

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390026

研究課題名(和文)創薬基盤確立に向けた効率的な人工タンパク質化学合成法の開拓

研究課題名(英文)Development of synthetic platform of proteins

研究代表者

大高 章(OTAKA, Akira)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20201973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬物標的をはじめ薬効発現に至る過程に關与する分子の多くはタンパク質であり、これらの機能の分子レベルでの理解は、薬物のシード探索から有効性評価に至るすべての段階に關係する重要研究課題である。機能解析に供すべきタンパク質分子の供給が一つの足枷となっており、機能情報発信能力を持つ人工タンパク質の効率的調製法の確立は創薬研究推進の上で喫緊の課題である。そこで本研究では創薬関連タンパク質機能解明と基盤となる、人工タンパク質効率的化学合成法の確立を従来から行ってきたチオエステル等価体であるSEAlide peptideを利用することで達成した。

研究成果の概要(英文)：We have developed N-sulfanylethylaniide (SEAlide) peptides. Extensive examination of SEAlide peptides showed that the amide-type SEAlide peptides can be directly and efficiently involved in NCL via thioester species in the presence of phosphate salts. The presence or absence of phosphate salts provided kinetically controllable chemoselectivity in NCL for SEAlide peptides. This allowed SEAlide peptides to be used in both one-pot/N-to-C-directed sequential NCL under kinetically controlled conditions, and the convergent coupling of large peptide fragments, which facilitated the chemical synthesis of proteins over about 100 residues. The use of SEAlide peptides, enabling sequential NCL operated under kinetically controlled conditions, and the convergent coupling, were used for the total chemical synthesis of a 162-residue monoglycosylated GM2-activator protein (GM2AP) analog.

研究分野：医薬品化学、ペプチド化学

キーワード：タンパク質 タンパク質化学合成 チオエステル Native Chemical Ligation

## 1. 研究開始当初の背景

薬効発現の鍵分子であるタンパク質機能を分子レベルで理解することは、多様な分野の集積によって成り立つ創薬研究をより論理的かつ合理的に推進する上で必須の事項である。これに向け、合成小分子を利用したケミカルバイオロジー的研究手法が一定の成功を収めつつある。もう一つのアプローチは、創薬関連タンパク質自身を主に分光学的手法により解析し、その機能を明らかにしようとするものである。これら機能解明に資する分子として、天然型タンパク質そのものが挙げられるが、外部に対して情報発信を行える人工タンパク質も極めて有用である。これらの人工タンパク質創製は、一般に遺伝子工学的手法では不可能であり、化学合成に頼らざるを得ない。すなわち、人工タンパク質効率的化学合成法の確立は、論理的かつ合理的創薬研究における基盤技術となるものである。さて、タンパク質化学合成は、Native Chemical Ligation (NCL)法の開発により進歩を遂げたが、未だその発展途上にあるのが現状であり、タンパク質完全化学合成に向けた取り組みが精力的に行われていた。申請者も創薬分野におけるタンパク質機能解析の重要性を念頭に、タンパク質化学合成、化学操作、化学修飾というタンパク質に対し3方向から研究を展開してきた。化学合成に関する研究では、ペプチドチオエステルとN末システインペプチドの化学選択的反応であるNCL法を基盤とし、NCL法における問題点を解消しうるN-Sulfanylethylamide (SEAlide) Peptide法およびSulfanylproline (HSPro)法の開発を進めていた。我々が研究を展開してきたSEAlide Peptide法、HSPro法はこれら3つ従来のNCL法における問題点解決に資するものであると考え、これらを基盤とした研究展開を計画した。すなわち、創薬関連タンパク質の機能解析を指向した人工タンパク質効率的化学合成法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

薬物標的をはじめ薬効発現に至る過程に関与する分子の多くはタンパク質であり、これらの機能の分子レベルでの理解は、薬物のシード探索から有効性評価に至るすべての段階に係る重要研究課題である。これに向けた戦略は、小分子プローブをタンパク質機能探索に利用する方法論、そしてタンパク質分子自身を解析する方法論の2つに大別される。ケミカルバイオロジー研究の活発化に伴い、前者の研究に大きな進展がみられる。一方、後者については、機能解析に供すべきタンパク質分子の供給が一つの足枷となっており、機能情報発信能力を持つ人工タンパク質の効率的調製法の確立は創薬研究推進の上で喫緊の課題である。そこで本研究では創薬関連タンパク質機能解明と基盤となる、人工タンパク質効率的化学合成法の確立を

その研究目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究目的を達成するため、「SEAlide Peptideを利用した効率的チオエステル合成法の確立」、「連続NCL法確立に向けた新規速度論的NCL法の開発」、「縮合部位の柔軟性向上に向けたシステインを必要としないNCL法の開発」、これら3つの目標を同時進行させ、人工タンパク質効率的完全化学合成法確立へ展開した。さらに、細胞内天然型タンパク質の合成タグ分子による修飾についても検討した。まず、平成24年度については、目標達成に向け、研究計画「SEAlide Peptide合成法の確立」、「速度論的NCLに利用可能な素反応の開発」、「NCL用Versatile Ligation Auxiliaryの開発」を行った。平成25年度以降は、3つの研究計画を人工タンパク質合成確立に向け統合し、タンパク質完全化学合成を目指した。さらに、細胞内天然型タンパク質修飾を利用した情報発信型人工タンパク質への変換について検討した。

## 4. 研究成果

(1) SEAlide Peptideを利用した効率的チオエステル合成法の確立 まず、SEAlide peptideの合成の基盤となるアニリン型リンカーへのFmocアミノ酸の効率的導入法について検討した。従来はGlyおよびAlaの導入法しか検討されていなかったが、タンパク質構成アミノ酸すべてに適用可能な方法論を見出すに至った。具体的にはPOCl<sub>3</sub>-Et<sub>3</sub>N系でFmocアミノ酸を活性化する方法論である。本法を利用し、各種アミノ酸導入SEAlide peptideの合成を行い、SEAlide peptideとして利用できるC末端アミノ酸の確定を行った。

(2) 速度論的NCL法の開発 SEAlide peptideに関する研究過程においてSEAlide部分はリン酸塩存在下においてのみチオエステルとして機能することを見出した。すなわち、これはSEAlide peptideはリン酸塩の有無により厳密に反応性を制御できることを意味する。この性質を利用することで、速度論的制御を基盤とする画期的なN-to-C-directive one/pot sequential NCL法を開発するに至った。また、これとは別に従来はNCL反応に利用が不可能とされてきたProチオエステルについても反応条件を選択することでNCL反応に利用可能であることを見出した。これにより、速度論的NCL法に結びつく素反応としてSEAlide peptideとProチオエステルを利用する2つの方法論を確立するに至った。

(3) タンパク質完全化学合成の達成 上記2つの研究成果を統合し、162残基からなる糖タンパク質であるGM2AP誘導体の完全化学合成を達成した。あわせてGM2APの構造活性相関研究を遂行するためには、種々の配列を有するGM2APタンパク質が必要となる。これについてもProチオエステルを利用した

反応を利用することで合成タンパク質の多様性拡大に成功した。また、当初は天然型 GM2AP の化学合成には成功していなかったが、糖導入部分での NCL 反応を可能とするシステム様誘導体の開発に成功し、天然型 GM2AP の完全化学合成にも成功した。

In cell タンパク質ラベリング化法の開発  
本研究課題ではタンパク質の完全化学合成に資する方法論の開発以外にタンパク質ラベリング化についても検討した。ここで利用したのは、我々が従来から研究を行ってきた刺激応答型ペプチド結合切断能力を有するアミノ酸の Spr である。すでに、Spr を利用することでペプチド機能の変換に成功していたので、細胞内導入とタンパク質ラベリングという 2 つの機能を Spr を利用することで転換し、細胞内に存在するタンパク質のラベル化を光照射下に達成した。

#### 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 13 件)すべて査読有

Design and synthesis of a hydrogen peroxide-responsive amino acid that induces peptide bond cleavage after exposure to hydrogen peroxide. M. Kita, J. Yamamoto, T. Morisaki, C. Komiya, T. Inokuma, L. Miyamoto, K. Tsuchiya, A. Shigenaga\*, and A. Otaka\*. *Tetrahedron Lett. in press*, 2015. (doi: 10.1016/j.tetlet.2015.05.060)

Photo-triggered fluorescent labelling of recombinant proteins in live cells. D. Jung, K. Sato, K. Min, A. Shigenaga, J. Jung, A. Otaka\*, and Y. Kwon\*. *Chem. Commun. in press*, 2015. (doi: 10.1039/C5CC01067E)

Total chemical synthesis of monoglycosylated GM2 ganglioside activator using a novel cysteine surrogate. K. Sato, K. Kitakaze, T. Nakamura, N. Naruse, K. Aihara, A. Shigenaga, T. Inokuma, D. Tsuji, K. Itoh, and A. Otaka\*. *Chem. Commun. in press*, 2015. (doi: 10.1039/C5CC02967H)

Synthesis of lactam-bridged cyclic peptides by using olefin metathesis and diimide reduction. K. Aihara, T. Inokuma, C. Komiya, A. Shigenaga, and A. Otaka\*. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4183-4191. (doi: 10.1016/j.tet.2015.04.093)

Development of chemical methodology for preparation of peptide thioesters applicable to naturally occurring peptides using a sequential quadruple acyl transfer system. Y. Tsuda, A. Shigenaga, M. Denda, K. Sato, K.

Kitakaze, T. Nakamura, T. Inokuma, K. Itoh, and A. Otaka\*. *ChemistryOpen in press*, 2015. (doi: 10.1002/open.201500086)

Photoinduced growth system of peptide nanofibers addressed by DNA hybridization. M. Furutani, A. Uemura, A. Shigenaga, C. Komiya, A. Otaka, and K. Matsuura\*. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8020-8022. (doi: 10.1039/C5CC01452B)

Liquid-phase synthesis of bridged peptides using olefin metathesis of protected peptide with long aliphatic chain anchor. K. Aihara, C. Komiya, A. Shigenaga, T. Inokuma, D. Takahashi, and A. Otaka\*. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 696-699. (doi: 10.1021/ol503718j)

Development of a fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker. J. Yamamoto, N. Maeda, C. Komiya, T. Tanaka, M. Denda, K. Ebisuno, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga\*, and A. Otaka\*. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5122-5127. (doi:10.1016/j.tet.2014.05.110)

Development of a traceable linker containing a thiol-responsive amino acid for the enrichment and selective labelling of target proteins. J. Yamamoto, M. Denda, N. Maeda, M. Kita, C. Komiya, T. Tanaka, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga\*, and A. Otaka\*. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3821-3826. (doi:10.1039/C4OB00622D)

Examination of native chemical ligation using peptidyl prolyl thioester. T. Nakamura, A. Shigenaga, K. Sato, Y. Tsuda, K. Sakamoto, and A. Otaka\*. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 58-60. (doi:10.1039/C3CC47228K)

Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors. K. Tanegashima, K. Tsuji, K. Suzuki, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 3770-3775. (doi:10.1016/j.febslet.2013.10.017)

Chemical Synthesis of Biologically Active Monoglycosylated GM2-activator Protein Analog Using N-Sulfanylethylanilide Peptide. K. Sato, A. Shigenaga, K. Kitakaze, K. Sakamoto, D. Tsuji, K. Itoh, and A. Otaka. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7855-7859. (doi: 10.1002/anie.201303390)

CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. K. Tanegashima, K. Suzukia, Y. Nakayama, K. Tsuji, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. *FEBS Lett.* **2013**, 587, 1731-1735. (doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.046)

[学会発表](計 18 件)

北 未来、佐藤浩平、猪熊 翼、重永 章、大高 章「Protein trans-splicing の高速化を指向した N-intein 合成法の開発研究」日本薬学会第 1 3 5 年会 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日(発表: 28 日)

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 1 3 5 年会 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日(発表: 28 日)

小宮千明、粟飯原圭佑、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 1 3 5 年会 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日、2015 年 3 月 25-28 日(発表: 26 日)

小倉圭司、平川寛子、森崎巧也、山本 純、戎野紘司、宮本理人、石澤啓介、土屋浩一郎、重永 章、大高 章「低酸素環境応答型アミノ酸の開発研究」日本薬学会第 1 3 5 年会 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日、2015 年 3 月 25-28 日(発表: 26 日)

成瀬公人、佐藤浩平、坂本 健、猪熊 翼、重永 章、大高 章「M6P 修飾型 GM2AP の合成検討」日本薬学会第 1 3 5 年会神戸学院大学(兵庫県・神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日、(発表: 28 日)

津田雄介、重永 章、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「Preparation of Peptide/protein Thioesters Using a Chemical Protocol Applicable to Expressed Proteins」第 51 回ペプチド討論会 徳島大学(徳島県・徳島市)、2014 年 10 月 22-24 日(発表日: 22 日)

Otaka, A.; Tsuda, Y.; Shigenaga, A. “Chemical thioester synthesis applicable to naturally occurring peptide sequence” 15<sup>th</sup> Akabori Conference, (Boppard, Germany), 2014 年 9 月 7 日 10 日(招待講演、発表 9 日)

大高 章、重永 章「インテインに学ぶ標的タンパク質研究手法の開発」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(招待講演、発表 27 日)

佐藤浩平、北風圭介、坂本 健、重永 章、

辻 大輔、伊藤孝司、大高 章「GM2 活性化タンパク質の収束的合成研究」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

傳田将也、山本 純、佐藤浩平、坂本 健、重永 章、佐藤陽一、山内あい子、大高 章「ラベル化試薬“SEAL-tag”の開発と COX-1 および hCA1 のラベル化」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

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「発現タンパク質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」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

江藤三弘、傳田将也、佐藤浩平、坂本 健、猪熊 翼、重永 章、大高 章「*N*-Sulfanylethylcoumarinylamide (SECmide) を用いたペプチドチオエステル調製法の開発」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

小宮千明、山本 純、猪熊 翼、重永 章、大高 章「還元的 N - N 結合切断反応の改良を基盤とした刺激応答型アミノ酸の実用的合成法の検討」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

宮島 凜、津田雄介、佐藤浩平、猪熊 翼、重永 章、大高 章「天然アミノ酸配列に適用可能な新規ペプチドチオエステル合成法の開発」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

森崎巧也、山本 純、重永 章、佐藤陽一、猪熊 翼、山内あい子、大高 章「標的タンパク質の効率的濃縮および選択的ラベル化を可能とする新規リンカー分子の開発」日本薬学会第 1 3 4 回年会 熊本大学(熊本県・熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日(発表: 28 日)

中村太寛、重永 章、佐藤浩平、津田雄介、坂本 健、大高 章「Application of peptidyl prolyl thioesters to native chemical ligation」4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, 50th Japanese Peptide Symposium ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)、2013 年 11 月 6-8 日(発表: 6 日)

大高 章「ペプチド・タンパク質を基盤とする創薬展開への化学基盤の開拓」創薬懇話会 2013、定山溪ビューホテル(北海道・札幌市)2013 年 7 月 4 日

大高 章「タンパク質性医薬品開発に向けたペプチド化学」生命分子機能研究会 2013 学術集会「生体分子を基盤とする創

薬科学」 長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市) 2013年3月8日.(招待講演)

〔図書〕(計1件)

Chemical synthesis of proteins using N-sulfanylethylamide peptides, based on N-S acyl transfer chemistry

A. Otaka\*, K. Sato, and A. Shigenaga. *Topics Current Chem.* **2015**, 363, 229(33-56). (doi: [10.1007/128\\_2014\\_586](https://doi.org/10.1007/128_2014_586))

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

研究室ウェブサイト:

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/otaka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大高 章 (OTAKA, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授

研究者番号: 20201973

### (2) 研究分担者

重永 章 (SHIGENAGA, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師

研究者番号: 10423394