

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：26810092
研究課題名(和文) グアニジド基とチオエステルを利用した水溶液中での無保護高速ペプチド合成法の開発

研究課題名(英文) Development of a new peptide synthetic method using peptide-guanidide and peptide-thioester

研究代表者
岡本 亮 (Okamoto, Ryo)
大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30596870
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、どのような配列でも合成が可能な汎用性の高い新しいペプチド合成法を実現するべく、水溶液中でのペプチド合成法の開発の検討をおこなった。この結果、アミノオキシカルバメート型の新しいアミノ基の保護基を見出した。これをもつアミノ酸誘導体は、フェニルアラニンの様に疎水性の高いアミノ酸誘導体でも水溶液に可溶であった。また、この保護基は水溶液中、還元的条件下で容易に5分以内に容易に除去が可能であると、30分以内で効率的な脱水縮合反応も実施可能である事を見出した。以上より新規保護基を利用した新しい水溶液中でのペプチド合成法の技術基盤を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, a new peptide synthetic methodology, which can be performed under aqueous solution, has been explored. After extensive investigation, aminoxy carbamate type protecting group was found as a new protecting group for amino group. The phenylalanine derivative having this new protecting group was found to be soluble in aqueous solution. Intriguingly, this new protecting group could be removed within 5 minutes under reductive aqueous solution condition. In addition, the coupling of amino acid derivatives having the new protecting group also could be performed under aqueous solution condition within 30 minutes. The results obtained in this study gave us a new opportunity for the development of next generation of peptide synthesis that can be performed in aqueous solution conditions.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ペプチド合成 カルバメート タンパク質合成 ヒドロキシルアミン

1. 研究開始当初の背景

近年、ペプチド鎖を原料として用いたタンパク質の精密化学合成が盛んに行われている。この手法では生物工学的に手に入れる事のできないタンパク質誘導体を得る事が可能となり、その有用性のため世界的に研究が展開されている。

原料となるペプチドの化学合成では、疎水性の保護基と有機溶媒を利用した固相合成法が一般的に用いられていた。1963年にメリフィールドが初めてのペプチド固相合成法を報告して以来、この手法によりタンパク質化学合成の原料だけでなく、様々な種類の生理活性ペプチドの合成もなされてきた。

しかし、有機溶媒を利用した現行のペプチド合成法では、標的のペプチド配列によって、有機溶媒とうまく親和せず、ペプチド鎖同士での分子会合による凝集が起こることが知られていた。この様な分子会合性の高い特殊な配列のペプチド合成では、構築途中のペプチド鎖が溶媒中に均一に分散せず、合成効率が劇的に低下してしまう。このような傾向は特に膜タンパク質など生物学的に重要な意味をもつタンパク質に含まれるペプチドに頻繁にみられ、結果、未だ膜タンパク質の化学合成研究や、分子会合性の高い疎水性生理活性ペプチドの合成研究は容易ではなかった。

このような現行のペプチド固相合成法の問題を解決するために、これまではペプチド鎖間の分子会合を抑える目的で、特殊な保護基やアミノ酸誘導体がペプチド合成に利用されてきた。しかし、有機溶媒を利用した基本的な合成戦略は同じであり、未だ完全な解決策はなかった。

2. 研究の目的

このような背景の中本研究では、どのような配列でも合成が可能な汎用性の高い新しいペプチド合成法の開発を目指し、水溶液中でのペプチド合成法の開発を行う事とした。

化学反応において、反応系中における基質や反応試薬に対する溶媒和の効果は、反応溶媒との組み合わせによって大きく異なる。このため反応溶媒の種類をかえることにより、化学反応の結果が劇的に変化する事がしばしばみられる。

一般的に生体高分子であるペプチドは、界面活性剤や変性剤を含む水溶液を利用する事で、効率的に可溶化できることが知られていた。すなわち、水溶液を反応溶媒として利用できれば、アミノ酸の配列に依存しない効率的かつ迅速なペプチド合成が可能になるのではないかと考えた。

しかし、従来用いられてきた疎水性保護基をもつアミノ酸誘導体では、水溶液に不要であり利用することができない。そこで本研究では新規に、できる限り保護基を利用する必要のない合成手法の開発を目指し検討をお

こなうこととした。

3. 研究の方法

本研究では上記目的を実現すべく、まず以下(i)-(iii)の3点を基盤技術の開発を検討することとした。この内、良好な結果が得られた手法をベースに、ペプチド合成を実施し、その反応性、効率性を調べ、新しいペプチド合成法を確立する事を計画した。

(i) チオエステルを用いた水溶液中での高速アミド結合構築法の開発

チオエステルを用いたペプチド鎖の連結反応について、有機溶媒中で、リジンの側鎖アミノ基以外はすべて遊離のペプチドであっても、ペプチド側鎖への縮合反応等の副反応なく、高選択的に分子間でペプチド結合が構築されることが知られていた(*Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1991, 64, 111.)。一方で、チオエステルは生体内反応で用いられる、水溶液に安定な活性基であることも広く知られている。以上を考慮し、チオエステルを利用すれば、最小の保護基の利用でアミノ酸間でのペプチド結合の構築が水溶液中でも可能になると考えた。そこで、本研究ではチオエステルを活性化基として利用した、水溶液で実施可能なアミド結合構築法を模索する事とした。

(ii) グアニジド基を利用した効率的なカルボキシル基の保護-再活性化法の開発

本申請者はこれまでに、C末端にN-アセチルグアニジンをもつペプチド-グアニジド体は中性緩衝溶液下で安定に存在するが、過剰量のチオールを加えた場合交換反応をおこし、ペプチドチオエステル体へと変換できることを見いだしていた(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 191.)。

そこで、アミノ酸-チオエステル体(ただしアミノ基側は固相に担持、もしくは保護基を導入)とアミノ基遊離のアミノ酸-グアニジド体間で(i)で述べた、チオエステルを利用する縮合反応を利用すれば、ペプチドグアニジド体を得られるものと考えた。さらにこの生成物であるペプチド-グアニジド体は、チオエステルへの変換により、再活性化が可能となる。これらのサイクルを繰り返す事ができれば、望む水溶液中でのペプチド合成法を確立できると考えた。そこで本研究では、新しいグアニジド誘導体を模索するとともに、迅速なグアニジド-チオエステル変換反応の開発を行う事にした。

(iii) 水溶液中で利用可能なアミノ基の新しい保護基の開発

本研究開始時迄に水溶液中で利用可能な様々な脱水縮合剤が既存試薬として知られていた(*Chem. Rev.* 2011, 111, 6557.)。しかし、ペプチド固相合成法に広く用いられる Fmoc、Boc アミノ酸誘導体は、カルボキシル基は遊

離であるものの、アミノ基が嵩高い疎水性保護基によって保護されているため、水溶液中には不溶であった。そこで、このような保護基にかわる親水性の保護基をもつアミノ酸誘導体があれば、アミノ酸の脱水縮合-アミノ基保護基除去のサイクルを繰り返して行う、現行のペプチド固相合成法を水溶液中で実施できるようになるのではないかと考えた。本項目ではこれを可能とする新規なアミノ基保護基の開発を実施した。

4. 研究成果

上記方法で示した各項目についてまず初年度(平成 26 年度)の検討と、その結果の概要を示す。

(i)チオエステルを用いた水溶液中での高速アミド結合構築法の開発

本検討は、4残基のペプチド MPAA チオエステル Ac-VYSA-MPAA (MPAA=4-mercapto-phenylacetic acid、Ac=アセチル基)と、遊離アミノ酸のアミノ基に対する縮合反応をモデル反応として、反応溶媒の pH、活性化法に着目し、最も効率的な縮合条件を検討した。

種々検討したところ、pH8 の緩衝溶液中、添加剤として高濃度のイミダゾールを含む pH8 の緩衝溶液中で、効率的に脱水縮合反応が進行する事を見出した。イミダゾール以外にも、HOSu、HOObt 等、縮合反応を促進する活性エステル調製のために広く利用される添加剤の効果も検討したが、いずれの場合も、イミダゾールを利用した系に比べ、加水分解反応が競合する事がわかった(Figure 1)。

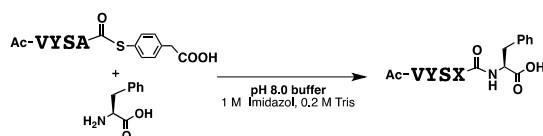


Figure 1

(ii)グアニジド基を利用した効率的な N-カルボキシル基の保護-再活性化法の開発

本検討は、4残基のペプチドグアニジド誘導体 Ac-VYSA-Gu(Gu=グアニジド基)を原料とし、様々な Gu 誘導体に対するチオエステルへの変換効率を検討した。グアニジド基としてはアセチル、もしくはピバロイル-グアニジンがチオエステルへと交換可能な脱離基として利用可能であることを既に見出していた。本研究ではさらに S-アルキルチオ尿素誘導体を中心に、グアニジン誘導体以外の誘導体についても、チオエステルへの効率変換が可能な新しい脱離基の探索をおこなった。

この結果、新たに 2-アミノチアゾリジンという、アルキルチオ尿素誘導体がチオエステルへと変換可能な誘導体である事を見出した。この誘導体もグアニジド誘導体と同様、中性付近の緩衝溶液中で、対応するペプチド

チオエステルへと変換できることが見出された(Figure 2)。

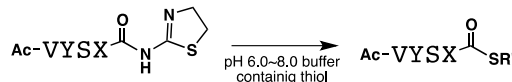


Figure 2.

(iii)水溶液中で利用可能なアミノ基の新しい保護基の開発

本項目では初年度(平成 26 年度)の検討において、ヒドロキシルアミンを有する、新規なカルバメート基(アミノカルバメート基(aminooxycarbamate:Aoc 基))を見出すに至った。興味深い事に、本保護基はチオールなどを含む中性の還元的な水溶液条件下で定量的かつ迅速に除去できることがわかった(Figure 3)。

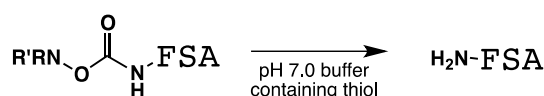


Figure 3.

以上の様に(i)、(ii)の検討の結果、新規な縮合反応とともに、チオエステルへの変換可能な新しい官能基を見出す事ができた。これらの結果は、本研究での目的だけでなく、ペプチド鎖の位置選択的連結を利用した、タンパク質の化学全合成への応用も、将来的に期待される。

しかしペプチド合成という観点からは、問題点も明らかとなった。まず (i)では水溶液中での縮合反応を実施するため、加水分解反応が競合しない反応条件を見出す事は困難であった。また(ii)でのグアニジド誘導体を利用したチオエステル変換反応については、反応が完了するにはいずれの誘導体であっても数時間の反応時間が必要である事が見出された。

一方でこれと平行して検討を行った (iii)においては良好な結果が得られた。ここで見出されたアミノオキシカルバメート型の保護基はこれまでに報告例のない非常に興味深い性質を示す保護基であった。また、水溶液中で利用可能な保護基である事を示唆する結果を得た。

そこで、2 年目は本申請での目的とした、水溶液中での高速ペプチド合成法の開発を達成すべく、(iii)で見出した基礎的な知見を元に、新規ペプチド合成手法の開発の検討を行った。

平成 27 年度には、まず N-置換型 Aoc 基をアミノ末端にもつモデルペプチドを新規な化合物として合成法を確立し、これらの性質を調べることで、最も本研究に最適な Aoc 型保護基の模索をおこなった。この結果、N,N-ジメチルヒドロキシルアミンをもつカルバメート基(dimethylaminoxy carbonyl: Dmac

基)を見出した。種々検討したところ、Dmaoc 基は、中性緩衝溶液中では安定であるとともに、最適な還元剤を加えた緩衝溶液中であれば5分以内にほぼ定量的に除去可能であることが分かった。

最適な新規カーバメート型保護基を見出したので、続いてこれをもつアミノ酸誘導体を新規に合成し、水溶液中での縮合反応の検討を行った。合成は市販のアミノ酸-tert ブチルエステルを原料として、3ステップで合成した。現在までのところ、Tyr, Gly, Phe, Leu 誘導体の合成に成功している。これらの誘導体のうち、側鎖に疎水性官能基であるベンゼン環をもつフェニルアラニンであっても、Dmaoc 誘導体 (*N*-Dmaoc-Phe)は水溶液中に可溶である事が確認された。このことから側鎖に疎水性の保護基を有するアミノ酸誘導体であっても、Dmaoc 誘導体では水溶性が十分確保できるものと期待される。

さらに *N*-Dmaoc-Phe を原料に4残基のペプチド(GGFL)の *N*末端アミノ基に対する脱水縮合反応の検討を行った。縮合剤として、水溶液中で利用可能な EDC·HCl / HOSu を、反応溶媒として DMF を含む水溶液を用い検討を行った。この結果、10%水/90%DMF 溶媒中では、30分以内に定量的な脱水縮合反応が進行する事を見出した。

以上より Dmaoc 基を利用する事で、ペプチド合成に必要な、アミノ酸の脱水縮合-アミノ基保護基の除去のサイクルを水溶液中で行えることを実証した。今後は本手法を固相合成に最適な条件の最適化を行うとともに、利用可能範囲を調べる必要が挙げられる。

本研究の結果、Dmaoc を利用した新しいペプチド化学を見出すに至った。現在までのところ、水溶液中での高速ペプチド合成法の完全な確立には至っていないものの、そのための新規な基盤技術を十分に見出す事ができた。

また、ここで見出した水溶液親和的な高極性保護基という概念は、水溶液を利用する必要がある、タンパク質合成化学において有用な概念であり、本研究で得られた結果は、目的とするペプチド合成だけでなく、その先にあるタンパク質の化学合成への応用も期待される知見と基盤技術であると考えられる。

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 1件)

"An efficient solid-phase synthesis of peptidyl-*N*-acetylguanidines for use in native chemical ligation" R. Okamoto, M. Isoe, M. Izumi, Y. Kajihara, *J. Pep. Sci.*, 査読有, 22, 343-351. (2016)

[学会発表](計 2件)

小野絵美子、和泉雅之、岡本亮、梶原康宏、水溶液中でのペプチド合成を目指した新規カルバメート型保護基の開発研究、日本化学会第 96 会春季年会、2016 年 3 月 27 日、同志社大学

Ryo Okamoto, Chemical synthesis of "racemic" antifreeze glycoprotein toward the X-ray crystallography of the highly O-glycosylated protein, 6th Chemical Protein Synthesis Meeting, 2015/6/5, St. Augustin

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 亮 (OKAMOTO, Ryo)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：30596870