

金属を用いないトリプトファン選択的修飾反応の開発に成功 ～均質性の高い次世代タンパク質製剤の創製につながると期待～

1. 発表者： 金井求（東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻 教授）
生長幸之助（東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻 助教）
関陽平（東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻 博士課程3年）
石山隆史（東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻 修士課程1年）
佐々木大輔（東京大学大学院薬学系研究科 特任研究員）
阿部純平（東京大学大学院薬学系研究科 特任研究員）
相馬洋平（東京大学大学院薬学系研究科 特任研究員）

2. 発表のポイント：

- ◆疎水性アミノ酸であるトリプトファン側鎖に対し、さまざまな機能性小分子を、修飾数を制御しつつ選択的に結合できる、新しいタンパク質化学修飾反応の開発に成功した。
- ◆本研究成果により、従来法よりも均質性の高い機能性タンパク質を簡便に調製可能となる。
- ◆本手法は化学修飾型タンパク質製剤の品質管理および薬効制御の面で、大きな進展をもたらす技術になると期待される。

3. 発表概要：

東京大学大学院薬学系研究科の金井求教授、生長幸之助助教らの研究グループは、金属を用いないトリプトファン選択的タンパク質修飾反応の開発に成功しました。

タンパク質は生体内機能を司る物質であり、医薬品などにも応用されています。タンパク質の化学修飾法はその機能向上や人工機能付与を行なえる方法論ですが、立体構造への影響を最小限にしつつ、高い化学選択性をもってそれを行うことは従来困難でした。

本研究グループは、独自開発した「安定有機ラジカル、注1」を用いることにより、生物活性ペプチド・酵素・抗体などに含まれるトリプトファン残基に対し、多彩な機能性小分子を結合させ、均質性の高い修飾体を得る方法を開発しました。水中・室温・ほぼ中性条件・短時間で実施でき、試薬を混ぜるだけの簡便な操作で行えるため、合成化学が専門でない科学者でも実施可能な、実用性の高い手法です。

抗体-薬物複合体に代表される化学修飾を施したタンパク質製剤は、今後大きな市場の拡大が見込まれています。本成果は、その品質管理・薬効制御などの面で大きな進展をもたらすことが期待されます。

本成果は、アメリカ化学会誌「Journal of the American Chemical Society」にオンラインで公開されます。

4. 発表内容：

<研究の背景>

がんやアルツハイマー病などの難治性疾患にも有効な医薬品の開発が望まれるさなか、ペプチド製剤やタンパク質製剤は魅力有る医薬群として注目を集めています。とりわけ抗体医薬は近年大きく売り上げを伸ばしており、現在では売上上位医薬品リストの大半を占めるに至っています。この背景にあって、抗体に小分子医薬を結合させて機能向上を図った抗体-薬物複合体に代表される「化学修飾型タンパク質製剤」が次世代型医薬群として有望視されており、近い将来に大幅な市場成長が見込まれています。

しかしながらそれを供給するための化学修飾反応の多くは、幅広く応用可能な技術水準にあるとは言い難いものでした。たとえばさまざまな位置のアミノ酸をランダムに修飾して混合物を与えてしまう、タンパク質の機能に重要とされる高次構造に影響を与えてしまう、毒性のある重金属や激しい反応条件を必要とする、など数々の問題を抱えています。これら従来法に頼る供給法では、医薬品質管理の困難さや薬効のばらつきなど、実用上の大きな問題が顕在化してきました。

本研究グループは、こういった次世代型タンパク質製剤を高品質に製造可能にする、化学選択的タンパク質修飾反応の開発に取り組んできました。

<研究の内容>

本研究グループは、金属を用いず行えるトリプトファン選択的タンパク質修飾反応の開発に成功しました。

タンパク質は、生体内機能を司る重要物質です。これを人工的に改変することができれば、医薬品や生命研究ツールなどへの応用が見込めます。しかしながら、タンパク質には類似性が高い官能基が多数含まれるため、それらを区別しつつ修飾数と修飾位置を制御して化学修飾を行える手法、つまり「化学選択的なタンパク質修飾反応の開発」は、困難な課題として知られていました。

この化学選択性を実現するべく、非天然型アミノ酸を予備導入するなどの手法が従来採られてきました(図1)。しかしながらこれには遺伝子操作が必要となるため、非常に手間がかかります。また、あまりに大きな化合物を自在導入することも難しいとされています。一方で天然型アミノ酸を標的とする修飾反応は、そのような準備を必要としない点で簡便に実施でき、より幅広い応用が見込めます。従来は、表面露出数の多い親水性アミノ酸(リジン)や、タンパク質の立体構造維持に重要とされるアミノ酸(システイン)を標的とする手法が主流でした(図1)。しかしながらこれらは均質性の低い混合修飾体を与えてしまう、立体構造に影響を与えてタンパク質機能を損なってしまう可能性が払拭できない、などの点で問題がありました。

これに対して今回開発された方法は、疎水性アミノ酸であるトリプトファンを標的とするものです。トリプトファンはほとんどのタンパク質に含まれるアミノ酸である一方、表面露出数が極めて少ないことが知られています。これを標的とした化学修飾反応が実現されれば、修飾数や修飾位置の予測および制御が従来法と比べて容易になります。しかしながらトリプトファン残基は反応性に乏しいため、毒性のある重金属試薬を用いたり、高温・強酸化条件などの激しい活性化条件を必要とするなど、実用性に乏しい手法が知られるのみでした。

今回開発された手法は、独自開発された「安定有機ラジカル」を用いることで、さまざまなペプチド・タンパク質に含まれるトリプトファン残基に対し、多彩な機能性小分子(蛍光分子、注2・ビオチン、注3・抗ガン剤など)を結合させるものです。水中・室温・ほぼ中性条件・

短時間で実施でき、試薬を混ぜるだけの簡便な操作で行えるため、合成化学が専門でない科学者でも実施可能な、実用性の高い手法です。反応しうるトリプトファンのは数は限られているため、修飾数の制御も容易であり、均質性の高い修飾体が実際に得られます。このような特性は、極めて均質性の高い試料を必要とする、タンパク質の結晶構造解析への応用が可能であることから伺えます（図1）。また抗体分子に対しても、その抗原（注4）への結合能を損なうことなく修飾できることも確かめられました。この成果は、とりわけ次世代医薬品として有望視される「抗体-薬物複合体」の新たな供給法としても期待されます。

<今後の展開>

本研究成果により、より均質性の高いタンパク質修飾体を簡便に調製可能となります。高価かつ毒性のある重金属を使用せず、簡便に実施可能な化学反応であるため、とりわけ生化学的応用を見据えた幅広い展開が見込まれます。抗体-薬物複合体に代表される人工化学修飾を施したタンパク質製剤は、今後大きな市場の拡大が見込まれています。本手法の普及によって、その品質管理・薬効制御などが大きく進歩することも期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Journal of the American Chemical Society」

論文タイトル：Transition Metal-Free Tryptophan-Selective Bioconjugation of Proteins

著者：Yohei Seki, Takashi Ishiyama, Daisuke Sasaki, Junpei Abe, Youhei Sohma, Kounosuke Oisaki*, Motomu Kanai*

DOI 番号：10.1021/jacs.6b06692

アブストラクト URL：http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b06692

6. 注意事項：

日本時間 8月19日（金）午前9時（米国東部時間：18日（木）午後8時）以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

東京大学大学院薬学系研究科

助教 生長 幸之助（オイスaki コウノスケ）

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel：03-5841-4835

E-mail：oisaki@mol.f.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科

教授 金井 求（カナイ モトム）

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel：03-5841-4830

E-mail：kanai@mol.f.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

注 1) 安定有機ラジカル

原子・分子を構成する電子は、通常 2 つずつ対になって化学結合もしくは非共有電子対の形で存在している。この一方を欠いた”不対電子”をもつ化学種のことをラジカルと呼ぶ。ほとんどのラジカルは反応性が高くきわめて不安定だが、特定の化学構造に組み込むことで安定に存在しうることが知られている。有機化学種に組み込まれたラジカルのうち、単離可能なものをここでは安定有機ラジカルと呼ぶ。

注 2) 蛍光分子

ある波長の光を吸収して一重項励起状態となり、その獲得エネルギーをより長波長の光（蛍光）として放出する機能を持つ分子。細胞内のタンパク質や生体小器官などを可視化する目的、すなわち細胞内イメージングに使用される。

注 3) ビオチン

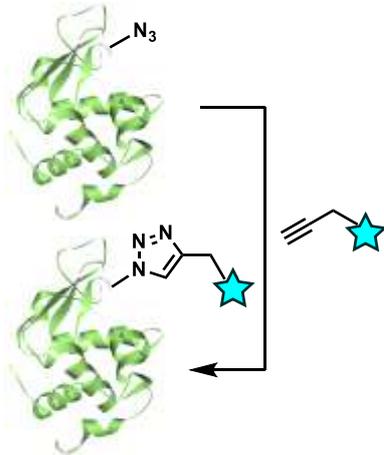
ビタミン B7 とも呼ばれる水溶性小分子であり、アビジンと呼ばれるタンパク質に対し極めて高い親和性を示す。この分子特性を生かした生命化学研究法がこれまでに多数開発され、現在でも広く用いられている。たとえば生体分子の効率的精製や、免疫染色によるタンパク質の検出などに使用される。

注 4) 抗原、抗体

免疫細胞に認識され、免疫反応を引き起こさせる物質を抗原と呼ぶ。この免疫反応の実態は、抗体と呼ばれる Y 字型タンパク質による分子特異的な認識過程が主であるため、抗体特異的に結合する分子を指して抗原と呼ぶこともある。

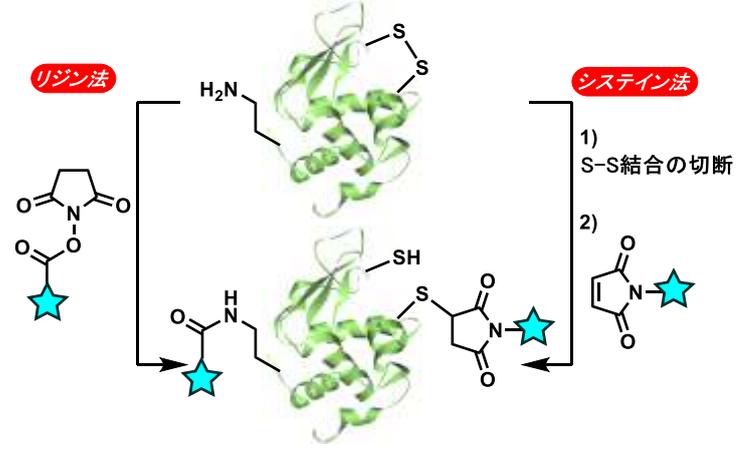
9. 添付資料：

従来法1：非天然型アミノ酸組込法



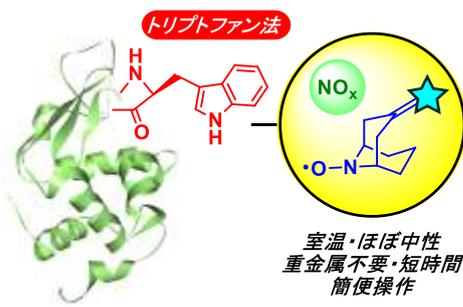
- 均質性の高い修飾体が調製可能
- 修飾位置/数の制御が可能
- ×遺伝子操作による非天然型アミノ酸の事前導入が必要

従来法2：高反応性天然型アミノ酸(リジン・システイン)側鎖の変換



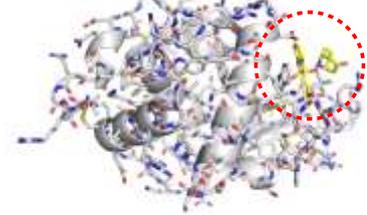
- 天然型タンパク質を修飾可能
- ×露出数が多いため修飾位置/数が制御困難→均質性の低い修飾体(リジン法)
- ×S-S結合の切断が必要→高次構造への影響が不可避(システイン法)

今回の手法：低反応性天然型アミノ酸(トリプトファン)側鎖の変換



室温・ほぼ中性
重金属不要・短時間
簡便操作

リゾチーム修飾体の結晶構造



- 天然型タンパク質を修飾可能
- 露出数が少ないため修飾位置/数が制御容易
- 立体構造は保たれる

図1. 今回開発された方法と従来の方法との比較

従来の方法では非天然アミノ酸の予備導入や、表面露出数の多い親水性アミノ酸残基（リジン）や、構造維持に重要とされるアミノ酸残基（システイン）を標的とする必要があった。

今回開発された方法は、露出位置の限られる疎水性アミノ酸残基（トリプトファン）を選択的に変換できる。修飾数の制御や修飾位置の予測がしやすく、また立体構造を保ったまま均質性の高い修飾体を得ることができる。有機ラジカル部位を介してさまざまな原子団（★で図示）を付加させることができるため、タンパク質の機能を向上させたり、天然には存在しない人工的機能を付与したものを創製することも可能となる。