

フラボタンパク質の一種であるアルデヒドデヒドロゲナーゼに類似した新規なモノオキシゲナーゼ (IcpA) であることを明らかにし、我々は大腸菌を宿主とした酵素の発現系とインジゴやインジルピンを生産する系の構築に成功した。

トルエンジオキシゲナーゼなどインジゴを合成することが知られている酵素は、複数のコンポーネントが会合したマルチコンポーネント酵素であり、インジゴを合成する微生物を育種するためには、各コンポーネントを共発現する必要がある。しかし、宿主として使用する微生物の性質や培養条件によって、コンポーネントの会合が不安定になることがある<sup>10)</sup>。一方、本酵素は *icpA* 遺伝子を単独で発現することで、インジゴやインジルピンを合成できる点に特徴があり、微生物や植物など多様な生物種による異種発現への応用が期待できる。また、インジゴは、染料として全世界で年間約1万7千トンが利用されており、現在は殆どが化学合成で生産されているが、既存の生産技術は、エネルギー消費が多く、環境負荷が高い。さらに、インジルピンは、抗がん活性を示す化合物として、臨床現場における応用が試みられており、IcpA 酵素は、インジゴやインジルピンを生産する環境に優しいバイオプロセスの構築へ応用が期待されている。

## 5. おわりに

人類は、農業や食品製造、環境浄化、医薬品、化成品の生産など、様々な分野において微生物を活用し、豊かな社会の創造に役立ってきた。しかし、これまでに人類が手にしている微生物遺伝子資源は、ほんの一部に過ぎず、有用な遺伝子資源の探索と活用は、私達の生活をより豊かにする可能性がある。今後の研究の進展に期待したい。

- Whitman, W.B., Coleman, D.C., & Wiebe, W.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 6578-6583.
- Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 4576-4579.
- Henriksen, G.L., Ketchum, N.S., Michalek, J.E., & Swaby, J.A. (1997) *Epidemiology*, 8, 252-258.
- Cerniglia, C.E., Morgan, J.C., & Gibson, D.T. (1979) *Biochem. J.*, 180, 175-185.
- Harms, H., Wittich, R.-M., Sinnwell, V., Meyer, H., Fortnagel, P., & Francke, W. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1157-1159.
- Kimura, N. & Urushigawa, Y. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 138-143.
- Krecka, G.M. & Gibson, D.T. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 288-296.

- Kimura, N., Kitagawa, W., Mori, T., Nakashima, N., Tamura, T., & Kamagata, Y. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 474-484.
- Kimura, N. & Kamagata, Y. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 365-373.
- Mason, J.R. & Cammack (1992) *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 277-305.
- Kimura, N., Nishi, A., Goto, M., & Furukawa, K. (1997) *J. Bacteriol.*, 179, 3936-3943.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., & Goodman, R.M. (1998) *Chem. Biol.*, R245-R249.
- Kimura, N. (2006) *Microb. Environ.*, 21, 201-215.
- Kimura, N., Sakai, K., & Nakamura, K. (2010) *Microb. Environ.*, 25, 133-139.
- Wagner, M. & Loy, A. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 218-227.

木村 信忠

(独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

Exploring for the biological and genetic resources from the uncultivated bacteria

Nobutada Kimura (Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

## 細胞内在性タンパク質の選択的化学修飾とエンジニアリング

### はじめに

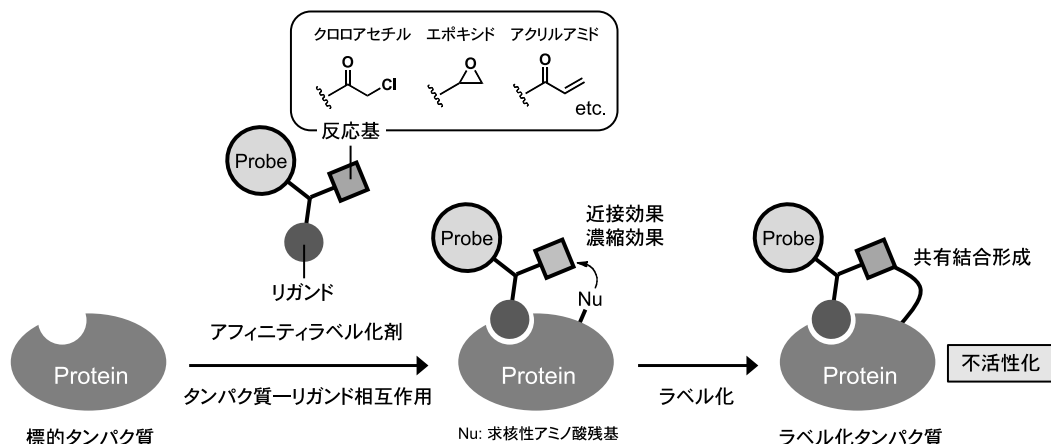
生命科学はポストゲノム時代を迎え、分子システムとしての生物の理解が進みつつある。それに伴い、個々の精製タンパク質の *in vitro* での生化学的解析に加え、細胞、組織、個体といったより高次の複雑系におけるタンパク質の機能を分子レベルで解明することが大きな課題となっている。特に近年、細胞や生体内でのタンパク質の挙動をそのままの環境下で「その場解析」する重要性が高まってきた<sup>1)</sup>。現在、そのためのアプローチの一つとして、GFPなどの蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングが世界中の研究室で盛んに行われている<sup>2)</sup>。その有用性について疑う余地はないが、この手法では、対象タンパク質に蛍光タンパク質を融合したものを細胞内に発現させ、あくまでもその「影武者」となる分子を観察しているという点に注意しなくてはならない。また、遺伝子発現を要する手法では、必然的に対象タンパク質を余分に(過剰)発現させるため、

人工的な細胞環境下での対象分子のふるまいを解析せざるを得ない。生命現象や疾病発症の作用機序を真に理解するためには、遺伝子操作を行わず、細胞にもともと存在する内在性タンパク質の機能や挙動をその場解析するという方向性が、今後、極めて重要になってくるものと考えられる。

細胞内の特定の「内在性」タンパク質を選択的に合成分子プローブによって「化学修飾（ラベリング）」することができれば、インタクトな細胞や *in vivo* 環境下でのタンパク質機能解析が可能になるものと期待される。例えば、あるタンパク質を蛍光色素で修飾し、その局在動態を観察する、あるいは、他のタンパク質との相互作用を蛍光変化によって検出するといったようなことが、細胞にもともと内在する真の対象タンパク質を用いてできるようになるであろう。化学ラベリングに基づいたアプローチでは、蛍光色素に限らず、NMR プローブ、ESR プローブ、光クロスリンカー、ケージド基など、さまざまなタイプの機能性プローブをタンパク質に導入することができ、蛍光イメージング以外の幅広い実験モードによる機能解析も可能になる。しかし、細胞内のように多種多様な生体分子が濃縮された環境下で、特定の標的タンパク質のみを狙って化学修飾するというのはそもそも可能なのであろうか？筆者らは最近になり、「タンパク質のアフィニティラベル化」の化学を応用することで、細胞内在性タンパク質の機能解析に展開可能な新規の化学ラベル化法を開発することに成功した。本稿では、この内在性タンパク質ラベリングツール「リガンド指向型トシル化学」<sup>3)</sup>について概説する。

## 1. 古典的なアフィニティラベル化—原理とその問題点—

タンパク質のアフィニティラベル化は、タンパク質とそのリガンド分子（薬剤など）との特異的な相互作用を利用したタンパク質修飾法である（図1<sup>4)</sup>。この手法では、①標的タンパク質に対して親和性を持つリガンド分子、②そのタンパク質に導入したい合成分子プローブ、③反応基、の三つのモジュールから構成される化合物を「アフィニティラベル化剤」として使用する。反応基としては、ハロアセチル、エポキシド、アクリルアミドなどの求電子性基や、光によって活性種を生成するベンゾフェノン、フェニルアジド、ジアジリン化合物などの光反応基がこれまでに使用されている。アフィニティラベル化剤は標的タンパク質の存在下、特異的なタンパク質-リガンド相互作用によって標的タンパク質と複合体を形成する。これにより、近接効果および濃縮効果が作用し、反応基がその近傍の求核性アミノ酸残基（Cys, His, Tyr, Lys など）と効率よく反応することで、ラベル化が達成される。この手法の重要なポイントとして、1) 夾雑系においても標的タンパク質選択的な化学修飾が可能なること、2) ラベル化部位はリガンド結合ポケットの近傍に特異的であること、3) タンパク質にもともと存在するアミノ酸残基を狙えるため、変異導入を施していない天然（内在性）タンパク質に対して適用できること、などが挙げられる。これらの特徴だけを見ると、アフィニティラベル化は内在性タンパク質の選択的ラベル化法として既に確立されているように思えるかも知れない。しかし、重大な欠点の一つがあった。従来の



アフィニティラベル化では、ラベル化後、リガンド分子は共有結合的に標的タンパク質に連結される。そのため、ラベル化タンパク質の活性中心ポケットはそのアフィニティリガンドによって常にマスクされ、もはや本来の機能を発現することはできない。すなわち、従来のアフィニティラベル化は、タンパク質の「不活性化」を伴う化学修飾法であり、その後の機能解析などへの応用は不可能であった。

## 2. リガンド指向型トシル (LDT) 化学

筆者らは、前節で述べたアフィニティラベル化の強みを生かしつつ、更に、標的タンパク質を不活性化しない新しいタイプのアフィニティラベル化の化学を考案することを目指した。さまざまな試行錯誤<sup>5,6)</sup>の末に辿り着いたのは、トシル化学に基づいたアフィニティラベル化法—「リガンド指向型トシル化学 (ligand-directed tosyl chemistry, LDT 化学)」—である<sup>3)</sup>。その基本原理を図 2A に示す。この LDT 化学では、標的タンパク質に対するリガンド分子と導入したい合成分子プローブを求電子性のフェニルスルホン酸エステル (トシルエステル) 基を介して連結した化合物をラベル化剤として用いる (リガンド分子はフェニルスルホン酸側に、プローブはアルコール側に配置する)。LDT ラベル化剤は、従来のアフィニティラベル化と同様に、タンパク質-リガンド相互作用を駆動力として標的タンパク質のリガンド結合ポケット近傍の求核性アミノ酸残基と特異的に反応する。その際、トシル化学では  $S_N2$  型の求核置換反応によってフェニルスルホン酸基が脱離するため、本系では、ラベル化反応と同時にリガンド分子がラベル化剤骨格から切り離される仕組みとなっている。つまり、LDT 化学では、リガンド分子は標的タンパク質と共有結合を形成せず、そのタンパク質に望みのプローブのみを「トレースレス (traceless) に」化学修飾することができる。

## 3. LDT 化学による炭酸脱水酵素のラベル化

筆者らは、まず、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase, CA) を標的タンパク質として選び、LDT 化学の有効性を検証した<sup>3)</sup>。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<sup>7)</sup>をリガンドとし、これとクマリン系蛍光色素をトシル基で連結したラベル化剤 1 を設計・合成した (図 2B)。1 と CA イソフォーム II (CAII) の精製体との反応をテストチューブ内にて評価したところ、CAII の表面かつリガンド結合ポケットの近傍に位置する 3 番目の His 残基特異的にラベル化が進行した。より強力な阻害剤を共存

させた競合条件下やスルホンアミドリガンドを有さない化合物 4 を用いたラベル化実験では、CAII のラベル化は全く進行せず、ラベル化反応はタンパク質-リガンド相互作用によって駆動されていることが示された。また、酵素活性アッセイの結果、ラベル化 CAII の活性は天然型のもの (未修飾 CAII) とほぼ同等であり、LDT 化学によるラベル化では標的タンパク質を不活性化しないことが確認された。

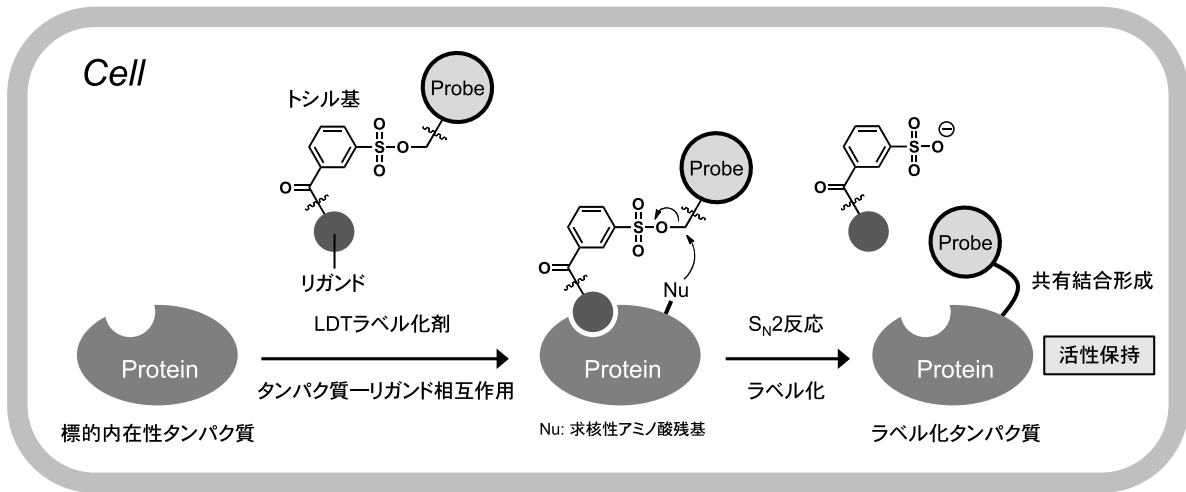
赤血球には CA が内在的に発現していることが知られている。そこで、ヒト赤血球細胞の懸濁液にラベル化剤 1 を加え、赤血球内の内在性 CA に対するラベル化を評価した。その結果、赤血球内には非常に多くの種類のタンパク質や膨大な量のヘモグロビンが混在しているにも関わらず、CA のみに対する極めて選択的なラベル化が確認された。先のテストチューブ実験と同様に、競合阻害条件下では、ラベル化は全く進行しなかった。ラベル化反応中の溶血 (赤血球膜の損傷) も一切見られず、1 は高い細胞膜透過性と生体適合性を持つこと、また、ラベル化反応は確かに細胞内で進行していることが示された。

LDT 化学による CA 選択的なラベル化は、マウス個体内でも進行することが判明した。ビオチンをプローブとして持つラベル化剤 2 を用い、これを実験用マウス (Slc: ICR) に尾静脈注射により投与した。一定時間後、血液成分を回収し、ウエスタンブロッティングにより解析した結果、CA のみに対する選択的なビオチンラベル化が確認された。リガンドを持たない化合物 5 を用いた場合には、ラベル化は進行しなかった。また、ラベル化剤を投与したマウスの異常も見られなかった。この結果は、生きた動物個体内における内在性タンパク質の選択的ラベル化に成功した世界初の事例である。

## 4. 赤血球内在性炭酸脱水酵素のバイオセンサー化

先の結果を受け、筆者らは、赤血球中の CA に<sup>19</sup>F プローブを導入し、<sup>19</sup>F ラベル化 CA とその阻害剤との結合挙動を<sup>19</sup>F NMR 測定により細胞内で直接観察することを試みた<sup>3)</sup>。<sup>19</sup>F は、蛍光イメージングでは観察できないような試料や生体深部でも測定可能な NMR/MRI プローブとして現在大変注目されている<sup>8)</sup>。赤血球懸濁液にラベル化剤 3 を添加し、その後のラベル化の過程を *in-cell* NMR 測定により追跡した (細胞内には<sup>19</sup>F 源がないため、バックグラウンドシグナルが全くない状態での観察が可能である)。その結果、内在性 CA にプローブが導入される過程を<sup>19</sup>F NMR シグナルのケミカルシフトの変化として観測する

**A**



**B**

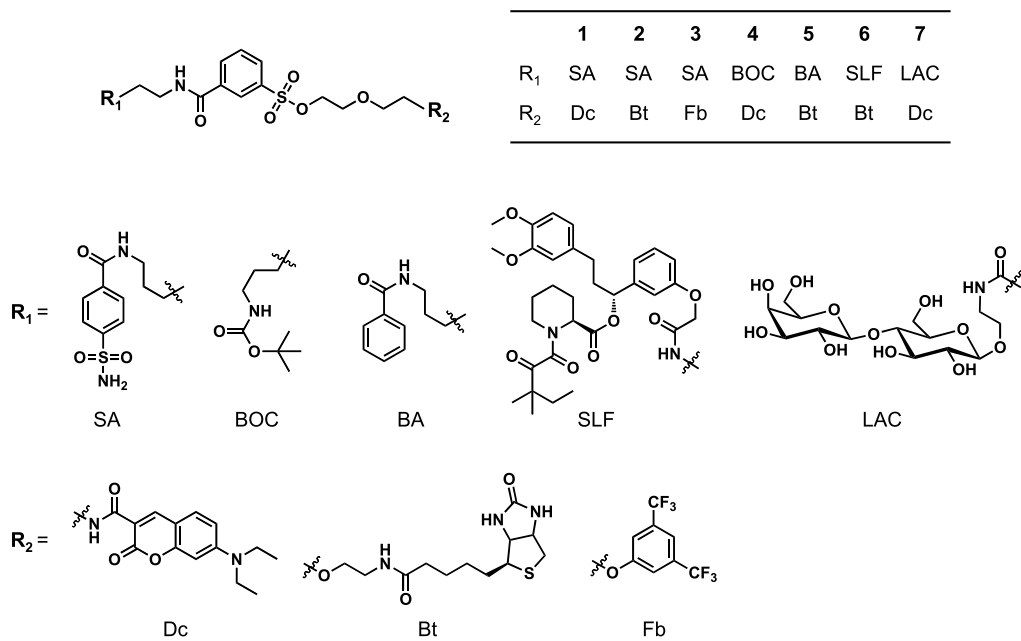


図2 リガンド指向型トシル (LDT) 化学

(A) LDT 化学の原理. LDT 化学では, 古典的なアフィニティラベル化法とは異なり, リガンド分子がラベル化と同時にラベル化剤から切り離される. (B) LDT ラベル化剤の分子構造.

SA: ベンゼンスルホンアミド (benzenesulfonamide)

BOC: Boc 基 (Boc group)

BA: 安息香酸 (benzoic acid)

SLF: FKBP12 合成リガンド (synthetic ligand of FKBP12)

LAC: ラクトース (lactose)

Dc: 7-ジエチルアミノクマリン (7-diethylaminocoumarin)

Bt: ビオチン (biotin)

Fb: 1,3-ビストリフルオロメチルベンゼン (1,3-bis(trifluoromethyl)benzene)

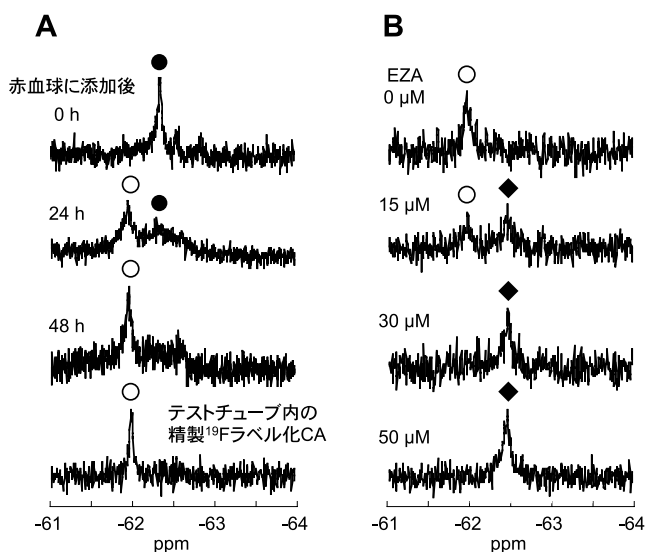


図3 LDT化学による赤血球内での $^{19}\text{F}$  NMR バイオセンサーの構築

(A) ラベル化剤3を用いた赤血球内在性CAの $^{19}\text{F}$ ラベル化プロセスとテストチューブ内で調製した精製 $^{19}\text{F}$ ラベル化CAの $^{19}\text{F}$  NMR スペクトル。(B) 赤血球内に構築した $^{19}\text{F}$ ラベル化内在性CAに対する阻害剤添加における $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルの変化。●ラベル化剤, ○ $^{19}\text{F}$ ラベル化CA, ◆EZA (ethoxzolamide) を結合した $^{19}\text{F}$ ラベル化CA。内部標準トリフルオロ酢酸のピークを $-75.6$  ppmとした。

ことができた(図3A)。テストチューブ内で調製した $^{19}\text{F}$ ラベル化CAを用いた比較検討の結果、赤血球内の $^{19}\text{F}$ ラベル化CAは、活性中心ポケットにリガンド分子が何も結合していない状態であることが判明した(詳細な議論については参考文献9を参照頂きたい)。赤血球内に構築した $^{19}\text{F}$ ラベル化CAに対して、細胞外から阻害剤(EZA)を添加したところ、添加量に応じたケミカルシフトの再変化が確認された(図3B)。すなわち、LDT化学を用いることで、細胞内に存在するタンパク質を細胞内でそのままバイオセンサーへと変換し、タンパク質とリガンドとの相互作用をその生きた細胞環境下でその場観察することに初めて成功した。

## 5. LDT化学による他の細胞内在性タンパク質のラベル化

LDTラベル化剤はモジュール的に構成されているため、リガンド分子を変更することで、他のさまざまなタンパク質に対するラベル化が可能である。例えば、免疫抑制剤FK506のアナログとなるSLFをリガンド<sup>10)</sup>として用いた場合(ラベル化剤6)、白血球系Jurkat細胞中の内在性FKBP12をビオチンタグで選択的に標識することが可能であっ

た<sup>3)</sup>。FKBP12は細胞内に低濃度にしか存在しないため、LDT化学は発現量の低いタンパク質に対しても適用できることが示されたことになる。また、リガンドとしてラクトース<sup>11)</sup>を用いることで(ラベル化剤7)、真アナゴの表皮粘膜組織中に内在するラクトース結合レクチン congerin を選択的に蛍光ラベル化することも可能であった<sup>3)</sup>。

## おわりに

LDT化学は、細胞や生物個体などの環境下に存在する「内在性の」標的タンパク質を選択的に化学修飾することのできる現在唯一の手法である。その一般性は高く、高親和性/高選択性のリガンド分子が見出されているタンパク質に対しては幅広く適用できるものと考えられる。近年では、タンパク質に対する特異的小分子リガンドの探索も盛んに進められており、今後、本手法で狙えるタンパク質も確実に増えていくものと予想される。また、本手法ではさまざまなタイプの合成分子プローブを使用することができ、各種分光学プローブの導入によるタンパク質の細胞内構造あるいは相互作用の解析や、内在性タンパク質の光活性制御など、研究者の目的やアイデア次第で多様な実験系を構築することができるであろう。LDT化学の誕生は、生体内の内在性タンパク質の機能や挙動をそのままの環境下でその場解析するという新しい理想的な生命研究スタイルの確立に向けた重要な第一歩であり、今後、基礎生物学、創薬、病理学などのさまざまな研究対象に積極的に適用されていくことを期待したい。また、内在性タンパク質の選択的ラベル化に使用可能な新しい戦略や有機化学を更に拡充していくことは、我々化学者に課せられた大きな課題の一つである。

- 1) Johansson, K. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, 5, 63–65.
- 2) 宮脇敦史 (2000) GFPとバイオイメージング, 実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座3, 羊土社.
- 3) Tsukiji, S., Miyagawa, M., Takaoka, Y., Tamura, T., & Hamachi, I. (2009) *Nat. Chem. Biol.* 5, 341–343.
- 4) Wold, F. (1977) *Methods Enzymol.*, 46, 3–14.
- 5) 築地真也, 浜地 格 (2007) 蛋白質核酸酵素, 52, 1581–1587.
- 6) 高岡洋輔, 築地真也, 浜地 格 (2009) 化学, 64 (7), 29–34.
- 7) Supuran, C.T. (2008) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 168–181.
- 8) Yu, J., Kodibagkar, V.D., & Mason, R.P. (2005) *Curr. Med. Chem.*, 12, 819–848.
- 9) Takaoka, Y., Sun, Y., Tsukiji, S., & Hamachi, I. (2011) *Chem. Sci.*, 2, 511–520.
- 10) Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L.W., Hatada, M., Amara, J.F., Rollins, C.T., Stevenson, L.F., Magari, S.R., Wood, S.A.,

- Courage, N.L., Lu, X., Cerasoli, F., Jr., Gilman, M., & Holt, D. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 10437-10442.
- 11) Koshi, Y., Nakata, E., Miyagawa, M., Tsukiji, S., Ogawa, T., & Hamachi, I. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 245-251.

築地 真也<sup>1</sup>, 石田 学<sup>1</sup>, 浜地 格<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>長岡技術科学大学

産学融合トップランナー養成センター,

<sup>2</sup>京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻)

Selective chemical labeling and engineering of endogenous cellular proteins

Shinya Tsukiji, Manabu Ishida (Top Runner Incubation Center for Academia-Industry Fusion, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan) and Itaru Hamachi (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura Campus, Nishikyō-ku, Kyoto 615-8510, Japan)

## DNA 損傷刺激に応答した p53 の活性化機構における RUNX3 の新たな役割とアポトーシス誘導

### 1. はじめに

抗がん剤処理や放射線照射などの DNA 損傷刺激に暴露された細胞のレスポンスは、その細胞の生死を分ける重要なイベントの一つである。DNA 損傷刺激に曝された細胞の核内では、リン酸化された ataxia telangiectasia mutated (p-ATM) が損傷を受けた DNA を含むクロマチン領域のヒストン H2AX をリン酸化し、リン酸化された H2AX (γH2AX) が損傷部位に集積し、損傷部位のマーキングが迅速に行われる。その後、γH2AX と親和性の高い nuclear factor with BRCT domain 1 (NFB1)/mediator of the DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) が DNA 修復複合体を損傷部位に集積させ、損傷 DNA の修復を介して当該細胞の正常な細胞周期への復帰を促進する<sup>1-3)</sup>。しかしながら、重篤な DNA 損傷を受けた細胞では、修復不可能と判断され p53 依存性のアポトーシス誘導経路が起動し、その細胞はアポトーシスによって生体から排除される<sup>4)</sup>。このように、p53 の活性化は特にがん細胞の抗がん剤や放射線に対する感受性の決定にあずかる重要なプロセスの一つであり、その詳細な分子機構の解明は急務である。そのためには、DNA 損傷刺激に応答して p53 の機能を制御する因

子の同定と、その詳細な機能解析が不可欠である。本稿では、ヒト胃がんのがん抑制タンパク質である RUNX3 が p53 のコアクチベーターとして機能するという新たな知見が得られたので紹介する<sup>5)</sup>。

### 2. RUNX ファミリーの構造と機能

RUNX3 は進化的に保存された Runt ドメインを持つ RUNX ファミリーに属する。RUNX ファミリーは、この Runt ドメインを介して様々な転写因子とヘテロダイマーを形成し、その下流標的遺伝子群の転写を特異的に制御する。哺乳類の RUNX ファミリーは RUNX1, RUNX2 および RUNX3 から構成される。これらのメンバーの生理的な機能には大きな隔たりが認められる。すなわち、これまでの報告によれば、RUNX1 および RUNX2 はそれぞれ血球系への分化および骨分化において重要な役割を担っていると考えられている。一方で、RUNX3 は胃腸管の形成および神経分化に関与している<sup>6)</sup>。注目すべきは、RUNX ファミリーの異常は様々な疾患に密接にリンクしているという事実である。RUNX1 は急性骨髄性白血病 (AML) における染色体転座の標的であり、また RUNX2 の LOH (loss of heterogeneity) は鎖骨頭蓋骨異形成の原因であるとされている<sup>7)</sup>。LOH とは、対立遺伝子の片方が染色体不安定性のために欠落する現象のことである。さらに、RUNX3 のノックアウトマウスの解析から、RUNX3 は胃がんのがん抑制遺伝子であることが指摘されている<sup>8)</sup>。

### 3. がん抑制遺伝子としての RUNX3

Li らは、RUNX3 のノックアウトマウスの解析から胃粘膜の過形成を見出した。次に、彼らは胃がん組織を用いた発現解析を行ったところ、RUNX3 が座位するヒト染色体 1p36 領域の LOH と、RUNX3 のプロモーター領域のメチレーションの組み合わせによる顕著な RUNX3 の発現低下を見出した。さらに、RUNX3 の変異解析を行ったところ、変異の頻度は極めて稀ではあるが、彼らは Runt ドメインをコードする領域内に R122C 変異を見出した。Runt ドメインは RUNX3 の機能発現にとって重要な意味を持つことから、R122C 変異による Runt ドメインの構造異常は、RUNX3 のがん抑制機能に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。実際に、ヌードマウスを用いた実験から、R122C 変異は RUNX3 のがん抑制機能を顕著に阻害することが示された<sup>8)</sup>。その後の精力的な発現解析の結果、メチレーションによる RUNX3 の発現抑制は胃がんに限定されているわけではなく、肺がん、肝細胞がん、乳がん、膵