

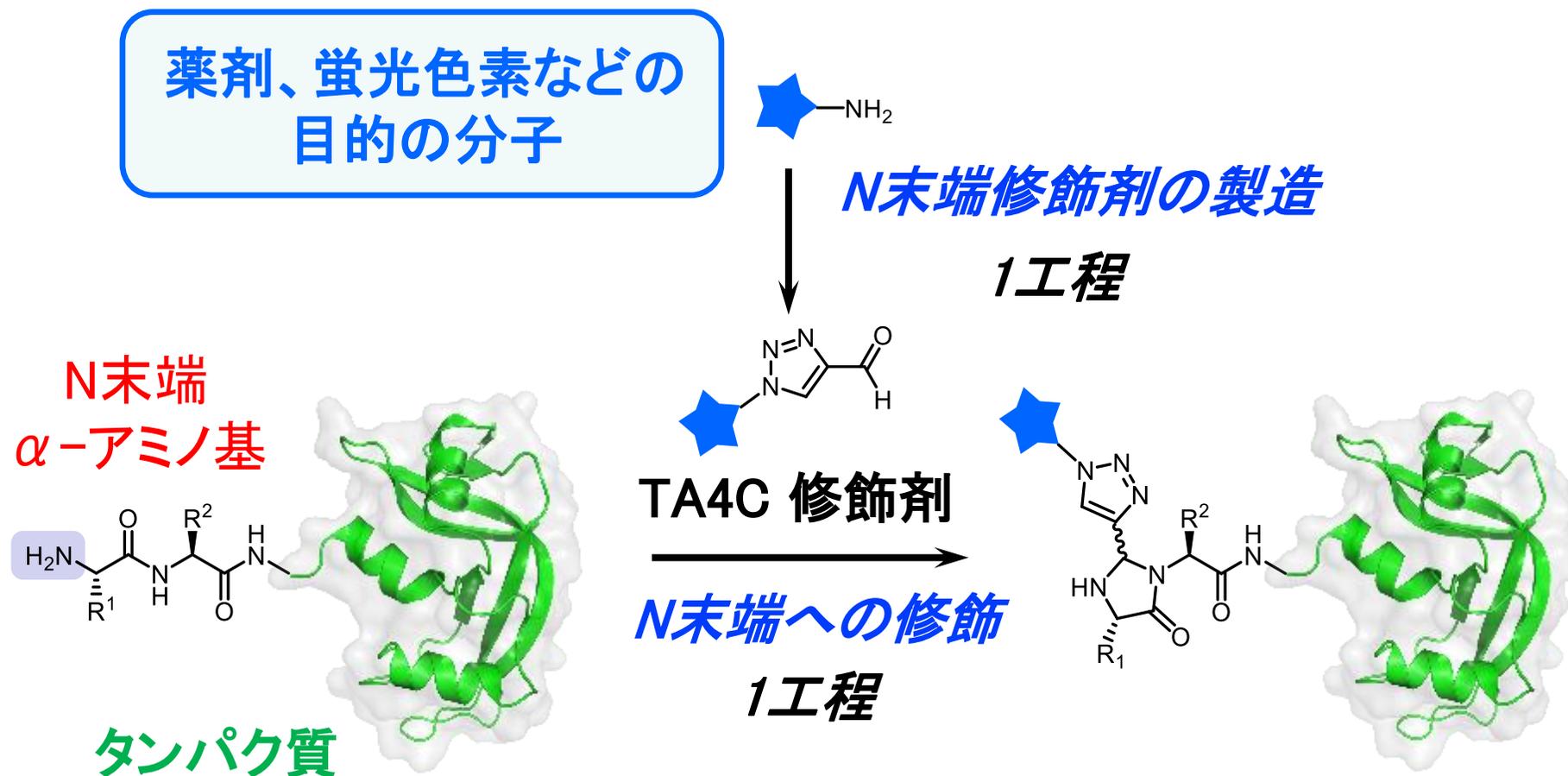
バイオ医薬品のための タンパク質N末端選択的修飾技術

大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻
准教授 小野田 晃



2020年2月4日

全2工程で、あらゆるタンパク質の N末端に薬剤をつなぐ新技術



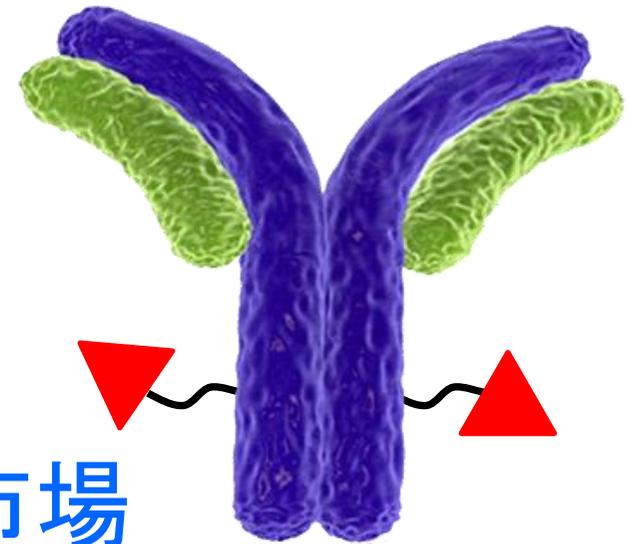
ChemBioChem, 2020(表紙)、
特願2019-035340

化学修飾の例：タンパク質と薬剤をつなぐ (抗体-薬剤複合体)

抗体によってがん細胞を標的にする。抗体につないだ薬物をがん細胞内に送る。最先端のがん治療薬。

⇒タンパク質との固定位置を制御して、薬剤とつなぐ技術が重要である。

⇒バイオ医薬品などの大きな市場に応用される技術である。



タンパク質の化学修飾

- バイオ医薬品、検査試薬、タンパク質材料、酵素固定化触媒、バイオデバイスなどの広範な応用に、タンパク質の化学修飾が利用されている。
- 蛍光色素、核酸、ペプチド、機能性タグ、材料表面の分子等とタンパク質をつなぐ化学修飾技術が求められている。
- 位置選択性が高く、簡便な化学修飾技術が求められている。

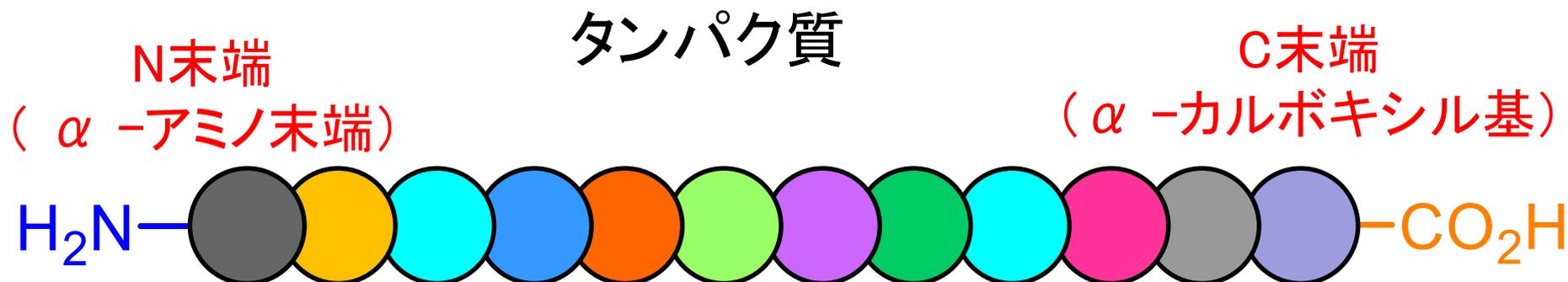
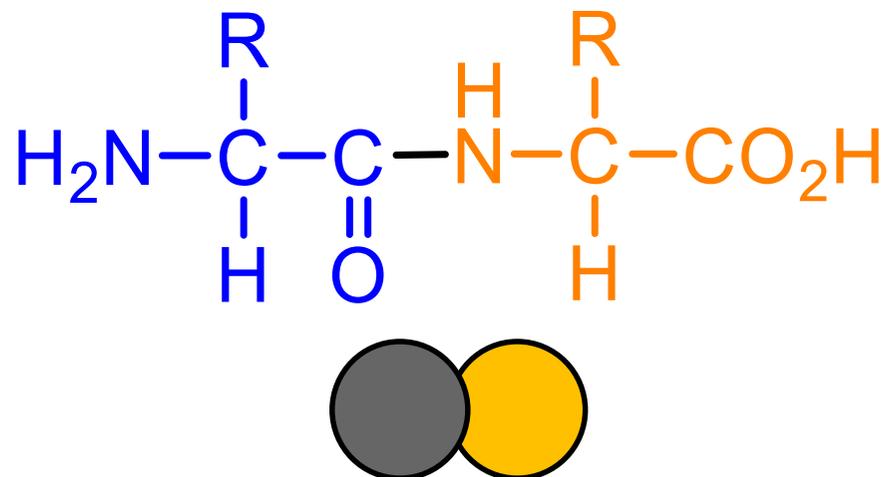
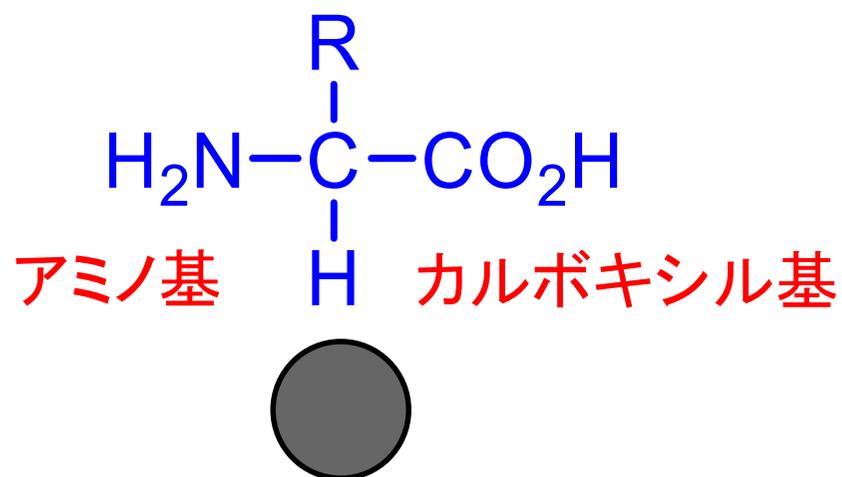
従来のタンパク質化学修飾技術

- リジン残基修飾（活性エステルとの縮合）
 - 最も一般的に利用される修飾方法
 - タンパク質表面の複数のリジン残基と反応
 - ランダムな修飾体を生成
- システイン残基修飾（マレイミドとの付加反応）
 - 汎用修飾方法
 - 選択性、反応性ともに優れ、実用的
 - システインはタンパク質に含まれる割合が低く(<1%)、必要に応じて遺伝子改変により導入

タンパク質のN末端

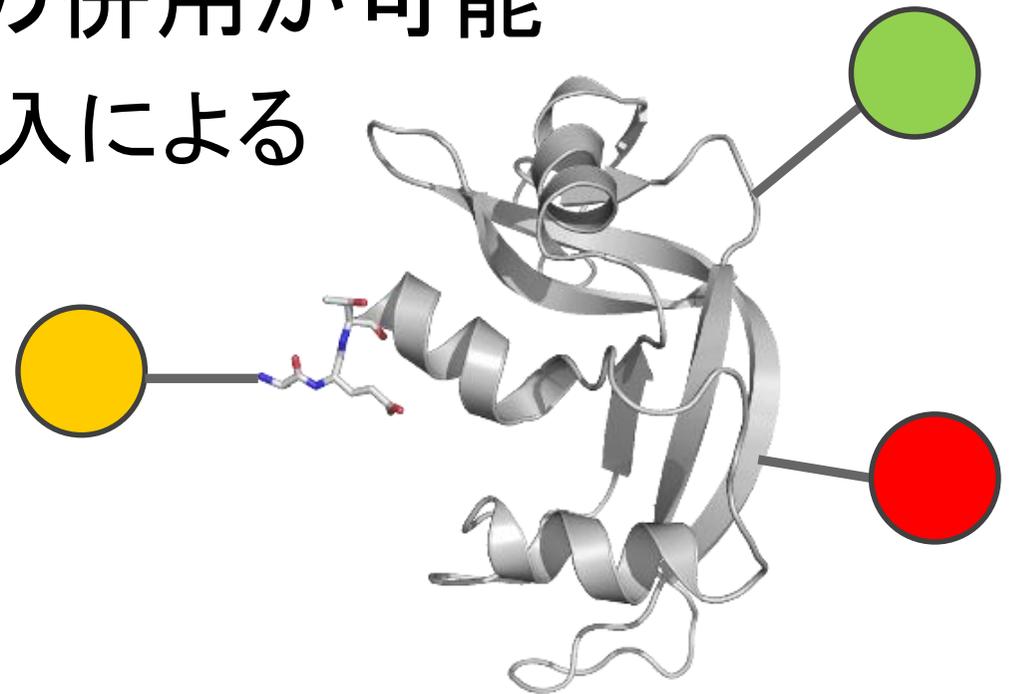
アミノ酸(20種類)

ペプチド



タンパク質N末端修飾技術の特徴

- あらゆるタンパク質に存在する
- 機能への影響が小さい
- 残基選的方法との併用が可能
 - 多数の分子を導入による
テラーメイド化



従来のN末端修飾技術の問題点

アルデヒド誘導体と還元剤による還元的アルキル化等が最も簡便な手法。

N末端の選択性が低い

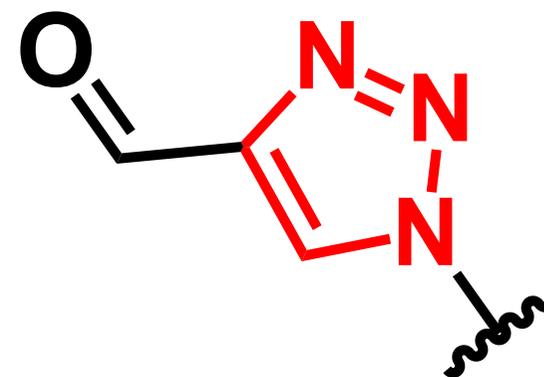
低いpH (4.5以下)が必要

収率が低下する傾向

等の問題があった。

本技術：新たなN末端修飾剤

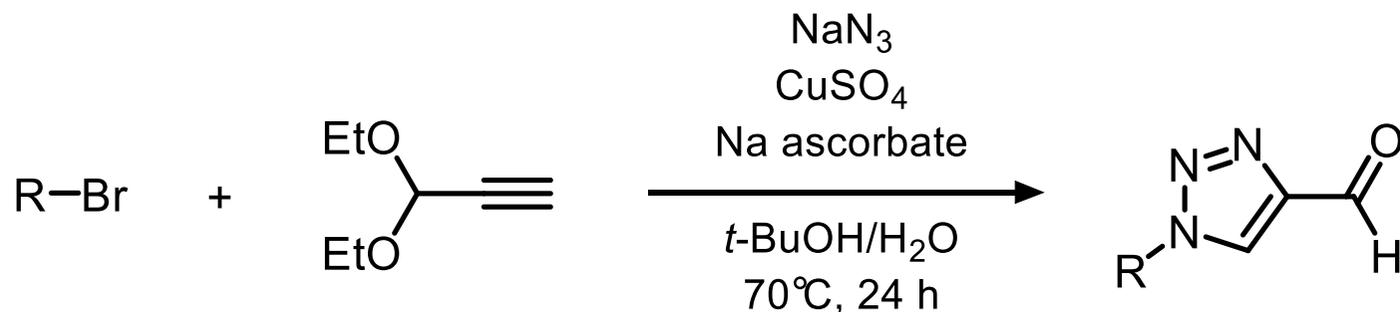
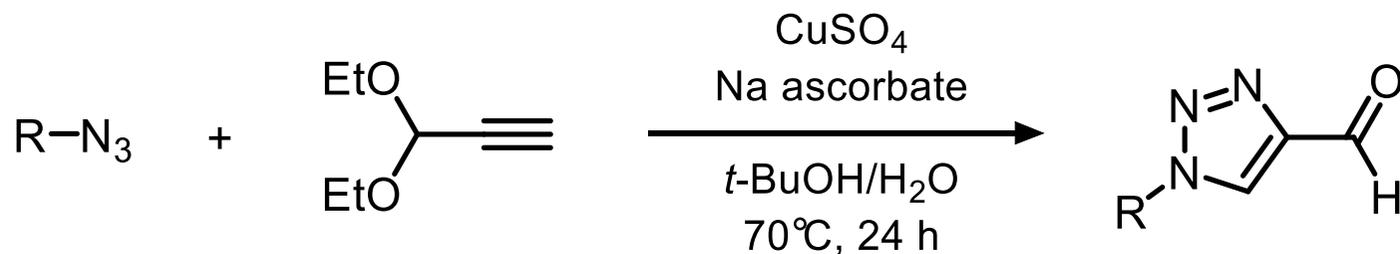
1H-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド
(TA4C)



- N末端の選択性が高い
- すべてのN末端のアミノ酸残基に適用できる
- 1工程で修飾剤を製造
- 全2工程で、修飾タンパク質を調製

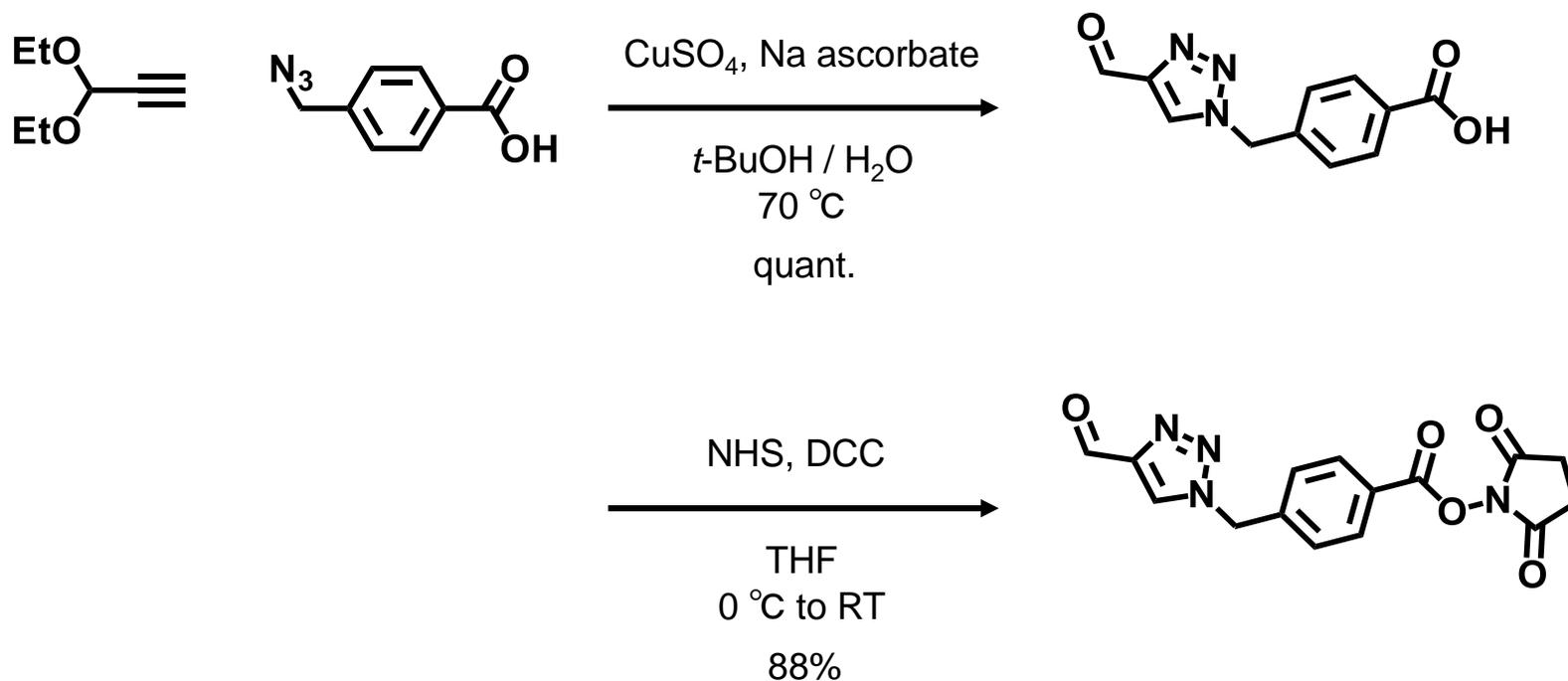
N末端修飾剤TA4Cの製造1

- ・ アジド化合物あるいは臭化物から最短1工程で合成可能。



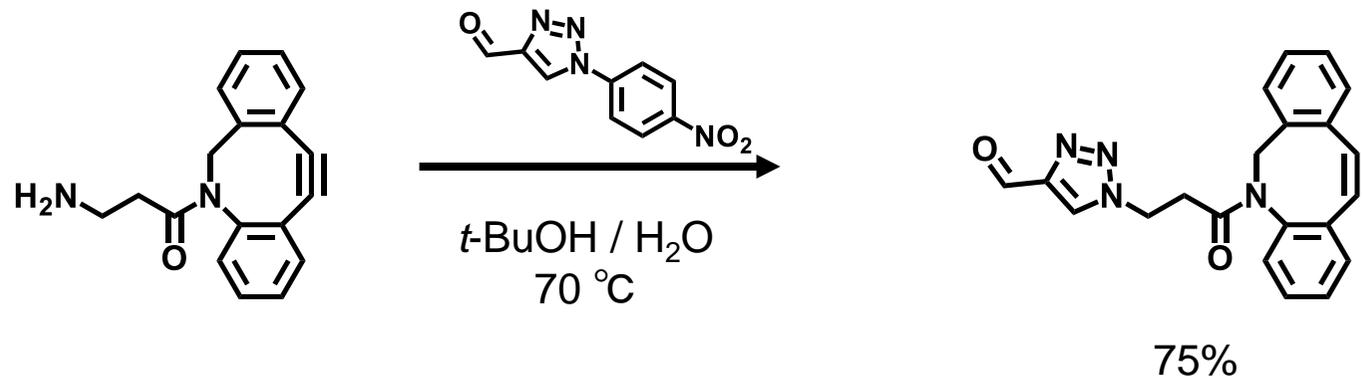
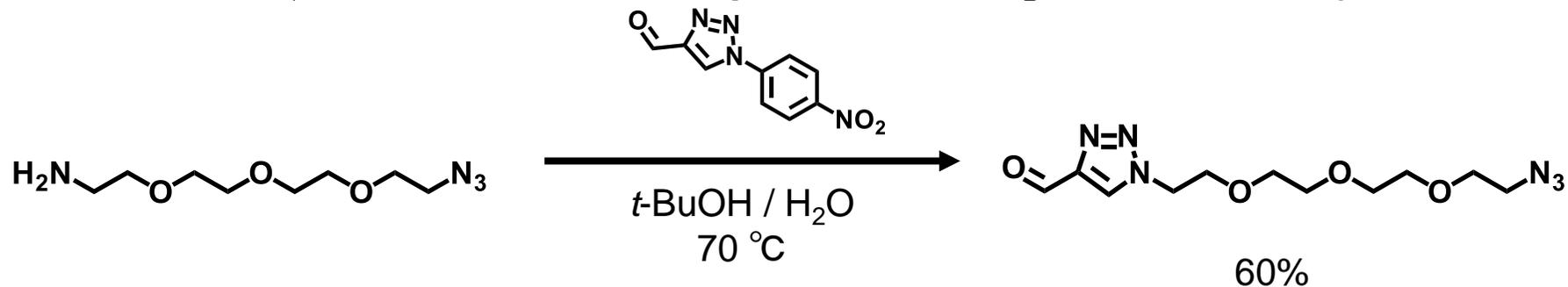
N末端修飾剤TA4Cの製造2

- 修飾剤TA4Cの活性化エステル化合物を容易に製造可能。



N末端修飾剤TA4Cの製造3

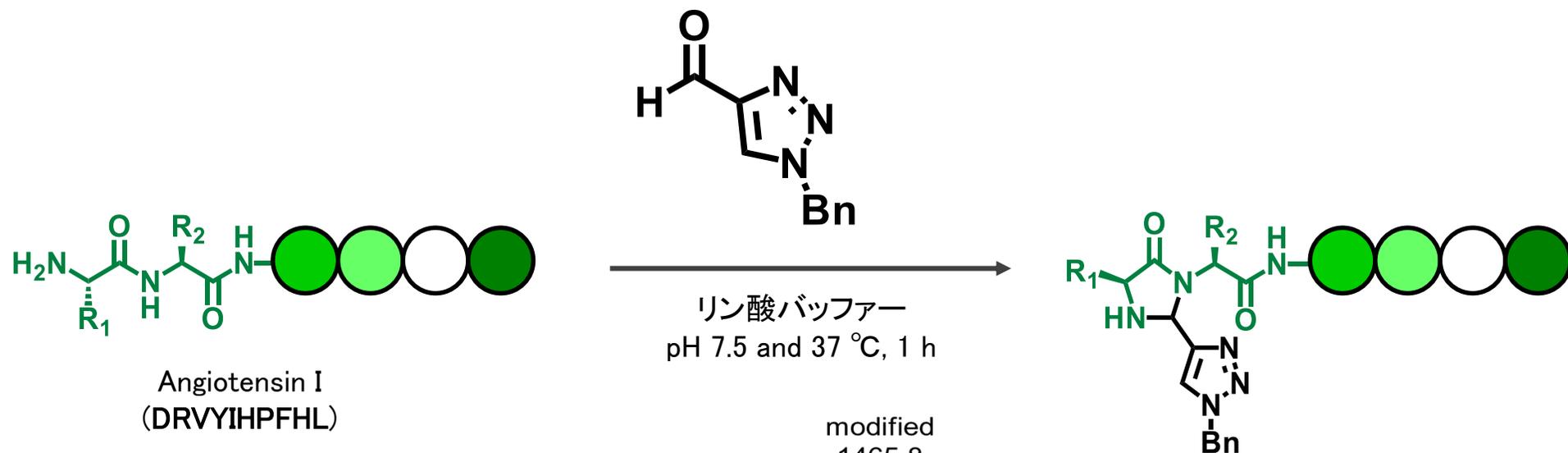
- ・ アミン化合物から1工程で合成可能。
(ディムロス転位を活用)
- ・ アジド、アルキンを簡便に導入可能。



従来の修飾剤製造技術との比較

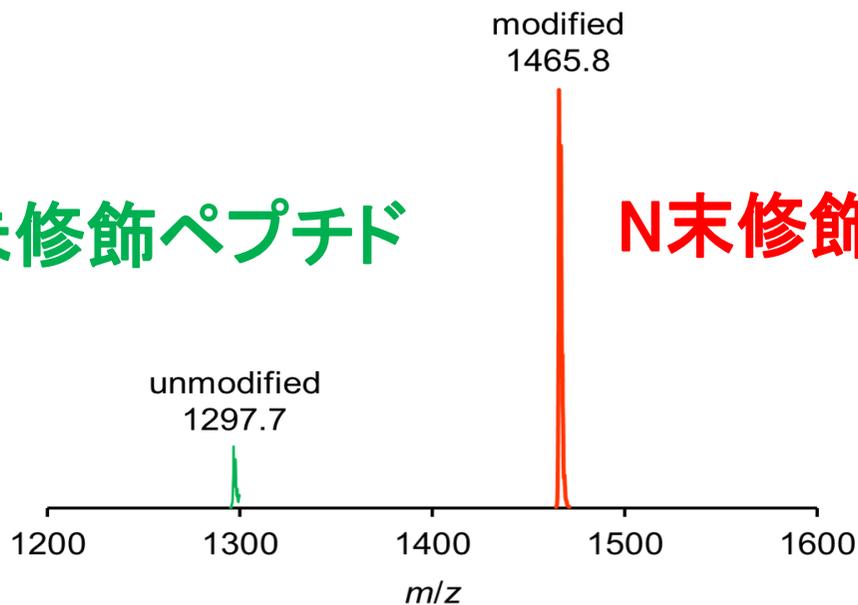
- 従来技術は3工程以上の修飾剤製造工程が必要な点が問題点であったが、1段階で製造することに成功した。
- 本技術の適用により、製造工程が短縮できるため、製造コストが1/2～1/3程度まで削減されることが期待される。

ペプチドN末端修飾の実施例1



未修飾ペプチド

N末修飾ペプチド

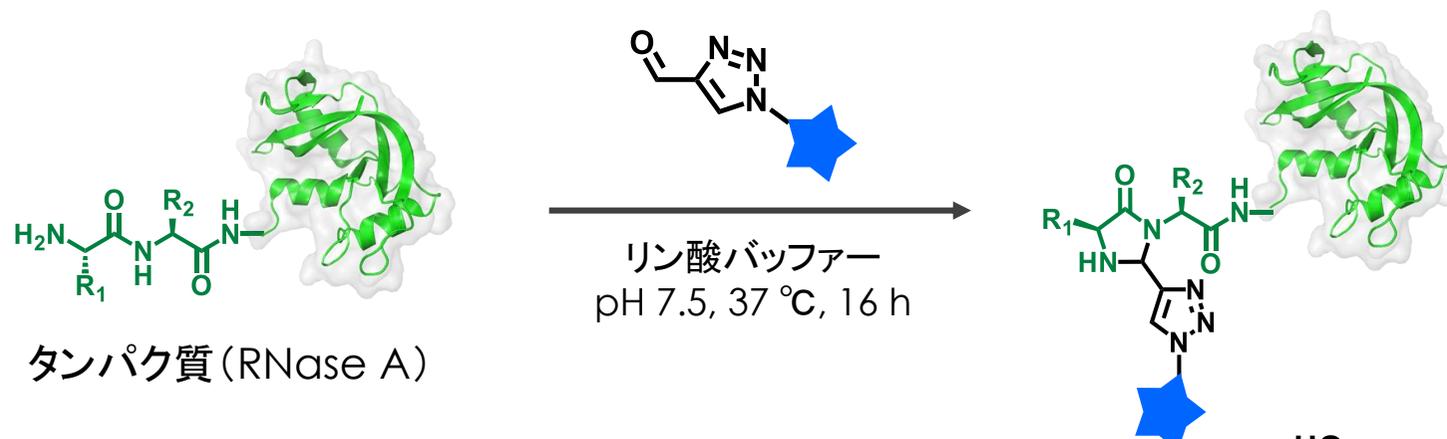


ペプチドN末端修飾の実施例2

- ・ 高い選択性、高い修飾率
- ・ リジン側鎖とは反応しない

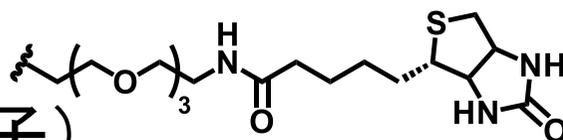
	ペプチド	修飾率 (%)
1	DRVYIHPFHL (Angiotensin I)	92
2	WAGGDASGE (Delta-sleep inducing peptide)	91
3	YGGFMRRVGRPE (BAM-12P)	96
4	LRQFLQ K SLAAAA-NH ₂ (Neuronostatin-13)	98
5	Ac -YVG	—
6	pEAK SQGGSN (Serum thymic factor)	—
7	RPPGFSPFR (Bradykinin)	—

タンパク質N末端修飾の実施例1



ビオチン

(精製用の分子)



14,163

修飾

タンパク質

79%

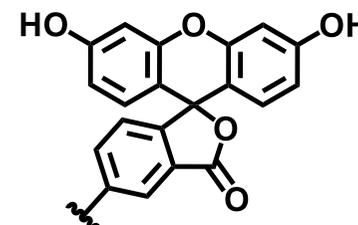
未修飾
タンパク質

13,683



フルオレセイン

(蛍光色素)



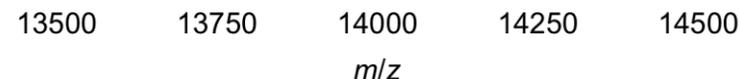
14,093

修飾

タンパク質

73%

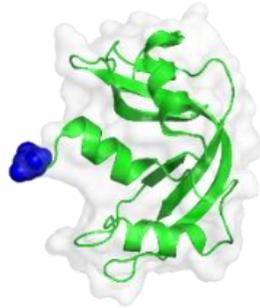
13,683



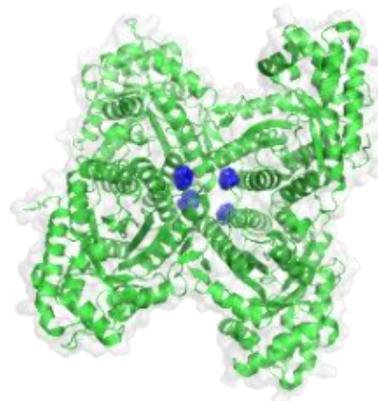
Condition: 50 μ M RNase, 10 mM TA4C derivatives, 10 mM potassium phosphate buffer at pH 7.5 and 37 °C, 16 h.

タンパク質N末端修飾の実施例2

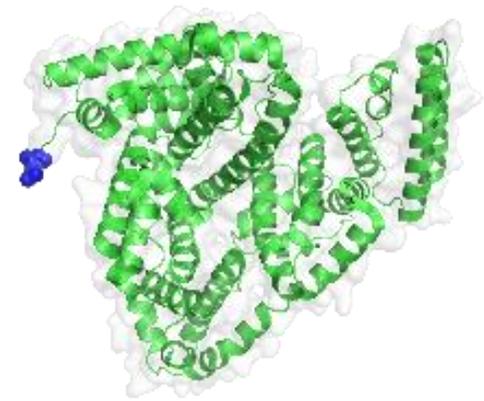
- ・ 高いN末端選択性
- ・ すべてのタンパク質に適用可能
(ただし、N末端は保護されていないもの)



RNase A
N-terminus: Lys
10 Lys
90%



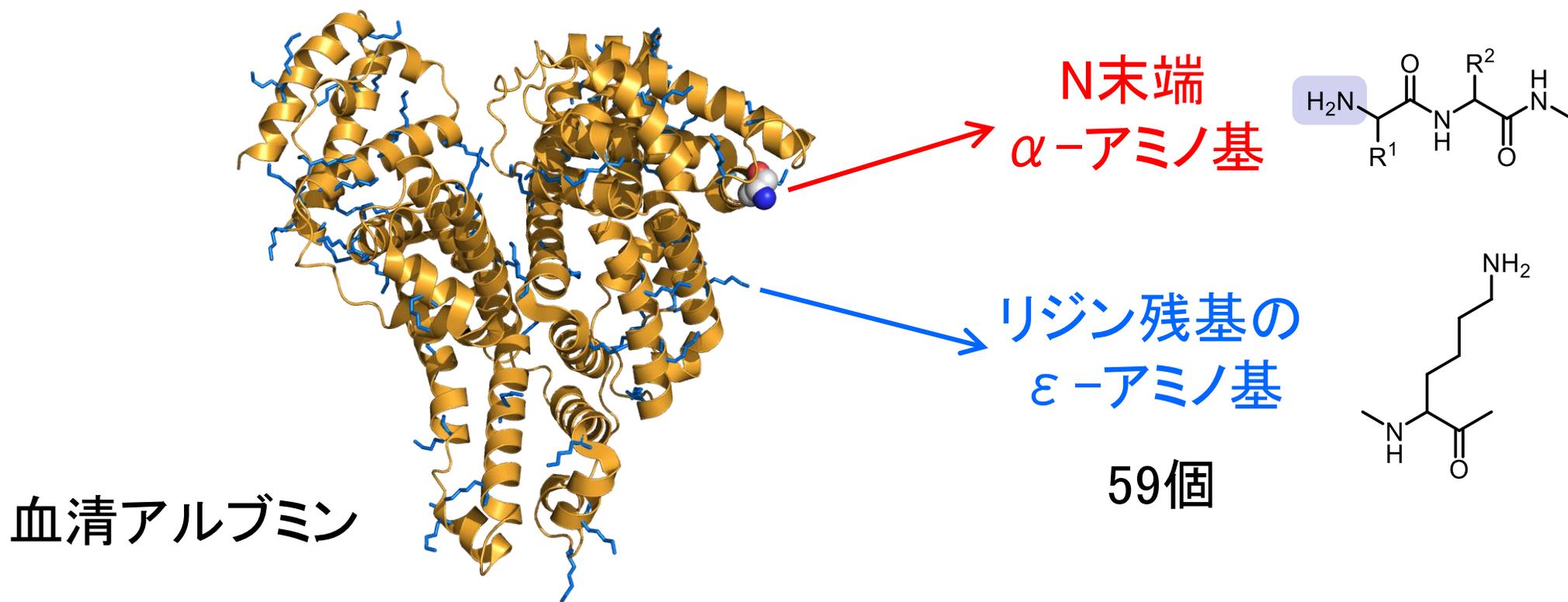
Aldolase
N-terminus: Pro
25 Lys
94%



Bovine serum albumin
N-terminus: Asp
59 Lys
66%

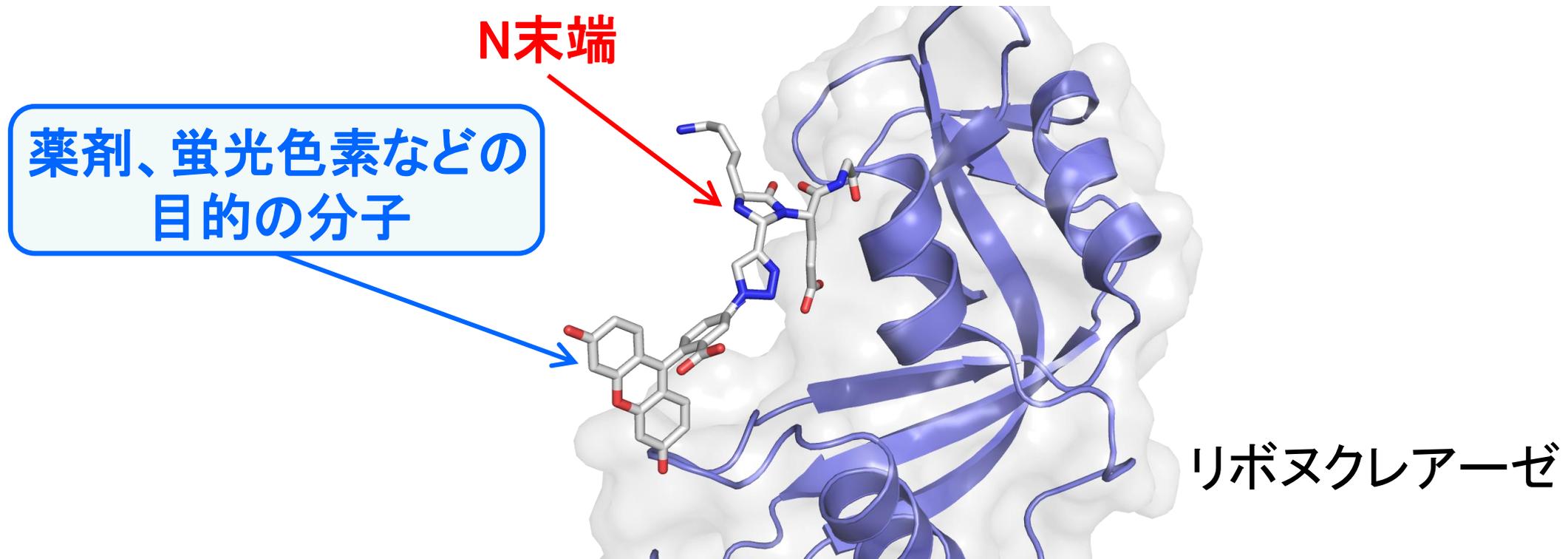
タンパク質N末端修飾の実施例3

- 高いN末端選択性
 - リジン残基(59個)の ϵ -アミノ基とは反応せずにN末端の α -アミノ基と選択的に反応

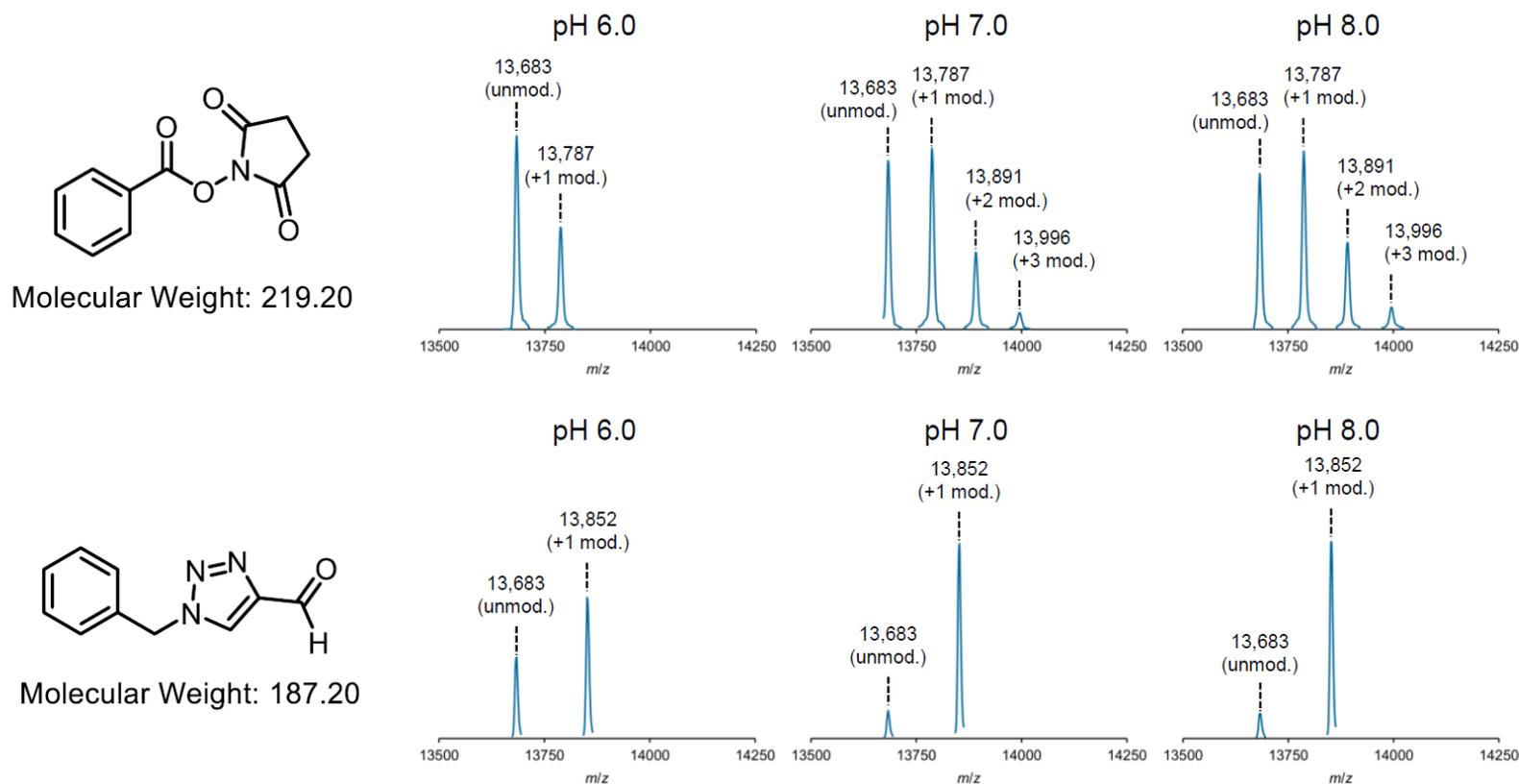


タンパク質N末端修飾の実施例4

- ・ タンパク質の機能を保持
 - リボヌクレアーゼの構造と活性を保持し、N末端に蛍光色素を導入することに成功



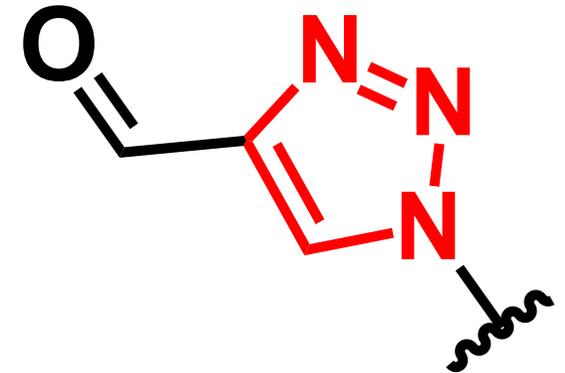
従来技術（活性化エステル）との比較



ESI-TOF mass spectra of RNase after treatment with (a) benzoic acid NHS-ester (1 eq. to protein) at 25 °C for 12 h, and (b) **1** (100 eq. to protein) at 37 °C for 16 h.

本技術：新たなN末端修飾剤

1H-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド
(TA4C)



- N末端の選択性が高い
- すべてのN末端のアミノ酸残基に適用できる
- 1工程で修飾剤を製造
- 全2工程で、修飾タンパク質を調製

従来の修飾法との比較

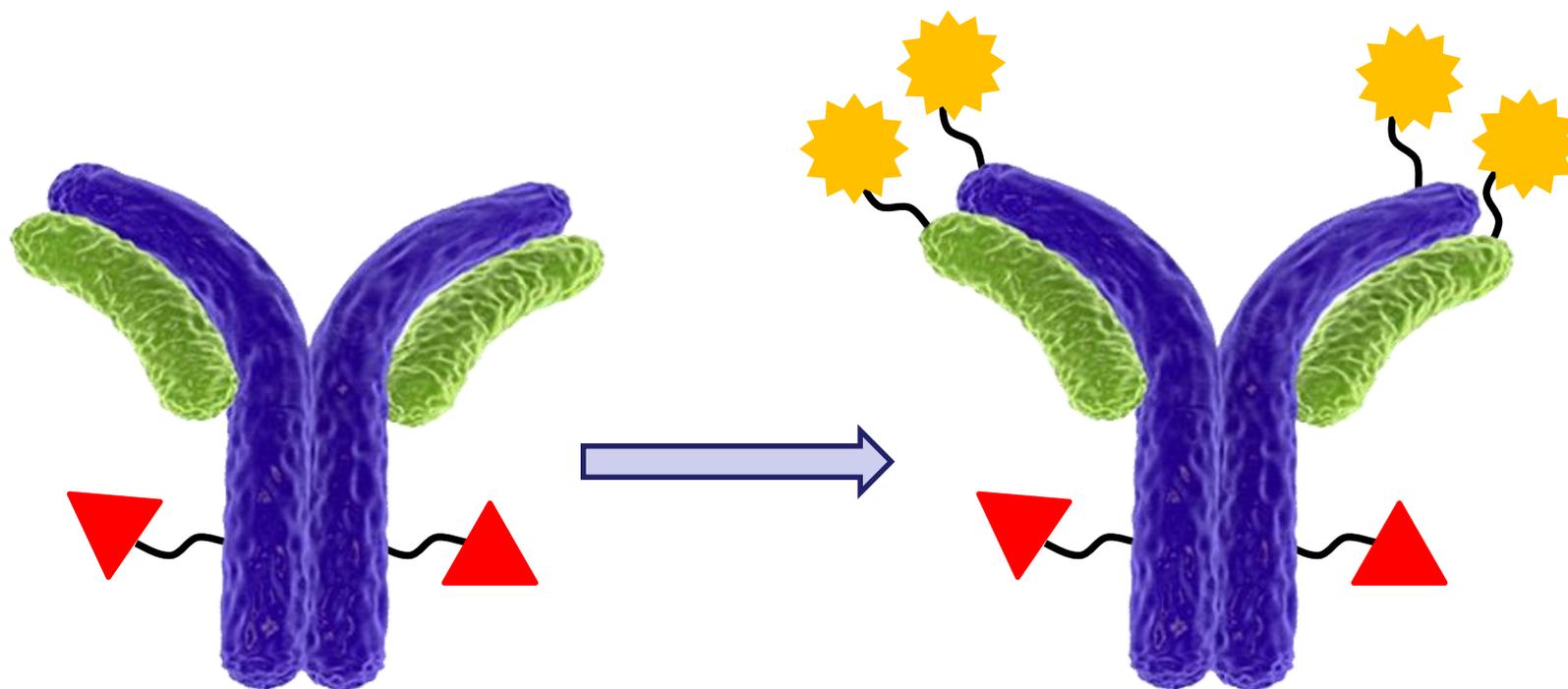
技術方法	TA4C	従来技術1	従来技術2	従来技術3
N末端の適合性	高い	高い	高い	低い
選択性	高い	高い	低い	高い
修飾工程数	1	1	2	1
修飾剤合成工程数	1	3	0	4
修飾・脱修飾の制御	可能	可能	不可	不可

想定される用途1

- タンパク質への位置選択的な化学修飾と、修飾剤の製造工程の簡便さを生かした、バイオ医薬品や検査試薬へ応用
- 既存の抗体医薬などの動態解析のための色素や放射性ラベリング
- タンパク質材料、酵素固定化触媒、バイオデバイスに展開することも可能

想定される用途2

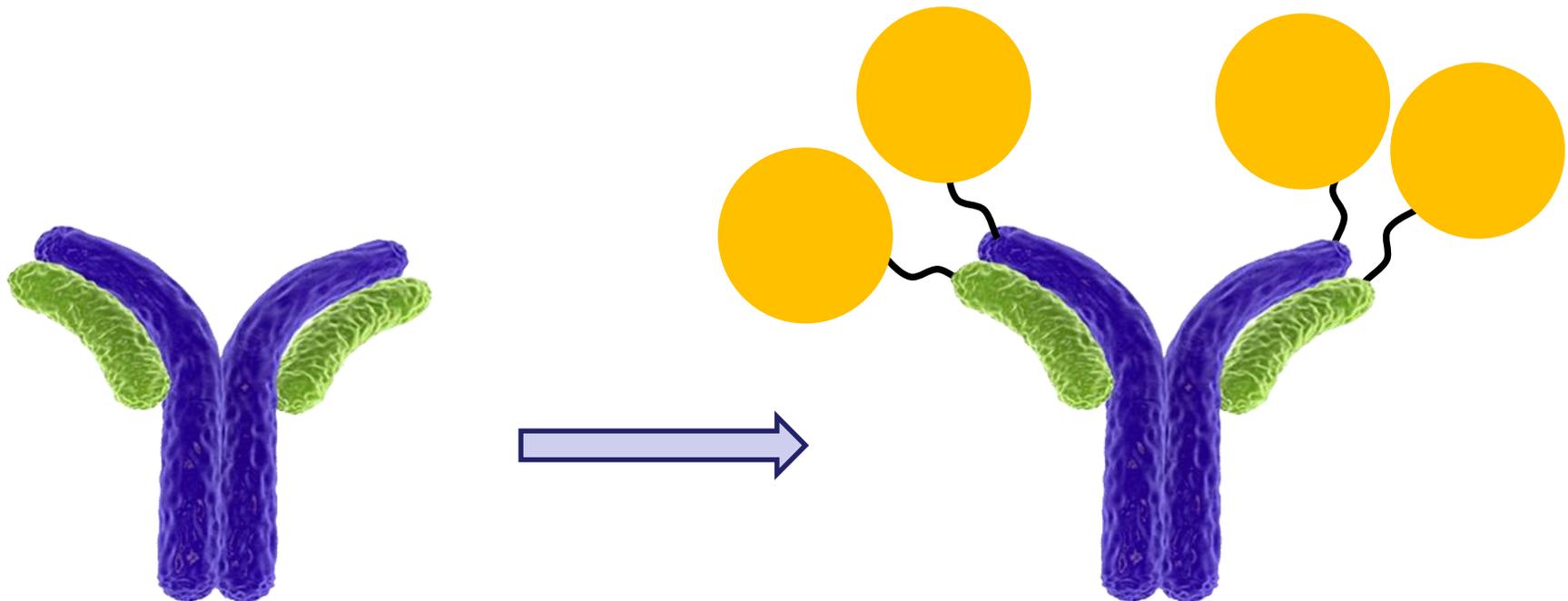
- バイオ医薬品や検査試薬
 - タンパク質への多点かつ位置選択的な化学修飾



想定される用途3

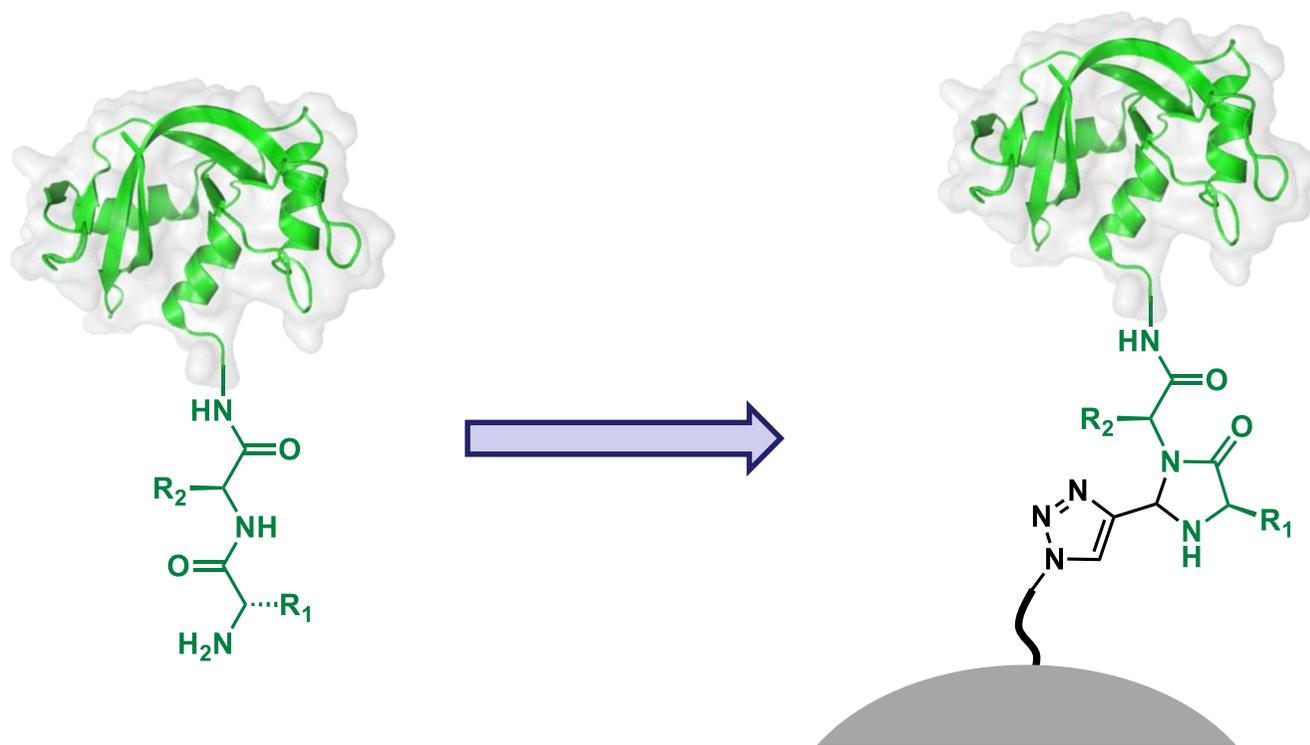
- バイオ医薬品や検査試薬

- 手持ちのタンパク質試料に対して、タンパク質、ペプチド、核酸などを修飾可能



想定される用途3

- タンパク質固定化材料
 - タンパク質・酵素の配向を制御して利用可能
 - ポリマー担体、電極、細胞表面など



実用化に向けた課題

- 用途次第ではあるが、既に実用化可能な修飾方法に仕上がっている。
- 修飾反応の収率向上、使用する修飾剤の低減に取り組んでいく。
- 修飾体の安定性を制御できる技術を確立する必要もある。一方で、修飾した分子がタンパク質から外れる特性を徐放としての活用も期待できる。

企業への期待

- 薬剤との化学修飾、タンパク質やペプチドの徐放を開発中の企業、タンパク質や酵素の固定化の分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。
- 修飾タンパク質の応用や特性評価の技術を持つ企業とのライセンス締結、共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

<出願1>

- 発明の名称 : タンパク質及び／又はペプチド修飾用分子
- 出願番号 : PCT/JP2019/008142
- 出願人 : 大阪大学
- 発明者 : 林高史、小野田晃、井上望

<出願2>

- 発明の名称 : タンパク質及び／又はペプチド修飾用分子
- 出願番号 : 特願2019-035340
- 出願人 : 大阪大学
- 発明者 : 林高史、小野田晃、井上望

お問い合わせ先

大阪大学共創機構 産学共創・渉外本部
イノベーション戦略部門 産学官連携支援室

TEL 06-6879-4875

e-mail contact@uic.osaka-u.ac.jp