

審査の結果の要旨

氏名 加茂 直己

タンパク質は二十種類のアミノ酸から構成されており、それらに翻訳後修飾が施されることによって構造や動態を大きく変化させる。また、タンパク質での修飾制御の異常がしばしば病気の発症をもたらす。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や非天然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。しかし、長鎖タンパク質の化学合成において導入可能な官能基に強い制限があり、更に精製過程の繰り返しに伴う収率の低下や作業の煩雑性が懸念された。本論文では有機金属錯体を用いてこれら従来の問題点を解決し、分子量二万を超えるタンパク質の新規化学合成法について述べている。本論文は六章より構成されている。

第一章では、本論文の背景を概説し、研究の目的を述べている。初めにタンパク質化学合成法においてネイティブケミカルライゲーション (NCL) を始めとする主要な技術及びそれに付随する問題点を概説した上で、近年におけるタンパク質化学への有機金属錯体の応用について述べている。最後に従来の問題点の解決のための本論文で扱う戦略について詳述し、有機金属錯体による新規タンパク質化学合成の開発の意義について述べている。

第二章では、アルキンを含むタンパク質の化学合成法について報告されている。タンパク質化学合成において最後にシステインをアラニンへ変換する工程が必要だが、アルキン修飾を含む場合にその損傷をもたらす。この副反応を回避するためにシリル保護アルキンユニットを開発した。立体サイズの異なるシリル保護アルキンユニットを用いることで段階的かつ選択的な脱保護が可能になり、部位特異的なタンパク質標識に成功した。一例として、段階的に脱保護されたアルケンに対するヒュスゲン環化付加反応を介して異なる 2 種類の蛍光色素が部位特異的に導入された TP1 タンパク質の化学合成を達成した。

第三章では、パラジウム錯体を用いたアスパラギン酸とシステイン間のペプチド連結法の開発について述べられている。チオエステル末端アスパラギン酸ユニットをペプチドフラグメントとして選択しなければならない場合、高い割合で立体異性体が生じることを避けることができない。アスパラギン酸の保護基としてアリル基を用い、これを Pd/TPPTS 錯体と 4-メルカプトフェニル酢酸 (MPAA) を併用することによって NCL 中での異性体の生成を完全に抑制しつつ、ワンポットで NCL を高収率で遂行することができた。従来の方法と比較しても最も効率の良いアスパラギン酸とシステイン間の連結法の開発に成功した。

第四章では、Pd/TPPTS 錯体を用いて複数に分割されたペプチド断片をワンポットで連結し全長のタンパク質を得る戦略が述べられている。まず、ペプチド断片 N 末端システインの保護基としてアリルオキシカルボニル (alloc) 基を選択した。MPAA が有する 3 つの特性、(1) NCL 反応を大きく加速させる添加剤、(2) 脱保護中間体である π -アリルパラ

ジウム錯体に対する捕捉剤、(3) alloc 基脱保護後の Pd/TPPTS 錯体の弱い触媒毒としての機能を活用して、新規ペプチド断片ワンポット連結法を考案した。標的として 142 残基から構成されるヒストン H2AX を選び、世界で初めて五つに分割されたペプチド断片をワンポットで連結し、全長タンパク質を単離収率 59%で得ることに成功した。また、Pd/TPPTS 錯体による alloc 基脱保護条件と PdCl₂ 錯体によるアセトアミドメチル基脱保護条件の直交性に着目し、リジントリメチル化を有するヒストン H3 の化学合成を達成した。本結果は、Pd 錯体を用いたペプチド断片ワンポット連結法がタンパク質化学合成が抱えた問題を解決する合成戦略になることを示している。

第五章では、有機ルテニウム錯体を用いたワンポット連結法によるヒストン H1.2 と HP1 α の化学合成と各翻訳後修飾の機能解析について述べられている。従来、膨大な求核性官能基を有するタンパク質上で金属触媒ペプチド連結反応は困難であるとされていた。律速段階や密度汎関数理論計算に基づいた金属錯体の設計を行った結果、alloc 基に脱保護において 5,000 当量のチオール分子存在下においても Pd/TPPTS 錯体に比べ 50 倍以上の触媒活性を有するルテニウム触媒を見出した。タンパク質上でこのような高い触媒活性を示す金属錯体は報告されていない。このルテニウム触媒をタンパク質化学合成法に応用しワンポット連結法を用いて分子量二万を超すヒストン H1.2 と HP1 α の化学合成法の確立を達成した。さらに、リン酸化やユビキチン化など部位特異的に翻訳後修飾が導入されたタンパク質を合成して評価した結果、H1.2 上の 53 番目アルギニンにおけるシトルリン化や HP1 α における 11 番目から 14 番目のセリンにおけるリン酸化が、ヘテロクロマチンの形成を担うタンパク質と DNA との相互作用に強い影響を与えることが初めて示された。これら各修飾の重要な意義はルテニウム触媒を用いたタンパク質合成によって初めて明らかになったものであり、本手法による修飾タンパク質の合成はエピジェネティクスにのみならず幅広い生命現象の解明にも寄与すると考えられる。

第六章では、本論文の総括と、今後の展望が述べられている。

以上のように本論文では、有機金属錯体を活用したタンパク質化学合成法における諸問題を解決するための新規戦略が考案され、分子設計及び反応条件・金属錯体の最適化によってその手法の有用性が実証されている。有機金属錯体を用いたワンポットペプチド連結法は従来の手法と比較しても最大の効率を示し、その汎用性は翻訳後修飾を有する長鎖タンパク質への化学合成によって証明された。また、本手法で合成した修飾タンパク質は現在クライオ電子顕微鏡などによる生物物理学研究に応用されており、タンパク質化学合成法を飛躍的に効率化した今回の戦略は、今後、生化学・構造生物学・医薬品開発などの関連分野の発展に大きく貢献することが期待される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。