

博士論文

新規視床下部分泌性小タンパク質の合成法の確立

平成 28 年 3 月

広島大学大学院総合科学研究科

総合科学専攻

益田 恵子

目次

略語一覧	1
序論	3
第 1 章 大腸菌を用いた組み換え発現系による調製	15
1. 序文	15
2. 方法	17
2.1. 試薬類	17
2.2. 発現プラスミドの作製	17
2.3. rat NPGL-Gly の調製	18
2.4. rat NPGM-Gly の調製	19
2.5. C 末端のアミド化	19
2.6. 質量分析	20
3. 結果	21
3.1. rat NPGL-Gly の発現	21
3.2. rat NPGM-Gly の発現	21
3.3. C 末端のアミド化	22
4. 考察	26
4.1. rat NPGL-Gly と rat NPGM-Gly の発現	26
4.2. C 末端のアミド化	28
第 2 章 Intein の原理を用いた手法による調製	30
1. 序文	30
2. 方法	34
2.1. 試薬類	34
2.2. C 末端アミド化法による調製	34
2.2.1. His-TF-rNPGM-Intein-CBD の発現と精製	34
2.2.2. C 末端のアミド化と His-TF タグの切断	35

2.3.	Native chemical ligation 法による調製	36
2.3.1.	rat NPGM ¹⁻²⁷ チオエステルの調製	36
2.3.2.	rat NPGM ²⁸⁻⁸⁸ -NH ₂ の合成	37
2.3.3.	Native chemical ligation	38
2.4.	質量分析	38
3.	結果	39
3.1.	C 末端アミド化法による調製	39
3.2.	Native chemical ligation 法による調製	42
4.	考察	46
4.1.	C 末端アミド化法による調製	46
4.2.	Native chemical ligation 法による調製	47
第 3 章	マイクロウェーブを用いた固相法による調製	51
1.	序文	51
2.	方法	54
2.1.	試薬類	54
2.2.	rat NPGL、rat NPGM、chicken NPGL、chicken NPGM の合成	54
2.3.	<i>O</i> -アシルイソペプチドの <i>O</i> -to- <i>N</i> アシル転移	55
2.4.	rNPGM の部分配列の合成	55
2.5.	rNPGM ¹⁻³⁹ 、rNPGM ⁴⁰⁻⁵⁹ 、rNPGM ⁶⁰⁻⁸⁸ の合成	56
2.6.	質量分析	56
3.	結果	57
3.1.	rat NPGL における合成条件の最適化	57
3.1.1.	縮合条件の最適化	57
3.1.2.	脱保護条件の最適化	58
3.2.	rat NPGM、chicken NPGL、chicken NPGM の合成	58
3.3.	rat NPGM の収率向上条件検討	62
3.3.1.	<i>O</i> -アシルイソペプチド法を用いた合成	62
3.3.2.	部分配列のプレ合成	62
3.4.	シュードプロリンジペプチドを用いた収率向上	63
3.5.	rat NPGL と rat NPGM の部分配列の合成効率比較	64

4. 考察	70
4.1. 合成条件	70
4.2. rat NPGM の収率向上条件検討	73
4.3. シュードプロリンジペプチドによる収率向上	74
第4章 ジスルフィド結合の解析及び形成方法の検討	76
1. 序文	76
2. 方法	77
2.1. rat NPGM の架橋位置解析	77
2.1.1. CHO 細胞由来 rat NPGM の解析	77
2.1.2. 大腸菌 SHuffle 株由来 rat NPGM の解析	78
2.2. 架橋形成	78
2.2.1. DMSO 酸化法	78
2.2.2. グルタチオン法	78
2.3. 質量分析	79
3. 結果	80
3.1. rat NPGM の架橋位置解析	80
3.2. rat NPGL の架橋形成	83
3.3. rat NPGM、chicken NPGL、chicken NPGM の架橋形成	84
4. 考察	89
4.1. rat NPGM の架橋位置	89
4.2. 架橋形成	90
結論	92
謝辞	97
引用論文	98
参考論文	110

略語一覽

AA	amino acid
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
CBD	chitin binding domain
CHO	chinese hamster ovary
COMU	(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy) dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
DCM	dichloromethane
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DIPCI	diisopropylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EDT	1,2-ethanedithiol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
GSH	reduced glutathione
GSSG	oxidized glutathione
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxide hexafluorophosphate
HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1H-benzotriazole-3-oxide hexafluorophosphate
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxy-1H-benzotriazole hydrate
HPLC	high-performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

MCS	multiple cloning site
MESNA	sodium 2-mercaptoethanesulfonate
MPAA	4-mercaptophenylacetic acid
NCL	native chemical ligation
NMM	<i>N</i> -methyldmorpholine
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
NPGL	neurosecretory protein GL
NPGM	neurosecretory protein GM
OD	optical density
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	polyethelene glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PyBOP	1H-benzotriazol-1-yloxy-tri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>t</i> Bu	<i>t</i> -butyl
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TF	trigger factor
TFA	trifluoroacetic acid
Trt	trytil

序論

生理活性ペプチドの探索

生体内では様々なペプチドやタンパク質が生命活動を支えている。それらを同定し詳細な生理機能や作用メカニズムを明らかにすることは、生物学的知見をもたらすのみならず、創薬等の医療分野にも発展し得るものである。しかしながら、生体内から極微量の生理活性ペプチドを探し当てることは容易でない。Schallyらはブタの視床下部から様々なペプチドの単離に成功しているが、その際に用いた組織量は数十万頭分に及ぶ（成長ホルモン放出ホルモンは約 20 万頭分 [Schally et al., 1969a]、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンは約 10 万頭分 [Schally et al., 1969b]、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンは約 20 万頭分 [Schally et al., 1971a; Schally et al., 1971b]、成長ホルモン放出抑制ホルモンであるソマトスタチンは約 47 万頭分 [Schally et al., 1976]）。また、強力な摂食促進因子であるニューロペプチド Y が同定された際には、ブタの脳 400 kg 分から抽出するという大掛かりな仕事であった [Tatemoto et al., 1982]。この障害を乗り越えるきっかけとなったのが松尾・寒川らによる抽出法の開発であり、組織を採取後すぐさま煮沸処理することによってプロテアーゼを失活させ、生理活性ペプチドの分解を抑えた結果、ブタの脊髄 20 kg 分からニューロメディン K、ニューロメディン B、ニューロメディン C、ニューロメディン L、ニューロメディン N 等の同定に成功した [Kangawa et al., 1983; Minamino et al., 1983; Minamino et al., 1984a; Minamino et al., 1984b; Minamino et al., 1984c]。さらにその後、ヒトやラットの心房わずか 50 g 分から心房性ナトリウム利尿ペプチドの同定に成功している [Kangawa and Matsuo, 1984; Kangawa et al., 1984]。これ以降、ペプチド探索研究は飛躍的に発展していった。

同じく 20 世紀後半、既知受容体のアミノ酸配列を基にした相同性検索によって膨大な受容体が発見された。それらはリガンドが不明であることから、オーファン（孤児）受容体と呼ばれる。オーファン受容体のリガンド探索は精力的に行われており、これまでに様々な生理活性ペプチドが同定されてきた。その例として、摂食行動や睡眠障害のナルコレプシーに関与することで有名になったオレキシン [Sakurai et al., 1998]、成長ホルモン分泌促進因子受容体のリガンドとして発見されたグレリン [Kojima et al., 1999] 等がある。リガンドが同定された受容体はさらに研究が進み、オレキシン受容体は睡眠障害、グレリン受容体は代謝異常の治療のターゲットとなっている [Chung et al., 2008]。

より最近の事例としては、GPR37 及び GPR37L1 はプロサポシン及びプロサポシン由来ペプチドであるプロサプチドの受容体であり、GPR171 は BigLEN の受容体であることが明らかになっているが [Gomes et al., 2013; Meyer et al., 2013]、未だ多くのオーファン受容体がりガンド不明のままであり [Civelli et al., 2013]、発見が待たれる生理活性ペプチドが存在する可能性は極めて高い。世界中の研究者が新規生理活性ペプチドの同定を目指し、抽出の対象とする動物種や組織、抽出液の分画精製において指標とする活性評価法について、幾通りもの組み合わせを検討している。しかしながら、新規ペプチド発見の報告はニューロメディン S [Mori et al., 2005] の同定以降著しく減少しており、ペプチド探索研究には新しいアプローチが求められているのかもしれない。

新規遺伝子の発見

Neurosecretory protein GL (NPGL) 及び *Neurosecretory protein GM (NPGM)* は、ニワトリの視床下部漏斗部より、サブトラクション法を用いた遺伝子探索からのアプローチにより発見された新規遺伝子である [Ukena et al., 2014]。サブトラクション法とは遺伝子の引き算であり、ある領域で特異的に発現する遺伝子を同定する手法である。標的領域の cDNA にアダプターを付加したものと、対照領域の cDNA をハイブリダイズさせ、二重鎖を形成しなかったアダプター付き cDNA を回収すれば、標的領域で特異的に発現する遺伝子を同定できるという仕組みである [Gurskaya et al., 1996; Diatchenko et al., 1996]。ニワトリには大きく分けて卵用鶏と肉用鶏があるが、肉用鶏は食欲旺盛で急速に成長し、孵化 1 週間後には体重が卵用鶏の約 2 倍になる。その肉用鶏の摂食調節中枢である視床下部漏斗部を標的領域とし、小脳を対照領域としてサブトラクション法によるスクリーニングが行われた。そして、596 クローンの DNA シークエンス結果から、既知遺伝子を除く 20 遺伝子について特異的なプライマーが作製され、大脳、間脳、中脳、小脳、視床下部漏斗部での mRNA 発現量の解析が行われた。その二次スクリーニングの結果、3 つの遺伝子が視床下部漏斗部に特異的に発現していた。その 3 つの遺伝子において、*in situ* ハイブリダイゼーション法による形態解析が行われ、2 つはグリア細胞に発現していることが分かり、最後に残った 1 つが神経細胞に発現している *NPGL* であった [Ukena et al., 2014]。*NPGL* は、データベース上に機能不明のタンパク質をコードした遺伝子として登録されており、翻訳産物の前駆体タンパク質には、生理活性ペプチドに特徴的な C 末端アミド化ドナーである Gly 残基と、プロセッシングサイトである塩基性アミノ酸対を含んでいた。さらに、データベース解析により、別の染色体上に

パラログ遺伝子である *NPGM* が存在することが明らかとなった [Ukena et al., 2014]。

***NPGL* 及び *NPGM* の進化的保存性**

NPGL 及び *NPGM* の進化的保存性について、バイオインフォマティクス解析が行われている (谷内ら、未発表)。TBLASTN を用いた相同性検索やシンテニー (遺伝子の並びの保存性) 解析により、*NPGL* と *NPGM* が脊椎動物に広く保存されていることや、*NPGL* の近隣には *ADAM23* が、*NPGM* の近隣には *ADAM22* が存在することが明らかになっている (図 1A,B)。ADAM22 と ADAM23 は AMPA 型グルタミン酸受容体の制御タンパク質である LGI1 の受容体であり、ADAM22 はシナプス後細胞に、ADAM23 はシナプス前細胞に存在している [Sagane et al., 2008; Kegel et al., 2014]。ADAM22 と ADAM23 もパラログ関係にあり、それらの近傍に存在する *NPGL* と *NPGM* がパラログ関係にあることと一致している。

哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類においては *NPGL* 及び *NPGM* の両方が存在する (図 1A,B,D)。一方で魚類においては、ゾウギンザメ等の軟骨魚類では *NPGL* 及び *NPGM* の両方が存在するが、硬骨魚類のうちの真骨類ではどちらか片方のみしか持たないものが多く、メダカやフグ等は *NPGL* のみ、ゼブラフィッシュは *NPGM* のみを持っている (図 1A,B,D)。さらに、ヤツメウナギ等の円口類にも 2 つのホモログ遺伝子が存在するが、そのうちの 1 つは近隣遺伝子の並びがヒトの *NPGL* と *NPGM* の両方と類似しており、*NPGL* と *NPGM* の共通祖先である可能性が示唆されている (図 1C,D)。このように、*NPGL* 及び *NPGM* は脊椎動物に広く存在しており、その起源は少なくとも円口類まで遡る。これらのことから、*NPGL* 及び *NPGM* は重要な生理機能を担っていることが示唆されている。

***NPGL* 及び *NPGM* の mRNA 発現**

NPGL 及び *NPGM* の mRNA の発現について、リアルタイム PCR 法による解析が行われている (浮穴ら、未発表)。ニワトリにおいて、肉用鶏と卵用鶏のいずれにおいても、成長に伴って *NPGL* の発現は増加するが、*NPGM* の発現は反対に減少する。1 日齢のヒナにおいて、肉用鶏より卵用鶏のほうが *NPGL* の発現が約 4 倍高く、*NPGM* の発現が約 6 倍高いが、15 日齢では差が見られなくなる。48 時間の絶食条件下では、*NPGL* の発現には肉用鶏と卵用鶏のいずれにおいても変動は見られないが、*NPGM* の発現は肉用鶏に

において約 3 倍に増加し、卵用鶏において約 6 倍に増加する。

ラットやマウスにおいても *NPGL* は、ニワトリの視床下部漏斗部に相当する視床下部基底部に特異的に発現している。一方で *NPGM* は、ラットにおいては脳でも発現が見られ、マウスにおいては間脳でも発現が見られる。また、ラットにおいてのみ精巣でも *NPGL* 及び *NPGM* の発現が見られるが、それらがタンパク質に翻訳されて生理機能を担っているかは不明である。さらに、ラットにおいて様々なエネルギー代謝状態下における mRNA 発現変動についても解析が行われている。48 時間絶食条件下では、*NPGL* の発現は約 2 倍に、*NPGM* の発現は約 1.4 倍に増加する。レプチン受容体遺伝子に変異があり、肥満を呈す Zucker 糖尿病肥満ラットにおいては、野生型に比べて *NPGL* 及び *NPGM* の発現が約 30% 減少する。また、野生型ラットにインスリンを皮下投与すると *NPGL* 及び *NPGM* の発現が約 20~30% 減少するが、ストレプトゾシンを用いて膵臓ランゲルハンス島 β 細胞を破壊した 1 型糖尿病モデルラットにインスリンを皮下投与すると、*NPGL* 及び *NPGM* の発現が約 2 倍に増加する。絶食やレプチンシグナル異常、インスリン投与によって *NPGL* 及び *NPGM* の発現が変動することから、エネルギーホメオスタシスに関与することが示唆されている。

NPGL 及び NPGM の成熟構造

多くのペプチドホルモンは前駆体タンパク質から数段階の酵素反応を経て成熟体となる [Hook et al., 1994]。まずシグナルペプチダーゼにより N 末端のシグナルペプチドが切断され、次にプロホルモン転換酵素により塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys) で切られ、カルボキシペプチダーゼ H (E) やアミノペプチダーゼにより余分なアミノ酸が切られ、さらにその過程で、糖鎖付加やアセチル化、リン酸化、スルホン化、C 末端のアミド化等の活性や安定性に重要な翻訳後修飾が生じ、成熟ペプチドになる (図 2A) [Hook et al., 1994; Kim and Seong, 2001]。カルシトニンのように 1 つの前駆体タンパク質から 1 つの成熟ペプチドが生じるものもあれば、エンケファリンのように複数の成熟ペプチドが生じるものもあり、インスリンのように 2 量体を形成するものもある (図 2B) [Hook et al., 1994]。

ニワトリ、ヒト、ラットの *NPGL* 及び *NPGM* の翻訳産物のアミノ酸配列のアライメントを図 3A に示す。上述の通り、分泌を指示するシグナルペプチド配列、活性に重要な C 末端アミド化のドナーとなる Gly 残基、プロセッシングサイトである塩基性アミノ酸対 (Arg-Arg または Lys-Arg) を有していることから、分泌性ペプチドの前駆体タン

パク質であることが示唆される。また、2つの Cys 残基が高度に保存されており、活性や立体構造形成に重要なジスルフィド結合を形成することが示唆される。哺乳類の NPGM では、さらに3つ目の Cys 残基を有しており、ジスルフィド結合の形成パターンが3通り考えられる。これらのことから、保存された Cys 残基を含む領域、即ち、シグナルペプチド直下からアミド化ドナーである Gly 残基直前までの約 80 アミノ酸残基からなる小タンパク質が成熟 NPGL 及び NPGM として切り出されることが示唆される (図 3B)。NPGL 及び NPGM という名は、その推定成熟構造の C 末端配列が Gly-Leu-NH₂ あるいは Gly-Met-NH₂ と高度に保存されていることに由来している [Ukena et al., 2014]。しかしながら、内因性の NPGL 及び NPGM は同定されておらず、それらの詳細な生理機能や作用機序等は明らかになっていない。

NPGL 及び NPGM の化学合成

NPGL 及び NPGM の生理機能を解明するためには、行動薬理学的および形態学的解析等に用いるための大量のペプチドが必要であり、それらを合成しなければならない。様々なペプチドを簡便且つ迅速に合成することができる手法として、固相法 [Merrifield, 1963] がよく知られている。固相法とは、レジン（樹脂）を足場としてアミノ酸を C 末端側から 1 残基ずつ伸長させていく手法である (図 4)。レジン（樹脂）はペプチドよりもはるかに大きなビーズであり、それにペプチドを連結させておくことで、各反応後にレジンが通らない大きさのフィルターでろ過するだけで容易に反応液を除去することができる。用いるアミノ酸のアミノ基や側鎖は、副反応を防ぐために保護基により保護されている。アミノ基が 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) 基で保護されたアミノ酸を Fmoc アミノ酸といい、それを用いる固相法を Fmoc 固相法という [Fields and Noble, 1990]。1 アミノ酸の伸長は、約 1 時間のアミノ酸の縮合反応と、約 15 分間の Fmoc 基の脱保護反応からなり、これを目的ペプチドのアミノ酸の数だけ繰り返し、最後に TFA によってレジンと側鎖の保護基を切り離すと（クリーベージ）、目的ペプチドが得られる (図 4)。今日では試薬の分配や攪拌を自動で行ってくれる合成装置も普及している。しかしながら、固相法は短鎖ペプチドの合成には有効であるが、長鎖ペプチドになればなるほど反応数が増えるため、合成難易度も高くなっていく。例えば、1 アミノ酸残基の伸長成功率が 99% であったとしても、88 残基になるとその収率は単純計算で $0.99^{88} \approx 40\%$ である。その 1 残基の成功率が 95% に下がれば、収率は $0.95^{88} \approx 1\%$ にまで低下する。また、長鎖ペプチドになるほど二次構造を形成しやすくなり、反応点が隠れてしまい、合成効率が低下する。

ペプチドの疎水性が高いほど凝集傾向も高く、より合成困難である。これらのことから、一般的に 50 残基以上のペプチドの合成は極めて困難である。

NPGL 及び NPGM は 80 アミノ酸残基以上の長鎖ペプチドであり、疎水性も高い。先行研究において固相法による合成が試みられているが、やはり失敗に終わっている。そこで、長鎖ペプチドの合成効率向上が期待できるシュードプロリンジペプチドを用いた合成が試みられた。シュードプロリンジペプチドとは、OH 基を側鎖に持つ Ser または Thr 残基を Pro 残基様に可逆的に保護したジペプチドであり、伸長中ペプチドの二次構造の形成を抑制し、凝集を防ぐ (図 5A) [Wöhr et al., 1996]。また、2 残基同時に導入することができるため、収率向上に加えて合成時間を短縮できるという利点もある。Pro 様骨格は非ネイティブな構造であるが、クリーベイジ時の TFA 処理によって元のネイティブ構造に戻る。このシュードプロリンジペプチドを用いて NPGL 及び NPGM の合成が試みられたが、収率は 1% に満たなかった (図 5B,C)。

本研究の目的

上述の通り、NPGL 及び NPGM は脊椎動物において重要な生理機能を担うことが示唆されるが、内因性の NPGL 及び NPGM は同定されておらず、その詳細な生理機能は明らかになっていない。それらを明らかにするためには行動薬理学的および形態学的解析等に用いるための大量のペプチドが必要であり、NPGL 及び NPGM を再現性良く安定的に調製できる系を構築しなければならない。しかしながら、NPGL 及び NPGM の合成は一般的な手法では極めて困難である。そこで本研究では、分子生物学的手法から有機化学的手法まで様々な手法を用いて、rat NPGL (rNPGL)、rat NPGM (rNPGM)、chicken NPGL (cNPGL)、chicken NPGM (cNPGM) の合成法を確立することを目的とした。第 1 章では大腸菌を用いた組み換え発現系による rNPGL と rNPGM の調製について、第 2 章では Intein のタンパク質スプライシング反応の原理を用いた手法による rNPGM の調製について、第 3 章ではマイクロウェーブを用いた固相法による rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の調製について述べる。第 4 章では、rNPGM のジスルフィド結合の位置解析と、合成した NPGL 及び NPGM の架橋形成について述べる。

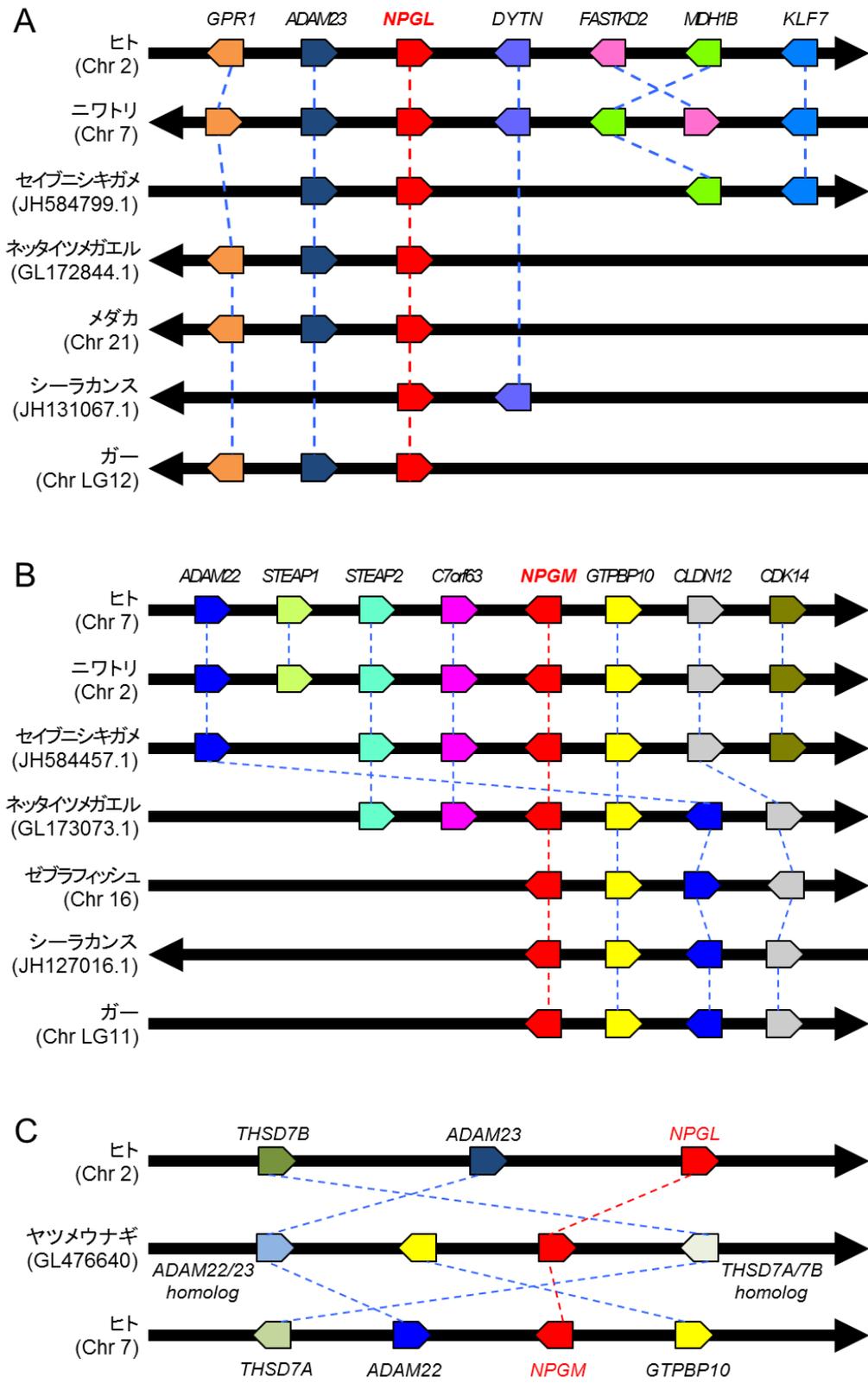


図 1. 次頁へ続く

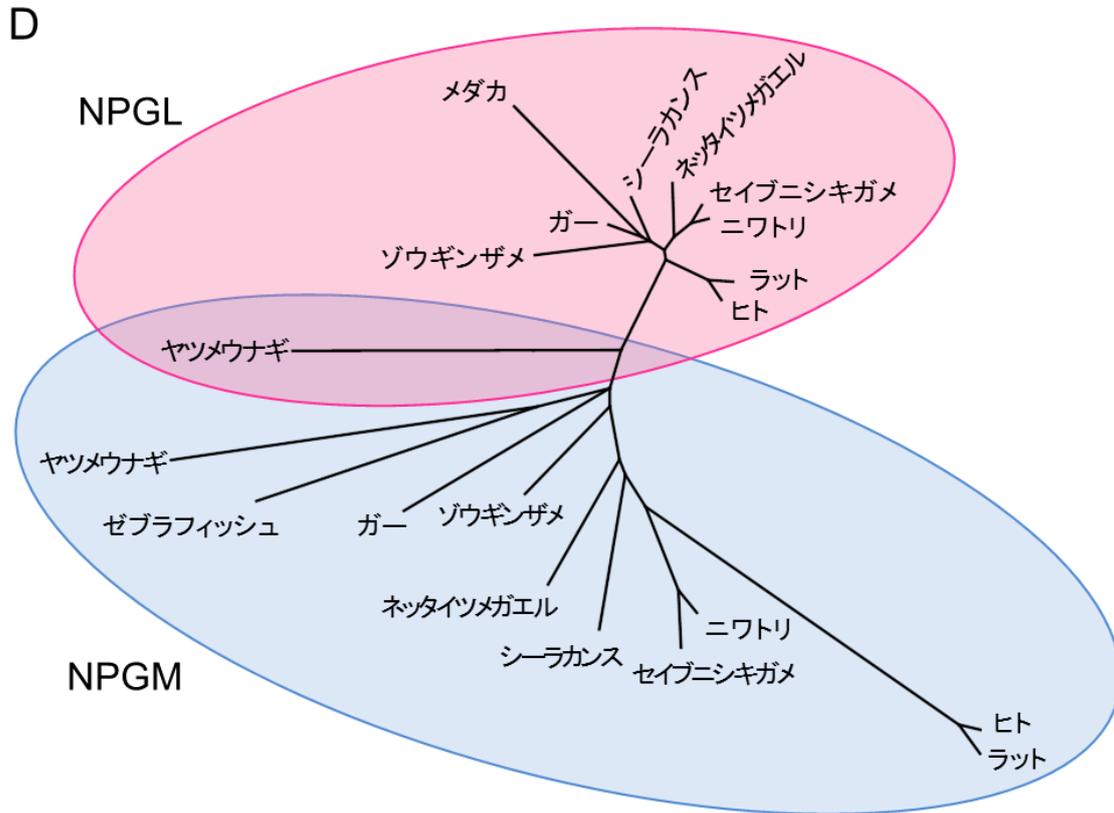


図1. NPGL 及び NPGM のバイオインフォマティクス解析

(A) NPGL と近隣遺伝子のシテニー解析。(B) NPGM と近隣遺伝子のシテニー解析。NPGL と NPGM の近傍に、パラログ遺伝子である ADAM23 と ADAM22 が存在する。(C) ヒトの NPGL 及び NPGM とヤツメウナギの NPGL/NPGM ホモログ。ヤツメウナギの NPGL/NPGM ホモログは、NPGL と NPGM の共通祖先である可能性が示唆される。(D) NPGL 及び NPGM のアミノ酸配列の分子系統樹 (近隣結合法、JTT モデル)。NPGL 及び NPGM は脊椎動物に広く保存されている。メダカは NPGL のみ、ゼブラフィッシュは NPGM のみ存在する。NPGL と NPGM の重なる部分は、ヤツメウナギに存在する NPGL と NPGM の共通祖先と考えられるホモログ。

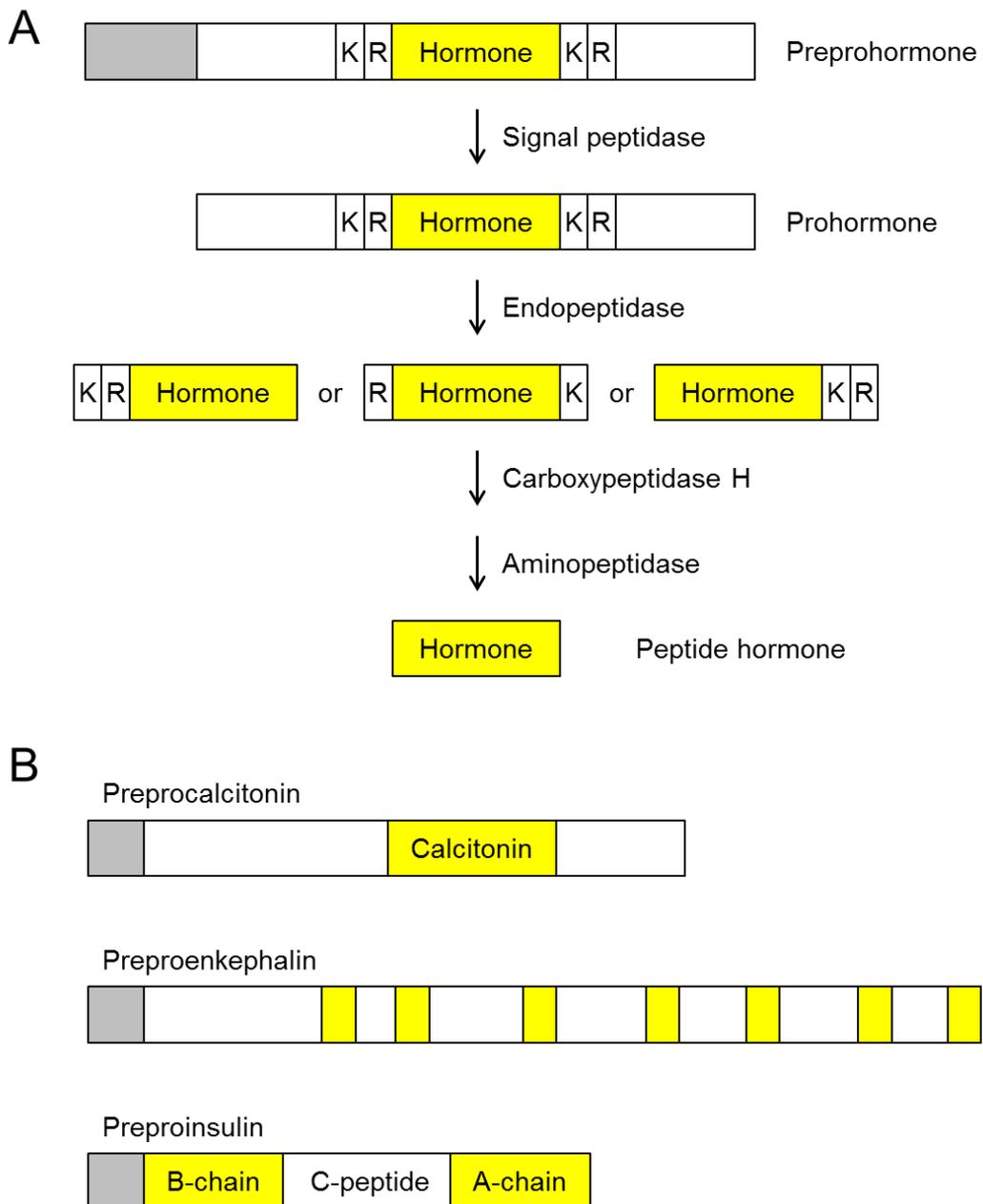


図2. ペプチドホルモンのプロセッシング [Hook et al., 1994]

(A) プロセッシング過程。シグナルペプチダーゼにより N 末端のシグナルペプチド（灰色部分）が切断され、プロホルモン転換酵素により塩基性アミノ酸対 (K-R, R-R, K-K, R-K) で切られ、カルボキシペプチダーゼ H やアミノペプチダーゼにより余分なアミノ酸が切られ、成熟ペプチドになる。(B) 様々なペプチドの前駆体構造。上から、カルシトニン、エンケファリン、インスリンの前駆体。全て N 末端にシグナルペプチドがある。1 つの前駆体から生じる成熟ペプチドの数は様々である。インスリンは、A 鎖と B 鎖がジスルフィド結合によって 2 量体を形成した後 C ペプチドが切断されて成熟体となる。

A

Chick NPGL	M-DFGNRGRIHYNMRLTYSLLVMGVFCVTPSLCHSQIDPLALGRADPQCWESSSAVLIEMR
Human NPGL	MADPGNRGGIHRPLSFTCSLLIVGMCCVSPFFCHSQTDLLALSQADPQCWESSSVLLEMW
Rat NPGL	MTDPGTRSRNHCPLSLTCLLLIVGMYVSPVFCCHSQTDLLTLNQADPQCWESSSMLLLEMR
Chick NPGM	M-EFMWKRWRWYLQLGCVLIINLVYANLDYLKEAPASL--G---QIDHQCEVSSHGLVEMK
Human NPGM	M-CFATRRWFYHLGCMMLINLVNADFEFQKGVLASISPGITKIDIDLQCWKACSLTLIDLK
Rat NPGM	M-GSAVRRWLYLPLGCI MLFNLTADLEFQKGVLAGISPGITADIDLQCWNTCSLTLIDLK
Chick NPGL	KPRI SDSVSGFWD FMI FLKSS ENLKHGALFWD LAQLFWD IYVD CVLSRTHGLGKRQLAKAQ
Human NPGL	KPRVSN TVSGFWD FMI YLKSS ENLKHGALFWD LAQLFWD IYVD CVLSRNHGLGRRQLVGEE
Rat NPGL	KPRVSN TVSGFWD FMI YLKSS ENLKHGALFWD LAQLFWD IYVD CVLSRNHGLGRRELAGEE
Chick NPGM	KLKVADPVIALWDFMLFLKESPKPKHNELFNDLAQNFWD MYVD CVLSRSHGMGRRQLVSPR
Human NPGM	ELKIEHNVD AFWNFMLFLQKSQRPGHYNVFLNIAQDFWDMYVD CLLSRSHGMGRRQVMPPK
Rat NPGM	EIKIEHNVD AFWNFMLFLQKSQRPGHYSVFLNIAQDFWDMYID CLLSRSHGMGRRQVLSSK
Chick NPGL	QRITTLPSQFTGRNQGMFTHIQRSVLTTRKDFEFEDIKNHKHKSRSSTLLGRI TGE LGKKRK
Human NPGL	EKISAAQPQHTRSKQGTYSQLLRTSFLKKKELIEDLISMHVRRSGSSVI GKNLEIKRK
Rat NPGL	QRVSKVLPRLHGIKQGAYSQLLRSIYLKKKELIGDLTSMQLQKWGPFTGKEKLQIKRNRS
Chick NPGM	YSSTYSHRTLQGS AFTNPF
Human NPGM	YNFPQKITGGNLNVYLRE
Rat NPGM	YNFPQKMAGRDLKVYL RK

B

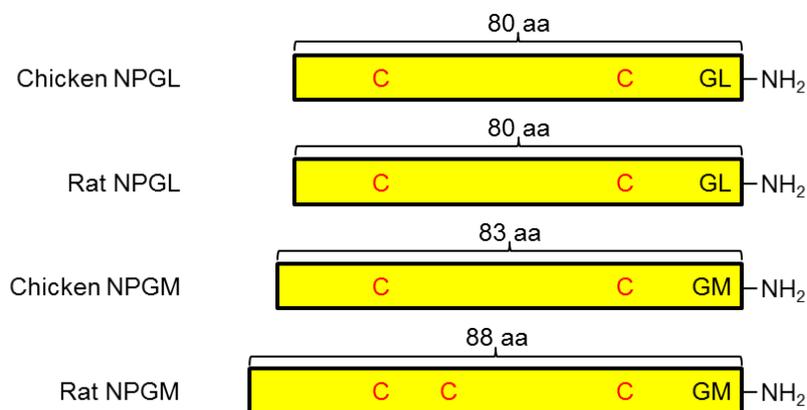


図3. NPGL 及び NPGM のアミノ酸配列と推定成熟構造

(A) ニワトリ、ヒト、ラットの NPGL 及び NPGM の前駆体タンパク質のアミノ酸配列。分泌を指示するシグナルペプチド (青)、アミド化ドナーである Gly 残基とプロセッシングサイトである塩基性アミノ酸対 (緑)、ジスルフィド結合に関与すると考えられる Cys 残基 (赤) を有することから、黄色で示す領域が成熟 NPGL 及び NPGM として切り出されることが示唆される。(B) ニワトリとラットの成熟 NPGL 及び NPGM の推定構造の模式図。哺乳類の NPGM のみ Cys 残基を 3 つ有することから、3 通りのジスルフィド結合の形成パターンが考えられる。

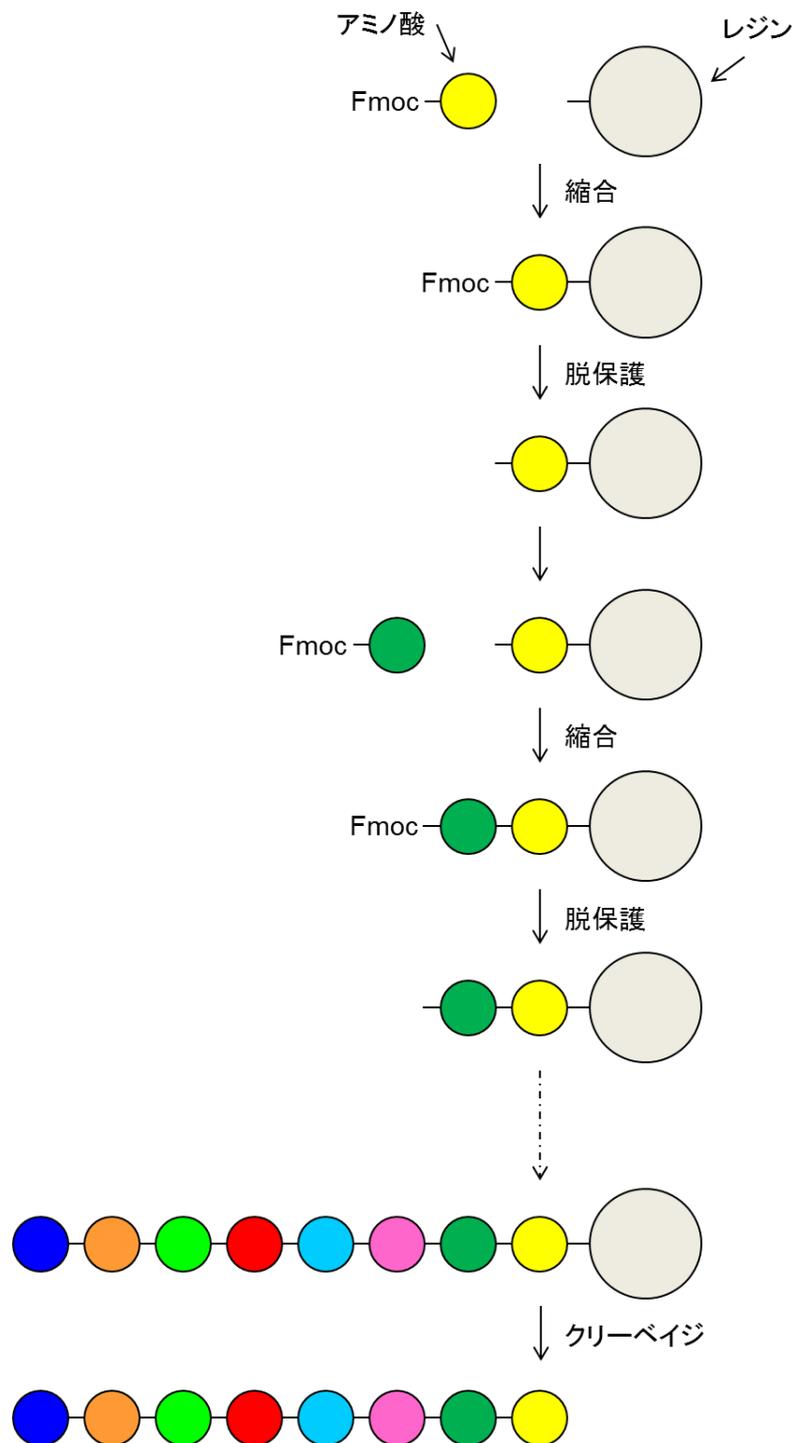


図 4. Fmoc 固相法の模式図

レジンを出場としてアミノ酸を C 末端側から 1 残基ずつ伸長させるペプチド合成法。Fmoc アミノ酸の縮合と Fmoc 基の脱保護を繰り返し、最後にレジンから切り出す (クリーベージ)。

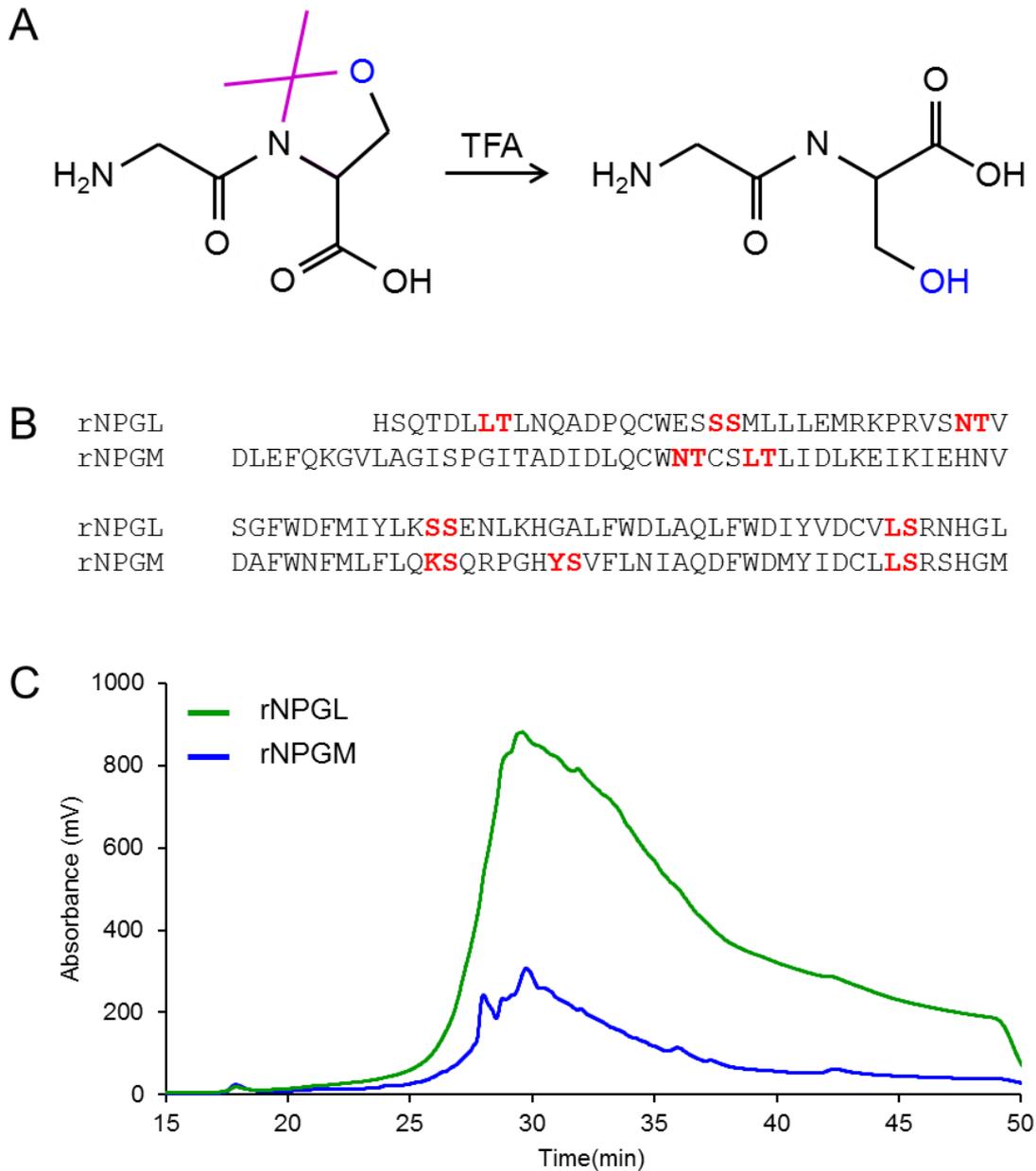


図 5. シュードプロリンジペプチドを用いた固相法による rNPGL 及び rNPGM の合成

(A) シュードプロリンジペプチド。Ser または Thr 残基の OH 基 (青) を Pro 残基様に可逆的に保護 (紫) したジペプチドであり、伸長中ペプチドの二次構造形成を抑制する。TFA によって元の Ser・Thr 残基に戻る。(B) rNPGL 及び rNPGM のアミノ酸配列。シュードプロリンジペプチドの挿入位置を赤字で示す。(C) シュードプロリンジペプチドを用いて固相法により合成した rNPGL 及び rNPGM の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 35–65% ACN over 30 min; 1.0 ml/min; 220 nm)。シュードプロリンジペプチドを用いても収率は 1% に満たなかった。

第 1 章 大腸菌を用いた組み換え発現系による調製

1. 序文

組み換え発現系は、宿主の転写・翻訳システムを利用するため長鎖ペプチドの調製が容易である。多くのバイオ医薬品は組み換え発現系によって調製されており、インスリンやアルブミン、成長ホルモン、インターフェロン等がその例としてあげられる [Demain and Vaishnav, 2009]。宿主としては、大腸菌や酵母、哺乳類培養細胞や昆虫細胞等を選択できるが、中でも大腸菌は最も古くから様々なタンパク質の調製に広く用いられている [Terpe 2006; Fernández and Vega, 2013]。酵母や哺乳類培養細胞、昆虫細胞を用いる場合は発現に週単位の時間を要するのに対して、大腸菌を用いれば日単位で迅速に組み換えタンパク質を得ることができ、コストも低いという利点がある [Brondyk, 2009]。しかしながら、組み換えタンパク質の発現量や可溶性は、そのタンパク質の特性や、用いる宿主大腸菌及び発現ベクターに大きく左右されるため、より効率的な発現条件及び精製条件を検討する必要がある。また、大腸菌は C 末端アミド化の機構を持たないため、組み換え発現後に修飾を施さなければならない。

本章では、rNPGL 及び rNPGM の C 末端にアミド化ドナーとなる Gly 残基を付加したものを発現させた後、アミド化酵素を用いて C 末端のアミド化を試みた。宿主大腸菌には、最も一般的なプロテアーゼ欠損株である BL21 (DE3) 株、RNaseE 変異株である BL21 Star (DE3) pLysS 株、ジスルフィド結合形成を促す SHuffle 株や SHuffle lysY 株 (pLysS や lysY を持つ株は、非誘導時の発現を抑える) を用いた。発現ベクターには、発現効率の高い T7 プロモーターをコードする pETIK ベクター (図 6A) と、低温ショックにより発現を誘導する *cspA* プロモーターと、精製を簡便にするための His タグ、バクテリア由来のシャペロンであり組み換えタンパク質のフォールディングを促す Trigger Factor (TF) をコードする pCold TF DNA ベクター (図 6B) を用いた。まず、pETIK ベクターを用いて rNPGL-Gly の発現を試みたところ、不溶性の封入体を形成したため、封入体からの精製を試みた。次に、rNPGM-Gly においては、pCold TF DNA ベクターを用いて可溶化発現を試みた。最後に、アミド化酵素による C 末端のアミド化を試みた。

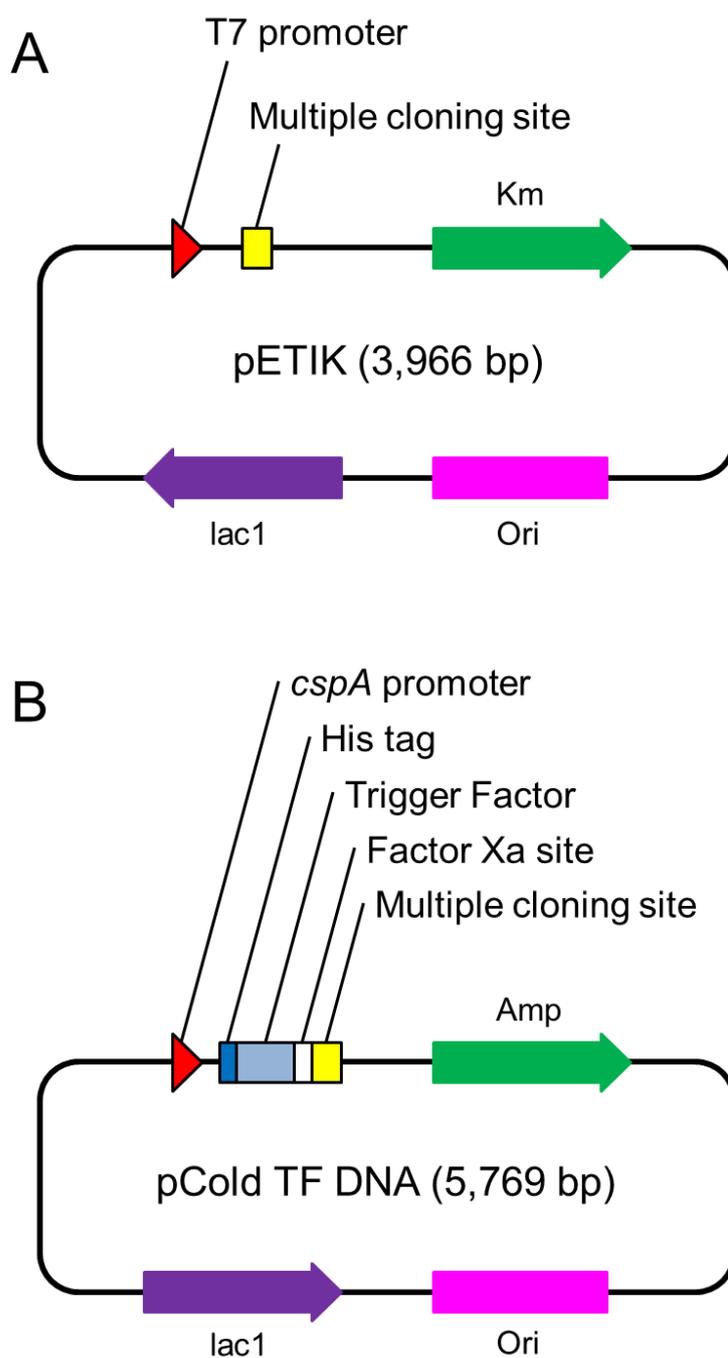


図 6. rNPGL-Gly 及び rNPGM-Gly の発現に用いた発現ベクター

(A) rNPGL-Gly の発現に用いた pETIK ベクター。発現効率の高い T7 プロモーターをコードしている。(B) rNPGM-Gly の発現に用いた pCold TF DNA ベクター。低温ショックにより発現を誘導する *cspA* プロモーター、精製を簡便にするための His タグ、バクテリア由来シャペロンである Trigger Factor をコードしている。

2. 方法

2.1. 試薬類

pGEM-T easy vector は Promega (WI, USA) より、pETIK はバイオダイナミクス(東京、日本) より、pCold TF DNA vector はタカラバイオ(滋賀、日本) より購入した。大腸菌 DH5 α 株はニッポンジーン(東京、日本) より、BL21 株は GE Healthcare (Little Chalfont, UK) より、BL21 (DE3) 株はバイオダイナミクスより、BL21 Star (DE3) pLysS 株は Thermo Fisher Scientific (MA, USA) より、SHuffle 株と SHuffle T7 lysY 株は New England Biolabs (MA, USA) より購入した。

2.2. 発現プラスミドの作製

7 週齢オスの Wistar ラットの視床下部基底部より、TRIzol reagent (Life Technologies, CA, USA) と Oligotex-(dT) 30 (タカラバイオ) を用いて mRNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡、大阪、日本) を用いて cDNA に逆転写した。cDNA を鋳型に、*Nde* I サイトを含むフォワードプライマーと、*Eco*R I サイト、終止コドン、アミド化ドナーとなる Gly 残基を含むリバースプライマーを用いて、rNPGL 及び rNPGM を増幅した(表 1)。PCR は、*Ex Taq* (タカラバイオ) を用いて、初期変性 95°C-20 秒、変性 95°C-20 秒、アニーリング 55°C-20 秒、伸長 72°C-20 秒、40 サイクルで行った。さらに、rNPGM は 72°C-10 分により末端にアデニンを付加した。

rNPGL-Gly と pETIK を *Nde* I 及び *Eco*R I で消化し、Ligation high (東洋紡) を用いて繋いだ(以後、pETIK \times rNPGL-Gly と表記する)。大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、30 μ g/ml のカナマイシンを含む LB 培地で 37°C で一晚培養し、Plasmid DNA purification kit (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いてプラスミドを精製した。rNPGM-Gly は、pGEM-T easy vector に Ligation high を用いて繋いだ。大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地で 37°C で一晚培養し、NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) を用いてプラスミドを精製した。それを *Nde* I 及び *Eco*R I で処理して rNPGM-Gly を切り出し、pCold TF DNA vector に繋ぎ、上述と同様にプラスミドを精製した(以後、pCold TF DNA \times rNPGM-Gly と表記する)。シーケンスの確認は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits と ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて行った。

表 1. rNPGL と rNPGM の増幅に用いたプライマー配列

配列	
rNPGL Forward	5'- GGCAATTCCATATGCACAGTCAGACAGACCTGCT -3'
rNPGL Reverse	5'- CGGAATTCTATCCTAAGCCATGGTTCCTAG -3'
rNPGM Forward	5'- GCCGCATATGGACTTGGAATTCAGAAAGG -3'
rNPGM Reverse	5'- CGGAATTCTAGCCCATCCCATGAGACCTTGAAA -3'

2.3. rat NPGL-Gly の調製

pETIK×rNPGL-Gly を用いて、大腸菌 BL21 (DE3) 株、BL21 Star (DE3) pLysS 株、SHuffle T7 lysY 株をそれぞれ形質転換した。BL21 (DE3) 株は、15 µg/ml のカナマイシンを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別し、コロニーを 8 ml LB 培地 (30 µg/ml カナマイシン) に植え継ぎ、37°C で培養した。BL21 Star (DE3) pLysS 株は、15 µg/ml のカナマイシンと 34 µg/ml のクロラムフェニコールを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別し、コロニーを 5 ml の LB 培地 (30 µg/ml カナマイシン、34 µg/ml クロラムフェニコール) に植え継ぎ、37°C で培養した。SHuffle T7 lysY 株は、30 µg/ml のカナマイシンを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別し、コロニーを 10 ml の LB 培地 (30 µg/ml カナマイシン) に植え継ぎ、37°C で培養した。それぞれ、OD₆₀₀ = 0.4 のとき、IPTG を終濃度 0.1 mM になるよう添加し、37°C で 3 時間発現を誘導した。遠心分離 (5,000×g、10 min、4°C) により菌体を回収し、-80°C で凍結保存した。タンパク質の発現は、SDS-PAGE と 2D-SILVER STAIN II (コスモバイオ、東京、日本) を用いた銀染色により確認した。

BL21 (DE3) 株の菌ペレット 1 g に対して 5 ml の BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, WI, USA) を添加して溶菌し、遠心分離 (15,000 rpm、20 min、4°C) 後、沈殿を回収した。沈殿を洗浄バッファー (1% Triton X-100、0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) で懸濁し、遠心分離 (15,000 rpm、20 min、4°C) 後、沈殿を回収した。これを 4 回繰り返した。沈殿を D₂O で懸濁し、遠心分離 (15,000 rpm、20 min、4°C) 後、沈殿を回収した。これを 2 回繰り返した。沈殿を可溶化バッファー (6 M グアニジン塩酸塩、0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) で溶解し、遠心分離 (10,000 rpm、20 min、4°C) 後、上清を回収した。逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、カラム : C8 (TSKgel Octyl-80Ts、4.6×250 mm ; 東ソー、東京、日本)、流速 : 0.5 ml/min、溶出 : A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 42–62%、40 分間)、検出 : 220 nm の条件で精製した。

2.4. rat NPGM-Gly の調製

pCold TF DNA×rNPGM-Gly を用いて、大腸菌 BL21 株と SHuffle 株をそれぞれ形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別した。コロニーを LB 培地 (50 µg/ml アンピシリン) で 37°C で一晚培養後、新しい LB 培地 (50 µg/ml アンピシリン) 200 ml に植え継ぎ、37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.5 のとき、培養液を 30 分間氷冷後、IPTG を終濃度 0.1 mM になるよう添加し、15°C で 24 時間発現を誘導した。遠心分離 (5,000×g、10 min、4°C) により菌体を回収し、-80°C で凍結保存した。タンパク質の発現は SDS-PAGE 及び銀染色により確認した。

SHuffle 株の菌ペレット 1 g に対して 5 ml の BugBuster Reagent を添加して溶菌し、遠心分離 (15,000 rpm、20 min、4°C) 後、上清を回収した。カラムに Ni-NTA agarose (Qiagen, Venlo, Netherlands) を入れ、平衡化バッファー (50 mM NaH₂PO₄、0.3 M NaCl、pH 8.0) で平衡化後、カラムの出口を閉めて抽出上清を添加し、4°C で 1 時間インキュベートを行った後、溶出バッファー (50 mM NaH₂PO₄、0.3 M NaCl、0.1 M イミダゾール、pH 8.0) で溶出した。溶出液を His-TF タグ切断反応用バッファー (20 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、2 mM CaCl₂、pH 8.0) に対して 4°C で一晚透析した。BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク定量を行い、タンパク質 1 mg に対して Factor Xa protease (New England Biolabs) 2 µg を添加し、20°C で 16 時間反応させた後、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を終濃度 1 mM になるよう添加して反応を停止した。アセトンを終濃度 40% になるよう添加し、His-TF タグを沈殿除去した。逆相 HPLC により、カラム：シアノプロピル (TSKgel CN-80Ts、4.6×250 mm；東ソー)、流速：0.5 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 35–55%、40 分間)、検出：220 nm の条件で精製した。

2.5. C 末端のアミド化

アミド化酵素は recombinant human peptidylglycine α-amidating monooxygenase / PAM (R&D systems, MN, USA) を用いた。rNPGM-Gly 1 mg を 2 ml のバッファー (0.2 M Tris-HCl、pH 7.0、0.5% Nonidet P-40、5 mM アスコルビン酸、20 µM CuSO₄、0.1 mg/ml カタラーゼ、2 µg/ml アミド化酵素) に溶解し、37°C で一晚反応させた。逆相 HPLC により、カラム：C8 (YMC-Pack C8、4.6×150 mm；YMC、京都、日本)、流速：0.5 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B

液 40–60%、40 分間)、検出：220 nm の条件で精製した。

2.6. 質量分析

生成物の質量は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF-MS) またはエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization mass spectrometry: ESI-MS) により測定した。MALDI-TOF-MS は AXIMA-CFR plus (島津製作所、京都、日本) を用いて、ESI-MS は LTQ Orbitrap XL 及び Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。主な理論質量値を表 2 に示す。

表 2. 各生成物の理論質量値一覧

	[M+H] ⁺ (average)	[M+H] ⁺ (monoisotopic)
Met-rNPGL-Gly (SH)	9538.02	9531.64
Met-rNPGL-NH ₂ (SH)	9479.98	9473.64
His-Met-rNPGM-Gly (SH)	10494.20	10487.13
His-Met-rNPGM-NH ₂ (SH)	10436.16	10429.12

3. 結果

3.1. rat NPGL-Gly の発現

発現効率の高い T7 プロモーター [Studier and Moffatt, 1986] をコードする pETIK を用いて、rNPGL-Gly (約 10 kDa) を発現するプラスミドを作製した (図 7A)。開始 Met 残基が残るため、最終的に Met-rNPGL-Gly となる。この発現プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株、BL21 Star (DE3) pLysS 株、SHuffle T7 lysY 株の 3 種類を形質転換し、OD₆₀₀ = 0.5 のときに 0.1 mM IPTG により発現を誘導し、37°C で 3 時間培養した。その結果、BL21 (DE3) 株及び BL21 Star (DE3) pLysS 株では発現が認められたが、いずれも封入体を形成しており、SHuffle T7 lysY 株においては発現が認められなかった (図 7B)。そこで、より発現量の多かった BL21 (DE3) 株の封入体からの rNPGL-Gly の精製を試みた。まず、封入体に含まれる不要なタンパク質を除去するため、1% の Triton X-100 を含むバッファー (1% Triton X-100、0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) に懸濁して 30 分程度振とうさせ、遠心分離して上清を捨て、この作業を 4 回以上繰り返した。次に、D₂W による懸濁と遠心分離を 2 回繰り返して Triton X-100 を除去した。そして、6 M グアニジン塩酸塩を含むバッファー (6 M グアニジン塩酸塩、0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) により可溶化した。可溶化液を逆相 HPLC により精製したところ、29 分と 40 分にピークが見られた (図 7C)。MALDI-TOF-MS の結果、いずれも rNPGL-Gly に相当する質量が検出された。それぞれの溶出位置から、29 分のピークはジスルフィド結合を形成した rNPGL-Gly であり、40 分のピークは架橋していない rNPGL-Gly であることが示唆された。

3.2. rat NPGM-Gly の発現

rNPGL-Gly の発現において封入体を形成したため、rNPGM-Gly は可溶化タグとの融合タンパク質として、低温で発現させることにした。そこで、低温ショックにより発現を誘導する *cspA* プロモーター、翻訳を促進する translation enhancing element (TEE) 配列 [Etchegaray and Inouye, 1999]、精製用の His タグ、バクテリア由来シャペロンである TF をコードする pCold TF DNA ベクターに rNPGM-Gly を挿入し、His-TF-rNPGM-Gly (His-TF tag = 52 kDa, rNPGM-Gly = 10 kDa) を発現するプラスミドを作製した (図 8A)。His-TF tag は Factor Xa により切断することができるが、*Nde* I サイトである His-Met 配

列が残るため、最終的に His-Met-rNPGM-Gly となる (図 8A)。この発現プラスミドを用いて BL21 株と SHuffle 株を形質転換し、 $OD_{600}=0.5$ のときに氷冷及び 0.1 mM IPTG により発現を誘導し、15°C で 24 時間培養した。その結果、BL21 株においては発現した His-TF-rNPGM-Gly の多くが封入体を形成したが、SHuffle 株においては可溶性画分に発現が認められた (図 8B)。そこで、SHuffle 株の可溶性画分からの His-TF-rNPGM-Gly の精製を試みた。SHuffle 株の可溶性画分を His タグに対するアフィニティーカラムである Ni²⁺カラムに添加し、His-TF-rNPGM-Gly を精製した。His-TF タグを Factor Xa により切断し、アセトンを終濃度 40% になるよう添加して沈殿させた。その上清を逆相 HPLC により精製したところ、2 つのピークが見られた (図 8C)。ESI-MS の結果、21 分のメインピークからはジスルフィド結合を形成した His-Met-rNPGM-Gly が検出された (図 8D)。また、22 分のピークは、Factor Xa の非特異的な切断によるものと考えられる、His-Met-rNPGM-Gly より C 末端が 5 残基短いものであった (データ非表示)。培養液 1 L あたり 0.4 mg の rNPGM-Gly が得られた。

3.3. C 末端のアミド化

rNPGM-Gly を用いて、アミド化酵素による C 末端のアミド化を試みた。rNPGM-Gly 1 mg を 2 ml のアミド化反応液 (0.2 M Tris-HCl、pH 7.0、0.5% Nonidet P-40、5 mM アスコルビン酸、20 μ M CuSO₄、0.1 mg/ml カタラーゼ、2 μ g/ml アミド化酵素) に溶解し、37°C で一晩反応させた。それを逆相 HPLC により精製したところ、3 つのピークに分かれた (図 9A)。それぞれのピークを ESI-MS により解析し、rNPGM-Gly 及び rNPGM-NH₂ の理論値と比較したところ、ピーク 1 及び 2 から rNPGM-NH₂ が検出された (図 9B)。しかしながら、rNPGM-NH₂ より質量が 18 小さい、脱水物と考えられる副生成物も混在していた (図 9B)。また、ピーク 3 からは rNPGM-NH₂ により質量が 32 大きい、酸素が 2 つ付加したものと考えられる副生成物が検出された (図 9B)。未反応の rNPGM-Gly は見られなかった (図 9B)。アミド化酵素により rNPGM-NH₂ を調製することができたが、副反応を避けられず、HPLC の条件を検討しても分離することができなかった。

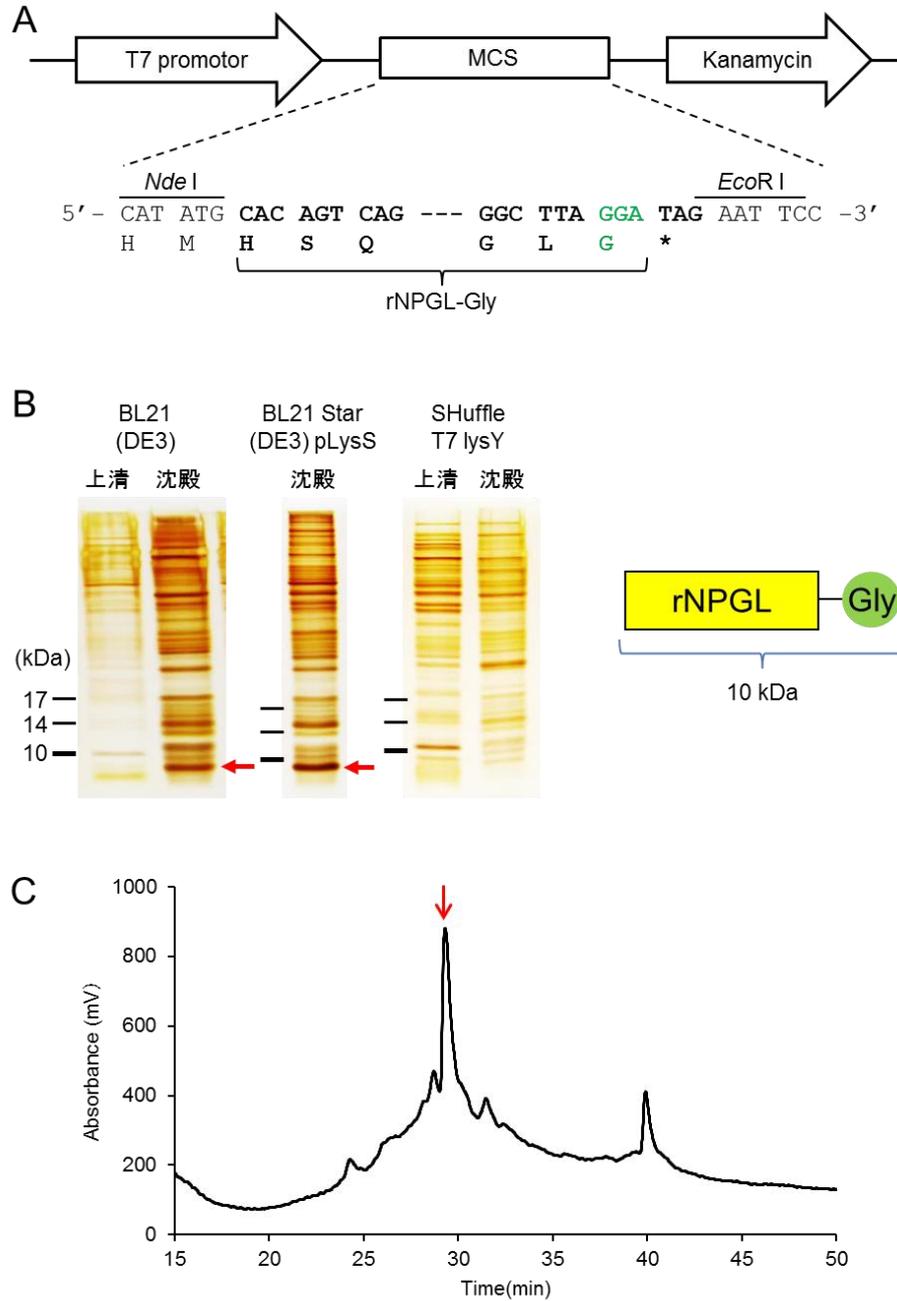


図 7. rNPGL-Gly の発現

(A) 発現プラスミドの設計。pETIK ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) に rNPGL-Gly を挿入した。(B) BL21 (DE3) 株、BL21 Star (DE3) pLysS 株、SHuffle T7 lysY 株における rNPGL-Gly の発現比較 (15%ゲル、銀染色)。BL21 (DE3) 株と BL21 Star (DE3) pLysS 株の封入体に発現が認められた。(C) rNPGL-Gly の逆相 HPLC クロマトグラム。BL21 (DE3) 株の封入体を 1% Triton X-100 バッファーで洗浄後、6 M グアニジン塩酸塩バッファーで可溶化し、逆相 HPLC により精製した (TSKgel Octyl-80Ts, 4.6×250 mm; 42–62% ACN over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。

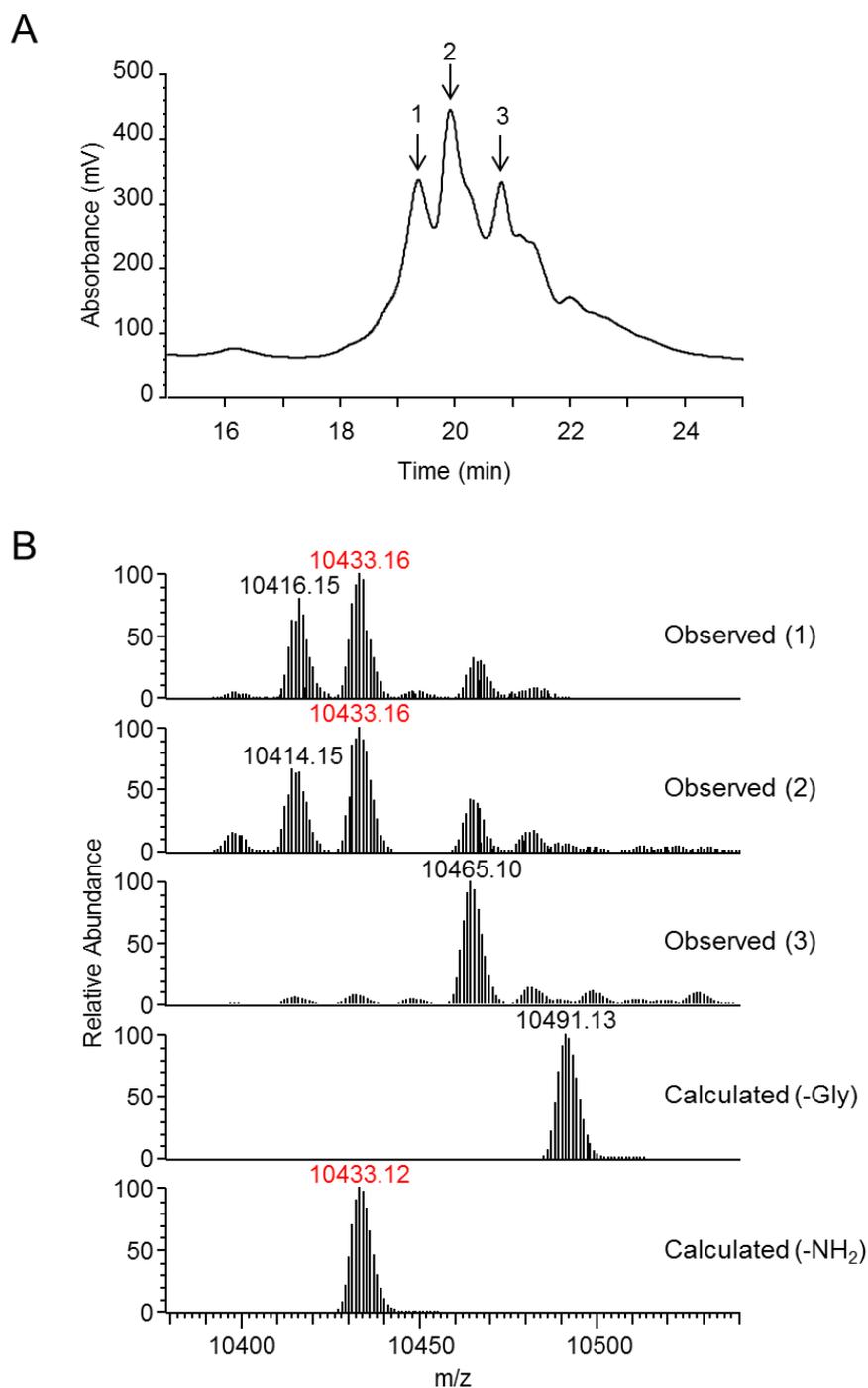


図 9. アミド化酵素による rNPGM-Gly のアミド化

(A) アミド化反応後の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack C8, 4.6×150 mm; 40–60% ACN

over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。 (B) 各ピークの ESI-MS の実測スペクトルと、rNPGM-Gly 及び rNPGM-NH₂ の理論スペクトル。ピーク 1 と 2 より rNPGM-NH₂ に相当する質量値が検出されたが、脱水物 (10415.15) と考えられる副生成物も混在していた。

4. 考察

4.1. rat NPGL-Gly と rat NPGM-Gly の発現

まず、発現効率の高い T7 プロモーター [Studier and Moffatt, 1986] をコードする pETIK ベクターを用いて rNPGL-Gly の発現を試みた結果、BL21 (DE3) 株及び BL21 Star (DE3) pLysS 株において発現させることができた。BL21 (DE3) 株は最も一般的なプロテアーゼ欠損株であり、そのうちの Star 株は、菌内に転写された mRNA がより安定になるように RNaseE に変異が入れられている。pLysS を持つ株は、T7 リゾチームを恒常的に発現して T7 ポリメラーゼによる転写を抑制し、非誘導時にバックグラウンドとなる発現レベルを低下させるため、毒性のあるタンパク質に対して有効である。発現誘導前は lac リプレッサーによりプロモーターからの転写、翻訳が抑制されているが、それは完全ではないためである。その BL21 (DE3) 株及び BL21 Star (DE3) pLysS 株において rNPGL-Gly の発現が認められたが、いずれも封入体を形成していた。組み換えタンパク質は宿主にとって異物であるため、不溶性の封入体を形成しやすい傾向がある。封入体を形成してしまった場合、変性剤等による可溶化及び再構成が必要となるが、封入体には大腸菌由来の膜画分のプロテアーゼが混在しているため、それらが活性再生すると目的タンパク質を分解してしまう。従って、再構成前に封入体を界面活性剤等により洗浄し、プロテアーゼを除去しておく必要がある。そこで、封入体の洗浄及び可溶化条件を検討したところ、1%の Triton X-100 を含むバッファーで洗浄し、6 M グアニジン塩酸塩を含むバッファーで可溶化させることができた。最終的な収量としては BL21 (DE3) 株の方が多かったため、BL21 (DE3) 株の封入体から rNPGL-Gly を精製した。

封入体は正しくフォールディングされなかったものの凝集体であり、その再構成の条件の最適化は困難を伴うことが多いため、一般的に目的タンパク質は可溶化発現させるのが望ましいとされている。発現タンパク質が毒性を示したり封入体を形成したりしてしまう場合は、発現効率の低いプロモーターや低温発現系の利用、可溶化タグの融合等が推奨される [Terpe, 2006]。そこで、rNPGM-Gly の発現においては、低温ショックにより発現を誘導する *cspA* プロモーター [Goldstein et al., 1990] と、バクテリア由来のシヤペロンである Trigger Factor (TF) をコードする pCold TF DNA ベクターを用いた。T7 システムでは発現量や溶解性が低いタンパク質に関して、pCold ベクターによりそれらが改善する例がいくつもある [Qing et al., 2004]。低温での発現は、*cspA* プロモーターの下流にある目的タンパク質の発現を促すが、一方で、大腸菌由来のタンパク質の発現は

抑制される。このシステムは、目的タンパク質の溶解性、収率、立体構造、活性において一般的に良い結果をもたらす [Rosano and Ceccarelli, 2014]。さらに、TF は新生タンパク質のフォールディングを促進する働きを持っている [Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Maier et al., 2005]。9 種類のタグ {His、SUMO [Malakhov et al., 2004]、チオレドキシシン [LaVallie et al., 2000]、MsbA [Su et al., 2007]、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) [Smith and Johnson, 1988]、HaloTag7 [Ohana et al., 2009]、マルトース結合ドメイン (MBP) [Kapust and Waugh, 1999]、TF、NusA [Davis et al., 1999]} を用いて 20 種類のタンパク質の発現及び可溶化効率を比較した研究があるが、SUMO、チオレドキシシン、MBP、TF が特に有効であるとしている [Bird, 2011]。そこで、低温発現系と TF を用いて rNPGM-Gly の可溶化発現を試み、BL21 株と SHuffle 株を形質転換したところ、SHuffle 株において可溶化発現が認められた。SHuffle 株は、ジスルフィド結合の形成を促すグルタチオンやチオレドキシシンを還元してしまう酵素 (チオレドキシシン還元酵素とグルタチオン還元酵素) を欠損しており、さらに、本来ペリプラズム (細胞膜と細胞外膜の間の空間) にある、ジスルフィド結合の形成を促すイソメラーゼ DsbC を細胞質に発現するように改良された株である [Lobstein et al., 2012]。これらのことから、低温発現系、シャペロン、ジスルフィド結合を形成しやすい環境の相乗効果により、発現した rNPGM-Gly の立体構造形成が促され、可溶化したと考えられる。また、結果には示していないが、rNPGL-Gly は pCold TF DNA ベクターや SHuffle 株を用いても可溶化発現させることはできなかった。上述の 9 種類の可溶化タグの比較研究においては特に SUMO タグが優れているとされているため [Bird, 2011]、rNPGL-Gly の発現にそれを用いると良いかもしれない。

組み換え発現系により調製した rNPGL 及び rNPGM は、N 末端に Met 残基あるいは His-Met 残基が付加している。組み換えタンパク質に付加配列を残さないために、Met 残基の C 末端側で切断する作用があり、酵素よりも安価な臭化シアン (CNBr) [Rais-Beghdadi et al., 1998] がよく用いられるが、rNPGL 及び rNPGM は内部に Met 残基を有しているためそれを使用することはできない。rNPGL 及び rNPGM は 80 及び 88 アミノ酸残基の長鎖ペプチドであるため、N 末端の 1~2 残基の付加は活性に大きな影響を及ぼさないと考えられるが、その確証はない。

各種条件検討により rNPGL-Gly 及び rNPGM-Gly を調製することができたが、その収量は多くなかった。本研究ではバッフル付フラスコを用いて培養したが、エアレーション効率は、大腸菌の生育に大きく影響するため、酸素量や pH を厳密に制御できるファー

メンターを用いることで収量をあげられると考えられる。また、飛躍的な収量向上が期待できる手法として、発現タンパク質を大腸菌内に溜め込ませずにペリプラズムや培地中に放出させる手法がある [Mergulhão et al., 2005]。ペリプラズムにはフォールディングを促すジスルフィド結合イソメラーゼやペプチジルプロリルイソメラーゼが存在するため、分泌されたタンパク質は活性や安定性、溶解性の点で優れていることが多い [Shokri et al, 2003; Mergulhão et al., 2005]。大腸菌は5つのタイプの分泌経路を有しているが本来のタンパク質の分泌量はそう多くなく、組み換えタンパク質を分泌させることができれば夾雑物が比較的少ない状態で得られる [Mergulhão et al., 2005]。また、組み換えタンパク質のN末端にシグナルペプチドを付加することによって分泌させることができ、そのシグナルペプチドは役目を終えた後に切断されるため、N末端にMet残基等の余分なアミノ酸残基が残らない [Mergulhão et al., 2005]。驚くべきことに、この手法によりグラムオーダーで組み換えタンパク質を得ている例がいくつかあり、コレラ毒B (1 g/L) [Slos et al., 1994]、セルロース結合ドメイン (2.8 g/L) [Hasenwinkle et al., 1997]、インスリン様成長因子I (2.5 g/L) [Joly et al., 1998]、アルカリホスファターゼ (5.2 g/L) [Choi et al., 2000]、ヒトの顆粒球コロニー刺激因子 (3.2 g/L) [Jeong and Lee, 2001]、レバンフルクトトランスフェラーゼ (4 g/L) [Lee et al., 2001] があげられる。この手法により rNPGL-Gly 及び rNPGM-Gly の収量も大きく向上させることができるかもしれない。ただし、分泌効率はタンパク質の大きさやアミノ酸組成によって大きく異なる点に注意する必要がある [Mergulhão et al., 2005]。

上述の通り、rNPGL-Gly 及び rNPGM-Gly の収量については課題が残るが、rNPGM-Gly については抗体作製に十分な量は得られた。それを抗原として、rNPGM に特異的に反応を示す抗体が作製された。

4.2. C末端のアミド化

哺乳類のペプチドホルモンの約50%、昆虫ホルモンの80%以上は、そのC末端がアミド化されている [Eipper BA and Mains, 1988; Kim and Seong, 2001]。アミド化酵素は下垂体の内分泌細胞や多くの神経細胞において高い発現が見られるが、内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞等、全身に広く存在している [Kim and Seong, 2001]。また、アミド化酵素を欠損したマウスやショウジョウバエは早期に死に至る [Bousquet-Moore et al., 2010]。C末端のアミド化は、ペプチドの活性発揮に重要な役割を担っている。例えば、ラットにおいて neuroendocrine regulatory peptide (NERP)-1 (LEGSFLGGSEAGERLLQGLAQV

EA-NH₂) 及び NERP-2 (EAEATRQAAAQEERLADLASDLLLQYLLQGGARQRDLG-NH₂) はバソプレシンの分泌を抑制するが、C 末端が Gly 残基の NERP-1 及び NERP-2 にはその分泌抑制作用が全く見られない [Yamaguchi et al., 2007]。同様に、NPGL 及び NPGM においても C 末端のアミド化は活性に必要であると考えられる。

アミド化酵素がカエルの皮膚やウシの下垂体から単離及び構造決定されて以来 [Mizuno et al., 1986; Murthy et al., 1986; Mizuno et al., 1987]、組み換え発現系によりアミド化酵素が作られ、様々なペプチドの C 末端のアミド化に用いられてきた。その例として、マストパラン-X (INWKGIAAMAKKLL-NH₂) [Kohno et al., 1998] やヒトのアドレノメデュリン (YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQTYQFTDKDKDNVA RPSKISPQGY-NH₂) [Mitsuda et al., 2002]、甲殻類の血糖上昇ホルモン (GAMGSLFDPSC TGVFDRQLLRRLGRVCDDCFNVFREPNAVATECRSNCYNNPVFRQCMAYVVPAPHLHNEH REAVQMV-NH₂) [Katayama et al., 2002; Mosco et al., 2008; Nagai et al., 2009] 等があげられる。同様に、アミド化酵素を用いて rNPGM-Gly の C 末端のアミド化を試みたが、収率が低く副生成物の混入を避けられなかった。rNPGM-Gly に反応性の高いフリーの Cys 残基が存在することが副反応の原因である可能性が考えられる。アミド化酵素は高価であるため、収率の低さは深刻な問題である。さらに、本研究遂行途中で主要メーカーのアミド化酵素の製造が中止となり、入手さえも困難となってしまった。これらのことから、アミド化酵素による rNPGL-Gly 及び rNPGM-Gly の C 末端のアミド化は断念せざるを得なくなった。代替の C 末端アミド化法として、カルボキシペプチダーゼ Y を用いて C 末端のアミノ酸残基をアミド化したアミノ酸残基に置換するという手法があり ($-X-Y-OH + H-Z-NH_2 \Rightarrow -X-Z-NH_2 + H-Y-OH$; X, Y, Z = アミノ酸)、組み換え発現系により調製したヒトのグルカゴン様ペプチド 1 (7-36) の C 末端をアミド化させている例がある (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂) [Hong et al., 2000; Zhang et al., 2004]。しかしながら、rNPGL-Gly 及び rNPGM-Gly の収量向上が先決問題である。

第2章 Intein の原理を用いた手法による調製

1. 序文

第1章において、アミド化酵素による rNPGM-Gly の C 末端アミド化反応効率が低く、さらに、アミド化酵素の入手が困難となった。従って、アミド化酵素を用いない手法で NPGM 及び NPGM を調製する必要がある。そこで、Intein の原理を用いたペプチド調製法を検討することにした。Intein とは、酵母やバクテリアに存在し、タンパク質スプライシングを生じさせるタンパク質である。タンパク質スプライシングとは、「N 末側 Extein-Intein-C 末側 Extein」からなる前駆体タンパク質から、「Intein」がスプライシングを生じさせて抜け落ち、両端の Extein が結合されて「N 末側 Extein-C 末側 Extein」となる反応であり、反応の進行には Cys 残基の SH 基が重要な役割を担っている (図 10)。この反応機構を応用したものとして、C 末端アミド化法 [Cottingham et al., 2001] と Native chemical ligation (NCL) 法 [Dawson et al., 1994] が知られている。そこで本章では、これらの手法により rNPGM の調製を試みた。

C 末端アミド化法は、目的タンパク質の C 末端に Intein を融合し、アンモニウム塩存在下で SH 基を持つ DTT を添加してスプライシング様反応を生じさせ、C 末端をアミド化するというものである (図 11A) [Cottingham et al., 2001]。Intein と精製用タグの Chitin Binding Domain (CBD) をコードする pTXB1 ベクターが市販されているため、それに rNPGM を挿入し、さらに rNPGM-Intein-CBD を切り出し、pCold TF DNA ベクターに挿入して N 末端に His-TF タグを付加し、可溶化発現を試みた (図 11B)。その後、C 末端のアミド化と His-TF タグの切断を試みた (図 11B)。

NCL 法は、ペプチドフラグメントを縮合する手法であり、C 末端にチオエステル構造を有するペプチド (ペプチドチオエステル) と N 末端に Cys 残基を有するペプチド (Cys ペプチド) を中性条件下で混合すると、ネイティブなペプチド結合で縮合される (図 12A) [Dawson et al., 1994]。そこで、rNPGM の 3 つの Cys 残基 (Cys²⁴、Cys²⁸、Cys⁸⁰) のうち、Cys²⁸ を縮合部位に選定し、N 末側の 27 残基 (rNPGM¹⁻²⁷) をペプチドチオエステルとして、C 末側の 61 残基 (rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂) を Cys ペプチドとして調製し、NCL 法による縮合を試みた (図 12B)。rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルは、アミド化法と同様の原理で Intein との融合タンパク質にチオールを反応させることにより調製することができるため、組み換え発現系による調製を試みた。rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ は、確実に C 末端がアミド化されたものとして得るため、リンクアミドレジンを用いた固相法による合成を試みた。

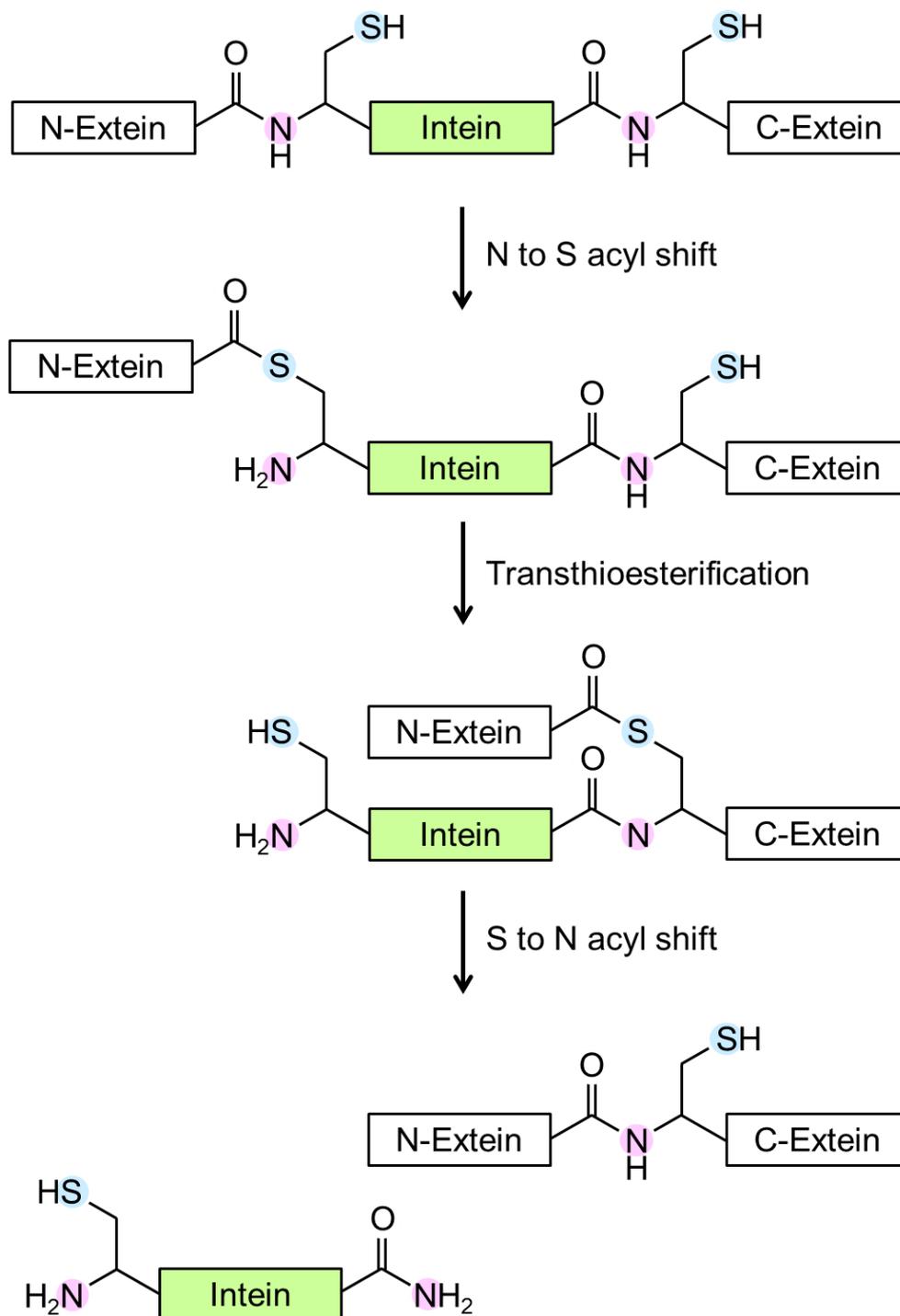


図 10. タンパク質スプライシング [Ding et al., 2003]

N 末側 Extein—Intein—C 末側 Extein からなる前駆体タンパク質から、Intein が抜け落ちて両側の Extein が縮合される。Cys 残基がチオール基 (青) とアミノ基 (ピンク) が反応の進行に重要である。

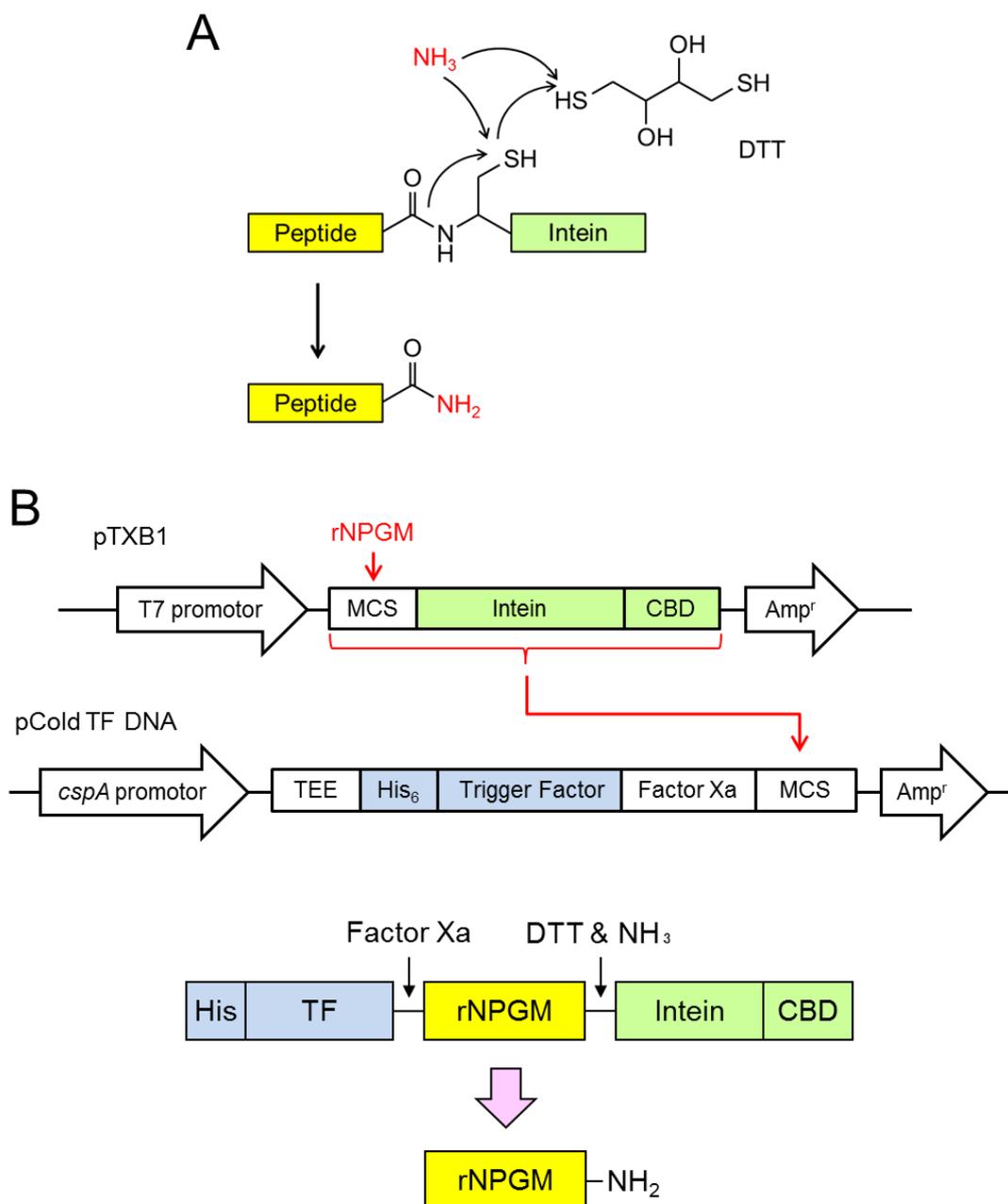


図 11. Intein の原理を応用した C 末端アミド化法による rNPGM の調製

(A) C 末端アミド化法 [Cottingham et al., 2001]。目的ペプチドと Intein の融合タンパク質に、アンモニウム塩存在下で DTT を添加すると、目的ペプチドの C 末端がアミド化される。(B) C 末端アミド化法による rNPGM の調製のスキーム。rNPGM を pTXB1 ベクターに挿入後、Intein-CBD と共に切り出し、pCold TF DNA に挿入することで、His-TF-rNPGM-Intein-CBD を可溶化発現させる。その後、C 末端のアミド化と His-TF タグの切断を行い、rNPGM-NH₂ を調製する。

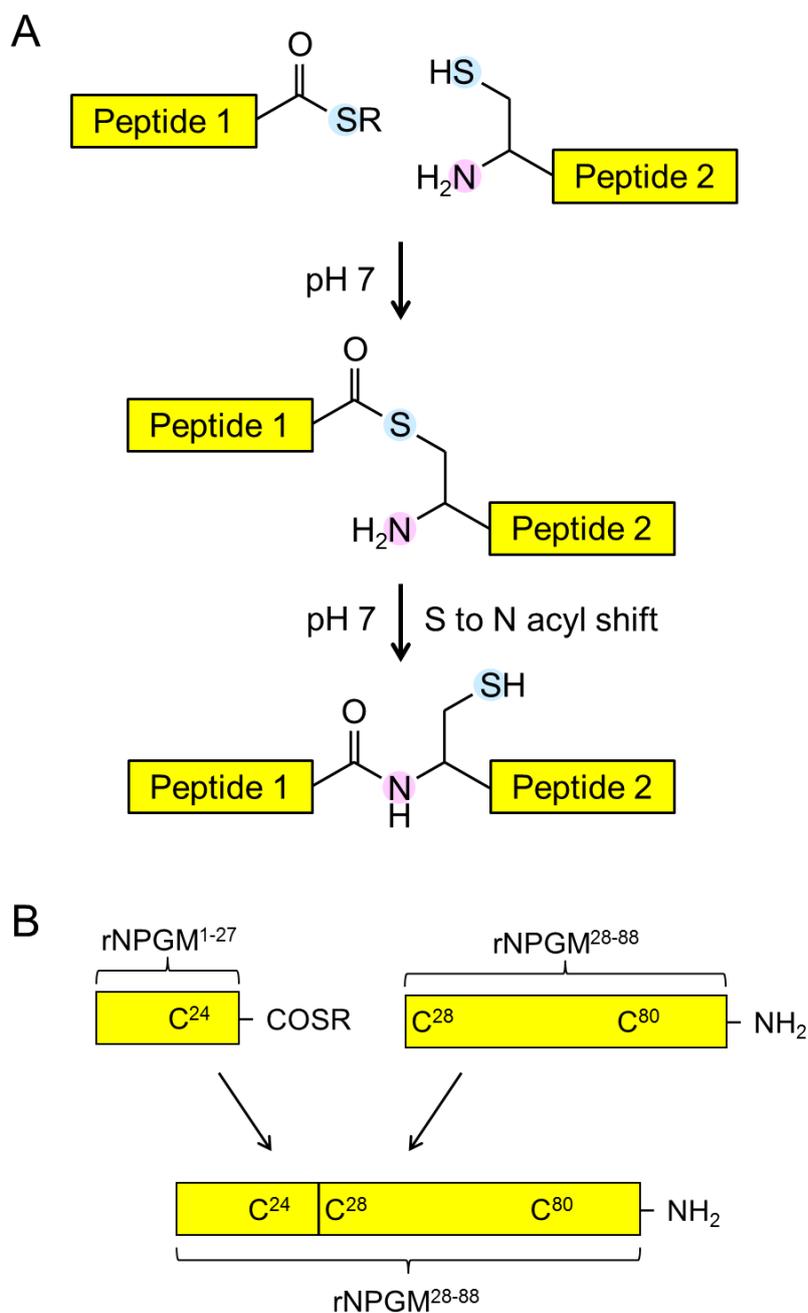


図 12. Intein の原理を応用した Native chemical ligation (NCL) 法による rNPGM の調製
 (A) NCL 法の原理 [Dawson et al., 1994]。C 末端がチオエステル化したペプチド (Peptide 1) と N 末端に Cys 残基を持つペプチド (Peptide 2) を中性条件下で混合すると、ペプチド結合により縮合される。(B) NCL 法による rNPGM の調製スキーム。rNPGM の 28 番目の Cys 残基を縮合部位とし、rNPGM¹⁻²⁷ をペプチドチオエステルとして Intein の原理を用いた手法により調製し、rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ を Cys ペプチドとして固相法により調製し、NCL 法により縮合する。

2. 方法

2.1. 試薬類

pCold TF DNA vector はタカラバイオより、pTXB1 vector は New England Biolabs より購入した。大腸菌 DH5 α 株はニッポンジーンより、BL21 (DE3) 株はバイオダイナミクスより、BL21 Star (DE3) pLysS 株は Thermo Fisher Scientific より、SHuffle 株は New England Biolabs より購入した。

Fmoc アミノ酸誘導体、TGS-RAM、PyBOP、HOBt は島津製作所より購入した。Fmoc アミノ酸誘導体の側鎖の保護基は、Asn・Cys・Gln・His は Trt 基、Asp・Glu は OtBu 基、Arg は Pbf 基、Lys・Trp は Boc 基、Ser・Tyr は tBu 基のものを用いた。シュードプロリンジペプチド {Fmoc-Leu-Thr(psiMe, MePro)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-Ser(psiMe, MePro)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-Ser(psiMe, MePro)-OH、Fmoc-Leu-Ser(psiMe, MePro)-OH} は Novabiochem (Darmstadt, Germany) より購入した。ピペリジン、TFA、ジエチルエーテルはナカライテスク (京都、日本) より購入した。チオアニソール、EDT、エチルメチルスルフィド、2-メチルインドールは東京化成工業 (東京、日本) より購入した。フェノールはシグマアルドリッチより、NMM は片山化学工業より購入した。

2.2. C 末端アミド化法による調製

2.2.1. His-TF-rNPGM-Intein-CBD の発現と精製

第1章で作製した pCold TF DNA \times rNPGM-Gly を鋳型に、*Nde* I サイトを含むフォワードプライマーと *Sap* I サイトを含むリバースプライマーを用いて、rNPGM を増幅した (表3)。PCR は、*Ex Taq* (タカラバイオ) を用いて、初期変性 94 $^{\circ}$ C-3 分、変性 94 $^{\circ}$ C-30 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C-30 秒、伸長 72 $^{\circ}$ C-30 秒、30 サイクルで行った。PCR 産物と pTXB1 を *Nde* I 及び *Sap* I で消化し、Ligation high (東洋紡) を用いて繋いだ (以後、pTXB1 \times rNPGM と表記する)。大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37 $^{\circ}$ C で一晩選別した。コロニーを 100 μ g/ml のカルベニシリンを含む LB 培地 5 ml に植え継ぎ、37 $^{\circ}$ C で一晩培養後、Nucreo Spin Plasmid (MACHEREY-NAGEL) を用いてプラスミドを精製した。pTXB1 \times rNPGM を *Nde* I 及び *Pst* I で処理して rNPGM-Intein-CBD を切り出し、pCold TF DNA ベクターに繋いだ (以後、pCold TF DNA

×rNPGM-Intein-CBD と表記する)。DH5α 株を形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別した。コロニーを 5 ml の LB 培地 (50 µg/ml アンピシリン) で 37°C で一晚培養後、Nucleo Spin Plasmid を用いてプラスミドを精製した。シークエンスの確認は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits と ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

表 3. rNPGM の増幅に用いたプライマー配列

配列	
Forward	5'- GGCAATTCATATGGACTTGGAATTCAGAAAGG -3'
Reverse	5'- GGTGGTTGCTCTTCCGCACATCCCATGAGACCTTGAAA-3'

pCold TF DNA×rNPGM-Intein-CBD を用いて、大腸菌 SHuffle 株、BL21 Star (DE3) pLysS 株、BL21 (DE3) 株をそれぞれ形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別した。コロニーを 5 ml の LB 培地 (50 µg/ml カルベニシリン) で 37°C で一晚培養後、新しい培地 (50 µg/ml カルベニシリン) に 50 分の 1 量を植え継ぎ、37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.5 のとき、培養液を 30 分間氷冷後、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように添加し、15°C で 24 時間発現を誘導した。遠心分離 (5,000×g、10 min、4°C) により菌体を回収し、−80°C で凍結保存した。タンパク質の発現は SDS-PAGE 及び銀染色により確認した。

BL21 Star (DE3) pLysS 株の菌ペレット 1 g に対して、5 ml の BugBuster Reagent (Novagen) と 5 µl の Benzonase (Novagen) を添加して溶菌し、遠心分離 (15,000 rpm、20 min、4°C) 後、上清を回収した。カラムに TALON Metal Affinity Resin (タカラバイオ) を入れ、カラム体積 5 倍量の平衡化バッファー (50 mM NaH₂PO₄、0.3 M NaCl、pH 7.0) で平衡化し、抽出上清を添加後、3 倍量の平衡化バッファーで洗浄し、3 倍量の溶出バッファー (50 mM NaH₂PO₄、0.3 M NaCl、0.1 M イミダゾール、pH 7.0) で溶出した。

2.2.2. C 末端のアミド化と His-TF タグの切断

溶出液を C 末端アミド化反応用バッファー (20 mM HEPES、0.1 mM EDTA、pH 8.0) に対して 4°C で一晚透析した。炭酸水素アンモニウム (NH₄HCO₃) を終濃度 2 M になるよう添加して溶解させた後、DTT を終濃度 50 mM になるよう添加し、一晚室温で攪拌した。次に、His-TF タグ切断反応用バッファー (20 mM Tris-HCl、0.1 M NaCl、2 mM CaCl₂、

pH 8.0) に対して 4°C で一晩透析した。BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク定量を行い、タンパク質 1 mg に対して Factor Xa (New England Biolabs) 0.5 μ l を添加し、室温で 16 時間反応させた後、PMSF を終濃度 1 mM になるよう添加して反応を停止した。

切離した Intein-CBD 及び His-TF タグをメタノール沈殿により除去した。サンプル体積に対して 0.5、1、1.5 または 2 倍量のメタノールを添加し、4°C で 15 分間静置した。遠心分離 (1,700 \times g, 15 min, 4°C) 後、上清を回収し、エバポレーターを用いてメタノールを除去した。逆相 HPLC により、カラム：シアノプロピル (TSKgel CN-80Ts, 4.6 \times 250 mm ; 東ソー)、流速：0.5 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 33–53%、40 分間)、検出：220 nm の条件で精製した。

2.3. Native chemical ligation 法による調製

2.3.1. rat NPGM¹⁻²⁷ チオエステルの調製

第 1 章で作製した pCold TF DNA \times rNPGM-Gly を鋳型に、*Nde* I サイトを含むフォワードプライマーと *Sap* I サイトを含むリバースプライマーを用いて、rNPGM¹⁻²⁷ を増幅した (表 4)。PCR は、*Ex Taq* を用いて、初期変性 94°C–3 分、変性 94°C–30 秒、アニーリング 55°C–30 秒、伸長 72°C–15 秒、30 サイクルで行った。PCR 産物と pTXB1 vector を *Nde* I 及び *Sap* I で消化し、Ligation high を用いて繋いだ (以後、pTXB1 \times rNPGM¹⁻²⁷ と表記する)。大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37°C で一晩選別した。コロニーを 5 ml の LB 培地で 37°C で一晩培養後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドを精製した。シーケンスの確認は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits と ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

表 4. rNPGM¹⁻²⁷ の増幅に用いたプライマー配列

配列	
Forward	5'- GGCAATTCATATGGACTTGGAATTCAGAAAGG -3'
Reverse	5'- GGTGGTTGCTCTTCCGCAAGTGTTCAGCACTGAAGAT -3'

pTXB1×NPGM¹⁻²⁷を用いて、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB プレート上で 37°C で一晚選別した。コロニーを 10 ml の LB 培地 (50 µg/ml アンピシリン) で 37°C で一晚培養後、新しい LB 培地 (50 µg/ml アンピシリン) 300 ml に 50 分の 1 量を植え継ぎ、37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.5 のとき、IPTG を終濃度 0.1 mM になるよう添加し、37°C で 3 時間発現を誘導した。遠心分離 (5,000×g、10 min、4°C) により菌体を回収し、-80°C で凍結保存した。タンパク質の発現は SDS-PAGE と銀染色により確認した。

菌ペレット 4.6 g に BugBuster Reagent 23 ml と Benzonase 33 µl を添加して溶菌し、遠心分離 (15,000 rpm、20 min、4°C) 後、上清を回収し、3 等分した。カラムに 2 ml の Chitin Beads (New England Biolabs) を入れ、3 条件 (pH 8.0-25°C、pH 6.5-25°C、pH 8.0-4°C) でチオエステル化効率を比較した。カラム体積 10 倍量の平衡化バッファー (20 mM HEPES、50 mM NaCl、pH 8.0 または 6.5) で平衡化し、抽出上清を添加後、3 倍量の平衡化バッファーで洗浄した。カラムの出口を閉め、3 倍量のチオエステル化バッファー (0.1 M MESNA、20 mM HEPES、50 mM NaCl、pH 8.0 または 6.5) を添加し、25 または 4°C で一晚反応させた後、カラムの出口を開けて反応液を回収した。逆相 HPLC により、カラム : C8 (YMC-Pack C8、4.6×150 mm ; YMC)、流速 : 0.5 ml/min、溶出 : A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 27-67%、40 分間)、検出 : 220 nm の条件で精製した。

2.3.2. rat NPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の合成

自動ペプチド合成装置 PSSM-8 (島津製作所) を用いて合成した。レジンは TGS-RAM (0.24 mmol/g) 40 mg を使い、10 µmol のスケールで合成した。縮合反応は、アミノ酸 /PyBOP/HOBt/NMM (10:10:10:15 equiv.) を用いて、3 分間の活性化の後、30 分間行った。脱保護反応は、30% ピペリジン/DMF を用いて 4 分間を 2 回行った。合成終了後、メタノールで合成物を洗浄し、乾燥させた。

クリーベジは、2 ml のカクテル (TFA 82%、チオアニソール 5%、H₂O 5%、フェノール 3%、EDT 3%、エチルメチルスルフィド 2%、2-メチルインドール 20 mg) を用いて室温で 6 時間行い、冷ジエチルエーテルで沈殿させ、室温で乾燥させた。沈殿物を 1 ml の DMSO で溶解し、逆相 HPLC により、カラム : C18 (YMC-Pack Pro C18、10×150 mm ; YMC)、流速 : 1.0 ml/min、溶出 : A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 35-65%、30 分間)、検出 : 280 nm の条件で精製した。

2.3.3. Native chemical ligation

Met-rNPGM¹⁻²⁷ チオエステル 3 mg と rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ 7 mg を 1 ml の NCL 反応用バッファー (8 M グアニジン塩酸塩、0.1 M Na₂HPO₄、pH 8.0、0.1 M MPAA、20 mM TCEP) に溶解した。反応液は窒素でバブリングし、25°Cで一晩静置した。逆相 HPLC により、カラム：シアノプロピル (TSKgel CN-80Ts、4.6×250 mm；東ソー)、流速：0.5 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 40–60%、40 分間)、検出：220 nm の条件で精製した。

2.4. 質量分析

生成物の質量は、MALDI-TOF-MS または ESI-MS により測定した。MALDI-TOF-MS は AXIMA-CFR plus (島津製作所) を用いて、ESI-MS は LTQ Orbitrap XL 及び Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。主な理論質量値を表 5 に示す。

表 5. 各生成物の理論質量値一覧

	[M+H] ⁺ (average)	[M+H] ⁺ (monoisotopic)
Met-rNPGM ¹⁻²⁷ -OH	3037.50	3035.48
Met-rNPGM ¹⁻²⁷ -thioester	3160.50	3158.48
rNPGM ²⁸⁻⁸⁸ -NH ₂	7280.53	7275.59
Met-rNPGM ¹⁻⁸⁸ -NH ₂ (SH)	10299.01	10292.06
His-Met-rNPGM-NH ₂ (SH)	10436.16	10429.12
His-Met-rNPGM-OH (SH)	10437.15	10430.11

3. 結果

3.1. C 末端アミド化法による調製

His-TF-rNPGM-Intein-CBD (92 kDa) を発現するプラスミドを作製し、大腸菌 SHuffle 株、BL21 Star (DE3) pLysS 株、BL21 (DE3) 株の3種類を形質転換した。その結果、SHuffle 株と BL21 Star (DE3) pLysS 株においては可溶化発現が認められたが、BL21 (DE3) 株では発現は見られなかった (図 13A)。そこで、より可溶化効率の高かった BL21 Star (DE3) pLysS 株の上清から His-TF-rNPGM-Intein-CBD の精製を試みた。His タグに対するアフィニティーカラムである Co^{2+} カラムを用いて精製したところ、溶出画分に His-TF-rNPGM-Intein-CBD がメインバンドとして見られ、効率良く精製することができた (図 13B)。しかしながら、His-TF-rNPGM (62 kDa) に相当するバンドや、His-TF (52 kDa) に相当するバンドも見られた (図 13B)。

His-TF-rNPGM-Intein-CBD を含む溶出液を C 末端アミド化用バッファーに対して透析し、炭酸水素アンモニウム存在下、DTT で処理したところ、Intein-CBD は効率良く切断された (図 13C)。さらに、His-TF タグ切断用バッファーに対して透析し、Factor Xa で処理したところ、rNPGM に相当するバンドが見られた (図 13C)。

切断した Intein-CBD 及び His-TF タグは、それぞれ約 30 kDa 及び約 52 kDa の高分子であり、そのまま逆相 HPLC に添加するとカラムの詰まりの原因となる。そこで、メタノール沈殿による除去を試みた。サンプル量に対してメタノール量が 0.5、1、1.5、2 倍となるように添加し、Intein-CBD 及び His-TF タグの沈殿の程度を比較したところ、His-TF タグはメタノール添加量が等量以上で、Intein-CBD はメタノール添加量が 1.5 倍量以上で、ほぼ沈殿除去することができた (図 13D)。しかしながら、メタノール添加量が 0.5 倍量以上で rNPGM も同じく沈殿してしまった (図 13D)。

メタノール添加量が 1.5 倍量の時の上清を逆相 HPLC により精製したところ、27 分にシングルピークとして溶出された (図 13E)。それを MALDI-TOF-MS により解析したところ、rNPGM に相当する質量値が検出された。しかしながら、His-Met-rNPGM-NH₂ 及び His-Met-rNPGM-OH の理論質量値はそれぞれ 10429.12 及び 10430.11 であり、分子量が大きい中での約 1 の差を TOF-MS の精度では識別することができず、調製した His-Met-rNPGM の C 末端がアミドであるかフリーであるか、あるいは混在しているのか、正確にはわからなかった。

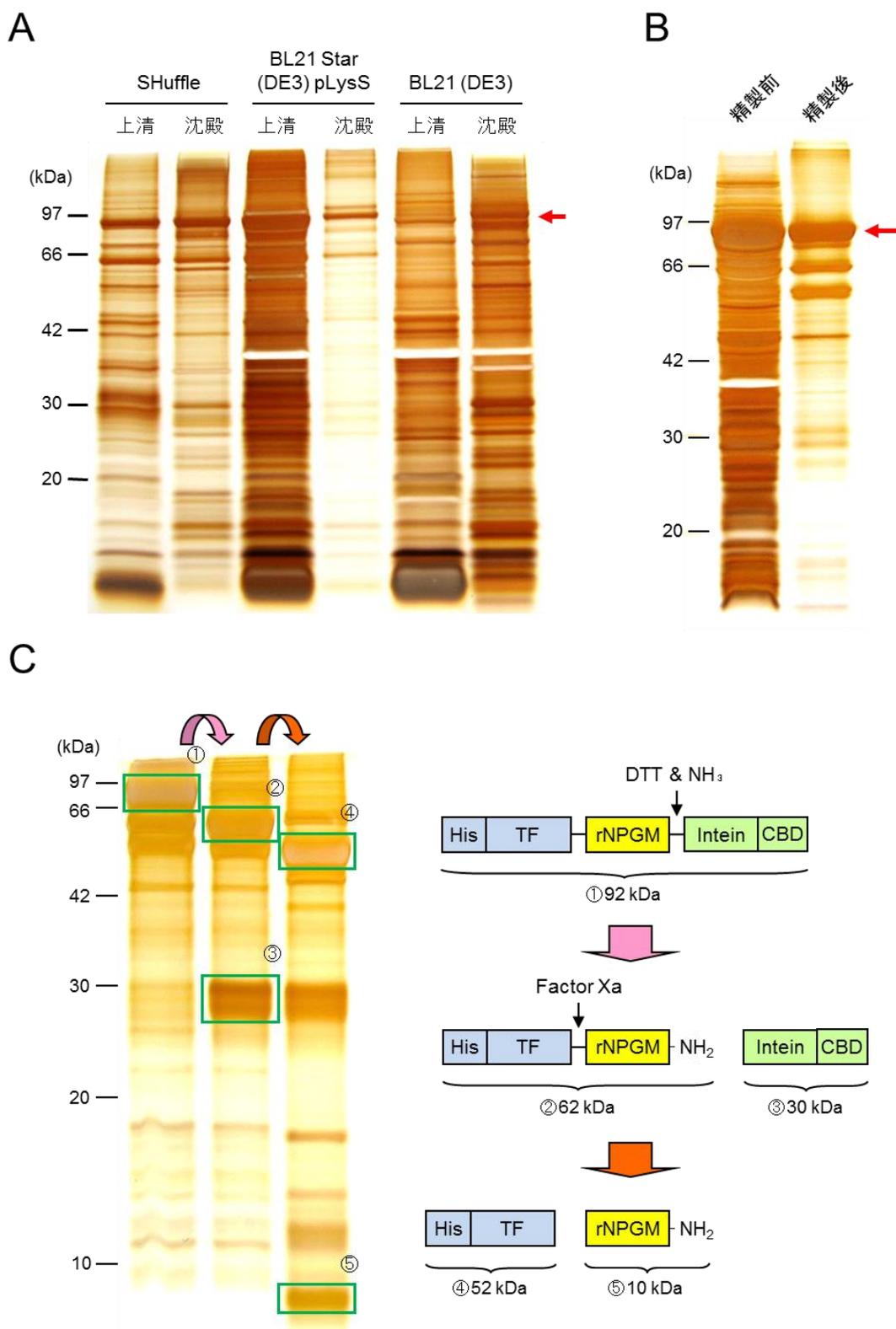


図 13. 次頁へ続く

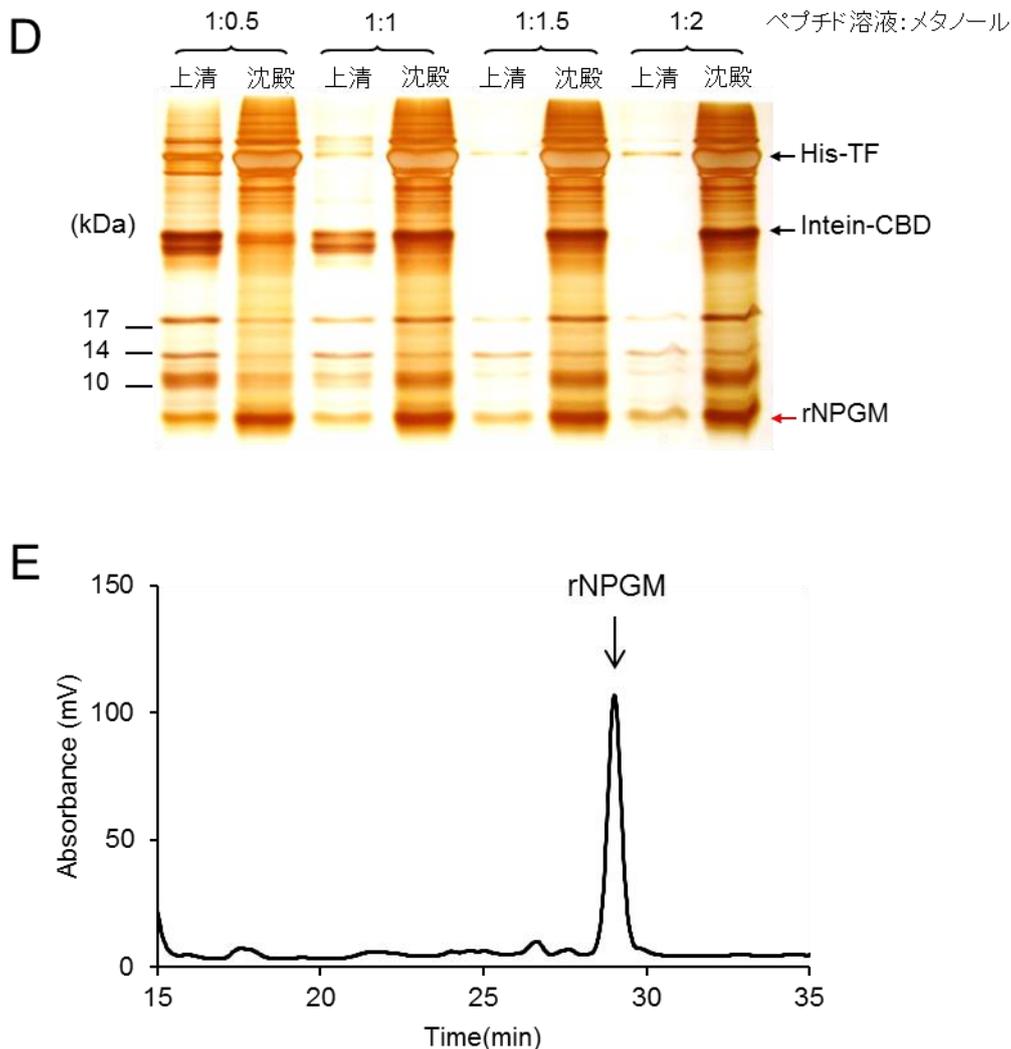


図 13. C 末端アミド化法による rNPGM-NH₂ の調製

(A) His-TF-rNPGM-Intein-CBD の発現比較。pCold TF DNA × rNPGM-Intein-CBD を用いて、SHuffle 株、BL21 Star (DE3) pLysS 株、BL21 (DE3) 株を形質転換し、His-TF-rNPGM-Intein-CBD の発現を比較した (10%ゲル、銀染色)。BL21 Star (DE3) pLysS 株の上清により多く可溶化発現が認められた (矢印)。(B) BL21 Star (DE3) pLysS 株の上清の Co²⁺カラム精製 (10%ゲル、銀染色)。His-TF-rNPGM-Intein-CBD を矢印で示す。(C) DTT 及びアンモニウム塩を用いた rNPGM の C 末端アミド化と、Factor Xa を用いた His-TF タグの切断 (15%ゲル、銀染色)。(D) メタノール沈殿による His-TF 及び Intein-CBD の除去 (15%ゲル、銀染色)。メタノール添加量が 1.5 倍量以上で His-TF タグ及び Intein-CBD を沈殿除去することができたが、rNPGM も沈殿した。(E) メタノール 1.5 倍量時の上清の逆相 HPLC クロマトグラム (TSKgel CN-80Ts, 4.6×250 mm; 33–53% ACN over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。rNPGM を精製したが、C 末端がアミド化されているかは判別できなかった。

3.2. Native chemical ligation 法による調製

rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルは、組み換え発現系により調製を試みた。Intein 及び CBD をコードする pTXB1 ベクターのマルチクローニングサイトに rNPGM¹⁻²⁷ を挿入し、rNPGM¹⁻²⁷-Intein-CBD を発現するプラスミドを作製した (図 14A)。これまでと同様に、rNPGM¹⁻²⁷-Intein-CBD の N 末端には開始 Met 残基が残る (図 14A)。この発現プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換したところ、可溶性画分に Met-rNPGM¹⁻²⁷-Intein-CBD に相当する 33 kDa (Met-rNPGM¹⁻²⁷ = 3 kDa, Intein-CBD = 30 kDa) のバンドが見られた (図 14B)。続いて、その上清をキチンカラムに添加し、オンカラムで rNPGM¹⁻²⁷ の C 末端のチオエステル化を試みた。チオエステル化反応の模式図を図 14C に示す。Met-rNPGM¹⁻²⁷-Intein-CBD に 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (sodium 2-mercaptoethanesulfonate: MESNA) を作用させ、Intein-CBD を切り離すとともに Met-rNPGM¹⁻²⁷ の C 末端をチオエステル化し、Met-rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルをカラムから溶出させた。その際、チオエステル化反応は pH が高いほど迅速であるが、形成したチオエステルは pH が低い方が安定に保たれることが知られているため [Kawakami et al., 2009]、Met-rNPGM¹⁻²⁷ チオエステル化効率を pH 8.0-25°C、pH 6.5-25°C、pH 8.0-4°C の 3 条件で比較した。その結果、pH 6.5-25°C の条件下において最も Met-NPGM¹⁻²⁷ チオエステル化効率が高く、pH 8.0-4°C の条件下においては著しく収率が低かった (図 14D)。収率は 2.7 mg/L であった。

rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ は確実に C 末端がアミド化したものとして調製するため、リンクアミドレジンを用いて固相法により合成を試みた。また、61 残基と長鎖であるため、シューードプロリンジペプチドを Leu³⁰-Thr³¹、Lys⁵⁶-Ser⁵⁷、Tyr⁶³-Ser⁶⁴、Leu⁸²-Ser⁸³ の 4 ヶ所に導入して合成した (図 15A)。その結果、10 μmol の合成スケールにおいて 15% の収率で合成することができた (図 15B)。

最後に、調製した Met-rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルと rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の縮合を試みた。NCL 反応は中性条件下におくだけで進行するが、一般的には様々なチオールが触媒として用いられる。中でも特に反応性が高く、水に可溶であり、悪臭のない 4-メルカプトフェニル酢酸 (4-mercaptophenylacetic acid: MPAA) [Johnson and Kent, 2006] を触媒として用いた。NCL 反応の模式図を図 16A に示す。Met-rNPGM¹⁻²⁷ チオエステル 3 mg と rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ 7 mg を 1 ml の NCL 反应用バッファー (8 M グアニジン塩酸塩、0.1 M Na₂HPO₄、pH 8.0、0.1 M MPAA、20 mM TCEP) に溶解し、室温で一晩反応させたところ、縮合された Met-rNPGM¹⁻⁸⁸ が得られた (図 16B)。収率は 30% であった。

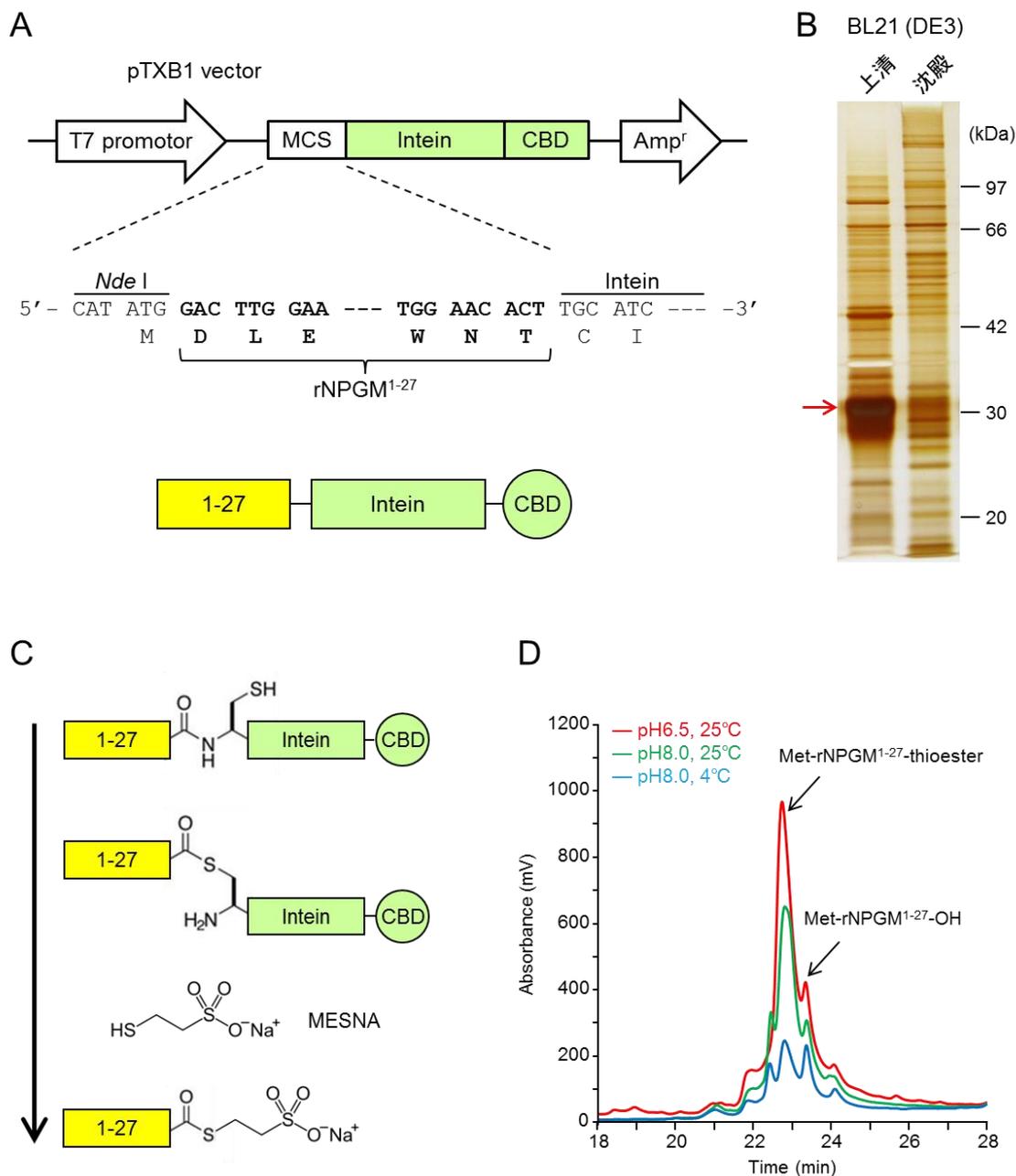
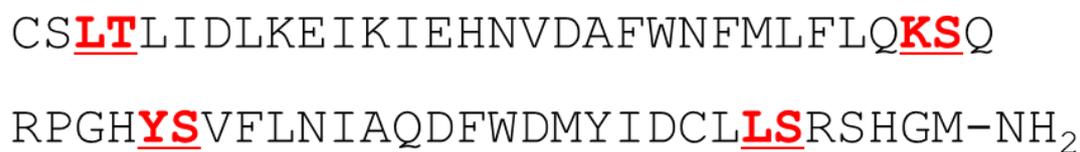


図 14. Intein を用いた rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルの調製

(A) rNPGM¹⁻²⁷-Intein-CBD 発現プラスミドの設計。(B) BL21 (DE3) 株における発現 (10%ゲル、銀染色)。(C) C 末端のチオエステル化反応の模式図。目的ペプチドの C 末端側に Intein を融合したタンパク質に MESNA を添加すると、目的ペプチドの C 末端がチオエステル化される。(D) チオエステル化反応効率の比較(YMC-C8, 4.6×150 mm; 27–67% ACN over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。pH 6.5 で 25°C の条件下が最も rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルの収率が高かった。

A



B

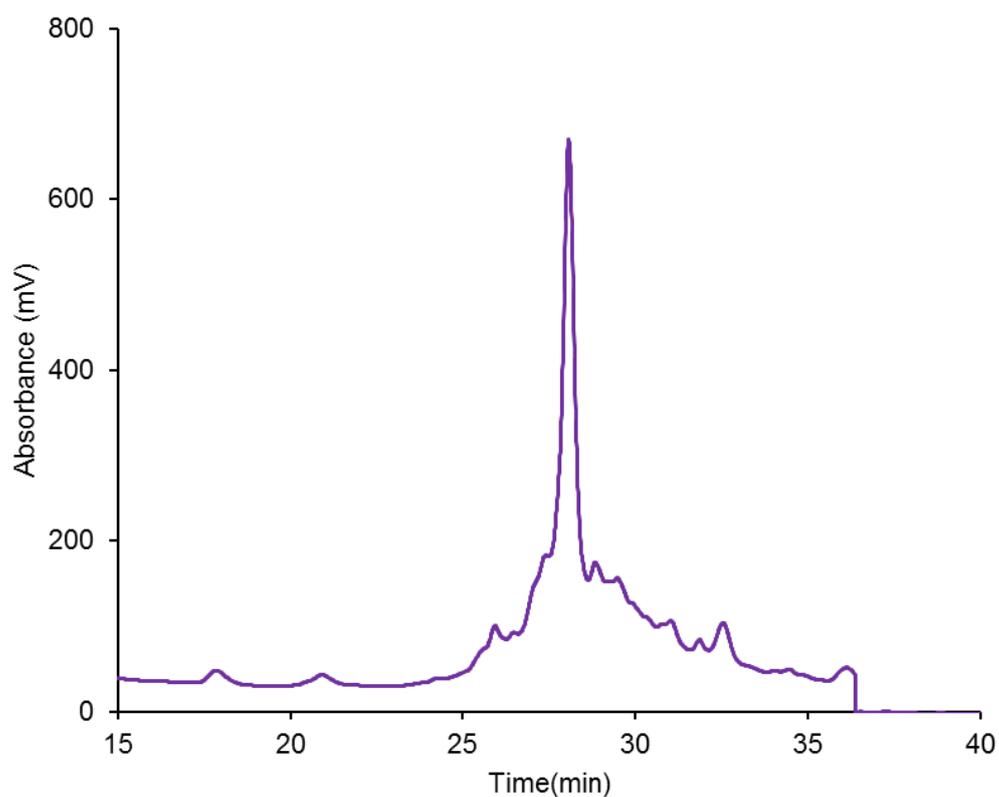


図 15. シュードプロリンジペプチドを用いた固相法による rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の合成
(A) rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ のアミノ酸配列。シュードプロリンジペプチドの挿入位置を赤字で示す。
(B) 合成した rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 35–65% ACN over 30 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。

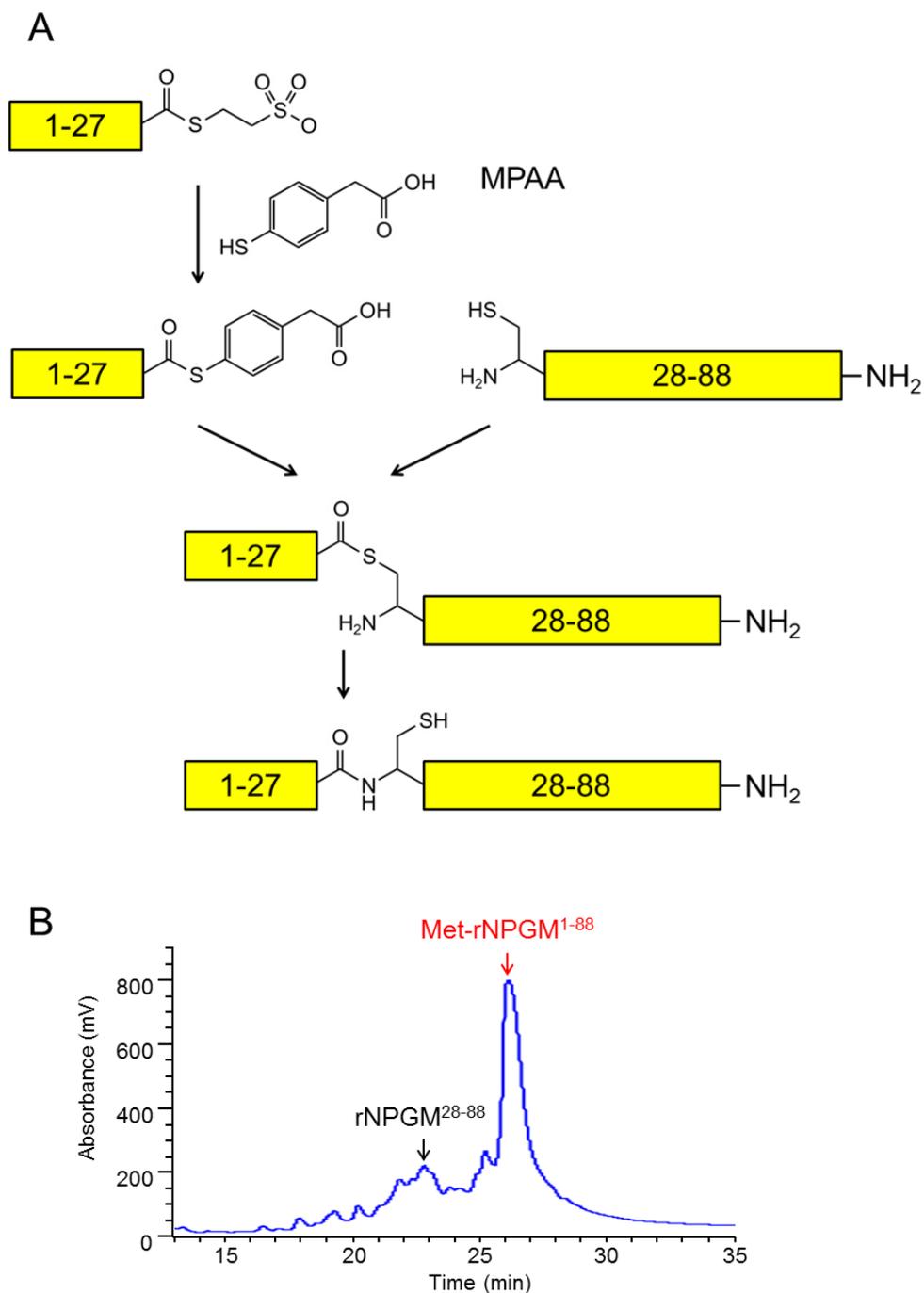


図 16. NCL 法による rNPGM の調製

(A) NCL 反応の模式図。(B) 室温で一晩反応後の反応液の逆相 HPLC クロマトグラム (TSKgel CN-80Ts, 4.6×250 mm; 35–55% ACN over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。縮合された Met-rNPGM¹⁻⁸⁸ が得られた。

4. 考察

4.1. C 末端アミド化法による調製

第 1 章においてアミド化酵素を用いた C 末端のアミド化が困難となったため、Intein を用いた C 末端アミド化法 [Cottingham et al., 2001] による調製を試みた。第 1 章と同様に pCold TF DNA ベクターを用いることによって His-TF-rNPGM-Intein-CBD を可溶性発現させることができた。しかしながら、Co²⁺カラムで精製した際、その溶出液中に目的の His-TF-rNPGM-Intein-CBD の他に His-TF-rNPGM であると考えられるものも混在しており、Intein-CBD が非特異的に切断されてしまう可能性があることがわかった。

Intein-CBD が非特異的に切断されてしまうと rNPGM の C 末端をアミド化することができない。rNPGM-OH と rNPGM-NH₂ を逆相 HPLC によって分離できるかどうかかわからないため、アミド化反応を行う前に、非特異的に切断された His-TF-rNPGM-OH を除去しておくことが望ましい。結果には示していないが、His タグに対するアフィニティーカラムではなく CBD に対するアフィニティーカラムにより精製すれば、

His-TF-rNPGM-OH は保持されないため除去できると考え、キチンカラムでの精製を試みた。しかしながら、His-TF-rNPGM-Intein-CBD はキチンカラムへの保持力が弱く素通りしてしまった。そこで、カラムの底を閉め、サンプル添加後に 1 時間インキュベートを行うことでカラムへ保持させようと試みたが、改善されなかった。

また、アミド化反応と Factor Xa 処理によって His-TF 及び Intein-CBD を切断することができたが、メタノール沈殿によって His-TF 及び Intein-CBD のみならず rNPGM も同様に沈殿してしまい、収率が低かった。分子量の差で分離する限外濾過を用いれば、原理上は His-TF 及び Intein-CBD と rNPGM をわけることが可能であるが、疎水性の高い rNPGM は濾過フィルターへの吸着が懸念される。

最終生成物を MALDI-TOF-MS により解析した結果、His-Met-rNPGM に相当する質量値が得られた。しかしながら、His-Met-rNPGM-NH₂ 及び His-Met-rNPGM-OH の理論質量値はそれぞれ 10429.12 及び 10430.11 であり、分子量が大きい中での約 1 の差を TOF-MS の精度では識別することができなかった。例え C 末端がアミド化されていたとしても、上述のようにフリー体が混在している可能性が高く、収率も低い。従って、Intein を用いた C 末端アミド化法による rNPGM の調製は効率的とは言えなかった。また、この手法を用いた C 末端アミド化ペプチドの調製に関する報告も少ないため、別の手法に変更することにした。

4.2. Native chemical ligation 法による調製

C 末端アミド化法による rNPGM の調製は効率的ではなかったため、同様に Intein の原理を応用した手法である NCL 法による調製を試みた。NCL 法は様々な長鎖で合成困難なペプチドの合成に恩恵をもたらしており [Thapa et al., 2014]、123 残基の造雄腺ホルモン前駆体タンパク質 [Katayama et al., 2010] や 166 残基のエリスロポエチン [Richardson et al., 2008]、203 残基の HIV-1 プロテアーゼ [Torbeev et al., 2007] 等がその成功例としてあげられる。

NCL 法による縮合には Cys 残基が必要であるが、Cys 残基は存在比が約 2% と低いアミノ酸である。そのため、Cys 残基を 1 つも持たないペプチドやタンパク質に NCL 法を適用できないことが問題であった。しかし、NCL 後に Cys 残基を脱硫酸して Ala 残基に変換する手法が開発され [Yan and Dawson, 2001]、Cys 残基を持たないペプチドでも NCL 法により調製することができるようになった。その後様々なアミノ酸の側鎖に SH 基を導入したものが開発され、近年では Val、Lys、Thr、Leu、Pro、Gln、Arg、Asp、Glu、Trp 残基も縮合部位に選択できるようになっている [Malins and Pyne, 2014]。これらは脱硫の必要があるため、縮合部位以外に Cys 残基が存在する場合はそれも同様に脱硫されてしまう。SH 基の硫黄 (S) がセレン (Se) に置換されたものを導入したアミノ酸 (現在利用できるのは Ala [Metanis et al., 2010]、Pro [Townsend et al., 2012]、Phe [Malins and Pyne, 2012]、Asp 残基 [Thompson et al., 2013] の 4 つのみ) を用いれば、TCEP と DTT によって Se のみを脱セレン化できるため、他の Cys 残基が脱硫されることはない。このように技術開発によって現在では様々なアミノ酸残基を縮合部位として選ぶことができるが、rNPGM は 3 つの Cys 残基 (Cys²⁴、Cys²⁸、Cys⁸⁰) を有するため、まずはその 3 つの中から縮合部位を選択することにした。Cys ペプチドの合成の容易さの点から考えれば、最も C 末端側の Cys⁸⁰ が最適であると言える。しかしながらこの場合、ペプチドチオエステルの調製において問題がある。Intein を利用したチオエステル構造の形成効率は目的ペプチドの C 末端のアミノ酸残基に依存することが知られているが、そのアミノ酸残基が Asp 残基の場合は非特異的なクリーベッジが生じやすく、チオエステル化の前に Intein が切離されてしまう傾向があり、一方で、Pro 残基の場合はクリーベッジが生じず、チオエステル化させることができない [Muralidharan and Muir, 2006]。rNPGM の Cys⁸⁰ の N 末側のアミノ酸残基は Asp 残基であるため、ペプチドチオエステルの調製の点から考えると縮合部位として適切ではない。これらのことから、Cys²⁸ を縮合部位に選択した。

Cys²⁸ の N 末側のアミノ酸残基は Thr 残基であり、Intein を用いたチオエステル化反応効率は約 90% であることが知られている。また、チオエステル化反応は pH が高いほど迅速であるが、形成したチオエステルは pH が低い方が安定に保たれる [Kawakami et al., 2009]。そこで、チオエステル化反応時の pH を 8.0 と 6.5 で比較検討したところ、pH 6.5 の方がより収率が高かった。また、一般的に反応速度と温度には相関があることから、温度制御が可能か否かを検討するために 25°C と 4°C での比較検討も行ったが、4°C ではチオエステル化されなかった。pH 6.5 で 25°C の条件において、rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルの収量は 2.7 mg/L であった。

Cys²⁸ を縮合部位に選定すると、Cys ペプチドが 61 残基と長鎖ペプチドになるため、通常の固相法では合成困難である。長鎖ペプチドの調製には組み換え発現系が適しているが、組み換え発現系でペプチドを調製すると通常 N 末端が Met 残基（開始コドン）となるため、Cys ペプチドの調製には適さない。組み換え発現系で Cys ペプチドを調製するために、Factor Xa の認識配列の直下に Cys 残基がくるように設計し、組み換え発現後に酵素消化することで N 末端を Cys 残基にするという方法がある [Erlanson et al., 1996]。しかしながら、rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ は確実に C 末端がアミド化したものとして調製する必要があり、第 1 章で述べたようにアミド化酵素を用いることはできないため、リンクアミドレジンを用いた固相法による合成を試みた。そして、序論で述べたシュードプロリンジペプチドを用いて 10 μmol のスケールで合成したところ、約 11 mg の rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ が得られた。

NCL の反応効率は縮合部位 Xaa-Cys のアミノ酸残基に依存し、Gly 残基のように側鎖が小さなアミノ酸残基であれば数時間以内で効率良く縮合されるが、Pro や Ile、Val 残基のように特に β 位がかさ高いアミノ酸は縮合に数日を要し、最終的な効率も概ね 50% 以下である [Hackeng et al., 1999]。rNPGM¹⁻²⁷ の C 末端は Thr 残基であり、縮合効率が低い傾向があるため NCL 反応に数日を要することが予測されたが、実際には一晩で効率良く縮合されていた。この縮合の速さには Cys²⁴ が関与している可能性がある。Cys 残基が豊富に含まれているペプチドは、MPAA 等のチオールを加えずとも効率良く縮合される例がある。4 つの Cys 残基を持つ 33 残基のオレキシシン A (pQPLPDCCRQKTCSCR LYELLHGAGNHAAGILT-L-NH₂; 縮合部位は Thr¹¹-Cys¹²) や 6 つの Cys 残基を持つ 35 残基のタランチュラ毒プロトキシシン I (ECRYWLGGCSAGQTCCKHLVCSRRHGWCVWD GTFS; 縮合部位は Thr¹⁴-Cys¹⁵)、8 つの Cys 残基を持つ 63 残基のサソリ毒クルトキシシン (KIDGYPVDYWNCKRICWYNNKYCNDLCKGLKADSGYCWGWTLSCYQCQLPDNAR

IKRSGRCRA; 縮合部位は Leu²⁶-Cys²⁷) においては、チオール非存在下でも 20 時間以内に縮合される [Tsuda et al., 2015]。反対に、プロトキシニン I の Cys¹⁵ 以外の 5 つの Cys 残基を Acm 基により保護してしまうと、縮合効率が著しく低下する [Tsuda et al., 2015]。フリーの Cys 残基が NCL 反応を促進するメカニズムとして、N 末側フラグメントに含まれる Cys 残基がその C 末端のアミノ酸残基と反応してチオラクトンを形成し、反応促進に寄与することが示唆されている [Tsuda et al., 2015]。これらのことから、rNPGM においても N 末側フラグメントに含まれる Cys²⁴ が NCL 反応の促進に関与していると考えられる。

上述の通り、rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルと rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の縮合効率は予想より高く、一晩で未反応物は見られなくなった。しかしながら、NCL 反応に用いた rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルと rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の総重量に対して、NCL 反応後に最終的に得られた rNPGM の重量は約 30% であった。124 残基のヒトの分泌型ホスホリパーゼ A2 の合成において、NCL による縮合効率は約 90% であったが、そこから精製を経た結果 50% のロスが生じたという報告がある [Hackeng et al., 1999]。このことから、rNPGM の収率の低さも精製過程における非特異的吸着によるものであり、疎水性の高さに起因していると考えられる。rNPGM¹⁻²⁷ チオエステル及び rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ の収率はそれぞれ 2.7 mg/L 及び 11 mg/10 μ mol スケールであり、いずれも調製に数日を要する。そして、rNPGM¹⁻²⁷ チオエステルと rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ を 1:1 (約 3 mg : 7 mg) で NCL 反応にかけたとき、得られる rNPGM は約 3 mg である。ラットを用いた投与実験でのペプチド必要量は、単回投与では約 1 mg であるが、慢性投与では約 30 mg であることを考えると、NCL 法による rNPGM の調製の収率は十分とは言えないため、収率向上が求められる。

チオエステル化の工程は省くことが可能であり、N 末側ペプチドと Intein の融合タンパク質をキチンカラムに保持させたまま、Cys ペプチドと MPAA を添加して NCL 反応を行うことができる [Muir et al., 1998]。この方法であれば、ペプチドチオエステルの形成反応中のロスや保管中の分解を避けることができ、また、精製や凍結乾燥に要する時間を削減できる。しかしながらこの場合、NCL 反応中も Intein のフォールディング状態を保持しておかなければならないため、変性剤や界面活性剤等を加えることができない。そのため、ペプチドを高濃度で溶解させることが困難であり、縮合効率が低下しやすいという問題がある [Muralidharan et al., 2006]。rNPGM²⁸⁻⁸⁸-NH₂ は疎水性が高く、水系溶媒には溶解しないため、オンカラムでの NCL 法による縮合は困難であると考えられ、収量向上は見込めない。

各フラグメントの収量を飛躍的に向上させることができれば、rNPGM の収量も向上する。本研究ではペプチドチオエステルの調製に Intein の系を用いたが、固相法による化学合成も可能である。チオエステルは塩基に対して不安定であるため、塩基による脱保護を繰り返す Fmoc 法では通常合成することはできないが、スルホンアミドリンカーを用いてペプチドチオエステルを合成する手法がある [Ingenito et al., 1999]。さらにそれを発展させたものとして、ペプチド *N*-アシルスルホンアミドを用いたライゲーシオン法がある [Burlina et al., 2012]。ペプチド *N*-アシルスルホンアミドは固相法により合成することができ、ペプチドチオエステルへの変換の必要がなくそのままライゲーシオン反応へ持ち込むことが可能であり、Cys ペプチドと MPAA を加えるとネイティブなペプチド結合により縮合される [Burlina et al., 2012]。ペプチド *N*-アシルスルホンアミドを合成するためには、レジンにスルファミルブチリルリンカーを導入する必要があるが [Burlina et al., 2012]、リンカー導入の手間を省くために市販の 4-Sulfamylbutyryl Resin (Novabiochem) を用いることもできる。そのリンカーが導入されたレジンを用いて Fmoc 法によりペプチドを合成後、トリメチルシリルジアゾメタン (TMS-CHN₂) によりスルホンアミドをメチル化し、TFA によりクリーベージすると、ペプチド *N*-アシルスルホンアミドを得ることができる [Burlina et al., 2012]。ペプチド *N*-アシルスルホンアミドを用いたライゲーシオン法により実際に 58 残基のウシの膵臓トリプシンインヒビター (RPDFCLEPPYTGPCCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRT CGGA; 縮合部位は Gly³⁷-Cys³⁸) が合成されているが、ライゲーシオンに要する時間は NCL 法による調製のとき [Lu et al., 1998] と同じ約 8 時間であり、代替法として有効である [Burlina et al., 2012]。この手法を用いれば rNPGM¹⁻²⁷ の大量合成が可能になると考えられるが、上述の通りやや特殊な技術を要する。また、TMS-CHN₂ は強い毒性があり呼吸器系に有害であるため、その取扱いには十分な注意が必要である [Murphy et al., 2009]。

第3章 マイクロウェーブを用いた固相法による調製

1. 序文

第2章において、NCL法により確実にC末端がアミド化しているrNPGMを調製することができた。しかしながら、フラグメントに分割したことによって合成や精製の工程が増えてしまい、要する時間や手間に対して十分な収量を得られなかった。NPGL及びNPGMをより迅速かつ大量に調製するためには、作業工程をできるだけ簡略化する必要がある。そのためには、固相法により約80残基を最後まで合成することが最善であると考えられるが、序論でも述べたように、長鎖ペプチドの合成は通常固相法では極めて困難である。しかし近年、長鎖・疎水性ペプチドの合成に有効であるとして、マイクロウェーブを用いた固相法 [Pedersen et al., 2012] やO-アシルイソペプチド法 [Sohma et al., 2004] が注目されている。

マイクロウェーブを用いた固相法とは、アミノ酸の縮合やFmoc基の脱保護の際にマイクロウェーブを照射するというものであり、反応時間短縮や反応効率向上、凝集抑制等の様々な利点がある [Pedersen et al., 2012]。マイクロウェーブが初めて固相法に用いられて以来 [Yu et al., 1992]、徐々にその有用性が評価され、近年ではマイクロウェーブ照射機能を搭載した自動ペプチド合成装置が一般に利用されるようになってきている。従来の自動ペプチド合成装置は反応条件がある程度決められているものが多かったため、目的ペプチドのアミノ酸配列を設定し、弾き出された通りに試薬を調製するだけで合成を行うことができた。一方、近年のマイクロウェーブ照射式自動ペプチド合成装置は、マイクロウェーブ照射時の温度（約40~90℃）や時間、液量、洗浄回数、攪拌強度等、反応工程毎に細かくカスタマイズできるようになっている。マイクロウェーブを用いた固相法では、各反応における設定温度や反応時間が収量に大きく影響するが、それは一概に向上とは限らない。マイクロウェーブの照射によって様々な副反応のリスクも高まるため、かえって純度が低下したり精製が困難になったりする可能性がある。そのため、通常固相法よりも各種合成条件を目的ペプチドに合わせて慎重に検討しなければならない。また、縮合剤や脱保護剤、レジン、アミノ酸の側鎖の保護基にも、縮合効率や脱保護効率を上げるものだけでなく、凝集や各種副反応を抑制するもの等、様々なものが開発されている。それらの組み合わせが目的ペプチドの収率を大きく左右する。

O-アシルイソペプチド法とは、OH基含有アミノ酸残基（Ser・Thr）において、NH₂基のアシル化（ペプチド結合）の代わりに側鎖OH基をアシル化（エステル結合）して

ペプチドを合成する方法である (図 17) [Sohma et al., 2007]。O-アシル構造を有することでペプチドの二次構造形成が阻害され、凝集性が低くなり、溶解性も飛躍的に向上する。O-アシル結合は非ネイティブな結合であるが、中性条件下におくと O-to-N 分子内アシル転移を生じ、ネイティブなペプチド結合に戻すことができる (図 17) [Sohma et al., 2007]。言い換えれば、クリーベージ後も中性条件下におくまでは O-アシル結合を維持できるということであり、合成時のみならず、バイオアッセイ等に用いる直前までその凝集抑制効果が期待できるという利点がある。近年では、O-アシル結合により結合したジペプチドが市販されており、合成の際に導入することで O-アシルイソペプチドを得ることができる。さらに、光解離性保護基を用いてペプチド結合への復元を紫外線照射により時間的・空間的に制御するなど、開発・応用が進んでいる [Taniguchi et al., 2006; Taniguchi et al., 2008]。

本章では、マイクロウェーブを用いた固相法による rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の合成を試み、はじめに、縮合条件と脱保護条件の最適化を行った。その後、rNPGL、rNPLM、cNPGL、cNPGM の合成効率を比較したところ、rNPGM の収率がとりわけ低かったため、2 通りの方策で収率向上を試みた。1 つ目の方策として、O-アシルイソペプチド法による収率向上を試みた。rNPGM の Leu³⁰-Thr³¹ 部分に O-アシル結合の導入を試み、ジペプチドの縮合条件やその後の脱保護条件、O-to-N アシル転移反応条件を検討した。2 つ目の方策として、部分配列のプレ合成による収率向上を試みた。rNPGM の中の数残基のアミノ酸配列を先に合成し、全長を合成する際にそのペプチドを導入すれば、合成効率を向上できるのではないかと考えた。そこで、プレ合成に適した領域を検討し、N 末側にある "GVLGI" と、中央部にある "FMLFL" を合成することにした。また、rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の全てにおいて、シュードプロリンジペプチドを導入し、収率向上を試みた。加えて、rNPGL と rNPGM において、合成困難な領域を調べた。rNPGL については、合成の合間にレジンを少量回収し、ペプチド鎖の伸長経過を調べた。rNPGM については、N 末側の 39 残基 (rNPGM¹⁻³⁹)、中間部の 20 残基 (rNPGM⁴⁰⁻⁵⁹)、C 末側の 29 残基 (rNPGM⁶⁰⁻⁸⁸)、の 3 つの領域に分割してそれぞれを合成し、収率を比較した。

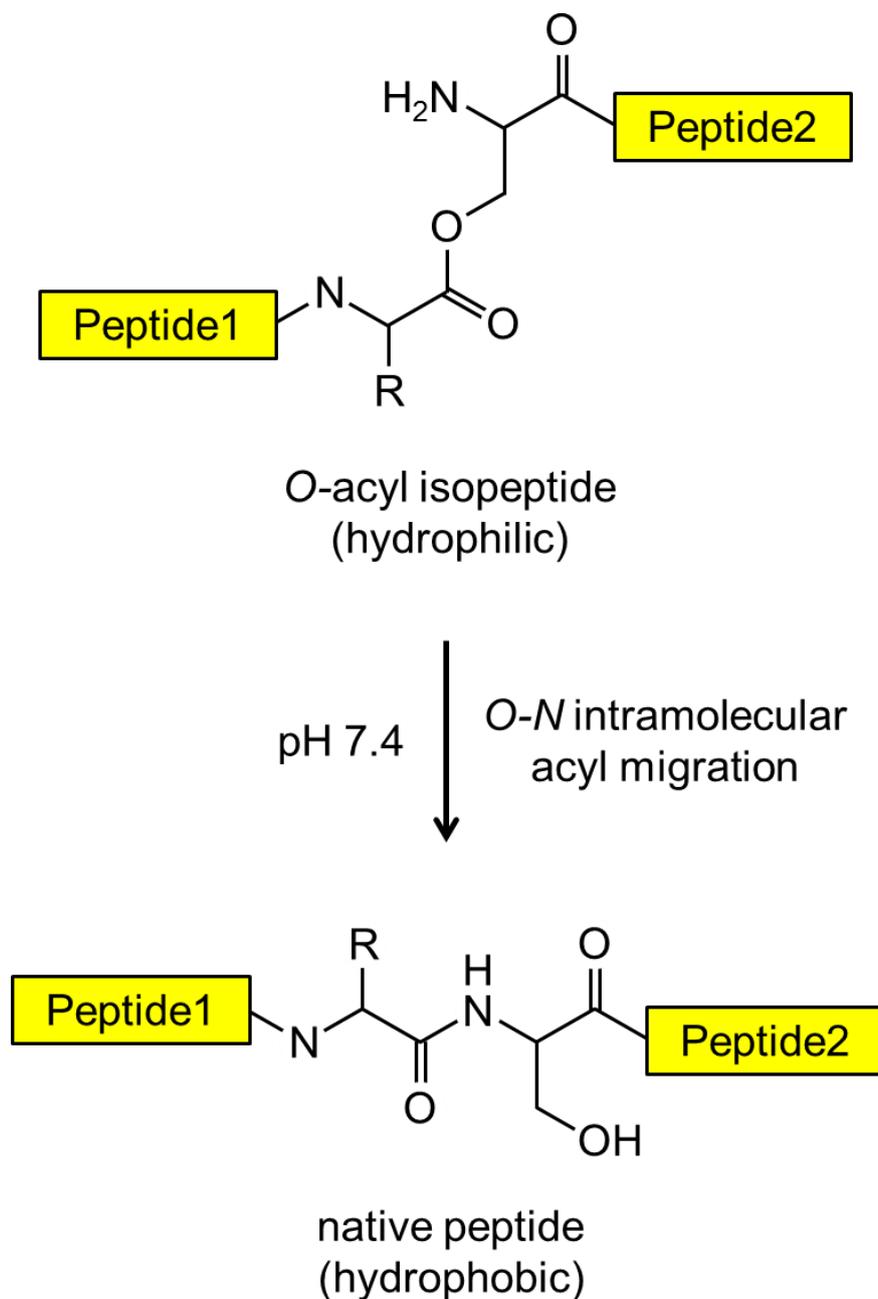


図 17. O-アシルイソペプチド法 [Sohma et al., 2007]

OH 基含有アミノ酸残基 (Ser・Thr) において、NH₂基のアシル化 (ペプチド結合) の代わりに側鎖 OH 基をアシル化 (エステル結合) してペプチドを合成する方法。O-アシル構造を有することでペプチドの二次構造形成が阻害され、凝集性が低くなり、溶解性が飛躍的に向上する。O-アシル結合は、中性条件下におくと O-to-N 分子内アシル転移を生じ、ペプチド結合に戻る。

2. 方法

2.1. 試薬類

Fmoc アミノ酸誘導体、*O*-アシルイソジペプチド {Boc-Thr(Fmoc-Leu)-OH}、シュードプロリンジペプチド {Fmoc-Leu-Ser(psiMe, MePro)-OH, Fmoc-Leu-Thr(psiMe, MePro)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-Ser(psiMe, MePro)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-Ser(psiMe, MePro)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-Ser(psiMe, MePro)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-Ser(psiMe, MePro)-OH} は、Novabiochem より購入した。Fmoc アミノ酸誘導体の側鎖の保護基は、Asn・Cys・Gln・His は Trt 基、Asp・Glu は OtBu 基、Arg は Pbf 基、Lys・Trp は Boc 基、Ser・Tyr は tBu 基のものを用いた。Rink Amide-ChemMatrix resin (Matrix Innovation, Quebec, Canada) はバイオタージ・ジャパン (東京、日本) より、Fmoc-Ile-Resin、Fmoc-Leu-Resin、Fmoc-Lys-Resin、Fmoc-Arg-Resin、TGS-RAM は島津製作所より購入した。HATU は AAPPTec (KY, USA) より、HBTU、HOAt、HOBt は渡辺化学工業 (広島、日本) より、COMU はシグマアルドリッチ (MO, USA) より、PyBOP は島津製作所より購入した。ピペリジン、ピペラジン、DIEA、NMP、TFA、ジエチルエーテルはナカライテスクより購入した。チオアニソール、EDT、1-メチルピロリジン、ヘキサメチレンイミン、エチルメチルスルフィド、2-メチルインドールは東京化成工業より購入した。フェノール、DCM はシグマアルドリッチより購入した。DIPCI は渡辺化学工業より、NMM は片山化学工業より、DMF は和光純薬工業 (大阪、日本) より購入した。

2.2. rat NPGL、rat NPGM、chicken NPGL、chicken NPGM の合成

マイクロウェーブ照射式ペプチド自動合成装置 Syro Wave (Biotage, Uppsala, Sweden) を用いて合成した。レジンは Rink Amide-ChemMatrix resin (0.5 mmol/g) を使い、50 μ mol のスケールで合成した。各反応及び洗浄は 3 ml で行った。縮合反応は表 7 に示す条件で行い、Arg 残基はダブルカップリングを行った。*O*-アシルイソジペプチド導入時は、Boc-Thr(Fmoc-Leu)-OH/HOAt/DIPCI (4:4:4.4 equiv.)/DCM を用いて、室温で 2 時間行った。脱保護反応は、40% ピペリジン/DMF または 40% ピペリジン/0.1 M HOBt/DMF または 5% ピペラジン/0.1 M HOBt/DMF を用いて、50°C で 3 分間行った。*O*-アシルイソジペプチド導入後は、reagent A (25% 1-メチルピロリジン、2% ヘキサメチレンイミン、3% HOBt/NMP:DMF = 1:1) を用いて室温で 20 分間行った。合成終了後、DCM で 3 回洗浄し、室

温で乾燥させた後、 -20°C で保存した。

クリーページは、10 ml の reagent K (TFA 82.5%、フェノール 5%、チオアニソール 5%、 H_2O 5%、EDT 2.5%) [King et al., 1990] を用いて室温で 3 時間行い、冷ジエチルエーテルで沈殿させ、室温で乾燥させた。沈殿物を DMSO で溶解し、逆相 HPLC により、カラム：C18 (YMC-Pack Pro C18、 10×150 mm ; YMC)、流速：1.0 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 40–60%、40 分間)、検出：280 nm の条件で精製した。

2.3. O-アシルイソペプチドの O-to-N アシル転移

O-アシル型 rNPGM 400 μg を 40 μl の DMSO で溶解し、20 μl ずつに分けた。一方を pH 7.3 の PBS で 10 倍希釈し、1 時間後、遠心分離して沈殿を回収し、DMSO 100 μl で溶解した。それぞれを逆相 HPLC により、カラム：C18 (YMC-Pack Pro C18、 10×150 mm ; YMC)、流速：1.0 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 40–60%、40 分間)、検出：280 nm の条件で精製した。

2.4. rNPGM の部分配列の合成

合成装置 Syro Wave を用いて、通常の固相法により rNPGM の部分配列である GVLGI と FMLFL を合成した。レジンはそれぞれ Fmoc-Ile-Resin と Fmoc-Leu-Resin を用い、100 μmol のスケールで合成した。縮合反応は、アミノ酸/HBTU/HOBt $\cdot\text{H}_2\text{O}$ /DIEA (3:3:3:6 equiv.) を用いて 60 分間行った。脱保護反応は、20% ピペリジン/DMF を用いて 3 分間と 15 分間の 2 回行い、最後の N 末端の Fmoc 基は残した。合成終了後、DCM で 3 回洗浄し、室温で乾燥させた後、 -20°C で保存した。

クリーページは、3 ml の reagent K (TFA 82.5%、フェノール 5%、チオアニソール 5%、 H_2O 5%、EDT 2.5%) [King et al., 1990] を用いて室温で 1 時間行い、冷ジエチルエーテルで沈殿させ、室温で乾燥させた。沈殿物を 1 ml の DMSO で溶解し、逆相 HPLC により、カラム：C18 (YMC-Pack Pro C18、 10×150 mm ; YMC)、流速：1.0 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配、検出：280 nm の条件で精製した。

2.5. rNPGM¹⁻³⁹、rNPGM⁴⁰⁻⁵⁹、rNPGM⁶⁰⁻⁸⁸の合成

合成装置 PSSM-8 (島津製作所) を用いて、通常の固相法により合成した。レジンはそれぞれ Fmoc-Lys-Resin (0.59 mmol/g)、Fmoc-Arg-Resin (0.46 mmol/g)、TGS-RAM (0.24 mmol/g) を用い、9 μ mol のスケールで合成した。縮合反応は、アミノ酸/PyBOP/HOBt \cdot H₂O/NMM (10:10:10:15 equiv.) を用いて、3 分間の活性化の後、30 分間行った。脱保護反応は、30%ピペリジン/DMF を用いて 4 分間を 2 回行った。合成終了後、メタノールで洗浄し、乾燥させた。

クリーベージは、2 ml のカクテル (TFA 82%、チオアニソール 5%、H₂O 5%、フェノール 3%、EDT 3%、エチルメチルスルフィド 2%、2-メチルインドール 20 mg) を用いて室温で 6 時間行い、冷ジエチルエーテルで沈殿させ、室温で乾燥させた。沈殿物を DMSO で溶解し、逆相 HPLC により、カラム : C18 (YMC-Pack Pro C18、10 \times 150 mm ; YMC)、流速 : 1.0 ml/min、溶出 : A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配、検出 : 280 nm の条件で精製した。

2.6. 質量分析

生成物の質量分析は、ESI-MS により、LTQ Orbitrap XL 及び Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。主な理論質量値を表 6 に示す。

表 6. 各生成物の理論質量値一覧

	[M+H] ⁺ (average)	[M+H] ⁺ (monoisotopic)
rNPGL (SH)	9348.78	9342.60
rNPGM (SH)	10167.82	10161.02
cNPGL (SH)	9183.62	9177.59
cNPGM (SH)	9620.21	9613.76

3. 結果

3.1. rat NPGL における合成条件の最適化

3.1.1. 縮合条件の最適化

マイクロウェーブによる加熱はFmocの脱保護及びアミノ酸の縮合の両方に有効であるが、特に縮合に対して効果的である [Malik et al., 2010]。そこで、まず縮合条件（試薬、温度、時間）の検討を行った。全ての脱保護は40%ピペリジン/DMFを用いて50°C-3分の条件で行った。

まず、最も一般的な縮合剤及び補助剤であるHBTU及びHOBtを用いて、50°C-5分の条件で合成を試みた。その結果、メインピークはブロードであったものの、rNPGLを合成することができ、収率は約6%であった（表7、図18A）。次に、縮合剤及び補助剤を変えて収率向上を試みた。HBTUより縮合能が高い試薬として、HATUやCOMUが知られている。まず、HBTUと価格が同程度であるCOMUと、補助剤としてHOAtを用いて合成を試みたが、rNPGLを合成することはできなかった（表7）。そこで、極めて縮合能が高く、エピ化防止や立体障害克服の点で優れており、価格も高いHATUを使用したところ、rNPGLの収率が10%に向上した（表7、図18B）。続いて、マイクロウェーブの照射条件（反応温度・反応時間）を検討した。反応温度を50°Cから60°Cに上げて合成を行った結果、収率に顕著な差は見られなかった（表7、図18C）。また、反応時間を5分から10分にしたところ、rNPGLは得られず、主生成物は質量値5190.64の短いものであった（表7、図18D）。

上記の結果から、rNPGLの合成における縮合反応はHATUを用いて50°C-5分の条件が最も適していた（表7）。

表7. rNPGL合成時の縮合条件及び収率一覧

	Reagent	Equiv.	Temp. (°C)	Time (min)	Yield (%)
1	AA/HBTU/HOBt/DIEA	4/3.6/4/8	50	5	6
2	AA/COMU/HOAt/DIEA	4/3.6/4/8	50	5	—
3	AA/HATU/DIEA	4/4/8	50	5	10
4	AA/HATU/DIEA	4/4/8	60	5	8
5	AA/HATU/DIEA	4/4/8	50	10	—

3.1.2. 脱保護条件の最適化

Asp 残基を含むペプチドにおいて、ピペリジンを用いた脱保護時に副反応としてアスパルチミド (分子量-18) やピペリジド (分子量+67) が形成されるおそれがある [Dolling et al., 1994]。マイクロウェーブの照射はそれらの形成リスクを増加させるが、ピペリジンをより反応性の穏やかなピペラジンに置換したり、HOBt を添加したりすることによって軽減させることができる [Palasek et al., 2007]。rNPGL は 6 つの Asp 残基を含んでいるため、脱保護条件の検討を行った。縮合反応は HATU を用いて 50°C-5 分の条件で行った。

まず、40%ピペリジンに 0.1 M HOBt を添加し、50°C-3 分の条件で脱保護を行い、逆相 HPLC により精製した (図 19A)。その主生成物を回収し、再度逆相 HPLC で精製した (図 19B)。そのメインピークと肩ピークを ESI-MS により解析したところ、メインピークからは rNPGL が検出されたが、溶出の早い方の肩ピーク中にピペリジドと考えられる副生成物がわずかに混在していた (図 19C)。また、酸素が 1 つまたは 3 つ付加したものと考えられる副生成物も検出された (図 19C)。次に、40%ピペリジンを 5%ピペラジンにし、0.1 M HOBt を添加して同様に合成と解析を行った (図 19D-F)。ESI-MS の結果、アスパルチミドやピペリジドの形成は見られなかったが、Gln 残基や Cys 残基が欠落したものと考えられる副生成物が混在していた (図 19F)。これらの結果から、アミノ酸の欠落がより少ない 40%ピペリジン/0.1 M HOBt を用いることにした。

3.2. rat NPGM、chicken NPGL、chicken NPGM の合成

rNPGL の合成において、縮合反応は HATU を用いて 50°C-5 分、脱保護反応は 40%ピペリジン/0.1 M HOBt を用いて 50°C-3 分の条件がより適していたため、同様の条件で rNPGM、cNPGL、cNPGM の合成を試みた。それぞれの合成物を逆相 HPLC により精製したところ、rNPGM においては 2 つのピークに分かれ、溶出の遅い方のピークは目的の rNPGM であったが、溶出の早い方のピークは酸素が 1 つ付加したものと考えられる酸化物であった (図 20A)。cNPGL においては比較的収率が良かったが、逆相 HPLC において主生成物より疎水性側にも同じ分子量を持つピークが見られ、何らかの副生成物が生じていた (図 20B)。cNPGM においては主生成物の他に Trt 基が脱保護されていないものも多く見られた (図 20C)。rNPGL の収率は 10%であったのに対し、rNPGM、cNPGL、cNPGM の収率はそれぞれ約 2%、12%、6%であり、大きなばらつきが見られた。

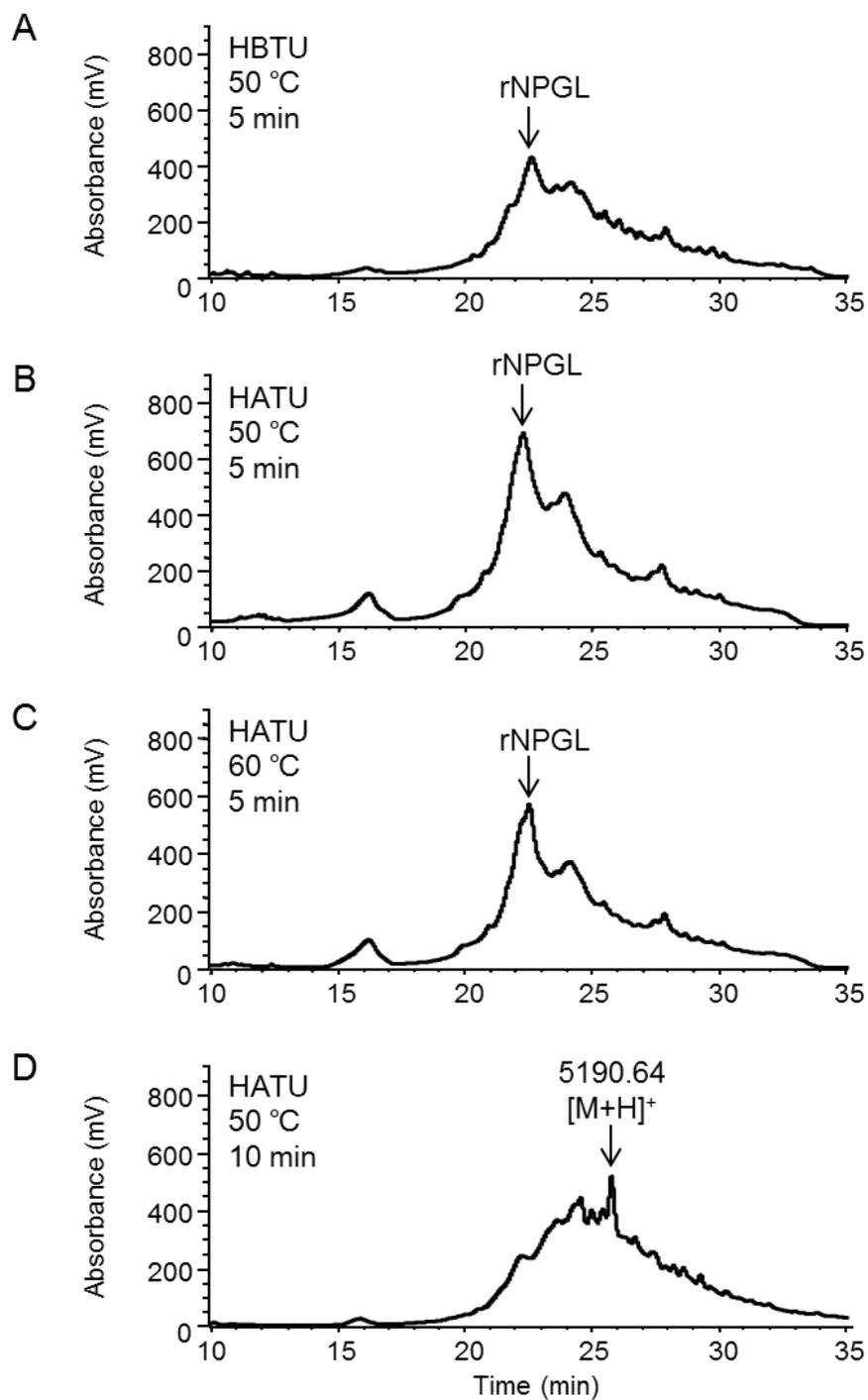


図 18. rNPGL の合成における縮合条件の検討

(A) HBTU を用いて 50°C-5 分、(B) HATU を用いて 50°C-5 分、(C) HATU を用いて 60°C-5 分、(D) HATU を用いて 50°C-10 分の条件で縮合したときの合成物の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 40–60% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。HATU を用いて 50°C-5 分 (B) の条件が最も良い。

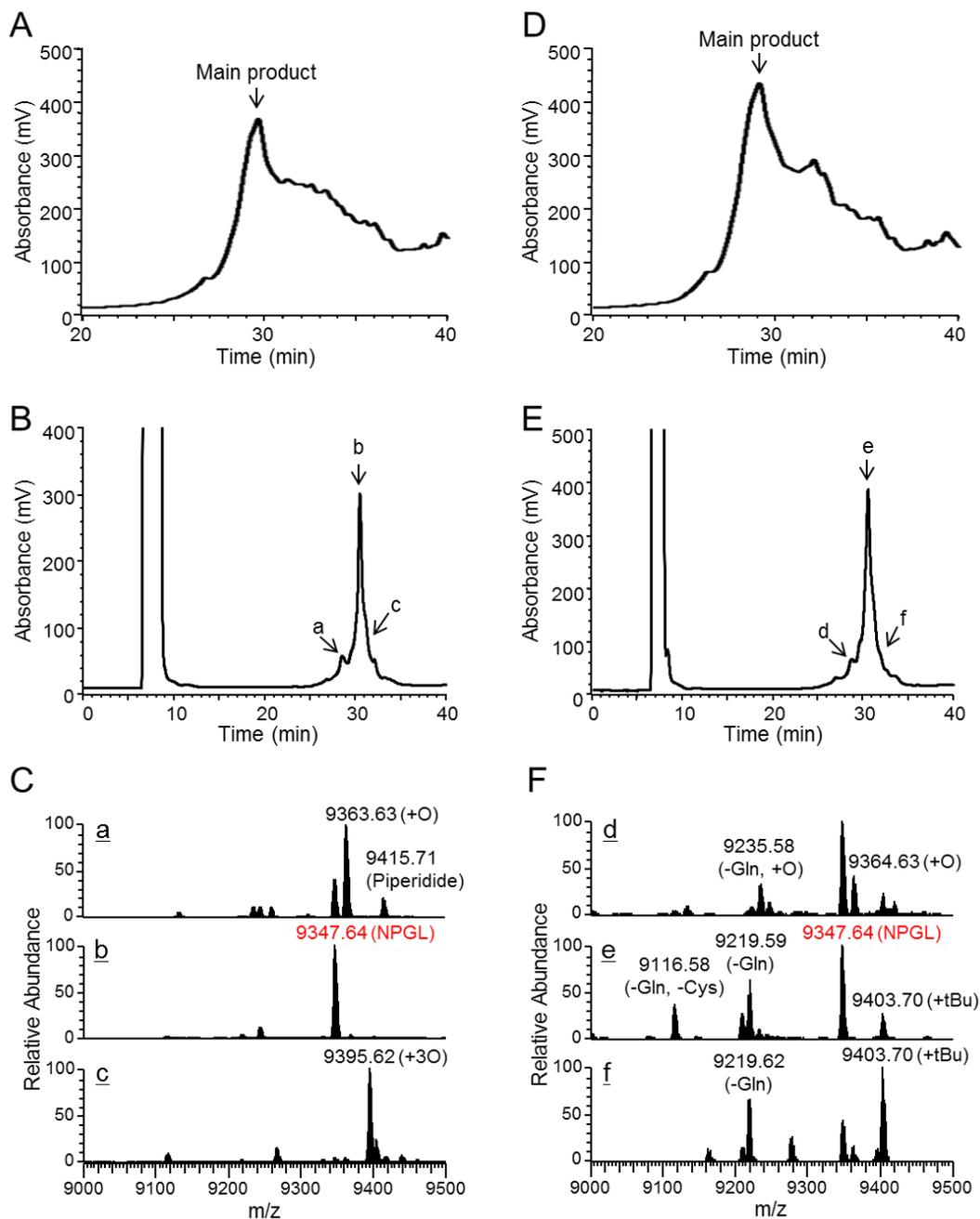


図 19. rNPGL の合成における脱保護条件の検討

(A~C) 40%ピペリジン/0.1 M HOBt を用いて脱保護したときの rNPGL の逆相 HPLC と ESI-MS。(D~F) 5%ピペラジン/0.1 M HOBt を用いて脱保護したときの rNPGL の逆相 HPCL と ESI-MS。(A, D) 各合成物の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 40–60% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。(B, E) 各主生成物の再精製(同条件)。(C, F) 各主生成物及び副産物 (B-a, b, c; E-d, e, f) の ESI-MS。40%ピペリジン/0.1 M HOBt ではわずかにピペリジドが見られ、5%ピペラジン/0.1 M HOBt では Gln や Cys 残基の欠落が見られた。

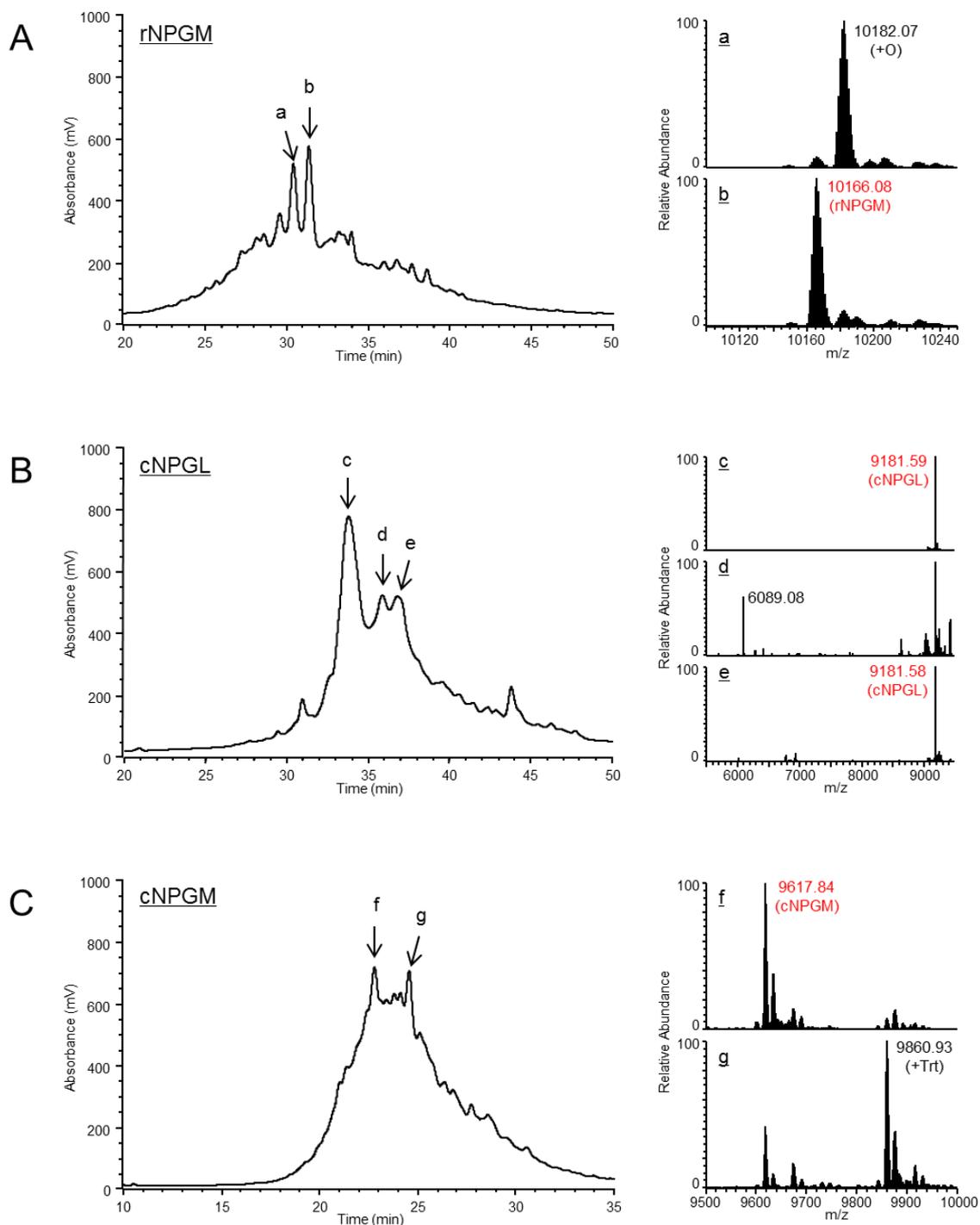


図 20. rNPGM、cNPGL、cNPGM の合成

(A) rNPGM、(B) cNPGL、(C) cNPGM の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 1.0 ml/min; 280 nm; rNPGM, cNPGL, 40–60% ACN over 40 min; cNPGM, 35–65% ACN over 30 min) と各主生成物及び副生成物 (a~g) の ESI-MS。

3.3. rat NPGM の収率向上条件検討

3.3.1. *O*-アシルイソペプチド法を用いた合成

同じ縮合及び脱保護条件で rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM を合成して収率を比較した結果、rNPGM の収率が最も低かったため、*O*-アシルイソペプチド法により収率向上を試みた。Leu³⁰-Thr³¹ を *O*-アシルイソジペプチドに置換し (図 21A)、*O*-アシルイソジペプチド導入時はジペプチド/HOAt/DIPCI/DCM を用いて室温で 2 時間反応させ、それ以外の条件はこれまでと同様にして合成した。その結果、*O*-アシル結合部分で切断された rNPGM³¹⁻⁸⁸ と考えられる質量値 8553.20 のものが得られた (データ非表示)。そこで、Leu³⁰-Thr³¹ 導入後の脱保護を Reagent A (25%メチルピロリジン、2%ヘキサメチレンイミン、3% HOBt/ NMP:DMF = 1:1) [Yoshiya et al., 2009] に変えて室温で 20 分にしたところ、ネイティブな rNPGM の溶出位置より約 3%親水性側にピークが現れた (図 21B)。ESI-MS の結果、rNPGM に相当する質量値 10166.07 が検出されたが、Thr¹⁷ が縮合されず N 末端がグアニジル化された rNPGM¹⁸⁻⁸⁸ と考えられる不純物 (質量値 8537.21) も混在していた (図 21B,E)。また、それぞれの酸化物も見られた (図 21B,E)。回収した主生成物を再度逆相 HPLC により精製したが、それらの不純物を除去することはできなかった (図 21C,E)。やむを得ず、不純物が混在したままの状態での *O*-to-*N* アシル転移反応を行った。凍結乾燥した *O*-アシル型の rNPGM を少量の DMSO で溶解後、pH 7.3 の PBS で 10 倍希釈したところ、すぐに白濁した。その沈殿物を DMSO で溶解して逆相 HPLC により精製したところ、希釈前の 26 分のメインピークが減少して 29 分に新たなピークが現れた (図 21D)。このことから、rNPGM が *O*-アシル型から *N*-アシル型になり、ピークがシフトしたと考えられた。しかしながら、ESI-MS の結果、ピークシフトが生じたのは rNPGM ではなく、グアニジル化した rNPGM¹⁸⁻⁸⁸ と考えられる不純物の方であった (図 21E)。また、合成効率も約 1.5%であり、*O*-アシルイソジペプチドを用いずに合成した時の 2%を下回っていた。これらの結果から、*O*-アシルイソペプチド法による rNPGM の収率向上は困難であった。

3.3.2 部分配列のプレ合成

O-アシルイソペプチド法による rNPGM の収率向上は困難であったため、部分配列のプレ合成により収率向上を試みることにした。数残基のペプチドであれば確実に合成す

ることができるため、それを先に調製し、Fmoc アミノ酸と同じ要領で縮合すれば、収率を向上させることができるのではないかと考えた。すなわち、数残基のペプチドを合成し、N末端のFmoc基は残したままクリーベージする。そこでまず、プレ合成に適した配列を探した。一度クリーベージをするということは、側鎖の保護基も全て外れてしまうということであり、反応性の高い側鎖を持つアミノ酸を含む配列はドメインに不向きである。そこで、側鎖に保護基のないアミノ酸が連続する領域であればプレ合成に適していると考え、それに該当するAla、Leu、Phe、Gly、Val、Ile、Met、Pro残基の位置を調べた。その結果、N末側にGVLGI、中央部にFLMFLと、5残基以上続く配列が2つあったため、それらを調製することにした(図22A)。GVLGIとFLMFLは短鎖ペプチドであるため通常の固相法により合成した。縮合はHBTUを用いて60分、脱保護は20%ピペリジンを用いて3分と15分の2回の条件で合成し、最後のN末端の脱保護は行わずにFmoc基を残した。それらをクリーベージして逆相HPLCにより精製したところ、GVLGIはアセトニトリル約70%、FLMFLはアセトニトリル約90%で溶出し、いずれも極めて高い疎水性を示した(図22B,C)。収率は、GVLGIが約70%、FLMFLが約80%であった。

合成した2つのペプチドを用いて、マイクロウェーブを用いた固相法によりrNPGMの合成を試みた。脱保護は40%ピペリジンを用いて50°C-3分、縮合はHATUを用いて、通常のアミノ酸のときは50°C-5分、ペプチドのときは長めの50°C-10分の条件で合成した。等量は、通常のアミノ酸は5等量、ペプチドは3等量になるようにした。これらの条件で合成した結果、rNPGMを合成することができた(図22D)。しかしながら、収率は約3%であり、顕著な向上は見られなかった。

3.4. シュードプロリンジペプチドを用いた収率向上

rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGMの全てにおいて、シュードプロリンジペプチドにより収率向上を試みた。シュードプロリンジペプチドを挿入する際は、それら同士が2残基以上離れるように、また、Pro残基と2残基以上離れるようにすることが推奨される。それに従って、rNPGLはLeu⁷-Thr⁸、Ser²⁰-Ser²¹、Asn³⁴-Thr³⁵、Ser⁴⁸-Ser⁴⁹、Leu⁷⁴-Ser⁷⁵の5ヶ所、rNPGMはAsn²⁶-Thr²⁷、Leu³⁰-Thr³¹、Lys⁵⁶-Ser⁵⁷、Tyr⁶³-Ser⁶⁴、Leu⁸²-Ser⁸³の5ヶ所、cNPGLはSer²⁰-Ser²¹、Ser⁴⁸-Ser⁴⁹、Leu⁷⁴-Ser⁷⁵の3ヶ所、cNPGMはSer²³-Ser²⁴、Leu⁷⁷-Ser⁷⁸の2ヶ所をシュードプロリンジペプチドに置換して合成した(図23A)。その結果、rNPGLとcNPGLにおいては副生成物が減少し、rNPGMとcNPGMにおいては収

量向上が見られた (図 23B)。rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の各収率は、シュードプロリンジペプチドを用いずに合成した時が約 10%、2%、12%、6%であったのに対して、シュードプロリンジペプチドを用いて合成すると約 20%、4%、12%、30%であった。rNPGL 及び rNPGM の収率は 2 倍に向上し、cNPGM においては 5 倍に向上した。cNPGL においては収率に顕著な差は見られなかった。

3.5. rat NPGL と rat NPGM の部分配列の合成効率比較

rNPGL 及び rNPGM において、合成困難な領域の同定を試みた。rNPGL においては、マイクロウェーブを用いた固相法による合成の途中でレジンを少量回収し、逆相 HPLC 及び ESI-MS により合成経過を調べた。縮合反応は HATU を用いて 50°C-5 で行い、脱保護反応は 40% ピペリジンを用いて 50°C-3 分で行った。Val³⁶ の縮合が終了した時点でレジンを少量回収して合成経過を調べたところ、極めて効率良く合成されており、アミノ酸の欠落は見られなかった (図 24A-C)。しかしながら、メインピークより疎水性側のピークからも同じ質量値が検出され、何らかの副生成物が生じていた (図 24B,C)。次に、N 末側から 6 番目の Leu 残基の縮合が終了した時点で合成経過を調べたところ、メインピークの中に Ala 残基が欠落したものと考えられる副生成物が混在していた (図 24A-C)。さらに、分子量が約 600~1500 程小さい不純物が多く見られた (図 24B,C)。正確な組成は不明であるが、アミノ酸が欠落したものや途中で伸長が止まったもの、あるいは切断されてしまったものであると考えられる。これらのことから、rNPGL においては Val³⁶ より N 末側に合成困難な領域があることがわかった。

rNPGM においては、N 末側の 39 残基 (rNPGM¹⁻³⁹)、中間部の 20 残基 (rNPGM⁴⁰⁻⁵⁹)、C 末側の 29 残基 (rNPGM⁶⁰⁻⁸⁸) に分け、通常の固相法により合成し、それらの収率を比較した (図 25A)。縮合反応は PyBop と HOBt を用いて 30 分行い、脱保護反応は 30% ピペリジンを用いて 4 分を 2 回行った。その結果、収率は、rNPGM¹⁻³⁹ が 1%、rNPGM⁴⁰⁻⁵⁹ が 24%、rNPGM⁶⁰⁻⁸⁸ が 11% であり、N 末端側の合成効率が極めて低かった (図 25B)。

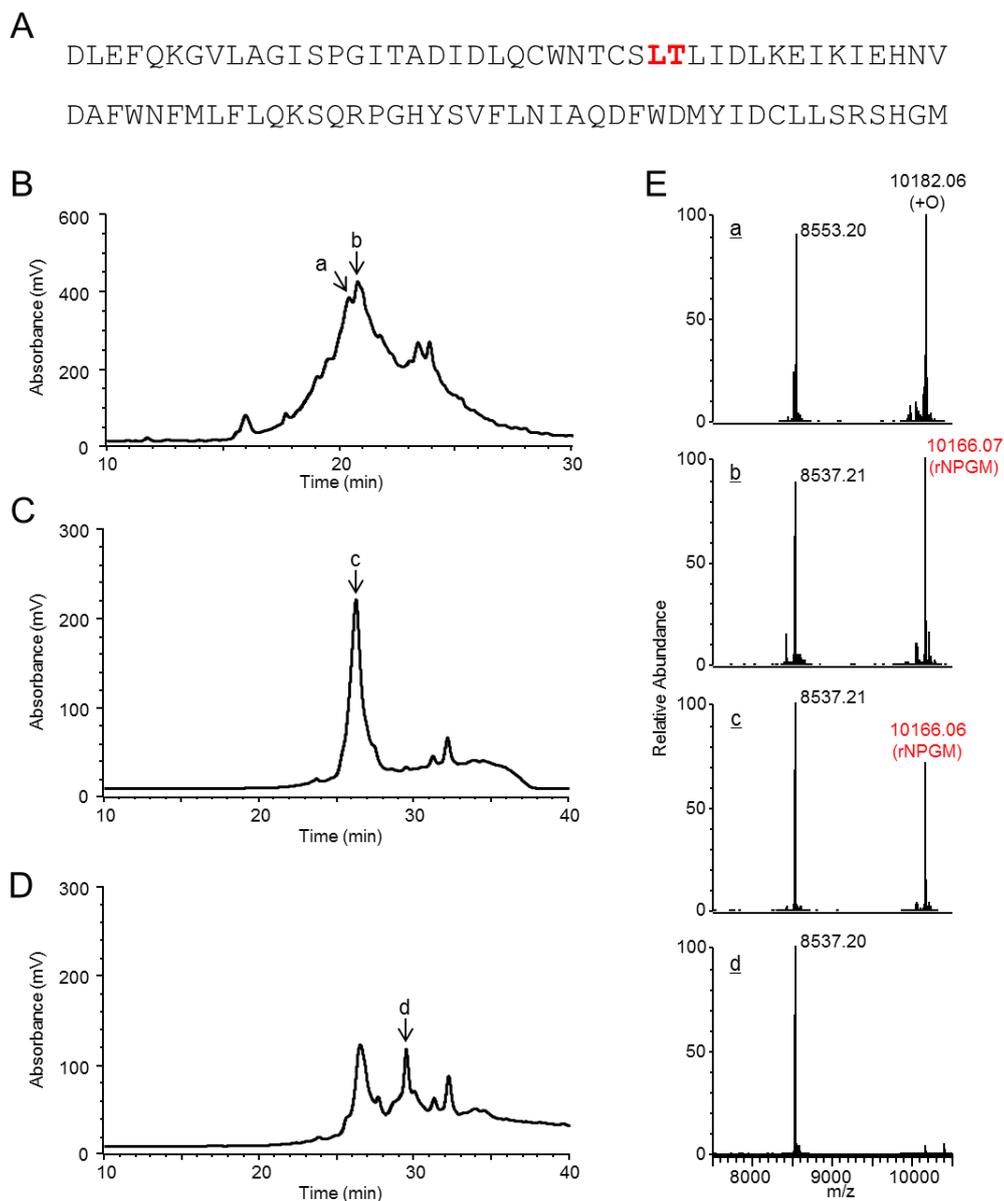


図 21. *O*-アシルイソペプチド法による rNPGM の合成

(A) rNPGM のアミノ酸配列。*O*-アシルイソジペプチド置換位置を赤字で示す。(B) *O*-アシルイソジペプチドを用いて合成した rNPGM の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 40–70% ACN over 30 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。(C) *O*-アシル rNPGM の再精製 (YMC-Pack Pro C18; 40–60% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。(D) *O*-to-*N* アシル転移反応 (pH 7.3, 1 h) 後の逆相 HPLC クロマトグラム (同条件)。(E) 各主生成物 (B-a, b; C-c; D-d) の ESI-MS。*O*-アシルイソジペプチドを用いて rNPGM を合成することができたが、*N* 末端がグアニジル化した rNPGM¹⁸⁻⁸⁸ と考えられる不純物 (質量値 8537.21) も混在しており、1 h の *O*-to-*N* アシル転移反応によりピーシフトが生じたのは不純物のみであった。

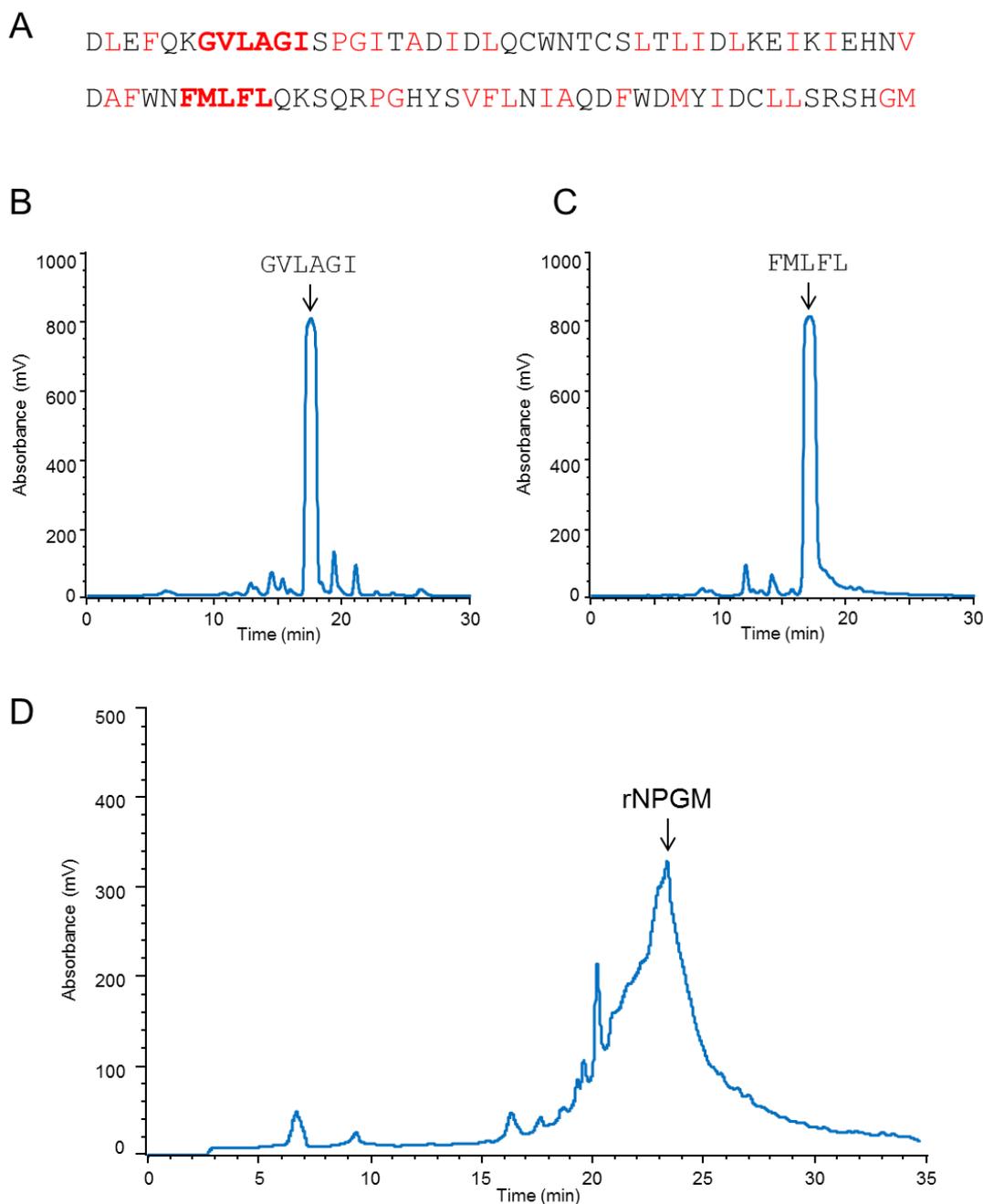


図 22. rNPGM の部分配列のプレ合成

(A) rNPGM のアミノ酸配列。側鎖に保護基のないアミノ酸を赤字で、そのうちプレ合成した部分を赤字で示す。(B) 合成した GVLAGI の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 60–100% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。(C) 合成した FMLFL の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18; 80–100% ACN over 20 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。(D) GVLAGI と FMLFL を用いて合成した rNPGM の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18; 40–70% ACN over 30 min; 1.0 ml/min; 280 nm)。

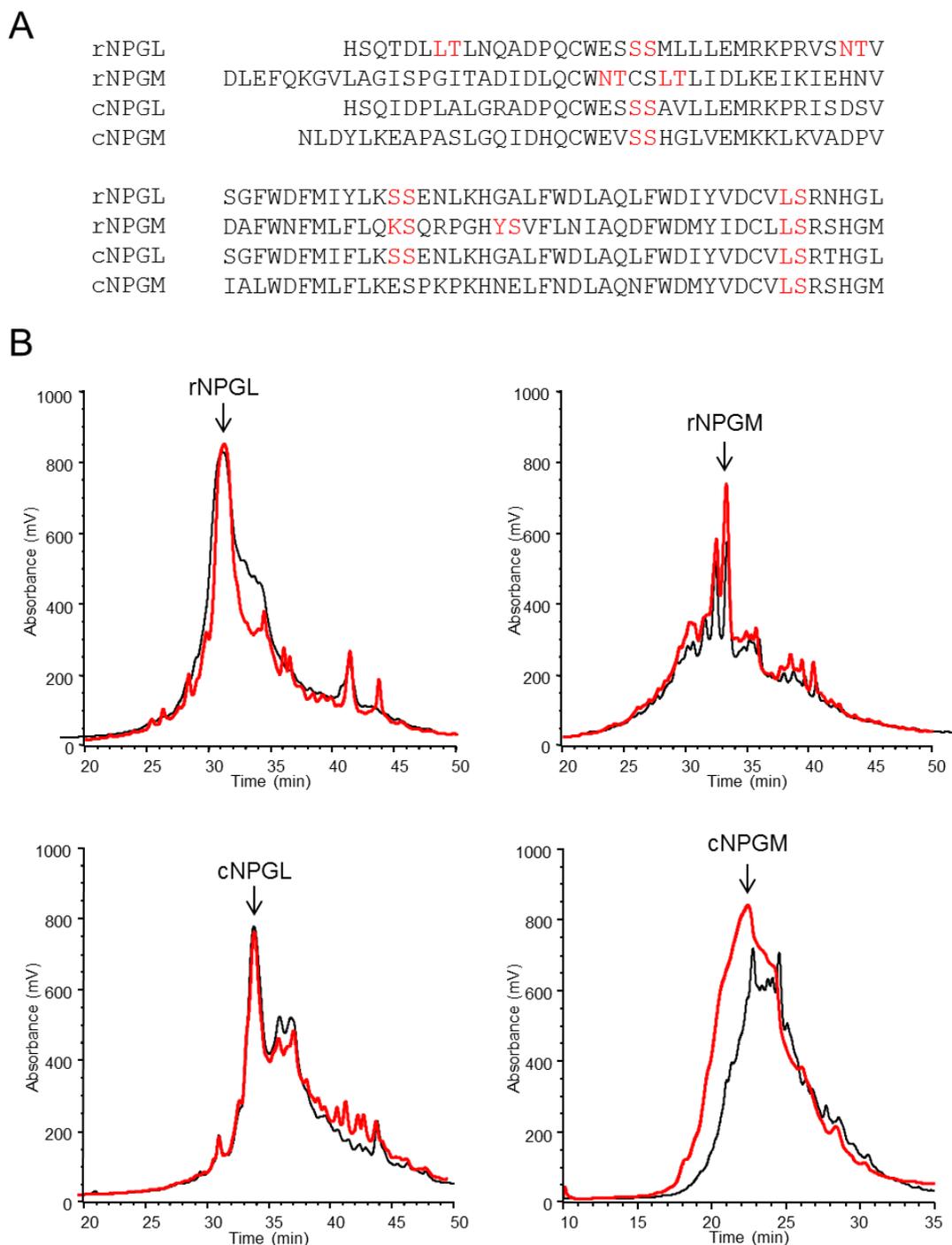


図 23. シュードプロリンジペプチドを用いた NPGL 及び NPGM の合成

(A) シュードプロリンジペプチドの導入位置 (赤字) (B) rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の逆相 HPLC 精製 (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 1.0 ml/min; 280 nm; rNPGL, rNPGM, cNPGL, 40–60% ACN over 40 min; cNPGM, 35–65% ACN over 30 min)。シュードプロリンジペプチドを用いずに合成したものを黒線で、シュードプロリンジペプチドを用いて合成したものを赤線で示す。

A

rNPGM ¹⁻³⁹	DLEFQKGVLAGISPGITADIDLQ C WNT C SLTLIDLKEIK
rNPGM ⁴⁰⁻⁵⁹	IEHNVDAFWNFMLFLQKSQR
rNPGM ⁶⁰⁻⁸⁸	PGHYSVFLNIAQDFWDMYID C LLSRSHGM

B

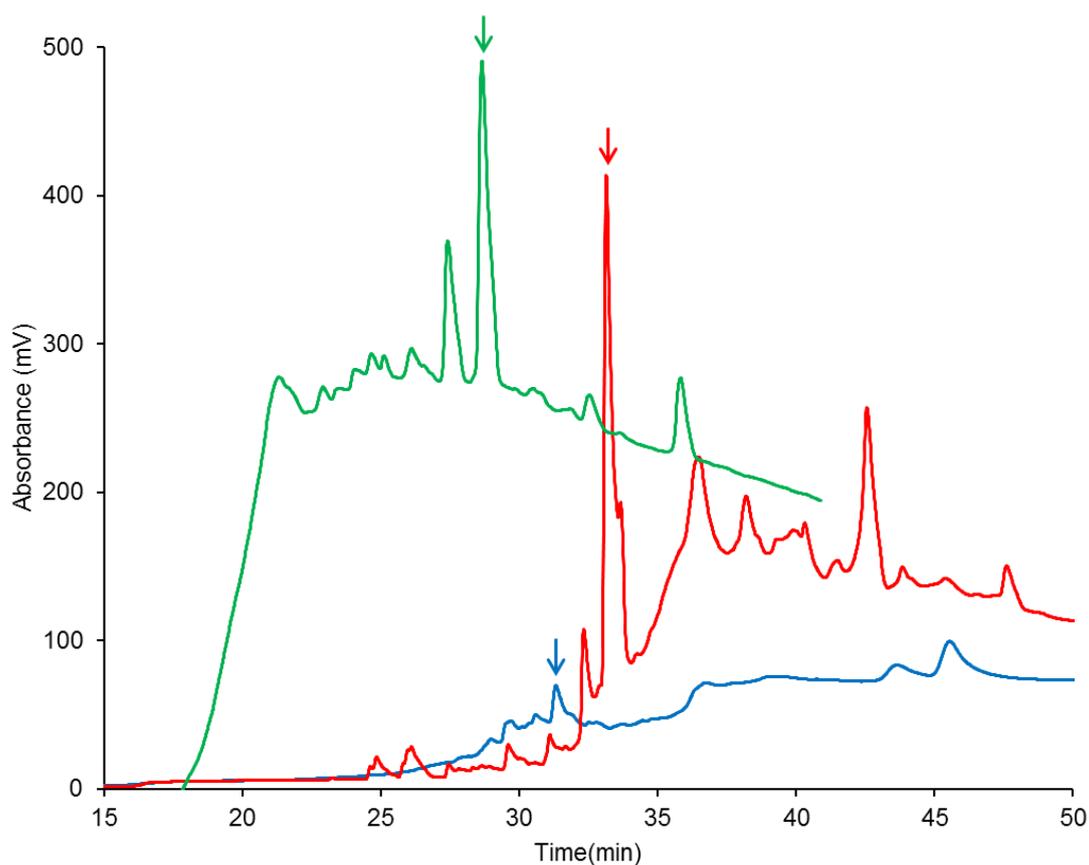


図 25. rNPGM の部分配列の合成効率比較

(A) rNPGM フラグメント 3 種のアミノ酸配列。Cys 残基を太字で示す。(B) rNPGM¹⁻³⁹、rNPGM⁴⁰⁻⁵⁹、rNPGM⁶⁰⁻⁸⁸ の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 1.0 ml/min; 220 nm; rNPGM¹⁻³⁹, 25–65% ACN over 40 min; rNPGM⁴⁰⁻⁵⁹, 20–60% ACN over 40 min; rNPGM⁶⁰⁻⁸⁸, 35–65% ACN over 30 min)。目的物を矢印で示す。rNPGM¹⁻³⁹ が最も合成困難であった。

4. 考察

4.1. 合成条件

マイクロウェーブを用いた固相法は、アミロイドβ [Bacsa et al., 2010] やアミリン [Muthusamy et al., 2010]、マウス白血病ウイルスの CTL エピトープ [Malik et al., 2010]、ハンチントン病原因子ハンチンチン [Singer et al., 2010] など、多くの合成困難なペプチドの合成に効果を発揮している。そこで、マイクロウェーブを用いた固相法による NPGL 及び NPGM の合成を試み、各種合成条件を検討した。

最も古典的なレジンはポリスチレン製であるが、疎水性が高いために長鎖ペプチドの合成には不向きである。それに対してポリエチレングリコール (polyethylene glycol: PEG) を用いたレジンが開発されている。PEG は親水性が高いだけでなく、膨潤しやすい特性があり、ポリスチレンに比べて DMF 中では約 2 倍、TFA 中では約 10 倍に膨潤する。そのため、ペプチド間の距離が離れて凝集が抑制され、合成溶媒や試薬が浸透しやすくなり、効果的に反応を行える。ポリスチレンを PEG で修飾したレジンがあるが、それらは概ね 30 残基程度の中程度のペプチドの合成に適している。本研究では、100% PEG 製である ChemMatrix [García-Martín et al., 2006; García-Ramos et al., 2010] を用いることで約 80 残基の NPGL 及び NPGM を合成することができた。また、近年 CEM 社が開発した SpheriTide も長鎖ペプチドの合成に有効であるとされている。SpheriTide は、バクテリア由来のポリリジンをセバシン酸で架橋してパーティクルを構成したものである。ポリスチレンや PEG はランダムに重合されているのに対し、SpheriTide はポリリジンを用いているため反応点が規則的に並んでいる。そのため、バッチ毎の再現性が良く、1 mmol/g 以上のハイロードでも立体的に効率よく凝集を防ぐことができるとされている。つまり、反応溶液量が少なく済むため合成スケールの拡大が可能である。本研究では 10 ml の反応容器でロード量 0.5 mmol/g の PEG レジンをを用いて 50 μmol のスケールで合成を行ったが、SpheriTide を用いることでより高スケール且つ低ボリュームで 1 回の収量を上げることができると考えられる。

縮合剤には、カルボジイミド系、ウロニウム系、ホスホニウム系、トリアジン系、ピリジニウム系など、様々な種類が存在する [El-Faham and Albericio, 2011]。古くからカルボジイミド系のジイソプロピルカルボジイミド (diisopropylcarbodiimide: DIC) 等がよく用いられており、反応促進やラセミ化抑制のために HOBt 等の補助剤が併用されている [Benoiton and Kuroda, 1981]。HOBt のベンゼン環をピリジン環に置換したものが

HOAt であり、より反応促進及びラセミ化抑制効果が高い [Carpino et al., 1993]。HOBt 及び HOAt を基本骨格としたウロニウム系縮合剤が、HBTU 及び HATU である [Carpino et al., 1993; Abdelmoty et al., 1994]。現在ではこれらが主流になっているが、縮合能の高い HATU は高価であるため、困難でない合成には HBTU が一般的に用いられる。長年 HOBt や HOAt が広く用いられてきたが、これらのベンゾトリアゾール類は爆発性が高いことが問題となり [Wehrstedt et al., 2005]、爆発性のない代替試薬として Oxyma が注目され始めた [Subirós-Funosas et al., 2009a]。Oxyma を基本骨格としたウロニウム系縮合剤が COMU であり [El-Faham et al., 2009]、縮合能の高さが注目されている。HBTU や HATU は、反応性の高いウロニウム塩よりも反応性の低いグアニジウム塩の存在比の方が高いが [Carpino et al., 2004]、COMU はウロニウム塩でのみ存在するという特徴がある [El-Faham et al., 2009]。合成困難なペプチドとしてよく知られている Leu-エンケファリンの Aib (α -アミノイソブタン酸) アナログ (Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu-NH₂) において、HBTU、HATU、COMU を用いて合成したときのそれぞれの収率は 21%、76%、89% であり、COMU の縮合能の高さが示されている [Subirós-Funosas et al., 2009b]。また、COMU は DIEA 等の塩基と反応して呈色する性質を持ち、反応が終了すると変色するため、経過を視覚的に確認することができる [El-Faham et al., 2009]。さらに、COMU は HATU より安価である。rNPGL の合成において HBTU、HATU、COMU を用いたところ、HATU を用いたときの収率が 10% と最も高かった。一方で、HATU と同等以上の縮合能を持つとされる COMU では、rNPGL を全く合成することができなかった。この原因として、縮合剤の安定性が関与していると考えられる。HBTU、HATU、COMU の半減期は、DMF に溶解してオープンバイアルにおいたとき、それぞれ約 5 日、3 日、3 時間であると報告されている [Tofteng et al., 2012]。80 残基の rNPGL の合成には約 2 日を要するため、COMU より HATU の方が適していたと考えられる。

マイクロウェーブの照射はアミノ酸の縮合や Fmoc 基の脱保護効率を上げる反面、Cys や His 残基のラセミ化のリスクも高めてしまう。ラセミ化は目的物の収率低下を招くだけでなく、一般的に目的物との分離が困難であることも問題である。30 アミノ酸残基からなるニューロペプチド W (WYKHAVSPRYHTVGRASGLLMGLRRSPYLW) の場合、11 番目の His 残基がラセミ化したものはネイティブなものと同様に似た性質を示し、逆相のみならずイオン交換 HPLC でも分離することができない [Hibino et al., 2012]。従って、ラセミ化は最小限に留めなければならない。ラセミ化のリスクは縮合温度を 50°C 以下にすることで抑えることができる [Palasek et al., 2007]。rNPGL の合成において、縮

合温度が 50°C と 60°C では収率に顕著な差は見られなかったため、よりラセミ化のリスクが低い 50°C が適していると判断した。また、His 及び Cys 残基の保護基として一般的に広く利用されている Trt 基 [Barlos et al., 1982] を用いたが、ラセミ化を効果的に抑制することができる保護基として Ddm 基や Dpm 基 [Góngora-Benítez et al., 2012]、Mbom 基 [Hibino and Nishiuchi, 2011] がある。特に、Mbom 基を用いれば、80°C の高温条件下においても His 及び Cys 残基のラセミ化を概ね 1% 以下に抑えることができる [Hibino and Nishiuchi, 2012; Hibino et al., 2012; Hibino et al., 2014]。ただし、Mbom 基を用いる場合は、TFA によるクレーベイズの際にホルムアルデヒドを生じてペプチドのヒドロキシメチル化を招くため、ホルムアルデヒドのスカルベンジャーとして 5 等量のメトキシアミン塩酸塩 (MeONH₂·HCl) を添加することが推奨される [Hibino and Nishiuchi, 2011]。これらの保護基を用いることで NPGL 及び NPGM を高温条件下でより効率良く伸長させることができる可能性がある。

マイクロウェーブの照射は、Asp 残基が C 末側のアミノ酸残基と環化したアスパルチミドや、アスパルチミドが開環してピペリジンが付加したピペリジドの形成リスクも高める [Palasek et al., 2007]。アスパルチミドとピペリジドは目的ペプチドと分子量が異なるため (それぞれ -18 と +67) [Dölling et al., 1994]、質量分析での判別や HPLC での分離が一般的に容易である。一方、アスパルチミドの開環時に α 位でなく β 位に Asp 残基が位置したものが生じるが、これは目的ペプチドと分子量が同じであり、HPLC の溶出位置も重なる場合が多い [Behrendt et al., 2015]。従って、これらの副反応のリスクは極力抑えなければならない。アスパルチミドの形成リスクは、Asp-Gly、Asp-Asp、Asp-Asn、Asp-Arg、Asp-Ser、Asp-Thr、Asp-Cys(Acm) の配列において特に高いことが知られている [Bodanszky and Kwei, 1978; Mergler et al., 2003; Behrendt et al., 2015]。その副反応は、ピペリジンの代わりに反応性がより穏やかなピペラジンをを用いたり、HOBt を添加したりすることにより抑制できる [Palasek et al., 2007]。また、ギ酸の添加が有効であるという報告もある [Michels et al., 2012]。rNPGL の合成においては、40% ピペリジンに 0.1 M HOBt を添加しただけではピペリジドの形成を完全に抑えることができなかった。一方、5% ピペラジン/0.1 M HOBt では脱保護効率が低く、Cys や Gln 残基の欠落が目立った。液体であるピペリジンと異なり、固体であるピペラジンは DMF や NMP に最大で 6% 程度しか溶解させることができないが、エタノールと NMP (10:90) の混合液中では 10% まで溶解させることができ、20% ピペリジンと同程度の脱保護能が期待できるという報告がある [Collins et al., 2014]。HOBt やピペラジンの濃度を高めることで、ピペリジド

の形成やアミノ酸の欠落を現状より改善することができる可能性もあるが、側鎖の保護基を変える方がより有効であると考えられる。アスパルチミドの形成を抑制する効果がある保護基として Die 基や Mpe 基が知られているが [Mergler and Dick, 2005]、近年、より優れた保護基として Bno (5-n-butyl-5-nonyl) 基や Php (4-n-propyl-4-heptyl) 基が報告されており、これらは 60°C の高温条件下且つ HOBt 非存在下においても効果的にアスパルチミドやピペリジドの形成を抑制する [Behrendt et al., 2015]。この Bno 基や Php 基を用いれば、rNPGL の合成においてもアミノ酸を欠落させることなく、アスパルチミドやピペリジドの形成を抑制することができると考えられる。

上述のように、ラセミ化やアスパルチミド形成を抑える Mbom 基や Bno 基等を用いれば、高温条件での合成が可能になり、NPGL 及び NPGM の収率向上が期待できる。また、高温で反応させると廃液後もレジンに熱が残るため、その余熱によって DMF や NMP による洗浄効率の向上が期待でき、その回数や時間、溶媒の消費量の削減が可能になる [Collins et al., 2014]。洗浄の回数や時間を削減できれば、約 80 残基の合成においては特に大幅な時間短縮に繋がる。また、用いる溶媒の大部分はレジンや送液ラインの洗浄に充てられており、その消費量はランニングコストに大きく影響する。さらに、洗浄は各縮合及び脱保護反応後に行うのが基本であるが、縮合反応後の残留アミノ酸は脱保護反応に用いる第二級アミンによって不活化されるため [Kanzian et al., 2009]、縮合反応後の洗浄は省略できるとも言われている [Collins et al., 2014]。本研究では、各縮合及び脱保護反応後に 3 ml で 5 回の洗浄を行っており、送液ラインの洗浄に用いる分も含めると、約 4 L の DMF を使用している。もしも縮合反応後の洗浄を省略すると、DMF の消費量を約 1.2 L 削減することができる。さらに、1 回の洗浄に約 5 分を要しており、80 回分の洗浄を省略すると合成時間を約 7 時間短縮することができる。高温条件での合成と併せて、洗浄工程についても検討の余地がある。

4.2. rat NPGM の収率向上条件検討

rNPGL と同様の条件で rNPGM を合成した結果、収率は約 5 分の 1 であった。そこで、*O*-アシルイソペプチド法により収率向上を試みた。凝集性の高く合成困難なペプチドの代表例としてアミロイド β 1-42 (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA) が知られているが、その Gly²⁵-Ser²⁶ 間に *O*-アシル構造を導入すると通常より 100 倍高い水溶性 (0.14 mg/mL → 15 mg/mL) を示すと報告されている [Sohma et al., 2005]。この効果は *O*-アシル構造によって NH₂ 基が増えることによるものと考え

られている。同様に、rNPGM の Leu³⁰-Thr³¹ を *O*-アシルイソジペプチドに置換して合成したものは、逆相 HPLC においてネイティブな rNPGM より早く溶出し、親水性が高まっていることが示唆された。しかしながら、収率に顕著な差は見られず、グアニジル化した rNPGM¹⁸⁻⁸⁸ と考えられる不純物も混在していた。さらに、中性条件下におきネイティブ構造への変換を試みたが、ピークシフトが生じたのは不純物のみであった。

次に、部分配列のプレ合成により収率向上を試みた。収率向上のみならず、数残基分の縮合及び脱保護反応を省略することができるため、合成時間も短縮できると考えた。数残基であれば大量合成が容易であると考えられるので、一度大量に調製しておけば何度も利用することができ、作り足しの手間は少なくて済むと考えられる。しかしながら、N 末側の "GVLAGI" と中央部の "FMLFM" を先に合成し、それをを用いて rNPGM を合成することができたものの、その収率は約 3% であり、顕著な向上は見られなかった。本研究ではプレ合成するペプチドとして側鎖に保護基のないアミノ酸が並ぶ配列を選択したが、HO-TrtA-PEG Resin (渡辺化学工業) を用いれば任意の配列を選択することができる。HO-TrtA-PEG Resin は、50% の酢酸でクリーベージすることができるため、側鎖の保護基を外すことなく次の合成に持ち込むことができる。rNPGM の部分配列の合成効率を比較した結果、合成困難な領域は N 末側の約 40 残基に存在することが示唆された。その領域の中で特に合成困難な領域を特定し、それを先に調製することができれば、rNPGM の収率を向上させることができる可能性がある。

4.3. シュードプロリンジペプチドによる収率向上

Pro 残基には二次構造の形成を阻害して凝集を防ぐ効果があり、アミリン類似体の糖尿病治療薬プラムリンチドの設計にも応用されている。アミリンは膵臓ランゲルハンス島β細胞から分泌される 37 残基のペプチドであり、インスリンやレプチンの作用を増強させることが知られている [Cooper et al., 1987; Trevaskis et al., 2008]。一方でヒトのアミリン (KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY-NH₂) は凝集性が高く、2 型糖尿病の膵臓に見られるアミロイドプラークの主成分でもある [Cooper et al., 1987]。それに対してラットのアミリン (KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂) は凝集性がない。ヒトのアミリンの高い凝集性は 20~29 残基目の配列部分に起因しているが、そのうちの FGAILSS の配列部分がラットでは LGPVLP であり、Pro 残基が 3 つ存在している [Cooper et al., 1989]。そこで、プラークを形成しないヒトのアミリン類似体として、FGAILSS の Ala 及び Ser 残基を Pro 残基に置換したプラムリンチドが

開発された [Kolterman et al., 1997]。また、ヒトのアミリンの合成においてもマイクロウェーブとシュードプロリンジペプチドが用いられているが、収率向上に効果的なシュードプロリンジペプチドの挿入位置はプラーク形成の要因となる配列より N 末側の Ser¹⁹-Ser²⁰である [Harris et al., 2013]。マイクロウェーブを用いると、Arg¹¹までは効率良く伸長できるが Gln¹⁰の縮合効率が低く、その合成困難な配列が現れる前の Ser¹⁹-Ser²⁰をシュードプロリンジペプチドに置換しておくことで収率が向上する [Harris et al., 2013]。このことから、生理条件下において凝集の原因となる配列と合成困難な配列は同じではないことがわかる。

rNPGL 及び rNPGM の部分配列の合成効率を比較した結果、合成困難な領域は N 末側の約 40 残基に存在することが示唆された。その領域を含め、全配列中でシュードプロリンジペプチドに置換可能な配列を全て置換して収率への影響を調べた。rNPGL 及び rNPGM は 5 ヶ所、cNPGL は 3 ヶ所、cNPGM は 2 ヶ所をシュードプロリンジペプチドに置換して合成を行った結果、特に cNPGM における収率向上が最も大きく、約 5 倍に向上した。この顕著な収率向上には、ペプチド鎖がまだ短い C 末側の Leu⁷⁷-Thr⁷⁸よりも、N 末側の Ser²³-Ser²⁴をシュードプロリンジペプチドに置換したことが特に影響していると考えられる。一方、cNPGM より 3 ヶ所多く置換した rNPGL 及び rNPGM の収率向上は約 2 倍であった。シュードプロリンジペプチドの過剰導入が原因である可能性も考えられる。rNPGM の Lys⁵⁶-Ser⁵⁷と Tyr⁶³-Ser⁶⁴の間に Pro 残基が存在すること、また、シュードプロリンジペプチドは通常のアミノ酸誘導体と比較して高価であることを踏まえると、その挿入位置を N 末側に絞り、最も収率向上に効果的な位置を調べる必要がある。また、cNPGL においてはシュードプロリンジペプチドの有無で収率に顕著な差は見られなかった。しかしながら、第 4 章で詳細に述べるが、通常のアミノ酸誘導体を用いて合成した cNPGL よりも、シュードプロリンジペプチドを用いて合成した cNPGM の方が架橋収率が 1.8 倍高かった。このことから、シュードプロリンジペプチドを用いたことにより純度が向上したと考えられる。

第4章 ジスルフィド結合の解析及び形成方法の検討

1. 序文

第3章において、マイクロウェーブとシュードプロリンジペプチドを用いた固相法により、rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGMの大量調製に成功した。これらはジスルフィド結合を形成していないため、それを形成させる必要がある。一般的に、ジスルフィド結合はペプチドの活性や安定性において重要な役割を担っている [Zhang et al., 2011]。例えば、インスリンは1つの分子内結合と2つの分子間結合によって2量体構造を安定化しているが、そのうちの1つでも欠損すると受容体への結合能が0.02%以下に低下する [Chang et al., 2003]。同様に、NPGL及びNPGMにおいてもジスルフィド結合は活性に重要な影響を及ぼすと考えられる。中でも、哺乳類のNPGMは3つのCys残基を有していることから架橋の形成パターンが3通り考えられるため、正しい位置で架橋させる必要がある。

そこで本章では、まずrNPGMにおいてジスルフィド結合の形成に関与するCys残基の同定を試みた。既に、哺乳類培養細胞であるChinese Hamster Ovary (CHO)細胞にrNPGM前駆体遺伝子を導入した安定株が構築されているため、その培養上清を用いて、CHO細胞から産出・分泌されたrNPGMの架橋の位置を解析した。また、第1章において、正しいジスルフィド結合の形成を促すように改良された大腸菌であるSHuffle株を用いてrNPGM-Glyを調製することができたため、その組み換えrNPGM-Glyを用いて同様に架橋の位置を解析した。続いて、合成したrNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGMのジスルフィド結合の形成を試みた。いずれも疎水性が高く水系溶媒には難溶であるため、溶媒組成を主に検討した。

2. 方法

2.1. rat NPGM の架橋位置解析

2.1.1. CHO 細胞由来 rat NPGM の解析

CHO (*dehydrofolate reductase*⁻: *dhfr*) 細胞に、*rNPGM* 前駆体遺伝子を pcDNA3.1 (Life technologies) に挿入した *rNPGM* 発現ベクターと *dhfr* 発現ベクター (pSV2-*dhfr*) を X-treme GENE 9 DNA transfection reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて導入した。10%の fetal bovine serum (FBS) と 1 mg/ml の G418 を含むヌクレオシド非含有の alpha-MEM (Life technologies) 中で培養し、細胞の選別を行った。さらに、6 週間かけて 5–500 nM のメトトレキサートを添加して遺伝子増幅を行い、*rNPGM* 安定発現細胞を樹立した。*rNPGM* の発現を免疫染色により確認するために、pcDNA3.1 導入 (mock) もしくは *rNPGM* 安定発現 CHO 細胞を Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific) に播種し、第1章で調製した組み換え *rNPGM*-Gly を抗原として得られた抗 *rNPGM* 抗体 (1000 倍希釈) を用いて標識後、ローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1000 倍希釈) を結合させ、蛍光顕微鏡 (キーエンス、大阪、日本) で観察した。

rNPGM 安定発現 CHO 細胞の培養上清 400 ml をボイルし、冷却後、終濃度 5%になるよう酢酸を添加した。遠心分離後、上清を Sep-Pak CN 6 cc Vac Cartridge (Waters, MA, USA) に添加し、14%メタノール/56%アセトニトリル/0.1% TFA により溶出した。逆相 HPLC により、カラム: C18 (TSKgel ODS-80Ts, 4.6×150 mm; 東ソー)、流速: 0.5 ml/min、溶出: A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 20–60%、40 分間)、検出: 220 nm の条件で、2 分毎に分画した。ピークが見られたフラクション 38 と 40 と、ポジティブコントロールとして組み換え *rNPGM*-Gly を用いて、ウェスタンブロットを行った。15% SDS-PAGE により分離し、polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に転写し、抗 *rNPGM* 抗体 (1000 倍希釈) でブロット後、HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare) を結合させ、ECL Western Blotting Detection Reagents (Promega) を用いて検出した。

ウェスタンブロット解析において組み換え *rNPGM*-Gly と同程度の分子量のバンドが見られたフラクション 40 について、さらに 2 通りの解析を進めた。1 つ目の解析として、フラクション 40 を 15% SDS-PAGE により分離し、Silver Stain MS kit (和光純薬工業) を用いて銀染色を行い、組み換え *rNPGM*-Gly と同程度の分子量のバンドを切り出

した。トリプシンを用いて 35°C で一晩ゲル内消化し、消化産物を MALDI-TOF-MS と ESI-MS/MS により解析した。2 つ目の解析として、フラクション 40 を Asp-N (Roche Diagnostics) を用いて 37°C で一晩消化後、逆相 HPLC で精製し、得られたピークを MALDI-TOF-MS により解析した。

2.1.2. 大腸菌 SHuffle 株由来 rat NPGM の解析

rNPGM-Gly 0.1 mg を 500 μ l のアルキル化反応液 (50 mM ヨードアセトアミド、50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0) で溶解し、遮光下で 2 時間インキュベートし、フリーの Cys 残基を不可逆的にアルキル化した。反応液は、逆相 HPLC により、カラム: C8 (YMC-Pack C8、4.6 \times 150 mm ; YMC)、流速: 0.5 ml/min、溶出: A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 40–60%、40 分間)、検出: 220 nm の条件で精製した。

アルキル化していないものとしたもののそれぞれを、0.5 μ g の Asp-N を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) 200 μ l 中で 37°C で一晩消化した。反応液は、逆相 HPLC により、カラム: C8 (YMC-Pack C8、4.6 \times 150 mm ; YMC)、流速: 0.5 ml/min、溶出: A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配 (B 液 10–60%、50 分間)、検出: 220 nm の条件で精製した。得られたピークを ESI-MS により解析した。

2.2. 架橋形成

2.2.1. DMSO 酸化法

ペプチド 5 mg を DMSO 0.8 ml で溶解し、1N HCl 0.2 ml を添加し、室温で 4–48 時間反応させた。逆相 HPLC により、カラム: C18 カラム (YMC-Pack Pro C18、10 \times 150 mm ; YMC)、流速: 1.0 ml/min、溶出: A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配、検出: 280 nm の条件で精製した。

2.2.2. グルタチオン法

ペプチド 5 mg に対して DMSO 100 μ l で完全に溶解し、900 μ l の反応液 (0.4 M Tris-HCl pH 8.5、50% アセトニトリル、1 mM EDTA、5 mM GSH、0.5 mM GSSG) で希釈し、室

温で 4–48 時間反応させた。反応後、6 M グアニジン塩酸塩溶液 500 μ l を添加してアセトニトリル濃度を下げた。逆相 HPLC により、カラム：C18 (YMC-Pack Pro C18、10 \times 150 mm ; YMC)、流速：1.0 ml/min、溶出：A 液 (水、0.1% TFA) と B 液 (アセトニトリル、0.1% TFA) の直線濃度勾配、検出：280 nm の条件で精製した。

2.3. 質量分析

生成物の質量は、MALDI-TOF-MS または ESI-MS により測定した。MALDI-TOF-MS は AXIMA-CFR plus (島津製作所) を用いて、ESI-MS は LTQ Orbitrap XL 及び Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。主な理論質量値を表 8 に示す。

表 8. 各生成物の理論質量値一覧

	[M+H] ⁺ (average)	[M+H] ⁺ (monoisotopic)
rNPGL (SS)	9346.78	9340.60
rNPGM (SS)	10165.82	10159.02
cNPGL (SS)	9181.62	9175.59
cNPGM (SS)	9618.21	9611.76
DLQCWNTCSLTLI (SS)	1508.78	1507.71
DCLLSRSHGMG	1176.3668	1175.5296

3. 結果

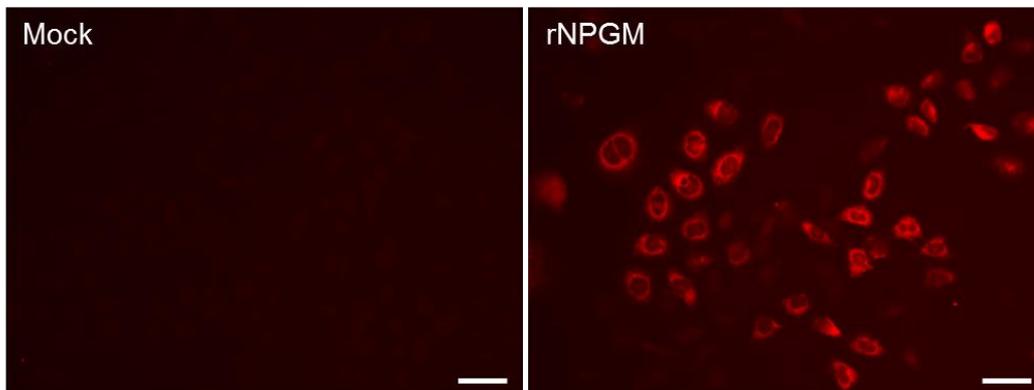
3.1. rat NPGM の架橋位置解析

rNPGM 前駆体遺伝子を導入した CHO 細胞を *rNPGM* 抗体を用いて免疫染色したところ、細胞質に *rNPGM* の発現が認められた (図 26A)。その培養上清を逆相 HPLC により 2 分毎に分画したところ、フラクション 38 と 40 に 2 つのピークが見られた (図 26B)。それらを回収し、第 1 章において大腸菌を用いて調製した *rNPGM*-Gly と共にウエスタンブロット解析を行ったところ、フラクション 38 からは組み換え *rNPGM*-Gly よりやや大きい分子量のバンドが検出され、フラクション 40 からは組み換え *rNPGM*-Gly と同程度の分子量のバンドが検出された (図 26C)。さらに、フラクション 38 と 40 を MALDI-TOF-MS により解析した結果、フラクション 38 からは推定成熟 *rNPGM* の C 末端側に 24 アミノ酸残基が付加したものに相当する質量値が、フラクション 40 からは推定成熟 *rNPGM* の C 末端側に 2~6 アミノ酸残基が付加したものに相当する質量値が検出された (図 26D)。

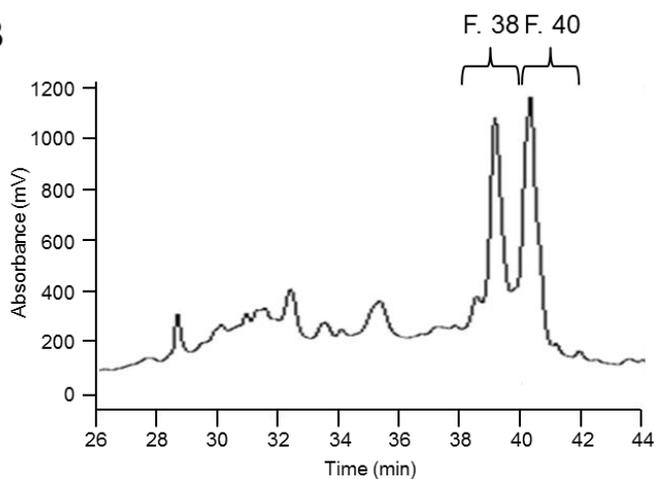
推定成熟 *rNPGM* により近いフラクション 40 を用いてさらに解析を進めた。まず、Lys または Arg 残基の C 末側で切断する酵素であるトリプシンを用いてフラクション 40 をゲル内消化し、MALDI-TOF-MS により解析した。その結果、推定成熟 *rNPGM* の N 末端領域にある “DLEFQK” と、中央部にある “IEHNVDAFWNFMLFLQK” のフラグメントに相当する質量値が検出された (図 26E)。さらに ESI-MS/MS により、“DLEFQK” の配列を決定した (図 26F)。“DLEFQK” の N 末端はトリプシンの消化サイトではないことから、シグナルペプチド直下で切断されて分泌されることが示された。次に、フラクション 40 を Asp 残基の N 末側で切断する酵素である Asp-N を用いて消化し、MALDI-TOF-MS により解析した。その結果、推定成熟 *rNPGM* の N 末端領域にある “DLEFQKGVLAGISPGITA” と、N 末側の 2 つの Cys 残基を含む “DLQCWNTCSLTLI” のフラグメントに相当する質量値が検出された (図 26E)。さらに、“DLQCWNTCSLTLI” と考えられるフラグメントを TCEP により還元処理したところ、質量値が 2 増加し、分子内にジスルフィド結合が形成されていたことが示唆された (図 26G)。

上述の結果、成熟 *rNPGM* はシグナルペプチド直下で切断されて分泌されることが、また、N 末側の 2 つの Cys 残基間でジスルフィド結合を形成していることが示唆された。しかしながら、CHO 細胞により産出された *rNPGM* は微量であったため、C 末端側の Cys 残基を含むフラグメントを検出することはできなかった。

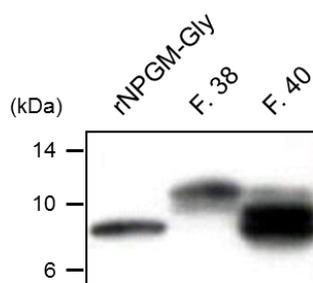
A



B



C



D

MGSAVRRWLYLPLGCIMLFNLTDADLEFQKGVLAGISPGITADIDLQCWNTCSLTLIDLKEIKIEHNVDA
FWNFMLFLQKSQRPGHYSVFLNIAQDFWDMYIDCLLSRSHGMGRRQVLSSKYNFPQKMAGRDLKVYLRLK

E



図 26. 次頁へ続く

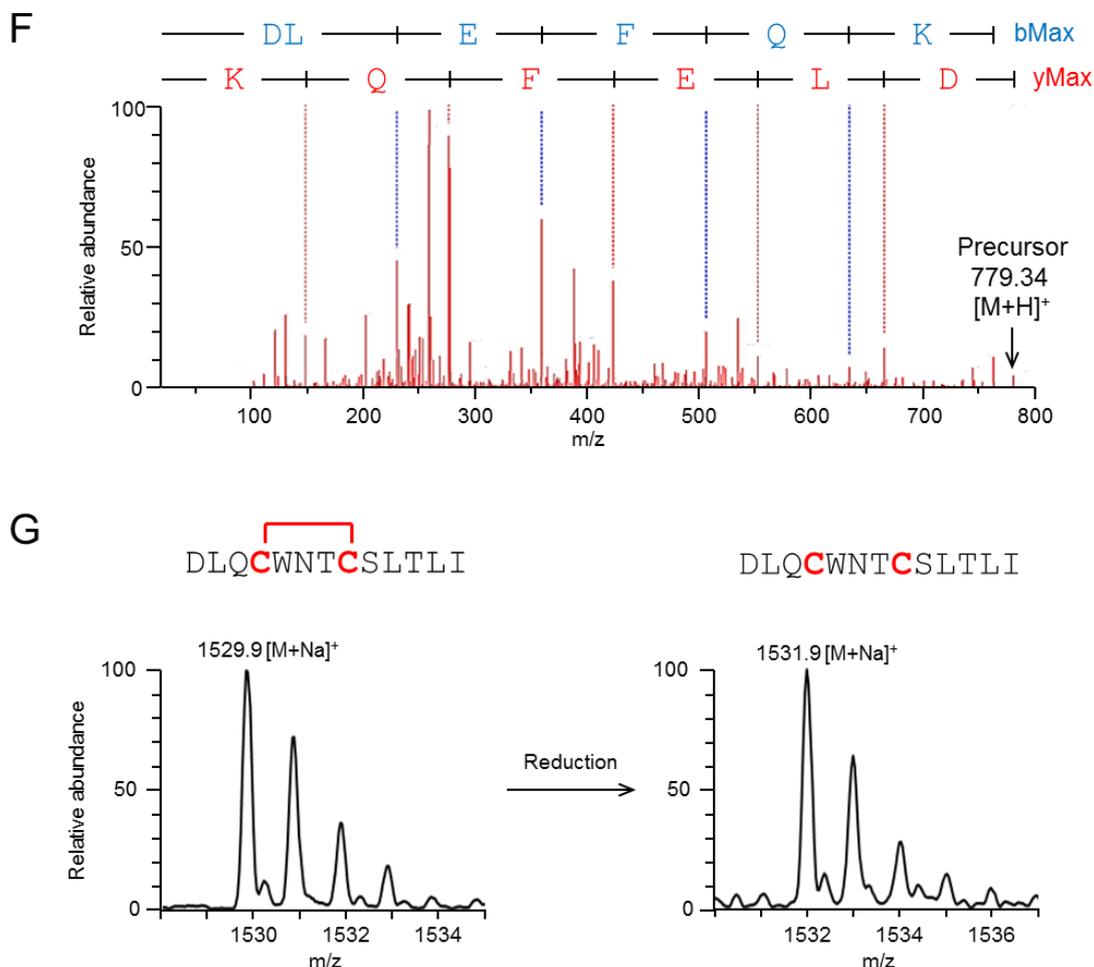


図 26. CHO 細胞由来 rNPGM の架橋位置解析

(A) rNPGM 安定発現細胞の免疫染色像。Bars = 50 μm 。細胞質に rNPGM の発現が認められた。
 (B) 培養上清の逆相 HPLC による分画 (TSK gel ODS-80Ts, 4.6 \times 150 mm; 20–60% ACN over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。
 (C) フラクション 38 及び 40 のウェスタンブロット解析。組み換え rNPGM-Gly をポジティブコントロールとして使用した。
 (D) rNPGM 前駆体タンパク質のアミノ酸配列と、フラクション 38 及び 40 の MALDI-TOF-MS により検出された配列。推定成熟配列を太字、フラクション 38 の検出配列を緑線、フラクション 40 の検出配列を青線で示す。
 (E) rNPGM 前駆体タンパク質のアミノ酸配列と、トリプシン消化サイト (\downarrow)、フラクション 40 トリプシン消化後の検出配列 (実線)、Asp-N 消化サイト (\uparrow)、フラクション 40 Asp-N 消化後の検出配列 (点線)。
 (F) トリプシン消化物の ESI-MS/MS。"DLEFQK" の N 末端はトリプシンの消化サイトではないことから、シグナルペプチド直下で切断されて分泌されることが示された。
 (G) Asp-N 消化物及びその還元物の MALDI-TOF-MS。"DLQCWNTCSLTLI" が検出され、還元処理により質量値が 2 増加したことから、架橋されていたことが示された。

続いて、大腸菌 SHuffle 株に発現させた rNPGM-Gly を用いて、同じく架橋の位置を解析した。まず、ヨードアセトアミドを用いてフリーの Cys 残基をアルキル化した。続いて、アルキル化していないもの及びアルキル化したものの両方を、それぞれ Asp-N により消化した。各反応液を逆相 HPLC により精製し、得られたピークを ESI-MS により解析した。その結果、アルキル化していない rNPGM-Gly において、C 末端側の Cys 残基を含む "DCLLSRSHGMG" が 22 分に溶出した (図 27A,B)。それに対し、アルキル化した rNPGM-Gly においては、その "DCLLSRSHGMG" のピークは見られず、その代わりに Cys 残基がアルキル化した "DCLLSRSHGMG" が 21 分に溶出した (図 27A,B)。架橋された N 末側の 2 つの Cys 残基を含む "DLQCWNTCSLTI" は、アルキル化していない rNPGM-Gly 及びアルキル化した rNPGM-Gly のいずれにおいても検出された (図 27A,B)。また、31 分にはアルキル化した N 末端領域の "HMDLEFQKGVLAGISPGITA" に相当するものが溶出していたが、これは Met 残基が過剰にアルキル化されたものと考えられる (図 27A,B)。以上の結果から、CHO 細胞により産出された rNPGM と同様に、大腸菌 SHuffle 株に発現させた rNPGM-Gly も、N 末側の 2 つの Cys 残基間でジスルフィド結合を形成していることが示された。さらに、C 末端側の Cys 残基はフリーであることが示された。

3.2. rat NPGL の架橋形成

まず rNPGL において架橋の形成条件を検討した。NPGL 及び NPGM は疎水性が高いため、溶媒組成を主に検討した。初めに、疎水性ペプチドの溶解性の問題を回避することができる DMSO 酸化法 [Tamamura et al., 1993] による架橋を試みた。5 mg の rNPGL を 0.8 ml の DMSO で溶解し、0.2 ml の 1 N HCl を添加して室温で反応させた。その結果、rNPGL は完全に溶解していたが、架橋反応の進行は遅く、2 日後も未反応物が残っていた (図 28A)。

次に、最もよく用いられる架橋法の一つであるグルタチオン法による架橋を試みた。疎水性の高いペプチドである ω -conotoxin TxVII は、50% のメタノールを含むバッファー中でグルタチオン法により架橋されているため [Sasaki et al., 1999]、同様の方法で架橋を試みた。しかしながら、rNPGL は 50% メタノール中でも溶解性が低かったため、メタノールの代わりにアセトニトリルを用いて検討を行った。rNPGL をまず少量の DMSO で完全に溶解し、その後 10 mM GSH 及び 1 mM GSSG を含む 50% アセトニトリルで 10 倍希釈したところ、析出することなく溶解したままに保つことができた。その反応液を室温で攪拌したところ、48 時間後には未反応物が無くなった (図 28B)。メインピークと肩ピークを ESI-MS により解析したところ、メインピークからは架橋した rNPGL が、

親水性側の肩ピークからはグルタチオンが2つ付加したもの、疎水性側の肩ピークからはグルタチオン1つと酸素3つが付加したものと考えられる副生成物が検出された(図28C)。さらに、rNPGLの同位体ピークを、架橋及びアミド化されている目的のrNPGL、アミド化していないrNPGL、架橋していないrNPGLのそれぞれの理論ピークと比較した。その結果、目的のrNPGLの理論ピークと完全に一致した(図28D)。また、回収したrNPGLを再度逆相HPLCにかけたところ、シングルピークとして得られ、高純度に精製できていた(図28E)。架橋の収率は30%であった。

3.3. rat NPGM、chicken NPGL、chicken NPGMの架橋形成

rNPGLと同様に、50%アセトニトリル中でグルタチオンにより、rNPGM、cNPGL、cNPGMの架橋を試みた。その結果、rNPGMは溶解せず白濁した。cNPGLとcNPGMは完全に溶解し、架橋反応は2日で終了した(図29A,B)。cNPGLにおいては、シュードプロリンジペプチドを用いずに合成したものと用いて合成したものとで架橋後のピーク形状が異なり、シュードプロリンジペプチドを用いて合成したものの方が肩ピークが小さかった(図29A)。それぞれの収率は20%と36%であり、1.8倍の差が見られた。cNPGMの収率は30%であった。rNPGMは50%アセトニトリル中で溶解しなかったため、DMSO酸化法による架橋を試みた。その結果、rNPGMは完全に溶解し、約2日で架橋された(図29C)。生成物の架橋位置をAsp-N消化により解析した結果、CHO細胞や大腸菌に産生されたrNPGMと同様に、N末側の2つのCys残基間で架橋されていた(図29D,E)。収率は20%であった。

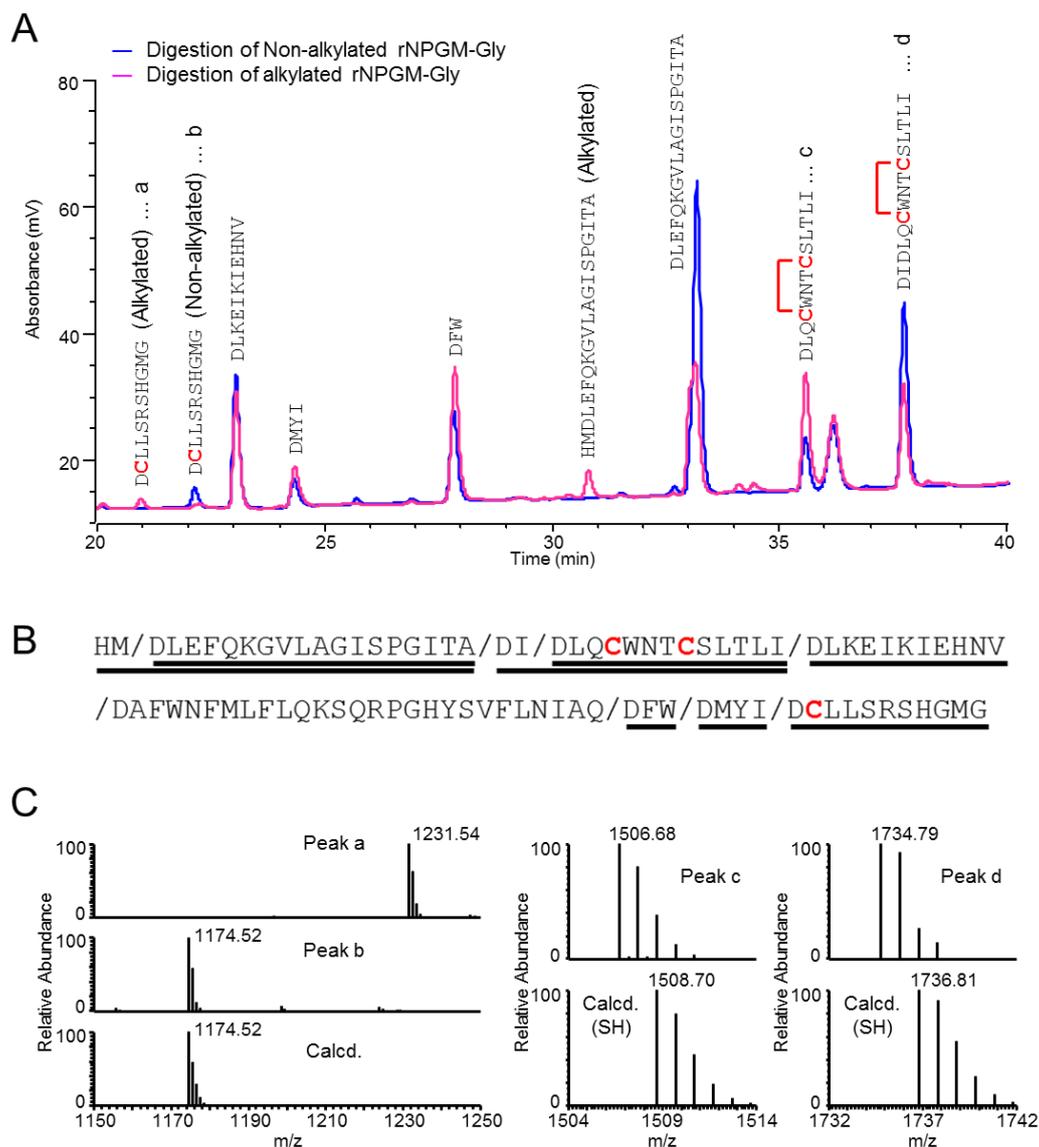


図 27. 大腸菌由来 rNPGM-Gly の架橋位置解析

(A) 非アルキル化及びアルキル化 rNPGM-Gly の Asp-N 消化物の逆相 HPLC クロマトグラム (YMC-Pack C8, 4.6×150 mm; 40–60% ACN over 40 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。21 分に C 末側のアルキル化した Cys 残基を含むフラグメント (a) が、22 分に C 末側のアルキル化していない Cys 残基を含むフラグメント (b) が、36 及び 38 分に N 末側の 2 つの Cys 残基を含むフラグメント (c, d) が見られた。(B) 組み換え rNPGM-Gly のアミノ酸配列と、Asp-N 消化サイト (斜線) 及び検出配列 (下線)。(C) Cys 残基を含むフラグメントの ESI-MS。Peak b は ”DCLLSRSHGMG” の理論値と一致しており、Peak a はそれより 57 大きいことからアルキル化されていることが示された。Peak c 及び d は還元型の ”DLQCWNTCSLTLI” 及び ”DLQCWNTCSLTLI” の理論値より 2 小さいことから、架橋されていることが示された。

第4章 ジスルフィド結合の解析及び形成方法の検討

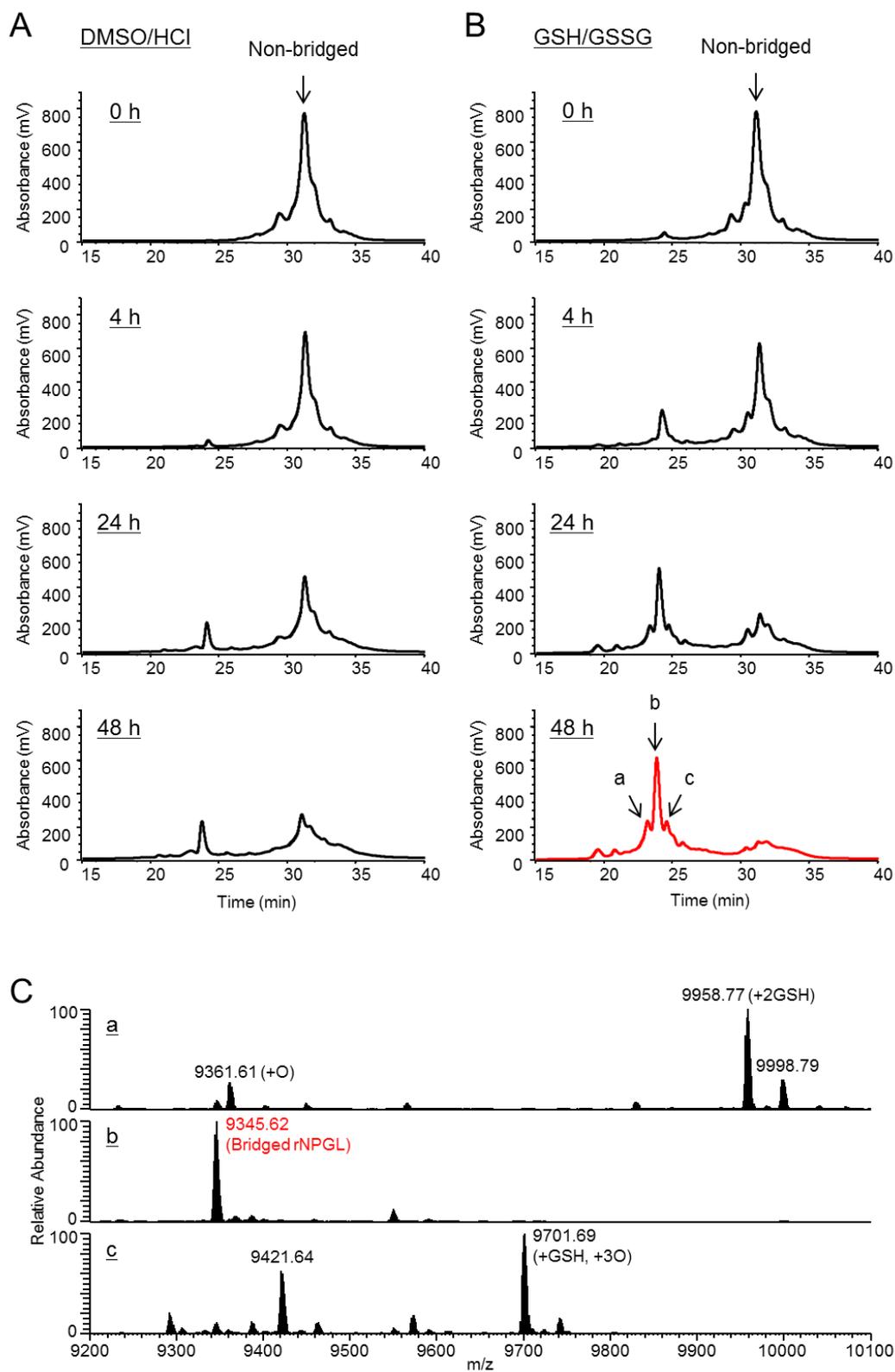


図 28. 次頁に続く

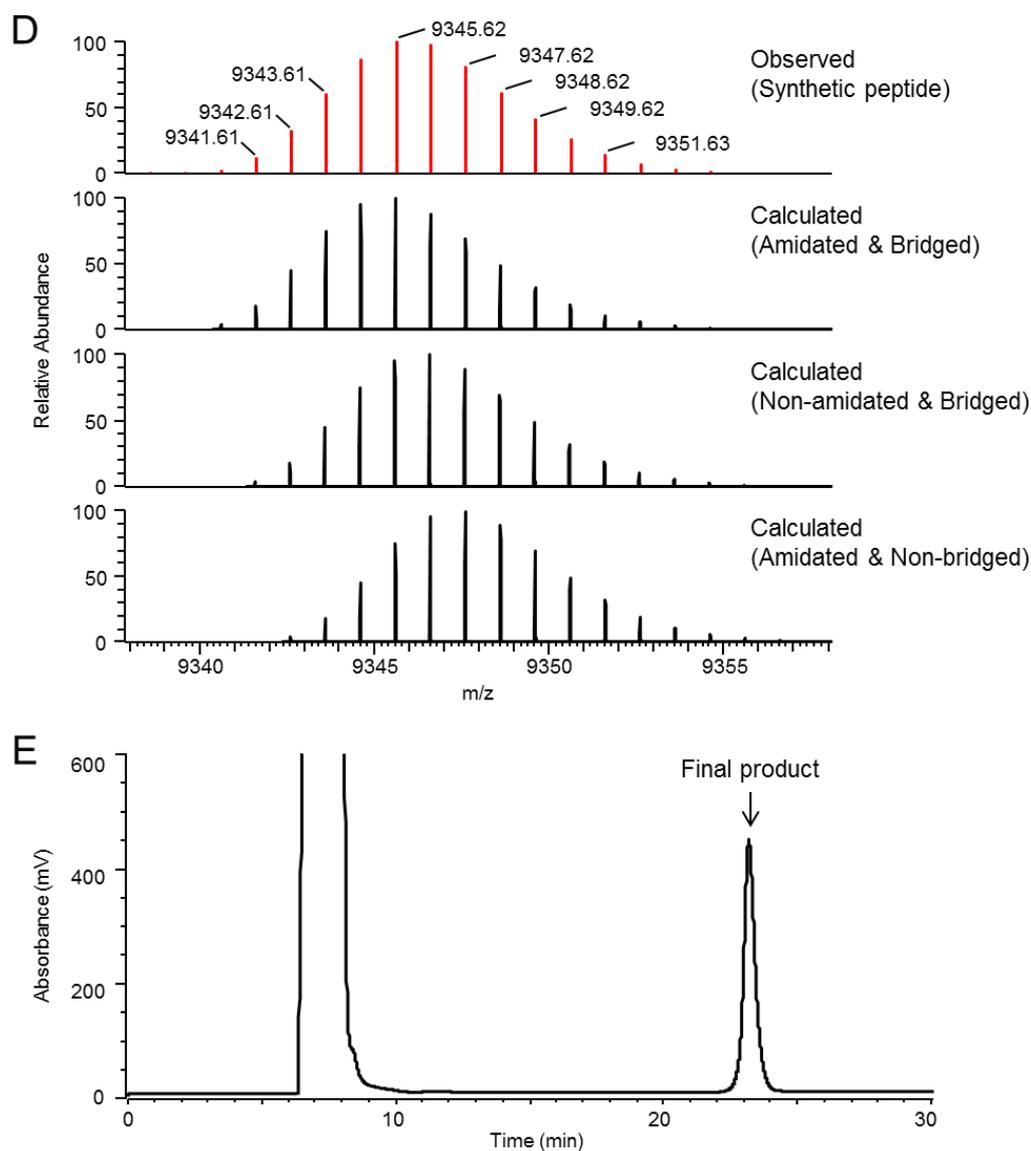


図 28. rNPGL のジスルフィド結合形成

(A) DMSO 酸化法による架橋形成経過 (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 40–60% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 220 nm)。48 時間後も未反応物が見られた。(B) 50%アセトニトリル中でのグルタチオン法による架橋形成経過 (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 40–60% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 220 nm)。48 時間で架橋された。(C) グルタチオン法における 48 時間後の生成物ピークの ESI-MS。主生成物は架橋した rNPGL であり、副生成物はグルタチオンが 1 つまたは 2 つ付加した rNPGL であった。(D) 架橋した rNPGL の ESI-MS と各種理論ピーク (架橋及びアミド化している rNPGL、アミド化していない rNPGL、架橋していない rNPGL) との比較。架橋及びアミド化している rNPGL の理論ピークと一致した。(E) 最終精製品の逆相 HPLC による純度確認 (YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 40–60% ACN over 40 min; 1.0 ml/min; 220 nm)。

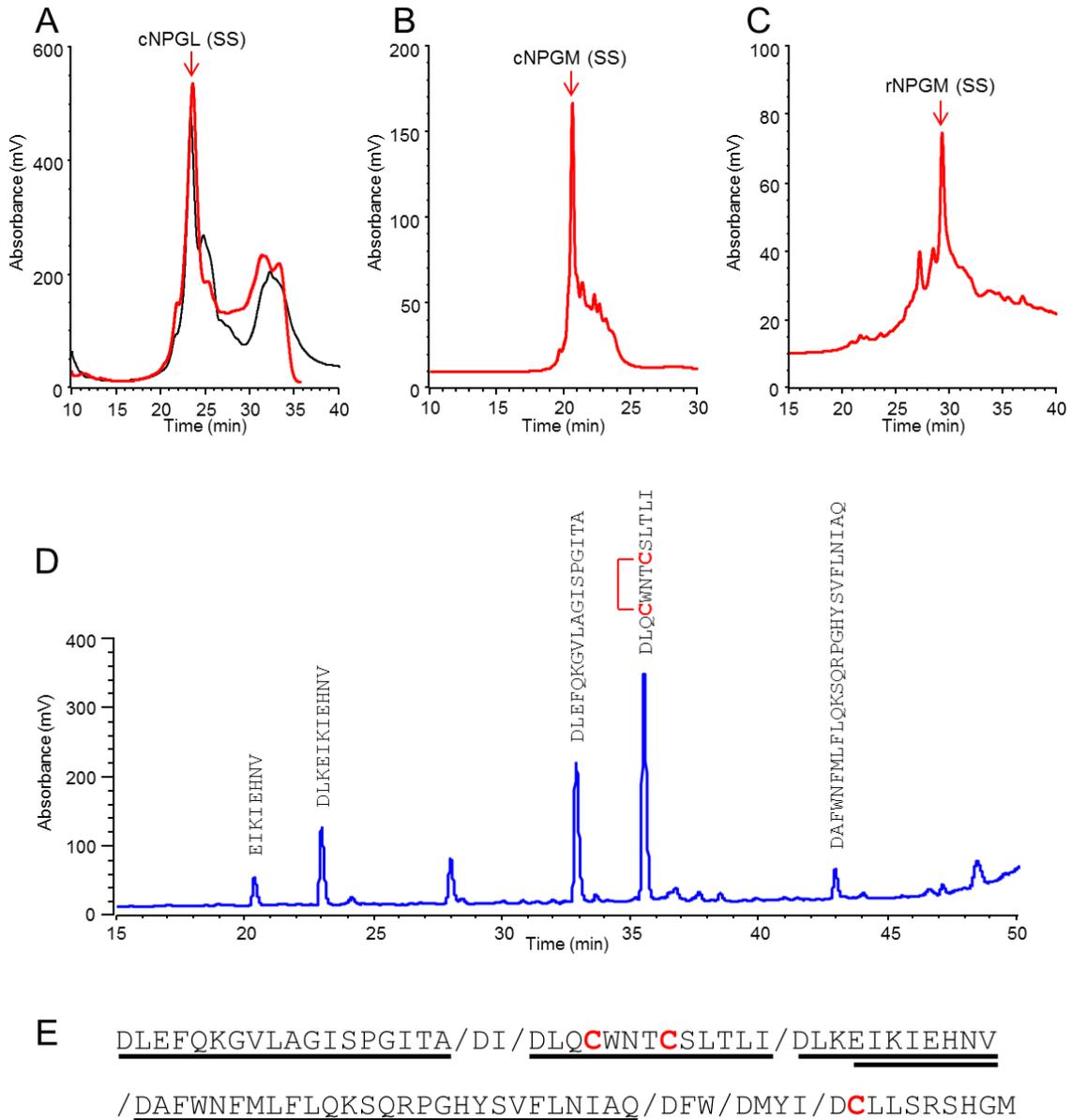


図 29. rNPGM、cNPGL、cNPGM の架橋形成

(A) グルタチオン法による cNPGL の架橋形成 (黒線：シュードプロリンジペプチドを用いずに合成した cNPGL の架橋形成。赤線：シュードプロリンジペプチドを用いて合成した cNPGL の架橋形成)。(B) グルタチオン法による cNPGM の架橋形成。(C) DMSO 酸化法による rNPGM の架橋形成。(YMC-Pack Pro C18, 10×150 mm; 1.0 ml/min; 280 nm; rNPGM, cNPGL, 40–60% ACN over 40 min; cNPGM, 35–65% ACN over 30 min) (D) DMSO 酸化法により架橋した rNPGM の Asp-N 消化による架橋位置解析 (YMC-Pack C8, 4.6×150 mm; 10–60% ACN over 50 min; 0.5 ml/min; 220 nm)。(E) rNPGM のアミノ酸配列と、Asp-N 消化サイト (斜線) と検出配列 (下線)。CHO 細胞や大腸菌が産生した rNPGM と同様に N 末側の 2 つの Cys 残基で架橋された。

4. 考察

4.1. rat NPGM の架橋位置

rNPGM 前駆体遺伝子を導入した CHO 細胞の培養上清を用いて、分泌されるペプチドの構造解析を行った。予想通り、*rNPGM* はシグナルペプチド直下で切断され分泌されていた。しかしながら、C 末端はアミド化されておらず数残基の付加配列が残っていた。この理由として、CHO 細胞の分泌経路が考えられる。分泌経路には、分泌小胞を形成して細胞膜に輸送される構成性分泌経路と、分泌顆粒に貯蔵された後に刺激に応じて細胞膜に輸送される調節性分泌経路があるが、非内分泌細胞である CHO 細胞は構成性分泌経路しか持たない。Lys-Arg 配列を含むレニン前駆体は、CHO 細胞においては正しく切断されないが、内分泌細胞であり調節性分泌経路を持つマウス下垂体細胞である AtT-20 細胞においては活性型のレニンに変換される [Hosaka et al., 1991]。本実験では扱いやすく生産性の高い CHO 細胞を用いたが、*rNPGM* の C 末端のアミド化について検証するためには AtT-20 細胞等の内分泌細胞を用いることが望ましいと考えられる。また、視床下部より内因性の *rNPGM* を単離し構造解析を行う必要がある。

Cys 残基の保存性から、*rNPGM* も Cys²⁴-Cys⁸⁰ 間でジスルフィド結合を形成しているのではないかと予測した。しかしながら、哺乳類細胞である CHO 細胞が産生した *rNPGM* も、正しい架橋形成を促す大腸菌である SHuffle 株が産生した *rNPGM* も、どちらも N 末側の Cys²⁴-Cys²⁸ 間で架橋されており、Cys⁸⁰ がフリーの状態であった。ダイマー形成の可能性も考える必要があるが、CHO 細胞や大腸菌に産生させたものの中にも合成物を化学的に架橋させた際もそれは得られたことがないため、フリーで存在していると考えられる。フリーの Cys 残基を持つペプチドについて様々な報告がある。ヒトのインターロイキン-2 [Wang et al., 1984]、ヘルペスウイルス 1 型の糖タンパク質 D [Wilcox et al., 1988]、ヒトの顆粒球コロニー刺激因子 [Lu et al., 1989] は、フリーの Cys 残基を 1 つ有しているが、受容体との相互作用や活性性に特に必要でなく、細胞膜内やその分子の内側など、外からアクセスしにくい場所に位置している。ヒトのインターフェロン-β やショウジョウバエのアセチルコリンエステラーゼにおいては、フリーの Cys 残基を除去すると安定性が向上するという報告がある [Mark et al., 1984; Fremaux et al., 2002]。ファージのエンドリシンは 3 つの Cys 残基を持ち、不活性状態では C 末側の 2 つがジスルフィド結合を形成した状態で、N 末側の 1 つがフリーの状態でグラム陰性菌の細胞膜に埋め込まれているが、細胞膜から放出されることによって埋め込まれていたフリーの

Cys 残基が露出すると、分子内のジスルフィド結合に作用して架け替えを起こし、活性化状態となって溶菌活性を発揮する [Xu et al., 2005; Kutty et al., 2010]。また、タンパク質チロシンホスファターゼファミリーは HCX₅R モチーフを有しており、その Cys 残基が活性に不可欠である [Zhang et al., 2015]。rNPGM の詳細な生理機能は明らかになっていないが、ジスルフィド結合のパターンの違いやフリーの Cys 残基の有無が活性にどのような影響を与えるのか、今後の検討課題である。

4.2. 架橋形成

最もシンプルなジスルフィド結合の形成方法は空気酸化である。そこに、ヨウ素やフェリシアン化カリウム、グルタチオン等の酸化剤を添加すると架橋反応が促進されるが、一方で、Cys 残基の過剰酸化によるスルホン酸形成や、Met、Trp、Tyr 残基の酸化といった副反応も起こり得る [Annis et al., 1997; Cline et al., 2004]。

rNPGL、cNPGL、cNPGM は、50%アセトニトリル中でグルタチオンにより架橋させることができ、それぞれの収率は 30%、36%、30%であった。rNPGM は DMSO 酸化法で架橋することができ、収率は 20%であった。第3章において、cNPGL はシュードプロリンの有無で合成効率に顕著な差が見られなかったが、シュードプロリンジペプチドを用いずに合成したものの架橋収率は 20%であったのに対して、シュードプロリンジペプチドを用いて合成したものの架橋収率は 36%であり、1.8 倍の向上が見られた。すなわち、シュードプロリンを用いたことにより合成後の純度が向上し、架橋効率も向上したと考えられる。

いずれの架橋反応も、HPLC のクロマトグラムから判断すると未反応物は残っており、比較的効率良く進行しているように見えるが、精製したペプチドの重量から算出した収率は上述の通り 30%前後であった。このことから、疎水性が高いためにカラム等へ非特異的に吸着したと考えられる。経験則として、Cys 残基を含むペプチドは収率が低くなる傾向があることが知られている。特に、rNPGM の収率がより低いのは、Cys 残基が一つ多いことが原因である可能性がある。

rNPGL は、DMSO 酸化法でもグルタチオン法でも完全に溶解していたが、DMSO 酸化法では架橋反応が進行しなかった。一方、rNPGM は DMSO 酸化法で架橋させることができた。この理由として、ジスルフィド結合に関与する Cys 残基の位置が影響している可能性がある。rNPGL はそれらの Cys 残基間の距離が遠いため、DMSO 中での穏やかな空気酸化では架橋を形成することができず、グルタチオンによるジスルフィド交換

反応が必要であったと推測される。対して、rNPGM は Cys 残基間の距離が 3 アミノ酸残基分と近いと、DMSO 酸化法でも架橋させることができたと考えられる。また、DMSO 酸化法による rNPGM の架橋には約 2 日を要したが、アミリンの架橋においては DMSO 中に 2,2'-ジピリジルジスルフィドを添加することで約 20 分で架橋を形成させている [Harris et al., 2013]。同様の方法で rNPGM の架橋反応を促進することができるか、また、DMSO のみでは架橋されなかった rNPGL も架橋されるか、検証の余地がある。また、2,2'-ジピリジルジスルフィドやその異性体である 4,4'-ジピリジルジスルフィドは、酸性から弱塩基性まで幅広い pH 条件下において効果的に架橋形成を促進する [Grassetti et al., 1967; Maruyama et al., 1999]。その特性から、還元型ペプチドの HPLC 溶出液に直接 2,2'-ジピリジルジスルフィドや 4,4'-ジピリジルジスルフィドを添加して架橋反応を行うことも可能である [Cline et al., 2004]。同様に、還元型の NPGL 及び NPGM を HPLC 溶出液から直接架橋反応に移行させることができれば、凍結乾燥の手間や時間を省くことができるだけでなく、再溶解の問題も解消されることが考えられる。

いずれのペプチドも、架橋前のものに比べて架橋後のものは HPLC の溶出位置が親水性側にシフトしていた。このことから、ジスルフィド結合はこれらの溶解性に重要な役割を担っていることが示唆される。

結論

NPGL 及び *NPGM* は、鳥類の視床下部漏斗部より初めて発見された新規遺伝子であり、脊椎動物に広く存在することから重要な生理機能を担うことが示唆されている。*NPGL* 及び *NPGM* は分泌性小タンパク質の前駆体をコードすることが示唆されており、成熟 *NPGL* 及び *NPGM* は約 80 アミノ酸残基からなり、活性や立体構造形成に重要な C 末端アミド化やジスルフィド結合を有していることが示唆される。しかしながら、内因性の *NPGL* 及び *NPGM* は同定されておらず、それらの生理機能も明らかになっていない。*NPGL* 及び *NPGM* の生理機能を解明するためには、行動薬理的及び形態学的解析等に用いるための大量のペプチドが必要であるが、最も一般的なペプチド合成法である固相法では 50 残基以上の長鎖ペプチドを合成することは極めて困難である。そこで本研究では、分子生物学的手法から有機化学的手法まで様々な手法を用いて、*rNPGL*、*rNPGM*、*cNPGL*、*cNPGM* の合成法を確立することを目的とした。

初めに、長鎖ペプチドの調製が容易な大腸菌を用いた組み換え発現系による調製を試みた。大腸菌では C 末端のアミド化は生じないため、アミド化ドナーとなる Gly 残基を C 末端に付加したものを発現させ、その後アミド化酵素によるアミド化を試みた。発現効率の高いベクターを用いて *rNPGL-Gly* の発現を試みたところ、封入体を形成したため、封入体から精製した。*rNPGM-Gly* は、可溶化タグである TF との融合タンパク質として低温発現系により発現させたところ、可溶化させることができ、可溶性画分から精製することができた。しかしながら、アミド化酵素を用いた C 末端のアミド化において副生成物の混入を避けられなかった。また、本研究遂行中にアミド化酵素が製造中止となり、入手さえも困難となった。

アミド化酵素を用いない手法で調製する必要性に迫られたため、*Intein* のタンパク質スプライシングの原理を用いた手法により、*rNPGM* の調製を試みた。まず、目的ペプチドの C 末端に *Intein* を融合したタンパク質に、アンモニウム塩と DTT を添加して目的ペプチドの C 末端をアミド化する手法による調製を試みた。*rNPGM* の C 末側に *Intein* を融合したタンパク質を、大腸菌を用いた組み換え発現系により調製し、炭酸水素アンモニウムと DTT を添加したところ、*Intein* を切り離すことができた。しかしながら、C 末端がアミド化されているか否かは質量にして 1 の差であり、全体の分子量が約 10000 Da である中で、その僅かな差の判別が困難であった。また、*Intein* の非特異的な切断も見られ、*rNPGM-OH* の混入が懸念された。そこで、タンパク質スプライシングと同様

の反応機構でペプチドチオエステルと Cys ペプチドを縮合する手法である NCL 法による調製を試みた。rNPGM の 3 つの Cys 残基のうち N 末側から 2 番目の Cys 残基を縮合部位とし、N 末側の 27 残基をペプチドチオエステルとして、C 末側の 61 残基を Cys ペプチドとして、それぞれ調製を試みた。ペプチドチオエステルは、Intein を用いた C 末端アミド化法と類似の手法により、Intein との融合タンパク質に MESNA を添加することで調製することができた。C 末側の 61 残基は、リンクアミドレジンとシュードプロリンジペプチドを用いた固相法により、確実に C 末端がアミド化されたものとして合成することができた。それらを NCL 法により縮合したところ、88 残基の rNPGM を調製することができた。しかしながら、フラグメントにわけたことによって合成や精製の工程も増えてしまい、疎水性の高い rNPGM は特に精製時のロスが大きく、調製に要する手間や日数に対して収量が十分ではなかった。

NPGL 及び NPGM の合成法は、今後ルーチンワークとして繰り返し合成していくことを考えると、収量に加えて簡便さと迅速さが求められる。そこで、近年注目されているマイクロウェーブを用いた固相法による合成を試みた。まず、rNPGL の合成において、固相や縮合剤、各反応の温度や時間等、各種条件の比較検討を行った。その結果、100%PEG レジンを用いて、縮合反応は HATU を用いて 50°C-5 分、脱保護は 40%ピペリジン/0.1 M HOBt を用いて 50°C-3 分の条件がより高収率であった。そして、同様の方法で rNPGM、cNPGL、cNPGM も合成することができた。しかしながら、rNPGM の収率は極めて低かった。そこで、疎水性ペプチドの凝集を抑制して溶解性を飛躍的に向上させる手法である *O*-アシルイソペプチド法による収率向上を試みた。*O*-アシル構造はクリーベッジ後も中性条件下におくまでは維持することができるため、合成時のみならず精製時にもその凝集抑制効果が期待できると思われた。しかしながら、*O*-アシルイソジペプチドを導入後は反応性の穏やかな脱保護条件に変える必要があったため、親水性の *O*-アシル rNPGM を合成することはできたものの、その収率は *O*-アシルイソジペプチドを用いずに合成した時を下回った。次に、部分配列のプレ合成による収率向上を試みた。rNPGM の N 末端領域の 6 残基と中央部の 5 残基を先に調製し、アミノ酸と同じ要領で縮合させることで、合成効率向上のみならず合成時間短縮も期待できると考えた。しかしながら、rNPGM を合成することはできたものの、顕著な収率向上は認められなかった。そこで、シュードプロリンジペプチドによる収率向上を試みた。rNPGL と rNPGM は 5 ヶ所、cNPGL は 3 ヶ所、cNPGM は 2 ヶ所をシュードプロリンジペプチドに置換し、縮合及び脱保護は同様の条件で合成した。その結果、rNPGL と rNPGM は約 2 倍、cNPGM

は約 5 倍に収率が向上した。いずれも合成に要する時間は 2~3 日であり、精製に要する時間は 1~2 日であった。rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の収率はそれぞれ 20%、4%、12%、30%であった。

最後に、合成した NPGL 及び NPGM のジスルフィド結合形成を試みた。架橋を試みる前に、Cys 残基を 3 つ持つ rNPGM の正しい架橋位置を明らかにするため、哺乳類培養細胞である CHO 細胞や、ジスルフィド結合を形成しやすいように改良された大腸菌 SHuffle 株に産生させた rNPGM の架橋の位置を解析した。産生された rNPGM をトリプシンや Asp-N により消化し、質量分析により解析したところ、N 末側の 2 つの Cys 残基間で架橋していることが明らかになった。続いて、それぞれの架橋形成を試みた。いずれも疎水性が高いため溶媒組成を主に検討した結果、rNPGL、cNPGL、cNPGM は、50%アセトニトリル中でグルタチオン法により架橋させることができた。より疎水性の高い rNPGM は 50%アセトニトリル中でも溶解しなかったが、DMSO 酸化法により架橋させることができた。いずれも架橋に要する時間は約 2 日であり、精製に要する時間は約 1 日であった。rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の収率はそれぞれ 30%、20%、36%、30%であった。

本研究により確立した rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の合成法と収率を図 30 に示す。凍結乾燥等に要する時間を含めると約 10 日間で、rNPGL 30 mg、rNPGM 5 mg、cNPGL 20 mg、cNPGM 50 mg を合成できる系を確立した。ラットやニワトリを用いた脳室内投与実験における必要ペプチド量は、単回投与では約 1 mg、2 週間の慢性投与では約 30 mg である。これまでは 1 mg の調製さえも極めて困難であったが、本研究により単回投与実験のみならず慢性投与実験の遂行も可能になった。また、大腸菌を用いた組み換え発現系により調製した rNPGM-Gly や、マイクロウェーブを用いた固相法により合成した rNPGL を用いて、抗 NPGM 及び抗 NPGL 抗体が作製された。

そして現在、ラットやニワトリを用いた投与実験により、NPGL 及び NPGM の生理機能が少しずつ明らかになりつつある（鹿野ら、未発表）。NPGL 及び NPGM は、鳥類の摂食調節中枢である視床下部漏斗部より発見されたため、摂食調節に関与すると考えられていた。しかしながら、ラットの脳室内に NPGL や NPGM を単回投与しても、摂食量に顕著な変化は認められなかった。そこで、NPGL の 2 週間の慢性投与が行われた結果、熱産生に関与する褐色脂肪組織の機能低下を引き起こし、白色脂肪組織における脂肪蓄積を促すことが示唆された。ニワトリにおいても、NPGL 及び NPGM の 2 週間の慢性投与により白色脂肪組織の肥大化が認められている。NPGL 及び NPGM は中枢

に局在する因子であるが、褐色脂肪組織へ投射する交感神経の活動を抑制することにより、末梢での脂肪蓄積を制御している可能性が示唆されている。投与実験によって NPGL 及び NPGM は脂肪蓄積に関与することが示唆されたことから、ラットにおいて アデノ随伴ウイルスを用いた NPGL 及び NPGM の過剰発現実験が始められ、また、NPGL のトランスジェニックマウスも作製され、慢性投与実験時と同様に脂肪蓄積作用が認められている。さらに、TAL エフェクターヌクレアーゼ (Transcription Activator-Like Effector Nuclease: TALEN) の技術を用いて NPGL ノックアウトラットも作製されており、現在解析が進められている。今後、合成した NPGL 及び NPGM が受容体探索にも用いられ、より詳細な生理機能や作用機序が明らかになっていくと期待される。

本研究により NPGL 及び NPGM を大量に合成することができ、上述のように活性も見られたが、内因性の NPGL 及び NPGM が同定されていないため、合成物の構造や活性が天然物と同様であるか否かは明らかでない。内因性の NPGL 及び NPGM が同定され次第、二次構造や三次構造、活性の程度について比較解析を行う必要がある。また、rNPGM において、架橋パターンの異なるものやフリーの Cys 残基を Ser 残基等に置換したアナログペプチドを合成してそれらの活性を比較することができれば、哺乳類の NPGM のみ有する 3 つ目の Cys 残基の意義についても言及することができるであろう。さらに、代替ペプチドの開発も必要であると考えている。確立した合成系はマイクロウェーブという特殊な技法を用いるため、専用の合成機が必要であり、誰しもが容易に再現できるとは言い難い。また、NPGL 及び NPGM の溶解性の低さは、扱いの難しさの原因となり再現性の高い解析結果を得る上で不都合である。投与実験の溶媒として現在は 30% プロピレングリコールが用いられているが、溶解性を高める有機溶媒や界面活性剤は細胞毒性が懸念されるため、できる限り使用すべきでない。非常に凝集性の高いアミロイドβにおいては、合成機の違いによって収率が変ることや実験者によって実験結果がばらつくことは珍しくなく、円滑な研究推進が妨げられている。従って、天然物と同等の活性を発揮し、より合成や扱いが容易な代替ペプチドを設計することには大きな意義がある。そのためには、アミノ酸配列の保存性等を基に活性中心と予測される配列を含むペプチドフラグメントをいくつか合成し、天然物と活性を比較してより近いものを選別する必要がある。代替ペプチドの開発に成功すれば、より短期間に低コストで必要量を確保することができると考えられ、NPGL 及び NPGM の生理機能解析の飛躍的な進展に繋がるはずである。

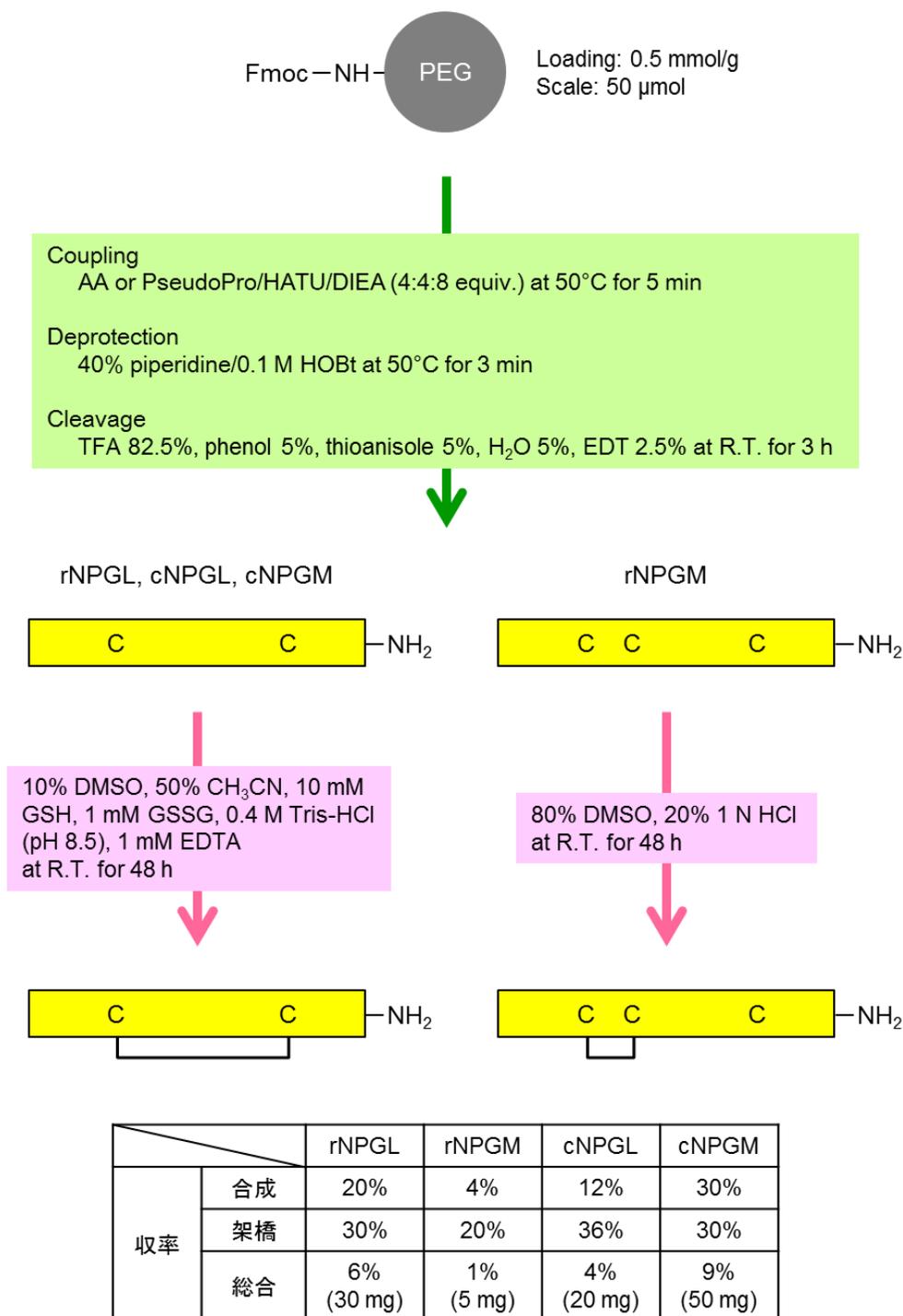


図 30. 確立した rNPGL、rNPGM、cNPGL、cNPGM の合成法と収率

マイクロウェーブとシュードプロリンジペプチドを用いた固相法によりそれぞれ合成し、rNPGL、cNPGL、cNPGM は 50%アセトニトリル中でグルタチオン法により、rNPGM は DMSO 酸化法により架橋する。50 μ mol スケールで合成した際、最終的に rNPGL 30 mg、rNPGM 5 mg、cNPGL 20 mg、cNPGM 50 mg を得られる。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、御指導と御鞭撻を賜りました広島大学大学院総合科学研究科の浮穴和義教授に厚く御礼申し上げます。また、学位審査委員として御助言をくださいました同研究科の斎藤祐見子教授、古川康雄教授、山崎昌廣教授、石田敦彦教授に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、技術的な御指導と御協力を頂きました浮穴研究室の岩越-浮穴栄子博士、大山晴香博士、谷内秀輔博士、古満芽久美さん、並びに、広島大学自然科学研究支援開発センターの網本智子さんに深く感謝いたします。この他にも、御指導、御助言、御協力を下さいました先生方と学生の方々に心より感謝いたします。

引用論文

- Abdelmoty I, Albericio F, Carpino LA, Foxman BM, Kates SA. Structural studies of reagents for peptide bond formation: Crystal and molecular structures of HBTU and HATU. *Lett Pept Sci.* 1994; 1: 57–67.
- Annis I, Hargittai B, Barany G. Disulfide bond formation in peptides. *Methods Enzymol.* 1997; 289: 198–221.
- Bacsa B, Bosze S, Kappe CO. Direct solid-phase synthesis of the beta-amyloid (1-42) peptide using controlled microwave heating. *J Org Chem.* 2010; 75: 2103–2106.
- Barlos K, Papaioannou D, Theodoropoulos D. Efficient "one-pot" synthesis of N-tritylamino acids. *J Org Chem.* 1982; 47: 1324–1326.
- Behrendt R, Huber S, Martí R, White P. New t-butyl based aspartate protecting groups preventing aspartimide formation in Fmoc SPPS. *J Pept Sci.* 2015; 21: 680–687.
- Benoiton NL, Kuroda K. Studies on racemization during couplings using a series of model tripeptides involving activated residues with unfunctionalized side chains. *Int J Pept Protein Res.* 1981; 17: 197–204.
- Bird LE. High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*. *Methods.* 2011; 55: 29–37.
- Bodanszky M, Kwei JZ. Side reactions in peptide synthesis. VII. Sequence dependence in the formation of aminosuccinyl derivatives from beta-benzyl-aspartyl peptides. *Int J Pept Protein Res.* 1978; 12: 69–74.
- Bousquet-Moore D, Mains RE, Eipper BA. Peptidylglycine α -amidating monooxygenase and copper: a gene-nutrient interaction critical to nervous system function. *J Neurosci Res.* 2010; 88: 2535–2545.
- Brondyk WH. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol.* 2009; 463: 131–147.
- Burlina F, Morris C, Behrendt R, White P, Offer J. Simplifying native chemical ligation with an N-acylsulfonamide linker. *Chem Commun.* 2012; 48: 2579–2581.
- Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J Am Chem Soc.* 1993; 115: 4397–4398.
- Carpino LA, Imazumi H, El-Faham A, Ferrer FJ, Zhang C, Lee Y, Foxman BM, Henklein P, Hanay C, Mügge C, Wenschuh H, Klose J, Beyermann M, Bienert M. The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002; 41: 441–445.

- Chang SG, Choi KD, Jang SH, Shin HC. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin. *Mol Cells*. 2003; 16: 323–330.
- Choi JH, Jeong KJ, Kim SC, Lee SY. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000; 53: 640–645.
- Chung S, Funakoshi T, Civelli O. Orphan GPCR research. *Br J Pharmacol*. 2008;153: S339–S346.
- Civelli O, Reinscheid RK, Zhang Y, Wang Z, Fredriksson R, Schiöth HB. G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013; 53: 127–146.
- Cline DJ, Thorpe C, Schneider JP. General method for facile intramolecular disulfide formation in synthetic peptides. *Anal Biochem*. 2004; 335: 168–170.
- Collins JM, Porter KA, Singh SK, Vanier GS. High-efficiency solid phase peptide synthesis (HE-SPPS). *Org Lett*. 2014; 16: 940–943.
- Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 8628–8632.
- Cooper GJ, Day AJ, Willis AC, Roberts AN, Reid KB, Leighton B. Amylin and the amylin gene: structure, function and relationship to islet amyloid and to diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta*. 1989; 1014: 247–258.
- Cottingham IR, Millar A, Emslie E, Colman A, Schnieke AE, McKee C. A method for the amidation of recombinant peptides expressed as intein fusion proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 974–977.
- Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1999; 65: 382–388.
- Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*. 1994; 266: 776–779.
- Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. 2009; 27: 297–306.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 6025–6030.
- Ding Y, Xu MQ, Ghosh I, Chen X, Ferrandon S, Lesage G, Rao Z. Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing. *J Biol Chem*. 2003; 278: 39133–39142.

- Dölling R, Beyermann M, Haenel J, Kernchen F, Krause E, Franke P, Brudel M, Bienert M. Piperidine-mediated side product formation for Asp(OBut)-containing peptides. *J Chem Soc Chem Commun.* 1994; 38: 853–854.
- Eipper BA, Mains RE. Peptide alpha-amidation. *Annu Rev Physiol.* 1988; 50: 333–344.
- El-Faham A, Subirós-Funosas R, Prohens R, Albericio F. COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chem Eur J.* 2009; 15: 9404–9416.
- El-Faham A, Albericio F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev.* 2011; 111: 6557–6602.
- Erlanson DA, Chytil M, Verdine GL. The leucine zipper domain controls the orientation of AP-1 in the NFAT.AP-1.DNA complex. *Chem Biol.* 1996; 3: 981–991.
- Etchegaray JP, Inouye M. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1999; 274: 10079–10085.
- Fernández FJ, Vega MC. Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. *Curr Opin Struct Biol.* 2013; 23: 365–373.
- Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990; 35: 161–214.
- Fremaux I, Mazères S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C, Fournier D. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem.* 2002; 3: 21.
- García-Martín F, Quintanar-Audelo M, García-Ramos Y, Cruz LJ, Gravel C, Furic R, Côté S, Tulla-Puche J, Albericio F. ChemMatrix, a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J Comb Chem.* 2006; 8: 213–220.
- García-Ramos Y, Paradís-Bas M, Tulla-Puche J, Albericio F. ChemMatrix(®) for complex peptides and combinatorial chemistry. *J Pept Sci.* 2010; 16: 675–678.
- Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 283–287.
- Gomes I, Aryal DK, Wardman JH, Gupta A, Gagnidze K, Rodriguiz RM, Kumar S, Wetsel WC, Pintar JE, Fricker LD, Devi LA. GPR171 is a hypothalamic G protein-coupled receptor for BigLEN, a neuropeptide involved in feeding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 16211–16216.
- Góngora-Benítez M, Mendive-Tapia L, Ramos-Tomillero I, Breman AC, Tulla-Puche J, Albericio F. Acid-labile Cys-protecting groups for the Fmoc/tBu strategy: filling the gap. *Org Lett.* 2012; 14: 5472–5475.
- Grassetti DR, Murray JF Jr. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys.* 1967; 119: 41–49.

- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem.* 1996; 240: 90–97.
- Hackeng TM, Griffin JH, Dawson PE. Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 10068–10073.
- Harris PW, Kowalczyk R, Hay DL, Brimble MA. A single pseudoproline and microwave solid phase peptide synthesis facilitates an efficient synthesis of human amylin 1-37. *Int J Pept Res Ther.* 2013; 19: 147–155.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002; 295: 1852–1858.
- Hasenwinkle D, Jervis E, Kops O, Liu C, Lesnicki G, Haynes CA, Kilburn DG. Very high-level production and export in *Escherichia coli* of a cellulose binding domain for use in a generic secretion-affinity fusion system. *Biotechnol Bioeng.* 1997; 55: 854–863.
- Hibino H, Nishiuchi Y. 4-Methoxybenzyloxymethyl group as an N π -protecting group for histidine to eliminate side-chain-induced racemization in the Fmoc strategy. *Tetrahedron Lett.* 2011; 52: 4947–4949.
- Hibino H, Nishiuchi Y. 4-Methoxybenzyloxymethyl group, a racemization-resistant protecting group for cysteine in Fmoc solid phase peptide synthesis. *Org Lett.* 2012; 14: 1926–1929.
- Hibino H, Miki Y, Nishiuchi Y. Synthesis and application of N α -Fmoc-N π -4-methoxybenzyloxymethylhistidine in solid phase peptide synthesis. *J Pept Sci.* 2012; 18: 763–769.
- Hibino H, Miki Y, Nishiuchi Y. Evaluation of acid-labile S-protecting groups to prevent Cys racemization in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J Pept Sci.* 2014; 20: 30–35.
- Hong D, Mingqiang Z, Min L, Changqing C, Jifang M. Production of recombinant salmon calcitonin by amidation of precursor peptide using enzymatic transacylation and photolysis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 267: 362–367.
- Hook VY, Azaryan AV, Hwang SR, Tezapsidis N. Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing. *FASEB J.* 1994; 8: 1269–1278.
- Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K, Nakayama K. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem.* 1991; 266: 12127–12130.
- Ingenito R, Bianchi E, Fattori D, Pessi A. Solid phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/t-Bu chemistry. *J Am Chem Soc.* 1999; 121: 11369–11374.

- Jeong KJ, Lee SY. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2001; 23: 311–318.
- Johnson EC, Kent SB. Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. *J Am Chem Soc*. 2006; 128: 6640–6646.
- Joly JC, Leung WS, Swartz JR. Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 2773–2777.
- Katayama H, Ohira T, Aida K, Nagasawa H. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*. 2002; 23: 1537–1546.
- Katayama H, Hojo H, Ohira T, Ishii A, Nozaki T, Goto K, Nakahara Y, Takahashi T, Hasegawa Y, Nagasawa H, Nakahara Y. Correct disulfide pairing is required for the biological activity of crustacean androgenic gland hormone (AGH) : synthetic studies of AGH. *Biochemistry*. 2010; 49: 1798–1807.
- Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983; 114: 533–540.
- Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 118: 131–139.
- Kangawa K, Fukuda A, Minamino N, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of beta-rat atrial natriuretic polypeptide (beta-rANP) of 5,000 daltons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 119: 933–940.
- Kanzian T, Nigst TA, Maier A, Pichl S, Mayr H. Nucleophilic reactivities of primary and secondary amines in acetonitrile. *Eur J Org Chem*. 2009; 6379–6385.
- Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*. 1999; 8: 1668–1674.
- Kawakami T, Aimoto S. The use of a cysteinyl prolyl ester (CPE) autoactivating unit in peptide ligation reactions. *Tetrahedron*. 2009; 65: 3871–3877.
- Kegel L, Jaegle M, Driegen S, Aunin E, Leslie K, Fukata Y, Watanabe M, Fukata M, Meijer D. Functional phylogenetic analysis of LGI proteins identifies an interaction motif crucial for myelination. *Development*. 2014; 141: 1749–1756.
- Kim KH, Seong BL. Peptide amidation: production of peptide hormones *in vivo* and *in vitro*. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2001; 6: 244–251.
- King DS, Fields CG, Fields GB. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res*. 1990; 36: 255–266.

- Kohno T, Kusunoki H, Sato K, Wakamatsu K. A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. *J Biomol NMR*. 1998; 12: 109–121.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402: 656–660.
- Kolterman OG. Amylin and glycaemic regulation: a possible role for the human amylin analogue pramlintide. *Diabet Med*. 1997; 14: S35–S38.
- Kuty GF, Xu M, Struck DK, Summer EJ, Young R. Regulation of a phage endolysin by disulfide caging. *J Bacteriol*. 2010; 192: 5682–5687.
- LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA, McCoy JM. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 322–340.
- Lee J, Saraswat V, Koh I, Song KB, Park YH, Rhee SK. Secretory production of *Arthrobacter* levan fructotransferase from recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 195: 127–132.
- Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact*. 2012; 11: 56.
- Lu HS, Boone TC, Souza LM, Lai PH. Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 268: 81–92.
- Lu W, Starovasnik MA, Kent SB. Total chemical synthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor by native chemical ligation. *FEBS Lett*. 1998; 429: 31–35.
- Maier T, Ferbitz L, Deuerling E, Ban N. A cradle for new proteins: trigger factor at the ribosome. *Curr Opin Struct Biol*. 2005; 15: 204–212.
- Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*. 2004; 5: 75–86.
- Malik L, Tofteng AP, Pedersen SL, Sørensen KK, Jensen KJ. Automated 'X-Y' robot for peptide synthesis with microwave heating: application to difficult peptide sequences and protein domains. *J Pept Sci*. 2010; 16: 506–512.
- Malins LR, Payne RJ. Synthesis and utility of β -selenol-phenylalanine for native chemical ligation-deselenization chemistry. *Org Lett*. 2012; 14: 3142–3145.
- Malins LR, Payne RJ. Recent extensions to native chemical ligation for the chemical synthesis of peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol*. 2014; 22: 70–78.

- Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81: 5662–5666.
- Maruyama K, Nagasawa H, Suzuki A. 2,2'-Bispyridyl disulfide rapidly induces intramolecular disulfide bonds in peptides. *Peptides*. 1999; 20: 881–884.
- Mergler M, Dick F, Sax B, Stähelin C, Vorherr T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part II. *J Pept Sci*. 2003; 9: 518–526.
- Mergler M, Dick F. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part III. *J Pept Sci*. 2005; 11: 650–657.
- Mergulhão FJ, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*. 2005; 23: 177–202.
- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1963; 85: 2149–2154.
- Metanis N, Keinan E, Dawson PE. Traceless ligation of cysteine peptides using selective deselenization. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010; 49: 7049–7053.
- Meyer RC, Giddens MM, Schaefer SA, Hall RA. GPR37 and GPR37L1 are receptors for the neuroprotective and glioprotective factors prosaptide and prosaposin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 9529–9534.
- Michels T, Dölling R, Haberkorn U, Mier W. Acid-mediated prevention of aspartimide formation in solid phase peptide synthesis. *Org Lett*. 2012; 14: 5218–5221.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983; 114: 541–548.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984a; 119: 14–20.
- Minamino N, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin L: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Neuropeptides*. 1984b; 4: 157–166.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984c; 122: 542–549.
- Mitsuda, Y., Takimoto, A., Kamitani, S., Kitamura, K., Sakata, T. and Mitsushima, K. Large-scale production of functional human adrenomedullin: expression, cleavage, amidation, and purification. *Protein Expr Purif*. 2002; 25: 448–455.
- Mizuno K, Sakata J, Kojima M, Kangawa K, Matsuo H. Peptide C-terminal alpha-amidating enzyme purified to homogeneity from *Xenopus laevis* skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; 137: 984–991.
- Mizuno K, Ohsuye K, Wada Y, Fuchimura K, Tanaka S, Matsuo H. Cloning and sequence of cDNA encoding a peptide C-terminal alpha-amidating enzyme from *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 148: 546–552.

- Mori K, Miyazato M, Ida T, Murakami N, Serino R, Ueta Y, Kojima M, Kangawa K. Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J*. 2005; 24: 325–335.
- Mosco A, Edomi P, Guarnaccia C, Lorenzon S, Pongor S, Ferrero EA, Giulianini PG. Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. *Regul Pept*. 2008; 147: 88–95.
- Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6705–6710.
- Muralidharan V, Muir TW. Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat Methods*. 2006; 3: 429–38.
- Murphy NG, Varney SM, Tallon JM, Thompson JR, Blanc PD. Fatal occupational exposure to trimethylsilyl-diazomethane. *Clin Toxicol*. 2009; 47: 712.
- Muthusamy K, Albericio F, Arvidsson PI, Govender P, Kruger HG, Maguire GE, Govender T. Microwave assisted SPPS of amylin and its toxicity of the pure product to RIN-5F cells. *Biopolymers*. 2010; 94: 323–330.
- Murthy AS, Mains RE, Eipper BA. Purification and characterization of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase from bovine neurointermediate pituitary. *J Biol Chem*. 1986; 261: 1815–1822.
- Nagai C, Asazuma H, Nagata S, Ohira T, Nagasawa H. A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides*. 2009; 30: 507–517.
- Ohana RF, Encell LP, Zhao K, Simpson D, Slater MR, Urh M, Wood KV. HaloTag7: a genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expr Purif*. 2009; 68: 110–120.
- Palasek SA, Cox ZJ, Collins JM. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *J Pept Sci*. 2007; 13: 143–148.
- Pedersen SL, Tofteng AP, Malik L, Jensen KJ. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem Soc Rev*. 2012; 41: 1826–1844.
- Qing G, Ma LC, Khorchid A, Swapna GV, Mal TK, Takayama MM, Xia B, Phadtare S, Ke H, Acton T, Montelione GT, Inouye M. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2004; 22: 877–882.
- Rais-Beghdadi C, Roggero MA, Fasel N, Reymond CD. Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag. *Appl Biochem Biotechnol*. 1998; 74: 95–103.
- Richardson JP, Macmillan D. Optimisation of chemical protein cleavage for erythropoietin semi-synthesis using native chemical ligation. *Org Biomol Chem*. 2008; 6: 3977–3982.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014; 5: 172.

- Sagane K, Ishihama Y, Sugimoto H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int J Biol Sci.* 2008; 4: 387–396.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998; 92: 573–585.
- Schally AV, Sawano S, Arimura A, Barrett JF, Wakabayashi I, Bowers CY. Isolation of growth hormone-releasing hormone (GRH) from porcine hypothalami. *Endocrinology.* 1969a; 84: 1493–1506.
- Schally AV, Redding TW, Bowers CY, Barrett JF. Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem.* 1969b; 244: 4077–4088.
- Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RM, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971a; 43: 393–399.
- Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A. Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem.* 1971b; 246: 7230–7236.
- Schally AV, Dupont A, Arimura A, Redding TW, Nishi N, Linthicum GL, Schlesinger DH. Isolation and structure of somatostatin from porcine hypothalami. *Biochemistry.* 1976; 15: 509–514.
- Sasaki T, Feng ZP, Scott R, Grigoriev N, Syed NI, Fainzilber M, Sato K. Synthesis, bioactivity, and cloning of the L-type calcium channel blocker omega-conotoxin TxVII. *Biochemistry.* 1999; 38: 12876–12884.
- Shokri A, Sandén AM, Larsson G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 60: 654–664.
- Singer D, Zauner T, Genz M, Hoffmann R, Zuchner T. Synthesis of pathological and nonpathological human exon 1 huntingtin. *J Pept Sci.* 2010; 16: 358–363.
- Slos P, Speck D, Accart N, Kolbe HV, Schubnel D, Bouchon B, Bischoff R, Kieny MP. Recombinant cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*: high-level secretion, purification, and characterization. *Protein Expr Purif.* 1994; 5: 518–526.
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988; 67: 31–40.
- Sohma Y, Sasaki M, Hayashi Y, Kimura T, Kiso Y. Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through *O-N* intramolecular acyl migration reaction of *O*-acyl isoepitides. *Chem Commun (Camb).* 2004; 124–125.

- Sohma Y, Chiyomori Y, Kimura M, Fukao F, Taniguchi A, Hayashi Y, Kimura T, Kiso Y. 'O-Acyl isopeptide method' for the efficient preparation of amyloid beta peptide 1-42 mutants. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13: 6167–6174.
- Sohma Y, Yoshiya T, Taniguchi A, Kimura T, Hayashi Y, Kiso Y. Development of O-acyl isopeptide method. *Biopolymers.* 2007; 88: 253–262.
- Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986; 189: 113–130.
- Su Y, Zou Z, Feng S, Zhou P, Cao L. The acidity of protein fusion partners predominantly determines the efficacy to improve the solubility of the target proteins expressed in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2007; 129: 373–382.
- Subirós-Funosas R, Prohens R, Barbas R, El-Faham A, Albericio F. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry.* 2009a; 15: 9394–9403.
- Subirós-Funosas R, Acosta GA, El-Faham A, Albericio F. Microwave irradiation and COMU: a potent combination for solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 2009b; 50: 6200–6202.
- Tamamura H, Otaka A, Nakamura J, Okubo K, Koide T, Ikeda K, Fujii N. Disulfide bond formation in S-Acetoamidomethyl cysteine-containing peptides by the combination of silver trifluoromethanesulfonate and dimethylsulfoxide / aqueous HCl. *Tetrahedron Lett.* 1993; 34: 4931–4934.
- Taniguchi A, Sohma Y, Kimura M, Okada T, Ikeda K, Hayashi Y, Kimura T, Hirota S, Matsuzaki K, Kiso Y. "Click peptide" based on the "O-acyl isopeptide method": control of A beta1-42 production from a photo-triggered A beta1-42 analogue. *J Am Chem Soc.* 2006; 128: 696–697.
- Taniguchi A, Skwarczynski M, Sohma Y, Okada T, Ikeda K, Prakash H, Mukai H, Hayashi Y, Kimura T, Hirota S, Matsuzaki K, Kiso Y. Controlled production of amyloid beta peptide from a photo-triggered, water-soluble precursor "click peptide". *Chembiochem.* 2008; 9: 3055–3065.
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.* 1982; 296: 659–660.
- Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 72: 211–222.
- Thapa P, Zhang RY, Menon V, Bingham JP. Native chemical ligation: a boon to peptide chemistry. *Molecules.* 2014; 19: 14461–14483.

- Thompson RE, Chan B, Radom L, Jolliffe KA, Payne RJ. Chemoselective peptide ligation-desulfurization at aspartate. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013; 52: 9723–9727.
- Tofteng AP, Pedersen SL, Staerk D, Jensen KJ. Effect of residual water and microwave heating on the half-life of the reagents and reactive intermediates in peptide synthesis. *Chem Eur J.* 2012; 18: 9024–9031.
- Torbееv VY, Kent SB. Convergent chemical synthesis and crystal structure of a 203 amino acid "covalent dimer" HIV-1 protease enzyme molecule. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007; 46: 1667–1670.
- Townsend SD, Tan Z, Dong S, Shang S, Brailsford JA, Danishefsky SJ. Advances in proline ligation. *J Am Chem Soc.* 2012; 134: 3912–3916.
- Trevaskis JL, Coffey T, Cole R, Lei C, Wittmer C, Walsh B, Weyer C, Koda J, Baron AD, Parkes DG, Roth JD. Amylin-mediated restoration of leptin responsiveness in diet-induced obesity: magnitude and mechanisms. *Endocrinology.* 2008; 149: 5679–5687.
- Tsuda S, Yoshiya T, Mochizuki M, Nishiuchi Y. Synthesis of cysteine-rich peptides by native chemical ligation without use of exogenous thiols. *Org Lett.* 2015; 17: 1806–1809.
- Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 446: 298–303.
- Wade JD, Bedford J, Sheppard RC, Tregear GW. DBU as an N alpha-deprotecting reagent for the fluorenylmethoxycarbonyl group in continuous flow solid-phase peptide synthesis. *Pept Res.* 1991; 4: 194–199.
- Wang A, Lu SD, Mark DF. Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure-function analysis of the cysteine residues. *Science.* 1984; 224: 1431–1433.
- Wehrstedt KD, Wandrey PA, Heitkamp D. Explosive properties of 1-hydroxybenzotriazoles. *J Hazard Mater.* 2005; 126: 1–7.
- Wilcox WC, Long D, Sodora DL, Eisenberg RJ, Cohen GH. The contribution of cysteine residues to antigenicity and extent of processing of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J Virol.* 1988; 62: 1941–1947.
- Wöhr T, Wahl F, Nefzi A, Rohwedder B, Sato T, Sun X, Mutter M. Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 1996; 118: 9218–9227.
- Xu M, Arulandu A, Struck DK, Swanson S, Sacchettini JC, Young R. Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science.* 2005; 307, 113–117.

- Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007; 282: 26354–26360.
- Yan LZ, Dawson PE. Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization. *J Am Chem Soc.* 2001; 123: 526–533.
- Yoshiya T, Kawashima H, Sohma Y, Kimura T, Kiso Y. O-acyl isopeptide method: efficient synthesis of isopeptide segment and application to racemization-free segment condensation. *Org Biomol Chem.* 2009; 7: 2894–2904.
- Yu HM, Chen ST, Wang KT. Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *J Org Chem.* 1992; 57: 4781–4784.
- Zhang L, Chou CP, Moo-Young M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. *Biotechnol Adv.* 2011; 29: 923–929.
- Zhang ZY, Dodd GT, Tiganis T. Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36: 661–674.
- Zhang ZZ, Yang SS, Dou H, Mao JF, Li KS. Expression, purification, and C-terminal amidation of recombinant human glucagon-like peptide-1. *Protein Expr Purif.* 2004; 36: 292–299.

参考論文

第1章 大腸菌を用いた組み換え発現系による調製

- (1) Masuda K, Furumitsu M, Taniuchi S, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K.

Production and characterization of neurosecretory protein GM using *Escherichia coli* and Chinese Hamster Ovary cells.

FEBS Open Bio. 2015; 5: 844–851.

第2章 Intein の原理を用いた手法による調製

- (2) Masuda K, Furumitsu M, Ooyama H, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K.

Synthesis of neurosecretory protein GM composed of 88 amino acid residues by native chemical ligation.

Tetrahedron Lett. 2016; 57: 804–807.

第3章 マイクロウェーブを用いた固相法による調製

- (3) Masuda K, Ooyama H, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K.

Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of neurosecretory protein GL composed of 80 amino acid residues.

J Pept Sci. 2015; 21: 454–460.

第4章 ジスルフィド結合の解析及び形成方法の検討

上記 (1) と (3)