様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 １９ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：１９Ｈ０３３４８

研究課題名（和文）タンパク質化学合成を革新するペプチド連結触媒の開発

研究課題名（英文）Studies to develop peptide ligation catalysts enabling easier and faster protein synthesis

研究代表者
山次　健三（Yamatsugu, Kenzo）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：３０６４６８０７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はタンパク質の化学合成を革新的に簡単にする化学触媒の開発を目指したものである。具体的には、ペプチドC末端チオエステルとペプチドN末端を同時に活性化し、それらを連結する触媒の開発を目的とした。結果として、C末端、N末端それぞれを活性化する触媒を見出すことに成功したが、それらの活性を維持したまま一つの触媒として融合させることは出来なかった。本研究で得られた知見をもとに、特に、C末端活性化触媒と共存可能なN末端活性化触媒を重点的に検討することで、タンパク質の化学合成を革新的に簡便にする触媒の開発が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究ではタンパク質の化学合成を革新的に簡単にする化学触媒の開発を目指し、ペプチドC末端チオエステルとペプチドN末端を同時に活性化して連結する触媒の開発を目的とした。結果として、C末端、N末端それぞれを活性化する触媒を見出すことに成功したが、それらを一つの触媒として融合させることは出来なかった。得られた知見をもとに検討を重ねることで、タンパク質の化学合成を簡便にする触媒の開発を可能にしたい。

研究成果の概要（英文）：This research aims to develop chemical catalysts that simplify the chemical synthesis of proteins. Specifically, we aimed to develop a catalyst that simultaneously activates a peptide C-terminal thioester and a peptide N-terminus and ligates them. As a result, we succeeded in finding catalysts that activate the C-terminus and the N-terminus respectively, but were unable to fuse them into a single catalyst while maintaining their activity. Based on the knowledge obtained in this study, we will focus on developing N-terminal activating catalysts that can coexist with C-terminal activating catalysts, in order to develop catalysts that will revolutionize and simplify protein chemical synthesis.

研究分野：有機化学

キーワード：タンパク質　ペプチド　ライゲーション　触媒

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

タンパク質はそのアミノ酸一次配列情報に加えて、様々な化学修飾（翻訳後修飾）を受けて多様な構造・機能を獲得し、生命活動の中心を担っている。従って、これら機能性タンパク質を合成してその構造・機能を解析すること、そしてその機能性タンパク質を生化学的・治療的用途に用いること（タンパク質医薬など）は、重要かつ有用である。

タンパク質を合成する従来の方法は、大腸菌や昆虫細胞などの発現系を用いたリコンビナントタンパク質の合成が一般的であった。しかしこの方法で得られるタンパク質は、望みの化学修飾を受けていないか、受けていても様々な化学修飾を様々な位置に受けた混合物であり、タンパク質の機能解析や高い均質性を求められるタンパク質医薬の目的には適さない場合が多い。さらに、通常は天然のアミノ酸および天然の化学修飾で構成されるタンパク質しか得ることができず、蛍光プローブや抗がん剤などで修飾したタンパク質は得られない。

こうした背景から、タンパク質の化学合成技術が発展してきた。現在頻用される技術は大きく 2 つあり、ペプチド連結反応を基盤にしたタンパク質の化学合成と遺伝子コード拡張技術を用いる方法である。遺伝子コード拡張技術は、大腸菌などのホスト生物が持つ tRNA および aminoacyl-tRNA 合成酵素に干渉しない tRNA/aminoacyl-tRNA 合成酵素の組み合わせを用いて終止コドンのひとつに非天然型のアミノ酸をコードさせ、翻訳後修飾などの修飾を望みの位置に持つタンパク質を発現させる方法である。しかし、その成否は、ホスト生物がもつそれと干渉しない tRNA/aminoacyl-tRNA 合成酵素の組み合わせを得られるかに依存しており、一般性が高いとは言えない。一方でタンパク質の化学合成は、２つの短いペプチドセグメント（～40 残基）を連結させて長いペプチド鎖（タンパク質）を作るペプチド連結反応を基盤にしており、非常に多様な短鎖修飾ペプチドを固相合成できるために、導入可能な修飾に関して適用範囲の広い手法である。多くの手法が開発されているが、もっとも頻用されるのが Native Chemical Ligation（NCL）である。NCL はカルボキシ末端がチオエステルであるペプチドとアミノ末端にシステインを持つペプチドとを連結する方法であり、ペプチドチオエステルとシステインのチオール基とのエステル交換反応と、続く分子内 S-N アシル基転移反応を鍵とする。アミノ酸側鎖の保護を必要とせずに 2 つのペプチドを信頼性高く連結可能であることから非常に有用である。しかし、重大な limitation として連結部位のアミノ末端にシステインが必要であり、タンパク質として、あるいは望みの連結位置にシステインを持たない場合には、チオール基を持たせた非天然型特殊アミノ酸を不斉合成し、それをペプチドアミノ末端へ導入、ペプチド連結反応後に脱硫反応を行うことでチオール基を除去して天然のアミノ酸構造へと変換する必要がある。これは非常に煩雑な工程であるうえ、本法でも未だ連結位置として使用できないアミノ酸（例えばセリン）が存在する。

２．研究の目的

以上の背景から、特別なアミノ酸、特別な後処理を必要とせずに、いかなるアミノ酸位置でも実施可能なペプチド連結反応を開発し、タンパク質化学合成を革新的に簡便にすることを目的とした。

３．研究の方法

上記の目的を達成するため、化学触媒による戦略を採用することとした。すなわち、NCL 同様にカルボキシ末端（C 末端）がチオエステルであるペプチドと、アミノ末端（N 末端）無保護ペプチド（但し、システインに限定されない）を基質とし、両者を同時に活性化しつつ適切な位置に配置する協奏機能触媒を開発することによって両者の連結を可能にすることを検討した。

４．研究成果

(1)ペプチド C,N-両末端活性化触媒 DSH-CHO の検討

我々は以前にアセチル CoA などの脂肪族チオエステルを効率的に活性化する触媒として、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）の 2 位にメルカプトメチル基を導入した触媒 DSH を開発していた [1)]。そこで、ペプチド C 末端チオエステルを活性化する触媒として DSH を採用し、ここにペプチド N 末端を活性化するモチーフを融合させることを考えた。ペプチド N 末端を活性化するモチーフとしては Francis らが報告した 2-ホルミルピリジンを採用することとした [2)]。彼らは 2-ホルミルピリジンがポリペプチドアミノ末端側の 2 残基とイミン形成、続く分子内環化反応によってイミダゾリジノン構造を形成し、ペプチドおよびタンパク質のアミノ末端選択的ラベル化に使用できることを報告している。以上を踏まえ、設計した触媒 DSH-CHO の触媒サイクルを図１に示す。① DSH-CHO のチオール基とペプチドチオエステル（peptide A）との間の動的エステル交換反応によって、ペプチドアシル基が DSH-CHO に取り込まれた中間体（1）を得る。② 続いて中間体１中のホルミル基がもうひとつのペプチド（peptide B）のアミノ末端２残基と反応することでイミダゾリジノン中間体（2）を与える。上記２つの工程（①と②）はどちらが先に起こ

っても構わない。③ 続いて求核的ピリジン窒素によるアシル基の分子内活性化を経て活性なアシルピリジニウム中間体（3）を与える。④ 活性化されたアシル基が適切な位置にあるイミダゾリジノン窒素原子へと転移し、アシル化イミダゾリジノン中間体（4）を与える。⑤ アシル化されたイミダゾリジノンは加水分解が促進され、ペプチド連結体生成物を与えるとともに DSH-CHO が再生する。

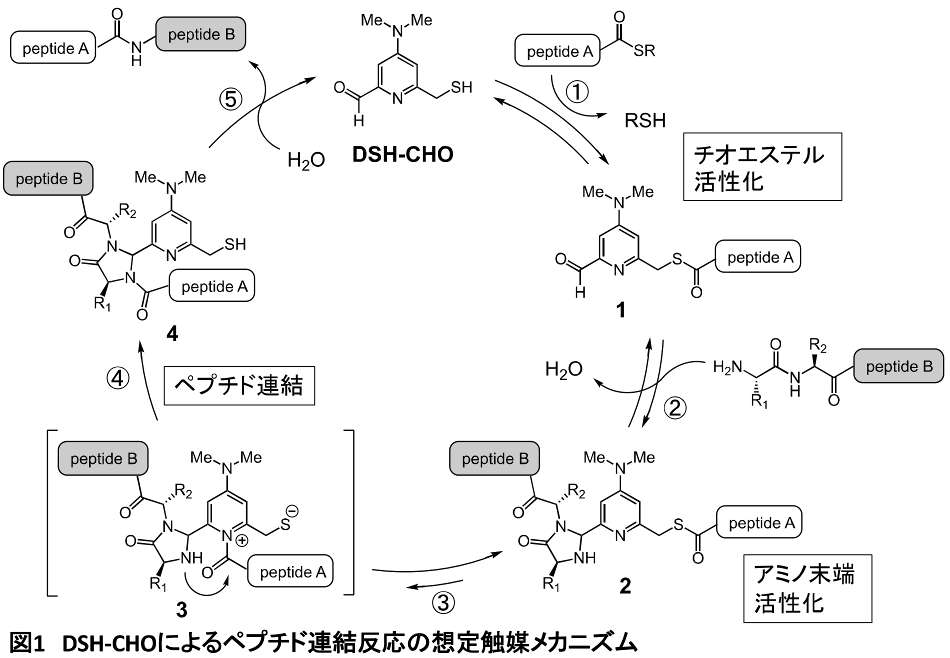

図1 DSH-CHOによるペプチド連結反応の想定触媒メカニズム

DSH-CHO 触媒を実際に合成し、各種条件において短鎖ペプチドの連結を試みたが、望みの連結生成物は一切得られなかった。その原因を検討したところ、DSH の 6 位にホルミル基を導入すると、DSH の有する外部チオエステルとの動的チオール・チオエステル交換能が損なわれることがわかった。すなわち、ひとつの 4-ジメチルアミノピリジン骨格に、ペプチド C 末端を活性化するためのメルカプトメチル基と、ペプチド N 末端を活性化するためのホルミル基を同時に持たせてはいけないことが明らかとなった。

(2)ペプチド N 末端活性化モチーフとその置換様式の検討

そこで DSH 部分とホルミルピリジンを一体化するのではなく独立させ、互いを適切なリンカーで繋ぐことを検討することとした。そのためにまず、ホルミルピリジンのホルミル基の位置、およびリンカーを連結する位置を決定することとした。3 残基からなるペプチド H-RAW-NH_2 に対して、各種ホルミルピリジン誘導体を混合し、生成物であるイミダゾリジノンの収率を算出したところ、① ホルミル基の位置は 2 位が適切であること、②リンカーの導入位置は 4 位ないしは 5 位が好ましいことがわかった（図２）。

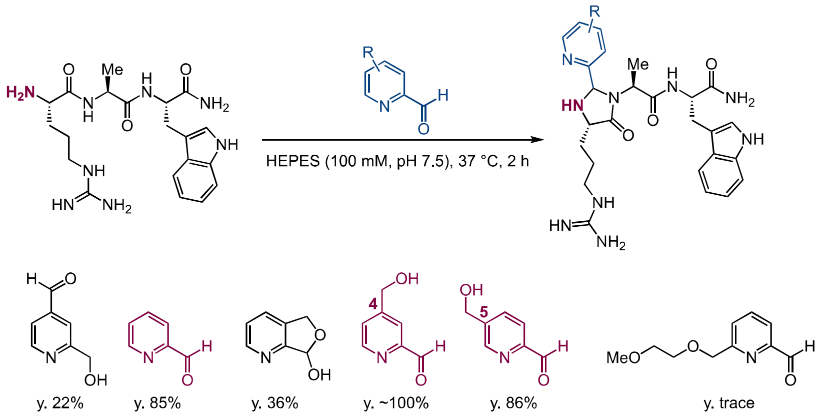

図2 ホルミルピリジンの置換様式の検討

(3)2 者分離型 DSH-PyCHO 触媒の検討

ホルミルピリジンへのリンカー結合位置を見出したので、次にペプチド C 末端を活性化する DSH とペプチド N 末端を結合する 2-ホルミルピリジンを、それぞれの構造をなるべく変化させないような形でリンカーで結ぶ触媒を検討した。図 3 に示す触媒を合成し（DSH のチオール基はジスルフィドとして保護し、反応系中で還元剤によりチオールを遊離させている）、先と同様に 3 残基からなるペプチド H-RAW-NH_2 との反応を検討した。反応はペプチドとの連結反応ではなく、ペプチド C 末端カルボキシ基の最も単純なモデルとして酢酸由来のチオエステルを用いた。しかし、様々な条件を検討したが、望みの連結生成物は得られなかった。反応を精査したところ、適切な位置にリンカーを導入したにも関わらず、ホルミルピリジンとペプチド N 末端の結合が十分に進行していないことがわかった。すなわち、DSH 部分の導入により、ホルミルピリジンとペプチド N 末端との反応が阻害されている可能性が示唆された。

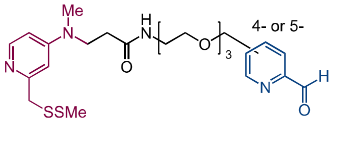

図3 2者分離型DSH-PyCHO触媒の検討

(4)DSH に代わるペプチド C 末端活性化触媒の検討

我々は、本研究とは別プロジェクトとして細胞内のアセチル CoA（チオエステル）を活性化する触媒として *m*BnA 触媒（図 4）を開発している[3)]。先の検討により、DSH とホルミルピリジンの共存が不適切であると示唆されたため、DSH を *m*BnA に置き換えた触媒を検討した。しかし、この場合においても望みのペプチド連結生成物は得られなかった。

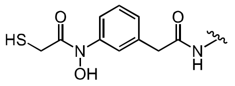

図4 *m*BnA触媒の構造

(5)今後の方針

今回、ペプチド C 末端と N 末端を連結させる協奏機能触媒の発見には至らなかった。C 末端を活性化する触媒および N 末端を活性化する触媒はそれぞれ独立には機能しうるが、２つの活性を維持したまま共存させることが課題であった。今後は、互いの共存を可能にする触媒モチーフ、特に N 末端を活性化するモチーフに注力して検討を続けていきたい。

＜引用文献＞

1) Amamoto, Y.; Aoi, Y.; Nagashima, N.; Suto, H.; Yoshidome, D.; Arimura, Y.; Osakabe, A.; Kato, D.; Kurumizaka, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. “Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin” *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7568-7576.

2) MacDonald, J. I.; Munch, H. K.; Moore, T.; Francis, M. B. “One-Step Site-Specific Modification of Native Proteins with 2-Pyridinecarboxyaldehydes” *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 326-331.

3) Habazaki, M.; Mizumoto, S.; Kajino, H.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. “A chemical catalyst enabling histone acylation with endogenous Acyl-CoA” *ChemRxiv* DOI: 10.26434/chemrxiv-2022-zxn90.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 山次健三
2．発表標題 細胞のエピゲノムに介入できる有機分子触媒
3．学会等名 第24回　ケムステVシンポ　有機分子触媒（招待講演）
4．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔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