

固相吸着反応法を活用したペプチド連結法の開発と インターロイキン 21 の半合成研究

Development of Peptide Ligation Methods Using Reversible Adsorption to Solid Support for Semi-synthesis of Interleukin-21

The Scripps Research Institute 藤岡 侑美

研究期間 2025 年 11 月 3 日～2026 年 5 月 2 日

滞在研究機関 Department of Chemistry, The Scripps Research Institute,
10550 N Torrey Pines Rd. Ste. CHWL 138, CA 92037-1000, United States

共同研究者等 Prof. Philip E. Dawson

区分 個人 A

Glycosylation is a prevalent post-translational modification, and homogeneous glycoproteins are essential for detailed functional studies. This study aimed to establish a semi-synthetic route to the bioactive glycoprotein interleukin-21 (IL-21) by combining bacterial expression with chemical ligation. Two independent projects were pursued at the Dawson laboratory. First, a novel ligation method at Ser/Thr residues was investigated as an alternative to cysteine-dependent NCL. N-terminal selective aminoacylation was achieved in a model peptide (60% yield, pH 5.5), but application to the IL-21 sequence was hampered by poor peptide solubility. Second, Reversible Adsorption to Solid Support (RASS) was explored for peptide thioesterification, achieving near-quantitative conversion and enabling one-step synthesis of thiolactone-type cyclic peptides. RASS holds promise for future application to IL-21 semi-synthesis.

海外研究活動概要

タンパク質のグリコシル化は生体内で高頻度にかかる翻訳後修飾であり、多くのタンパク質が糖タンパク質として存在する。糖鎖は炎症・免疫反応の制御、タンパク質の品質管理、細胞接着など重要な生理現象に関与し、糖鎖構造の違いに基づく詳細な機能解析には均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質の精密供給が不可欠である。化学合成を基盤とした糖タンパク質合成が注目される一方で、固相合成で用いる過剰な DMF や縮合剤・アミノ酸は環境負荷が大きく、化学合成のみに頼らない新たな合成戦略の確立が求められている。

本研究では、大腸菌発現法と化学合成法を組み合わせた半合成アプローチにより、生理活性糖タンパク質インターロイキン 21 (IL-21) の効率的合成法の確立を目指して Scripps 研究所の Dawson 研究室に留学した。本合成ルートでは発現ペプチドの N 末端残

基がセリン/スレオニン (Ser/Thr)となるため、一般的にペプチド連結法に用いられるシステイン(Cys)残基を必要としない新規ライゲーション法の開発を主目的として取り組んだ。一方、Dawson 研では固相吸着反応法 (RASS : Reversible Adsorption to Solid Support) を用いたペプチドチオエステル化の研究も独立して進められており、本手法が IL-21 合成における発現ペプチドのライゲーション工程への応用可能性を持つことから、このプロジェクトにも並行して参加した。RASS を用いたチオエステル化の検討を進める過程では、N 末端に Cys を持つペプチドヒドラジドから 1 ステップでチオラクトン型環状ペプチドが合成できるという予期せぬ新知見も得られ、生理活性環状ペプチド合成への新たな展開としても期待される成果となった。

成果

1. Ser/Thr を連結部位とする新規ペプチドライゲーション法の開発

一般的にペプチ連結法に用いられるネイティブケミカルライゲーション(NCL)では Cys 残基のチオール基を起点としたチオエステル交換・S→N アシル転移が反応の鍵であるが、本研究の合成ルートでは Cys 残基を持たない Ser/Thr が N 末端に位置する。そこで、N 末端にアスパラギン酸(Asp)・アスパラギン(Asn)があるペプチド用いた既存のライゲーション反応が活性チオエステルと高めの pH 条件下で行われていることに着目し、側鎖を経由した反応機構に加えてダイレクトアミノリシスも関与しているとの仮説を立てた。チオエステルの種類と pH を最適化することにより、Ser の N 末端アミノ基への選択的アミノ酸導入が可能ではないかと考えた。

Lys の N 末端アミノ基との選択性が課題となるが、Lys アミノ基の pKa は N 末端よりも高いことから、低 pH での反応により N 末端選択性が得られると考えた。PFP エステルおよび 4-ニトロフェニルチオエステルを活性エステルとして用い、10 残基のモデルペプチドを対象に検討を行ったところ、pH 5.5 の条件で HPLC 収率約 60%にて N 末端選択的なアミノ酸導入に成功した。しかし、IL-21 の実際の配列 (36 残基) に展開したところ、ペプチドの溶解性が著しく低く、モデルペプチドの 10 倍以上希釈した条件での反応が必要となったため、反応の進行が著しく低くなることが判明した。この結果から、本ライゲーション法を IL-21 配列に直接適用するためには、ペプチドの溶解性改善または反応条件の大幅な最適化が必要であるという重要な知見が得られた。

2. RASS を活用したペプチド N 末端チオエステル化法の開発と環状ペプチド合成

上記の検討と並行して、Dawson 研が近年確立した RASS 法 (Reversible Adsorption to Solid Support) を活用したペプチドチオエステル化法の開発にも取り組んだ。RASS は C18 シリカなどの固相表面にペプチドを吸着させた状態で化学反応を行う手法である。疎水性の固相にペプチドを吸着させることで溶液中では不安定な疎水性ペプチドを安定に保持でき、また低分子のみを選択的に洗い流すことができるため、中間精製を経ずに逐次反応が可能という利点を持つ。本手法はオリゴヌクレオチド合成への応用が主であったが、ペプチドへの展開は限られており、本研究

はその重要な拡張となる。

具体的には、ヒドラジドからアシルピラゾール環を経てチオエステルを生成する Dawson 研の手法を RASS に展開した。この反応は強力なカオトロピック剤であるグアニジン塩酸塩存在下でピラゾールの生成速度およびピラゾールとチオエステル種の安定性が著しく向上することも確認されており、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行う際に用いられる水/アセトニトリルなどのグアニジン塩酸塩を含まない系では進行しにくいことが派遣先の知見として得られている。

まず、固相条件の検討を行った。過去の研究では C18 シリカが用いられていたが、さらに固相担体を探したところポリスチレン-ジビニルベンゼン系の固相担体が適切な吸着と溶出のバランスを示すことを確認した。

過去の条件にしたがい、4-メルカプトフェニル酢酸 (MPAA) をチオール試薬、アセチルアセトン、溶媒として HPLC バッファーを用いた条件で 5 アミノ酸のモデルのペプチドヒドラジドから HPLC 収率ほぼ 100%でのチオエステル生成に成功した。MPAA が固相と強く相互作用し、溶出されにくい問題が生じたが、実際に使用する疎水性の高い発現ペプチドに応用した際はペプチドが溶出する前に溶出できると考えられる。

さらに、得られたアシルピラゾール中間体が固相上でも安定なことを利用し、NCL 型の分子内反応によるチオラクトン型環状ペプチドの合成へ展開した。*Listeria monocytogenes* 由来のクオラムセンシングペプチド (配列: ACFMFV, CFMFV) を標的として、既存法より大幅に簡便な 1 ステップでの環状ペプチド合成に成功し、今後の関連天然物合成への応用が期待できる。

今後の展望

本研究で確立した RASS を用いたチオエステル化・環状ペプチド合成法は、今後さらなる発展が期待される。本研究の合成ルートでは IL21 の N 末端ペプチドはペプチドヒドラジドとして得られ、その後ペプチド連結に使用される。しかし、凝集されてしまう課題がある。RASS 法を利用することで、ペプチド連結法に用いることにチオエステルをより簡便に合成することが可能だと考える。現在は、アメリカでの滞在を伸ばし、RASS 法を HPLC のシステムを利用することに応用を目指し研究を進めている。