

博士論文（要約）

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

濱島 航

【目的】

タンパク質翻訳後修飾 (PTM) 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。一方、非内在性化学修飾も、タンパク質機能解析や機能付与において有用な意義を持つ。しかしながら、このような化学修飾を、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に導入することは容易ではない。私は、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】

触媒として、当研究室で開発したアシル CoA 活性化触媒 (DSH¹) 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 Fig 1 に示す。

触媒分子はアシル化剤と動的なチオール・チオエステル交換を行い、分子内にアシル基を取り込む。また、触媒分子は結合リガンド部位を介して標的タン

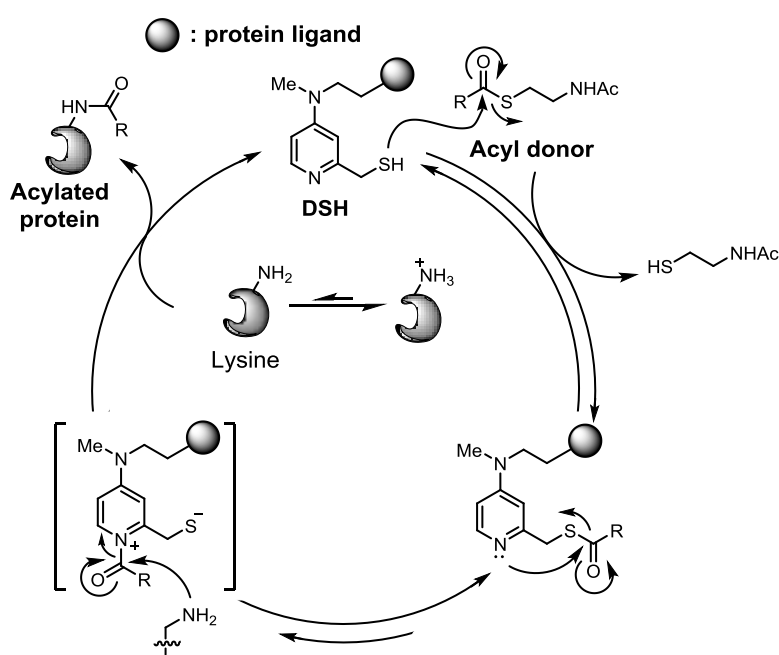


Fig 1. Reaction design

パク質を選択的に認識する。触媒分子内で活性化されたアシル基は近接効果により標的タンパク質内の近傍に存在するリジン残基選択的に反応し、目的のアシル化タンパク質を生成する。このような触媒反応の生細胞内での実現を目指し、実験に取り組んだ。

【実験・結果】

リンカー長の異なる触媒分子 TMP-DSH (S, M, L) を合成し、触媒分子の構造最適化を行った。単離精製した大腸菌リコンビナント eDHFR-GFP に対し各 TMP-DSH、アシル化剤としてアセチル CoA および還元剤として TCEP を添加し中性緩衝液中において反応に付した後、アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した (Fig 2)。その結果、中リンカーの触媒 TMP-M-DSH が最も高い反応性を示すことが分かった。

LC-MS/MS による反応収率の解析を行ったところ、32 番目のリジン残基 (K32) のアセチル化は、触媒非存在下では 0.5%であったのに対し、TMP-M-DSH の添加により 93.7%まで促

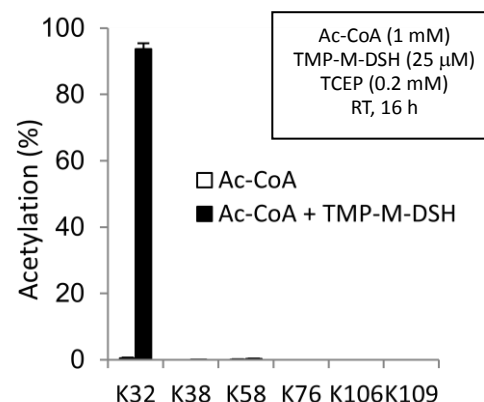
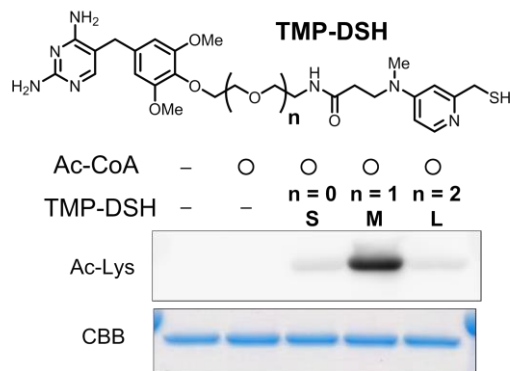


Fig 2. Optimization of linker length

Fig 3. Acetylation at each lysine

進されることが分かった (Fig 3)。また、eDHFR は 6 つのリジン残基を持つが、K32 以外のリジン残基についてはいずれもほとんどアセチル化の進行は確認されず、高い位置選択性を有することが分かった。触媒結合部位と各リジン残基の位置関係を確認するため、TMP と同じ結合部位に結合する低分子メトトレキサートと eDHFR の共結晶 X 線構造解析結果を参照したところ、最も高い収率を示した K32 はリガンド結合部位の近傍に位置していることが分かった。

続いて、同反応の細胞内適用に取り組んだ。HEK293T 細胞に eDHFR-GFP を発現させ、TMP-M-DSH およびアセチル化剤としてアセチル CoA を加えて反応を行ったが、全くアセチル化が進行しなかった。一方で、アセチル CoA の部分構造である NAC-Ac を用いたところ、K32 のアセチル化が 11%程度の収率で進行した (Fig 4)。これは、細胞膜透過型のアセチル化剤を用いることが細胞内反応に必須であることを示唆している。また、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 以上の分子であり、細胞膜透過を妨げている可能性が懸念されるため、触媒デザインの改良に取り組むことにした。

細胞反応用の触媒として DSH のチオール基をプロドラッグ化した DSSMe を設計した (Fig 5)。DSSMe はジスルフィド保護により酸化的二量体化が抑えられ、細胞外の中性培地中において安定に存在する。また、細胞内には数 mM レベルでグルタチオンが存在することが知られており、細胞内

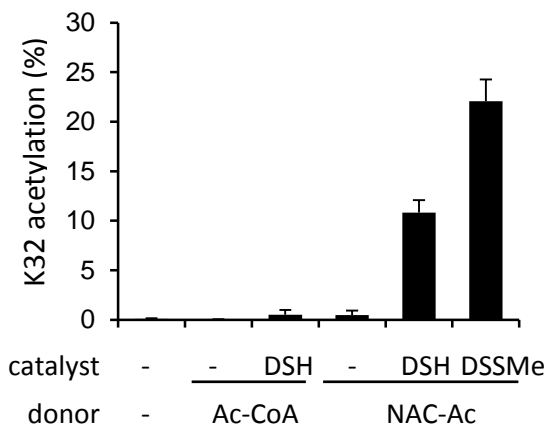
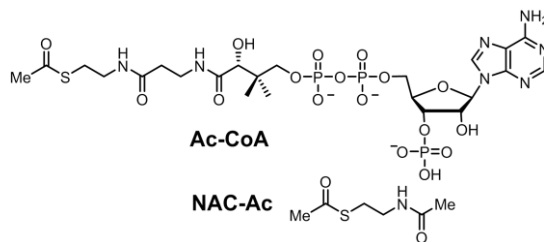


Fig 4. Acetylation in living cell

に入ると速やかに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。

TMP-M-DSSMe を用いて細胞内反応を行ったところ、およそ 2 倍の収率向上が見られ、22%程度の収率で K32 のアセチル化が進行した (Fig 4)。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も可能である

ことが分かった。マロニル化反応を用いて細胞内アシル化反応のタンパク質間選択性を評価したところ、標的タンパク質選択的にアシル化反応が進行することが分かった (Fig 5)。

【総括】

私は、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に取り組み、標的タンパク質選択的、かつ残基選択的に進行するアシル化触媒系を見出した。現在は、別のアシル基や異なるタンパク質への反応適用を検討している。本結果は、化学触媒による細胞内タンパク質修飾を通じた細胞機能制御に向けて重要な知見であると考えている。

【文献】

1. Amamoto, Y.; Aoi, Y.; Nagashima, N.; Suto, H.; Yoshidome, D.; Arimura, Y.; Osakabe, A.; Kato, D.; Kurumizaka, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7568.

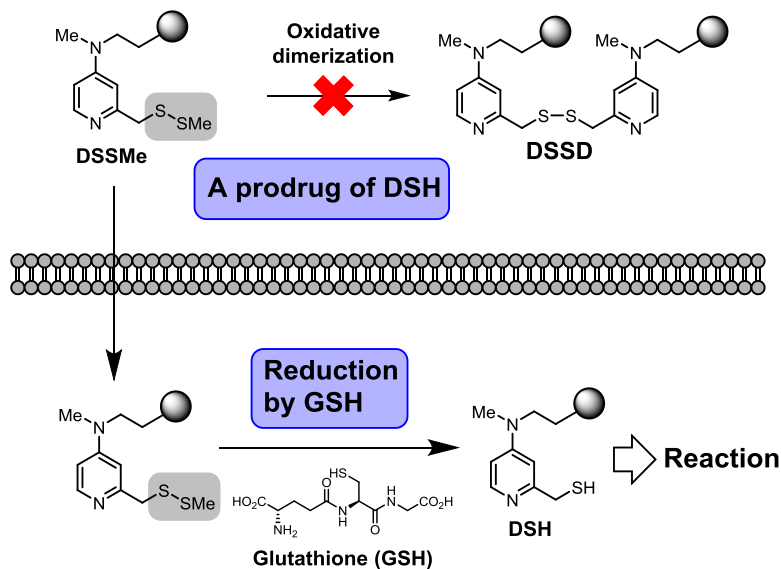


Fig 5. Catalyst design for in-cell acylation

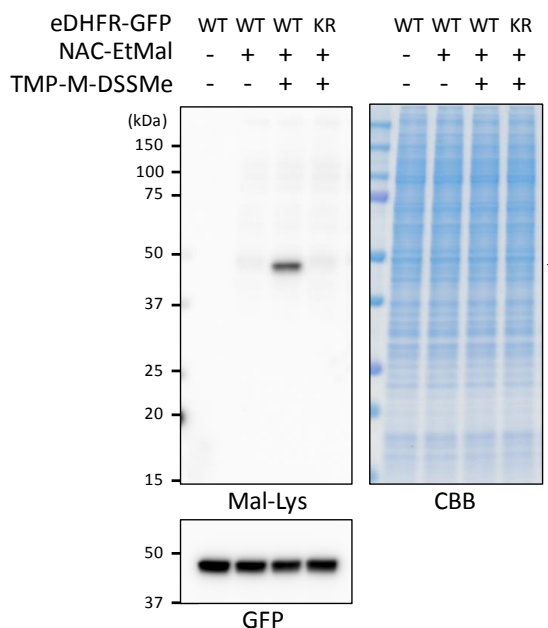


Fig 6. Protein selectivity in living cell