

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2014
 課題番号：25810104
 研究課題名(和文) リガンド連結型一電子酸化触媒による標的タンパク質選択的ケミカルラベリング法の開発

研究課題名(英文) Ligand-Directed Selective Protein Modification Based on Local Single-Electron-Transfer Catalysis

研究代表者
 佐藤 伸一 (Sato, Shinichi)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：20633134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の分子修飾は生命科学の研究において有用な手法であるにもかかわらず、現在汎用されている手法は求電子的修飾剤との共有結合形成反応に限られ、求電子的な反応以外の方法で天然のアミノ酸残基と特異的に効率良く変換を起こす反応の開発は挑戦的な課題である。
 Ru(bpy)₃錯体を用いた一電子移動型の反応により、芳香族アミノ酸チロシン残基に対する修飾法を開発した。生体内環境への調和性の高いRu(bpy)₃触媒の特徴を活かし、標的タンパク質の親和性リガンドとRu(bpy)₃触媒の共役した分子を用いることで、タンパク質の混在系や細胞内環境での標的タンパク質の選択的ラベル化反応に応用できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The chemical modification of proteins with synthetic probes is an important technique in chemical biology, protein-based therapy, and material science. It is an essential tool for the development of antibody-drug conjugates and protein-based drug delivery agents. Furthermore, The target-protein-selective chemical modification with small-molecule probes has received much interest as a powerful method for the study of individual proteins in their native environments.
 We developed tyrosine-selective bioconjugation reaction using single-electron-transfer (SET) reaction. We found tyrosine modification reaction using a Ru(bpy)₃ photocatalyst as a SET catalyst.
 N'-acetyl-N,N-dimethyl-1,4-phenylenediamine was found to be a suitable tyrosine modifier under the reaction condition with Ru(bpy)₃ and visible light irradiation even in mild pH conditions (pH 6.0-7.4). The target-selective protein modification was achieved using a ligand-conjugated Ru(bpy)₃.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質化学修飾 ケミカルラベリング チロシン残基修飾 タンパク質機能化 標的タンパク質
 光触媒 Ru(bpy)₃ 一電子移動反応

1. 研究開始当初の背景

従来のタンパク質化学修飾のほとんどは求電子的な試薬を使って、主にシステイン残基、リシン残基といった求核性アミノ酸残基との間に共有結合を形成するものであった。それ以外の方法で天然のアミノ酸残基と特異的に効率の良い変換を起こす有機化学反応を開発することは挑戦的な課題であった。このような背景の中、申請者らは、一電子酸化的手法を用いて、芳香族アミノ酸残基の一つであるチロシン残基の実用的な修飾法を開発すべく研究に着手した。

2. 研究の目的

ペプチドやタンパク質構造中のチロシン残基と特異的な結合形成を可能にする化学修飾法を開発を目標とした。

研究の進行の上で、ルテニウム光触媒を用いた生体環境調和性の高い、温和な条件でもチロシン残基の修飾が可能であるという知見が得られた。よって、次のステップの目標として、タンパク質混在系の中においても、標的のタンパク質のチロシン残基を選択的に修飾することを目指した。

3. 研究の方法

初めに様々な一電子酸化剤とチロシン修飾剤に成り得る化合物のスクリーニングをペプチド/MADLI-TOF-MSを用いた実験系により行った。チロシン修飾反応として得られた、ルテニウム光触媒を用いた反応条件を最適化、反応メカニズムの推定実験を行った。

また、特定のタンパク質の親和性リガンドとルテニウム触媒を連結させた分子や、検出可能な修飾剤をデザインし、有機合成化学の手法により合成した。これらの触媒分子・修飾剤を用いて、タンパク質混在系や細胞内の環境における標的のタンパク質の化学修飾(ラベル化)の選択性を検証した。

4. 研究成果

ルテニウム光触媒($\text{Ru}(\text{bpy})_3$)を用いた可視光刺激の温和な反応条件において、ペプチド、タンパク質のチロシン残基が効率的に修飾されることが明らかとなった。

また、タンパク質親和性リガンド連結型のルテニウム触媒はマウスの赤血球ライセートや細胞内といった複雑なタンパク質混在

系においても標的のタンパク質(炭酸脱水素酵素、上皮成長因子受容体)を選択的にラベル化することを明らかにした。

さらに、リガンド連結型の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 触媒が標的タンパク質選択な酸化的機能失活(ノックダウン)を誘導することに着目した。その結果、特定の条件ではタンパク質のノックダウンを誘導し、また別の条件においては、ラベル化を選択的に誘導した。すなわち、「タンパク質のノックダウンとラベル化の制御」を一つの触媒で達成することに成功した。

一方で、一電子酸化剤と修飾剤構造をチューニングした結果として、ルテニウム光触媒とは別に、特定の鉄触媒を用いたチロシン残基選択的な修飾法を見出すに至っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Shinich Sato., Kohei Morita., Hiroyuki Nakamura. Regulation of Target Protein Knockdown and Labeling Using Ligand-Directed $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ Photocatalyst. *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 250-256. (査読有)
- (2) Shinich Sato., Hiroyuki Nakamura. Ligand-directed Selective Protein Modification Based on Local Single Electron Transfer Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 8681-8684. (査読有)

[学会発表](計 14 件)

- (1) 佐藤伸一、森田耕平、中村浩之、リガンド連結型 Ru 光触媒を用いたタンパク質ノックダウンとラベル化の制御、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 ~ 28 日(神戸学院大学、兵庫医療大学、神戸)
- (2) 中村公亮、佐藤伸一、中村浩之、ルミノール誘導体を用いた鉄触媒存在下での Tyr 残基特異的タンパク質ラベル化反応、日本化学会第 95 春季年

- 会、2015年3月26~29日(日本大学、船橋)
- (3) 佐藤伸一、中村浩之、標的タンパク質のラベル化を指向した一電子酸化的チロシン残基修飾反応の開発、第68回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2014年11月29~30日(新潟大学、新潟)
- (4) Shinich Sato., Hiroyuki Nakamura. Target-selective Protein Modification Based on Local Environmental Single Electron Transfer Catalysis, *18th Malaysian International Chemical Congress*, (招待講演) November 3-5, 2014 (Kuala Lumpur, Malaysia)
- (5) 佐藤伸一、一電子酸化触媒を用いたタンパク質のチロシン残基修飾法開発と応用、第1回資源研フォーラム、2014年10月21~22日(東京工業大学、東京都目黒区)
- (6) Hiroyuki Nakamura., Shinich Sato. Target-selective Protein Modification Using Ligand-conjugated Ru(bpy)₃ Catalyst, *XXVI International Congress of Organometallic Chemistry*, July 13-18, 2014 (Sapporo, Hokkaido)
- (7) 佐藤伸一、森田耕平、中村浩之、リガンド連結型 Ru(bpy)₃ 触媒を用いた標的選択的タンパク質光分解とラベル化反応の制御、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014年6月11~13日(大阪大学、大阪)
- (8) 中村公亮、佐藤伸一、中村浩之、Luminol 誘導体を用いた鉄触媒存在下での Tyr 残基高選択的ラベル化反応、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014年6月11~13日(大阪大学、大阪)
- (9) 佐藤伸一、中村浩之、光触媒を利用した生体内標的タンパク質ラベル化法の開発、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー~分子標的と活性制御~」第6回公開シンポジウム、2014年5月28~29日(名古屋大学、名古屋)
- (10) 佐藤伸一、中村浩之、一電子酸化反応に基づくチロシン残基修飾法の開発と標的タンパク質選択的ラベル化法への応用、日本薬学会第134年会、2014年3月27~30日(熊本大学、熊本)
- (11) Shinich Sato., Hiroyuki Nakamura. Target-selective Protein Labeling Based on Local Single Electron Transfer Catalysis, *The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity*, October 28-29, 2013 (Pacifico Yokohama, Kanagawa)
- (12) Shinich Sato., Hiroyuki Nakamura. Ligand-directed Selective Protein Modification Based on Local Environmental Single Electron Transfer Catalysis, *International Chemical Biology Society 2nd Annual Conference ICBS2013*, October 7-9, 2013 (Shirankaikan, Kyoto)
- (13) 佐藤伸一、中村浩之、標的指向性 Ru(bpy)₃ 錯体をもちいた局所環境での一電子酸化反応の制御と標的タンパク質選択的ラベル化法への応用、第60回有機金属討論会、2013年9月12~14日(学習院大学、東京都豊島区)
- (14) 佐藤伸一、中村浩之、局所環境での一電子酸化反応を利用した標的タンパク質選択的ラベル化法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会 2013年6月19~21日(東京医科歯科大学、東京都文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：チロシンの修飾方法
発明者：佐藤伸一、中村浩之、
権利者：国立大学法人東京工業大学
種類：特許願
番号：特願 2014-246487
出願年月日：2014 年 12 月 5 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://syn.res.titech.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 伸一（SATO SHINICHI）
東京工業大学・資源化学研究所・助教
研究者番号：20633134

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし