

Title	Chemical Synthesis of Proteins in Solution Using Chloroform-Trifluoroethanol and Chloroform - Phenol Mixed Solvents : Synthesis of Human Amyloid $\beta$ -Peptides, Midkine, Pleiotrophin and Leptin.
Author(s)	乾, 達也
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44589">https://hdl.handle.net/11094/44589</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	乾達也
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第18058号
学位授与年月日	平成15年7月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Chemical Synthesis of Proteins in Solution Using Chloroform-Trifluoroethanol and Chloroform-Phenol Mixed Solvents : Synthesis of Human Amyloid $\beta$ -Peptides, Midkine, Pleiotrophin and Leptin. (クロロホルム-トリフルオロエタノールおよびクロロホルム-フェノール混合溶媒を用いた溶液法による蛋白質の化学合成：ヒト型アミロイド $\beta$ -ペプチド、ミッドカイン、プレイオトロフィンおよびレプチンの合成)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次 (副査) 教授 田中 徹明 教授 今西 武 教授 小林 資正

## 論文内容の要旨

1901年にジペプチドの合成が報告されて以来すでに100年、これまでさまざまな保護基や試薬が開発されペプチド合成の方法論も確立されたものとなり、今日ではほとんどすべてのペプチドが化学合成出来るようになった。しかしながら100残基を越すような蛋白質の合成においては、これまでいくつかの報告がされているがその方法にはいろいろな制約があり自由に蛋白質を合成出来るものではなかった。(便宜上、ここでは100残基以上のものを蛋白質、それ以下のものをペプチドと定義する)。そこで、筆者はBoc法を用いた最大保護法による溶液中でのセグメント縮合法、即ち縮合剤として1-エチル-3-(*N,N*-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を、添加剤として3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt)を使用するEDC-HOObt法を使用し、蛋白質を簡便に合成出来る化学合成法を確立する目的で研究を進めた。

固相合成法によるペプチドの合成は簡便かつ迅速で非常に有用な方法である。しかしながら合成ペプチドの分子量が大きくなるにつれ、短鎖ペプチドや欠損ペプチドなどの副生物が増え目的物からこれらを完全に除去する事は難しくなる。これに対しセグメント縮合法は、各保護セグメントを精製した後に縮合反応に使用するため、高純度な目的物を比較的簡単に得る事が出来る。中でも、セグメント縮合反応を溶液中で行う液相合成法は、各保護セグメントの精製のみならず合成中間体の精製も可能であり、また反応規模の拡大にも特段の制約が無いため、高純度の合成ペプチドを得る手法としては最も確立され信頼性の高いものである。しかし液相合成を進める上で一番の問題となるのが保護ペプチド中間体の溶解度である。この問題は目的とするペプチドの鎖長が長くなるに連れ深刻で、各反応段階での一時的保護基の除去や、縮合反応が不完全となり、結果として副生成物の混入を招く。筆者はこの問題を克服するため反応溶媒として従来ペプチド合成でよく用いられるジメチルホルムアミド(DMF)、*N*-メチルピロリドン(NMP)やジメチルスルホキシド(DMSO)よりさらに強力な溶解力を持つクロロホルム-トリフルオロエタノール(CHCl<sub>3</sub>-TFE)混合溶媒を適用した。またCHCl<sub>3</sub>-TFE混合溶媒より更に強力な溶解力を持つCHCl<sub>3</sub>-phenol混合溶媒を開発し、これを難溶性のペプチド及び蛋白質の合成に適用した。

保護ペプチド中間体の溶解度低下の原因は分子内または分子間の水素結合、疎水結合により分子が会合し、 $\beta$ シート構造を形成することによる。したがって $\beta$ シート構造を壊し分子を会合状態から分散した状態に出来る溶媒が求め

られてきた。CHCl<sub>3</sub>-TFE 混合溶媒は TFE の水素結合力和 CHCl<sub>3</sub> の疎水結合力の相互作用により分子の会合を阻害する事で強力な溶解力を示す。CHCl<sub>3</sub>-TFE 混合溶媒は黒田によりペプチド合成に利用されたが、蛋白レベルの分子に利用し、その有用性を示したのは今回が初めてである。また CHCl<sub>3</sub>-TFE より強い溶解力をもつ溶媒を探索した結果、CHCl<sub>3</sub> と phenol の組み合わせが強力な溶解力を示す事がわかった。しかしながら phenol は酸性度が強く詳細な条件検討なしにペプチド合成に応用する事は出来なかった。そこでモデルペプチドを用いた実験から反応を定量的に終了させ、エピメリ化などの副反応もない反応条件、すなわちアミン成分に対しカルボキシル成分を 1.1 当量、EDC を 2 当量、HOObt を 3 当量使用する条件を見出した。しかもセグメントの C 末端アミノ酸として検討した 11 種アミノ酸 (Ala, Gln, Glu (cyclohexyl), Ile, Leu, Lys (2-chlorobenzoyloxycarbonyl), Met, Phe, Pro, Ser (benzyl), Val) すべてにおいて良好な結果が得られたことから、どのような蛋白質でもセグメント縮合時のエピメリ化の心配なく適当な長さのセグメントに分けることが出来る高い汎用性を持ち合わせている事が証明できた。

実際のペプチド合成では難溶性ペプチドとして知られるアミロイドの合成において CHCl<sub>3</sub>-TFE にも溶けないセグメントが存在した。そこでモデルペプチド検討した条件を用い CHCl<sub>3</sub>-phenol 混合溶媒中、セグメント縮合を行った結果、アミロイドを高純度かつ高収率で合成する事が出来た。また CHCl<sub>3</sub>-TFE 及び CHCl<sub>3</sub>-phenol 混合溶媒を用いた合成法を利用して新規ヘパリン結合性神経成長因子ヒト型ミッドカイン (hMK, 121 アミノ酸残基)・ヒト型プレイオトロフィン (hPTN, 136 アミノ酸残基)、更には摂食を抑制する蛋白質として知られるヒト型レプチン (hLeptin, 146 アミノ酸残基) の合成を行い両混合溶媒が蛋白領域分子の合成に対して有用であることを証明した。殊に hMK や hPTN の合成では最終両ドメインの縮合が、60 残基から 70 残基程の大きな保護ペプチド中間体同士の縮合にもかかわらず僅か 1 時間で定量的に反応を終了させる事が出来、CHCl<sub>3</sub>-TFE 混合溶媒の蛋白質合成における有用性をはじめて示す事が出来た。また合成戦略的にも液相合成の利点を生かし、両ドメイン分子を同時に合成することが出来た。この結果、当初生物学的手法では量の確保が出来なかった hMK, hPTN の生物活性や構造解析を行う事が出来た。難溶性が予想された hLeptin の合成においては、やはり CHCl<sub>3</sub>-TFE 混合溶媒にも溶けない保護ペプチド中間体が存在した。この様な蛋白質領域の高分子量でかつ難溶性の分子であっても CHCl<sub>3</sub>-phenol 混合溶媒の利用で合成する事が出来た。筆者は上記蛋白質の合成を通し CHCl<sub>3</sub> と TFE 混合溶媒あるいは CHCl<sub>3</sub> と phenol 混合溶媒を用いた蛋白質、殊に難溶性の蛋白質の化学合成法を確立した。この方法により蛋白質の化学合成がより確実に、より定量的に行えると筆者は確信している。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子操作技術が普及し蛋白質の大量合成が可能となったが、種々の翻訳後修飾や、非天然型のアミノ酸の取り込みを考えると、ペプチドの化学合成は依然重要である。液相法と較べて、自動化の観点からすると固相重合法が優位であるが、固相法では重合度が大きくなるにつれ極端に反応生成物の純度が低下する。そこで考え出されたのがペプチドフラグメントを固相で重合し、それらを精製した後、液層で重合させる手法である。現在広く用いられているのは Boc-基による末端保護と、側鎖官能基の最大保護法であり、重合反応をすべて終えたのち、無水 HF による保護基を脱離する方法である。この手法の最大の弱点は保護基のついたフラグメントに対する十分な溶解度を持つ溶媒の選択が困難な点にある。

乾君は広くペプチド合成に用いられている DMF (N,N'-dimethylformamide)、NMP (N-methyl-2-pyrrolidone) や DMSO (dimethylsulfoxide) などの有機溶媒などでは  $\beta$ -シート形成による会合体の沈殿形成が低溶解度の原因であると考えた。そこでこれら  $\beta$ -シートを破壊する溶媒として、用いられる TFE (2,2,2-trifluoroethanol) と CHL (chloroform) または DCM (dichloromethane) の混合溶媒を検討したが、Amyloid  $\beta$ -peptides ; A $\beta$  (1-42) のような非常に会合を起こすペプチドにはやはり不十分であることを示し、新たに CHL と phenol の混合溶媒が  $\beta$ -シート形成を阻止するのに最適であることを見出した。さらに重合剤としての EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) さらに添加剤として HOObt (3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine) が多く用いられるが、この縮合反応中に起こるエピメリゼーションおよびエステル形成の抑制条件を

モデル系を用いて検討した。得られた知見を基に旨く、CHL-TFE および CHL-phenol の溶媒を使い分けることにより 121 残基の新規ヘパリン結合性神経成長因子ヒト型ミッドカイン、136 残基のヒト型プレイオトロフィンさらに 146 残基のヒト型レプチンの合成に成功した。

以上のように乾君による本研究では難溶性長鎖保護ペプチドの縮合反応に広く用い得る溶媒条件を見出し、生物科学上重要なペプチドの合成に成功した。本研究の成果は、今後のペプチドの化学合成に資するところ大であり、学位の授与に値すると考えられる。