

## 審査の結果の要旨

氏名 マラフスカ カタジナ ヨアンナ

Malawska Katarzyna Joanna は、「Plural-Step Protein Modifications at Tryptophan (トリプトファンを起点とする複数工程のタンパク質修飾法)」というタイトルで、以下の研究を行った。

### 【研究背景・目的】

タンパク質の化学修飾法は、新たな医薬品（生物製剤）や材料の創出を可能にする重要な技術である。しかしながらタンパク質の構造的複雑さと機能保持を考慮すると、効率的かつ選択的な化学修飾の実現には技術的課題も多い。1971年に Faulk と Taylor によって抗体や標的タンパク質 (POI) への金ナノ粒子標識法が開発されて以来、標的タンパク質-金ナノ粒子コンジュゲートは光学・電子顕微鏡の造影目的に現在でも用いられている。しかし当時は構造不定で大サイズ (~5 nm) の金コロイドを用い、タンパク質との非特異的吸着 (非共有結合性相互作用) を介して製造されていたため、化学的に不安定かつ構造不均質なコンジュゲートとならざるを得ず、応用拡張や造影精度向上には限度があった。我々はこの課題を踏まえ、構造明確かつ均質で化学的にも安定な金ナノクラスター ( $Au_nSR_m$ ) に着目した。これを位置選択的に標的タンパク質へと結合させたコンジュゲートを用いることが出来れば、特にクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) における主要な問題の一つである S/N 比の低さを解決できると考えた。この目的に 1.5-2 nm サイズの金ナノクラスター ( $Au_{102}$  や  $Au_{144}$  など) を活用した報告は存在するものの、 $<1$  nm サイズの  $Au_{25}$  ナノ粒子を標的タンパク質に位置選択的に結合させ、cryo-EM での構造解析へ応用した事例は現在までに知られていない。本研究では、トリプトファン (Trp) を標的とした化学修飾法に基づいて、小サイズ金ナノクラスター-粒子を均質結合させることを目標とした研究を行った。

### 【方法・結果】

Trp はタンパク質構成アミノ酸の中では最小の存在率と露出数を誇るため、これを標的とする化学修飾法は、修飾体の位置選択性制御や純度 (均質性) 向上に有利である。2016年

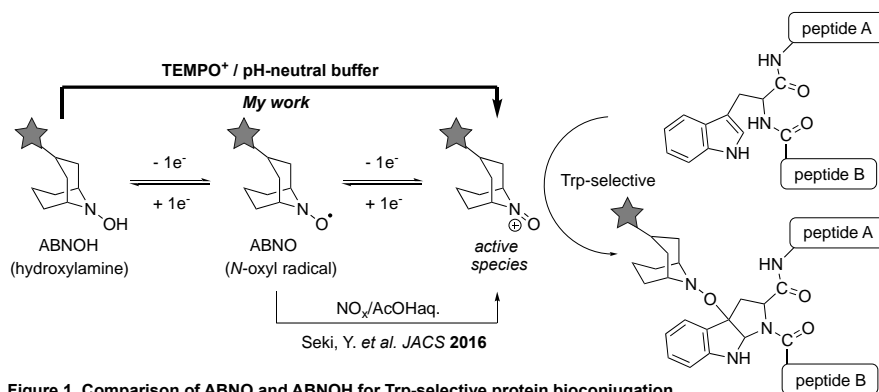
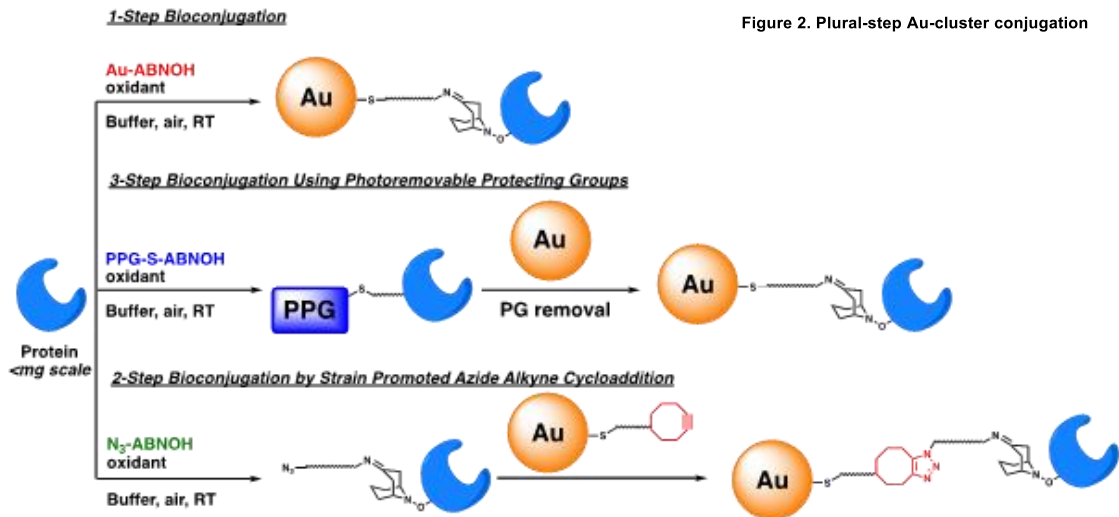


Figure 1. Comparison of ABNO and ABNOH for Trp-selective protein bioconjugation

に所属研究室では、有機ラジカル (ABNO) を用いる遷移金属フリー-Trp 選択的タンパク質修飾法を報告していたが、1) 酸性媒体の必要性ゆえに標的タンパク質を変性させる可能性があること、2) ラジカル試薬の純度・構造決定が難しいことが課題であり、 $Au_{25}$  ナノ粒子標識法へと応用するには技術的不足があった。そこでまずは NMR 解析可能なヒドロキシアミン型試薬 (ABNOH) を用いる反応条件の精査を行ったところ、TEMPO<sup>+</sup>酸化剤を用いることで、中性 pH 緩衝液中、収率よく反応が進行する条件を新たに発見することに成功した (Figure 1)。



本条件に基づき、様々なアプローチから標的タンパク質—金ナノクラスターコンジュゲートの製造法の開発を試みた (Figure 2)。まずは、チオール配位子交換によって PEG リンカーを介して ABNOH と Au<sub>25</sub> ナノ粒子を連結した試薬を調製し、TEMPO<sup>+</sup>条件にてペプチドおよびタンパク質 (リゾチーム・抗体) への修飾を検討した (1 工程法、Figure 2 上部)。ペプチドレベルでは ESI-MS 解析によって低収率ながら結合形成が確認されたものの、タンパク質レベルでは分析法の限界ゆえに、結合形成の実証が困難であった。

酸化的な Trp 修飾条件に還元的に振る舞う金ナノ粒子を晒すことによる反応阻害が危惧されたため、Trp 修飾と金ナノ粒子結合の過程を分離すべく、複数工程の Trp 修飾法を検討した。すなわち、チオール基を持つ ABNOH 試薬を POI に反応させた後に、チオール交換によって金ナノ粒子を結合させるアプローチを試みた。チオール基は Trp 修飾条件に不適合であるため、光分解性保護基 (PPG) で一時的に保護する戦略を採用した (3 工程法、Figure 2 中段)。いくつかの PPG-S-ABNOH 試薬を合成して検討した結果、7-ジエチルアミノクマリン型 PPG が最も効果的であることがわかり、これを用いることで Trp 修飾→光脱保護→チオールへの結合形成という 3 工程修飾を中程度の収率で達成できることをペプチドレベルで確認した。しかしながら光脱保護過程で併発する光異性化が全体の変換効率を下げていることもわかり、タンパク質レベルでは収率良く修飾を行うことは困難であることも判明した。

そこでチオール交換の代わりに、歪み促進型アジド-アルキン付加環化 (SPAAC) を用いて POI と金ナノクラスターを連結させるアプローチを試みた (2 工程法、Figure 2 下部)。すなわち、信頼性高く結合可能である N<sub>3</sub>-ABNOH 試薬をまず標的タンパク質に結合させ、その後にシクロオクチン部位を備えた金ナノクラスターを結合させるという戦略である。金ナノクラスターでの検討前に、蛍光分子 (FITC) を用いてプロセスの有効性を確認したところ、リゾチームおよびトラスツズマブ抗体に対して、高効率での蛍光標識が可能である事、バックグラウンド反応が大幅に抑制できることを確認した。現在はこの 2 工程法を金ナノクラスター〜粒子修飾へと応用すべく、さらなる条件最適化を進めている。

以上の業績は、化学条件に敏感かつサイズの大きな機能性分子 (金属クラスター、核酸、別種のタンパク質など) を均質結合させ、高精度な機能を発揮するタンパク質コンジュゲートの創出に貢献する基盤技術となる。博士 (薬科学) の学位論文として合格と認められる。