



2024年12月13日

報道関係者各位

慶應義塾大学
東京科学大学

市販試薬を活用。タンパク質のN末端に 機能性分子を結合する簡便な手法を開発 ーバイオ医薬品や生体材料開発への応用に期待ー

慶應義塾大学薬学部の花屋賢悟講師、田口和明准教授、東京科学大学 理学院 化学系の河野正規教授、和田雄貴助教による共同研究グループは、市販のマレイミド誘導体を用いて、タンパク質のN末端に蛍光分子や医薬分子などの機能性人工分子を結合させる、簡便な化学修飾法を開発しました。

タンパク質の化学修飾は、特定のアミノ酸残基に人工分子を結合させることで、タンパク質に新たな機能を付加する技術です。この技術は、タンパク質の機能解明を目的とした生命科学研究だけでなく、創薬など幅広い分野で活用されています。特にマレイミドは、アミノ酸の一種であるシステインと特異的に反応する化合物として知られており、さまざまな機能性分子を結合させた誘導体が市販され、タンパク質の化学修飾において最も広く利用されている試薬の一つです。しかし、マレイミドと反応可能なシステインを持たないタンパク質は多く存在しています。このため、マレイミド誘導体を用いた化学修飾が可能なタンパク質は限られるという課題がありました。

本研究では、タンパク質にマレイミド誘導体とともに2-PCA、銅(II)塩を加えることでN末端アミノ酸（注1）を化学修飾する新しい新たな手法を開発し、この課題を克服しました。この手法は、特定のアミノ酸残基や配列を必要とせず、幅広いタンパク質に適用可能です。さらに、N末端で架橋したタンパク質-タンパク質複合体や抗体-薬物複合体（ADC：Antibody-Drug Conjugates）（注2）の作製にも成功し、マレイミド誘導体を用いた化学修飾法の適用範囲を大幅に拡大させました。

この成果は、タンパク質をベースにしたバイオ医薬品（注3）や生体材料開発の新たな可能性を切り開くものであり、さまざまな科学分野への貢献が期待されます。本研究成果は、2024年11月27日に国際学術誌「Angewandte Chemie International Edition」に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・市販のマレイミド誘導体を用いて、ペプチドやタンパク質のN末端アミノ酸に多様な機能性分子を結合させる新しい化学修飾法を開発した。
- ・タンパク質と市販の試薬をpH 6の水溶液中で混合するだけで、蛍光分子や医薬品分子を結合した新たな機能性タンパク質やペプチドを作製できる、非常に簡便な方法である。
- ・開発した手法を用いて、N末端で架橋されたタンパク質複合体や、抗体-薬物複合体（ADC）の作製に成功し、その応用可能性を実証した。

2. 研究背景

タンパク質の化学修飾は、タンパク質と他の生体高分子や機能性人工分子を架橋することで、天然には存在しない新たな機能を持つタンパク質の創製を可能にする重要な技術です。この技術は、生命

科学研究だけでなく、タンパク質を基盤としたバイオ医薬品や、人工臓器やインプラントなど、ヒトへの移植を目的とした生体材料の開発など幅広い分野で応用されています。均一な構造や性質を示す修飾タンパク質を得るためには、特定の amino 酸残基を選択的に化学修飾する方法が必要です。

マレイミドは amino 酸の一種であるシステインと特異的に反応することが知られており、さまざまな機能性分子が結合したマレイミド誘導体が市販されています。これらを用いた化学修飾は操作が簡便で、現在では標準的な方法として広く用いられています (図 1 上)。しかし、多くのタンパク質はマレイミド誘導体との反応に必要なシステイン残基を持たないため、適用可能なタンパク質が限られるという課題がありました。

一方、N 末端 amino 酸はすべてのタンパク質に共通して存在しているため、化学修飾の反応部位として非常に有望です。そのため、市販のマレイミド誘導体を用いて N 末端 amino 酸を修飾する簡便な代替手法の開発は、マレイミド誘導体の適用範囲を大幅に拡大すると期待されます。

3. 研究内容・成果

本研究グループは以前、N 末端 amino 酸と 2-ピリジンカルボキシアルデヒド (2-PCA) によって生成されるイミンが、銅(II)塩と中性水溶液中で安定な金属錯体を形成する特性を利用し、アルドール反応による N 末端 amino 酸の化学修飾法を報告しました¹。今回の研究では、この反応過程で生成されると考えられる銅(II)-エノラート中間体が 1,3-双極子として機能する点に着目しました (図 1 下)。

具体的には、さまざまな N 末端 amino 酸を有するタンパク質にマレイミド誘導体、2-PCA、銅(II)塩を加え、pH 6 の水溶液中で反応させることで、N 末端 amino 酸上で 1,3-双極子付加環化反応 (注 4) が進行し、効率的かつ選択的に N 末端を修飾できることを発見しました。この方法は、特定の amino 酸残基や特殊な amino 酸配列を必要とせず、広範囲のペプチドやタンパク質の修飾に適用可能な点が特長です。

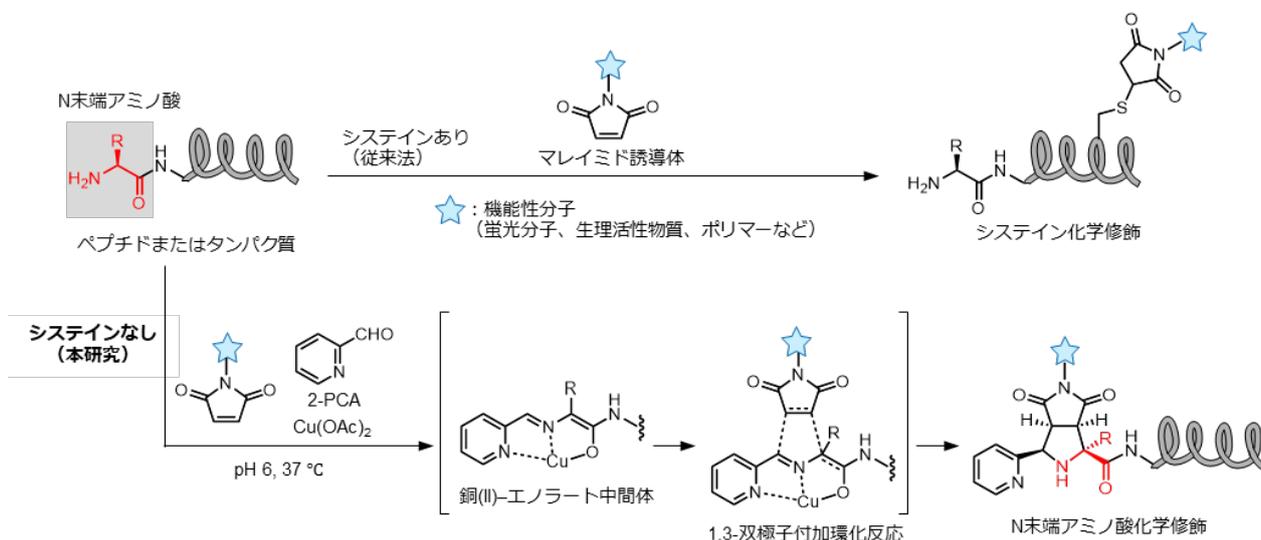


図 1. マレイミド誘導体を用いたタンパク質の N 末端 amino 酸の化学修飾
システインがある場合には、マレイミド誘導体はシステインと反応する (上)。システインがない場合には、マレイミド誘導体とともに 2-PCA、銅(II)塩を加えると N 末端 amino 酸を化学修飾できる (下)。この反応は銅(II)-エノラート中間体とマレイミド誘導体の 1,3-双極子付加環化反応を経由していると考えられる。

さらに、アジド基を有する 2-PCA (アジド-2-PCA) とマレイミド誘導体でタンパク質を化学修飾し、続いてアジド基を活用する既存の反応を用いて別の機能性分子を導入することで、2 種類の機能

性人工分子を N 末端アミノ酸上に導入したタンパク質を調製することにも成功しました (図 2)。

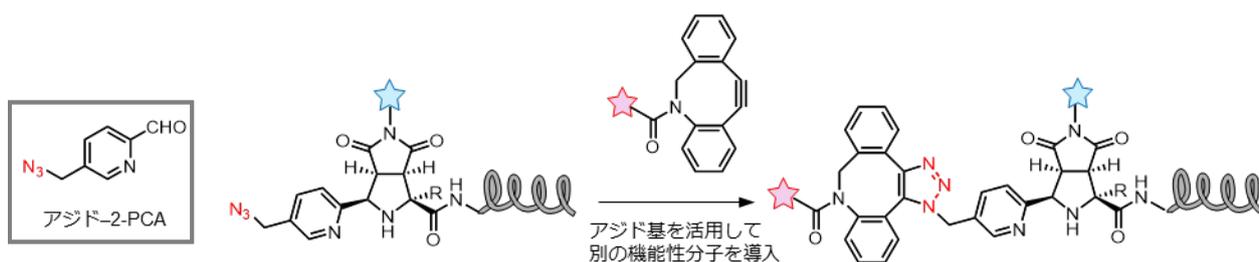


図 2.アジド-2-PCA を活用した、2 種類の機能性人工分子をタンパク質に導入する方法

この技術を活用し、N 末端で架橋されたタンパク質複合体や、抗体であるトラスツズマブに蛍光分子 Cy5 と生理活性物質モノメチルアウリスタチン E (MMAE) を搭載した抗体-薬物複合体、MMAE-Cy5-トラスツズマブの調製を実現しました (図 3A)。がん細胞を移植したマウスに MMAE-Cy5-トラスツズマブを注射すると、がん細胞に集積して可視化することができました (図 3B)。

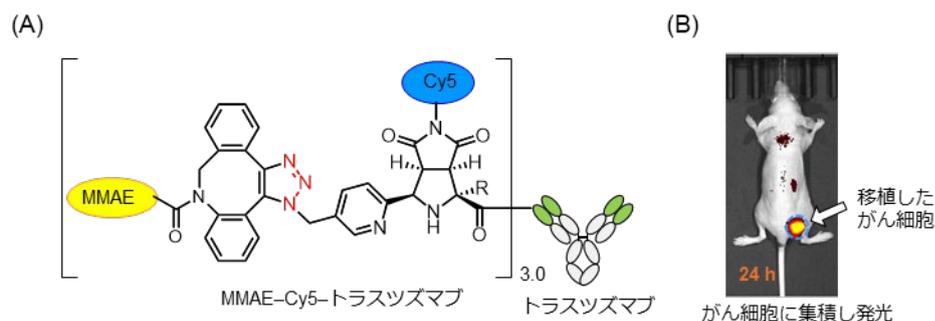


図 3. (A) 抗体トラスツズマブに蛍光分子 Cy5 と生理活性物質モノメチルアウリスタチン E (MMAE) を結合させた抗体-薬物複合体 MMAE-Cy5-トラスツズマブ、(B) MMAE-Cy5-トラスツズマブを注射して移植したがん細胞を蛍光観察により可視化したマウス

4. 今後の展開

これまで、さまざまなアミノ酸残基を標的とするタンパク質の化学修飾法が報告されてきましたが、必要な試薬をオンデマンドで合成する必要がある場合が多く、その手間が広範な研究者による応用を妨げていました。一方、本研究では、全て市販されていて容易に入手可能である、銅塩と 2-PCA に加え、多様なマレイミド誘導体を活用することで、簡便で再現性の高い修飾法を実現しました。この方法は特別な試薬合成を必要としないため、幅広い科学者が手軽に実施できると期待されます。

本研究で開発した実用的な化学修飾法は、タンパク質の化学修飾を基盤とした基礎研究や応用研究を加速させ、医薬品や生体材料の開発など、多くの分野における技術革新に大きく貢献することが期待されます。

<参考文献>

1. Kengo Hanaya *et al.* Chem. Eur. J. 28, e202201677 (2022).

<原論文情報>

- ・タイトル: One-Step Maleimide-Based Dual Functionalization of Protein N-Termini
- ・著者: Kengo Hanaya,* Kazuaki Taguchi, Yuki Wada, Masaki Kawano
- ・雑誌: Angewandte Chemie International Edition
- ・DOI: 10.1002/anie.202417134

<用語説明>

注1 N末端アミノ酸: タンパク質やペプチド鎖を構成するアミノ酸鎖の末端で、遊離のアミノ基(ペプチド結合していないアミノ基)のある側にあるアミノ酸残基。遊離のカルボキシ基のある側のアミノ酸残基をC末端アミノ酸と呼ぶ。

注2 抗体-薬物複合体(ADC): 抗体に抗がん剤などの薬物を結合させた医薬品。がん細胞と特異的に結合する抗体の性質を利用して、抗がん剤をがん細胞に送達するよう設計されている。

注3 バイオ医薬品: 生体分子を遺伝子組み換えや細胞培養技術などのバイオテクノロジーを応用して製造された、タンパク質など生体分子からなる医薬品。

注4 1,3-双極子付加環化反応: 隣接する三原子の間で4個の電子を共有する化学種である1,3-双極子と不飽和結合を有する分子の間の付加反応で、生成物が環式化合物となる反応。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 薬学部 専任講師 花屋 賢悟 (はなや けんご)

TEL : 03-5400-2695 FAX : 03-5400-2695 E-mail : hanaya-kn@keio.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室(友成、増田) TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>

東京科学大学総務企画部広報課 TEL : 03-5734-2975 FAX : 03-5734-3661

E-mail : media@ml.tmd.ac.jp <https://www.isct.ac.jp/ja>