The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Site-Specific Modification of a Protein N-Terminus or Heme Cofactor with Functional Molecules via a Triazole Linkage
Author(s)	井上, 望
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76519
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　井上　望　　）	
論文題名	Site-Specific Modification of a Protein N-Terminus or Heme Cofactor with Functional Molecules via a Triazole Linkage （タンパク質N末端あるいはヘム補因子へのトリアゾール結合を介した機能性分子の位置特異的修飾）

論文内容の要旨

タンパク質への機能性分子の修飾は、タンパク質の機能解明などの基礎研究やタンパク質機能を活用した材料・デバイス創出などの応用研究における基盤技術である。例えば、医薬分子を結合させた抗体（抗体－薬剤複合体）は優れた標的指向性を有し、次世代抗体医薬として注目を集めている。医薬分野以外にも、酵素反応を利用したバイオセンサーやバイオ触媒、あるいはタンパク質複合材料の構築等、環境・材料科学分野においてもタンパク質修飾技術の活用は多岐にわたる。

タンパク質はその立体構造と機能が密接に関連するため、近年では、位置特異的なタンパク質修飾手法の開発が重要な課題となっている。化学反応に基づく位置特異的な修飾手法に着目すると、最も一般的な方法として、活性化エステルによるリジン側鎖のアミド縮合やマレイミドによるシステイン側鎖とのマイケル付加が知られる。さらに、タンパク質N末端/C末端はタンパク質に普遍的に存在するため、位置特異的な化学修飾の標的として様々な手法が報告されている。例えば、N末端アミノ基を標的としたアシル化や還元的アルキル化、あるいはN末端アミノ酸残基との環化反応などが知られている。一方、アミノ酸残基や末端官能基等のタンパク質を構成するアミノ酸の化学修飾のほかにも、置換可能な補因子を有するタンパク質においては、化学修飾を施した補因子と交換することで、補因子特異的な機能性分子導入が可能である。

安定かつ容易に構築可能な官能基の活用は、タンパク質化学修飾の基本戦略である。アルキン－アジド環化付加(AAC)反応により形成されるトリアゾール環は、酸塩基・酸化還元あるいは酵素分解に対する高い安定性に加えて、アミド結合に類似した電子的・構造的特徴を有することから、タンパク質化学修飾に適した官能基と考えられる。銅(I)を触媒とするAAC (CuAAC)反応や、歪み促進型AAC (SPAAC)反応は、官能基選択性や生体直交性に加え、水中においても高い収率を与えることから、タンパク質化学修飾のツールとして広く活用されている。さらに、前述した位置特異的な化学修飾手法と組み合わせることで、AAC反応の優れた反応特性を活用した位置特異的なタンパク質修飾が期待される。

博士論文に関する研究では、タンパク質関連研究のさらなる発展に向け、トリアゾール結合形成を介したタンパク質N末端あるいは補因子特異的な修飾剤・修飾手法の開発を行った。

第一章ではタンパク質N末端への位置特異的アジド基導入に加え、銅イオンの配位によりCuAAC反応を促進する新たなアジド化試薬6-(アジドメチル)-2-ピリジンカルボアルデヒド (6AMPC)を用いた効率的な生体分子修飾手法を確立した。またピリジン母骨格への置換基導入によりCuAAC反応がさらに促進されることを見出した。第二章では新たなN末端特異的修飾剤として1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド (TA4C)誘導体を見出した。トリアゾール環を母骨格とする本修飾剤は、CuAAC反応やDimroth転位反応により簡便に調製可能である。またDimroth転位反応を用い、入手容易なアミン化合物を前駆体とした一段階での修飾剤合成、および同修飾剤を用いた一段階でのタンパク質N末端修飾を達成した。第三章では、Dimroth転位反応を用いたTA4C誘導体合成の改良に向け、固相合成を活用することで反応副生物を簡便に除く手法を確立した。本手法を用いることで、市販のアミン前駆体を出発物質とする簡便なタンパク質N末端修飾手法を確立した。第四章では、再構成法とCuAAC反応を組み合わせ、電子伝達ヘムタンパク質をカーボンナノチューブ側壁に修飾したヘムタンパク質－カーボンナノチューブ複合材料を構築した。活性中心ヘムを電極材料近傍に配向させることが可能な本手法は、円滑な電子伝達を促進し、バイオエレクトロニクスの高性能化が期待できる。

以上、本博士論文では、タンパク質関連研究のさらなる発展に向け、トリアゾール結合形成を活用したタンパク質N末端あるいはヘム補因子特異的な新しい修飾剤・修飾手法の開発について記述した。本研究は、タンパク質の化学修飾を介した、生命現象の解明等の基礎研究や抗体－薬剤複合体作成、バイオ電極構築等の応用研究の拡大に大きく寄与するものである。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　井上　望　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　（教授）	林　高史
	副 査　（教授）	桑畑　進
	副 査　（教授）	櫻井　英博
	副 査　（教授）	南方　聖司
	副 査　（教授）	今中　信人
	副 査　（教授）	宇山　浩
	副 査　（教授）	町田　憲一
	副 査　（教授）	能木　雅也　（産業科学研究所）
	副 査　（教授）	古澤　孝弘　（産業科学研究所）

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、タンパク質関連研究のさらなる発展に向け、トリアゾール結合形成を活用したタンパク質N末端あるいはヘム補因子特異的な新しい修飾剤・修飾手法の開発について記述したものである。本博士論文は序論と本論の計４章、および結論から構成され、その概要は以下の通りである。

序論では、タンパク質位置特異的な修飾の研究背景を踏まえ、本博士論文の目的と概要について記している。

第１章では、銅を触媒とするアルキンーアジド環化付加反応（CuAAC反応)を介したタンパク質N末端への位置特異的な機能性分子修飾手法の開発について記している。タンパク質N末端は多くのタンパク質において活用可能な修飾点であり、位置特異的な修飾手法の開拓が求められている。本申請者は、過去の知見をもとにした独自の分子設計により、N末端特異的なアジド基導入に加え、銅イオンの配位によりCuAAC反応を促進する新たなN末端修飾剤として6-(アジドメチル)-2-ピリジンカルボアルデヒド（6AMPC)を開発した。質量分析法を用いた解析から、本修飾剤によるアジド基導入がN末端特異的に進行することを明らかにした。また蛍光分子を用いた反応追跡から、6AMPCにより修飾したタンパク質において後続するCuAAC反応が促進されることを確認した。加えて、6AMPCの構造改変によりCuAAC反応のさらなる促進が可能であることも示した。さらに、本手法を用いたタンパク質N末端特異的な蛍光色素・アフィニティータグ・ポリマーの修飾を達成した。N末端特異的かつ効率的な生体分子修飾を可能とする本手法はケミカルバイオロジー、創薬化学やバイオ材料開発の観点から高く評価できる。

第２章では、一段階でのタンパク質N末端修飾を行う新たな修飾剤の開発について記している。Francisらによって報告された2-ピリジンカルボアルデヒド誘導体はN末端特異的な機能性分子修飾を可能とすることから有用であるが、一方で修飾剤調製に多段階の反応を要する点でさらなる改善が求められる。本申請者は種々の検討を踏まえ、新たなN末端特異的修飾剤としてトリアゾール環を母骨格とする1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド（TA4C)誘導体を見出した。本修飾剤は、CuAAC反応により簡便に調製可能であり、蛍光色素・アフィニティータグ・ポリマーを導入したTA4C修飾剤の合成とこれらを用いたタンパク質N末端修飾を達成した。加えて、TA4C誘導体に特有なDimroth転位反応を活用し、入手容易なアミン化合物を前駆体とした一段階での修飾剤合成、および同修飾剤を用いた一段階でのタンパク質N末端修飾に成功した。簡便かつ高収率での修飾剤合成、修飾剤の単離精製を必要としない本手法はケミカルバイオロジー、創薬化学やバイオ材料開発の観点から高く評価できる。

第３章では、第２章において確立したDimroth転位反応を用いたTA4C誘導体合成の改良について記している。本反応では副生成物としてアニリン誘導体が生じるため、in vivoでのタンパク質修飾などに向けてさらなる改善が求められる。本申請者は、固相合成を活用することで反応副生物を簡便に除去可能となることをめざし、反応前駆体をポリスチレン樹脂上に担持した反応剤を開発した。赤外分光測定ならびにX線光電子分光測定により樹脂上への反応前駆体の固定化を同定した。次に、本反応剤を用いて市販のアミン前駆体を出発物質とする固相Dimroth転位反応を実施し、遠心操作により反応副生物を含む樹脂を簡便に除くことで、高い純度のTA4C誘導体を得た。連続してタンパク質N末端修飾を行うことで、蛍光色素・アフィニティータグなどがN末端特異的に導入されたタンパク質の獲得に成功した。本手法を用いたタンパク質修飾は、煩雑な有機合成を一切必要としないため、生化

学・材料科学分野など有機合成をバックグラウンドに持たない研究者も容易に実施可能となる。簡便な修飾剤調製に着眼した本手法は、ケミカルバイオロジー、創薬化学やバイオ材料開発の観点からで高く評価できる。

第４章では、酸化還元タンパク質とカーボンナノナノチューブの複合化によるバイオ電極材料の構築について記している。酸化還元タンパク質－電極材料間の電子伝達の円滑化はバイオ電極の電極特性改善に重要な戦略である。本申請者は、活性中心に補因子ヘム*b*（プロトポルフィリンIX）を有するヘムタンパク質に着眼し、補因子配向性を制御した、カーボンナノチューブ側壁へのヘムタンパク質固定化を試みた。具体的には、電子伝達ヘムタンパク質シトクロムb_{562}（CYT)をモデルタンパク質に採用し、合成ヘムを用いた再構成法により、アジド基を補因子特異的に導入した再構成CYTを調製した。またラジカル反応を介して側壁にアルキン基を導入した単層カーボンナノチューブ（f-SWNT)を合成した。続いてCuAAC反応を用い再構成CYTおよびf-SWNTを複合化し、補因子ヘムがカーボンナノチューブ側壁に配向した複合体を調製した。得られた複合体について原子間力顕微鏡によるモルフォロジー観察、電気化学測定によるヘム補因子固定化の確認を行った。活性中心ヘムを電極材料近傍に配向させることが可能な本手法は、円滑な電子伝達を促進し、バイオエレクトロニクスへの応用が特に期待される。

結論では、本論文を総括し、本研究を通して得られた知見、明らかとなった結果についてまとめている。

以上のように、本論文はケミカルバイオロジー、創薬あるいはバイオエレクトロニクスを含む材料科学の発展に貢献する有用な研究結果をまとめたものであり、学術的に高く評価できる。

従って本論文は博士論文として価値あるものと認める。