

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659055

研究課題名（和文） 高選択的速度論支配ペプチド結合形成反応を基盤とするタンパク質化学合成法の開拓

研究課題名（英文） Development of methodology for chemical synthesis of proteins based on kinetically controlled peptide bond formation

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（和文）：N-Sulfanylethylanilide (SEAlide と略)をチオエステル等価体としたペプチド結合形成反応について詳細な検討を加えた。SEAlide ユニットはリン酸塩が存在する条件では、チオエステルとして機能し、ペプチド結合形成反応に関与できるが、リン酸が存在しない条件では反応に関与することができない。この実験事実に基づき、SEAlide を利用した速度論的ペプチド結合形成反応の確立を行った。SEAlide を利用した速度論的反応は極めて速度論的選択性が高く、3 あるいは 4 つのペプチドフラグメントを連続的に縮合することを可能とする方法論である。これを利用することで 162 残基からなる糖タンパク質 GM2AP の化学合成に成功した。

研究成果の概要（英文）：N-Sulfanylethylanilide (SEAlide) peptides were developed with the aim of achieving facile synthesis of peptide thioesters. The SEAlide moiety was proved to function as a thioester in the presence of phosphate salts and to participate in native chemical ligation (NCL) with N-terminal cysteinyl peptides, and this has served as a powerful protein synthesis methodology. The reactivity of a SEAlide peptide (anilide vs thioester) can be easily tuned with or without the use of phosphate salts. This interesting property of SEAlide peptides allows sequential three-fragment or unprecedented four-fragment ligation for efficient one-pot peptide/protein synthesis. Chemical synthesis of 162-residue GM2AP was achieved using the kinetically controlled ligation based on the SEAlide chemistry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ペプチド、チオエステル、速度論的支配、Native Chemical Ligation

1. 研究開始当初の背景

Native Chemical Ligation (NCL)法の開発によりタンパク質化学合成は飛躍的に身近なものとなった。この NCL 法はペプチドチオエステルと N 末端システインペプチド間の化学選択的反応を特徴とするもので大変

有用性の高い方法論である。しかし、この NCL 方にもいくつかの改善点が残されていた。一つは必須の合成ユニットであるペプチドチオエステルを簡便に如何にして合成するかである。これについて、我々は現在のペプチド合成の主流である Fmoc 法で簡便に合

成可能な前駆体として N-sulfanylethylanilide (SEAlide) ペプチドの開発、合成を手掛けてきた。もう一つの課題は、ペプチドチオエステルフラグメントを連続的に NCL 反応に付し、タンパク質化学合成に適用できるのかどうかという課題であった。これについてアルキルチオエステルとアリールチオエステルの反応性の差を利用した速度論的方法論が開発されてきたが、その選択性は充分ではなかった。我々は、単なるチオエステル等価体と考えていた SEAlide peptide が興味深い反応性を示すことを偶然見出し、これを展開することで高選択的な速度論支配型のペプチド結合形成反応の開拓に挑戦することにした。

2. 研究の目的

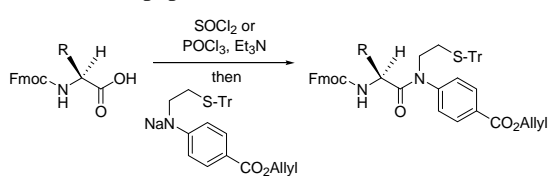
本研究では上述の SEAlide peptide を利用した高選択的・速度論的コントロール下での連続的フラグメント縮合法による長鎖タンパク質完全化学合成法の確立を本研究の目的とした。ペプチドチオエステル N 末端システインペプチドフラグメントという 2 つのユニットを縮合させる Native Chemical Ligation (NCL) 法は、小分子タンパク質 (50~70 残基程度) の化学合成法として有用性が高い。本法の長鎖タンパク質合成への実用的展開には、連続的 NCL 法が必要である。まず効率的・速度論的 NCL 法の確立を行い、次いで実際のタンパク質化学合成に挑戦することとした。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するため、「効率的かつ汎用性の高い SEAlide peptide の合成」、「SEAlide peptide の NCL 反応の詳細な検討」、「連続的 NCL 反応への応用とタンパク質合成への展開」、これら 3 つの目標を年次進行に伴い順次行った。いずれの研究計画も基本的に有機化学的実験の範疇のものであるが、最後のタンパク質合成への展開については実際の合成タンパク質の生理活性の検討も実施する計画を立てた。

4. 研究成果

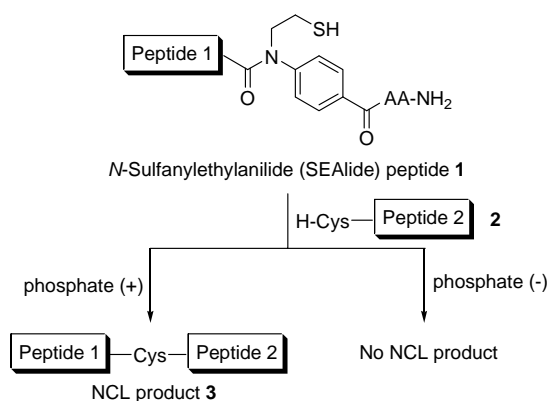
(1) SEAlide peptide の効率的合成法の確立



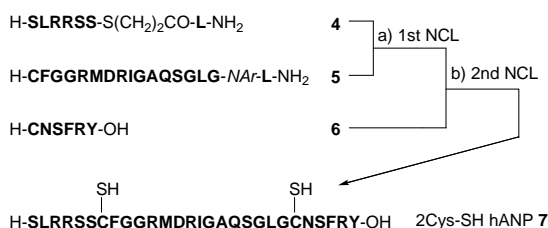
以前の研究より、SEAlide peptide の有用性は報告してきたが、合成可能であった SEAlide peptide は末端が Gly および Ala に限定されていた。これは 2 級芳香族アミンをアシル化する

必要があるという点が足かせとなっていた。そこで種々の版の条件の検索を通じて、アミノ酸 20 種類のに適用可能な反応条件として、POCl₃ および SOCl₂ を利用する方法論を開発し、その有用性を明らかにした。

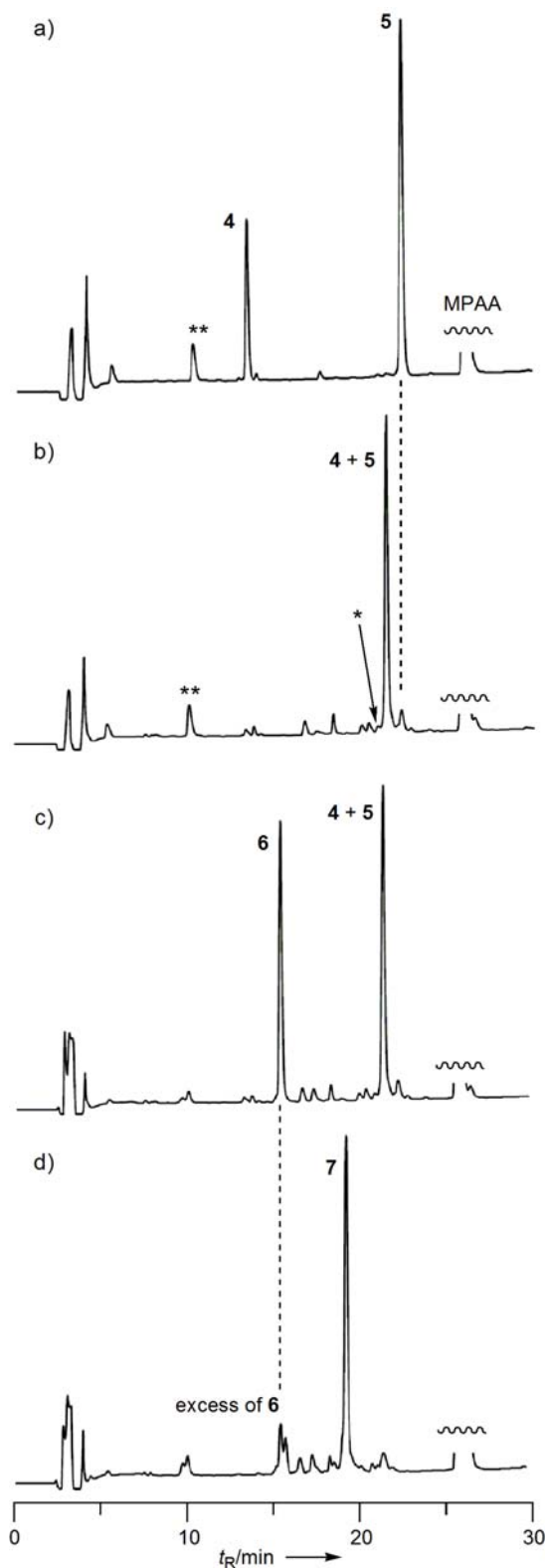
(2) SEAlide を利用した速度論的・反応の開発当初、SEAlide peptide は、酸性条件でチオエステル体へと変換され、NCL 反応に利用可能であると報告してきた。しかし、副反応の詳細な解析を通じて、リン酸塩が存在する条件では SEAlide peptide はチオエステルとして機能するが、塩が存在しない条件ではチオエステルとはならず、アニリド型で安定に存在する。すなわち、リン酸塩の有無によって反応コントロールが可能であるとの結果を得た (下図)。



この成果をを利用して、モデルペプチドを 3 つあるいは 4 つのフラグメントから one-pot で連続的に縮合し、その合成を達成した。その hANP の合成スキームを下図に示した。



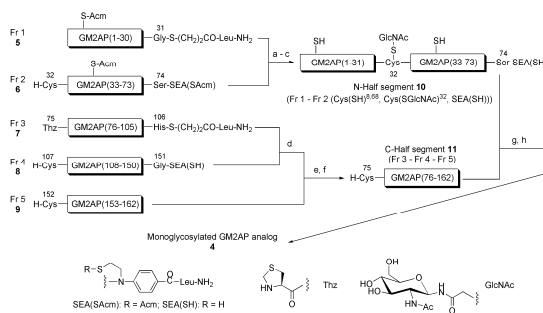
この hANP 合成では、3 つの縮合反応を同一反応容器内で行い、最初の NCL 反応はリン酸が存在しない条件、2 段階目の NCL 反応ではリン酸塩が存在する条件で反応を行った。速度論的分割は極めて効率的に進行し、従来のアルキルチオエステルとアリールチオエステルを利用した反応に比し、極めて高い選択性で反応が進行した。次ページに反応進行の HPLC を示した。その選択性の高さを知ることができる。



(3) GM2AP の化学合成

GM2AP はアミノ酸 162 残基からなる糖タンパク質である。SEAlide を利用した速度論的反応をにより GM2AP の化学合成を達成した。全体を 5 つのフラグメントに分割し、N 末側を 2 つのフラグメントから、C 末側を 3 つの

フラグメントから構築した。特に C 末側フラグメントについては SEAlide peptide を利用した one-pot/sequential NCL 法を採用した(下図)。



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 13 件)

1. Sato, K.; Shiganaga, A.; Kitakaze, K.; Sakamoto, K.; Tsuji, D.; Itoh, K. Otaka, A. Chemical Synthesis of Biological Active Monoglycosylated GM2-activator Protein Using N-sulfanylethylanilide peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, (doi: 10.1002/anie.201303390) (査読有).
2. Tanegashima, K.; Suzuki, K.; Nakayama, Y.; Tsuji, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A.; Hara, T. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12–CXCR4 signaling axis. *FEBS Letters* **2013**, (doi:10.1016/j.febslet.2013.04.046) (査読有).
3. Shigenaga, A.; Ogura, K.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ebisuno, K.; Miyamoto, L.; Ishizawa, K.; Tsuchiya, K.; Otaka, A. Development of a Reduction-Responsive Amino Acid that Induces Peptide Bond Cleavage in Hypoxic Cells. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 968-971 (doi:10.1002/cbic.201200141) (査読有).
4. Sakamoto, K.; Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Tsuda, S.; Hibino, H.; Nishiuchi, Y.; Otaka, A. Synthetic Procedure for N-Fmoc Amino Acyl-N-Sulfanylethylaniline Linker as Crypto-Peptide Thioester Precursor with Application to Native Chemical Ligation. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6948-6958 (doi: 10.1021/jo3011107) (査読有).
5. Otaka, A.; Sato, K.; Ding, H.; Shigenaga, A. One-Pot/Sequential Native Chemical Ligation Using N-Sulfanylethylanilide Peptide. *The Chemical Record* **2012**, *12*, 479-490 (doi: 10.1002/tcr.201200007) (査読有).
6. Ogura, K.; Shigenaga, A.; Ebisuno, K.; Hirakawa, H.; Otaka, A. Fmoc-based solid-phase synthesis of adenylylated

- peptides using diester-type adenylylated amino acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3429-3432 (doi:10.1016/j.tetlet.2012.04.063) (査読有).
7. Yamamoto, J.; Tanaka, T.; Denda, M.; Shigenaga, A.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Otaka, A. Design and Synthesis of Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. *Biopolymers* **2011**, *96*, 492-492 (査読有).
 8. Tsuji, K.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Shigenaga, A.; Hara, T.; Otaka, A. Synthesis of CXCL14 and its derivatives utilizing C to N or N to C directive sequential NCL protocol. *Biopolymers* **2011**, *96*, 447-447. (査読有)
 9. Tsuji, K.; Shigenaga, A.; Sumikawa, Y.; Tanegashima, K.; Sato, K.; Aihara, K.; Hara, T.; Otaka, A. Application of N-C- or C-N-directed sequential native chemical ligation to the preparation of CXCL14 analogs and their biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4014-4020 (doi:10.1016/j.bmc.2011.05.018) (査読有).
 10. Shigenaga, A.; Hirakawa, H.; Yamamoto, J.; Ogura, K.; Denda, M.; Yamaguchi, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. Design and synthesis of caged ceramide: UV-responsive ceramide releasing system based on UV-induced amide bond cleavage followed by O-N acyl transfer. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3984-3990. (査読有)
 11. Sato, K.; Tsuda, S.; Tsuji, K.; Sakamoto, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. N-sulfanylethylanyl derivative as a peptide thioester equivalent. *Biopolymers* **2011**, *96*, 445-445 (査読有).
 12. Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Tsuda, S.; Sumikawa, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. N-Sulfanylethylanyl Peptide as a Crypto-Thioester Peptide. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1840-1844 (doi:10.1002/cbic.201100241) (査読有).
 13. Ding, H.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Morishita, K.; Otaka, A. Dual Kinetically Controlled Native Chemical Ligation Using a Combination of Sulfanylproline and Sulfanylethylanyl Peptide. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5588-5591 (doi:10.1021/ol202316v) (査読有).

[学会発表] (計 50 件)

1. Otaka, A. Chemical Protein Synthesis Using N-Sulfanylethylanyl Peptide. The 14rd Akabori Conference, 北海道 (2012年9月12日)
2. Otaka, A. N-Sulfanylethylanylides as a Versatile Chemical Device for the Protein

Chemistry. 2012 SNU symposium on Medicinal Chemistry, ソウル大学, Seoul, Korea (2012年5月15日)

3. 大高 章「情報発信型人工タンパク質創製に向けた有機・生物有機化学的挑戦」第101回有機合成シンポジウム2012年【春】、慶應義塾大学、東京都 (2012年6月6日)
4. 大高 章、重永 章「Development of nucleocytoplasmic shuttle peptide using stimulus-responsive processing device」日本生物物理学会第49回年会、兵庫県立大学、兵庫県 (2011年9月16日)

[図書] (計 2 件)

1. 大高 章「第12章 生理活性ペプチドホルモン」生体有機化学 (東京化学同人)、141-148、**2012**.
2. 重永 章、山本 純、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への応用」遺伝子医学MOOK 21号 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 (木曾良明 編)、メディカルドゥ、168-172、**2012**.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/otaka/>

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：