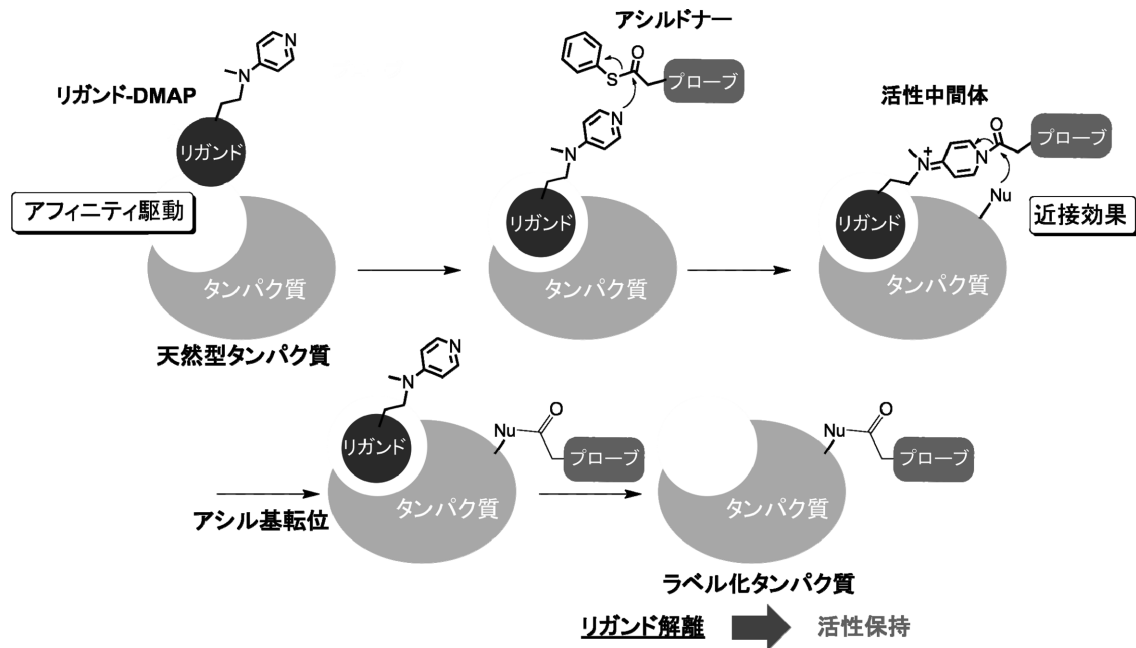


図6 LT-DMAP法を用いたラベル化

DMAP)を創案した。その概略図を図6に示す。DMAPとはdimethylaminopyridineと呼ばれる有機化学で汎用されるアシル化反応の有機触媒であり、LT-DMAPはこのアシル化反応を利用したタンパク質ラベル化法である。

タンパク質のリガンドとDMAPを連結させたLT-DMAPは、標的タンパク質によって認識(アフィニティ駆動)されると、活性中心付近に固定化される。そこに、アミノ酸残基をアシル化(アルカノイル化)するための反応剤として、チオエステル基を有するプローブ分子(アシルドナー)が接近すると、DMAP部位とチオエステル基が反応することで、活性化された中間体を形成する。この活性中間体はリガンド-タンパク質間相互作用によってタンパク質表面に固定されているため、近接効果が有効に作用する位置にある求核性アミノ酸残基が選択的にアシル化される。すなわち、LDT化学が1段階の反応でタンパク質をラベル化するのに対し、LT-DMAPは2段階反応でのラベル化である。LT-DMAP法は、LDT化学と同様に、リガンド分子がタンパク質上に修飾されることはないため、タンパク質の機能損失は起こらない。

### 3-2-2. LT-DMAP法によるラベル化

LT-DMAPによるラベル化反応は、Cong IIを標的タンパク質として検証された。リガンド部分にラクトースを導入し、DMAP部位を一つ有するLT-DMAPラベル化剤8およびアシルドナーとしてフルオレセイン型のチオエステル化合物19を用いた。

ラベル化実験の結果、Cong IIへのラベル化は進行した

ものの、ラベル化効率はそれほど高いものではなかった。そこで、触媒の多価効果を活用することとした。すなわち、DMAPの数を増やすことで、よりアシル化反応速度を向上させる戦略である(図7-a)。

Cong II(化合物8-10)およびSH2(Src homology 2) domain(化合物11-13)、FKBP12(化合物14-16)を標的タンパク質とし、リガンドに連結させるDMAP部分の一つ、二つ、三つと増やしたLT-DMAP化合物をそれぞれ設計・合成し、ラベル化反応の反応速度を評価した。いずれの標的タンパク質に対してもアシルドナー19を用いて検討した結果、DMAPの数が増えるほど反応速度は向上し、DMAP部分を三つ有するtrivalent DMAPではラベル化反応がほぼ1時間以内に終了した(図7-b)。このラベル化速度はLDT化学によるラベル化と比較して非常に速く、細胞実験等に適した迅速なラベル化であった。

さらに、ラベル化されるアミノ酸残基を検証したところ、主にLys残基にラベル化されることが明らかとなった。LDT化学とLT-DMAP法では、ラベル化の反応機構およびラベルされるアミノ酸残基が異なることから、これらのラベル化手法は互いに相補的な方法として標的タンパク質に応じて適用可能であることが示唆される。

次に、LT-DMAP法によって細胞膜結合タンパク質のラベル化反応が良好に進行することを明らかにした。HEK293細胞に過剰発現させたブラジキニン受容体(B2R)を標的とし、trivalent DMAP型のラベル化剤17およびアシルドナー19を用いてラベル化したところ、やはり1時間以内にラベル化反応は完了した。また、HOE140という強

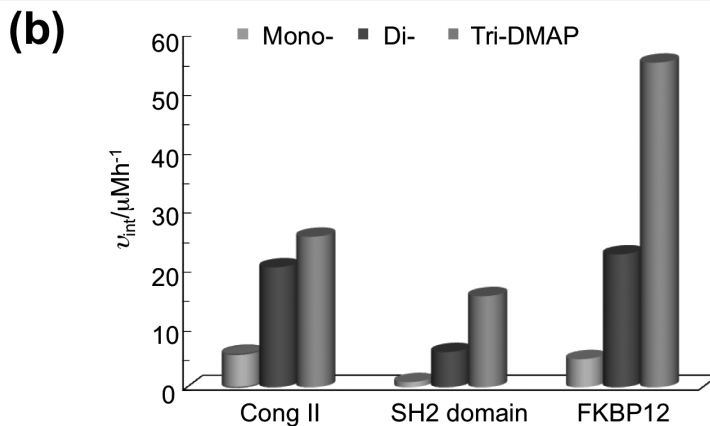
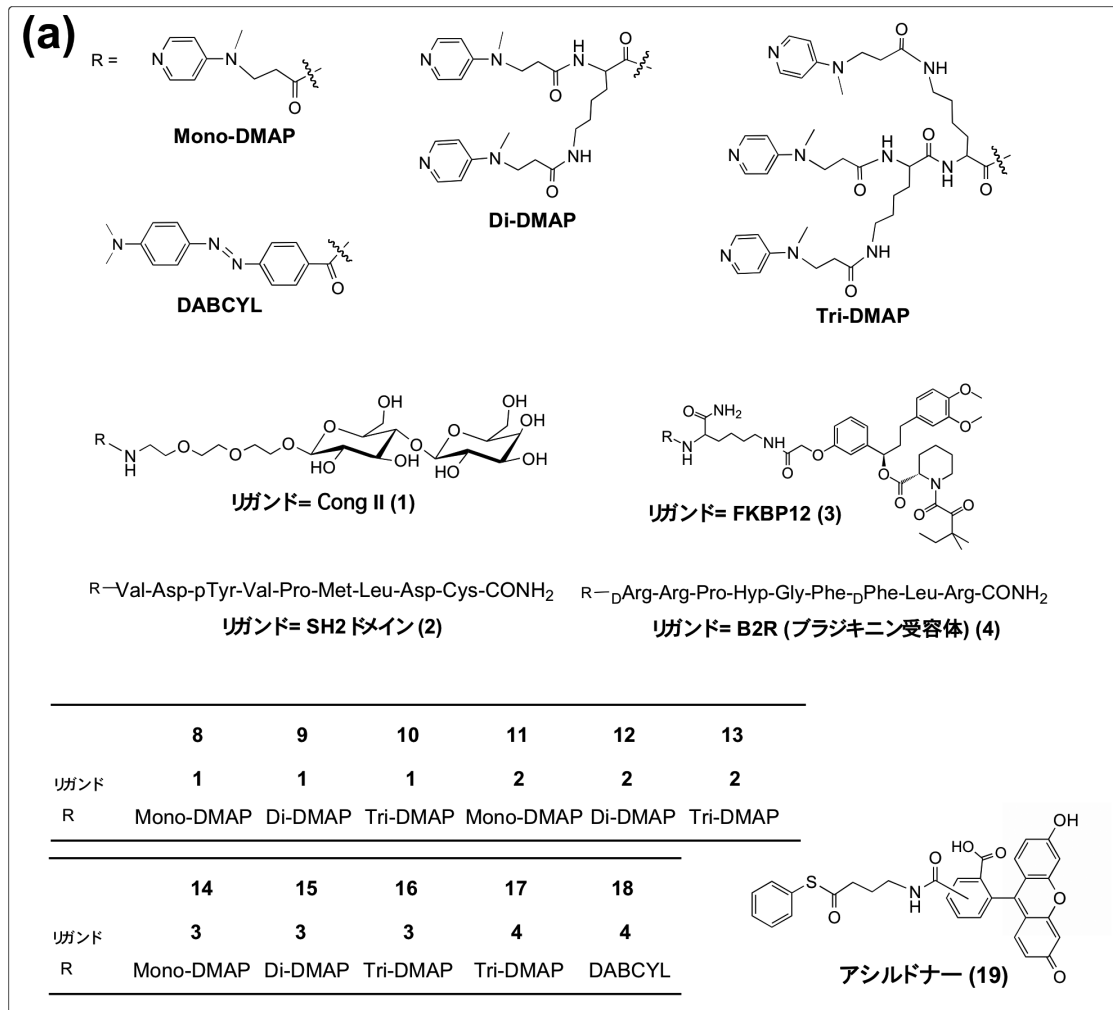


図7 ラベル化剤の構造 (a) と各種標的タンパク質に対する DMAP の数によるラベル化速度の違い (b)

力な B2R antagonist 共存下では、ラベル化反応は進行せず、図7のようにタンパク質-リガンドアフィニティを駆動力とし、DMAP 部分がアシル化反応を触媒していることが示された。

また、ラベル化前後での B2R のブライキニン (基質) に対する応答活性は、ラベル化前後で変化なく、ラベル化に

よってタンパク質の活性は損なわれていないことが明らかとなった。LT-DMAP を用いて、フルオレセインでラベル化した B2R に、リガンドと DABCYL を連結した化合物 18 を投与すると、フルオレセインと DABCYL 間での蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer; FRET) により、濃度依存的にフルオレセイン蛍光が



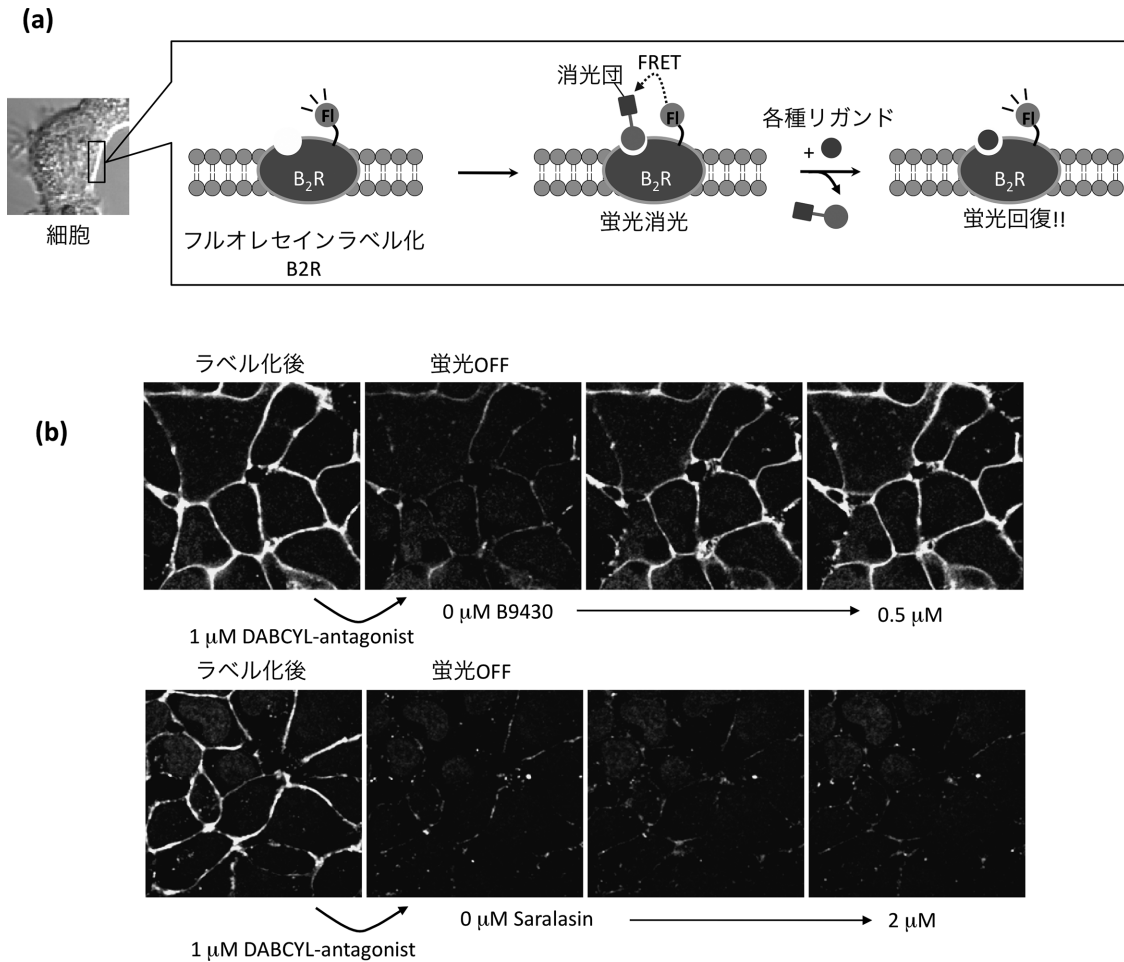


図8 LT-DMAPによるB<sub>2</sub>Rの蛍光型バイオセンサー化と阻害剤認識の概略図 (a) およびB<sub>2</sub>R各種リガンド (high-affinity ligand=B9430, low-affinity ligand=saralasin) を用いたバイオセンサー評価 (b)

消光した。そこにB<sub>2</sub>Rの様々なリガンドを添加すると、リガンドのB<sub>2</sub>Rへの親和性に応じてフルオレセイン蛍光が回復した (図8-a, b)。このように生細胞膜上でリガンド認識の様子がリアルタイムで蛍光観察可能なB<sub>2</sub>Rバイオセンサーが簡便に構築できることが示された。

#### 4. ラベル化法のまとめ

タグ融合タンパク質に対するリアクティブタグシステムを用いたラベル化法は、トランスフェクションの必要があるものの、タンパク質の種類に依存せずに一般性の高いラベル化と行うことができる。ペプチドタグのレパートリーが少ないのが問題であるものの、細胞表層のタンパク質への選択的ラベル化手法としては特に有効である。

内在性タンパク質を標的としたラベル化法として開発したLDT化学およびLT-DMAP法は、特異的なリガンドが同定されていないタンパク質には適応できない欠点がある。また、タンパク質の種類に応じてラベル化剤を設計・合成する必要はあるものの、天然の内在性タンパク質に対

して活性を保持したまま種々のプローブをラベル化することができるため、これらのラベル化手法は今後のバイオロジー研究において強力な化学ツールとなりうるであろう。特に、LDT化学では、細胞内・組織・生物個体においてもラベル化が進行するので、天然タンパク質が生体内で実際にどのような局在・動態を示すのか検討することも可能となると期待される。

これに対して、LT-DMAP法によるラベル化は、二段階の反応を利用するため、蛍光やMRIなどの導入したいモダリティ変換の際に、アシルドナー側のみを変更すればよく、比較的容易である。ラベル化反応が非常に速い特徴もあり、より短時間に生じる事象の観察に適した手法として活用されるであろう。

#### 5. おわりに

タンパク質ラベル化技術は近年活発に研究され、日々新たな手法が提案されている。このようなタンパク質ラベル化法には有機化学をはじめとして、錯体化学、超分子化

学, 生化学, 分子生物学, 構造生物学など数々の複合的な知識が要求される。各ラベル化法を相補的に上手く使い分けることが, 細胞および生体内でのタンパク質の機能を理解する最善の方法であると考える。

#### 文 献

- 1) Tsien, R.Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544.
- 2) Lippincott-Schwartz, J. & Patterson, G.H. (2003) *Science*, **300**, 87-91.
- 3) Sato, M., Ozawa, T., Inukai, K., Asano, T., & Umezawa, Y. (2002) *Nat. Biotech.*, **20**, 287-294.
- 4) Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., & Johnsson, K. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 86-89.
- 5) Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M.G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klauert, D.H., Bulleit, R.F., & Wood, K.V. (2008) *ACS Chem. Biol.*, **3**, 373-382.
- 6) Griffin, B.A., Adams, S.R., & Tsien, R.Y. (1998) *Science*, **281**, 269-272.
- 7) Guignet, E.G., Hovius, R., & Vogel, H. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 440-444.
- 8) Ojida, A., Honda, K., Shinmi, D., Kiyonaka, S., Mori, Y., & Hamachi, I. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452-10459.
- 9) Nonaka, H., Tsukiji, S., Ojida, A., & Hamachi, I. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15777-15779.
- 10) Nonaka, H., Fujishima, S., Uchinomiya, S., Ojida, A., & Hamachi, I. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9301-9309.
- 11) Tsukiji, S., Miyagawa, M., Takaoka, T., Tamura, T., & Hamachi, I. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 341-343.
- 12) Koshi, Y., Nakata, E., Miyagawa, M., Tsukiji, S., Ogawa, T., & Hamachi, I. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 245-251.
- 13) Wang, H., Koshi, Y., Nonaka, H., Minato, D., Kiyonaka, S., Mori, Y., Tsukiji, S., & Hamachi, I. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12220-12228.