

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550187

研究課題名(和文) 自発的チオエステル形成ユニットを用いる蛋白質の選択的標識反応の開発

研究課題名(英文) Development of a method for protein labeling by the use of intramolecular thioester-forming unit

研究代表者

川上 徹 (Kawakami, Toru)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：70273711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した自発的分子内活性化ユニットを用いて、標識グループを部位選択的に蛋白質に導入する方法の開発を目的とした。

まず、標的蛋白質に結合するリガンドが分離することなくチオエステルへ変換されるリガンド結合型自発的活性化ユニットの設計と合成を行った。副甲状腺ホルモン(PTH)受容体を発現させた細胞に対して、PTH部分ペプチドをリガンドとし、この受容体の蛍光標識を試みた結果、蛍光顕微鏡観察によって受容体発現部位に蛍光を確認できた。しかし、最終的には共有結合によって受容体が修飾できたかどうか確認できなかった。一方で、ここで設計した自発的活性化ユニットを利用して蛋白質の化学合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：We had found that a peptide containing a sequence, Cys-Pro ester (CPE), at the C terminus is spontaneously transformed into a peptide thioester, which can be used for the peptide ligation. In this research, we aimed to develop a method for the site-specific labeling of proteins. At first, we made modification of the original CPE structure for the use of protein labeling, in which the ligand for protein binding was retained after thioester formation. Then, a peptide with partial sequence of parathyroid hormone (PTH) containing the modified CPE structure and a fluorescence group was synthesized. When the cell expressing a PTH receptor was treated with the peptide, synthesized, the fluorescence was observed at the same position with the receptor, and we were not able to confirm the covalent bonding between the fluorescence group and the receptor. On the other hand, we succeeded in the total chemical synthesis of proteins using the newly developed modified CPE structure.

研究分野：ペプチド合成

キーワード：生体分子 ペプチド タンパク質 受容体 チオエステル 部位特異的修飾

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の選択的な標識法は蛋白質の機能や挙動を調べるために重要な技術である。生細胞においては蛍光蛋白質に代表されるようなプローブを導入して目的蛋白質を観察する手法が主流である。特定の蛋白質やペプチド配列のタグを導入し、このタグを選択的に修飾する方法も多く用いられている。あるいはナンセンスサプレッションを利用する方法などある。これらの手法はいずれも細胞中での蛋白質の修飾法として有用であるが、目的蛋白質(遺伝子)に対して遺伝子工学的に修飾を施し、細胞に導入する必要がある。これに対して、目的蛋白質と選択的に相互作用するリガンドなどを介して、修飾基を導入する方法が注目されている [1]。これらの方法では細胞に対して外部から遺伝子を導入することなく、特定の化合物を加えることによって、生細胞や組織に含まれる蛋白質を標識できる利点があり、簡便かつ部位選択的に修飾基を導入することが可能となる。さらに、より簡便で、選択性の高い方法が望まれている。

一方で研究代表者らは、蛋白質の化学合成法の開発の中で、分子内自発的チオエステル形成ユニットとして、Cys-Pro エステル (CPE) 構造を見出している [2]。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者らが独自に開発した自発的分子内活性化 CPE ユニットの応用するアミド結合による蛋白質の部位選択的標識基導入法の開発を目的とした。CPE 構造を含む分子は中性緩衝液中で自発的な分子内反応により活性なチオエステルへ変換される。この自発的活性化ユニットは活性体前駆体に相当するものであり、それ自身は活性体ではない。そのために標的分子に到達するまでの非特異的な反応が軽減され、標的分子とより選択的に反応すると期待した。この骨格を蛋白質修飾に適した構造に改変し、蛋白質を部位選択的に修飾する方法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) リガンド結合型自発的活性化ユニットの開発

オリジナルの CPE 構造を介してリガンドと標識グループを結合させると、活性化の際にリガンドと標識グループが分離してしまう。そこで、リガンド結合型自発的活性化ユニットを設計した。

(2) PTH 誘導体を用いる生細胞上 PTH 受容体の共有結合による蛍光標識

副甲状腺ホルモン(PTH)受容体に対して PTH 部分ペプチドをリガンドとすることで、細胞表面のこの受容体のリガンド結合部位の蛍光標識を行った。PTH は 84 残基のペプチドであるが、N 末端部分ペプチド(34 残基)で

十分な活性が得られることが知られている。この部分ペプチドを用いてその受容体との相互作用が詳細に検討され、PTH 受容体 N 末端領域と PTH 部分ペプチドの共結晶構造が報告されている [3]。この構造から、PTH ペプチド中の特定の Glu 残基と PTH 受容体の特定の Lys 残基が近接していることが示されている。この PTH ペプチドの Glu 残基およびその周辺のアミノ酸残基に改変型 CPE 構造を導入したアミノ酸誘導体で置換し、受容体 Lys 残基のアミノ基へのアシル基転移による蛍光標識を試みた。

(3) 改変型 CPE 構造を利用する蛋白質化学合成

改変型 CPE 構造は結果としてオリジナルの CPE 構造よりも活性であり、速やかにチオエステルへ変換されることがわかった。そこで、改変型 CPE 構造を用いる蛋白質合成を検討した。ここでは翻訳後修飾により遺伝子の調整が行われているヒストン H3 および H4 の完全化学合成および半合成を行った。

4. 研究成果

(1) リガンド結合型自発的活性化ユニットの開発

CPE 構造中の Pro 残基を N-置換 Gly 残基に置換し、エステル構造を N-置換基に導入することで活性化時にリガンドが分離しない構造を設計し、合成した。結果としてこの改変型 CPE 構造においても分子内で自発的にチオエステルへ変換され、その際にリガンドが分離しないことがわかった。さらに、この改変型 CPE 構造ではオリジナルの CPE 構造よりも速やかにチオエステルに変換され、ライゲーションによる蛋白質合成にも有用であることがわかった。また、反応速度向上は CPE 構造の後ろに 1 残基のかさ高いアミノ酸残基を導入することでも達成できた。

(2) PTH 誘導体を用いる生細胞上 PTH 受容体の共有結合による蛍光標識

リガンド結合型自発的活性化ユニットを介してアミノ酸側鎖に蛍光標識基を導入した。このアミノ酸残基を導入した PTH(1-34) 誘導体を固相合成により合成することができた。このペプチドと PTH 受容体を発現させた細胞との反応を行ったところ、共焦点蛍光顕微鏡観察によって細胞表面に蛍光が観察され、これは PTH 受容体の発現部位と一致した。しかし、この蛍光標識グループがリガンドと受容体の相互作用による非共有結合ではなく、アミド結合による共有結合によって確実に標識できたかどうかは、最終的に確認することができなかった。

(3) 改変型 CPE 構造を利用する蛋白質化学合成

ヒストンはクロマチンの構成単位であるヌクレオソームのコアを形成する蛋白質であ

る。ヒストン H2A, H2B, H3, H4 の 4 種類各 2 分子からなる 8 量体がコアを構成し、それに DNA が巻き付くことでヌクレオソームを形成する。遺伝子の発現などの機能の調整に対して、ヒストンの翻訳後修飾は重要な役割を果たしている。今回、CPE 構造を改変することにより、チオエステルへの変換速度に向上が見られたので、この構造を用いてヒストン蛋白質の合成を行った。

まず、9 番目の Lys 残基側鎖アミノ基にトリメチル基を導入したヒストン H3 (135 残基) を 3 つの合成ブロックに分けてそれぞれ固相合成によって合成し、ライゲーション法によって順次結合させることによって、全長のヒストン H3 の全合成に成功した。

また、ヒストン修飾の多くは N 末端部位にあることから、より簡便な合成法の開発を目的として、組換えペプチドを C 末端側合成ブロックとして用いて、これと化学合成した N 末端合成修飾ペプチドとを結合する方法を開発した。9 番目の Lys 残基側鎖アミノ基にトリメチル基を導入したヒストン H3 および、20 番目の Lys 残基側鎖アミノ基にトリメチル基を導入したヒストン H4 (102 残基) の合成にそれぞれ成功した。

本研究の一つの目的であった、独自開発した自発的活性化ユニットを用いる生細胞中での選択的な蛋白質の修飾反応については、細胞上で標的受容体蛋白質の局在部位における蛍光を確認することができた。しかし、最終的に共有結合によるものかどうか確認することができなかった。一方で、このリガンド結合型自発的活性化ユニットの開発過程でより活性化自発的活性化ユニットを見出すことができ、これを用いて部位特異的にペプチド同士を反応させることによって蛋白質の化学合成を達成することができた。

<引用文献

- S. Tsukiji et al., *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 341.
T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron* **2009**, 65, 3871.
A. A. Pioszak, H. E. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 5034.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- T. Kawakami, Y. Akai, H. Fujimoto, C. Kita, L. Takemura, Y. Aoki, M. Waseda, S. Aimoto, Sequential Peptide Ligation by the Combination of Cys-Pro Ester and Thioester Methods: An Application to a Synthesis of Histone H3, *Peptide Science* 2012, 77-78 (2013) 査読有。
T. Kawakami, Y. Akai, H. Fujimoto, C. Kita, Y. Aoki, T. Konishi, M. Waseda, L. Takemura, S. Aimoto, Sequential Peptide Ligation by Combining the Cys-Pro Ester

(CPE) and Thioester Methods and its Application to the Synthesis of Histone H3 Containing a Trimethyl Lysine Residue, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **86**, 690-697 (2013) DOI: 10.1246/bcsj.20130026 査読有。

T. Kawakami, A. Kamauchi, E. Harada, S. Aimoto, Enhancement in the Rate of Conversion of Peptide Cys-Pro esters to Peptide Thioesters by Structural Modification, *Tetrahedron Lett.*, **55**, 79-81 (2014) DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.10.121 査読有。

T. Kawakami, Y. Akai, R. Yoshikawa, I. Suetake, S. Tajima, S. Aimoto, Total Chemical Synthesis and Semi-synthesis of Histone H3 and H4 by the Use of Cys-Pro Ester Auto-activating Unit for the Thioester, *Peptide Science* 2013, 47-48 (2014) 査読有。
T. Kawakami, H. Hojo, Phenacyl Group as a Protecting Group for Thiol in the Use of Recombinant Peptides as Building Blocks for the Peptide Ligation Strategy, *Peptide Science* 2014, 117-118 (2015) 査読有。

T. Kawakami, Peptide Thioester Formation via an Intramolecular N to S Acyl Shift Reaction for Peptide Ligation, *Topics in Current Chemistry*, **362**, 107-135 (2015) DOI: 10.1007/128_2014_575 査読有。

T. Kawakami, R. Yoshikawa, Y. Fujiyoshi, Y. Mishima, H. Hojo, S. Tajima, I. Suetake, Synthesis of Histone Proteins by CPE Ligation using a Recombinant Peptide as the C-Terminal Building Block, *J. Biochem.*, accepted (2015) DOI: 10.1093/jb/mvv056 査読有。

〔学会発表〕(計 16 件)

T. Kawakami, A. Kamauchi, S. Aimoto, Peptide Thioester Formation at a Cys Residue via an N-S Acyl Shift Reaction, The 14th Akabori Conference, Niseko, Hokkaido, 2012.9.12

川上 徹, 赤井優一, 藤本久雄, 喜多千恵子, 竹村梨沙, 青木裕子, 早稲田真澄, 相本三郎, Cys-Pro エステル法とチオエステル法の連続ライゲーション: ヒストン H3 の合成, 第 49 回ペプチド討論会, 鹿児島市, 2012.11.8

川上 徹・赤井優一・藤本久雄・喜多千恵子・竹村梨沙・青木優子・早稲田真澄・相本三郎, 自発的活性化ユニット Cys-Pro エステルを用いる連続ライゲーションによるヒストン H3 の合成, 日本化学会第 93 春季年会, 滋賀県草津市, 2013.3.25.
T. Kawakami, S. Aimoto, Protein Synthesis by Chemical Ligation Based on the Use of a Peptide-Cys-Pro Ester as a Peptide Thioester Precursor, International Scientific Conference on "Chemistry - Opportunity and Development" 35th Anniversary of the

Institute of Chemistry, Hanoi, Vietnam, 2013.9.16.

T. Kawakami, A. Kamauchi, E. Harada, S. Aimoto, Rate Enhancement of Conversion of Peptide Cys-Pro ester to Peptide Thioester by the Structural Modifications, 4th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications Symposium, Kobe, 2013.11. 3 .

T. Kawakami, Y. Akai, R. Yoshikawa, I. Suetake, S. Tajima, S. Aimoto, Total Chemical Synthesis and Semi-synthesis of Histone H3 and H4 by the Use of Cys-Pro Ester Auto-activating Unit for the Thioester Precursor, 5th Asia-Pacific International Peptide Symposium, Suita, Osaka, 2013.11.7 .

T. Kawakami, Synthesis of Histone H3 by Chemical Ligation, The 8th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-8), Osaka, 2013.11.26 .

T. Kawakami, Chemical Protein Synthesis by the Ligation Based on the Use of an *N* to *S* Acyl Shift Reaction, 17th Korean Peptide and Protein Symposium, Seoul, Korea, 2013.11.29.

川上 徹, 吉川 諒, 相本三郎, 田嶋正二, 末武 勲, ケミカルライゲーションによる修飾ヒストン合成法の開発: H4K20me の合成とテトラソームの再構成, エピジェネティクス研究会 第7回年会, 奈良市, 2013.5.30 .

川上 徹, 吉川 諒, 藤吉佑樹, 北條裕信, 田嶋正二, 末武 勲, 組換えペプチドをC末端側合成ブロックとして用いたCys-Pro エステル(CPE)ライゲーション法によるヒストンタンパク質の合成, 日本化学会第94春季年会名古屋大学, 名古屋市, 2014.3.29 .

川上 徹, 吉川 諒, 藤吉佑樹, 北條裕信, 田嶋正二, 末武 勲, 組換えペプチドをC末端側合成ブロックとして用いたCys-Pro エステル(CPE)ライゲーション法によるヒストンの合成, エピジェネティクス研究会 第8回年会, 東京, 2014.5.28 .

T. Kawakami, R. Yoshikawa, Y. Fujiyoshi, H. Hojo, S. Tajima, I. Suetake, Synthesis of Histone by the Use of Cys-Pro Ester (CPE) Ligation, 33th European Peptide Symposium, Sofia, Burugaria, 2014.9.4.

T. Kawakami, Synthesis of Modified Histones by the Use of CPE Chemistry, The 15th Akabori Conference, Boppard, Germany, 2014.9.9.

川上 徹, 北條裕信, 発現ペプチドをライゲーション法の合成ブロックとして用いるためのフェナシル基のチオール保護基としての可能性, 第51回ペプチド討論会, 徳島市, 2014.10.23 .

T. Kawakami, Methods for Peptide Thioester

Preparation, IBC's 7th Annual AsiaTIDE, 2015.3.4, Osaka.

川上 徹, 北條裕信, ライゲーション法において発現ペプチドを合成ブロックとして用いるためのフェナシル基のチオール保護基としての可能性, 日本化学会第95春季年会, 千葉県船橋市, 2015.3.26 .

〔図書〕(計2件)

川上 徹, 相本三郎, システイン残基における*S*-ペプチド体を利用するペプチドライゲーション法の開発. 遺伝子医学MOOK21 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用(編)木曾良明, メディカルドゥ pp76-82 (2012).

北條裕信, 川上 徹, ペプチドチオエステルを用いるペプチド縮合. ファインケミカルシリーズ クリックケミストリー 基礎から実用まで (編)高田十志和, 小山靖人, 深瀬浩一, シーエムシー出版 pp214-223 (2014).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/publication/kawa.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 徹 (KAWAKAMI, Toru)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 70273711

(2)連携研究者

開 祐司 (HIRAKI, Yuji)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 40144498