

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05844

研究課題名(和文)新規収斂的ワンポットペプチド連結法による糖タンパク質の迅速合成と結晶構造解析

研究課題名(英文) Development of a new convergent one-pot peptide ligation for the facile synthesis of glycoproteins and its crystallography

研究代表者

岡本 亮 (Okamoto, Ryo)

大阪大学・理学研究科・講師

研究者番号：30596870

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)：タンパク質の化学合成は、遺伝子組み換え技術では調製できない様々なタンパク質誘導体が得られる化学技術である。本研究では、タンパク質化学合成の鍵となるペプチド連結ステップにおける新技術として、複数のペプチド連結をワンポットでの実施を可能にする、ペプチド-グアニジド体を利用した位置選択的ペプチド連結法を開発した。これにより、166アミノ酸からなるエリスロポエチンのアミノ酸配列を、4つのペプチドセグメントのワンポット連結反応によって構築することに成功した。また開発した技術によって、環状タンパク質の合成も可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した技術は、これまで容易ではなかった大型のタンパク質とともに、環状タンパク質などの遺伝子工学では手に入らない特殊な構造のタンパク質合成にも利用可能である。この技術を利用することで、今後様々な人工機能性タンパク質の合成が期待できる。このような分子は天然に存在するタンパク質の機能を凌駕できる可能性を秘めており、基礎研究から創薬などの応用研究を含む広範な生命科学研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chemical synthesis is an indispensable technique for the preparation of unique proteins, which cannot be prepared by recombinant technique. In this work, we have developed a new regioselective peptide coupling strategy that enables one-pot peptide ligations. This new technique is based on the unique switchable reactivity of peptide-guanidine, an emerging peptide derivative. As a result, we succeeded in the assembly of full length of erythropoietin consisting of 166 amino acids from 4 peptide segments in one-pot manner. Furthermore, we also successfully synthesized a small circular protein by using the new regioselective peptide coupling strategy.

研究分野：生物有機化学

キーワード：タンパク質化学合成 ペプチドライゲーション ペプチド-グアニジド エリスロポエチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の化学合成は、遺伝子組み換え技術では調製できない様々なタンパク質誘導体が得られる化学技術である。タンパク質の化学合成では、複数の短いペプチドを溶液中で順次連結することで、標的とするタンパク質骨格の全長ポリペプチドを得る。この際、原料として様々な化学修飾を施したペプチドを利用することで、任意の修飾タンパク質の合成が可能である。

しかしこれまで 150 アミノ酸残基(分子量 20 kDa 程度)を超える大きさのタンパク質誘導体の化学合成は困難であった。タンパク質化学合成の鍵となるペプチド連結には、ネイティブケミカルライゲーション(NCL)を中心とした種々の化学反応が開発されてきた。NCLは、ペプチドチオエステルと、別のペプチドN末端に位置するシステイン(Cys)残基を水溶液中で化学選択的に連結できる反応である。チオエステルの種類を変えることで、速度論支配的にNCL反応をコントロールする kinetically controlled ligation(KCL)も報告されており、これにより複数のペプチドをワンポットで連結する道も拓かれた。しかしこの手法では、反応性は違えどもチオエステルという共通構造を利用するため、アミノ酸配列に依存して十分には各ペプチドの反応性を制御しきれないのが実情であった。このため、KCLというコンセプトの重要性は認識されつつも広くは利用されていなかった。近年ではチオエステル前駆体を利用することで、この問題を解決する試みがなされているが、いずれも特別なリンカーの調製や、厳密な反応条件のコントロール等の煩雑な作業を必要とし、普遍的に利用されるには至っていなかった。この結果、未だ複数のペプチド連結過程では、繰り返しの精製作業等の時間と労力を要する作業を含む従来の合成戦略が広くとられ、150 残基を超えるタンパク質合成ではミリグラムスケールでの合成すら容易ではなかった。

2. 研究の目的

上述の背景の元、本研究では 150 残基以上のアミノ酸から構成されるタンパク質でも迅速に合成できる、新しいタンパク質化学合成技術基盤を確立することを目的とした。生体内の機能性タンパク質の平均的なサイズは 150~200 アミノ酸程度である。したがって、このようなタンパク質を迅速に得られるようになれば、広範な生命科学研究に貢献することが期待された。

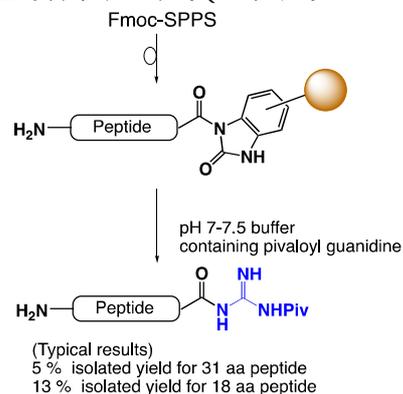
3. 研究の方法

簡便にタンパク質合成を行うための基盤技術として、収斂的なワンポットペプチド連結反応の開発を行った。これを実現するためにペプチド-グアニジド体を利用した新規な位置選択的NCLの開発、およびその周辺技術の検討を行った。ペプチド-グアニジド体は近年本研究代表者らが見出した、ペプチドC末端カルボキシル基がN-アシルグアニジンと脱水縮合した新しいペプチド誘導体である。この誘導体は中性水溶液中で安定であるが、大過剰のアルキルチオールによってペプチドチオエステルへと変換可能であるという特性を有していた。本研究ではこの性質を利用することで、高度にペプチドの反応性を制御した新しい拡張型KCLの開発を検討した。一連の検討においては、166 アミノ酸からなる生理活性糖タンパク質エリスロポエチン(EPO)のアミノ酸配列を標的とした。また別途、新規拡張型KCL法を利用した環状タンパク質の合成を行い、本手法による特殊な構造のタンパク質合成への有用性の検討も行った。

4. 研究成果

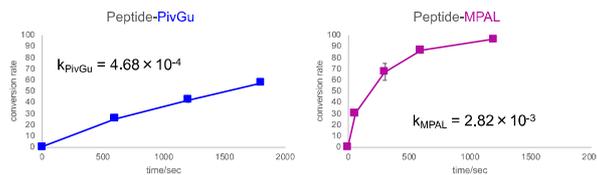
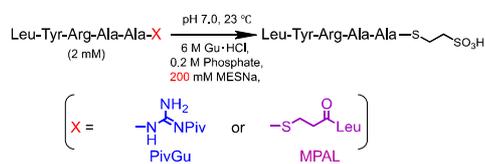
簡便なペプチド-グアニジド体合成法の確立

まず始めに、ペプチド-グアニジド体を利用するにあたり、広くペプチド合成に利用されている Fmoc 法を利用した新規合成法の開発を行った。先行研究より本申請者は、Boc 法によって合成したペプチドチオエステルを原料とした、ペプチド-ピバロイルグアニジド(ペプチド-PivGu)への交換反応を見出していた。Fmoc 法は Boc 法のように強酸を用いる繰り返し作業を必要とせず、相対的に安全な合成法であるが、直接的にペプチドチオエステルを合成することはできない。このため近年、Fmoc 法によりペプチドチオエステルと反応性が同等な様々な誘導体が報告されていた。そこで本研究では、ペプチドチオエステル等価体の一つであるペプチド-N-acyl-benz-imidazolinone(Nbz)体を原料として、新規なペプチド-グアニジド合成プロトコルを検討した。この結果、Fmoc ペプチド合成により固相上に構築した、ペプチド-Nbz 体をピバロイルグアニジン(0.2 M)を含む、中性の緩衝溶液で(pH7-7.5)で処理することで、目的とするペプチド-PivGuを固相から遊離させ、ペプチド固相合成法として十分な収率で得られることを見出した。



ペプチド-PivGu 体の反応性の解析

続いて、モデルペプチドとして Leu-Tyr-Arg-Ala-Ala-PivGu と、同じ配列の mercaptopropionyl-Leu(MPAL) チオエステル体を利用し、それぞれのチオエステル交換反応の反応速度の比較をおこなった。この結果、PivGu 体は約 6 倍反応性が低いことが明らかとなった。MPAL チオエステルはアルキルチオエステルの中でも比較的反応性の低い誘導体であり、PivGu 体がこれよりもさらに反応性が低いことから、ペプチド-PivGu は十分に反応性を制御した KCL が可能になると考えられた。



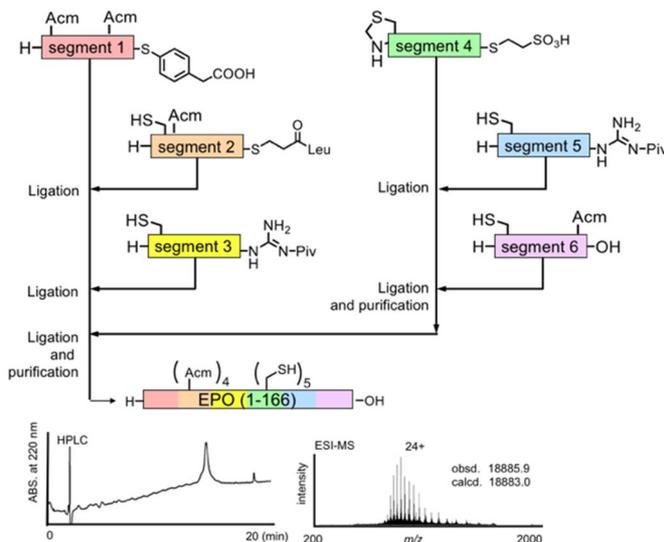
ペプチド-PivGu を利用した収斂的ワンポットペプチド連結反応の開発

続いて、166 残基から成るエリスロポエチン(EPO)全長ペプチド鎖を、6つのペプチドセグメント(N末端側より seg1~6,それぞれ 29、20、18、30、30、39 残基)に分割し、このうち seg1-3、および seg4-6 をペプチド-PivGu を利用する拡張型 KCL によるワンポットでの連結を行った。

まず seg4、5 について seg 4-アルキルチオエステル、seg 5-PivGu として合成し、NCL を行ったところ、目的とする seg45-PivGu を主生成物として得た。ここに、EPO の C 末端に位置する遊離のペプチド seg6 を連続的に混ぜ合わせたところ、目的とする seg456 の生成を得ることに成功した。以上より pivGu 体を利用することで、基本的な KCL 反応が実施可能であることを見出した。

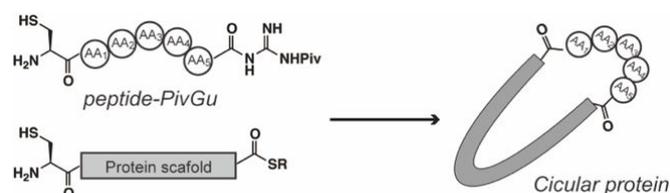
N 末端側のペプチドセグメントについては、peptide-PivGu 体の反応性の低さを利用し、seg1-アリアルチオエステル、seg2-アルキルチオエステル、seg3-PivGu 体三者でのペプチド連結をおこなった。この結果、低収率ながらも目的とする seg123-PivGu 体をえる事に成功した。一連の検討の中で、seg1、seg2 間での従来型の KCL における反応効率の低さが、結果として目的とする 3 者連結反応の収率低下を招くことがわかった。しかしながら PivGu の反応性を利用することで、このような特殊な KCL の実施は可能であることが見出され、目的とする seg123 が得られた。

続いて、得られた seg123(67 残基)、seg456(99 残基)を、精製することなく混ぜ合わせる収斂的ワンポット連結反応を検討した。しかし、種々検討したところ、この反応系では EPO 全長鎖を効率よく生成することは困難であった。この主たる原因は、seg456 の N 末端 Cys 残基のもつアセタール保護の除去が問題であることが明らかとなった。そこで、seg4-6 の合成と保護基の除去後精製を行い単品の seg456 を得た後、未精製の seg1-3 とのワンポット連結反応を行った。この結果、目的とする 166 アミノ酸からなる EPO 全長鎖の構築に成功した。現在までのところ、seg123 の拡張型 KCL での反応効率が、最後の NCL 反応にも反映されているため、全長鎖の生成効率は必ずしも高いものではなかったが、本手法により最低でも 4 セグメントのワンポットペプチド連結が可能であることが明らかとなった。



拡張型 KCL を利用した環状タンパク質の合成

本研究の過程で、今回開発した拡張型 KCL により化学合成ペプチドと小型タンパク質のもつそれぞれの N 末端と C 末端を相互に連結し、環状たんぱく質構造を構築できることを見出した。この結果は申請時には予期しないものであったが、これにより、非天然型ペプチドを自在に土台たんぱく質に組み込むことが可能であり、新しい機能性タンパク質デザインへの利用が期待される。



まとめ

本研究より、ピバロイルグアニジド体はアルキルチオエステルよりも反応性が低いものの、チオエステルと同様にペプチド連結反応に利用可能であることが明らかとなった。これを利用した拡張型 KCL は、各ペプチドセグメントと必要なチオールを添加するだけで簡便に実施可能である。本研究でも示した通り、このような利便性は環状タンパク質などの遺伝子工学では手に入らない特殊な構造のタンパク質合成にも利用可能であり、今後、より複雑な構造のタンパク質合成への利用が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Okamoto, R.; Ono, E.; Izumi, M.; Kajihara, Y., N,N-Dimethylaminoxy Carbonyl, a Polar Protecting Group for Efficient Peptide Synthesis. *Frontiers in Chemistry* 7 (173). 査読有 2019, 1-6. DOI: 10.3389/fchem.2019.00173

(2) Orii, R.; Sakamoto, N.; Fukami, D.; Tsuda, S.; Izumi, M.; Kajihara, Y.; Okamoto, R., Total Synthesis of O-GalNAcylated Antifreeze Glycoprotein using the Switchable Reactivity of Peptidyl-N-pivaloylguanidine. *Chem. - Eur. J.* 査読有 23 (39), 2017, 9253-9257. DOI: 10.1002/chem.201702243

(3) Okamoto, R., Recent Advancements in the Preparation of Structurally Defined Glycoproteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 査読有, 29 (165), 2017, E1-E10. DOI: 10.4052/tigg.1612.2E

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 折井亮、深見大地、津田栄、真木勇太、和泉雅之、梶原康宏、岡本亮; 化学合成により調製した不凍糖タンパク質を用いた O-GalNAc 残基の機能解明、日本化学会第 99 春季年会、2019、甲南大学

(2) 折井亮、深見大地、津田栄、真木勇太、和泉雅之、梶原康宏、岡本亮; 化学合成不凍糖タンパク質アナログを用いた O-GalNAc 化の機能解明、第 37 回日本糖質学会年会、2018、仙台国際センター

(3) Ryo Okamoto, Ryo Orii, Daichi Fukami, Sakae Tsuda, Masayuki Izumi, and Yasuhiro Kajihara; Total Synthesis of O-GalNAcylated Antifreeze Glycoprotein Toward Elucidation of the Functional Role of O-GalNAcylation; 29th International Carbohydrate Symposium 2018, Portugal

(4) 花尾 卓哉、真木 勇太、梶原 康宏、岡本 亮; ペプチドピバロイルグアニジド体を用いた新規ワンポットペプチド連結法の開発研究、日本化学会第 98 春季年会、2018、日本大学理工学部 船橋キャンパス

(5) Ryo Okamoto; Total chemical synthesis of O-GalNAcylated antifreeze glycoprotein using the switchable reactivity of peptidyl-N-pivaloylguanidine, 6th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & its Applications Symposium, 2017, Australia

(6) Ryo Okamoto, Ryo Orii, Daichi Fukami, Sakae Tsuda, Masayuki Izumi, Yasuhiro Kajihara; Total Chemical Synthesis of O-GalNAcylated Antifreeze Glycoprotein using the Switchable Reactivity of Peptidyl-N-pivaloylguanidine, 7th Chemical Protein Synthesis Meeting, 2017, Israel