

合成レセプター分子によるタンパク質表面の認識とその利用

Development of artificial receptors for protein surface recognition

宮崎大学工学部物質環境化学科 大島達也

【緒言】

大環状化合物はその分子空孔に標的となるゲスト分子を取り込むことによりゲストのサイズ等を識別できることから、生体系の分子認識現象を理解するためのモデル化合物としての研究が発達してきた。その典型例はクラウンエーテルやカリックスアレーン類による金属イオンの認識、シクロデキストリンによる有機分子の認識などである^{1,2)}。これらの研究ではホスト分子内に比較的小さいゲスト分子を取り込む様式が検討されてきたが、最近、このような人工のホスト分子が自身よりもはるかに大きいタンパク質の表面に結合し、タンパク質の機能改変に関わることが報告されるようになった。本講演では、このような人工ホスト分子によるタンパク質「表面」の認識について報告例をいくつか紹介し、その展望について考察する。

【クラウンエーテル類によるタンパク質の認識・修飾】

Cram らによるアミノ酸の光学分割の研究に知られるように、クラウンエーテルのうち 18-crown-6 はその空孔の大きさと対称性がアンモニウムイオン (RNH_3^+) の認識に適しており、三脚型の水素結合形成によって安定な複合体を形成する (図1参照)。同様にして 18-crown-6 がタンパク質中のリジン残基に由来するアミノ基 (RNH_3^+) と結合してタンパク質の物性や機能を改変しうることが近年明らかになってきた。

1985年、Odell らはシトクロム *c* (Cyt-*c* と略記する) などの幾つかのタンパク質がクラウンエーテルの存在下でメタノール中に溶解することを報告している³⁾。その後 Reinhoudt らは幾つかのプロテアーゼ類がクラウンエーテル類が共存するとその活性が増大することを明らかにした⁴⁾。そのメカニズムについては当初不明な点が多く、クラウンエーテルがタンパク質近傍の水の移動、脱離等に関与しているという解釈もあったが、反応速度の解析により、このクラウンエーテルによる有機溶媒中での酵素の活性化は、クラウンエーテルとリジン残基 (NH_3^+) の錯形成によりタンパク質が可溶化・保護されたことによることがほぼ明らかになっている^{5,6)}。

Cyt-*c* は 18-crown-6 との複合化により本来有しない peroxidase 活性を示すようになる。これは 18-crown-6 が Cyt-*c* 表面に付加することでタンパク質の立体構造が変化し、基質が Cyt-*c* の活性中心に到達できるようになるためである。Tsukube らはこれを利用した低温下での Cyt-*c* の触媒機能について検討している⁷⁾。

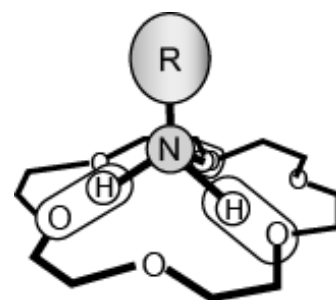


図1. 18-crown-6・アンモニウム間の三脚型水素結合

【カリックスアレーン誘導体によるタンパク質の認識・修飾】

筆者らはカリックス[6]アレーンの6つの水酸基に酢酸基を配した誘導体 (${}^t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$) がアミノ酸エステル、核酸塩基類、カテコールアミン類などの様々な生体由来のアミン類に対する非常に大きな親和力を有することを明らかにしてきた^{8,9)}。 ${}^t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ 分子は 18-crown-6 と同様、 NH_3^+ を認識するのに理想的な空孔サイズと C_3 対称性を有しており、かつ NH_3^+ とカルボキシル基との間で静電的相互作用が働くことで、立体的にも電荷においても良好な相補性を有することがこの親和性の由来である。

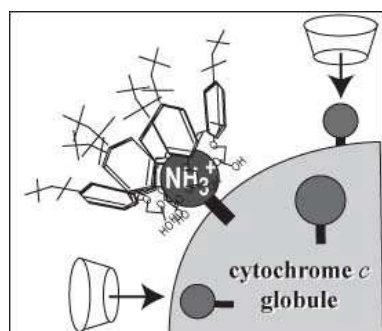


図2 $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ とCyt-cによる複合体形成の概念図

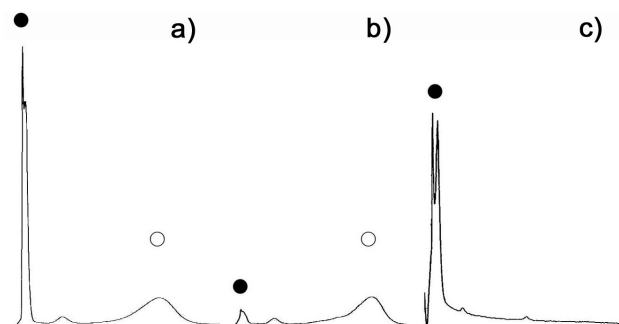


図3 $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ によるタンパク質の抽出分離(クロマトグラム) a) 抽出前の水相 b) 抽出後の水相 c) 逆抽出溶液 ●: Cyt-c ○: Lyso

近年筆者らはこの $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ が水溶液中の Cyt-c を有機溶媒中へ定量的に抽出できることを明らかにした¹⁰⁾。図2は $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ によるタンパク質抽出の概念図である。牛心臓由来の Cyt-c は全アミノ酸残基の18%にあたる19個がリジン残基であり”Lys-rich”なタンパク質であるといえる。 $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ 分子は Cyt-c 分子表面のこれらのリジン残基における ϵ -アミノ基各個を1:1錯形成反応によって包接すると考えられる。このような反応がタンパク質1分子に対して複数点で起こることで、生成する分子複合体は電荷が相殺され、表面が疎水化されることで有機溶媒に抽出される。水溶液中の Cyt-c に対して20倍等量以上の $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ を含む有機溶媒を接触させると Cyt-c は100%有機溶媒へ抽出される。こうして有機溶媒中に抽出された Cyt-c はカリックスアレーンとの相互作用により peroxidase 活性を発現するようになり、有機溶媒中でフェノール類の酸化触媒として機能するようになる。

$t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ 分子は NH_3^+ 基を認識し包接することで Cyt-c を抽出しているため、タンパク質抽出において”Lys-rich”なタンパク質を選択的に抽出することができる。Cyt-c とリゾチーム (Lyso と略記) は分子量・等電点は互いに類似するがリジン残基の数は Cyt-c が19個、Lyso が6個と大きく異なるため、これらの混合溶液に $t\text{Oct}[6]\text{CH}_2\text{COOH}$ を含む有機相を接触させると Cyt-c だけが抽出され、Lyso は全く抽出されない系を構築することができる(図3)。すなわちこの抽出系を用いると、タンパク質をその表面アミノ酸残基の組成に基づいて分離することができる¹¹⁾。

【人工レセプターによるタンパク質表面の「面」による認識・修飾】

上述した例は、大環状化合物によるタンパク質表面のアミノ酸残基への「点」における認識現象であるが、これに対して A.D.Hamilton らはタンパク質表面の「面」による認識を目標として研究を展開しており、近年優れた研究を報告している¹²⁾。

そもそもタンパク質同士が結合し複合体を形成する際には、結合相手と相補性を持つアミノ酸残基が立体的に配置され、疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合などによって多点で結合している。従ってタンパク質表面全体に結合することを目的としたレセプター分子には、大きな表面積で多点で相補的にタンパク質分子と結合することが要求される。そこで彼らはタンパク質の表面積に匹敵する大きなレセプター分子を、大環状化合物を基礎骨格として構築した。図4はその一例である。カリックス[4]アレーンを骨格として抗体を模した環状ペプチド基を導入したレセプター分子は 450\AA 以上の分子表面を有し、タンパク質と1:1の比で複合体を形成する¹³⁾。このようなレセプター分子は加水分解酵素に結合して活性を阻害したり¹⁴⁾、タンパク質同士の結合を阻害する機能を示すようになる¹⁵⁾。

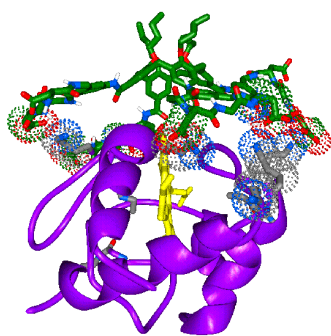
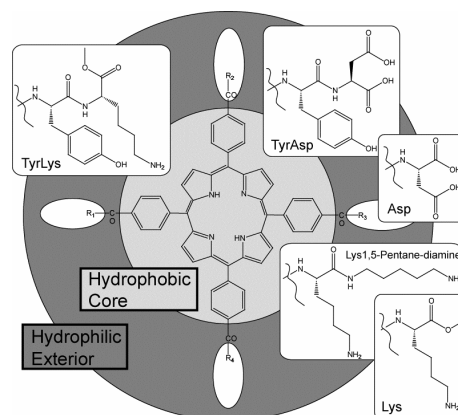
図4 擬似抗体分子とタンパク質の複合化¹³⁾

図5 テトラフェニルポルフィリンを基礎骨格としたタンパク質結合性レセプターの構造

最近、Hamilton らは大環状化合物テトラフェニルポルフィリン (TPP) に、タンパク質と結合するためのペプチド残基を手足のように伸ばした合成レセプターTPP 誘導体を開発した (図5)¹⁶⁾。このレセプター分子は TPP の剛直で疎水性の中心核からなり、その末端に多様なペプチド残基を導入することができる。電荷、サイズ、疎水性、対称性の異なるペプチドを4箇所の導入部位へ個別に導入すれば、各種タンパク質に対するこれら TPP 誘導体の結合特性は導入基によって全く異なるものになる。

Hamilton らはまず5種類のペプチドから2種類を選んで基礎骨格となるテトラカルボキシ TPP と一段階で縮合させた。反応生成物は2種類のペプチド基が様々なパターンで導入された置換体の混合物であり、個別に分離できる。導入するペプチドの組み合わせを変えることで比較的簡単に35種類の TPP 誘導体が得られている。こうして得られた各種 TPP 誘導体の溶液を個別に各種のタンパク質の溶液と混合すると、タンパク質と結合した場合に TPP 誘導体は色を変える (図6)。導入された官能基の種類と立体配置の違いにより、結合性を示す TPP 誘導体は結合相手となるタンパク質によって異なるため、数種類のレセプターをタンパク質と混合し、その蛍光パターンを確認することで、タンパク質の同定を視覚的に行うことが可能である。彼らはこの同定法を Protein Fingerprint (タンパク質の指紋採取) と呼んでいる。

プロテオミクス研究におけるタンパク質の簡便な検出や、医療診断における病気の兆候となる特定のタンパク質の検出など、多様な環境において特定のタンパク質を検出するための簡単・確実な優れた手法が現在求められている。こうしたタンパク質検出キットとしてはモノクローナル抗体、抗体フラグメント、核酸アダプターが開発されているが、これらは化学的不安定性や、検出するためのラベル化といった問題を抱えている。各種合成レセプターとの結合

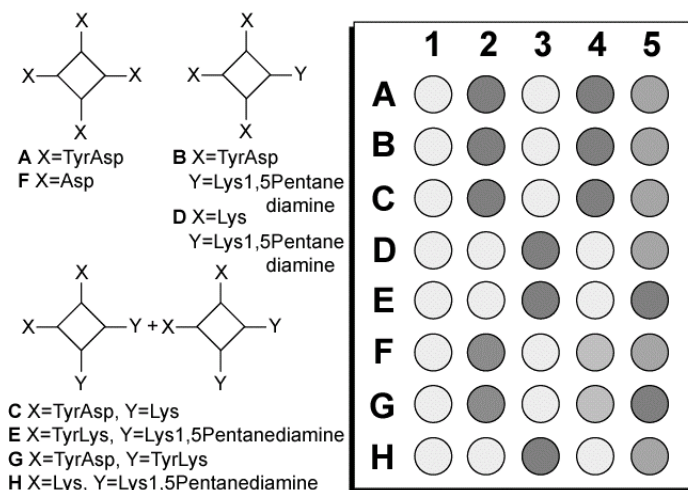


図6. タンパク質 (1~5)・レセプター (A~H) 混合液の蛍光パターンによるタンパク質同定。

例えばこの場合、タンパク質 (3) はレセプターD, E, Hと結合し、タンパク質 (4) はA, B, Cと強く、F, Gと弱く結合していることが視覚的に判断できる。

性を蛍光検出で視覚的に簡便に確認し、その組み合わせによりタンパク質を同定する Hamilton らの提案は、簡便性・汎用性といった長所を有していると考えられる。

【結言】

以上の例に挙げられるように、人工レセプター分子とタンパク質の相互作用に関する研究は近年になっていくつかの研究グループによって報告されるようになり、今後一層関心を集める研究分野であると予測される。タンパク質の表面を認識する (protein surface recognition) 分子として人工レセプター分子を用いる利点としては、

- (1) 特定のアミノ酸残基 (例えばリジン) を認識することでタンパク質表面の位置選択的な修飾を行える
- (2) 目的に応じた修飾材料として、多様で生体分子よりも安定な誘導体を設計・合成することができる
- (3) ゲストとなるタンパク質表面部位を包接により立体的に修飾・保護する
- (4) 非共有結合による比較的穏やかで容易な修飾である といった特長が挙げられる。

また、これまでの概念がタンパク質表面のアミノ酸残基を「点」で認識するのに対し、上述の A.D.Hamilton らのグループでは、より表面積の大きなレセプター分子を設計して、レセプター1分子でタンパク質表面の複数の官能基と多点で相互作用することによりタンパク質表面を「面」で認識する概念の下に研究を展開している。このようなコンセプトに基づいてタンパク質表面に存在する官能基の立体配置を認識できるレセプター分子はタンパク質の高度認識材料として広範な用途が見込まれるため、今後こうしたレセプター分子の開発は一層活発になると予想される。

【参考文献】

- 1) 妹尾学、荒木孝二、大月穰、超分子化学 (東京化学同人)
- 2) 築部浩編著、分子認識化学 (三共出版)
- 3) Odell, B.; Earlam, G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 359.
- 4) Reinhoudt, R. D.; Eendebak, A. M.; Nijenhuis, W. F.; Verboom, W.; Kloosterman, M.; Schoemaker, H. E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 399.
- 5) Unen D.-J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *J Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 877.
- 6) Unen D.-J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Biotech. Bioeng.* **2002**, *77*, 248.
- 7) Paul, D.; Suzumura, A.; Sugimoto, H.; Teraoka, J.; Shinoda, S.; Tsukube, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11478.
- 8) Oshima, T., Goto, M., Furusaki, S. *J. Incl. Phenom.*, **2002**, *43*, 77.
- 9) Oshima, T., Oishi, K.; Ohto, K.; Inoue, K. *J. Incl. Phenom.*, **2005**, *in press*.
- 10) Oshima, T., Goto, M., Furusaki, S. *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 438.
- 11) Oshima, T.; Higuchi, H.; Ohto, K.; Inoue, K.; Goto, M. *Langmuir*, **2005**, *21*, 7280.
- 12) Peczu, M. W. Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479.
- 13) Hamuro, Y.; Celama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2680.
図4のモデル図は Prof. Hamilton に提供頂いた。
- 14) Park, H. S.; Lin, Q.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8.
- 15) Wei, Y.; McLendon, G. L.; Hamilton, A. D.; Case, M. A.; Purring, C. B.; Lin, Q.; Park, H. S.; Lee, C.-S.; Yu, T. *Chem. Commun.* **2001**, 1580.
- 16) Baldini, L.; Wilson, A. J.; Hong, J., Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5656.