

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12742

研究課題名（和文）固相表面上の局所環境反応制御による抗体の部位特異的修飾

研究課題名（英文）Site Specific Antibody Modification Using Catalyst-Functionalized Affinity Beads

研究代表者

佐藤 伸一（Sato, Shinichi）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：20633134

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：我々が独自に開発したRu光触媒を用いたタンパク質修飾技術は触媒の周辺数nmという限定された空間で選択的に反応が進行する。Ru / dcbpy錯体と標的タンパク質に対するリガンド分子の2種類の低分子構造をビーズに担持させることで、タンパク質の非特異的吸着を抑制しつつ、リガンド結合タンパク質を精製すると同時に、共有結合形成による化学修飾を達成した。また、タンパク質混在系からリガンド結合タンパク質を高感度に検出する技術、従来のアフィニティークロマトグラフィー法では解析が困難な低親和性のリガンド結合タンパク質を解析する手法、抗体を精製して機能化する手法を見出した。

研究成果の概要（英文）：We developed the protein modification technique which take place in the proximity of a few nanometers around the ruthenium photocatalyst. The two types of small molecules, the Ru / dcbpy complex and the ligand molecule of the target protein, were modified on the beads. This ruthenium photocatalyst-functionalized affinity beads enable the target selective purification from protein mixture and chemical labeling simultaneously without significant non-specific binding proteins to the beads. In addition, (1) the high sensitive detection of ligand binding protein with chemical labeling, (2) the detection of low affinity ligand binding protein that is difficult to be detected by conventional affinity chromatography method, (3) antibody purification and chemical labeling were achieved.

研究分野：化学生物学、有機化学、創薬化学

キーワード：触媒的タンパク質修飾 ラジカル反応 アフィニティー精製 タンパク質機能化 Ru光触媒 抗体化学修飾

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の化学的分子修飾(ケミカルラベリング)による機能付加は既に存在する天然型のタンパク質を修飾する手法であり、遺伝子改変を介して人工的に新たにタンパク質を発現させる分子生物学的手法とは一線を画す。機能性タンパク質、特に抗体のラベリングは、検出タグ導入、固相担持といった生物学研究における有用なツールを提供するだけでなく、代謝安定化、殺細胞性などの機能付与は、近年急激な成長を遂げているバイオ医薬においても重要な研究課題である。抗体ケミカルラベリングの足場として使用できるのは、求核性アミノ酸残基のリジン(Lys)残基、システイン(Cys)残基の2種類にほぼ限られるのが現状であった。反応部位制御の観点では、存在比の多いLys残基は標的にされにくく、主に抗体構造上のジスルフィド結合の部分的還元が用いられるが、反応制御が困難で多くの問題点が指摘されていた。

一方、我々はRu(ルテニウム)光触媒を一電子酸化触媒として用いたラジカル的な反応に着目し、芳香族アミノ酸残基の一つであるチロシン(Tyr)残基を標的としたラベル化反応の開発に成功していた。

2. 研究の目的

本ラベリング技術は触媒の近傍だけでラベル化反応を制御できるため、触媒を標的部位選択的に近接させることができれば、抗体の狙った部位でのケミカルラベリングができると着想した。そこで、以下のような目的を通じ、抗体をはじめとする機能性タンパク質の部位特異的修飾を可能にする固相表面上でのタンパク質ケミカルラベリングの反応場の構築を目指した。

- (1) 効率的なケミカルラベリングを誘導する固相表面の反応場開発
- (2) 固相表面の反応場でのタンパク質精製とケミカルラベリング
- (3) 抗体分子への応用

3. 研究の方法

(1) 効率的なケミカルラベリングを誘導する固相表面の反応場開発
磁気分離可能で用意に回収可能な磁気ビーズを担体として選択した。我々が開発したラジカルなタンパク質チロシン残基修飾反応はRu光触媒のごく近傍でのみ選択的に進行することが予想されていたので、リガンド分子と触媒分子の分子間距離を考慮しつつ反応場をデザインし、磁気ビーズ上にリガントと触媒を担持した。概念実証の標的タンパク質として、比較的強い親和性リガンドが入手容易な炭酸脱水酵素(Carbonic Anhydrase, CA)と、磁気ビーズでの精製法が確立されているジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)を

選択した。

(2) 固相表面の反応場でのタンパク質精製とケミカルラベリング

CAとDHFRに対して、それぞれをタンパク質混在系から精製しつつケミカルラベリングを行った。ケミカルラベリングによってさまざまな機能を導入できるが、ここでは、ビオチンでラベル化することを計画した。ビオチン化されたタンパク質はStreptavidin-horseradish peroxidase(SAv-HRP)によって高感度に可視化できるため、従来の銀染色の感度(~数ng)より10~100倍高感度にビーズからの精製タンパク質を検出することが可能な手法に成ると考えた。

また、研究期間の他の研究課題の成果により、ラベル化剤毎に触媒からのラベル化有効範囲が異なるという知見を得た。そこから、反応場のデザイン以外にも、ラベル化剤の構造チューニングによるラベル化剤ラジカルの特性を制御し、反応場に適切なラベル化有効距離、ラベル化効率を有するラベル化剤を得ることが重要であると考え、ビーズ上の結合タンパク質をケミカルラベリングするために最適な反応場とラベル化剤の組み合わせを探索した。

(3) 抗体分子への応用

上記のタンパク質混在系から、標的を精製し、ケミカルラベリングにより機能化するという概念を抗体修飾に応用した。抗体の部位選択的なりガンド分子とRu光触媒を連結させた反応場を構築し、適切なラベル化剤によるラベル化を行うことで、抗体を精製・機能化した。

4. 研究成果

初めに、FGビーズを担体として用いて、CAを標的としてタンパク質混在系からCAを精製しつつ、ケミカルラベリングすることを目指した。Ru(bpy)₃錯体2をCAのリガンド分子1と同時にビーズに担持したところ、2に由来する非特異的なタンパク質吸着が観測された。Ru錯体による2+の正電荷が非特異的吸着の原因であると考え、Ru錯体とビーズのリンカーに長鎖のPEGを導入した錯体3や錯体内で電荷を中和した4を合成した。それぞれのRu錯体とCAリガンドを同時に担持したビーズを用いてCAの精製を検討した。その結果、4を用いた時に、目立ったタンパク質非特異的吸着を誘導する事無く、CAを精製することに成功した(図1)。

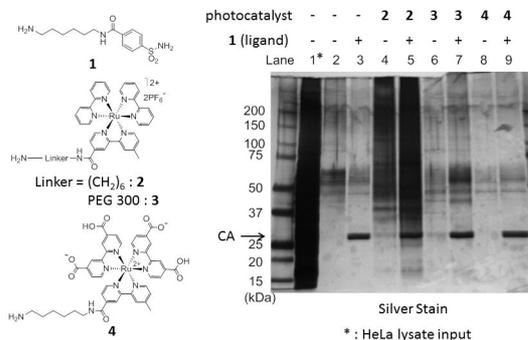
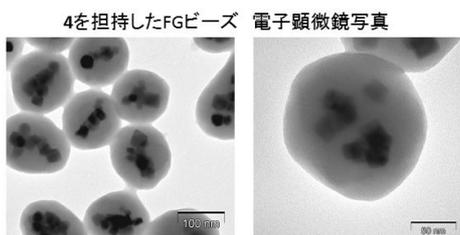


図 1

2, 3, 4 をそれぞれ担持したビーズの特性を評価したところ、ビーズの表面電荷の + 性は 4 を用いた時に抑制されており、この特性が非特異的吸着を抑制できた要因であると示唆された (表 1)。

表 1

Ru photocatalyst	Diameter [nm]	Zeta-potential [mV]
-	261.7	+ 14.2
2	272.9	+ 29.1
3	357.9	+ 23.9
4	262.8	+ 9.42



また、4 と CA リガンドを担持したビーズはタンパク質混在系から CA を精製しつつ、ケミカルラベリングを行うことが可能であった。さらに、磁気回収の容易さを利用して、ビーズは効率良く回収でき、タンパク質精製機能とケミカルラベリングの触媒機能は繰り返しの使用も可能であった (図 2)。

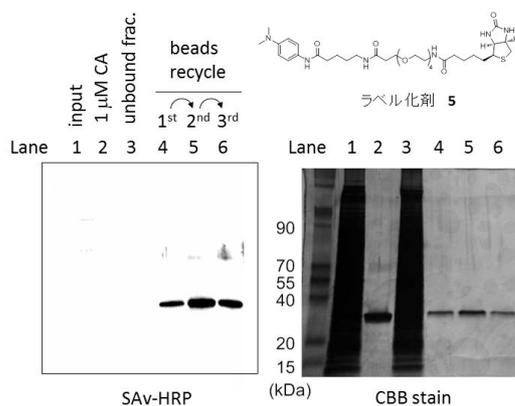


図 2

次に、リガンド分子を DHFR に結合することが知られている MTX 誘導体 6 に変え、細胞に内在する DHFR を精製しつつ、機能化した。ラベル化剤 5 によりビオチンを DHFR に結合させることが出来るため、SAV-HRP を用いた検出法により、通常のアフィニティークロマトグラフィーに用いられる銀染色よりも高感度なビーズ結合タンパク質の検出が可能であった。実際に、低濃度の細胞破碎液から DHFR を精製して検出する用途においても、銀染色では検出できないような微量のビーズ結合タンパク質も解析することが可能であった (図 3)。

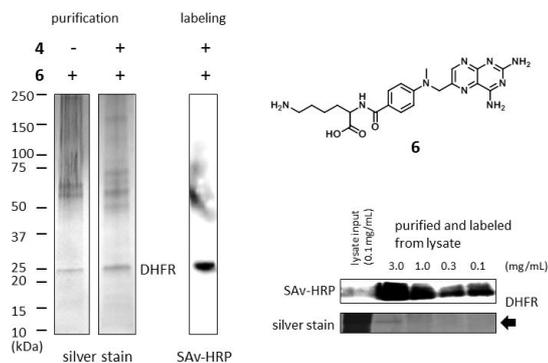


図 3

また、通常のアフィニティークロマトグラフィーで精製できるタンパク質は一般的に K_d 値 $< 10^{-6}$ M オーダーの結合力を持つものに適用範囲が限られる。弱い結合力のタンパク質はビーズの洗浄操作の過程でリガンドから解離し、解析困難な量まで減少してしまうことが原因である。上記の手法では精製操作後にタンパク質のラベル化を行うものであるが、本手法はタンパク質のケミカルラベリング段階を、洗浄操作を介さずに行うことも可能である。そこで、従来のアフィニティークロマトグラフィーでは解析できないような弱い結合力のタンパク質の解析に本手法を適用した。

ラベル化剤の構造を検討した結果、特定の構造を持つラベル化剤が触媒のごく近傍、すなわちビーズ表面の制限された反応場でのみ効果的にケミカルラベリングを誘導することを見出した。これを用いて、細胞に内在する 10^{-4} M オーダーの弱い結合力のリガンド結合タンパク質を解析することにも成功した。

最後に、抗体の捕捉分子に抗体 Fc 領域に結合するリガンド分子を用いて、本手法を抗体の精製と機能化に応用した。抗体を精製しつつ、ビーズ表面の限られた反応空間でタンパク質ケミカルラベリングすることで、抗体を部位選択的に機能化することに成功した。

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 4 件)

Shinichi Sato, Kosuke Nakamura, Hiroyuki Nakamura, Tyrosine-Specific Chemical Modification with in situ Hemin-Activated Luminol Derivatives, ACS Chem. Biol., 2015, 10, 2633-2640 (査読有).

Shinichi Sato, Kosuke Nakamura, Hiroyuki Nakamura, HorseRadish-Peroxidase-Catalyzed Tyrosine Click Reaction, ChemBioChem, 2017, 18, 475-478 (査読有).

Shinichi Sato, Michihiko Tsushima, Hiroyuki Nakamura, Selective Purification and Chemical Labeling of Target Protein on Ruthenium Photocatalyst-Immobilized Affinity Beads, Chem. Commun., 2017, 53, 4838-4841 (査読有).

Shinichi Sato, Michihiko Tsushima, Kensuke Hatano, Hiroyuki Nakamura, Development and Application of Catalytic Tyrosine Modification, Yakugaku Zasshi, 2018, 138, 39-46 (査読有).

[学会発表](計 29 件)

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(横浜国立大学、神奈川) 2015年5月16日

佐藤伸一、中村公亮、中村浩之、ルミノール誘導体を用いたチロシン残基に選択的な共有結合形成反応の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会(東北大学、宮城) 2015年6月10日~2015年6月12日

S. Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, Heme-Catalyzed Click Reaction with Luminol Derivatives, 1st Asian Conference on Chemosensor & Imaging Probes (Seoul, Korea) 2015年11月16日~2015年11月18日

S.Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, Tyrosine-selective chemical modification using single-electron-transfer catalyst, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015)(Honolulu, USA) 2015年12月15日~2015年12月20日

S.Sato, K. Nakamura, H. Nakamura, Heme-Catalyzed Tyrosine Click Reaction, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Science (大阪) 2016年1月20日~2016年1月22日

佐藤伸一、中村公亮、中村浩之、ルミノール誘導体を用いたチロシン残基選択的な化学修飾法開発、日本化学会第96回年会(同志社大学、京都) 2016年3月24日~2016年3月27日

羽田野兼資、佐藤伸一、中村浩之、光触媒を用いた Tyr 残基修飾反応における一電子移動範囲の解明、日本化学会第96回年会(同志社大学、京都) 2016年3月24日~2016年3月27日

佐藤伸一、中村公亮、中野洋文、中村浩之、チロシン残基選択的な化学修飾法を用いたチロシンホスファターゼ活性スクリーニング法の開発、日本化学会第96回年会(同志社大学、京都) 2016年3月24日~2016年3月27日

對馬理彦、佐藤伸一、中村浩之、ビーズ固相表面における一電子酸化的なタンパク質修飾法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会(京都) 2016年6月15日~2016年6月17日

佐藤伸一、タンパク質チロシン残基の触媒的修飾法の開発、理研シンポジウム第11回有機合成化学のフロンティア(理化学研究所、埼玉) 2016年6月24日

M. Tsushima, S. Sato, H. Nakamura, Target-Selective Protein-Modification using Ru(bpy)₃ Catalyst Immobilized on Affinity Beads, 10th Workshop of Organic Chemistry for Junior Chemists (WPCJC10)(台湾)、2017年1月6日~2017年1月9日

佐藤伸一、タンパク質の触媒的修飾法の開発と応用、徳島大学薬学部第3回 BRIGHT symposium(徳島大学、徳島) 2017年3月7日

對馬理彦、佐藤伸一、中村浩之、アフィニティービーズ上における標的選択的なタンパク質機能化法の開発、日本化学会第97回年会(慶応大学、東京) 2017年3月16日~2017年3月19日

佐藤伸一、對馬理彦、中村公亮、中村浩之、触媒的チロシン残基修飾法の応用、日本薬学会第137年会(東北大学、宮城) 2017年3月24日~2017年3月27日

對馬理彦、佐藤伸一、中村浩之、Ru 光触媒固定化アフィニティービーズを用いた標的選択的なタンパク質修飾法の開発、第 73 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(学習院大学、東京) 2017 年 5 月 20 日

佐藤伸一、羽田野兼資、對馬理彦、中村浩之、修飾剤のラジカル寿命制御に基づく触媒的タンパク質ラベル化の反応場制御(北海道大学、北海道) 2017 年 6 月 7 日~2017 年 6 月 9 日

對馬理彦、佐藤伸一、中村浩之、タンパク質の精製と機能化を同時に可能とする Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズの開発(北海道大学、北海道) 2017 年 6 月 7 日~2017 年 6 月 9 日

佐藤伸一、タンパク質チロシン残基の触媒的ラベル化法の開発、有機合成化学協会平成 29 年度若手研究者のためのセミナー(東京) 2017 年 7 月 8 日

佐藤伸一、對馬理彦、羽田野兼資、中村浩之、触媒的タンパク質ラベル化法の開発と応用、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム(東京大学、東京) 2017 年 9 月 7 日~2017 年 9 月 9 日

松村雅喜、佐藤伸一、中村浩之、HRP によって活性化される新規チロシン残基ラベル化剤の開発と修飾条件検討、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム(東京大学、東京) 2017 年 9 月 7 日~2017 年 9 月 9 日

②①藤牧寛城、佐藤伸一、中村浩之、チロシン修飾反応を利用した新規 PTP 活性測定法の開発、第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム(名古屋大学、名古屋) 2017 年 10 月 25 日~2017 年 10 月 27 日

②② S. Sato, M. Tsushima, H. Nakamura, Photocatalyst-Proximity-Dependent Protein Chemical Labeling, International CLS Forum 2018 (東京工業大学、東京) 2018 年 3 月 3 日~2018 年 3 月 4 日

②③ M. Tsushima, S. Sato, H. Nakamura, Catalytic Labeling of Ligand-Binding Proteins on Ruthenium Photocatalyst-Functionalized Affinity Beads, International CLS Forum 2018 (東京工業大学、東京) 2018 年 3 月 3 日~2018 年 3 月 4 日

②④ S. Sato, M. Tsushima, K. Hatano H. Nakamura, Proximity-Dependent Tyrosine Chemical Labeling, International Congress on Pure and Applied Chemistry (ICPAC) (シ

ェムリアップ、カンボジア) 2018 年 3 月 7 日~2018 年 3 月 10 日

②⑤藤牧寛城、佐藤伸一、中村浩之、チロシン残基選択的ラベル化反応を利用した PTP 活性測定法の開発、日本化学会第 98 春季年会(日本大学、千葉) 2018 年 3 月 20 日~2018 年 3 月 23 日

②⑥ S. Sato, Development and Application of Catalytic Protein Labeling Based on Radical Reactions, 日本化学会第 98 春季年会(日本大学、千葉) 2018 年 3 月 20 日~2018 年 3 月 23 日

②⑦吉田正輝、羽田野兼資、佐藤伸一、中村浩之、HRP 触媒によるチロシン残基ラベル化反応におけるラベル化可能範囲評価法の確立、日本化学会第 98 春季年会(日本大学、千葉) 2018 年 3 月 20 日~2018 年 3 月 23 日

②⑧對馬理彦、佐藤伸一、中村浩之、Ru 光触媒を担持したアフィニティービーズ上での標的タンパク質選択的ラベル化、日本化学会第 98 春季年会(日本大学、千葉) 2018 年 3 月 20 日~2018 年 3 月 23 日

②⑨松村雅喜、佐藤伸一、中村浩之、チロシン残基ラベル化によるタンパク質機能化のための反応条件の検討、日本化学会第 98 春季年会(日本大学、千葉) 2018 年 3 月 20 日~2018 年 3 月 23 日

〔図書〕(計 1 件)

佐藤伸一、中村浩之、タンパク質の部位特異的な機能修飾 N 末端修飾法の開発、月刊「化学」最新のトピックス欄、化学同人、2015、Vol70、

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: チロシンホスファターゼ及びチロシンキナーゼ活性の測定法

発明者: 佐藤伸一、中村浩之、中野洋文

権利者: 佐藤伸一、中村浩之、中野洋文

種類: 特許

番号: 特願 2015-198329

出願年月日: 平成 27 年 10 月 8 日

国内外の別: 国内

名称: METHOD FOR MEASURING TYROSINE PHOSPHATASE AND TYROSINE KINASE ACTIVITY

発明者: 佐藤伸一、中村浩之、中野洋文

権利者: 佐藤伸一、中村浩之、中野洋文

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/078224

出願年月日: 平成 28 年 9 月 26 日

国内外の別： 国外

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 伸一 (Sato, Shinichi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：20633134