

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390006

研究課題名（和文） 不溶性膜タンパク質化学合成に向けた化学的基盤の確立と応用

研究課題名（英文） Development of methodology for the preparation of membrane proteins

研究代表者

大高 章 (OTAKA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20201973

研究成果の概要：極めて溶解性の低い膜タンパク質の化学合成に向けた化学的基盤として、自然界に見出されるタンパク質の自己編集システムであるインテイン-エクステイン系に着目した。この系は、基本的に2つのペプチド結合の切断反応と3つのアシル基転移反応から成り立っている。このインテイン-エクステイン系の模倣が不溶性タンパク質合成に有用と考え、系に含まれる基本的反応の模倣を通じて、不溶性タンパク質合成に役立つ幾つかの反応システムを見出し、その応用展開について検討を加えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：薬品合成化学、ペプチド・タンパク質化学、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：不溶性膜タンパク質、インテイン、エクステイン、ペプチドチオエステル、アシル転位、スプライシング

1. 研究開始当初の背景

細胞膜受容体をはじめとする不溶性膜タンパク質の機能解析は、ポストゲノム時代におけるタンパク質研究の最重要課題の一つである。研究を遂行するにあたり、膜タンパク質自身を調製あるいは膜にインテグレートされた状態のタンパク質の非侵襲的な操作が必要不可欠である。しかし、これらは、膜タンパク質の難溶性ため化学合成法、遺伝子工学法を問わず、極めて困難である。化学合成法は、機能解析に有用な情報発信型非天然アミノ酸を容易かつ自由に導入できる利点を持つ。そこで、不溶性という問題を回避し、かつ脂

質膜へインテグレートされた膜タンパク質の合成を可能とするような化学的基盤の確立とそれを利用した膜タンパク質の調製および膜タンパク質の非侵襲的操作について検討することとした。

2. 研究の目的

化学的基盤確立のため、前駆蛋白質から中間配列が自発的に除去され、残った部分が再結合する Intein-Extein System による蛋白質スプライシング反応の化学的模倣を基本戦略とした。すなわち、Extein 相当部分を膜に

インテグレートされる配列、Intein 相当部分を溶解性促進配列とし、Intein 相当部分が自発的にスプライシングされるような化学的デバイスを導入するという考えである。さらに、一連の反応を脂質膜存在下で行い、膜貫通部位を自発的に膜へインテグレートさせる予定である。

このような方針の下、科研費交付期間内に不溶性膜蛋白質合成に必要とされる化学的基盤の確立を、主にインティンを介した蛋白質スプライシングの化学的模倣を目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究では脂質膜担持型合成、Native Chemical Ligation (NCL)、蛋白質スプライシング反応の化学的模倣の3点を膜蛋白質合成のための基本戦略と位置づけている。

まず、脂質膜担持型合成の問題点として、ペプチドの脂質膜に対する方向性を制御できないことがあった。これは、ペプチドをインテグレートさせた脂質膜の調整法によるものである。すなわち、膜貫通セグメントは、難溶性であるため、脂質成分、ペプチド成分を共に溶解後、リポソームを調製しなければならないことに起因する。

そこで、この方向性制御の問題を、親水性膜蛋白質合成アシスト配列の導入により、解決する計画を立てた。親水性配列の導入は次のような利点を持つ。a) ペプチドセグメント自身の合成、精製が容易となる；b) 親水性配列導入膜ペプチドセグメントを水溶液とし、リポソーム懸濁液に添加すると、疎水性の膜貫通セグメントのみが膜に導入され、膜への方向性制御導入が可能となる。

親水性アシスト配列は、その役目を終えた後は、これを適切に除去する必要がある。この不要部分の除去と膜貫通部分の縮合に Intein-Extein System による蛋白質スプライシング反応を応用することとし、その化学的模倣について検討することとした。

4. 研究成果

研究期間内においては特に Intein-Extein 系の化学的模倣について検討を加えた。模倣すべき反応として、特に N-S アシル基転位に伴うペプチド結合の切断およびチオエステル精製への展開についてまず検討を加えた。次いで、ペプチド結合切断に伴う、イソペプチドユニットからの正常型ペプチドへの変換反応について検討を加えた。

(1) N-S アシル基転位によるチオエステルの合成：研究期間内にこの項目について2つの新規方法論の開発を行った。すなわち、システム由来オキサゾリジノンを利用する方

法論と N-置換型アニリン骨格を利用する方法である。いずれの手法もチオエステル合成に極めて有用な方法論であり、本手法の開発によって従来困難とされていた Fmoc 法によるチオエステル合成が可能となった。

(2) ペプチド結合切断法の開発とペプチド機能変換への展開：ペプチド結合切断デバイスの開発に成功した。アスパラギン側鎖置換型アミノ酸とトリメチルロック型フェノール性水酸基含有アミノ酸の開発である。前者はイミド環形成により、また後者はラクトン環形成に伴い本来比較的安定なアミド結合切断を誘起する。また、これらアミノ酸をケージド化し、光応答性を付与して、光刺激に伴うペプチド結合の切断に成功した。特に後者のアミノ酸を利用した場合の切断反応は早く、このトリメチルロック型アミノ酸とイソペプチドからの正常型ペプチドへの変換反応を組み合わせることで、光刺激に応答して、細胞内でその局在を変化させる核-細胞質シャトルペプチドの創製に成功した。本研究成果は極めて独創性が高く、国の内外から高い評価を得た。現在、これらの成果を基盤として蛋白質化学合成基盤の確立に向けて、さらなる研究展開を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Synthesis of Amide-type Fluoroalkene Dipeptide Isosteres by Intramolecular Redox Reaction. Y. Yamaki, A. Shigenaga, J. Li, Y. Shimohigashi, A. Otaka. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3278-3285. (査読有り)
2. Synthesis of Fluoroalkene Dipeptide Isosteres by Intramolecular Redox Reaction Utilizing N-Heterocyclic Carbenes (NHCs)". Y. Yamaki, A. Shigenaga, K. Tomita, T. Narumi, N. Fujii, A. Otaka. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3272-3277. (査読有り)
3. FRET-based assay of the processing reaction kinetics of stimulus-responsive peptides: influence of amino acid sequence on reaction kinetics. A. Shigenaga, J. Yamamoto, H. Hirakawa, K. Yamaguchi, A. Otaka. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2212-2216. (査読有り)
4. N→S acyl-transfer-mediated synthesis of peptide thioesters using anilide derivatives. S. Tsuda, A. Shigenaga, K. Bandoh, A. Otaka.

- Org. Lett.* **2009**, *11*, 823-826. (査読有り)
5. Electrostatically constrained α -helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to Enfuvirtide. H. Nishikawa, S. Nakamura, E. Kodama, S. Ito, K. Kajiwara, K. Izumi, Y. Sakagami, S. Oishi, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, A. Otaka, N. Fujii, and M. Matsuoka. *Int. J. Cell. Biol.* **2009**, *41*, 891-899. (査読有り)
 6. Identification of minimal sequence for HIV-1 fusion inhibitors, H. Nishikawa, S. Oishi, M. Fujita, K. Watanabe, R. Tokiwa, H. Ohno, E. Kodama, K. Izumi, K. Kajiwara, T. Naitoh, M. Matsuoka, A. Otaka, and N. Fujii. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *20*, 9184-9187. (査読有り)
 7. Synthesis of a nucleocytoplasmic shuttle peptide possessing a stimulus-responsive amino acid. A. Shigenaga, D. Tsuji, N. Nishioka, S. Tsuda, K. Itoh and A. Otaka. *Chemical Biology* **2008**, *1*, 7-10. (査読有り)
 8. Heptad Repeat-Derived Peptides Block Protease-Mediated Direct Entry from the Cell Surface of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus but Not Entry via the Endosomal Pathway. M. Ujike, H. Nishikawa, A. Otaka, N. Yamamoto, N. Yamamoto, M. Matsuoka, E. Kodama, N. Fujii, and F. Taguchi. *J. Virology* **2008**, *82*, 588-592. (査読有り)
 9. Synthesis of a stimulus-responsive processing device and its application to a nucleocytoplasmic shuttle peptide. A. Shigenaga, D. Tsuji, N. Nishioka, S. Tsuda, K. Itoh and A. Otaka. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1929-1931. (査読有り)
 10. Synthesis of (Z)-alkene-containing cis-proline dipeptide mimetics using samarium(II) diiodide (SmI_2)-mediated reductive alkylation reaction. Y. Sasaki, A. Shigenaga, N. Fujii and A. Otaka. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2000-2008. (査読有り)
 11. Development of copper-mediated allylation of γ -activated- α,β -unsaturated lactam toward peptide mimetic synthesis. Y. Sasaki, K. Yamaguchi, T. Tsuji, A. Shigenaga, N. Fujii and A. Otaka. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3221-3224. (査読有り)
 12. A novel one-pot reaction involving organocopper-mediated reduction/transmetalation/asymmetric alkylation, leading to the diastereoselective synthesis of functionalized (Z)-fluoroalkene dipeptide isosteres. T. Narumi, A. Niida, K. Tomita, S. Oishi, A. Otaka, H. Ohno and N. Fujii. *Chem. Commun.* **2006**, *45*, 4720-4722. (査読有り)
 13. Stereoselective Synthesis of (Z)-Alkene-Containing Proline Dipeptide Mimetics. Y. Sasaki, A. Niida, T. Tsuji, A. Shigenaga, N. Fujii, and A. Otaka. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4969-4979. (査読有り)
 14. Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. T. Koide, Y. Nishikawa, S. Asada, C. M. Yamazaki, Y. Takahara, D. L. Homma, A. Otaka, K. Ohtani, N. Wakamiya, K. Nagata, and K. Kitagawa. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11177-11185. (査読有り)
 15. Synthesis of (Z)-Alkene and (E)-Fluoroalkene-Containing Diketopiperazine Mimetics Utilizing Organocopper-Mediated Reduction-Alkylation and Diastereoselectivity Examination Using DFT Calculations. A. Niida, M. Mizumoto, T. Narumi, E. Inokuchi, S. Oishi, H. Ohno, A. Otaka, K. Kitaura, and N. Fujii. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4118-4129. (査読有り)
 16. Stereoselective Synthesis of 3,6-Disubstituted-3,6-dihydropyridin-2-ones as Potential Diketopiperazine Mimetics Using Organocopper-Mediated anti-SN2' Reactions and Their Use in the Preparation of Low-Molecule CXCR4 Antagonists. A. Niida, H. Tanigaki, E. Inokuchi, Y. Sasaki, S. Oishi, H. Ohno, H. Tamamura, Z. Wang, S. C. Peiper, K. Kitaura, A. Otaka, and N. Fujii. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3942-3951. (査読有り)
 17. $\alpha 2$ Isoform-specific activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose at a physiological level activates glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle. M. Nakano, T. Hamada, T. Hayashi, S. Yonemitsu, L. Miyamoto, T. Toyoda, S. Tanaka, H. Masuzaki, K. Ebihara, Y. Ogawa, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa, A. Otaka,

T. Fushiki, and K. Nakao. *Metab. Clinic. Experiment.* **2006**, *55*, 300-308. (査読有り)

18. Unequivocal Synthesis of (Z)-Alkene and (E)-Fluoroalkene Dipeptide Isomers to Probe Structural Requirements of Peptide Transporter PEPT1 A. Niida, K. Tomita, M. Mizumoto, H. Tanigaki, T. Terada, S. Oishi, A. Otaka, K. Inui, and N. Fujii. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 613-616. (査読有り)
19. Cysteine-derived S-Protected Oxazolidinones: Potential Chemical Devices for the Preparation of Peptide Thioesters. Y. Ohta, S. Itoh, A. Shigenaga, S. Shintaku, N. Fujii, and A. Otaka. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 467-470. (査読有り)

[学会発表] (計 42 件)

1. 重永 章, 山本 純, 平川寛子, 山口圭子, 大高 章, 「任意の刺激応答型ペプチド結合切断デバイスの反応速度に与えるアミノ酸配列の影響」、日本薬学会第 129 回年会 (京都)、2009 年 3 月
2. 前田奈美, 津田修吾, 石澤祥衣, 重永 章, 大高 章, 「分子内 NCL を利用した環状ペプチド合成法の開発 (1)」、日本薬学会第 129 回年会 (京都)、2009 年 3 月
3. 西山由希子, 中本亜樹, 重永 章, 大高 章, 「分子内 NCL を利用した環状ペプチド合成法の開発 (2)」、日本薬学会第 129 回年会 (京都)、2009 年 3 月
4. 住川栄健, 津田修吾, 重永 章, 大高 章, 「蛋白質化学合成を指向した無保護ペプチドフラグメント順次縮合法の開発」、日本薬学会第 129 回年会 (京都)、2009 年 3 月
5. 平川寛子, 西岡直美, 山口圭子, 重永 章, 大高 章, 「光刺激応答型アミド結合切断反応のケージドセラミド創製への応用」、日本薬学会第 129 回年会 (京都)、2009 年 3 月
6. 平川寛子, 西岡直美, 山口圭子, 重永 章, 大高 章, 「光刺激応答型アミド結合切断デバイスを利用したケージドセラミドの創製」、創薬懇話会 2008 (徳島)、2008 年 12 月
7. 八巻陽子, 重永 章, 大高 章, 「分子内 redox 反応を利用したフルオロアルケンジペプチドイソスターの合成」、第 34 回

反応と合成の進歩シンポジウム (京都)、2008 年 11 月

8. 平川寛子, 西岡直美, 山口圭子, 重永 章, 大高 章, 「光刺激応答型アミド結合切断反応を利用したケージドセラミドの創製」、第 47 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (岡山)、2008 年 11 月
9. 前田奈美, 津田修吾, 重永 章, 大高 章, 「N-S アシルシフトを利用した環状ペプチドライブラリー構築の試み」、第 47 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (岡山)、2008 年 11 月
10. 森下 巧, 津田修吾, 前田奈美, 重永 章, 大高 章, 「ペプチド結合切断能を有する側鎖修飾型アスパラギンの開発」、第 47 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (岡山)、2008 年 11 月
11. 山本 純, 住川栄健, 西岡直美, 重永 章, 古田寿昭, 大高 章, 「近赤外二光子励起応答型ペプチド結合切断デバイスの開発」、第 47 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (岡山)、2008 年 11 月
12. 津田修吾, 前田奈美, 坂東清美, 重永 章, 大高 章, 「Synthesis of peptide thioester using N-substituted aniline derivatives」、第 45 回ペプチド討論会 (東京)、2008 年 10 月
13. 八巻陽子, 重永 章, 大高 章, 「Synthesis of fluoroalkene dipeptide isostere utilizing intramolecular redox reaction」、第 45 回ペプチド討論会 (東京)、2008 年 10 月
14. 重永 章, 西岡直美, 山本 純, 平川寛子, 住川栄健, 山口圭子, 大高 章, 「Influence of an amino acid sequence on kinetics of peptide bond cleavage reaction induced by a stimulus-responsive amino acid」、第 45 回ペプチド討論会 (東京)、2008 年 10 月
15. 住川栄健, 津田修吾, 重永 章, 大高 章, 「The application of peptide thioacids to NCL-type sequential condensation of peptide fragments」、第 45 回ペプチド討論会 (東京)、2008 年 10 月
16. 津田修吾, 重永 章, 辻 大輔, 西岡直美, 住川栄健, 伊藤孝司, 大高 章, 「Development of UV irradiation-responsive

- amino acid with peptide bond cleavage ability and its application to a nucleocytoplasmic shuttle peptide」、第22回内藤コンファレンス(札幌)、2008年9月
17. 住川栄健、津田修吾、重永 章、大高 章、「チオカルボン酸を利用した化学的蛋白質合成法の開発に関する研究」、第24回若手化学者のための化学道場(徳島)、2008年9月
 18. 大高 章、重永 章、西岡直美、辻 大輔、伊藤孝司、「Cleavage of peptide bonds for the preparation of functional peptides」、The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Drug Design and Development(仙台)、2008年5月
 19. 八巻陽子、重永 章、大高 章、「Synthesis of fluoroalkene dipeptide isosteres utilizing intramolecular redox reaction catalyzed by N-heterocyclic carbene」、The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Drug Design and Development(仙台)、2008年5月
 20. 重永 章、西岡直美、山本 純、大高 章、「任意の刺激応答型ペプチド結合切断デバイスの開発」、日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会(東京)、2008年5月
 21. 重永 章、辻 大輔、西岡直美、山本 純、津田修吾、伊藤孝司、大高 章、「ペプチド結合切断能を有する光応答型アミノ酸の開発と核-細胞質シャトルペプチドへの応用」、日本薬学会第128回年会(横浜)、2008年3月
 22. 津田修吾、前田奈美、重永 章、大高 章、「人工プロテインスプライシングシステムにおけるペプチド結合切断のための側鎖修飾型アスパラギンの検討」、日本薬学会第128回年会(横浜)、2008年3月
 23. 重永 章、辻 大輔、西岡直美、津田修吾、伊藤孝司、大高 章、「ペプチド結合切断能を有する刺激応答型アミノ酸の開発と核-細胞質シャトルペプチドへの展開」、第33回反応と合成の進歩シンポジウム(長崎)、2007年11月
 24. 重永 章、辻 大輔、西岡直美、津田修吾、伊藤孝司、大高 章、「Development of stimulus-responsive amino acid with peptide bond-cleavage ability and its application to a nucleocytoplasmic shuttle peptide」、第44回ペプチド討論会(富山)、2007年11月
 25. 津田修吾、前田奈美、西岡直美、重永 章、大高 章、「機能性ペプチドの創製を目指したアミド結合切断法の開発」、第46回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(高知)、2007年11月
 26. 八巻陽子、住川栄健、重永 章、大高 章、「N-ヘテロサイクリックカルベンを利用したフルオロアルケンイソスターの合成」、第46回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(高知)、2007年11月
 27. 山口圭子、辻 貴志、佐々木義一、重永 章、大高 章、「有機銅試薬を用いたS_N2'型アリル化反応の開発とプロリン型ジペプチドイソスターの合成」、第46回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(高知)、2007年11月
 28. 大高 章、重永 章、辻 大輔、西岡直美、津田修吾、伊藤孝司、「Development of amino acid derivative with amide cleavage ability and its use for the design of shuttle peptides」、4th International Peptide Symposium in conjunction with 7th Australian Peptide Conference and 2nd Asia-Pacific International Peptide Symposium(Queensland, Australia)、2007年10月
 29. 重永 章、辻 大輔、津田修吾、伊藤孝司、大高 章、「刺激応答型アミノ酸を利用した核-細胞質シャトルペプチドの開発」、日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(京都)、2007年5月
 30. 重永 章、津田修吾、大高 章、「外部刺激応答型ペプチドプロセシングデバイスの開発」、日本薬学会第127回年会(富山)、2007年3月
 31. 八巻陽子、重永 章、富田健嗣、鳴海哲夫、藤井信孝、大高 章、「N-ヘテロサイクリックカルベンによる分子内レドックス反応を利用したフルオロアルケンイソスターの合成」、日本薬学会第127回年会(富山)、2007年3月
 32. 重永 章、新宅沙織、大高 章、「外部刺激応答型ペプチドの合成と外部刺激応答能の検討」、第32回反応と合成の進歩シンポジウム(広島)、2006年12月

33. 重永 章、新宅沙織、大高 章、
「Development of Photo-responsive
Self-processing Peptides」、43rd Japanese
Peptide Symposium/4th Peptide Engineering
Meeting (横浜)、2006年11月
34. 辻 貴志、佐々木義一、山口圭子、重永
章、藤井信孝、大高 章、「Synthesis of
(Z)-alkene cis-Xaa-Pro type dipeptide
isosteres using organocopper-mediated
anti-S_N2' reactions」、43rd Japanese Peptide
Symposium/4th Peptide Engineering
Meeting (横浜)、2006年11月
35. 辻 貴志、佐々木義一、山口圭子、重永
章、藤井信孝、大高 章、「有機銅試薬を
用いたプロリン型(Z)-アルケンジペプチ
ドイソスターの立体選択的合成研究」、第
45回日本薬学会病院薬剤師会中国四国
支部学術大会 (広島)、2006年10月
36. 重永 章、新宅沙織、大高 章、「光刺激
応答型ペプチドの開発と速度論的検討」、
第7回長井長義記念シンポジウム (徳島)、
2006年9月
37. 重永 章、新宅沙織、大高 章、「Design,
Synthesis and Photo-processing Reaction of
Peptides Possessing the External
Stimulus-responsive Amino Acid」、29th
European Peptide Symposium (Gdansk,
Poland)、2006年9月
38. 佐々木義一、辻 貴志、新居田歩、重永
章、藤井信孝、大高 章、「Regio- and
Stereoselective Synthesis of (Z)-Alkene
cis-Xaa-Pro Dipeptide Mimetics with
Organocopper-mediated Anti-S_N2'
Reactions」、29th European Peptide
Symposium (Gdansk, Poland)、2006年9月
39. 大高 章、太田悠介、重永 章、藤井信
孝、「Development of Chemical Devices for
Chemical Ligations」、The 11th Akabori
Conference (Kloster Banz, Germany)、2006
年9月
40. 重永 章、新宅沙織、大高 章、
「Development of Photo-triggered
Self-processing Peptides」、ICOB-5 &
ISCNP-25 IUPAC International Conference
on Biodiversity and Natural Products (京都)、
2006年7月
41. 大高 章、太田悠介、重永 章、藤井信
孝、「Preparation of peptide thioester utilizing
S-protected oxazolidinone derived from
systeme」、The 11th Korea-Japan Joint
Symposium On Drug Design and
Development (Jeju Island, Korea)、2006年5
月
42. 佐々木義一、新居田歩、辻 貴志、重永
章、藤井信孝、大高 章、「Synthesis of
(Z)-alkene-containing Pro dipeptide isosteres
corresponding to cis-prolyl peptides」、The
11th Korea-Japan Joint Symposium On Drug
Design and Development (Jeju Island,
Korea)、2006年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大高 章 (OTAKA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・教授

研究者番号：20201973

(2) 研究分担者

重永 章 (SHIGENAGA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・教授

研究者番号：10423394