

Title	A Study of Chemical Protein Synthesis : Development of a Method for Peptide Thioester Preparation via an N-S Acyl Shift Reaction
Author(s)	中村, 健一郎
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58004
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	中 村 健 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 5 7 1 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	A Study of Chemical Protein Synthesis : Development of a Method for Peptide Thioester Preparation via an N-S Acyl Shift Reaction (蛋白質化学合成に関する研究：N-Sアシル基転位反応を用いたペプチド チオエステル調製法の開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 相 本 三 郎 (副査) 教 授 村 田 道 雄 教 授 高 尾 敏 文

論文内容の要旨

【背景と目的】

タンパク質を化学的に調製する方法として、あらかじめ調製した 20 から 50 残基程度のアミノ酸からなるペプチドを合成ブロックとし、それらを縮合するライゲーション法が一般的に用いられている。これまで、多様なライゲーション法が開発されてきたが、いずれのライゲーション法でもペプチドチオエステルを共通の合成ブロックとして利用している。現在、ペプチド合成の主流は、簡単な操作で効率よくペプチドの調製が可能な Fmoc 固相合成法であるが、Fmoc 基を除去するためのピペリジン処理によりチオエステルが容易に分解することや、チオエステルの分解抑制のために低求核性塩基を用いて Fmoc 基を除去しても、チオエステル部位のアミノ酸が一部ラセミ化するなどの問題があり、ペプチドチオエステルを Fmoc 法で直接調製することは困難である。もしも、ペプチド鎖伸長後に任意のアミド結合をチオエステル結合に変換することが出来れば、直接合成の際に起こる問題を一気に解決できるはずである。そこで、アミド結合をチオエステル結合へと変換する間接法の開発を目的として、*N*-S アルキル基転位反応の探索と反応の最適化を行うこととした。

【結果】

N-S アシル基転位反応は生体内反応においてはしばしば見られる反応であるが、それを化学的に効率よく起こすことができるのか、さらに、それを利用してペプチドチオエステルを得ることが出来るか否か不明であった。そこで申請者は ^{13}C NMR、逆相 HPLC、質量分析法を用いてシステイン及び、4,5-ジメトキシ-2-メルカプトベンジル (Dmmb) 補助基を介した *N-S* アシル基転位反応の解析を行った。するとトリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液中で転位生成物である *S*-ペプチド体が前者は 500 時間で、後者は 15 時間で約 80% 生成することが明らかになった。この結果から Dmmb 補助基を介した *N-S* アシル基転位反応を利用してペプチドチオエステルの調製法を開発することにした。下図に示すように、Dmmb 補助基含有ペプチド **1** を Fmoc 法により調製し、TFA 処理により *N-S* アシル基転位反応を起こし *S*-ペプチド **2** と変換した。更にチオール性試薬で処理することによりチオールチオエステル交換反応を起こし安定なペプチドチオエステル **3** と導いた。本手法ではチオエステル部位のアミ

α酸残基の差異 (Gly, Ala, Leu, Phe, Ser) に依らず80%以上の効率でペプチド**1**を基準に目的物**3**を得ることが出来た。また、ペプチド鎖伸長反応時にチオエステル結合を有さないことから、これまで問題となっていたチオエステル結合の分解やチオエステル結合に隣接したアミノ酸残基のラセミ化(下図：“*”部)に関して本質的に回避することができた。更に、固相上で*N-S*アシル基転位反応を行うことにより目的のペプチドチオエステルのみを切り出すことに成功し、簡便なペプチドチオエステルの調製法を開発した。固相上での転位反応を利用して40 残基を超えるような長鎖ペプチドチオエステルやリン酸化ペプチドチオエステルも効率良く合成できた。以上のように*N-S*アシル基転位反応を利用した新規なペプチドチオエステル調製法を開発し、その有用性を示した。本研究は蛋白質合成化学の発展に寄与するものと考えられる。

The diagram illustrates the *N-S* acyl transfer reaction used for synthesizing peptide thiocarbonates. It shows three main stages: 1. Starting material: A peptide chain (PEPTIDE) linked to a resin support (R¹) via its C-terminus. The side chain contains an α-amino acid residue with a hydroxyl group and an allyl group. 2. Intermediate formation: Reaction with a base (OH⁻) deprotonates the hydroxyl group, which then attacks the carbonyl carbon of the amide bond, forming a cyclic intermediate (2) with a thiolate group (-S-) and an ester linkage. 3. Final product: Reaction with a thiol reagent (R³-SH) opens the cycle, resulting in the final peptide thiocarbonate product (3), where the side chain is modified to contain a thioether-linked ester group (-S-CO-O-R³). The labels 1, 2, and 3 are placed below their respective structures.

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調製法

論文審査の結果の要旨

博士学位申請者の中村 健一郎氏は、タンパク質の化学合成法を発展させる上で克服しなければならない課題の一つであるペプチドチオエステル調製法の開発を中心に研究を行った。現在タンパク質合成法として多様なライゲーション法が開発されているが、いずれのライゲーション法でもペプチドチオエステルを合成ブロックとして利用している。しかしながら、現在広く用いられているFmoc固相ペプチド合成法では、ピペリジン処理によるチオエステルの分解や、チオエステルの分解を抑制できても、チオエステル部位のアミノ酸のラセミ化などの問題があり、Fmoc法でのペプチドチオエステルの調製は困難であると考えられていた。そこで、申請者は、Fmoc法でペプチド鎖を伸長させた後に、任意のアミド結合をチオエステル結合に変換することが出来れば、直接合成の際に起こる問題を一気に解決できるはずであると考え、研究を開始した。申請者は、ペプチド鎖の縮合を目的として開発された補助基、4,5-ジメトキシ-2-メルカプトベンジル基、の関与する副反応を解析し、それがN-Sアシル基転位反応であること、平衡時にはペプチド結合の80%がチオエステル結合となっていること、さらにチオエステル型ペプチドを合成ブロックとして用いることの出来るペプチドチオエステルへと効率よく変換できることを明らかにした。これらの知見を総合し、Fmoc固相合成法を用いて合成したペプチドから、穏和な条件下でラセミ化を伴うことなく効率よく合成ブロックであるペプチドチオエステルを調製する方法を開発した。

本研究の成果は、タンパク質の化学合成法の発展に大きく貢献する成果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認める。