OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	ペプチド合成における強酸処理時の副反応の抑制および当該抑制法を適用した翻訳後修飾ペプチドの合成研究
Author(s)	泰地, 美沙子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58001
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【33】

氏名	泰地（たいち） 美沙子（みさこ）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 23563 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	ペプチド合成における強酸処理時の副反応の抑制および当該抑制法を適用した翻訳後修飾ペプチドの合成研究
論文審査委員	（主査） 教授 深瀬 浩一 （副査） 教授 相本 三郎　教授 梶原 康宏　教授 西内 祐二

論文内容の要旨

ペプチドやタンパク質は、様々な生化学的事象に関与する。ペプチドやタンパク質が機能するためには、多くの場合、高次構造形成に加えて、リン酸化や糖化に代表されるタンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を担っている。翻訳後修飾ペプチドやタンパク質化学合成のアプローチから、それらの分子レベルでの機能解析を目的とし本研究を行った。まず、それらの化学合成において、従来法の持つ問題点の解決を検討した。次に、得られた知見を適用して、種々の翻訳後修飾ペプチドを合成し、構造と機能の解析を行ったので報告する。

1．ペプチド合成における強酸処理による最終脱保護時の副反応の抑制

Boc/Bzl 法でのペプチド合成において、最も問題点が多い段階である強酸を用いた最終脱保護反応に焦点を当てた。最終脱保護反応では、保護基由来のカルボカチオンがペプチドを修飾する副反応がしばしば起こる。副反応を抑制するため、カルボカチオンを捕捉する添加剤を加えて最終脱保護反応を行うのが一般的である。しかし、従来法では、Met へのアルキル化と His(Bom)由来の副反応の抑制が困難であった。新たな添加剤を探索した結果、強酸処理において 2-メルカプトピリジンが Met 含有ペプチドのアルキル化を効率よく抑制すること、またヒドロキシルアミン誘導体が His(Bom)由来のホルムアルデヒドに起因する副反応を抑制することを見出した。これらの副反応は、酸処理において最も深刻な副反応の 1 つである。これら添加剤により、大幅な収率の向上並びに手間やコストの削減が大いに期待できる。この知見を以下のペプチド合成に適用した。

2．セリンプロテアーゼ阻害剤マリノスタチン（MST)の合成およびその構造と機能解析

MST は海洋細菌が産生するセリンプロテアーゼ阻害剤であり、分子内の側鎖間で 2 つのエステル結合を有する。2 つのエステル結合の選択的な形成を鍵反応とし、効率よく MST とそのアナログを合成した。また、MST の構造活性相関および、NMR 解析や酵素との複合体の X 線結晶構造解析を行い、MST の機能解析を行った。さらに、MST 構造のモチーフを適用して、MST とは異なる酵素阻害特異性を備えた阻害剤の創製を行い、MST の阻害特異性をズブチリシンからトリプシンに改変した。

3．タンパク質の翻訳後修飾 SUMO 化の機能解析へ向けた SUMO 化ペプチドの合成

SUMO は約 10 kDa のポリペプチドであり、Lys 残基の側鎖でイソペプチド結合を形成する。標的タンパク質が SUMO 化されることによる構造と機能変化を観察するため、SUMO 化ペプチドの合成を行った。その合成では、ケミカルライゲーションを援用してペプチド鎖の伸張および標的タンパク質ドメインへの SUMO の導入を行った。ケミカルライゲーションに供した各セグメントは、1 の手法を適用することにより、効率よく合成した。

論文審査の結果の要旨

泰地美沙子は、「ペプチド合成における強酸処理時の副反応の抑制および当該抑制法を適用した翻訳後修飾ペプチドの合成研究」と題して以下の研究を実施した。

Ⓐペプチド合成時の副反応については、既に詳細な研究が集積されている。しかし、解決すべき懸案として①メチオニンやスルフィド基へのアルキル化（スルホニウム化）、②ベンジルオキシメチル（Bom）基由来のホルムアルデヒドに起因する副反応が残されていた。それぞれの解決策として、強酸処理時に、①2-メルカプトピリジンを添加することにより、メチオニンやビオチンを含むペプチドのアルキルスルホニウム体の生成を効率よく抑制した。また②MeONH2 HCl がホルムアルデヒドに起因する副反応を抑制することを明らかにした。これら抑制策は実用的価値も高く、ペプチドをターゲットとした研究に寄与するものである。

Ⓑ上記抑制法を用いた翻訳後修飾ペプチドやタンパク質の合成研究として、マリノスタチン（MST）の合成を行った。MST は、セリンプロテアーゼ阻害剤であり、分子内の側鎖間（Asp-Ser, Asp-Thr）で 2 つのエステル結合を有する。互いに選択的に除去可能な 2 組の保護基を、（Asp-Ser, Asp-Thr）に導入することにより、選択的なエステル結合形成を行った。この MST の合成戦略を利用して、様々なアナログを合成し、構造活性相関および、NMR や X 線結晶構造解析から MST の構造と機能解析を行った。また、MST の構造をモチーフにした他のセリンプロテアーゼ阻害剤のデザインと合成を行い、この構造が他のプロテアーゼ阻害剤の開発に有用であることを実証した。

Ⓒ植物の転写因子である PHR1 を標的タンパク質とし、タンパク質の翻訳後修飾のうちのひとつである SUMO 化の機能解析を計画した。SUMO は 78 残基のポリペプチドであり、Lys 残基の側鎖でイソペプチド結合を形成する。PHR1 に含まれる 69 残基の GARP ドメインが SUMO 化されることによる機能変化を観察するため、SUMO 化された GARP ドメインと、GARP ドメインをそれぞれ合成した。チオエステル法とネイティブケミカルライゲーション法を適用した合成法は、他の SUMO 化タンパク質の合成にも適用可能であり、未だ詳細が明らかでない SUMO 化の機能解析に貢献できると期待される。

以上の業績はペプチドやタンパク質の化学合成に大きく貢献するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。