

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14979

研究課題名(和文)半合成抗体様分子創製法の開拓研究

研究課題名(英文)Synthetic Study on Semi-synthetic Antibody

研究代表者

大高 章(OTAKA, Akira)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：20201973

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)：本研究を通じて人工抗体分子作成のために必要とされる天然アミノ酸配列のチオエステルへの変換法、2種類の開発に成功した。一つは特定の配列に対するNi(II)の配位とこれに引き続く4回のアシル基転移反応からなる反応である。もう一つは位置選択的な特定システイン残基に対するシアノ化とこのシアノ化システインを対象としたヒドラジンによる開裂反応である。生成したペプチドヒドラジドは容易にチオエステルへの反感が可能である。これら二つの反応は化学的に天然ペプチド配列をチオエステルに変換しうるものであり、従来にない画期的な反応である。

研究成果の概要(英文)：In this study, chemical methodology for the conversion of naturally occurring peptide sequences to the thioester units or their equivalent. We developed two innovative methodologies for this purpose. One methods uses the Ni(II)-coordination to four residue sequence, consisting of Ser-Xaa-His-Yaa. After coordination of the Ni(II) to the four residue sequence, four sequential acyl-transfer occurred to produce peptide hydrazide. The resulting hydrazide could be successfully converted to the corresponding thioesters. Other procedure utilizes the regioselective S-cyanylation followed by hydrazinolysis of the N-terminal side peptide bond of the cyanylation residue. This procedure allowed for the formation of thioester. Established two methodologies were successfully applied to the conversion of various type of naturally occurring peptide sequences to the corresponding peptide and protein thioesters. And such thioesters will find great utility for the semi-synthesis of antibody molecules.

研究分野：創薬化学

キーワード：ペプチド 蛋白質 チオエステル アシル基転移反応

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬をはじめとする生物医薬品は、低分子医薬には見られない特長を有し薬物療法分野に革新をもたらし、売上高世界 Top Ten 中に7品目がランクインし目覚ましい成長を遂げつつある医薬品群である。本研究は生物医薬品の中心である抗体医薬品のさらなる高機能化に有機化学的な観点から取り組み、従前の遺伝子工学的手法のみでは到達不可能な半合成抗体様分子創出法を開拓することを目的とする。現在、抗体医薬品の高機能化としては抗体依存性細胞障害反応 (ADCC) 活性の向上を目指した協和発酵キリンによるポテリジェント技術が有名である。また、薬物と抗体の複合体形成も抗体医薬の効力増強法として有効であるが、抗体には複合体形成に関与し得る官能基が多数存在し、均一な抗体-薬物複合体の創製には困難を伴う。さて、申請者はタンパク質完全化学合成研究の中で、天然のチオエステル形成段階を化学デバイスで模倣した効率的ペプチドチオエステル合成システムの開発に成功した。ペプチドチオエステルは1,2-アミノチオール構造を有する化合物と高い選択性で反応し、縮合生成物を与えるので、タンパクチオエステルが容易に調製できれば、均一な抗体-薬物複合体が容易かつ高純度で合成可能となる。天然チオエステル形成段階に関する Intein タンパク質を利用する手法があるが成功確率は満足できるものでなく、新たなタンパクチオエステルの調製法が強く求められていた。そこで、本研究では、将来的な抗体分子への展開を念頭に置き、天然アミノ酸配列を化学的にチオエステルに変換可能な方法論を確立することを中心課題として研究を遂行することとした。

## 2. 研究の目的

タンパク質チオエステルは、タンパク質を部位特異的に修飾し、均一性の高い複合体分子などを創製するうえで極めて有用な反応中間体である。そこで汎用性が高いタンパク質チオエステル調製法の開発が求められている。本研究では、いまだ成功例のない発現タンパク質に適応可能なチオエステルの化学的調製法の創出を行い、これを基盤に抗体医薬品の高機能化に有機化学的な観点から取り組み、従前の遺伝子工学的手法のみでは到達不可能な半合成抗体様分子創出法を開拓することを目的とした。すなわち、本研究は困難とされてきたタンパク質の部位特異的修飾をチオエステルにより達成し、次世代生物医薬品の開発に結び付けるものでタンパク質化学分野のみならず生物医薬品開発分野における波及効

果も大変大きなものがある。

## 3. 研究の方法

発現タンパク質に適応可能な化学的手法に基づくタンパクチオエステル調製法の創出を行い、半合成抗体様分子の創製に挑戦する。化学的手法は Intein タンパク質機能の短鎖ペプチド配列による模倣によって達成する計画を立てた。発現タンパク質からタンパクチオエステルが容易に調製することが可能となれば、高機能タンパク性医薬品の創製に格段の進歩をもたらすもので、タンパクチオエステルの効率的調製法の確立は生物有機化学分野における喫緊の課題の一つである。タンパクチオエステル調製に利用可能な手法はチオエステル化したタンパク質のC末側に130残基を超える Intein タンパク質を融合させ、Intein 配列が有するN-Sアシル基転位反応を促進する酵素作用によりチオエステルを調製する方法論がある。しかし、本手法の利用によるチオエステル形成の成功確率は決して高いものでないため、新たなタンパクチオエステル形成反応の創出が広く望まれていた。申請者は、Intein によるチオエステル形成反応機構を人工化学デバイスで模倣することで化学合成による効率的チオエステル合成を達成した。しかし、化学デバイスを利用する限り、タンパク質発現系が利用できないため、タンパクチオエステルを効率的に合成することは極めて困難である。そこで、申請者は Intein 配列のチオエステル形成に関する機能をアミノ酸10残基以下の短鎖ペプチド配列で模倣するという着想に至った。模倣する際には、化学的シグナルでチオエステル形成が進行するようにデザインを施せば、短鎖機能配列を含む発現タンパク質を化学反応によりチオエステルに変換できることを意味するものである。本提案研究は、Intein タンパク質のチオエステル形成に関する機能を短鎖の機能配列で模倣し、化学反応で制御しようとする点に極めて斬新なアイデアがある。また、発現タンパク質の化学反応によるチオエステルへの変換反応は、国の内外を問わず信頼性の高い成功例はないのが現状である。この観点からも本研究のチャレンジ性は極めて高いと考えた。さらに上記の研究を遂行する過程において、ペプチドチオエステルの前駆体としてペプチドヒドラジドの有用性を認識するとともに、ペプチドヒドラジドを調製ターゲットとしても目的の達成が図れることが明らかとなった。そこで、Intein 機能の短鎖ペプチド配列でも模倣以外に位置選択的システイン残基のシアノ化反応およびカルボキシペプチダーゼによる

加水分解反応を利用した方法論についてもその応用可能性について検討を加えた。

#### 4. 研究成果

(1) Intein 配列機能の短鎖ペプチド配列による模倣

短鎖ペプチド配列として Ser(or Thr)-X-His-Z 配列を利用し、この配列に対する Ni(II)の選択的配位とこれに続く4つのアシル基転移反応を基盤とする sequential quadruple acyl transfer system (SQAT system)を開発した (Fig. 1, 2)。

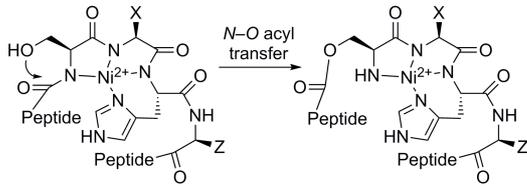


Fig.1. 特定4残基配列に対する Ni(II)イオンの選択的配位反応と続く N-O アシル基転移反応

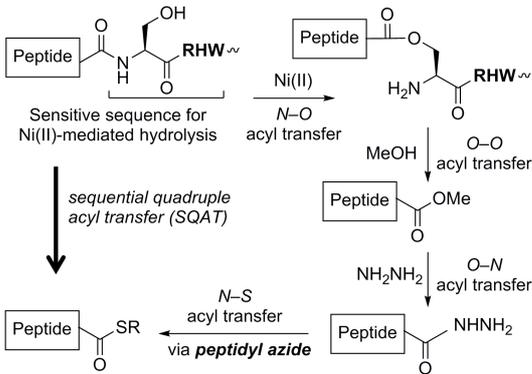


Fig.2. Ni(II)の配位反応を基盤とした SQAT 法の概念図

SQAT 法を利用することで天然ペプチド配列 Ser-Arg-His-Trp 配列が選択的にペプチドヒドラジド配列を経由してこれをペプチドチオエステルに変換することが可能であることを明らかにした。ペプチドレベルでの反応は十分に進行することを明らかにしたので (Fig 3)、現在タンパク質レベルでの応用可能性について検討を加えている。

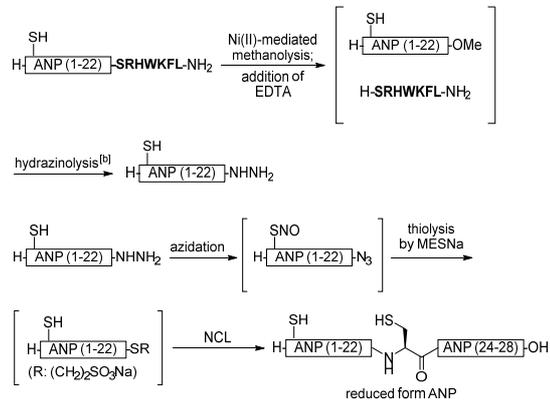


Fig 3. モデルペプチドへの利用と続く Native Chemical Ligation (NCL)反応を利用した還元型 hANP の合成

(2) 位置選択的な Zn-finger 形成反応とこれに続く S-シアノ化反応とヒドラジド化反応の開発

下図 Fig. 4 に示したように Zn-finger 配列を利用することで配列特異的な S-シアノ化反応の開発に成功した。これを利用することで第2番目の天然ペプチド配列に応用可能なペプチドチオエステル合成法を開発した。

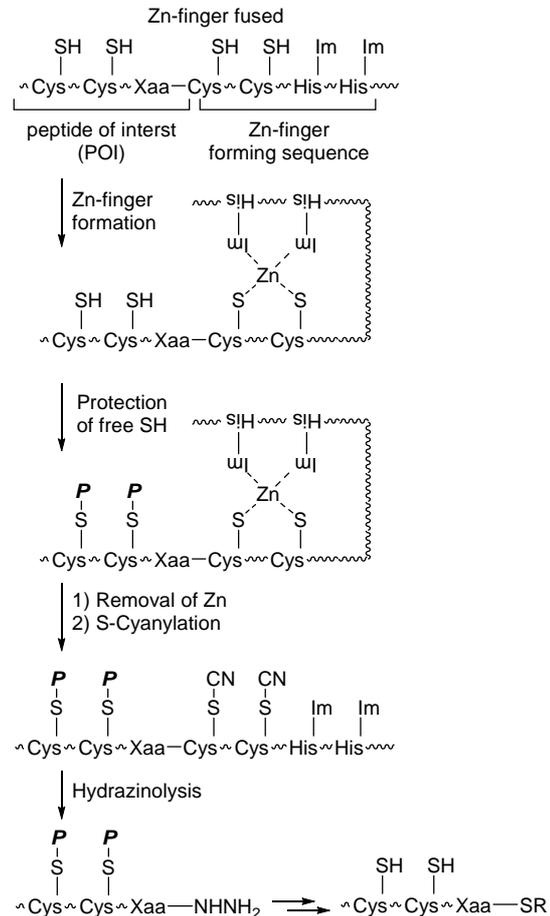


Fig.4 S-シアノ化反応を利用したチオエステル合成

SQAT 法および選択的なシアノ化反応とこれに続いたヒドラジド化によるペプチド結合の切断反応を key 反応としたチオエステル調製法 2 種類の開発に成功した。これらの方法論は天然配列を選択的にチオエステルに変換できるものとして極めて独創性、独自性の高いものである。現在これらのタンパク質への応用について検討を続けており、これを発展させることで当初の目的に結びつけることが可能なものと考えている。また、新たな試みとして、ある種のアルデヒドおよびヒドラジンの存在下において、カルボキシペプチダーゼにより天然ペプチド配列をペプチドヒドラジド経由でチオエステルに変換可能であることを明らかにしつつある。これは第 3 の方法論として、本計画の達成に有用なものと現在精力的に検討を加えている。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 3 件 )

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*. 査読有、Vol.106、2016、531-546、10.1002/bip.22757  
Komiya, 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.* 査読有、Vol.81、2016、699-707、10.1021/acs.joc.5b02399  
Shimizu, T.; Miyajima, R.; Kohei, S.; 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*, 査読有、Vol.72、2016、992-998、10.1016/j.tet.2015.12.070  
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.* 査読有、Vol.64、2016、375-378、10.1248/cpb.c15-01025  
Aihara, K.; Yamaoka, K.; Naruse, N.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A. One-pot/sequential native chemical ligation using photocaged crypto-thioester. *Org. Lett.* 査読有、Vol.18、2016、596-599、10.1021/acs.orglett.5b03661  
Nakamura, T.; Sato, K.; Naruse, N.; Kitakaze, K.; Inokuma, T.; Hirokawa, T.; Shigenaga, A.; Itoh, K.; Otaka, A. Tailored synthesis of 162-residue S-monoglycosylated

GM2-activator protein (GM2AP) analogues that allows access to protein library. *ChemBioChem*. 査読有、Vol.17、2016、1986-1992、10.1002/cbic.201600400  
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.* 査読有、Vol.18、2016、4416-4419、10.1021/acs.orglett.6b02207  
Tsuda, S.; Mochizuki, M.; Sakamoto, K.; Denda, M.; Nishio, H.; Otaka, A.; Yoshiya, T. N-Sulfanylethylaminoxybutyramide (SEAoxy): A Crypto-Thioester Compatible with Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Lett.* 査読有、Vol.18、2016、5940-5943、10.1021/acs.orglett.6b03055  
津田雄介、重永 章、佐藤浩平、中村太寛、北風圭介、猪熊 翼、伊藤孝司、大高 章、天然アミノ酸配列に適用可能な新規タンパク質チオエステル合成法の開発、*ケミカルバイオロジー*、査読有、Vol.9、2015、7-10.  
Tsuda, Y.; Shigenaga, A.; Denda, M.; Sato, K.; Kitakaze, K.; Nakamura, T.; Inokuma, T.; Itoh, K.; Otaka, A. Development of chemical methodology for preparation of peptide thioesters applicable to naturally occurring peptides using a sequential quadruple acyl transfer system. *ChemistryOpen*、査読有、Vol.4、2015、448-452、10.1002/open.201500086  
Sato, K.; Kitakaze, K.; Nakamura, T.; Naruse, N.; Aihara, K.; Shigenaga, A.; Inokuma, T.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. The total chemical synthesis of the monoglycosylated GM2 ganglioside activator using a novel cysteine surrogate. *Chem. Commun.* 査読有、Vol.51、2015、9946-9948、10.1039/C5CC02967H  
Tsuji, K.; Tanegashima, K.; Sato, K.; Sakamoto, K.; Shigenaga, A.; Inokuma, T.; Hara, T.; Otaka, A. Efficient one-pot synthesis of CXCL14 and its derivative using an N-sulfanylethylanilide peptide as a peptide thioester equivalent and their biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有、Vol.23、2015、5909-5914、10.1016/j.bmc.2015.06.064  
Otaka, A.; Sato, K.; Shigenaga, A. Chemical synthesis of proteins using N-sulfanylethylanilide peptides, based on N-S acyl transfer chemistry. *Topics in Current Chem.* 査読有、Vol.363、2015、33-56.

[ 学会発表 ] ( 計 1 3 件 )

河野誉良、成瀬公人、猪熊 翼、重永 章、大高 章、チオエステル等価体として機能するタンパク質の化学合成のための新規補助基の開発、日本薬学会第 137 年会、2017

年3月24~27日、仙台国際センター、東北大学川内地区（宮城県仙台市）  
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回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016年11月30日~12月2日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）  
中村太寛、重永 章、成瀬公人、猪熊 翼、大高 章、Tailored Synthesis of 162-Residue S-Monoglycosylated GM2-Activator Protein (GM2AP) Analogues Applicable to the Preparation of a Protein Library、第53回ペプチド討論会、2016年10月26~28日、京都テルサ（京都府京都市）  
Komiya, C.; Aihara, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Intein-inspired Amide Bond Processing Device. 34th European Peptide Symposium 2016 & 8th International Peptide Symposium、2016年9月1日~3日、Leipzig (Germany)  
山岡浩輔、栗飯原圭佑、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、2016年6月30日~7月1日、エクスィブ蓼科（長野県茅野市）  
Otaka, A.; Miyajima, R.; Tsuda, Y.; Shigenaga, A. Regioselective S-Cyanylation-mediated Preparation of Peptide Thioester. 16th Akabori Conference Japanese-German Symposium on Peptide Science、2016年5月23~26日、六甲山ホテル（兵庫県神戸市）  
小宮千明、栗飯原圭佑、猪熊 翼、重永 章、大高 章、Development of intein-inspired peptide bond processing device . 第52回ペプチド討論会、2015年11月16~18日、平塚中央公民館（神奈川県平塚市）  
Otaka, A. *N*-Sulfanylethylanilide peptide as a crypto thioester for protein chemical synthesis. 5th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Application Symposium 2015、2015年10月22~25日、Queensland (Australia)  
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、タンパク質半化学合成を指向した配列特異的チオエステル化法の開発、創薬懇話会 2015 in 徳島、2015年7月2~3日、グランドエクスィブ鳴門ザ・ロッジ（徳島県鳴門市）  
大高 章、佐藤浩平、重永 章 化学合成によるタンパク質製剤調製の挑戦、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24日~26日、あわぎんホール（徳島県徳島市）  
Tsuda, Y.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Denda, M.; Sato, K.; Kitakaze, K.; Nakamura, T.; Inokuma, T.; Itoh, K.; Otaka, A. Development of Chemistry-based Protocol for Sequence-dependent Thioesterification.

American Peptide Symposium 2015、2015年6月20~25日、Orland (USA)  
中村太寛、重永 章、佐藤浩平、津田雄介、坂本 健、猪熊 翼、大高 章、GM2活性化タンパク質誘導体の第二世代化学合成法の開発研究、日本薬学会第135年会、2015年3月25日~28日、神戸学院大学、兵庫医療大学 他（兵庫県神戸市）  
小宮千明、栗飯原圭佑、猪熊 翼、重永 章、大高 章、プロテインスプライシング模倣型ペプチド結合切断デバイスの開発研究、日本薬学会第135年会、2015年3月25日~28日、神戸学院大学、兵庫医療大学 他（兵庫県神戸市）

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大高 章 (OTAKA, Akira)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学系）・教授

研究者番号：20201973