

研究成果報告書

研 究 題 目		マイクロ波を用いた長鎖ペプチドの大量合成法の確立	実 施 年 度
			2020 年度
代 表 研 究 者	所 属	広島大学 大学院統合生命科学研究科 総合科学部 自然探究領域	
	氏 名	浮 穴 和 義 印	

1. 研究の目的・背景

これまでに我々は、脳の視床下部領域に特異的に発現しており、パラログ関係にある 2 種類の新規遺伝子を見出した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014)。ここ数年間の研究推進により、これら新規遺伝子は摂食調節中枢に発現しており、エネルギーホメオスタシスに重要な脳因子をコードしている新規摂食及びエネルギー代謝調節関連遺伝子であることを見出している (マウス; Endocrinology 2017、ラット; eLife 2017、ニワトリ; Front. Endocrinol. 2019、総説; Gen. Comp. Endocrinol. 2018 など)。これら新規遺伝子から翻訳されるタンパク質には 80~88 アミノ酸残基からなる分泌性長鎖ペプチドがコードされており、それぞれの C 末端部分の配列から、Neurosecretory protein GL 及び GM (NPGL 及び NPGM) と命名した。ペプチド内部に Cys 残基が複数個あることからジスルフィド結合の存在が考えられる。

NPGL 及び NPGM の生理機能を解明するためには、合成物の効率的な大量産出が必要となる。NPGL に関しては、ペプチド有機化学合成方法を漸く確立しているが (J. Pept. Sci. 2015)、改善すべき点がある。さらに、NPGL より長い NPGM のペプチド合成方法の確立は達成できておらず、研究が停滞している状態である。この NPGM は、88 アミノ酸残基からなる長鎖ペプチドであり、NPGL とアミノ酸配列の相同性が 32%であり、疎水性も極めて高い。またシステイン残基が 3 つあるために架橋パターンが不明なことと C 末端がアミド化された構造をしている。そこで本研究では、マイクロ波照射を利用したペプチド有機化学合成を行い、長鎖ペプチド性の NPGL 及び NPGM の効率的な大量産出方法の確立を目的とした。本研究の遂行により、機能解析のための足掛かりとなる NPGL 及び NPGM の合成物を効率的に得ることができ、今後の摂食・エネルギー代謝調節機構の分子メカニズムの解明のための礎となると考えた。我々はラットとニワトリを用いて機能解析を進めようとしているため、ラットとニワトリの NPGL 及び NPGM の化学合成の確立を目指した。

小分子の有機合成分野におけるマイクロ波の利用は極めて一般的な手法となっている。マイクロ波は電波の一つで、電波は電磁波の 1 つである。電子レンジに代表されるマイクロ波を用いた温度上昇は生活面でも大いに役立っている。特に近年、有機化学合成分野でのマイクロ波の利用は急速に進んでいるが、長鎖ペプチドの固相合成法への利用は未知な点が多い。本研究は電気エネルギーの有効利用のために有益な成果を生むと考えて、研究を遂行した。

2. 研究成果及び考察（申請時の計画に対する達成度合を織込む）

上述の通り、ペプチド化学合成はマイクロ波照射可能なペプチド合成機を用いた。まず、ラット NPGL 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。同様の方法でラット NPGM、ニワトリ NPGL、ニワトリ NPGM も合成することができた。しかしながら、ラット NPGM 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。しかしながら、O-アシルイソジペプチド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 NPGM 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。ラット NPGM 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、ラット NPGM 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。そこで次に、シュードプロリンジペプチドによる収率向上を試みた。ラット NPGL とラット NPGM は 5 ヶ所、ニワトリ NPGL は 3 ヶ所、ニワトリ NPGM 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、ラット NPGL とラット NPGM は約 2 倍、ニワトリ NPGM は約 5 倍に収率が向上した。ラット NPGL、ラット NPGM、ニワトリ NPGL、ニワトリ NPGM の収率はそれぞれ 20%、4%、12%、30%であった。さらに、合成した NPGL 及び NPGM のジスルフィド結合形成を試みた。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、ラット NPGL、ニワトリ NPGL、ニワトリ NPGM 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。より疎水性の高いラット NPGM 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。ラット NPGL、ラット NPGM、ニワトリ NPGL、ニワトリ NPGM の収率はそれぞれ 30%、20%、36%、30%であった。最終的に 1 回の合成で約 30mg の大量の合成物を得ることに成功した。

最後に、NPGL 及び NPGM の可溶化を高める目的のために、N 末端側に 9 アミノ酸残基からなる親水性タグを付加したペプチド合成にも取り組んだ。その結果、合計 88～97 アミノ酸残基からなる NPGL 及び NPGM を効率よく合成でき、さらに親水性を高められることを見出した。これらを用いて、現在、動物への投与実験を行い、タグ無しペプチドとの活性比較を進めているところである。

本研究の着手前は NPGM のペプチド化学合成が全く進んでいなかったが、それを達成することができ、当初の研究計画を 100%遂行することに成功した。特に、マイクロ波照射とシュードプロリンジペプチドを用いることで、難合成・長鎖ペプチドの化学合成を効率的に大量に行えることを初めて示した。

3. 経費の使用状況（申請時の計画に対する実績を記述）

本経費は、ほぼ当初の計画通りに使用し、全額を使用し終えた。

設備備品としてペプチド合成時に必要な真空ポンプを購入した。実験スペースが手狭であったため、全学共通研究スペースを借用したため、その実験室使用料を支出した。マイクロ波照射可能なペプチド合成機は1年に最低1回のメンテナンスが必要であるため、当初27万円の経費を計上していたが、結果的には16.5万円となった。そのため、その差額の余剰分を消耗品費として使用した。消耗品はいずれもペプチド合成に必要な器具類と試薬類であった。ペプチド化学合成の消耗品はいずれも高価であるため、本研究助成の採択が大いに役立った。

以上の通り、助成いただいた研究経費を有効に使用させていただき、下記の通り、学会発表並びに学術論文公表など、大きな成果を上げることができた。

この場をお借りして、公益財団法人 中国電力技術研究財団に御礼申し上げる。

4. 将来展望（今後の発展性、実用化の見込み等について記述）

アミノ酸がアミド結合により連結したペプチドは、ライフサイエンス分野において生体機能分子の機能解析や酵素基質・創薬・ワクチン作製などに利用されている。さらに、長鎖ペプチドはタンパク質の一部でもあり、タンパク質は生体内の最大の構成要素である。そのため、ペプチド合成は、化学・製薬企業も含め重要な市場を形成しており、ベンチャー企業を含め多くの受託合成会社が存在している。近年、様々なペプチド化学合成法が開発されているが、50 アミノ酸残基以上の長鎖ペプチドの合成は通常困難が伴う。短いペプチド断片を合成後に縮合するライゲーション法による長鎖ペプチド合成法があるが、特殊な合成技術と知識が必要であり、有機化学者以外の非専門家が簡単にペプチド化学合成を行える技術として一般化されてはいない。今回の研究でも用いた通り、マイクロ波照射を利用した有機化学合成が行われるようになり、より短時間での合成が可能となっている。特に、ペプチド合成の分野においても反応時間の短縮が期待でき、また、凝集体の形成を防止し、より長鎖ペプチドの合成にも用いられることとなった。今回の研究遂行により、合成困難な約100アミノ酸残基からなる長鎖ペプチド（小タンパク質）の合成法を確立できたため、基礎研究での科学的利用に関して研究用試薬として販売も十分にあり得ると考えている。また、同様に難合成の長鎖ペプチド合成にも応用可能であると考えており、これに特化したベンチャー企業の立ち上げも考慮に入れて現在研究を進めている。

5. 成果の発表（学会での発表、学術誌への投稿等を記載。予定を含む）

学会発表

内藤万菜、岩越栄子、古満芽久美、成松勇樹、福村圭介、三村朱花、浮穴和義 溶解性向上を目指した視床下部分泌性小タンパク質 NPGL の有機化学合成と作用解析 第 92 回 日本動物学会オンライン 米子大会 2021 年 9 月 2～4 日 発表予定

学術誌（全て謝辞あり）

1. Narimatsu Y, Fukumura K, Iwakoshi-Ukena E, Mimura A, Furumitsu M, Ukena K. Subcutaneous infusion of neurosecretory protein GL promotes fat accumulation in mice. **Heliyon** (2021 in press)
2. Fukumura K, Shikano K, Narimatsu Y, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Naito M, Ukena K. Effects of neurosecretory protein GL on food intake and fat accumulation under different dietary nutrient compositions in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 85:1514-1520 (2021)
3. Moriwaki S, Narimatsu Y, Fukumura K, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ukena K. Effects of chronic intracerebroventricular infusion of RFamide-related peptide-3 on energy metabolism in male mice. **Int. J. Mol. Sci.** 21:8606 (2020)