

蛋白質の精製およびラベル化を同時に可能とする トレーサブル釣り竿分子の開発

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部（薬学系）
機能分子合成薬学分野
重永 章

1. はじめに

プロテオミクス分野における最も重要な基盤技術の一つとして、プロテオームからの標的蛋白質の精製技術が挙げられる。従来の精製法が標的蛋白質の量を指標としてきたのに対し、近年、標的蛋白質の活性を指標とした手法が注目されている。その一つとして、Activity Based Protein Profiling (ABPP)が挙げられる(図1)^[1]。この方法では、まず標的蛋白質の活性中心と共有結合を形成する阻害剤(標的蛋白質結合部位)にアルキンを導入した小分子をプロテオームへ添加する。すると、プロテオーム中の活性型標的蛋白質のみがこれと結合し、アルキニル化蛋白質となる。その後、アルキン部分へクリックケミストリーによりビオチン部位を導入し、アビジンカラムを用いて標的蛋白質を精製するという方法である。

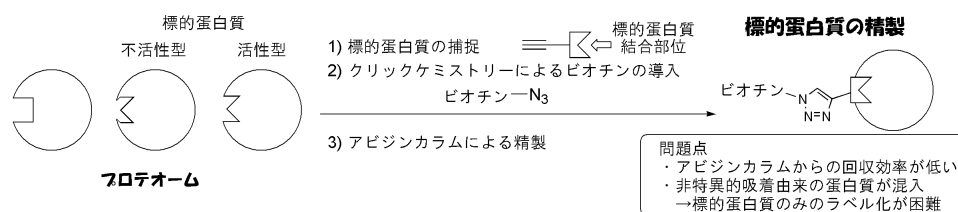


図1. 従来の ABPP を用いた蛋白質精製法 (ABPP: Activity based protein profiling)

アビジンカラム精製において、精製後の標的蛋白質に非特異的吸着由来の蛋白質が混入する場合があります。この際、カラム溶出液中の標的蛋白質のみをラベル化することは困難を極めます。さらに、ビオチン-アビジン間の結合は強固であるため、アビジンカラムからのビオチン修飾蛋白質の回収効率は往々にして低い。この問題点を克服するため、Cleavableリンカーの開発が盛んに行われている。Cleavableリンカーとは特定の条件下において切断可能なリンカーのことであり、これを標的蛋白質結合部位-ビオチン間へ導入し、アビジンカラムへの吸着後にこの部分を切断することにより効率的に蛋白質を回収する。これまで種々のCleavableリンカーが開発されているものの、これらの多くは切断にpH変化などを利用するため、その生理的条件下での安定性に疑問があった。

そこで本研究では、生理的条件下では切断されず、さらに切断後に生じる官能基を足がかりとした標的蛋白質のみの特異的修飾を可能とするリンカーの創成と、これを用いた標的蛋白質の高効率の精製・ラベル化法の確立を目指すこととした。

2. 方法

本研究では、生理的条件下では切断されず、さらに切断後に生じる官能基を足がかりとした標的蛋白質のみの特異的修飾を可能とするリンカー、すなわちトレーサブル釣り竿分子の創成と、これを用いた標的蛋白質の高効率の精製・ラベル化法の確立を目指すこととした(図2)。

我々はこれまで、刺激応答型アミノ酸、すなわち刺激にตอบสนองしてペプチド結合切断を誘起するアミノ酸の開発を行ってきた(図3)^[2-8]。この系では、刺激によるフェノール性水酸基上保護基の除去をトリガーとしてペプチド結合が切断される。本研究では、生理的条件下では除去困難な保護基を導入した刺激応答型アミノ酸を開発し、これを基盤とした釣り竿分子の開発を目指すこととした。

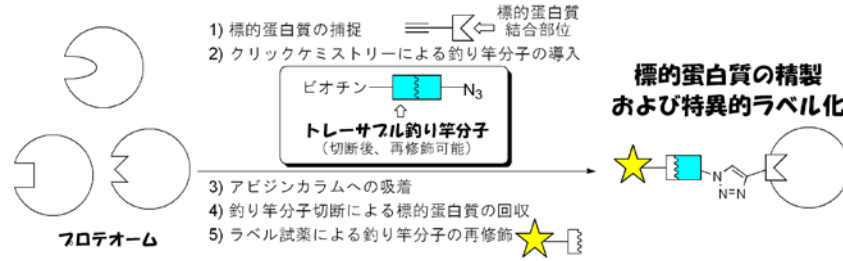


図2. 本研究の概要

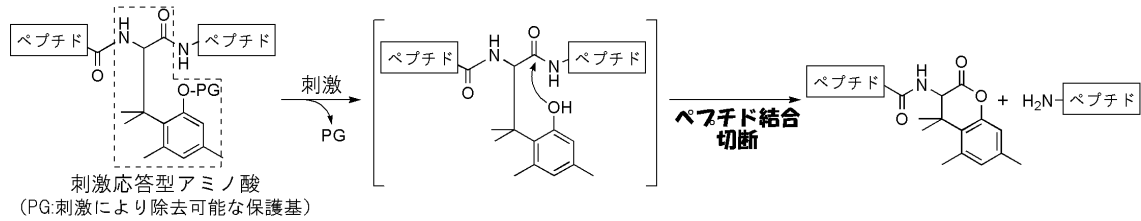


図3. 我々のこれまでの研究

分子設計を図4に示す。本研究ではN末端にビオチンを、C末端にアジドを有する釣り竿分子の合成を行うこととした。この際、生体内にはほとんど存在しないフッ素アニオンによる釣り竿分子切断を可能とするため、保護基としてTBDPS基を導入した刺激応答型アミノ酸を用いることとした。本研究では、まずABPPを利用して標的蛋白質上へアルキン部位を導入する。次に釣り竿分子とのクリック反応後、アジジンカラムへ吸着させる。続いてフッ素アニオン処理により釣り竿分子を切断し、アミノオキシ基が提示された標的蛋白質を得る。アミノオキシ基は生理的条件下においてアルデヒドと選択的に縮合するため、得られた蛋白質溶液にアルデヒド含有ラベル化試薬を加えることにより、標的蛋白質の特異的ラベル化が可能になるという設計である。

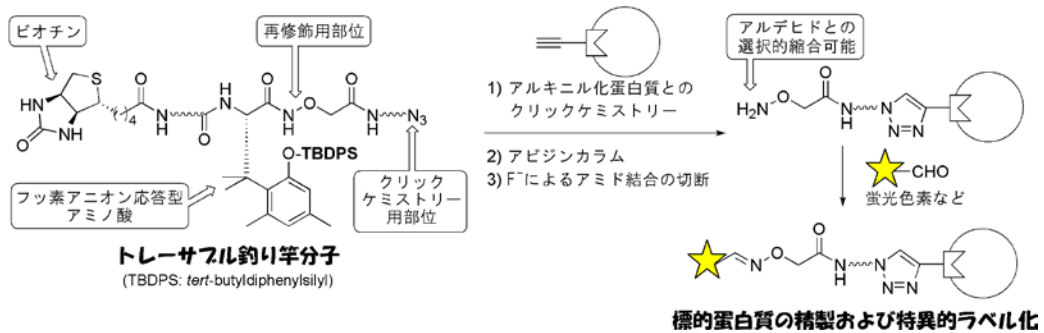


図4. トレーサブル釣り竿分子の分子設計

3. 結果

我々はまず、フッ素アニオン応答型アミノ酸誘導体**1**を合成することとした(図5)。しかし、フェノール**2**へのTBDPS基導入について種々検討したものの、目的とするシリル体**3**を高収率にて得ることは困難であった。そこでTBDPS基同様、フッ素アニオン処理により除去可能なシロキシベンジル基を導入した誘導体**4**を合成することとした。この結果、既知化合物**5**^[5]から出発し、6工程を経て目的とするFmocアミノ酸誘導体**4**を得ることに成功した。次にFmoc固相ペプチド合成法を用い、フッ素アニオン応答部位を導入したトレーサブル釣り竿分子**6**の合成を達成した。

続いて、アルキニル化蛋白質のモデルとしてアルキン含有ペプチド**7**を用い、トレーサブル釣り竿分子とのクリック反応、フッ素アニオン処理によるアミド結合切断、および生じたアミノオキシ基のラベル化について検討した(図6)。まず釣り竿分子**6**とペプチド**7**を水系溶媒中、クリック反応に付したところ、コンジュゲート**8**が高収率にて得られた。続いてコンジュゲート**8**をフッ素アニオンで処理した後、ラベル化試薬として3-プロモベンズアルデヒドを加えたところ、アミド結合切断成績体**9**に加え、切断後にラベル化されたモデルペプチド**10**が高純度で得られた。以上の結果から、トレーサブル釣り竿分子のアルキンとのクリック反応結合、フッ

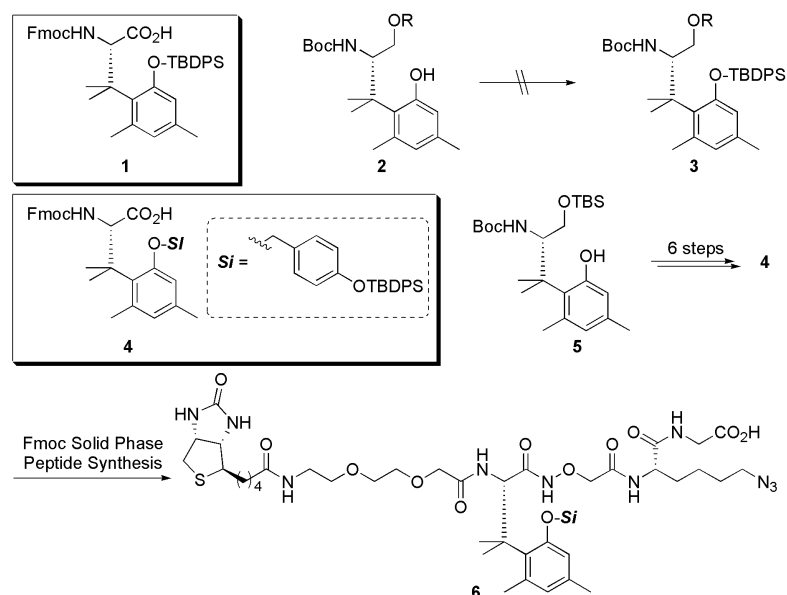


図5. トレーサブル釣り竿分子の合成

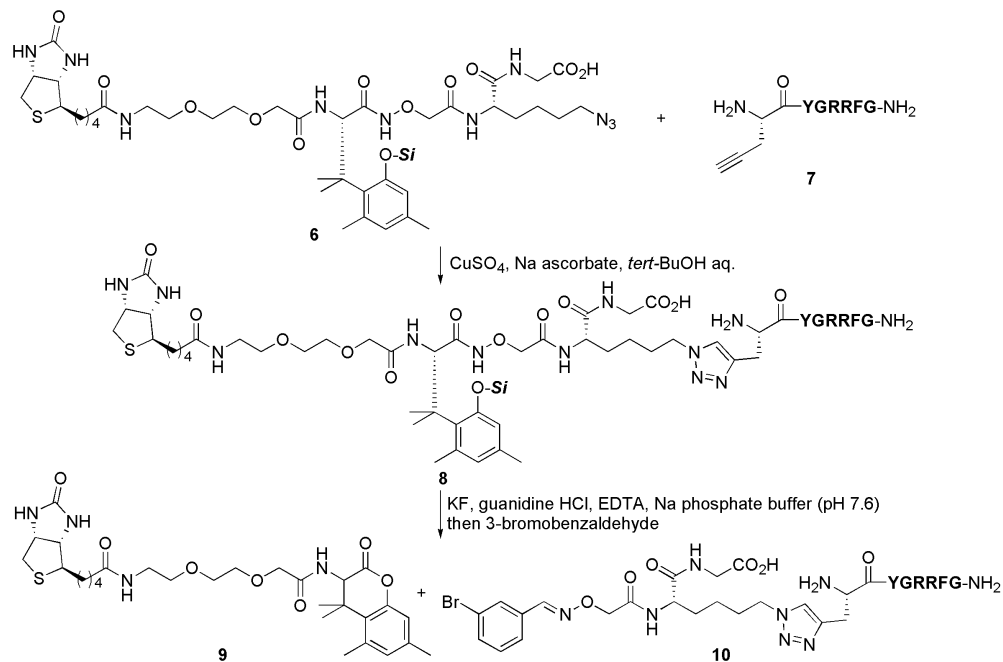


図6. モデルペプチドを用いた実験

素アニオン処理による切断、および切断成績体の選択的ラベル化が進行することが明らかとなった。現在、アルキニル化蛋白質を用いた同様の実験について、鋭意検討を行っている。

4. まとめ

我々はトレーサブル釣り竿分子の合成と、これを用いたモデルペプチドのラベル化に成功した。今後はトレーサブル釣り竿分子を用いた蛋白質精製・ラベル化法を確立するとともに、本手法を真に実用的な方法論へと昇華させていきたい。

5. 参考文献

- [1] Cravatt, B. F. et al. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383. [2] Shigenaga, A. et al. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1929. [3] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2212. [4] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2525. [5] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868. [6] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7367. [7] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3984. [8] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8879.