

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590010

研究課題名(和文) 様々なアミノ酸サイトでのペプチドフラグメント縮合を可能とする高汎用性補助基の開発

研究課題名(英文) Development of auxiliaries for ligation of peptides at a site other than cystein

研究代表者

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・講師

研究者番号：10423394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々なアミノ酸サイトでのペプチドフラグメント縮合を可能とする高汎用性補助基の開発を目的とした。タンパク質化学合成では、まずペプチドフラグメントを固相合成した後、これらフラグメントを液相にて縮合する。従来の縮合法では縮合サイトにシステイン(Cys)残基が必須となるため、合成可能なタンパク質に限られる。本研究ではこの制約を打破するため、Cys側鎖模倣型補助基を利用したCys不要なフラグメント縮合法の確立を目指した。この結果、補助基の開発に成功するとともに、アスパラギン部位でのペプチドフラグメント縮合に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, development of auxiliaries for ligation of peptides at a site other than cystein was challenged. The auxiliary that can be removed by UV-irradiation was synthesized and was incorporated onto a side chain of asparagine (Asn). Ligation of peptides at Xaa-Asn site was successfully achieved by the use of the Asn derivative via auxiliary assisted ligation followed by photo-removal of the auxiliary. Application of the auxiliary to amino acids other than Asn is in progress.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：Native Chemical Ligation フラグメント縮合 タンパク質化学合成 光解離性補助基

1. 研究開始当初の背景

多くの医薬品は、タンパク質と相互作用することによりその作用を発現する。すなわち、これらタンパク質の機能解明は、医薬品の作用機序解明などを経て新薬開発につながる可能性がある。タンパク質の機能解明研究において、蛍光色素などのレポーター分子を導入したタンパク質が汎用される。近年、タンパク質機能のより精密かつ詳細な解明を目指し、特定部位のみにレポーター分子を有するタンパク質が求められている。

特定部位のみが修飾されたタンパク質の調製法の一つとして、タンパク質化学合成の利用が挙げられる。タンパク質の化学合成では、まずペプチドフラグメントを固相合成した後、これらフラグメントを液相にて縮合する。縮合法としては近年、二つの無保護フラグメント同士の化学選択的縮合を可能とする Native Chemical Ligation (NCL) が最も汎用されている。この方法では、まずペプチドチオエステルがシステイン (Cys) 含有ペプチドとの $S \rightarrow S$ アシル基転移反応をおこす。その後、生じた中間体の分子内 $S \rightarrow N$ アシル基転移反応が進行し、縮合生成物を与える。すなわち、NCL を利用するには、縮合サイトに Cys 残基が必須となる。このため、NCL は非常に有用な反応であるにもかかわらず、合成可能なタンパク質に限られるという問題があった。

近年、この問題点を解決するため、非 Cys サイトでのフラグメント縮合法が盛んに開発されている。その多くは、アミノ酸側鎖上にチオール基を導入し、NCL 同様の反応を行った後に脱硫反応に付した後、対応する天然型アミノ酸へと変換するものである。例えば我々は、メルカプトプロリン含有ペプチドの NCL 様反応と続く脱硫により、プロリンサイトでのフラグメント縮合に成功している。本手法を用いて様々なアミノ酸サイトにて縮合反応を行う場合、それぞれに対応するチオール導入型アミノ酸誘導体の多段階合成が必須となり、煩雑を極める。さらに脱硫反応ではシステインがアラニンへ還元されるため、本手法の Cys 含有タンパク質合成への直接的適用は困難である。

以上の問題点克服を目指し我々は、種々の市販アミノ酸誘導体側鎖上に簡便に導入可能であり、かつ紫外線を照射するのみで除去可能なチオール含有高汎用性補助基を開発し、これを用いた Cys 以外のアミノ酸サイトでのフラグメント縮合法を確立することとした。

2. 研究の目的

本研究では、様々なアミノ酸サイトでのペプチドフラグメント縮合を可能とする高汎用性補助基の開発を目的とした。タンパク質化学合成では、まずペプチドフラグメントを固相合成した後、これらフラグメン

トを液相にて縮合する。従来の縮合法では縮合サイトに Cys 残基が必須となるため、合成可能なタンパク質に限られる。本研究ではこの制約を打破するため、Cys 側鎖模倣型補助基を利用した Cys 不要なフラグメント縮合法の確立を目指した。

3. 研究の方法

我々は、以下の計画に従って順次研究を進めた。

- (1) 補助基誘導体の合成：種々アミノ酸への導入を念頭に置き、各種の補助基誘導体を合成する。
- (2) 保護アミノ酸への導入：(1)より得られる補助基を市販のアミノ酸誘導体上へ導入した後、必要に応じて保護基の除去などを行い、Fmoc 固相ペプチド合成法に適した補助基含有アミノ酸誘導体を得る。
- (3) ペプチドへの導入：(2)より得られるアミノ酸誘導体を導入したペプチドを、Fmoc 固相合成法を用いて合成する。
- (4) NCL 様反応の検討：(3)より得られる補助基含有ペプチドを用いた NCL 様反応の反応条件検討を行う。NCL 様反応が進行しない場合は、補助基の再設計を行う。
- (5) 補助基の除去：(4)より得られる縮合生成物への紫外線照射実験を行い、補助基除去のための最適条件探索を行う。

4. 研究成果

アスパラギン (Asn) 部位でのフラグメント縮合に挑戦した。まず補助基を設計・合成したのち、Asn 側鎖への導入に成功した。さらに本アミノ酸のペプチドへの導入法を確立したのち、これを用いたフラグメント縮合を達成した。その後、反応を精査したところ、二つの課題が明らかとなった。すなわち、我々の開発したフラグメント縮合反応が従来の NCL に比べて遅いこと、および補助基除去に用いる紫外線照射がシステイン側鎖の副反応を誘起することの二点である。そこでこれらの原因を調査した結果、前者は中員環遷移状態を経ることが反応速度を低下させていること、そして後者はチイルラジカルが副反応を誘起していることが示唆された。前者については反応は遅いながらも生成物が得られることからこれ以上検討せず、本研究では後者についてさらなる研究を行った。この結果、溶媒組成や光量の変更により、副反応を大幅に抑制することに成功した。現在、Asn 以外のアミノ酸部位でのフラグメント縮合を目指して、さらなる研究を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Aihara, K.; Inokuma, T.; Komiya, C.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Synthesis of

lactam-bridged cyclic peptides by using olefin metathesis and diimide reduction” *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4183-4191.

(doi: 10.1016/j.tet.2015.04.093)

査読有

Yamamoto, J.; Maeda, N.; Komiya, C.; Tanaka, T.; Denda, M.; Ebisuno, K.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; Otaka, A. “Development of a fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker” *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5122-5127.

(doi: 10.1016/j.tet.2014.05.110)

査読有

Yamamoto, J.; Denda, M.; Maeda, N.; Kita, M.; Komiya, C.; Tanaka, T.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; Otaka, A. “Development of a traceable linker containing a thiol-responsive amino acid for the enrichment and selective labelling of target proteins” *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3821-3826.

(doi: 10.1039/C4OB00622D)

査読有

Ebisuno, K.; Denda, M.; Ogura, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A. “Development of caged non-hydrolyzable phosphoamino acids and application to photo-control of binding affinity of phosphopeptide mimetic to phosphopeptide-recognizing protein” *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2984-2991.

(doi: 10.1016/j.bmc.2014.04.002)

査読有

重永 章、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」*化学工業 (特集 ペプチド化学の新潮流 (1))* **2014**, *65*, 849-856.

査読無

Nakamura, T.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Tsuda, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. “Examination of native chemical ligation using peptidyl prolyl thioester” *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 58-60.

(doi: 10.1039/C3CC47228K)

査読有

Sato, K.; Shigenaga, A.; Kitakaze, K.; Sakamoto, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. “Chemical synthesis of biologically active monoglycosylated GM2-activator protein analog using *N*-sulfanylethylanilide peptide” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7855-7859.

(doi: 10.1002/anie.201303390)

査読有

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

重永 章「刺激応答型アミノ酸の開発とケミカルバイオロジー分野への展開」*薬学雑誌* **2012**, *132*, 1075-1082.

(doi: 10.1248/yakushi.132.1075)

査読有

Otaka, A.; Sato, K.; Ding, H.; Shigenaga, A. “One-pot/sequential native chemical ligation using *N*-sulfanylethylanilide peptide” *Chem. Record* **2012**, *12*, 479-490.

(doi: 10.1002/tcr.201200007)

査読有

[学会発表](計28件)

重永 章「Peptide/Protein-based Chemical Biologyのための基盤技術の開発」第18回スクリプス・バイオメディカルフォーラム、阪急ターミナルスクエア(大阪府大阪市)、2014年11月22日

重永 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」2014年日本化学会中国四国支部大会、山口大学(山口県山口市)、2014年11月8-9日

大高 章、重永 章「インテインに学ぶ標的タンパク質研究手法の開発」日本薬学会第134回年会、熊本大学(熊本県熊本市)、2014年3月27-30日

重永 章「SEAlide as thioester equivalent for chemical synthesis of proteins」4th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Application Symposium、舞子ビラ(兵庫県神戸市)、2013年11月2-4日

重永 章「Development of stimulus-responsive amino acid and its application to chemical biology」International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan、東北大学(宮城県仙台市)、2013年9月28-30日

重永 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への応用」生命分子機能研究会2013 学術集会「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」、長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)、2013年9月19-20日

山本 純、北 未来、重永 章、佐藤陽一、山内あい子、大高 章「標的タンパク質の精製・選択的ラベル化ツール「トレーサブルリンカー」の開発」日本薬学会第133回年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2013年3月27-30日

北 未来、山本 純、戎野紘司、重永 章、大高 章「過酸化水素応答型アミノ酸の開発研究」日本薬学会第133回年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2013年3月27-30日

戎野紘司、傳田将也、小倉圭司、寺脇 拓、重永 章、大高 章「ケージド非水解性リン酸化アミノ酸含有ペプチドの合成とタンパク質結合能の評価」第30回メディスン

ナルケミストリーシンポジウム、タワーホール船堀（東京都江戸川区）2012年11月28-30日
佐藤浩平、北風圭介、坂本 健、重永 章、辻 大輔、伊藤孝司、大高 章「リソソーム病治療薬を指向したヒトGM2活性化タンパク質誘導体の化学合成と活性評価」第30回メディシナルケミストリーシンポジウム、タワーホール船堀（東京都江戸川区）2012年11月28-30日
辻 耕平、種子島幸祐、重永 章、栗飯原圭佑、丁 昊、傳田将也、原 孝彦、大高章「CXCL14受容体の同定とそのアンタゴニストペプチドの合成」第30回メディシナルケミストリーシンポジウム、タワーホール船堀（東京都江戸川区）2012年11月28-30日
山本 純、傳田将也、戎野紘司、重永 章、佐藤陽一、山内あい子、大高 章「フッ化物イオン応答型トレーサブルリンカーを利用したタンパク質精製実験」第30回メディシナルケミストリーシンポジウム、タワーホール船堀（東京都江戸川区）2012年11月28-30日
傳田将也、山本 純、坂本 健、重永 章、佐藤陽一、山内あい子、大高 章「タンパク質選択的ラベル化法の開発研究」第51回日本薬学会・日本薬剤師会、日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、島根県民会館（島根県松江市）2012年11月10-11日
北 未来、山本 純、戎野 紘司、重永 章、大高 章「酸化ストレス応答型アミノ酸の開発研究」第51回日本薬学会・日本薬剤師会、日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、島根県民会館（島根県松江市）2012年11月10-11日
重永 章「Development of stimulus-responsive amino acids and their application to peptide based chemical biology」第49回ペプチド討論会、鹿児島県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）2012年11月7-9日
重永 章、小倉圭司、平川寛子、山本 純、戎野紘司、宮本理人、石澤啓介、土屋浩一郎、大高 章「Design and synthesis of hypoxia-responsive amino acid which causes peptide bond cleavage in hypoxic cells」第49回ペプチド討論会、鹿児島県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）2012年11月7-9日
坂本 健、佐藤浩平、重永 章、辻 耕平、津田修吾、響野 元、西内祐二、大高 章「Development of efficient synthetic protocol for Fmoc amino acid-incorporated N-sulfanylethyl-aniline linker as peptide thioester precursor」第49回ペプチド討論会、鹿児島県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）2012年11月7-9日
佐藤浩平、北風圭介、坂本 健、重永 章、

辻 大輔、伊藤孝司、大高 章「Convergent chemical synthesis of human GM2 activator protein analog using SEAlide chemistry」第49回ペプチド討論会、鹿児島県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）2012年11月7-9日
辻 耕平、種子島幸祐、重永 章、栗飯原圭佑、傳田将也、丁 昊、原 孝彦、大高章「Synthesis of antagonistic peptide for putative CXCL14 receptor proteins and their identification」第49回ペプチド討論会、鹿児島県民交流センター（鹿児島県鹿児島市）2012年11月7-9日
大高 章、佐藤浩平、丁 昊、重永 章「N-Sulfanylethylamide peptide for peptide engineering」The Sixth Peptide Engineering Meeting（Atlanta, Georgia, USA・Emory University Conference Center）2012年10月2-5日
⑳ 佐藤浩平、北風圭介、坂本 健、重永 章、辻 大輔、伊藤孝司、大高 章「Chemical synthesis of human GM2 activator protein analog using SEAlide peptide-mediated one-pot multi-fragment condensation」The 6th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences、武田薬品工業（株）研修所（大阪府吹田市）2012年9月13、14日
㉑ 辻 耕平、種子島幸祐、重永 章、栗飯原圭佑、傳田将也、丁 昊、原 孝彦、大高章「Development of novel antagonistic peptide for CXCL14 receptor」The 6th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences、武田薬品工業（株）研修所（大阪府吹田市）2012年9月13、14日
㉒ 重永 章、大高 章「“化学”でペプチド・タンパク質をあやつる」第28回若手化学者のための化学道場、島根県立青少年の家（島根県出雲市）2012年9月7、8日
㉓ 重永 章「刺激応答型アミノ酸を基盤とした生命科学分野へのアプローチ」生有研シンポジウム、サントリー生命科学財団生物有機科学研究所（大阪府三島郡）2012年8月27日
㉔ 丁 昊、佐藤浩平、森下 巧、重永 章、大高 章「4-チオプロリンを用いたDual-kinetic NCL法の開発」第44回若手ペプチド夏の勉強会、ロッジ舞洲 LODGE MAISHIMA（大阪府大阪市）2012年8月5-7日
㉕ 佐藤浩平、北風圭介、坂本 健、重永 章、辻 大輔、伊藤孝司、大高 章「タンパク質完全化学合成～ケミストによるタンパク質医薬品開発を目指して～」第44回若手ペプチド夏の勉強会、ロッジ舞洲 LODGE MAISHIMA（大阪府大阪市）2012年8月5-7日
㉖ 山本 純、傳田将也、戎野紘司、重永 章、佐藤陽一、山内あい子、大高 章「フッ化物イオン応答型トレーサブルリンカーを利用したタンパク質精製法の開発」日本ケ

- ミカルバイオロジー学会第7回年会、京都大学（京都府京都市）2012年6月7-9日
- ⑳ 傳田将也、山本 純、佐藤浩平、坂本 健、重永 章、佐藤陽一、吉村好之、山内あい子、大高 章「新規タンパク質選択的ラベル化試薬”SEAL-tag”の開発研究」日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会、京都大学（京都府京都市）2012年6月7-9日

〔図書〕(計1件)

重永 章、山本 純、大高 章「生物活性小分子の結合パートナータンパク質を知りたい - リンカー分子を用いたタンパク質精製法 - 」実験医学増刊号 驚愕の代謝システム～メタボロームの階層から解き明かす疾患研究の新たなステージ～(末松 誠、杉浦悠毅 編)、羊土社、204(150-156)、**2014**。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

研究室ウェブサイト:

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・講師

研究者番号: 10423394