

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19182

研究課題名(和文) 合成化学と遺伝子工学を融合した抗体様タンパク質の機能改変

研究課題名(英文) Synthetic chemistry-genetic engineering technology enabling the modification of antibody protein functions

研究代表者

西形 孝司(nishikata, takashi)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：90584227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、金属触媒存在下での非天然アミノ酸合成研究を行った。しかし、金属触媒を用いてアミノ酸を合成すると金属残渣が避けられずタンパクに悪影響を及ぼす。そこで、金属触媒非存在下での非天然アミノ酸合成プロセスの確認を行った。その結果、炭酸セシウム存在下、プロモカルボニル化合物(第三級アルキル源)とアミンとの反応を開発した。また、本研究過程では、アミンの代わりにアルコールが立体特異的にキラル第三級アルキル基質と反応することを見出した。本技術は、tRNAに炭素官能基を組み込む際の知見となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の機能はタンパク質の全体的な形できまり、タンパク質の形はそれを構成するアミノ酸により決定されることから、非天然アミノ酸をタンパク質合成に自在に組み合わせることができれば、思い通りの機能を持つデザインタンパクを作ることが可能である。これにより、例えば、抗体タンパクなどの医療分野に応用できれば、この分野にパラダイムシフトをもたらすことができる。本研究で得られた成果は、デザインタンパクを合成するには至っていないが非天然アミノ酸の合成法、tRNAへの組み込み手法やタンパク改変のための遺伝子情報に関する基礎的データを得ることができたため今後のデザインタンパク研究分野に重要な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first conducted an unnatural amino acid synthesis study in the presence of a metal catalyst. However, when amino acids are synthesized using a metal catalyst, metal residues are inevitably adversely affected for proteins. Therefore, we confirmed the process of synthesizing unnatural amino acids in the absence of a metal catalyst. As a result, we developed a reaction between an α -bromocarbonyl compound (tertiary alkyl source) and an amine in the presence of cesium carbonate. In addition, in this research process, it was found that alcohol instead of amine reacts stereospecifically with a chiral tertiary alkyl substrate. This technique can be a finding when incorporating carbon functional groups into tRNA.

研究分野：有機合成化学

キーワード：合成化学 遺伝子工学 タンパク アミノ酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は酵素や医薬品として産業に欠かせない生体分子であり、DNA の情報に従って配列された 20 種類の天然アミノ酸から構成されている。しかし、天然アミノ酸から構成されるタンパク質はしばしば、活性を失いやすかったり、触媒できる化学反応に制限があったりする。この問題を克服するために従来よりタンパク質を非天然アミノ酸で改変する研究が注目されている。この技術の一つの画期的な応用は抗体医薬品分野であり、大量・安価に生産する技術の開発が激しい。治療薬と期待される抗体およびその可変領域タンパク質にはいくつか種類があり、その一つである Nanobody は小さく微生物等で生産しやすい反面、安定性が低い。抗体医薬は生体内での安定性～半減期～が重要で、その向上が求められる。この解決策として構成している天然アミノ酸を非天然型アミノ酸で置換することができれば、側鎖間の相互作用を強化して安定性の向上が期待でき、さらに抗原認識部位にもこれを適用すれば、抗体医薬で最も重要な、抗原との結合強化など、天然アミノ酸の限界を超える機能が期待できる。

2. 研究の目的

上記背景をふまえ、本研究では、有機合成的に設計したアミノ酸を様々に合成し、それを抗体様タンパク質の天然アミノ酸と置換する技術の開発を行う遺伝子工学の 2 つの分野を組み合わせた非天然型機能性タンパク質分子の人工合成のための革新的な手法開発を目的とする。すなわち、抗体様タンパク質の改変予定の天然アミノ酸に対応するアンチコドンをもつ tRNA に所望の非天然アミノ酸を導入し、得られた tRNA をタンパク質合成に組み込むことで、所望の非天然アミノ酸が導入された抗体様タンパクの合成を達成する。本研究ではモデル系として Nanobody の改良を行うが、確立した技術は汎用的であるので、あらゆるタンパク質の機能改善に展開できる。

3. 研究の方法

本研究を次の 3 つに分けて 3 年で達成する。1) 応募者の開発した銅触媒反応[Nishikata, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, 56, 11610]により各種非天然型アミノ酸を合成。2) tRNA の 3'末端 OH 基へ非天然型アミノ酸を選択的に導入するために、縮合剤をリンクした酵素様多点配位分子のアミノ酸への修飾と tRNA とアミノ酸との縮合反応の設計。3) 非天然アミノ酸 tRNA による、非天然抗体様タンパク質を創出。

また、本研究を下記実施体制で達成する。研究組織は 2 つの研究グループで構成される。金属触媒での合成を専門とする西形（研究代表者）が開発した手法でアミノ酸を合成し(課題 1)、その tRNA への導入法開発を行う(課題 2)。一方、星田グループ（分担）は非天然アミノ酸で部分的に換装した抗体様タンパク質合成を行う(課題 3)。

4. 研究成果

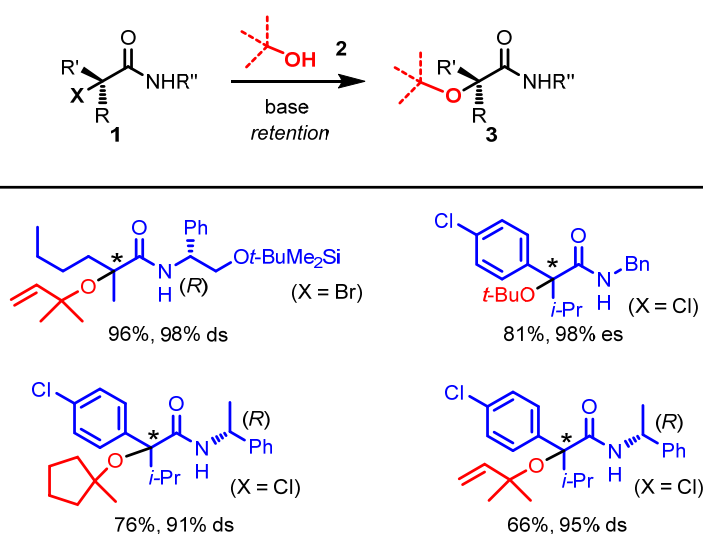
有機合成化学と遺伝子工学的アプローチの 2 通りから報告する。

有機合成化学：

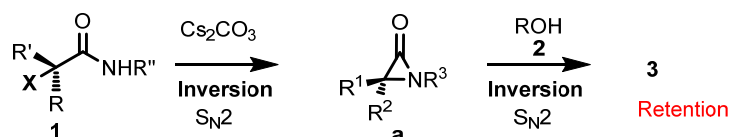
(1) 金属触媒非存在下での非天然アミノ酸合成：非天然アミノ酸の合成法は、以前に銅触媒を大量に用いることで達成していた。しかし、アミノ酸からの金属除去プロセスが今後問題になると考えられたため、金属触媒非存在下での非天然アミノ酸合成プロセスの確認を行った。 α ブロモカルボニル化合物(第三級アルキル源)を炭酸セシウム存在下、及び銅触媒非存在下にアミンとの反応を試みたところ、アセトニトリル中室温にて対応するアミノ化生

成物を確認することができた。アニリンやアルキルアミン類が反応に用いることが可能であるが、アンモニアを直接的に使用するには至っていない。現在のところ反応機構は分かっていないが、単純な S_N1 や S_N2 反応で進行しておらず、何らかの反応プロセスが関わっていると考えられる。本反応の欠点は、 α プロモカルボニル化合物(第三級アルキル源)とアミンとの反応において、アミノ酸を生じる α アミノ化体だけでなく、カルボニル部位にアミノ化したアミド化合物の生成が抑えられない点である。一方、銅触媒の効果も並行して検討を行っており、こちらは第三級炭素上で反応が進行した生成物である α アミノ化体が副生成物を生じずに収率良く得られていた。次に、この反応条件を用いて光学活性プロモカルボニル化合物とアミンとの反応を行った。当初は不斉配位子を用いる不斉アミノ化反応を検討していたがまったく効果が得られないため、立体特異的反応の開発に取り組んだ。その結果、銅触媒または銅の代わりに炭酸セシウムを用いると立体特異的に反応が進行することを見出した。不斉第三級炭素上で立体特異的に反応が進行するという非常に珍しい例である。しかしながら、選択性はよいものの収率の向上や再現性に問題があり、これが今後の課題である。

(2)上記アミノ化反応の開発過程で、エーテル化反応を見出した。アミノ化反応の溶媒検討でアルコールを用いた際に、炭酸セシウム存在下 *tert*-ブチルアルコールとアルファプロモカルボニル(第三級アルキル源)が収率良く反応することを見出した。*tert*-ブチルアルコールが求核剤として第三級アルキルと反応するという非常に珍しい例である。この反応をさらに精査した結果、立体特異的エーテル化反応として論文化することができた[Nishikata, ACIE, 2001](下式)。



反応機構の直接的な証拠は得られていないが、この反応はアジリジノン経路で進行していると考えられる。その理由は、反応で得られた生成物が基質の絶対立体配置を保持していたためである。アジリジノン経路であれば、反転を2回繰り返すことでその立体を保持することができる。



本反応を参考に、今後は光学活性非天然アミノ酸を合成し tRNA への組み込みを目指す。

遺伝子工学：非天然アミノ酸を導入するモデルタンパク質の抗体様タンパク質 Nanobody から、緑色蛍光タンパク質 GFP に結合する遺伝子配列を選び（Nanobody-G1）、酵母で遺伝子全合成した。Nanobody-G1 を可視化するために赤色蛍光タンパク質 RFP と融合して、酵母細胞で発現させるとこの融合タンパク質は細胞質に均一に存在した。そこで Nanobody-G1 と GFP の結合を観察できるように、GFP をミトコンドリアタンパク質 Mdm10 と融合させて局在化させ、結合能を持つ Nanobody-G1 が GFP の共局在として観察できるようにした（図、WT）。これを利用して、Nanobody-G1 遺伝子に種々変異を導入し GFP との結合能の変化を観察した。各アミノ酸残基をアラニンに変えたところ、T29A（下図）のように共局在に影響を与えない変異が多い一方で、I31（図、I31A）, T57, G97, P104 で結合が見られなくなったことから、これらが結合に重要なアミノ酸残基と推定され、結合に重要なアミノ酸残基を特定することができた。これに対して、L33A 変異はより強い局在を示したことから、変異により結合能を強化できることが明らかになった。

続いて、アミノ酸配列が異なる GFP 結合性 Nanobody（Nanobody-G2）を対象として、抗原結合部位のうち CDR1 と CDR2 を構成するアミノ酸残基 23 カ所をアラニンに置換した。先に行った Nanobody-G1 と同じ、31 番目および 57 番目の変異で結合能が低下した。さらに別のタンパク質に結合能を示す Nanobod-P1 を合成し、抗原タンパク質ともに、異なる蛍光タンパク質と融合して発現させたところ、細胞内で蛍光タンパク質の共局在が観察されたことから、抗原 - 抗体反応が生じていることが示された。そこで、この Nanobody-P1 でも変異解析を行ったところ、56 番目の変異で結合能が低下した。この変異は Nanobody-G1, G2 の変異解析で見られた 57 番目のアミノ酸残基と非常に近い位置にあることから、この位置のアミノ酸残基が、普遍的に結合に重要性であることが示唆され、これらのアミノ酸残基が、非天然アミノ酸に変換するターゲット位置となることが明らかになった。

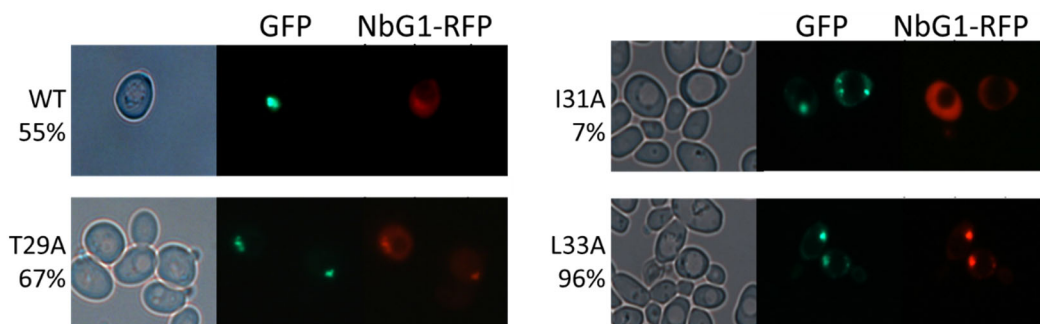


図 酵母細胞内での蛍光タンパク質を指標とした Nanobody 結合解析

野生型（WT）及び変異体の名称の下の数値は共局在を示した細胞の割合を示している。
GFP:Mdm10-GFP 融合タンパク質、NbG1-RFP:Nanobody-G1-RFP 融合タンパク質

まとめ

以上、本研究では光学活性非天然アミノ酸を合成するための知見として、炭酸セシウム存在下アミンとアルファプロモカルボニルの反応系を発見した。また、種々の結合能を精査したところ 57 番目のアミノ酸残基が、非天然アミノ酸に変換するターゲット位置となることが明らかになった。この知見を活かし、光学活性アミノ酸を合成し、それを tRNA に組み込んでいく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Murata Yumi, Takeuchi Kentaro, Nishikata Takashi | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 The synthetic protocol for α -bromocarbonyl compounds via brominations | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Tetrahedron | 6. 最初と最後の頁 2726-2736 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2019.03.048 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Hirata Goki, Takeuchi Kentarou, Shimoharai Yusuke, Sumimoto Michinori, Kaizawa Hazuki, Nokami Toshiki, Koike Takashi, Abe Manabu, Shirakawa Eiji, Nishikata Takashi | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Chemistry of Tertiary Carbon Center in the Formation of Congested C-O Ether Bonds | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition | 6. 最初と最後の頁 4329 ~ 4334 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202010697 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 島田 泰成、下拂 優介、竹内 健太郎、平田剛輝、西形孝司 |
| 2. 発表標題 2 - プロモカルボニル化合物とプロパルギルアルコール類によるヒドロアミノ化制御反応の開発 |
| 3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 竹内健太郎、下拂優介、平田剛輝、西形孝司 |
| 2. 発表標題 第三級炭素上で進行する求核反応の立体化学 |
| 3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takashi Nishikata |
| 2. 発表標題 The transformations of α -bromocarbonyls |
| 3. 学会等名 PSRC-9 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西形孝司 |
| 2. 発表標題 第三級炭素上での反応化学：立体障害に打ち勝つ多彩な合成方法論 |
| 3. 学会等名 第31回若手研究者のためのセミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 幸崎新悟, 星田尚司, 赤田倫治 |
| 2. 発表標題 抗体様分子の酵母細胞内における抗原抗体反応解析系の構築 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第51回講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹内 健太郎・下拂 優介・西形 孝司 |
| 2. 発表標題 2-プロモカルボキシアミドとアルコール類の反応による立体的に混み入ったエーテル類の合成とその反応機構解析 |
| 3. 学会等名 日本化学会春季年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|--|---|----|
| 研究 分担 者 | 星田 尚司 (Hoshida Hisashi) (00314823) | 山口大学・大学院創成科学研究科・教授 (15501) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|