

博士論文

**Applications of Organometallics
for Total Chemical Protein Synthesis**

(タンパク質化学合成法における有機金属化合物の応用)

加茂 直己

1. 緒言

タンパク質は 20 種類のアミノ酸から構成されており、酵素などにより翻訳後修飾が施されることでその構造や動態を大きく変化させる。また特定のタンパク質上での修飾の制御が異常になることで病気の発症につながるとされている。各修飾の機能を明らかにするには部位特異的に翻訳後修飾が導入された標的タンパク質を調製する必要がある。タンパク質化学合成法は遺伝子工学的手法に比べ多様な修飾アミノ酸を導入でき、タンパク質の機能解析において強力なツールである。この手法は固相合成法により標的タンパク質の断片を合成した後、ペプチド連結反応を繰り返すことで全長のタンパク質を得る。広く一般的に用いられている連結法は、C 末端のチオエステルと N 末端のシステイン間の反応を利用した Native Chemical Ligation (NCL) 法である^[1]。これにより 100 種類以上のタンパク質が化学的に合成されてきたが、以下の問題点が挙げられた。1. 化学合成タンパク質に導入可能な機能性分子の種類に制限がある点。2. NCL 法による連結部位によっては副反応が生じる点。3. 200 残基を超えるような長鎖タンパク質を合成する場合、工程数の増加に伴う全収率の低下と煩雑な実験操作が生じる点。したがってより多様なタンパク質を合成しその機能を解明するためにはこれらの問題点を解決する必要がある。

近年、遷移金属錯体を活用したタンパク質上での反応が注目を集めている。これまでタンパク質上での鈴木-宮浦カップリングや^[2]、Tsuji-Trost 反応を用いたラベリング反応^[3]や金属錯体を用いたタンパク質上の保護基の選択的な脱保護^[4]が報告されてきた。このようにユニークな反応性をもたらす遷移金属錯体をタンパク質化学合成に応用することを考えた。

本博士論文では有機遷移金属化合物を用いたより効率的なタンパク質化学合成法を提案する。第 2 章では立体障害の異なるシリル保護アルキンを用いた選択的ラベリング法について述べる。第 3 章では Pd 錯体を用いた効率的な Asp-Cys 間での NCL 法の開発について述べる。第 4 章、第 5 章では Pd 錯体又は Ru 触媒を用いて複数に分割されたペプチド断片を精製を介さずに One-pot で連結することでより多種類の翻訳後修飾入りの標的タンパク質を容易に調製する手法について述べる(Figure 1)。

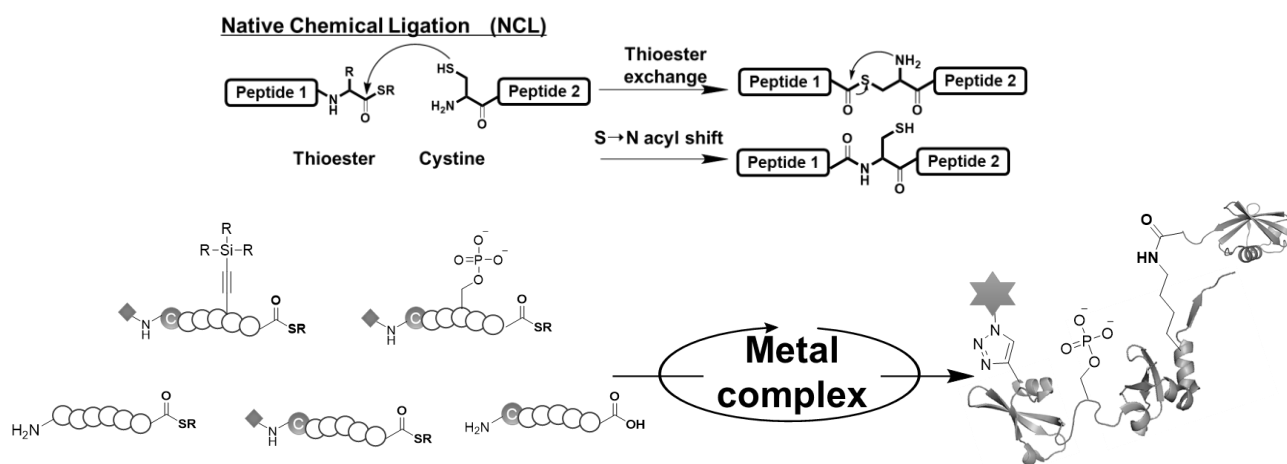
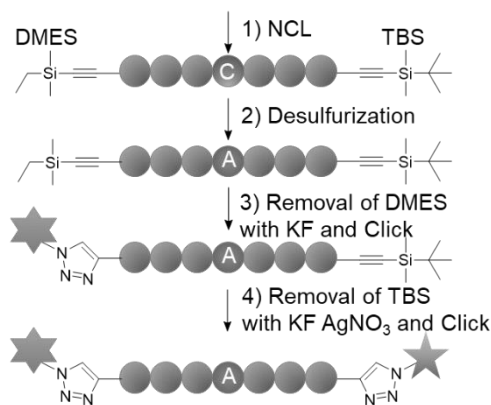


Figure 1. Reaction mechanism of NCL and applications of organometallics to create multi-functionalized proteins.

2. シリル保護アルキンを用いた化学合成タンパク質への機能性分子導入法の開発

NCL によるペプチド連結に用いるシステイン残基はタンパク質中では存在率が低いため、より豊富に存在するアラニン残基へと変換する脱硫反応^[5]を用いることで幅広い種類のタンパク質が合成されてきた。しかし、脱硫反応の系中ではラジカルが生じアルキンなどの様々な機能性分子がこの反応条件で副反応を起こしてしまう^[6]。1 価の銅錯体を用いた Click 反応による機能性分子の導入を指向し、アルキンの末端をシリル基によって保護する手法を考案した(Scheme 1)。

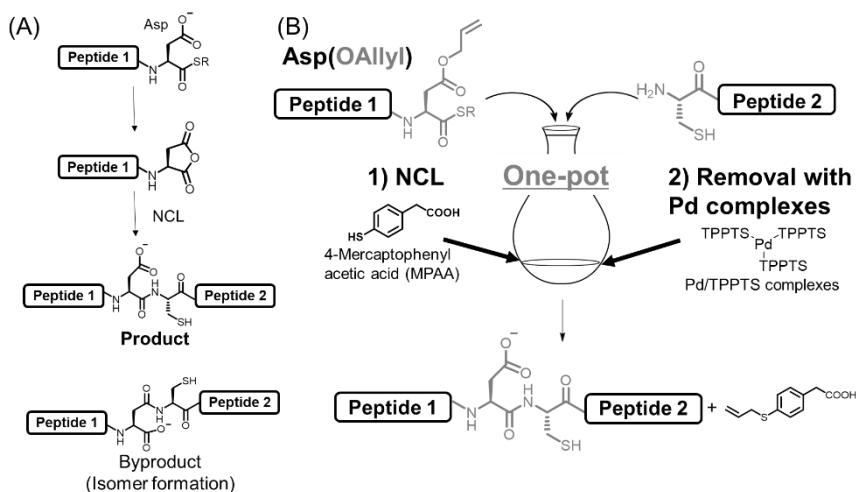
初めに dimethylethylsilyl(DMES) 基または tert-butyl dimethylsilyl(TBS)基によって保護されたアルキンを含むペプチドを調製した。このペプチドを脱硫反応条件下で反応させたところ、シリル保護アルキンに対して副反応が進行することなく目的とするアラニンへと変換されたペプチドを収率 60-80%で得た。更にシリル基の脱保護条件を検討したところ DMES 基はフッ化カリウムのみによって外れ TBS 基はフッ化カリウムに加え硝酸銀を組み合わせることによって外れ、シリル基の立体障害の差によって脱保護の直行性が生じたことが分かった。最後に、この2つのシリル保護アルキンを Transition protein 1 (TP1)と呼ばれるタンパク質に導入し、NCL によるペプチド連結と脱硫反応を行った後、選択的にシリル基を脱保護しヒュスゲン環化付加反応によって蛍光色素である Cy3 と Cy5 を部位特異的に導入することに成功した。この技術を用いることで光応答性クロスリンカーなど他のラジカルに耐えない分子も導入可能であると考えられる。



Scheme 1. Silyl-protected alkynes.

3. Pd 錯体を用いた効率的な Asp-Cys 間での NCL 法の開発

NCL においてチオエステルに隣接するアミノ酸が Asp の場合、NCL 中で 36%の割合で異性体が副生成物として観察される^[7](Scheme 2A)。この副生成物を抑制するため Asp の側鎖にベンジル基が導入された^[8](Scheme 2B)、脱保護前に反応液を精製する必要があり、さらに強力な還元剤を用いて脱保護を行うため様々な副反応が生じる。

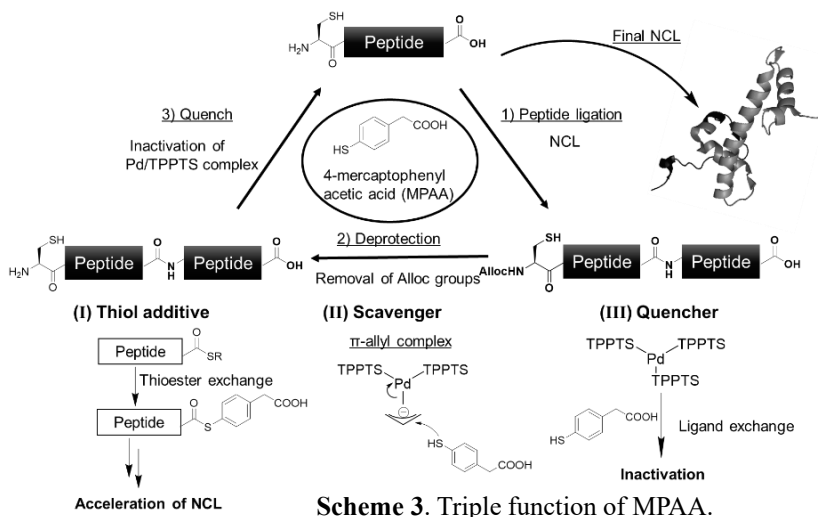


Scheme 2. (A) Isomer linkage during NCL between Asp and Cys. (B) NCL between allyl-protected Asp and Cys, followed by allyl removal.

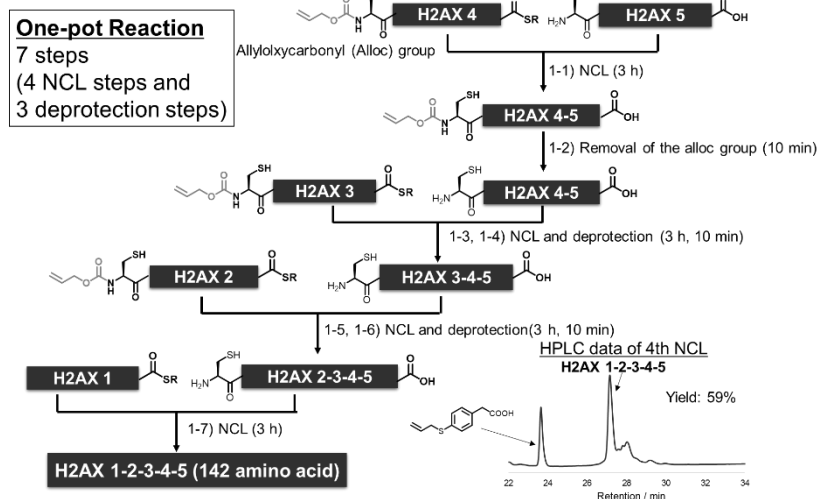
そこで Asp の保護基としてアリル基を用いる方法を考案した。この保護基の導入により NCL 中での異性体は観察されず、また脱保護については中性条件で 0 価の Pd 錯体と NCL 反応を促進するチオール触媒である MPAAs を π -allyl 錯体に対する求核剤として用いることで穏和な条件下で外すことに成功した。結果として Asp-Cys 間の NCL とアリル基の脱保護という 2 つの反応を One-pot で行い、88%という高い単離収率で反応が進行することを確認した。最後にカルモジュリンの機能を制御する PEP-19(62 残基)というタンパク質を本手法による化学合成し、その汎用性を示した。

4. チオフェノール分子の Triple Function を用いた Pd 錯体による複数ペプチド断片 One-pot 連結法

長鎖タンパク質を合成する場合多くのペプチド断片を連結する必要があるが、多段階反応に伴う精製回数の増加により全収率が低下し合成完了までに多大の時間を要する。この問題を解決するため、精製ステップを介さずにペプチド断片を One-pot で連結する手法が求められてきた。One-pot ペプチド連結反応を行うためには NCL 法によるペプチドの連結と N 末端システインの保護基の脱保護を連続的に行う必要がある。用いる保護基の条件としては 1. 迅速に且つ定量的に脱保護反応が進行すること、2. 用いた脱保護剤は次の NCL 反応開始前には不活性化されていることの 2 つの条件を満たす必要がある。そこでシステインの保護基として allyloxycarbonyl (alloc) 基の導入を検討した。これは同じ機構で外れるアリル基が NCL 条件下で 2 当量の Pd/3,3',3''-phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid) trisodium salt (TPPTS) 錯体を用いて 10 分で定量的に脱保護が進行したためである。本研究においては新たに NCL 反応開始前の Pd 錯体の不活性化について検討する必要がある。



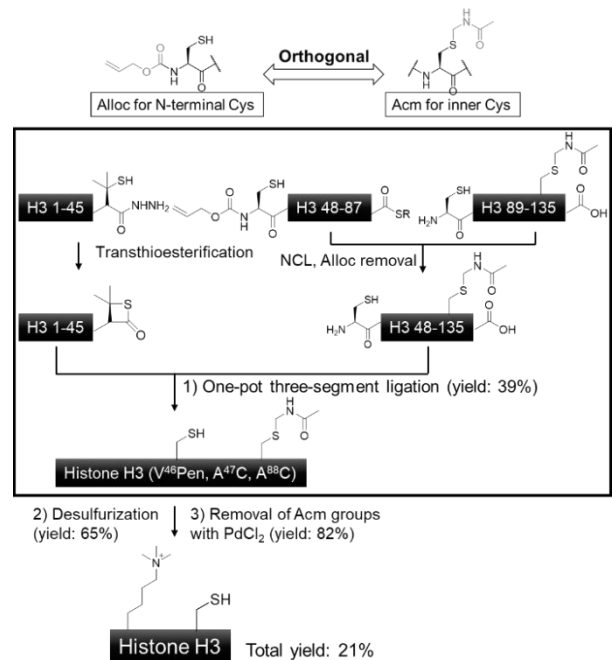
脱保護後の Pd/TPPTS 錯体を不活性化するうえで、チオール分子の金属錯体に対する "Poisoning Effect" に注目した。NCL 条件下では連結反応を加速させるチオール添加剤として高濃度の 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA) が含まれており、この過剰量の MPAA が alloc 基脱保護後、Pd/TPPTS 錯体を不活性化すると考えた。



本研究では MPAA という 1 つのチオフェノール分子に対し 1) NCL 反応を加速させるチオール添加剤、2) 脱保護中間体として生成する π -allyl Pd 錯体に対する補足剤、3) alloc 基脱保護後の Pd/TPPTS 錯体の不活性化剤といった 3 つの機能を付与することで効率的なペプチド断片 One-pot 連結を達成できると考えた (Scheme 3)。

本研究で提唱する手法の有用性を示すため、142 残基から構成されるヒストン H2AX の化学合成を行った。全長のタンパク質を 5 つのペプチド断片へと分割し、Figure 2 に示す反応スキームに従い NCL と Pd/TPPTS 錯体による alloc 基の脱保護、MPAA による Pd 錯体の不活性化の 3 つのサイクルを繰り返すことで世界初 5 つに分割された断片を One-pot で連結することに成功した。従来法では 10 日以上要する工程がわずか 2 日で完了し単離収率 59% で最終生成物を得ることができ、7 つの各ステップが 93% の効率で進行したことが分かった。この収率は他の One-pot 連結法に比べても高い値を示している^[9]。

続いて9番目のリシンにトリメチル化(H3K9me3)が導入されたヒストン H3 の化学合成を行った。この翻訳後修飾はヘテロクロマチン領域に局在する修飾で遺伝子転写不活性化につながるとされている。H3 には内在のシステイン残基が存在し NCL 後のシステインをアラニンへと変換する脱硫反応における副反応を防ぐため、acetamidomethyl (acm)基によって保護する必要がある。先行研究より 2 価の Pd 錯体を用いてこの保護基が外れることが報告されているが、alloc 基を外す場合には Tsuji-Trost 反応に基づき立体障害の大きいホスフィン分子によって配位された 0 価の Pd 錯体がいられる。実際に acm 基存在下で Pd/TPPTS 錯体を添加したところ、alloc 基が選択的に脱保護された (Scheme 4)。続く NCL 反応と脱硫反応、2 価 Pd 錯体による acm 基の脱保護を行い、標的とする H3K9me3 を含む H3 を全収率 21%で得た。本結果より Pd 錯体を用いたペプチド断片 One-pot 連結法がシステイン含有タンパク質の化学合成にも適用可能であることが分かった。



Scheme 4. Chemical synthesis of histone H3.

5. Ru 触媒を用いたリンカーヒストン H1.2 のヘテロクロマチンプロテイン 1 α (HP1 α)の全合成

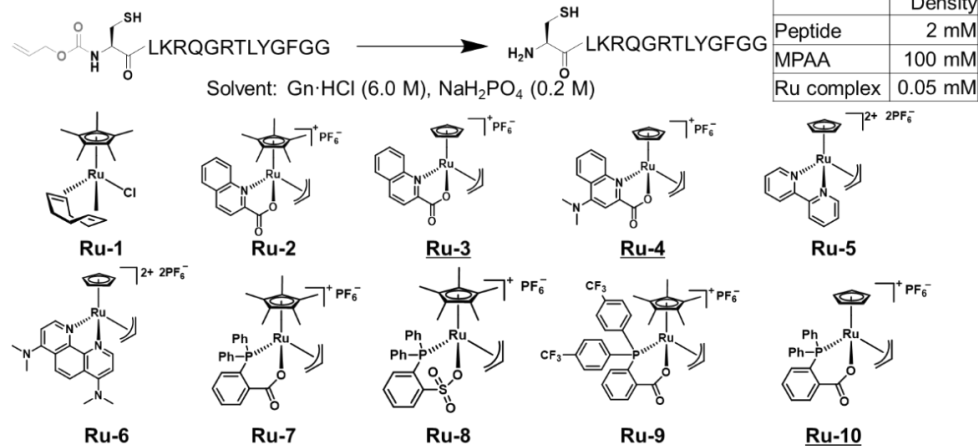


Figure 3. Candidates of Ru catalysts for the alloc deprotection.

NCL 条件下で alloc 基を外す際には 2 当量の Pd/TPPTS 錯体が必要であり、触媒量での脱保護反応は困難であった。One-pot ペプチド連結反応を達成する上で MPAA の不活性化剤としての役割は重要であるが、同時に本来の Pd/TPPTS 錯体の活性に悪影響を及ぼすと考えられる。実際にタンパク質上での金属錯体を用いた水中でのクロスカップリング反応や脱保護反応は 10 当量以上の金属錯体を要し^{[2],[4]}、触媒回転を達成することは困難とされてきた。

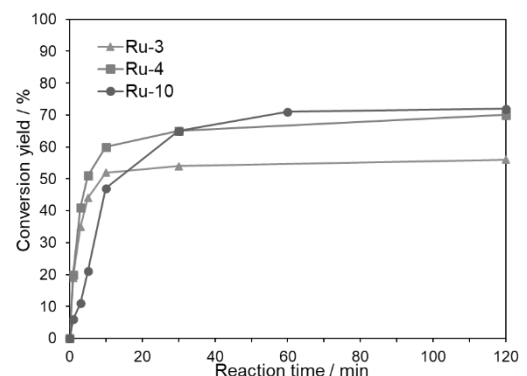
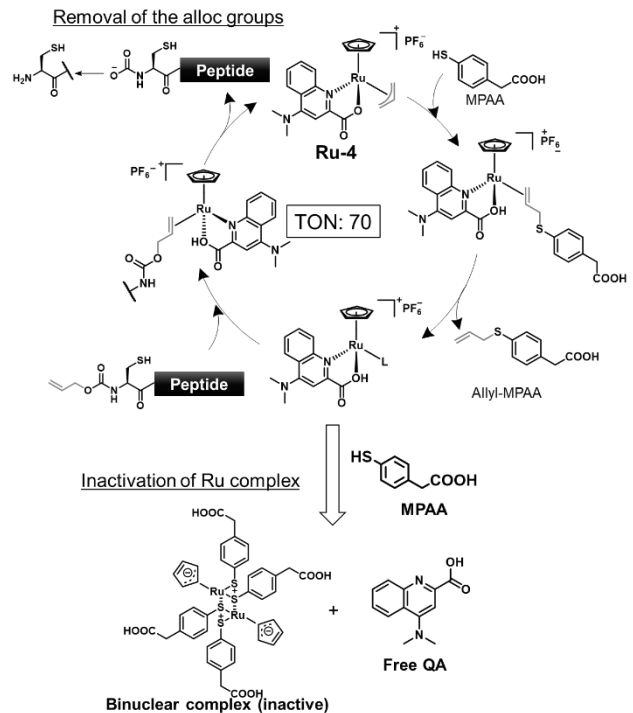


Figure 4. Deprotection using 1 mol% Ru catalyst.

チオール分子存在下でのタンパク質上で金属錯体の触媒反応を達成するため、ルテニウム(Ru)錯体に

注目した。1999年に $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (**Ru-1**: $\text{Cp}^* = \eta^5\text{-pentamethylcyclopentadienyl}$, $\text{cod} = \eta^4\text{-1,5-cyclooctadiene}$)を用いたチオール分子へのアリル基転移反応が初めて報告された^[10]。更に、より高活性を示すキノリンを配位子とした $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{QA})\text{allyl}]\text{PF}_6$ (**Ru-2**: $\text{QA} = 2\text{-quinolinecarboxylate}$) and $[\text{Cp}\text{Ru}(\text{QA})\text{allyl}]\text{PF}_6$ (**Ru-3**: $\text{Cp} = \eta^5\text{-cyclopentadienyl}$)が報告されている^[11]。更にこの Ru 触媒については2014年にグルタチオン過剰存在下、小分子に導入された alloc 基の脱保護が効率的に進行することが報告されている^[12]。そこでこれら Ru 触媒がタンパク質化学合成応用可能か調べた。

MPAA (100 mM)を含むタンパク質変性条件下で 5 mol%の各 Ru 触媒を添加し HPLC によって反応追跡したところ、**Ru-3**、**Ru-4**、**Ru-10** では alloc 基が定量的に脱保護され、更にペプチド上の官能基にアリル



Scheme 5. Simultaneous Alloc removal and deactivation.

基が転移していなかったことから、MPAA が $\pi\text{-allyl Ru}$ 錯体に対する補足剤として機能していることが分かった(Figure 3)。次に触媒量を 1 mol%まで減らし触媒回転数を算出したところ、**Ru-3** は 56、**Ru-4** は 70、**Ru-10** は 72 という結果となり、Pd/TPPTS の触媒回転数が 1.2であることを考慮すると **Ru-4** と **Ru-10** は Pd/TPPTS 錯体に比べて 50 倍以上の触媒活性を有することが分かった(Figure 4)。また MPAA による不活性化については 200 mol%の Pd/TPPTS 錯体が 10 分以内に活性を失っているのに対し、10 mol%の **Ru-4** と **Ru-10** は 10 分経過後でも活性を有しており、さらに **Ru-10** については 30 分経過後も活性を有していた。以上よりこれら Ru 触媒は Pd/TPPTS 錯体に対して MPAA に対する耐性が向上している事が分かった。NMR による分析と MALDI-TOM mass による質量分析によりこれら Ru 触媒は MPAA と配位子交換し 2 核錯体を形成することで不活性化することがわかり、Ru 錯体は alloc 基の脱保護を触媒すると同時に 2 核錯体の形成を伴って活性を失うことが分かった(Scheme 5)。より短時間で不活性化が完了することから標的タンパク質の化学合成には **Ru-4** を用いることとした。

最初の標的タンパク質としてリンカーヒストン H1.2 を選んだ。このタンパク質はヌクレオソームの dyad と呼ばれる溝に入ることでクロマトソーム構造を形成し、クロマチンをより凝縮し遺伝子転写の不活性化に寄与している^[13]。H1.2 上には様々な翻訳後修飾が導入されることが知られており、本研究ではクロマトソーム構造の不安定化に影響を及ぼすとされる 53 番目のアルギニンにおけるシトルリン化 (R53Cit)と 172 番目のセリンにおけるリン酸化(S172ph)が導入された H1.2 の合成を行った。全長 212 アミノ酸から構成される H1.2 を 5 つのペプチド断片へと分割し、NCL と 20 mol%の Ru 触媒による alloc 基の脱保護を繰り返すことでペプチド断片を One-pot で連結した。脱硫反応によってシステインをアラニンへと変換した後、クロマトソーム再構成実験を行った (Figure 5)。ゲルバンドシフトアッセイにおけるヌクレオソームとクロマトソームのバンド強度の比較により H1.2 の結合力を算出したところ、R53Cit 存在下ではヌクレオソームに対する結合力が 30%ほど低下していることが分かった。結晶構造解析からも R53 はリンカーDNA のマイナーグループと相互作用していることが知られており、H1.2 と DNA との静電相互作用が Cit によって弱くなったため H1.2 の結合力が低下したと考えられる。

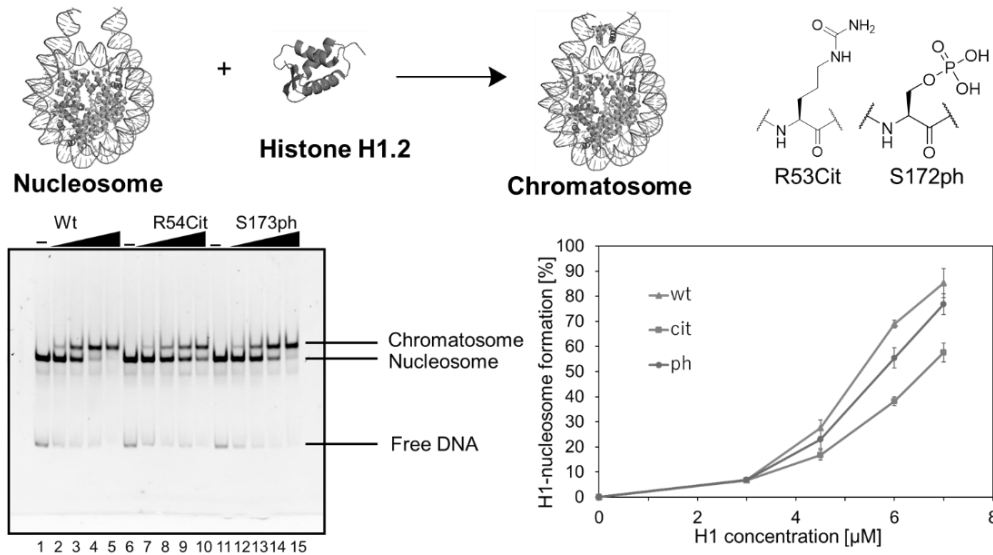


Figure 5. Gel band shift assay for reconstitution of chromatosomes.

続いて Ru 触媒を用いて HP1 α の化学合成を行った。このタンパク質は Chromodomain(CD)と Chromoshadow domain(CSD)の2つの Globular domain を有し、この2つの domain が Hinge 領域によってつながっている。CD は K9me3 を有するヒストン H3 と相互作用し、CSD はホモダイマーを形成することが知られており、高濃度 H3K9me3 存在下では高次クロマチン構造の形成に寄与する^[14]。全長 191 アミノ酸から構成される HP1 α を5つのペプチド断片へと分割し、Ru 触媒を用いた One-pot ペプチド連結法を用いて全長の HP1 α の化学合成を行った。更に、N 末端領域にセリンリン酸化が導入された HP1 α や Hinge 領域にリシンのアセチル化、セリンリン酸化が導入された HP1 α 、CSD 中の 154 番目のリシンにユビキチンが導入された HP1 α の合成を行った。各 HP1 α を用いて DNA との結合力を調べたところ、N 末端領域に4つのセリンリン酸化が導入されると DNA に対する結合力が大きく低下することが分かった (Figure 6)。この修飾は細胞周期の間期で観察されており、HP1 α と DNA との結合を制御していると考えられる。

Binding between HP1 α and DNA

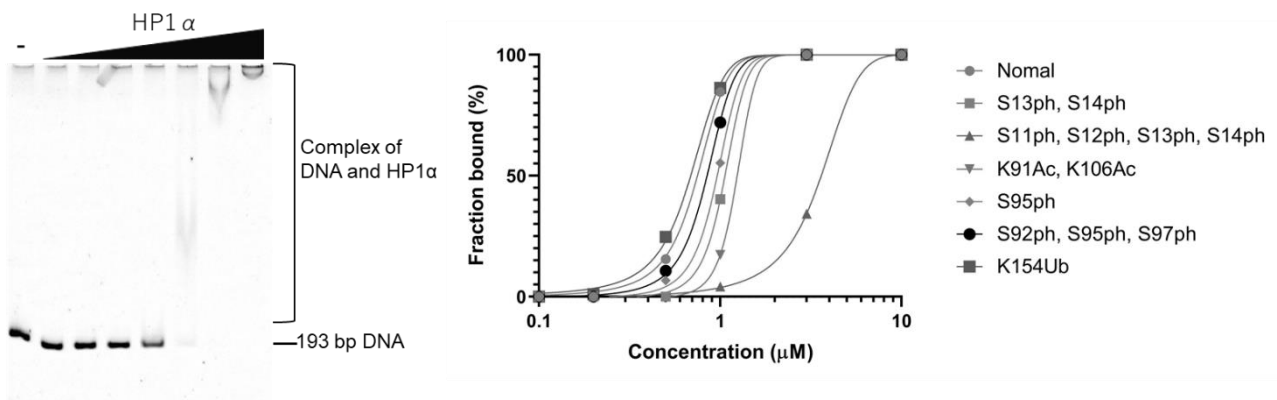


Figure 6. Gel band shift assay to analyze the interaction between DNA and HP1 α .

4. 結言

本博士論文では有機遷移金属錯体を活用した新規タンパク質化学合成法について報告した。シリル保護アルキンを用い、銀錯体と銅錯体を駆使することで化学合成タンパク質へ効率的に機能性分子を導入する手法を開発し、更に Pd 錯体を用いた効率的な Asp と Cys 間の NCL 法を開発した。また、Pd/TPPTS 錯体を用いたペプチド断片 One-pot 連結法により従来のタンパク質化学合成法では困難であった長鎖タンパク質の調製を容易にした。更に、Ru 錯体を用いることでチオール過剰量存在下においてもタンパク質上での触媒反応が可能となり、より効率的な化学合成法を用いて H1.2 や HP1 α の合成ルートを確立し、その翻訳後修飾の機能解明を行った。これらの技術を組み合わせることでより多様なタンパク質を創出し構造解析を通して従来は機能が未解明だったタンパク質に関する理解を深め、分子生物学の発展に貢献すると期待される。

5. 参考文献

- [1] Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science*. **1994**, *266*, 776–779.
- [2] Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347.
- [3] Tilley, S. D.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080–1081
- [4] Li, J.; Yu, J.; Zhao, J.; Wang, J. Zheng, S.; Lin, S.; Chen, L.; Yang, M.; Jia, S.; Zhang, X.; Chen, P. R. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 352–361.
- [5] Wan, Q.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.
- [6] Qi, Y.-K.; Chang, H.-N.; Pan, K.-M.; Tianac, C.-L.; Zheng, J.-S. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 14632–14635.
- [7] Blanco-Canosa, J. B.; Nardone, B.; Albericio, F.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7197–7209.
- [8] Villain, M.; Gaertner, H.; Botti, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3267–3272.
- [9] Zuo, C.; Zhang, B.; Yan, B.; Zheng, J.-S. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 727–744.
- [10] Kondo, T.; Morisaki, Y.; Uenoyama, S.; Wada, K.; Mitsudo, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8657–8658.
- [11] Tanaka, S.; Pradhan, P. K.; Maegawa, Y.; Kitamura, M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3996–3998.
- [12] Völker T.; Dempwolff, F.; Graumann, P. L.; Meggers, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10536–10540.
- [13] Fyodorov, D. V.; Zhou, B. R.; Skoultchi, A. I.; Bai, Y. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 192–206.
- [14] Kumar, A.; Kono, H. *Biophys. Rev.* **2020**, *12*, 387–400.

6. 発表論文

Publication related to thesis

- [1] Hayashi, G.; **Kamo, N.**; Okamoto, A. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5918–5921.
- [2] **Kamo, N.**; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4337–4340.
- [3] **Kamo, N.**; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16533–16537.
- [4] **Kamo, N.**; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 8378–8382.
- [5] **Kamo, N.**; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Murakami, H.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *To be submitted.*

Publication not related to thesis

- [6] Hao, F.; Murphy, K. J.; Kujirai, T.; **Kamo, N.**; Kato, J. Koyama, M.; Okamoto, A.; Hayashi, G.; Kurumizaka, H.; Hayes, J. J. *Nucleic Acids Res.* **2020**, DOI: 10.1093/nar/gkaa949