

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13992

研究課題名(和文)霜降仮説に基づく不凍糖タンパク質の構造簡素化

研究課題名(英文)Development of Anti-Freeze Glycoprotein

研究代表者

柴田 哲男 (Shibata, Norio)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40293302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：有機合成化学によって不凍糖タンパク質を供給するためには、不凍糖タンパク質の簡素化、即ち小分子化が必要である。我々は、疎水空間と親水空間を均一に分散させる「霜降仮説」により不凍活性が出ると仮説を立て、その仮説を実証する物質として含フッ素ガラクトース・ノナペプチド(Gal-F-Pro9)を設計した。Gal-F-Pro9は、含フッ素プロリンを9量体とした後、プロパルギルガラクトースとのクリック反応によって合成した。Gal-F-Pro9の不凍活性を調べたところ、予想通りGal-F-Pro9は活性を示すことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Antifreeze (glyco)proteins are very large molecules found in the blood serum of Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. While the utility of antifreeze (glyco)proteins has been expected in a variety of area in life sciences, the availability of antifreeze (glyco)proteins is strictly limited to natural resources. We herein report the design and synthesis of antifreeze (glyco)proteins with small molecular weights. Based on our novel hypothesis, "a marbled beef hypothesis", we designed a (glyco)protein containing fluorinated amino acids and sugars, i.e., galactose nona-fluorinated proline (Gal-F-Pro9) as a material which demonstrates the hypothesis. The synthesis of Gal-F-Pro9 was achieved by the Click reaction of nona-fluorinated proline and propargyl-galactose. As our expectation, Gal-F-Pro9 showed an inhibition of ice recrystallization.

研究分野：フッ素化学

キーワード：フッ素 ペプチド プロリン 糖 不凍活性

1. 研究開始当初の背景

不凍糖タンパク質 (AFGP, antifreeze glycoprotein) とは、1969年に Arthur DeVriesらが南極海の魚の血液中から始めて単離した特殊な糖タンパク質であり、その化学構造は糖とアミノ酸の繰り返し構造から成る分子量 2.6-33 kD の複合体である (図1)。AFGPは、わずか数 mg/mL という低濃度で不凍作用を発揮する。極地の魚類に多くみられる他、昆虫や植物でも確認されるなど、数種類存在することが知られている。AFGPの不凍作用機構は、AFGPが氷結晶の特定の表面に強く吸着し、結晶の熱的安定性を下げて氷の成長を抑制するものであることが明らかにされている (*Science*, **1971**, 172, 1152)。

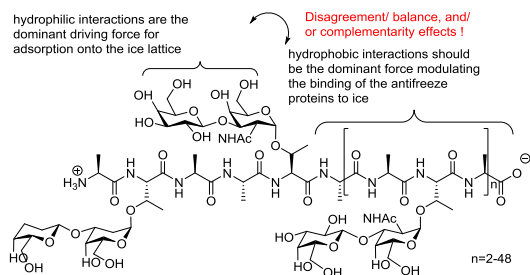


図1. AFGPの分子構造

最近の研究では別の作用機構も報告されており、AFGPの不凍作用は既存の不凍物質の作用機構とは異なり、極めて特異的に作用するため、不凍タンパク質研究は、食品、美容から医療など幅広い分野で展開されている。しかし、現在に至るまで、不凍タンパクの供給は魚類や植物などから抽出してくる手法しかなく、十分に供給できているとは言い難いため、不凍タンパク質を効率的に供給する手法の開発はいまなお切望されている。また、有機合成化学による供給を目指し、AFGPの全合成や固相合成法も報告されているが、実用的な手法は開発されていない。

2. 研究の目的

有機合成化学によって不凍糖タンパク質を供給するためには、現在発見されているような巨大な分子量の糖タンパクを標的とする限り非現実的である。そこで、不凍糖タンパク質の簡素化、即ち小分子化することを提案する。不凍活性の小分子化にあたり、不凍活性のメカニズムを知る必要がある。しかしながら、その具体的なメカニズムは未だにわかっていない。そこで、我々は、不凍活性のメカニズムについて、霜降牛肉のように疎水空間と親水空間を均一に分散させる「霜降仮説」を立てた。即ち、水分子クラスターを親水空間に柱状に捉え、氷核の形成を阻止させる。さらに双極子の大きな偏りをフッ素により生み出し低分子化を実現するという考えである。この仮説の鍵は水分子の間に均一的に不凍糖タンパクが分散し、氷の結晶の成長を阻害すると考えたところにある。その際、

疎水空間と親水空間を均一分散させるのに、不凍糖タンパクのコンフォメーションが重要となると推察した。牛肉は、そのランクが上がるほど、冷凍庫でも凍らない。理由は単純明快で、脂肪が満遍なく均一に分布しているためである。そこで、水分子中でも不凍タンパク質が、極めて広範囲に均一分散し、液体であるにも関わらず、まるで霜降り肉のような超分子構造を形成すれば、不凍活性が出ると考えた。

3. 研究の方法

3-1. 分子設計

疎水空間と親水性空間を交互に出現させれば、仮説の「霜降り」状態を作り出せる可能性がある。そこで、フッ素化アミノ酸と糖の繰り返し構造を設計した (図2)。フッ素は水素に次いで小さい原子であり、水素のミミックとして働く。そのうえ、全元素中最も高い電気引力度を持つ。そのため、たった一つのフッ素原子やフッ素官能基導入でも化合物の双極子が増加し、水溶性や脂溶性に顕著な変化を示す。とりわけ、周辺に水素結合を示すヘテロ原子がある場合には、フッ素の効果は最高となり、水素結合の威力を強くする。さらに、鎖状分子に組み込んだ場合には、「Gauche effect」と呼ばれる効果により、回転異性体を鎖状構造のまま固定化することも報告されている (*Chem. Commun.* **2007**, 5075, *Tetrahedron* **2010**, 66, 2196)。これらの知見から糖ペプチドにフッ素を導入すれば、鎖状構造のままコンフォメーションを制御・固定化出来る。

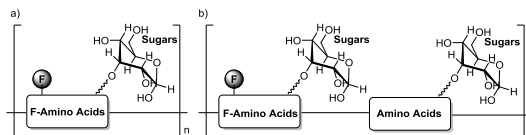


図2. 設計した含フッ素糖タンパクの分子構造

3-2. 含フッ素アミノ酸の選定と含フッ素糖タンパクモデルの合成

含フッ素糖タンパクの分子構造の繰り返しユニットに用いるアミノ酸として a) フェニルアラニン型のもの、b) プロリン型のを考えてその合成に着手した (図3)。

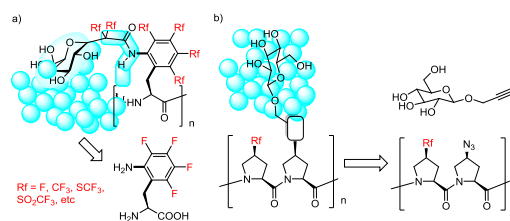


図3. 標的分子 a) フェニルアラニン型; b) プロリン型

まず、a)のフッ素で部分的に官能基化されたフェニルアラニン類に合成に取りかかった。しかしながら、様々な合成戦略のもと試

みたが、目的物質を合成することが出来ず、断念した。

続いて b) の含フッ素プロリン型の化合物の合成を開始した。プロリン鎖はヘリックス I とヘリックス II の 2 種の螺旋構造を取ることが知られている。ヘリックス I は 1 巻きが約 1.9 オングストロームで 1 回転あたり約 3.3 残基、ヘリックス II は 1 巻きが約 3.8 オングストロームで 1 回転あたり 3 残基のプロリンで構成され、ヘリックス I はプロリンがより密に詰まった構造であることが知られている。ヘリックス内の水素結合や、プロリン環上の置換基によってヘリックスのプロリンの密度が変化することから、フッ素を導入したポリプロリン鎖では、ゴーシュ効果によりヘリックスの密度が大きく変化することが考えられる。そのため、フッ素の導入具合により、不凍活性調整に大きな変化を及ぼすと考えた。合成は次のように行った。トランス N-Boc-4-ヒドロキシプロリンメチルエステルから 2 工程でアジド基を導入した。次に Boc 基を除去した後、別途合成したフッ素を導入したプロリンと縮合させ 2 量体を得た。フッ素プロリンは DAST とヒドロキシプロリンの反応から合成した。加水分解によってカルボン酸とした後、再び別途合成したフッ素プロリンメチルエステルと縮合させプロリン 3 量体を得た。次にプロリン 3 量体化合物を加水分解しカルボン酸とした後、別途、類似の方法にて合成したプロリン 3 量体のアミン部位と縮合した。さらに先のカルボン酸 3 量体によりプロリン鎖を伸長させ、アジド基を持つフッ素化プロリンノナペプチドとした。(図 4)。

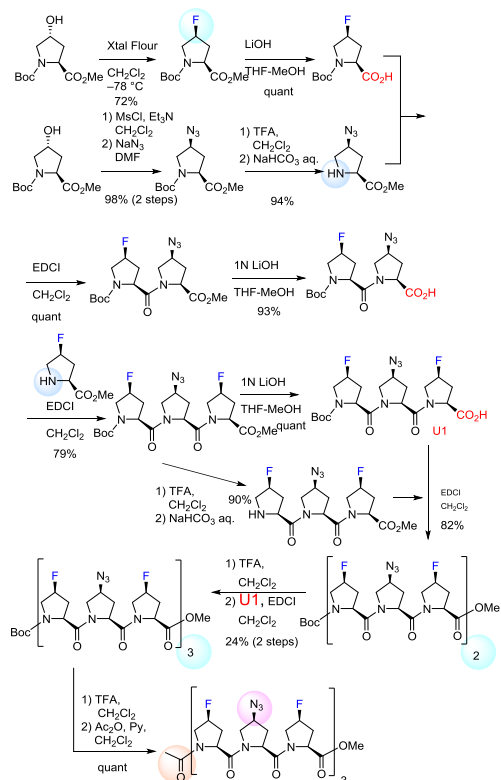


図 4. フッ素プロリンノナペプチドの合成

プロパルギル化したガラクトースは下記のように合成した (図 5)。

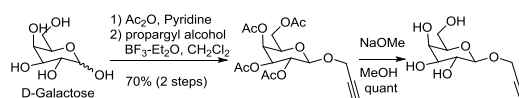


図 5. プロパルギルガラクトースの合成

最後に、フッ素プロリンノナペプチドとプロパルギルガラクトースをクリック反応にて連結させ、目的の含フッ素ガラクトース・ノナペプチド (Gal-F-Pro9) を合成した (図 6)。

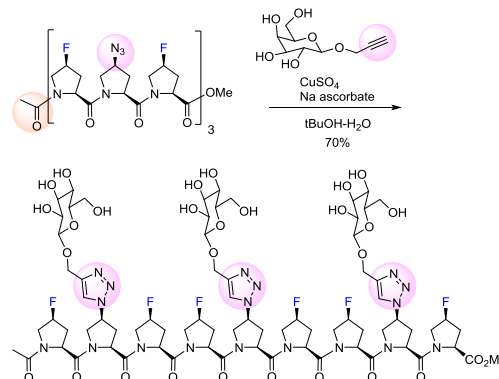


図 6. 含フッ素ガラクトース・ノナペプチド (Gal-F-Pro9) の合成

3-3. 含フッ素ガラクトース・ノナペプチド (Gal-F-Pro9) の立体構造

不凍活性を期待して合成した Gal-F-Pro9 の 3 次元構造をスパルタンにて DF T 計算し、その電子密度マップを確認した (図 7)。期待通りに青色、緑色、赤色などが層になって現れており、霜降り状態を創り出すのに都合の良い 3 次元構造であることがわかった。

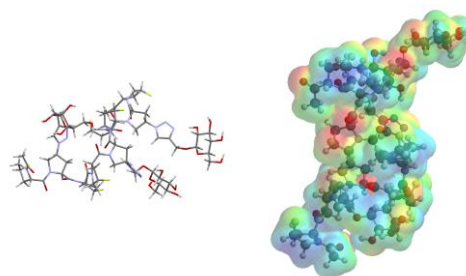


図 7. 含フッ素ガラクトース・ノナペプチド (Gal-F-Pro9) の電子密度マップ

4. 研究成果

合成した Gal-F-Pro9 の不凍活性を評価した。実験は次のように行った。フッ素化ペプチドをショ糖濃度 30% に調整し、温度制御顕微鏡ステージ上で急速凍結した後、 -6°C まで一定の速度で昇温させ、 -6°C で 30 分経過した氷結晶の様子を顕微鏡で観察した。その結果、期待どおり、設計したフッ素化糖ペプチドが不凍活性を示すことがわかった (図 8)。さらに、フッ素化体と非フッ素化体で不凍活性に差があることを見出した。

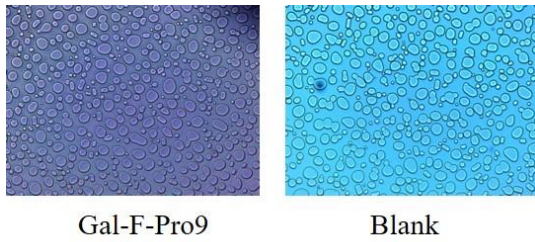


図 8. Gal-F-Pro9 の不凍活性

次に、合成したフッ素化糖ペプチドの CD スペクトルを測定したところ、設計通り α -ヘリックス構造を形成していることが強く示唆された。なお、ペプチドの溶解性に問題が残った (図 9)。

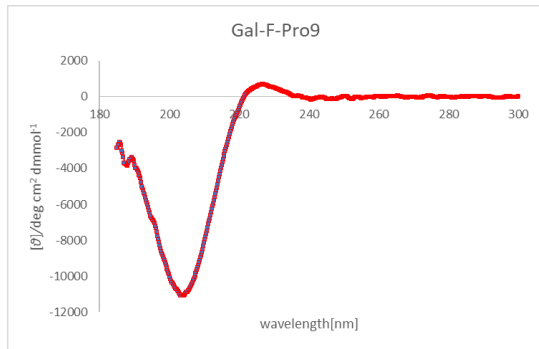


図 9. 含フッ素糖ノナペプチドの CD スペクトル

そこで、水溶性向上を考え、糖部分の構造を変化させた化合物を合成することとした。市販のラクトースを用い、アセチル化の後、プロパルギル化を行い、アセチル基を脱保護することでプロパルギル化ラクトースの合成を達成した。続いて、初年度で確立した合成法を用いて別途合成したアジド基を有する含フッ素糖ペプチドに対し、クリック反応を行い連結させ、糖部分をラクトースに置き換えた含フッ素ラクトース・ノナペプチド (Lac-F-Pro9) の合成に成功した (図 10)。

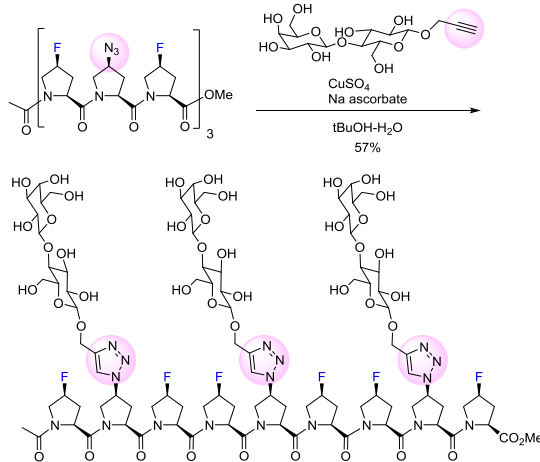


図 10. 水溶性を改善した含フッ素ラクトース・ノナペプチド (Lac-F-Pro9) の合成

一方、分子の双極子モーメント向上を狙い、プロリンに脂溶性の最も高い官能基であるトリフルオロメチルチオ基を導入することを計画した。そのため、目的に叶うトリフルオロメチルチオ基導入反応の開発を検討した。その結果、 CF_3 -DAST 試薬を用いた手法により、 α -トリフルオロメチルチオ (SCF_3) ケトン類が首尾良く合成出来ることを見出した。本手法により SCF_3 -プロリンや SCF_3 -ピログルタミン酸が合成出来る可能性が高く、 SCF_3 含有の糖ペプチドの合成へと展開していく。

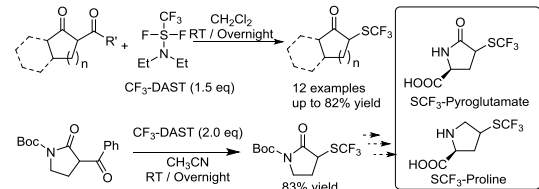


図 10. α -トリフルオロメチルチオ (SCF_3) ケトン類の合成

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①吉岡 拓哉, Saidalimu Ibrayim, 鈴木 柊吾, 徳永 恵津子, 柴田 哲男 「DAST 誘導体を用いたトリフルオロメチルチオ化反応とその応用」第 40 回フッ素化学討論会 (鳥取)

②吉岡 拓哉, Saidalimu Ibrayim, 徳永 恵津子, 柴田 哲男 「 CF_3 -DAST による金属触媒を用いないトリフルオロメチルチオ化反応」日本化学会 第 98 春季年会 (2018) (千葉)

③住井 裕司, 日比野 隼大, 徳永 恵津子, 柴田 哲男 「不凍活性物質を目指した含フッ素糖ペプチドの設計と合成」日本化学会 第 98 春季年会 (2018) (千葉)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

名古屋工業大学柴田研究室

<http://www.ach.nitech.ac.jp/~organic/shibata/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 哲男 (SHIBATA Norio)

名古屋工業大学大学院工学研究科・教授

研究者番号：40293302

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

徳永恵津子 (TOKUNAGA Etsuko)

名古屋工業大学大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号：70569889

住井 裕司 (SUMII Yuji)

名古屋工業大学大学院工学研究科・助教

研究者番号：10612848

YIWUREYIMUJIANG SAIDALIMU (イウ
レイムジャン サイダリム)

名古屋工業大学大学院工学研究科・外国人
特別研究員

研究者番号：該当しない