

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：35409

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21483

研究課題名（和文）翻訳後修飾部分に多様性を有するタンパク質ライブラリ精密構築への挑戦

研究課題名（英文）Protein semi-synthesis-based construction of protein library with diversity in post-translational modification

研究代表者

重永 章（Shigenaga, Akira）

福山大学・薬学部・教授

研究者番号：10423394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、タンパク質医薬品が広く注目を集めている。より高活性な同医薬品を探索するためのアプローチとして、タンパク質ライブラリの利用が挙げられる。タンパク質ライブラリの構築では、いかに効率よく多様性を持たせるかがカギとなる。タンパク質のアミノ酸配列へ多様性を持たせることは、容易に達成できる。しかし、翻訳後修飾部分への多様性導入は困難を極める。このため我々は、翻訳後修飾部分に多様性を有するタンパク質ライブラリ構築に資する、新たなタンパク質半合成法確立に挑戦することとした。その結果、新規タンパク質半合成法の確立に成功するとともに、鍵反応の機構について量子化学の観点から知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、タンパク質医薬品が注目されています。同医薬品の探索では、タンパク質ライブラリが利用可能です。タンパク質ライブラリとは多くのタンパク質を集めたもので、図書館で本を探すようにタンパク質ライブラリから高活性タンパク質を探します。本ライブラリ構築では、いかに多くのタンパク質を用意するか、つまり多様性を持たせるかがカギとなります。タンパク質の多くは、本体と翻訳後修飾に分けられます。多様性を前者に持たせる技術は確立されていますが、後者に持たせるのは困難でした。そこで私たちは、翻訳後修飾部分に多様性を持つタンパク質ライブラリ構築の基盤となる、新たなタンパク質半合成法の確立に挑戦し、成功しました。

研究成果の概要（英文）：Protein drugs have received widespread attention in recent years. The use of protein libraries facilitates the search for a more active protein drug. The key to building a protein library is how to efficiently create diversity. Diversity in the amino acid sequences of proteins can be easily achieved; however, it is difficult to introduce diversity into the post-translational modification. For this reason, we decided to challenge the establishment of a new protein semi-synthesis method that contributes to the construction of a protein library with diversity in post-translational modifications. As a result, we succeeded in establishing a new protein semi-synthesis method. Furthermore, the mechanism of the key reaction was rationalized by quantum chemical calculations.

研究分野：有機合成化学

キーワード：タンパク質半合成 ネイティブケミカルライゲーション ペプチドチオエステル タンパク質化学 ペプチド化学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬品をはじめとするタンパク質医薬品が広く注目を集めている。より高活性・高機能性のタンパク質医薬品を探索するためのアプローチの一つとして、タンパク質ライブラリの利用が挙げられる。タンパク質ライブラリの構築では、いかに効率よくタンパク質に多様性を持たせるかが鍵となる。タンパク質のアミノ酸配列へ多様性を持たせることは、遺伝子工学的手法を用いることで比較的容易に達成できる。これに対し、翻訳後修飾部分に多様性を有するタンパク質ライブラリの構築は、下記3つの理由から困難を極める。1) 翻訳後修飾は遺伝子に直接コードされていないため、遺伝子工学的手法により翻訳後修飾部分に多様性を持たせることは容易ではない；2) 発現系を用いた場合、翻訳後修飾部分の均一性が担保できない（特に糖鎖修飾）；3) 化学合成により翻訳後修飾部位を有するタンパク質の合成は可能だが煩雑なため、多数の誘導体を合成することは現実的ではない。このような現状であるにも関わらず、翻訳後修飾はタンパク質の活性制御において重要な役割を果たすことは周知の事実である。このため我々は、翻訳後修飾部分に多様性を有するタンパク質ライブラリ構築に資する新たな方法論確立に挑戦することとした。

2. 研究の目的

翻訳後修飾部分に多様性を有するタンパク質ライブラリを構築するにあたり、発現タンパク質と化学合成ペプチドの縮合を利用するタンパク質半合成法に着目した。縮合反応として、チオエステルとシステインの化学選択的反応である Native Chemical Ligation (NCL) を用いることとした。従来のタンパク質半合成法では、発現タンパク質と化学合成ペプチドを縮合することで目的とするタンパク質を調製する（図1A）。このため、修飾した化学合成ペプチドを用いた場合、修飾は生成するタンパク質の末端付近にしか導入できない。しかし、翻訳後修飾は末端近傍以外でも頻繁に起こっている。そこで我々は、1つの化学合成ペプチドを2つの発現タンパク質で挟むよう縮合することで、中央部分に修飾を有するタンパク質を生成するタンパク質半合成法を開発することとした（図1B）。まず、発現タンパク質を我々の開発した手法でC末端選択的にチオエステル化し、フラグメントAを得る。次に、N末端にシステインを、中央に修飾を、C末端に SEALide（我々が開発した、チオエステルへと用時変換可能な補助基。N-Sulfanylethyl anilide の略。3フラグメントの挙縮合を可能とする）を導入した化学合成ペプチド B との NCL に付す。続いて、生成物の SEALide 部分をチオエステルへと変換したのち、定法を用いて調製可能なN末端にシステインを有する発現タンパク質 C との NCL に付す。すると、中央部分に修飾を有するタンパク質を精密合成できるというアプローチである。本手法では、すでに確立されている方法に従って修飾ペプチド B のライブラリを構築し、得られるペプチドと発現タンパク質 A および C を縮合するのみで、修飾部分に多様性を有するタンパク質ライブラリが簡単に構築できる。本手法では発現タンパク質として A および C を常に用いるため、ライブラリ構築にあたって様々なタンパク質を発現させる必要がない。つまり、本修飾タンパク質ライブラリは、すでに確立され汎用されているペプチドライブラリと同程度の労力で構築可能である。

3. 研究の方法

本研究では鍵となる下記2要素について検討した。すなわち、発現タンパク質 C 末端をチオエステル化する独自の手法の確立、および SEALide の反応性制御機構の解明である。それぞれの具体的内容については次項で詳述する。

4. 研究成果

1) 発現タンパク質 C 末端チオエステル化法の確立

我々は以前、入手容易なカルボキシペプチダーゼ Y (CPaseY) を利用した、新たなタンパク質 C 末端チオエステル化法を開発した (Komiya et al. *Chem. Commun.* 2019, 55, 7029)。CPaseY はセリンプロテアーゼの一種であり、中間体アシルセリンを経てタンパク質・ペプチド C 末端アミノ酸を加水分解する。この際、水より求核性の高いヒドラジンを共存させることで A

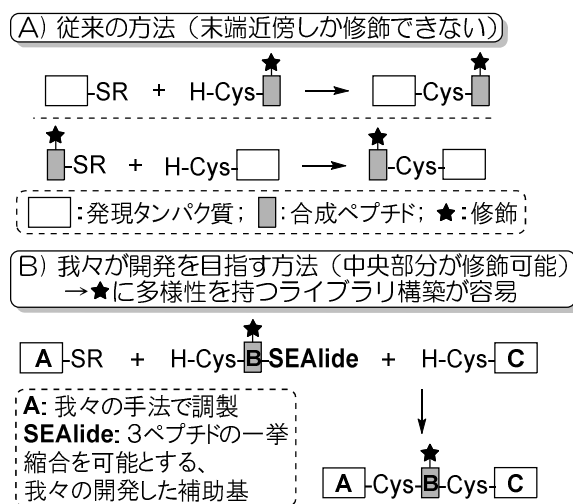


図1. 修飾部分を有するタンパク質の半合成法

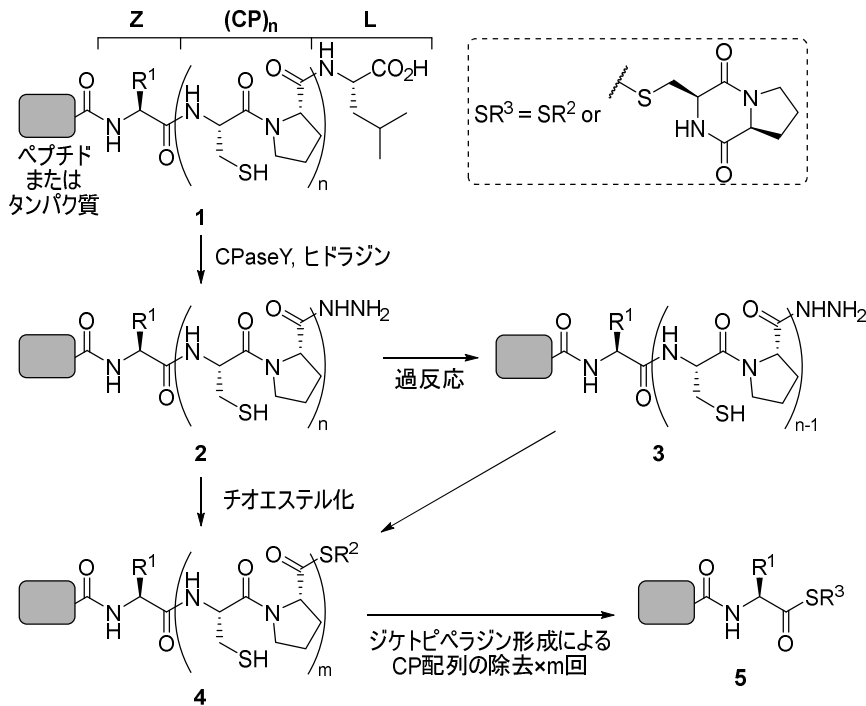


図2 . 本研究で確立したタンパク質C末端チオエステル化法の概略

シルセリン中間体がヒドラジド化と反応し、発現タンパク質C末端のヒドラジン修飾体が得られるという方法である。なお、得られるヒドラジン修飾体は既知法に従い、タンパク質チオエステルへと変換可能である (Fang et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *50*, 7645)。本手法は酵素による認識配列を必要としないため、従来の他酵素を用いるC末端チオエステル化法の課題、すなわち生成物中に酵素認識配列が残るという課題を解決できるものである。

本研究ではまず、この手法の応用可能性について精査した。その結果、CPaseYによるヒドラジド化はC末端から4残基目が疎水性アミノ酸の場合に速く、過反応が見られる場合があった。本残基の影響についてさらに精査したところ、親水性アミノ酸を導入した場合は反応が遅く、原料の残存が認められることがあった。このためCPaseYを用いた反応では、C末端付近の配列が変わるごとに詳細な反応条件の検討が必要となり、この煩雑さが本研究の妨げとなることが予測された。そこで本課題を解決するため、C末端から4残基目のアミノ酸の種類によらずヒドラジド化速度が一定となる系の構築を目指した。

本研究では、チオエステルC末端アミノ酸の種類にかかわらず、C末端から4番目のアミノ酸が常にプロリンとなる系を設計した。すなわち、システイン - プロリン (CP) 配列を複数導入することとした (図2)。基質1 ($n > 1$) をCPaseY/ヒドラジンとの反応に付すと、まず2が生じる。この際に過反応が起こると、プロリンの切断は遅くロイシンの切断は速いことから、システイン - プロリン配列が1つ減った3となる。これらの混合物をチオエステルへと変換すると、4 ($m = 1$) の場合は1回の、4 ($m > 1$) の場合は複数回のジケトピペラジン形成反応 (Kawakami and Aimoto, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 76) が起こり、チオエステル5が生成する設計である。

まず、システイン - プロリン配列の繰り返し回数が1、2および3回のものについて、ヒドラジド化の速さを比較した。本実験では基質として、1のZ部位に疎水性アミノ酸を導入したもの、および親水性アミノ酸を導入したものをを用いた。この結果、繰り返し回数に応じて反応速度の差が縮まり、 $n=3$ の場合は反応速度がZ部位に依存しないことが明らかとなった。続いて、過反応の詳細について検証した。Z部分にフェニルアラニンを導入したペプチド ($n = 1$) を基質として用いた場合、過反応生成体が主生成物として得られた。これに対して $n = 3$ の場合、目的物のみが得られた。次に、システイン - プロリン繰り返し配列がチオエステル化と続くNCLの間に除去されるか検証した。システイン - プロリン繰り返し配列を3つ含むヒドラジン誘導体を基質として用い、一連の反応をワンポットで行ったところ、目的とするNCL生成物がほぼ単一の生成物として得られた。この際、システインプロリン配列が残ったものは検出されなかった。以上の結果から、本研究の鍵反応となるタンパク質C末端チオエステル化法の課題、すなわちC末端付近の配列に依存して副生成物が生じる問題を解決することができた。

2) SEALideの反応性制御機構の解明

新型コロナウイルス感染症対策のためウェットな実験を行うことが困難となった間、量子化学計算に基づき、本研究課題の鍵化合物であるSEALideの反応性制御機構を考察することとした。SEALide

は中性水溶媒中、リン酸塩非存在下では安定に存在し、リン酸塩を加えると分子内 N-S アシル基転移が起こりチオエステルへと変換される(Sato et al. *ChemBioChem* 2011, 12, 1840)。この反応機構に関する知見を得るため、SEAlide のモデルとして、本来はペプチドである部分をアセチル基に置換した化合物 **6** を用いた計算を行った(図3)。各種添加剤存在下で密度汎関数法計算を行ったところ、リン酸二水素イオンの存在下では活性化エネルギーが 25 kcal/mol 以下に下がることが明らかとなった。さらに遷移状態を精査したところ、リン酸二水素イオンはプロトン供与体および受容体として働いていた。以上の結果から、リン酸二水素イオンは酸・塩基触媒として働くことで SEAlide のチオエステル系正反応を促進していることが示唆された。

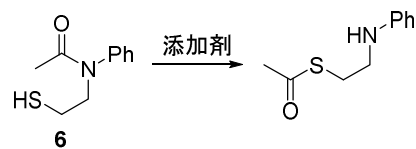


図3 . SEAlide モデル化合物の
N-S アシル基転移反応

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shigenaga Akira	4. 巻 18
2. 論文標題 Theoretical study on reaction mechanism of phosphate-catalysed N ² S acyl transfer of N-sulfanylethylaniilide (SEAlide)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 9706 ~ 9711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B01968B	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 Ueda Masahiro, Komiya Chiaki, Ariei Sayuki, Kusumoto Kohshi, Denda Masaya, Okuhira Keiichiro, Shigenaga Akira, Otaka Akira	4. 巻 68
2. 論文標題 Sequence-Independent Traceless Method for Preparation of Peptide/Protein Thioesters Using CPaseY-Mediated Hydrazinolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00674	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 -

1. 著者名 Kobayashi Daishiro, Naruse Naoto, Denda Masaya, Shigenaga Akira, Otaka Akira	4. 巻 18
2. 論文標題 Deprotection of S-acetamidomethyl cysteine with copper(ii) and 1,2-aminothiols under aerobic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 8638 ~ 8645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B01475C	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 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 重永 章
2. 発表標題 アミド結合切断反応に着目した生命科学研究支援分子の開発
3. 学会等名 徳島大学大学院医歯薬学研究部・BRIGHT合同公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重永 章
2. 発表標題 アミド結合切断反応に着目した生命科学志向型ツールの開発
3. 学会等名 第2回 生命科学Webセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重永 章
2. 発表標題 Density functional theory (DFT)-based insights into reaction mechanism of phosphate catalyzed N-S acyl transfer of N-sulfanylethylanilide (SEAlide)
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重永 章
2. 発表標題 アミド結合の切断にこだわった生命科学研究支援分子の開発
3. 学会等名 第53回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重永 章
2. 発表標題 実務経験を積んだうえで有機化学を学び直す
3. 学会等名 福山市薬剤師会シリーズ研修会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Shigenaga, Masaya Denda, Akira Otaka
2. 発表標題 Development of acyl transfer-based chemical and chemical biology tools for protein science
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福山大学薬学部 生体有機化学研究室 https://www.fukuyama-u.ac.jp/pharm/pharmacy/labo-list/org_bioorg_chem/
--

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	大高 章 (Otaka Akira) (20201973)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	
研究分担者	伊藤 孝司 (Itoh Kohji) (00184656)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	

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
---------	---------