

## タンパク質完全化学合成を基盤とするカスタムメイド型人工酵素創製への挑戦

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2020-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 浩平 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10297/00027381">http://hdl.handle.net/10297/00027381</a>

令和元年6月18日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21077

研究課題名(和文) タンパク質完全化学合成を基盤とするカスタムメイド型人工酵素創製への挑戦

研究課題名(英文) Challenges for synthesis of custom-made artificial enzymes based on chemical synthesis of protein

研究代表者

佐藤 浩平 (Sato, Kohei)

静岡大学・工学部・助教

研究者番号：30756705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通じてタンパク質完全化学合成の必須合成中間体であるN末端チアゾリジン含有ペプチドチオエステルを、対応するヒドラジドから直接合成可能な手法の開発に成功した。この直接分子変換は従来法では達成不可能とされたものであり、従来にない画期的な反応である。また、ペプチドヒドラジドを鍵化合物とする固相ライゲーション法のための反応を見出し、効率的なペプチド鎖多成分縮合への基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体高分子のひとつであるタンパク質は様々な活性を示し、食品・医薬品分野から工業分野まで広く産業応用されている。これら有用タンパク質を自在にデザインしナノレベルでファインチューニングされた人工タンパク質を創出可能な技術として、化学合成法があげられる。本研究で得られた成果は、化学合成法によりタンパク質を合成する際の技術的課題を解決する画期的なものであり、タンパク質を対象とする多様な分野への波及効果も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully developed a method that can directly synthesize N-terminal thiazolidine-containing peptide thioester, which is an essential synthetic intermediate for complete chemical synthesis of proteins, from the corresponding hydrazide. This type of transformation has not been achieved by conventional methods. We also developed a novel solid-phase chemical ligation method for efficient protein synthesis, with peptide hydrazide as the key molecule. These results will find great utility in the preparation of useful artificial proteins.

研究分野：ペプチド化学、タンパク質化学

キーワード：ペプチド タンパク質 チオエステル ヒドラジド チアゾリジン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体高分子のひとつであるタンパク質は様々な活性を示し、食品・医薬品分野から工業分野まで広く産業応用されている。例えば酵素反応は、高い官能基選択性・立体選択性を常温・常圧・中性条件で達成可能であり、リパーゼによる不斉合成をはじめ有機合成化学分野においてもその有用性が認められている[引用文献 1]。合成化学分野における酵素利用を強力に推進し常用手法へと昇華するうえで、特定の基質にのみ作用するという酵素反応特有の問題をいかに克服するかが鍵を握る。すなわち、基質特異性の本質であるアミノ酸側鎖官能基の空間配置を、ナノレベルでファインチューニングすることが求められる。この課題に対し、タンパク質原性アミノ酸の置換・挿入・欠損による酵素ライブラリー構築とスクリーニングを手段とするいわゆる酵素工学的アプローチが試みられているが、調製可能な酵素ライブラリーは天然アミノ酸 20 種類の範疇に制限される。一方、ペプチドレベルでは非天然アミノ酸構造を構成ユニットとするフォルダマーによる二次構造制御と官能基の空間配置デザインに関する研究が進められ、天然アミノ酸由来ペプチドとは異なる構造や機能が見出されている[引用文献 2]。そこで、本研究ではフォルダマー構成ユニットに代表される非天然アミノ酸構造を系統的に導入可能なタンパク質調製法として研究代表者が研究実績を有するタンパク質化学合成に着目し、タンパク質工学的手法では開拓不可能であった各種官能基の空間配置をナノレベル制御した網羅的酵素ライブラリーを構築しカスタムメイド型人工酵素創出に挑戦することとした。

### 2. 研究の目的

本研究では合成化学的に価値の高い炭素 - 炭素結合形成反応を触媒する酵素のひとつであり本酵素を有機合成化学的に応用した例が報告されつつあるフルクトース-6-リン酸アルドラーゼ A (FSAA) をモデルとして、「これまでに化学合成が達成されていない FSAA の完全化学合成法の確立」と「フォルダマー構造導入を基盤とした天然酵素を凌駕するスーパー-FSAA の開発」を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

本研究は下記順に従って進めた。

- (1) FSAA 完全化学合成のための各ペプチド鎖の固相合成
- (2) N 末端 Thz 含有ペプチドチオエステルの新規合成法の開発
- (3) 効率的タンパク質合成を指向した固相ライゲーション法の開発

### 4. 研究成果

(1) FSAA の完全化学合成に取り組むにあたり、FSAA を Fr1~Fr7 の 7 つのペプチド鎖に分割して固相合成した後に native chemical ligation 法による縮合と続く縮合部位システイン残基の脱硫反応によるアラニン残基への変換を経る合成法を立案した。Fr1(1-33)、Fr2(34-61)、Fr3(62-94)、Fr4(95-124)、Fr5(125-159)、Fr6(160-178)、Fr7(179-220)の 7 ペプチド鎖の固相合成を検討し、Fr5(125-159)を除く 6 つのペプチド鎖については合成を達成した。Fr5(125-159)は N 末端システイン含有ペプチドチオエステルとして合成を試みたが、Boc 法による直接合成、側鎖アンカー法による合成いずれにおいても満足いく収量で所望のペプチド鎖を得ることはできなかった。

(2) そこで、Fr5(125-159)の合成法としてペプチドヒドラジドを前駆体とする合成手法を適用することとした。本ペプチドは N 末端チアゾリジン (Thz) 含有ペプチドチオエステルとして合成する必要があるが、ヒドラジド法ではチオエステルへの変換時に Thz 部位が分解するためにこの分子型を直接合成することはできない。そこで、N-Thz 含有ヒドラジドに適用可能な新規ヒドラジド活性化条件の探索を進めたところ、トリフルオロ酢酸溶媒中、*m*-クレゾール、チオアニソール存在下亜硝酸ナトリウムを作用させることで、Thz 構造の分解を抑えつつチオエステル体へと高効率で変換可能なことを見出した (図 1)。

(3) 本手法の開発によりすべての FSAA 合成用ペプチド鎖にアクセス可能となったが、タンパク質の収束的合成を進めるにあたり、多段階合成となるため各段階での HPLC 精製に伴う収率低下が懸念された。そこで、HPLC 精製回数を減らす目的で、固相担体を利用するペプチド鎖縮合反応を開発することにした。すなわち、C 末端ペプチド鎖を固相上に担持し、これを基質として順次ペプチド鎖を縮合するという戦略である。この時、過剰の試薬等は洗浄・ろ過のみで除去可能なため、HPLC 精製は必要なく、全体の収率向上が見込める。本合成戦略を成功裏に導くうえで、無保護ペプチドをいかに選択的に固相担体に担持するか、そして合成したタンパク質分子をいかに選択的に固相担体から切り出すかが鍵を握る。そこで、ペプチドヒドラジドの反応性に着目し検討を開始した。

ヒドラジドはアルデヒドと選択的に反応し、ヒドラゾンを与えることが知られている。ヒドラゾン形成は可逆反応であるため、固相上でのペプチド鎖縮合時に欠落することを防ぐ目的でヒドラゾンを還元しアルキルヒドラジドとして担持することを計画した。その結果、反応条件を精査した結果ペプチドヒドラジドをアルデヒド修飾樹脂に効率的に担持する条件を特定した。また、ペプチドアルキルヒドラジドに水溶液中で硫酸銅を作用させることで、顕著な副反応を伴うことなく選択的に加水分解され対応するカルボン酸を与えることが明らかとなった。さらにこれらの反応が固相上でも進行することが明らかとなり、固相ライゲーション法の基盤技術を確認することに成功した (図 2)。

以上、当初目的とした FSAA の完全化学合成には至らなかったものの、その研究過程で新規チオエステル法の開発および固相ライゲーション法の開発を達成した。現在、これらの FSAA 合成への応用について検討を続けており、これを発展させることで当初の目的に結び付けることが可能なものと考えている。

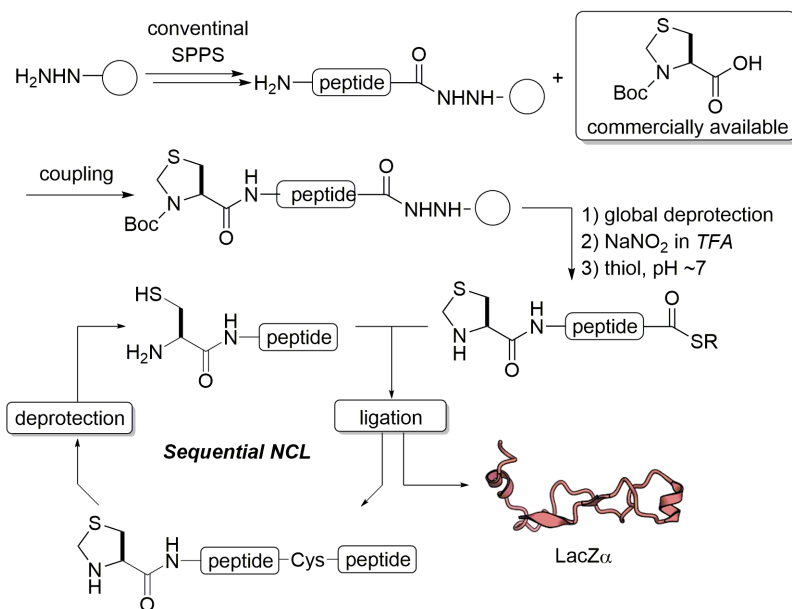


図 1. 開発した N 末端 Thz 含有ペプチドチオエステル合成法と連続 NCL によるタンパク質化学合成の概念図

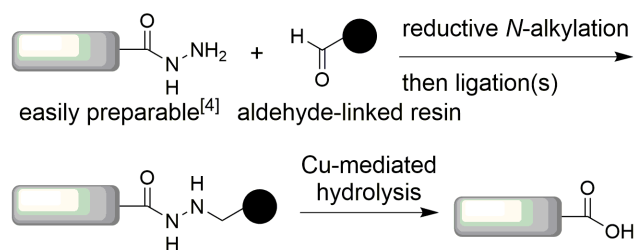


図 2. ペプチドヒドラジドを鍵化合物とする固相ライゲーション法の概念図

#### < 引用文献 >

- [1] M. T. Reetz *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480.  
 [2] C. M. Goodman *et al. Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- P. Vámosi, K. Matsuo, T. Masuda, K. Sato, T. Narumi, K. Takeda, N. Mase “Rapid Optimization of Reaction Conditions Based on Comprehensive Reaction Analysis Using a Continuous Flow Microwave Reactor” *Chem. Rec.* **2019**, *19*, 77–84. (10.1002/tcr.201800048, 査読有)
- K. Sato, S. Tanaka, K. Yamamoto, Y. Tashiro, T. Narumi, N. Mase “Direct synthesis of N-terminal thiazolidine-containing peptide thioesters from peptide hydrazides” *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9127–9130. (10.1039/C8CC03591A, 査読有)
- N. Mase, Moniruzzaman, S. Mori, J. Ishizuka, F. Kumazawa, S. Yamamoto, K. Sato, T. Narumi “Organocatalytic ring-opening polymerization of l-lactide in supercritical carbon dioxide under plasticizing conditions” *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 4329–4396. (10.1016/j.tetlet.2018.10.065, 査読有)
- T. Narumi, T. Nishizawa, T. Imai, R. Kyan, H. Taniguchi, K. Sato, N. Mase “Improvement of chemical stability of conjugated dienes by chlorine substitution” *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6527–6533. (10.1016/j.tet.2018.09.030, 査読有)
- T. Narumi, K. Miyata, A. Nii, K. Sato, N. Mase, T. Furuta “7-Hydroxy-N-Methylquinolinium Chromophore: A Photolabile Protecting Group for Blue-Light Uncaging” *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4178–4182. (10.1021/acs.orglett.8b01505, 査読有)
- N. Mase, Moniruzzaman, S. Yamamoto, Y. Nakaya, K. Sato, T. Narumi “Organocatalytic Stereoselective Cyclic Polylactide Synthesis in Supercritical Carbon Dioxide under Plasticizing

Conditions” *Polymers* **2018**, *10*, 713 (10.3390/polym10070713, 査読有)

N. Mase, Y. Nishina, S. Isomura, K. Sato, T. Narumi, N. Watanabe “Fine-bubble-based strategy for the palladium-catalyzed hydrogenation of nitro groups: measurement of ultrafine bubbles in organic solvents” *Synlett* **2017**, *28*, 2184–2188. (10.1055/s-0036-1588869, 査読有)

R. Kyan, K. Sato, N. Mase, N. Watanabe, T. Narumi “Tuning the catalyst reactivity of imidazolylidene catalysts through substituent effects on the N-aryl groups” *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2750–2753. (10.1021/acs.orglett.7b01105, 査読有)

A. Sugita, K. Ito, Y. Sato, R. Suzuki, K. Sato, T. Narumi, N. Mase, Y. Takano, T. Matsushita, S. Tasaka, Y. Kawata “The role of chemisorption for push-pull chromophores on SiO<sub>2</sub> surfaces in non-electrically poling host-guest NLO polymers” *J. Photochem. Photobiol., A* **2017**, *340*, 35–45. (10.1016/j.jphotochem.2017.03.007, 査読有)

S. Matsushita, N. Masaki, K. Sato, T. Hayasaka, E. Sugiyama, S.-P. Hui, H. Chiba, N. Mase, M. Setou “Selective improvement of peptides imaging on tissue by supercritical fluid wash of lipids for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry” *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 1475–1480. (10.1007/s00216-016-0119-3, 査読有)

M. Eto, N. Naruse, K. Morimoto, K. Yamaoka, K. Sato, K. Tsuji, T. Inokuma, A. Shigenaga, A. Otaka “Development of an anilide-type scaffold for the thioester precursor N-Sulfanylethylcoumarinyl amide” *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4416–4419. (10.1021/acs.orglett.6b02207, 査読有)

T. Nakamura, K. Sato, N. Naruse, K. Kitakaze, T. Inokuma, T. Hirokawa, A. Shigenaga, K. Itoh, A. Otaka “Tailored synthesis of 162-residue S-monoglycosylated GM2-activator protein (GM2AP) analogues that allows facile access to protein library” *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1986–1992. (10.1002/cbic.201600400, 査読有)

M. Denda, T. Morisaki, T. Kohiki, J. Yamamoto, K. Sato, I. Sagawa, T. Inokuma, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otaka “Labelling of endogenous target protein via N-S acyl transfer-mediated activation of N-sulfanylethylanilide” *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6244–6251. (10.1039/C6OB01014H, 査読有)

K. Kitakaze, Y. Mizutani, E. Sugiyama, C. Tasaki, D. Tsuji, N. Maita, T. Hirokawa, D. Asanuma, M. Kamiya, K. Sato, M. Setou, Y. Urano, T. Togawa, A. Otaka, H. Sakuraba, K. Itoh “Protease-resistant modified human  $\beta$ -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model” *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 1691–1703. (10.1172/JCI85300, 査読有)

P. L. S3ti, H. Yamashita, K. Sato, T. Narumi, M. Toda, N. Watanabe, G. Marosi, N. Mase “Synthesis of a self-assembling gold nanoparticle-supported organocatalyst for enamine-based asymmetric aldol reactions” *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1984–1990. (10.1016/j.tet.2016.02.065, 査読有)

T. Shimizu, R. Miyajima, K. Sato, K. Sakamoto, N. Naruse, M. Kita, A. Shigenaga, A. Otaka “Facile synthesis of C-terminal peptide thioacids under mild conditions from N-sulfanylethylanilide peptides” *Tetrahedron* **2016**, *72*, 992–998. (10.1016/j.tet.2015.12.070, 査読有)

J. Cui, T. Katsuno, K. Totsuka, T. Ohnishi, H. Takemoto, N. Mase, M. Toda, T. Narumi, K. Sato, T. Matsuo, K. Mizutani, Z. Yang, N. Watanabe, H. Tong “Characteristic fluctuations in glycosidically bound volatiles during tea processing and identification of their unstable derivatives” *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1151–1157. (10.1021/acs.jafc.5b05072, 査読有)

[学会発表](計11件)

佐藤 浩平, 石川 賢哉, 津田 修吾, 鳴海 哲夫, 吉矢 拓, 間瀬 暢之「ペプチドヒドラジドの選択的加水分解反応と固相ライゲーションへの応用」日本薬学会第139年会(2019年)

石川 賢哉, 佐藤 浩平, 津田 修吾, 鳴海 哲夫, 吉矢 拓, 間瀬 暢之「ペプチドヒドラジドを利用する新規 Solid-Phase Chemical Ligation 法の開発」日本化学会第99春季年会(2019年)

Kohei Sato, Shoko Tanaka, Kazuki Yamamoto, Yosuke Tashiro, Tetsuo Narumi, Nobuyuki Mase 「Expanding the utility of peptide hydrazide for chemical synthesis of protein」10th International Peptide Symposium (2018年)

Kenya Ishikawa, Kohei Sato, Shugo Tsuda, Tetsuo Narumi, Taku Yoshiya, Nobuyuki Mase 「Solid-phase chemical ligation using peptide hydrazide as traceless linker」10th International Peptide Symposium (2018年)

Shoko Tanaka, Kohei Sato, Tetsuo Narumi, Kohji Itoh, Akira Otaka, Nobuyuki Mase 「Synthetic study of GM2 activator protein and its analogs by using peptide hydrazide」10th International Peptide Symposium (2018年)

Kohei Sato, Shoko Tanaka, Yosuke Tashiro, Tetsuo Narumi, Nobuyuki Mase 「Facile conversion of peptide hydrazide to peptide thioester without composition of N-terminal Thz moiety」256th ACS National Meeting & Expo (2018年)

田中 晶子, 佐藤 浩平, 田代 陽介, 鳴海 哲夫, 間瀬 暢之「ペプチドヒドラジドを利用した生物活性ペプチドの合成研究」日本化学会第98春季年会(2018年)

Kohei Sato, Kazuki Yamamoto, Tetsuo Narumi, Naoharu Watanabe, Nobuyuki Mase 「Direct transformation of peptide hydrazide into N-Thz thioester peptide」 25th American peptide symposium (2017 年)

山本 和樹, 佐藤 浩平, 鳴海 哲夫, 渡辺 修治, 間瀬 暢之 「ペプチドヒドラジドを起点とした N 末端チアゾリジン含有ペプチドチオエステル直接合成法の開発」 日本化学会第 97 春季年会 (2017 年)

佐藤 浩平, 山本 和樹, 鳴海 哲夫, 渡辺 修治, 間瀬 暢之 「Thz 含有ペプチドチオエステルの直接合成に適用可能なペプチドヒドラジド変換法の開発」 日本薬学会第 137 年会 (2017 年)

佐藤 浩平, 山本 和樹, 鳴海 哲夫, 渡辺 修治, 間瀬 暢之 「Simple protocol for Fmoc-based preparation of N-terminal Thz-peptide thioester via peptide hydrazide」 第 53 回ペプチド討論会 (2016 年)

〔その他〕

研究室ウェブサイト

<https://wwp.shizuoka.ac.jp/sato-kohei/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

※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、研究者個人に帰属されます。