

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620091

研究課題名(和文) 親油性イオン対の導入によるポリペプチドの有機溶媒への可溶化とヘリックス形成

研究課題名(英文) Preparation of oligopeptides with lipophilic ionpairs and control of solubility in organic solvents

研究代表者

佐田 和己 (SADA, KAZUKI)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80225911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アセチレン誘導体をもつアミノ酸とロイシンを用いてFmoc固相合成によって5-13残基程度のオリゴペプチドを合成し、アジド基をもつ第四級テトラアルキルアンモニウムのテトラフェニルホウ酸塩とのクリック反応により、オリゴペプチドへの親油性イオン対の導入を行った。質量分析から親油性イオン対をもつオリゴペプチドが検出され、生成が確認できた。生成したオリゴペプチドの1,2ジクロロエタン中での溶解度は対応するイオン性導入前のオリゴペプチドより数倍向上することが明らかになった。したがって、親油性イオン対のイオン解離による静電反発および浸透圧がオリゴペプチドの溶解性の向上につながったものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we investigated incorporation of tetraalkylammonium tetraphenylborate as a lipophilic ionpair into some lipophilic oligopeptide chains and enhancement of solubility in less polar media by introducing the ionpair. Fmoc solid-state synthesis provided oligopeptides with 5-13 amino acid with one or two acetylenic residues. Then, click reaction between these oligopeptides and azide-modified tetraalkylammonium tetraphenylborate gave the oligopeptides. ESI-mass spectrometry clearly indicated introduction of tetraphenylborate tetraalkylammonium ionpair. They were soluble in 1,2-dichloroethane and solubility of the oligopeptides with this ionpair increased compared to that of the unmodified oligopeptides. Therefore, incorporation of the lipophilic ionpair should contribute to solubility due to electrostatic repulsion and osmotic pressure.

研究分野：超分子化学

キーワード：イオン対 オリゴペプチド 生体機能利用 分子認識 イオン解離 可溶化

1. 研究開始当初の背景

超分子化学における現在の主要な課題のひとつに、ナノサイズの複雑な空間の自在な構築法の開発が挙げられる。近年、配位子と金属イオンの自己組織化によって、大きなサイズの空間の構築が可能となっているが、極めて対称性の高い多面体構造のみが可能であり、ナノメートルを超える非対称の複雑な空間をもつ構造体の設計・形成は現在でも容易ではない。この点について、生体に目を向けてみると、多くの生体高分子、特にタンパク質はその一次元のペプチド鎖を巧みに利用して隣接したアミノ酸残基間の水素結合を利用した α -ヘリックス構造や離れたアミノ酸残基間の水素結合を利用した β -シート構造などの二次構造を形成し、それらが高次に会合することによるナノサイズの構築物が形成され、その多くは内部に非対称なナノサイズの空間が形成されることは良く知られている。このタンパク質の構造形成はアミド間の水素結合とアミノ酸側鎖の疎水性相互作用による水中の凝集、イオン性残基の水和による表面への露出などによって生じるとされる。したがって、この高次構造を水以外の溶媒で達成することは現在でも困難とされている。その理由としては、まずタンパク質やオリゴペプチドが低極性有機溶媒にはほとんど溶けないことが知られている脂質やPEGなどとの複合化による可溶化は知られているが、その場合のオリゴペプチド・タンパク質の状態は明確にはなっていない。この難溶性はタンパク質表面のイオン性残基が低極性溶媒中では凝集し、反発力ではなく、凝集力として機能するためである。さらに溶媒の低極性化は水素結合自身を強くすることにつながるだけでなく、疎水性残基は逆に表面へ露出することで、変性が起こり、二次構造を含む高次構造の形成が崩れることにより、難溶となる困難と考えられている。

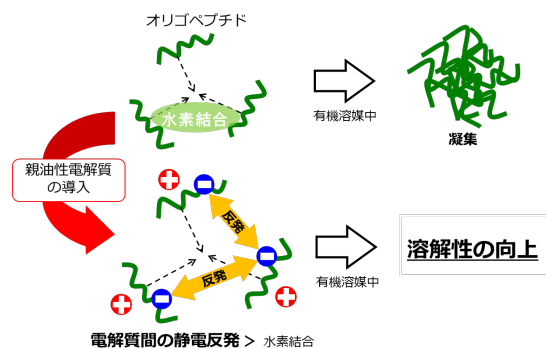
他方、われわれはこれまでテトラフェニルボレーートのテトラフェニルホスホニウム塩やテトラアルキルアンモニウム塩は疎水性が高くかつ嵩高い官能基で覆われており、低極性有機溶媒（クロロホルムやTHFなど、誘電率が4以上の極性をもつ溶媒）中でイオン対が部分的に解離することが電気伝導度測定より明らかにされている。これらのイオン対をわれわれは「親油性イオン対」とよび、様々な機能性材料への展開を行ってきた。その代表例として、親油性イオン対を疎水性の高い高分子へ導入すると、生成するイオン性高分子が低極性有機溶媒中で還元粘度異常を示し、高分子電解質としてふるまうことを世界に先駆けて明らかにした。さらに、この高分子を架橋することでゲルを作製したところ、イオン解離によって高分子鎖上同種のイオンでの反発と浸透圧によって、高分子鎖が大きく空間的に広がり、非極性溶媒を高い効率で吸収する材料の創製に成功している。

このような背景のもと、親油性イオン対を

導入したオリゴペプチドが低極性溶媒中でイオン解離することができれば、水中と同様な溶解性を獲得でき、さらに高次構造形成への展開が可能になると着想した。一般的に電荷を持たせることは水への溶解性を向上させるものであり、色素を含む様々な難溶性物質の可溶化法であり、低極性有機溶媒中では逆に溶解性が低下すると考えられているが、親油性のイオン対は低極性有機溶媒（クロロホルムやTHFなど、誘電率が4以上の極性をもつ溶媒）中で部分的に解離すると期待できる。タンパク質の有機溶媒への可溶化は一部の酵素について、低極性有機溶媒中でも活性があることが知られており、高次構造が保持されていると考えられているが、ポリペプチドを積極的に溶解させ、高次構造を形成させようとする研究は皆無であり、ペプチド科学からみた場合に極めて独創性の高いアプローチと思われる。また、従来疎水性残基のみからなるポリペプチドについては固相合成における反応性の低下や水または水-極性有機溶媒系への難溶性から、HPLCなどでの分離精製の困難さから、これまであまり系統的な研究がなされていない。本研究は親油性のイオン対を導入により、溶解性を向上させるものであり分離精製への道を拓くものであり、このようなイオン対を導入し、分離精製した後、温和な条件でイオン性部位を切断する手法を確立することができれば、様々な疎水性ペプチド合成が可能になり、膜タンパク質の膜内ドメインの研究に大きく貢献できる波及効果が期待できる。

2. 研究の目的

本研究ではオリゴペプチドに低極性溶媒中で解離する親油性の高いイオン対を導入する新規手法の開拓を第1の目的とする。さらに静電反発を利用した親油性の高いイオン対の導入によるオリゴペプチドの有機溶媒への可溶化効果を明らかにし、有機溶媒中における二次構造を形成を検討する。オリゴペプチドの水素結合形成を利用したヘリックス形成を中心としたナノレベルの構築体の設計原理を明らかにする。



3. 研究の方法

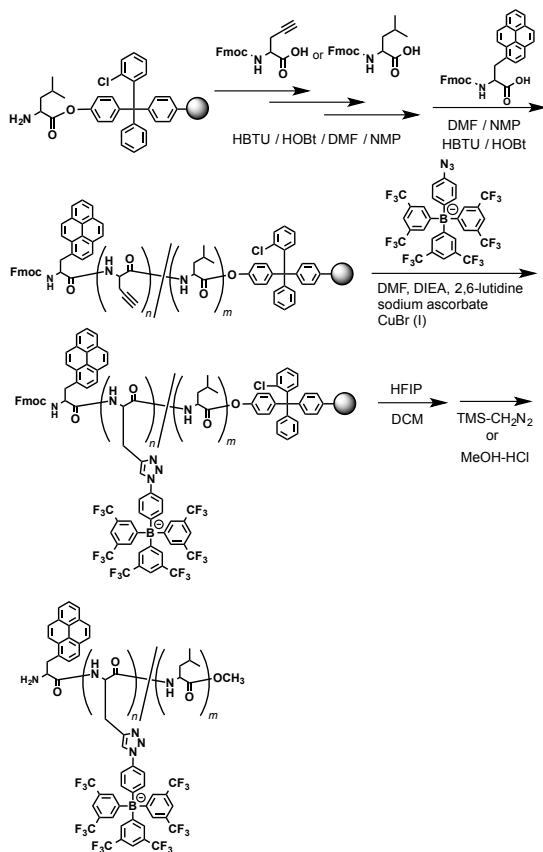
(1) 反応性官能基としてアジド基をもつ親油性イオン対の合成

親油性の高いテトラフェニルボレーート塩

に反応性官能基（特にアジド基）の導入する合成計画を立てた。対カチオンについては反応の最後の段階で疎水性の高いテトラフェニルホスホニウム塩または長鎖アルキルからなる第4級テトラアルキルアンモニウム塩へとイオン交換を行う。すべての反応生成物はカラムクロマトグラフィー等により単離精製後、NMR, IR, 質量分析, 元素分析などの機器分析により、同定を行った。

(2) ポリペプチドの固相合成およびクリック反応による親油性イオン対の導入

オリゴペプチドの合成は通常 Fmoc 固相合成法によって行った。下図に一般的な合成スキームを示す。配列は Leu などの繰り返し構造をもつものなど、比較的単純なものを検討し、親油性イオン対をクリック反応で導入するため、オリゴペプチドにはアセチレンをもつアミノ酸誘導体をその固相合成時に導入した。溶解度評価のために、オリゴペプチドの N 末端に疎水性が高く、可視部に吸収を持つピレンをもつアミノ酸 (Py) を導入した。前項で合成したアジド基をもつ親油性イオン対を銅イオン (I) 存在下でオリゴペプチドのアセチレンと反応させることにより、親油性イオン対の導入を行った。その際、クリック反応は担体上と固相担体から切り離れた後、遊離のオリゴペプチドへの反応の両方を検討した。さらに C 端はジアゾメタンやメタノール・酸で処理することにより、メチルエステル化した。



最終的なオリゴペプチドの配列を以下に示す。(LP は親油性イオン対導入予定部位)

L5: Py-L-LP-L-L

L8: Py-L-L-LP-L-L-L-L

L13: Py-L-LP-L-L-L-L-LP-L-L-L-L-L

生成物はいずれも NMR, IR, 質量分析, 元素分析などの機器分析により、同定を行った。

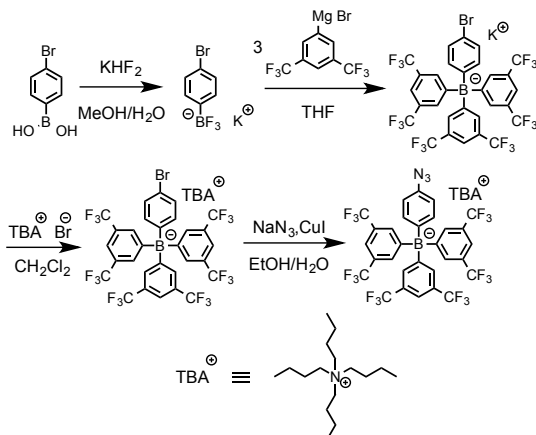
(3) 親油性イオン対を導入したオリゴペプチドの溶解性評価

前項で合成した親油性イオン対を導入したオリゴペプチドの溶解度をアセトン・1,2-ジクロロエタンなどの有機溶媒を用いて調べた。まず、これらのオリゴペプチドを有機溶媒へ懸濁させ、十分攪拌した後、メンメンブレンフィルターで濾過した後、紫外可視吸収スペクトルを測定することにより、ピレン官能基の吸光度より評価した。

4. 研究成果

(1) 反応性官能基としてアジド基をもつ親油性イオン対の合成

下図に従いフェニルホウ酸誘導体を原料として、ホウ素原子のトリフルオロ化、対応する 3,5-ビストリフルオロメチルプロモベンゼンブロミドから誘導される Grignard 試薬とのカップリングにより、一つのベンゼン環上に臭素をもつテトラフェニルボレート塩のカリウム塩を良好な収率で合成することに成功した。このカリウム塩をテトラブチルアンモニウム塩にイオン交換した後、ヨウ化銅存在下、アジ化ナトリウムで処理することにより、アジド基をもつ第四級テトラブチルアンモニウム テトラフェニルボレート塩誘導体を合成することに成功した。



さらに修飾反応の反応条件の探索のため、耐酸性について検討を行った。0.5%トリフルオロ酢酸 (TFA) のジクロロメタン (DCM) 溶液では容易にホウ素炭素結合が分解され、ホウ酸イオンの分解が起こるが、25%ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) の DCM 溶液では十分な安定性をもつことが明らかになった。

(2) オリゴペプチドの固相合成およびクリック反応による親油性イオン対の導入

アセチレンを含むアミノ酸 1 つまたは 2 つ

含み、残りはロイシンからなるオリゴペプチドの合成を行った。

L5およびL8についてはESI-MASSによる同定を行ったところ、アニオンモードからは期待される分子量に、親油性イオン対をもつオリゴペプチドが検出され、親油性イオンをもつオリゴペプチドの生成が確認できた。L13については2箇所のアセチレンのうち、1つのみが反応したもののみが確認された。

(3) 親油性イオン対を導入オリゴペプチドの溶解性評価および集合体形成

いずれの生成物も HFIP に分散可能であった。さらにこの溶液にアセトンや1,2ジクロロエタンを加え、濃縮することにより、溶媒置換を行い、これらの低極性溶媒中での紫外可視吸収スペクトルによりその溶解度を評価したところ、親油性イオン対の導入によって、溶解性の向上が認められた。特に1,2ジクロロエタンでは親油性イオンを導入していないものと比べて10倍程度溶解度の向上が見られた。しかしながら、現状ではこれらの親油性イオン対の導入をしたオリゴペプチドにおいても、蒸発乾固すると、いずれの場合も不溶化するため、溶解性向上については更なる検討が必要と思われる。

またこれらのオリゴペプチドについて、円二色性スペクトル(CD)の測定を行ったが、いずれも溶媒に問題があり、ヘリックス形成を議論することが困難であり、NMRなどの手法の検討が必要であることが明らかになった。また、これらのオリゴペプチドの両親媒性について評価したところ、有機溶媒中での会合挙動が明らかになり、親油性イオン対を疎水部とする新しい両親媒性物質であることを示すことができた。

(4) まとめ

親油性イオン対を導入オリゴペプチドの溶解性の向上が見られたことから、このようなイオン対を導入する手法が有機溶媒中でも可溶化の手法として有効であることが示された。しかしながら、高次構造の確認が次の課題として残されている。

材料科学の観点からはアジド基をテトラアルキルアンモニウムテトラフェニルボレート塩の合成に成功しており、アセチレンをもつ様々な機能性材料に同種イオンを容易に導入することができる手法の開発に成功しており、親油性イオン対を持つ新規材料の開発に弾みがつくものと思われる。

また親油性イオン対を疎水部とし、オリゴペプチド部位を親水部とすることで、従来の界面活性剤とは逆の構造をもつ両親媒性分子の構築にもつながり、超分子化学として展開が期待できる。

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0件)
当該なし

〔学会発表〕(計5件)

①福島寛太、須永総玄、南部貴則、小門憲太、佐田和己、親油性電解質を有するオリゴペプチドの合成、日本化学会第96春季年会、2016年3月25日、同志社大学京田辺キャンパス、京都府京田辺市

②山田泰平・小門憲太・佐田和己、イオン対を疎水部とする両親媒性分子の分子集合体形成、日本化学会第96春季年会、2016年3月24日、同志社大学京田辺キャンパス、京都府京田辺

③Taihei Yamada, Kenta Kokado, Kazuki Sada, Reverse amphiphiles having a lipophilic ion pair as the hydrophobic part, Pacifichem 2015, 2015年12月17日, Hawaii Convention Center, ホノルル市(米国)

④山田泰平・小門憲太・佐田和己、非極性溶媒中での静電相互作用による両親媒性糖誘導体の分子集合体制御、第64回高分子討論会、2015年9月15日、東北大学川内キャンパス、宮城県仙台市

⑤山田泰平・小門憲太・佐田和己、イオン対を疎水部とする両親媒性分子の合成と分子集合体形成、第66回コロイドおよび界面化学討論会、2015年9月10日、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県鹿児島市

〔その他〕

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~matchemS/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐田 和己 (SADA KAZUKI)

北海道大学・大学院理学研究院 教授

研究者番号：80225911

(2) 研究分担者

小門 憲太 (KOKADO KENTA)

北海道大学・大学院理学研究院 助教

研究者番号：40600226