

## 新任教員紹介

# 生命化学科・講師 片山秀和

### 略歴

1999.3 東京大学農学部生物生産化学専修 卒業  
2001.3 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻修士課程 修了  
2004.3 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻博士課程 修了  
2004.4 日本学術振興会特別研究員（受入機関：大阪大学蛋白質研究所）  
2007.1 東海大学糖鎖科学研究所 特定研究員  
2010.4 現職



### 担当科目

入門ゼミナール、生命有機化学 I、生命有機化学 IV、基礎化学実験、生物有機化学実験

### 研究活動内容

#### 1. まえがき

近年のタンパク質化学合成技術の発展は目覚ましく、多くの低分子量タンパク質が、比較的容易に化学合成できるようになってきた。短いペプチド鎖を化学選択的に縮合する技術は、タンパク質化学合成において鍵となる反応であり、最近急速に進歩してきた。本稿では、私が東海大学糖鎖科学研究所において行った研究、および今後の展望について概説する。

#### 2. 研究概要

##### 2.1. 新規アミノ基保護基の開発

ペプチドの化学合成には、固相合成法が一般的に用いられている。この方法では、50 アミノ酸残基程度までのペプチドであれば、自動合成機等を用いて簡単に合成することが可能である。一方、それよりも長鎖のペプチド/タンパク質の化学合成は、固相合成によって得られたペプチドを、化学選択的に縮合することによって達成される。そのペプチド同士を縮合する方法の一つとして、チオエステル法がある。

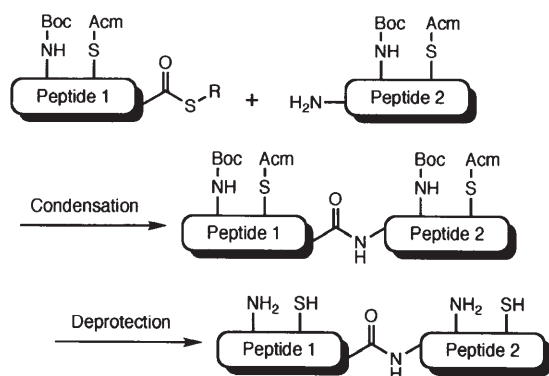


図1 チオエステル法の反応スキーム。

チオエステル法は、ペプチドの C 末端にチオエステル基を配し、後に選択的に活性エステルへと導くことによって、アミノ基と縮合する方法である (図 1)。この方法では、部位選択的な縮合のために、反応に関与しないアミノ基およびメルカプト基を保護しておく必要がある。従来、Lys 残基側鎖のアミノ基と Cys 残基側鎖のメルカプト基には、それぞれ Boc (*tert*-butoxy-carbonyl) 基および Acm (acetamidomethyl) 基が保護基として用いられてきた。しかし、Boc 基は酸に不安定であり、ペプチド固相合成後の樹脂からの切り出しに広く用いられているトリフルオロ酢酸 (TFA) によって除去されてしまうため、縮合反応前に Boc 基を導入し直す必要があり不便であった。そこで、通常の固相合成に用いられる種々の反応条件や酸処理において安定で、かつ後に選択的に脱保護可能な新たな保護基の開発を行うことにした。

私は、azido 基および pyruvoyl 基がその保護基として有用なのではないかと考え、これらが導入された Lys 誘導体をそれぞれ合成し、ペプチド合成へと用いた (図 2)。その結果、これらの保護基は、固相合成やチオエステル法における縮合反応の諸条件下において安定で、かつ縮合反応後に選択的に脱保護することが可能であった。これらの保護基を用いて、甲殻類の色素拡散ホルモン (PDHs) やイモガイの毒素成分である Conturakin-G の合成に成功した。

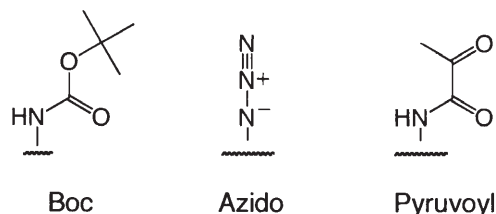


図2 各保護基の構造。

またアジド基が糖タンパク質の化学合成においても有用であるかどうかを検証するために、マウス Pro-opiomelanocortin (1-74) の合成を行った。このタンパク質は、2カ所の糖鎖付加部位を有しており、そのような複雑な糖タンパク質の合成においても、アジド基が保護基として有用であることが明らかになった。

## 2. 2. 生物学的手法と化学的手法を融合させた糖タンパク質の化学合成

糖タンパク質やリン酸化タンパク質といった翻訳後修飾を伴うタンパク質を化学合成する際、その修飾された部分は化学的に合成する必要があるが、それ以外の修飾が無い部分は通常のポリペプチド鎖であることから、遺伝子組み換え技術を用いて大腸菌等に発現させることによって得ることも可能である。特に、ペプチド縮合反応の一つである Native chemical ligation (NCL) 法では、チオエステル法とは異なりペプチド鎖に保護基を必要としないため、組換えタンパク質を利用することも可能である。しかし、この方法には二つの問題点がある。一つは、N末端側ペプチドのC末端には、チオエステル法と同様、チオエステル基を必要とすることであり、通常の組換えタンパク質発現系ではペプチドチオエステルを得ることが困難である。もう一つは、C末端側ペプチドのN末端にCys残基を必要とする点であり、通常の組換えタンパク質発現系では、N末端をCys残基にすることが困難である。

最近になって、C-intein 融合タンパク質からペプチドチオエステルを調製する方法が確立され、前者の問題点が解決された。私は、その方法を利用してオカダゴンシの造雄腺ホルモン (AGH) の化学合成を行った。AGH は、A鎖とB鎖からなる insulin 様ヘテロ二量体ペプチドであり、A鎖に付加した Asn 結合型糖鎖がその生物活性に必須であることが明らかになっている。また、AGH は insulin と同様に B鎖—Cペプチド—A鎖からなる前駆体として合成され、Cペプチドが除去されることによって活性型へと変換される。本合成は、前駆体のN末端側110残基 (B鎖からA鎖途中まで) を大腸菌発現系によって、糖鎖部分を含むC末端側13残基を化学合成によってそれぞれ調製し、NCL法によって縮合後にCペプチドを除去する経路によって行った。

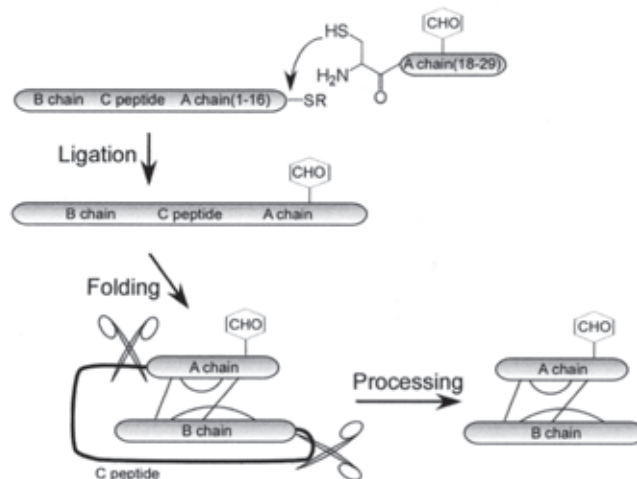


図3 AGHの合成スキーム。

図3に示したスキームに従い、糖鎖を付加した2本鎖AGHの化学合成を達成した。しかし、合成したAGHは、糖鎖の構造に関わらず生物活性を示さなかった。これは、得られた合成AGHのジスルフィド結合架橋様式が天然型とは異なっていたからであることが後に明らかになった。この結果は、AGHの天然型の構造が熱力学的最安定構造ではないことを示唆するものであり、大変興味深いものであった。

## 3. おわりに—今後の展望—

タンパク質の化学合成研究は、もう終わった分野であると思われがちである。しかし、実際には非常に限られたタンパク質しか合成することができないのが現状である。特に、糖タンパク質やリン酸化タンパク質といった翻訳後修飾を含むタンパク質は、組換えタンパク質発現系によって均一な構造を有するものを得ることが困難であることから、今後もこの分野の研究を進展させていくことは重要であると思われる。

ペプチド縮合反応やそれに利用される保護基など、まだまだ改良できる点は残されている。それらを一歩ずつ完成形に近づけることによって、より簡便な、そしてペプチド合成になじみの薄い人にもできる方法論へ昇華できるものと私は考えている。