

【目的】 生体内には多くの物質が存在し、様々な化学反応を起こしている。これら物質や反応の生理的意義を解明するうえで、細胞や生体内において当該物質周辺や反応点近傍に存在するタンパク質の網羅的解析が重要となる。このような、特定環境下のタンパク質のみを網羅的に解析するアプローチは、コンディショナルプロテオミクス (CP) と呼ばれている。CP 研究では、対象とする物質や反応を認識・検知して近傍のタンパク質をラベル化する試薬が必要となる。このようなラベル化試薬は、現在までいくつか報告されている。しかし、特定の物質 (イオン) をトリガーとしてラベル化を惹起するよう設計されているため、汎用性に難があった。すなわち、新たな物質や反応をトリガーとするにはラベル化試薬を一から設計しなおす必要があり、この煩雑さが CP の発展を阻害していた。そこで著者は、保護基 (PG) を置換するのみで様々な物質・反応をトリガーとしたラベル化を可能とする、新たな高汎用性ラベル化試薬を開発することとした。なお、標題の「論理ゲート型プロテオミクス」とは CP のことであり、特定の環境下にあるタンパク質のみを対象とした、すなわち“特定の環境”と“タンパク質の有無”を AND ゲートとしたプロテオミクスを意味する。

【方法】 これまで著者らは、PG を置換するのみで様々な環境にตอบสนองしたペプチド結合を切断する環境応答型アミノ酸の開発を行ってきた。本研究ではこの際の知見を活かし、CP のための新たなラベル化試薬を設計した。ラベル化試薬 A は三重結合を挟み、一方にラベルを、他方に PG により保護された水酸基を有する。この試薬は求電子性を持たないため、タンパク質のラベル化は起こさない。しかし、特定環境下で PG が除去されると生じた中間体が分解され、アレノン B を生じる。アレノンは求電子性が高いため、近傍に存在するタンパク質の求核性部位による共役付加反応を受ける。この結果、特定環境下にあるタンパク質のみが網羅的にラベル化される設計である。本研究ではまず、ラベル化試薬の反応性精査を目指し、PG 部分には生体内環境ではなくフッ化物イオン処理で容易に除去可能な *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基を導入することとした。また合成の容易さを考慮し、X はシアノ基と、R は水素原子とした。さらに、クリックケミストリーを利用してラベル部分に多様性を持たせることを可能とし、かつ紫外線吸収を指標とした HPLC による追跡を容易にするため、アルキン末端をベンジルアジド誘導体としたラベル化試薬 C を設計した。

【結果】 ラベル化試薬 C の合成経路を確立したのち、タンパク質の代わりにモデルペプチド D を用いて反応性の検証を行った。両化合物をアセトニトリル/リン酸緩衝液に溶解したのち、テトラブチルアンモニウムフルオリドを加えて 37°C でインキュベートした。得られた反応液を HPLC で解析したところ、複数のピークが観測された。溶出液の質量分析を行った結果、いくつかのピークにおいて、ペプチド D にラベル化試薬が付加した目的物 E と一致する質量が観測された。以上の結果は当初の設計通り、ラベル化試薬 C が PG の除去をトリガーとして標的と結合したことを示唆している。なお、ラベル化実験では目的物 E に一致する質量を検出できたものの、構造不明の副生成物も多く観測された。この原因は、ラベル化試薬の反応性が高すぎることにあると著者は考えている。そこで今後は、ラベル化試薬 A の R 部分を種々変更し、ラベル化試薬の求電子性を調節することで副反応の抑制を試み、CP のための真に実用的な論理ゲート型ラベル化試薬の開発を進める計画である。

研究の概要と結果

