

令和元年度

博士論文

化学修飾タンパク質の構造変化による合成分子間相互作用の制御と  
タンパク質化学修飾に対する局所構造効果に関する研究

三宅 輝幸

奈良先端科学技術大学院大学

物質創成科学研究科

超分子集合体科学研究室

# 目次

第 1 章：序論 .....	1
1-1. 研究背景 .....	1
1-2. タンパク質構造の静的な特徴に着目した非天然タンパク質・酵素の構築.....	2
1-2-1. 遺伝子工学的手法を利用した天然タンパク質機能の改変例 .....	2
1-2-2. 化学修飾を利用した天然タンパク質機能の改変例 .....	3
1-3. タンパク質構造の動的な特徴に着目した非天然タンパク質・酵素の構築.....	5
1-3-1. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼに関する研究 .....	5
1-3-2. ポリマー内部に $\text{Adk}_{\text{tm}}$ を埋め込んだハイドロゲルの構築 .....	9
1-3-3. タンパク質構造変化に基づいたピレンプローブの発光特性スイッチング システムの構築.....	10
1-4. 金属錯体-金属錯体相互作用による機能制御 .....	11
1-4-1. 金属錯体-金属錯体相互作用による発光特性制御 .....	11
1-4-2. 金属錯体-金属錯体相互作用による触媒反応経路スイッチング.....	12
1-4-3. 金属錯体-金属錯体相互作用による磁性スイッチング.....	13
1-5. 異種分子相互作用による機能制御.....	14
1-5-1. 異種分子相互作用によるフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET).....	14
1-5-2. 異種錯体相互作用による水素発生反応.....	15
1-6. 本研究の目的.....	16
参考文献 .....	20
第 2 章：タンパク質構造変化による同種金属錯体の相互作用制御 .....	23
2-1. 研究目的.....	23
2-2. コバルト(III)サレン錯体による末端エポキシドの開環反応.....	24
2-3. コバルトサレン錯体 1 の分子設計と合成 .....	24

2-4. 同種金属錯体修飾アデニル酸キナーゼ (Co-salen Adk <sub>tm</sub> ) のキャラクター シオン .....	27
2-4-1. コバルトサレン錯体 1 による Adk <sub>tm</sub> への化学修飾 .....	27
2-4-2. UV-vis スペクトルおよび CD スペクトル .....	27
2-4-3. キナーゼ活性の確認 .....	29
2-4-4. ICP-MS 分析による Co <sup>2+</sup> の定量と Bradford 分析によるタンパク質の定量 .....	30
2-5. Co-salen Adk <sub>tm</sub> を触媒としたスチレンオキシドの開環反応の評価 .....	31
2-6. まとめ .....	33
2-7. 実験項 .....	34
2-7-1. 使用試薬および使用機器 .....	34
2-7-2. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk <sub>tm</sub> ) の 発現と精製 .....	34
2-7-3. ヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 1 の合成 .....	38
2-7-4. コバルトサレン錯体 1 による Adk <sub>tm</sub> への化学修飾 .....	48
2-7-5. Bradford 分析 .....	48
2-7-6. ICP-MS 分析 .....	48
2-7-7. Co-salen Adk <sub>tm</sub> を触媒としたスチレンオキシドの開環反応の評価 .....	48
参考文献 .....	49
 第 3 章 : システイン残基周辺の局所環境に着目したタンパク質への位置選 択的 化学修飾および局所構造効果によるシステインチオール の反応性の評 価 .....	51
3-1. 研究目的 .....	51
3-2. システイン残基周辺の局所環境に着目したタンパク質への位置選択的 化学修飾例 .....	51
3-3. システインチオールの反応性に影響するファクター .....	52
3-4. Adk <sub>tm</sub> の Cys55 と Cys169 の反応性の予想 .....	53
3-5. システイン残基周辺の局所環境に着目したピレン分子による Adk <sub>tm</sub> の位置選 択的 化学修飾 .....	56

3-6. pH 7.0-9.0 の範囲における Cys55 と Cys169 の反応性の評価 .....	59
3-7. アデニル酸キナーゼ 4 変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk <sub>qm</sub> )の設計および 2 次構造の評価 .....	63
3-8. システイン残基周辺の局所環境に着目したピレン分子による Adk <sub>qm</sub> の位置選 択的化学修飾 .....	64
3-9. HPLC 分析によるペプチド断片の評価 .....	65
3-10. Adk <sub>qm</sub> の分子動力学シミュレーション .....	69
3-11. まとめ .....	71
3-12. 実験項 .....	72
3-12-1. 使用試薬および使用機器 .....	72
3-12-2. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk <sub>tm</sub> ) の発現と精製 .....	72
3-12-3. ヨードアセトアミド基を有するピレン 2 の合成 .....	72
3-12-4. ピレン 2 による Adk <sub>tm</sub> への位置選択的部分化学修飾 .....	73
3-12-5. Adk <sub>tm</sub> のトリプシン消化 .....	74
3-12-6. pH 7.0-9.0 の範囲における Cys55 と Cys169 の反応性の評価 .....	74
3-12-7. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 4 変異体 (K50A/A55C/C77S/V169C; Adk <sub>qm</sub> ) の発現と精製 .....	75
3-12-8. ピレン 2 による Adk <sub>qm</sub> への位置選択的部分化学修飾 .....	76
3-12-9. Adk <sub>qm</sub> のトリプシン消化 .....	76
参考文献 .....	77
第 4 章：タンパク質構造変化による異種合成分子の相互作用制御 .....	79
4-1. 研究目的 .....	79
4-2. 異種合成分子修飾アデニル酸キナーゼのキャラクタリゼーション .....	80
4-2-1. MALDI-TOF-MS スペクトル .....	80
4-2-2. CD スペクトル .....	81
4-2-3. キナーゼ活性の確認 .....	82
4-3. 阻害剤および基質を用いた異種合成分子修飾タンパク質の蛍光測定 .....	83

4-3-1. UV-vis スペクトルおよび蛍光スペクトル .....	83
4-3-2. アデニル酸キナーゼ構成要素と基質および阻害剤の結合様式 .....	84
4-3-3. 阻害剤を用いた異種分子修飾タンパク質の蛍光測定 .....	86
4-3-4. 基質を用いた異種分子修飾タンパク質の蛍光測定 .....	88
4-3-5. 蛍光強度の消光効率とスタッキング構造の相関に関する考察 .....	89
4-4. まとめ .....	92
4-5. 実験項 .....	93
4-5-1. 使用試薬および使用機器 .....	93
4-5-2. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk <sub>tm</sub> ) の 発現と精製 .....	93
4-5-3. フェナントロリン 3 によるピレン修飾タンパク質への逐次的化学修飾 .	93
4-5-4. ヨードアセトアミドによるピレン修飾タンパク質への逐次的化学修飾 .	94
4-5-5. 阻害剤 (A <sub>p5</sub> A) 添加による蛍光スペクトル測定 .....	94
4-5-6. 基質 (ADP) 添加による蛍光スペクトル測定 .....	95
4-5-7. 分子動力学シミュレーション .....	95
参考文献 .....	97
第 5 章：結論と展望 .....	98
謝辞 .....	101
発表論文 .....	102

## アミノ酸残基略号表

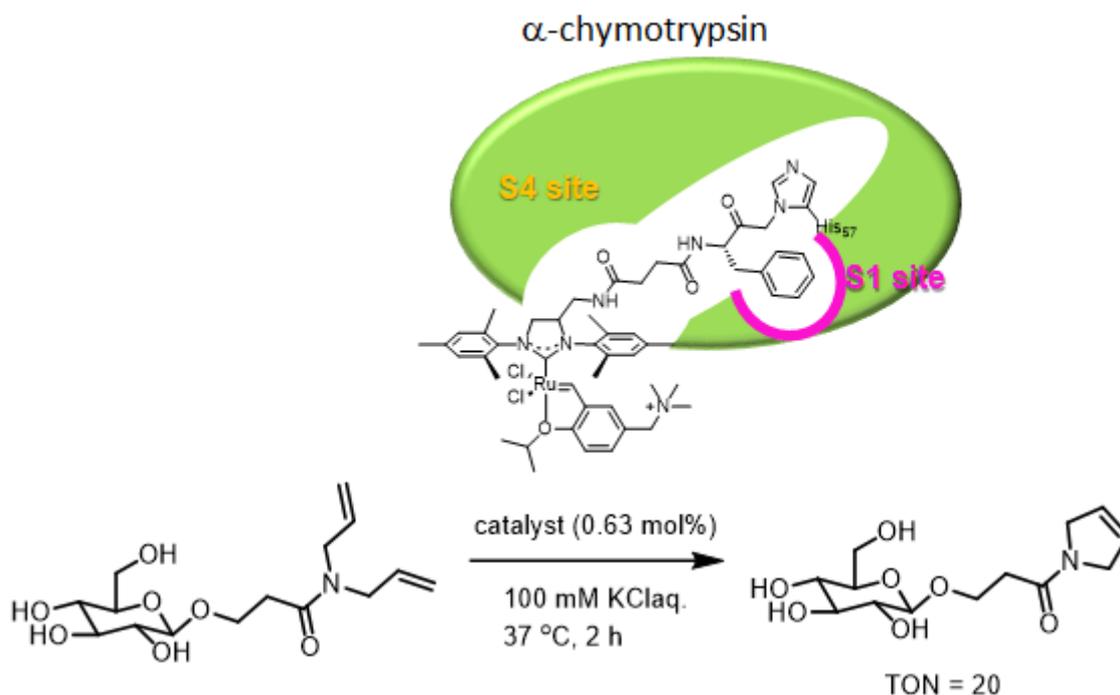
アミノ酸	3文字表記	1文字表記
グリシン	Gly	G
アラニン	Ala	A
バリン	Val	V
ロイシン	Leu	L
イソロイシン	Ile	I
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
システイン	Cys	C
メチオニン	Met	M
アスパラギン酸	Asp	D
グルタミン酸	Glu	E
リシン	Lys	K
アルギニン	Arg	R
ヒスチジン	His	H
アスパラギン	Asn	N
グルタミン	Gln	Q
フェニルアラニン	Phe	F
チロシン	Tyr	Y
トリプトファン	Trp	W
プロリン	Pro	P

# 第 1 章：序論

## 1-1. 研究背景

天然のタンパク質は、20 種類のアミノ酸からなる生体高分子であり、適切なアミノ酸配列からなる $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートなどの事前組織化された 2 次構造の組み合わせによって、3 次構造、4 次構造を形成し、機能を発揮する。タンパク質には、生体構造を構成する「構造タンパク質(e.g. コラーゲン)」、生体内で物質を輸送する「輸送タンパク質(e.g. ヘモグロビン)」、生体内の栄養を貯蔵する「貯蔵タンパク質(e.g. フェリチン)」、代謝などの化学反応を触媒する「酵素(e.g. トリプシン)」などがある。

近年、生化学的実験手法(e.g. 遺伝子操作、コンピュータデザイン)や構造解析技術(e.g. X 線構造解析、NMR 解析、分子動力学シミュレーション)が飛躍的に発展してきており、遺伝子操作による変異体開発や、合成分子の化学修飾を駆使して、非天然タンパク質・酵素を構築する研究が行われてきた<sup>1,2</sup>。非天然タンパク質・酵素の構築は、天然タンパク質がもつ機能の向上<sup>3</sup>や、天然タンパク質にはない機能を持たせる<sup>4</sup>(e.g. 閉環メタセシス(スキーム 1-1.))ことを目的に研究が盛んに行われている。以下に非天然タンパク質・酵素を構築した研究例を示す。



スキーム 1-1.  $\alpha$ -キモトリプシンに固定化された Hoveyda-Grubbs 触媒による閉環メタセシス反応.

## 1-2. タンパク質構造の静的な特徴に着目した非天然タンパク質・酵素の構築

### 1-2-1. 遺伝子工学的手法を利用した天然タンパク質機能の改変例

Hilvert らは、リボフラビンの合成酵素である lumazine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* (ScLS)の5量体(図 1-2-1a)が作り出す中央の環状部位構造に着目し、その環状部位にアミノ酸の変異導入(E99A/D103L/H107K)を施し(図 1-2-1b)、その環状部位でレトロアルドール反応を触媒する非天然酵素 (ScLS-2) を構築した<sup>5</sup>。Ala や Leu でできた空間に疎水的親和性の高い基質が取り込まれ、近接した位置にある複数の Lys によってイミン中間体が形成され、反応が進行していく(スキーム 1-2-1)。この研究例は、タンパク質の構造そのものを巧みに利用して、機能創発が達成されている。

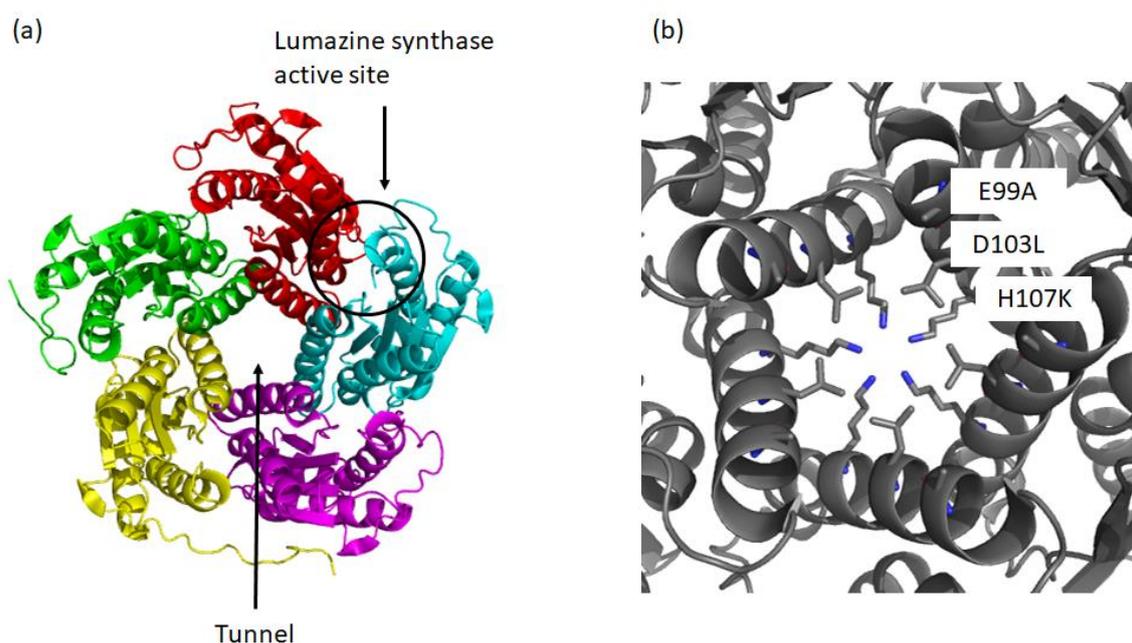
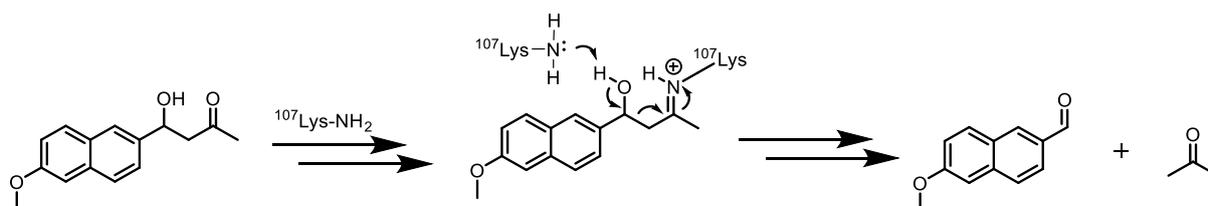


図 1-2-1. 遺伝子工学的手法を利用したレトロアルドール反応を触媒する非天然酵素 (ScLS-2) の構築. (a) *Saccharomyces cerevisiae* lumazine synthase (ScLS)の結晶構造(PDB: 1EJB); (b) 結晶構造より推定される環状部位の空間配置(Ala99、Leu103、Lys107 は Pymol ソフトウェア上で ScLS wild-type (PDB: 1EJB)の Glu99、Asp103、His107 をそれぞれのアミノ酸に置き換えている).

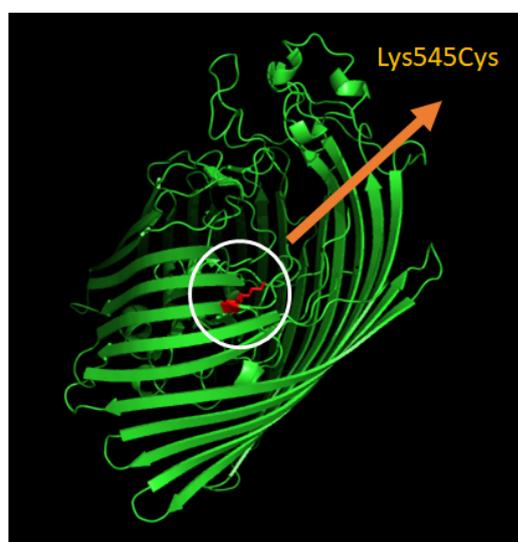


スキーム 1-2-1. ScLS-2 (E99A/D103L/H107K)によるレトロアルドール反応.

## 1-2-2. 化学修飾を利用した天然タンパク質機能の改変例

奥田らは、筒型の膜貫通タンパク質である *Ferric hydroxamate uptake protein component A* の変異体(FhuA  $\Delta$ CVF<sup>TEV</sup>)の Cys545 にマレイミド基を持つ銅(II)ターピリジン錯体を共有結合的に化学修飾し、ディールス・アルダー反応を触媒する非天然酵素を構築した<sup>6</sup>(図 1-2-2)。アザカルコンとシクロペンタジエンのディールス・アルダー反応による生成物は、高い *endo* 選択性を示した(スキーム 1-2-2)。この高い *endo* 選択性はタンパク質内部の規制された構造が必要不可欠であり、この研究例も事前組織化されたタンパク質構造を利用し、触媒反応の反応場として利用している。

(a)



(b)

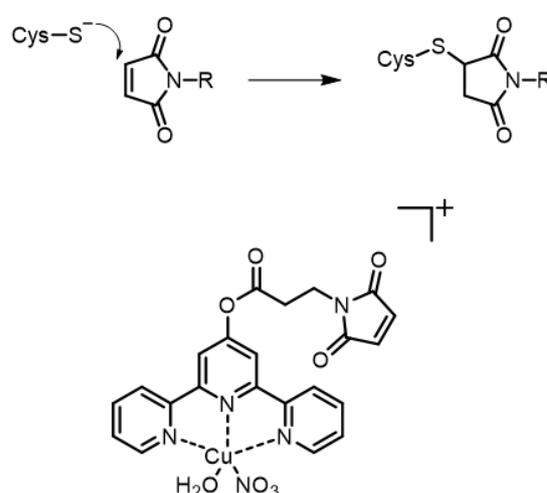
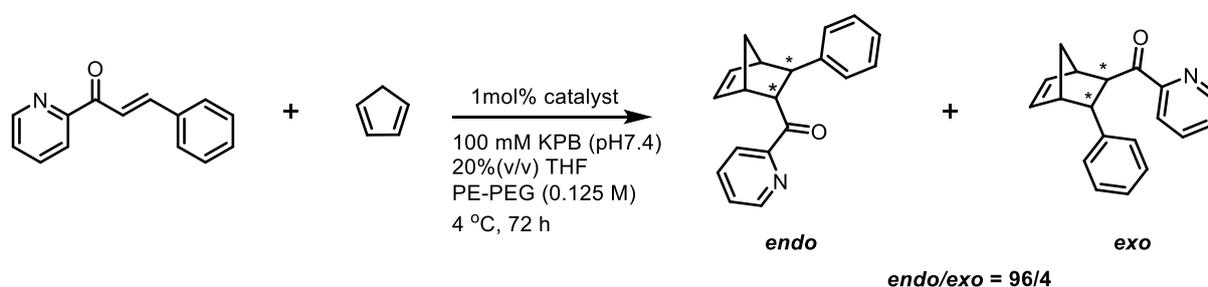


図 1-2-2. 化学修飾を利用したディールス・アルダー反応を触媒する非天然酵素 (FhuA  $\Delta$ CVF<sup>TEV</sup>-ターピリジン銅(II)錯体) の構築. (a) *Ferric hydroxamate uptake protein component A* (FhuA)の結晶構造(PDB: 1BY3); (b) システインとマレイミドの反応およびターピリジン銅(II)錯体の構造式.



スキーム 1-2-2. FhuA  $\Delta$ CVF<sup>TEV</sup>-ターピリジン銅(II)錯体によるディールス・アルダー反応.

1-2-1.、1-2-2.で示した非天然酵素の研究例は、どちらも、タンパク質の事前組織化された構造そのものを反応場として利用している。つまり、タンパク質構造の事前組織化された構造(静的な特徴)に着目して、非天然タンパク質・酵素が創成されている。一方、タンパク質の中には、数十Å単位の構造変化を起こして、機能を発揮するものも存在する。例えば、リン酸転移酵素であるアデニル酸キナーゼや様々な細胞内の機能調節に関与するカルモジュリンなどがある。このようなタンパク質の構造変化(動的な特徴)に着目することも非天然タンパク質・酵素を創成するための1つのアプローチであり、構造変化を起こして、反応場を作り出すといったユニークな機能創発(e.g.光センサー)が期待される。次に、タンパク質構造の「動的な特徴」に着目した研究例を示す。

### 1-3. タンパク質構造の動的な特徴に着目した非天然タンパク質・酵素の構築

#### 1-3-1. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼに関する研究

大腸菌由来アデニル酸キナーゼ(Adk<sub>e</sub>)は、Mg<sup>2+</sup>存在下で、アデノシン一リン酸(AMP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン三リン酸(ATP)間のリン酸基転移酵素であり、 $Mg^{2+} \cdot ATP + AMP \rightleftharpoons Mg^{2+} \cdot ADP + ADP$ の反応を触媒する<sup>7</sup>。Adk<sub>e</sub>は、その機能が大きな構造変化に依存しているため、ダイナミクスと触媒反応の関連性の研究<sup>8</sup>において、優れたモデルタンパク質である。

Adk<sub>e</sub>は214残基の1本のポリペプチド鎖からなり、NMPドメイン、LIDドメイン、Coreの3つの構成要素から構成されている(図1-3-1-1)。NMPドメインは、30-67番残基の部分(28-72番残基という報告<sup>8</sup>もある)で、NMPドメインとCoreの間にアデノシン一リン酸(AMP)結合サイトを有している。LIDドメインは、118-160番残基の部分(113-176番残基という報告<sup>8</sup>もある)で、LIDドメインとCoreの間にアデノシン三リン酸(ATP)結合サイトを有している。残りの1-29、68-117、161-214残基部分がCoreである(図1-3-1-1)。

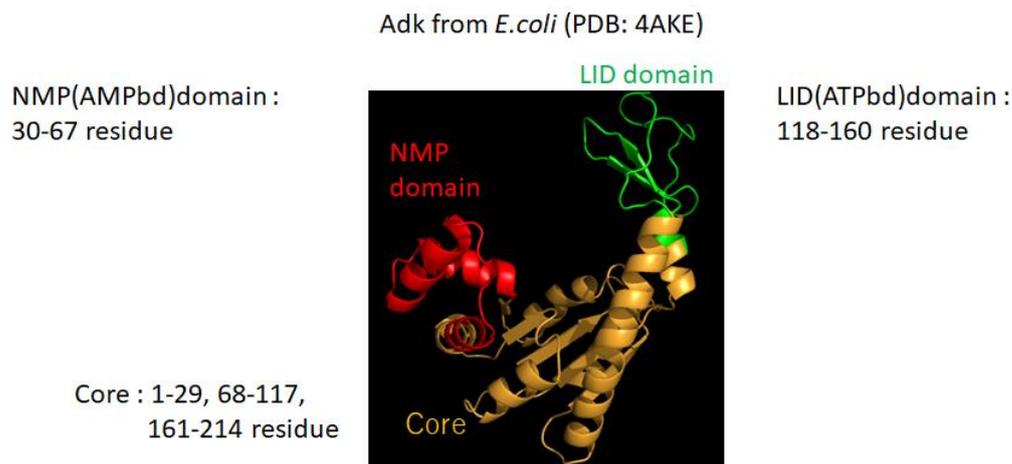


図 1-3-1-1. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ(Adk<sub>e</sub>)の構成要素.

Coreは触媒過程において構造的に安定で、LIDドメインとNMPドメインが大きな構造変化を示す<sup>9,10</sup>。2つのドメイン(NMPドメイン、LIDドメイン)は、リン酸基転移反応に適した活性中心を形成するとともにATP、AMPの加水分解を防ぐために、水から結合サイトを守るように構造変化を起こす<sup>11</sup>。そして、速度論的研究<sup>12</sup>、NMR分析<sup>13</sup>、分子動力学シミュレーション<sup>14</sup>などの研究では、触媒過程の律速段階が、生成物放出時の構造変化(closed構造→open構造)に関連していることを提案している。

ATP の結合モデルは、まず ATP が p-loop(7-16 番残基、図 1-3-1-2)と相互作用を起こし、それに伴う少しの構造的な摂動が LID ドメインに影響を与え、LID ドメインが構造変化し、ATP が結合サイトに結合するというモデルが提唱されている<sup>13</sup>。また、3つのアルギニン残基(Arg123、Arg156、Arg167、図 1-3-1-2)が ATP との相互作用に関与していることが推測されている<sup>15</sup>。

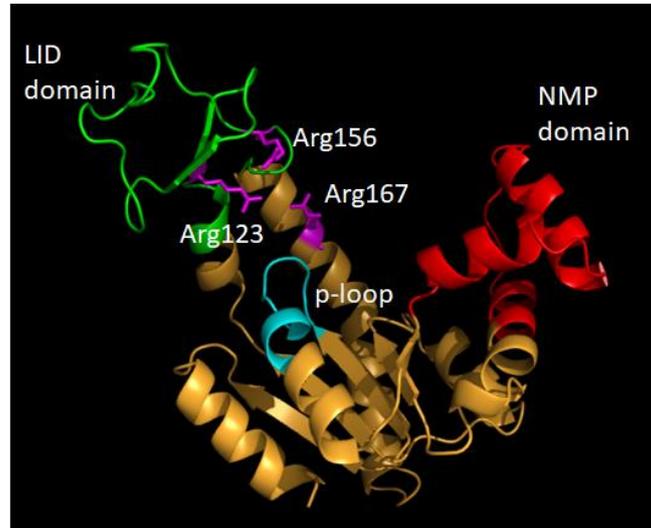


図 1-3-1-2. ATP の結合に関与する p-loop(7-16 番残基、cyan)と 3つのアルギニン残基 (Arg123、Arg156、Arg167、magenta).

実際に、closed 構造 Adk<sub>e</sub> の X 線結晶構造(PDB : 1AKE<sup>16</sup>)では、Arg156 の側鎖と ATP の  $\gamma$ -phosphate(P3)と AMP の  $\alpha$ -phosphate(P5)に対応するリン酸エステルとの水素結合が存在している(図 1-3-1-3)。

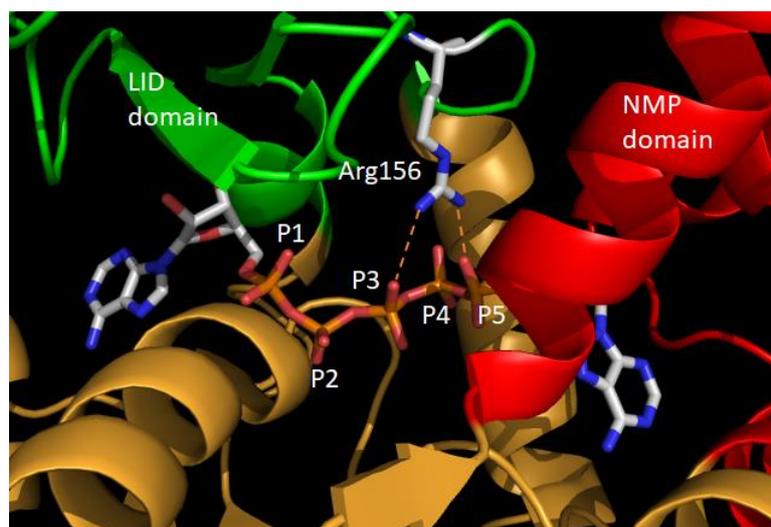


図 1-3-1-3. Closed 構造 Adk<sub>e</sub> の X 線結晶構造(PDB: 1AKE<sup>16</sup>)での Arg156 の側鎖とリン酸エステルとの水素結合.

さらに、Core ドメインに属する Glu170 側鎖のカルボキシル基と NMP ドメインに属する Leu58 の主鎖のアミドとの水素結合が存在している(図 1-3-1-4)。また、最初に LID ドメインに ATP が結合して構造が変化し、その摂動を受けて NMP ドメインに AMP が結合して構造変化を起こすことが知られている<sup>8</sup>。

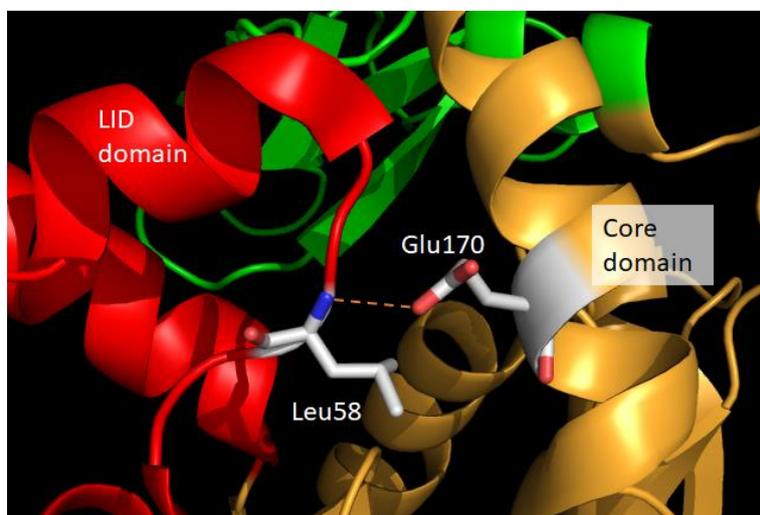


図 1-3-1-4. Closed 構造 Adk<sub>e</sub> の X 線結晶構造(PDB: 1AKE<sup>16</sup>)での Core ドメインに属する Glu170 の側鎖と LID ドメインに属する Leu58 の主鎖アミドとの水素結合。

アデニル酸キナーゼのリン酸基転移反応は、Mg<sup>2+</sup>濃度に依存すること<sup>12</sup>や Mg<sup>2+</sup>がリン酸基転移の静電的な“かなめ”になり、転移反応を促進すること<sup>14</sup>が報告されている。さらに、Adk<sub>e</sub>の基質結合サイトの溝に位置するループ上のアミノ酸残基 “<sup>84</sup>Asp-Gly-Phe-Pro-Arg<sup>88</sup>”がタンパク質構造の維持や触媒機能にとっても重要であることが報告されている<sup>17</sup>。特に、Asp84 は、Mg<sup>2+</sup>と基質との結合に関与しており<sup>18</sup>(図 1-3-1-5)、D84H 変異体は wild type に比べ、K<sub>m</sub> 値が約 10 倍上昇することが報告されている<sup>17</sup>。

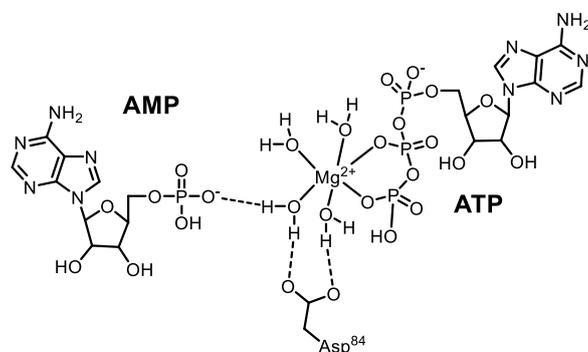


図 1-3-1-5. 分子動力学シミュレーションから得られた Mg<sup>2+</sup>と基質および Asp84 との結合様式。

2つの基質がそれぞれの結合サイトに結合して、closed 構造になった時に、リン酸基転移反応が進行する。その時、いくつかの水素結合ネットワークによって closed 構造が安定化されていることが分子動力学シミュレーションによる研究で示唆されている<sup>10</sup>(例えば、Asp61、Arg88、Thr175 間の相互作用や Ala11、Arg119、Phe137、Gly198 間の相互作用である)。さらに、分子動力学シミュレーションの研究で closed 構造から open 構造への遷移状態の時に“salt bridge zipper”と呼ばれる、4つの塩橋(Asp33-Arg156、Arg36-Asp158、Asp54-Lys157、Lys57-Glu170)が形成されることを示唆する結果が報告されている(図 1-3-1-6)<sup>19</sup>。

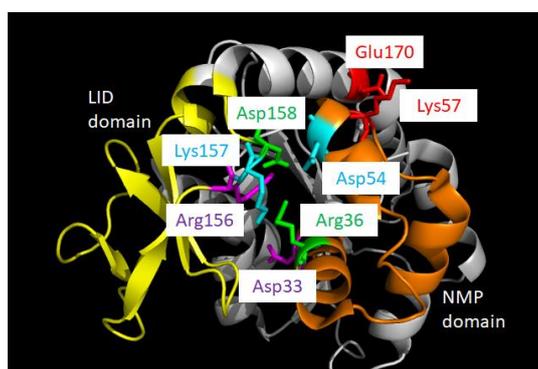


図 1-3-1-6. Closed 構造 Adk<sub>e</sub> の X 線結晶構造(PDB: 1AKE<sup>16</sup>)で示した salt bridge zipper の配置. Asp33-Arg156(magenta); Arg36-Asp158(green); Asp54-Lys157(cyan); Lys57-Glu170(red).

Adk<sub>e</sub> は触媒過程の際 Ala55 と Val169 間の距離が大きく変化することが知られている<sup>16,20</sup>(図 1-3-1-7)。さらに、合成分子を化学修飾させるために、Cys に置換した 26 種類のアデニル酸キナーゼ 2 変異体(元々存在している Cys77 を Ser に置換している)を用いた研究では、Cys55 と Cys169 は、チオール基の反応性が良いことが報告されている<sup>21</sup>。このことから、大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)がデザインされ、研究が行われている<sup>22-24</sup>。次に、Adk<sub>tm</sub> の構造変化を利用した研究例を示す。

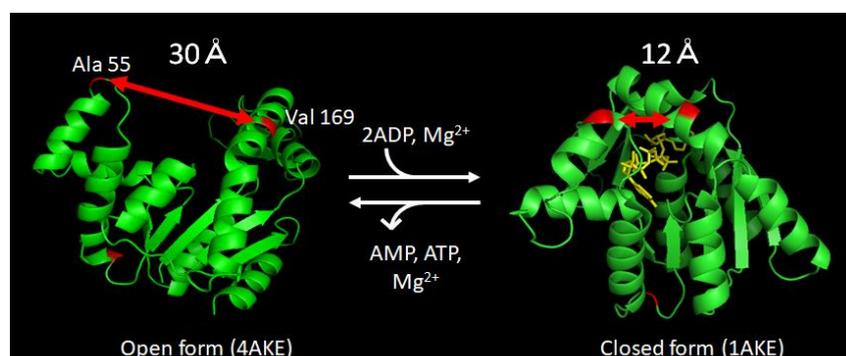


図 1-3-1-7. Adk<sub>e</sub> の構造変化. open 構造 (PDB: 4AKE<sup>20</sup>)、closed 構造 (PDB: 1AKE<sup>16</sup>)。

### 1-3-2. ポリマー内部に Adk<sub>tm</sub> を埋め込んだ水ゲルの構築

Cys との共有結合部位としてマレイミド基を持つポリマーを、Adk<sub>tm</sub> の 2 つの Cys に化学修飾した水ゲルが報告されている(図 1-3-2)<sup>22</sup>。このシステムは、基質結合に伴うタンパク質の構造変化により水ゲルが収縮し、それによりゲル内の薬剤が放出される機能を有している。しかし、ゲルの体積変化は、10%程度であり、カルモジュリン変異体を含んだ水ゲル<sup>25</sup> や抗原抗体反応を利用した水ゲル<sup>26</sup> とも似たようなゲルの体積変化(<20%)である。この研究例は、数十 Å 単位のタンパク質の構造変化を水ゲルの体積変化という巨視的な現象に変換している。

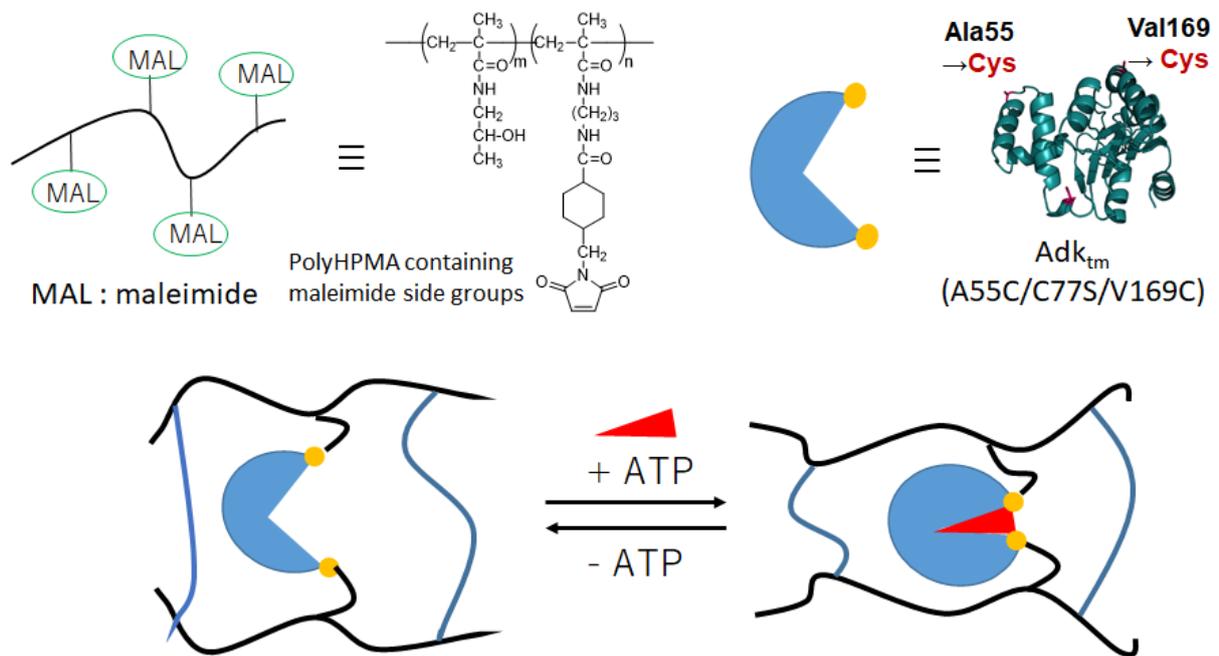


図 1-3-2. タンパク質の構造変化を利用した機能性水ゲルの構築.

### 1-3-3. タンパク質構造変化に基づいたピレンプローブの発光特性スイッチングシステムの構築

松尾らは、Cys との共有結合部位としてヨードアセトアミド基を持つピレンプローブ分子を、Adk<sub>tm</sub> の 2 つの Cys に化学修飾して、タンパク質構造変化に基づいたピレンプローブのモノマー/エキシマー発光特性のスイッチングシステムの構築を報告している(図 1-3-3a)<sup>23,24</sup>。阻害剤である *P*<sup>1</sup>,*P*<sup>5</sup>-ジ (アデノシン-5') 五リン酸 (Ap<sub>5</sub>A) を添加するとモノマー蛍光の減少およびエキシマー蛍光の増大が確認されている(図 1-3-3b)。さらに、Adk<sub>tm</sub> の触媒過程に呼応して、ピレンのモノマー/エキシマー発光特性のスイッチングを達成している(図 1-3-3c)。この研究例は、数十 Å 単位のタンパク質の構造変化を用いて修飾分子 2 分子の相互作用を変換している。

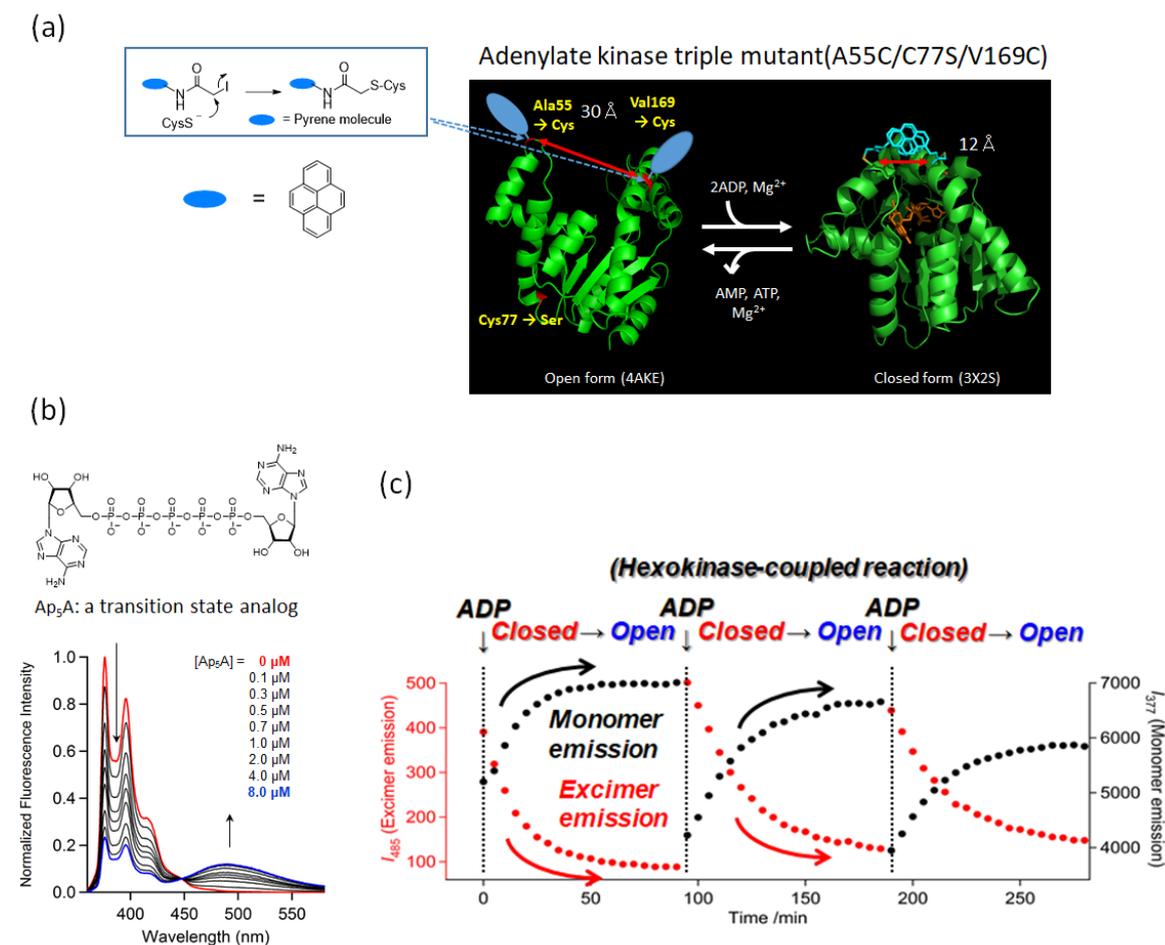


図 1-3-3. (a) タンパク質の構造変化に基づいたピレンプローブの発光特性スイッチングシステムの構築; (b) 阻害剤の添加による蛍光スペクトル変化; (c) ピレンのモノマー/エキシマー発光特性のスイッチング。

1-3-2.、1-3-3.で示した非天然タンパク質の研究例は、タンパク質構造の「動的な特徴」に着目した研究である。特に、1-3-3.の研究のように、タンパク質表面に2分子の距離依存的な性質をもつ分子を化学修飾させることで、生体分子機能をトリガーとした表面修飾分子機能の制御が可能となる。そこで次に、より多くの機能制御を実現するために、金属錯体-金属錯体相互作用あるいは、異種分子相互作用に着目した。以下にその研究例を示す。

#### 1-4. 金属錯体-金属錯体相互作用による機能制御

##### 1-4-1. 金属錯体-金属錯体相互作用による発光特性制御

平尾らは、ポリ-L-グルタミン酸のアニオン性の表面にカチオン性の Pt(II)錯体を静電的相互作用で修飾して、Pt(II)錯体の発光特性を制御したことを報告している<sup>27</sup>。単核錯体では、<sup>3</sup>MLCT/<sup>3</sup>LLCT 発光(<sup>3</sup>MLCT; 3 重項 Metal to Ligand Charge Transfer、<sup>3</sup>LLCT; 3 重項 Ligand to Ligand Charge Transfer、 $E_m = 650 \text{ nm}$ )を示すが、長いアルキル鎖の疎水性相互作用によってポリマー上で凝集させること(図 1-4-1-1)で、Pt(II)-Pt(II)と $\pi$ - $\pi$ 相互作用によって、複核錯体では<sup>3</sup>MMLCT 発光(<sup>3</sup>MMLCT; 3 重項 Metal-Metal to Ligand Charge Transfer、 $E_m = 820 \text{ nm}$ )を示す(図 1-4-1-2)。

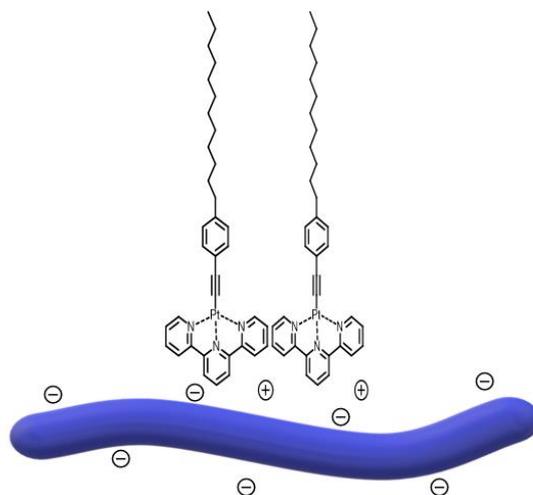


図 1-4-1-1. ポリ-L-グルタミン酸上での Pt(II)錯体の凝集の模式図.

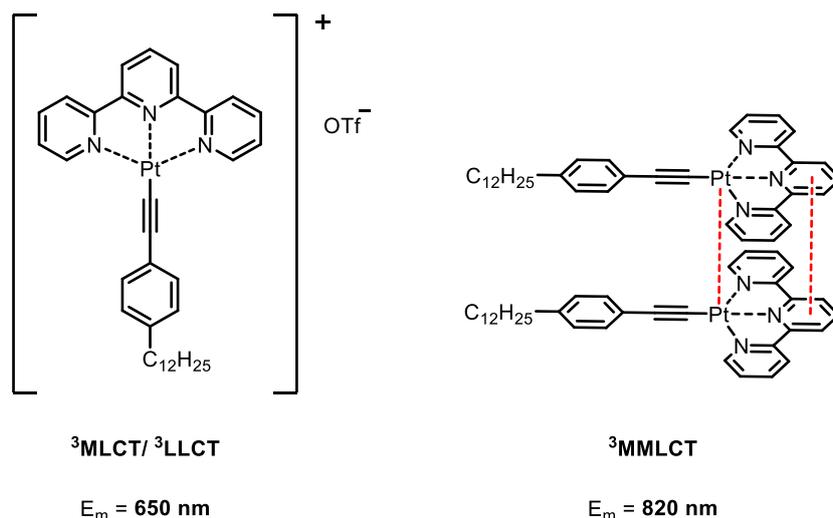


図 1-4-1-2. 距離依存的な発光特性をしめす Pt(II)錯体.

### 1-4-2. 金属錯体-金属錯体相互作用による触媒反応経路スイッチング

Co (II) サレン錯体はハロゲン化アルキルとの反応において、単核錯体と二核錯体で、異なる種類の反応を触媒する<sup>28</sup>。単核錯体では、還元的条件下でアルキル-Co (III) 錯体を経由して、還元反応が進行する。それに対して、2つの金属中心が近傍にある二核錯体では、アルキル-Co (III) 錯体同士が解離することで、生成するアルキルラジカル同士の C-C カップリング反応が優先する(図 1-4-2)。

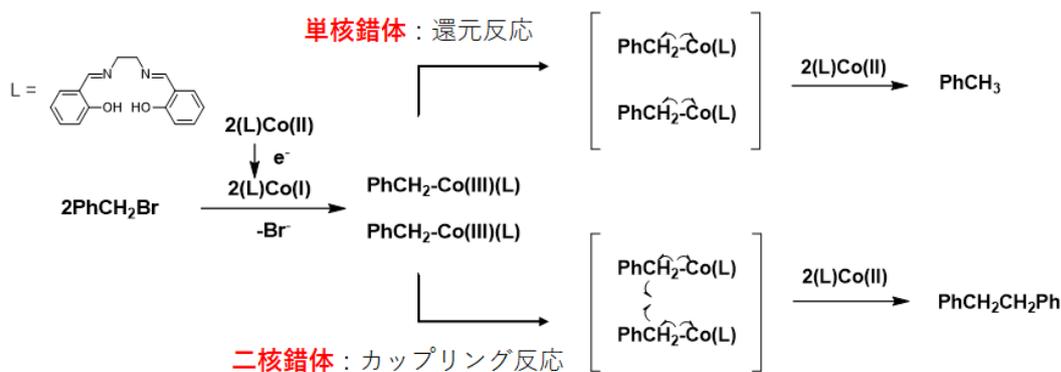
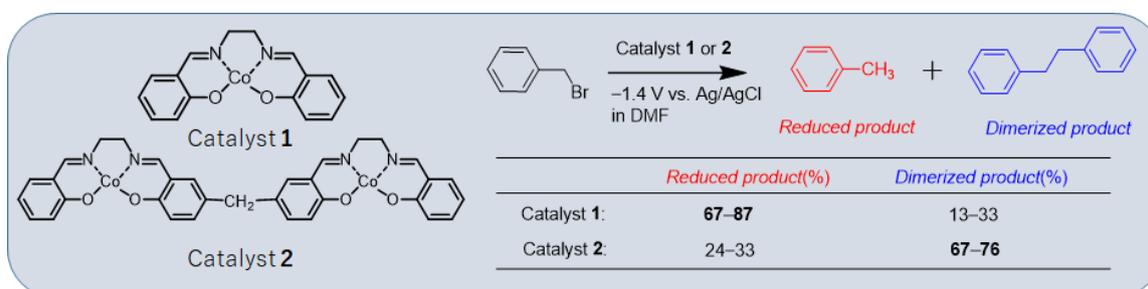


図 1-4-2. 単核と二核で異なる反応を触媒する Co(II)錯体.

### 1-4-3. 金属錯体-金属錯体相互作用による磁性スイッチング

田中らは、4つのロタキサン構造で架橋されたポルフィリン Cu(II)錯体とフタロシアニン Cu(II)錯体の分子間距離を、酸・塩基の添加によって変化させ、分子間スタッキングさせることで、Cu(II)-Cu(II)の磁性スイッチングに成功したことを報告している<sup>29</sup>。Cu(II)はd軌道に9つの電子を持っており、1つの不対電子があるため常磁性を示す。2分子間の距離が離れているとCu(II)は常磁性を示すが、距離が近づくと、隣り合った不対電子同士が反対向きに並ぶことで反強磁性を示す(図 1-4-3)。

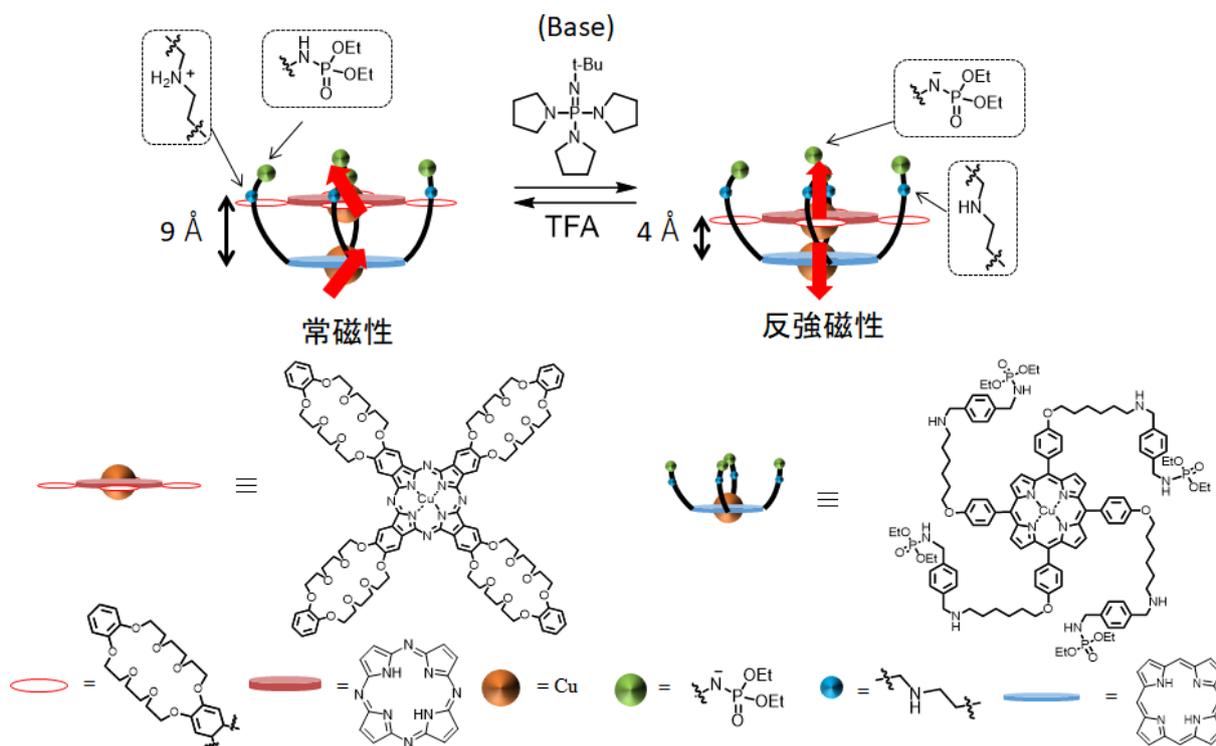


図 1-4-3. 分子間距離によって磁性スイッチングする Cu(II)錯体.(TFA:トリフルオロ酢酸)

## 1-5. 異種分子相互作用による機能制御

### 1-5-1. 異種分子相互作用によるフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)

上野らは、ペプチド上にピレン(Py)とクマリン誘導体(Cum)と $\beta$ -シクロデキストリン( $\beta$ -CD)を化学修飾し、PyとCumの距離と配向を制御することで、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET、フェルスター機構)と電子交換機構(デクスター機構)によるクエンチングのスイッチングを報告している<sup>30</sup>。フェルスター機構は、ドナーとアクセプター間の光エネルギーの移動である。ドナーとアクセプター間の吸収スペクトルの重なり積分が大きいほど、エネルギー移動が大きくなる。また、FRET効率は距離の6乗に反比例し、有効半径が1-10 nm程度である。一方、デクスター機構は、ドナーとアクセプター間の電子移動である。波動関数の重なりが必要となるので有効半径が0.3-1 nmの近距離のみで起こる。そのため、距離と配向の制御が重要になってくる。Cumが $\beta$ -CDに包接されていると、フェルスター機構によりPy(ドナー)からCum(アクセプター)にFRETが起こるが、 $\beta$ -CDに別の分子が包接されて、CumがPyに近づくと、クエンチングが起こる(図1-5-1)。2分子間の距離と配向を適切に制御したことで機能スイッチングが達成された。

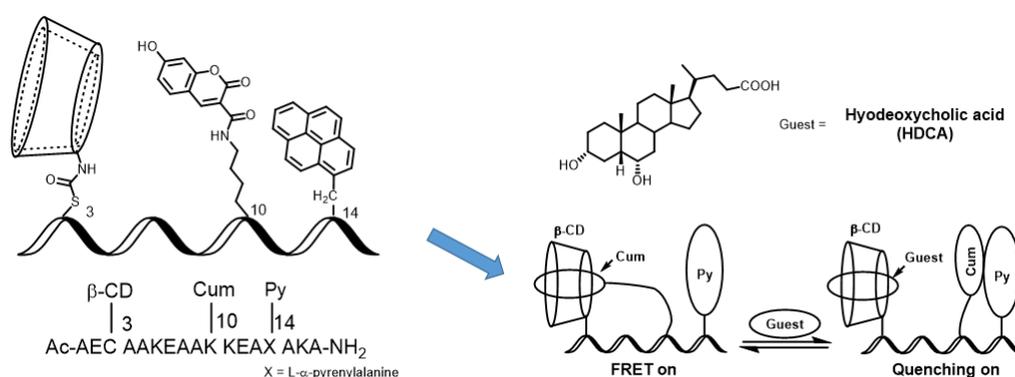


図 1-5-1. 異種分子相互作用による FRET の模式図.

### 1-5-2. 異種錯体相互作用による水素発生反応

酒井らは、分子内に Ru(II)と Pt(II)を持つ 2 価の錯体が犠牲試薬の存在下、可視光照射によって水素発生することを報告している<sup>31</sup>。可視光照射により、光増感剤である Ru(II)錯体が励起され、正孔と電子に分かれる。その電子が Pt(II)錯体に移動し、励起された Pt(II)錯体によって水(プロトン)が還元されて水素が発生する(図 1-5-2-1)。Ru(II)錯体と Pt(II)錯体が共有結合で繋がっていることで、スムーズに電子移動が起こり、犠牲試薬である EDTA が Ru(II)錯体に電子を供給することで、触媒的に反応が進行する(図 1-5-2-2)。

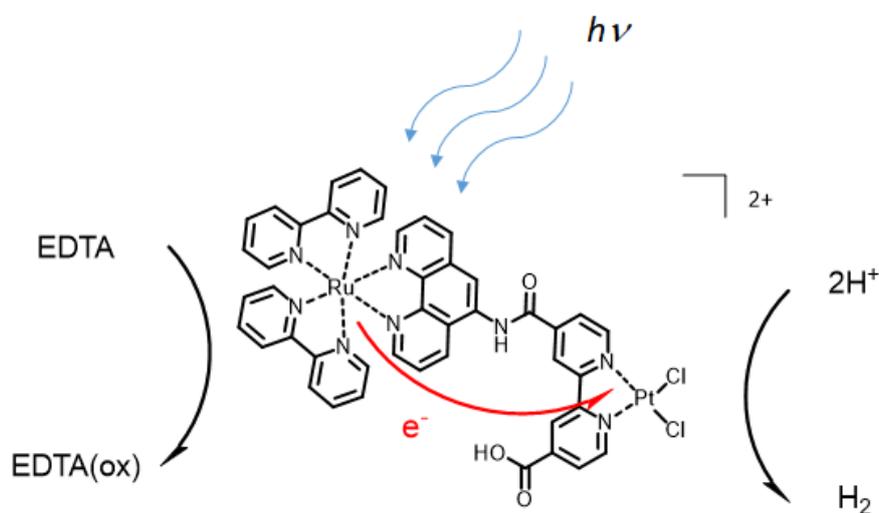


図 1-5-2-1. Ru(II)錯体と Pt(II)錯体の single component system による光駆動型水素発生反応.

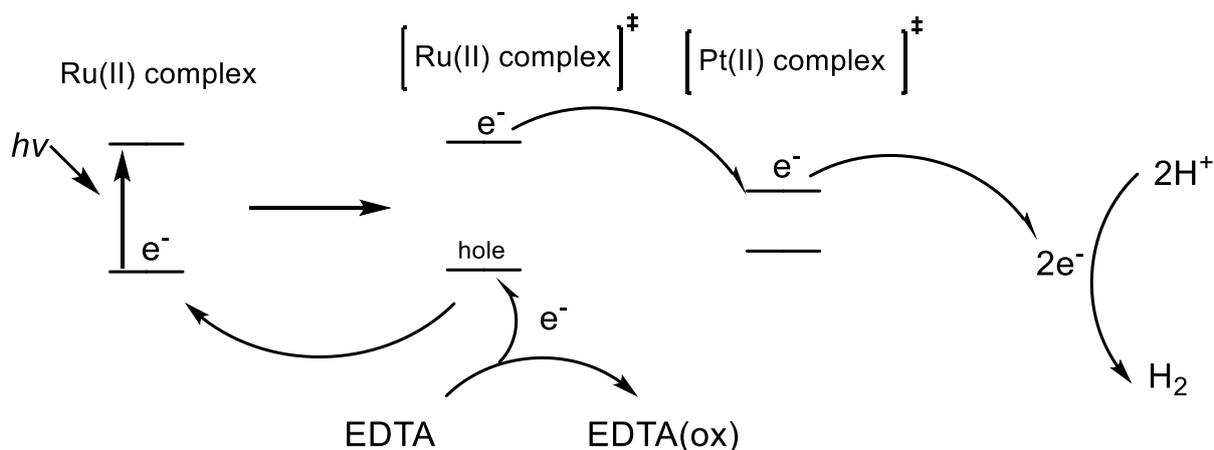


図 1-5-2-2. 光駆動型水素発生反応の反応メカニズム.

## 1-6. 本研究の目的

1-4.で示した金属錯体同士の相互作用による機能発現や、1-5.で示した異種分子の相互作用による機能発現は、ともに距離依存的な性質を持っている。このような距離依存的な性質をもつ金属錯体あるいは異種合成分子をアデニル酸キナーゼのような構造変化を示すタンパク質表面に化学修飾することで、生体分子機能をトリガーとした表面修飾分子機能の制御が可能になると考えられる。

本研究では、機能創発のためにデザインされたアデニル酸キナーゼ 3 変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の 2 つのシステイン残基に同種金属錯体/異種合成分子を化学修飾し、「タンパク質構造変化による同種金属錯体/異種合成分子の相互作用制御(図 1-6-1)」が可能であることを示した。また、システインチオールは、中性条件でも反応性が高いことから、修飾分子のコンジュゲーションサイトとして頻繁に利用されている。そして、異種合成分子の修飾において、システインチオールの反応性のコントロールは非常に重要である。

よって本研究では、「局所構造効果によるシステインチオールの反応性の評価」を行い、反応性の差を決定している大きなファクターを同定した。

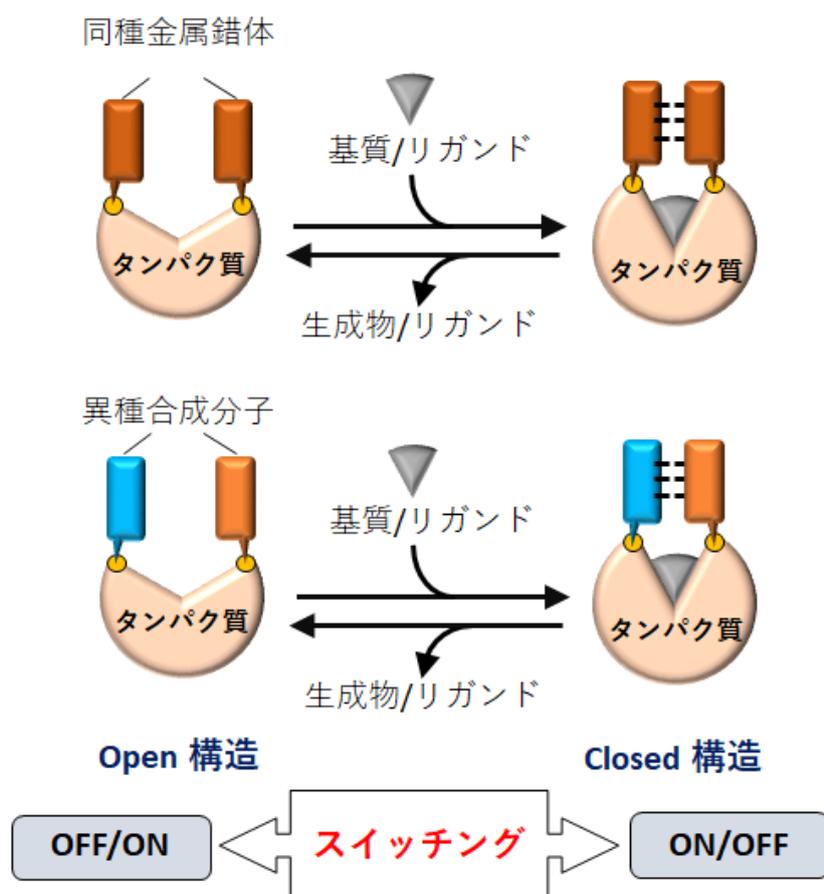


図 1-6-1. タンパク質の構造変化による同種金属錯体/異種合成分子の相互作用制御の模式図.

第2章では、ヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 **1**(図 1-6-2)を設計して合成した。コバルト(III)のサレン錯体は、末端エポキシドの開環反応の触媒として利用されている。その際、一つのコバルト錯体がルイス酸的に働いてエポキシドの酸素原子が配位し、もう一つのコバルト錯体が近づくことで反応が進行するというメカニズムが提唱されている<sup>32</sup>(図 1-6-3)。

そこで、Adk<sub>tm</sub>の2つのシステイン残基に2つのコバルトサレン錯体 **1**を化学修飾して、錯体修飾アデニル酸キナーゼ(Co-salen Adk<sub>tm</sub>)を構築した。そして Co-salen Adk<sub>tm</sub>を触媒としてスチレンオキシドの開環反応(スキーム 1-6-1)を評価し、Adk<sub>tm</sub>の構造変化による触媒反応の反応性制御が可能であることを示した。

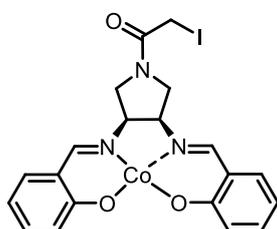


図 1-6-2. ヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 **1**の構造式.

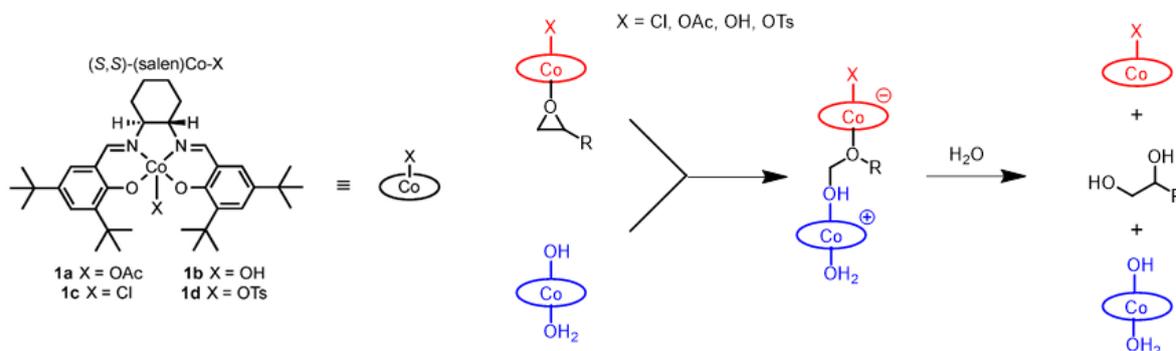
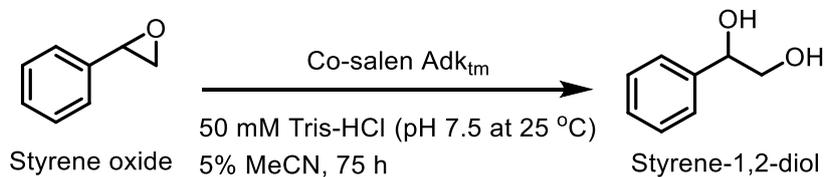


図 1-6-3. Co(III)サレン錯体による末端エポキシドの開環反応の推定反応メカニズム.



スキーム 1-6-1. スチレンオキシドの開環反応.

第3章では、システイン残基の化学修飾効率に対するシステイン残基周辺の局所構造効果を検証するために、0.5 等量のヨードアセトアミド基を有するピレン 2(図 1-6-4)を Adk<sub>tm</sub> 表面に化学修飾し、修飾タンパク質の生成分布を、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで検討した。その結果、Cys55 チオールの反応性は、Cys169 チオールよりも高いという結果を示した。Cys55 および Cys169 に隣接する酸性アミノ酸(Asp54/Glu170)が存在し、これらの残基との相互作用は、システインチオールの酸性度に影響を与えうる(図 1-6-5)。さらに、「システイン残基周辺の構造柔軟性」も考慮すべきファクターである。

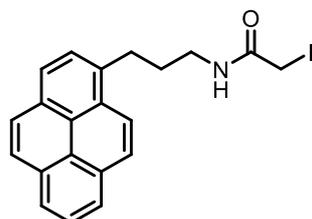


図 1-6-4. ヨードアセトアミド基を有するピレン 2 の構造式.

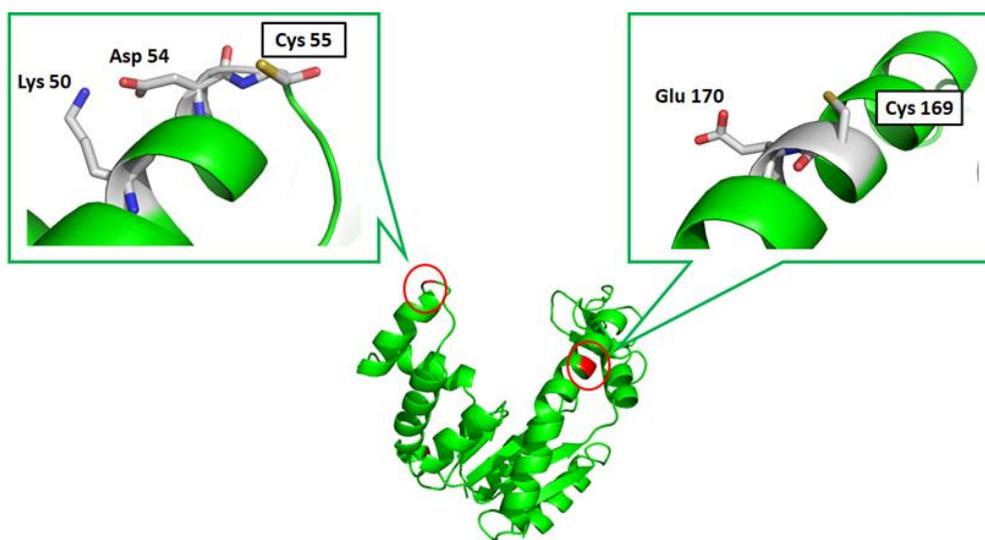


図 1-6-5. Adk<sub>tm</sub> のシステイン残基周辺の局所環境.(Cys55 と Cys169 は Pymol ソフトウェア上で wild-type Adk (PDB: 4AKE<sup>20</sup>)の Ala55 と Val169 をそれぞれ Cys に置き換えている.)

次に、2つのシステインチオールの反応性の差を決定しているのは、隣接する酸性アミノ酸の存在であると考え、アデニル酸キナーゼ 4 変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)を設計した。設計のコンセプトとして K50A の変異を加え、Lys50 と Asp54 の相互作用を除去することで、Cys55/169 の隣の酸性アミノ酸の条件を同じにした(図 1-6-6)。そして、限られた量(0.5 等量)のピレン 2 を Adk<sub>qm</sub> 表面に化学修飾し、修飾タンパク質の生成分布を、

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで検討した。そして、修飾タンパク質をトリプシン消化でペプチド断片にした後、HPLC分析でペプチド断片を分析した。そして、2つのシステインチオール反応性の差を大きく決定しているファクターを同定した。

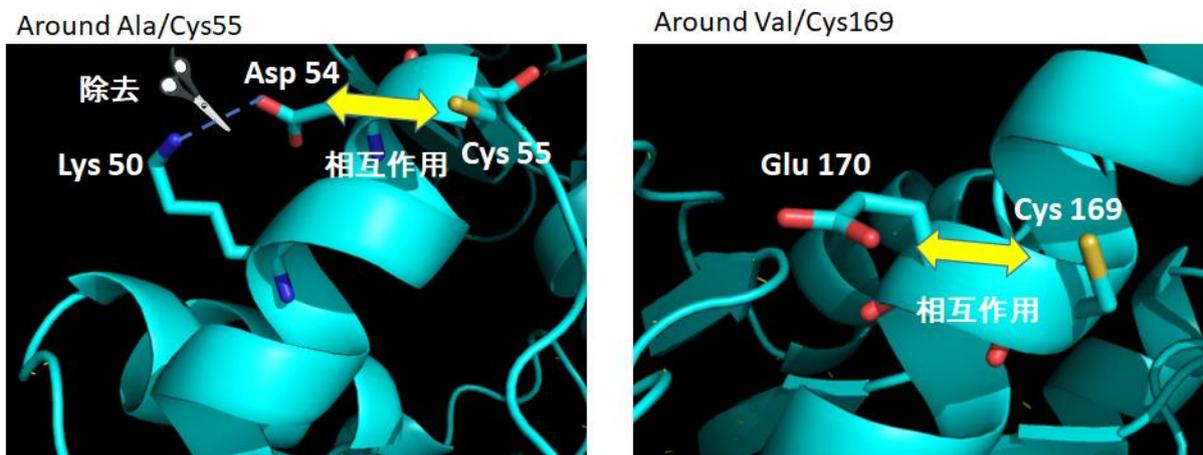


図1-6-6. アデニル酸キナーゼ4変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)の設計コンセプト。(Cys55とCys169はPymolソフトウェア上でwild-type Adk (PDB: 4AKE<sup>20</sup>)のAla55とVal169をそれぞれCysに置き換えている.)

第4章では、タンパク質構造変化による異種合成分子の相互作用制御が可能であることを実証するために、Adk<sub>tm</sub>の2つのシステイン残基にヨードアセトアミド基を有するピレン2とヨードアセトアミド基を有するフェナントロリン3を逐次的に化学修飾した(図1-6-7)。そして異種合成分子修飾アデニル酸キナーゼ(C55pyrene-C169phen修飾タンパク質、C55phen-C169pyrene修飾タンパク質)を用いて、ピレン2のモノマー蛍光を評価した。そしてAdk<sub>tm</sub>の構造変化によるピレン2とフェナントロリン3の相互作用制御が可能であることを示した。

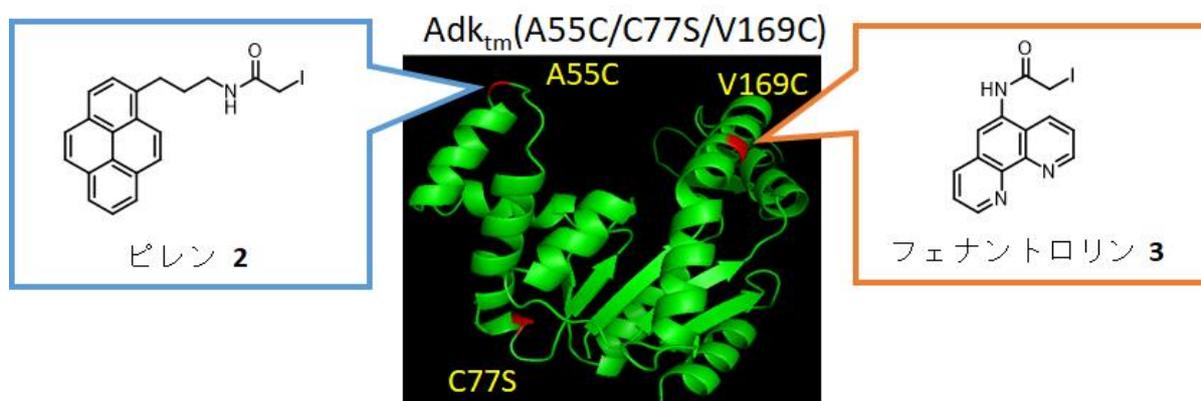


図1-6-7. ピレン2とフェナントロリン3によるAdk<sub>tm</sub>への逐次的化学修飾.

## 参考文献

1. Matsuo, T.; Hirota, S., Artificial enzymes with protein scaffolds: structural design and modification. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5638–5656.
2. Matsuo, T.; Miyake, T.; Hirota, S., Recent developments on creation of artificial metalloenzymes. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 151226(1)–151226(8).
3. Sato, H.; Hayashi, T.; Ando, T.; Hisaeda, Y.; Ueno, T.; Watanabe, Y., Hybridization of modified-heme reconstitution and distal histidine mutation to functionalize sperm whale myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 436–437.
4. Matsuo, T.; Imai, C.; Yoshida, T.; Saito, T.; Hayashi, T.; Hirota, S., Creation of an artificial metalloprotein with a Hoveyda-Grubbs catalyst moiety through the intrinsic inhibition mechanism of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1662–1664.
5. Wörsdörfer, B.; Henning, L. M.; Obexer, R.; Hilvert, D., Harnessing protein symmetry for enzyme design. *Acs Catal.* **2012**, *2*, 982–985.
6. Osseili, H.; Sauer, D. F.; Beckerle, K.; Arlt, M.; Himiyama, T.; Polen, T.; Onoda, A.; Schwaneberg, U.; Hayashi, T.; Okuda, J., Artificial Diels-Alderase based on the transmembrane protein FhuA. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1314–1321.
7. Noda, L., *The Enzyme* (Boyer, P. D., Ed.). *Academic press, New York*, **1973**, *8*, 279–305.
8. Ådén, J.; Wolf-Watz, M., NMR identification of transient complexes critical to adenylate kinase catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14003–14012.
9. Shapiro, Y. E.; Kahana, E.; Meirovitch, E., Domain mobility in proteins from NMR/SRLS. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12050–12060.
10. Formoso, E.; Limongelli, V.; Parrinello, M., Energetics and structural characterization of the large-scale functional motion of adenylate kinase. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8425(1)–8425(8).
11. Schulz, G. E., Induced-fit movements in adenylate kinases. *Faraday Discuss.* **1992**, *93*, 85–93.
12. Sheng, X. R.; Li, X.; Pan, X. M., An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22238–22242.
13. Ådén, J.; Weise, C. F.; Brännström, K.; Olofsson, A.; Wolf-Watz, M., Structural topology and activation of an initial adenylate kinase-substrate complex. *Biochemistry* **2013**, *52*, 1055–1061.
14. Kerns, S. J.; Agafonov, R. V.; Cho, Y. J.; Pontiggia, F.; Otten, R.; Pachov, D. V.; Kutter, S.; Phung, L. A.; Murphy, P. N.; Thai, V.; Alber, T.; Hagan, M. F.; Kern, D., The energy landscape of adenylate kinase during catalysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 124–131.
15. Pisljakov, A. V.; Cao, J.; Kamerlin, S. C.; Warshel, A., Enzyme millisecond conformational dynamics do not catalyze the chemical step. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 17359–17364.
16. Müller, C. W.; Schulz, G. E., Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap<sub>5</sub>A refined at 1.9 Å resolution - a model for a catalytic

transition-state. *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 159–177.

17. Rose, T.; Glaser, P.; Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Reinstein, J.; Le Blay, K.; Gilles, A. M.; Barzu, O., Structural and functional consequences of amino acid substitutions in the second conserved loop of Escherichia coli adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23654–23659.

18. Krishnamurthy, H.; Lou, H.; Kimple, A.; Vieille, C.; Cukier, R. I., Associative mechanism for phosphoryl transfer: a molecular dynamics simulation of Escherichia coli adenylate kinase complexed with its substrates. *Proteins* **2005**, *58*, 88–100.

19. Beckstein, O.; Denning, E. J.; Perilla, J. R.; Woolf, T. B., Zipping and unzipping of adenylate kinase: atomistic insights into the ensemble of open $\leftrightarrow$ closed transitions. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 160–176.

20. Müller, C. W.; Schlauderer, G. J.; Reinstein, J.; Schulz, G. E., Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure* **1996**, *4*, 147–156.

21. Jacob, M. H.; Amir, D.; Ratner, V.; Gussakowsky, E.; Haas, E., Predicting reactivities of protein surface cysteines as part of a strategy for selective multiple labeling. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13664–13672.

22. Yuan, W. W.; Yang, J. Y.; Kopečková, P.; Kopeček, J., Smart hydrogels containing adenylate kinase: translating substrate recognition into macroscopic motion. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15760–15761.

23. Fujii, A.; Hirota, S.; Matsuo, T., Reversible switching of fluorophore property based on intrinsic conformational transition of adenylate kinase during its catalytic cycle. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1218–1225.

24. Fujii, A.; Sekiguchi, Y.; Matsumura, H.; Inoue, T.; Chung, W. S.; Hirota, S.; Matsuo, T., Excimer emission properties on pyrene-labeled protein surface: correlation between emission spectra, ring stacking modes, and flexibilities of pyrene probes. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 537–548.

25. Ehrick, J. D.; Deo, S. K.; Browning, T. W.; Bachas, L. G.; Madou, M. J.; Daunert, S., Genetically engineered protein in hydrogels tailors stimuli-responsive characteristics. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 298–302.

26. Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T., A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature* **1999**, *399*, 766–769.

27. Moriuchi, T.; Yamada, M.; Yoshii, K.; Hirao, T., Controlled emission of platinum(II) terpyridyl complexes with poly-L-glutamic acid. *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 2562–2566.

28. Shimakoshi, H.; Ninomiya, W.; Hisaeda, Y., Reductive coupling of benzyl bromide catalyzed by a novel dicobalt complex having two salen units. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 1971–1974.

29. Yamada, Y.; Okamoto, M.; Furukawa, K.; Kato, T.; Tanaka, K., Switchable

- intermolecular communication in a four-fold rotaxane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 709–713.
30. Hossain, M. A.; Mihara, H.; Ueno, A., Novel peptides bearing pyrene and coumarin units with or without  $\beta$ -cyclodextrin in their side chains exhibit intramolecular fluorescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11178–11179.
31. Ozawa, H.; Haga, M. A.; Sakai, K., A photo-hydrogen-evolving molecular device driving visible-light-induced EDTA-reduction of water into molecular hydrogen. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4926–4927.
32. Ford, D. D.; Nielsen, L. P.; Zuend, S. J.; Musgrave, C. B.; Jacobsen, E. N., Mechanistic basis for high stereoselectivity and broad substrate scope in the (salen)Co(III)-catalyzed hydrolytic kinetic resolution. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15595–15608.

## 第 2 章：タンパク質構造変化による同種金属錯体の相互作用制御

### 2-1. 研究目的

これまでに、動的特徴を示すアデニル酸キナーゼ表面にピレン分子を修飾し、ピレン分子の  $\pi$ - $\pi$  スタッキングに基づいて発光特性をスイッチングするバイオシステムの構築に成功した研究が報告されている<sup>1,2</sup>。しかしながら、 $\pi$  分子系のスタッキングによる効果は、主として発光特性に限られている。ところが、金属錯体同士のスタッキングによる効果は、発光特性<sup>3</sup>に限らず、磁性<sup>4</sup>、触媒反応<sup>5</sup>などの他の機能も考えられる。そこで本研究では、 $\pi$  分子系にはない金属錯体同士の相乗効果を期待し、金属錯体-金属錯体相互作用を制御することができるバイオ触媒を創成し、標的機能として、金属錯体が関与する触媒反応に着目した。基盤となるタンパク質として、構造変化に伴い距離が大きく変化する Ala55 と Val169 を Cys に変異させ、金属錯体の導入を防ぐために Cys77 を Ser に変換した、大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>) を使用した。金属錯体同士が接近することで相乗効果を示すコバルトサレン錯体 **1** を 2 つの Cys に導入することで、タンパク質構造変化による触媒反応の反応性制御が可能であることを示した (図 2-1)。

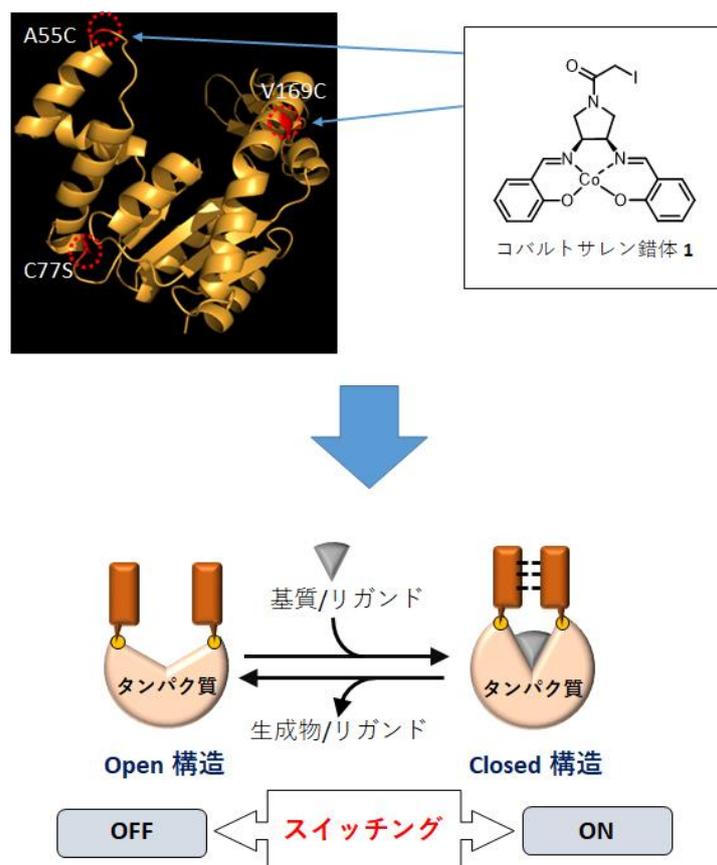


図 2-1. 金属錯体修飾タンパク質の構築およびタンパク質の構造変化による同種金属錯体の相互作用制御の模式図.

## 2-2. コバルト(III)サレン錯体による末端エポキシドの開環反応

コバルト(III)のサレン錯体は、末端エポキシドの開環反応の触媒として利用されている。その際、一つのコバルト錯体がルイス酸的に働いてエポキシドの酸素原子が配位し、もう一つのコバルト錯体が近づくことで反応が進行するというメカニズムが提唱されている<sup>6</sup>(図 2-2)。

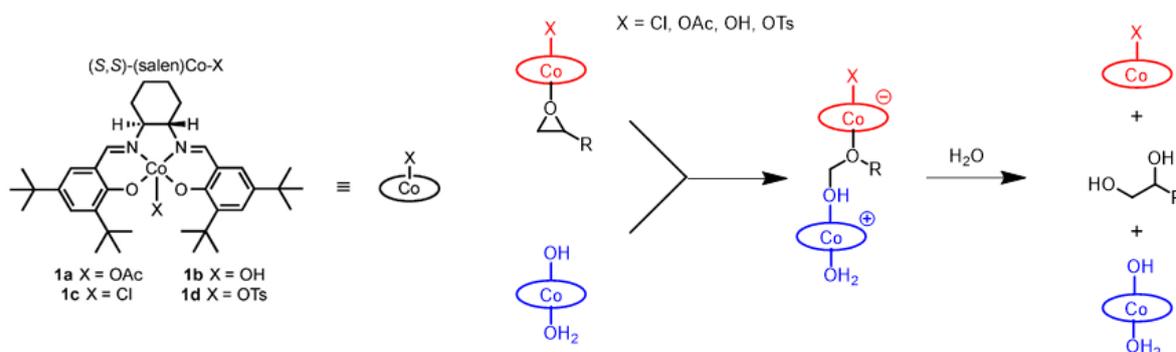


図 2-2. Co(III)サレン錯体による末端エポキシドの開環反応の推定反応メカニズム.

## 2-3. コバルトサレン錯体 **1** の分子設計と合成<sup>7,8</sup>

タンパク質構造変化による触媒反応の反応性制御が可能であることを示すために、システイン残基への修飾部位であるヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 **1**(図 2-3-1)を設計し、9 段階の反応により合成した(スキーム 2-3-1)。7 段階目までは、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 分析で化合物を同定した。8 段階目のヨードアセトアミドサレンリガンドは<sup>1</sup>H-NMR 分析(図 2-3-2)、ESI-HR-MS 分析(図 2-3-3)で同定し、最終化合物は ESI-HR-MS 分析(図 2-3-4)で同定した。さらに、コバルトサレン錯体の UV-vis スペクトルはすでに帰属されており<sup>9</sup>、350-450 nm 付近に MLCT (Metal to Ligand Charge Transfer、d- $\pi^*$ 遷移)、250-350 nm 付近に Ligand ( $\pi$ - $\pi^*$ 遷移)に由来するピークが観測される。合成したコバルトサレン錯体 **1** の UV-vis スペクトルは、コバルトサレン錯体に典型的な UV-vis スペクトルが観測された(図 2-3-5)。

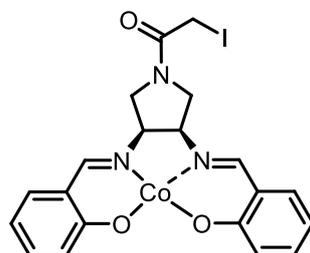
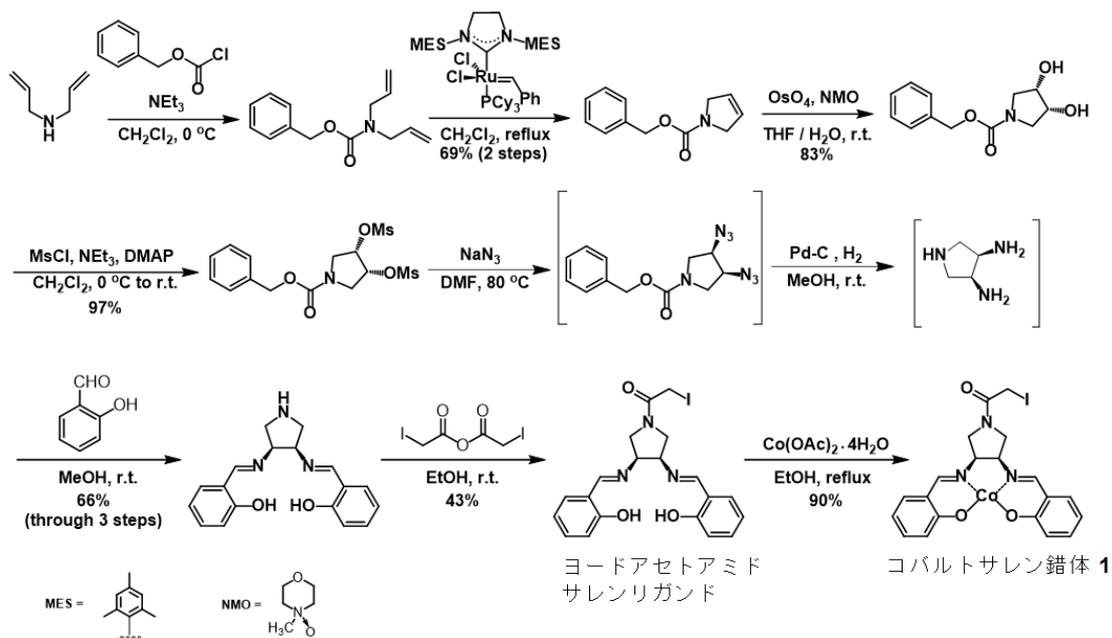


図 2-3-1. ヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 **1** の構造式.



スキーム 2-3-1. コバルトサレン錯体 **1** の合成スキーム。

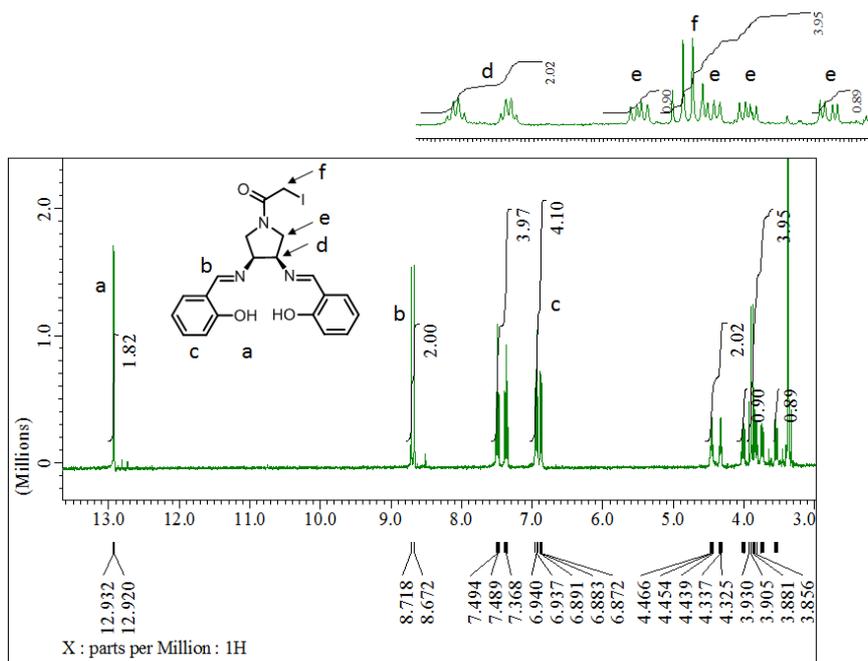


図 2-3-2. ヨードアセトアミドサレンリガンドの 400 MHz  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル。

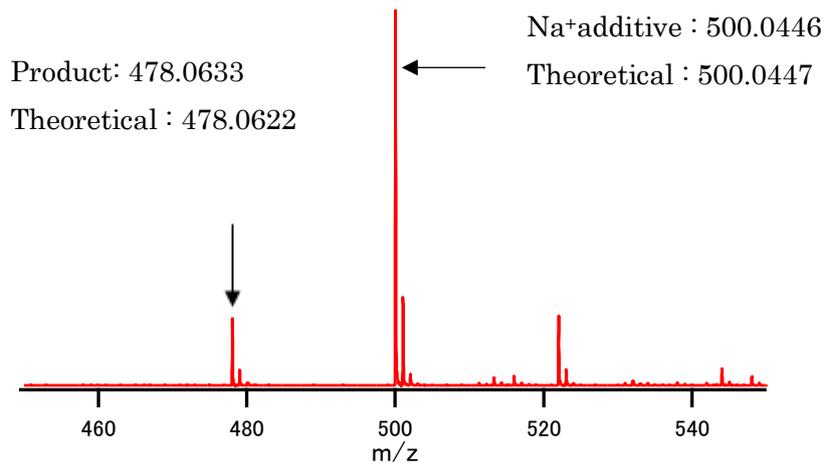


図 2-3-3. ヨードアセトアミドサレンリガンドの ESI-HR-MS スペクトル.

Product: 533.9715  
Theoretical: 533.9725

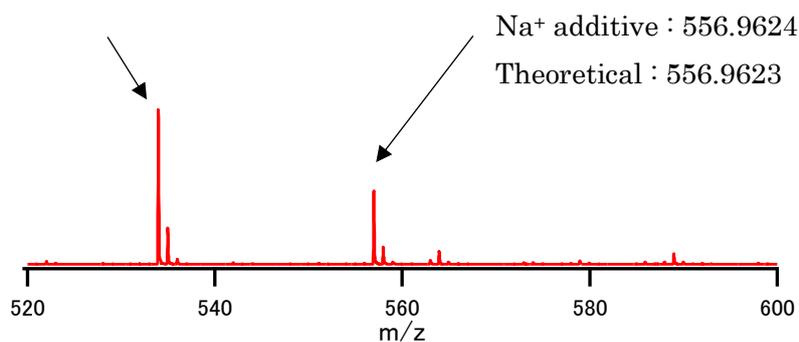


図 2-3-4. コバルトサレン錯体 **1** の ESI-HR-MS スペクトル.

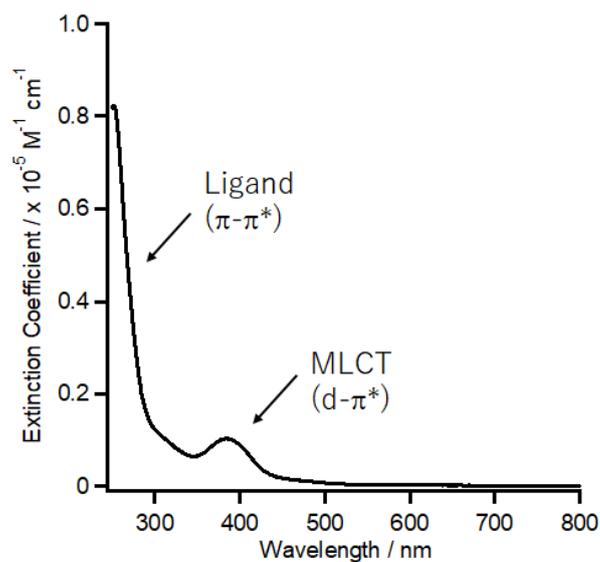


図 2-3-5. コバルトサレン錯体 **1** の UV-vis スペクトル. 条件: 14  $\mu$ M in 10 mM KPB (pH 7.5 at 25  $^{\circ}$ C, DMSO 0.05% (v/v)).

## 2-4. 同種金属錯体修飾アデニル酸キナーゼ(Co-salen Adk<sub>tm</sub>)のキャラクタリゼーション

### 2-4-1. コバルトサレン錯体 1 による Adk<sub>tm</sub> への化学修飾

Adk<sub>tm</sub> に 2 つのコバルトサレン錯体 1(図 2-3-1)を化学修飾するために、2.5 等量のコバルトサレン錯体 1 と Adk<sub>tm</sub> を pH 8.0 の条件で 19 時間インキュベートした。Hitrap desalting カラムクロマトグラフィー(ゲルろ過カラム、GE Healthcare)による精製後、MALDI-TOF-MS による質量分析測定を行ったところ、コバルトサレン錯体 1 が 2 分子導入された Adk<sub>tm</sub> の分子量ピーク( $m/z=24,419$ 、 $[M+H^+]$ ) が観測された(図 2-4-1)。このことから、Adk<sub>tm</sub> 表面にコバルトサレン錯体 1 が 2 分子修飾された Co-salen Adk<sub>tm</sub> が構築されたことを確認した。

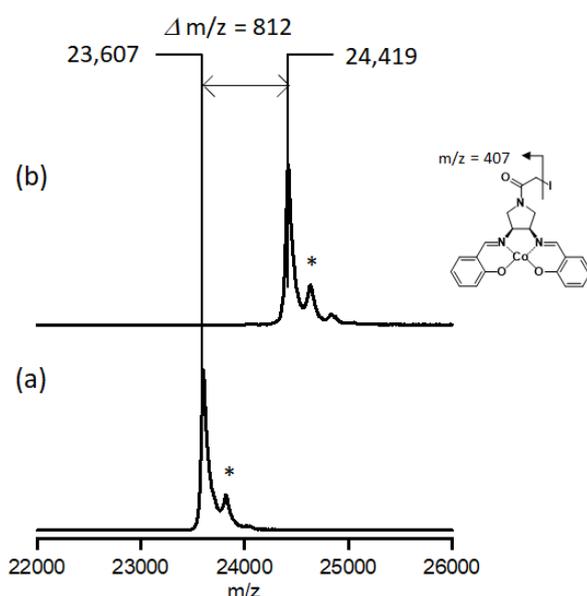


図 2-4-1. Co-salen Adk<sub>tm</sub> の MALDI-TOF-MS スペクトル. (a) 未修飾 Adk<sub>tm</sub>; (b) Co-salen Adk<sub>tm</sub>; \*ピーク: マトリックス(シナピン酸)付加物.

### 2-4-2. UV-vis スペクトルおよび CD スペクトル

コバルトサレン錯体の UV-vis スペクトルはすでに帰属されており<sup>9</sup>、350-450 nm 付近に、MLCT ( $d-\pi^*$ 遷移)、250-350 nm 付近に Ligand ( $\pi-\pi^*$ 遷移)に由来するピークが観測される。Co-salen Adk<sub>tm</sub> の UV-vis スペクトルでは、コバルトサレン錯体に典型的な UV-vis スペクトルが観測された(図 2-4-2-1)。MALDI-TOF-MS スペクトルの結果と合わせ、Adk<sub>tm</sub> にコバルトサレン錯体が修飾されていることが示された。

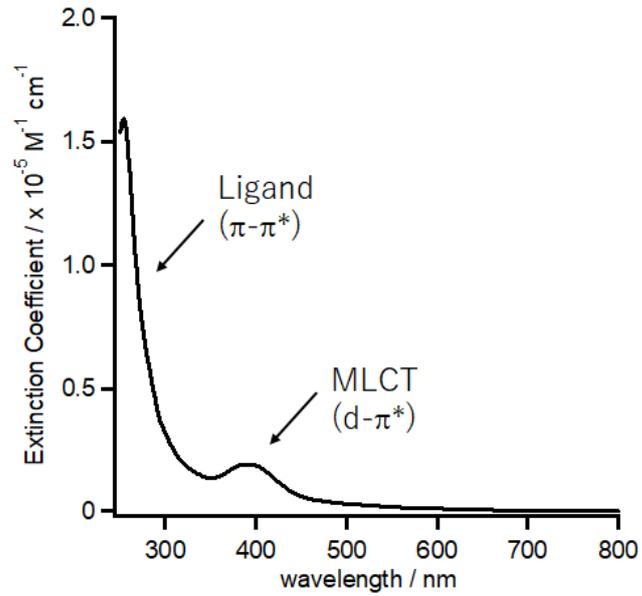


図 2-4-2-1. Co-salen Adk<sub>tm</sub> の UV-vis スペクトル. 条件 : [Co-salen Adk<sub>tm</sub>] = 7 μM in 10 mM KPB (pH 7.5 at 25 °C).

Co-salen Adk<sub>tm</sub> は未修飾 Adk<sub>tm</sub> と類似の CD スペクトルを示した(図 2-4-2-2)。この結果より、Co-salen Adk<sub>tm</sub> の 2 次構造は保持されていることが示された。

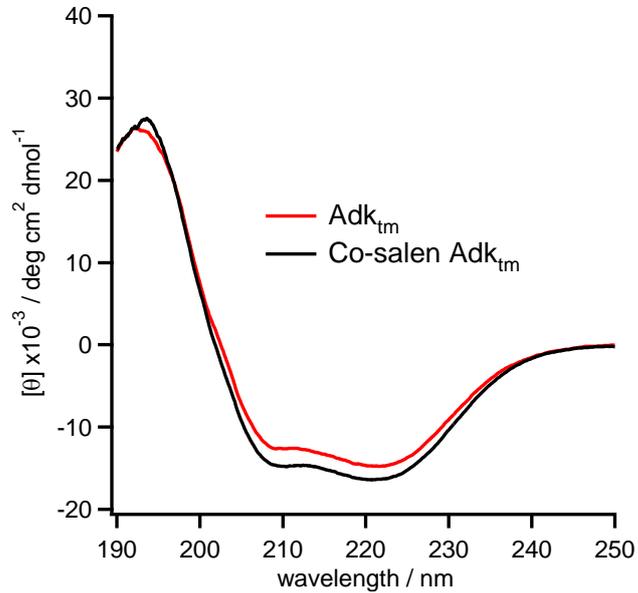
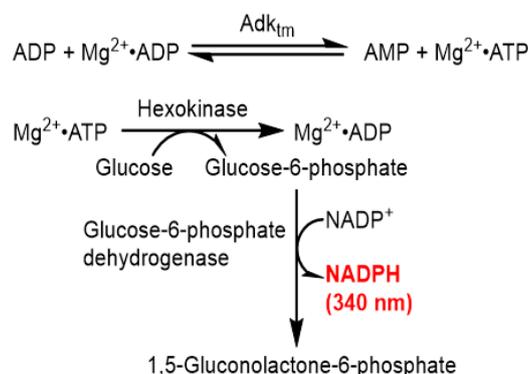


図 2-4-2-2. Co-salen Adk<sub>tm</sub> の CD スペクトル. (—) Co-salen Adk<sub>tm</sub>, (—) Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [protein] = 7 μM in 10 mM KPB (pH 7.5 at 25 °C).

### 2-4-3. キナーゼ活性の確認

アデニル酸キナーゼが本来持っているキナーゼ活性を確認するため、ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの共役反応を行った。この共役反応により、最終的に生成する還元型ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸(NADPH)を 340 nm の吸光度で追跡することで、キナーゼ活性を確認することができる<sup>10</sup> (スキーム 2-4-3)。Co-salen Adk<sub>tm</sub> の酵素活性は、未修飾 Adk<sub>tm</sub> と比較し 2.5 割程度抑制されていた(図 2-4-3)。アデニル酸キナーゼの触媒過程の律速段階は、生成物放出時の構造変化(closed 構造→open 構造)に関連していることが提案されており<sup>11-14</sup>、いくつかのアデニル酸キナーゼ変異体は、wild type アデニル酸キナーゼと比較して  $K_m$  値が上昇することが報告されている<sup>15,16</sup>。従って、タンパク質表面への錯体修飾が closed 構造に影響を与えていると考えられるが、Co-salen Adk<sub>tm</sub> は、アデニル酸キナーゼとしてのキナーゼ活性を保持していることが示された。また、このことから、Co-salen Adk<sub>tm</sub> の 2 次構造が保持されていることが確認された。



スキーム 2-4-3. ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの共役反応。

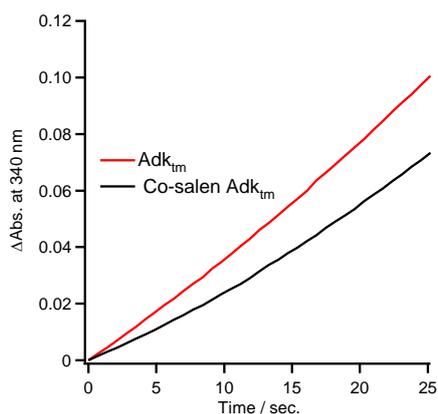


図 2-4-3. 酵素活性測定の結果. (—) Co-salen Adk<sub>tm</sub>, (—) Adk<sub>tm</sub>. 条件 : [protein] = 44 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), [glycylglycine] = 58 mM, [NADP<sup>+</sup>] = 2.3 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 10 mM, Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase = 15 units/ 2mL, [ADP] = 2 mM, [Glucose] = 10 mM.

#### 2-4-4. ICP-MS 分析による $\text{Co}^{2+}$ の定量と Bradford 分析によるタンパク質の定量

MALDI-TOF-MS 分析では、試料をイオン化させて測定を行うため、仮に静電的相互作用や疎水的相互作用などの非特異的吸着により、コバルトサレン錯体 **1** がアデニル酸キナーゼに結合していたとしても、強いエネルギーを与えるためピークとして観測されない。そこで、Co-salen Adk<sub>tm</sub> のサンプルを 2 つに分け、1 つは ICP-MS 分析による  $\text{Co}^{2+}$  の定量<sup>17</sup> を行い、もう 1 つは Bradford 分析によるタンパク質の定量<sup>18</sup> を行った(図 2-4-4)。そして、それぞれの検量線より濃度を算出した(表 2-4-4)。表 2-4-4 より、タンパク質に対してコバルトサレン錯体 **1** が 2.32 結合しているという結果が得られた。この結果より、アデニル酸キナーゼに 2 つのコバルトサレン錯体 **1** が結合しており、非特異的相互作用によるコバルトサレン錯体 **1** の結合がないことが示された。

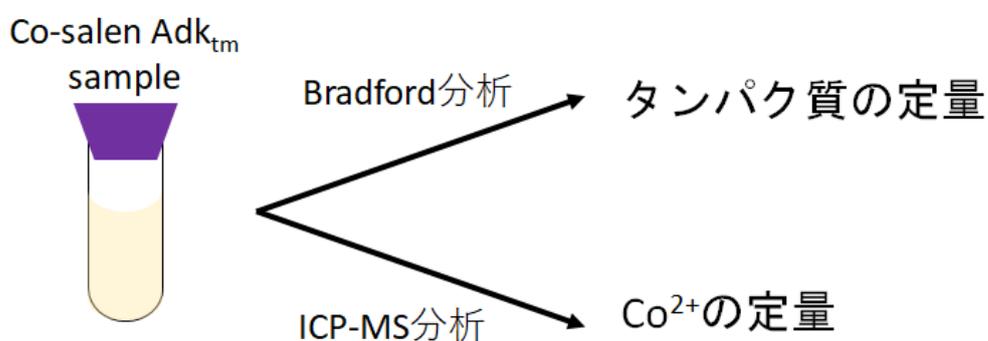


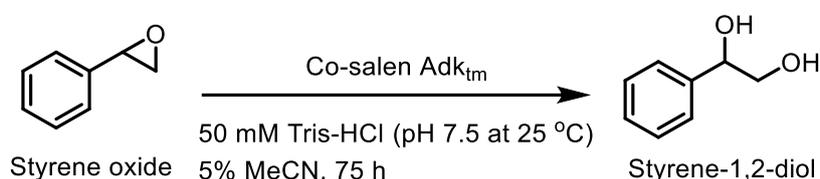
図 2-4-4. ICP-MS 分析による  $\text{Co}^{2+}$  の定量と Bradford 分析によるタンパク質の定量の方法.

表 2-4-4. ICP-MS 分析による  $\text{Co}^{2+}$  の定量と Bradford 分析によるタンパク質の定量の結果.

	タンパク質	$\text{Co}^{2+}$
濃度 [ $\mu\text{M}$ ]	0.69	1.6
比率	1	2.32

## 2-5. Co-salen Adk<sub>tm</sub> を触媒としたスチレンオキシドの開環反応の評価

Co-salen Adk<sub>tm</sub> を触媒としたスチレンオキシドの開環反応を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C)、5%アセトニトリル中で 75 時間反応させた(スキーム 2-5)。反応追跡は HPLC 分析で行い、内部標準として 1-フェニルエタノール(1-PE)を用いた(図 2-5-1)。触媒回転数(TON)は、生成物の生成量を元に計算した。阻害剤 P<sup>1</sup>,P<sup>5</sup>-ジ (アデノシン-5') 五リン酸(Ap<sub>5</sub>A、図 2-5-2) は、アデニル酸キナーゼを closed 構造に保つための試薬である。評価方法として、アデニル酸キナーゼを open 構造と closed 構造の 2 つの状態に分けて反応性を比較し TON で評価した(表 2-5)。その結果、open 構造 (TON=14) に比べ、closed 構造 (TON = 17) の方が、1.2 倍反応性が向上した。この結果は、closed 構造になった時に、錯体同士が近づき協奏的に働いたためであると考えられる。このことは、金属錯体同士の相互作用をタンパク質の構造変化によって制御できたことを示唆している。



スキーム 2-5. スチレンオキシドの開環反応.

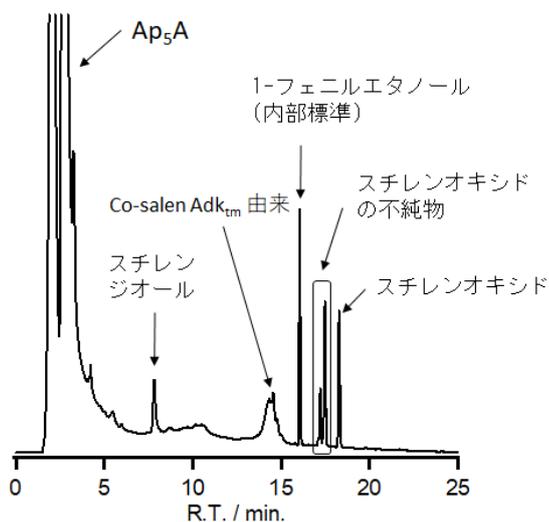


図 2-5-1. 27 時間後における closed 構造の HPLC クロマトグラム. HPLC 分析条件: Tosoh ODS-100V カラム(4.6 mm×250 mm), 流速:1 mL/min., 検出波長: 254 nm, バッファーA: 超純水, バッファーB: アセトニトリル, 分離メソッド: 0-7 min. B20%, 7-12 min. B20-70%, 12-22 min. B70%, 22-32 min. B100%.

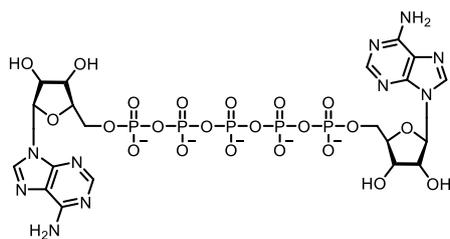


図 2-5-2. Ap<sub>5</sub>A の構造式.

表 2-5. スチレンオキシドの開環反応の結果.<sup>a</sup>

	Open 構造	Closed 構造
TON <sup>b</sup>	14	17

<sup>a</sup> 反応条件: [スチレンオキシド] = 1 mM, [Co-salen Adk<sub>tm</sub>] = 30 μM, [Ap<sub>5</sub>A] = 0 or 300 μM, V = 556 μL in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C, アセトニトリル 5% (v/v), 25 °C, 75 h). <sup>b</sup> スチレンジオール<sup>1</sup>の生成量を元に計算した.

## 2-6. まとめ

本章では、タンパク質の構造変化による触媒反応の反応性制御が可能であることを示すために、ヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 **1** をアデニル酸キナーゼ 3 変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の 2 つのシステイン残基に化学修飾した。コバルト(III)のサレン錯体は、末端エポキシドの開環反応の触媒として利用されている。その際、一つのコバルト錯体がルイス酸的に働いてエポキシドの酸素原子が配位し、もう一つのコバルト錯体が近づくことで反応が進行するというメカニズムが提唱されている<sup>6</sup>。実際に、得られた錯体修飾アデニル酸キナーゼ(Co-salen Adk<sub>tm</sub>)を触媒として、スチレンオキシドの開環反応を評価した結果、錯体同士が離れている open 構造 (TON = 14) に比べて、錯体同士が近づいている closed 構造 (TON = 17) の方が、1.2 倍反応性が向上した。この結果は、closed 構造になった時に、錯体同士が近づき協奏的に働いたためであると考えられる。よって、タンパク質の構造変化による同種金属錯体の相互作用制御がわずかながら達成された。

さらなる触媒反応の反応性制御を達成するための 1 つの方法は、金属錯体の修飾位置の検討が考えられる(図 2-6)。今回使用した Adk<sub>tm</sub> は、修飾した分子同士がスタッキングするようにデザインされている<sup>2</sup>。しかしながら触媒反応の場合、基質が 2 つの錯体の間に入りこむ必要がある(図 2-2)。そのため、修飾位置をファインチューニングすることで、コバルトサレン錯体 **1** によるエポキシドの開環反応のさらなる反応性制御が可能になると考えられる。

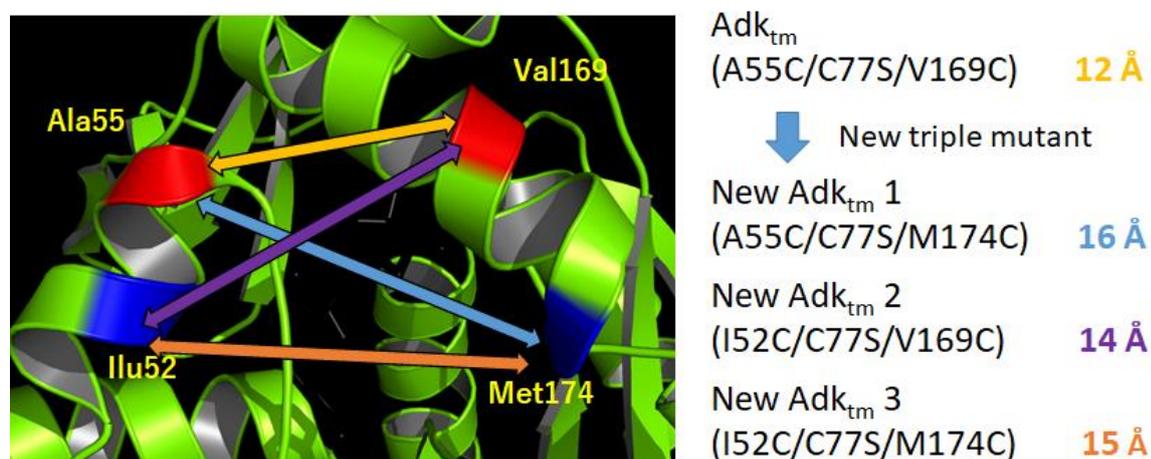


図 2-6. 金属錯体の修飾位置のファインチューニング。

## 2-7. 実験項

### 2-7-1. 使用試薬および使用機器

#### 使用試薬

本研究で使用した試薬は、和光純薬工業、東京化成工業、シグマアルドリッチ、ナカライテスクから販売されているものを使用した。

#### 使用機器

- ・ SHIMADZU BIOTECH BioSpec-nano
- ・ 紫外可視吸収分光光度計 (Shimadzu UV-2550)
- ・ FPLC (ÄKTA prime plus FPLC chromatogram system (GE Healthcare))
- ・ HPLC (Shimadzu, SPD-M20A(diode array detector), LC-20AB (liquid chromatograph), DGU-20A<sub>3</sub> (Degasser))
- ・ 400 MHz 超伝導 NMR (JEOL JNM-ECP-400)
- ・ MALDI 専用飛行時間型質量分析計 (Bruker Autoflex II)
- ・ ESI 専用飛行時間型質量分析計 (JEOL AccuTOF、JMS-T100LC)
- ・ 誘導結合プラズマ質量分析装置 (Shimadzu ICPM-8500)
- ・ 円二色性分散計 (JASCO J-725)
- ・ ラピダス ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO AE-6530P)
- ・ パワーステーション 1000XP (ATTO AE-8750)

### 2-7-2. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C;Adk<sub>tm</sub>) の発現と精製<sup>1</sup>

#### 形質転換

アデニル酸キナーゼ 3 変異体(A55C/C77S/V169C;Adk<sub>tm</sub>)の発現がコードされた pEAK91 プラスミド(1 ng/μL) 5 μL を HB101 コンピテントセルに加え、氷浴上で 5 分静置した。その後、ヒートショック(42 °C、1 min)を行い、氷浴上で 5 分静置した。SOC 培地 400 μL を加えインキュベートした (37 °C、1 h)。LB プレート培地に HB101 コンピテントセルを撒きインキュベートした (37 °C、16 h)。

#### 培養

LB 培地 5 mL にアンピシリン (100 mg/mL) 5 μL を加え、LB プレート培地のコロニーを爪楊枝でピックアップして植菌し、振とう培養した (37 °C、250 rpm、9 h)。その後、LB 培地 600 mL にアンピシリン (100 mg/mL) 600 μL を加えたものにスケールアップし、振とう培養した (37 °C、245 rpm、15 h)。そして遠心分画 (4 °C、5000 rpm、10 min) により、溶液成分 (LB 培地) と沈殿物 (菌体)に分離し、菌体を回収した。

#### Adk<sub>tm</sub> の抽出

100 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH = 7.5 at 4 °C) で菌体を懸濁さ

せた (菌体 : バッファー = 1 g : 2 mL)。その後、凍結融解を 3 回行い、菌体破碎 (Amp 40%、on 1sec、off 1 sec、6 min) を行った。そして、遠心分画 (4 °C、17000 G、1 h) により、溶液成分 (Adk<sub>tm</sub> を含むタンパク質) と沈殿物 (大腸菌由来の不溶成分) に分離し、溶液成分を回収した。その後、溶液成分にストレプトマイシン硫酸塩を加え(タンパク溶液 : ストレプトマイシン硫酸塩 = 1 mL : 10 mg)、10 分攪拌した。そして、遠心分画(4 °C、17000 G、30 min)により、溶液成分を回収した。

## 透析

0.1% 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH = 7.5 at 4 °C) で透析を行い(25 倍希釈×3)、NaCl 濃度を下げた。

## DEAE Sepharose カラムクロマトグラフィー (陰イオン交換カラムクロマトグラフィー)

透析したタンパク質溶液を DEAE Sepharose カラム (CV=25 mL) で精製し、回収する部分は UV-vis スペクトル (図 2-7-2-1)で確認し、素通り成分 150 mL を回収した。その後、限外ろ過でタンパク溶液を濃縮した。

カラム条件

バッファー : 1 mM トリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP) を含む  
50 mM Tris-HCl バッファー (pH = 7.5 at 4 °C)

流速 : 0.8 mL/min

フラクション : 5 mL / tube

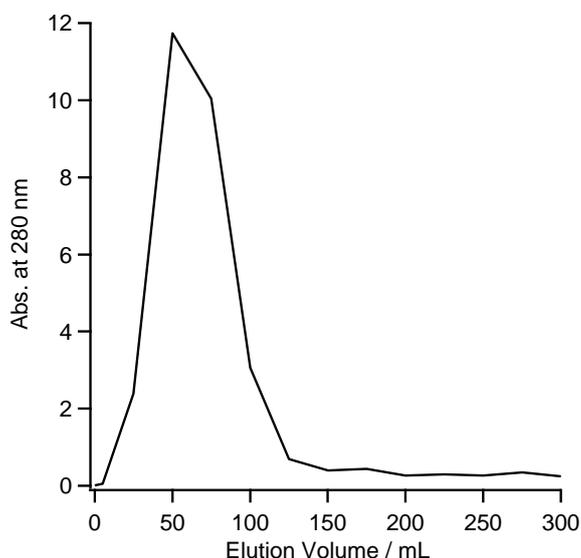


図 2-7-2-1. DEAE Sepharose カラムクロマトグラフィーのクロマトグラム.

### Blue Sepharose カラムクロマトグラフィー (アデニル基選択的アフィニティーカラムクロマトグラフィー)

濃縮したタンパク溶液を Blue Sepharose カラム (CV = 62 mL) で精製した(図 2-7-2-2)。該当するフラクション (60–200 mL) を回収し、限外ろ過で濃縮した。

カラム条件

バッファー : A: 1 mM TCEP を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH = 7.5 at 4 °C)

B: 1 mM TCEP + 1 M KCl を含む 50 mM Tris-HCl バッファー  
(pH = 7.5 at 4 °C)

流速 : 0.5 mL/min

グラジエント : linear グラジエント (0→50%、0 - 250 mL)

フラクション : 5 mL / tube

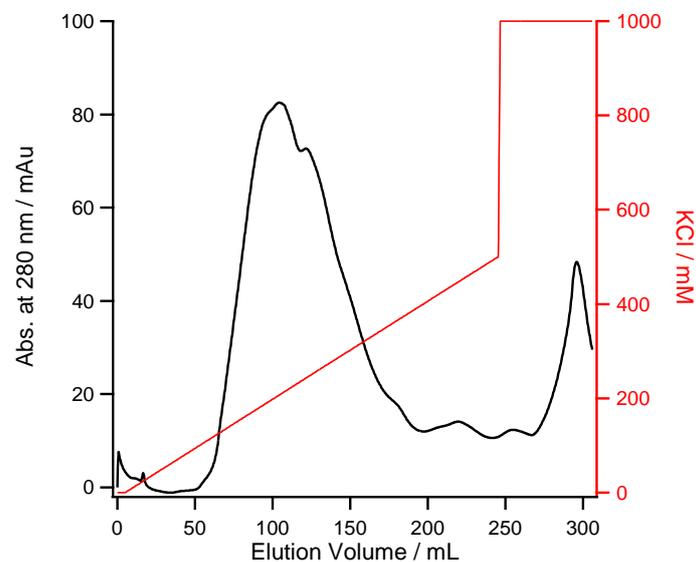


図 2-7-2-2. Blue Sepharose カラムクロマトグラフィーのクロマトグラム.

### Hi-Load 26/600 カラムクロマトグラフィー (ゲル濾過カラムクロマトグラフィー)

濃縮したタンパク溶液をフィルターに通し、Hi-Load 26/600 カラム (CV = 320 mL) で精製した(図 2-7-2-3)。該当するフラクション (160–180 mL) を回収し、ポリアクリルアミド電気泳動で純度を確認した(図 2-7-2-4)。

カラム条件

バッファー : 1 mM TCEP を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH = 7.5 at 4 °C)

流速 : 0.8 mL/min

フラクション : 5 mL / tube

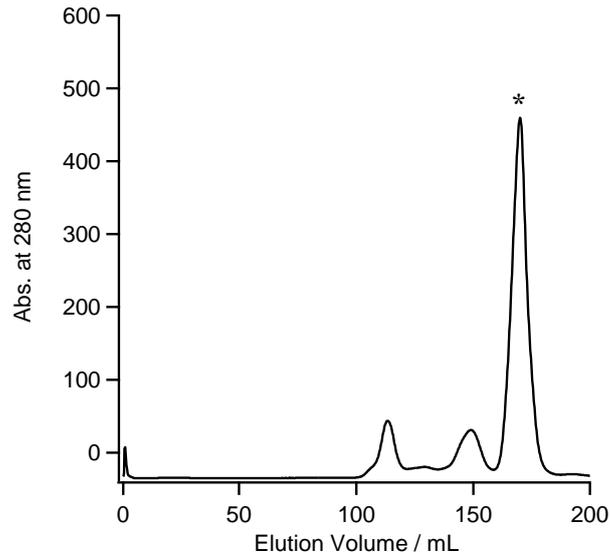


図 2-7-2-3. Hi-Load 26/600 カラムクロマトグラフィーのクロマトグラム.\*ピークの部分を回収した.

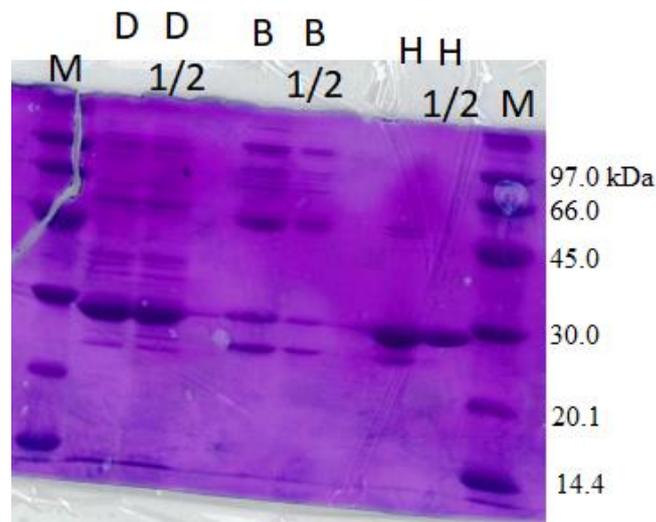


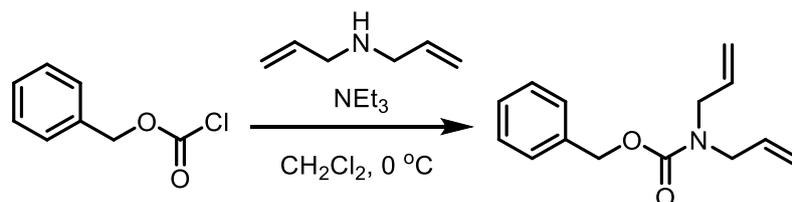
図 2-7-2-4. ポリアクリルアミド電気泳動の結果. 条件 : 15% アクリルアミド, 300V, 20 mA, 6 W, 70 min. M:マーカー; D: DEAE sepharose カラムクロマトグラフィー回収ピーク; D<sub>1/2</sub>: DEAE sepharose カラムクロマトグラフィー回収ピーク(1/2 希釈); B: Blue sepharose カラムクロマトグラフィー回収ピーク; B<sub>1/2</sub>: Blue sepharose カラムクロマトグラフィー回収ピーク(1/2 希釈); H: Hi-Load 26/600 カラムクロマトグラフィー回収ピーク; H<sub>1/2</sub>: Hi-Load 26/600 カラムクロマトグラフィー回収ピーク(1/2 希釈).

## 保存

精製した Adk<sub>m</sub> 溶液を超純水で透析し ( 100 倍希釈×3)、エッペンチューブに 1 mL ずつ小分けにした。その後、液体窒素で凍結した後、凍結乾燥して-80 °Cで保存した。

## 2-7-3. ヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 1 の合成 <sup>7,8</sup>

### 2-7-3-1. Benzyl diallylcarbamate の合成



100 mL ナスフラスコにジアリルアミン 0.376 g (3.87 mmol)、トリエチルアミン(NEt<sub>3</sub>) 0.391 g (3.87 mmol) を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 15 mL に溶解させ、氷浴中で攪拌し、Z-クロリド 0.5 mL (3.52 mmol) をシリンジで少量ずつ加えていった。氷浴中で 1 時間攪拌させた後、室温に戻して 1 時間攪拌した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を減圧濃縮し、AcOEt に溶解させた。分液漏斗に移し、10%クエン酸 aq.、sat. NaHCO<sub>3</sub> aq.、sat. NaCl aq. で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水した。ろ過で無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を取り除きエバポレーターで減圧濃縮し、<sup>1</sup>H-NMR 測定 (図 2-7-3-1) により生成物を確認し、無色液体を得た。ベンジルアルコールが混ざっていたが、そのまま次の反応に進んだ。0.738 g (計算収率 91%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$  = 7.41-7.29 (m, 5H, Ph), 5.77 (br, 2H, 2 × N-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 5.15 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-OCO-), 5.14 (br, 4H, 2 × N-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 3.88 (d, 4H, *J* = 6.4 Hz, 2 × N-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)

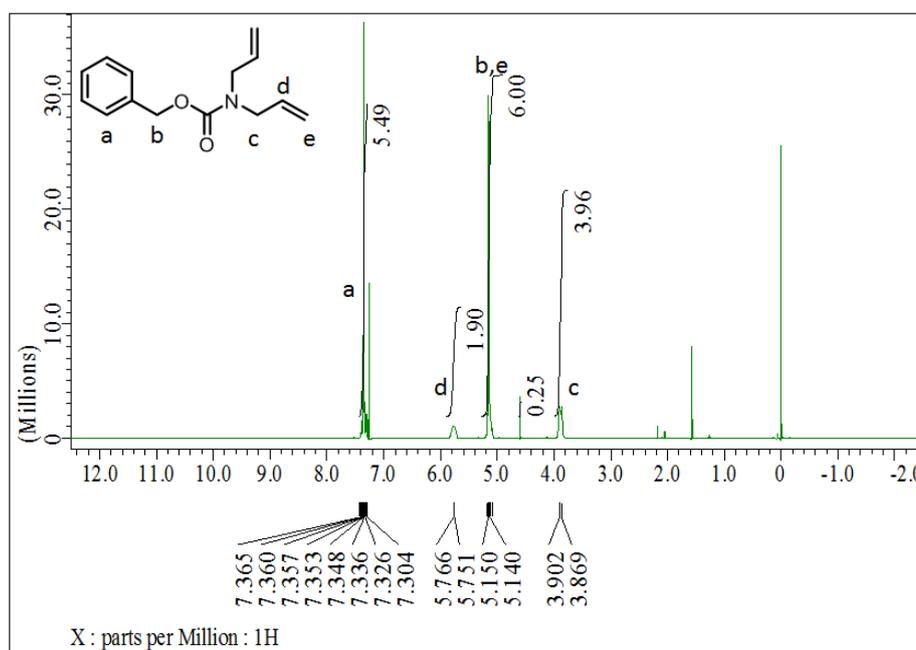
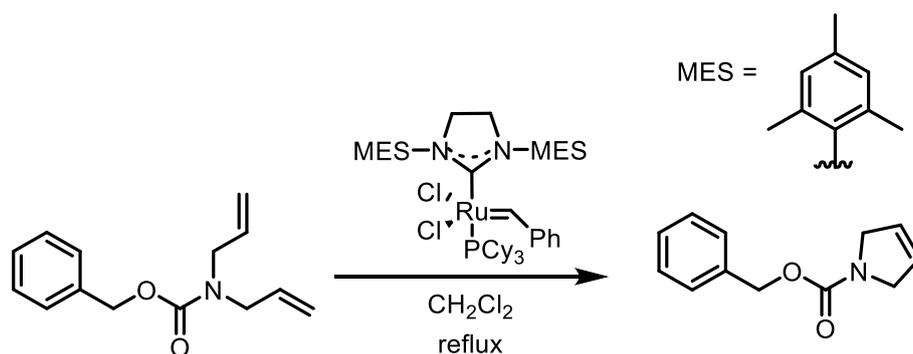


図 2-7-3-1. Benzyl diallylcarbamate の 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR スペクトル。

## 2-7-3-2. Benzyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylate の合成



100 mL ナスフラスコに benzyl diallylcarbamate 0.738 g (3.19 mmol)、Grubbs catalyst 2<sup>nd</sup> generation 0.023 g (27.1  $\mu$ mol) を加え、ジムロートを付けて N<sub>2</sub> 置換した。そこへ dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 15 mL をシリンジで加え、16 時間加熱還流した。エバポレーターで CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane/AcOEt=2/1、*R<sub>f</sub>*=0.6) で精製した。<sup>1</sup>H-NMR(図 2-7-3-2)、<sup>13</sup>C-NMR(図 2-7-3-3)測定により生成物を同定し、無色液体を得た。 収量 0.496 g (2 steps 収率 69%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$  = 7.40-7.29 (m, 5H, Ph), 5.83-5.75 (m, 2H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH), 5.17 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-OCO-), 4.24-4.17 (m, 4H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)  $\delta$  = 154.78, 137.11, 128.63, 128.10, 128.03, 125.95, 125.82, 66.92, 53.58, 53.11

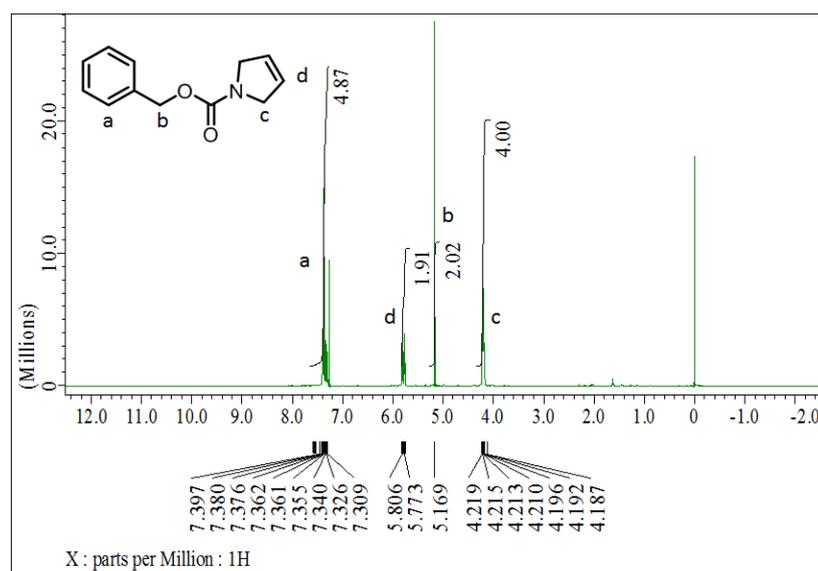


図 2-7-3-2. Benzyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylate の 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR スペクトル。

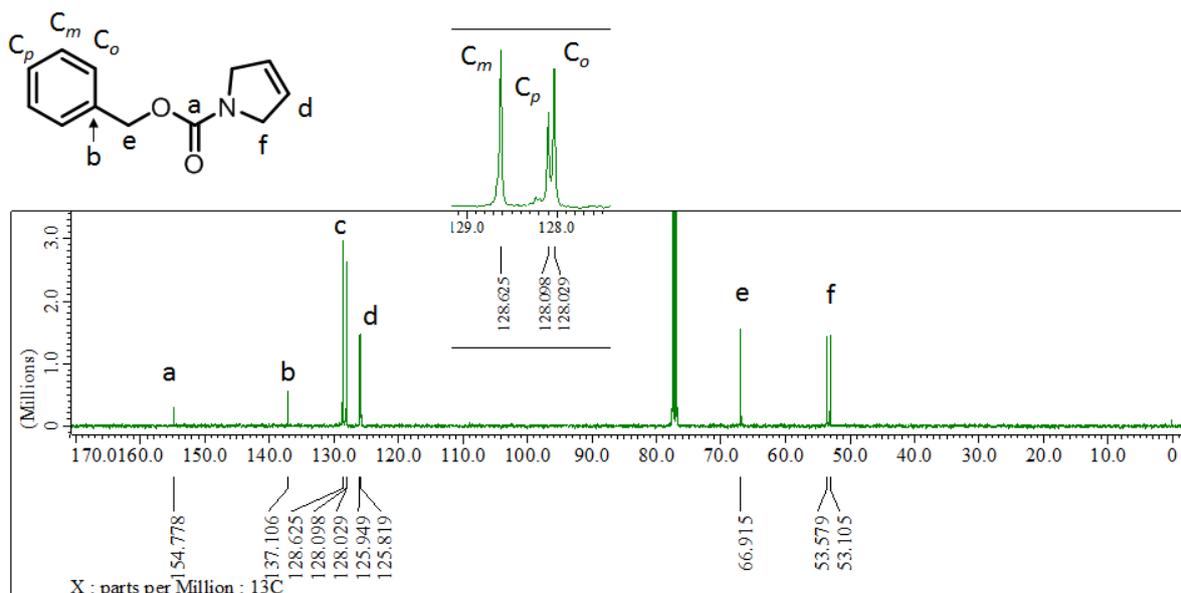
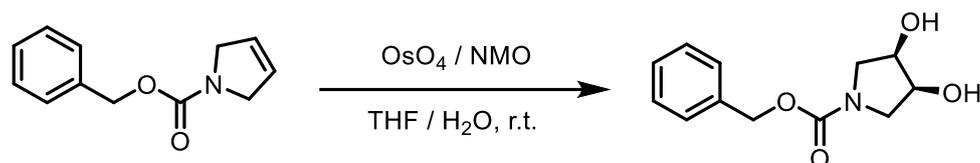


図 2-7-3-3. Benzyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate の 100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル.

### 2-7-3-3. Benzyl- (3*S*,4*R*) -3,4-dihydroxypyrrolidine-1-carboxylate の合成



100 mL ナスプラスチックに benzyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate 0.300 g (1.48 mmol) を加え、THF 5 mL、水 2 mL の混合溶媒に溶解した。N-メチルモルホリンオキシド-水和物(NMO) 0.258 g (1.92 mmol)、10%マイクロカプセル化四酸化オスミウム( $\text{OsO}_4$ ) 0.040 g (14.76  $\mu\text{mol}$ ) を加え、室温 (22  $^{\circ}\text{C}$ ) で 24 時間攪拌した。THF を減圧濃縮し、AcOEt に溶解させた。分液漏斗に移し、水で分液操作を行った。水層を AcOEt で 3 回抽出した後、有機層を合わせて無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水した。ろ過で無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を取り除きエバポレーターで AcOEt を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt、 $R_f=0.5$ ) で精製した。 $^1\text{H}$ -NMR(図 2-7-3-4)、 $^{13}\text{C}$ -NMR(図 2-7-3-5)測定により生成物を同定し、無色液体を得た。収量 0.289 g (収率 83%)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 7.42-7.29 (m, 5H, Ph), 5.13 (d, 2H,  $J$  = 0.8 Hz, Ph- $\text{CH}_2$ -OCO-), 4.30-4.24 (m, 2H, 2  $\times$  N- $\text{CH}_2$ -CH-OH), 3.70-3.64 (m, 2H, N- $\text{CH}_2$ -CH-OH), 3.47-3.39 (m, 2H, N- $\text{CH}_2$ -CH-OH), 2.42 (br, 2H, 2  $\times$  N- $\text{CH}_2$ -CH-OH)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  = 155.23, 136.73, 128.68, 128.24, 128.08, 71.25, 70.49, 67.21, 50.75, 50.48

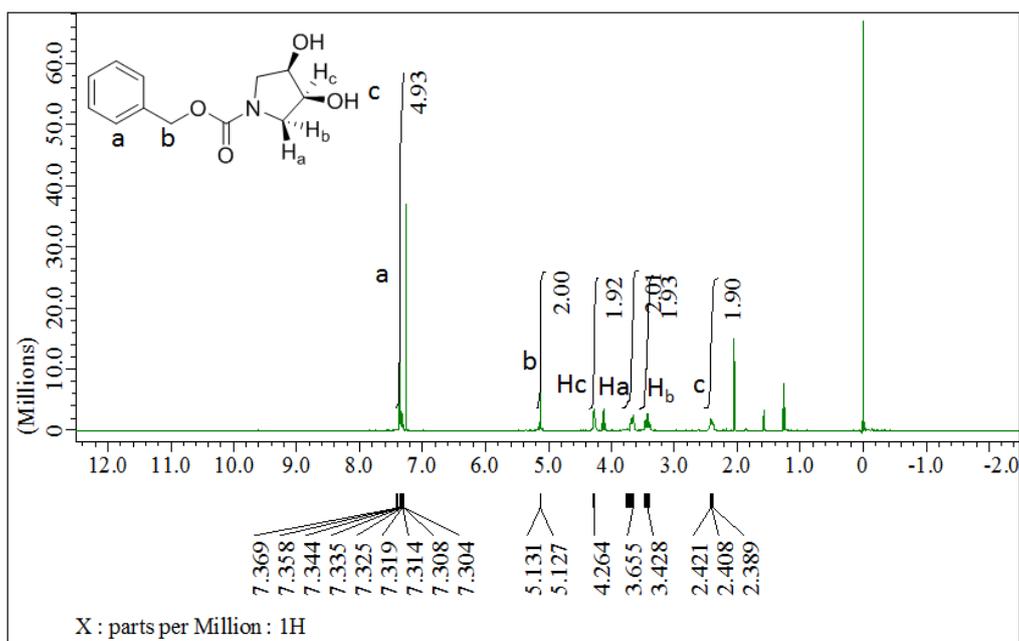


図 2-7-3-4. Benzyl- (3*S*,4*R*) -3,4-dihydroxypyrrolidine-1-carboxylate の 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル.

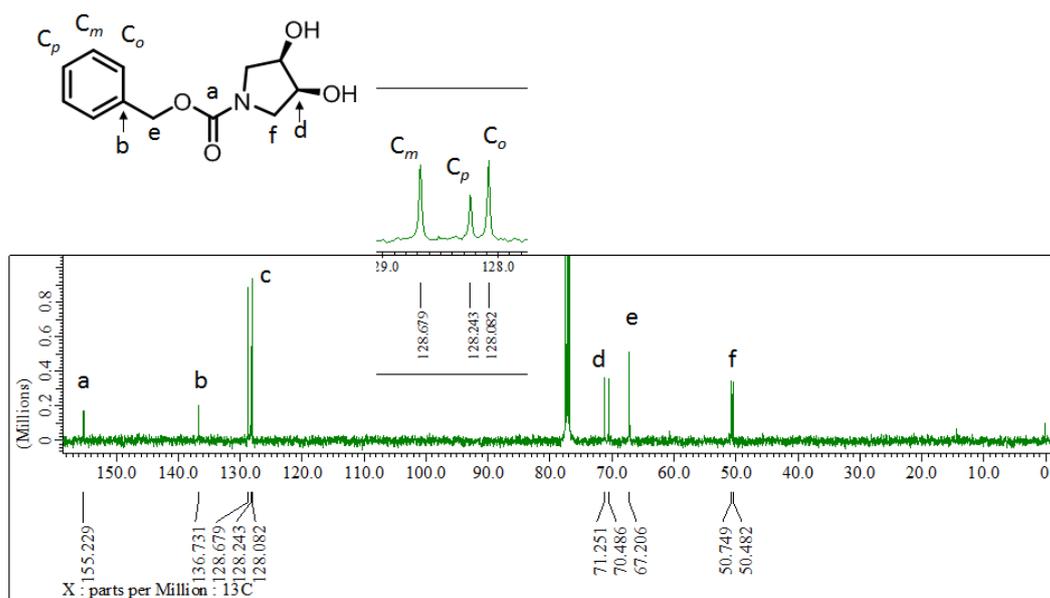
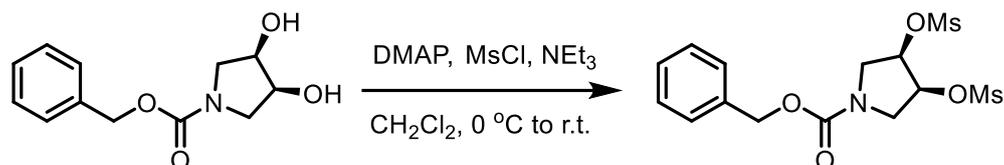


図 2-7-3-5. Benzyl- (3*S*,4*R*) -3,4-dihydroxypyrrolidine-1-carboxylate の 100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル.

#### 2-7-3-4. Benzyl-(3*S*,4*R*)-3,4-bis((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate の合成



200 mL ナスフラスコに benzyl-(3*S*,4*R*)-3,4-dihydroxypyrrolidine-1-carboxylate 1.66 g (7.00 mmol) を入れ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50 mL に溶解し、氷浴中で攪拌した。トリエチルアミン (NEt<sub>3</sub>) 2.12 g (21.0 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) 0.171 g (1.40 mmol)、塩化メタンスルホニル(MsCl) 2.40 g (21.0 mmol) それぞれを小びんにとりパスツールで 200 mL ナスフラスコに加え、小びんを CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 mL で洗い、200 mL ナスフラスコに加え、全量が 65 mL となるように CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加えた。氷浴中で 17.5 時間攪拌した後、室温 (23.0 °C) で 4.5 時間攪拌させた。室温 (23.0 °C) で N,N-ジメチルエチレンジアミン 0.624 g (7.08 mmol) を加え 30 分攪拌した。エバポレーターで CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を減圧濃縮し、AcOEt に溶解させた。分液漏斗に移し、5% クエン酸 aq.、5% NaHCO<sub>3</sub> aq.、sat. NaCl aq. で洗浄し、有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。ろ過で無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を取り除きエバポレーターで減圧濃縮した。<sup>1</sup>H-NMR(図 2-7-3-6)、<sup>13</sup>C-NMR(図 2-7-3-7)測定により生成物を同定し、白色固体を得た。収量 2.66 g (収率 97%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ = 7.38-7.33 (m, 5H, Ph), 5.19 (br, 2H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH-OMs), 5.15 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ph-CH<sub>2</sub>-OCO-), 3.88-3.84 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH-OMs), 3.76-3.68 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH-OMs), 3.14 (s, 6H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH-OMs)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ = 154.46, 136.17, 128.79, 128.54, 128.38, 75.58, 75.31, 67.77, 48.62, 48.50, 38.97, 38.90

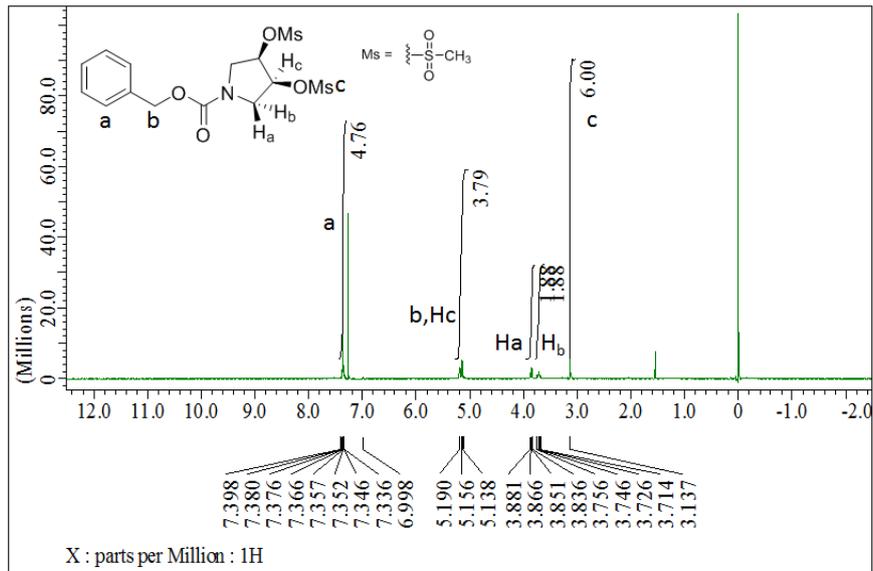


図 2-7-3-6. Benzyl-(3*S*,4*R*)-3,4-bis((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate の 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル.

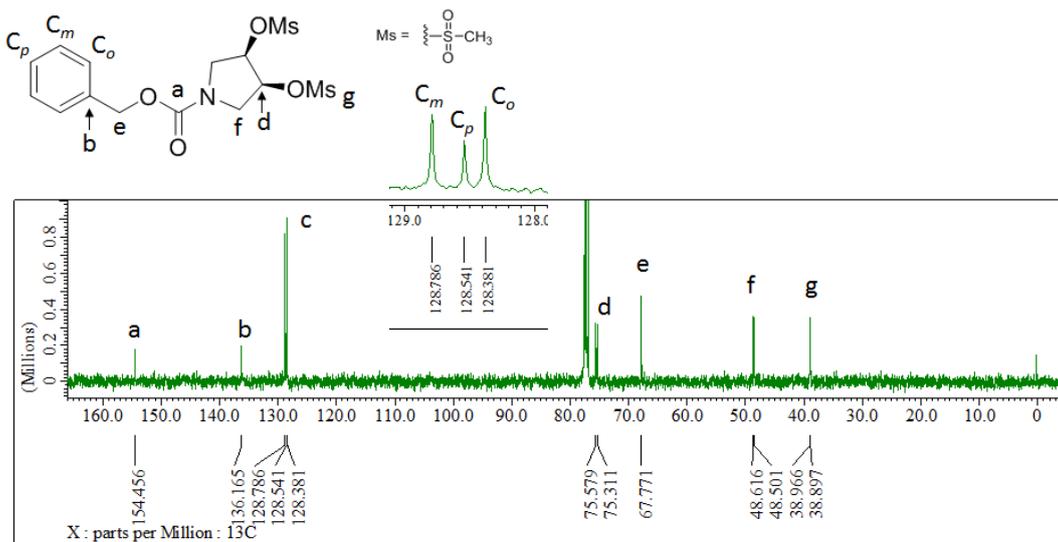
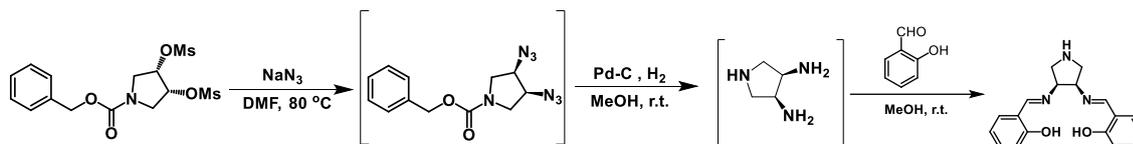


図 2-7-3-7. Benzyl-(3*S*,4*R*)-3,4-bis((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate の 100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル.

### 2-7-3-5. サレンリガンドの合成



#### アジド化

benzyl-(3*S*,4*R*)-3,4-bis((methylsulfonyl)oxy)pyrrolidine-1-carboxylate 0.630 g (1.60 mmol)、アジ化ナトリウム(NaN<sub>3</sub>) 0.640 g (9.83 mmol)、DMF 10 mL を 100 mL ナスフラスコに加え、N<sub>2</sub> 雰囲気下 80 °C で加熱した。23 時間後、反応を終了し Hexane/AcOEt = 1/1 溶液 15 mL に溶かし、水 30 mL で 3 回洗浄した。次に、水層を Hexane/AcOEt = 1/1 溶液 10 mL で 2 回抽出した。その後、有機層を sat.NaCl aq. で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。ろ過して無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を取り除き、エバポレーターで濃縮しながら、Hexane/AcOEt 溶液を MeOH に置換した。そして、次の反応に進んだ。

#### 水素還元

10%Pd-C 0.095 g を加え、MeOH で洗いこみ全量を 20 mL とした。N<sub>2</sub> 置換を 10 回行った後、H<sub>2</sub> 置換を 5 回行い、室温 (27 °C) で 31 時間攪拌した。反応終了後、セライトろ過で 10%Pd-C を取り除き、エバポレーターで 10 mL まで濃縮し、次の反応に進んだ。

#### サレンリガンド形成

水素還元を終えた MeOH 溶液にサリチルアルデヒド 0.380 g (3.20 mmol) をパスツールで滴下し、N<sub>2</sub> 雰囲気下、室温 (27 °C) で 14.5 時間攪拌した。エバポレーターで MeOH を減圧濃縮した後、Et<sub>2</sub>O で再沈殿、Et<sub>2</sub>O/AcOEt で再沈殿をそれぞれ 1 回行った。<sup>1</sup>H-NMR(図 2-7-3-8)、<sup>13</sup>C-NMR(図 2-7-3-9)測定により生成物を同定し、淡黄色沈殿を得た。収量 0.326 g (3 steps、収率 66%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  = 13.31 (s, 2H, 2×Ph-OH), 8.61 (s, 2H, 2×N=CH-Ph), 7.45 (dd, 2H,  $J$  = 1.6 Hz and 7.6 Hz, Ph), 7.33 (dt, 2H,  $J$  = 1.6 Hz and 7.6 Hz, Ph), 6.90 (dt, 2H,  $J$  = 1.6 Hz and 7.6 Hz, Ph), 6.86 (d, 2H,  $J$  = 7.6 Hz, Ph), 4.15-4.10 (m, 2H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH-N=CH-), 3.02-2.98 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH-N=CH-)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO)  $\delta$  = 165.87, 160.61, 132.36, 131.79, 118.73, 118.59, 116.54, 72.03, 52.94

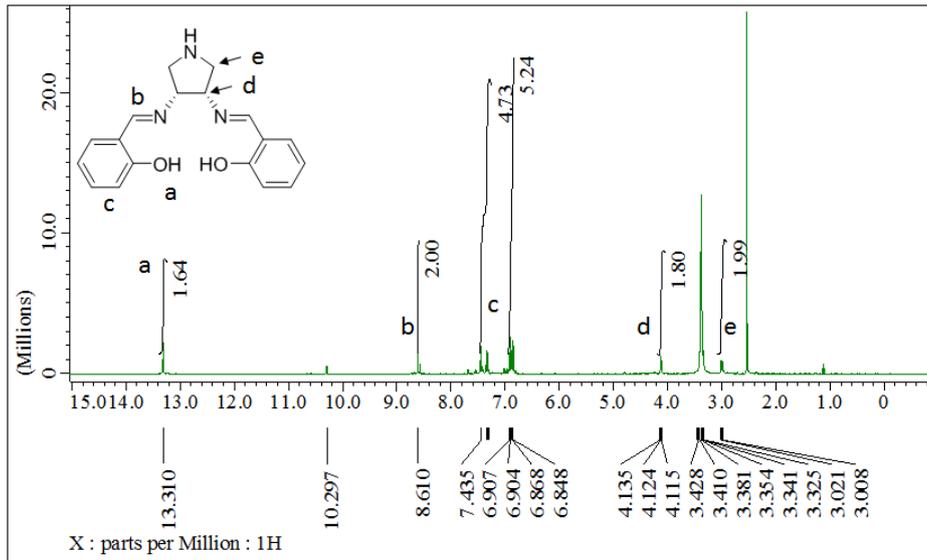


図 2-7-3-8. サレンリガンドの 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル.

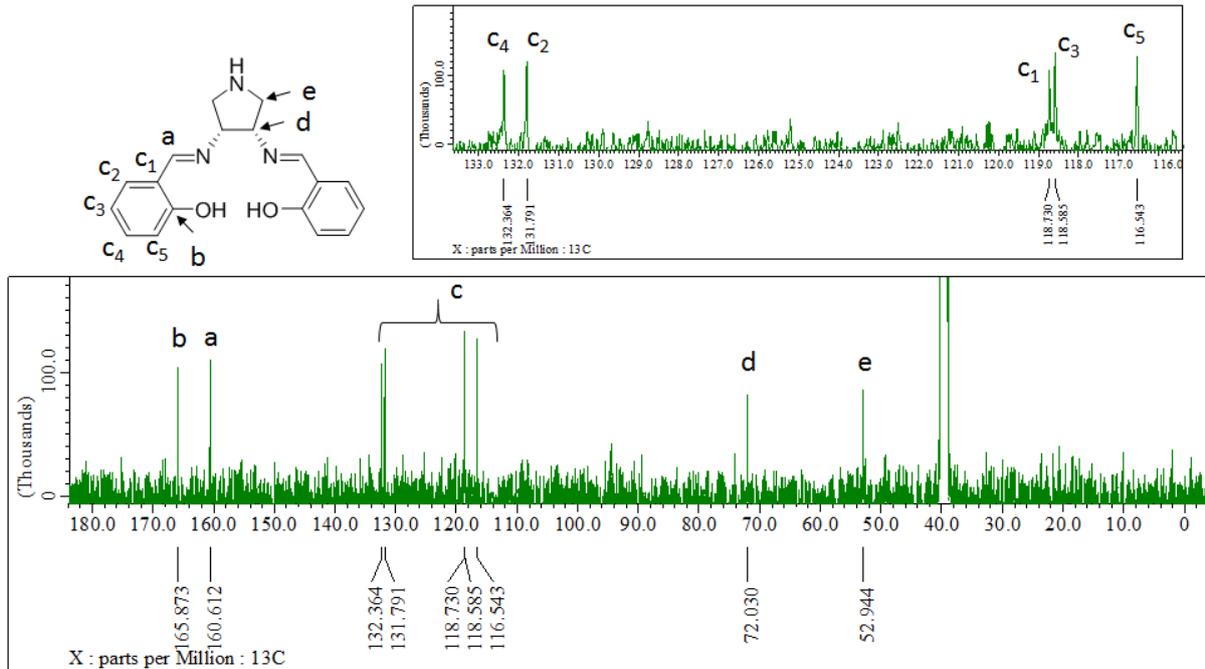
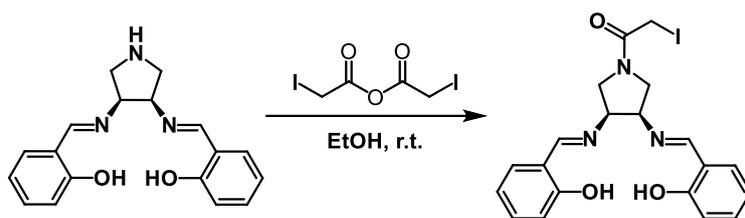


図 2-7-3-9. サレンリガンドの 100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル.

### 2-7-3-6. ヨードアセトアミドサレンリガンドの合成



50 mL ナスフラスコにサレンリガンド 0.022 g (71.1  $\mu\text{mol}$ )、二 (ヨード酢酸) 無水物 0.050 g (142.2  $\mu\text{mol}$ ) を入れ、EtOH 4 mL に溶解し、遮光して室温 (21  $^{\circ}\text{C}$ ) で 6 時間攪拌した。エバポレーターで EtOH を濃縮した後、Hexane / EtOH で再沈殿を行った。 $^1\text{H-NMR}$ (図 2-7-3-10)、ESI-HR-MS(図 2-7-3-11)測定により生成物を同定し、淡黄色沈殿を得た。収量 0.013 g (収率 43%)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  = 12.93 (d, 2H,  $J$  = 4.8 Hz,  $2 \times \text{Ph-OH}$ ), 8.72 (s, 1H,  $\text{N=CH-Ph}$ ), 8.67 (s, 1H,  $\text{N=CH-Ph}$ ), 7.51-7.47 (m, 2H, Ph), 7.39-7.35 (m, 2H, Ph), 6.96-6.92 (m, 2H, Ph), 6.89-6.86 (m, 2H, Ph), 4.48-4.44 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH-N=CH-}$ ), 4.35-4.31 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH-N=CH-}$ ), 4.03-3.99 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH-N=CH-}$ ), 3.93-3.86 (m, 2H,  $\text{N-CO-CH}_2\text{-I}$ ), 3.86-3.81 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH-N=CH-}$ ), 3.77-3.73 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH-N=CH-}$ ), 3.57-3.53 (m, 1H,  $\text{N-CH}_2\text{-CH-N=CH-}$ )

ESI-HR-MS(positive mode)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{N}_3\text{I} + \text{Na}^+$ ) calcd. 500.0446, found 500.0447

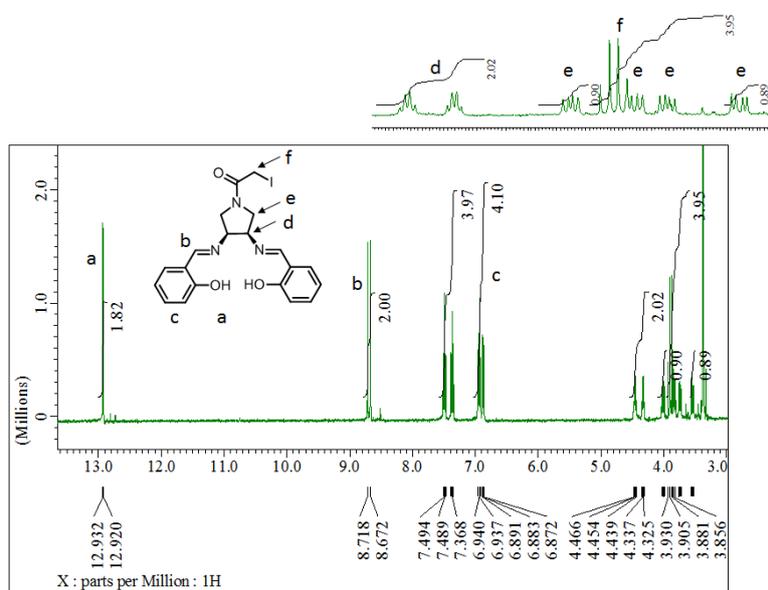


図 2-7-3-10. ヨードアセトアミドサレンリガンドの 400 MHz  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル.

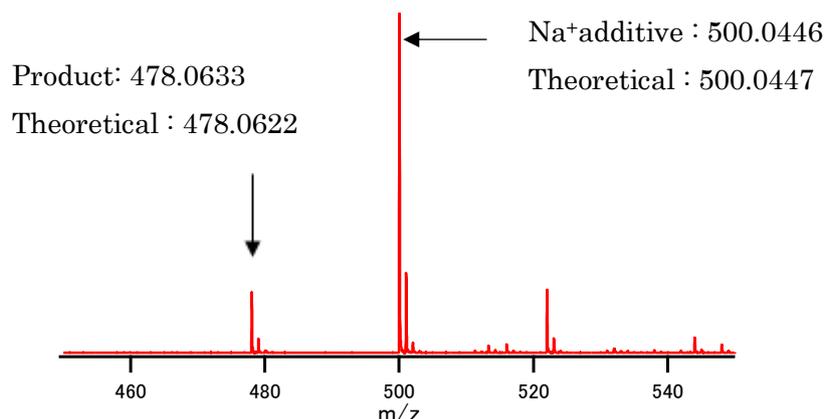
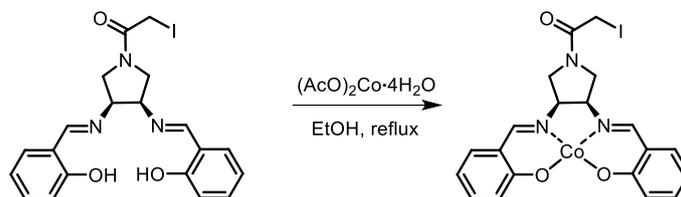


図 2-7-3-11. ヨードアセトアミドサレンリガンドの ESI-HR-MS スペクトル.

### 2-7-3-7. コバルトサレン錯体 1 の合成



50 mL ナスフラスコにヨードアセトアミドサレンリガンド 0.013 g (27.2  $\mu\text{mol}$ )、酢酸コバルト(II)四水和物 0.007 g (27.2  $\mu\text{mol}$ ) を入れ、EtOH 3 mL に溶解し、 $\text{N}_2$  雰囲気下で 2 時間加熱還流した。エバポレーターで EtOH を濃縮した後、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈して分液漏斗に移し水で分液操作をした後、有機層を無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水した。ろ過で無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を取り除き、エバポレーターで  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  を減圧濃縮した後、ESI-HR-MS(図 2-7-3-12)測定により生成物を同定し、茶色沈殿を得た。収量 0.013 g (収率 90%)

ESI-HR-MS(positive mode)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{N}_3\text{ICo} + \text{Na}^+$ ) calcd. 556.9624, found 556.9623

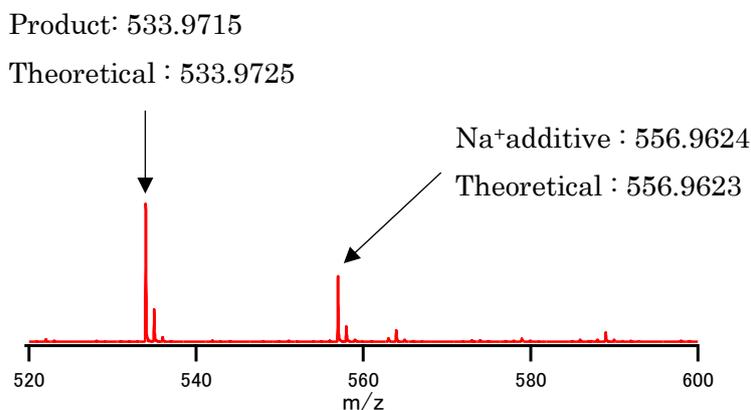


図 2-7-3-12. コバルトサレン錯体 1 の ESI-HR-MS スペクトル.

#### 2-7-4. コバルトサレン錯体 1 による Adk<sub>tm</sub> への化学修飾

Adk<sub>tm</sub> を 50 mM 炭酸水素アンモニウムバッファー (pH = 8.0 at 25 °C) に溶かし、DMSO に溶解させたコバルトサレン錯体 1 を加え、終濃度を Adk<sub>tm</sub> 200 μM、コバルトサレン錯体 1000 μM (2.5 eq.) の溶液 986 μL をエッペンチューブに作製した。そして、エッペンチューブを遮光して、25 °C で 19 時間 インキュベートした。シリンジ操作で Hitrap desalting (ゲルろ過) カラム(5 mL、GE healthcare)によって過剰のコバルトサレン錯体 1 を取り除くとともに、超純水に置換した。その後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥して、-80 °C で保管した。

#### 2-7-5. Bradford 分析

Adk<sub>tm</sub> 溶液 (0, 0.25 μM, 0.50 μM, 1.0 μM, 2.0 μM, 10 mM Tris-HCl (pH = 7.5 at 25 °C)) を作製し、Adk<sub>tm</sub> 溶液 500 μL と Coomassie Brilliant Blue (CBB) 溶液 500 μL (Protein Assay CCB 溶液を超純水で 5 倍希釈したもの) を混合し、25 °C で 5 分インキュベートした後に UV-vis スペクトル測定を行い、検量線を作成した。そして、Co-salen Adk<sub>tm</sub> サンプル 500 μL と CBB 溶液 500 μL (Protein Assay CCB 溶液を超純水で 5 倍希釈したもの) を混合し、25 °C で 5 分インキュベートした後にタンパク質量を測定した。

#### 2-7-6. ICP-MS 分析

検量線用サンプルとして Co<sup>2+</sup> 含有 0, 50 ppb, 100 ppb, 150 ppb, 200ppb の硝酸 1% 溶液を準備し、検量線を作成した。Co-salen Adk<sub>tm</sub> サンプルの硝酸 1% 溶液を作製し、ICP-MS 分析で Co<sup>2+</sup> の含有量を測定した。

#### 2-7-7. Co-salen Adk<sub>tm</sub> を触媒としたスチレンオキシドの開環反応の評価

表 2-7-7 の終濃度になるように 50 mM Tris-HCl バッファー (pH = 7.5 at 25 °C) で全量 556 μL (アセトニトリル 5%) のサンプルをエッペンチューブに調整した。そして、エッペンチューブを 25 °C で 75 時間 インキュベートした。反応追跡は、HPLC 分析で行い、内部標準として 1-フェニルエタノールを用いた。触媒回転数 (TON) は、生成物の生成量を元に計算した (表 2-7-7)。

表 2-7-7 反応条件と触媒回転数 (TON).

	Open 構造	Closed 構造
Styrene oxide	1 mM	1 mM
Co-salen Adk <sub>tm</sub>	30 μM	30 μM
Ap <sub>5</sub> A	—	300 μM
TON	14	17

## 参考文献

1. Fujii, A.; Hirota, S.; Matsuo, T., Reversible switching of fluorophore property based on intrinsic conformational transition of adenylate kinase during its catalytic cycle. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1218–1225.
2. Fujii, A.; Sekiguchi, Y.; Matsumura, H.; Inoue, T.; Chung, W. S.; Hirota, S.; Matsuo, T., Excimer emission properties on pyrene-labeled protein surface: correlation between emission spectra, ring stacking modes, and flexibilities of pyrene probes. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 537–548.
3. Moriuchi, T.; Yamada, M.; Yoshii, K.; Hirao, T., Controlled emission of platinum(II) terpyridyl complexes with poly-L-glutamic acid. *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 2562–2566.
4. Yamada, Y.; Okamoto, M.; Furukawa, K.; Kato, T.; Tanaka, K., Switchable intermolecular communication in a four-fold rotaxane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 709–713.
5. Shimakoshi, H.; Ninomiya, W.; Hisaeda, Y., Reductive coupling of benzyl bromide catalyzed by a novel dicobalt complex having two salen units. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 1971–1974.
6. Ford, D. D.; Nielsen, L. P.; Zuend, S. J.; Musgrave, C. B.; Jacobsen, E. N., Mechanistic basis for high stereoselectivity and broad substrate scope in the (salen)Co(III)-catalyzed hydrolytic kinetic resolution. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15595–15608.
7. Watanabe, Y.; Namba, A.; Umezawa, N.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Higuchi, T., Enhanced catalase-like activity of manganese salen complexes in water: effect of a three-dimensionally fixed auxiliary. *Chem. Commun.* **2006**, 4958–4960.
8. Pordea, A.; Mathis, D.; Ward, T. R., Incorporation of biotinylated manganese-salen complexes into streptavidin: new artificial metalloenzymes for enantioselective sulfoxidation. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 930–936.
9. Kurahashi, T.; Fujii, H., Unique ligand-radical character of an activated cobalt salen catalyst that is generated by aerobic oxidation of a cobalt(II) salen complex. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3908–3919.
10. Kunst, A.; Draeger, B.; Ziegenhorn, J., UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase In *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim, Germany, Verlag Chemie, **1984**, 163–172.
11. Sheng, X. R.; Li, X.; Pan, X. M., An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22238–22242.
12. Ådén, J.; Weise, C. F.; Brännström, K.; Olofsson, A.; Wolf-Watz, M., Structural topology and activation of an initial adenylate kinase-substrate complex. *Biochemistry* **2013**, *52*, 1055–1061.
13. Kerns, S. J.; Agafonov, R. V.; Cho, Y. J.; Pontiggia, F.; Otten, R.; Pachov, D. V.; Kutter, S.; Phung, L. A.; Murphy, P. N.; Thai, V.; Alber, T.; Hagan, M. F.; Kern, D., The energy landscape of adenylate kinase during catalysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 124–131.
14. Beckstein, O.; Denning, E. J.; Perilla, J. R.; Woolf, T. B., Zipping and unzipping of adenylate kinase: atomistic insights into the ensemble of open<-->closed transitions. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 160–176.
15. Sinev, M. A.; Sineva, E. V.; Ittah, V.; Haas, E., Domain closure in adenylate kinase. *Biochemistry* **1996**, *35*, 6425–6437.
16. Rose, T.; Glaser, P.; Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Reinstein, J.; Le Blay, K.; Gilles, A. M.; Barzu, O., Structural and functional consequences of amino acid substitutions in the second conserved loop of Escherichia

coli adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23654–23659.

17. Chen, J. H.; Jiang, S. J., Determination of cobalamin in nutritive supplements and chlorella foods by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1210–1215.

18. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

### 第 3 章：システイン残基周辺の局所環境に着目したタンパク質への位置選択的化学修飾および局所構造効果によるシステインチオールの反応性の評価

#### 3-1. 研究目的

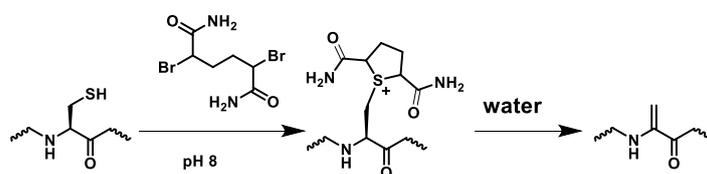
20 種類のアミノ酸の中でも、システインのチオール基は中性条件でも求核性が高いことから、蛍光プローブを用いた生物学的現象の可視化<sup>1</sup>や抗体-薬物複合体(ADCs)<sup>2</sup>を目的として、化学生物学や薬学の分野で研究が行われている。さらに、コンジュゲーションサイトとしてアデニル酸キナーゼ 3 変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の 2 つのシステインにピレン分子を化学修飾し、タンパク質の構造変化に伴うピレン分子の発光特性スイッチングが報告されている<sup>3,4</sup>。

一つのタンパク質中のいくつかのシステイン残基の存在は、合成分子の位置選択的化学修飾を複雑にしている。しかしながら、システインチオールの反応性のコントロールはこの問題を緩和することができる。

本章では、Adk<sub>tm</sub> の 2 つのシステイン残基周辺の局所環境に着目し、位置選択的化学修飾が可能であるかどうかを検証し、反応性の差を決定しているファクターを同定した。

#### 3-2. システイン残基周辺の局所環境に着目したタンパク質への位置選択的化学修飾例

Caddick らは、システイン残基周辺の局所環境の違いを使って、緑色蛍光タンパク質(GFP) 2 変異体(S147C/T230C)の位置選択的ラベリングを報告している<sup>5</sup>。Cys230 はタンパク質の表面にあり、2,5-ジブromoヘキサンジアミドと反応して、スルホニウムイオンになった後、すぐに水分子と反応して、デヒドロアラニンになる(スキーム 3-2)<sup>6</sup>。それに対して、Cys147 はβ-バレル構造の内側にあるために、水分子が疎水部分に入り込めず、スルホニウムイオンのままで反応が停止する(図 3-2)。このように、タンパク質のシステイン残基周辺の立体障害を利用して、化学修飾の様式が異なることを示した。



スキーム 3-2. システインチオールと 2,5-ジブromoヘキサンジアミンの反応.

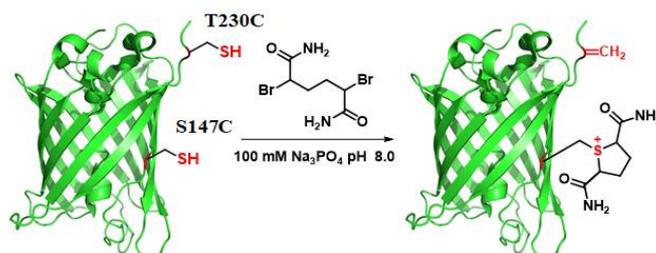


図 3-2. システイン残基周辺の局所環境に着目した GFP 2 変異体(S147C/T230C)の位置選択的ラベリング.

### 3-3. システインチオールの反応性に影響するファクター

システイン残基がタンパク質表面上にあったとしても、システインチオールの反応性は、3-2.のような立体障害以外にもいくつかのファクターに影響される。

1つのファクターがシステイン残基周辺の静電場である。小さなチオール化合物でも、電気的な置換基効果(電子供与基/電子求引基)がチオールの酸性度(pKa)に影響する(表 3-3)<sup>7</sup>。L-システインのチオールは pKa = 8.30<sup>8</sup> であり、ペプチド上のシステインチオール(e.g. グルタチオン)は pKa = 8.75<sup>9</sup> である(図 3-3)。システインチオールの反応性における局所的な静電場効果の重要性について、ペプチドを使ったジスルフィド結合交換反応の速度論的解析<sup>10</sup>、ペプチドの密度汎関数理論(Density Functional Theory、DFT)計算<sup>11</sup>、シミュレーションによるギブスの自由エネルギー( $\Delta G$ )の算出<sup>12</sup>、統計解析<sup>13</sup>などを利用した結果が報告されている。

表 3-3. 酸性度に影響を与える電気的な置換基効果(電子供与基/電子求引基)

チオール化合物	pKa(SH)
HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	10.05
HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	8.27
HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Me	6.56

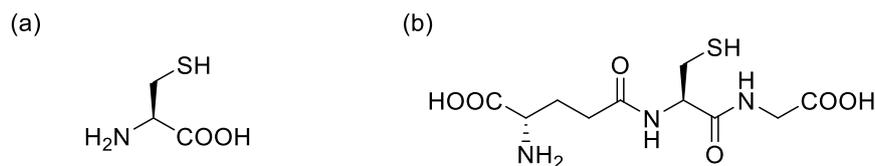
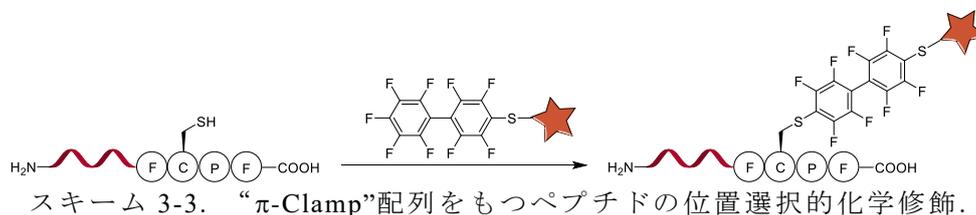


図 3-3. L-システイン(a)とグルタチオン(b)の構造式.

また、システインチオールの反応性は、ペプチド上のシステイン残基周辺のアミノ酸配列に依存することも報告されている<sup>14</sup>。“ $\pi$ -Clamp” と呼ばれる Cys を芳香族アミノ酸(Phe、Trp、Tyr)で挟んだ配列(Xxx-Cys-Pro-Xxx、Xxx = Phe、Trp、Tyr)を持つペプチドの Cys がパーフルオロアリアル化合物と位置選択的に反応する(スキーム 3-3)。2つの芳香族アミノ酸のベンゼン環がパーフルオロアリアル基を認識してシステインチオールを活性化し、Pro は他のアミノ酸残基の立体配座を正しくすると推測されている。



システインチオールの反応性に影響するもう1つのファクターは、システイン残基周辺の構造柔軟性である。Marino らのシミュレーションによる pKa 予測の研究は、システイン残基周辺の構造柔軟性がシステインチオールを含む水素結合ネットワークと相互に関連付けられ、システインチオールの pKa シフトを起こすことを提案している<sup>15</sup>。

### 3-4. Adk<sub>tm</sub> の Cys55 と Cys169 の反応性の予想

3-2.、3-3.で示したシステインチオール反応性に影響するファクター(立体障害、静電場、構造柔軟性)は、タンパク質構造にも当てはまる。しかしながら、システインチオールと局所的なファクター(静電効果/構造効果)に関するこれまでの研究は、ペプチドを使ったジスルフィド結合交換反応の速度論的解析<sup>10</sup>、ペプチドの DFT 計算<sup>11</sup>、シミュレーションによる  $\Delta G$  の算出<sup>12</sup>、統計解析<sup>13</sup>、ペプチドの位置選択的化学修飾<sup>14</sup>、シミュレーションによる pKa 予測<sup>15</sup>などが行われてきた。

そこで本研究では、大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)をモデルタンパク質に選び、タンパク質表面上の 2 つのシステイン残基周辺の局所環境に着目した。2 つのシステイン残基 Cys55 と Cys169 は、それぞれタンパク質の表面に位置しており、隣に酸性アミノ酸である Asp54 と Glu170 が存在している。システインチオール(-SH)は、中性条件でも反応性の高いチオラートイオン(-S<sup>-</sup>)になるが、近傍に酸性アミノ酸が存在すると、酸性アミノ酸のカルボキシル基が放出するプロトン(H<sup>+</sup>)のアクセプターとなってしまう、水素結合を結ぶ。その結果、反応性の高いチオラートイオン(-S<sup>-</sup>)になりづらく、反応性が低下する(図 3-4-1)。そこで、2 つのシステイン残基に着目すると、Cys55 は $\alpha$ -ヘリックスとループの境目に位置しているのに対して、Cys169 は $\alpha$ -ヘリックスの中央に位置している(図 3-4-2)。

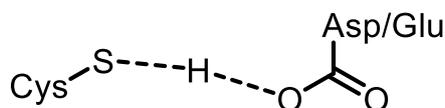


図 3-4-1. システインと酸性アミノ酸の水素結合.

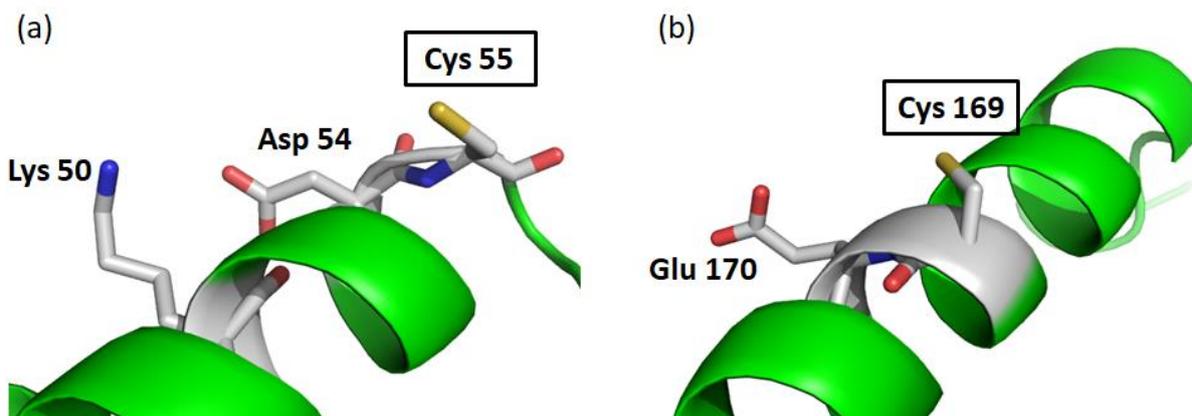


図 3-4-2. Adk<sub>tm</sub> のシステイン残基周辺の局所環境. a) Cys55 周辺; b) Cys169 周辺. (Cys55 と Cys169 は Pymol ソフトウェア上で wild-type Adk (PDB: 4AKE<sup>16</sup>)の Ala55 と Val169 をそれぞれ Cys に置き換えている.)

次に、2つのシステイン残基周辺の環境を把握するために、分子動力学シミュレーションを行った。図3-4-3は、Adk<sub>tm</sub>の分子動力学シミュレーション中のエネルギーの時間変化を示しており、シミュレーションを開始してすぐにエネルギーが一定になっている。このことは、タンパク質の主鎖構造が安定を保っていることを示している。しかしながら、シミュレーション中のアミノ酸の側鎖官能基は、タンパク質の構造揺らぎにより、フリップのパターンがいくつか存在すると考えられる。いくつかある構造の中で、存在確率の最も多い構造が最安定構造(minimum energy structure)として決定されるため、最安定構造(minimum energy structure)で比較を行った。

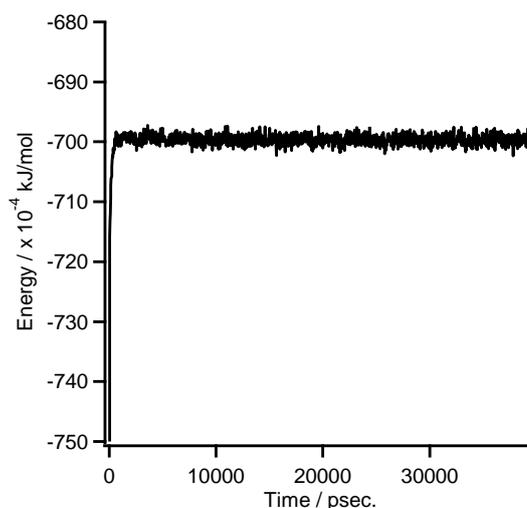


図3-4-3. Adk<sub>tm</sub>の分子動力学シミュレーション中のエネルギーの時間変化. 分子動力学シミュレーションはYASARA structureソフトウェア(Ver.15.3.8)<sup>17</sup>で行った. シミュレーション条件: 力場: AMBER03; 水溶液モデル: 0.9% NaCl(aq.); 電荷の割り付け: pH = 8.0 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、wild-type AdkのX線結晶構造(PDB: 4AKE<sup>16</sup>)を使用した.

分子動力学シミュレーションでAdk<sub>tm</sub>を解析して得られた最安定構造(minimum energy structure)とwild-typeのアデニル酸キナーゼのX線結晶構造(PDB: 4AKE<sup>16</sup>)のC<sub>α</sub>-位置を基準に重ね合わせた構造(C<sub>α</sub>-RMSD(Root Mean Square Deviation) = 0.414 Å)を比較した(図3-4-4a)。そして、システイン残基周辺の局所環境に着目すると、wild-type AdkのLys50とAsp54は相互作用している(図3-4-4c、Green)。Adk<sub>tm</sub>のLys50とAsp54も相互作用しており(図3-4-4c、Cyan)、Cys55がフリーな状態にある。それに対して、wild-type AdkのGlu170はVal169とは、逆方向に向いているが(図3-4-4d、Green)、Adk<sub>tm</sub>のGlu170はCys169の方にフリップする傾向が見られ、Cys169周辺の静電場に影響を与えていると考えられる(図3-4-4d、Cyan)。結果として、静電場の影響を受けないCys55の反応性が高いと予想される。

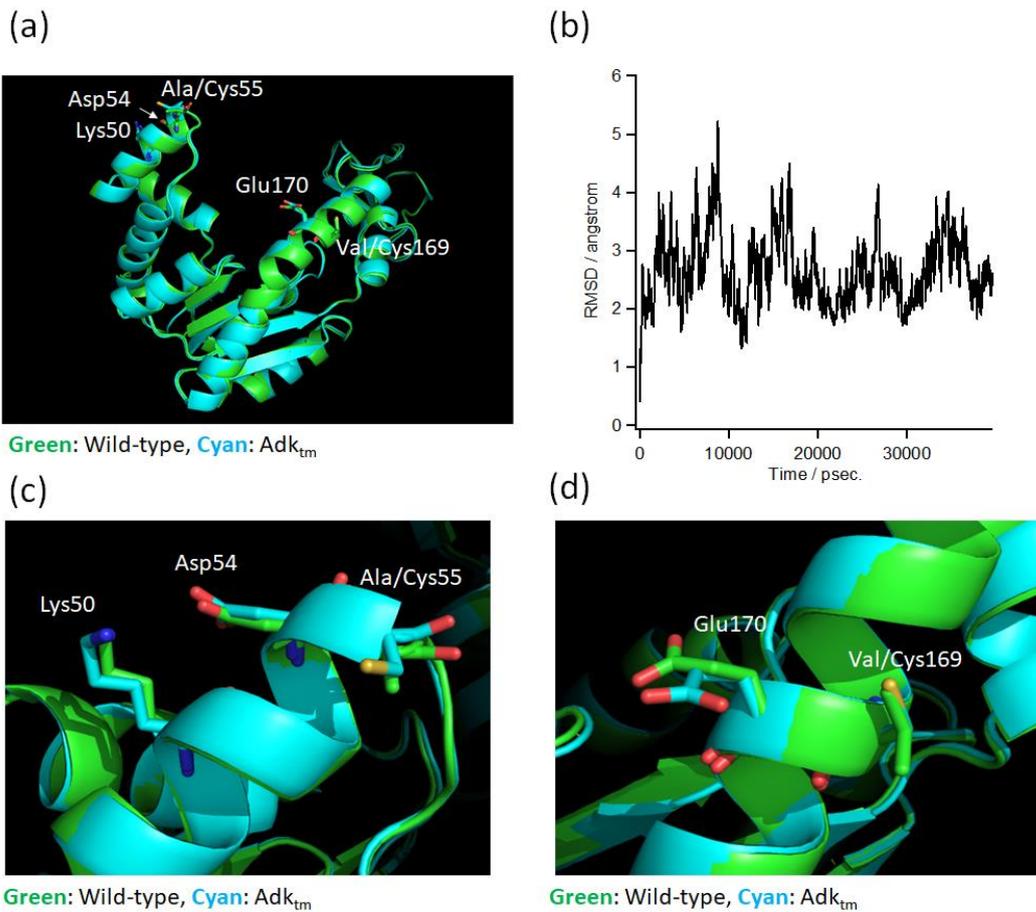


図 3-4-4. Adk<sub>tm</sub> の最安定構造(cyan)と wild-type Adk の X 線結晶構造(PDB: 4AKE<sup>16</sup>, green)の重ね合わせた図. (a) 全体構造; (b) 分子動力学シミュレーション中の C $\alpha$ -RMSDs の時間変化; (c) Ala/Cys55 周辺の拡大図; (d) Val/Cys169 周辺の拡大図. 分子動力学シミュレーションは YASARA structure ソフトウェア(Ver.15.3.8)<sup>17</sup>で行った. シミュレーション条件: 力場: AMBER03; 水溶液モデル: 0.9% NaCl<sub>aq</sub>.; 電荷の割り付け: pH = 8.0 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、wild-type Adk の X 線結晶構造(PDB: 4AKE<sup>16</sup>) の Ala55 と Val169 を、ソフトウェア上で Cys に置き換えたものを使用した.

### 3-5. システイン残基周辺の局所環境に着目したピレン分子による Adk<sub>tm</sub> の位置選択的化学修飾

Adk<sub>tm</sub>のCys55とCys169の反応性を比較するために、0.5等量のピレン**2** (図3-5-1)とAdk<sub>tm</sub>をpH 8.0の条件で反応させた(Cys:ピレン**2** = 2:1)。理論的に、4種類のタンパク質が得られる：未修飾タンパク質、Cys55修飾タンパク質、Cys169修飾タンパク質、Cys55/Cys169修飾タンパク質。

実際に、反応混合物の精製中に得られたクロマトグラムは、これら4つのタンパク質が分離可能であることを示した(図3-5-2)。精製して得られた4つのピークをMALDI-TOF-MS分析(図3-5-3)した結果、

ピークA：未修飾タンパク質 ( $m/z = 23,607$ )、

ピークD：Cys55/Cys169修飾タンパク質 ( $m/z = 24,205$ )

であることが示された。ピークBとピークCの分子量は、ピレン**2**が1つ修飾されたタンパク質に対応していた( $m/z = 23,906$ )。同じ分子量であるにもかかわらず、異なる溶出位置にピークが現れていることは、異なるシステイン残基にピレン**2**が修飾されていることが考えられる。

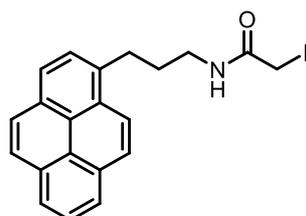


図3-5-1. ピレン**2**の構造式.

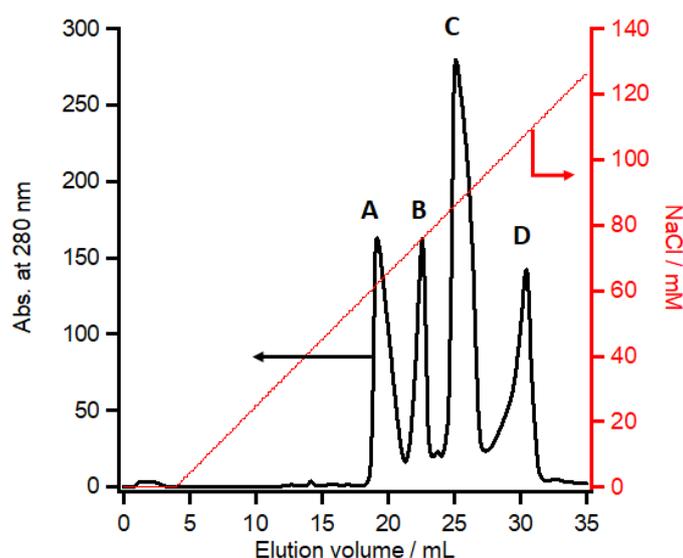


図3-5-2. Adk<sub>tm</sub>とピレン**2** (0.5 等量)の反応混合物の陰イオン交換カラムクロマトグラム. Column: Mono Q (1 mL, GE healthcare), Flow rate: 0.5 mL/min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-320 mM, over 80 mL).

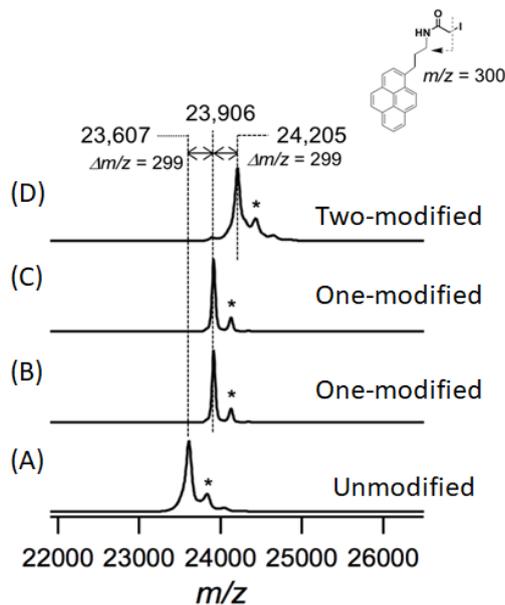


図3-5-3. 陰イオン交換カラム精製で得られた4つのピークのMALDI-TOF-MSスペクトル; (A) ピークA; (B) ピークB; (C) ピークC; (D) ピークD; \*ピーク: マトリックス(シナピン酸)付加物. 理論値: ピレン1つ修飾タンパク質 ( $m/z = 23,906$ ), ピレン2つ修飾タンパク質 ( $m/z = 24,205$ ).

ピークBとピークCのピレン2の修飾位置を決定するために、上記の4つのピークのトリプシン消化を行い、それぞれのタンパク質を対応するペプチド断片に切断した(図3-5-4)。それぞれのピークの未修飾のシステイン残基は、ジスルフィド結合を防ぐために、過剰量のヨードアセトアミドと反応させ、カルバミドメチル化した(図3-5-5)。そして、Cys55とCys169が含まれているペプチド断片に着目し、ピークBとピークCのピレン2の修飾位置を特定した(図3-5-6)。

未修飾タンパク質(ピークA)は、カルバミドメチル修飾51-57残基フラグメント( $m/z = 838.97$ )、カルバミドメチル修飾168-184残基フラグメント( $m/z = 2075.40$ )を示した。同様に、Cys55/Cys169修飾タンパク質(ピークD)は、ピレン2修飾51-57残基フラグメント( $m/z = 1081.07$ )、ピレン2修飾168-184残基フラグメント( $m/z = 2317.49$ )を示した。ピークBは、 $m/z = 838.97$ 、 $2317.49$ の分子量ピークが検出されていることからCys169修飾タンパク質、それに対してピークCは、 $m/z = 1081.97$ 、 $2075.40$ の分子量ピークが検出されていることからCys55修飾タンパク質であると決定することができた。

以上の結果をまとめると、図3-5-2に示したピークA、B、C、Dはそれぞれ、未修飾タンパク質、Cys169修飾タンパク質、Cys55修飾タンパク質、Cys55/Cys169修飾タンパク質である。また、図3-5-2のピークB(Cys169修飾タンパク質)とピークC(Cys55修飾タンパク質)は、どちらもピレン2が1つ修飾されたタンパク質であるので、280 nmにおけるモル吸光係数( $\epsilon_{280}$ )が同じであ

り、それぞれのピーク面積がそれぞれのタンパク質濃度となる。ピークB、Cのピーク面積を比較するとピークCのピーク面積が大きいことから、予想した通り、反応性はCys55の方がCys169より高いことが示された。

この結果は、「隣の酸性アミノ酸との相互作用(Asp54とGlu170)」と「システイン残基周辺の構造柔軟性」の2つのファクターでもたらされたと考えられる。

MR/IILLGAPGAGK/GTQAQFIMEK/YGIPQISTGDMLR/AAVK/SGSELGK/QAK/  
 DIMD<sup>55</sup>CGK/LVTDELVIALVK/ER/IAQEDSR/NGFLLDGFPR/TIPQADAMK/  
 EAGINVDYVLEFDVPDELIVDR/IVGR/R/VHAPSGR/VYHVK/FNPPK/VEGK/  
 DDTVGEELTR/K/DDQEETVR/K/R/L<sup>169</sup>CEYHQMTAPLIGYYSK/EAEAGNTK/  
 YAK/VDGTK/PVAEVR/ADLEK/ILG

図3-5-4. Adk<sub>tm</sub>のアミノ酸配列.(“/”はトリプシン消化の位置を示している.)

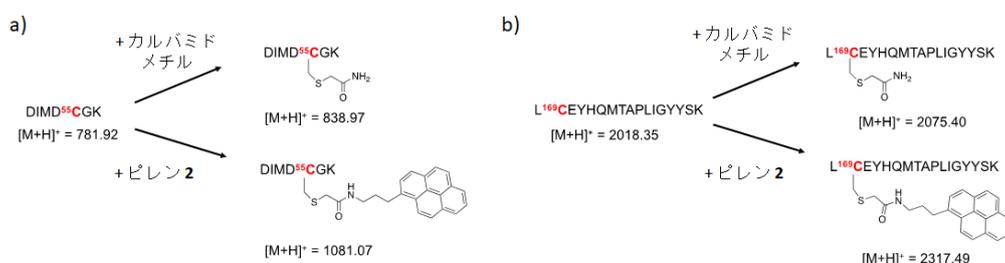


図3-5-5. Adk<sub>tm</sub>のシステイン残基を含むペプチドフラグメント. a) Cys55を含むフラグメント; b) Cys169を含むフラグメント.

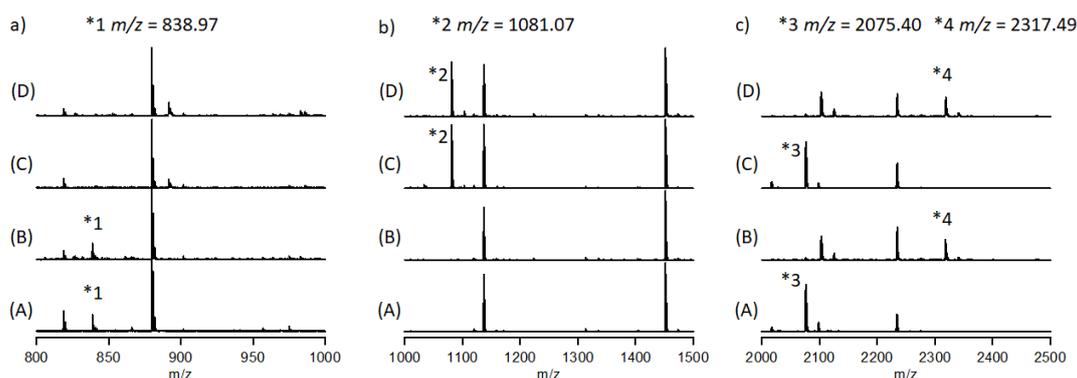


図3-5-6. 未修飾タンパク質(A)、Cys169修飾タンパク質(B)、Cys55修飾タンパク質(C)、Cys55/Cys169修飾タンパク質(D)のトリプシン消化によって得られたペプチドフラグメントのMALDI-TOF-MSスペクトル (マトリックス: CHCA). a)  $m/z = 800$  to  $1000$ の範囲のスペクトル; b)  $m/z = 1000$  to  $1500$ の範囲のスペクトル; c)  $m/z = 2000$  to  $2500$ の範囲のスペクトル. \*1: Cys55-カルバミドメチル修飾51-57残基フラグメント, \*2: Cys55-ピレン2修飾51-57残基フラグメント, \*3: Cys169-カルバミドメチル修飾168-184残基フラグメント, \*4: Cys169-ピレン2修飾168-184残基フラグメント.

### 3-6. pH 7.0-9.0 の範囲における Cys55 と Cys169 の反応性の評価

Cys55/Cys169のチオール反応性に隣の酸性アミノ酸(Asp54/Glu170)が影響することを検証するために、Cys55とCys169の修飾効率におけるpHの効果について検討した。0.5等量のピレン2とAdk<sub>tm</sub>をpH 7.0-9.0の範囲で反応させた後の、クロマトグラムを重ね合わせたものを図3-6-1に示した。

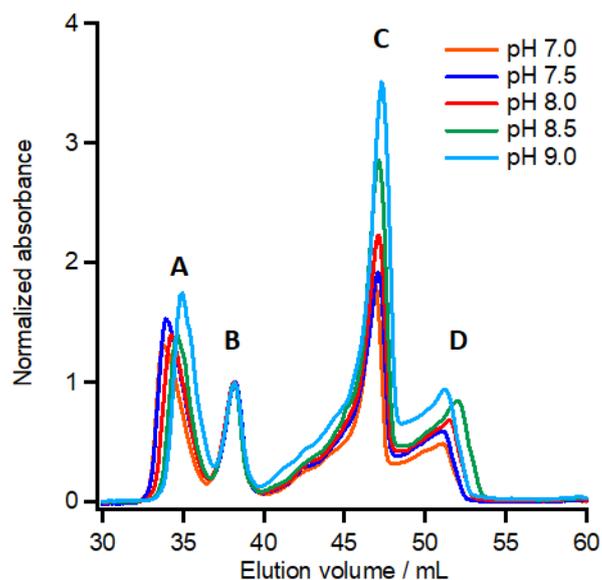


図3-6-1. pH 7.0-9.0におけるAdk<sub>tm</sub>とピレン2の反応混合物の重ね合わせたクロマトグラム. Column: Mono Q (1 mL, GE healthcare), Flow rate: 0.5 mL/min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-200 mM, over 120 mL). A: 未修飾タンパク質; B: Cys169修飾タンパク質; C: Cys55修飾タンパク質; D: Cys55/Cys169修飾タンパク質.

そして、クロマトグラムのエリア面積から各ピークのタンパク質濃度を求め、表3-6にpH7.0-9.0の範囲におけるタンパク質濃度の分布として4つのパラメーター: “Total Conjugation Ratio(TCR、式3-6-1)”、“Single Conjugation Ratio(SCR、式3-6-2)”、“Conjugation Selectivity Excess(CSE、式3-6-3)”、“Ratio of Partially modified Adk<sub>tm</sub>s(RPA、式3-6-4)”を示した。TCRは、ピレン2の修飾された場所と数に関係なく、全修飾効率を示している(式3-6-1、図3-6-2)。SCRは、全修飾タンパク質のうち、ピレン1つ修飾タンパク質の比率を示している(式3-6-2、図3-6-3)。CSEは、Cys169修飾タンパク質に対するCys55修飾タンパク質の過剰率として定義しており、Cys55の選択性過剰率を示している(式3-6-3、図3-6-4)。CSE = 0%は、2つのシステイン残基に選択性がなく、CSE = 100%は、Cys55のみが修飾されることを示している。RPAは、Cys169に対するCys55の割合で定義しており、2つのシステインチオールの反応性の差を直接的に示す指標となる。

$$\text{TCR}(\%) = \frac{\text{全修飾タンパク質}}{\text{全タンパク質}} \times 100 \quad (\text{式3-6-1})$$

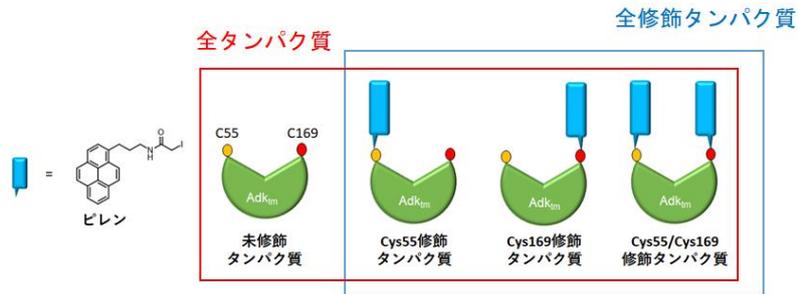


図3-6-2. TCRの定義式に含まれる各項の説明図.

$$\text{SCR}(\%) = \frac{\text{ピレン1つ修飾タンパク質}}{\text{全修飾タンパク質}} \times 100 \quad (\text{式3-6-2})$$

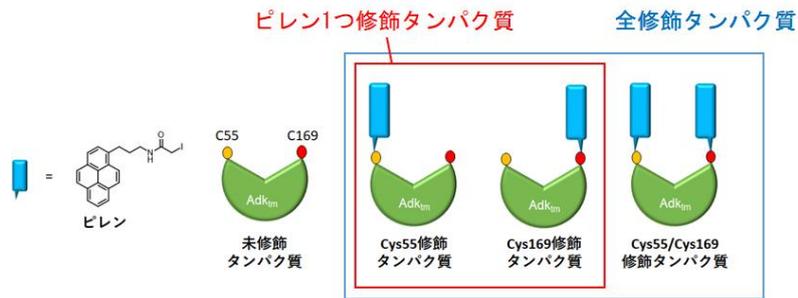


図3-6-3. SCRの定義式に含まれる各項の説明図.

$$\text{CSE}(\%) = \frac{\text{全Cys55修飾タンパク質} - \text{全Cys169修飾タンパク質}}{\text{全Cys55修飾タンパク質} + \text{全Cys169修飾タンパク質}} \times 100 \quad (\text{式3-6-3})$$

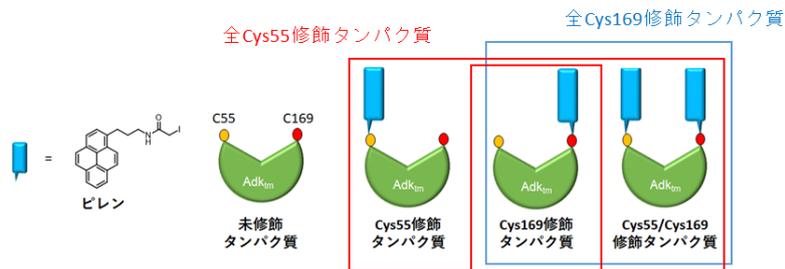


図3-6-4. CSEの定義式に含まれる各項の説明図.

$$\text{RPA}(-) = \frac{\text{Cys55修飾タンパク質}}{\text{Cys169修飾タンパク質}} \quad (\text{式3-6-4})$$

表 3-6. pH7.0-9.0 の範囲におけるタンパク質濃度の分布 <sup>a,b,c</sup>

pH	Total Conjugation	Single Conjugation	Conjugation Selectivity	Ratio of
	Ratio	Ratio	Excess	Partially modified Adk <sub>tm</sub> s
	TCR(%)	SCR(%)	CSE(%)	RPA(-)
7.0 <sup>d</sup>	55 ± 4	84 ± 2	36 ± 3	2.8 ± 0.3
7.5 <sup>d</sup>	53 ± 4	86 ± 2	39 ± 4	3.1 ± 0.3
8.0 <sup>d</sup>	64 ± 5	82 ± 3	38 ± 4	3.4 ± 0.4
8.5 <sup>e</sup>	68 ± 7	82 ± 4	46 ± 4	5.0 ± 0.2
9.0 <sup>e</sup>	71 ± 7	85 ± 3	53 ± 5	6.1 ± 0.2

<sup>a</sup>反応条件: [タンパク質] = 20 μM, [ピレン2] = 20 μM, V = 3.0 mL (DMSO 0.04% (v/v), 25 °C, 20 h, 遮光). <sup>b</sup>タンパク質濃度は、クロマトグラムの各ピークのエリア面積と異なるモル吸光係数( $\epsilon_{280}$ )から求めた; Column : Mono Q (1 mL, GE healthcare), Flow rate: 0.5 mL/min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0–200 mM, over 120 mL), 検出波長: 280 nm,  $\epsilon_{280} = 10680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (未修飾タンパク質),  $20280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ピレン1つ修飾タンパク質),  $29880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ピレン2つ修飾タンパク質). <sup>c</sup>標準偏差は、3回以上の実験から算出した. <sup>d</sup>50 mM HEPES buffer. <sup>e</sup>50 mM Tris-HCl buffer.

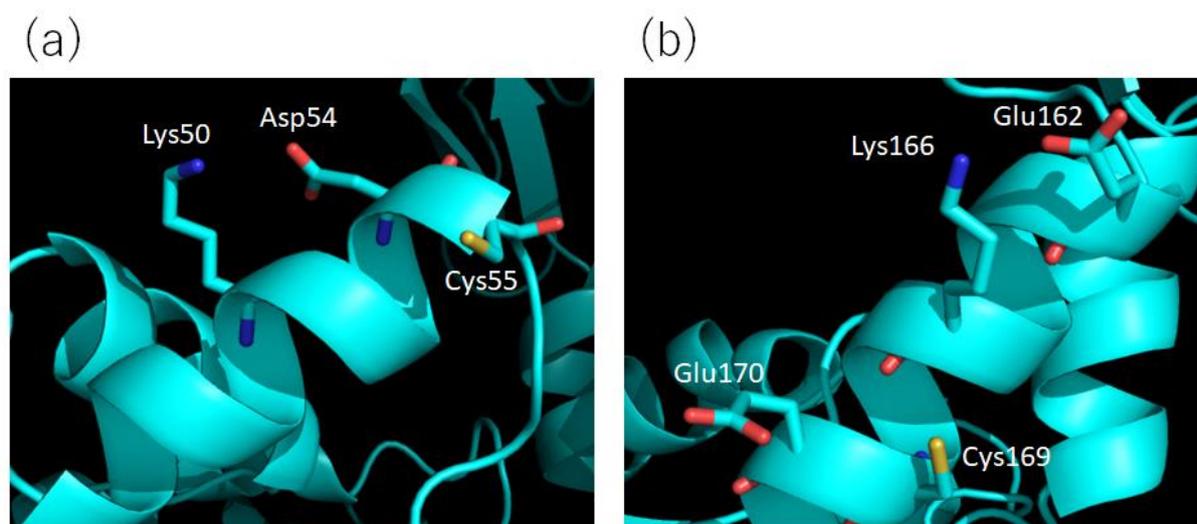


図3-6-5. Adk<sub>tm</sub>の分子動力学シミュレーションの結果.(a)Cys55周辺の拡大図, (b)Cys169周辺の拡大図. シミュレーション条件: 力場: AMBER03; 水溶液モデル: 0.9% NaCl<sub>aq</sub>.; 電荷の割り付け: pH = 8.0 at 298.15 K.分子動力学シミュレーションの初期構造は、wild-type AdkのX線結晶構造(PDB: 4AKE<sup>16</sup>)のAla55とVal169を、ソフトウェア上でCysに置き換えたものを使用した.

TCRは、pHが高くなると増加する傾向にあり、SCRはpH増加に関係なく一定値であった。このことは、ピレン1つ修飾タンパク質の収量が増加していることを示している。CSEとRPAは、pH 8.0までは一定値を示したが、それよ

りも高くなると、増加する傾向にあった。そして、2つのシステインチオールの反応性の差であるRPAは、pH 9.0において、Cys55チオールの反応性が約6倍高いことを示している。このことは、システイン残基周辺の局所環境を反映していると考えられる。2つのシステイン残基はタンパク質表面にあるので、これらの残基の修飾効率に立体障害の影響はないと思われる。

それゆえに、修飾効率に影響するファクターの1つは、システインチオールの酸性度である。分子動力学シミュレーションで得られた構造のCys55の隣のAsp54は、Lys50の方へフリップする傾向がみられ(図 3-6-5a)、Cys55のチオールはAsp54の影響を回避することができると考えられる。それに対して、Cys169の隣のGlu170は、Cys169の方へフリップし、Lys166はGlu162の方へフリップする傾向があり、Glu170とLys166は相互作用していないと考えられる(図 3-6-5b)。

pHが高くなると、チオール(-SH)がチオラートイオン(-S<sup>-</sup>)となり、Asp54/Glu170の側鎖のカルボキシラートイオン(-COO<sup>-</sup>)と静電反発を起こすと考えられる。Asp54はCys55と静電反発を起こした後、反対側に相互作用するLys50が存在するため、Lys50とAsp54は相互作用を示す傾向となり、Cys55は、よりフリーな状態になると考えられる。それに対して、Glu170はCys169と静電反発を起こした後、反対側に相互作用するパートナーが存在しない。したがって、熱力学的に安定となるために、Cys169はGlu170の影響を回避しきれない傾向にあると考えられる。つまりpHが高くなると、Cys169の反応性はあまり変わらず、Cys55の反応性が増大すると考えられる。

また、システイン残基周辺の構造柔軟性の影響もあると思われる。

### 3-7. アデニル酸キナーゼ 4 変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)の設計および2次構造の評価

3-6.でCys55がCys169よりも反応性が高いことが示された。そして、この2つのCysの反応性の差を決めているファクターとして、「隣の酸性アミノ酸との相互作用(Asp54とGlu170)」と、「システイン残基周辺の構造柔軟性」の2つのファクターが考えられる。次に、2つのシステインチオール基の反応性の差を決定しているのは、隣接する酸性アミノ酸の存在であると考え、アデニル酸キナーゼ4変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)を設計した。設計のコンセプトとしてK50Aの変異を加え、Lys50とAsp54の相互作用を除去することで、Cys55/169の隣の酸性アミノ酸の条件を同じにした(図3-7-1)。設計したAdk<sub>qm</sub>は、Adk<sub>tm</sub>と類似したCDスペクトルが得られた(図3-7-2)。よって、変異を加えたことによる2次構造の変化はほとんどないことが示された。

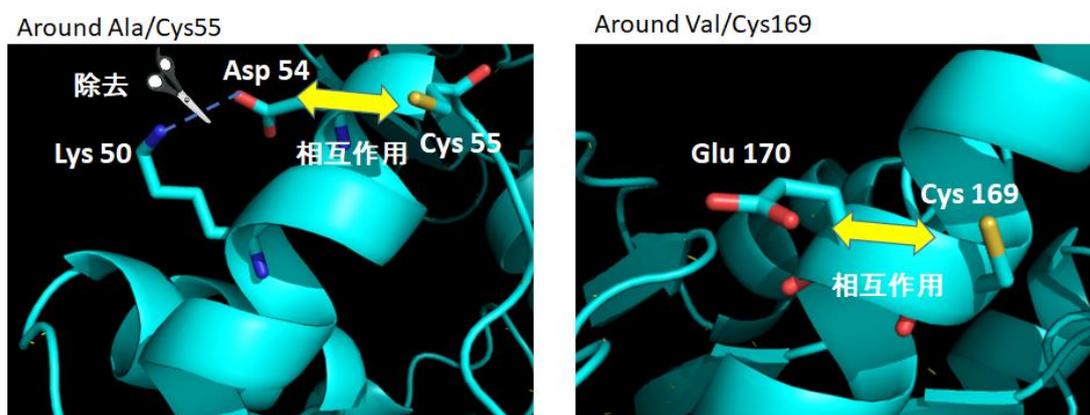


図3-7-1. アデニル酸キナーゼ4変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)の設計コンセプト. (Cys55とCys169はPymolソフトウェア上でwild-type Adk (PDB: 4AKE<sup>16</sup>)のAla55とVal169をそれぞれCysに置き換えている.)

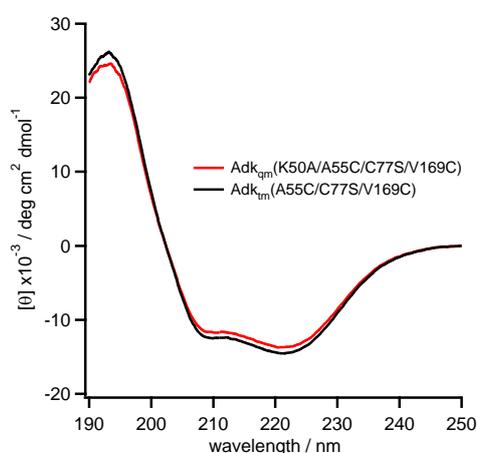


図3-7-2. Adk<sub>tm</sub>とAdk<sub>qm</sub>のCDスペクトルの比較. (—) Adk<sub>tm</sub>, (—) Adk<sub>qm</sub>. 条件: [protein] = 7 μM in 10 mM KPB (pH 7.5 at 25 °C).

### 3-8. システイン残基周辺の局所環境に着目したピレン分子による Adk<sub>qm</sub> の位置選択的化学修飾

Adk<sub>qm</sub>のCys55とCys169の反応性を比較するために、0.5等量のピレン2 (図3-5-1)とAdk<sub>qm</sub>をpH 8.0の条件で反応させた(Cys :ピレン2 = 2 : 1)。

実際に、反応混合物の精製中に得られたクロマトグラムは、3つのピークを示した(図3-8-1)。精製して得られた3つのピークをMALDI-TOF-MS分析(図3-8-2)した結果、

ピークA : 未修飾タンパク質 ( $m/z = 23,550$ )、

ピークB : ピレン1つ修飾タンパク質 ( $m/z = 23,849$ )、

ピークC : ピレン2つ修飾タンパク質 ( $m/z = 24,148$ )

であることが示された。クロマトグラムのエリア面積と280 nmのモル吸光係数( $\epsilon_{280}$ 、表3-6 footnote)より、生成物分布;  $0.24 : 1 : 0.18 =$  未修飾タンパク質:ピレン1つ修飾タンパク質:ピレン2つ修飾タンパク質となり、TCR = 83%、SCR = 85%となった。Adk<sub>tm</sub>に対して、pH 8.0におけるTCRの増加(cf. TCR =  $64 \pm 5\%$ 、Adk<sub>tm</sub>)とSCRがほとんど同じこと(cf. SCR =  $82 \pm 3\%$ 、Adk<sub>tm</sub>)は、ピレン2つ修飾タンパク質の収量への影響が最小限である一方、ピレン1つ修飾タンパク質の量が増加していることを示している。

ピレン1つ修飾タンパク質(ピークB)のピークが1本であることは、変異を加えたことで、タンパク質の表面電荷が変わり、ピレン1つ修飾タンパク質の分離ができなかった、もしくは、1種類のタンパク質しか存在していないと考えられる。

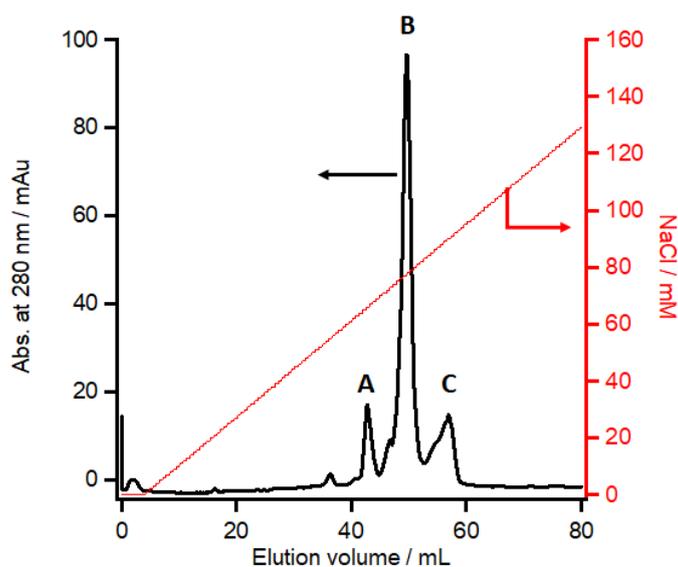


図3-8-1. Adk<sub>qm</sub>とピレン2 (0.5 等量)の反応混合物の陰イオン交換カラムクロマトグラム. Column: Mono Q (1 mL, GE healthcare), Flow rate: 0.5 mL/min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-200 mM, over 120 mL).

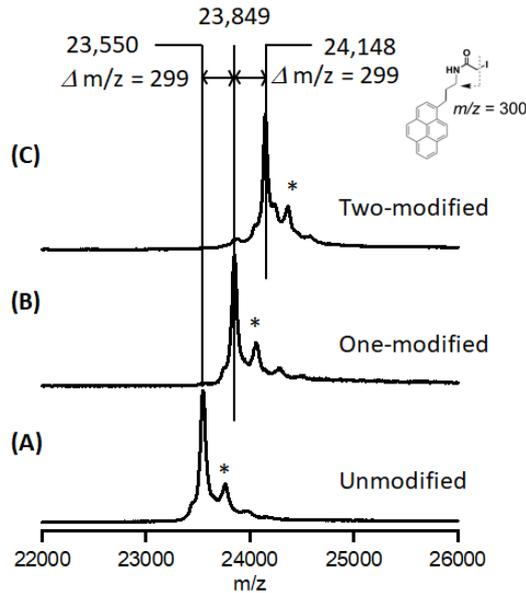


図3-8-2. 陰イオン交換カラム精製で得られた3つのピークのMALDI-TOF-MSスペクトル。(A) ピークA; (B) ピークB; (C) ピークC; \*ピーク：マトリックス(シナピン酸)付加物. 理論値: ピレン1つ修飾タンパク質( $m/z = 23,849$ ); ピレン2つ修飾タンパク質( $m/z = 24,148$ ).

### 3-9. HPLC 分析によるペプチド断片の評価

ピレン1つ修飾タンパク質(ピークB)のピークについて、分離ができなかったのか、あるいは1種類のタンパク質しか存在していないのかを確認するために、トリプシン消化でペプチド断片にした後、HPLC分析でピレン特有の吸収波長(341 nm)を追跡することで検証した。まず、図3-8-1で得られた3つのピークのトリプシン消化を行い、それぞれのタンパク質を対応するペプチド断片に切断した(図3-9-1)。それぞれのピークの未修飾のシステイン残基は、ジスルフィド結合を防ぐために、過剰量のヨードアセトアミドと反応させ、カルバミドメチル化した(図3-9-2)。そして、Cys55とCys169が含まれているペプチド断片に着目した(図3-9-3)。未修飾タンパク質(ピークA)は、カルバミドメチル修飾51-57残基フラグメント( $m/z = 1109.27$ )、カルバミドメチル修飾168-184残基フラグメント( $m/z = 2075.40$ )を示した。同様に、Cys55/Cys169修飾タンパク質(ピークC)は、ピレン2修飾51-57残基フラグメント( $m/z = 1351.37$ )、ピレン2修飾168-184残基フラグメント( $m/z = 2317.49$ )を示した。ピークBは、 $m/z = 1351.37$ 、 $2075.40$ の分子量ピークが検出されていることからCys55修飾タンパク質のみが検出され、Cys169修飾タンパク質は検出されなかった。

MR/IILLGAPGAGK/GTQAQFIMEK/YGIPQISTGDMRL/AAVK/SGSELGK/  
 QAADIMD<sup>55</sup>CGK/LVTDELVIALVK/ER/IAQEDSR/NGFLLDGFPR/TIPQADAMK/  
 EAGINVDYVLEFDVPELIVDR/IVGR/R/VHAPSGR/VYHVK/FNPPK/VEGK/  
 DDVTGEELTTR/K/DDQEETVR/K/R/L<sup>169</sup>CEYHQMTAPLIGYYSK/EAEAGNTK/  
 YAK/VDGTK/PVAEVR/ADLEK/ILG

図3-9-1. Adk<sub>qm</sub>のアミノ酸配列.(“/”はトリプシン消化の位置を示している.)

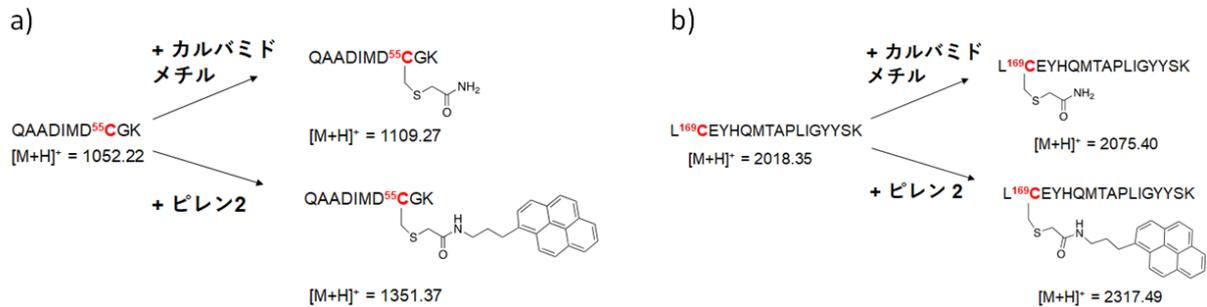


図3-9-2. Adk<sub>qm</sub>のシステイン残基を含むペプチドフラグメント. a) Cys55を含むフラグメント; b) Cys169を含むフラグメント.

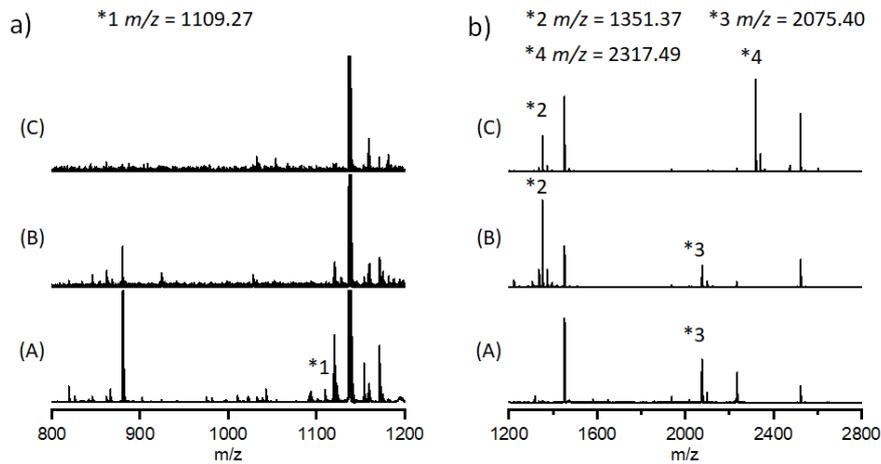


図3-9-3. 未修飾タンパク質(A)、ピレン1つ修飾タンパク質(B)、ピレン2つ修飾タンパク質(C)のトリプシン消化によって得られたペプチドフラグメントのMALDI-TOF-MSスペクトル (マトリックス : CHCA). a)  $m/z$  = 800 to 1200の範囲のスペクトル; b)  $m/z$  = 1200 to 2800の範囲のスペクトル. \*1: Cys55-カルバミドメチル修飾51-57残基フラグメント; \*2: Cys55-ピレン2修飾51-57残基フラグメント; \*3: Cys169-カルバミドメチル修飾168-184残基フラグメント; \*4: Cys169-ピレン2修飾168-184残基フラグメント.

次に、トリプシン消化して得られたピレン1つ修飾Adk<sub>qm</sub>(ピークB、Adk<sub>qm</sub> with one pyrene)のサンプルを用いてHPLC分析を行い、ピレン特有の341 nmの波長で追跡した(図3-9-4)。リファレンスとして、ピレン2つ修飾Adk<sub>qm</sub>(ピークC、Adk<sub>qm</sub> with two pyrenes)、ピレン2つ修飾Adk<sub>tm</sub>(Adk<sub>tm</sub> with two pyrenes)のサンプルを用いた。

ピレン2つ修飾Adk<sub>qm</sub>(ピークC、Adk<sub>qm</sub> with two pyrenes)とピレン2つ修飾Adk<sub>tm</sub>(Adk<sub>tm</sub> with two pyrenes)は、同じCys169を含むフラグメントを持つため、同じ保持時間にクロマトグラムのピークが現れると考えられる。

実際のHPLC分析の結果(図3-9-4)より、27.7 min(\*1)のピークがCys169を含むフラグメントであると同定した。したがって、28.6 min(\*2)のピークがAdk<sub>qm</sub>のCys55を含むフラグメント、29.7 min(\*3)のピークがAdk<sub>tm</sub>のCys55を含むフラグメントと同定した。

ピレン1つ修飾Adk<sub>qm</sub>(ピークB、Adk<sub>qm</sub> with one pyrene)のサンプルは、28.6 min(\*2)のピークがメインピークとして現れ、27.7 min(\*1)のピークがほとんど現れていない。Adk<sub>qm</sub> with two pyrenesとAdk<sub>qm</sub> with one pyreneのクロマトグラムに現れた31.0 min(\*4)のピークは、Adk<sub>tm</sub> with two pyrenesのクロマトグラムには現れていないことから、Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むフラグメントの部分消化によって生成したマイナーフラグメントに由来するピークであると考えられる。さらに、トリプシン消化の結果もCys169に修飾されたフラグメントが検出されていない(図3-9-3)ことから、ほとんどがCys55に修飾されたタンパク質であると考えられる。

この結果、Conjugation Selectivity Excess (CSE) = 74%となり、Adk<sub>tm</sub>の約2倍の修飾選択性を示した(cf. CSE = 38 ± 4%、Adk<sub>tm</sub> at pH 8.0)。さらに、ピレン1つ修飾タンパク質のみを単離したもの(Adk<sub>qm</sub> with one pyrene)で2つのシステインチオールを比較した結果、HPLCの面積比でCys55が98%の修飾率を示した。

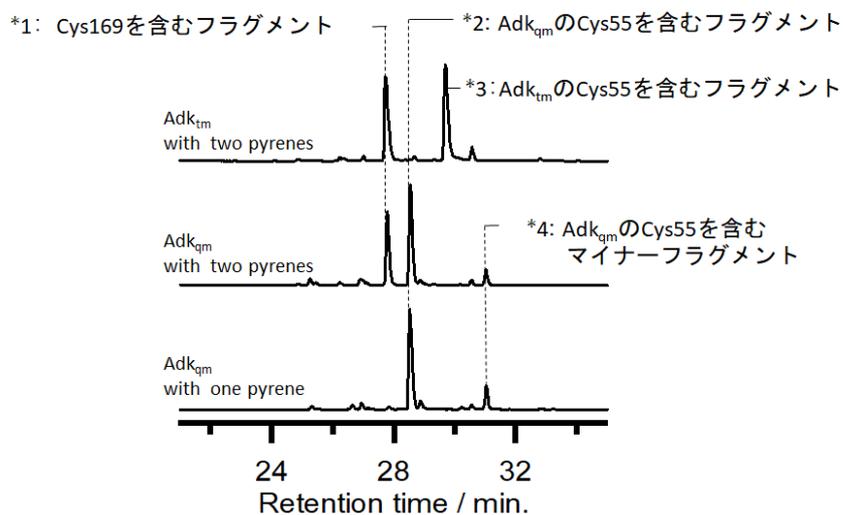


図3-9-4. 341 nmで追跡したHPLC分析のクロマトグラム. Adk<sub>tm</sub> with two pyrenes: ピレン2つ修飾Adk<sub>tm</sub>; Adk<sub>qm</sub> with two pyrenes: ピレン2つ修飾Adk<sub>qm</sub>; Adk<sub>qm</sub> with one pyrene: ピレン1つ修飾Adk<sub>qm</sub>; \*1: 27.7 min.; \*2: 28.6 min.; \*3: 29.7 min.; \*4: 31.0 min.; 分析カラム: Tosoh TSKgel ODS-100V 5 μm 4.6 mm x 250 mm, バッファーA: 0.1% ギ酸, バッファーB: アセトニトリル, 検出波長: 341 nm, 流速: 1 mL/min., 分離メソッド: B 2-70% over 40 min.

さらにLC-MS分析による同定も行い、\*1: Cys169を含むフラグメント(図3-9-5a)、\*2: Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むフラグメント(図3-9-5b)、\*3: Adk<sub>tm</sub>のCys55を含むフラグメント(図3-9-5c)、\*4: Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むマイナーフラグメント(図3-9-5d)のそれぞれ対応するフラグメントイオンが検出された。その結果、\*4: Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むマイナーフラグメントは、\*2: Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むフラグメントに比べ、分子量が17減少しており、N末端のグルタミン(Gln)が脱アンモニアすることによる環化で生成したピログルタミン酸(pyro-Glu)となっているもの<sup>18</sup>(スキーム 3-9-1)であると同定できた。

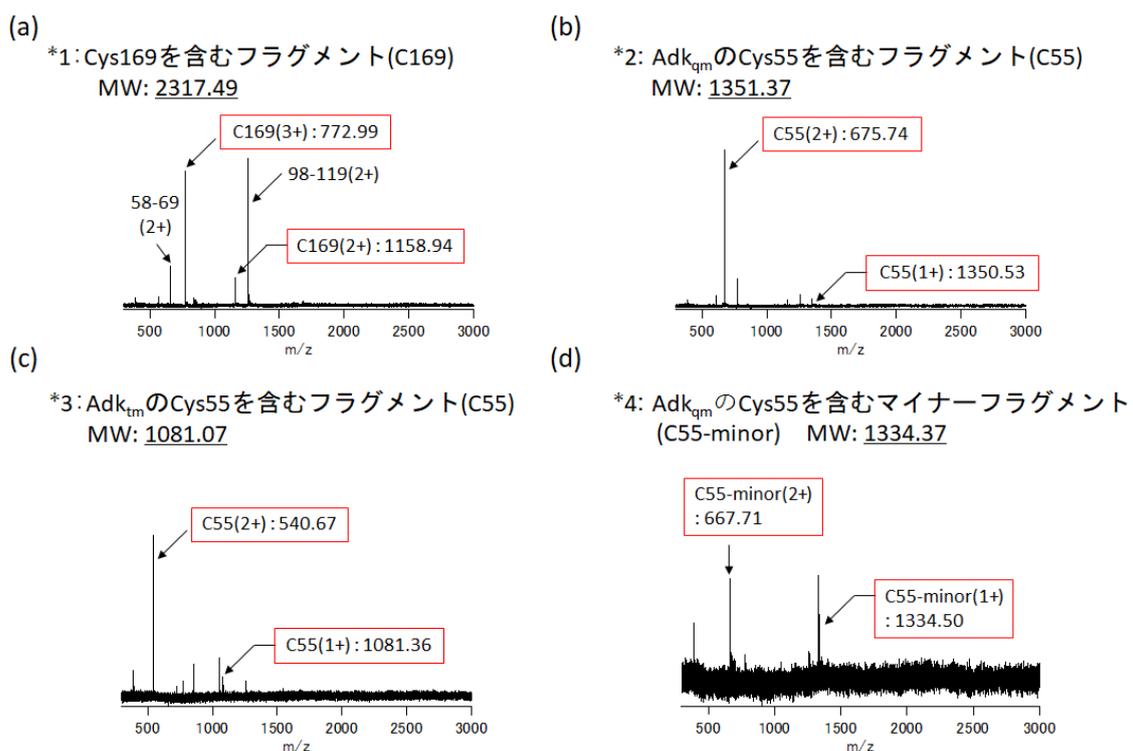
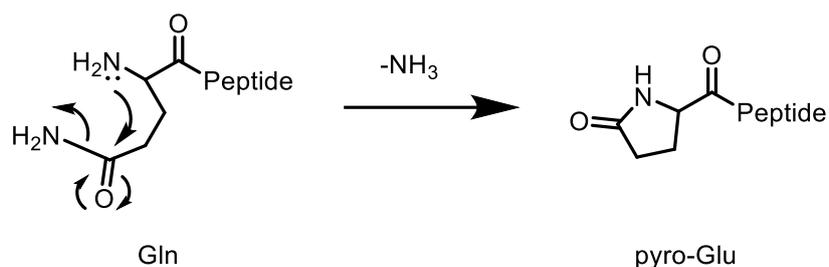


図3-9-5. LC-MS分析の結果. (a) \*1: Cys169を含むフラグメント;(b) \*2: Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むフラグメント;(c) \*3: Adk<sub>tm</sub>のCys55を含むフラグメント;(d) \*4: Adk<sub>qm</sub>のCys55を含むマイナーフラグメント.



スキーム3-9-1. N末端グルタミン(Gln)の脱アンモニア(NH<sub>3</sub>)による環化で生成するピログルタミン酸(pyro-Glu)の反応式.

### 3-10. Adk<sub>qm</sub> の分子動力学シミュレーション

次に、2つのシステイン残基周辺の環境を把握するために、Adk<sub>qm</sub>の分子動力学シミュレーションを行った。分子動力学シミュレーションでAdk<sub>qm</sub>を解析して得られた最安定構造(minimum energy structure)とwild-typeのアデニル酸キナーゼ(PDB: 4AKE<sup>16</sup>)のC<sub>α</sub>-位置を基準に重ね合わせた構造(C<sub>α</sub>-RMSD = 0.402 Å)を比較した(図3-10a)。そして、システイン残基周辺の局所環境に着目すると、Adk<sub>qm</sub>のAsp54は変異を加えたにもかかわらず、Cys55とは離れた位置にあり、Cys55はフリーな状態にあった(図3-10c、Cyan)。それに対して、Adk<sub>qm</sub>のGlu170はCys169の方にフリップする傾向が見られ、Cys169の静電場に影響を与えていると考えられる(図3-10d、Cyan)。

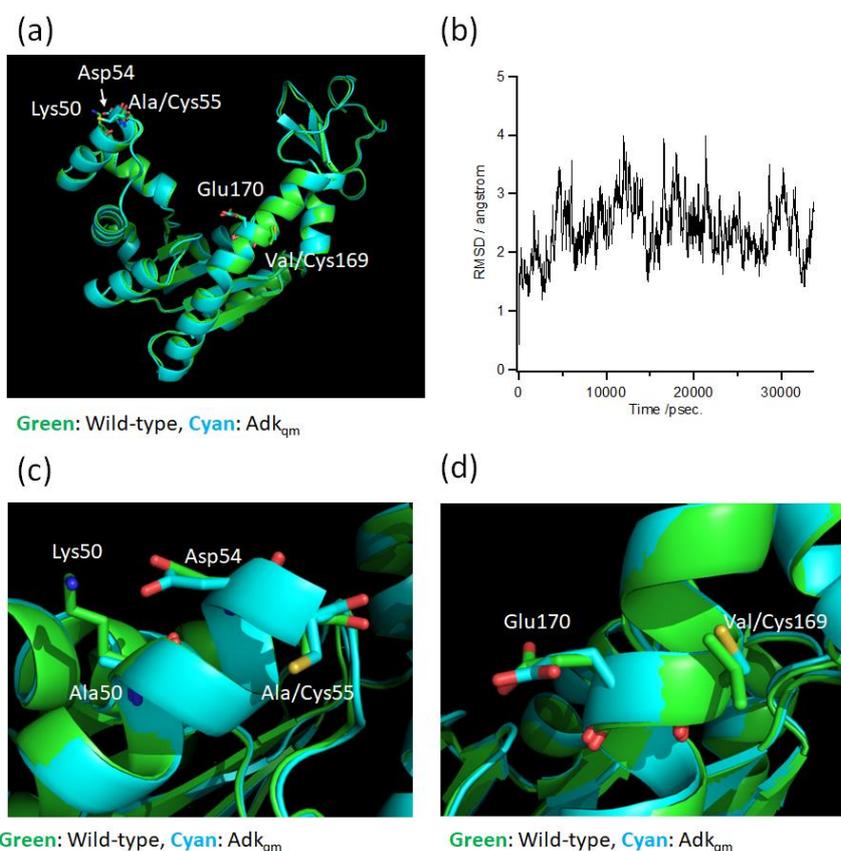


図 3-10. Adk<sub>qm</sub> の最安定構造(cyan)と wild-type Adk の X 線結晶構造(PDB: 4AKE<sup>16</sup>, green)の重ね合わせた図. (a) 全体構造; (b) 分子動力学シミュレーション中の C<sub>α</sub>-RMSDs の時間変化; (c) Ala/Cys55 周辺の拡大図; (d) Val/Cys169 周辺の拡大図. 分子動力学シミュレーションは YASARA structure ソフトウェア(Ver.15.3.8)<sup>17</sup>で行った. シミュレーション条件: 力場: AMBER03; 水溶液モデル: 0.9% NaCl<sub>aq</sub>; 電荷の割り付け: pH = 8.0 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、wild-type Adk の X 線結晶構造 (PDB: 4AKE<sup>16</sup>) の Lys50 を Ala に、Ala55 と Val169 を、ソフトウェア上で Cys に置き換えたものを使用した.

Adk<sub>qm</sub>の分子動力学シミュレーションの結果は、Adk<sub>tm</sub>の場合と同じような状況となった。分子動力学シミュレーションより得られたAdk<sub>qm</sub>の最安定構造では、Asp54の側鎖は、wild-type Adkに比べてCys55の方に少し傾いていたが、まだCys55からは距離が離れており(図3-10c、Cyan)、Asp54とCys55の相互作用は重要でないことを示唆している。これに関して、Cys55の増加した修飾選択性(CSE = 74%)を説明する1つのもっともらしいファクターは、システイン残基周辺の局所的な構造柔軟性に対するLys50Ala変異の影響である。Lys50とAsp54の位置は、 $\alpha$ -ヘリックスを安定化するために相互作用する理想的な位置である、 $\alpha$ -ヘリックス上で4残基離れている。Lys50Alaの変異によるLys50とAsp54の相互作用の除去は、 $\alpha$ -ヘリックスの構造柔軟性に影響している。その構造的な摂動は、Cys55周辺の局所的な構造柔軟性にも影響し、修飾効率の増加に貢献していると考えられる。Cys55は $\alpha$ -ヘリックスの端に位置しているため、Cys55周辺の構造柔軟性は、 $\alpha$ -ヘリックスの中央に位置しているCys169と比較して大きくなる。上記で説明したように、水素結合を含むシステインチオール反応性とシステイン残基周辺の構造柔軟性は相互に関係していると考えられる<sup>15</sup>。

結果として、「システイン残基周辺の構造柔軟性」が「隣の酸性アミノ酸との相互作用(Asp54とGlu170)」よりも、Cys55の反応性を決定する大きなファクターであることが示された。

### 3-11. まとめ

本章では、システイン残基の化学修飾効率に対するシステイン残基周辺の局所環境の効果を検証するために、限られた量(0.5 eq.)のヨードアセトアミド基を有するピレン $2$ をアデニル酸キナーゼ3変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の2つのシステイン残基に化学修飾し、修飾タンパク質の生成分布を、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで検討した。両方のシステイン残基はタンパク質表面に位置しているにもかかわらず、Cys55チオールの反応性は、Cys169チオールよりも高く、pH 9.0において約6倍に達した。Cys55およびCys169には隣接する酸性アミノ酸(Asp54/Glu170)が存在し、これらの残基との相互作用は、システインチオールの酸性度に影響を与えうる。また、「システイン残基周辺の構造柔軟性」は考慮すべきファクターである。

そこで、2つのCysの反応性の差を大きく決定しているファクターを同定するために、Lys50とAsp54の相互作用を無くしたアデニル酸キナーゼ4変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)を設計し、限られた量(0.5 eq.)のピレン $2$ をAdk<sub>qm</sub>の2つのシステイン残基に化学修飾した。そして、トリプシン消化でペプチド断片にした後、ピレン特有の341 nmの吸収波長でHPLC分析した結果、Cys55修飾タンパク質が主生成物であることが示された。さらに、トリプシン消化の結果もCys55修飾タンパク質のみであることを示していた。Lys50Alaの変異を加えたことでLys50とAsp54の相互作用がなくなり、Cys55が含まれている $\alpha$ -ヘリックスの柔軟性が増加した。その構造的な摂動がシステイン残基周辺の構造柔軟性にも影響を及ぼしたと考えられる。ピレン1つ修飾タンパク質のみを単離したもの(Adk<sub>qm</sub> with one pyrene)で2つのシステインチオールの修飾率を比較した結果、HPLCの面積比でCys55が98%の修飾率を示した。

これらの結果から、「システイン残基周辺の構造柔軟性」が「隣の酸性アミノ酸との相互作用(Asp54とGlu170)」よりも、2つのCysの反応性の差を決定している大きなファクターであることが明らかとなった。

### 3-12. 実験項

#### 3-12-1. 使用試薬および使用機器

##### 使用試薬

本研究で使用した試薬は、和光純薬工業、東京化成工業、シグマアルドリッチ、ナカライテスクから販売されているものを使用した。

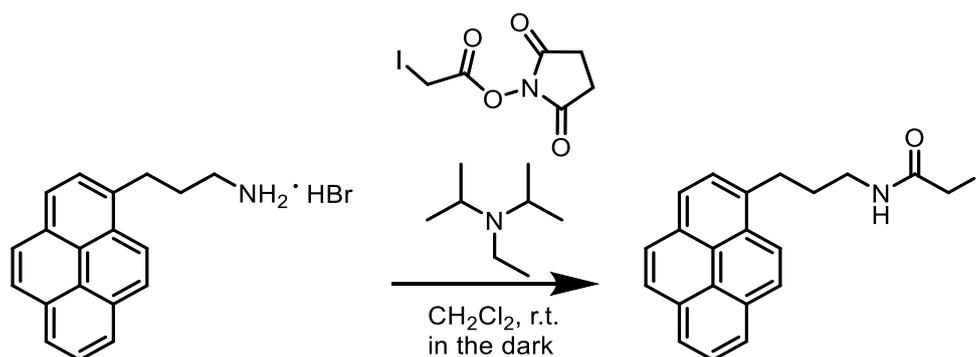
##### 使用機器

- ・ SHIMADZU BIOTECH BioSpec-nano
- ・ 紫外可視吸収分光光度計 (Shimadzu UV-2550)
- ・ FPLC (ÄKTA prime plus FPLC chromatogram system (GE Healthcare))
- ・ HPLC (Shimadzu, SPD-M20A(diode array detector), LC-20AB(liquid chromatograph), DGU-20A<sub>3</sub> (Degasser))
- ・ 400 MHz 超伝導 NMR (JEOL JNM-ECP-400)
- ・ MALDI 専用飛行時間型質量分析計 (Bruker Autoflex II)
- ・ 円二色性分散計 (JASCO J-725)
- ・ ラピダス ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO AE-6530P)
- ・ パワーステーション 1000XP (ATTO AE-8750)

#### 3-12-2. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>) の発現と精製<sup>3</sup>

第2章と同じ方法で、Adk<sub>tm</sub>の発現と精製を行った。

#### 3-12-3. ヨードアセトアミド基を有するピレン 2 の合成<sup>4</sup>



50 mLナスフラスコに、(1-pyrenyl)-propylamine hydrobromide 0.050 g (0.147 mmol) とジイソプロピルエチルアミン0.051 mL (0.294 mmol)を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5 mLに溶解した。その溶液に、ヨード酢酸 N-スクシンイミジル 0.050 g (0.176 mmol)をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 mLに溶かしたものを加え、遮光して室温で4 時間攪拌した。反応混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で希釈して分液漏斗に移し、水で3回洗浄した後、有機層を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で脱水した。ろ過で無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を取り除きエバポレ

ーターでCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、R<sub>f</sub>=0.18)で精製した。<sup>1</sup>H-NMR(図3-12-3)測定により生成物を同定し、白色個体を得た。収量0.032 g(収率 51%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) δ = 8.27 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, pyrene), 8.19-8.12 (m, 4H, pyrene), 8.04-7.99 (m, 3H, pyrene), 7.88 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, pyrene), 6.03 (br, 1H, -NH-CO), 3.85 and 3.65 (s, 2H, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-I), 3.47-3.40 (m, 4H, pyrene-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 2.16-2.09 (m, 2H, pyrene-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-)

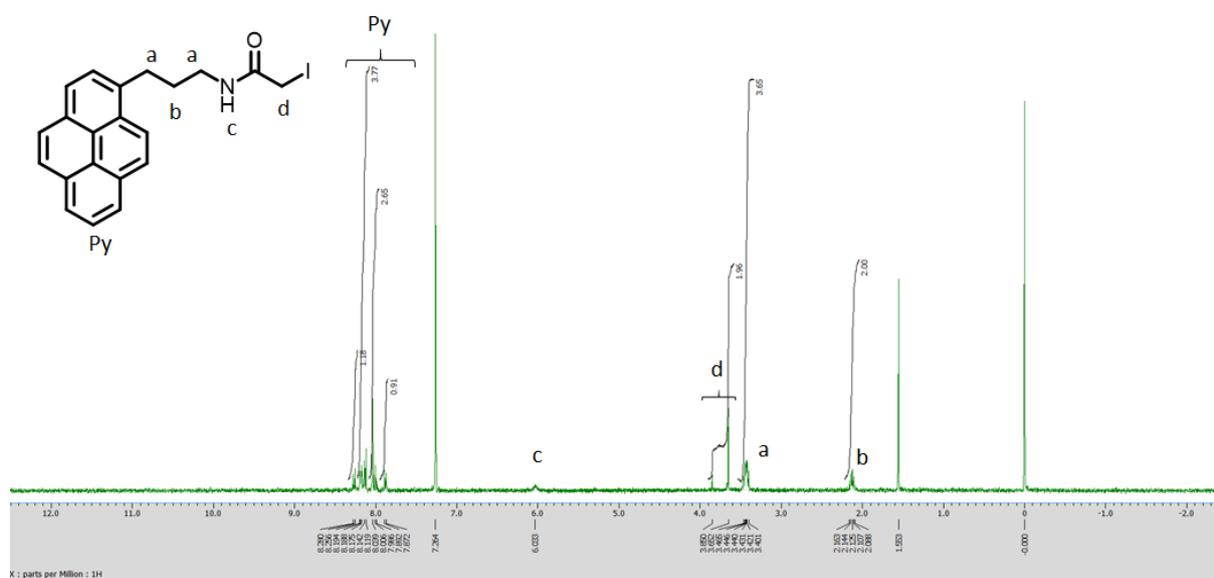


図3-12-3. ヨードアセトアミド基を有するピレン2の400 MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトル。

### 3-12-4. ピレン2による Adk<sub>tm</sub>への位置選択的部分化学修飾

Adk<sub>tm</sub>を20 mM HEPESバッファー (pH = 8.0 at 25 °C) に溶かし、DMSOに溶解させたピレン2を加え、終濃度をAdk<sub>tm</sub> 20 μM、ピレン2 20 μM (0.5 eq.)の溶液 12 mLをファルコンチューブに作製した。そして、ファルコンチューブを遮光して、25 °Cで20時間、軽く揺らしながら(50 rpm)インキュベートした。反応終了後、メンブレンフィルターに通し、アミコンで遠心濃縮した。その後、反応混合物を陰イオン交換カラム(column: Mono Q (CV = 1 mL), Flow rate: 0.5 mL / min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-320 mM, over 80 mL))で精製した。サンプル保存は、シリンジ操作でHitrap desalting カラム(5 mL、GE healthcare)によって超純水に置換した後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥して、-80 °Cで保管した。

### 3-12-5. Adk<sub>tm</sub> のトリプシン消化

ピレン<sub>2</sub>によるAdk<sub>tm</sub>への位置選択的化学修飾を行い、カラム精製して凍結保存した各フラクションサンプルを100 mM 炭酸アンモニウムバッファー (pH 8.0) 25  $\mu$ Lに溶かした溶液に、2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE) 25  $\mu$ L、200 mM ジチオトレイトール (DTT) 1  $\mu$ Lを加え、遮光して60 °Cで1時間インキュベートした。次に、空いているシステイン残基によるジスルフィド結合を防ぐために、200 mM ヨードアセトアミド(IAM) 4  $\mu$ Lを加え、遮光して25 °Cで1時間インキュベートした。そして、過剰量のIAMをクエンチするために、200 mM DTT 1  $\mu$ Lを加え、遮光して25 °Cで1時間インキュベートした。その後、超純水でTFEを希釈し、100 mM 炭酸アンモニウムバッファーでpH 8-9に調整した。そして43  $\mu$ Mトリプシン溶液5  $\mu$ Lを加え、遮光して37 °Cで18時間インキュベートした。酢酸 10  $\mu$ Lを加えてpH 3-4に調整し、トリプシン消化を停止した。その後、その溶液をそのままMALDI-TOF-MS分析した。

### 3-12-6. pH 7.0-9.0 の範囲における Cys55 と Cys169 の反応性の評価

50 mM HEPESバッファー(pH = 7.0 or 7.5 or 8.0 at 25 °C) / 50 mM Tris-HClバッファー(pH = 8.5 or 9.0 at 25 °C) にAdk<sub>tm</sub>を溶かし、DMSOに溶解させたピレン<sub>2</sub>を加え、終濃度を[Adk<sub>tm</sub>] = 20  $\mu$ M、[ピレン<sub>2</sub>] = 20  $\mu$ M (0.5 eq.) の溶液 3 mLをファルコンチューブに作製した。そして、ファルコンチューブを遮光して、25 °Cで20時間、軽く揺らしながら(50 rpm)インキュベートした。反応終了後、メンブレンフィルターに通し、アミコンで遠心濃縮した。その後、Hitrap desalting カラム(5 mL、GE healthcare)によって20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C)にバッファー交換し、陰イオン交換カラム(column: Mono Q (CV = 1 mL), Flow rate: 0.5 mL / min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-200 mM, over 120 mL))で精製した。得られたクロマトグラムの各ピーク面積(図3-12-6)からそれぞれの比を計算し、Total Conjugation Ratio (TCR)、Single Conjugation Ratio (SCR)、Conjugation Selectivity Excess (CSE)、Ratio of Partially modified Adk<sub>tm</sub>s (RPA)を評価した。

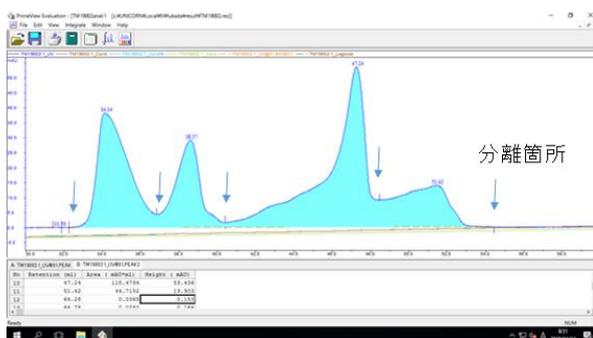


図3-12-6. ピーク面積の計算方法. (“↓”は分離箇所を示している.)

### 3-12-7. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 4 変異体 (K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>) の発現と精製<sup>3</sup>

第2章と同じ方法で、Adk<sub>qm</sub>の発現と精製を行った。

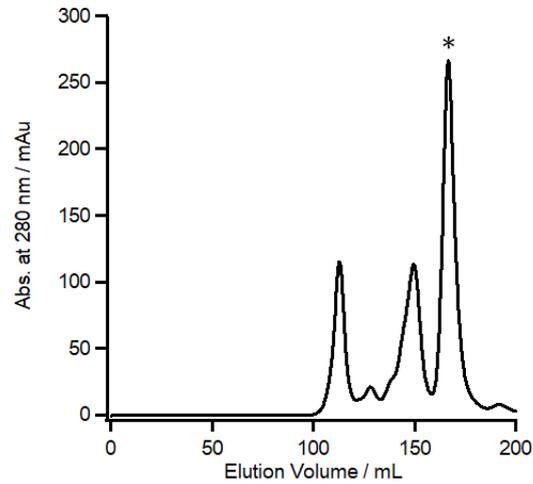


図3-12-7-1. Hi-Load 26/600カラムクロマトグラフィーのクロマトグラム. \*ピークを回収した.

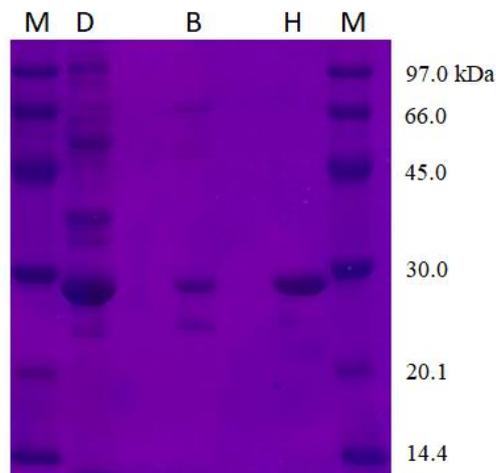


図3-12-7-2. ポリアクリルアミド電気泳動の結果. 条件:15% アクリルアミド, 300V, 20 mA, 6 W, 70 min. M:マーカー; D: DEAE sepharoseカラムクロマトグラフィー回収ピーク; B: Blue sepharoseカラムクロマトグラフィー回収ピーク; H: Hi-Load 26/600カラムクロマトグラフィー回収ピーク.

### 3-12-8. ピレン 2 による Adk<sub>qm</sub> への位置選択的部分化学修飾

Adk<sub>qm</sub>を50 mM HEPESバッファー (pH = 8.0 at 25 °C) に溶かし、DMSOに溶解させたピレン2を加え、終濃度を[Adk<sub>qm</sub>] = 20 μM、[ピレン2] = 20 μM (0.5 eq.) の溶液 3 mLをファルコンチューブに作製した。そして、ファルコンチューブを遮光して、25 °Cで20時間、軽く揺らしながら(50 rpm)インキュベートした。反応終了後、メンブレンフィルターに通し、アミコンで遠心濃縮した。その後、Hitrap desalting カラム(5 mL、GE healthcare)によって20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C)にバッファー交換し、陰イオン交換カラム(column: Mono Q (CV = 1 mL), Flow rate: 0.5 mL / min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-200 mM, over 120 mL))で精製した。サンプル保存は、シリンジ操作でHitrap desalting カラム(5 mL、GE healthcare)によって超純水に置換した後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥して、-80 °Cで保管した。

### 3-12-9. Adk<sub>qm</sub> のトリプシン消化

ピレン2によるAdk<sub>qm</sub>への位置選択的的化学修飾を行い、カラム精製して凍結保存した各フラクションサンプルを用いて、3-12-5と同じ方法で行った。

## 参考文献

1. Chen, C. Y.; Zhou, L. Q.; Liu, W.; Liu, W. S., Coumarinocoumarin-based two-photon fluorescent cysteine biosensor for targeting lysosome. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 6138–6143.
2. Zhang, D.; Le, H.; Cruz-Chuh, J. D.; Bobba, S.; Guo, J.; Staben, L.; Zhang, C.; Ma, Y.; Kozak, K. R.; Lewis Phillips, G. D.; Vollmar, B. S.; Sadowsky, J. D.; Vandlen, R.; Wei, B.; Su, D.; Fan, P.; Dragovich, P. S.; Khojasteh, S. C.; Hop, C.; Pillow, T. H., Immolation of p-aminobenzyl ether linker and payload potency and stability determine the cell-killing activity of antibody-drug conjugates with phenol-containing payloads. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 267–274.
3. Fujii, A.; Hirota, S.; Matsuo, T., Reversible switching of fluorophore property based on intrinsic conformational transition of adenylate kinase during its catalytic cycle. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1218–1225.
4. Fujii, A.; Sekiguchi, Y.; Matsumura, H.; Inoue, T.; Chung, W. S.; Hirota, S.; Matsuo, T., Excimer emission properties on pyrene-labeled protein surface: correlation between emission spectra, ring stacking modes, and flexibilities of pyrene probes. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 537–548.
5. Nathani, R. I.; Moody, P.; Chudasama, V.; Smith, M. E. B.; Fitzmaurice, R. J.; Caddick, S., A novel approach to the site-selective dual labelling of a protein via chemoselective cysteine modification. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3455–3458.
6. Chalker, J. M.; Lercher, L.; Rose, N. R.; Schofield, C. J.; Davis, B. G., Conversion of cysteine into dehydroalanine enables access to synthetic histones bearing diverse post-translational modifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1835–1839.
7. Friedman, M., *The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl groups in amino acids, peptides and proteins*. Pergamon Press: Elmsford, NY, **1973**.
8. Edsall, J. T. and J. W., *Biophysical Chemistry*. Academic Press, Inc.: New York, **1958**.
9. Li, N. C.; Gawron, O.; Bascuas, G., Stability of zinc complexes with glutathione and oxidized glutathione1. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 225–229.
10. Snyder, G. H.; Cennerazzo, M. J.; Karalis, A. J.; Field, D., Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry* **1981**, *20*, 6509–6519.
11. Roos, G.; Loverix, S.; Geerlings, P., Origin of the pKa perturbation of N-terminal cysteine in  $\alpha$ - and  $3_{10}$ -helices: a computational DFT study. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 557–562.
12. Mazmanian, K.; Sargsyan, K.; Grauffel, C.; Dudev, T.; Lim, C., Preferred hydrogen-bonding partners of cysteine: implications for regulating cys functions. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 10288–10296.
13. Zhang, W. L.; Pei, J. F.; Lai, L. H., Statistical analysis and prediction of covalent ligand targeted cysteine residues. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 1453–1460.
14. Tharp, J. M.; Liu, W. S. R., The " $\pi$ -Clamp" offers a new strategy for site-selective protein modification. *ChemBiochem* **2016**, *17*, 883–885.

15. Marino, S. M., Protein flexibility and cysteine reactivity: influence of mobility on the H-bond network and effects on pKa prediction. *Protein J.* **2014**, *33*, 323–336.
16. Müller, C. W.; Schlauderer, G. J.; Reinstein, J.; Schulz, G. E., Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure* **1996**, *4*, 147–156.
17. Krieger, E.; Koraimann, G.; Vriend, G., Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* **2002**, *47*, 393–402.
18. Liu, Y. D.; Goetze, A. M.; Bass, R. B.; Flynn, G. C., N-terminal glutamate to pyroglutamate conversion in vivo for human IgG2 antibodies. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 11211–11217.

## 第4章：タンパク質構造変化による異種合成分子の相互作用制御

### 4-1. 研究目的

第2章でアデニル酸キナーゼ3変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の2つのシステイン残基にヨードアセトアミド基を有するコバルトサレン錯体 **1** を化学修飾し、タンパク質の構造変化に基づいた同種金属錯体による触媒反応の反応性の制御が可能であることを示した。そして、第3章で2つのシステイン残基周辺の局所環境に着目し、ピレン **2** を位置選択的かつ部分的に化学修飾をして分けることに成功した。さらに、ピレン1つ修飾タンパク質の空いているシステイン残基にヨードアセトアミドを化学修飾して、Adk<sub>tm</sub> への異種分子の逐次的化学修飾ができることも示した。

本章では、第2章、第3章の結果を踏まえ、ピレン1つ修飾タンパク質の空いているシステイン残基に別の合成分子であるフェナントロリン **3** (図4-1) の導入を検討した。フェナントロリンは、アントラセン(非複素環)からピリジニウム(複素環)への電荷移動により、アントラセンの蛍光がクエンチングするという報告<sup>1</sup>に基づいて選択した。よって、タンパク質表面に異種合成分子を逐次的に化学修飾し、タンパク質構造変化によるピレンモノマー蛍光のクエンチングが可能であることを示した(図4-1)。

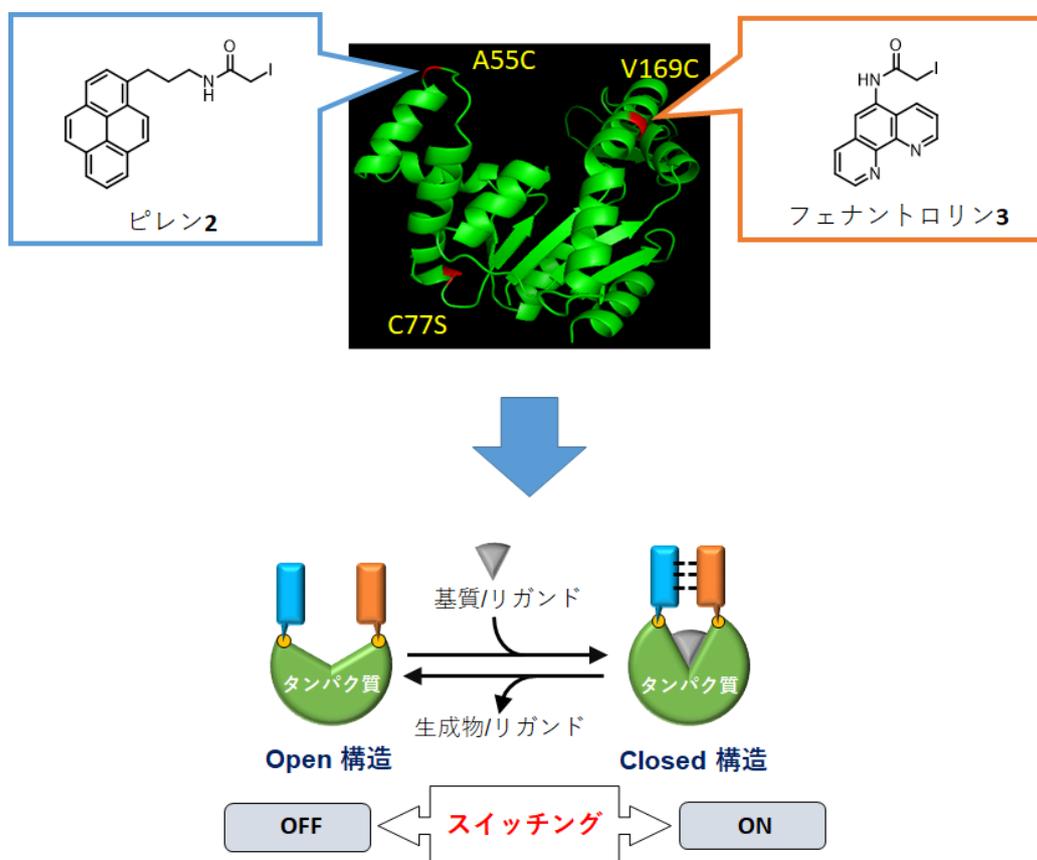


図 4-1. 異種分子修飾タンパク質の構築およびタンパク質構造変化による異種合成分子の相互作用制御の模式図.

## 4-2. 異種合成分子修飾アデニル酸キナーゼのキャラクタリゼーション

### 4-2-1. MALDI-TOF-MS スペクトル

タンパク質表面に異種合成分子を逐次的に化学修飾するために、10 等量のフェナントロリン **3** とピレン修飾タンパク質を pH 8.5 の条件で 2 時間インキュベートした。陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(MonoQ、GE Healthcare)による精製後、MALDI-TOF-MS による質量分析測定を行ったところ、フェナントロリン **3** が修飾された分子量のピーク ( $m/z = 24,141$ 、 $[M+H^+]$ ) が観測された(図 4-2-1-1)。このことから、Adk<sub>tm</sub> 表面にピレン **2** (pyrene) とフェナントロリン **3** (phen) がそれぞれ修飾された異種合成分子修飾タンパク質が構築された。

さらに、20 等量のヨードアセトアミド(IAM)とピレン修飾タンパク質を pH 8.0 の条件で 4 時間インキュベートした。Hitrap desalting カラムクロマトグラフィー(ゲルろ過カラム、GE Healthcare)による精製後、MALDI-TOF-MS による質量分析測定を行ったところ、ヨウ素が脱離したアセトアミドが修飾された分子量のピーク ( $m/z = 23,963$ 、 $[M+H^+]$ ) が観測された(図 4-2-1-2)。このことから、Adk<sub>tm</sub> 表面にピレン **2** (pyrene) とアセトアミド(acetamide) がそれぞれ修飾された異種合成分子修飾タンパク質が構築された。

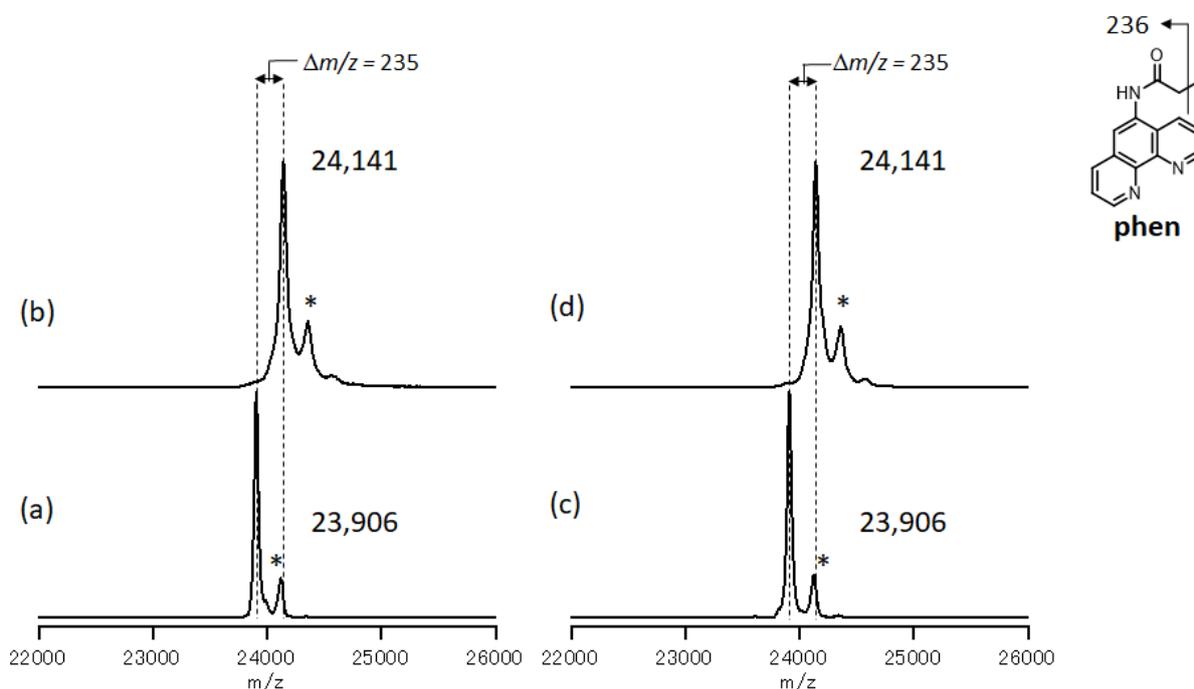


図 4-2-1-1. ピレン **2** とフェナントロリン **3** を化学修飾したタンパク質の MALDI-TOF-MS スペクトル. (a) C55pyrene 修飾タンパク質; (b) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; (c) C169pyrene 修飾タンパク質; (d) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質; \*ピーク: マトリックス(シナピン酸)付加物.

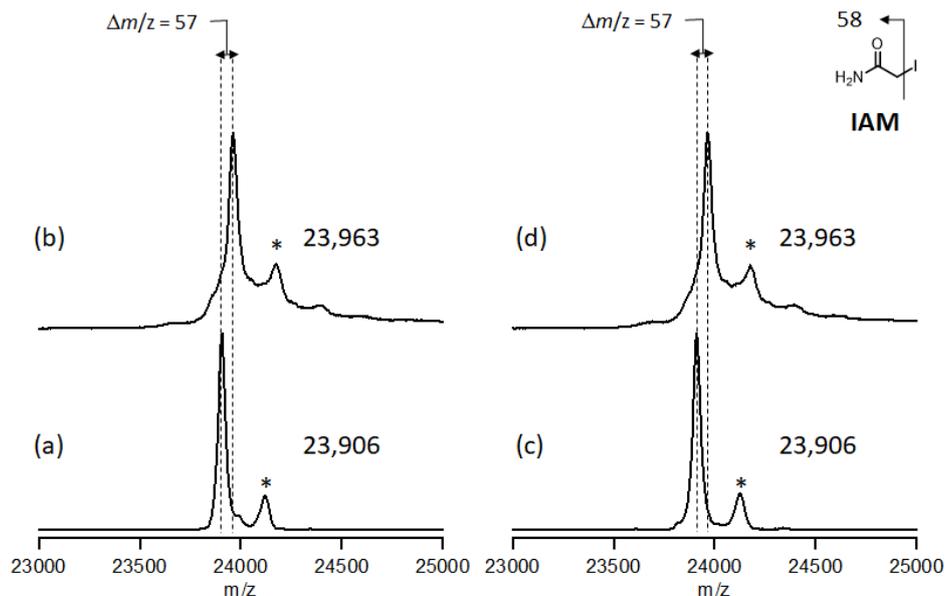


図 4-2-1-2. ピレン 2 とアセトアミドを化学修飾したタンパク質の MALDI-TOF-MS スペクトル. (a) C55pyrene 修飾タンパク質; (b) C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質; (c) C169pyrene 修飾タンパク質; (d) C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質; \*ピーク: マトリックス(シナピン酸)付加物.

#### 4-2-2. CD スペクトル

今回得られた異種合成分子修飾タンパク質は、未修飾  $\text{Adk}_{\text{tm}}$  と類似の CD スペクトルを示した(図 4-2-2)。この結果より、異種合成分子修飾タンパク質の 2 次構造は保持されていることが示された。

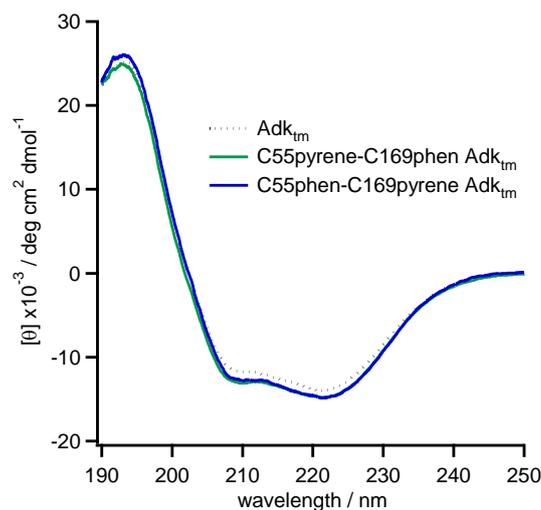
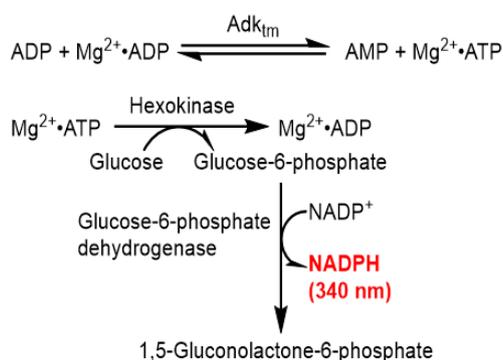


図 4-2-2. 異種合成分子修飾タンパク質の CD スペクトル. (...) 未修飾タンパク質; (—) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; (—) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質. 条件: [protein] = 3.5-6.8  $\mu\text{M}$  in 10 mM KPB (pH 7.5 at 25 °C).

### 4-2-3. キナーゼ活性の確認

アデニル酸キナーゼが本来持っているキナーゼ活性を確認するため、ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの共役反応を行った。この共役反応により、最終的に生成する還元型ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸(NADPH)を 340 nm の吸光度で追跡することで、キナーゼ活性を確認することができる<sup>2</sup>(スキーム 4-2-3)。今回得られた 2 種類の異種合成分子修飾タンパク質は、アデニル酸キナーゼとしてのキナーゼ活性を保持していることが示された(図 4-2-3)。また、このことから 2 次構造が保持されていることも確認された。



スキーム 4-2-3. ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの共役反応。

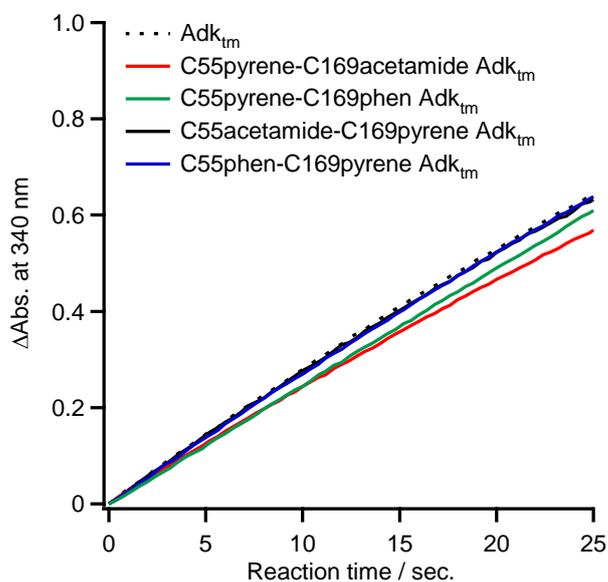


図 4-2-3. 酵素活性測定の結果. (···) 未修飾タンパク質; (—) C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質; (—) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; (—) C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質; (—) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質. 条件: [protein] = 44 nM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), [glycylglycine] = 58 mM, [NADP<sup>+</sup>] = 2.3 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 10 mM, Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase = 15 units/ 2mL, [ADP] = 2 mM, [Glucose] = 10 mM.

### 4-3. 阻害剤および基質を用いた異種合成分子修飾タンパク質の蛍光測定

#### 4-3-1. UV-vis スペクトルおよび蛍光スペクトル

C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質の UV-vis スペクトルおよび蛍光スペクトルを図 4-3-1-1 に示した。異種分子修飾タンパク質は、330-350 nm にピレンの  ${}^1L_a$  遷移に由来する吸収スペクトル(black line)がある<sup>3</sup>。345 nm で励起させて得られた蛍光スペクトルは、376 nm と 396 nm にピークを持つ、典型的なピレンのモノマー蛍光スペクトルを示した<sup>4</sup>。また、C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質(図 4-3-1-2)、C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質(図 4-3-1-3)、C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質(図 4-3-1-4)も同様のスペクトルを示した。

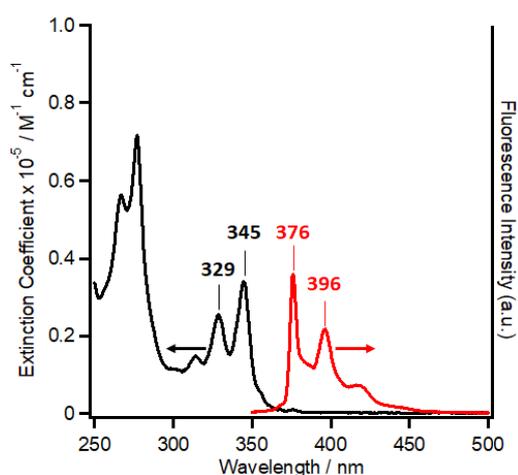


図 4-3-1-1. C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質の UV-vis スペクトル(black line, left axis) および蛍光スペクトル(red line, right axis). バッファー : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 蛍光スペクトルの励起波長 = 345 nm.

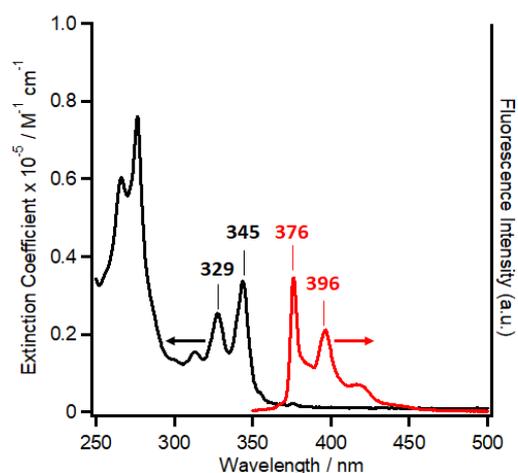


図 4-3-1-2. C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の UV-vis スペクトル(black line, left axis) および蛍光スペクトル(red line, right axis). バッファー : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 蛍光スペクトルの励起波長 = 345 nm.

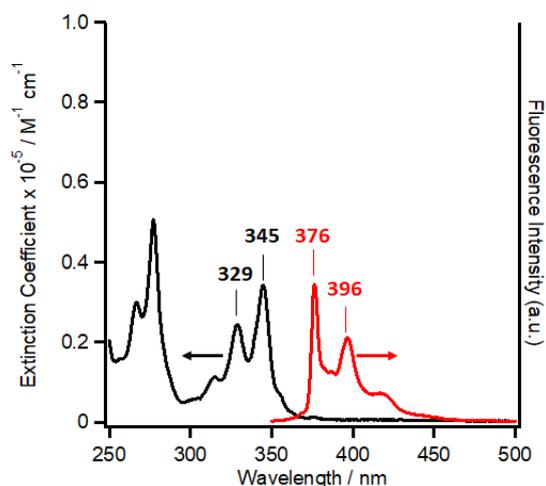


図 4-3-1-3. C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質の UV-vis スペクトル(black line, left axis)および蛍光スペクトル(red line, right axis). バッファー : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 蛍光スペクトルの励起波長= 345 nm.

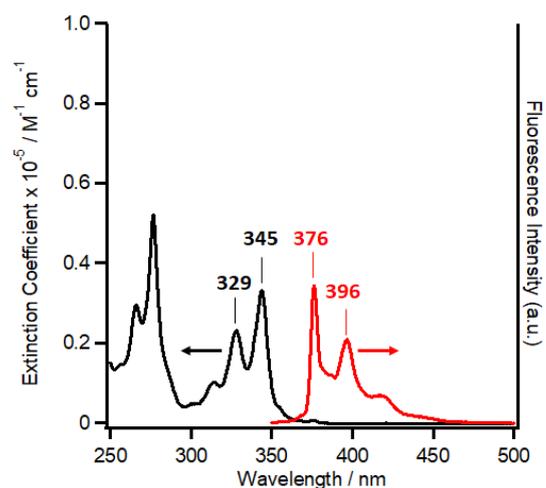


図 4-3-1-4. C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質の UV-vis スペクトル(black line, left axis)および蛍光スペクトル(red line, right axis). バッファー : 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 蛍光スペクトルの励起波長= 345 nm.

#### 4-3-2. アデニル酸キナーゼ構成要素と基質および阻害剤の結合様式

大腸菌由来アデニル酸キナーゼ(PDB: 4AKE<sup>5</sup>)は 214 残基の 1 本のポリペプチド鎖からなるリン酸転移酵素で、NMP ドメイン、LID ドメイン、Core の 3 つの構成要素から構成されている(図 4-3-2-1)。NMP ドメインは、30-67 番残基の部分で、NMP ドメインと Core の間にアデノシン一リン酸(AMP)結合サイトを有している。LID ドメインは、118-160 番残基の部分で、LID ドメインと Core の間にアデノシン三リン酸(ATP)結合サイトを有している。残りの 1-

29、68-117、161-214 残基部分が Core である<sup>6</sup>。さらに、LID ドメインは、NMP ドメインよりも柔軟性が高いことが知られている<sup>7</sup>。また、最初に LID ドメインに基質が結合して構造が変化し、その摂動を受けて NMP ドメインに基質が結合して構造変化を起こすことが知られている<sup>8</sup>。

今回基質として用いたアデノシン二リン酸(ADP、図 4-3-2-2a)は、両方のドメインに結合することができる(2:1 結合モデル)。一方、阻害剤である  $P^1, P^5$ -ジ (アデノシン-5') 五リン酸( $Ap_5A$ 、図 4-3-2-2b)は、2 つの ADP がリン酸基で架橋された構造をしており、同時に 2 つのドメインに結合する(1:1 結合モデル)。

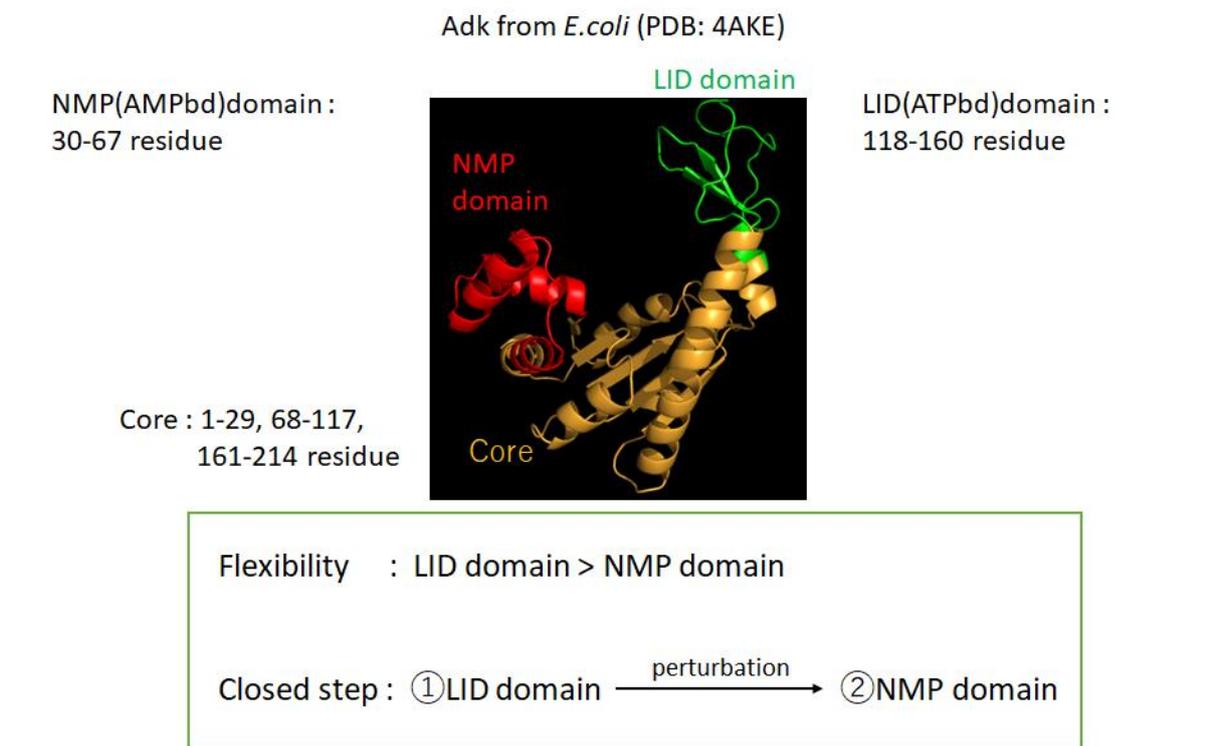


図 4-3-2-1. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ(PDB:4AKE<sup>5</sup>)の構成要素と 2 つのドメインの特性.

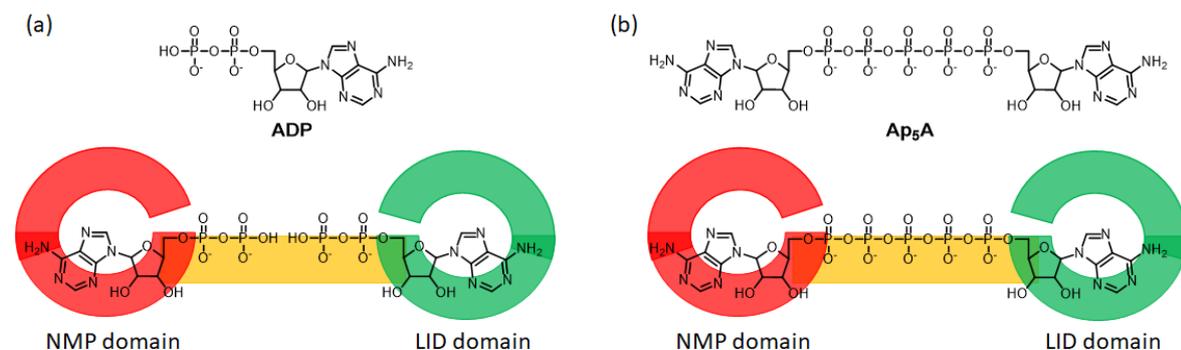


図 4-3-2-2. アデニル酸キナーゼの基質および阻害剤の結合様式. (a) ADP; (b)  $Ap_5A$ .

#### 4-3-3. 阻害剤を用いた異種分子修飾タンパク質の蛍光測定

アントラセン(非複素環)からピリジニウム(複素環)への電荷移動により、アントラセンの蛍光がクエンチングするという報告<sup>1</sup>に基づいて、タンパク質構造変化による異種合成分子の相互作用制御が可能であるのかを示すために、阻害剤である  $P^1, P^5$ -ジ (アデノシン-5') 五リン酸 ( $Ap_5A$ ) 存在下における C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質と C55phen-C55pyrene 修飾タンパク質のピレンモノマー蛍光クエンチングを検討した。希釈溶液条件下([異種合成分子修飾タンパク質(protein)] = 100 nM)、 $Ap_5A$  存在下においてリファレンスである C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質、C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質それぞれに対して、ピレンモノマー蛍光(376 nm)の減少が観測された(図 4-3-3-1a、図 4-3-3-2a)。蛍光強度は、 $[Ap_5A]/[[protein]]$  に対して 2 段階で減少しており、 $[Ap_5A]/[[protein]] = 1$  のところに変曲点が現れた(図 4-3-3-1b、図 4-3-3-2b)。得られた滴定曲線は、 $Ap_5A$  とタンパク質の 1:1 の結合がタンパク質の構造変化を引き起こし、ピレン環とフェナントロリン環のスタッキングを誘発することを示している。 $Ap_5A$  の高濃度でのわずかな蛍光強度の減少は、タンパク質表面のピレン環とアデニル環の弱い相互作用によって引き起こされるバックグラウンド消光に起因している<sup>9</sup>。さらに、リファレンスである C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質、C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質の  $Ap_5A$  低濃度領域の蛍光強度の減少は、正電荷を帯びた側鎖アミノ基(Lys、Arg)との相互作用によるクエンチングと考えられる<sup>10</sup>。Cys55 は NMP ドメインに属し、NMP ドメインと Core の間にアデノシン-リン酸(AMP)結合サイト(AMPbd)がある。Cys169 は LID ドメインに属し LID ドメインと Core の間にアデノシン三リン酸(ATP)結合サイト(ATPbd)がある。そして、AMPbd は ATPbd よりも結合定数が低いことが報告されている<sup>7</sup>。C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質では、 $Ap_5A$  とピレン環が相互作用することで、先に AMPbd に結合すると考えられるが、AMPbd は結合定数が低いため、滴定初期の蛍光強度の減衰はほとんど見られない。そのため、少し  $Ap_5A$  の量が増えてくると蛍光強度の減衰が始まるのでシグモイド型を示していると考えられる。一方、C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質では、 $Ap_5A$  とピレン環が相互作用することで、先に結合定数の高い ATPbd に結合すると考えられるため、シグモイド型を示さなかったと考えられる。

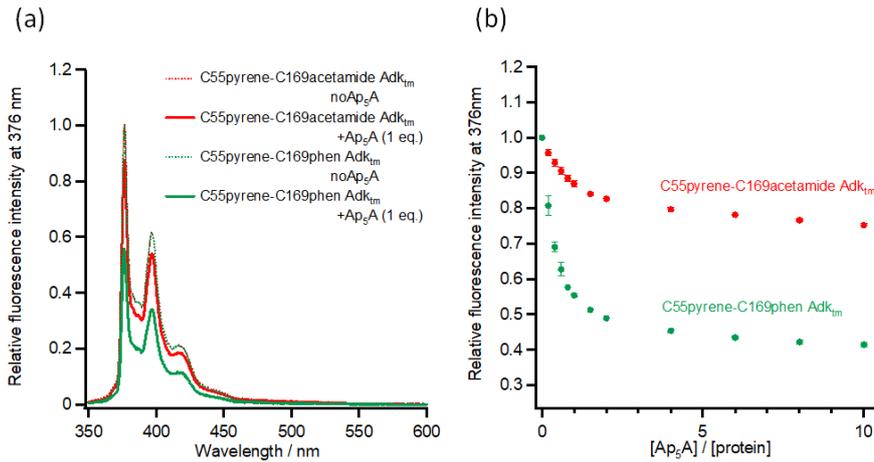


図 4-3-3-1. 阻害剤添加による C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質および C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化. (a) 波長に対する C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質および C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化; (···) C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質; (—) C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質+Ap<sub>5</sub>A (1 eq.); (···) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; (—) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質+Ap<sub>5</sub>A (1 eq.); (b) [Ap<sub>5</sub>A]/[protein]に対する蛍光スペクトル変化; **red circle**: C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質; **green circle**: C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; 条件: [protein] = 100 nM in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 励起波長 = 345 nm.

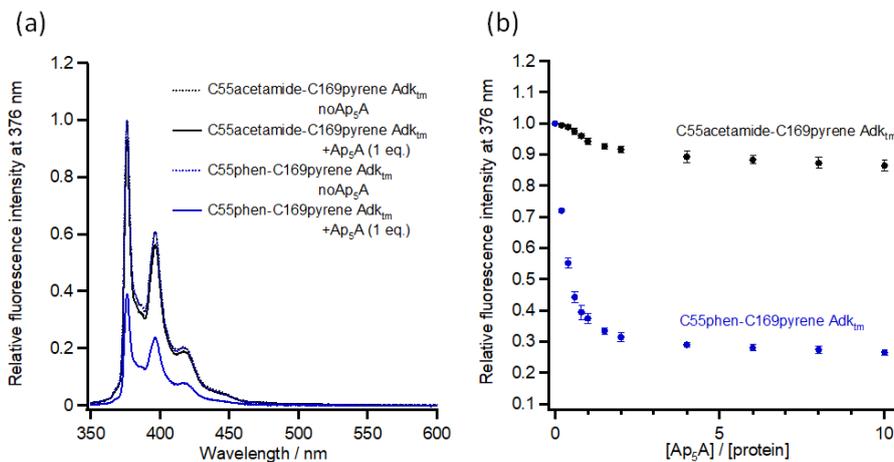


図 4-3-3-2. 阻害剤添加による C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化. (a) 波長に対する C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化; (···) C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質; (—) C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質+Ap<sub>5</sub>A (1 eq.); (···) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質; (—) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質+Ap<sub>5</sub>A (1 eq.); (b) [Ap<sub>5</sub>A]/[protein]に対する蛍光スペクトル変化; **black circle**: C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質; **blue circle**: C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質; 条件: [タンパク質] = 100 nM in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 励起波長 = 345 nm.

#### 4-3-4. 基質を用いた異種分子修飾タンパク質の蛍光測定

基質であるアデノシン二リン酸 (ADP) 存在下における C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質と C55phen-C55pyrene 修飾タンパク質のピレンモノマー蛍光クエンチングを検討した。希釈溶液条件下([異種合成分子修飾タンパク質] = 100 nM)、ADP 存在下においてリファレンスである C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質、C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質それぞれに対して、モノマー蛍光(376 nm) の減少が観測された(図 4-3-4)。基質結合に伴う構造変化により、ピレン **2** とフェナントロリン **3** が近づいてスタックし、タンパク質分子内のピレンモノマー蛍光クエンチングが観測されたと考えられる。ADP の高濃度でのわずかな蛍光強度の減少は、タンパク質表面のピレン環とアデニル環の弱い相互作用によって引き起こされるバックグラウンド消光に起因している<sup>9</sup>。

前述したように、アデニル酸キナーゼは、異なる基質結合サイトを持つ2つのドメイン(NMP ドメイン(AMP 結合ドメイン), LID ドメイン(ATP 結合ドメイン))があり、ADP は両方のドメインに結合することができる(図 4-3-2-1、図 4-3-2-2)。さらに、最初に LID ドメインに基質が結合して構造が変化し、その摂動を受けて、NMP ドメインに基質が結合して構造変化を起こすことが知られている<sup>7</sup>。このことから、蛍光スペクトルはシグモイド型の曲線となり、アロステリックな挙動が観測されると予想された。

しかしながら、実際の蛍光スペクトルは、シグモイド型の曲線とはならず、アロステリックな挙動が観測されなかった(図 4-3-4)。これは、ピレン **2** のリンカー部分が長く、片方のドメインが閉じた状態(ADP 低濃度領域)の時に、フェナントロリン **3** と接近してピレンのモノマー蛍光のクエンチングが起こるため、基質添加による蛍光スペクトルは、アロステリックな挙動を示さなかったと推測される。

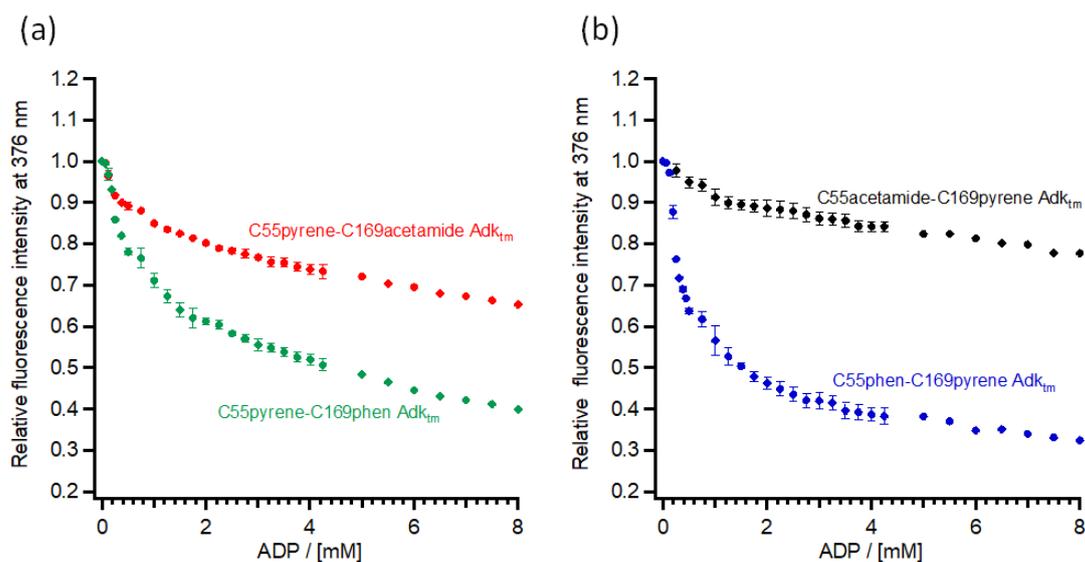


図 4-3-4. 基質添加による異種分子修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化. (a) 基質濃度に対する C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質および C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化; red circle: C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質; green circle: C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; (b) 基質濃度に対する C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化; black circle: C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質; blue circle: C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質; 条件: [protein] = 100 nM in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 励起波長 = 345 nm.

#### 4-3-5. 蛍光強度の消光効率とスタッキング構造の相関に関する考察

C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質と C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質を比べた時、蛍光強度の消光効率は C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の方が大きかった(図 4-3-5-1)。

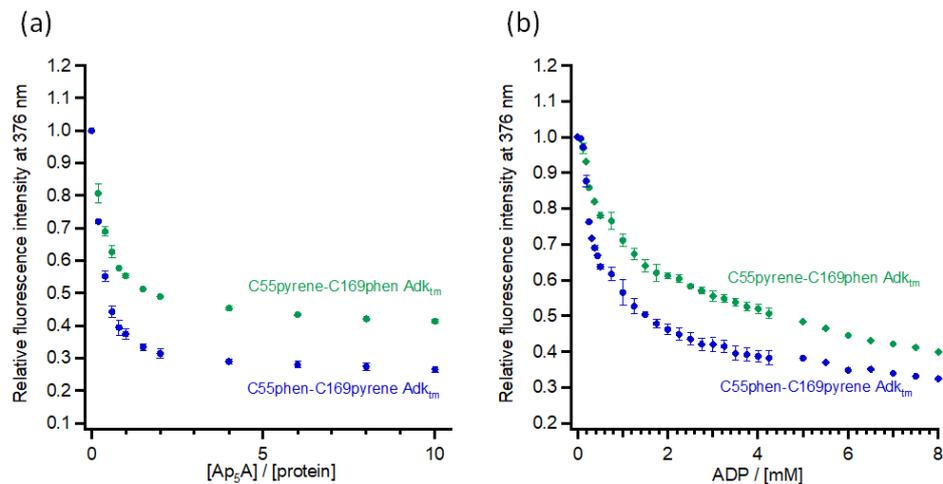


図 4-3-5-1. C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の蛍光スペクトル変化の比較. (a) Ap<sub>5</sub>A 存在下; (b) ADP 存在下; green circle: C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; blue circle: C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質.

条件: [protein] = 100 nM in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C); 励起波長 = 345 nm.

蛍光強度のクエンチング効率とスタッキング構造の相関関係を検討するために、C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質と C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の closed 構造における分子動力学シミュレーションを行った。

シミュレーションの構造は、C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質と C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の両方で、ピレン-フェナントロリン複合体を示した(図 4-3-5-2)。そして、Lys 側鎖がピレン環と面していた(Lys166 for C55pyrene-C169phen Adk、Lys57 for C55phen-C169pyrene Adk)。この構造的な特徴は、Cys55 と Cys169 にピレンを修飾した Adk<sub>tm</sub> の X 線結晶構造 (PDB: 3X2S<sup>11</sup>) で得られた Lys166 の側鎖とピレン環の CH- $\pi$ 相互作用の結果と類似している(図 4-3-5-3)。この CH- $\pi$ 相互作用は、タンパク質表面上のピ

レン-フェナントロリン複合体の安定化に寄与していると考えられる。

C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質の構造では、ピレンのリンカーのアミド基が Glu162 と Lys166 の間で水素結合ネットワークを形成し、フェナントロリンのアミド基は相互作用するアミノ酸残基が存在しなかった(図 4-3-5-4a)。それに対して、C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質の構造では、Lys166 の側鎖とフェナントロリンのアミドのカルボニルが相互作用を示していた(図 4-3-5-4b)。この相互作用が、フェナントロリン環の配向を固定することを手助けしていると考えられる。

C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質での Lys166 の貢献との比較として、C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質でのピレンのリンカーのアミド基と Lys166 の相互作用は、フレキシブルなプロピレンリンカーのため、重要でないと考えられる。

以上の結果より、蛍光強度の消光効率に影響を与える可能性のある要因の1つは、フェナントロリンの配向を固定するアミノ酸残基の存在ということが示唆された。C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質のフェナントロリン環の配向が固定されたことによって、ピレン環との接触面積が大きくなり、蛍光強度の消光効率が大きくなったと推測している。

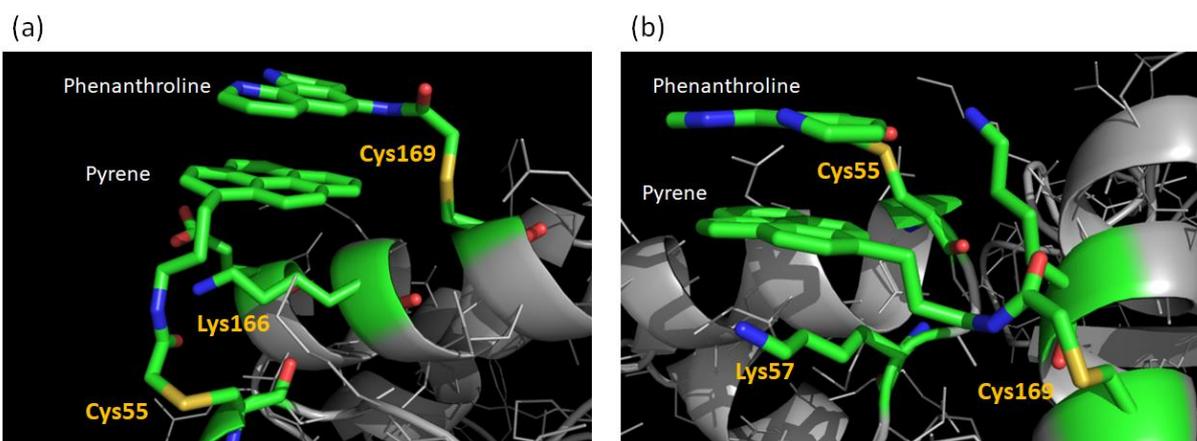


図 4-3-5-2. 分子動力学シミュレーション構造におけるピレン-フェナントロリン複合体の形成およびピレンと Lys 側鎖の CH- $\pi$ 相互作用. (a) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質; (b) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質. 分子動力学シミュレーションは YASARA structure ソフトウェア(Ver.15.3.8)<sup>12</sup>で行った. シミュレーション条件: 力場: YASARA2; 水溶液モデル: 0.9% NaCl<sub>aq</sub>.; 電荷の割り付け: pH = 7.5 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、Cys55/Cys169 にピレンを修飾した Adk<sub>tm</sub> の X 線結晶構造(PDB: 3X2S<sup>11</sup>)のピレン部分を、ソフトウェア上でピレン **2** とフェナントロリン **3** に置き換えたものを使用した。

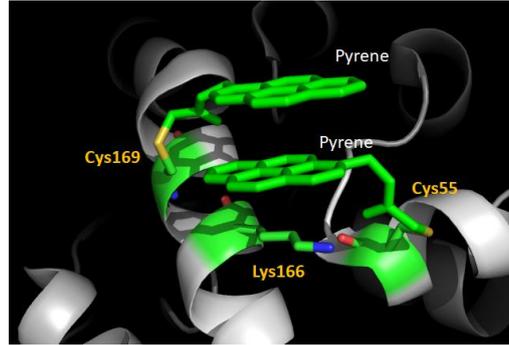


図 4-3-5-3. Cys55/Cys169 にピレンを修飾した Adk<sub>tm</sub> の X 線結晶構造(PDB: 3X2S<sup>11</sup>)におけるピレン-ピレン複合体の形成およびピレンと Lys 側鎖の CH- $\pi$ 相互作用.

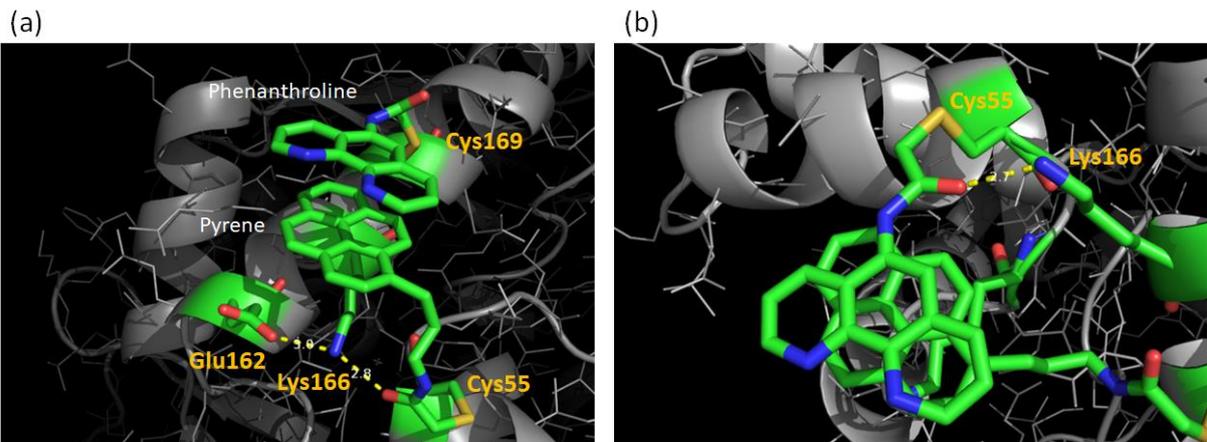


図 4-3-5-4. (a) C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質におけるピレンのリンカーのアミド基と Glu162 と Lys166 間の水素結合ネットワーク; (b) C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質における Lys166 とフェナントロリンのアミドカルボニル間の水素結合. 分子動力学シミュレーションは YASARA structure ソフトウェア(Ver.15.3.8)<sup>12</sup>で行った. シミュレーション条件: 力場: YASARA2; 水溶液モデル: 0.9% NaCl<sub>aq</sub>.; 電荷の割り付け: pH = 7.5 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、Cys55/Cys169 にピレンを修飾した Adk<sub>tm</sub> の X 線結晶構造(PDB: 3X2S<sup>11</sup>)のピレン部分を、ソフトウェア上でピレン **2** とフェナントロリン **3** に置き換えたものを使用した.

#### 4-4. まとめ

本章では、タンパク質の構造変化によるピレンモノマー蛍光クエンチングが可能であるのかを示すために、第3章で得られたピレン1つ修飾タンパク質にフェナントロリン **3** を逐次的に化学修飾した。そして、阻害剤 (Ap<sub>5</sub>A) および基質 (ADP) 添加によるピレンモノマー蛍光のスペクトル変化の比較を行った。その結果、リファレンス(C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質および C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質)に対して、C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質は、ピレンモノマー蛍光クエンチングが観測された。これは、Ap<sub>5</sub>A および ADP 結合に伴う構造変化により、ピレン **2** とフェナントロリン **3** が近づいてスタックし、タンパク質分子内でのピレンモノマー蛍光クエンチングが起こったと考えられる。さらに、分子動力学シミュレーションによって得られたピレンとフェナントロリンのスタッキングの構造は、ピレンと Lys 残基間の CH- $\pi$  相互作用、修飾分子のアミド基と周辺アミノ酸残基との相互作用によって安定化されていることが示唆された。よって、タンパク質の構造変化による異種合成分子の相互作用制御が達成された。

## 4-5. 実験項

### 4-5-1. 使用試薬および使用機器

#### 使用試薬

本研究で使用した試薬は、和光純薬工業、東京化成工業、シグマアルドリッチ、ナカライテスクから販売されているものを使用した。

#### 使用機器

- ・ SHIMADZU BIOTECH BioSpec-nano
- ・ 紫外可視吸収分光光度計 (Shimadzu UV-2550)
- ・ 分光蛍光光度計 (JASCO FP-8300)
- ・ FPLC (ÄKTA prime plus FPLC chromatogram system (GE Healthcare))
- ・ MALDI 専用飛行時間型質量分析計 (Bruker Autoflex II)
- ・ 円二色性分散計 (JASCO J-725)
- ・ ラピダス ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO AE-6530P)
- ・ パワーステーション 1000XP (ATTO AE-8750)

### 4-5-2. 大腸菌由来アデニル酸キナーゼ 3 変異体 (A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>) の発現と精製<sup>13</sup>

第2章と同じ方法で、Adk<sub>tm</sub>の発現と精製を行った。

### 4-5-3. フェナントロリン 3 によるピレン修飾タンパク質への逐次的化学修飾

2つのピレン修飾タンパク質(C55pyrene修飾タンパク質、C169pyrene修飾タンパク質)を2 mM エチレンジアミン4酢酸 (EDTA)、30 μM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (TCEP)を含む20 mM 炭酸アンモニウムバッファー (pH = 8.5 at 25 °C) に溶かし、DMSOに溶解させたフェナントロリン 3を加え、[ピレン修飾タンパク質]=2 μM、[フェナントロリン 3]=20 μM(10 eq.) の溶液13.5 mL(C55pyrene修飾タンパク質)と溶液4.5 mL (C169pyrene修飾タンパク質)をそれぞれファルコンチューブに作製した。そして、ファルコンチューブを遮光して、25 °Cで2 時間、軽く揺らしながら(50 rpm)インキュベートした。反応終了後、メンブレンフィルターに通し、アミコンで遠心濃縮した。その後、反応混合物を陰イオン交換カラム(column: Mono Q (CV = 1 mL), Flow rate: 0.5 mL / min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-320 mM, over 80 mL))で精製した(図4-5-3)。サンプル保存は、シリンジ操作でHitrap desalting カラム(5 mL、GE healthcare)によって超純水に置換した後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥して、-80 °Cで保管した。

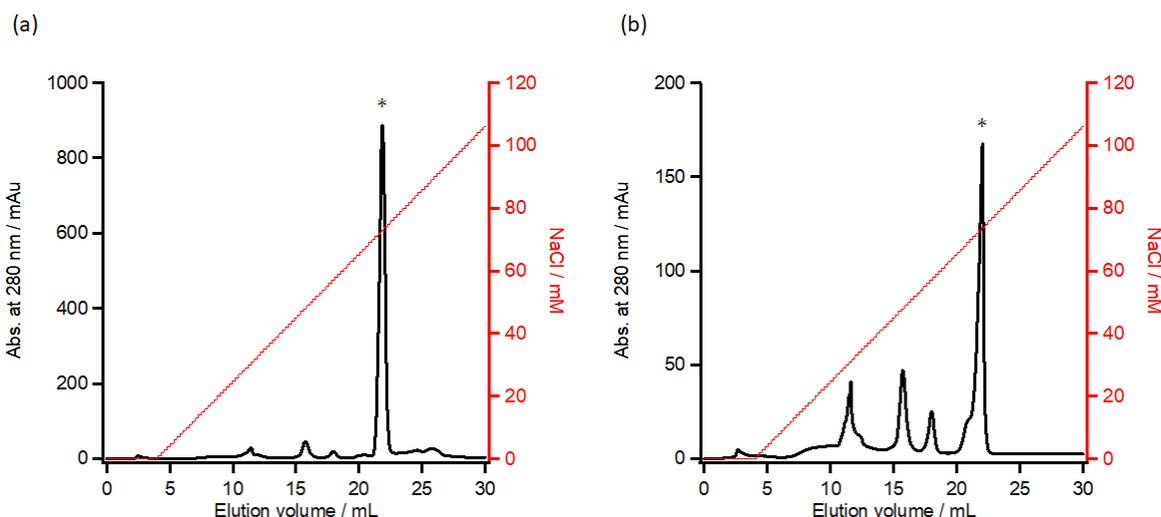


図4-5-3. ピレン修飾タンパク質とフェナントロリン3 (10 等量)の反応混合物の陰イオン交換カラムクロマトグラム. (a) C55pyrene-C169phen修飾タンパク質; (b) C55phen-C169修飾タンパク質. \*ピークをそれぞれ回収した. Column: Mono Q (1 mL, GE healthcare), Flow rate: 0.5 mL/min, Eluent: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 4 °C) with linear gradient of NaCl (0-320 mM, over 80 mL).

#### 4-5-4. ヨードアセトアミドによるピレン修飾タンパク質への逐次的化学修飾

2つのピレン修飾タンパク質(C55pyrene修飾タンパク質、C169pyrene修飾タンパク質)を20 mM HEPES (pH = 8.0 at 25 °C) に溶かし、DMSOに溶解させたヨードアセトアミドを加え、[ピレン修飾タンパク質] = 2 μM、[ヨードアセトアミド] = 40 μM (20 eq.) の溶液 11 mL(C55pyrene修飾タンパク質)と溶液 2.9 mL (C169pyrene修飾タンパク質)をそれぞれファルコンチューブに作製した。そして、ファルコンチューブを遮光して、25 °Cで4 時間、軽く揺らしながら(50 rpm)インキュベートした。反応終了後、メンブレンフィルターを通し、アミコンで遠心濃縮した。その後、シリンジ操作でHitrap desalting カラム(5 mL、GE healthcare)によって過剰のヨードアセトアミドを取り除くとともに、超純水に置換した。その後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥して、-80 °Cで保管した。

#### 4-5-5. 阻害剤 (Ap<sub>5</sub>A) 添加による蛍光スペクトル測定

Condition: [protein] = 100 nM, [Ap<sub>5</sub>A] = 0-1 μM, Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), Ex: 345 nm, Ex band width: 2.5 nm, Em band width: 2.5 nm, Response: 0.1 sec, sensitivity: High, Data: 0.2 nm, Scan speed: 200 nm/min, cumulative number: 3.

#### 4-5-6. 基質 (ADP) 添加による蛍光スペクトル測定

Condition: [protein] = 100 nM, [ADP] = 0-8 mM, Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), Ex: 345 nm, Ex band width: 2.5 nm, Em band width: 2.5 nm, Response: 0.1 sec, sensitivity: High, Data: 0.2 nm, Scan speed: 200 nm/min, cumulative number: 3.

#### 4-5-7. 分子動力学シミュレーション

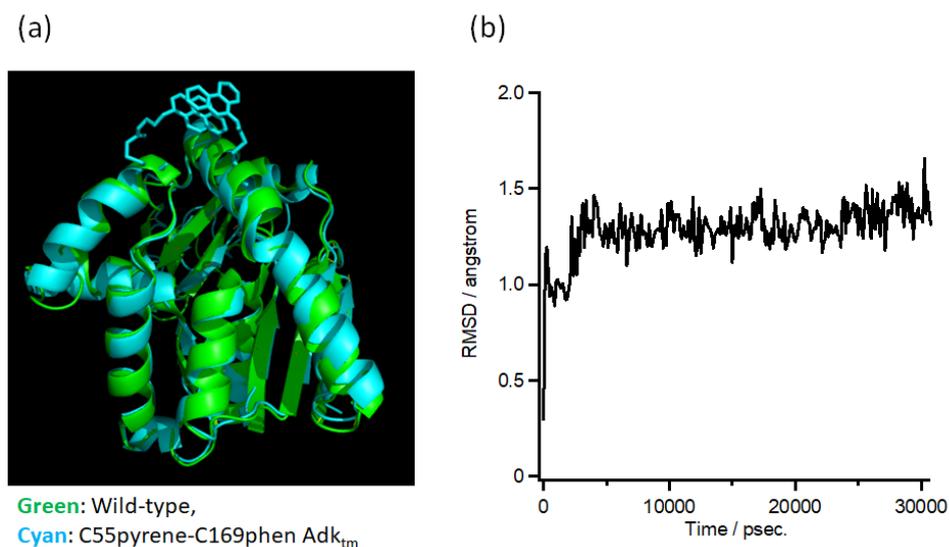


図 4-5-7-1. C55pyrene-C169phen Adk<sub>tm</sub> の最終構造(cyan)と wild-type Adk の X 線結晶構造 (PDB: 1AKE<sup>14</sup>, green)の重ね合わせた図. (a) 全体構造(C<sub>α</sub>-RMSD = 0.892 Å); (b) 分子動力学シミュレーション中の C<sub>α</sub>-RMSDs の時間変化. 分子動力学シミュレーションは YASARA structure ソフトウェア (Ver.15.3.8)<sup>12</sup> で行った. シミュレーション条件: 力場: YASARA2; 水溶液モデル: 0.9% NaCl(aq.); 電荷の割り付け: pH = 7.5 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、Cys55/Cys169 にピレンを修飾した Adk<sub>tm</sub> の X 線結晶構造 (PDB: 3X2S<sup>11</sup>)のピレン部分を、ソフトウェア上でピレン **2** とフェナントロリン **3** に置き換えたものを使用した.

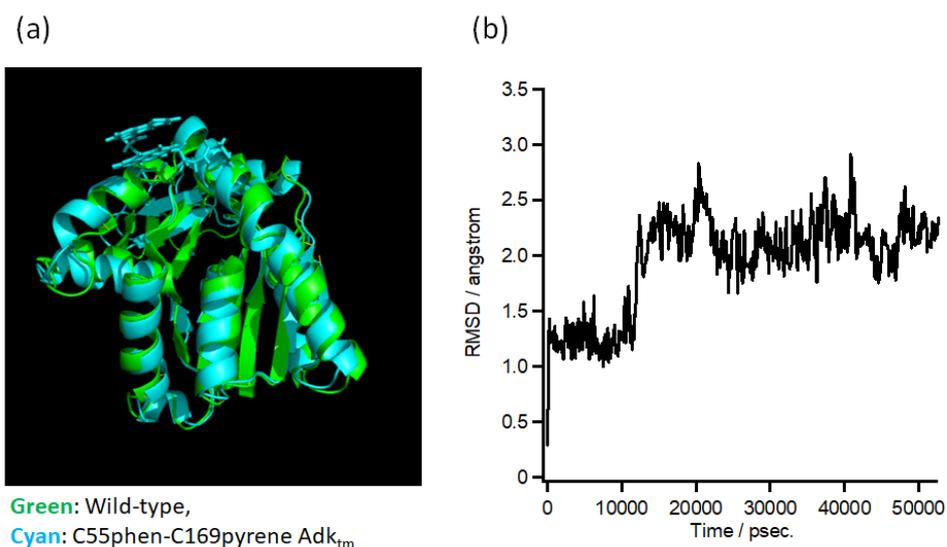


図 4-5-7-2. C55phen-C169pyrene Adk<sub>tm</sub> の最終構造(cyan)と wild-type Adk の X 線結晶構造 (PDB: 1AKE<sup>14</sup>, green)の重ね合わせた図. (a) 全体構造( $C_{\alpha}$ -RMSD = 0.861 Å); (b) 分子動力学シミュレーション中の  $C_{\alpha}$ -RMSDs の時間変化. 分子動力学シミュレーションは YASARA structure ソフトウェア (Ver.15.3.8)<sup>12</sup> で行った. シミュレーション条件: 力場: YASARA2; 水溶液モデル: 0.9% NaCl<sub>aq</sub>.; 電荷の割り付け: pH = 7.5 at 298.15 K. 分子動力学シミュレーションの初期構造は、Cys55/Cys169 にピレンを修飾した Adk<sub>tm</sub> の X 線結晶構造 (PDB: 3X2S<sup>11</sup>)のピレン部分を、ソフトウェア上でピレン **2** とフェナントロリン **3** に置き換えたものを使用した.

## 参考文献

1. Blackburn, G. M.; Lockwood, G.; Solan, V., Intramolecular fluorescence quenching of anthracene by heterocyclic ligands. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1976**, 1452–1456.
2. Kunst, A.; Draeger, B.; Ziegenhorn, J., UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase In *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim, Germany, Verlag Chemie **1984**, 163–172.
3. Ueno, A.; Suzuki, I.; Osa, T., Association dimers, excimers, and inclusion complexes of pyrene-appended  $\gamma$ -cyclodextrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6391–6397.
4. Sinev, M.; Landsmann, P.; Sineva, E.; Ittah, V.; Haas, E., Design consideration and probes for fluorescence resonance energy transfer studies. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 352–362.
5. Müller, C. W.; Schlauderer, G. J.; Reinstein, J.; Schulz, G. E., Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure* **1996**, *4*, 147–156.
6. Shapiro, Y. E.; Kahana, E.; Meirovitch, E., Domain mobility in proteins from NMR/SRLS. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12050–12060.
7. Formoso, E.; Limongelli, V.; Parrinello, M., Energetics and structural characterization of the large-scale functional motion of adenylate kinase. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8425(1)–8425(8).
8. Ådén, J.; Wolf-Watz, M., NMR identification of transient complexes critical to adenylate kinase catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14003–14012.
9. Xu, Z.; Singh, N. J.; Lim, J.; Pan, J.; Kim, H. N.; Park, S.; Kim, K. S.; Yoon, J., Unique sandwich stacking of pyrene-adenine-pyrene for selective and ratiometric fluorescent sensing of ATP at physiological pH. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15528–15533.
10. Weltman, J. K.; Szaro, R.P.; Frackelton, A. R., Jr.; Dowben, R. M.; Bunting, J. R.; Cathou, B.E., N-(3-pyrene)maleimide: a long lifetime fluorescent sulfhydryl reagent. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3173–3177.
11. Fujii, A.; Sekiguchi, Y.; Matsumura, H.; Inoue, T.; Chung, W. S.; Hirota, S.; Matsuo, T., Excimer emission properties on pyrene-labeled protein surface: correlation between emission spectra, ring stacking modes, and flexibilities of pyrene probes. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 537–548.
12. Krieger, E.; Koraimann, G.; Vriend, G., Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* **2002**, *47*, 393–402.
13. Fujii, A.; Hirota, S.; Matsuo, T., Reversible switching of fluorophore property based on intrinsic conformational transition of adenylate kinase during its catalytic cycle. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1218–1225.
14. Müller, C. W.; Schulz, G. E., Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap<sub>5</sub>A refined at 1.9 Å resolution - a model for a catalytic transition-state. *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 159–177.

## 第5章：結論と展望

第2章では、タンパク質の構造変化による触媒反応の反応性制御が可能であることを示すために、ヨードアセトアミド基を有するコバルト salen 錯体 **1** をアデニル酸キナーゼ 3 変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の2つのシステイン残基に化学修飾した。実際に、得られた錯体修飾アデニル酸キナーゼ (Co-salen Adk<sub>tm</sub>)を触媒として、スチレンオキシドの開環反応を評価した結果、錯体同士が離れている open 構造 (TON = 14) に比べて、錯体同士が近づいている closed 構造 (TON = 17) の方が、1.2 倍反応性が向上した。この結果は、closed 構造になった時に、錯体同士が近づき、協奏的に働いたためであると考えられる。よって、タンパク質の構造変化による同種金属錯体の相互作用制御がわずかながら達成された。今後、錯体分子の修飾位置をファインチューニングすることで、さらなる反応性制御が達成できると考えられる。

第3章では、システイン残基の化学修飾効率に対するシステイン残基周辺の局所環境の効果を検証するために、限られた量(0.5 eq.)のヨードアセトアミド基を有するピレン**2**をアデニル酸キナーゼ3変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)の2つのシステイン残基に化学修飾し、修飾タンパク質の生成分布を、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで検討した。両方のシステイン残基はタンパク質表面に位置しているにもかかわらず、Cys55チオールの反応性は、Cys169チオールよりも高く、pH 9.0において約6倍に達した。Cys55およびCys169には隣接する酸性アミノ酸(Asp54/Glu170)が存在し、これらの残基との相互作用は、システインチオールの酸性度に影響を与えうる。また、「システイン残基周辺の構造柔軟性」は考慮すべきファクターである。次に、2つのシステインチオールの反応性の差を決定しているのは、隣接する酸性アミノ酸の存在であると考え、アデニル酸キナーゼ4変異体(K50A/A55C/C77S/V169C; Adk<sub>qm</sub>)を設計した。設計のコンセプトとしてK50Aの変異を加え、Lys50とAsp54の相互作用を除去することで、Cys55/169の隣の酸性アミノ酸の条件を同じにした。限られた量(0.5 eq.)のピレン**2**をAdk<sub>qm</sub>の2つのシステイン残基に化学修飾した。そして、トリプシン消化でペプチド断片にした後、ピレン特有の341 nmの吸収波長でHPLC分析した結果、Cys55修飾タンパク質が主生成物であることが示された。さらに、トリプシン消化の結果もCys55修飾タンパク質のみであることを示していた。Lys50Alaの変異を加えたことでLys50とAsp54の相互作用がなくなり、Cys55が含まれている $\alpha$ -ヘリックスの柔軟性が増加した。その構造的な摂動がシステイン残基周辺の柔軟性にも影響し、Cys55への修飾選択性が98%(HPLC分析の面積比)になった。これらの結果から、「システイン残基周辺の構造柔軟性」が「隣の酸性アミノ酸との相互作用(Asp54とGlu170)」よりも、2つのCysの反応性の差を

決定している大きなファクターであることが明らかとなった。

第4章では、タンパク質の構造変化によるピレンモノマー蛍光クエンチングが可能であるのかを示すために、第3章で得られたピレン1つ修飾タンパク質にフェナントロリン**3**を化学修飾した。そして、阻害剤 (Ap<sub>5</sub>A) および基質 (ADP) 添加によるピレンモノマー蛍光のスペクトル変化の比較を行った。その結果、リファレンス(C55pyrene-C169acetamide 修飾タンパク質および C55acetamide-C169pyrene 修飾タンパク質)に対して、C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質は、ピレンモノマー蛍光クエンチングが観測された。これは、Ap<sub>5</sub>A および ADP 結合に伴う構造変化により、ピレン**2**とフェナントロリン**3**が近づいてスタックし、タンパク質分子内でのピレンモノマー蛍光クエンチングが起こったと考えられる。よって、タンパク質の構造変化による異種合成分子の相互作用制御が達成された。

本研究では、異種分子の相互作用制御の観点から、分子動力学シミュレーションによって得られたピレンとフェナントロリンのスタッキングの構造は、ピレンと Lys 残基間の CH- $\pi$ 相互作用、修飾分子のアミド基と周辺アミノ酸残基との相互作用によって安定化されていることが示唆された。C55pyrene-C169phen 修飾タンパク質および C55phen-C169pyrene 修飾タンパク質のスタッキング構造と蛍光クエンチング効率は、同じ化合物が化学修飾されていても同じではなかった。このことは、位置選択的化学修飾法の開発の重要性を示している。本研究の成果は、アデニル酸キナーゼのような構造変化を示すタンパク質に異種分子を逐次的に化学修飾し、生体分子機能をトリガーとした異種修飾分子の機能スイッチングの構築(図 5-1)に貢献できると考えられる。応用例として、高感度なプローブ分子の開発が期待される。特にポルフィリンなどの $\pi$ 系化合物の機能スイッチングを行う際、事前に分子動力学シミュレーションなどで構造を予測し、修飾分子近傍のアミノ酸残基の環境を把握することで、CH- $\pi$ 相互作用や $\pi$ - $\pi$ 相互作用を示すアミノ酸残基への変異が可能となり、より良い機能発現が実現できると考えられる。

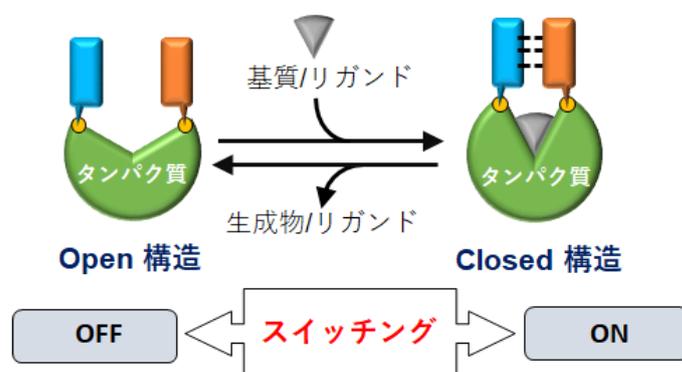


図 5-1. 生体分子機能をトリガーとした異種修飾分子の機能スイッチングの模式図.

さらに、システインチオール反応性の観点から、コンジュゲーションサイト周辺の局所的な構造柔軟性が、コンジュゲーションサイトの反応性を制御するための重要なファクターであることを示した。コンジュゲーションサイト周辺の局所的な構造柔軟性の摂動は、タンパク質表面に様々な合成分子を位置選択的に化学修飾するための有用な戦略となり、本研究の成果は、抗体-薬物複合体の構築(図 5-2)に貢献できると考えられる。抗体は、Y字型のタンパク質で、分子内に4つのジスルフィド結合を有している。抗体への化学修飾戦略として、ジスルフィド結合の還元や遺伝子操作によるCys残基の導入が行われている。そして、異成分の混ざりものが多いことや、過剰の化学修飾による凝集などが問題点である。そこで、システインチオール反応性を制御することで、単一成分が得られ、問題解決につながると考えられる。コンジュゲーションサイトとして、タンパク質表面の構造柔軟性の高い $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートの末端あるいは、ヒンジループ上にCys残基を導入することで、位置選択的に薬物(Drug)を導入できると考えられる。

近年、抗体にポルフィリンなどの光増感剤(Photosensitizer)を化学修飾し、光線力学療法のための抗体医薬品が開発されてきている。そこで、上記のコンジュゲーションサイトに加えて、 $\pi$ -Clamp(Xxx-Cys-Pro-Xxx、Xxx = Phe、Trp、Tyr)のような配列を加えることで、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用により、ポルフィリンなどの $\pi$ 系化合物への反応性を向上させられると思われる。そこで、光増感剤と蛍光プローブを逐次的に化学修飾して、薬の位置を確認しながら治療ができる抗体医薬の開発にも貢献できると考えられる。

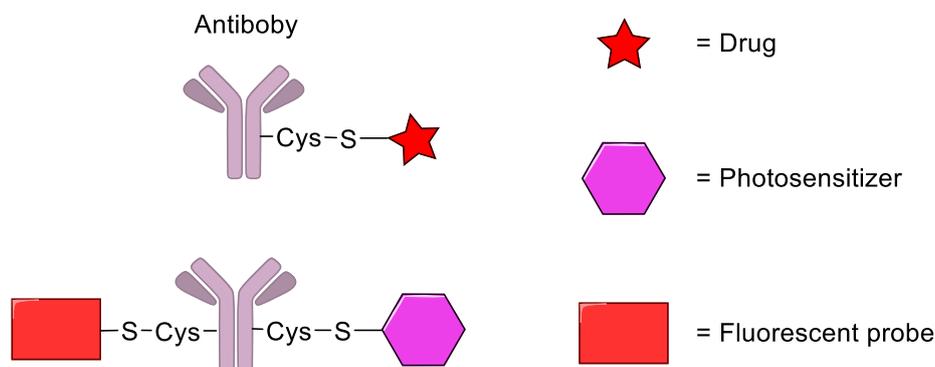


図 5-2. 抗体-薬物複合体の模式図.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、研究に専念できる環境と多くの議論の機会を与えていただきました廣田俊教授に、深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、生化学系の実験および錯体合成の実験についてのアドバイスやディスカッションだけでなく、日々の研究生活すべてにおいて、適切な指導をしていただきました松尾貴史准教授に深く感謝申し上げます。

本研究に対し、スーパーバイザーとして数々の御助言を賜りました、本田崇宏教授、垣内喜代三教授に厚く御礼申し上げます。

報告会において、本研究に対する貴重な助言をいただきました長尾聡助教授、山中優助教授に厚く御礼申し上げます。

研究室での生活を支えてくださいました田代雅子秘書に深く感謝いたします。

質量分析測定を行っていただきました西川嘉子技術職員に厚く御礼申し上げます。

日々の研究において、様々なアドバイスや手助けをしていただいた先輩、同期、後輩の皆さまに御礼申し上げます。

最後に、研究生活を支え続けてくれた家族に感謝します。

三宅 輝幸

## 発表論文

本研究の基礎となる公表論文は次のとおりである。

1. Regioselective chemical modification of cysteine residues on protein surfaces focusing on local environment around the conjugation site.  
Teruyuki Miyake, Ryosei Tamaki, Moeko Asanuma, Yoji Fukada, Shun Hirota and Takashi Matsuo.  
*Bioconjugate Chem.* in press. (doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00869)

参考論文を以下に示す。

1. Recent developments on creation of artificial metalloenzymes.  
Takashi Matsuo, Teruyuki Miyake and Shun Hirota.  
*Tetrahedron Lett.* **2019**, 60, 151226(1)–151226(8).
2. Effect of substituents on TiO<sub>2</sub> photocatalytic oxidation of *trans*-stilbenes.  
Teruyuki Miyake, Yuichiro Hashimoto, Seihou Jinnai, Ryusei Oketani and Suguru Higashida.  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, 92, 55–60.
3. Formation of lactones by decarboxylation of aromatic diacids via TiO<sub>2</sub>-mediated photocatalytic reactions in acetonitrile solution.  
Ryusei Oketani, Teruyuki Miyake, Seihou Jinnai, Takuya Fukui, Hidetaka Tsujimoto, Michio Matsumura and Suguru Higashida.  
*Chem. Lett.* **2016**, 45, 801–803.