

Title	タンパク質の人工翻訳後修飾法の開発
Sub Title	Exploration of protein bioconjugation with boronic acids
Author	花屋, 賢悟(Hanaya, Kengo)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>タンパク質の翻訳後修飾のように、タンパク質上の特定のアミノ酸残基を人工的に化学修飾すれば、その機能、細胞内局在、分解などを制御することができる。申請者は以前、ホウ素原子を含む分子であるボロン酸と、遷移金属イオンを用いて、タンパク質中のシステインまたはピログルタミン酸のみを選択的に化学修飾する手法を確立した。本研究では、不対電子を有する分子種が関与するラジカル反応に注目し、上記とは異なるアミノ酸の化学修飾法の開発に取り組んだ。活性酸素ラジカルがタンパク質やDNAの特定の部位と反応するように、ラジカル分子の構造を工夫すれば生理条件下、特定のアミノ酸残基と反応すると期待した。銅イオンを作用させるとラジカル分子が生成するようボロン酸を設計した。このボロン酸を、銅イオン存在下、種々のペプチドと反応し、その反応液をMALDI-TOF MSやHPLCで分析、評価した。種々反応条件を検討したところ、pH 10.0のホウ緩衝液中、75 °Cで反応させると、ペプチドが一部化学修飾された。銅イオンの代わりに他の遷移金属イオンを用いた場合にも化学修飾されたことから、ラジカル反応以外の反応機構も示唆された。実験に用いた複数種のペプチドのアミノ酸配列の比較から、チロシンが化学修飾されたと結論した。この反応条件下、アジド基を導入したボロン酸を用いて化学修飾し、さらにアジドとアルキンの特異的な反応(クリックケミストリー)を利用して、ビオチンを導入したペプチドの創製に成功した。ただし、pH 10.0、75 °Cという反応条件はタンパク質を変性させる可能性が高いため、さらなるボロン酸の構造変換および反応条件の検討が必要である。</p> <p>Natural post-translational modifications of proteins grant structural diversities and varies physical and biological properties. Meanwhile, chemists have developed artificial post-translational modification, called "bioconjugation", which can build novel functionalized macromolecules by incorporation of small molecules such as drugs, fluorophores, and tag molecules. Boronic acids [R-B(OH)₂] have been applied to bioconjugations due to hydrophilic nature and good stability under physiological conditions. We have already reported cysteine- or pyroglutamate-selective chemical modification with boronic acid and nickel ion.</p> <p>Radical species such as reactive oxygen species (ROS) can bind to proteins and DNAs with high chemo-selectivity even in the presence of water molecules and inorganics in vivo. We expected structural fine tunes of radical species can lead to achieve successful bioconjugation of proteins with high amino acid selectivity. In this study, the reactions of peptides with boronic acids and copper ions as radical sources were conducted under various reaction conditions. The modified peptides were observed after incubation at 75 °C and pH 10 in MALDI-TOF MS and HPLC analyses. The modification proceeded in the presence of other transition metals such as zinc and scandium instead of copper ion, suggesting other possibilities of reaction mechanism. Peptide sequence screening revealed tyrosine to be a main target in the reactions. Finally, we succeeded in the preparation of azide-functionalized peptides which allow further incorporation of useful handles via click chemistry of azide and alkyne.</p> <p>Since the harsh reaction conditions (pH 10 and 75 °C) utilized in the study cannot be applied to protein modifications, the further investigation is still needed.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190172

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	500（特B）千円
	氏名	花屋 賢悟	氏名（英語）	Kengo HANAYA		
研究課題（日本語）						
タンパク質の人工翻訳後修飾法の開発						
研究課題（英訳）						
Exploration of protein bioconjugation with boronic acids						
1. 研究成果実績の概要						
<p>タンパク質の翻訳後修飾のように、タンパク質上の特定のアミノ酸残基を人工的に化学修飾すれば、その機能、細胞内局在、分解などを制御することができる。申請者は以前、ホウ素原子を含む分子であるボロン酸と、遷移金属イオンを用いて、タンパク質中のシステインまたはピログルタミン酸のみを選択的に化学修飾する手法を確立した。本研究では、不対電子を有する分子種が関与するラジカル反応に注目し、上記とは異なるアミノ酸の化学修飾法の開発に取り組んだ。活性酸素ラジカルがタンパク質や DNA の特定の部位と反応するように、ラジカル分子の構造を工夫すれば生理条件下、特定のアミノ酸残基と反応すると期待した。銅イオンを作用させるとラジカル分子が生成するようボロン酸を設計した。このボロン酸を、銅イオン存在下、種々のペプチドと反応し、その反応液を MALDI-TOF MS や HPLC で分析、評価した。種々反応条件を検討したところ、pH 10.0 のホウ緩衝液中、75 °C で反応させると、ペプチドが一部化学修飾された。銅イオンの代わりに他の遷移金属イオンを用いた場合にも化学修飾されたことから、ラジカル反応以外の反応機構も示唆された。実験に用いた複数種のペプチドのアミノ酸配列の比較から、チロシンが化学修飾されたと結論した。この反応条件下、アジド基を導入したボロン酸を用いて化学修飾し、さらにアジドとアルキンの特異的な反応（クリックケミストリー）を利用して、ビオチンを導入したペプチドの創製に成功した。ただし、pH 10.0、75 °C という反応条件はタンパク質を変性させる可能性が高いため、さらなるボロン酸の構造変換および反応条件の検討が必要である。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Natural post-translational modifications of proteins grant structural diversities and varies physical and biological properties. Meanwhile, chemists have developed artificial post-translational modification, called “bioconjugation”, which can build novel functionalized macromolecules by incorporation of small molecules such as drugs, fluorophores, and tag molecules. Boronic acids [R-B(OH)₂] have been applied to bioconjugations due to hydrophilic nature and good stability under physiological conditions. We have already reported cysteine- or pyroglutamate-selective chemical modification with boronic acid and nickel ion.</p> <p>Radical species such as reactive oxygen species (ROS) can bind to proteins and DNAs with high chemo-selectivity even in the presence of water molecules and inorganics in vivo. We expected structural fine tunes of radical species can lead to achieve successful bioconjugation of proteins with high amino acid selectivity. In this study, the reactions of peptides with boronic acids and copper ions as radical sources were conducted under various reaction conditions. The modified peptides were observed after incubation at 75 °C and pH 10 in MALDI-TOF MS and HPLC analyses. The modification proceeded in the presence of other transition metals such as zinc and scandium instead of copper ion, suggesting other possibilities of reaction mechanism. Peptide sequence screening revealed tyrosine to be a main target in the reactions. Finally, we succeeded in the preparation of azide-functionalized peptides which allow further incorporation of useful handles via click chemistry of azide and alkyne.</p> <p>Since the harsh reaction conditions (pH 10 and 75 °C) utilized in the study cannot be applied to protein modifications, the further investigation is still needed.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			