

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15705

研究課題名（和文）構造均一な化学修飾タンパク質の迅速合成法の開発と生命科学研究への応用

研究課題名（英文）Method for efficient synthesis of chemically functionalized proteins and application for biology research

研究代表者

大石 俊輔 (Oishi, Shunsuke)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教

研究者番号：80707795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：化学合成タンパク質のLate-Stage Functionalization法を開発し、構造が均一な様々な修飾タンパク質を系統的、網羅的に合成することを目的とした。タンパク質を化学的に全合成し、側鎖官能基の反応性を制御することで完全に均一な構造の修飾タンパク質を得ることが本研究の特徴である。実際に植物性システインリッチタンパク質を蛍光修飾することに成功し、生物活性試験およびバイオイメージング実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の合成では、高純度のタンパク質が得られる反面、しばしば面倒で時間がかかるプロセスである。特に、化学修飾を組み込む場合は、合成初期段階で修飾構造を導入する必要があるため、全合成プロセスを繰り返すことが必要となる。本研究ではLate-Stage Functionalization法により、迅速に修飾タンパク質を化学合成する方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：We developed a Late-Stage Functionalization method for chemically synthesized proteins, aiming to systematically and exhaustively synthesize various uniformly structured modified proteins. The distinguishing feature of this study is the ability to obtain modified proteins with completely uniform structures by chemically synthesizing proteins and controlling the reactivity of side chain functional groups. We succeeded in fluorescently modifying a plant cysteine-rich protein, and conducted bioactivity assays and bioimaging experiments.

研究分野：有機合成化学

キーワード：タンパク質化学 ペプチド化学 ケミカルバイオロジー 有機合成化学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の化学修飾は基礎生物学や創薬研究を支える重要な技術となっている。しかし構造均一かつ精密に修飾されたタンパク質の誘導体群を迅速に得る方法は未開拓である。申請者らは、この問題を解決するため、合成の終盤に誘導化を行う Late-Stage Functionalization を提案する。すなわち化学合成による精密な改変タンパク質の合成とバイオコンジュゲーション化学を組み合わせた戦略である。誘導化に用いる反応剤を変更することにより、簡便に様々な修飾タンパク質を得ることができる。これにより、ケミカルバイオロジー研究や基礎生物学への貢献が期待できる。

### 2. 研究の目的

化学合成タンパク質の Late-Stage Functionalization 法を開発し、構造が均一な様々な修飾タンパク質を系統的、網羅的に合成することを目的とする。タンパク質を化学的に全合成し、側鎖官能基の反応性を制御することで完全に均一な構造の修飾タンパク質を得ることが本研究の特徴である。また、このときフォールディング後の活性タンパク質に対し修飾を行い修飾の前後でタンパク質の立体構造を保持し、修飾後に複雑な精製操作無しで生物学実験に適用できる手法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

Fmoc ペプチド固相合成法により調整したペプチドを KAHA ライゲーションなどの反応で連結し、合成タンパク質を得る。このとき、側鎖に光分解性保護基 (PGG) で保護されたヒドロキシルアミンを持つ人工アミノ酸を導入しておく。リフォールディング操作によりタンパク質の立体構造を形成した後、UV 照射により PGG を除去し、KAT ライゲーションにより修飾を行う。修飾タンパク質からは透析により小分子性の不純物を除く。

### 4. 研究成果

#### TfLURE、TcLURE タンパク質の化学合成

分泌性システインリッチタンパク質 (CRPs) の合成は、分子間および分子内の無秩序なジスルフィド結合の形成によるタンパク質の不溶化の問題のために困難である。化学合成法では、より高純度で還元型の CRPs を得ることができる。これはタンパク質の酸化的フォールディングにより活性型を得る際に有利となる。本研究では、 $\alpha$ -ケト酸-ヒドロキシルアミン (KAHA) ライゲーションを用いて花粉管誘引タンパク質である *Torenia fournieri* LURE (TfLURE) と *Torenia concolor* LURE (TcLURE) およびそのキメラタンパク質の化学合成を行った。

合成は 2 つのペプチドセグメントを KAHA ライゲーションで連結する方法で行った。保護された Fmoc-Phe- $\alpha$ -ケト酸を予めロードしたポリスチレンレジン上で確立された Fmoc-SPPS 手順を用いて、システイン保護  $\alpha$ -ケト酸セグメントを調製した。酸によるレジンからのペプチドの切断後、粗ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製し、良好な収率で Cys(Acm) 保護型  $\alpha$ -ケト酸ペプチドセグメントを得た。もう一方のシステイン保護 5-オキサプロリンセグメントは、Fmoc-SPPS を用いて調製し、逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製した。2 つのペプチドセグメントを KAHA ライゲーションによって連結した。反応は 0.1M のシュウ酸を添加した 50%(v/v) の水溶性ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で、60°C で 24 時間で行った。KAHA ライゲーション反応はスムーズに進行し、ライゲーション生成物が得られた。さらに 6M の Guanidinium 塩酸 (Gdn·HCl) で 10 倍に希釈し、pH を 9.6 に調整することで、O-N acyl shift により、システイン側鎖が保護された LURE タンパク質が得られた。

システイン側鎖の Acm 保護基は、50% (v/v) 酢酸水溶液中で 1% AgOAc (w/v) によって除去した。さらに得られた還元型タンパク質を変性バッファー (6M Gdn·HCl, 0.3M Tris, pH7.0) に溶解したのち、フォールディングバッファー (5mM 還元型グルタチオン、2.5mM 酸化型グルタチオン、pH 8.2) で 8 倍に希釈し、4°C で 24 時間攪拌した。分析用 RP-HPLC によりメインピークがシフトし、新たなピークが現れたことを確認した。これは、熱力学的に安定な、ジスルフィド結合を持つ TfLURE タンパク質であった。これを分取 RP-HPLC で精製し、凍結乾燥により TfLURE タンパク質を得た。

得られた TfLURE タンパク質の生物活性は、花粉管誘引試験によって *E. coli* での発現によって得られた組換えタンパク質と同等であることを確認した。

#### EPF タンパク質の化学合成

合成の標的として、EPF ファミリーの分泌型システインリッチタンパク質 (CRP) を選択した。11 の EPF メンバーのうち、EPFL9、EPF2、および EPF1 が、植物表皮の気孔の形成を調節する因子であることが知られている。

還元型の EPFL9 は標準的な Fmoc SPPS を用いて合成した。しかし、EPF2 の Cys27, Ser28, Val29、および EPF1 の Phe25, Val26, Cys27 のカップリング効率は非常に低く、目標とするペプチドを得

ることはできなかった。そのため、ペプチドライゲーション反応を用いて EPF2 および EPF1 タンパク質の化学合成を目指した。

EPF2 は Ser32-Cys33 間での NCL による合成を計画した。ペプチドチオエステルセグメントは、ペプチドヒドラジド前駆体から作製することが可能で、これは標準的な Fmoc SPPS で合成することができる。N 末端にシステイン残基を含むもう一方のペプチドセグメントは、標準的な Fmoc SPPS によって合成した。2つのペプチドセグメントによる NCL 反応を検討した。最適化された反応条件下で行った結果、生死物を 67%の収率で得ることができた。Acm 基の脱保護ののち、還元型 EPF2 を分取 RP-HPLC により精製した。

また EPF1 は Val30-Glu31 間での KAHA ライゲーションによって合成することとした。 $\alpha$ -ケト酸を含むペプチドセグメントの合成を、保護されたバリン  $\alpha$ -ケト酸を担持した樹脂を用いて標準的な Fmoc 法によって行った。樹脂からの TFA による切断後、得られたペプチドは、0.1% TFA を含む水性アセトニトリルに対する溶解性が悪く、RP-HPLC で分析・精製することが困難であった。この溶解性の問題を克服するため、2つの Gly-Ser O-isoacyl ジペプチドユニットをペプチドセグメントに組み込むことを計画した。これは、ペプチドの溶解性を向上させることが知られている。我々は、Fmoc-SPPS において、2つの N $\alpha$ -boc 保護 Gly-Ser O-isoacyl ジペプチドを組み込むことにより、ペプチドセグメントの再合成を行った。2つの O-isoacyl ジペプチドを含むペプチドセグメントは溶解性が改善されており、RP-HPLC による精製によってセグメントを得ることができた。もう一方の 5-オキサプロリンセグメントも Fmoc-SPPS により合成した。得られたペプチドセグメントを用いて KAHA ライゲーション反応を行った。ライゲーション生成物は3つのエステル結合とデブシペプチド結合を含んでおり、溶解性には問題はなかった。さらに塩基性条件下での N-O acyl shift により全てのエステル部位をアミドに変換した。Acm 基の脱保護ののち、還元型 EPF1 を分取 RP-HPLC により精製した。

得られた還元型 EPFs を用いてフォールディング条件を検証した。EPFs を変性バッファーに溶解し、1時間後にフォールディングバッファーで希釈したのち、EPFs タンパク質を分取逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製した。

次に、化学的に合成した EPFs の生物活性の評価を行った。結果として、合成 EPFs が気孔の発生に対する活性を持っていることを確認した。

EPF タンパク質の生体内での動態を視覚化するため、N 末端にヒドロキシアミンを組み込んだ上で蛍光色素を選択的に導入した。光分解性保護基を持つオルニチンヒドロキシアミンを導入することでヒドロキシアミンを持つ EPF タンパク質を得て、さらにフォールディングを行なった。

ヒドロキシルアミンは KAT と反応し、アミド結合を形成する。ヒドロキシアミンを持つ EPF タンパク質に対して、KAT を持つ蛍光色素反応させ、EPF タンパク質を蛍光修飾した。

我々は色素で標識された5種の EPFL9 の生物学的活性を評価し、その中でも BODIPY-EPFL9 が生物学的活性を保持していることを明らかとした。EPFs は受容体様キナーゼ ERECTA ファミリータンパク質と相互作用することが知られている。BODIPY-EPFL9 の細胞膜での局在を視覚化を行なった。BODIPY-EPFL9 と細胞膜染色剤 FM4-64 を共に処理した結果、気孔前駆体細胞の細胞膜で強い BODIPY 信号が検出された。一方で、非標識の EPFL9 を競合剤として事前に作用させると、細胞膜での BODIPY 信号の明確なピークは検出されなかった。このことから BODIPY-EPFL9 が上皮細胞に特異的に取り込まれることを示唆する。

Kumarswamyreddy, N., Nakagawa, A., Endo, H., Shimotohno, A., Torii, K. U., Bode, J. W., and Oishi, S. (2022) Chemical synthesis of the EPF-family of plant cysteine-rich proteins and late-stage dye attachment by chemoselective amide-forming ligations, *RSC Chem Biol*, RSC 3, 1422–1431.

Kumarswamyreddy, N., Reddy, D. N., Robkis, D. M., Kamiya, N., Tsukamoto, R., Kanaoka, M. M., Higashiyama, T., Oishi, S., and Bode, J. W. (2022) Chemical synthesis of *Torenia* plant pollen tube attractant proteins by KAHA ligation, *RSC Chem Biol*, RSC 3, 721–727.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kumarswamyreddy Nandarapu, Reddy Damodara N., Robkis D. Miklos, Kamiya Nao, Tsukamoto Ryoko, Kanaoka Masahiro M., Higashiyama Tetsuya, Oishi Shunsuke, Bode Jeffrey W.	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemical synthesis of <i>Torenia</i> plant pollen tube attractant proteins by KAHA ligation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2CB00039C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okabe Hiroyuki, Naraoka Asuka, Isogawa Takahiro, Oishi Shunsuke, Naka Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Acceptor-Controlled Transfer Dehydration of Amides to Nitriles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4767 ~ 4770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.9b01657	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 Zhang Yinfeng, Hirota Tsuyoshi, Kuwata Keiko, Oishi Shunsuke, Gramani Subramanian G., Bode Jeffrey W.	4. 巻 141
2. 論文標題 Chemical Synthesis of Atomically Tailored SUMO E2 Conjugating Enzymes for the Formation of Covalently Linked SUMO <sup>2</sup> E2/E3 Ligase Ternary Complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 14742 ~ 14751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b06820	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
スイス	ETH Zurich			