

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05313

研究課題名(和文) DNAを足場としたペプチド断片の同時連結反応によるタンパク質の効率的化学合成

研究課題名(英文) Chemical synthesis of protein via simultaneous ligation of multiple peptide segments on DNA scaffold

研究代表者

林 剛介 (Hayashi, Gosuke)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40648268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDNAの2重鎖形成を足がかりとしたペプチド連結反応を開発した。DNAとペプチドを光分解性のリンカーで繋いだコンジュゲートを作製し(光照射によって、DNA-ペプチド間の結合が切れ、天然の配列を持つペプチドが生成することを確認)、2種類の光分解性DNA-ペプチドコンジュゲートを用いてペプチド連結反応を行った。その結果、DNAを足場としたペプチド連結反応は通常のペプチド連結反応よりも1000倍以上の速さで進行することが明らかとなった。最終的には、3種類のDNA-ペプチドコンジュゲートを用いて、3種類のペプチドをDNA足場上で同時に連結することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、従来mMオーダーで行う必要の合ったペプチド連結反応がサブnMの濃度で実施可能であることを示すことができた。またDNAの親水性によって疎水性ペプチド断片の水溶性向上させ、かつ低濃度で連結反応を行うことで、これまで連結反応に用いることが困難であった疎水性ペプチドを連結することができる新しい技術となった。これにより、これまでより多様なタンパク質を化学的に合成できる可能性があり、ライフサイエンス研究だけでなく、医薬学研究の発展にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel peptide ligation strategy harnessing the two intrinsic characteristics of oligodeoxynucleotides (ODNs), i.e., their hydrophilicity and hybridization ability, which allowed an increase in the water solubility of peptides and the reaction kinetics due to the proximity effect, respectively. Peptide&#8211;ODN conjugates cleavable to regenerate native peptide sequences were synthesized using novel lysine derivatives containing conjugation handles and photolabile linkers, via solid-phase peptide synthesis and subsequent conjugation to 15-mer ODNs. Two complementary conjugates were applied to carbodiimide-mediated peptide ligation on a DNA scaffold and the subsequent DNA removal was conducted by photoirradiation in a traceless fashion.

研究分野：生物有機化学

キーワード：タンパク質化学合成 ペプチド連結反応 DNA templated chemistry

### 1. 研究開始当初の背景

複数のペプチド断片を連続的に連結させることで目的タンパク質を得る「タンパク質化学合成法」は、多様な非天然アミノ酸を容易に導入できるため、次世代の機能性タンパク質作製技術として注目を集めている。しかし、これまでに合成されたタンパク質の多くが 200 アミノ酸以下の小さなタンパク質であり、大きなタンパク質の合成が困難、という欠点がある。これは、合成対象となるタンパク質が大きくなればなるほど連結するペプチド断片の数が増し、全長タンパク質を得るために必要な連結反応およびその後の精製ステップ数の増加による収率の低下が顕著になるためである。

また、合成するタンパク質が大きくなるとタンパク質構造の核となる疎水性領域を形成するアミノ酸の割合が増えるため、ペプチド断片の水への難溶性が問題となる。そこで私は「ペプチド断片の水溶性を担保しながらタンパク質化学合成を効率化する方法とはどのようなものか?」という学術的問いを抱き、本研究を提案するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質化学合成を効率化するために DNA を足場として 3 種類以上のペプチド断片を反応溶液中で整列させ、隣接したペプチド断片同士を同時かつ配向を制御しながら連結させる方法論の開発を目的とする(図 1)。これまでの方法ではペプチド断片を連結するたびに HPLC による精製操作が必要であり、またペプチド連結反応は通常 mM オーダーの濃度で行う必要があるため、水溶性の低いペプチドの連結は困難であった。

これまでのタンパク質化学合成研究は、有機化学で培われた技術やノウハウを取り入れることで大きく発展してきたが、本研究は生体高分子である DNA をタンパク質合成研究に取り入れたという点にオリジナリティがあり、従来法とは一線を画す。また、ペプチドの水溶性を上げるための補助分子として、かつペプチドを整列させるための足場分子として DNA の機能に着目した点が本研究の特徴である。

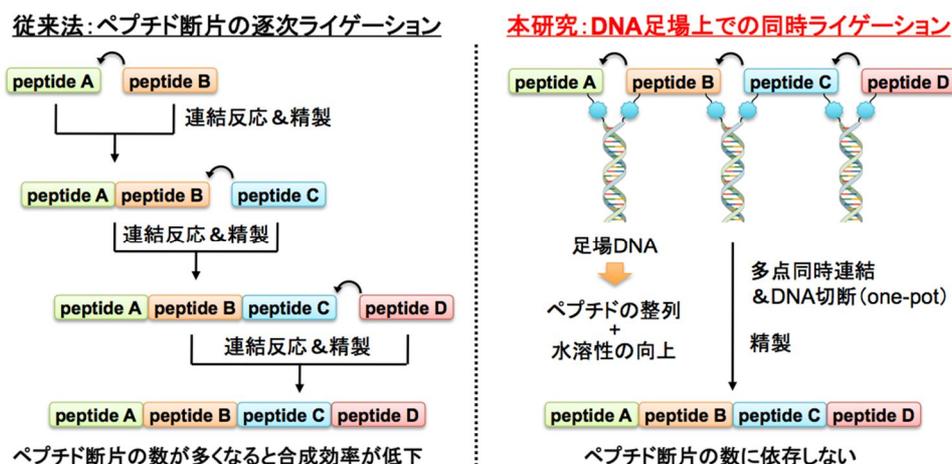


図1 一般的なタンパク質化学合成法（従来法）および DNA を足場とするタンパク質化学合成（本研究）の概要

### 3. 研究の方法

本研究ではペプチド断片を DNA 上で整列させるために、DNA-ペプチドコンジュゲートの合成が必要不可欠である。また、そのコンジュゲートはペプチド連結反応後に外部刺激により切断され、天然のペプチド配列を再生成する必要がある。そのための我々は、Lys の側鎖を介して繋がった DNA-ペプチドコンジュゲートの合成を行うこととした。

ペプチドは Fmoc 固相合成により研究室内で作製し、DNA は購入したものを使用した。ペプチドと DNA の連結は、Lys 側鎖に光分解性保護基を介して末端にアジド(あるいはアルキン)を有する新規 Fmoc アミノ酸を開発し、これを固相合成で導入することでペプチドを合成し、別でアルキン(あるいはアジド)を有する DNA (あらかじめ作製)を用意した後、それぞれを液相で反応させることで行った。各反応の追跡や精製操作はすべて HPLC によって行った。作製したコンジュゲートを用いてペプチド連結反応や DNA の光除去反応を行ったが、これも HPLC によって反応を追跡した。また得られた分子の同定は、MALDI-TOF MS によって行った。

### 4. 研究成果

まず初めに、DNA とペプチドを光分解性のリンカーで繋ぐための特殊アミノ酸の設計と合成を行った (図 2)。この特殊アミノ酸は、クリック反応により DNA と連結させるため、分子の末端にアジド基またはアルキン基を有する設計となっており、基本骨格としてはリシン側鎖のアミノ基が光分解性のオルトニトロベンジル基を介して繋がった構造をしている。次に、Fmoc 固相合成法を用いて特殊アミノ酸が導入されたペプチドを合成し、一本鎖 DNA とクリック反応で連結することに成功した。また、光照射によって、DNA-ペプチド間の結合が切れ、天然の配列を持つペプチドが生成することも確認した。続いて、2 種類の光分解性 DNA-ペプチドコンジュゲートを用いてペプチド連結反応を行った。縮合剤として水溶性のカルボン酸活性化剤である EDC を用いた。その結果、DNA を足場としたペプチド連結反応は通常のペプチド連結反応よりも 1000 倍以上の速さで進行することが明らかとなった。また疎水性のペプチドに対して、DNA の付加により親水性を付与することができることも示すことに成功した。さらに、3 種類の DNA-ペプチドコンジュゲートを用いて、3 種類のペプチドを DNA 足場上で同時に連結することにも成功した。これは、3 種類のペプチドを同時に連結させた初めての例である。

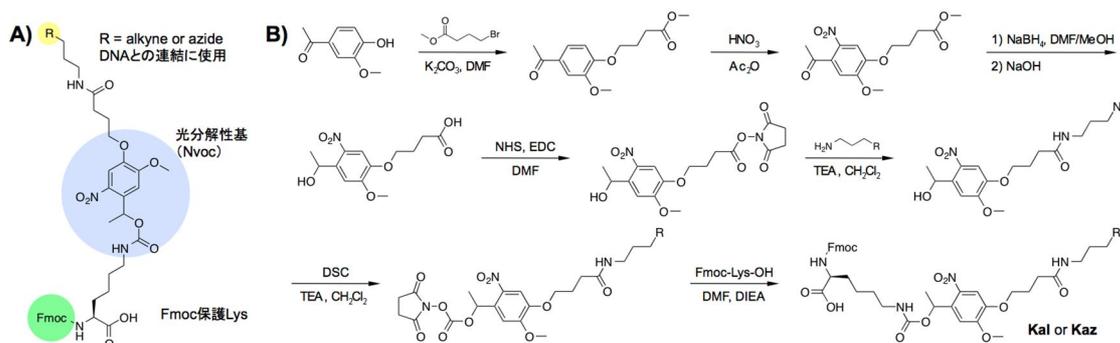


図 2 ペプチドと DNA を繋ぐ新規アミノ酸 Kal および Kaz の分子構造 (A) とその合成ルート (B)

次に、これまでカルボン酸活性化剤を用いて行ってきた連結反応を活性化剤を使用しない方法へと変更するために、システインとチオエステル間で反応してネイティブなアミド結合を生じる NCL を用いる系の開発を行った。NCL 反応には、チオエステル前駆体の合成が必要不可欠となるため新たなチオエステル前駆体の開発に着手した。システイン-プロリン-脱離基の配列を持つペプチドが S-N アシルシフトを経て高効率にチオエステル前駆体に変換されることに着目し、固相合成上で合成可能な新たな脱離基を探索した。その結果、セリンやトレオニン側鎖の水酸基を主鎖アミド基と環化させてえられる環状イミド構造 (オキサゾリジノン構造) が脱離基として優れていることを見出した。具体的には、Fmoc 固相合成で C 末端側に CPS(orT)-Tle (tert-Leucine) 構造を持つペプチドを合成し、その後 Ser or Thr の保護基を選択的に脱保護、CDI を用いた環化反応を行うことで目的の CPI (cysteinyI-prolyl-imide) 構造を定量的に合成できることを示した。CPI 構造のチオエステル前駆体としての機能を評価したところ、S-N アシルシフト型チオエステル前駆体としては、最も高速・高効率で反応することを明らかにした。CPI 構造を用いてヒストンタンパク質の合成に成功しており、本チオエステル前駆体の実用性を示すことが出来た。

さらにこのチオエステル前駆体をさらに発展させた CP-Thd (チアゾリジノン) ペプチドの開発に成功した。チオエステル前駆体として機能することが知られている「Cys-Pro-脱離基」構造の脱離基にチアゾリジノン構造を持つ CP-Thd ペプチドの開発を行った。チアゾリジノン構造は、ペプチド固相合成中に導入される Cys 残基から樹脂上で定量的に誘導することが可能であり、また固相合成後に液相で迅速かつ定量的にチオエステルへと変換可能であることを明らかにした。CP-Thd ペプチドは、これまで開発された N-S アシルシフト型チオエステル前駆体としては、最も高効率にチオエステルへと変換可能な分子となった。最終的には、CP-Thd ペプチドを用いてヒストン H3 タンパク質のワンポット化学合成に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanase Masafumi, Nakatsu Koki, Cardos Charlane Joy, Konda Yoshiki, Hayashi Gosuke, Okamoto Akimitsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Cysteinylprolyl imide (CPI) peptide: a highly reactive and easily accessible crypto-thioester for chemical protein synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 5967 ~ 5975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9sc00646j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 林 剛介	4. 巻 56
2. 論文標題 タンパク質化学合成を活用した翻訳後修飾研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 46 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.1_46	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Gosuke, Okamoto Akimitsu	4. 巻 78
2. 論文標題 Novel Strategies of Peptide Ligation for Accelerating Chemical Protein Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 130 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaiishi.78.130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi G, Yanase M, Nakatsuka Y, Okamoto A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Simultaneous and Traceless Ligation of Peptide Fragments on DNA Scaffold.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1246-1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b01655.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsu Koki、Yanase Masafumi、Hayashi Gosuke、Okamoto Akimitsu	4. 巻 22
2. 論文標題 Fmoc-Compatible and C-terminal-Sequence-Independent Peptide Alkyl Thioester Formation Using Cysteinyloxy Imide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4670 ~ 4674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c01450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Gosuke Hayashi
2. 発表標題 Novel technologies for studying chromatin modifications
3. 学会等名 42nd MBSJ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi
2. 発表標題 Challenges and prospects in chemoselective ligations: from protein synthesis to site-specific conjugation
3. 学会等名 LE STUDIUM CONFERENCES
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi
2. 発表標題 Novel Peptide Ligation Strategies for Chemical Protein Synthesis
3. 学会等名 Seminar at University of Paris
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi
2. 発表標題 Chemical Protein Synthesis with Novel Ligation Strategies
3. 学会等名 Seminar at CBM, CNRS Orleans Campus
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 剛介
2. 発表標題 修飾タンパク質作製を可能にする最先端技術 ~生合成 vs 化学合成~
3. 学会等名 第568回東北大学薬学研究科セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林剛介
2. 発表標題 エビジェネティクス研究とタンパク質化学合成
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi
2. 発表標題 One-pot Sequential or Simultaneous Ligation of Multiple Peptide Fragments for Facilitating Chemical Protein Synthesis
3. 学会等名 ICPAC Langkawi2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi, Naomi Kamo, Masafumi Yanase, and Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 One-pot Multiple Peptide Ligation Strategies Harnessing Palladium Complex or DNA Scaffold
3. 学会等名 International Peptide Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi, Masafumi Yanase, Yoshiki Konda, Yu Nakatsuka and Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 DNA Scaffold-mediated Peptide Ligation
3. 学会等名 ISNAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林剛介、梁瀬将史、加茂直己、岡本晃充
2. 発表標題 効率的タンパク質合成を指向した ペプチド連結法の開発
3. 学会等名 第13回ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林剛介、梁瀬将史、加茂直己、菅田祥己、岡本晃充
2. 発表標題 タンパク質化学合成を加速する ペプチドライゲーション戦略
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林剛介
2. 発表標題 アミノ酸の精密重合体であるタンパク質の化学的全合成とその効率化
3. 学会等名 第165回東海高分子研究会講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林剛介、岡本晃充	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 193
3. 書名 生体分子反応を制御する 化学的手法による機構と反応場の解明 「エピジェネティック修飾の謎を解き 明かす核酸およびタンパク質化学」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------