

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14336

研究課題名(和文)ピコリン誘導体を利用したペプチド可溶化タグの創生

研究課題名(英文)Study of a novel peptide solubilizing tag based on picoline derivative

研究代表者

朝比奈 雄也 (Asahina, Yuya)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：10737232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、難溶性ペプチドの溶解性を改善する「ペプチド可溶化タグ」の新規開発を目的として行った。可溶化タグの骨格には、溶解性の高さ、可溶化部分の拡張性に加えて最終段階で選択的に脱保護ができると予想されるピコリン骨格を選び、まずはその誘導体の合成から行った。しかし、初年度に報告したアリル基から足場にした官能基化と、次年度で報告したアミノグリニャール試薬からの合成ルートでは、最終的な目的化合物の保護体を効率良く得ることができなかった。ピコリン化合物の誘導には、さらなる検討、もしくは根本的に新しい合成ルートを模索する必要があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ピコリン骨格を誘導し、目的の誘導体を得ることが困難であることがわかった。しかし、新たな合成ルートを開拓し、可溶化タグの開発が実現されれば、難溶性ペプチドの合成を、通常の可溶ペプチドと同様に行えるようになることが期待される。その結果、従来では効率よく合成できなかった膜タンパク質の膜貫通ドメインなどを筆頭とする高疎水性ペプチド、タンパク質の汎用性の確立につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Study for a novel peptide solubilizing tag based on a picoline moiety was attempted. However, the desired picoline derivative could not be obtained due to difficulty of derivatization of pyridine component. These results show that a fundamental synthetic plan should be reframe to successfully proceed this project.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ペプチド化学 難溶性ペプチド 可溶化 ピコリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物のタンパク質の大半は、糖鎖付加、リン酸化、メチル化など、何らかの翻訳後修飾を受けて存在し、重要な生命現象に深く関わっていることが知られている。しかし、これら翻訳後修飾の機能は未だ不明瞭である。なぜなら、均一な翻訳後修飾が施されたタンパク質サンプルを調製する方法が確立しておらず、純粋なサンプルを利用した機能解析が難しいためである。化学合成法では、生化学的手法と異なり、均一かつ位置選択的に修飾が施されたサンプルを調製することが可能であるため、着目したいある構造の機能解析を系統的に行うことができる。こういった背景から、申請者らグループは、ペプチド固相合成法と、ペプチド同士を縮合するペプチドライゲーション法を駆使した効率的タンパク質合成方法、とりわけ、翻訳後修飾の一種である糖鎖付加がなされた糖タンパク質の合成法を確立してきた。この方法では、目的タンパク質から分割されたペプチドセグメント(部分配列)を固相法により組み立て、逆相 HPLC によって高純度に精製した後、それらを化学選択的に縮合することで、目的のタンパク質が得られる。これら方法を開発、改良することで、様々な糖タンパク質の合成に成功し、これら機能の理解を進めていこうとしている。

しかし、種々のタンパク質の合成を行う過程で、ペプチドセグメントの難溶性という問題にしばしば直面してきた。通常のペプチドは、ポリアミド結合と親水性アミノ酸側鎖の高い極性により、水溶性が高い。したがって、固相合成後の粗生成ペプチドの精製は、酸性水溶液を移動相とした逆相 HPLC により行われる。しかし、あるタンパク質の部分ペプチドや膜タンパク質などは、非極性アミノ酸残基を多く含み、水に対する親和性が極めて低い。加えて、等電点が低い酸性ペプチドであることも多い。これら性質が相まって、酸性の逆相 HPLC 条件下では電荷を持つことができず、疎水性相互作用によって凝集してしまい、精製どころか、どのような溶媒にも、溶解させることすら不可能になる(図1)。タンパク質合成では、高純度の前駆体を利用することが大前提であるため、難溶性の問題は、合成計画を根底から狂わせる大きな問題となる。我々は、この解決方法として、難溶性ペプチドの水溶性を高める親水性保護基、ピコリル(Pic)基を、先行研究にて開発した。Pic 基は、ピリジン部分が精製条件下でプロトン化されるため、高い極性をペプチド鎖に与える。その上、グルタミン酸側鎖カルボン酸にエステル型で導入することで電荷を反転し、効率よく等電点を上昇させることも可能である。加えて、合成の最終段階であっても、亜鉛還元により、容易に除去できることも大きな利点もある。しかし、この Pic 基をその他の難溶性ペプチドへ応用する際に、ある問題が浮上した。それは、十分に溶解性を高めるためには、複数箇所に Pic 基を導入しなければならないこと、である。すなわち、難溶性ペプチドには、導入可能な官能基が少ない場合が多く、この方法だけで効果的に可溶化させることは難しい。1つの可溶化タグでも十分な効果を得るべく、可溶化部位の拡張や設計が、柔軟かつ簡便に行うことのできる新しい可溶化タグが求められていた。

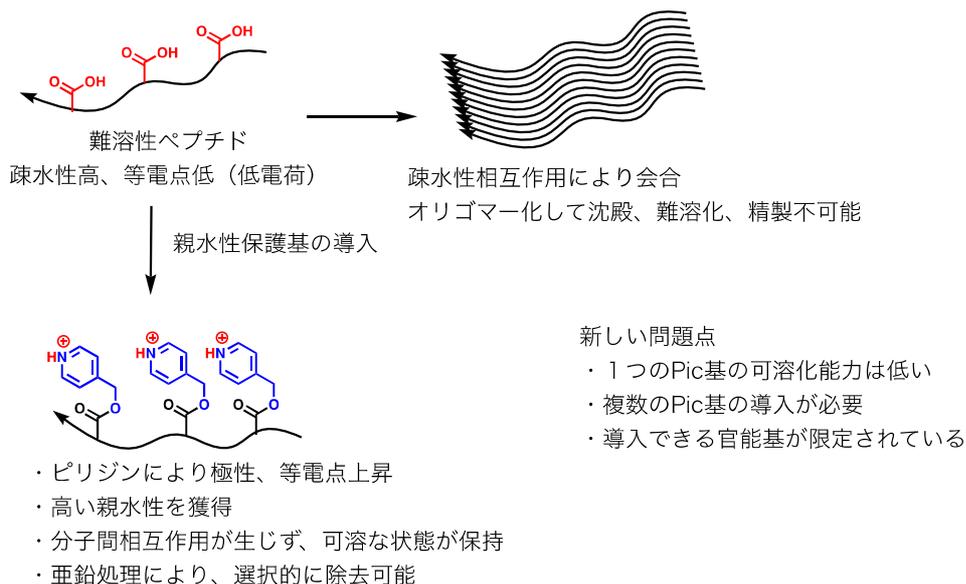


図1 難溶性ペプチドの特徴と、凝集メカニズム

### 2. 研究の目的

先行研究で開発された Pic 基は、タンパク質の可溶化タグとしてふさわしい特性を持っている反面、新たな問題点も浮かび上がってきた。それは、Pic 基1つの可溶化能力が低く、難溶性に応じて多数の Pic 基の導入が求められることである。そこで、この弱点を克服すべく、Pic 基を改変し、従来のピリジン部分に加えて、ペプチド鎖の組み立て後に親水性部分の拡張が可能な新

規可溶化タグを設計した(図2)。この可溶化タグには、2つのアミノプロピル基の保護基を除去した後、生じたアミノ基を足場に任意の親水性化合物を2つ導入することができる。これら操作は、全て固相担体上で完結されるため、液相法では扱いにくい吸湿性の高極性化合物などでも、容易に導入することができる。さらに、Fmoc-保護 Arg、もしくは His などを用いれば、通常の固相合成法と同じ操作で、親水性部分を繰り返して拡張することも可能である。従来の Pic 基では、1つにつき1つの電荷を与えることしかできなかったのに対して、この可溶化タグならば、1つのタグに対して多数の電荷を与えることができる上に、導入する親水性化合物をも柔軟に選択することもできるため、より強力かつ汎用性に富む可溶化タグが創生されると期待している。

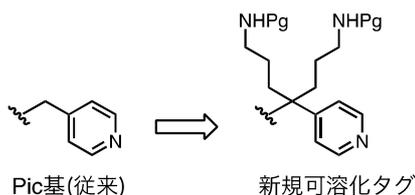


図2 新規可溶化タグの構造

### 3. 研究の方法

本可溶化タグの具体的利用法について述べる。初めに、新規可溶化タグであるピコリン誘導体の合成を行う。次に、得られた可溶化タグをグルタミン酸に組み込んだものを調製する。その後、通常の Fmoc 固相法により、ペプチド鎖を伸長し、可溶化タグ付きアミノ酸誘導体も同様に導入する。ペプチド伸長終了後、ここで可溶化に適した親水性化合物の模索を行う。次に、一部脱樹脂処理を行い、難溶性ペプチドの溶解性が十分に確保されたのか確認する。もし、可溶化できなかった場合でも、残していた中間体ペプチド樹脂から、速やかに親水性部分の再設計を行うことができる。膜タンパク質など、極度の難溶性が予想される場合は、Fmoc 保護 Arg もしくは His を使用すれば、固相法と同じ操作で、繰り返し伸長することができるため、良好な溶解性が得られるまで、可溶化部分を拡張することが可能になる。従来の方法では、ペプチドの可溶化に必要な Pic 基の個数を予想することは難しく、いわば勘で導入数を決めざるを得なかった。それでも難溶性が改善されなかった場合は、最初から合成設計組み立て直す必要があった。しかし、この可溶化タグならば、ペプチド鎖の組み立てを終えた中間体ペプチド樹脂から、親水性化合物の導入と伸長を、すべて固相上で行うことが可能である。すなわち、十分な溶解性が得られるまで、導入化合物を自在に置換し、可溶ペプチドへ迅速に誘導することが可能となる。

### 4. 研究成果

まずは、ピコリン誘導体の調製に着手した(図3)。市販のイソニコチン酸エチル1を出発原料に対して、アリルグリニャール試薬を反応させ、3級アルコール2を得た。次に、アルコールをトリメチルシリル基で保護した後、オレフィンに対して、ヒドロホウ素化続く、酸化反応により、末端アルコールを持つ4の合成を検討した。しかし、ヒドロホウ素化反応時に、ボラン付加の位置選択性が得られなかったため、酸化後の目的のジオールは、分離が不可能な異性体の混合物となった。次に、ボランの付加位置選択性が高いとされるジシamilボランを反応に利用した。しかし、この反応では、ボランの付加反応が完全に進まず、酸化後に得られた目的物4は、追跡量でしか得られなかった。その後、種々のハイドロボレーション試薬を検討したが、満足に目的化合物を与える条件はなかった。そこで、遊離のアルコールを保護せず、化合物2をそのままハイドロボレーション、続く酸化を試みた結果、低収率ながら、目的のトリオール5を得た。3級アルコールのみを選択的に保護し、4を得た後、メシル化、続くフタルイミド化にて、化合物6を低収率(18%)ながら得た。次にフタルイミドの除去と続くアリルオキシカルボニル化を行ったものの、この系では、複雑な混合物を与え、目的物7の単離には至らなかった。これら検討の結果により、この合成経路では効率よく可溶化タグを調製することは難しいと判断した。上記の合成ルートでは、3級アルコールを構築後、複数の工程を経て窒素官能基化する必要があり、その途中で様々な問題が生じていた。この問題を回避すべく、出発原料と反応させるグリニャール試薬に予め窒素官能基を導入することで、ピコリン化合物の状態での誘導工程を削減することにした。新たに使用するグリニャール試薬は、グリニャール試薬の調製や反応中において安定で、なおかつ誘導が容易であると考えられるジアリルアミン8を設計し、1-ブromo-2-クロロプロパンから2工程で調製した。得られた8をイソニコチン酸エステル1と加熱還流下で反応させることで、目的のビスジアリルアミノプロピル基が導入された化合物9を得た。次に、4つのアリ

ル基を脱保護する検討を行った。しかし、アルキルアミン上のアリル基は、予想以上に安定であったため、種々の処理条件では、完全に脱保護することができなかった。例えば、常法のテトラキストリフェニルホスフィンパラジウムを用いた系では、部分的な反応のみしか確認されなかった。また、この反応で共存させるアリル補足剤の検討も同時に行ったが、目立った反応効率の改善には至らなかった。また、強塩基性条件下 ( $t\text{-BuOK}$ , DMSO) でアリル基の異性化を試したものの、全く反応は進行しなかった。一方、強酸性条件下では、化合物自体の分解反応が見られた。

以上の報告のように、目的の可溶化タグの誘導は、未だ成功しておらず、別の合成ルートを新たに計画する、もしくは、可溶化タグの構造を変更する必要があるものと思われる。

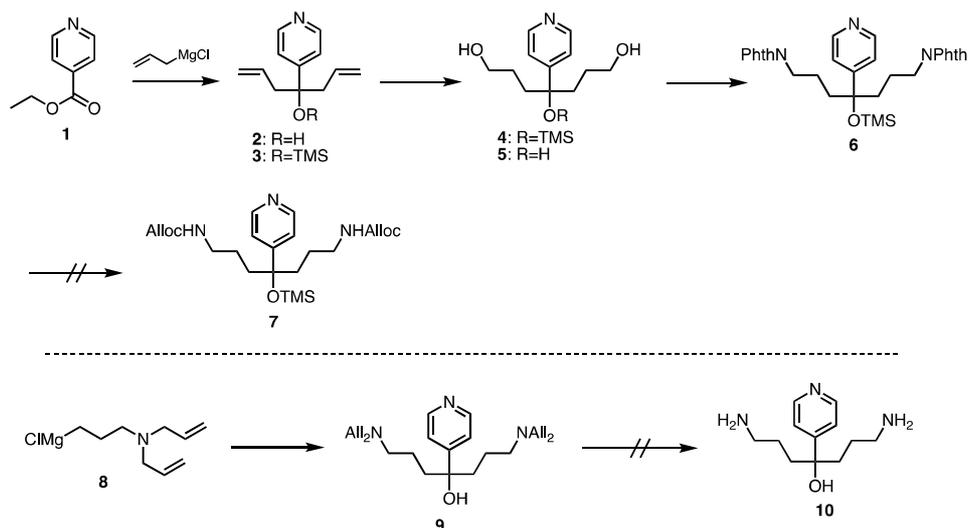


図2 可溶化タグの合成経路

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda Naoki, Takei Toshiki, Asahina Yuya, Hojo Hironobu	4. 巻 24
2. 論文標題 Sialyl Tn Unit with TFA-Labile Protection Realizes Efficient Synthesis of Sialyl Glycoprotein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 2593-2597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201706127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asahina Yuya, Kawakami Toru, Hojo Hironobu	4. 巻 2019
2. 論文標題 Glycopeptide Synthesis Based on a TFA-Labile Protection Strategy and One-Pot Four-Segment Ligation for the Synthesis of O-Glycosylated Histone H2A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1915-1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201801885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nimura Yuka, Kabayama Kazuya, Asahina Yuya, Hanashima Shinya, Hojo Hironobu, Murata Michio, Fukase Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of electrostatic interaction between ganglioside GM3 and transmembrane peptide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Conference Proceedings	6. 最初と最後の頁 20020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5089453	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asahina Yuya, Hojo Hironobu	4. 巻 85
2. 論文標題 One Step Synthesis of Fmoc-Aminoacyl-N-alkylcysteine via the Ugi Four-Component Condensation Reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1458 ~ 1465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b02433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 朝比奈雄也、川上徹、北條裕信
2. 発表標題 4 - メチルベンジル保護とワンポットライゲーションを利用した糖付きヒストンH2Aの化学合成
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuya Asahina, Toru Kawakami, Hironobu Hojo
2. 発表標題 Synthesis of histone H2A carrying O-(N-acetylglucosamine) by using novel GlcNAc-Ser unit and one-pot ligation method
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤駿、朝比奈雄也、北條裕信
2. 発表標題 糖ペプチド合成を志向したシアル酸カルボキシ保護基の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈雄也
2. 発表標題 精密有機化学による特異的修飾タンパク質の合成
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会、シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 朝比奈雄也
2. 発表標題 糖タンパク質合成を志向した糖鎖合成法の開発
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー、30代研究者が切り拓くタンパク質化学合成の新潮流（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈雄也、北條裕信
2. 発表標題 Facile synthesis of Fmoc-aminoacyl-N-alkylcysteine dipeptide by Ugi multi-component reaction
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤駿、朝比奈雄也、北條裕信
2. 発表標題 糖ペプチド合成のためのシアル酸カルボキシ基保護基の検討
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤駿、朝比奈雄也、北條裕信
2. 発表標題 シアル酸を有する O-結合型糖アミノ酸の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤達也、朝比奈雄也、北條裕信
2. 発表標題 ペプチド上の -フコシル結合の安定性の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学蛋白質研究所 蛋白質有機化学研究室 <a href="http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/index.html">http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/index.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考