

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07858

研究課題名(和文) 真に実用的なペプチド・タンパク質機能制御を可能とする刺激応答型アミノ酸の開発

研究課題名(英文) Development of a stimulus-responsive amino acid that enables functional control of peptides and proteins

研究代表者

重永 章 (SHIGENAGA, Akira)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・講師

研究者番号：10423394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では真に実用的なペプチド・タンパク質機能制御系の構築を目的とし、その基盤となる高速アミド結合切断反応を開発したのち、刺激応答型アミノ酸へと展開することを目指した。なお刺激応答型アミノ酸とは、外部からの刺激によりペプチド主鎖アミド結合の切断を誘起する人工アミノ酸と定義する。

本研究の結果、蛍光を指標としたアミド結合切断反応のモニタリング系を確立するとともに、本反応が一次反応であり中間体の半減期から速度論的比較ができることを明らかにした。さらに、反応速度の向上を目指して種々の誘導体を合成し、この中から特に酸性条件下でのアミド結合切断を著しく加速する誘導体を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：A stimulus-responsive amino acid, which induces stimulus-triggered amide/peptide bond cleavage, enables functional control of peptides and proteins. In this project, we challenged to accelerate the amide bond cleavage of the stimulus-responsive unit that should be the bases for practical stimulus-responsive amino acids. We first established a fluorescence-based system to easily monitor the amide bond cleavage. Then, several new stimulus-responsive units were synthesized and their kinetics of the amide bond cleavage was evaluated based on the fluorescence monitoring. Finally, we successfully found out a new stimulus-responsive unit, its amide bond cleavage is significantly accelerated under acid conditions.

研究分野：有機合成化学

キーワード：トリメチルロック 機能制御 ペプチド タンパク質 刺激応答 ラクトン化 アミド結合切断 ペプチド結合切断

1. 研究開始当初の背景

ケミカルバイオロジー分野において、細胞外部からの刺激による細胞内現象の制御法が盛んに開発されている。このための鍵分子として、外部からの刺激をアミド結合切断へと変換するトリメチルロック誘導体が注目を集めている [1]。例えば申請者らも、本分子を基本骨格とした刺激応答型アミノ酸、すなわち外部からの刺激によりペプチド主鎖の切断を誘起する人工アミノ酸を開発し、これを基盤とした細胞内でのペプチド機能制御法の確立に成功している [2]。これら研究ではリアルタイムでの機能制御を可能とするため、外部からの刺激に応じて直ちにアミド結合が切断される必要がある。しかし申請者らのこれまでの研究から、ある種の誘導体では本反応が非常に遅いことが明らかとなっていた (最も遅い場合、中間体の半減期は 52 分) [3]。そこで本研究では、トリメチルロック誘導体を基盤としたペプチド・タンパク質リアルタイム機能制御系の構築を念頭に置き、高速アミド結合切断を可能とするトリメチルロック誘導体の開発と刺激応答型アミノ酸への展開を目指すこととした。

参考文献

- [1] Levine, M. N.; Raines, R. T. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2412-2420.
- [2] Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Kohiki, T.; Inokuma, T.; Otaka, A. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 505-513 (Akabori Special Issue, Invited Review).
- [3] Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Hirakawa, H.; Yamaguchi, K.; Otaka, A. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2212-2216.

2. 研究の目的

本研究では真に実用的なペプチド・タンパク質リアルタイム機能制御系の構築を目的とし、トリメチルロック誘導体を基盤とした高速アミド結合切断反応系を開発したのち、本誘導体の刺激応答型アミノ酸への展開を目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究は下記順に従って進めた。

- (1) アミド結合切断反応の追跡を容易とするモニタリング系の構築
- (2) 高速アミド結合切断ユニットの開発
- (3) 上記ユニットを基本骨格としたアミノ酸誘導体の合成
- (4) 上記アミノ酸を導入したペプチドの調製法の確立

4. 研究成果

申請者はまず、蛍光を指標としたアミド結合切断反応のモニタリング方法を確立し、本アミド結合切断反応が一次反応であり、反応速度を反応中間体の半減期に基づき比較できることを明らかにした。続いて、アミド結

合切断反応の速度の向上を目指し、立体障害の大きい *tert*-ブチル基を導入した誘導体の合成に挑戦した。しかし、その合成は困難であることが判明した。そこで、同じく立体障害の大きいイソプロピル基を導入した誘導体を合成し、その反応速度を測定した。その結果、予測に反し、反応の加速は観測されなかった。このため分子設計の方針を転換し、トリメチルロックのフェノール性水酸基を他の求核性官能基へと置換した誘導体を種々合成したところ、一部の誘導体において、特に酸性条件下でのアミド結合切断が著しく加速されることを見出した。そこで、本骨格を基盤とした刺激応答型アミノ酸を開発し、アミド結合切断反応速度を測定したところ、予想外にも反応速度の上昇は見られなかった。この原因がペプチド主鎖による立体障害に起因すると考察されたため、アミノ酸部分を α -アミノ酸型から β -アミノ酸型へと変更し立体障害の影響を抑制した誘導体を合成することとした。現在までに当該誘導体の合成に成功するとともに、本アミノ酸を導入したモデルペプチドの合成を達成している。今後は、本モデルペプチドのアミド結合切断反応について検討したのち、本アミノ酸もしくはその誘導体を真に実用的なペプチド・タンパク質機能制御法へと展開する計画である。なお、上述の研究成果については論文投稿準備中であり未発表のため、化合物の具体的構造を含むその詳細については、今後投稿予定の論文中において詳しく述べたい。

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13件)

- 1) Shigenaga, A.*; Naruse, N.; Otaka, A. “ProteoFind: A script for finding proteins that are suitable for chemical synthesis” *Tetrahedron* **2018**, *74*, 2291-2297. (査読あり)
- 2) Kohiki, T.[#]; Kato, Y.[#]; Nishikawa, Y.; Yorita, K.; Sagawa, I.; Denda, M.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.*; Fukui, K.*; Otaka, A.* “Elucidation of inhibitor-binding pocket of D-amino acid oxidase using docking simulation and *N*-sulfanylethylanilide-based labeling technology” *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5289-5297 and 5240. ([#]equal contribution) *Inside Front Cover* (査読あり)
- 3) Kohiki, T.; Nishikawa, Y.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Chemical synthetic platform for chlorpromazine oligomers that were reported as photo-degradation products of chlorpromazine” *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, *65*, 1161-1166. (査読あり)

- 4) Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Kohiki, T.; Inokuma, T.; Otaka, A. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 505-513 (Akabori Special Issue, Invited Review). (査読あり)
- 5) Eto, M.[#]; Naruse, N.[#]; Morimoto, K.; Yamaoka, K.; Sato, K.; Tsuji, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* "Development of an anilide-type scaffold for the thioester precursor *N*-sulfanylethylcoumarinyl amide" *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4416-4419. ([#]equal contribution) (査読あり)
- 6) Morisaki, T.; Denda, M.; Yamamoto, J.; Tsuji, D.; Inokuma, T.; Itoh, K.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* "*N*-Sulfanylethylanilide-based traceable linker for enrichment and selective labelling of target proteins" *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6911-6913. (査読あり)
- 7) Denda, M.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Yamamoto, J.; Sato, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* "Labelling of endogenous target protein via N-S acyl transfer-mediated activation of *N*-sulfanylethylanilide" *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6244-6251. *Highlighted in Current Hot Articles in Organic & Biomolecular Chemistry* (査読あり)
- 8) Shimizu, T.; Miyajima, R.; Sato, K.; Sakamoto, K.; Naruse, N.; Kita, M.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* "Facile synthesis of C-terminal peptide thioacids under mild conditions from *N*-sulfanylethylanilide peptides" *Tetrahedron* **2016**, *72*, 992-998. (査読あり)
- 9) Shimizu, T.; Miyajima, R.; Naruse, N.; Yamaoka, K.; Aihara, K.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* "Facile preparation of peptides with C-terminal *N*-alkylamide via radical-initiated dethiocarboxylation" *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 375-378. (査読あり)
- 10) Komiyama, C.[#]; Aihara, K.[#]; Morishita, K.; Ding, H.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A.* "Development of an intein-inspired amide cleavage chemical device" *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 699-707. ([#]equal contribution) (査読あり)
- 11) Miyajima, R.; Tsuda, Y.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Imanishi, M.; Futaki, S.; Otaka, A.* "Preparation of peptide thioesters from naturally occurring sequences using reaction sequence consisting of regioselective S-cyanylation and hydrazinolysis" *Biopolymers (Peptide Science, Special Issue: Emerging Peptide Science from Japan)* **2016**, *106*, 531-546. (査読あり)
- 12) Aihara, K.; Yamaoka, K.; Naruse, N.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A.* "One-pot/sequential native chemical ligation using photo-caged crypto-thioester" *Org. Lett.* **2016**, *18*, 596-599. (査読あり)
- 13) Kita, M.; Yamamoto, J.; Morisaki, T.; Komiyama, C.; Inokuma, T.; Miyamoto, L.; Tsuchiya, K.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* "Design and synthesis of a hydrogen peroxide-responsive amino acid that induces peptide bond cleavage after exposure to hydrogen peroxide" *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4228-4231. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計16件)
- 1) 重永 章、大高 章「アシル基転移反応を基盤とする標的タンパク質精製・機能解明ツールの開発」日本薬学会第138年会(シンポジウム 中分子創薬研究のフロンティア)(金沢市・ANA クラウンプラザホテル金沢) 2018年3月25-28日
- 2) 重永 章「アミド結合切断反応を基盤とした生命科学指向型ツールの開発」第43回反応と合成の進歩シンポジウム(富山市、富山国際会議場) 2017年11月6, 7日
- 3) 古曳泰規、傳田将也、藤川昂樹、猪熊 翼、重永 章、小暮健太郎、大高 章「*N*-Sulfanylethylanilide を用いた細胞内標的タンパク質ラベル化法の開発」日本薬学会第137年会(仙台市・東北大学) 2017年3月24-27日
- 4) 津田雄介、重永 章、辻 耕平、傳田将也、佐藤浩平、北風圭介、中村太寛、猪熊 翼、伊藤孝司、大高 章「タンパク質位置選択的修飾を指向したチオエステル調製法の開発」第34回メディスナルケミストリーシンポジウム(つくば市・つくば国際会議場) 2016年11月30日~12月2日
- 5) 森崎巧也、傳田将也、辻 大輔、山本 純、猪熊 翼、伊藤孝司、重永 章、大高 章「SEAlide を基盤とした標的タンパク質精製ツールの開発研究」第34回メディスナルケミストリーシンポジウム(つくば市・つくば国際会議場) 2016年11月30日~12月2日
- 6) 山岡浩輔、栗飯原圭佑、成瀬公人、猪熊 翼、重永 章、大高 章「One-pot sequential

- native chemical ligations using photocaged crypto-thioester」第53回ペプチド討論会（京都市・京都テルサ）2016年10月26-28日
- 7) 森崎巧也、傳田将也、山本 純、辻 大輔、猪熊 翼、伊藤孝司、重永 章、大高 章「Development of N-sulfanyltehylanilide (SEAlide)-based traceable linker for enrichment and selective labeling of target proteins」第53回ペプチド討論会（京都市・京都テルサ）2016年10月26-28日
- 8) 重永 章「N-Sアシル基転移反応を基盤としたタンパク質完全化学合成法の開拓」有機合成化学協会中国四国支部主催第74回パネル討論会『次世代を切り拓く全合成研究の若い力』（徳島市・徳島大学）、2016年10月1日
- 9) 粟飯原圭佑、山岡浩輔、成瀬公人、猪熊 翼、重永 章、大高 章「One-Pot/Sequential Native Chemical Ligation Using Photo-responsive Crypto-thioester」34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium (Universitat Leipzig, Leipzig, German) 2016年9月4-7日
- 10) 小宮千明、粟飯原圭佑、猪熊 翼、重永 章、大高 章「Intein-inspired Amide Bond Processing Device」34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium (Universitat Leipzig, Leipzig, German) 2016年9月4-7日
- 11) 山岡浩輔、粟飯原圭佑、成瀬公人、猪熊 翼、重永 章、大高 章「光応答型チオエステル等価体を用いた多成分 One-pot NCL 法の開発研究」創薬懇話会2016 in 蓼科（茅野市・エクシブ蓼科）2016年6月30日-7月1日
- 12) 森崎巧也、傳田将也、辻 大輔、山本 純、猪熊 翼、伊藤孝司、重永 章、大高 章「標的タンパク質精製ツール“SEAlide-based traceable linker”の開発」日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会（京都市・京都テルサ）2016年6月15-17日
- 13) 古曳泰規、傳田将也、森崎巧也、辻 大輔、猪熊 翼、伊藤孝司、重永 章、大高 章「“SEAL-tag”を基盤とした細胞内での標的タンパク質ラベル化法の開発」日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会（京都市・京都テルサ）2016年6月15-17日
- 14) 重永 章、大高 章「ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー研究のための基盤技術の開拓」日本薬学会第136年会（シンポジウム「疾患代謝」から解明される生命現象と創薬研究への応用）（横浜市・パシフィコ横浜）2016年3月26-29日
- 15) 重永 章「ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー研究のための基盤技術の開拓」名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学特別セミナー（名古屋市・名古屋大学）、2015年10月16日
- 16) 小宮千明、粟飯原圭佑、猪熊 翼、重永 章、大高 章「タンパク質自己編集システムを範としたアミド結合切断反応の開発」第三十一回若手化学者のための化学道場（淡路市・淡路夢舞台国際会議場）2015年8月27, 28日
- 〔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〕
- 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・大学院医歯薬学研究部(薬学域)
 ・講師
 研究者番号：10423394
- (2)研究分担者
 なし
- (3)連携研究者
大高 章 (OTAKA, Akira)
 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)
 ・教授
 研究者番号：20201973
- 猪熊 翼 (INOKUMA, Tsubasa)
 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)
 ・助教
 研究者番号：40541272
- (4)研究協力者
 なし