

濱島航は、「生細胞内において標的タンパク質を選択的に修飾する化学触媒の開発」というタイトルで、以下の研究を行った。

## 背景と目的

タンパク質翻訳後修飾は、様々な生体機能を制御する重要な内在性化学修飾である。20 種類のアミノ酸から構成されるタンパク質は、アセチル化やマロニル化、メチル化、リン酸化、脂肪酸化など様々な翻訳後修飾を受けることで、多様な機能を獲得し複雑な生体機能制御を実現している。例えば、クロマチンを構成するタンパク質であるヒストンはリジン残基のアセチル化を介して遺伝子発現の ON-OFF を制御していることが知られている。このような化学修飾を人為的に導入する反応はエピジェネティックツールとして、あるいは医療への応用にも期待される有用な反応であると言える。しかしながら、標的タンパク質選択的、かつ残基選択的に生細胞内で人為的な化学修飾を導入することは容易ではない。

そこで濱島は、生細胞内において標的タンパク質を選択的に修飾する化学触媒の開発とそれによる機能発現を目指し、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) をモデルタンパク質として、細胞内において eDHFR の特定のリジン残基を選択的にアシル化修飾できる触媒系の確立に取り組んだ。

## 方法と結果

触媒として、アシル CoA 活性化触媒 DSH と eDHFR 選択的結合リガンドであるトリメトプリム (TMP) のハイブリッド分子を用いた。また、アシル化剤として、対応するアシル基を有するチオエステルを用いた。

想定される反応機構を図 1 に示す。触媒分子は分子内に持つチオール基を介してアシル化剤と動的なチオール・チオエステル交換を行い目的のアシル基を分子内に取り込む。触媒分子内に取り込まれたアシル基は分子内反応により活性なアシルピリジニウムイオンを生成する。また、触媒分子は結合リガンド部位を介し

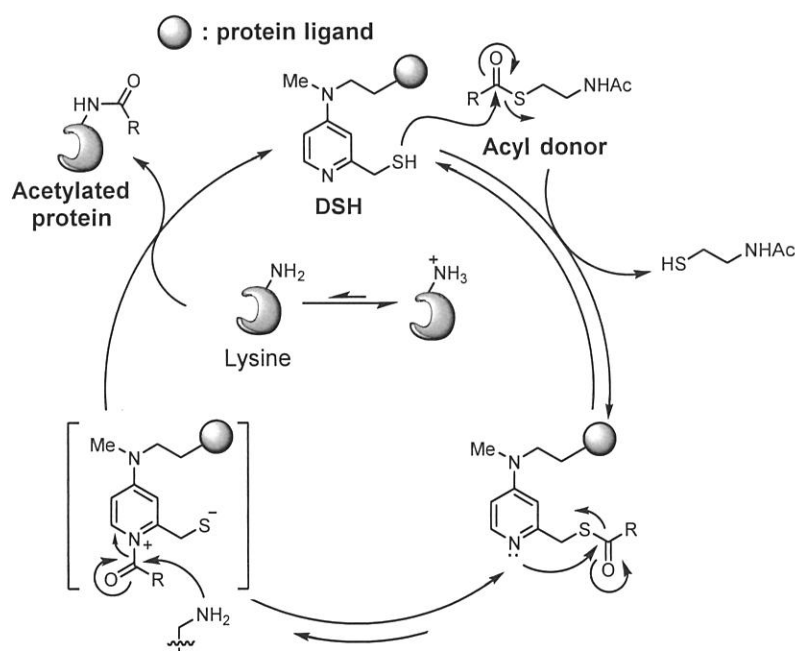


図 1. DSH アシル化システムの想定反応機構

て標的タンパク質を選択的に認識し、近接効果により近傍に存在するリジン残基選択的にアシル基の転移反応を行い、目的のアシル化タンパク質を生成する。

当研究室は、この DSH アシル化システムを用いたヒストンの残基選択的なアシル化反応を達成している (*J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 7568.) が、これは in-vitro での反応に留まっていた。そこで濱島は、標的タンパク質リジン残基の選択的なアシル化反応を生細胞内において実現する触媒の開発を目標として研究に取り組んだ。

検討の結果、触媒として用いている DSH は中性緩衝液中で容易に酸化されジスルフィド二量体を形成することが判明した。酸化的二量体 DSSD は分子量 1000 以上の分子であることから、触媒の細胞膜透過性の低下が細胞内反応を妨げている可能性が懸念された。

そこで、触媒の酸化的二量体化を防ぐ新たなデザインとして DSSMe を設計した (図 2)。DSSMe は DSH

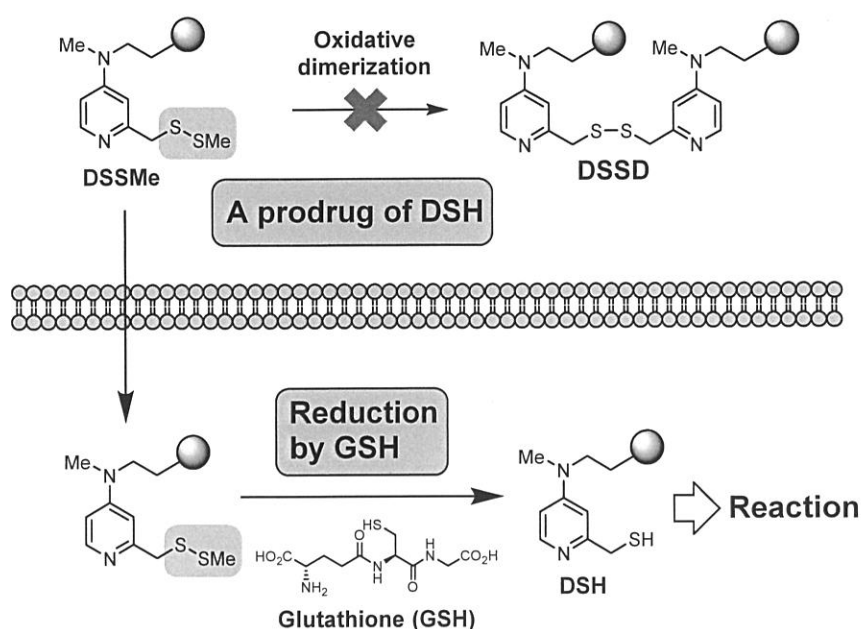


図 2. DSSMe の反応デザイン

のチオール基をメチルジスルフィドで保護してプロドラッグ化したものである。ジスルフィド保護により酸化的二量体化を防ぐことで、細胞外の中性培地中でも安定に存在し、細胞膜透過を助けることが想定される。また、細胞内には数 mM レベルでグルタチオン (GSH) が存在することが知られており、DSSMe は細胞内に入ると速やかにグルタチオンによってジスルフィド部位が還元され DSH を生成することが期待される。

新たな触媒 TMP-DSSMe とアセチル化剤 NAC-Ac (図 3) を用いて、細胞内発現 eDHFR のアセチル化反応に取り組んだところ、リガンド結合部位近傍に位置する K32 選択的なアセチル化反応が進行することが分かった。細胞内におけるタンパク質間選択性についても確認したところ、本反応は標的タンパク

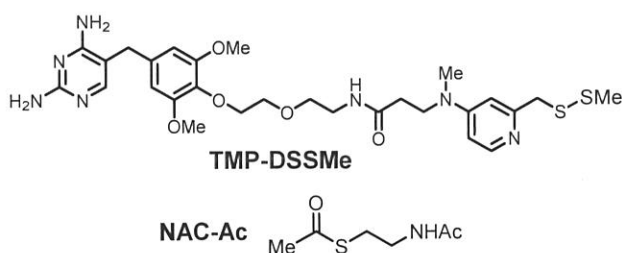


図 3. 触媒 TMP-DSSMe とアセチル化剤 NAC-Ac

質選択的に進行することが分かった。また、用いるアシル化剤のアシル基を変えることで、マロニル化やアジドアセチル化のような異なる細胞内アシル化反応にも適用可能であることを見出した。

さらに、タンパク質一般性を評価する目的で別のタンパク質・リガンドペアを用いた細胞内アシル化反応にも取り組み、Halotag や内在性タンパク質である HSP90 の細胞内アセチル化反応も達成した。今後はヒストンのアセチル化のような生理学的に意義あるアシル化修飾の人為的な導入に応用されることが期待される。

以上の業績は、標的タンパク質選択的なリジン残基の触媒的アシル化反応を細胞内において初めて達成したものであり、博士 (薬科学) の学位論文として合格と認められる。