

タンパク質合成化学とバイオサイエンス

大阪大学蛋白質研究所 相本三郎

1. はじめに

1980年代、液相法と固相法という2通りのペプチド合成法のどちらがタンパク質の化学合成に適しているか比較検討されていた。いずれの方法に於いてもタンパク質の化学合成は達成されたが、液相法あるいは固相法だけのタンパク質の合成には限界があると認識されるようになった。そこで、低分子量タンパク質であれば、修士課程の大学院生が1年程度で合成することができる新規合成法の開発を目指して研究を開始した。本講演では、タンパク質の合成法の開発に関する筆者らの研究成果を紹介する。

2. ペプチドチオエステルを合成ブロックとするタンパク質合成法

Blakeらは、C末端をチオカルボキシ基としたペプチドを固相法で合成し、これを合成ブロックとして用い、タンパク質を合成する方法を1981年に報告した¹⁾。この方法では、C末端のチオカルボキシ基を銀イオンによって選択的に活性化してペプチド結合を形成させるため、ペプチド側鎖のカルボキシ基は遊離のままペプチドどうしを縮合できるというユニークな特徴をもっていた。しかし、システイン含有ペプチドの合成ルートがしばらく開発されなかったこと、チオカルボキシ基の求核反応性が高く副反応を起こすことや酸化されやすいことなどのため、この方法は研究グループの解散とともに忘れ去られようとしていた。

一方、筆者らは、側鎖のカルボキシ基を保護したペプチド固相法で合成し、アミノ基に保護基を導入したのち、これを合成ブロックとして用い、縮合剤を用いてペプチド鎖を縮合させる方法を開発していた。この方法では、カルボキシ基を保護した状態で合成ブロックの精製を行

わなければならない、溶解性の悪さから逆相HPLCでの精製が困難に直面していた。そこで、両者の長所を生かし、タンパク質の化学合成に広く

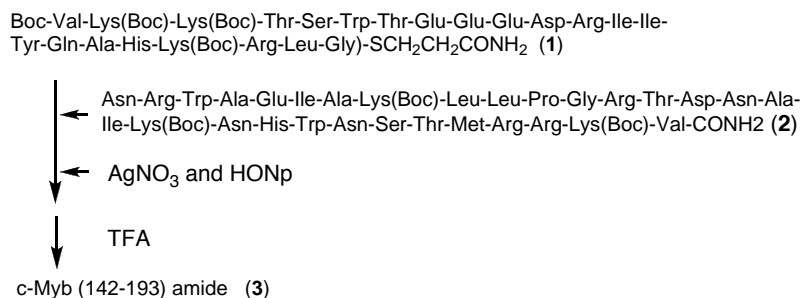


図1 チオエステル法による c-Myb (142-193) amide の合成

適用できる方法の開発を目指して研究を開始した。

検討の結果、ペプチドチオエステルを合成ブロックとすれば、Blake らの方法に含まれている欠点の多くを取り除くことができ、効率のよい長鎖ペプチド合成法が開発できるのではないかと考えた。そこで、モデルペプチドとして、固相法で *c*-Myb(142-163)-SCH₂CH₂CONH₂ を合成し、それに Boc 基を導入して調製した Boc-[Lys(Boc)^{143,144,160}]-*c*-Myb(142-163)-SCH₂CH₂CONH₂ と [Lys(Boc)^{171,182,192}]-*c*-Myb(164-193)-CONH₂ を硝酸銀と *p*-ニトロフェノール存在下で図 1 に示す縮合反応を試みたところ、図 2 に示すように、ほとんど副反応も伴わずに 52 残基のペプチド(**3**)を生成し、ペプチドチオエステルを合成ブロックとして用いる合成法は、タンパク質合成法としてきわめて有望であることが判明した²⁾。

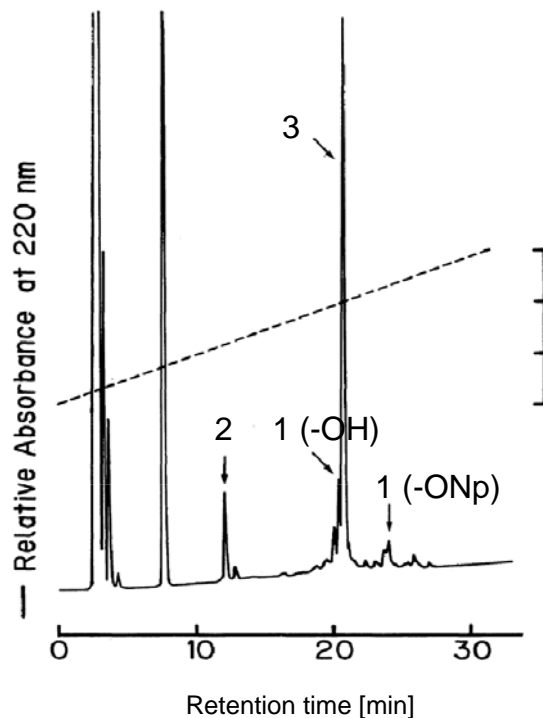


図2 反応溶液の HPLC の溶出パターン

1: Boc-[Lys(Boc)^{143,144,160}]-*c*-Myb(142-163)-SCH₂CH₂CONH₂, **2**: [Lys(Boc)^{171,182,192}]-*c*-Myb(164-193)-CONH₂, **3**: Boc-[Lys(Boc)^{143,144,160,171,182,192}]-*c*-Myb(164-193)-CONH₂

3. チオエステル法の改良

1) ペプチドチオエステルの調製

ペプチドチオエステルが優れた合成ブロックであることは明らかとなったが、その合成収率は低かった。原因を解析した結果、Boc 基除去のための TFA 処理の際に、チオエ

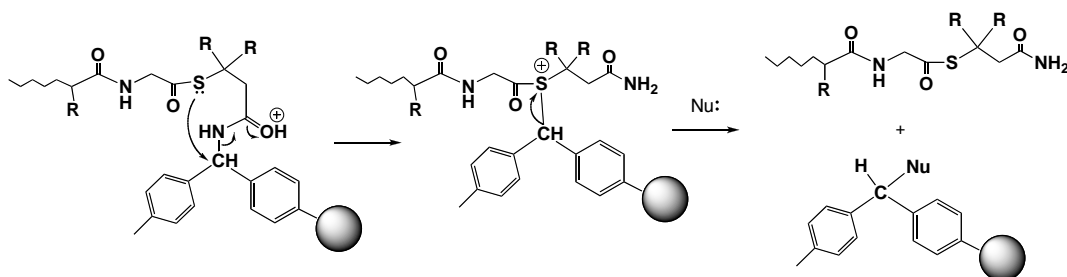


図3 TFA 処理の際に起こるペプチドチオエステルの樹脂からの脱落

ステルを構成するイオウ原子の関与する隣接基効果によりペプチドの樹脂からの脱離が加速されていることが明らかとなった。(図3)そこで、チオエステル部位を樹脂から遠ざけるために樹脂とチオエステル部位の間にアミノ酸を1残基挿入したところ、予想通り実用レベルの収率でペプチドチオエステルを調製できるようになった³⁾。

2) システイン含有ペプチドの合成法に関する研究

ペプチドチオエステルを合成ブロックとして用いても、システイン含有タンパク質の合成が困難であることに変わりはない。そこで、*S*-アセトアミドメチル化システイン (Cys(Acm)) 中のイオウ原子とチオエステル結合に含まれるイオウ原子に対する銀化合物の配位力の差に焦点を当て、チオエステルの活性化剤を検討した。その結果、AgCl/HOObt あるいは AgCl/HOBt の組み合わせで、縮合反応は順調に進行し、しかも Acm 基は全く分解されないことが判明した⁴⁾。その結果、図4に示す手順によりチオエステル法でシステイン含有タンパク質を自由に合成することができるようになった。

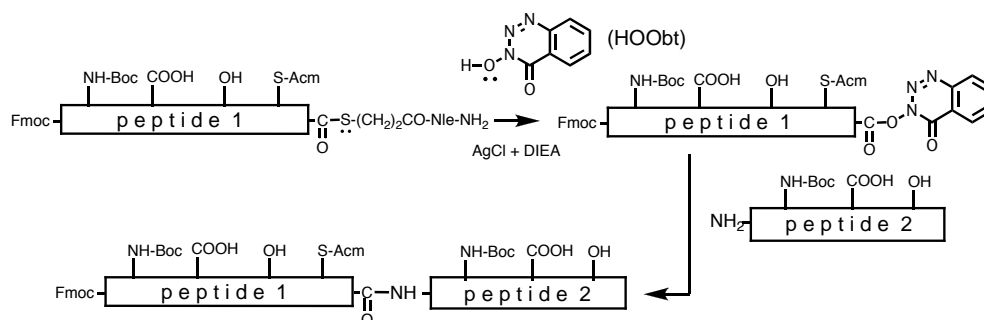


図4 現在のチオエステル法

1994年、native chemical ligation法 (NCL法) と命名されたタンパク質合成法が Kent らによって報告された⁵⁾。この方法は、アミノ酸のチオエステル (Xxx-SR) とシステインを混合しておく、分子間チオール-チオエステル交換反応とそれに引き続く *S-N*アシル基転位反応によって Xxx-Cys が生成するという1953年の Wieland らの論文⁶⁾と、ペプチドチオエステルを固相法で合成できるという筆者らの報告を背景とした方法で、極めて実用性の高い方法である。ただ NCL法ではペプチド鎖の縮合部位にシステイン残基が常に必要であるという制約がある。これを克服するために、様々なライゲーシオン補助基が開発され、その有効性が現在検討されている。

4. 発現タンパク質を合成ブロックとして用いるタンパク質調製法の開発

NCL法では発現タンパク質を合成ブロックとして利用できる。これは安定同位体標識した発現タンパク質を合成ブロックとすることができるという点で、この方法の極めて優れた特徴である。チオエステル法でも発現タンパク質を合成ブロックとして利用できる方法を検討した。合成ブロックとするためには、 α 位のアミノ基が遊離で、側鎖のア

ミノ基とチオール基に保護基が導入されたペプチドを発現タンパク質から調製する必要がある。検討の結果, Dixon らの開発した N 末端アミノ酸の除去法を応用することにより, 発現タンパク質から側鎖のアミノ基だけに保護基を導入した合成ブロックを調製するルートを開発することに成功した⁷⁾。(図 5) また、N 末端にセリンをもつ無保護のペ

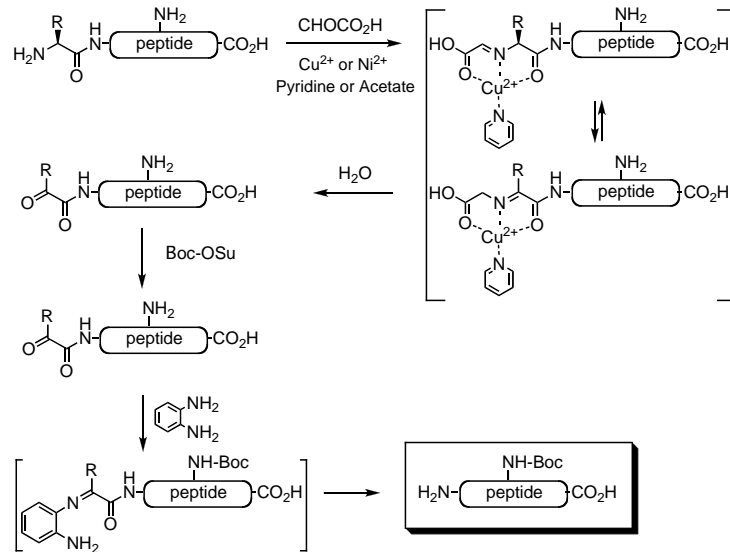


図 5 発現タンパク質からのチオエステル法用合成ブロックの調製経路

プチドを過ヨウ素酸処理し、N 末端に生成したアルデヒド基とチオエステルを選択的に縮合させることにより、-Xxx-Gly-間でペプチド鎖を縮合する方法も開発した⁸⁾。

5. Fmoc 法によるペプチドチオエステル調製法の開発

Boc 固相法を用いればペプチドチオエステルを効率よく調製できる。しかし、現在の標準的ペプチド合成法は Fmoc 法であり、しかもリン酸化ペプチドやグリコシル化ペプチドは、一般的に Boc 法よりも Fmoc 法の方が成績よく合成できる。そこで、Fmoc 法によるペプチドチオエステルの合成法の研究を行った。その結果、低求核性塩基を用いることにより Fmoc 法でペプチドチオエステルを合成することに成功したが、チオエステルに隣接するアミノ酸残基のラセミ化を防ぐことができなかった⁹⁾。

ひょんなことから、筆者の研究室で開発されたライゲーシオン用の補助基 (*N*-4,5-dimethoxy-2-mercaptobenzyl 基) が、弱酸性条件下で *N*-*S* アシル基転位反応に介在し、容易にチオエステル体を形成するということが ^{13}C NMR による解析から明らかになった。これをきっかけとして Fmoc 法でペプチド鎖を伸長させたのち、補助基の結合したアミド結合をチオエステル結合へと効率よく変換する方法を開発することに成功した¹⁰⁾。(図 6 a) この方法では、ピペリジン処理がくり返されるペプチド鎖の伸長時はアミド結合で存在し、伸長反応完了後にチオエステルに変換するため、ラセミ化を効率よく防ぐことができる。さらに、Cys-Pro エステルをペプチドの C 末端に導入しておくとも自発的にペプチドチオエステルとなるという方法¹¹⁾も開発した。(図 7 b) その発

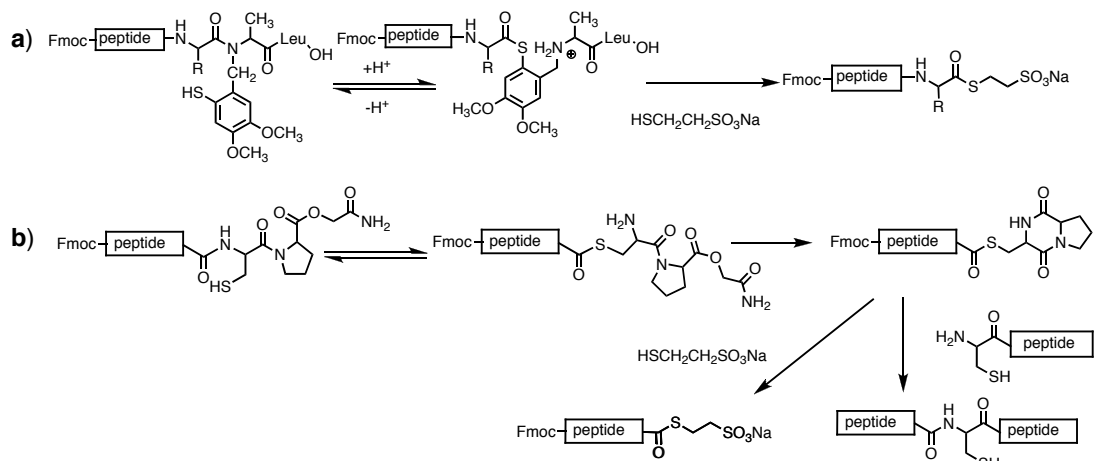


図6 N-Sアシル基転位反応を利用したペプチドチオエステルの合成法

展が期待されている。

4. タンパク質化学合成の効率 —SAIL アミノ酸で標識されたウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) の合成を例として—

側鎖の運動性を評価するため、立体整列同位体標識アミノ酸(SAIL アミノ酸)で標識したBPTIを合成した。本タンパク質はSAILアミノ酸で標識したものを無細胞系で調製しようとしたが、上手く発現できなかったため、化学合成することとなったものである。SAIL TyrとSAIL PheからBoc-Tyr(2Br-Z)とBoc-Pheを合成し、図7に従ってチオエステル法用のセグメントを合成した。両セグメントの収率はともに10%弱であった。縮合反応の収率が40%で、フォールディング後の単離収率が約30%であった。遊離のSAIL Tyr(34mg)とSAIL Phe(28mg)からBPTI 3.0mgを得ることができた。総収率は1.1%であった。合成効率は大腸菌並であったが、確実に調製できる点は化学合成の利点といえよう。

5. おわりに

20年にわたりタンパク質の化学合成法に取り組んできた。その間に、反応部位以外には完全に保護基を導入し、縮合剤を用いてペプチド鎖を結合するという合成法から、保護基は必要最低限あるいは全く用いずに、特定の部位で選択的に反応させるという合成法へと変わってきた。合成効率も向上してきた。これらの合成手法を基に、生物学的調製が困難な修飾タンパク質や標識タンパク質、膜タンパク質などの合成を目指して研究を続け、バイオサイエンスを支える基盤技術として、その発展に貢献していきたいと考えている。

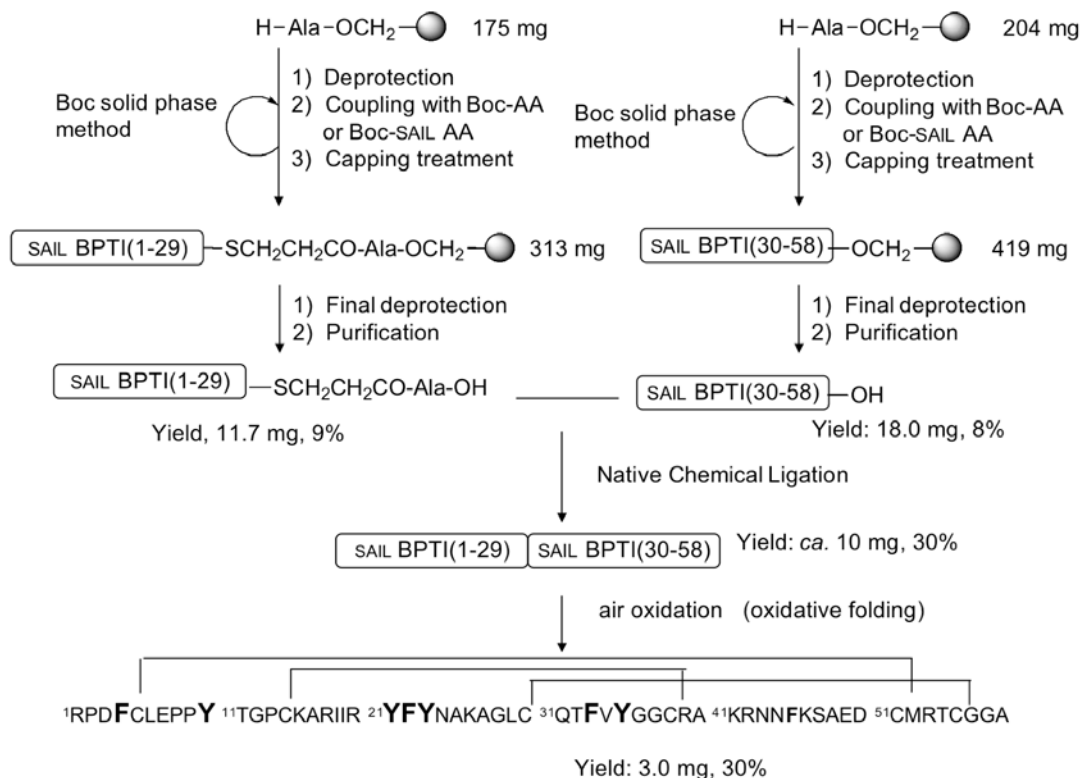


図7 SAIL(Stereo-Array Isotope Labeled)アミノ酸を導入した BPTI の合成
Tyr(Y)と Phe(F)の SAIL アミノ酸を用いて合成

参考文献

- 1) J. Blake, C. H. Li, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4055-4058 (1981)
- 2) H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 111-117(1991)
- 3) H. Hojo, Y. Kwon, Y. Kakuta, S. Tsuda, I. Tanaka, K. Hikichi, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2700-2706 (1993).
- 4) T. Kawakami, S. Aimoto, *Chem. Lett.*, 1157-1158 (1997)
- 5) P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B. Kent, *Science*, **266**, 776-779 (1994)
- 6) T. Wieland, E. Bokelamnn, L. Bauer, H.U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann.Chem.*, 583, 129-149 (1953).
- 7) T. Kawakami, K. Hasegawa, K. Teruya, K. Akaji, M. Horiuchi, F. Inagaki, Y. Kurihara, S. Uesugi, S. Aimoto, *J. Peptide Science*, **7**, 474-487 (2001)
- 8) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.*, **3**, 1403-1405 (2001)
- 9) X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 8669-8672 (1998)
- 10) K. Nakamura, H. Mori, T. Kawakami, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Aimoto, *Int. J. Peptide Res. Therapeutics*, **13**, 191-202 (2007)
- 11) T. Kawakami, S. Aimoto, *Chem. Lett.*, **36**, 76-77 (2007)