

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790012

研究課題名（和文） 蛋白質の高効率的精製・ラベル化を可能とする Recapturable リンカーの開発

研究課題名（英文） Development of a recapturable linker that enables isolation and labeling of target proteins

研究代表者

重永 章（SHIGENAGA AKIRA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10423394

研究成果の概要（和文）：プロテオミクス分野における重要な基盤技術として、プロテオームからの標的蛋白質の精製およびその選択的ラベル化技術が挙げられる。そこで本研究では、標的蛋白質の精製および選択的ラベル化を可能とする Recapturable リンカーの開発を目的とした。この結果、Recapturable リンカーの合成に成功するとともに、本リンカーの標的蛋白質モデル化合物への導入およびその選択的ラベル化を達成した。

研究成果の概要（英文）：In the field of proteomics, methodology of isolation followed by selective labeling of target proteins is indispensable. Therefore, we decided to develop a “Recapturable Linker” that enables isolation and selective labeling of the target proteins. As a result, the “Recapturable Linker” was synthesized and it was successfully applied to selective labeling of a model peptide of the target protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：アビジン、蛋白質精製、蛋白質ラベル化、ビオチン、プルダウン、ペプチド、ペプチド結合切断、有機合成化学

1. 研究開始当初の背景

プロテオミクス分野における最も重要な基盤技術の一つとして、プロテオームからの標的蛋白質の精製技術が挙げられる。従来の精製法が標的蛋白質の“量”を指標としてきたのに対し、近年、標的タンパク質の“活性”を指標とした手法が注目されている。その一つとして、Activity Based Protein Profiling (ABPP) を利用した方法が挙げられる。この方法ではまず、標的蛋白質の活性中心と共有

結合を形成する阻害剤（標的蛋白質結合部位）にアルキンを導入した小分子を、プロテオームへ添加する。すると、プロテオーム中の標的蛋白質のうち、活性型のもののみが標的蛋白質結合部位と結合し、アルキニル化蛋白質となる。その後、アルキン部分へクリックケミストリーによりビオチン部位を導入し、標的蛋白質をアビジンカラムにより精製するという方法である。

アビジンカラムによる精製において、ビオ

チン-アビジン間の結合は強固であるため、一般的にアビジンカラムからのビオチン修飾蛋白質の回収効率は低い。さらに溶出効率向上のため過酷な条件を用いると、精製後の標的蛋白質に非特異的吸着由来の蛋白質が混入することが知られている。このため、標的蛋白質を高効率に回収しつつ、かつカラム溶出液中の標的蛋白質のみをラベル化することは困難を極める。この問題点を克服するため、cleavable リンカーの開発が盛んに行われてきた。Cleavable リンカーとは特定の条件下において切断可能なリンカーのことであり、これを標的蛋白質結合部位とビオチンの間へ導入し、アビジンカラム後にこの部分を切断することにより高効率に蛋白質を回収する。これまで種々の cleavable リンカーが開発されているものの、これらの多くは切断反応に酵素や pH 変化、チオールなどの求核剤処理を利用するため、その生理的条件下での安定性に疑問があった。

2. 研究の目的

本研究では、生理的条件下では切断されず、さらに切断後に生じる官能基を足がかりとした標的蛋白質のみの選択的修飾を可能とするリンカー、すなわち Recapturable リンカーの開発と、これを用いた標的タンパク質の高効率の精製・ラベル化法の確立を目指すこととした。申請者はこれまで、刺激応答型アミノ酸、すなわち任意の刺激に応答してペプチド結合切断を誘起するアミノ酸の開発を行ってきた。この系では、任意の刺激によるフェノール性水酸基上保護基 (PG) の除去をトリガーとしてペプチド結合が切断される。本研究では生理的条件下では除去困難な保護基として、フッ素アニオンにより除去可能な保護基を PG 部分へ導入した刺激応答型アミノ酸を開発し、これを基盤とした Recapturable リンカーの開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究は、以下の計画 A~F に従って順次遂行することとした。

A 光学活性アミノ酸前駆体の不斉合成：Recapturable リンカーの中心骨格となるフッ素アニオン応答型アミノ酸前駆体について、有機触媒を用いた不斉合成を行う。

B フッ素アニオン応答型アミノ酸の合成：A より得られる光学活性アミノ酸前駆体をもとに、フッ素アニオン応答型アミノ酸を合成する。

C フッ素アニオン応答能の検討：B より得られるアミノ酸誘導体のフッ素アニオン応答能について検討する。

D Recapturable リンカー誘導体の合成：N 末端にビオチンを、C 末端にアジドを有する Recapturable リンカー誘導体の合成を行う。

E 小分子アルキンをを用いたモデル実験：Recapturable リンカー誘導体のアルキンとの反応、フッ素アニオン処理によるリンカーの切断、切断成績体のアルデヒドによる選択的ラベル化の各反応条件について、小分子アルキンをを用いた最適化を行う。

F 精製蛋白質を用いたモデル実験：精製したアルキニル化蛋白質を用いて E 同様の実験を行い、さらなる反応条件の最適化を図る。さらに、アビジンカラムを用いた濃縮・回収についても検討を行う。

4. 研究成果

研究期間内に、「2. 研究の目的」に示す A~E に成功した。以上の結果を基に現在、「F：精製蛋白質を用いたモデル実験」について検討するとともに、これら成果をまとめた論文の投稿準備を進めているところである。なお成果の詳細については、「5. 主な発表論文等」をご覧いただきたい。

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 20 件)

1. Ogura, K.; Shigenaga, A.; Ebisuno, K.; Hirakawa, H.; Otaka, A. "Fmoc-based solid phase synthesis of adenylylated peptides using diester-type adenylylated amino acid derivatives" *Tetrahedron Lett.* in press (査読有). DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.04.063.
2. Shigenaga, A.; Ogura, K.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ebisuno, K.; Miyamoto, L.; Ishizawa, K.; Tsuchiya, K.; Otaka, A. "Development of a reduction-responsive amino acid that induces peptide bond cleavage in hypoxic cells" *ChemBioChem* **2012**, *13*, 968-971 (査読有). DOI: 10.1002/cbic.201200141.
3. Shigenaga, A.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ogura, K.; Denda, M.; Yamaguchi, K.; Otaka, A. "Caged ceramide which releases parent ceramide after UV-induced amide bond cleavage followed by intramolecular O-N acyl transfer" *Peptide Science* **2011** **2012**, 385-386 (査読有).
4. Ding, H.; Sato, K.; Morishita, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Double-kinetically controlled proline ligation" *Peptide Science* **2011** **2012**, 133-134 (査読有).
5. Sato, K.; Tsuda, S.; Sakamoto, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "N-Sulfanyl-

- ethylamide peptide: a peptide thioester equivalent which can directly participate in native chemical ligation" *Peptide Science 2011* **2012**, 13-14 (査読有).
6. Shigenaga, A.; Morishita, K.; Yamaguchi, K.; Ding, H.; Ebisuno, K.; Sato, K.; Yamamoto, J.; Akaji, K.; Otaka, A. "Development of UV-responsive catch-and-release system of a cysteine protease model peptide" *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8879-8886 (査読有). DOI: 10.1016/j.tet.2011.09.062.
 7. Shigenaga, A.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ogura, K.; Denda, M.; Yamaguchi, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. "Design and synthesis of caged ceramide: UV-responsive ceramide releasing system based on UV-induced amide bond cleavage followed by *O-N* acyl transfer" *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3984-3990 (査読有). DOI: 10.1016/j.tet.2011.04.048.
 8. Ding, H.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Morishita, K.; Otaka, A. "Dual kinetically-controlled native chemical ligation using a combination of sulfanylproline and sulfanyl-ethylamide peptide" *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5588-5591 (査読有). DOI: 10.1021/ol202316v.
 9. Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Tsuda, S.; Sumikawa, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. "*N*-Sulfanylethylamide peptide as a crypto-thioester peptide" *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1840-1844 (査読有). DOI: 10.1002/cbic.201100241.
 10. Tsuji, K.; Shigenaga, A.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Sato, K.; Aihara, K.; Hara, T.; Otaka, A. "Application of N-C- or C-N-directed sequential native chemical ligation to the preparation of CXCL14 analogs and their biological evaluation" *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4014-4020 (査読有). DOI: 10.1016/j.bmc.2011.05.018.
 11. Sato, K.; Tsuda, S.; Tsuji, K.; Sakamoto, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "*N*-Sulfanylethylamide derivative as a peptide thioester equivalent" *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium* **2011**, 72-73 (査読有).
 12. Tsuji, K.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Shigenaga, A.; Hara, T.; Otaka, A. "Synthesis of CXCL14 and its derivatives utilizing C to N or N to C directive sequential NCL protocol" *Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium* **2011**, 74-75 (査読有).
 13. Otaka, A.; Shigenaga, A. "Development of amide bond cleavage device with application to chemical biology use" *Peptide Science 2010* **2011**, 49 (査読有).
 14. Tsuji, K.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Shigenaga, A.; Hara, T.; Otaka, A. "Synthesis and biological evaluation of CXCL14 and its derivatives" *Peptide Science 2010* **2011**, 182 (査読有).
 15. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Nishioka, N.; Denda, M.; Otaka, A. "Enantioselective synthesis of stimulus-responsive amino acid via pyrrolidinyl tetrazole catalyzed asymmetric α -amination of aldehyde" *Peptide Science 2010* **2011**, 202 (査読有).
 16. Sato, K.; Tsuda, S.; Maeda, N.; Denda, M.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Native chemical ligation using *N*-peptidyl anilide as crypto-thioester" *Peptide Science 2010* **2011**, 203 (査読有).
 17. Ogura, K.; Hirakawa, H.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Synthesis of nonhydrolyzable AMPylated amino acid analogues for uncovering the physiological role of AMPylation" *Peptide Science 2010* **2011**, 205 (査読有).
 18. Yamamoto, J.; Maeda, N.; Denda, M.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Development of recapturable cleavable linker for efficient enrichment and specific labeling of target proteins" *Peptide Science 2010* **2011**, 232 (査読有).
 19. Morishita, K.; Yamaguchi, K.; Ding, H.; Shigenaga, A.; Akaji, K.; Otaka, A. "Development of stimulus responsive thiol releasing system for controlling activity of cysteine protease" *Peptide Science 2010* **2011**, 290 (査読有).
 20. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Nishioka, N.; Otaka, A. "Enantioselective synthesis of stimulus-responsive amino acid via asymmetric α -amination of aldehyde" *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7367-7372 (査読有). DOI: 10.1016/j.tet.2010.07.033.
- [学会発表] (計 59 件)
1. 重永 章「刺激応答型アミノ酸の開発とケミカルバイオロジー分野への展開」第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (高松)、2011 年 11 月 13 日
 2. 重永 章「“化学”でペプチド・タンパク質を操る -神経変性疾患治療を目指して-」日本の薬学、四国の薬学部 (徳島)、2010 年 6 月 12 日
- [図書] (計 2 件)
1. 重永 章、山本 純、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への応用」遺伝子医学 MOOK 21 号 最新

ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (木曾良明 編)、メディカルドゥ、168-172、**2012**.

2. 大高 章、重永 章「第10章 最近のペプチド・タンパク質の化学合成について」機能性タンパク質・ペプチドの生体利用 (岡達三、二川健、奥恒行 編)、建帛社、205-231、**2010**.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/otaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重永 章 (SHIGENAGA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

研究者番号：10423394