

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550155

研究課題名（和文）*N-S*アシル基転位反応を基盤とする新規ペプチドライゲーション法の開発研究課題名（英文）Development of a new method for peptide ligation based on the *N-S* acyl shift reaction

研究代表者

川上 徹（KAWAKAMI TORU）

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：70273711

研究成果の概要（和文）：ペプチドチオエステルを合成ブロックとする種々の蛋白質合成法が報告されている。本研究ではCys残基における*N-S*アシル基転位反応を基盤とする新しいペプチドチオエステル調製法を開発した。既知のチオエステル前駆体であるCys-Proエステル構造に基づき、Cys-Pro-Cys配列を見出した。これは蛋白質性の構造のみからなり、組換え蛋白質として調製可能である。また、Pro残基の代わりに*N*-置換Gly残基を導入するとチオエステルへの変換反応が格段に向上することを見出した。

研究成果の概要（英文）：The peptide thioester is used as a building block for protein synthesis. In this research, we developed new methods for the peptide thioester synthesis. Based on the structure of Cys-Pro ester (CPE), Cys-Pro-Cys sequence was found to produce a peptide thioester. It could be prepared as a recombinant protein. When *N*-substitute Gly residue is introduced instead of the Pro residue in the CPE structure, this CNGE peptide produces the thioester more efficiently than the CPE peptide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛋白質，ペプチド，合成化学，ライゲーション，ペプチドチオエステル

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は様々な修飾を受けることでその機能調節がなされているが、その機能を分子化学的に詳細に解析するためには、十分量の特異的に修飾された蛋白質を調製する必要がある。生化学的手法だけでは一般に困難であるため、化学合成との融合が期待されている。

ペプチドの合成法として固相合成法では

通常 50 残基程度に限界があるため、蛋白質の化学合成ではペプチドを合成ブロックとして、いわゆるライゲーション法と呼ばれる方法で縮合する。そのライゲーション法の開発は、長鎖ペプチド・蛋白質の合成や糖鎖やリン酸基など翻訳後修飾含むペプチドの高純度、高効率合成のために重要な課題の1つである。また、ライゲーション法は蛋白質の修飾反応として応用することもでき、蛋白質

製剤の開発に重要な方法の1つであると期待される。現在では多くの場合、固相合成法により調製されるペプチドチオエステルを合成ブロックとして用い、ライゲーション法によって、順次つなぎ合わせることで合成が試みられている。申請者らを含めて世界的にライゲーション法の研究が行われ、発展し、利用されている。一方で、合成ブロックであるペプチドチオエステルの合成には未だ多くの課題が残されている。多くのグループが修飾ペプチドの合成に有利な Fmoc 法によるペプチドチオエステル合成法の開発に取り組んでいるが、これまでに決定的な方法は開発されていない。従って、Fmoc 法によってライゲーション可能な合成ブロックの合成を効率化する必要がある。

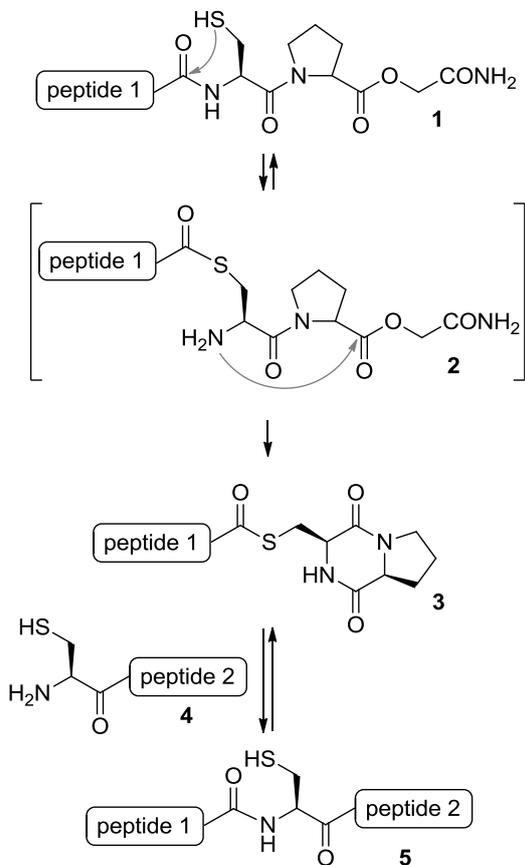


図1. *N-S*アシル基転位反応と CPE ライゲーション

申請者らはチオール基含有補助基やシステイン残基を含むペプチドを酸処理すると、ペプチド結合からチオエステル結合へ *N-S*アシル基転位反応が起こり、ペプチドチオエステル中間体 (*S*-ペプチド) が生成することを見出している。これを基に新規ペプチドチオエステル合成法の開発に取り組むとともに、チオエステルに代えて Fmoc 法により効率的に合成できるエステル、Cys-Pro エステル (CPE) 基をデザインし、CPE ライゲーション

法を開発した (図 1)。これら開発の過程で、一般的にシステイン含有ペプチドから *N-S*アシル基転位反応によってチオエステル中間体が生成することが示唆された。そこで、エステル構造を含まない天然アミノ酸だけからなるシステイン含有ペプチドが、*N-S*アシル基転位反応を経由することでライゲーション反応に適用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

長鎖ペプチド、蛋白質の化学合成法の開発の一環として申請者らが開発したシテイニルプロリルエステル (CPE) 法をもとに、エステル基を有さない自動活性化型ペプチドを用いる新規ライゲーション法の開発を目的とする。これにより組換え蛋白質を合成ブロックとして利用できる方法が開発できれば、化学合成法および生物学的調製法の利点を有効に組み合わせることにより、より多様な蛋白質を簡便に合成する方法を提供することが可能となる。また、この手法は *in vivo* での組換え蛋白質に対する C 末端修飾を可能とし、蛍光基などで修飾することで細胞内での蛋白質動態の解析の有用な方法を提供できるものとする。

3. 研究の方法

(1) ライゲーション活性を有するアミノ酸配列の探索

ライゲーション反応性を有するアミノ酸配列を探索するために、コンビナトリアル化学の手法により、適当なアミノ酸配列 (下図中の peptide) の C 末端にランダムな配列 (Xaa-Xbb-Xcc---Xnn) を有するペプチドライブラリーを作成する。ランダムな配列上の直前に *N-S*アシル基転位反応を経由してチオエステル中間体を形成する機能を想定してシステイン残基と、ターン構造を誘起し、特定の構造を安定化することを期待してプロリン残基を固定する。このペプチドライブラリーとシステイン誘導體との反応を行い、HPLC と質量分析を組み合わせることによって、その反応性を評価し、アミノ酸配列候補を選択する。

(2) 活性化アミノ酸配列を有するペプチドの解析とライゲーション

上記で得られたアミノ酸配列の候補を有するペプチドの反応性を解析し、さらに N 末端にシステイン残基を有するモデルペプチドとのライゲーション反応を検討する。

(3) 新しいペプチド C 末端活性化法の開発

化学合成においてはアミノ酸構造に限る必要はないので、新しい活性化構造をデザインし、より反応性の高いライゲーション法の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) ライゲーション活性を有するアミノ酸配列の発見

6 残基のモデルペプチドの C 末端に Cys-Pro に続き 3 残基のランダムな配列を有するペプチドライブラリーを構築し, Cys-ペプチドとのライゲーション反応を指標として, 反応性配列の探索を行った. その結果, Cys-Pro-Cys あるいは Cys-Pro-Ser 配列を有するペプチドが, 効率は非常に悪いながら, 中性条件下で Cys-ペプチドと反応し, ライゲーションが進行することを見出した.

(2) 活性化アミノ酸配列を有するペプチドの解析とライゲーション

上記で得られた配列を有するペプチド, すなわち, 6 残基のペプチドの C 末端に, Cys-Pro-Ser (CPS) あるいは Cys-Pro-Cys (CPC) 配列を有するペプチドを 0.1 M 塩酸中で反応させたところ, CPC ペプチドから, CPE ペプチドから誘導されるジケトピペラジンペプチド **3** と同じものが生成することを見出した. 塩酸中での反応では加水分解が多く見いだされたため, ヘプタフルオロ酪酸中で加熱すると 20%程度の収率でペプチドチオエステルが得られた. 一方で, CPS ペプチドからは同条件下では加水分解がほとんどで, チオエステルはほとんど生成しなかった. このことから, この反応は 2 個の Cys 残基において 2 回の連続した *N-S*アシル基転位反応と引き続くアミノ基とチオエステルの反応により, CPE 基と類似の反応機構によって, ジケトピペラジンチオエステルが形成されるものと推測される (図 2).

この CPC ペプチドの反応では, 生成するジケトピペラジン骨格上でエピ化が起こるが, 次のライゲーション時に外れるため問題はない. しかし, ロイシン残基部位でのチオエステル化ではラセミ化が起こった. 種々の条件を検討したがこれまでに解決策を見いだせていない. しかし, ここで見出した配列は蛋白質性の構造のみからなり, 大腸菌などを用いて調製される組換え蛋白質に適用できると考えられ, その応用が期待される. 今後の蛋白質合成法の展開のために大きな一歩である.

(3) 新しいペプチド C 末端活性化法の開発

CPE 基を改良し, プロリン残基の代わりにザルコシン (*N*-メチルグリシン) 誘導体を導入するとチオエステルへの変換効率が向上することが判明した. さらに改良を進め, メチル基の代わりにアルキル鎖を伸ばしたものの, あるいはベンジル基とすることにより, より反応性が向上することが判明した. これは Cys-*N*-置換 Gly 間の配座が, より *cis* 構造が安定であるためだと考えられる. この骨格では反応性だけではなく, CPE 基と比較すると, Gly の *N*-置換基として種々の構造を導入

することが可能であり, これはチオエステル化に伴い脱離しない. 現在その特性を生かした研究開発を進めている. 今後の課題として, 蛋白質に特異的なリガンドを導入することで目的蛋白質に選択的かつ蛋白質上の部位特異的なラベル化反応へ研究開発を進めている.

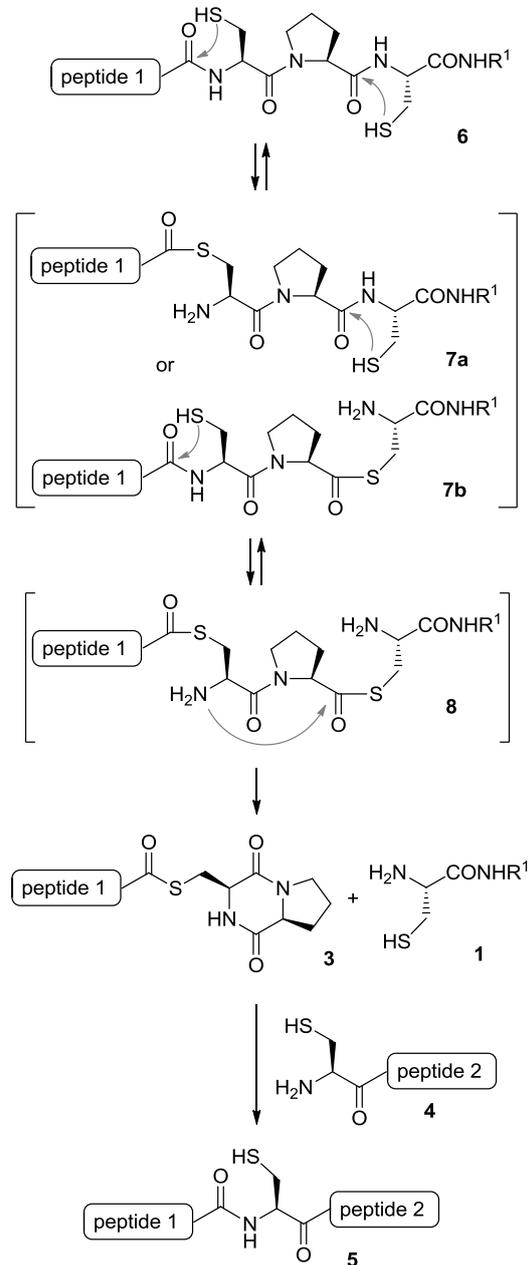


図 2. CPC ペプチドを用いるライゲーション

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 10 件)

1. 川上 徹, 相本三郎, *N-S*アシル基転位反応を用いるペプチドチオエステル合成

- 法の開発, 有機合成化学協会誌, 査読有, 70 巻, 166-176 (2012)
2. A. Kamauchi, E. Harada, S. Aimoto, T. Kawakami, Formation of peptide thioesters by the use of modified Cys-Pro Ester (CPE) autoactivating unit, Peptide Science 2011, 査読有, 135-136 (2012)
 3. T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide Ligation via thioester formation at the cysteine residue, Peptide Science 2010, Japanese Peptide Society, 査読有, 47 (2011).
 4. T. Kawakami, S. Shimizu, S. Aimoto, Peptide Diketopiperazine Thioester Formation at the Cys-Pro-Cys Position, Peptides 2010: Tales of Peptides, European Peptide Society, 査読有, 52-53 (2010).
 5. T. Kawakami, S. Shimizu, S. Aimoto. Peptide Thioester Formation by an *N* to *S* Acyl Shift Reaction at the Cysteinyll Prolyl Cysteine Position, Bulletin of Chemical Society of Japan, 査読有, 83 巻, 570-574 (2010)
 6. T. Kawakami, S. Shimizu, S. Aimoto, Synthesis of peptide thioesters based on an *N* to *S* acyl shift reaction, Peptide Science 2009, Japanese Peptide Society, 査読有, 79-80 (2010).
 7. S. Shimizu, S. Aimoto, T. Kawakami, Formation of peptide thioesters by an *N* to *S* acyl shift reaction at the cysteinyll prolyl cysteine position, Peptide Science 2009, Japanese Peptide Society, 査読有, 153-154 (2010).
 8. T. Kawakami, S. Aimoto, The use of a cysteinyll prolyl ester (CPE) autoactivating unit in peptide ligation reactions, Tetrahedron, 査読有, 65 巻, 3871-3877 (2009)
 9. K. Nakamura, T. Kanao, T. Uesugi, T. Hara, T. Sato, T. Kawakami, S. Aimoto. Synthesis of peptide thioesters via an *N-S* acyl shift reaction under mild acidic conditions on an *N*-4,5-dimethoxy-2-mercaptobenzyl auxiliary group, Journal of Peptide Science, 査読有, 15 巻, 731-737 (2009).
 10. T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide thioester formation and ligation using a cysteinyll prolyl ester (CPE) autoactivating unit, Peptides, American peptide Society, 査読有, 29-30 (2009).
- [学会発表] (計 15 件)
1. 鎌内彬貴, 川上 徹, 相本三郎, 改良型 CPE 自発的活性化ユニットによるペプチドチオエステル形成, 日本化学会第 92 春季年会, 2012.3.27, 慶応大学, 横浜
 2. 川上 徹, Synthesis of peptide thioesters by the use of an *N-S* acyl shift reaction for peptide ligation, 第 14 回ペプチドフォーラム, 2011.12.16, 鹿児島大学, 鹿児島
 3. A. Kamauchi, E. Harada, S. Aimoto, T. Kawakami, Formation of peptide thioesters by the use of modified Cys-Pro Ester (CPE) autoactivating unit, 第 48 回ペプチド討論会, 2011.9.28, 札幌コンベンションセンター, 札幌
 4. 川上 徹, 清水咲子, 相本三郎, チオエステルライゲーション法による蛋白質合成: システイン残基での *N-S* アシル基転位反応を経由するペプチドチオエステル形成, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011.6.7, ホテル阪急エキスポパーク, 吹田
 5. 假屋園大和, 川上 徹, 相本三郎, CPE 自己活性化ユニットを用いたリポソーム内でのチオエステル形成, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.3.28, 神奈川大学, 横浜
 6. 鎌内彬貴, 川上 徹, 相本三郎, Cys-Pro エステル (CPE) 自己活性化ユニットの改良によるペプチドチオエステル調製法の効率化, 日本化学会第 91 春季年会, 2011.3.28, 神奈川大学, 横浜
 7. 川上 徹, ライゲーション法による長鎖ペプチド合成: *N-S* アシル基転位反応を基盤とするペプチドチオエステル合成ブロックの合成法を中心に, 第 5 回プロセス化学ラウンジ, 2011.2.3, 琵琶レイクオーツカ, 大津
 8. T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide ligation via thioester formation at the cysteine residue, 5th International Peptide Symposium, 2010.12.9, 京都国際会議場, 京都
 9. T. Kawakami, S. Shimizu, S. Aimoto, Peptide Diketopiperazine-thioester formation *via* an *N-S* acyl shift reaction at the amide bond between -Xaa-Cys- in the -Xaa-Cys-Pro-Cys- sequence, The 13th Akabori Conference, 2010.9.14, Leipzig
 10. T. Kawakami, S. Shimizu, S. Aimoto, Peptide diketopiperazine thioester formation at the Cys-Pro-Cys position, 31st European Peptide Symposium, 2010.9.6, Copenhagen

11. 清水咲子, 相本三郎, 川上 徹, Cys-Pro-Cys 部位における *N-S* アシル基転位反応を利用したペプチドチオエステルの合成, 日本化学会第 90 春季年会, 2010. 3. 27, 近畿大学, 東大阪
12. T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide ligation based on an *N* to *S* acyl shift reaction, ICCEOCA-4, 2009. 12. 2, Bangkok
13. S. Shimizu, T. Kawakami, S., Aimoto, Formation of peptide thioesters by an *N* to *S* acyl shift reaction at the cysteinyl prolyl cysteine position, 第 46 回ペプチド討論会, 2009. 11. 5, 北九州国際会議場, 北九州
14. T. Kawakami, S. Shimizu, S., Aimoto, Synthesis of peptide thioester based on *N* to *S* acyl shift reaction, 第 46 回ペプチド討論会, 2009. 11. 5, 北九州国際会議場, 北九州
15. T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide thioester formation and ligation using a cysteinyl prolyl ester (CPE) autoactivating unit, 21th American Peptide Symposium, 2009. 6. 9, Broomington

[図書] (計 1 件)

1. 川上 徹, 相本三郎: システイン残基における *S*-ペプチド体を利用するペプチドライゲーショソ法の開発. 遺伝子医学 MOOK21 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用. メディカルドゥ pp76-82 (2012).

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organicc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 徹 (KAWAKAMI TORU)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 70273711