

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750154

研究課題名(和文)配糖化タンパクの収束的かつ自在な供給法開発による化学生物学的研究の堅固な基盤構築

研究課題名(英文)Development of convergent methodology to access a broad range of glycopeptides as a firm basis of chemical biology.

研究代表者

佐々木 要 (SASAKI, Kaname)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10611783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳後にさまざまな修飾を受けた糖タンパクなどの多様な修飾タンパクを化学的に純物質として合成するための収束的手法の開発を行った。まず、修飾の足掛かりとしてチオカルボン酸を有するオリゴペプチドの合成法として、新たなチオカルボン酸前駆体を開発し、オリゴペプチド合成に適用した。また、その開発の過程で、アスパラギン部位で結合を形成する新規ライゼーション反応を開発した。さらに、チオカルボン酸を足掛かりとした新規アミド合成反応として、アミノ酸の炭酸無水物を活用した手法を見出した。

研究成果の概要(英文)：Novel convergent synthetic methodologies to prepare proteins with post-translational modifications were developed. We found out that methylphenacyl thioesters are stable enough to be carried through standard Boc-TFA peptide elongation as a precursor of thioacids, and can be deprotected into the corresponding thioacids easily and cleanly. The thioacids prepared can be converted into amide bonds when treated with N-carbonyl cyclic amino acid anhydrides. We also developed a novel chemical ligation at the site of asparagine using oligopeptides with N-terminal N-Boc-protected beta-thioaspartic acid and C-terminal acyl azide respectively. The reaction proceeds via addition accompanied by loss of nitrogen and sulfur to give the corresponding asymmetrical imide, and deprotection of the Boc group, followed by a spontaneous N to N acyl shift.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ペプチド 糖 核酸 糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパクの翻訳後修飾反応は、細胞内および細胞間シグナリング、翻訳、DNA 修復、細胞周期制御、細胞分裂、ネクローシス、アポトーシスを含む、多くの生理学的プロセスへの関与が示唆されており注目すべき生体内反応である。例えば、ADP-リボシル化反応は、癌治療の標的としての可能性も報告されている。合成化学的に十分量の修飾タンパクを純物質として自由自在に供給できれば、修飾の有無による高次構造の変化やその安定性などのダイナミクス、類縁体プローブ合成による動態観察など、現象の理解を飛躍的に深化させると期待できる。微細量のタンパクの精製と評価に多大な労力を要している生物学の現状を打破し、翻訳後修飾反応の分子レベルでの理解に挑むための基盤技術として、本研究では、純粋な修飾タンパクの化学的供給法を確立する。

一残基ずつアミノ酸を伸長する逐次的なペプチドの固相合成法と、それぞれ C-末端チオエステルと N-末端システインを有する 2 つのオリゴペプチド同士を連結するネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法により、未修飾のタンパク質は合成が可能になりつつある。また、修飾ペプチドのなかでも N-結合型糖タンパクは、N-結合型糖鎖を有するアスパラギンを用いた逐次的ペプチド固相合成と NCL 法を組み合わせることにより、化学合成が達成されている。しかし、さらに多様で複雑な修飾タンパクの化学合成については、今後の発展が期待されている。

2. 研究の目的

先述した ADP-リボシル化反応は、Arg, Cys, リン酸化された Ser 残基などで進行することが知られるが、本研究では、アミドを介して Asn 残基で結合したものとチオエステルを介して Glu, Asp 残基で結合したものの合成に向けて反応開発を行った。これまでに、アミド結合を介した N-結合型糖タンパクや糖ペプチドの化学合成が報告されているが、いずれも、糖部分を有し適切に保護されたアミノ酸単量体を用いた逐次的な合成であり、天然に存在するような高分子量体を収束的に合成した例はない。一方、エステル結合については、エステル結合を有するアミノ酸モノマーを用いた逐次的ペプチド伸長反応により合成すると、エステル結合の不安定性のため、従来用いられている TFA あるいは HF のような酸を用いることができず、保護基の選定に困難が生じる。さらに、グリコシルエステルに関しては、ペプチド伸長後に糖アルコールとカルボン酸残基の脱水縮合反応を行うと、糖アノマー位の立体制御が困難であるし、ペプチドを可溶化するような DMF あるいは水を溶媒に用いた場合には、カルボン酸残基を求核剤とするグリコシル化反応自体が困難である。すなわち、既往の化学ではエステル修飾型のペプチ

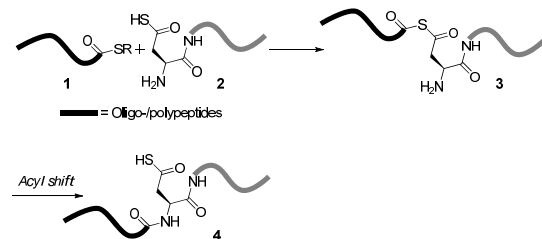
ドを化学合成することは極めて困難であり、それを可能にする新技術が求められている。そこで、我々がこれまで世界に先駆けて研究を行ってきたチオカルボン酸の化学を足掛かりとし、化学合成の最終段階で、あたかも翻訳後修飾のように収束的に修飾基を導入する手法を開発する。チオカルボン酸の極めて大きな求核性と酸性を活用することで、ポリペプチド上に種々の求核性官能基存在下、塩基性官能基がプロトン化される弱酸性条件下でチオカルボン酸選択的な修飾ができると期待される。このことから、無保護のリジンやアルギニン残基を有するペプチドも修飾反応やカップリング反応の基質として使用可能であると考えられる。カップリング後に過激な条件の脱保護反応を必要としない真の最終段階で修飾基を導入する手法を確立する。

3. 研究の方法

収束的修飾ペプチドの化学合成のために、(1)修飾の足掛かりとして、アミン、アルコール、 Guanidino, あるいはカルボン酸などの無保護の官能基の存在下でも官能基選択的に求電子変換反応が可能である、チオカルボン酸を有するペプチドを化学合成する手法を確立する、(2) ペプチド合成後の最終段階でチオカルボン酸を足掛かりとしてエステルやアミドなどの修飾基を導入するための手法を確立する、の 2 つに課題を分けて検討を行った。

(1) 側鎖にチオカルボン酸を有するペプチドの合成

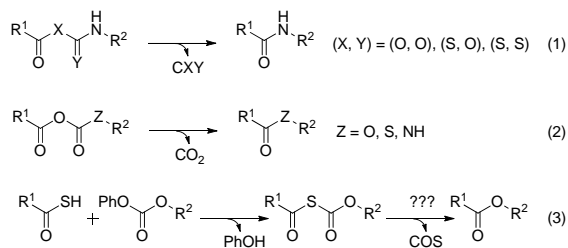
化学合成の鍵中間体として、チオカルボン酸を側鎖に有するペプチドの合成を行った。当初は高分子量のポリペプチドを収束的に合成するために、C-末端チオエステル 1 と N-末端のβ-チオアスパラギン酸 2 のチオエステル交換と続く S→N アシル転移により酸無水物 3 を経て 4 を与えるカップリング反応を開発する予定であった (Scheme 1)。チオエステル交換と S→N アシル転移によるカップリング反応は、近年 NCL 法として高分子量ペプチドの合成に広く用いられている。本法は、天然型のペプチド結合を収束的に与えるとともに、次の修飾の足掛かりとなるチオカルボン酸を還元するものと期待した。



Scheme 1. チオアスパラギン酸を用いたライゲーション。

(2) チオカルボン酸を足掛かりとするペプチドあるいはエステル合成

チオカルボン酸の捕捉反応により、アミドやエステルを合成する手法を開発した。既に我々は、グリコシルイソ(チオ)シアナートと(チオ)カルボン酸からカルボン酸炭酸無水物を経てアミドを生成する反応を報告している (**Scheme 2**, Eq. 1)。また、カルボン酸炭酸無水物からは脱炭酸を伴うエステルおよびチオエステル形成反応が進行することが古くから知られている (Eq. 2)。特にエステル化は R^2 が高い *tert*-ブチル基かつ反応媒体が水系であっても進行することから、脱炭酸反応は協奏的で極めて速いと考えられる。そこで、脱離基としてフェニル基などを有するカルボナートをチオカルボン酸で求核置換し、チオカルボン酸炭酸無水物と続く酸化硫化炭素を経てエステルを得る反応を検討した (Eq. 3)。



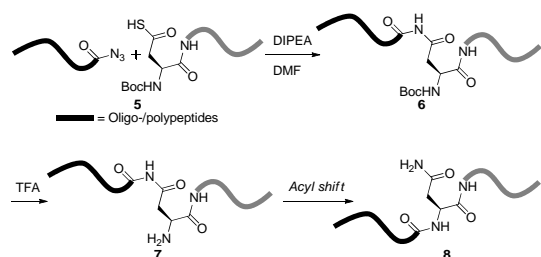
Scheme 2 脱 CO_2/COS を伴うアミド / エステル合成。

4. 研究成果

(1) 側鎖にチオカルボン酸を有するペプチドの合成

収束的合成法の検討

重要な合成中間体である側鎖にチオカルボン酸を有するペプチドの合成法開発に先立ち、高分子量のポリペプチド合成法として、C-末端アシルアジド **5** と N-末端のβ-チオアスパラギン酸 **6** からアスパラギン部位で天然型ペプチド結合を形成し **8** を与える反応を開発し論文発表した (**Scheme 3**)。



Scheme 3 アスパラギン部位での新規ライゲーション反応。

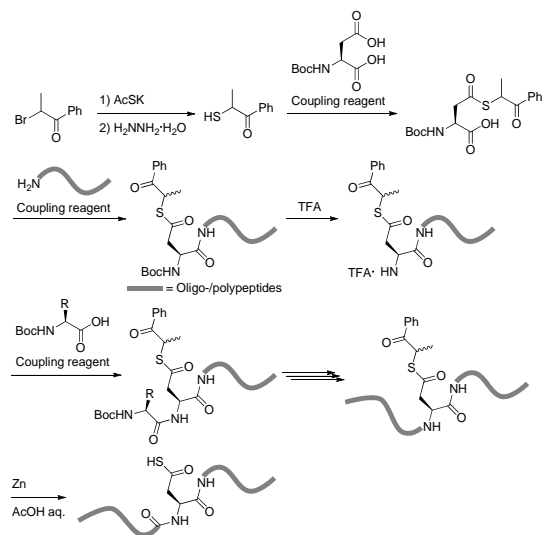
すなわち、アシルアジド **5** とチオカルボン酸 **6** の脱窒素および脱硫を伴うイミン形成反応で **7** を得た後、Boc 基を脱保護することで、1級アミンを還元した。続く一級アミンへのアシル転移により **8** を得た。アシル転移によるカップリング反応は、近年、ネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法として高分子量ペプチドの合成に広く用いられている

が、アスパラギン酸残基に適用した例はなく、本手法はシステイン - アスパラギン間の天然型結合を収束的に形成する新しい方法論となった。

一方で、本研究課題が目標のひとつに据えた、非対称チオカルボン酸無水物を経てシステイン - チオアスパラギン酸間の結合を形成する反応の完成には未だ至っておらず、さらなる検討が必要である。しかし、その過程で、チオカルボン酸無水物の形成と続く S_N アシル転位反応が、従来の C-末端から N-末端に向けた逐次的ペプチド合成法に変わりうる、高原子効率のペプチド合成法になることを見出した。本反応は、本研究課題の達成にも大きく寄与するものであった。

逐次的合成法の確立

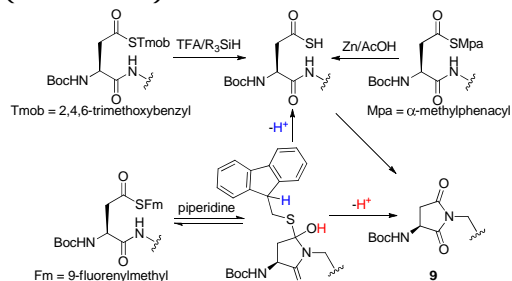
側鎖にチオカルボン酸を有するペプチドの合成を逐次的合成法により行った。すなわち、ペプチド合成に広く用いられている Boc 基-TFA の化学に基づく固相合成法と両立するチオカルボン酸前駆体をβ-位に有するアスパラギン酸を用いて、ペプチド鎖伸長を行った (**Scheme 4**)。その際、チオカルボン酸前駆体として、フェナシル、メチルフェナシル、ジメチルフェナシル、ビスフェナシルチオエステルを検討し、メチルフェナシルチオエステルが前駆体の安定性及びチオカルボン酸への可変性に最も優れていることを見出した。近年、開発報告数や引用数が伸びているチオカルボン酸前駆体のなかでも、汎用のペプチド保護基との直交性において有用性および信頼性の高い前駆体である。



Scheme 4 側鎖チオカルボン酸を有するペプチドの逐次的合成。

特に、脱保護によりペプチド鎖中でβ-チオアスパラギン酸残基を生成する際に、既往の 2,4,6-トリメトキシベンジル (Tmob) チオエステルを TFA で脱保護した場合や 9-フルオレニルメチル (Fm) チオエステルをピペリジンで脱保護した場合には相当量観察されるアスパラギン酸イミド **9** や、それを介して異性化したチオイソアスパラギン酸が観察

されなかったことは特筆すべきことである (Scheme 5).



Scheme 5. 側鎖チオカルボン酸を有するペプチド合成の副反応.

(2) チオカルボン酸を足掛かりとするペプチドあるいはエステル合成

チオカルボン酸を足掛かりとして、チオカルボン酸炭酸混合無水物と続く脱炭酸を経たエステル化反応を検討した。グリコシルニトロフェニルカルボナートとチオカルボン酸から炭酸無水物の生成を検討したが、望む置換体は得られなかった。そこで、単純なチオカルボン酸を有するモデル基質を用い、ニトロフェニルカルボナートから混合無水物の合成を試みたが、チオカルボン酸による置換反応は進行しなかった。現在までに修飾ペプチド合成に耐えうる高効率なエステル化反応条件を見出すに至っていない。一方、これらの検討の過程で、チオカルボン酸炭酸混合無水物がカルボン酸により求核置換を受けることを見出した。また、アミノ酸の環状炭酸無水物がチオカルボン酸により求核的開環反応を受けることを見出した。修飾タンパク合成に向けいっそう有望で、かつ、簡便なペプチド合成を可能にする新法の開発に繋がる新事実である。

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2件)

1. Kusumi, S.; Tomono, S.; Okuzawa, S.; Kaneko, E.; Ueda, T.; Sasaki, K.; Takahashi, D.; Toshima, K. Total synthesis of vineomycin B₂. *J. Am. Chem. Soc.*, ACS Publications, **135**, 15909–15912 (2013), DOI: 10.1021/ja407827n. (査読有り)
2. Mhidia, R.; Boll, E.; Fécourt, F.; Ermolenko, M.; Ollivier, N.; Sasaki, K.; Crich, D.; Delpech, B.; Melnyk, O. Exploration of an imide capture/*N,N*-acyl shift sequence for asparagine native peptide bond formation. *Bioorg. Med. Chem.*, Elsevier, **21**, 3479–3485 (2013), DOI: 10.1016/j.bmc.2013.02.053. (査読有り)

〔学会発表〕(計3件)

1. 山地 美穂・齋藤 良太・佐々木 要, 核酸塩基に結合する新規ボロン酸の合成と評価, 日本化学会第94春期年会, 名古屋, 2014. 3. 27.

2. 齋藤 良太・川埜 紗椰・佐々木 要, ヒドロキシアジン系複素環を側鎖に持つ環状トリセリントリラク톤の合成と金属配位能, 日本化学会第94春期年会, 名古屋, 2014. 3. 27.
3. 石澤 悠樹・佐々木 要・萩原 伸也・永次 史, 架橋性PNAオリゴマーの合成, 第23回万有仙台シンポジウム, 仙台, 2012. 6. 2.

〔図書〕(計1件)

1. Crich, D.; Sasaki, K. The Hunsdiecker and Related Reactions. In *Comprehensive Organic Synthesis, 2nd edition*; Molander, G. A.; Knochel, P., Eds.; Vol 7, Elsevier: Oxford, 2014, pp. 818–836.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 要 (SASAKI, Kaname)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号: 10611783