

論文内容要旨

| | | | |
|--|--|-----|-------|
| 報告 番号 | 甲 創 第 28 号 | 氏 名 | 津田 雄介 |
| 学位論文題目 | Development of novel methodologies for the preparation of peptide/protein thioesters applicable to naturally occurring sequences (天然アミノ酸配列に適用可能なペプチド・タンパク質チオエステル調製法の開発) | | |
| <p>【背景】タンパク質は様々な生命現象に関与しており、その機能解明研究では蛍光色素や非天然型アミノ酸などの機能性部位を導入したタンパク質が利用される。これらタンパク質の調製法の一つにタンパク質化学合成が挙げられる。タンパク質化学合成では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をそれぞれ固相合成した後、化学選択的な縮合反応である Native Chemical Ligation (NCL) 法を用い、液相にて両フラグメントを縮合する。しかし、長鎖タンパク質の化学合成には複数回の縮合および保護・脱保護を必要とするため、操作が煩雑かつ収率も低いという問題がある。その解決法として発現タンパク質より調製したタンパク質チオエステルと化学合成フラグメントの NCL によるタンパク質半化学合成が挙げられる。しかし、タンパク質チオエステル調製法として用いられている手法はインテインあるいはソルターゼを利用した生化学的手法に限られ、またその汎用性も決して高くない。このため、従来法に代わる新たなタンパク質チオエステル調製法の開発が求められている。そこで著者は、100 残基以上のアミノ酸からなるインテインの機能を模倣した短鎖ペプチドを利用した配列特異的チオエステル化法の構築に着手することとした。</p> <p>【方法・結果】まず著者は配列特異的チオエステル化法の開発にあたり、Bal らにより報告された Ni(II)の添加をトリガーとした配列特異的なペプチド結合加水分解反応に着目した。本反応では Xaa-Ser-Yaa-His-Zaa 配列 (Xaa, Yaa, Zaa: 任意のアミノ酸) を有するペプチドに Ni(II)を添加することで Ni(II)にペプチドが配位し、アミド結合が活性化される。その後、Xaa-Ser 間のペプチド結合が分子内 N-O アシル基転移反応を経てエステル型のイソペプチド中間体へと異性化した後、加水分解される。そこで著者は本反応条件下において適切な求核剤を用いることでイソペプチド中間体をチオエステルあるいはその前駆体へと変換可能だと考えた。そして種々検討の結果、4 回の連続したアシル基転移反応を利用した配列特異的チオエステル化法の開発に成功した。本反応ではまず、Ni(II)に配位する 4 残基のタグ配列を有するペプチドに対して、メタノール存在下にて Ni(II)を添加する。その結果 N-O および O-O アシル基転移反応によりイソペプチド中間体を経て、メチルエステルへと変換される。ここへヒドラジンを添加し、O-N アシル基転移反応によりペプチドヒドラジドへと変換する。最後に Liu らに報告された手法を用い、ペプチドヒドラジドをペプチドアジドへと変換した後、N-S アシル基転移反応を経てチオエステルへと変換するという方法である。</p> | | | |