

## 論文の内容の要旨

論文題目 **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)

氏名 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。この手法により様々な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. 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った。

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、Tsuji-Trost反応を用いたラベリング反応が報告されてきた。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。

## 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

NCL で用いる Cys 残基を存在率の高い Ala 残基へと変換する脱硫反応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。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。

初めにシリル保護アルキンを有するペプチドを脱硫反応条件下で反応させたところ、副反応が進行することなく目的とする Ala 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シリル基の立体障害の差によって選択的に脱保護できることが分かった。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。

## 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。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が、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。そこで Asp の保護基として allyl 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 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA) を  $\pi$ -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 allyl 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。

## 4. MPAA の Triple Function を用いた Pd 錯体によるペプチド断片 One-pot 連結法

長鎖タンパク質を合成する場合、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 Cys 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 allyl 基が NCL 条件下で 2 当量の Pd/3,3',3''-phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid) trisodium salt (TPPTS)錯体を用いて定量的に脱保護が進行したためである。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”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 MPAA が含まれており、この MPAA が alloc 基脱保護後、Pd/TPPTS 錯体を不活性化すると考えた。そこで MPAA という 1 つの分子に対し 1) NCL 反応を加速させるチオール添加剤、2)  $\pi$ -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。

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、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。

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。H3 には内在の Cys 残基が存在し脱硫反応における副反応を防ぐため、acetoamidomethyl (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 基を外す場合には高価な 0 価の Pd 錯体を用いられる。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。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。

## 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 $\alpha$ (HP1 $\alpha$ )の全合成

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。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。先行研究で報告されていた 10 種類の Ru 触媒を合成し 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、内 3 種類の Ru 触媒を用いることで alloc 基が定量的に脱保護された。次に触媒量を 1 mol%まで減らし脱保護反応を分析したところ触媒回転数が最大 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 錯体は Pd 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。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 触媒は 10 分経過後でも活性を有しており、MPAA に対する耐性が向上している事が分かった。したがってこの Ru 触媒を新たなタンパク質の化学合成へと応用することとした。

初めにリンカーヒストン H1.2 を標的として選んだ。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。本研究ではクロマトソーム構造の不安定化に影響するとされる 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。続いてクロマトソーム再構成実験を行いゲルバンドシフトアッセイにより 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。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。

続いて Ru 触媒を用いて HP1 $\alpha$  の化学合成を行った。全長 191 アミノ酸から構成される HP1 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ 、CSD 中の 154 番目のリシンにユビキチンが導入された HP1 $\alpha$  の合成を行った。各 HP1 $\alpha$  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。この修飾は細胞周期の間期で観察されており、HP1 $\alpha$  と DNA との結合を制御していると考えられる。

#### 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を用いることで合成タンパク質へ効率的に機能性分子を導入することに成功し、更に Pd 錯体を用いた 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 連結法により合成困難とされた長鎖タンパク質の調製を容易にした。更に、Ru 触媒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 $\alpha$  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。