



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_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 張 晏

審査委員 主査 教授 小野田 晃
副査 教授 小西 克明
副査 准教授 梅澤 大樹

学 位 論 文 題 名

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。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。申請者の所属研究室では、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Ni²⁺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)、ニューロノスタチン-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℃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、Ni²⁺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、Ni²⁺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。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Ni²⁺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Cu²⁺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Cu²⁺イオンを添加し、pH 6.0 のリン酸緩衝液中37℃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（N₃-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N₃-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を開発した。LGGに対して0.1当量の二重TA4Cを添加し、ESI-TOFMS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℃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、1*H*-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、Ni²⁺イオンを活用した二重修飾、Cu²⁺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。

審査委員一同は、以上の成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。