

システイン化学修飾によるタパク質機能解析・制御法の開発

善明, 直輝

<https://hdl.handle.net/2324/4784552>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)



氏 名 : 善明 直輝

論文題名 : システイン化学修飾によるタンパク質機能解析・制御法の開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

【序論】

生体内の重要な役割を担うタンパク質の機能解析において、特異的な化学修飾法は標的タンパク質の可視化・機能制御が可能なため有用な手法である。これまでも多くの手法が開発されてきたが、標的タンパク質の局在・機能への悪影響や、標的選択性の低さ、事前準備が困難であることなどから、適用範囲が限られているものが多い。これらの問題を解消することを目的として、本研究では Cys (システイン) 残基を標的としたタンパク質高選択的なラベル化法およびタンパク質切断を誘起する新規 Cys 化学修飾法の開発を行った。

【結果および考察】

タンパク質局在解析のための CysHis タグケミカルラベル化法の最適化

高解像度解析を行う電子顕微鏡イメージングにおいて従来の免疫電顕法では標識に用いる抗体の分子サイズ(15 kDa)の大きさから、標的とずれた位置で標識されてしまう問題が生じていた。当研究室で開発したアスパラギン酸連続配列タグと Zn 錯体プローブ(< 5 kDa)の特異的相互作用を用いた標識法「Reactive tag System」によって、より正確な位置情報が得られるようになった。本研究では、このタグ・プローブペアと干渉しない CysHis タグ・Ni 錯体プローブペアを開発することにした。これにより、タンパク質複合体のように近い位置に存在する異なる 2 種類のタンパク質を同時にラベル化することが可能となる(Fig. 1)。

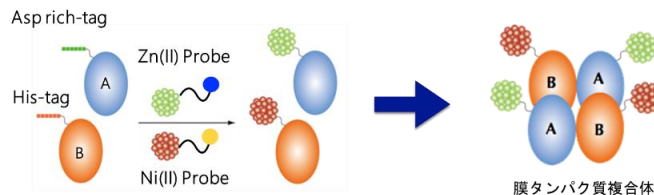


Figure 1. High resolution Dual color imaging with His-tag/Ni(II) and Asp-rich tag/Zn(II) probe pair.

高い求電子性を有するクロロアセトアミドを反応基としてタグ配列・プローブ構造の最適化を行い、H5CH5-tag/6-2Ni(II)のペアが高いラベル化効率を示すことを明らかにした。その後、より穏やかな求電子性反応基を検討することで、速いラベル化速度と高いラベル化特異性を併せ持つ DMAC-CF₃ 型の 12-2Ni(II)を見出した(vsH5CH5-tag: $t_{1/2}$ = 16.7 min, Fig. 2)。その後、細胞イメージングに適用可能であること、アスパラギン酸連続配列タグ/Zn 錯体プローブペアと干渉しないことが確かめられた。今後 TEM イメージングへの適用とタンパク質複合体解析への応用が期待できる。

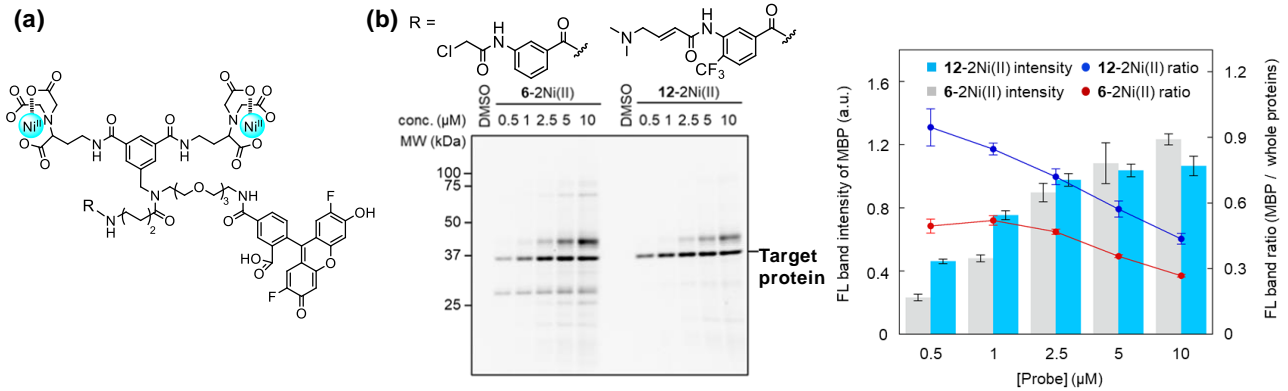


Figure 2. (a) Optimized structure of Ni(II) complex probe for labeling of CysHis-tag. (b) Evaluation of off-target labeling activity of 6-2Ni(II) and 12-2Ni(II) in *E. coli* lysate.

タンパク質配列切断が可能な新規システイン化学修飾法の探索

タンパク質を切断することでその機能を制御する手法は報告例が少なく、創薬や細胞におけるケミカルバイオロジー領域においてほとんど利用されてこなかった。そこで本研究では、タンパク質配列の迅速な切断を誘起する化学修飾を見出すことにした。

Cys 残基を有するタンパク質配列の切断効率を高感度かつ簡便に評価する蛍光アッセイ法を構築し、システイン側鎖の S-ホルミル化によりタンパク質のアミド結合が切断されることを見出した (Fig.3)。配列選択性について評価し、Cys 残基の隣にアスパラギン酸・アスパラギンを有する DC 配列、NC 配列で切断効率が大きく向上することを明らかにした。また、S-ホルミル化分子のホルミル基周辺に嵩高い置換基を導入することで、水中安定性の向上と広範にわたる Cys 反応性の調節を可能とした。

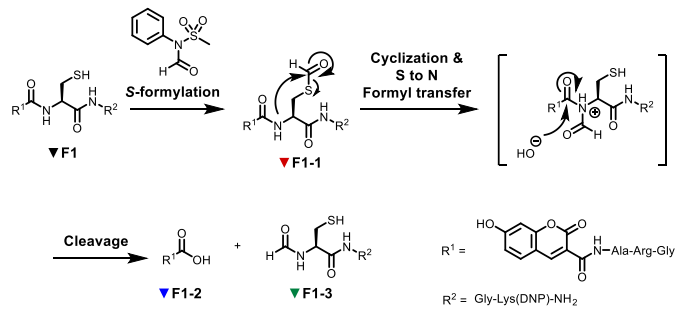


Figure 3. Plausible Mechanism of Cleavage peptide bond through S-formylation..

S-ホルミル化を利用した標的タンパク質の部位選択的切断法の検討

論文提出者の見出した S-ホルミル化を用いた標的タンパク質の部位選択的な切断法を確立できれば、タンパク質の機能解析および薬剤開発において有用なケミカルツールとなり得る。

タンパク質切断への適用において、S-ホルミル化後に求核性の高いチオール種を添加することで切断反応が促進可能であることを見出した。また、親和性を持つアスパラギン連続配列タグ/Zn 錯体プローブペアの反応部位として、チューニングにより Cys 反応性を抑えた S-ホルミル化分子を導入したプローブを利用することで、タグ上の DC 配列を迅速かつ配列選択的に切断可能であることを示した。今後、夾雑系・細胞表面での選択的なタンパク質切断を検討していく。

以上、本研究では標的タンパク質の選択的なラベル化・機能制御に利用可能な化学修飾法の開発を行い、有用な機能解析ケミカルツールとなり得ることを示した。