


論文内容要旨

報告番号	甲 創 第 3 号	氏名	佐藤 浩平
学位論文題目	Studies toward chemical synthesis of protein: application of <i>N</i> -sulfanylethylanilide peptide as crypto-thioester		
<p>【背景】 タンパク質調製法としては、遺伝子工学的手法が汎用される。しかし、非天然構造の導入や糖鎖付加等の翻訳後修飾の厳密な制御という点では改善の余地がある。これら課題を解決する方法として、化学合成法の利用が挙げられる。</p> <p>タンパク質化学合成は、ペプチド固相合成法によるペプチド鎖構築と液相でのペプチド鎖縮合という二段階からなる。ペプチド鎖縮合法として、ペプチドチオエステルと N 末端システイン含有ペプチド間の化学選択的縮合法である native chemical ligation (NCL) 法が汎用される。NCL 法の汎用性を高めるために、1) ペプチドチオエステルの簡便な調製法の開発、2) 複数ペプチド鎖の効率的縮合を可能とする手法の開発、3) 縮合部位にシステイン以外のアミノ酸を利用する手法の開発が求められている。当研究室では、簡便に合成可能なペプチドチオエステル前駆体として <i>N</i>-sulfanylethylanilide (SEAlide) ペプチドを開発してきた。これまでは、SEAlide ペプチドを酸性条件下処理することでチオエステルへと変換していたが、エピメリ化等の副反応が問題となっていた。</p> <p>【結果】 種々条件検討の結果、中性リン酸緩衝液中においてもチオエステルへの変換反応が進行することを明らかにした。本反応はリン酸イオン濃度に大きく依存し、非リン酸緩衝液中ではほとんど進行しなかった。この性質を利用することで、N 末端システイン含有 SEAlide ペプチドを鍵中間体とする one-pot 多成分縮合法を開発した。本縮合法を利用し、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドおよび α-コトキシシン誘導体の合成を達成した。</p> <p>続いて、リソソームタンパク質の一種であるヒト GM2 活性化タンパク質 (GM2AP) の完全化学合成に取り組んだ。GM2AP は 162 残基からなる糖タンパク質である。適切な位置にシステイン残基が存在しないため、まずはグリコシル化部位のアスパラギン残基をシステインに置換した GM2AP 誘導体の合成を行った。SEAlide ペプチドを利用して 5 つのペプチド鎖を縮合した後、フォールディングすることで GM2AP 誘導体の完全化学合成を達成した。</p> <p>確立した合成経路を天然型 GM2AP 合成に適用するためには、アスパラギン部位でのペプチド鎖縮合が必須である。そこで、β-メルカプト-<i>N</i>-グリコシル化アスパラギン誘導体を設計・合成し、脱硫反応と組み合わせることで形式的にグリコシル化アスパラギン部位での縮合を可能とする手法を開発した。本手法を GM2AP 合成に適用し、天然型 GM2AP の完全化学合成を達成した。</p> <p>Native Chemical Ligation (NCL)</p>  <p><i>N</i>-Sulfanylethylanilide (SEAlide) peptide</p> 