

文献セミナー (1/31) 回答

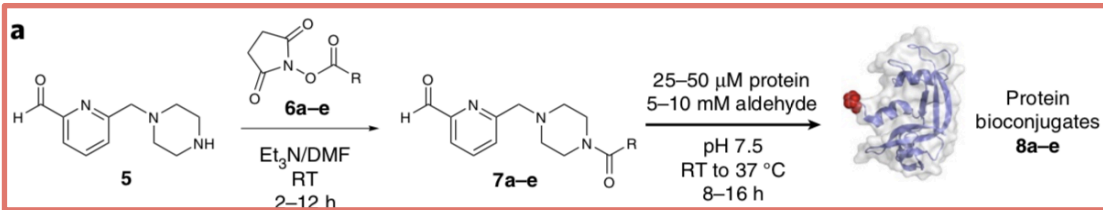
B4 野崎 多実子

セミナーは Imidazolidinone 形成によるタンパクの N 末修飾法とその応用について行いました。以下、セミナーでいただいた質問について回答いたします。

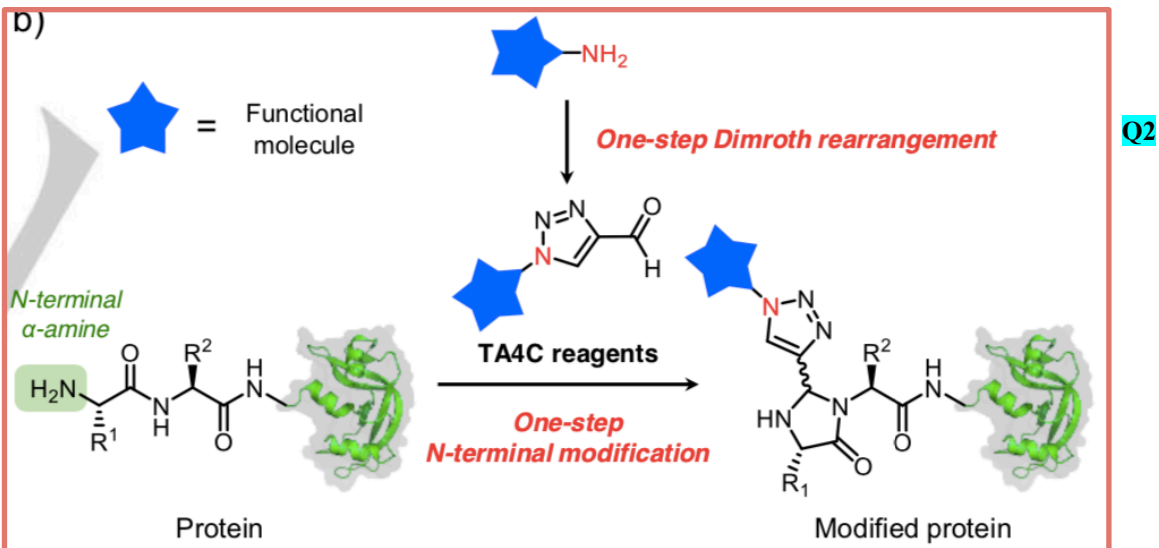
概要

Imidazolidinone 形成法 Q1

2PCA 法

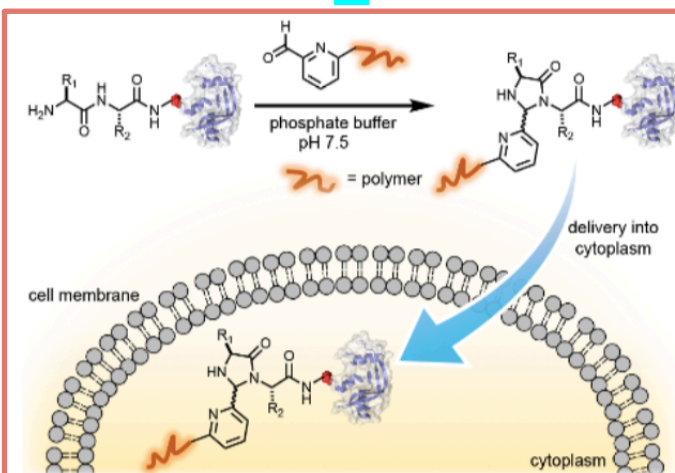


TA4C 法

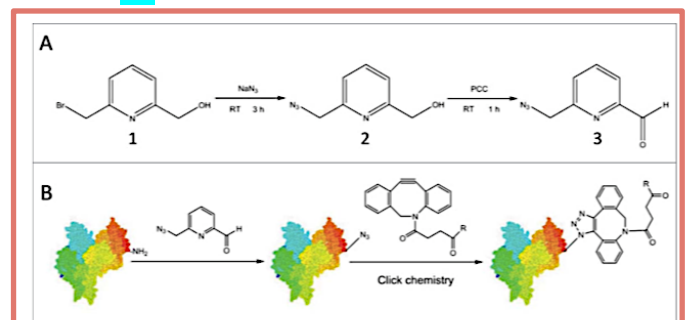


応用 Q5

タンパクの細胞内への輸送 Q3



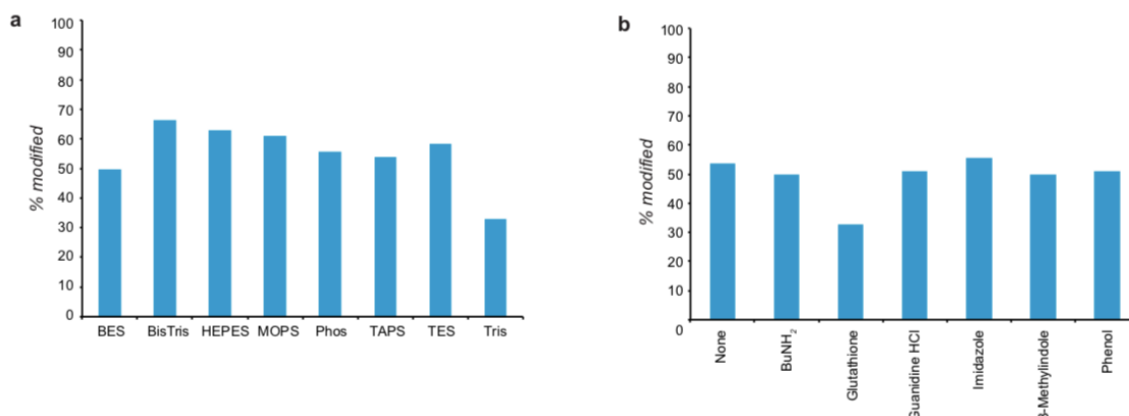
ADC Q4



Q1. 各 Imidazolidinone 形成法の buffer 検討

実際にタンパク反応に用いている buffer 以外の buffer では反応性は大きく変化するのか。

- ・2PCA (論文中のタンパクとの反応には phosphate buffer を使用)



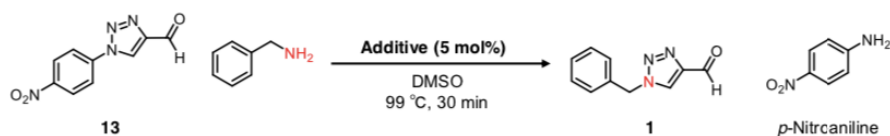
Supplementary Figure 8. Compatibility of the 2PCA reaction with buffer salts and additives. (a) RNase A (50 μ M) was reacted with 1 mM 2PCA in 50 mM of a variety of different buffers at pH 7.5 for 16 h at 37 $^{\circ}$ C. Most buffers showed no effect on the reaction; however, Tris buffer demonstrated a slight decrease in yield. (b) RNase A (50 μ M) was reacted with 1 mM 2PCA in 50 mM phosphate buffer at pH 7.5 for 16 h at 37 $^{\circ}$ C in the presence of 5 mM of the indicated additives. Although higher yields were observed for higher concentrations of 2PCA, 1 mM 2PCA was used for both screens to observe larger differences in yield. The data shown are based on ESI-TOF mass spectrometry analysis and represent a single experiment observation.

MacDonald JI, *et al* (2015). *Nature chemical biology*;11(5):326-331.

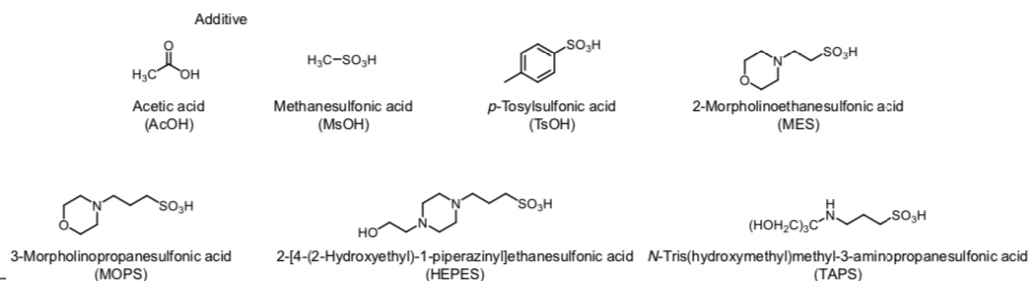
グルタチオン添加による収率の減少は、グルタチオンのチオールと 2PCA の間で生じる可逆的な相互作用によると考察されています。また、論文中に言及はありませんでしたが、Tris buffer に関しては一級アミンが存在することによる影響で収率が減少するのではないかと思います。

- ・TA4C (論文中のタンパクとの反応には MOPS を使用)

タンパクと TA4C との反応の buffer 検討については詳細な記述がありませんでした。以下には、TA4C 合成 (Dimroth 転移) の additive 検討の情報を載せておきます。



Entry	Additive	Conversion ^a (%)
1	none	56
2	AcOH	64
3	MsOH	85
4	TsOH	85
5	MES	86
6	MOPS	86
7	HEPES	85
8	TAPS	81
9 ^b	MOPS	91

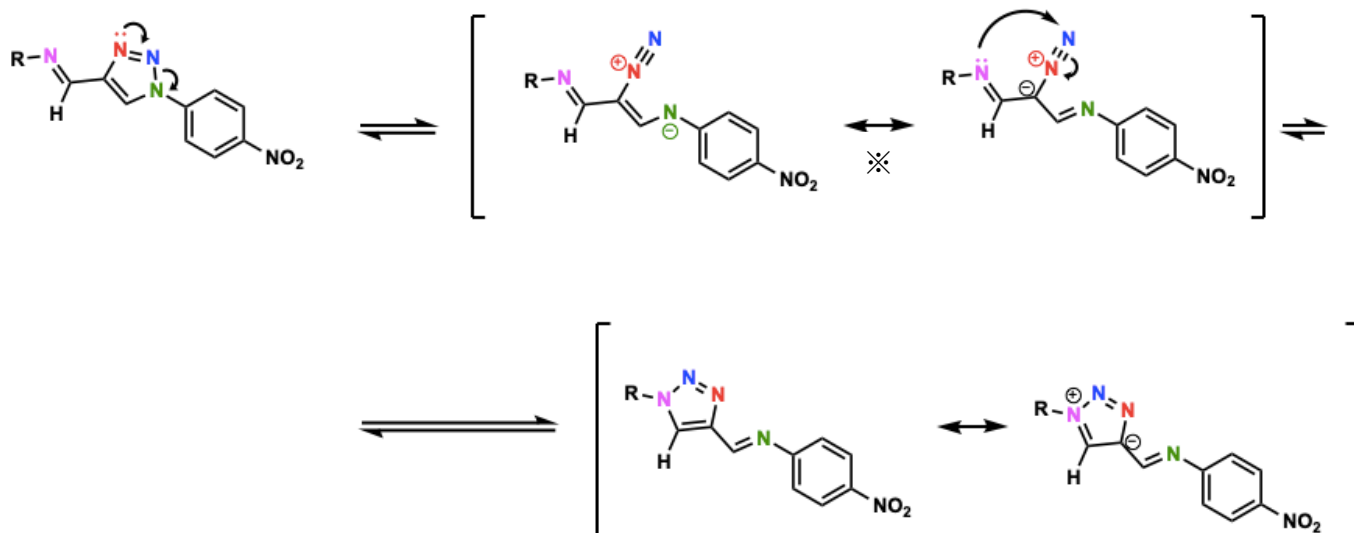


Onoda, A., Inoue, N., Sumiyoshi, E., & Hayashi, T. (2020). *ChemBioChem*,

Additiveとして sulfonate を含む化合物あるいは buffer を用いると Dimroth 転移の収率が向上することが示されており、buffer はタンパク反応前に除かなくても良いため 2 step タンパク修飾反応を容易にするとして MOPS が選ばれました。この 1 step 目で MOPS を使うこと、および 2PCA のタンパク反応において MOPS 中で高い収率が得られていることから、2 step 目のタンパク反応でも MOPS が使われることになったのではないかと考えています。

Q2. Dimroth 転移反応機構

Dimroth 転移の反応機構は以下の通りです。



ジアゾイミンの閉環 (※) は、下の図のように、 π 電子共役系に直行する窒素原子の孤立電子対の流れ込みによる σ 結合形成によるものです。

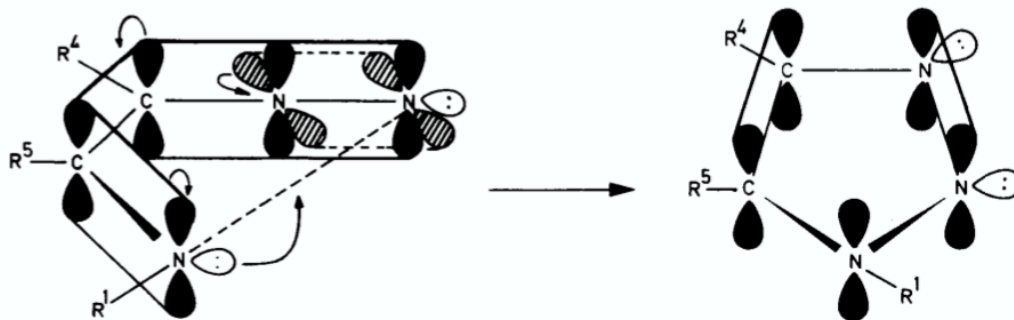


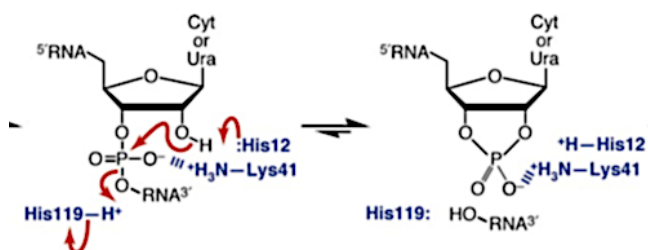
Figure 1. Electronic reorganization during the ring-closure of a diazo-imine.

L'abbé, G. (1990). *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 99(4), 281-291.

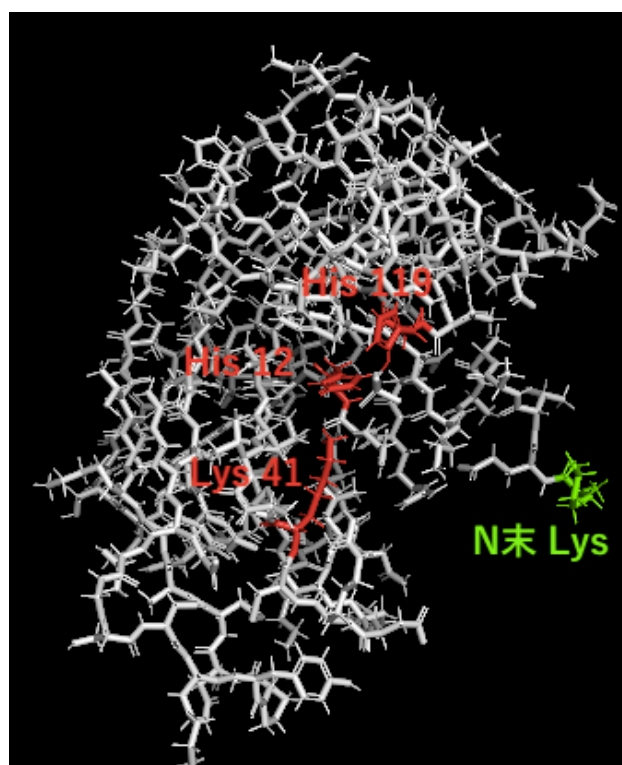
Q3. RNaseA の N 末ポリマー修飾による細胞内導入について

機能に影響を及ぼすことなく...なぜ? 酵素活性点が N 末から遠いから? つまりこの場合はラッキーだった?

RNaseA の N 末ポリマー修飾が RNaseA の機能に影響を与えない理由としては、N 末のリジンは酵素活性点に参与せず、酵素活性点からも離れていることが考えられます。RNaseA の酵素活性点は His12, Lys41, His119 であり、タンパクの結晶構造で見ても N 末からは離れていることが分かります。



Leland, P. A., & Raines, R. T. (2001). *Chemistry & Biology*, 8(5), 405-413.



PDB : 5RSA

Q4. Imidazolidinone 形成法の ADC への応用について

セミナーにおいて説明が不十分でしたが、紹介した論文では HER2 抗体の Fab と IgG のそれぞれについて 6-AM-2-PCA による N 末修飾を行なっています。それぞれの修飾に引き続いた実験としては以下が行われました。

<Fab 修飾>

In vitro 蛍光イメージング、LC-MS による修飾個数の計測、LC-MS/MS による結合箇所の確認、生細胞に対する抗体機能維持の確認 (HER2 抗原発現細胞に対する assay)

<IgG 修飾>

In vitro 蛍光イメージング、修飾による IgG の機能維持の確認 (HER2 タンパクに対する K_D 値の測定)

・DAR は算出されているのか

セミナーでお答えしたように、DAR は今回の論文では算出されていません。ただし、1つの Fab に対していくつの 6-AM-2-PCA 修飾が入ったかについては MS を用いた解析が行われ、1つ修飾が入った Fab が 43% (2)、2つ修飾が入った Fab が 36% ((3) + (4):へミアミナル体) であることが分かっています。

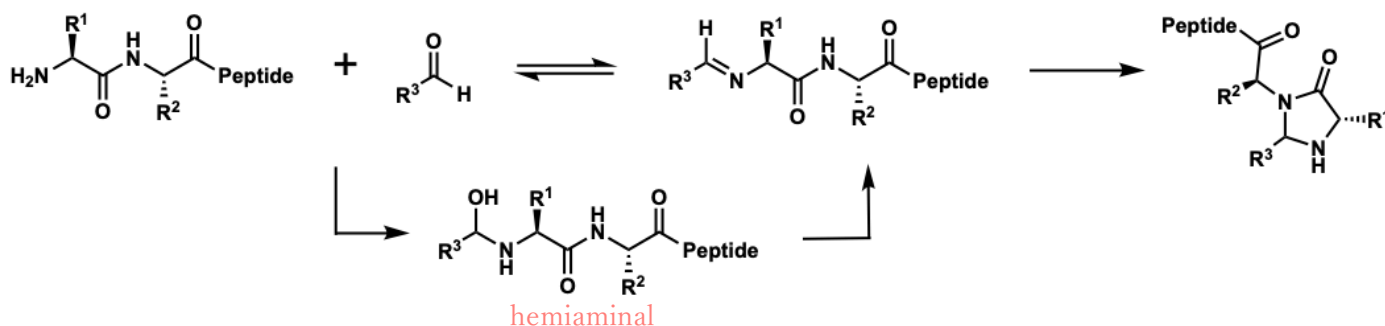


Table 1. Percent values of anti-Her2 Fab modified with 6-AM-2-PCA analyzed by MS.

	Non-modification	Mono-modification	Bis-modification	
Peak	(1): Fab	(2): Fab+1 label	(3): Fab+2 labels	(4): Fab+2 labels+H ₂ O
MW (Da)	50356	50503	50647	50665
Percent*	21%	43%	17%	19%

*represents mean of two measurements.

hemiaminal

Li, D. Z., Han, B. N., Wei, R., Yao, G. Y., Chen, Z., Liu, L., ... & Zhao, O. (2018). *MAbs*, 10(5), 712-

Q5. Application についての他の N 末修飾法との比較

Application は、imidazolidinone formation 法と他の方法を比較している論文はないか? Imidazolidinone 形成法は他に比べて機能面でどのくらいメリットがあるのか?

Imidazolidinone 形成法と酸化的カップリングのそれぞれを用いて酵素の再利用を行なった論文があります。この論文では、酵素の N 末端を Lithocholic acid (LA) で修飾し、LA と β CD の高い affinity を利用して β CD resin で酵素を回収した後、 β CD を加えて競合させて resin から外すことで酵素の繰り返し使用を可能にしました。

タンパク N 末の LA 修飾には 2PCA を用いた imidazolidinone 形成法と、*o*-aminophenole を用いた酸化的カップリング法を用いています。

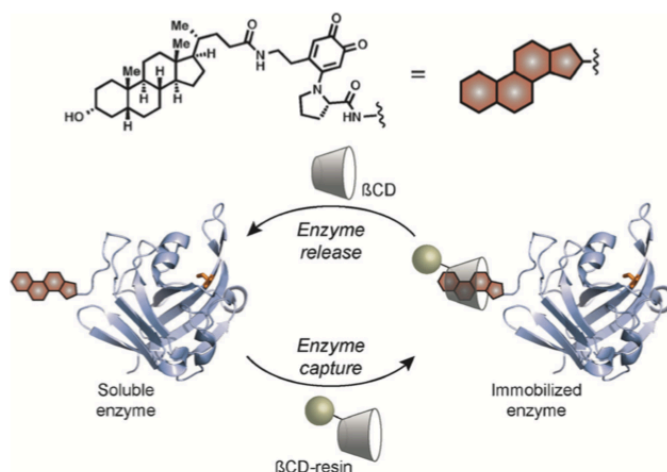
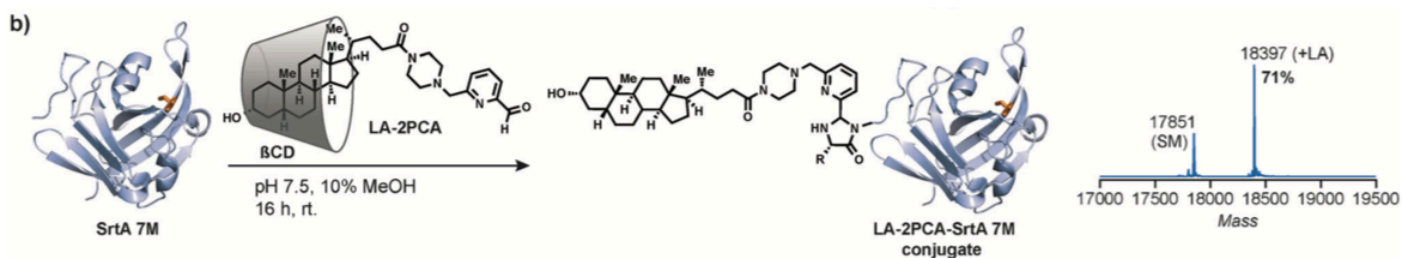


Figure 1. General scheme for the selective capture of LA-modified enzymes using β CD-functionalized sepharose resin. The noncovalently immobilized enzyme is released from the resin by competitive binding with β CD. Rosen, C. B., (2016). *ACIE*, 55(30), 8585-8589.

<Imidazolidinone 形成法>

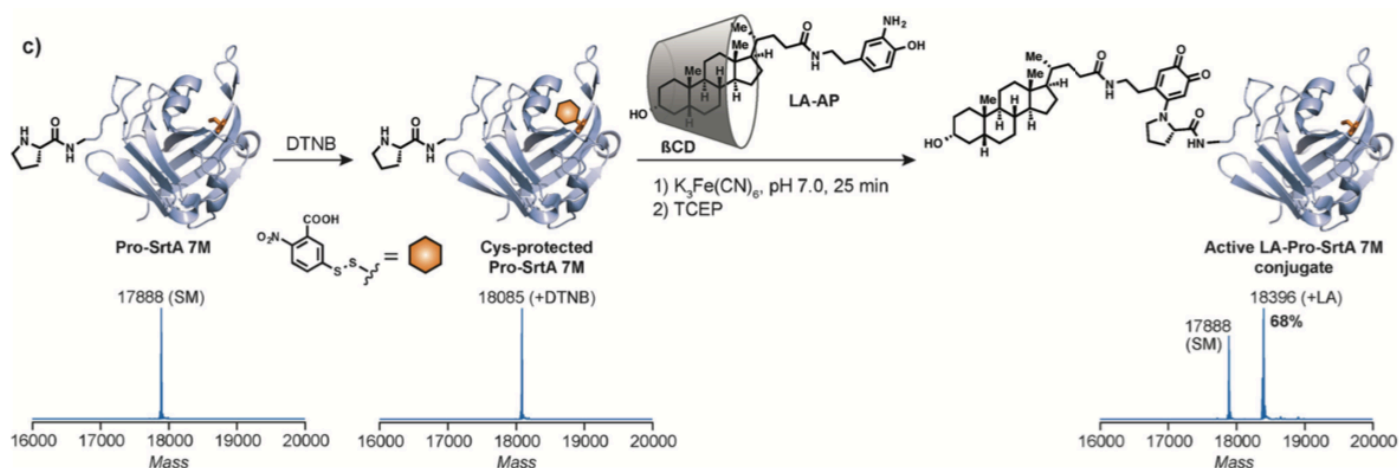


Imidazolidinone 形成法では LA-2PCA を合成し、 β CD 存在下、タンパクと反応させて 71%収率で N 末修飾タンパクを得ています。

(問題点)

- ・ LA が水に溶けにくいいため、LA-2PCA を溶解させるために 10% MeOH を加える必要があり、この MeOH の存在がタンパクの folding に影響を与える可能性がある。
- ・ Imidazolidinone は高温下で加水分解を受けうる。

<酸化的カップリング>



酸化的カップリングではタンパクの触媒活性部位のシステインを DTNB(Ellman's reagent)で保護し、 β CD 存在下、LA-*o*-aminophenole を加え $K_3Fe(CN)_6$ 存在下で酸化し、68%収率で N 末修飾タンパクを得ます。

(Imidazolidinone 形成法に対する利点)

- ・ β CD 過剰な条件で反応を行うため、LA-*o*-aminophenole は少量加えるだけでよく、MeOH を加えなくても溶解可能である。
- ・ 30 分以内で反応が可能である。

(問題点)

- ・ N 末の Pro に対して特に効率よく反応が進行するため、タンパクの N 末に Pro を挿入するように改変を行う必要がある。
- ・ Cys でカップリングが起こってしまうのを防ぐため、酵素活性部位の Cys を保護する必要がある。

以上のように、反応時間の観点、あるいは修飾化合物の物性によっては酸化カップリングがより有効なこともあります。Pro 挿入や Cys 保護などの手間を考えると、簡便さや普遍性の面では Imidazolidinone 形成法がより優れていると言えると考えています。