



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of N-terminal specific dual modification strategies of proteins using triazolecarbaldehyde derivatives
Author(s)	張, 晏
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第16736号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16736
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99581
Type	doctoral thesis
File Information	ZHANG_Yan_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨/Dissertation Abstract

博士 (環境科学)

氏 名/Applicant 張 晏

学 位 論 文 題 名/Title of Dissertation

Development of N-terminal specific dual modification strategies of proteins
using triazolecarbaldehyde derivatives

(トリアゾールカルボアルデヒド誘導体を用いたタンパク質N末端特異的二重修飾法の開発)

タンパク質は生体内で化学反応の制御や物質の運搬などの様々な役割を担っており、その構造や機能の解明だけでなく、機能を利用した応用研究も盛んに行われている。タンパク質の位置特異的な化学修飾は、バイオイメージング技術や抗体-薬物複合体の調製、タンパク質複合材料の構築において重要な手法である。さらに、複数の機能分子を位置特異的に複数連結した高機能化なタンパク質材料の創製は、より広範な用途開拓が期待される。従来の化学修飾では、リジン側鎖の ϵ -アミノ基やシステイン側鎖のチオール基が広く利用されているが、リジンは残基数が多く選択性が低いこと、システインは含有率が低く遺伝子改変が必要になること、さらにシステインと反応後のマレイミド部位の不安定性が課題であった。一方で、N 末端は全てのタンパク質に存在し、修飾によるタンパク質構造や機能への影響が小さいため魅力的な修飾点である。当研究室では、1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド (TA4C) 誘導体がタンパク質 N 末端の α -アミノ基と反応してイミダゾリジノン環を形成することにより、高い選択性を示す N 末端特異的修飾反応を報告している。本論文では、TA4C 誘導体を用いたタンパク質 N 末端特異的な二重修飾法の開発に取り組んだ。金属イオンより促進される二重修飾反応や新規ビス TA4C 試薬による多機能性タンパク質の調製を実現する新規の化学修飾方法を確立した。

第一章では、タンパク質修飾の基本概念を概説し、化学修飾および N 末端化学修飾の既報の手法を述べた。さらに、二重修飾とタンパク質コンジュゲーションに関する先行研究を紹介し、N 末端化学修飾を基盤とする二重修飾およびコンジュゲーション法の研究背景を示した。

第二章は、N 末端修飾試薬 TA4C に加えて Ni^{2+} イオンの添加により、タンパク質 N 末端への二重修飾手法の開発について述べている。アンジオテンシン I、牛副腎髄質ドデカペプチド、デルタ睡眠誘発ペプチド(DSIP)、ニューロスタチン-13、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、クチナーゼ (Cut) に対して、200 当量の TA4C 誘導体および 50 当量のニッケルイオンを添加し、pH 7.4 の PBS 緩衝液中 37°C で 16 時間反応させ、その生成物を LC-MS により評価した結果、 Ni^{2+} イオンを添加しない場合は、イミダゾリジノン環形成した一重修飾体が得られた。一方で、 Ni^{2+} イオンの添加時には、二重修飾体が主な生成物として得られることが判明した。トリペプチド Leu-Gly-Gly (LGG) とベンジル基を有する TA4C (Bn-TA4C) を用いて生成した二重修飾体の構造を ^1H NMR (核磁気共鳴法) と各種二次元測定により決定した。また、GFP および Cut を対象に、アルキン基、ベンジル基、グルコサミ

ン基、長鎖アルキル基、アジド基、ジベンゾシクロオクチン基など多様な官能基を有する TA4C 誘導体を用いた場合も二重修飾体が生成することから、本二重修飾法は適用範囲が広いことを実証した。TA4C による N 末端一重修飾タンパク質では、修飾部位は加水分解を受けて半減期 36 時間で未修飾体へ戻る。一方で、Cut に対してヘキシル基を有する TA4C を用いた二重修飾体は、加水分解の半減期は 121 時間となり、安定性が顕著に向上する。50°C と 60°C の加熱条件下でも修飾構造は安定であることが明らかとなった。次に、Cut とトラスツズマブ抗体に対してアジド基を導入した後、歪み促進型アジド-アルキン付加環化反応 (SPAAC 反応) によりジベンゾシクロオクチン基を有するカルボキシテトラメチルローダミンとの反応によって蛍光標識できることも示された。以上より、TA4C と Ni^{2+} イオンを用いた N 末端二重修飾法は安定なタンパク質二重修飾体を調製が可能であり、実用的なタンパク質化学修飾方法の開発に成功した。

第三章は、TA4C 誘導体、マレイミド試薬と Cu^{2+} イオンを用いた [3+2] 環化付加反応による N 末端二重修飾法を確立した。50 当量の Bn-TA4C と N-エチルマレイミド誘導体および 50 当量の Cu^{2+} イオンを添加し、pH 6.0 のリン酸緩衝液中 37°C で 16 時間、アンジオテンシン I、DSIP、GFP、Cut を修飾反応させた後、生成物を LC-MS により評価した。それぞれ二重修飾率は 99 %、99 %、85 %、84 % と高収率であり、本手法は多様なペプチドやタンパク質を適用可能であることを見出した。また、この手法の実用性を示すために Cut とストレプトアビジン (Sav) の複合体を調製した。ビオチン基を有するマレイミド誘導体とアジド基を有する TA4C 誘導体を用いて Cut の N 末端を二重修飾し、ビオチンとアジドが 56 % の収率で同時導入された (N_3 _biotin_Cut)。続いて、SPAAC 反応によりジベンゾシクロオクチン基を有する sulfo-Cy5 と N_3 _biotin_Cut を反応させて、蛍光標識体 Cy5_biotin_Cut を調製した。SDS-PAGE と蛍光イメージングの結果により、これらの複合体に対応する明確な 4 種類の発光バンドが確認された。以上の結果から、本手法により Sav に対して 1~4 分子の Cy5_biotin_Cut が導入され、酵素—Sav 複合体の構築を成功した。

第四章では、両末端の TA4C 部位をオリゴエチレングリコール鎖リンカーでつないだ二重 TA4C を活用して、新規バイオコンジュゲーション手法の開発について報告する。LGG に対して 0.1 当量の二重 TA4C を添加し、ESI-TOF MS より LGG の二量体が生成したことを確認した。また、タンパク質 RNaseA に対して 400 当量の二重 TA4C を加えて 37°C で 16 時間静置して、二重 TA4C 試薬の一端と RNaseA の N 末端を反応させた。過剰の二重 TA4C を除去した後に、20 当量のペプチドを添加した。LC-MS 解析より、ペプチド—RNaseA の連結体のピークが観察された。続いて、同様な手法により、GFP と RNaseA のコンジュゲーションを試みた。SDS-PAGE の結果から、GFP—RNaseA のバンドが確認されて、タンパク質のコンジュゲーションが進行したことが示唆された。以上より、二重 TA4C 誘導体を用いた N 末端修飾によりペプチド—ペプチド、ペプチド—タンパク質、タンパク質—タンパク質の N 末端同士を連結することに成功した。

本論文では、1H-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド (TA4C) 誘導体を基盤とする N 末端の化学修飾法を発展させ、 Ni^{2+} イオンを活用した二重修飾、 Cu^{2+} イオンとマレイミドを用いた環化付加型二重修飾、TA4C を用いたタンパク質連結の 3 つの新規手法を確立した。これらの手法は、安定で多機能なタンパク質修飾体を得るための実用的な方法であり、今後はタンパク質工学、ケミカルバイオロジー、およびバイオマテリアルの分野での応用が期待される。