

平成5年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託

「先進バイオ材料の創製加工技術の研究開発
(ペプチド応用二酸化炭素固定化・有効利用技術)」

成 果 報 告 書
(第2巻：総合調査研究)

平成6年3月

財団法人 大阪科学技術センター

NEDO 図書・資料室



010015468-1

179
68



目 次

第1章 ペプチドの構造設計

Stabilization of α -Helix in C-Terminal Fragments of Neuropeptide Y	
……Noboru Yumoto, Sachiko Murase, Takashi Hattori, Hitoshi Yamamoto, Yoshiro Tatsu, and Susumu Yoshikawa	1
Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Study of Elastase Substrates and Inhibitors	
……Motoyoshi Nomizu, Takanori Iwaki, Takeyoshi Yamashita, Yoshimasa Inagaki, Katsuhiko Asano, Miki Akamatsu and Toshio Fujita	7
ペプチドの構造設計	沼波憲一 18

第2章 ペプチドの合成技術

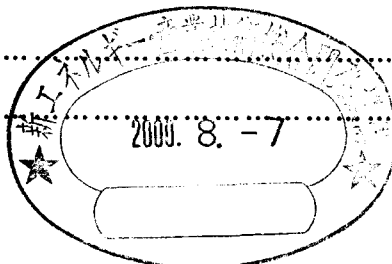
Synthesis of Barnase Site-Specifically Labelled with Two ^{13}C Atoms Using Partially Protected Peptide Thioester Building Blocks	
……Hironobu Hojo and Saburo Aimoto	23
ペプチド合成技術（化学的合成法）	豊島 正 28
酵素法によるペプチド合成	杉原耿雄 33

第3章 非天然アミノ酸の合成とペプチドへの取り込み

配座制御法による新しいグルタミン酸アゴニストの開発	大船泰史・島本啓子 39
Adaptability of nonnatural aromatic acids to the active center of the E. coli ribosomal A site	
……Takahiro Hoshaka, Ken Sato, Masahiko Sisido Kazuyuki Takai, Shigeyuki Yokoyama	49
異常アミノ酸類の合成をペプチドへの取り込み	大船泰史 53
非天然アミノ酸を含むペプチド	瀬戸保彦 59

第4章 ペプチドの構造解析

Molecular Conformation of Porcine Amelogenin in Solution: Three Folding Units at the N-Terminal, Central, and C-Terminal Regions	
--	--



……Yuji Goto, Eiichi Kogure, Toshio Takagi, Saburo Aimoto, and Takaaki Aoba	68
ペプチドの構造形成技術……………吉川 暹	74
ペプチドの構造形成とその評価……………山本 仁	81

第5章 ペプチドの生理活性

Total Synthesis of Aureobasidin A, an Antifungal Cyclic Depsipeptide

……Toru Kurome, Kaoru Inami, Tetsuya Inoue, Katsushige Ikai, Kazutoh Takesako, Ikunoshin Kato, and Tetsuo Shiba	88
--	----

第6章 ペプチドの材料化と機能発現

1. 材料化

ペプチドの材料化技術(1)……………谷 敝孝	92
ペプチドの材料化技術(2)……………藤村 庄	94

2. 機能発現

Synthesis of 2' (3')-O-Aminoacyl-pdCpA Carrying a Photofunctional Nonnatural Amino Acid

……Takaaki Ninomi and Masahiko Sisido	99
--------------------------------------	----

Photoswitching of NAD⁺-Mediated Enzyme Reaction through Photoreversible Antigen-Antibody Reaction

……Takahiro Hoshika, Kazuo Kawashima, and Masahiko Sisido	103
--	-----

分子識別機能(1)……………中路修平	105
--------------------	-----

分子識別機能(2)……………湯元 昇	110
--------------------	-----

膜機能とペプチド……………田口隆久	115
-------------------	-----

ペプチドの触媒作用(1)……………達 吉郎	121
-----------------------	-----

ペプチドの触媒作用(2)……………川原田 肇、大嶋健 駒田伊知朗	126
-------------------------------------	-----

STABILIZATION OF α -HELIX IN C-TERMINAL FRAGMENTS OF NEUROPEPTIDE Y

Noboru Yumoto, Sachiko Murase, Takashi Hattori, Hitoshi Yamamoto, Yoshiro Tatsu,
and Susumu Yoshikawa¹

Government Industrial Research Institute, Osaka, Ikeda, Osaka 563, Japan

Received September 30, 1993

To elucidate the α -helix-stabilizing effect of amino acids at the helical ends, we prepared analogs of C-terminal fragments of neuropeptide Y (NPY) containing an α -helical part. The helix-stabilizing tendency of N-terminal amino acid in NPY(12-36) was found to be as follows: Thr > Ser > Gly > Gln > Cys > Asn > Asp > Val > Phe > Glu > Lys > Tyr > Ala = Trp > His > Arg, suggesting the importance of end capping. The capping effect was not evident when N-termini in NPY(11-36) and NPY(13-36) were replaced. Under the same conditions as those for the receptor binding, [Thr¹²]NPY(12-36) had about 4-fold higher α -helix content than [Arg¹²]NPY(12-36). However, there was no apparent relationship between the helix content and binding affinity to the Y₂ receptor.

© 1993 Academic Press, Inc.

Neuropeptide Y (NPY) is an amidated 36 amino acid peptide, and has been proposed to have a compact globular structure named the PP-fold as shown in Fig. 1 based on the X-ray analysis of the homologous avian pancreatic polypeptide (1). However, recent NMR studies indicated that the α -helical part extends over residues 11-36 and the N-terminal part (residues 1-9) is an unstructured mobile segment in aqueous solution (2, 3).

NPY is widely distributed in the central and peripheral nervous systems, and thought to be involved in the sympathetic vascular control, the central regulation of endocrine and autonomic function, food intake, circadian rhythm, etc. (4). Two subtypes of receptors for NPY have been well characterized (5): Y₁ receptors are activated poorly by fragments of NPY, whereas Y₂ receptors can bind C-terminal fragments of NPY such

¹To whom correspondence should be addressed at Government Industrial Research Institute, Osaka, 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563, Japan. Fax: (+81)-727-51-9628.

Abbreviation used: NPY, neuropeptide Y.

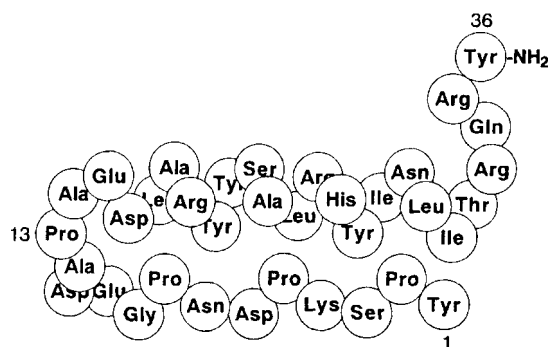


Fig. 1. Schematic drawing of porcine neuropeptide Y. The PP-fold comprises two antiparallel helices, an *N*-terminal polyproline helix (residues 1-8) and an amphipathic α -helix (residues 14-32), connected by a type I β -turn.

as NPY(13-36) effectively. A single substitution of the middle residue in the α -helical region with a helix-breaking proline residue caused decrease in the binding affinity to both types of receptors as well as in the α -helix content (6), suggesting that the formation of α -helical structure is very important for the receptor binding. To elucidate the α -helix-stabilizing effect of amino acids at the helical end in NPY, we have prepared analogs of C-terminal fragments of NPY, in which *N*-terminal residues were substituted.

Two major interactions that stabilize α -helix at its ends are known; charged side-chain/helix dipole interactions (7) and side-chain/main-chain hydrogen bonding (8). α -Helices have a large macrodipole with a positive pole near the *N*-terminus and a negative pole near the *C*-terminus, because individual peptide dipoles are aligned almost parallel to the helix axis. Therefore, electrostatic interactions between the macrodipole and charged side-chains at the ends of helix are important for α -helix stability (7, 9). An alternative determinant is the presence of residues at the helix ends whose side chains can form hydrogen bonds with the initial four NH groups and final four CO groups of the main chain, because these groups lack intrahelical hydrogen-bond partners. Such a type of side-chain/main-chain hydrogen bonding is called end capping or capping interaction (8, 10). In the PP-fold family, the charged side-chain/helix dipole interactions are reported to be important for the stabilization for the α -helical part (11, 12). In this study, however, we found that end capping at the *N*-terminus of the α -helical part in NPY is more important for the stabilization.

MATERIALS AND METHODS

Materials. NPY and Fmoc-L-amino acids were purchased from Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan), reagents for peptide synthesis and TentaGel TG-RAM resin from

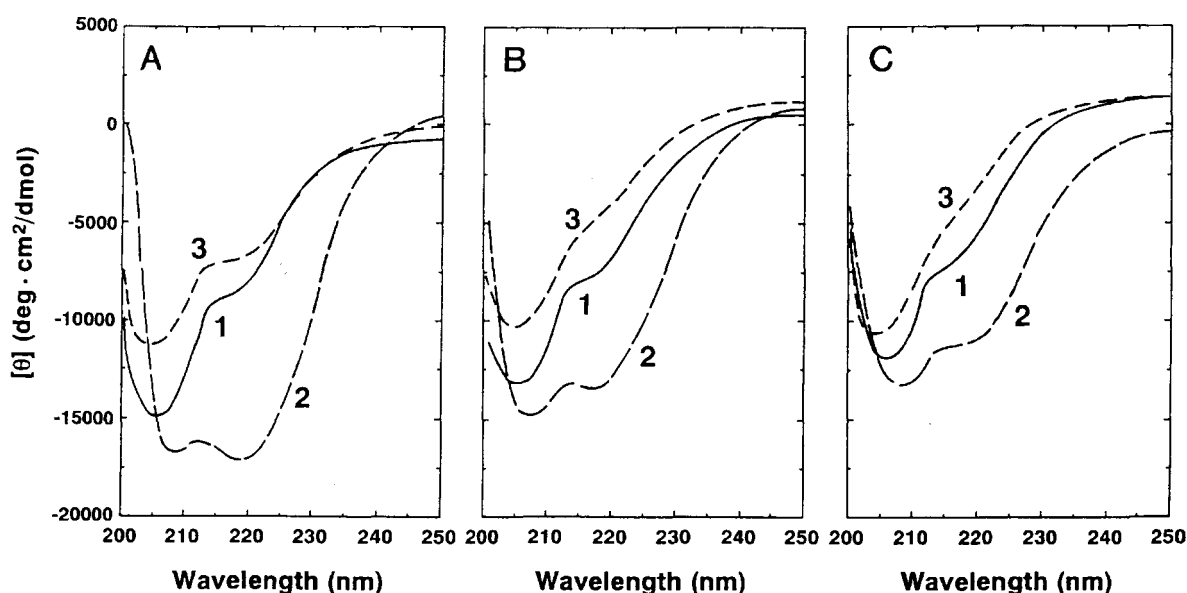


Fig. 2. CD spectra of NPY(12-36), [Thr¹²]NPY(12-36) and [Arg¹²]NPY(12-36). CD spectra were measured at 10°C (A), 25°C (B) and 37°C (C) with a 0.2 cm light path. The peptides were dissolved in 5 mM 7, N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminomethanesulfonate buffer (pH 7.5). Curve 1, NPY(12-36) (30.8 μ M); curve 2, [Thr¹²]NPY(12-36) (18.0 μ M); curve 3, [Arg¹²]NPY(12-36) (14.3 μ M).

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan), and ¹²⁵I-NPY labeled with Bolton and Hunter reagent from Amersham International (Amersham, U.K.). All the other chemicals used were of reagent grade.

Peptide Synthesis. NPY analogs were synthesized on a Shimadzu automated solid-phase peptide synthesizer PSSM-8, cleaved from the resin by trifluoroacetic acid, and purified by reversed phase HPLC. The purity of each peptide was checked by analytical HPLC, and the molecular weights were confirmed by mass spectrometry on a time-of-flight mass spectrometer (Shimadzu/Kratos Kompact MALDI II) with matrix-assisted laser desorption ionization.

CD Measurements. CD measurements were carried out with a Jasco spectropolarimeter, Model J-500A, equipped with a data processor DP-501. The temperature of peptide solutions was controlled by using a thermostatically controlled cell holder.

Receptor Binding Assay. Porcine hippocampal membranes used for binding assay were prepared according to the method of Shigeri *et al.* (13). The ¹²⁵I-NPY binding to Y₂ receptors on the hippocampal membranes was determined also by the method of Shigeri *et al.* (13).

RESULTS AND DISCUSSION

The secondary structure of analogs of C-terminal fragments of NPY was analyzed by CD, and typical examples are shown in Fig. 2. The analogs showed characteristic CD spectra indicating a mixture of α -helix and random coil. Calculation of the α -helix content by using the mean residue ellipticity at 222 nm, $[-\theta]_{222}$ (14) revealed that [Thr¹²]NPY(12-36) had about 4-fold higher α -helix content than [Arg¹²]NPY(12-36) at the same pH (pH 7.5) and temperature (37°C) as those for the receptor binding assay. Figure 3 shows the α -helix contents of analogs of NPY(11-36), NPY(12-36) and

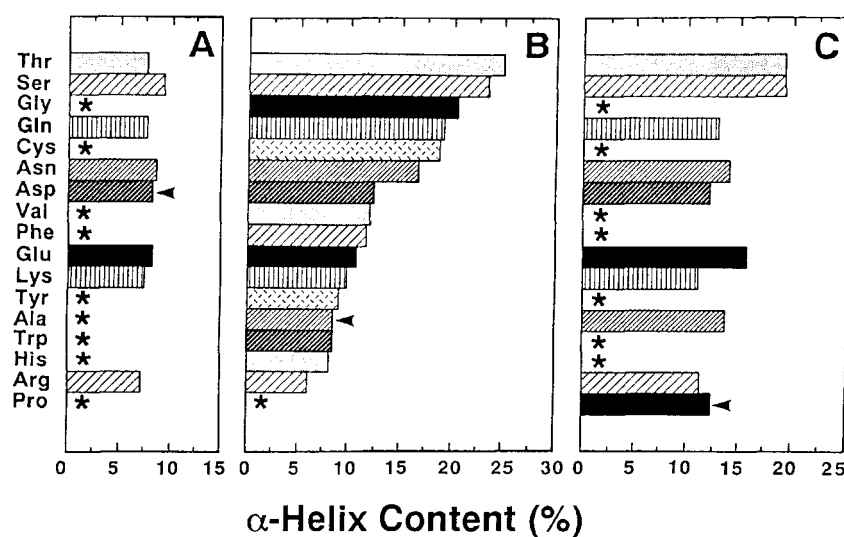


Fig. 3. α -Helix contents of analogs of NPY(11-36) (A), NPY(12-36) (B) and NPY(13-36) (C). In all analogs, *N*-terminal amino acids were replaced with the indicated amino acids. α -Helix contents were calculated by using $[\theta]_{222}$ values at 37°C according to the method of Chen *et al.* (14). Arrowheads indicate the wild-type *N*-terminal amino acids. *, not determined.

NPY(13-36) at pH 7.5 and 37°C. When the CD spectra of analogs of NPY(12-36) were monitored as a function of temperature, the midpoint temperatures of thermal unfolding curves decreased in order of α -helical content shown in Fig. 3B. In NPY(12-36), *N*-terminal residues whose side chains can accept a main chain NH proton (Thr, Ser, Gln, Cys, and Asn) are more effective for the helix-stabilization than negatively charged residues (Asp and Glu). Although the replacement of *N*-terminal Pro with Thr or Ser in NPY(13-36) also stabilized the α -helix to some extent, other substitutions in NPY(13-36) and any substitution in NPY(11-36) did not significantly affect the stability (Fig. 3AC). These results indicate that Ala-12 in NPY is located at the *N*-cap position which demarcates the helix *N*-terminus, and that *N*-terminal capping is more important for helix stabilization than negatively charged side-chain/helix dipole interactions in NPY. The helix-stabilizing tendency at this position is consistent with the preferences observed in X-ray elucidated proteins (10, 15) and short model peptides (16-18). The presence of Pro at 13th residue in NPY also coincides well with the preference at *N*-cap + 1 (10). The helix-stabilizing effect of Gly at 12th residue cannot be attributed to capping or charge-dipole interactions. A similar result obtained in barnase was explained in terms of the least interference of Gly with solvation of the NH groups at the helix terminus (19).

To reveal the relationship between formation of the α -helical part and receptor binding activity, we examined the inhibitory effect of above peptides on ^{125}I -NPY binding

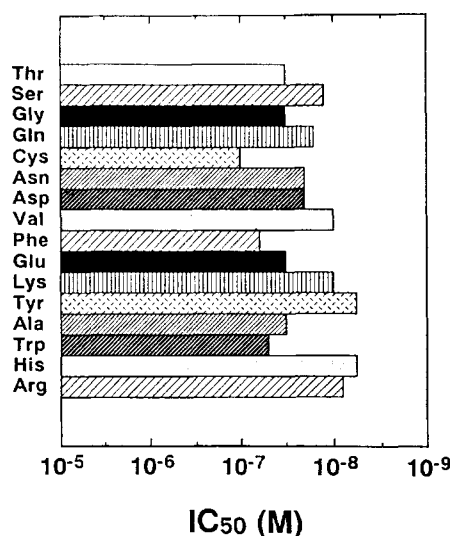


Fig. 4. Inhibition of ¹²⁵I-NPY binding to Y₂ receptor by analogs of NPY(12-36). IC₅₀ values were calculated from inhibition curves which were obtained by displacement of specific ¹²⁵I-NPY binding to porcine hippocampal membranes by the analogs.

to porcine hippocampal membranes, which were often used as a homogeneous Y₂ receptor preparation (6, 13). IC₅₀ values of the analogs of NPY(12-36) significantly differed as shown in Fig. 4, but there was no apparent relationship between the helix content and IC₅₀ value. Recent studies on the arginine-rich region (17 amino acid peptide) of the HIV Rev protein revealed that α -helix content of its analogs correlated well with specific binding to Rev response element RNA (20). In this case, formation of a rigid secondary structure is a prerequisite for specific binding to its target. In contrast, it seems unnecessary for NPY to form a rigid α -helical structure before binding to the Y₂ receptor.

REFERENCES

1. Schwartz, T. W., Fuhlendorff, J., Kjems, L. L., Kristensen, M. S., Vervelde, M., O'Hare, M., Krstenansky, J. L., and Bjørnholm, B. (1990) *Ann. NY Acad. Sci.* **611**, 35-47.
2. Cowley, D. J., Hoflack, J. M., Pelton, J. T., and Saudek, V. (1992) *Eur. J. Biochem.* **205**, 1099-1106.
3. Mierke, D. F., Dürr, H., Kessler, H., and Jung, G. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**, 39-48.
4. Wahlestedt, C. and Reis, D. J. (1993) *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **33**, 309-352.
5. Wahlestedt, C., Grundemar, L., Håkanson, R., Heilig, M., Shen, G. H., Zukowska-Grojec, Z., and Reis, D. J. (1990) *Ann. NY Acad. Sci.* **611**, 7-26.
6. Fuhlendorff, J., Johansen, N. L., Melberg, S. G., Thøgersen, H., and Schwartz, T. W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11706-11712.
7. Shoemaker, K. R., Kim, P. S., York, E. J., Stewart, J. M., and Baldwin, R. L. (1987) *Nature* **326**, 563-567.
8. Presta, L. G. and Rose, G. D. (1988) *Science* **240**, 1632-1641.
9. Scholtz, J. M. and Baldwin, R. L. (1992) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 95-118.
10. Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1988) *Science* **240**, 1648-1652.
11. Tonan, K., Kawata, Y., and Hamaguchi, K. (1990) *Biochemistry* **29**, 4424-4429.

12. Bjørnholm, B., Jørgensen, F. S., and Schwartz, T. W. (1993) *Biochemistry* **32**, 2954-2959.
13. Shigeri, Y., Mihara, S., and Fujimoto, M. (1991) *J. Neurochem.* **56**, 852-859.
14. Chen, Y.-H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1972) *Biochemistry* **13**, 3350-3359.
15. Stickle, D. F., Presta, L. G., Dill, K. A., and Rose, G. D. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 1143-1159.
16. Lyu, P. C., Zhou, H. X., Jelveh, N., Wemmer, D. E., and Kallenbach, N. R. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6560-6562.
17. Lyu, P. C., Wemmer, D. E., Zhou, H. X., Pinker, R. J., and Kallenbach, N. R. (1993) *Biochemistry* **32**, 421-425.
18. Forood, B., Feliciano, E. J., and Nambiar, K. P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 838-842.
19. Serrano, L. and Fersht, A. R. (1989) *Nature* **342**, 296-299.
20. Tan, R., Chen, L., Buettner, J. A., Hudson, D., and Frankel, A. D. (1993) *Cell* **73**, 1031-1040.

Quantitative structure–activity relationship (QSAR) study of elastase substrates and inhibitors

MOTOYOSHI NOMIZU¹, TAKANORI IWAKI¹, TAKEYOSHI YAMASHITA¹, YOSHIMASA INAGAKI¹,
KATSUHIKO ASANO¹, MIKI AKAMATSU² and TOSHIO FUJITA²

¹ Pharmaceutical Laboratory, Kirin Brewery Co. Ltd., Maebashi Gunma, Japan and ² Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

Received 27 August 1992, accepted for publication 17 January 1993

One hundred Suc-X-Y-Ala-pNA peptides (Suc: succinyl, pNA: *p*-nitroanilide, X, Y: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, α -aminobutyric acid, norvaline, norleucine) were synthesized and their reaction constants with porcine pancreatic elastase (K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m) were determined. These reaction constants were quantitatively analyzed using the Free–Wilson/Fujita–Ban method. The contribution of amino acid side chains to the reaction constants K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m , expressed logarithmically, was found to be additive. On the other hand, 19 elastase inhibitors of the general formula $CF_3CO-X-Y-Ala-pNA$ (X,Y: ten amino acids) were synthesized, and their inhibition constants were compared with the Michaelis constant for the corresponding substrates and analyzed using free-energy-related substituent constants. In the analysis of amino acid side chains in the Y position, the K_i value of the inhibitor was generally correlated to the K_m value of the substrate, which corresponded to the inhibitor, thus confirming the validity of the equation

$$\log(1/K_i) = 1.271 \log(1/K_m) + 4.831$$

This study may serve as a prototypical approach to unraveling structure–activity relationships of peptide substrates and inhibitors of medicinal or agricultural importance. © Munksgaard 1993.

Key words: elastase; Free–Wilson/Fujita–Ban analysis; inhibitor; peptide; QSAR analysis; substrate

Elastase is a major serine proteases which is considered to participate in the pathogenesis of some diseases, particularly of emphysema (1–3). Porcine pancreatic elastase (PPE) has been the subject of many studies using synthetic substrates and inhibitors (4–10). In particular, the substrate specificities of PPE have been determined and discussed with peptides *p*-nitroanilides (6), methyl esters (7), chloromethyl ketone inhibitors (8) and natural peptides (10).

Recently, the quantitative structure–activity relationship (QSAR) analyses of biologically active peptides, oxytocin (11), enkephalin (12), renin inhibitors (13), and bitter thresholds of peptides (14), have been studied. The hydrophobicity of oligopeptides has also been analyzed using QSAR techniques, and their structural descriptors were discussed (15).

In this paper we describe the QSAR analyses of the PPE substrates of the general formula Suc-X-Y-Ala-pNA [Suc: succinyl, pNA: *p*-nitroanilide, X,Y: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Aba (α -amino butyric acid), Nva (norvaline), Nle (norleucine)]. The QSAR analysis of the effects of the amino acid side chain on the substrates was useful for designing inhibitors. One hundred substrates have been synthesized and their cleavage by PPE was determined (K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m). The reaction constants were quantitatively analyzed using the Free–Wilson/Fujita–Ban method (16), and the effects of amino acid side chains on the reaction constants were elucidated in detail. In studies of en-

Abbreviations used: Suc, succinyl; pNA, *p*-nitroanilide; Aba, α -aminobutyric acid; Nva, norvaline; Nle, norleucine; PPE, porcine pancreatic elastase; QSAR, quantitative structure–activity relationship; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; TFA, trifluoroacetic acid; DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; Su, *N*-hydroxysuccinimidyl; Np, *p*-nitrophenyl; TLC, thin-layer chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; DMF, dimethylformamide; THF, tetrahydrofuran; DCHA, dicyclohexylamine; DMSO, dimethyl sulfoxide.

zyme and ligand, the specificity of the P_1 and P_1' sites (17) is the most important determinant, but in designing specific ligands or drugs, the specificities of the other sites are also important factors. The quantitative analyses of the subtle effects of amino acid side chains at the P_2 and P_3 sites should provide useful information for designing new inhibitors of elastase.

Nineteen trifluoroacetylated inhibitors (18, 19) with the general formula $CF_3CO-X-Y-Ala-pNA$ were synthesized, and their kinetic constants (K_i) were determined. The effects of amino acid residues in the X and Y position on inhibitory activity were also analyzed by QSAR techniques, providing an interesting correlation between the inhibitors and the corresponding substrates.

RESULTS

Synthesis of substrates and inhibitors

The synthesis of substrates and inhibitors is outlined as follows. Suc-tripeptide-pNA or CF_3CO -tripeptide-pNA was prepared by acylation with succinic anhydride or trifluoroacetylimidazole of the corresponding trifluoroacetic acid (TFA) treated *tert*-butyloxycarbonyl (Boc)-tripeptide-pNA. Boc-tripeptide-pNA compounds were synthesized by two routes. One route utilized the *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (20) condensation reagent for coupling of Boc-X-Y-OH with H-Ala-pNA. Boc-X-Y-OH was prepared using the *N*-hydroxysuccinimidyl (Su) (21) or *p*-nitrophenyl (Np) (22) active ester procedure. The other route utilized the DCC condensation through coupling of Boc-X-OH with HCl-dioxane-treated Boc-Y-Ala-pNA. Boc-Y-Ala-pNA was prepared by condensation of Boc-Y-OH and H-Ala-pNA using the DCC method.

Enzyme assays and kinetic analysis

Amidolytic activities of the above synthetic substrates were assayed using PPE and spectrophotometric monitoring at 410 nm of the rate of production of *p*-nitroaniline. Kinetic studies were carried out to determine K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m . The Michaelis constant, K_m , was calculated from the Lineweaver-Burk plot obtained with substrate concentrations in the range 0.01–2.5 mM; ($k_{cat} = v/[E]$).

The inhibitory activities of the above trifluoroacetyl tripeptide derivatives toward the enzyme were tested, and kinetic studies were carried out in order to determine the mode and potency (K_i) of the inhibition. Enzymatic activity was assayed by the use of the synthetic substrate Suc-(Ala)₃-pNA (compound 11) (9) and monitoring the rate of production of *p*-nitroaniline at 410 nm.

Analysis of substrates

The reaction constants which were observed for the synthetic substrates were analyzed quantitatively. Suc-Pro-Y-Ala-pNAs (Y: ten amino acids) were essentially

uncleaved by PPE, and Suc-Gly-Gly-Ala-pNA showed extremely low activity. Therefore these compounds were not used in these analyses. The $\log(1/K_m)$, $\log k_{cat}$ and $\log(k_{cat}/K_m)$ values of the 89 compounds are shown in Table 1. In each position the mathematical contributions of amino acid side-chains to the reaction constants were analyzed quantitatively using the Free-Wilson/Fujita-Ban method (16), using the regression equations shown below. This analytical method was based on the effect of a residue in each position relative to that of alanine, using the indicator variables for each amino acid residue except alanine. In these equations the variable takes a value of 0 or 1 [e.g. Gly(X) is the variable which takes a value of 1 only when the amino acid at position X is glycine in Suc-X-Y-Ala-pNA.].

$$\begin{aligned} \log(1/K_m) = & 0.127Nva(X) - 0.519Gly(Y) + 0.166Phe(Y) + \\ & (0.119) \quad (0.134) \quad (0.128) \\ & 0.524Nle(Y) + 0.206Aba(Y) - 0.171 \\ & (0.128) \quad (0.128) \quad (0.050) \end{aligned} \quad (1)$$

$n = 89, s = 0.178, r = 0.815$

$$\begin{aligned} \log k_{cat} = & -1.052Gly(X) - 0.309Phe(X) - 0.557Gly(Y) \\ & (0.116) \quad (0.110) \quad (0.125) \\ & -0.498Leu(Y) - 0.871Phe(Y) + 0.389Pro(Y) \\ & (0.119) \quad (0.119) \quad (0.119) \\ & -0.213Nle(Y) + 0.939 \\ & (0.119) \quad (0.052) \end{aligned} \quad (2)$$

$n = 89, s = 0.163, r = 0.948$

$$\begin{aligned} \log(k_{cat}/K_m) = & -1.158Gly(X) - 0.439Phe(X) - 0.147Leu(X) \\ & (0.089) \quad (0.085) \quad (0.085) \\ & -1.050Gly(Y) - 0.527Leu(Y) - 0.674Phe(Y) \\ & (0.100) \quad (0.095) \quad (0.095) \\ & +0.457Pro(Y) + 0.347Nle(Y) + 0.199Nva(Y) \\ & (0.095) \quad (0.095) \quad (0.095) \\ & +0.242Aba(Y) + 3.793 \\ & (0.095) \quad (0.051) \end{aligned} \quad (3)$$

$n = 89, s = 0.125, r = 0.979$

In these and the following equations, n is the number of compounds, s is the standard deviation, r is the correlation coefficient, and the values in parentheses are the 95% confidence intervals.

The constant values have been calculated for Suc-Ala-Ala-Ala-pNA.

Analysis of inhibitors

Next, the inhibitory potencies of the synthetic inhibitors, general formula $CF_3CO-X-Y-Ala-pNA$, were quantitatively analyzed. The mathematical contributions of amino acid residues in the X and Y positions to the inhibitory potency were calculated.

TABLE 1
Synthetic substrates and their reaction constants

No.	Suc-X-Y-Ala-pNA		log (1/ K_m)		log k_{cat}		log (k_{cat}/K_m)	
	X	Y	Obsd.	Calcd.	Obsd.	Calcd.	Obsd.	Calcd.
1	Gly	Ala	-0.354	-0.170	0.049	-0.113	2.695	2.636
2	Gly	Val	-0.231	-0.171	-0.105	-0.113	2.703	2.636
3	Gly	Leu	0.125	-0.171	-0.796	-0.611	2.328	2.109
4	Gly	Ile	0.036	-0.171	-0.337	-0.113	2.704	2.636
5	Gly	Pro	-0.322	-0.171	0.068	0.276	2.746	3.092
6	Gly	Phe	-0.260	-0.006	-0.854	-0.984	1.881	1.961
7	Gly	Aba	0.059	0.034	-1.121	-0.113	2.832	2.877
8	Gly	Nva	-0.220	-0.171	0.041	-0.113	2.882	2.834
9	Gly	Nle	0.149	0.353	-0.155	-0.326	2.994	2.983
10	Ala	Gly	-0.686	-0.690	0.107	0.383	2.422	2.743
11	Ala	Ala	-0.225	-0.171	0.936	0.939	3.711	3.793
12	Ala	Val	-0.049	-0.171	0.979	0.939	3.930	3.793
13	Ala	Leu	-0.193	-0.171	0.515	0.441	3.322	3.267
14	Ala	Ile	-0.083	-0.171	0.951	0.939	3.869	3.793
15	Ala	Pro	-0.207	-0.171	1.436	1.328	4.230	4.250
16	Ala	Phe	-0.072	-0.006	0.375	0.068	3.303	3.119
17	Ala	Aba	-0.114	0.034	1.033	0.939	3.920	4.035
18	Ala	Nva	-0.061	-0.171	1.045	0.939	3.985	3.992
19	Ala	Nle	0.638	0.353	0.622	0.726	4.265	4.141
20	Val	Gly	-0.493	-0.690	0.467	0.383	2.974	2.743
21	Val	Ala	-0.215	-0.171	1.185	0.939	3.970	3.793
22	Val	Val	0.041	-0.171	0.876	0.939	3.920	3.793
23	Val	Leu	-0.243	-0.171	0.561	0.441	3.318	3.267
24	Val	Ile	-0.170	-0.171	0.880	0.939	3.710	3.793
25	Val	Pro	0.033	-0.171	1.476	1.328	4.509	4.250
26	Val	Phe	0.018	-0.006	0.210	0.068	3.225	3.119
27	Val	Aba	0.276	0.034	0.866	0.939	4.140	4.035
28	Val	Nva	0.060	-0.171	0.965	0.939	4.025	3.992
29	Val	Nle	0.228	0.353	0.864	0.726	4.090	4.141
30	Leu	Gly	-0.559	-0.690	0.188	0.383	2.628	2.596
31	Leu	Ala	-0.326	-0.171	1.107	0.939	3.781	3.646
32	Leu	Val	-0.185	-0.171	0.780	0.939	3.595	3.646
33	Leu	Leu	-0.340	-0.171	0.412	0.441	3.072	3.119
34	Leu	Ile	-0.452	-0.171	0.991	0.939	3.539	3.646
35	Leu	Pro	0.142	-0.171	0.996	1.328	4.140	4.103
36	Leu	Phe	-0.152	-0.006	0.033	0.068	2.881	2.971
37	Leu	Aba	-0.158	0.034	1.053	0.939	3.895	3.888
38	Leu	Nva	-0.045	-0.171	0.925	0.939	3.880	3.844
39	Leu	Nle	0.071	0.353	0.956	0.726	4.041	3.993
40	Ile	Gly	-0.708	-0.690	0.607	0.383	2.900	2.743
41	Ile	Ala	-0.371	-0.171	1.210	0.939	3.838	3.793
42	Ile	Val	-0.252	-0.171	0.927	0.939	3.674	3.793
43	Ile	Leu	-0.312	-0.171	0.358	0.441	3.045	3.267
44	Ile	Ile	-0.152	-0.171	0.738	0.939	3.585	3.793
45	Ile	Pro	0.071	-0.171	1.274	1.328	4.346	4.250
46	Ile	Phe	-0.188	-0.006	0.158	0.068	2.971	3.119
47	Ile	Aba	-0.086	0.034	1.068	0.939	3.982	4.035
48	Ile	Nva	-0.228	-0.171	1.061	0.939	3.833	3.992
49	Ile	Nle	0.585	0.353	0.407	0.726	3.992	4.141
50	Phe	Gly	-0.812	-0.690	0.037	0.073	2.225	2.305
51	Phe	Ala	-0.425	-0.171	0.890	0.630	3.465	3.355
52	Phe	Val	-0.207	-0.171	0.511	0.630	3.303	3.355
53	Phe	Leu	-0.344	-0.171	0.310	0.132	2.965	2.828
54	Phe	Ile	-0.255	-0.171	0.490	0.630	3.236	3.355
55	Phe	Pro	-0.107	-0.171	1.000	1.019	3.893	3.811
56	Phe	Phe	0.013	-0.006	-0.409	-0.241	2.605	2.680

Continued

TABLE 1
(continued)

No.	Suc-X-Y-Ala-pNA		log (1/ K_m)		log k_{cat}		log (k_{cat}/K_m)	
	X	Y	Obsd.	Calcd.	Obsd.	Calcd.	Obsd.	Calcd.
57	Phe	Aba	0.053	0.034	0.556	0.630	3.610	3.596
58	Phe	Nva	-0.033	-0.171	0.612	0.630	3.579	3.553
59	Phe	Nle	0.108	0.353	0.553	0.417	3.660	3.702
60	Aba	Gly	-0.906	-0.690	0.565	0.383	2.658	2.743
61	Aba	Ala	-0.155	-0.171	1.086	0.939	3.931	3.793
62	Aba	Val	0.215	-0.171	0.619	0.939	3.834	3.793
63	Aba	Leu	-0.037	-0.171	0.471	0.441	3.435	3.267
64	Aba	Ile	0.222	-0.171	0.653	0.939	3.876	3.793
65	Aba	Pro	-0.362	-0.171	1.581	1.328	4.220	4.250
66	Aba	Phe	0.252	-0.006	-0.076	0.068	3.179	3.119
67	Aba	Aba	0.060	0.034	1.045	0.939	4.107	4.035
68	Aba	Nva	-0.244	-0.171	0.787	0.939	4.029	3.992
69	Aba	Nle	0.538	0.353	0.589	0.726	4.124	4.141
70	Nva	Gly	-0.377	-0.563	0.199	0.383	2.822	2.743
71	Nva	Ala	-0.362	-0.044	1.060	0.939	3.699	3.793
72	Nva	Val	0.051	-0.044	0.814	0.939	3.863	3.793
73	Nva	Leu	-0.246	-0.044	0.471	0.441	3.226	3.267
74	Nva	Ile	-0.228	-0.044	0.860	0.939	3.631	3.793
75	Nva	Pro	-0.143	-0.044	1.380	1.328	4.238	4.250
76	Nva	Phe	0.222	0.121	-0.102	0.068	3.124	3.119
77	Nva	Aba	0.131	0.161	0.925	0.939	4.061	4.035
78	Nva	Nva	0.316	-0.044	0.741	0.939	4.057	3.992
79	Nva	Nle	0.569	0.480	0.604	0.726	4.057	3.992
80	Nle	Gly	-0.851	-0.690	0.581	0.383	2.730	2.743
81	Nle	Ala	-0.328	-0.171	1.143	0.939	3.814	3.793
82	Nle	Val	-0.188	-0.171	0.840	0.939	3.653	3.793
83	Nle	Leu	-0.371	-0.171	0.303	0.441	2.947	3.267
84	Nle	Ile	-0.068	-0.171	0.730	0.939	3.662	3.793
85	Nle	Pro	-0.196	-0.171	1.380	1.328	4.185	4.250
86	Nle	Phe	0.244	-0.006	-0.086	0.068	3.158	3.119
87	Nle	Aba	0.215	0.034	0.812	0.939	4.025	4.035
88	Nle	Nva	-0.262	-0.171	1.176	0.939	3.914	3.992
89	Nle	Nle	0.420	0.353	0.736	0.726	4.173	4.141

In the analysis of the X position, the log(1/ K_i) values of the seven CF₃CO-X-Ala-Ala-pNAs are shown in Table 2. π -Values for amino acid side chains were proposed on the basis of the experimentally measured hydrophobicity (15, 23). Equation (4) was derived using them.

$$\log(1/K_i) = 0.515\pi - 0.329B + 4.471 \quad (4)$$

(0.193) (0.209) (0.249)

$$n = 7, s = 0.089, r = 0.967$$

In eqn. (4), B is an indicator variable: if the amino acid X has a branched side chain, $B = 1$; if it has a linear side chain, $B = 0$.

In the analysis of the Y position, the log(1/ K_i) values of the nine inhibitors are listed in Table 3. The corre-

TABLE 2
Inhibition of PPE by CF₃CO-X-Ala-Ala-pNA

No.	CF ₃ CO-X-Ala-Ala-pNA	log(1/ K_i)		π^a	B^b
		Obsd.	Calcd.		
101	Ala	4.545	4.631	0.31	0
102	Val	4.773	4.770	1.22	1
103	Leu	5.062	5.018	1.70	1
104	Ile	5.022	5.069	1.80	1
107	Aba	4.988	4.909	0.85	0
108	Nva	5.274	5.187	1.39	0
109	Nle	5.384	5.415	1.93	0

^a π -values from ref. (23).

^b $B = 0$ if the amino acid has linear side chain, or $B = 1$ if the amino acid side chain is branched.

TABLE 3
Inhibition of PPE by CF₃CO-Ala-Y-Ala-pNA

No.	CF ₃ CO-Ala-Y-Ala-pNA	log(1/K _i)		log(1/K _m) ^a
		Obsd.	Calcd.	
110	Gly	3.935	3.959	-0.354
101	Ala	4.545	4.545	-0.225
111	Val	4.847	4.769	-0.049
112	Leu	4.701	4.586	-0.193
113	Ile	4.569	4.726	-0.083
114	Pro	4.582	4.568	-0.209
115	Phe	4.635	4.740	-0.072
116	Aba	4.756	4.686	-0.114
117	Nva	4.764	4.754	-0.061

^a log(1/K_m) value corresponding to Suc-Ala-Y-Ala-pNA substrate listed in Table 1.

lation between log(1/K_i) for CF₃CO-Ala-Y-Ala-pNA and log(1/K_m) for the corresponding succinyl tripeptide derivative was found, and eqn. (5) was derived.

$$\log(1/K_i) = 1.271 \log(1/K_m) + 4.831 \quad (5)$$

(0.392) (0.104)

$$n = 9, s = 0.093, r = 0.945$$

In eqn. (5) log(1/K_m) is the logarithmic reaction constant of the corresponding succinyl tripeptide derivatives.

DISCUSSION

In eqns. (1)–(3) each slope value of the indicator variable terms shows the degree of the variation of activity caused by replacing the alanine residue with the corresponding amino acid into this position. The mathematical contributions of the amino acid side chains to the reaction constants in the X and Y positions are summarized in Table 4.

The Free-Wilson/Fujita-Ban method assumes that the mathematical contributions of each partial structure to the activity are additive. The contributions of amino acid side chains to log(1/K_m) and log *k*_{cat} were found to be additive to some degree; each value is found within a small range.

Equation (3) for log(*k*_{cat}/K_m) is a very satisfactory equation, as is shown by the standard deviation and the correlation coefficient. It suggests that effects of variation of the amino acids side chain in each position are almost completely explained by the additive model.

As shown in Table 4, an increase or decrease of the volume of amino acid side chain in the X position fails to increase log(1/K_m) and log *k*_{cat} relative to substrates having alanine in this position. In the Y position, the values of 1/K_m were found to show a tendency to increase with the length of the amino acid side chains, and the presence of amino acids with branched side chains did not affect 1/K_m relative to the values with an alanine residue in the same position. The *k*_{cat}-values

 TABLE 4
Effect of amino acid residues at X and Y positions on the substrate activity, the reference being taken as alanine in each position

	X			Y			Side chain
	Δlog(1/K _m)	Δlog <i>k</i> _{cat}	Δlog (<i>k</i> _{cat} /K _m)	Δlog(1/K _m)	Δlog(<i>k</i> _{cat})	Δlog(<i>k</i> _{cat} /K _m)	
Gly	0	-1.05	-1.16	-0.52	-0.56	-1.05	-H
Ala	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	-CH ₃
Aba	0	0	0	0.20	0	0.25	-CH ₂ -CH ₃
Nva	-0.13	0	0	0	0	0.20	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
Nle	0	0	0	0.52	-0.21	0.35	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
							CH ₃
Val	0	0	0	0	0	0	-CH
							CH ₃
							CH ₃
Leu	0	0	-0.15	0	-0.50	-0.52	-CH ₂ -CH
							CH ₃
							CH ₃
Ile	0	0	0	0	0	0	-CH
							CH ₂ -CH ₃
Pro		(negative)		0	0.39	0.46	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(N)
Phe	0	-0.31	-0.44	0.17	-0.87	-0.67	-CH ₂ -

^a Based on the effect of an alanine residue in each position.

relative to that of alanine were increased more by proline residues but were decreased by glycine, norleucine, leucine and phenylalanine.

These analyses suggest that the reaction constants in each position were related to hydrophobicity and steric effects of the amino acid side chains. K_m relates to the binding of the substrate to the enzyme, and k_{cat} to the preparation of acylated enzyme and the release of *p*-nitroaniline from the enzyme, which is related to the conformational variation of the enzyme. Thus this seemed to require a more detailed investigation by comparison with the effect of inhibition using inhibitors.

The effect of the amino acid residue in the X position is given in eqn. (4), which shows that $1/K_i$ is increased by hydrophobic amino acid side chains, and decreased by branched side chains. For the set of 7 residues in the X position, a correlation of the inhibitors and the substrates was not found. Thus the results suggested that in the case of a Suc-type substrate and a CF_3CO -type inhibitor, the amino acid in the X position binds to a different site on the enzyme.

From eqn. (5), obtained by analysis of the effect of the amino acid residue in the Y position, an interesting phenomenon is observed: the $1/K_i$ and K_m values are neutrally correlated (for details see Table 3). This phenomenon suggested that in the Y position the same amino acid is favored both in the substrate and in the inhibitor.

Many studies of the X-ray crystal structures of PPE with or without ligands have appeared (24), and the X-ray structure of trifluoroacetyl-dipeptide-pNA with PPE has been determined by Hughes *et al.* (25). This X-ray study showed that the CF_3CO group is at the S1 subsite in the active site of PPE, and dipeptide-pNA is bound at sites close to the S1' to S3' subsite. Comparison between the X-ray studies and our QSAR results suggests that the Suc-type substrate and CF_3CO -type inhibitor are bound in different sites. Nle was most suitable in the X position of CF_3CO -tripeptide-pNA, and the Lys residue in CF_3CO -dipeptide-pNA is bound at the S1' site of PPE. Nle and Lys have similar shapes but have differing charge distributions. Thus the two residues seem to bind close together in an area which is narrow and hydrophobic. However, in our QSAR study, a correlation of the amino acid effects in the Y position of the substrates (K_m) and the inhibitors (K_i) was observed. From this observation we postulate that the Y residue of the Suc-type substrate and the CF_3CO -type inhibitor seem to bind to close or similar sites of PPE.

These quantitative analyses of the effects of the amino acid composition on substrate and inhibitory activity are very interesting enzymatically and lead to a useful index for the design of new elastase inhibitors and the development of peptidic drugs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Amino acid derivatives and peptide reagents were obtained from Kokusan Chemical Works, Ltd. (Tokyo, Japan). Melting points were determined on a Yanagimoto melting point apparatus, model MP-J3. Optical rotations were measured with a JASCO automatic polarimeter, model DIP-140. The hydrolyses of peptide derivatives for amino acid analyses were carried out in 6 N HCl at 110 °C for 24 h. Amino acid compositions of acid hydrolysates were determined with a Hitachi amino acid analyzer, model L-8500. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica-gel plate (Kieselgel G60, Merck). HPLC was conducted with a Waters compact model 204, using a Nucleosil 5C18 column (7.5 × 250 mm).

General procedure for synthesis of Boc-Y-Ala-pNA (Y = Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Aba, Nva, Nle). DCC (5.92 g, 28.68 mmol) was added to a mixture of Boc-Y-OH (26.68 mmol) and H-Ala-pNA (5.00 g, 23.90 mmol) in dimethylformamide (DMF) (80 mL) at 0 °C and the mixture, after being stirred at room temperature overnight, was filtered. The solvent was removed by evaporation and the residue was extracted with AcOEt (200 mL). The organic phase was washed with 5% citric acid, 5% $NaHCO_3$ and H_2O , dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was crystallized from ether or isopropylether followed by recrystallization from MeOH with ether or isopropylether.

General procedure for synthesis of Boc-X-Y-OH (X, Y = Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe). Boc-X-OSu or ONp (30.0 mmol) in tetrahydrofuran (THF) (100 mL) was mixed with a solution or suspension of H-Y-OH (90.0 mmol) and Et_3N (12.5 mL, 90.0 mmol) in H_2O (50 mL) in an ice-bath. After 6 h the solvent was removed by evaporation and the residue was dissolved in 5% $NaHCO_3$ (200 mL). The aqueous phase was washed with ether and acidified with citric acid. The resulting precipitate was extracted with AcOEt (200 mL) and the extract was washed with 5% citric acid and aqueous saturated NaCl solution, then dried over Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified by recrystallization from appropriate solvents (MeOH- Et_2O , MeOH-isopropyl ether, AcOEt-n-hexane). If an oily precipitate was obtained, it was converted into the dicyclohexylamine (DCHA) salt and the salt was recrystallized or precipitated from MeOH-ether or AcOEt-n-hexane. Boc-Pro-Pro-OH and its DCHA salt were oily products, and could not be purified by the above procedures. They were purified by column chromatography on silica gel using $CHCl_3$ -MeOH (10:0.5) as an eluent.

General procedure for synthesis of Boc-X-Y-Ala-pNA from Boc-X-Y-OH and H-Ala-pNA (X, Y = Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe). DCC (592 mg, 2.87 mmol) was added to a mixture of Boc-X-Y-OH (2.87 mmol) and H-Ala-

TABLE 5
Purification procedure, m.p., optical rotation, *R_f* values and HPLC retention time of Suc-X-Y-Ala-pNA

No.	Suc-X-Y-Ala-pNA		Purification system ^a	M.p. (°C)	[α] _D ²⁰ in DMSO (conc.)	<i>R_f</i> ^b	HPLC retention time (min) ^c
	X	Y					
0	Gly	Gly	C	200–202	– 29.2 (0.3)	0.11	26.22
1	Gly	Ala	C	125–127	– 28.7 (0.1)	0.23	27.86*
2	Gly	Val	C	185–188	– 27.6 (0.7)	0.26	32.16
3	Gly	Leu	A	148–150	– 23.4 (0.6)	0.38	36.40
4	Gly	Ile	A	120–123	– 35.2 (0.2)	0.40	35.56*
5	Gly	Pro	A	216–218	– 57.8 (0.4)	0.16	29.40
6	Gly	Phe	A	102–105	– 30.9 (0.1)	0.40	38.22
7	Gly	Aba	A	151–153	– 20.0 (0.3)	0.16	31.16
8	Gly	Nva	A	108–110	– 13.8 (0.5)	0.16	35.24
9	Gly	Nle	A	97–99	– 11.8 (0.5)	0.16	37.46
10	Ala	Gly	A	130–132	– 1.4 (0.2)	0.24	28.82
11	Ala	Ala	B	122–124	– 26.2 (0.5)	0.16	30.64
12	Ala	Val	B	122–124	– 39.8 (0.5)	0.29	34.04*
13	Ala	Leu	B	175–177	– 35.4 (0.3)	0.45	38.90
14	Ala	Ile	B	225–227	– 40.8 (0.6)	0.37	38.60
15	Ala	Pro	B	130–132	– 57.2 (0.4)	0.37	30.46
16	Ala	Phe	B	136–138	– 20.2 (0.3)	0.54	41.38
17	Ala	Aba	B	214–216	– 30.3 (0.5)	0.18	34.04*
18	Ala	Nva	B	190–192	– 24.5 (0.3)	0.27	36.90
19	Ala	Nle	B	142–144	– 23.7 (0.5)	0.30	40.42
20	Val	Gly	A	190–194	– 11.2 (0.3)	0.38	34.12
21	Val	Ala	B	145–148	– 21.5 (0.4)	0.32	36.02
22	Val	Val	B	221–224	– 29.8 (0.3)	0.39	38.90
23	Val	Leu	B	122–125	– 30.4 (0.3)	0.51	44.42
24	Val	Ile	B	182–184	– 27.2 (0.3)	0.59	41.80
25	Val	Pro	B	115–117	– 39.8 (0.3)	0.45	35.54*
26	Val	Phe	B	229–233	– 20.4 (0.4)	0.49	49.82
27	Val	Aba	B	237–239	– 26.7 (0.3)	0.26	38.80*
28	Val	Nva	B	223–227	– 26.5 (0.3)	0.26	41.96*
29	Val	Nle	B	196–198	– 17.5 (0.4)	0.30	45.42
30	Leu	Gly	A	192–195	– 28.7 (0.5)	0.28	39.16*
31	Leu	Ala	B	170–173	– 22.9 (0.7)	0.36	40.80*
32	Leu	Val	B	222–225	– 29.9 (0.7)	0.40	42.74
33	Leu	Leu	B	120–122	– 30.6 (0.6)	0.68	48.60
34	Leu	Ile	B	214–217	– 31.1 (0.8)	0.56	45.80*
35	Leu	Pro	B	104–108	– 46.8 (0.5)	0.39	39.84
36	Leu	Phe	B	198–200	– 17.4 (0.3)	0.64	49.60
37	Leu	Aba	B	212–214	– 29.1 (0.4)	0.28	43.56
38	Leu	Nva	B	211–213	– 30.5 (0.5)	0.36	45.96*
39	Leu	Nle	B	178–180	– 31.1 (0.3)	0.39	49.84
40	Ile	Gly	C	113–115	– 9.2 (0.2)	0.32	37.56
41	Ile	Ala	B	225–228	– 16.9 (0.3)	0.47	40.20
42	Ile	Val	B	227–230	– 19.2 (0.3)	0.47	42.08
43	Ile	Leu	B	185–187	– 24.3 (0.3)	0.52	47.78
44	Ile	Ile	B	245–247	– 26.1 (0.3)	0.69	45.32
45	Ile	Pro	B	135–140	– 49.2 (0.4)	0.40	38.56
46	Ile	Phe	B	115–118	– 13.2 (0.3)	0.68	49.86
47	Ile	Aba	B	239–241	– 21.6 (0.4)	0.27	43.16*
48	Ile	Nva	B	238–240	– 26.6 (0.4)	0.37	47.54*
49	Ile	Nle	B	201–203	– 24.1 (0.3)	0.42	49.64*
50	Phe	Gly	A	105–107	– 14.6 (0.3)	0.42	38.86
51	Phe	Ala	A	195–197	– 12.8 (0.2)	0.40	41.80*
52	Phe	Val	B	120–124	– 10.4 (0.4)	0.68	39.20
53	Phe	Leu	B	206–208	– 14.7 (0.4)	0.65	48.76
54	Phe	Ile	B	192–195	– 12.7 (0.4)	0.68	46.66
55	Phe	Pro	A	100–102	– 21.3 (0.2)	0.46	41.46*

Continued

TABLE 5
(continued)

No.	Suc-X-Y-Ala-pNA		Purification system ^a	M.p. (°C)	[α] _D ²⁰ in DMSO (conc.)	Rf ^b	HPLC retention time (min) ^c
	X	Y					
56	Phe	Phe	B	210–223	– 38.1 (0.3)	0.52	49.40
57	Phe	Aba	B	210–212	– 11.3 (0.3)	0.56	43.76
58	Phe	Nva	B	212–215	– 19.2 (0.7)	0.54	46.62*
59	Phe	Nle	B	225–228	– 14.4 (0.5)	0.55	50.16*
60	Aba	Gly	C	215–217	– 13.8 (0.6)	0.15	31.42
61	Aba	Ala	A	219–221	– 13.6 (0.3)	0.23	34.96
62	Aba	Val	B	200–203	– 37.3 (0.4)	0.37	42.56
63	Aba	Leu	B	230–233	– 29.7 (0.4)	0.27	37.42*
64	Aba	Ile	B	225–230	– 40.1 (0.5)	0.30	39.80
65	Aba	Pro	C	92–95	– 41.7 (0.4)	0.20	34.24
66	Aba	Phe	B	225–228	– 64.4 (0.5)	0.42	44.40
67	Aba	Aba	B	249–253	– 21.5 (0.3)	0.21	36.98
68	Aba	Nva	B	224–227	– 33.3 (0.6)	0.24	39.42
69	Aba	Nle	B	192–194	– 30.0 (0.3)	0.26	42.62
70	Nva	Gly	C	209–212	– 12.2 (0.3)	0.20	35.58
71	Nva	Ala	B	199–202	– 22.5 (0.3)	0.28	37.96
72	Nva	Val	B	228–230	– 27.2 (0.4)	0.62	46.86
73	Nva	Leu	B	221–223	– 32.3 (0.4)	0.28	40.16
74	Nva	Ile	B	234–237	– 41.8 (0.4)	0.31	44.02
75	Nva	Pro	A	96–99	– 69.5 (0.4)	0.24	37.44
76	Nva	Phe	B	216–219	– 26.5 (0.5)	0.34	47.20*
77	Nva	Aba	B	239–243	– 32.4 (0.5)	0.24	40.78*
78	Nva	Nva	B	228–231	– 26.6 (0.7)	0.32	43.18
79	Nva	Nle	B	198–200	– 25.0 (0.7)	0.39	46.38
80	Nle	Gly	A	122–124	– 10.4 (0.3)	0.24	38.84
81	Nle	Ala	B	182–184	– 30.6 (0.5)	0.39	43.40
82	Nle	Val	B	172–174	– 19.1 (0.4)	0.40	49.98*
83	Nle	Leu	B	221–223	– 25.6 (0.5)	0.37	44.16
84	Nle	Ile	B	228–230	– 39.2 (0.6)	0.24	44.60
85	Nle	Pro	C	90–92	– 57.1 (0.4)	0.25	40.88*
86	Nle	Phe	B	213–215	– 14.7 (0.3)	0.45	51.58
87	Nle	Aba	B	226–228	– 31.2 (0.4)	0.31	47.16
88	Nle	Nva	B	216–218	– 21.5 (0.3)	0.27	47.02
89	Nle	Nle	B	174–177	– 20.5 (0.4)	0.39	49.56
90	Pro	Gly	C	92–94	– 19.3 (0.2)	0.40	33.10
91	Pro	Ala	C	102–104	– 26.9 (0.2)	0.51	35.22
92	Pro	Val	C	102–105	– 31.5 (0.3)	0.43	36.80
93	Pro	Leu	A	109–111	– 39.4 (0.3)	0.69	42.34
94	Pro	Ile	C	116–117	– 31.3 (0.3)	0.51	39.94
95	Pro	Pro	C	118–120	– 46.8 (0.4)	0.45	35.98
96	Pro	Phe	A	166–170	– 28.3 (0.3)	0.60	43.66
97	Pro	Aba	C	96–98	– 50.7 (0.3)	0.35	36.54*
98	Pro	Nva	C	94–98	– 42.3 (0.5)	0.38	39.60*
99	Pro	Nle	C	84–86	– 40.3 (0.5)	0.43	43.20

^a Compounds were purified following procedures A, B and C. (A) recrystallized from MeOH with n-hexane; (B) recrystallized from DMF with ether; (C) purified by HPLC, followed by precipitation from MeOH with n-hexane.

^b Rf values were determined in the following solvent system: CH₃Cl–MeOH–AcOH (9:1:0.5, v/v).

^c HPLC on Nucleosil 5C₁₈ column (7.5 × 250 mm) with gradient of acetonitrile (10–60%, 60 min) in 0.1% aq. TFA at a flow rate of 2.0 mL/min.

* Compounds were analyzed for C, H, and N within ± 0.4% of the theoretical values.

pNA (500 mg, 2.39 mmol) in THF (20 mL), and the mixture was stirred at room temperature overnight, then filtered and concentrated. The residue was dissolved in

AcOEt (50 mL). The organic phase was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO₃ and H₂O, dried over Na₂SO₄ and concentrated. The residue was crystal-

lized or precipitated from appropriate solvents (DMF–Et₂O, MeOH–Et₂O, MeOH–isopropyl ether, AcOEt–n-hexane). If the residue did not dissolve in AcOEt, the crude product was triturated with Et₂O and 5% citric acid, and the resulting powder was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO₃ and H₂O and crystallized or precipitated from appropriate solvents (DMF–AcOEt, DMF–Et₂O, MeOH–Et₂O).

General procedure for synthesis of Boc-X-Y-Ala-pNA from Boc-X-OH and Boc-Y-Ala-pNA (*X, Y* = Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Abu, Nva, Nle; at least one of *X* or *Y* is Abu, Nva or Nle). Boc-Y-Ala-pNA (2.50 mmol) was treated

with TFA (5 mL) in the presence of anisole (0.5 mL) at ice-bath temperatures for 60 min. After evaporation of TFA *in vacuo* at 30 °C or less, the residue was washed with n-hexane. The resulting oily precipitate was dissolved in 4 N HCl–dioxane (10 mL) at ice-bath temperatures, and after 10 min, n-hexane was added and washed. The residue was dried over KOH pellets *in vacuo* for 3 h and dissolved in DMF (20 mL), together with Et₃N (348 μL, 2.50 mmol) and Boc-X-OH (3.75 mmol). After addition of DCC (774 mg, 3.75 mmol), the solution was stirred overnight, then filtered and concentrated. The crude sample was purified by the above same procedures.

TABLE 6
M.p., optical rotation, R_f values and C, H, N analysis data of CF₃CO-X-Y-Ala-pNA

No.	CF ₃ CO-X-Y-Ala-pNA		M.p. (°C)	[α] _D ²⁰ in DMSO (conc.)	R _f ^a	Formula	Calcd. (Found)		
	X	Y					C	H	N
100	Gly	Ala	220–223	– 32.3 (0.46)	0.20	C ₁₆ H ₁₈ N ₅ O ₆ F ₃	44.35 (44.63)	4.19 4.21	16.16 16.13
101	Ala	Ala	245–247	– 40.3 (0.45)	0.38	C ₁₇ H ₂₀ N ₅ O ₆ F ₃	45.64 (45.60)	4.51 4.48	15.66 15.72
102	Val	Ala	272–274	– 48.7 (0.48)	0.36	C ₁₉ H ₂₄ N ₅ O ₆ F ₃	48.00 (47.81)	5.09 4.99	14.73 14.57
103	Leu	Ala	243–245	– 43.0 (0.45)	0.41	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₆ F ₃	49.08 (48.83)	5.35 5.26	14.31 14.23
104	Ile	Ala	239–243	– 49.8 (0.35)	0.51	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₆ F ₃	49.08 (48.88)	5.35 5.38	14.31 14.26
105	Phe	Ala	255–257	– 9.3 (0.49)	0.54	C ₁₉ H ₂₂ N ₅ O ₆ F ₃	48.21 (48.51)	4.68 4.70	14.80 14.67
106	Pro	Ala	252–256	– 64.9 (0.66)	0.35	C ₂₃ H ₂₄ N ₅ O ₆ F ₃	52.77 (52.63)	4.62 4.64	13.38 13.44
107	Abu	Ala	249–253	– 39.1 (0.48)	0.43	C ₁₈ H ₂₂ N ₅ O ₆ F ₃	46.86 (46.80)	4.81 4.81	15.18 15.18
108	Nva	Ala	259–263	– 42.1 (0.42)	0.50	C ₁₉ H ₂₄ N ₅ O ₆ F ₃	48.00 (48.04)	5.09 5.02	14.73 14.62
109	Nle	Ala	254–258	– 36.5 (0.50)	0.44	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₆ F ₃	49.08 (48.90)	5.35 5.36	14.31 14.23
110	Ala	Gly	222–224	– 55.8 (0.49)	0.28	C ₁₆ H ₁₈ N ₅ O ₆ F ₃	44.35 (44.30)	4.19 4.20	16.16 16.02
111	Ala	Val	274–277	– 40.3 (0.45)	0.34	C ₁₉ H ₂₄ N ₅ O ₆ F ₃	48.00 (47.81)	5.09 5.07	14.73 14.47
112	Ala	Leu	199–203	– 32.4 (0.50)	0.48	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₆ F ₃	49.08 (48.81)	5.35 5.33	14.31 14.18
113	Ala	Ile	207–210	– 36.3 (0.39)	0.49	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₆ F ₃	49.08 (48.79)	5.35 5.22	14.31 14.15
114	Ala	Phe	240–245	– 19.2 (0.52)	0.45	C ₁₉ H ₂₂ N ₅ O ₆ F ₃ · 1/2H ₂ O	47.31 (47.60)	4.81 4.76	14.45 13.91
115	Ala	Pro	105–108	– 115.1 (0.31)	0.39	C ₂₃ H ₂₄ N ₅ O ₆ F ₃	52.77 (52.55)	4.62 4.60	13.38 13.25
116	Ala	Abu	269–272	– 40.4 (0.44)	0.36	C ₁₈ H ₂₂ N ₅ O ₆ F ₃	46.86 (46.92)	4.81 4.80	15.18 15.14
117	Ala	Nva	256–258	– 30.0 (0.45)	0.38	C ₁₉ H ₂₄ N ₅ O ₆ F ₃	48.00 (47.86)	5.09 5.03	14.73 14.60
118	Ala	Nle	271–273	– 30.4 (0.45)	0.33	C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₆ F ₃	49.08 (48.90)	5.35 5.36	14.31 14.27

^a R_f values were determined in the following solvent system: CH₃Cl–MeOH–AcOH (9:1:0.5, v/v).

General procedure for synthesis of Suc-X-Y-Ala-pNA ($X, Y = \text{Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Aba, Nva and Nle}$). Boc-tripeptide-pNA (1.0 mmol) was cleaved by TFA (ca. 10 mL per g of peptide) in the presence of anisole (0.5 mL) at 0 °C for 60 min. After evaporation of TFA *in vacuo* at 30 °C or less, the residue was treated with dry ether. If a powder was obtained, it was collected by filtration, dried over KOH pellets *in vacuo* for 3 h and then used for the coupling reaction. If an oily precipitate was obtained, it was washed with n-hexane, dried over KOH pellets *in vacuo* for 3 h and then used for the coupling reaction. The TFA-treated samples were dissolved in DMF (20 mL) together with Et₃N (418 μL , 3 mmol) and succinic anhydride (368 mg, 2 mmol). After stirring for 4 h, the solvent was evaporated and the residue was redissolved in n-butanol (100 mL). The solution was washed with 5% citric acid and H₂O, and n-butanol was evaporated *in vacuo*. Products were purified by crystallization and precipitation from MeOH with n-hexane or DMF with Et₂O. If the obtained products had not been completely purified, these samples were purified by HPLC on a Nucleosil 5C₁₈ column (7.5 $\times$ 250 mm), which was eluted with a linear gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. Then the sample was precipitated from MeOH with n-hexane. The purity and identity of the sample were confirmed by TLC, HPLC and amino acid analysis. The final purification procedure, m.p., optical rotation, R_f values and retention time of analytical HPLC are shown in Table 5.

General procedure for synthesis of CF₃CO-X-Y-Ala-pNA ($X, Y = \text{Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Aba, Nva, Nle}$, where either X or Y was an alanine residue). TFA-treated samples of Boc-tripeptide-pNA (1.0 mmol) were dissolved in DMF (20 mL) together with Et₃N (418 μL , 3 mmol) and trifluoroacetylimidazole (630 mg, 3 mmol). The solution, after being stirred for 24 h, was concentrated and the residue was triturated with ether and 5% citric acid. The resulting powder was washed with 5% citric acid, 5% NaHCO₃ and H₂O and precipitated from DMF with Et₂O or AcOEt. Their physical contents and analytical data are shown in Table 6.

Enzyme assay. PPE was purchased from Sigma Co. All enzyme assays were performed spectrophotometrically at 40 °C on a Shimadzu UV-3000 spectrophotometer.

In a typical experiment the substrate [500 μL , 2.0–0.25 mM in 50 mM Tris buffer containing 2% dimethyl sulfoxide (DMSO)] was added to 450 μL of a 50 mM Tris buffer solution (pH 8.0) in a quartz cuvette and thermally equilibrated in the spectrophotometer for 2 min, and the absorbance was balanced at 410 nm. The enzyme (50 μL , 656 μM in 50 mM buffer) was added to the sample cuvette, and the increase in absorbance was monitored for 10 min. The Michaelis constant K_m was calculated from the Lineweaver–Burk plot obtained with substrate concentrations in the range 2.0–0.25 mM; $k_{\text{cat}} = V/[E]$.

Enzyme inhibition studies. In a typical experiment, 250 μL of the inhibitor (40–800 μM in 50 mM Tris buffer containing 10% DMSO) and 250 μL of Suc-(Ala)₃-pNA (4 mM in 50 mM Tris buffer containing 2% DMSO) were added to 450 μL of 50 mM Tris buffer in a quartz cuvette and thermally equilibrated in the spectrophotometer for 10 min, and the absorbance was balanced at 410 nm. The enzyme (50 μL of 656 mM in 50 mM Tris buffer) was added to the sample cuvette, and the increase in absorbance was monitored for 10 min. K_i -values were determined by plotting the slopes from Lineweaver–Burk curves vs. inhibitor concentration.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Drs. G.W. Milne, T.R. Burke and P.P. Roller, Laboratory of Medicinal Chemistry, NCI, NIH for encouragement and critical reading of the manuscript. We thank M. Mayuzumi and A. Ohkubo for their skilful technical assistance in this work.

REFERENCES

- Robert, L. & Hornebeck, W. (1989) *Elastin and Elastases*, vol. 1, CRC Press, Boca Raton
- Mittman, C. & Taylor, J.C. (eds.) (1988) *Pulmonary Emphysema and Proteolysis*, vol. 2, Academic Press, New York
- Morrison, H.M. (1987) *Clin. Sci.* **72**, 151–158.
- Powers, J.C. & Zimmerman, M. (1989) in *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs* (Sandler, M. & Smith, H.J., eds.), pp. 596–619, Oxford University Press, New York
- Del Mar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W., Fassett, M., & Geokas, M.C. (1980) *Biochemistry* **19**, 468–472
- Kasafirek, E., Fric, P., Slaby, J. & Malis, F. (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 1–13
- Thomson, A. & Kapadia, S.B. (1979) *Eur. J. Biochem.* **102**, 111–116
- Powers, J.C., Gupton, B.F., Hartley, A.D., Nishino, N. & Whitley, R.J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **485**, 156–166
- Bieth, J., Spiess, B. & Wermuth, C.G. (1974) *Biochem. Med.* **11**, 350–357
- Narayanan, A.S. & Anwar, R.A. (1969) *Biochem. J.* **114**, 11–17.
- Pliska, V. & Heiniger, J. (1988) *Int. J. Peptide Protein Res.* **31**, 520–536
- Fauchere, J.-L. (1984) *QSAR in Design of Bioactive Compounds: Proc. 1st Telesymposium on Medicinal Chemistry*, pp. 135–144, J.R. Prous, Barcelona
- Nisato, D., Wagnon, J., Callet, G., Mettefeu, D., Assens, J.-L., Plouzane, C., Tonnerre, B., Pliska, V. & Fauchere, J.-L. (1987) *J. Med. Chem.* **30**, 2287–2291
- Asao, M., Iwamura, H., Akamatsu, M. & Fujita, T. (1987) *J. Med. Chem.* **30**, 1873–1879
- Akamatsu, M., Yoshida, Y., Nakamura, H., Asao, M., Iwamura, H. & Fujita, T. (1989) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **8**, 195–203, Akamatsu, M. & Fujita, T. (1992) *J. Pharm. Sci.*, **81**, 164–174
- Fujita, T. & Ban, T. (1971) *J. Med. Chem.* **14**, 148–152
- Schechter, I. & Berger, A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162
- Dimicoli, J.-L., Renaud, A., Lestienne, P. & Bieth, J.G. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5208–5218

M. Nomizu *et al.*

19. Renaud, A., Lestienne, P., Hughes, D.L., Bieth, J.G. & Dimicoli, J.-L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8312–8316
20. Sheehan, J.C. & Hess, G.P., (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1067–1068
21. Anderson, G.W., Zimmerman, J.E. & Callahan, F. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839–1842
22. Bodanszky, M. & du Vigneaud, V. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5688–5691
23. Fauchere, J.-L. & Pliska, V. (1983) *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* **18**, 369–375
24. Bode, W., Meyer, E., Jr. & Powers, J.C. (1989) *Biochemistry* **28**, 1951–1963
25. Hughes, D.L., Sieker, L.C., Bieth, J. & Dimicoli, J.-L. (1982) *J. Mol. Biol.* **162**, 645–658

Address:

Motoyoshi Nomizu, Ph.D.

Laboratory of Developmental Biology

NIDR, NIH, Bldg 30, Rm 427

Bethesda, MD 20892

USA

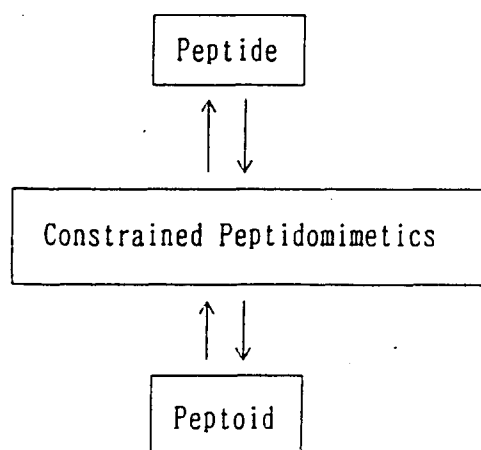
Tel: (301)-496-9855

Fax: (301)-402-0897

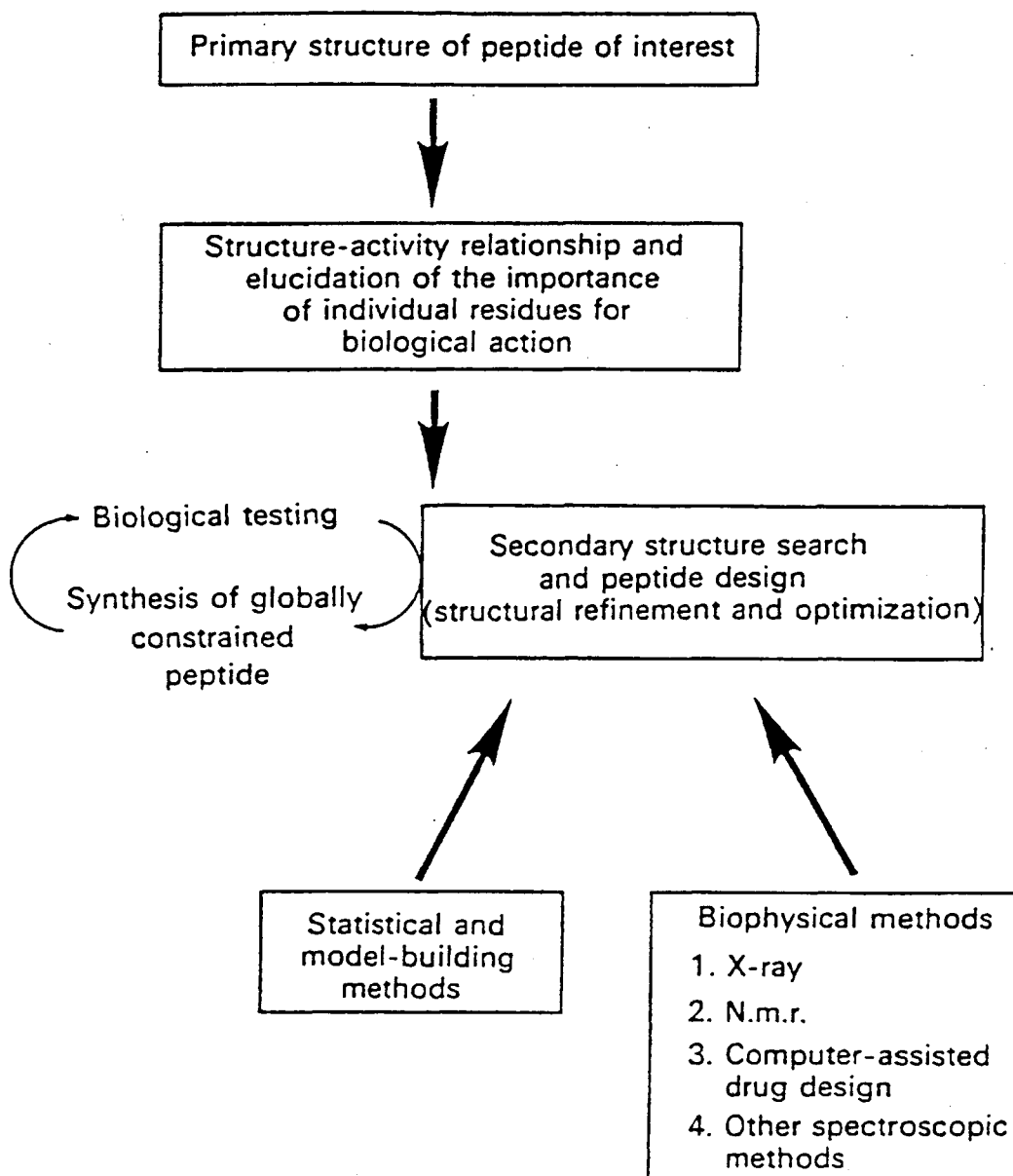
ペプチドの構造設計

田辺製薬株式会社 沼波憲一

生体に存在するペプチドの多くはホルモン、神経伝達、免疫作用等多彩な生理活性を通して身体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。従って循環不全、神経系疾患あるいは自己免疫疾患等の恒常性維持調節機構の失調に基づく疾病が増加している現在、ペプチドに代表される内因性因子を利用したいわゆる”生体医薬”が medicinal chemist に興味をもたれている。生理活性ペプチドの構造を基に高活性、高選択的でより作用時間の長い化合物(peptidomimetics) のデザイン、合成は多くの研究者によって精力的になされてきたが、目的を達成するためには多大の労力を要するのが現実である。近年、従来一般的なデザイン法として用いられてきた生理活性ペプチドのランダムな個々の構成アミノ酸の変換は、しだいにペプチドの活性発現に重要な役割を果たしている立体構造に基づいた rational drug design に変えられつつある。しかしながら、短鎖ペプチドは立体的な制約は乏しく又、活性発現部位での立体構造についても未知な部分が多いため、実際には多くの問題点をかかえている。生理活性ペプチド誘導体の構造設計への重要なステップである active conformation 解明へ向けて種々の方法が試みられているが、今回は、合成化学的見知から興味をもたれる”conformationally constrained peptidomimetics”へのアプローチを紹介するとともに、一例として我々が一連のACE阻害薬開発研究で得た知見をお示ししたい。これら一連の peptide から constrained peptidomimetics への変換の方法論が逆にペプチド工学における一要素である分子認識機能をもつ非ペプチド化合物(Peptoid) から新しい高機能ペプチド化合物の創製に役立つものと期待する。

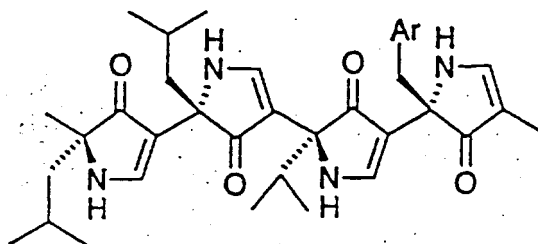


Outline of the General Strategy in the Design of Peptides

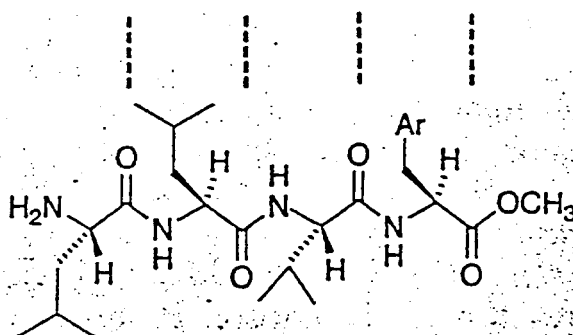


β -Pleated Sheet Peptidomimetics

**Linked pyrrolinone compound
mimics shape of β -pleated sheet**



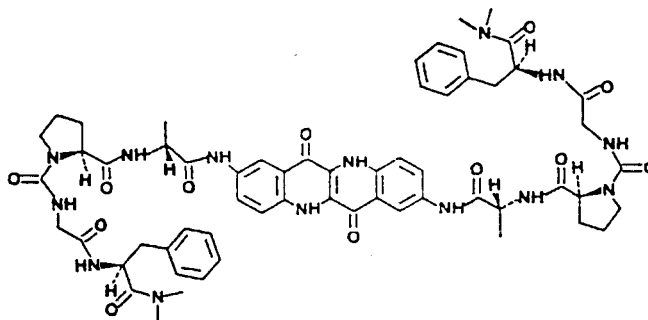
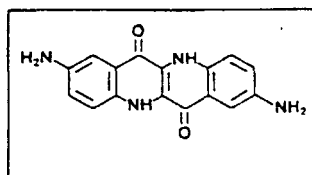
Pyrrolinone-based peptidomimetic



Angiotensinogen fragment

Ar = Aromatic group

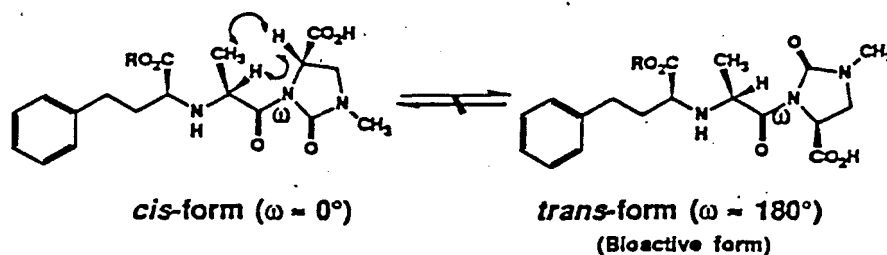
Pyrrolinone-based peptidomimetic simulates β -pleated sheet conformation of tetrapeptidyl angiotensinogen fragment. Dashed lines show alignment of carbonyl groups in the two structures. Side chains are also aligned



イミダゾリジノン環導入による配座固定

¹H-NMR Analyses of *cis-trans* Isomerization

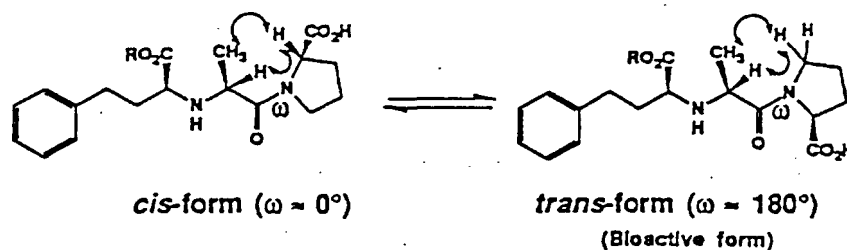
— Imidapril and Imidaprilat —



Compound	Solvent	<i>cis</i> / <i>trans</i> ratio
Imidapril hydrochloride	D ₂ O	>99% <i>trans</i>
Imidapril (free)	D ₂ O	>99% <i>trans</i>
Imidaprilat	D ₂ O + TFA	>99% <i>trans</i>

¹H-NMR Analyses of *cis-trans* Isomerization

— Enalapril and Enalaprilat —



Compound	Solvent	<i>cis</i> / <i>trans</i> ratio
Enalapril maleate	D ₂ O	44 / 56
Enalapril (free)	D ₂ O	52 / 48
Enalaprilat	D ₂ O	20 / 80
	D ₂ O + TFA	27 / 73

The conformation of the amide bond of Imidaprilat is restricted to the bioactive *trans* geometry.

References

1. G. Hölzemann, Kontakte(Darmstadt) 1, 3(1991).
2. V. J. Hruby et. al., Biochem. J. 268, 249(1990).
3. A. F. Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins(Edited by B. Weinstein), 7, 267(1983).
4. C. Toniolo, Int. J. Peptide Protein Res., 35, 287(1990).
5. A. C. Bach et. al., Int. J. Peptide Protein Res., 38, 314(1991).
6. M. J. Genin et, al., J. Org. Chem., 58, 860(1993).
7. P. Juvvadi et al., Int. J. Peptide Protein, 40 163(1992).
8. M. J. Genin et. al., J. Amer. Chem. Soc.,114, 8778(1992).
9. D. J. Kyle et. al., Peptide Res., 5, 206(1992).
10. J. W. Bean et. al., J. Amer. Chem. Soc., 114, 5328(1992).
11. J. E. Baldwin et. al., Tetrahedron Lett., 34, 1665(1993).
12. R. W. Hoffmann, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 31, 1124(1992).
13. A. B. Smith **III** et. al., J. Amer. Chem Soc., 114, 10672(1992).
14. A. B. Smith **III** et. al., Tetrahedron Lett., 34, 63(1993).
15. T. D. Gordon et. al., 34, 1901(1993).
16. R. Hirschmann et. al., J. Amer. Chem. Soc., 114, 9217(1992).
17. K. Nunami et. al., Peptide Chemistry., in press.

Synthesis of Barnase Site-Specifically Labelled with Two ^{13}C Atoms Using Partially Protected Peptide Thioester Building Blocks

Hironobu HOJO and Saburo AIMOTO*

Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565

(Received May 6, 1993)

Barnase, site-specifically labelled with two ^{13}C atoms, was synthesized using partially protected peptide thioesters as building blocks. Four partially protected peptide segments (Boc-[Lys(Boc)^{19,27}]-barnase(1—34)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂, *i*Noc-[Lys(Boc)^{39,49}]-barnase(35—52)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂, *i*Noc-[Lys(Boc)^{62,66}]-barnase(53—81)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂, [Lys(Boc)^{98,108}]-barnase(82—110)) were successively condensed in the presence of silver ions and *N*-hydroxysuccinimide (HONSu). Finally, barnase with full ribonuclease activity was obtained in a yield of 11% based on the carboxyl terminal peptide segment.

Most protein production is not performed by a chemical method, but by recombinant DNA technology. This is because neither the solid-phase nor solution methods of peptide synthesis are appropriate for the rapid preparation of highly pure proteins. In order to overcome the problems involved in both methods, we developed a procedure in which partially protected peptide thioesters prepared via a solid-phase method are used as building blocks for protein synthesis in a solution. This procedure¹⁾ was applied to the syntheses of *c*-Myb Protein (142—193) amide,²⁾ HU-type DNA-binding protein (HBs) of 90 amino acids³⁾ and its stable-isotope-labelled derivative.⁴⁾

To demonstrate the usefulness of this method for enzyme synthesis, we synthesized barnase, a protein comprising 110 amino acids with RNase activity (Fig. 1). In this study, barnase site-specifically labelled with two ^{13}C atoms was synthesized for a structural study of barnase in the future. This paper describes the results of the synthesis and the use of this method for protein synthesis.

Results and Discussion

Preparation of Peptide Segments: For synthetic purposes, the barnase sequence was divided into four peptide segments, as shown in Fig. 1. Gly⁵² and Ala⁷⁴ were labelled with ^{13}C as (2- ^{13}C) Gly and (1- ^{13}C) Ala, respectively.

A partially protected peptide thioester was prepared according to the procedure described in a previous paper.⁴⁾ To a 4-methylbenzhydrylamine resin (MBHA resin or NH₂-resin), *t*-butoxycarbonyl-L-nor-leucine (Boc-Nle) and Boc-Gly-SC(CH₃)₂CH₂COOH were successively introduced using dicyclohexylcarbodiimide (DCC) in the presence of 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) to obtain Boc-Gly-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH-resin.⁴⁾ On this resin, Boc-amino acids were successively condensed. After peptide chain assembly, the terminal amino group was protected with a 4-pyridylmethoxycarbonyl (*i*Noc) group. The protected peptide resin was treated with anhydrous hydrogen fluoride⁵⁾ to give a crude *i*Noc-peptide thioester, which

was purified by reversed-phase HPLC (RPHPLC). Boc groups were introduced to the side-chain amino groups of an HPLC-purified peptide thioester in order to realize selective removal of the amino protecting groups after segment condensation. The partially protected peptide segments were prepared in good yields without any problems, and were used for the barnase synthesis.

All of the partially protected peptide segments used for barnase synthesis are listed in Table 1. The yields of the peptide segments were calculated based upon the amino groups in the MBHA resin. The linker containing Nle and *S*-*t*-alkyl thioester moieties, where *t*-alkyl means 1,1-disubstituted alkyl, gave satisfactory yields in the preparation of peptide segments as in a previous synthesis.⁴⁾

Synthesis of Barnase by Segment Coupling:

Segment condensation was performed according to the scheme shown in Fig. 2. The typical coupling conditions were as follows: Peptides **3** (120 mg, 17 μmol) and **4** (100 mg, 13 μmol) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (2.3 ml). HONSu (30 mg, 260 μmol), AgNO₃ (13 mg, 77 μmol), and 4-methylmorpholine (NMM) (9 μl , 82 μmol) were then added in succession. The solution was stirred overnight at room temperature in the dark. The peptide was precipitated with distilled water and washed twice. After the precipitate was dissolved in 70% aqueous acetic acid, 800 mg of zinc dust was added. The solution was sonicated for 7 h under a nitrogen stream. After removing the zinc dust by centrifugation, the supernatant was dialyzed against distilled water using a Spectrapor membrane 6 and freeze-dried to give a mixture containing peptide **5** (170 mg). According to a similar procedure, peptides **2** and **5**, then peptides **1** and **6**, were successively condensed. The condensation reactions were monitored by HPLC using a C4 column. The HPLC elution profiles of the reaction mixtures are shown in Fig. 3. The segment coupling of peptide **5** and **2** and that of peptide **6** and **1** were almost complete within 6 h. During peptide chain elongation by segment coupling no HPLC purification was performed.

After segment condensation of peptides **1** and **6**, dis-

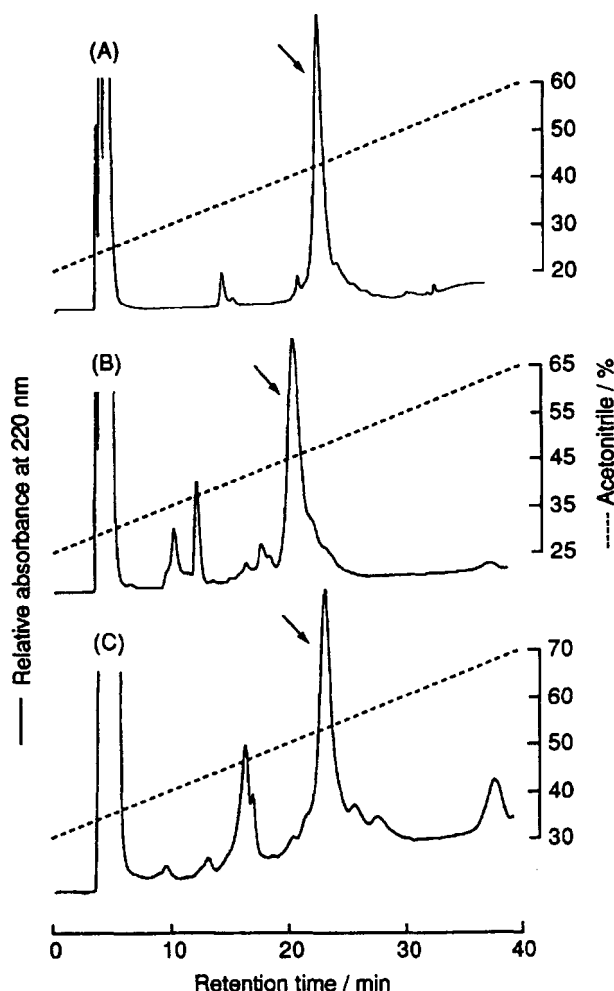


Fig. 3. HPLC elution profiles of the reaction mixtures of segment couplings after an overnight reaction. Arrows in panel A,B,C indicate α Noc-[Lys(Boc)^{62,66,98,108}]-barnase(53-110), α Noc-[Lys(Boc)^{39,49,62,66,98,108}]-barnase(35-110), and Boc-[Lys(Boc)^{19,27,39,49,62,66,98,108}]-barnase(1-110), respectively. Column: YMC-Pack C4 (4.6×250 mm). The broken line indicates the acetonitrile concentration in 0.1% TFA.

protecting groups was well solvated by DMSO, kept good flexibility around the reaction sites and, hence, retained high reactivity. Thus, the thioester building block method, which uses a minimal protection strategy, is suitable for protein synthesis, not only because of the ease of segment preparation, but also because of the high reactivity during segment condensation. The points which must be overcome in this method are to find an easily-removable protecting group instead of 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) or α Noc for the terminal amino group, and to establish a strategy with which to synthesize cysteine-containing proteins.⁷⁾

Materials and Methods

Boc-amino acid derivatives and MBHA resin were purchased from the Peptide Institute Inc. (Osaka). Boc-

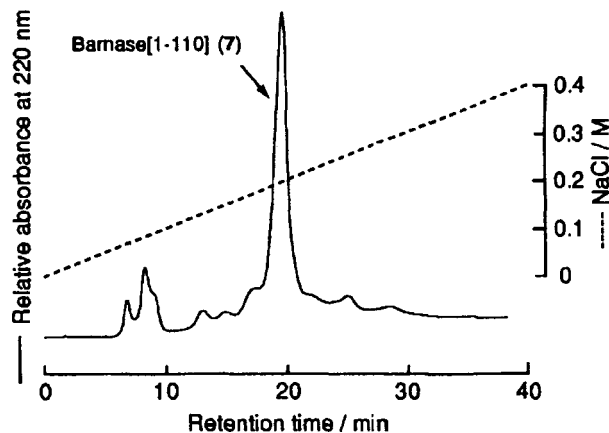


Fig. 4. Ion-exchange chromatography of the HPLC-purified barnase(1-110) (7) by Pharmacia HiLoad S-Sepharose HP (16×100 mm). The broken line indicates the NaCl concentration in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.0).

Arg(Tos)-OCH₂-C₆H₄CH₂CONHCH₂-C₆H₄-resin (Boc-Arg(Tos)-OCH₂-PAM-resin) was purchased from Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA.). (1-¹³C)Ala and (2-¹³C)Gly were purchased from Isotec Inc. (Miamisburg, OH.). The solvents and reagents used for solid-phase peptide synthesis were purchased from Watanabe Chemical Ind. Ltd. (Hiroshima). Analytical RPHPLC was performed on YMC-Pack ODS-AM or C4 (4.6×250 mm) and preparative RPHPLC was on YMC-Pack ODS-AM or PROTEIN-RP (20×250 mm) (YMC, Kyoto). The amino acids were analyzed on an L-8500 amino acid analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo) after hydrolysis with 4 M[#] methanesulfonic acid at 110 °C for 24 h in an evacuated sealed tube. The peptide mass number was determined by fast atom bombardment mass spectrometry using a JMS-HX100 (JEOL Ltd., Tokyo) equipped with a JMA-3100 mass data system. Although the peptide weight was an observed value, the yield was calculated based upon the amino acid analysis data. Sonication was performed using a Branson Model B-220. Dialysis was carried out using a Spectrapor 6 membrane (M. W. cut off 1000). Native barnase was a gift from Dr. H. Yanagawa of Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences. Yeast RNA was purchased from Kohjin Co., Ltd. (Tokyo).

Synthesis

Peptide Chain Elongation on a Solid Support.

Solid-phase syntheses of peptide segments were performed on a peptide synthesizer 430A (Applied Biosystems Inc.) using the 0.5 mmol scale, double-coupling protocol of the benzotriazole-active ester method of the system software version 1.40 NMP/HOBt *t*-Boc. Unreacted amino groups were capped by acetic anhydride after each amino acid introduction. The side-chain-protecting groups of Boc-amino acids were α -chlorobenzylloxycarbonyl (Cl-Z) for the N^ε of Lys, benzyl (Bzl) for the alcoholic OH of Thr and Ser, cyclohexyl ester (OcHex) for the β -carboxyl group of Asp, benzyl ester for the γ -carboxyl group of Glu, tosyl (Tos) for the N⁹ of Arg, benzyloxymethyl for the N^π of His, 2-bromobenzyl-

[#]1 M = 1 mol dm⁻³.

oxycarbonyl for the phenolic OH of Tyr and formyl (For) for the N^ε of Trp. Boc-Gly-SC(CH₃)₂CH₂COOH was prepared according to the method described in a preceding paper.⁴⁾

*i*Noc-[Lys(Boc)^{39,49}, (2-¹³C)Gly⁵²]-barnase(35—52)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂ (2). Boc-Nle (170 mg, 0.75 mmol) was mixed with 1 M HOBt in 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) (0.75 ml) and 1 M DCC in NMP (0.75 ml). After 30 min, this solution was mixed with neutralized MBHA-resin (850 mg, 0.54 mequiv of NH₂ group) and shaken for 4 h. After the Boc group was removed with 55% TFA in dichloromethane (DCM) for 5 and 15 min followed by neutralization with 5% *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) for 5 min (×2), Boc-(2-¹³C)Gly-SC(CH₃)₂CH₂COOH (220 mg, 0.75 mmol), prepared as the same procedure described previously,⁴⁾ was introduced to the Nle-NH-resin using 1 M HOBt in NMP (0.75 ml) and 1 M DCC in NMP (0.75 ml) in a similar manner, to give Boc-(2-¹³C)Gly-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH-resin. Using this resin, a protected peptide resin corresponding to the sequence of barnase (35—52), Boc-Trp(For)-Val-Ala-Ser(Bzl)-Lys(Cl-Z)-Gly-Asn-Leu-Ala-Asp(OcHex)-Val-Ala-Pro-Gly-Lys(Cl-Z)-Ser(Bzl)-Ile-(2-¹³C)Gly-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH-resin was prepared on a synthesizer by means of double coupling. After this resin was treated with 55% TFA in DCM for 5 and 15 min, followed by neutralization with 5% DIEA in DMF for 5 min (×2), 4-pyridylmethyl *p*-nitrophenyl carbonate (*i*Noc-ONp) (410 mg, 1.5 mmol) was allowed to react with the terminal amino group in 80% DMSO-NMP overnight, to give a protected peptide resin (1.9 g). An aliquot of the resin (510 mg) was treated with HF (8 ml), *p*-cresol (0.5 ml), and 1,4-butanedithiol (1.5 ml) at 0 °C for 90 min to give 250 mg of a crude product. This product was purified on RPHPLC to obtain *i*Noc-[(2-¹³C)Gly⁵²]-barnase (35—52)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂ (150 mg, 50 μmol, 35% based on the amino groups in the MBHA resin). Found: *m/z* 2134.5 (M+H)⁺. Calcd for (M+H)⁺: 2134.1. Amino acid composition: Asp_{2.16}Ser_{2.03}Pro_{1.03}Gly₃Ala_{3.27}Val_{2.04}Ile_{0.98}Leu_{1.06}Nle_{0.99}Lys_{2.08}Trp_{0.54}.

To the *i*Noc-[(2-¹³C)Gly⁵²]-barnase (35—52)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂ (150 mg, 50 μmol) dissolved in DMSO (2.6 ml), *N*-(*t*-butoxycarbonyloxy)succinimide (Boc-ONSu) (56 mg, 260 μmol) and triethylamine (36 μl, 260 μmol) were added; the resulting solution was stirred for 5 h. A mixed solvent of ether and ethyl acetate was added to the reaction mixture. The formed precipitate was collected by centrifugation and freeze-dried from a dioxane suspension to give 180 mg of peptide 2 (46 μmol, 32% based on the amino groups in the MBHA resin). Found: *m/z* 2335.0 (M+H)⁺, Calcd for (M+H)⁺: 2334.2. Amino acid analysis of peptide 2: Asp_{2.08}Ser_{1.88}Pro_{1.07}Gly_{3.05}Ala₃Val_{1.93}Ile_{0.98}Leu_{1.02}Nle_{0.99}Lys_{2.02}Trp_{0.50}.

Boc-[Lys(Boc)^{19,27}]-barnase(1—34)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂ (1). This peptide was prepared following the procedure described for the synthesis of peptide 2. Yield of peptide 1: 12% based on the amino groups in the MBHA resin. Amino acid analysis of peptide 1: Asp_{5.06}Thr_{2.82}Ser_{0.89}Glu_{4.08}Pro_{1.02}Gly_{2.01}Ala₄Val_{1.69}Ile_{1.61}Leu_{2.99}(Tyr+Nle)_{4.02}Phe_{0.97}Lys_{2.00}His_{1.00}.

*i*Noc-[Lys(Boc)^{62,66}, (1-¹³C)Ala⁷⁴]-barnase(53—81)-SC(CH₃)₂CH₂CO-Nle-NH₂ (3). This peptide

was prepared by the procedure described for the synthesis of peptide 2. Ala⁷⁴ was incorporated manually, by mixing with Boc-(1-¹³C)Ala (0.75 mmol), 1 M HOBt in NMP (0.75 ml) and 1 M DCC in NMP (0.75 ml) for 4 h. Yield of peptide 3: 12% based on the amino groups in the MBHA resin. Found: *m/z* 3775.5. Calcd for (M+H)⁺: 3775.9. Amino acid analysis of peptide 3: Asp_{4.29}Thr_{2.03}Ser_{3.00}Glu_{2.16}Pro_{1.03}Gly_{5.05}Ala₁Ile_{1.90}Leu_{1.00}(Tyr+Nle)_{1.98}Phe_{0.97}Lys_{2.01}Trp_{0.63}Arg_{2.98}.

[Lys(Boc)^{98,108}]-barnase(82—110) (4). Starting from Boc-Arg(Tos)-OCH₂-PAM-resin (0.83 g, 0.5 mmol), *i*Noc-[Lys(Boc)^{98,108}]-barnase(82—110) (440 mg, 62 μmol) was prepared by the procedure described for peptide 2. This peptide (130 mg, 18 μmol) was sonicated with zinc dust (200 mg) in 75% aqueous acetic acid (4 ml) under nitrogen for 2 h. After removing zinc dust, the solution was dialyzed against distilled water (1 dm³×3) and freeze-dried to give peptide 4 (120 mg, 17 μmol, 12% based on Arg in the starting resin). Found: *m/z* 3868.3. Calcd for (M+H)⁺: 3868.0. Amino acid analysis of peptide 4: Asp_{4.19}Thr_{4.13}Ser_{3.02}Glu_{1.11}Ile_{2.73}Leu₂Tyr_{3.05}Phe_{1.79}Lys_{2.10}His_{1.03}Trp_{0.40}Arg_{2.77}.

Synthesis of [(2-¹³C)Gly⁵², (1-¹³C)Ala⁷⁴]-barnase (1—110) (7). Peptides 3 (120 mg, 17 μmol), 4 (100 mg, 13 μmol) and HONSu (30 mg, 260 μmol) were dissolved in DMSO (2.3 ml) containing NMM (9.0 μl, 82 μmol). AgNO₃ (13 mg, 77 μmol) was then added and the mixture was stirred for 5 h at room temperature in the dark. The solution was stirred overnight after adding more NMM (4.0 μl, 36 μmol). A precipitate obtained by adding distilled water to the solution, was freeze-dried to give a powder (220 mg). This peptide was sonicated with zinc dust (800 mg) in 70% acetic acid (25 ml) under nitrogen for 7 h at room temperature. The solution was dialyzed against distilled water (1 dm³×3) and freeze-dried to give a mixture (170 mg) containing peptide 5. Following the same procedure, peptides 2 (81 mg, 20 μmol) and 1 (93 mg, 14 μmol) were successively condensed. The crude peptide obtained (320 mg) was treated with TFA (2.6 ml) containing 5% 1,4-butanedithiol (v/v) at room temperature for 15 min. TFA was removed under a nitrogen stream and the peptide was precipitated with ether. This peptide was purified on RPHPLC using PROTEIN-RP to give powdered peptide 7 (81 mg, 3.7 μmol) after freeze-drying. This peptide was further purified by ion-exchange chromatography using Pharmacia HiLoad S-Sepharose HP (16×100 mm), which was equilibrated with 0.05 M sodium phosphate (pH 6.0) and eluted with a 0 to 0.3 M NaCl gradient in the buffer over 30 min at a flow rate of 2.5 ml min⁻¹. The elution of the peptide was monitored by absorbance at 220 nm. The main fraction was collected and desalted by RPHPLC to give [(2-¹³C)Gly⁵², (1-¹³C)Ala⁷⁴]-barnase(1—110) (22 mg, 1.4 μmol, 11% based on peptide 4). Amino acid analysis of peptide 7: Asp_{14.94}Thr_{8.50}Ser_{8.39}Glu_{7.25}Pro_{2.96}Gly_{10.21}Ala₈Val_{3.54}Ile_{6.87}Leu_{6.77}Tyr_{6.80}Phe_{3.81}Lys_{8.13}His_{2.12}Trp_{1.79}Arg_{5.82}.

Measurement of RNase Activity. Yeast RNA (1.6 mg) was dissolved in 0.125 M Tris-HCl pH 8.5 (0.8 ml) and 0.2 ml of appropriately diluted enzyme was added. The mixture was incubated at 37 °C for 15 min. The reaction was stopped by adding a solution containing 6% HClO₄ and 1% lanthanum acetate (1 ml). The mixture was kept at 0 °C for 15 min and the precipitate was removed by centrifugation.

The supernatant (0.5 ml) was diluted with 4.5 ml of water, and the absorbance at 260 nm (A_{260}) was measured. An increase in A_{260} of 1.0 under these conditions was defined as 100 units of enzyme activity.

We express our thanks to Professor Mitiko Gō of Faculty of Science, Nagoya University, for her kind advice throughout this study, Dr. Hiroshi Yanagawa of Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences for the gift of native barnase and Professor Fumio Sakiyama and Mr. Satoshi Kuroda of the Institute for Protein Research, Osaka University, for measuring the enzymatic activity. We also thank Professor Yasutsugu Shimonishi of the Institute for Protein Research, Osaka University, for use of the mass spectrometer. This study was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research No. 02263101 from the Ministry of Education, Science and Culture.

References

- 1) In this method, segment condensation proceeds ac-

cording to the process shown below:

$$\text{R-CO-SR}' + \text{Ag}^+ + \text{HONSu} \xrightarrow{\text{DIEA}} [\text{R-CO-ONSu} + \text{Ag-SR}']$$

$$\xrightarrow{\text{NH}_2\text{-R}''} \text{R-CO-NH-R}'', \text{ where R-CO-SR}' \text{ is a partially protected peptide thioester, -SR}' \text{ is -SC(CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CO-Nle-NH}_2 \text{ and NH}_2\text{-R}'' \text{ is an amino component peptide.}$$

- 2) H. Hojo and S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 111 (1991).
- 3) H. Hojo and S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 3055 (1992).
- 4) H. Hojo, Y. D. Kwon, Y. Kakuta, S. Tsuda, I. Tanaka, H. Hikichi, and S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in press.
- 5) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 2164 (1967).
- 6) G. W. Rushizky, A. E. Greco, R. W. Hartley, and H. A. Sober, *Biochemistry*, **2**, 787 (1963).
- 7) Y. D. Kwon, R. H. Zhang, M. P. Bemquerer, M. Tominaga, H. Hojo, and S. Aimoto, *Chem. Lett.*, **1993**, 881.

ペプチド合成技術（化学的合成法）

(財)蛋白質研究奨励会

正 豐島

2.1 技術概要

ペプチド合成は1907年E. Fischerによりオクタデカペプチドの合成が行われたのにはじまり¹⁾、M. Bergmann、L. Zervasによるベンジルオキシカルボニル基の導入²⁾によって飛躍的に合成法が進歩した。さらにオキシトシン³⁾、インスリン⁴⁻⁶⁾などの合成に成功し、比較的長いペプチドも合成可能になった。その間縮合試薬、保護基、脱保護法等の開発も進み液相法により数多くのペプチドが合成され、長鎖ペプチドとしてはR N a s e⁷⁾、アンジオジェニン⁸⁾などアミノ酸残基数が100を超える蛋白質の合成も行われるようになった。液相法の場合、ペプチド鎖が長くなると合成中間体の溶解度が悪くなるが、最近溶媒も種々検討され労力は固相法に比べて多くかかるものの比較的長いペプチドを純粋に合成できるようになってきた。

一方、1963年にMerrifieldは不溶性樹脂上でペプチド鎖を延長していく固相法による画期的な合成法⁹⁾を開発しどのようなペプチドも簡単に合成できるように思われた。ところが長鎖ペプチドになるほど欠陥ペプチド(1残基または数残基のアミノ酸が欠如したペプチド)の分離が困難になり純度に問題があった。1980年代になり逆相高速液体クロマトグラフィーの目覚ましい発展により分離精製が比較的容易に行えるようになるとペプチドの固相合成法が見直され最近では固相法により多くのペプチドが簡単に合成されるようになった。とくに多くの種類の比較的短いペプチドを一度に合成するマルチプルシンセシス、ペプチドライブラリーなど有用な方法が開発されている。しかし短いペプチドでもシーケンスによってはdifficult sequenceと呼ばれ目的のペプチドの収率が悪く合成困難な場合もあるので注意を要する。

2. 2 各技術の研究例

通常のペプチド合成に関する化学的研究は既に良く研究され、その合成法もほぼ完成されたものになっており、蛋白構成アミノ酸からなるペプチドならば自由に合成できると言っても過言ではない。ペプチドの合成法（保護基、縮合剤、脱保護条件等）、合成例を列挙するにはあまりにも例が多く詳細は成書¹⁰⁻¹⁶⁾を参照されたい。そのうち重要と思われる合成例について述べたい。

2.2.1 液相法による合成例

RNase の合成⁷⁾

化学合成した蛋白質を結晶として単離した最初の例。

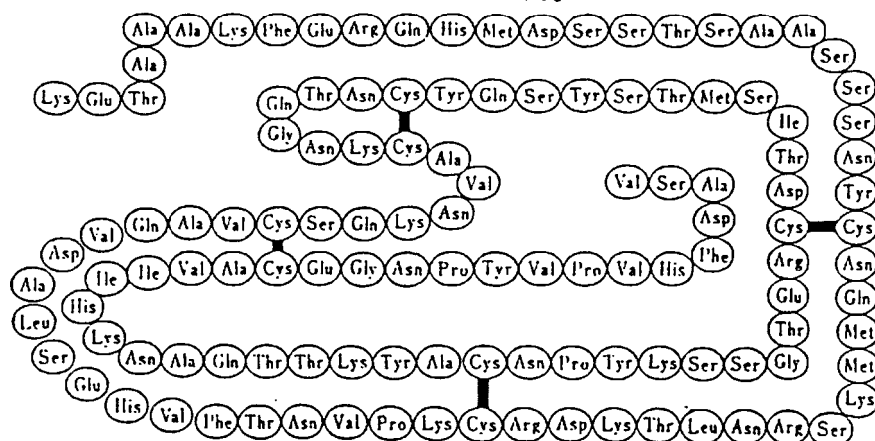


Fig. 1. Structure of Bovine Pancreatic Ribonuclease A

アンジオジェニンの合成⁸⁾

最終脱保護に無水フッ素を用いた蛋白質の合成例。

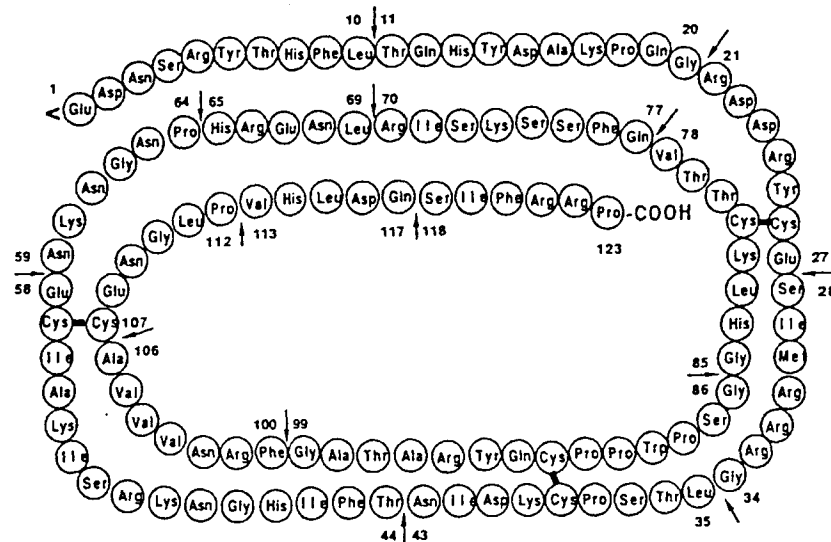
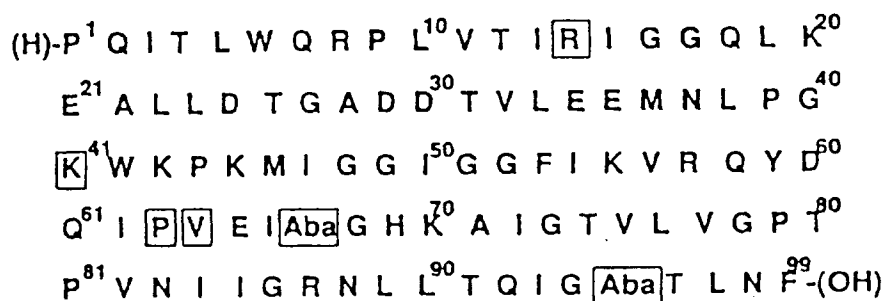


Fig. 1. Primary structure of angiogenin

2.2.2 固相法による合成例

HIV プロテアーゼの合成¹⁷⁾

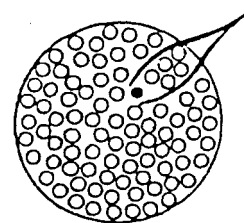
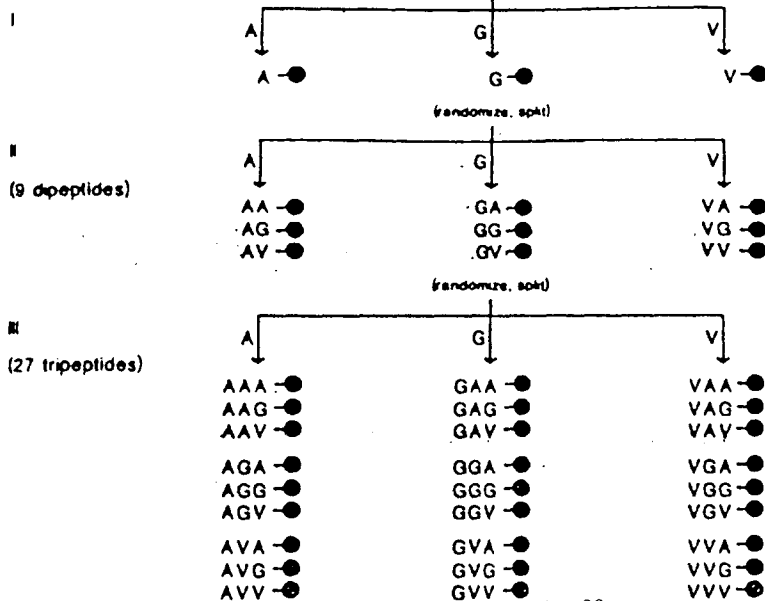
固相法により [Abu^{67,75}] HIV-1 protease を合成。合成品を結晶化して X 線解析。



ペプチドライブラリー¹⁸⁾

ランダムに多くのペプチドを一度に合成し、その中から生理活性を有するペプチドを得る方法。

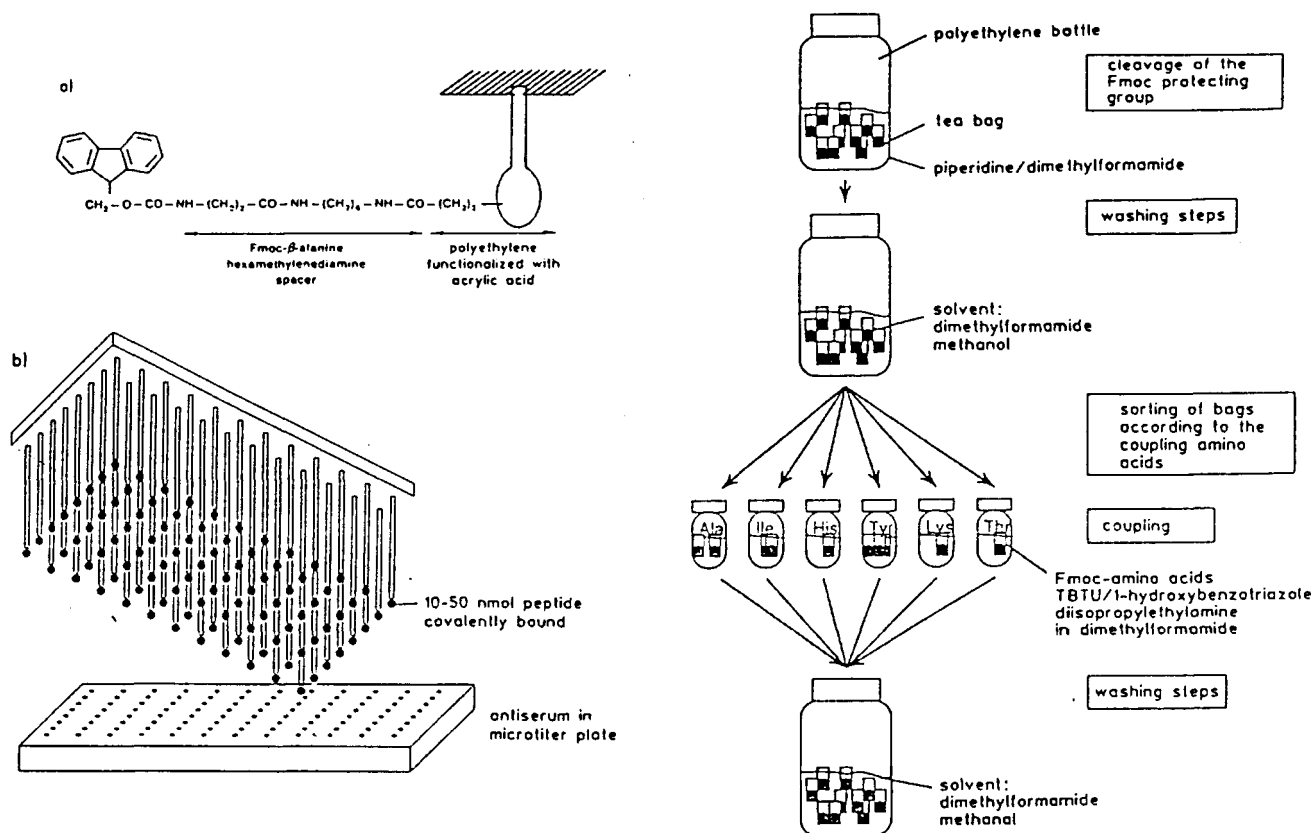
Coupling Step



1. Stained bead removed and washed
2. Peptide microsequenced from a single bead

マルチプルペプチド合成¹⁹⁾

ポリエチレンの細いピン先のさき又はTea Bagのような袋に入れた樹脂上にペプチドを合成し、側鎖の保護基を除去した後、ピン又は樹脂上で活性を測定する方法。それぞれの決まったシーケンスを合成。ペプチドを固相より脱離して単離することも可。



2.2.3 固相、液相法併用した合成例²⁰⁾

DNA結合蛋白(HBs)の合成：固相法により合成したフラグメントのチオエステルを液相法によりフラグメント縮合する方法。固相法と液相法の長所を生かし高純度の長鎖ペプチドを迅速に合成する。

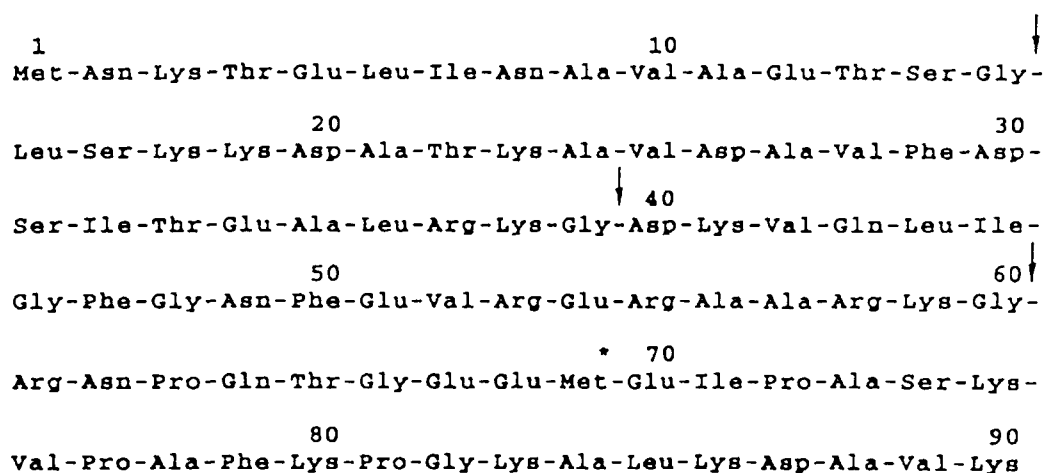


Fig. 1. Amino acid sequence of HBs. The arrows indicate the sites of segment coupling.
Met* indicates methionine-methyl-d₁.

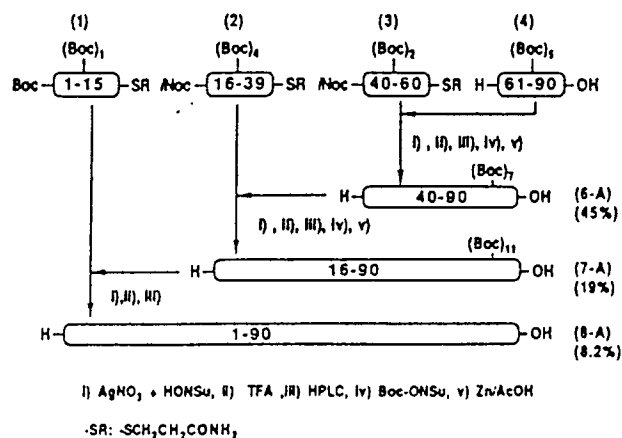
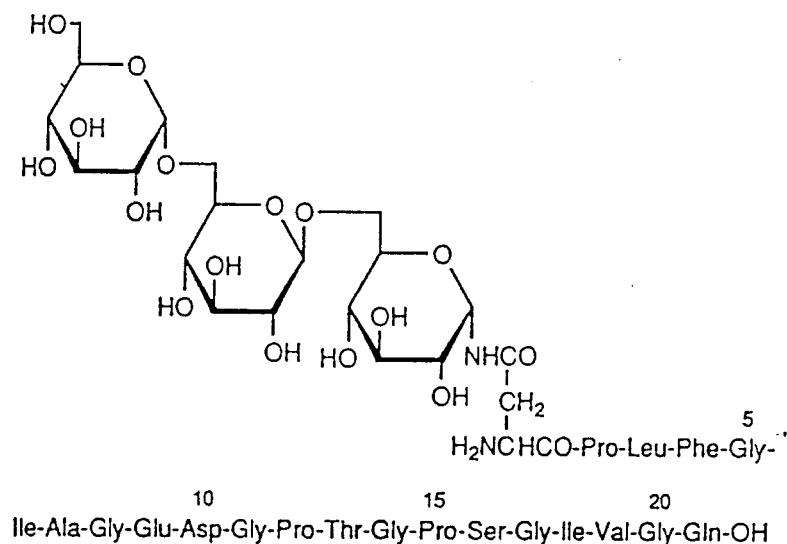


Fig. 4. Synthetic route of HBs(1—90) by segment coupling.

2. 3 所属機関の研究

糖ペプチドの合成（ネフリトゲノシドの合成）

酸に対して不安定な糖ペプチド・ネフリトゲノシドをアリルオキシカルボニル基を最終保護基に用いて初めて全合成した。



Proposed Structure of Nephritogenoside

2. 4 参考文献

- 1) E. Fischer, Chem. Ber., 40, 1754 (1907).
- 2) M. Bergmann, and L. Zervas, Chem. Ber., 65B, 1192 (1932).

- 3) V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, J. Am. Chem. Soc., 76, 3115, (1954).
- 4) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda, H. Zahn, Z. Naturforsch., 18b, 1120 (1963).
- 5) P. G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Thometsko, K. Suzuki, M. Tilak, J. Am. Chem. Soc., 86, 932 (1964).
- 6) Y. T. Kung, Y. G. Du, W. T. Huang, C. C. Chen, L. T. Ke, S. C. Hu, R. G. Jiang, S. Q. Chu, C. I. Niu, J. Z. Hsu, W. C. Chang, L. L. Chen, H. S. Li, Y. Wang, T. P. Loh, A. H. Chi, C. H. Li, P. T. Shi, Y. H. Yien, K. L. Teng, C. Y. Hsing, Sienta Sinica, 15, 544 (1966).
- 7) H. Yajima, N. Fujii, Chem. Pharm. Bull., 29, 600 (1981)
- 8) T. Kimura, N. Chino, S. Kumagae, H. Kuroda, J. Emura, and S. Sakakibara, Biochem. Soc. Transactions, 18, 1297 (1990).
- 9) R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963).
- 10) 大川乾次, " 大有機化学 ", 朝倉書店, 21巻, p.122 (1957)
- 11) 芝哲夫, " タンパク質化学 ", 共立出版, 1巻, p.361 (1969)
- 12) 泉屋信男, 加藤哲夫, 大野素徳, 青柳東彦, " ペプチド合成 ", 丸善 (1975)
- 13) 泉屋信男, 加藤哲夫, 大野素徳, 青柳東彦, " ペプチド合成の基礎と実験 ", 丸善 (1985)
- 14) 矢島治明, " タンパク質の化学 I V (生化学実験講座 1) ", 日本生化学会編, 東京化学同人, p.207 (1977)
- 15) 榊原俊平, " タンパク質の化学 I V (生化学実験講座 1) ", 日本生化学会編, 東京化学同人, p.401 (1977)
- 16) 木村皓俊, 榊原俊平, 矢島治明, 森原和之, " タンパク質の化学 (下) (続生化学実験講座 2) ", 日本生化学会編, 東京化学同人, p.641 (1987)
- 17) A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskolski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, S. B. H. Kent, Science, 245, 616 (1989)
- 18) a) K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersch, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, Nature, 354, 82 (1991) b) R. A. Houghten, C. Pinella, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, ibid, 354, 84 (1991)
- 19) G. Jung, and A. G. Beck-Sickinger, Angew. Chem. Int. Ed., 31, 367 (1992)
- 20) H. Hojo, and S. Aimoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 65, 3055 (1992)
- 21) T. Teshima, K. Nakajima, M. Takahashi, and T. Shiba, Tetrahedron Lett., 33, 363 (1992)

酵素法によるペプチド合成

(大阪市工研) 杉原耿雄

I. 特徴

- (1) 位置および立体特異的 (L型アミノ酸) である
- (2) ラセミ化が起こらない
- (3) 側鎖の保護が不要である
- (4) 生成ペプチドが酵素によって加水分解を受けない工夫が必要である
- (5) 有機溶媒存在下で合成を行なう場合が多く、酵素の失活を防ぐ工夫が必要である

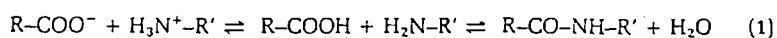
II. プロテアーゼの主特異性¹⁾

Table 1

Enzyme	Preferred cleavage site N-terminal C-terminal	Enzyme	Preferred cleavage site N-terminal C-terminal
Serine proteases		Thiol proteases	
Trypsin	↓ -Arg (or Lys)-Yaa-	Papain, <i>Streptococcus</i> protease	↓ -Phe (or Val, Leu)-Xaa-Yaa-
<i>Achromobacter</i> protease	↓ -Lys-Yaa-	Clostripain, cathepsin B	↓ -Arg-Yaa-
Chymotrypsin, subtilisin	↓ -Trp (or Tyr, Phe, Leu)-Yaa-	Cathepsin C	H-X-Phe (or Tyr, Arg)-Yaa-
Elastase, α-lytic protease	↓ -Ala (or Ser)-Yaa-	Metal proteases	
Proline-specific protease	↓ -Pro-Yaa-	Thermolysin	↓ -Xaa-Leu (or Phe)-
<i>Staphylococcus</i> V8 protease	↓ -Asp (or Glu)-Yaa-	<i>Myxobacter</i> protease II	↓ -Xaa-Lys-
Carboxypeptidase Y	↓ -Xaa-Yaa-	Aspartic proteases	
		Pepsin	↓ -Phe (or Tyr, Leu)-Trp (or Phe, Tyr)-

III. 方法論^{2) 3)}

- (1) 平衡論的アプローチ - すべてのプロテアーゼを利用できる



$$K_{ob} = \frac{[R-CO-NH-R']_{ob}}{[R-COOH]_{ob} [R'-NH_2]_{ob}} \quad (2)$$

$$K_{ob} = \frac{K}{(1 + 10^{pH-pK_1})(1 + 10^{pK_2-pH})} \quad (3)$$

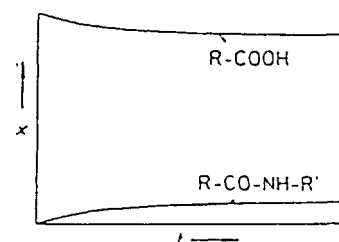
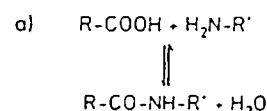


Fig. 1

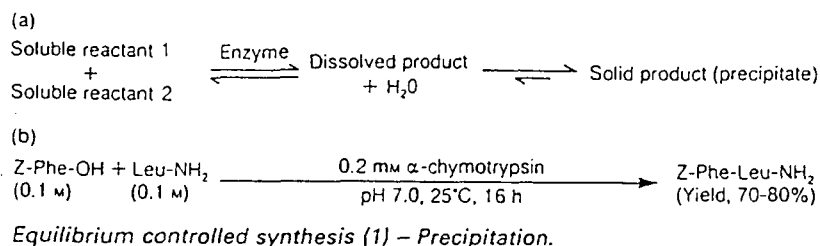
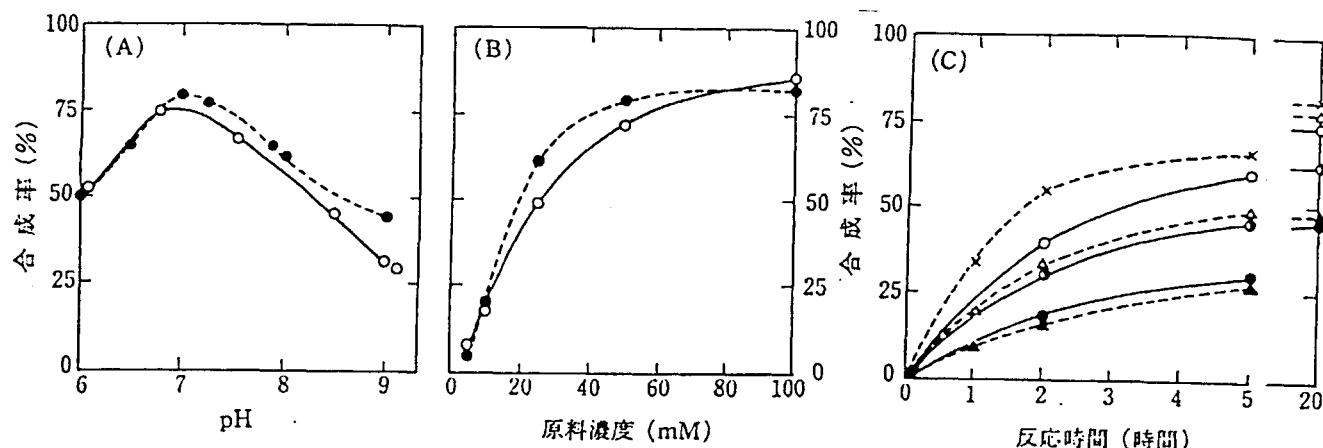


Table 2
Effect of blocking residues on product solubility

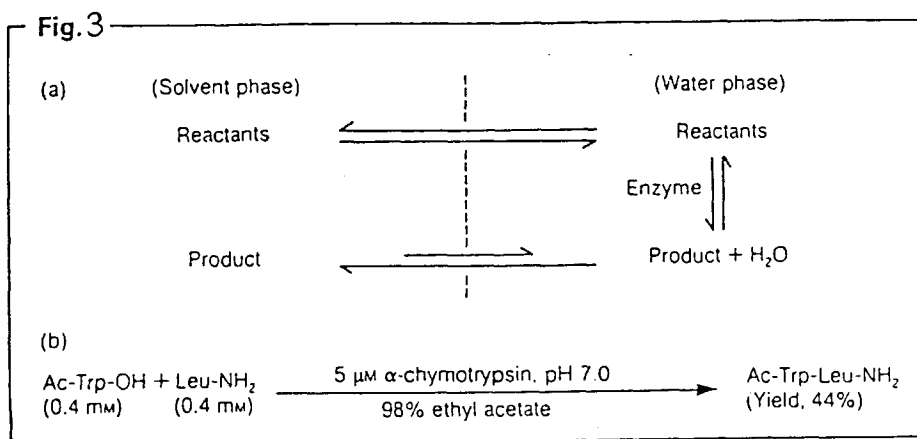
Product	Solubility ^a /μM
Ac-Phe-Leu-NH ₂	10 ⁴ (in water)
Z-Phe-Leu-NH ₂	27
Z-Phe-Leu-OEt	17
Z-Phe-Leu-OBu ^t	1.7
Z-Phe-Leu-NHC ₆ H ₅	0.8
Z-Phe-Leu-ODPM	0.03

^aIn pH 7.0 buffer containing 10% dimethylformamide.

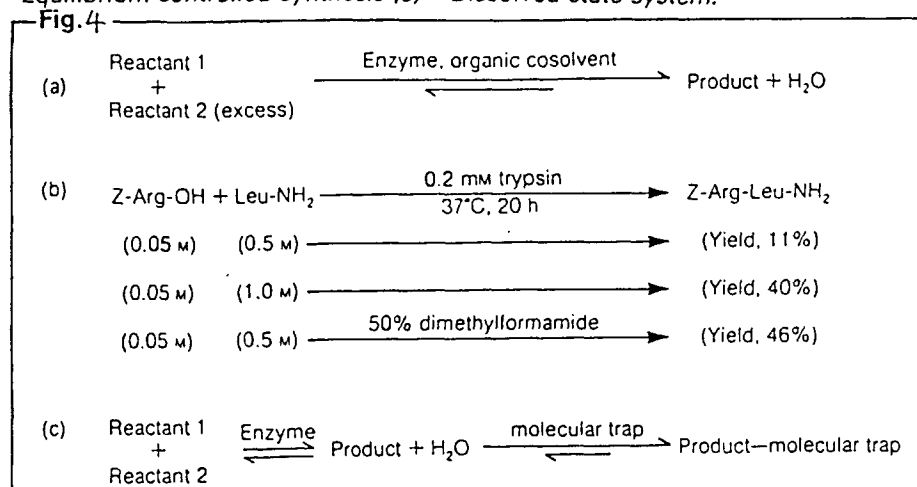
Fig. 2 キモトリプシン²¹⁾とサーモリシン²²⁾による Z-Phe-Leu-NH₂ 合成反応と反応条件



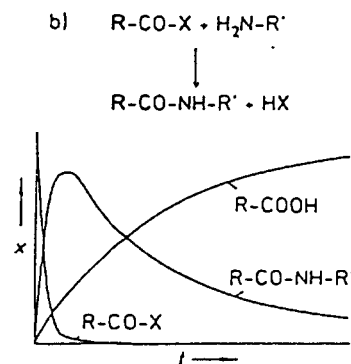
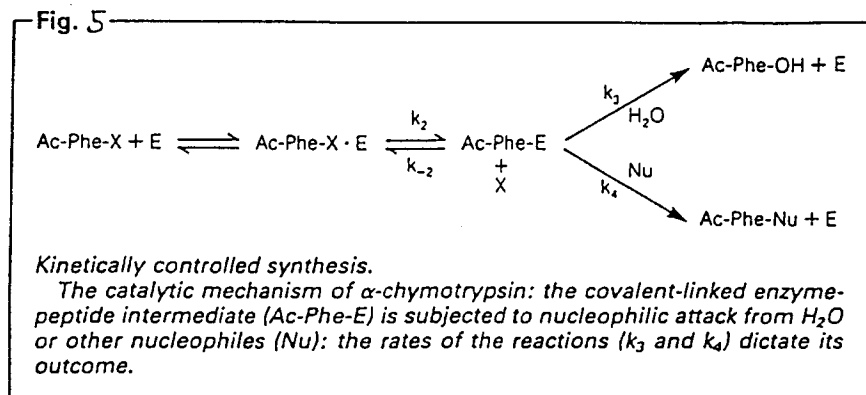
Equilibrium controlled synthesis (2) – Biphasic system.



Equilibrium controlled synthesis (3) – Dissolved state system.



(2) 速度論的アプローチ — アシル中間体を形成するセリンおよびチオールプロテアーゼしか利用できない



IV. セリンプロテアーゼのアミド水解活性の抑制 4) 5) 6) 7) 8) 9)

アミドの水解 — アシル中間体の生成が律速段階で、pHに依存しない

エステルの水解 — 脱アシルが律速段階で、pHに依存する

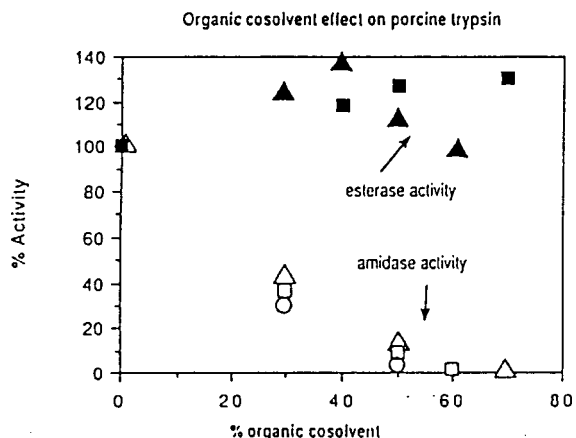


Figure 6. Effect of water-miscible organic solvents on the activities of porcine trypsin. The esterase activity toward *N*-benzoylarginine methyl ester (40 mM) was determined in 0.02 M CaCl_2 (2 mL) containing organic solvent. A 50- μL enzyme solution (4.17×10^{-5} M) in 0.004 M Tris, pH 7, was added to the substrate solution, and the solution was held at pH 8 by automatic addition of 0.025 M NaOH through a Radiometer pH-stat. The activity was determined on the basis of consumption of base. ($\square$) dioxane; ($\blacktriangle$) DMF. To determine the amidase activity, the enzyme was added to a solution (1 mL) containing *N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide, Tris (0.1 M), CaCl_2 (0.02 M), pH 8.0. The absorbance change at 410 nm was monitored. ($\circ$) acetonitrile; (Δ) DMF; ($\square$) dioxane.

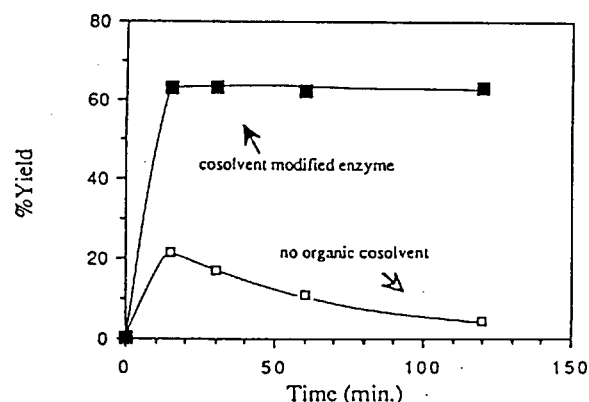
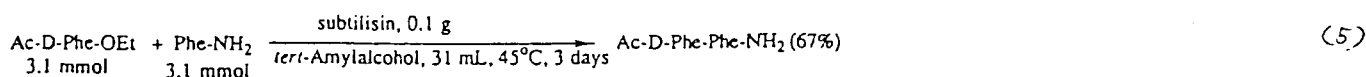
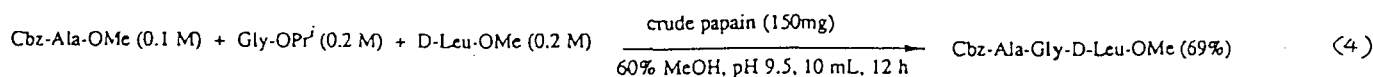


Figure 7. Comparison of cosolvent-modified enzyme and all-aqueous system for the synthesis of Bzl-Arg-Gly-NH_2 , as monitored by HPLC with a C-18 column. Conditions: 0.2 M Bzl-Arg-OEt , 0.2 M Gly-NH_2 , 0.25 M Tris, 0.02 M CaCl_2 , 0.1 mM TPCk-treated bovine trypsin, pH 10; cosolvent-modified system is 60% by volume dioxane, and approximately 30% of the initial esterase activity is retained after 2.5 h. No peptide formation was observed in the absence of enzymes. The product is soluble in both systems.

V. D型および非天然アミノ酸の導入^{10) 11) 12)}



VI. 新しいタイプのプロテアーゼ¹³⁾

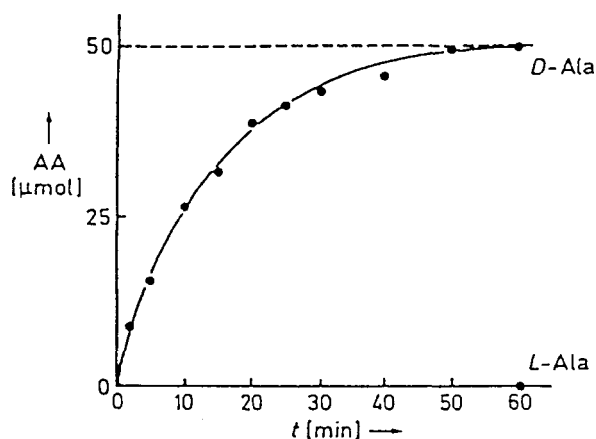


Fig. 8. Kinetic resolution of D,L-alanine amide by *Achromobacter* D-alanine aminopeptidase.

Table 3. Aminolysis of alanine methyl ester with 3-aminopentane catalyzed by *Achromobacter* D-alanine aminopeptidase [a].

Acyl donor	Solvent	Yield [%] [b]
D-alanine methyl ester HCl	butyl acetate	98
D,L-alanine methyl ester HCl	butyl acetate	48
L-alanine methyl ester HCl	butyl acetate	0
D-alanine methyl ester HCl	benzene	98
D-alanine methyl ester HCl	trichloroethane	91
D-alanine methyl ester HCl	toluene	67

[a] A reaction mixture containing PU-6-immobilized D-alanine aminopeptidase (7.5 units of partially purified enzyme of 210 units mg^{-1}), 0.1 mmol of alanine methyl ester hydrochloride, and 0.5 mmol of 3-aminopentane in water-saturated organic solvent (1 mL) was incubated at 30 °C for 1 h. [b] The yield was calibrated with chemically synthesized authentic products with ninhydrin.

VII. プロテアーゼの安定性の向上¹⁴⁾

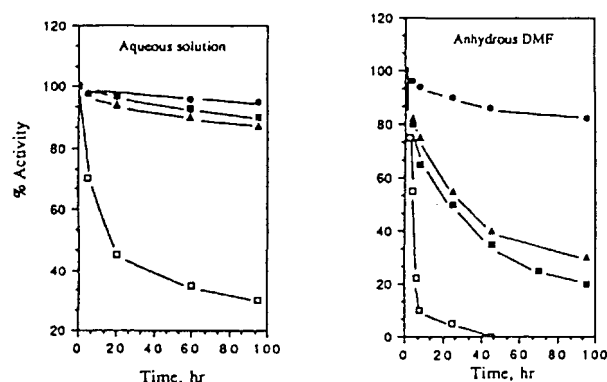


Figure 9. Stability of subtilisin BPN' and mutants in aqueous solution (0.05 M Tris-HCl, pH 8.4) and in DMF at 25 °C: $\square$, wild-type BPN'; $\blacksquare$, 8350; $\bullet$, 8397; $\blacktriangle$, 8399. The rate of inactivation was measured on the basis of the remaining activity as described previously.⁴ The inactivation is not simple first order. 8350: Met 50 Phe (hydrophobic), Gly 169 Ala (hydrophobic and configurational entropy), Asn 76 Asp (Ca^{2+} binding and H bonding), Gln 206 Cys (oxidized to Cys-SH, van der Waals), Tyr 217 Lys (H bonding), Asn 218 Ser (H bonding). 8397: The same as 8350 except no change for Tyr 217. 8399: The same as 8350 except no changes for Gly 169 and Tyr 217.

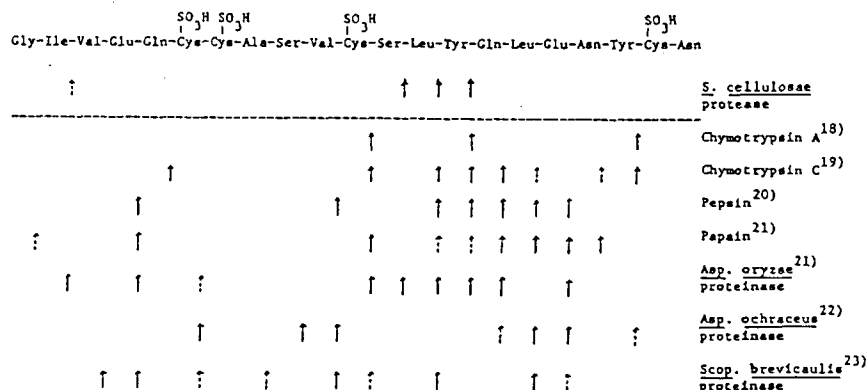
Table 4. Kinetic Constants for Subtilisin BPN' and Mutants^a

substrate	BPN'			8399		
	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	k_{cat} s^{-1}	K_m μM	k_{cat}/K_m $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
Suc-AAPF-pNA ^b	47	172	2.7×10^3	76	112	6.8×10^3
NTCl ^c	0.2	76	2.2×10^3	0.2	33	6.0×10^3
Z-Lys-SBzl	46	531	8.7×10^4	32	948	3.4×10^4
Bz-Tyr-OEt	70	1700	4.1×10^4	73	2358	3.1×10^4

TABLE 5 RELATIVE ACTIVITY OF THE ENZYME FOR VARIOUS SYNTHETIC PEPTIDES

The final concentration of the substrate was 10 mM, except for those given in parentheses. The rate of L-Phe-L-Leu-NH₂ was taken as 100.

Peptide	Relative activity	Peptide	Relative activity	Peptide	Relative activity
Gly-Ile	21.8	Leu-Val*	5.4	Phe [↓] -Leu [↓] -NH ₂	100
Gly-Phe	12.3	Leu-Tyr*	2.2	Pro-Phe [↓] -NH ₂	48.1
Gly-Leu	5.2	Leu-Pro	0	Pro-Leu [↓] -Gly-NH ₂	37.7
Gly-Lys	0	D-Leu-Tyr	0	Gly [↓] -Leu [↓] -NH ₂	10.3
Gly-Glu	0	Tyr-Leu*	3.2	Asp-Phe-OMe	0
Gly-Ala	0	Ser-Leu	3.8	Cbz-Ser	0
Gly-Asn	0	His-Leu*	0	Cbz-Phe	0
Gly-Gly	0	Pro-Leu	0	Cbz-Gly-Pro	0
Gly-Asp	0	Val-Phe	6.3	Bz-Gly-Lys	0
Gly-Pro	0	Lys-Glu	N	Cbz-Ile-Pro	0
Gly-D-Leu	0	Glu-Val	N	Cbz-Phe [↓] -Leu	4.7
Gly-D-Phe	N	Leu [↓] -Leu [↓] -Leu	2.4	Cbz-Leu [↓] -Tyr*	6.3

FIG. 10. Cleavage Site of Oxidized A-Chain of Insulin by the Protease from *S. cellulosa* and by Other Enzymes.

The arrows indicate a major site of action. The broken-line arrows indicate other bond split less readily.

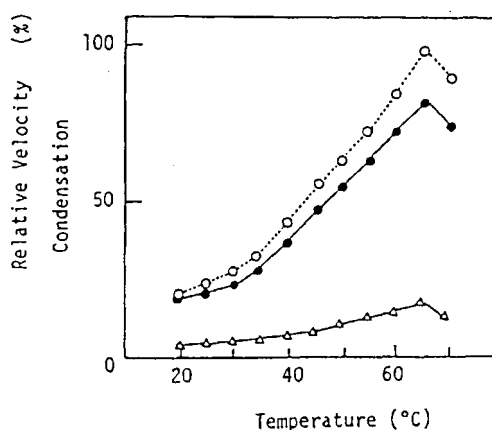


Fig. 11. The temperature dependences of the initial velocities of formation of (L-Leu-Gly)₂, (L-Leu-Gly)₃, and L-Leu (or Gly) from L-Leu-Gly. Δ , v_1 (initial velocity of (L-Leu-Gly)₂ formation); $\bullet$, v_2 (initial velocity of (L-Leu-Gly)₃ formation); $\circ$, v_{1T} (the sum of v_1 and v_2); $\square$, v_R (initial velocity of L-Leu (or Gly) formation). In condensation and hydrolytic reactions, the relative velocities of 100% correspond to v_{1T} and v_R at 65°C, respectively. Enzyme concentration: 3.0×10^{-5} M. Substrate concentration: 1.3×10^{-1} M.

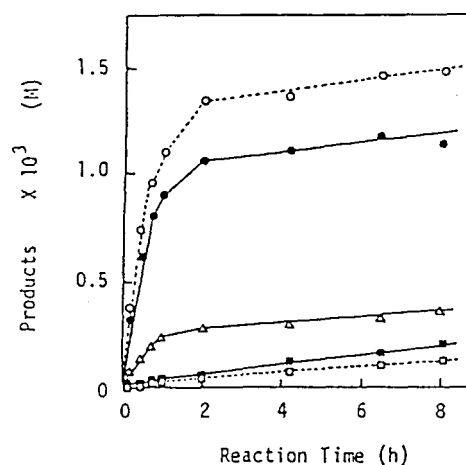


Fig. 12. An example of the time courses of formation of (L-Leu-Gly)₂, (L-Leu-Gly)₃, L-Leu, and Gly. Δ , (L-Leu-Gly)₂; $\bullet$, (L-Leu-Gly)₃; $\circ$, sum of (L-Leu-Gly)₂ and (L-Leu-Gly)₃; $\blacksquare$, L-Leu; $\square$, Gly. Enzyme concentration: 1.4×10^{-5} M. Substrate concentration: 1.3×10^{-1} M.

IX. 展望

X. 文献

- 1 Morihara, K. & Oka, T. (1982) *Kagaku no Ryouiki* 36, 444-455
- 2 Jakubke, H-D., Kuhl, P., & Konnecke, A. (1985) *Angew. Chem.* 97, 79-87
- 3 Kasche, V. (1986) *Enzyme Microb. Technol.* 8, 4-16
- 4 Barbas, C. F. III, Matos, J. R. West, J. B. Wong, C-H. (1988) *J. Ame. Chem. Soc.* 110, 5162-5166
- 5 Barbas, C. F. III, & Wong, C-H. (1987) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1987) 532-534
- 6 Coletti-Previero, M.A., Previero, M. & Zuckerkandl, E., (1969) *J. Mol. Biol.* 39, 493-501
- 7 Wong, C.H. Chen, S.T. Hennen, W.J. Bibbs, J.A. Wang, Y. F., Liu, J.L.C., Pantoliano, M.W., Whitlow, M., & Bryan, P.N. (1990) 112, 945-953
- 8 West, J.B., Hennen, W.J., Lalonde, J.L., Bibbs, J.A., Zong, Z., Meyer, E.F., & Wong, C.H. (1990) 112, 5314-5320
- 9 Widmer, F., Breddam, K., & Johanson, J.T. (1980) *Carlsberg Res. Commun.* 45, 453-463
- 10 Petkov, D.D., & Stoineva, I.B. (1984) *Tetrahedron Lett.* 25, 3751-3754
- 11 West, J.B., & Wong, C.H. *J. Org. Chem.* (1986) 51, 2728-2735
- 12 Margolin, A.L., Tai, D.F., & Klibanov, A.M. (1987) *J. Ame. Chem. Soc.* 109, 7885-7887
- 13 Asano, Y., Nakazawa, A., Kato, Y., & Kondo, K. (1989) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, 450-451
- 14 Zhong, Z., Jennifer, L.C.L., Dinterman, L.M., Finkelman, M.A., Mueller, T., Rollence, M.L., Whitlow, M., & Wong, C.H. (1991) 113, 683-684
- 15 Muro, T., Tominaga, Y., & Okada, S. (1984) *Agric. Biol. Chem.* 48, 1223-1230
- 16 Muro, T., Tominaga, Y., & Okada, S. (1986) *J. Biochem.* 99, 12625-1630
- 17 Muro, T., Murakami, T., Tominaga, Y., & Okada, S. (1987) *Agric. Biol. Chem.* 51, 607-609

配座制御法による新しいグルタミン酸アゴニストの開発

(財) サントリー生物有機科学研究所
大船 泰史・島本 啓子

1. はじめに

L-グルタミン酸は哺乳動物の中枢神経系における興奮性伝達物質として主要な役割を担うとともに、いろいろな脳・神経疾患に至る強い興奮毒性を示し、また最近になり記憶や学習の形成など高次な神経生理機能にかかわることが示唆され注目を集めている。このように多岐にわたる生理機能の発現にはシナプスにおけるグルタミン酸レセプターと伝達物質の可逆的な結合が引き金となっており、レセプターとグルタミン酸がかかわる分子認識の機構の解明は広範な脳神経機能研究の基礎として重要な研究課題となっている。

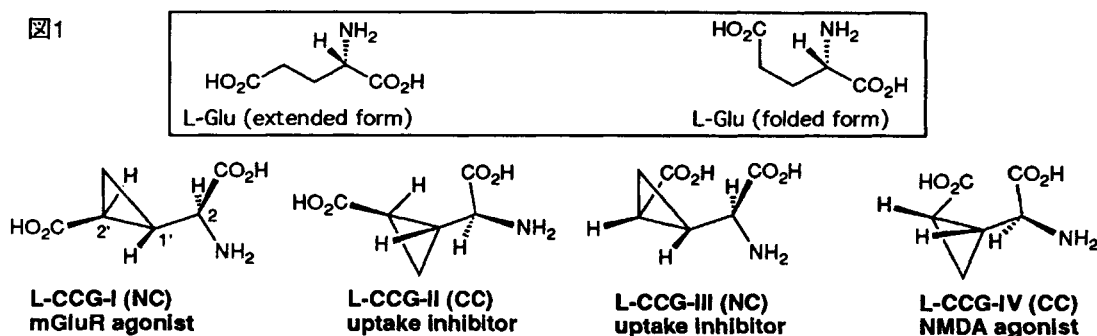
現在までグルタミン酸レセプターは(1)イオンチャンネルを形成するイオンチャンネル型と(2)G-蛋白を介し一連の細胞内代謝経路を活性化する代謝調節型に大別されている。

¹⁾ (1)では選択的かつ代表的なアゴニストとしてカイニン酸(KA)、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸(AMPA)などがあり、これらアミノ酸類によってこのレセプターのサブタイプ分類がなされている。

(2)では(1S,3R)-1-アミノシクロペンタン-1,3-ジカルボン酸((1S,3R)-ACPD)が代表的なアゴニストである。最近、クローン化によりグルタミン酸レセプター群は蛋白レベルでさらに細分化されるに至っている。

これら数多くのレセプターとリガンドであるグルタミン酸との結合にはグルタミン酸の3個の極性官能基が結合する(3点結合仮説)²⁾。グルタミン酸の極性官能基の空間配座はグルタミン酸がどのようなコンフォメーションをとるのかによって決まる。したがって、それぞれのレセプターは、グルタミン酸の特定のコンフォメーションを識別してグルタミン酸と結合するものと推定することができる。これをグルタミン酸レセプターの立体配座要請という。では、(1)や(2)のタイプのレセプターはどのようなコンフォメーションのグルタミン酸と結合するのであろうか？われわれはグルタミン酸のコンフォメーションを制御したアミノ酸類を設計、合成することによりグルタミン酸レセプターの立体配座要請を明らかにでき、これを基に有効なアゴニストやアンタゴニストの設計の手掛かりが得られるものと考えた。今回、グルタミン酸のコンフォメーションを制御するという発想で展開した最近の成果について述べたい。

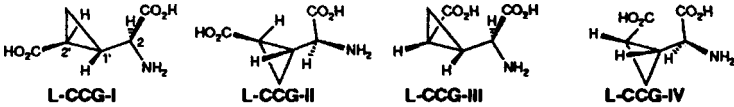
図1



2. L-2-カルボキシシクロプロピルグリシン (L-CCG-IV) の設計

さきに、われわれはグルタミン酸のコンフォメーションをextended型あるいはfolded型に制御した物質群として4種のL-2-カルボキシシクロプロピルグリシン (L-CCG-I-IV) を設計、合成した(図1)。哺乳動物の中樞神経系を用いた薬理学研究の結果、CCG類はグルタミン酸レセプターを強力に活性化する選択的なアゴニストであり神経生理機構研究に有用なプローブとなる物質群であることが明らかになっている(表1)。³⁻⁶⁾

表1 Neuropharmacological Profile of CCG Isomers (relative potency ratios; L-Glu = 1)

								
CCG	Depolarizing activity ^a	Binding affinity ^b	IP ₃ formation ^c		cAMP ^d	Receptor subtype	Remarks	
extended CCG-I	6	0.006	5	1	70	metabotropic	{ Selective metabotropic agonist [QA > CCG-I > t-ACPD > L-Glu] Depression of monosynaptic reflex L-Glu uptake inhibitor	
CCG-II	0.3	~0	<1	0.1	0.07			
folded CCG-III	0.5	~0	-	-	-	NMDA	L-Glu uptake inhibitor (potentiation) Potent NMDA agonist [CCG-IV > NMDA > L-Glu]	
CCG-IV	100	17	-	-	-			
NMDA	40	0.2	-	-	-	NMDA	mixed agonist	
KA	100	~0	-	-	-	KA		
QA	300	0.15	350	45	0.01	AMPA & metabotropic		
(1S,3R)-ACPD	2	not tested	1	0.2	1	metabotropic		

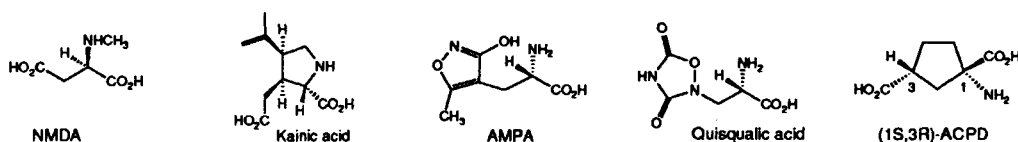
^a Depolarizing action on the rat spinal cord. (Shinozaki et al., Br. J. Pharmacol., 1989.)

^b Binding affinity to NMDA receptor in the rat cerebral cortex ([³H]CPP). (Kawai et al., Eur. J. Pharmacol., 1992.)

^c Enhancement of IP₃ metabolism in the rat hippocampal synaptoneurosome. (Nakagawa et al., Eur. J. Pharmacol., 1990.)

^d Stimulation of PI hydrolysis in mGluR1-expressing Chinese hamster ovary (CHO) cell. (Hayashi et al., Br. J. Pharmacol., 1992.)

^e Inhibition of forskolin-stimulated cAMP formation in mGluR2-expressing CHO cell. (Hayashi et al., Br. J. Pharmacol., 1992.)



以上の結果からグルタミン酸レセプターの立体配座要請として、近似的に(2)の代謝調節型レセプターはextended型のグルタミン酸のコンフォマーが、また(1)のうちNMDA型サブタイプはfolded型のグルタミン酸のコンフォマーが重要であることがわかった。これらはグルタミン酸の炭素鎖のコンフォメーションに関する情報である。さらに正確な活性配座を知るためには炭素鎖のコンフォマーに加えα-アミノ酸部位の回転異性体も含めた精密な解析が必要である。もし、CCG類のα-アミノ酸部位が自由に回転できず、むしろ固定しているならば、CCG類のα-アミノ酸部位のコンフォメーションを調べることでグルタミン酸レセプターの立体配座要請をさらに精密化することができる。そこで(1) CCG類の分光学的手法による精密配座解析、(2) CCG類のα-アミノ酸部位の回転異性体を固定できる類縁体、3'位置換CCG類の合成、さらに(3) CCG類の二面角や環の歪みを軽減した類縁体の合成を検討した。

3. CCG類の立体配座解析

CCG類の α -アミノ酸部位の回転異性体は立体反発を最小にする場合とイオン性が強く作用する場合の2通りが考えられる。NMDA型レセプターの強力なアゴニストであるL-CCG-IVを例にとると、カルボキシル基どうしの距離が近いコンフォマー（CC型）と α -アミノ基と2-カルボキシル基が近いNC型がそれに相当する（図2）。それぞれのコンフォマーの間では極性官能基の空間位置が大きく異なっている。従って、CCG類がどちらのコンフォマーをとっているか、また両者が生理的条件下回転できるかどうか調べることはレセプターの立体配座要請を知るうえで重要である。

CCG類の ^1H NMR ($J = 10 \sim 11$ Hz, pH 3~4) からCCG類のH-C2-C1'-Hの2面角は $\sim 180^\circ$ か $\sim 0^\circ$ である。2面角を $\sim 0^\circ$ とした場合には置換基は三員環に対してエクリプス型をとり不安定である。そうすると、L-CCG-IVの場合はアンチペリプラナーに固定した（CC型）が安定と考えられた（図2）。同様にH2とH1'がアンチペリプラナーをとるとすればL-CCG-Iは

（NC）型、IIは（CC）型、IIIは（NC）型である。まず、pH変化とJ値の相関を調べてみた（図3）。CCG-IとIIIの α -アミノ酸部位の立体配座はJ値から全pH領域ではほぼ固定していると思われる。一方、CCG-IIとIVのJ値は中性あるいは塩基性で8.5~9.0 Hzとなり、ある程度揺れていると考えられる。ちなみに、自由回転するグルタミン酸は全pH領域でJ値は6.0~6.5 Hzであった。次に、高温や Ca^{2+} イオンの存在下のNMR実験ではJ値やシグナルのパターンに顕著な変化は認められなかった。以上の結果から、CCG類の α -アミノ酸部位は自由回転していないと推定できる。なおX-線結晶解析⁷⁾から結晶状態ではL-CCG-II~IVはアンチペリプラナーのコンフォメーションをとっていることがわかった（図1、6）。

図2. L-CCG-IVの回転異性体

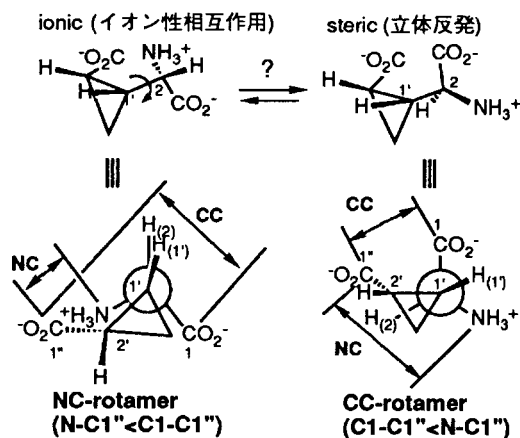
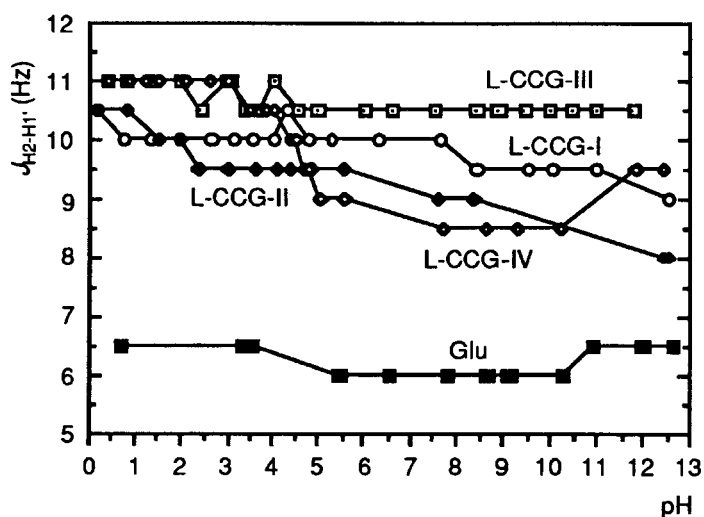


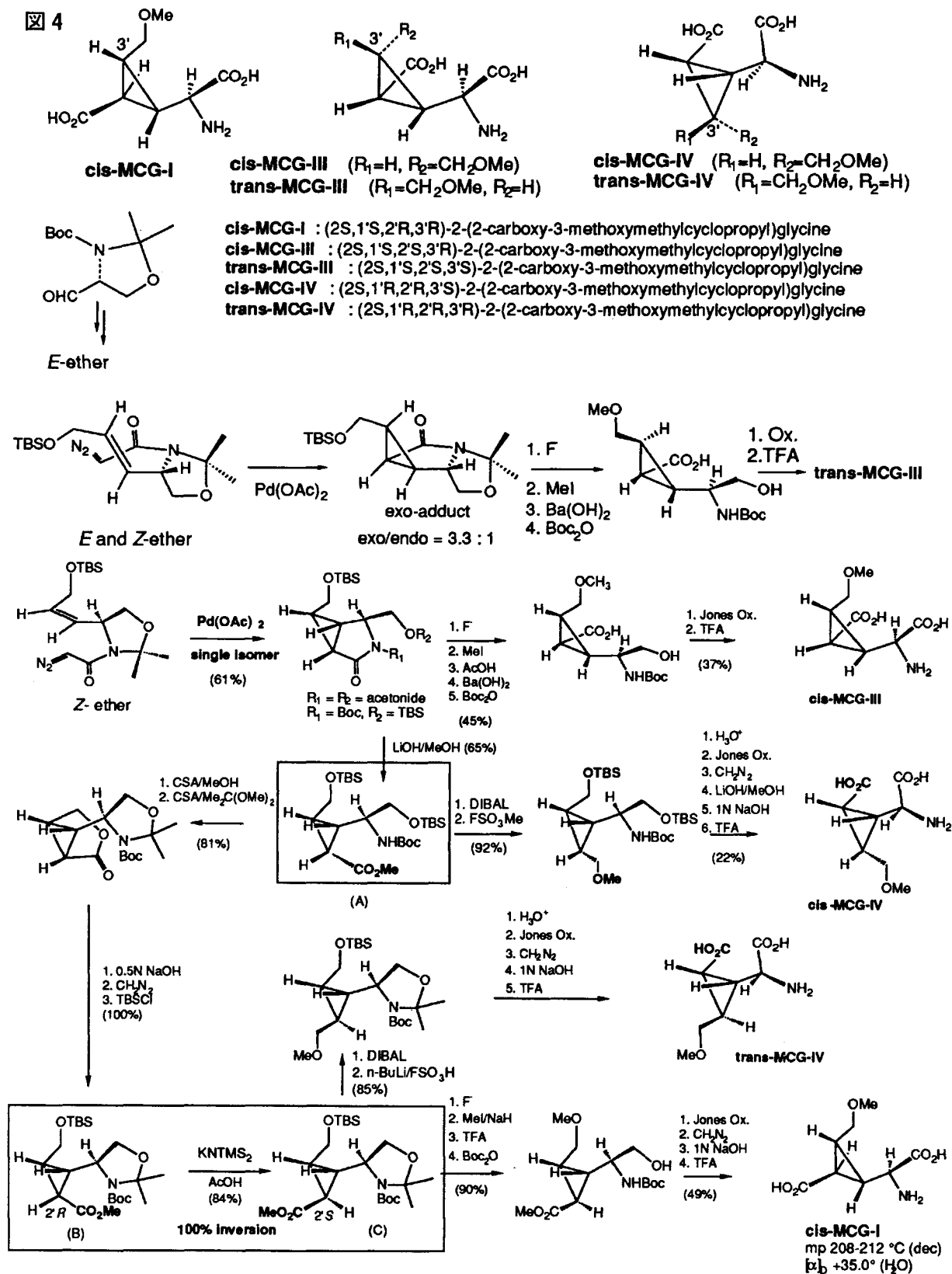
図3. CCG類のpHとJ値の相関



4. MCG類の合成

CCG類の配座解析から、CCG類の α -アミノ酸部位はかなり固定していることが推定できた。これを物質レベルで証明する試みとして、C3'位に置換基を導入したcis-MCG-I, cis-およびtrans-MCG-IIIとIVの合成をおこなった（cis型はC3'位の置換基により α -アミノ酸部位の回転が立体的に阻害されたモデルである）。また、これによりレセプター周辺環境の探索や親

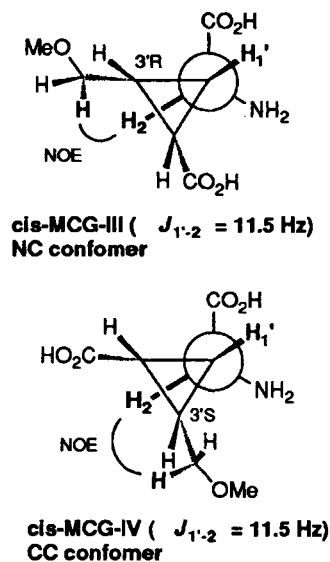
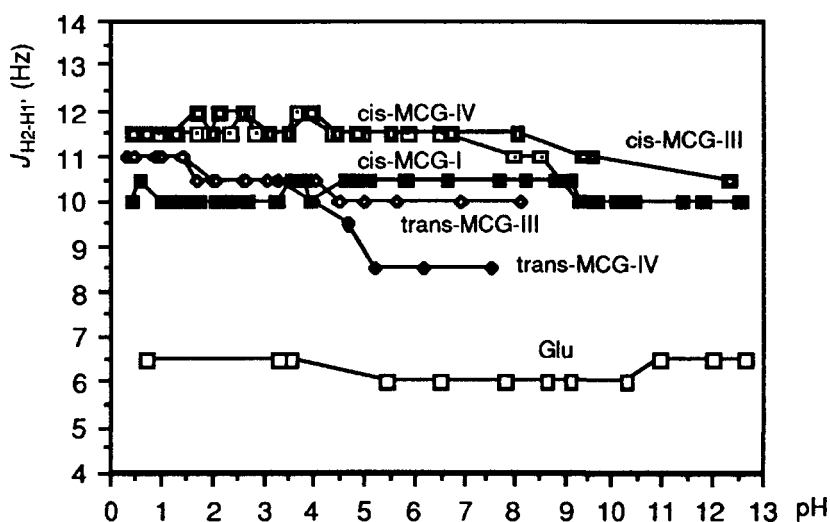
和性リガンドの開発も期待できる。D-セリナール誘導体を共通の出発原料として得られたE型およびZ型の不飽和エーテルを用い分子内環化付加反応を経て、5種類のMCG類を合成した(図4)。cis型のシクロプロピルエステルのtrans型への反転を鍵段階として用いることにより、すべての異性体を立体選択的に得ることができた。^{8a)}



5. MCG類の活性とグルタミン酸レセプターの立体配座要請

合成した5種のMCG類のうちcis-およびtrans-MCG-IVは新生ラット脊髄摘出標本で顕著な脱分極活性を示した。その活性は母核であるL-CCG-IVよりはよわいもののグルタミン酸をはるかに凌ぐ。神経薬理解析からcis-MCG-IVはNMDA型のアゴニストであった。一方C3'位の立体配置が反転したtrans-MCG-IVはNon-NMDA型 (KA型) の挙動を示した (後述)。cis-MCG-IはL-CCG-Iと同様に代謝調節型レセプターの選択的アゴニストと分類された。cis-やtrans-MCG-IIIには高濃度でも脱分極作用や母核であるL-CCG-IIIのようなグルタミン酸の再吸収阻害活性は認められなかった (C-3'位の置換基が再吸収部位に立体障害となっているのかもしれない)。

図5. MCG類のpHとJ値の相関

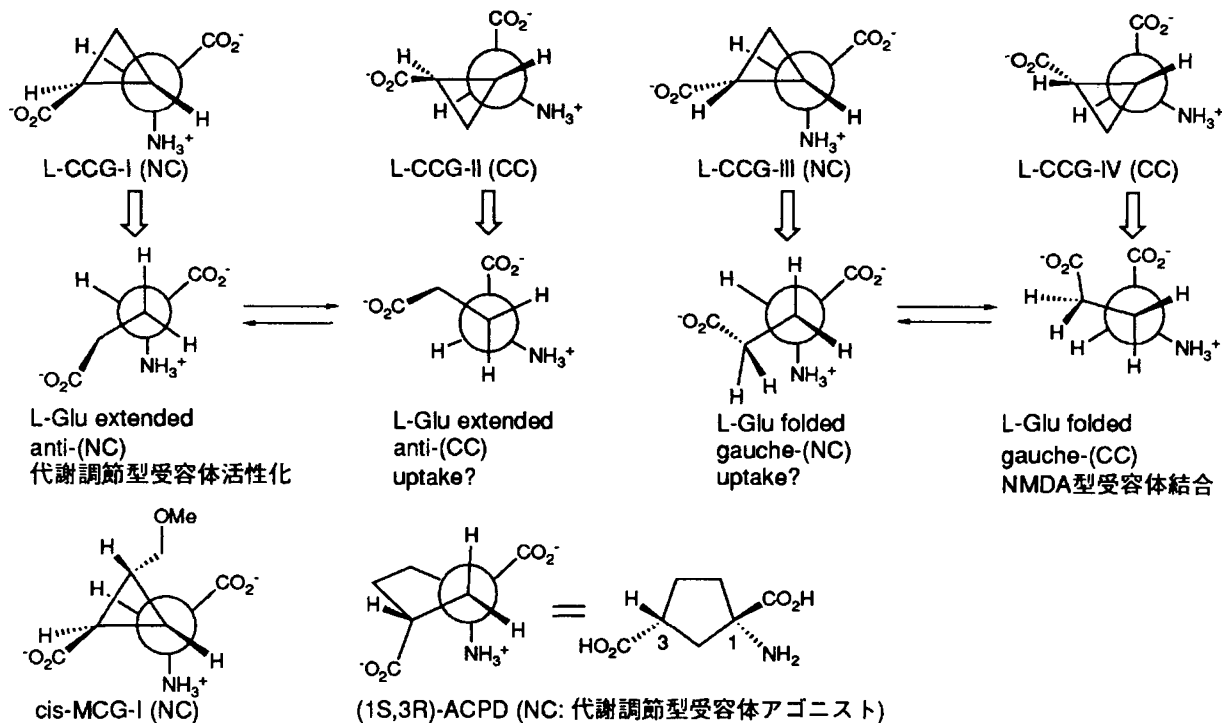


^1H NMRにおいてすべてのMCG類のC-2Hは大きなJ値を示した。特にcis体ではJ値にpH依存性の変化が小さくなり、またC-2HとC-3'位のメトキシメチレン水素との間に強いNOEが観測された。従って、C-2HとC-1'Hがアンチペリプラナーな配置をとっており、cis-MCG-IとIIIはNC型、cis-MCG-IVはCC型の立体配座をもつことがわかった。 α -アミノ酸部位の配座を凍結したcis-MCG-I, IVが母核を反映した活性を示すことからL-CCG-IはNC型であり、L-CCG-IVはCC型の立体配座であると考えられる。同様にL-CCG-IIはCC型を、L-CCG-IIIはNC型をとっているものと推定した。

6. グルタミン酸レセプターの立体配座要請

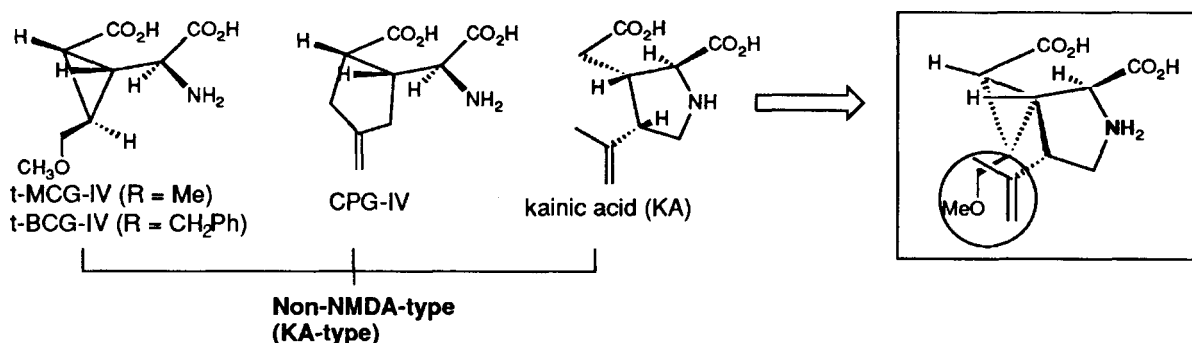
代謝調節型レセプターの選択的アゴニストであるL-CCG-Iの官能基の座標はグルタミン酸の安定配座の一つ、anti-(NC)のそれとよい一致を示す。また、このレセプターの代表的なアゴニスト、(1S,3R)-ACPDもL-CCG-IのNC型とよく重なることからこのレセプターの立体配座要請はグルタミン酸のanti-(NC)型のコンフォーマーといえる (図6)。NMDA型レセプターの強力なアゴニストL-CCG-IVの官能基の座標はグルタミン酸のgauche-(CC)⁹⁾のそれとよい一致を示す。従って、ここではgauche-(CC)がNMDAレセプターの立体配座要請を満足するコンフォーマーと考えられる。

図6. グルタミン酸受容体の立体配座要請



7. 三員環に由来する二面角や環の歪みを軽減した類縁体：新しいカイニン酸アゴニスト

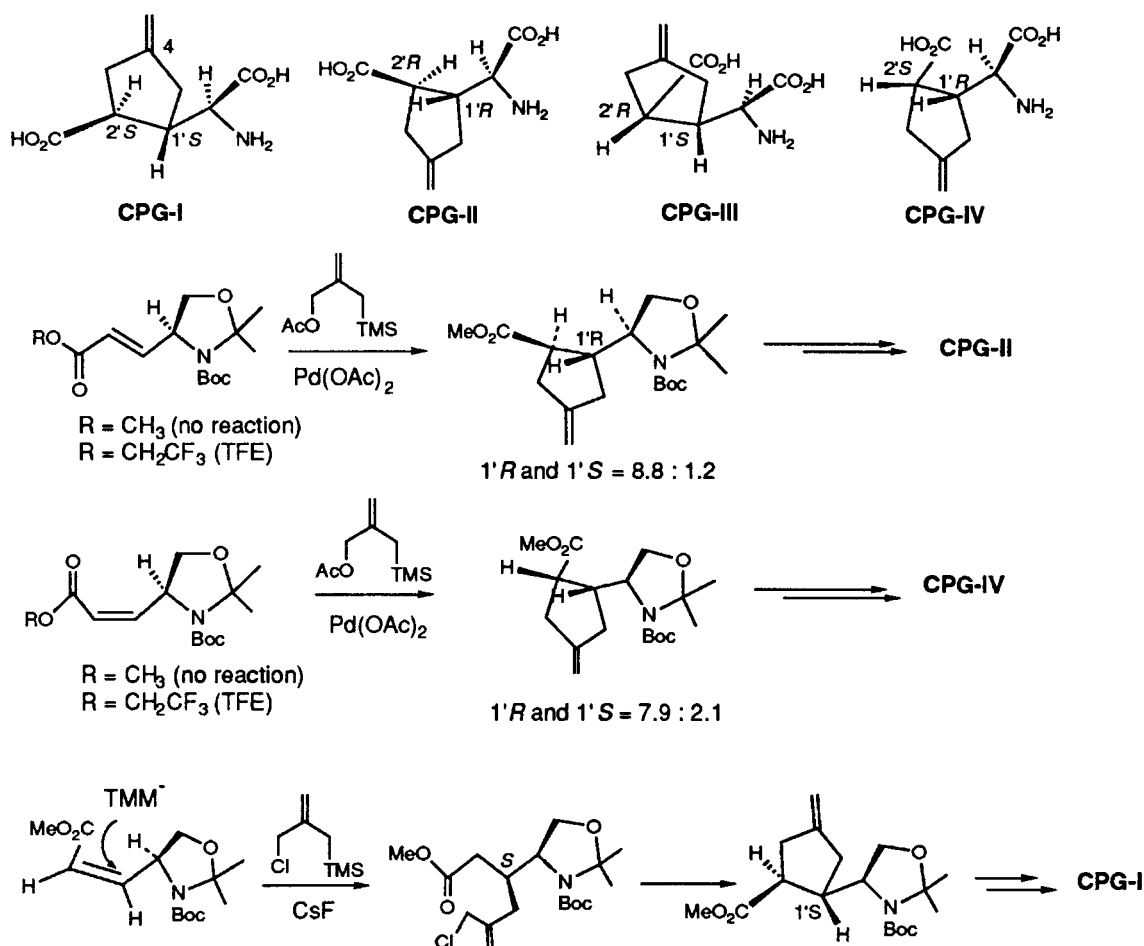
図7. カイニン酸受容体の立体配座要請



前述したように、NMDA型のアゴニストである cis-MCG-IV の C3' 位の立体配置が反転した trans-MCG-IV はカイニン酸型の挙動を示す。ベンジルオキシメチル体も同様であった。^{8b)} これらはカイニン酸骨格（カイノイドと総称される）¹⁰⁾ を持たないアミノ酸がカイニン酸型レセプターと結合するという稀な例である。カイニン酸の C3 位の酢酸基を図 7 のような folded 型のコンフォメーションに固定すると t-MCG-IV のグルタミン酸の部分構造を重ね合わせることができる。このとき、カイニン酸のイソプロペニル基と t-MCG-IV のメトキシメチル基も同じ空間を占める。一方、カイニン酸の二重結合を飽和したジヒドロカイニン酸がその活性を失うというのは良く知られた事実である。¹¹⁾ 白浜等は同じカイノイドに分類されるアクロメリン酸やその類縁体の研究を通じて、カイニン酸レセプターは π -電子作動性であると提唱している。¹²⁾ trans-MCG-IV は π 電子を持たないが、メトキシメチル基で相当する効果

をもたらしているようである。そこで、*t*-MCG-IVとカイニン酸の両方の構造的な特徴をもつグルタミン酸類縁体として (2*S*,1'*R*,2'*S*) -2- (2-カルボキシ-4-メチレンシクロペンチル) グリシン (CPG-IV) を考えた。図のようにCPG-IVの二重結合はカイニン酸のイソプロペニル基や*trans*-MCG-IVのメトキシメチル基と同じ空間を占める。また、CCG類は3員環によって二面角や環が歪んだ物質であることから、歪みを軽減することにより、当然レセプターとの結合に必要な官能基の空間配置が異なってくる。コンフォメーションと活性の比較の見地からも興味をもたれる。そこで、CPG-IVのみならずL型の4種のジアステレオマーの合成を検討した (図8)。¹³⁾

図8. CPG類の合成



光学活性なE型あるいはZ型の α,β -不飽和エステルを出発物質として用い、これらに対するパラジウム触媒を用いたトリメチレンメタン等価体の[3+2]型の環化付加反応、あるいはZ型の α,β -不飽和エステルに対するトリメチレンメタン等価体のマイケル型付加反応によりCPG類の合成を検討した。[3+2]型の環化付加反応はメチルエステル体では全く進行しなかったが、エステル基を2, 2, 2-トリフルオロエチルエステルに変換することにより解決できた。これは電気陰性なエステル基の導入により不飽和エステルの炭素-炭素二重結合が活性化された結果と考えている。環化付加は立体選択的に進行し、E型よりL-CPG-IIが、Z型よりL-CPG-IVが合成できた。一方、Z型のエステルとトリメチレンメタン等価体の

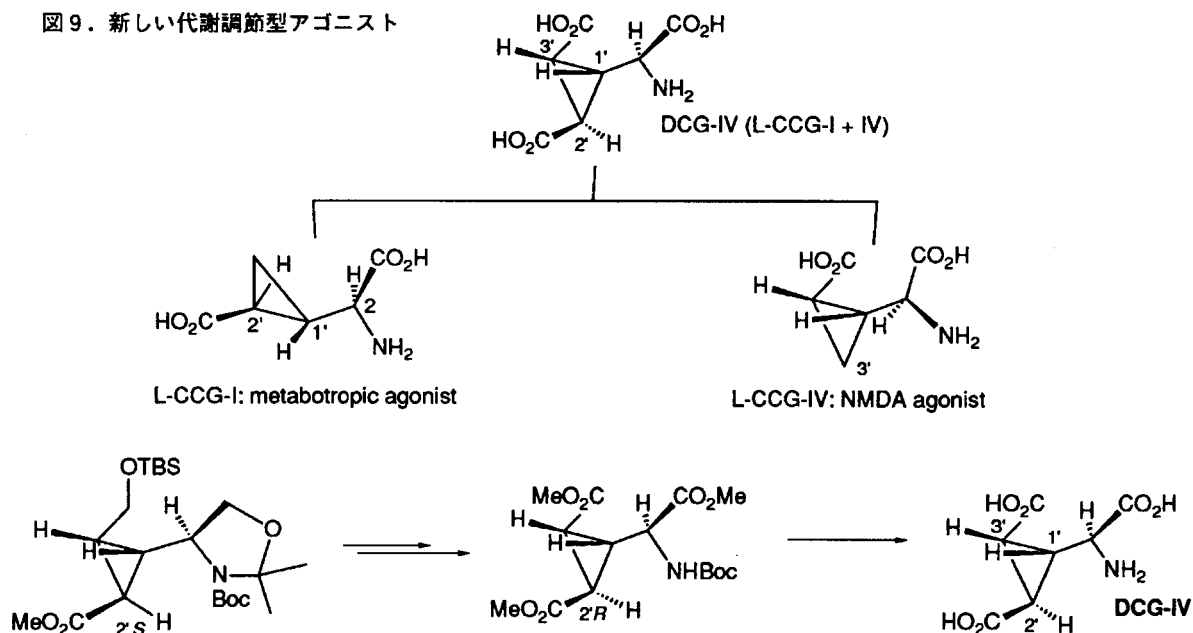
マイケル型付加反応は単一の生成物を与えた。これを環化後、数段階の処理でCPG-Iに導いた。

新生ラット脊髄摘出標本を用いた活性試験の結果、3種のCPG類のうちCPG-IやIIにはほとんど活性が観測されなかったが、CPG-IVはカイニン酸と同等の強さの活性を示すカイニン酸型アゴニストであることがわかった。CPG-IVのエキソメチレン基を水素添加で飽和したジヒドロ体では、カイニン酸と同様にほとんど活性がなくなる。これは先に述べたカイニン酸レセプターが π -電子作動性レセプターであるという仮説をサポートするものである。以上のことから、われわれはカイニン酸レセプターの立体配座要請がNMDA型と同じように図6のgauche-(CC)であり、空間的に適当な位置にある π -電子がレセプターとの結合に引き金として働いているものと推定している(図7)。実際にグルタミン酸の場合には何がこの引き金の役割を果たしているのか興味深いところである。

8. ハイブリッド分子の設計：新しい代謝調節型アゴニスト

L-CCG類の3'位にカルボキシル基を導入するとグルタミン酸のextended型とfolded型を合わせ持つ分子を設計できる。そこで、L-CCG-IVの3'位にtrans型のカルボキシル基を導入したDCG-IVを考えた。この分子はNMDA型のアゴニストであるL-CCG-IVと代謝調節型のアゴニストL-CCG-Iの構造を合わせ持っている(図9)。この物質はどちらのレセプターと結合するだろうか？その選択性に興味を持たれた。そこで、図4の合成中間体を用いてDCG-IVを合成した。

図9. 新しい代謝調節型アゴニスト



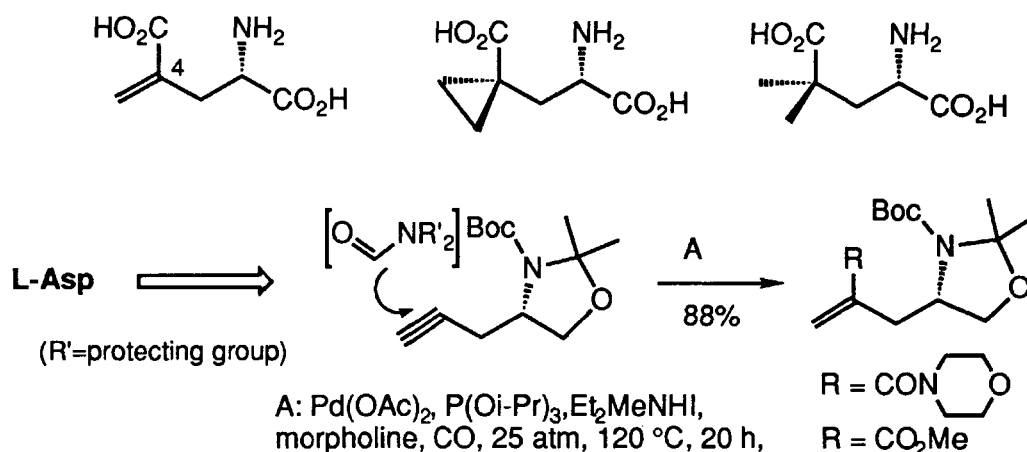
DCG-IVは、新生ラット脊髄摘出標本を用いた電気生理学的試験において、L-CCG-IVよりは弱いものの、グルタミン酸より強い脱分極活性 (10 μ M) を示し、この活性はNMDA型と分類された。一方この物質は低濃度 (100 nM以下) で単シナプス反射を抑制することから、cAMPの生成を抑制するタイプの代謝調節型レセプターに作用することが示唆された。その活性は従来もっとも強いとされたL-CCG-Iの10倍にも及ぶ。以上のことから、DCG-IVはそ

の構造を反映したNMDA型と代謝調節型の両方の活性をもつことがわかった。DCG-IVは低濃度で用いるかぎりNMDA型との結合に由来する脱分極活性を示さず、もっぱら代謝調節型レセプターに結合するアゴニストである。現在、DCG-IVはL-CCG-Iとならび代謝調節型レセプターの機能研究のプロープとして注目されている。^{14, 15)}

9. 4位置換グルタミン酸の合成：非代謝調節型アゴニスト

グルタミン酸の環による配座制御のみならず、側鎖の置換基がコンフォメーションに及ぼす効果も興味ある問題である。従来、いくつかの3、4位置換体が報告されているが、特に4位置換体の系統だった活性との関連はよくわかっていない。そこで、グルタミン酸の4位置換基が活性におよぼす要因を調べることを目的として、4-メチレン体、4-スピロシクロプロピル体、4、4-ジメチル体の合成を行った。これらの化合物はfolded型のコンフォメーションを優位の配座としてとるものと考えられる。アスパラギン酸より出発しプロバギルグリシン誘導体のカルボニル化を鍵段階としてエキソメチレン体とした。これを共通中間体として3種の化合物を図10のように合成できた。¹⁶⁾

図10. 4位置換グルタミン酸の合成



新生ラット脊髄摘出標本を用いた電気生理学的試験の結果、3種ともグルタミン酸と同等の活性を示した。その結果、4-メチレン体はNMDA型のアゴニストと分類された。一方、4-スピロシクロプロピル体と4、4-ジメチル体はNMDA型とカイニン酸型の混合アゴニストであることがわかった。3種の4位置換グルタミン酸に共通していることは、これらが代謝調節型に全く作用しないことである。グルタミン酸がすべてのレセプターと結合できる混合アゴニストであることを考慮すると、4位置換基は代謝調節型との結合を排除する働きがあることは注目に値する。合成品のコンフォメーションは固定されたものではないが、むしろfolded型のコンフォメーションを優位の配座としてとっているものと推定できる。もちろん、代謝調節型レセプターとの結合には4位置換基が立体障害となっている可能性を否定できないが、これらの結果はイオンチャンネル型レセプターにはfolded型のグルタミン酸のコンフォメーションの寄与が大きいとする今までの研究の結果をサポートする一例となるものと考えている。

以上のように、われわれはコンフォメーションを制御したアゴニストを設計することによりグルタミン酸レセプターの立体配座要請をかなり明らかにすることができたと考えている。今後はAMPA型レセプターの活性化要因を探ること、再吸収機構との関連を調べること、今回の結果を基にさらに有用な物質を設計することなどが課題である。

謝辞 本研究は合成ならびに神経活性の検討など、多くの方々との共同研究の成果である。引用文献に記載した共同研究者の方々に深く感謝したい。

References

1. Monaghan, D. T.; Bridges, R. J.; Cotman, C. W. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989, 29, 365.
2. (a) Curtis, D. R.; Phillis, J. W.; Watkins, J. C. *Brit. J. Pharmacol.* 1961, 16, 262. (b) Davies, J.; Evans, R. H.; Francis, A. A.; Jones, D.; Smith, A. S.; Watkins, J. C. *Neurochem Res.* 1982, 7, 1119.
3. (a) Yamanoi, K.; Ohfuné, Y.; Watanabe, K.; Li, P. N.; Takeuchi, H. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 1181. (b) Shimamoto, K.; Ishida, M.; Shinozaki, H.; Ohfuné, Y. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 4167.
4. (a) Shinozaki, H.; Ishida, M.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. *Brain Res.* 1989, 480, 355. (b) Shinozaki, H.; Ishida, M.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. *Br. J. Pharmacol.* 1989, 98, 1213.
5. (a) Nakagawa, Y.; Saitoh, K.; Ishihara, T.; Ishida, M.; Shinozaki, H. *Eur. J. Pharmacol.* 1990, 184, 205. (b) Ishida, M.; Akagi, H.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y.; Shinozaki, H. *Brain Res.* 1990, 537, 311. (c) Hayashi, Y.; Tanabe, Y.; Aramori, I.; Masu, M.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y.; Nakanishi, S. *Br. J. Pharmacol.* 1992, 107, 539.
6. (a) Kudo, Y.; Akita, K.; Ishida, M.; Shinozaki, H. *Brain Res.* 1991, 567, 342. (b) Kawai, M.; Horikawa, Y.; Ishihara, T.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. *Eur. J. Pharmacol.* 1992, 211, 195.
7. We thank Dr. N. Hamanaka, Ono Pharmaceutical Co. Ltd., for X-ray crystallography of CCGs.
8. (a) Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 4049. (b) Ishida, M.; Ohfuné, Y.; Shimada, Y.; Shimamoto, K.; Shinozaki, H. *Brain Res.* 1991, 550, 152.
9. (a) Lehmann, M. S.; Koetzle, T. F.; Hamilton, W. C. *J. Cryst. Mol. Struct.* 1972, 2, 225. (b) Lehmann, M. S.; Nunes, A. C. *Acta Cryst.* 1980, B36, 1621.
10. Hashimoto, K.; Shirahama, H. *J. Syn. Org. Chem. Japan.* 1989, 47, 212.
11. (a) Slevin, J. T.; Collins, J. F.; Coyle, J. T. *Brain Res.* 1983, 265, 169. (b) Conway, G. A.; Park, J. S.; Maggiora, L.; Mertes, M. P. *J. Med. Chem.* 1984, 27, 52.
12. Hashimoto, K.; Shirahama, H. In: *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine*; Lubec, G.; Rosenthal, G. A. Eds.; ESCOM: Leiden, 1990; p572.
13. Raghavan, S.; Ishida, M.; Shinozaki, H.; Nakanishi, K.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* in press.
14. Ohfuné, Y.; Shimamoto, K.; Ishida, M.; Shinozaki, H. *Biorg. Med. Chem. Lett.* 1993, 3, 15.
15. Ishida, M.; Saitoh, T.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y.; Shinozaki, H. *Br. J. Pharmacol.* in press.
16. Ouerfelli, O.; Ishida, M.; Shinozaki, H.; Nakanishi, K.; Ohfuné, Y. *Synlett.* 1993, 409.

Adaptability of nonnatural aromatic amino acids to the active center of the *E. coli* ribosomal A site

Takahiro Hoshaka^a, Ken Sato^a, Masahiko Sisido^{a,*}, Kazuyuki Takai^b, Shigeyuki Yokoyama^b

^aResearch Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

^bDepartment of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Received 9 September 1993; revised version received 7 October 1993

3'-*N*-Aminoacyl analogs of puromycin with nonnatural aromatic amino acids were synthesized and their inhibitory activity in *E. coli* in vitro protein synthesizing system was evaluated. The analogs with L-2-naphthylalanine, L-*p*-biphenylalanine, L-2-anthrylalanine and *trans*-L-*p*-phenylazophenylalanine were found to inhibit the protein synthesis with high efficiency. The inhibition suggests that these nonnatural amino acids are accepted by the active center of the *E. coli* ribosomal A site. A model for the adaptability of nonnatural aromatic amino acids to the active center is proposed.

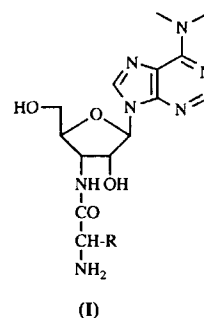
Nonnatural amino acid; Puromycin; Protein biosynthesis; Ribosome; A site

1. INTRODUCTION

Until recently, the amino acid replacements in proteins are limited to 20 natural amino acids in the ordinary protein engineering. Recently, however, several groups reported techniques for the incorporation of nonnatural amino acids into proteins [1–3] by the use of chemically misacylated tRNAs [4,5]. By introducing nonnatural amino acids into biosynthetic proteins, the scope of protein engineering will be extended to include a wide variety of artificial functions. In protein biosynthesis, the selection of amino acids takes place essentially at the aminoacylation of tRNA under the control of aminoacyl tRNA synthetase. Therefore, once a tRNA is misacylated with a noncognate amino acid, the latter amino acid will be directly incorporated into proteins. This was actually shown by Noren et al. [2] and Bain et al. [3]. However, they reported that the incorporation efficiency depends sharply on the type of amino acids. For instance, D-phenylalanine was exclusively rejected in their biosynthesizing system. This must be because other steps such as the peptide bond formation in ribosome, discriminate nonnatural amino acids from natural ones.

In this study, we evaluated the adaptability of nonnatural amino acids carrying a variety of aromatic groups, to the A site of *E. coli* ribosomal peptidyl transferase center. For this purpose, 3'-*N*-aminoacyl analogs of puromycin with nonnatural amino acids (Compound I)

were used. Puromycin is an inhibitor of protein synthesis and known to bind to the ribosomal A site and



block the entry of aminoacyl tRNA. The amino group of bound puromycin forms a peptide bond with the carboxyl group of the peptidyl tRNA on the P site. The resulting peptide with a terminal puromycin moiety leaves the ribosome. The inhibitory activity of puromycin analogs has been examined as a measure for the adaptability of amino acids to the active center of ribosomal A site. The analogs of aromatic amino acids, L-phenylalanine and L-tyrosine were most effective [6–8], and those with *O*-benzyl-L-serine, *S*-benzyl-L-cysteine [7,8], L-homocitrulline [9] and L-lysine [10] were moderately active, whereas the analogs of other amino acids were almost inactive. The optical configuration of the amino acids was also important since the D-phenylalanyl analog was far less active than the L-isomer [6].

We examined the inhibitory activity of puromycin analogs with nonnatural amino acids carrying large aromatic groups (Fig. 1), and predicted whether or not these nonnatural amino acids can be incorporated into proteins.

*Corresponding author. Present address: Department of Bioengineering Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-Naka, Okayama 700, Japan.

2. MATERIALS AND METHODS

Puromycin, puromycin aminonucleoside, L-1-naphthylalanine (2) and L-2-naphthylalanine (3) were purchased from Sigma. L-1-pyrenylalanine (4), L-2-pyrenylalanine (5), L-*p*-biphenylalanine (6), L-2-anthrylalanine (7), L-2-anthraquinonylalanine (8), L-9-carbazolylalanine (9), L-9-ethyl-3-carbazolylalanine (10), L-9-phenanthrylalanine (11) and L-*p*-phenylazophenylalanine (12) were synthesized in our laboratory [11]. L-AzOC_n (13–16) and L-CarC_n (17,18) were gifts from Professor Nishino of Kyushu Institute of Technology.

The puromycin analogs were synthesized as follows: puromycin aminonucleoside (0.01 mmol), *tert*-butoxycarbonyl-protected amino acid (0.01 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.011 mmol) were dissolved in 0.1 ml of anhydrous dimethylformamide. To this solution, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (0.011 mmol) was added at 0°C and the mixture was stirred for 2 h at 0°C and 22 h at room temperature. The mixture was diluted with 2 ml of ethyl acetate and washed twice with 4% NaHCO₃, and twice with saturated NaCl. The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. The resulting solid was recrystallized from ethylacetate and *n*-hexane. For deprotection, the product was dissolved in 0.1 ml of trifluoroacetic acid at 0°C. After 30 min at 0°C, the solvent was flushed off by N₂ gas, then the deprotected product was washed with ether for several times and dried in vacuo. The purity was confirmed by reverse-phase HPLC and ¹H-NMR.

In the inhibition experiment, *E. coli* S-30 extract [12], mRNA encoding bacteriophage T7 gene10, and ¹⁴C-labeled leucine were used. Protein synthesis was carried out at 37°C for 30 min in the presence of various concentrations of puromycin analogs. The amount of the protein synthesized was measured by filter paper disk technique [13]. The inhibitory activity of the analogs of puromycin was expressed relative to a control experiment without inhibitor.

3. RESULTS

The results of the inhibition experiments are summarized in Table I. Puromycin and L-phenylalanyl analogs showed strong inhibitory activity as reported previously [6]. Similarly, the analogs of L-2-naphthylalanine, L-*p*-biphenylalanine, L-2-anthrylalanine, and L-*p*-phenylazophenylalanine were found to inhibit with good efficiency. On the other hand, the analog of L-1-naphthylalanine showed negligible inhibitory activity, in contrast to that of L-2-naphthylalanine. The analogs of L-1-pyrenylalanine, L-2-pyrenylalanine, L-9-phenanthrylalanine, L-2-anthraquinonylalanine, L-9-carbazolylalanine and L-9-ethyl-3-carbazolylalanine were also inactive.

The inhibitory activity was markedly decreased when the *trans*-azobenzene group of the *p*-phenylazophenylalanyl analog was photoisomerized to the *cis*-form, as shown in Fig. 2. Irradiation with UV light at 350 nm resulted in conversion of about 80% of azobenzene group to the *cis*-form under photostationary state. The inhibitory activity of the puromycin analog was low under this condition. The extrapolation to 100% *cis*-form showed that the analog with *cis*-*p*-phenylazophenylalanine was virtually inactive.

The effect of spacer lengths between the C^α atom and aromatic groups was also examined. In Table IB, the results of azobenzene derivatives and carbazole deriva-

Table I

Inhibitory activity of 3'-*N*-aminoacyl analog of puromycin with a variety of aromatic natural and nonnatural amino acids in *E. coli* in vitro protein synthesizing system

Amino acid	Inhibition (%)					
	Concentration (M)					
	3 × 10 ⁻³	1 × 10 ⁻³	3 × 10 ⁻⁴	1 × 10 ⁻⁴	3 × 10 ⁻⁵	1 × 10 ⁻⁵
A.						
<i>O</i> -Methyltyrosine	—*	98.8	99.0	99.0	98.5	80.6
Phenylalanine	97.3	98.9	98.3	94.4	96.2	70.1
1-Naphthylalanine	65.6	29.2	0			
2-Naphthylalanine	99.2	90.0	92.3	93.9	74.6	28.4
1-Pyrenylalanine	—**	29.0	4.5	0		
2-Pyrenylalanine	—**	—**	0			
<i>p</i> -Biphenylalanine	97.8	90.4	71.6	64.5	55.4	56.3
9-Phenanthrylalanine	83.4	62.1	28.6	0		
2-Anthrylalanine	97.8	98.5	98.9	95.5	81.2	73.0
2-Anthraquinonylalanine	58.1	33.0	34.6	0		
9-Carbazolylalanine	25.5	5.7	7.1	0		
9-Ethyl-3-carbazolylalanine	0.8	11.0	4.4	0		
<i>p</i> -Phenylazophenylalanine	96.8	99.0	91.3	67.3	59.4	32.7
B.						
AzOC ₃	—*	99.9	89.6	37.8	14.1	8.1
AzOC ₄	97.8	96.5	79.7	64.5	33.8	0
AzOC ₅	—**	15.3	8.7	0		
AzOC ₆	—**	16.2	13.7	0		
CarC ₃	34.6	11.5	0			
CarC ₅	1.9	0				

*Not tested.

**Insoluble.

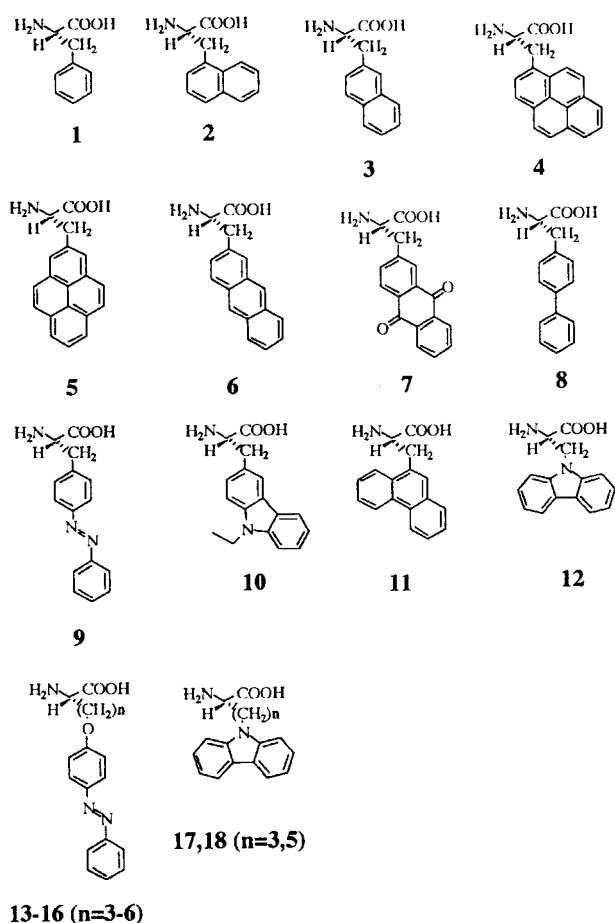


Fig. 1. Structure of aromatic natural and nonnatural amino acids used in this study.

tives are shown. The azobenzene derivatives having short spacers were active but those having long spacers were inactive. The carbazole derivatives were found to be inactive in every case.

4. DISCUSSION

The results in Table I show that the inhibitory activities of the puromycin analogs are widely different. The analogs are clearly divided into two groups depending on the inhibitory activity, those that show high activity at 10^{-5} M and those that show low activity even at 10^{-3} M.

The analogs of high inhibitory activity may bind to the active center and form peptidyl puromycin, as has been demonstrated previously for the phenylalanine analogs, tyrosine, *O*-benzylserine, and *S*-benzylcysteine. The puromycin analogs of those amino acids inhibited the protein synthesis and formed peptidyl puromycin in the ribosome [7,8]. On the other hand, those of low activity may either have low affinity for the active center, or effectively bind to the active center but do not

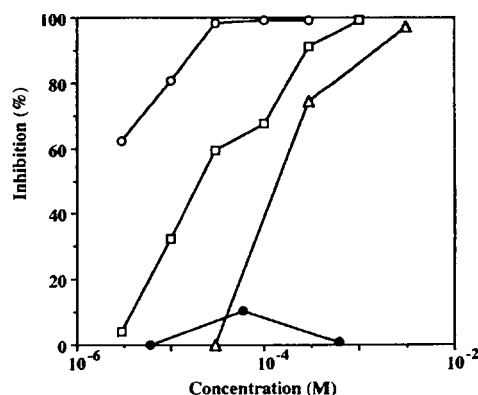


Fig. 2. Inhibitory activity of the puromycin analogs with L-*p*-phenylazophenylalanine: (□), *trans*-form (before irradiation); (Δ), 80% *cis*-form (after irradiation at 350 nm for 5 min); (●), 100% *cis*-form (extrapolated values); (○), puromycin as a reference.

react with peptidyl tRNA. If the latter is the case, however, a constant inhibitory efficiency that is lower than 100% will be observed after all the binding sites were occupied by the addition of an excess amount of the puromycin analog. The results in Table I exclude this possibility, because the inhibitory activity of each analog is not constant over the concentration range of 10^{-4} – 10^{-3} M and is increasing with the concentration. The concentration dependence in Table I shows that the low activities are due to low affinity for the active center. Therefore, it is concluded that L-2-naphthylalanine, L-*p*-biphenylalanine, L-2-anthrylalanine, *trans*-L-*p*-phenylazophenylalanine, AzOC₃ and AzOC₄ adapt to the active center of ribosomal A site, but L-1-naphthylalanine, L-1-pyrenylalanine, L-2-pyrenylalanine, L-2-anthraquinonylalanine, L-9-carbazolylalanine, L-9-ethyl-3-carbazolylalanine, L-9-phenanthrylalanine, *cis*-L-*p*-

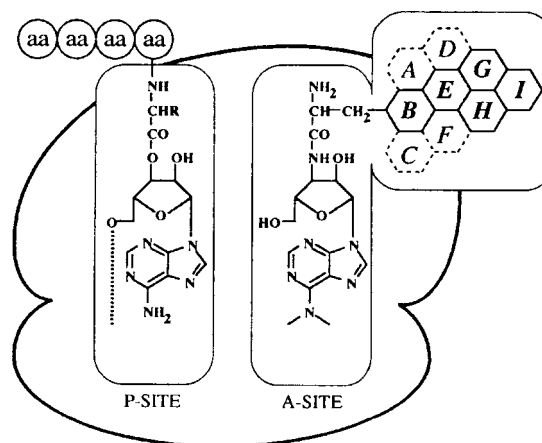


Fig. 3. A model for the adaptability of nonnatural aromatic amino acids to the active center of *E. coli* ribosomal A site. The 3'-*N*-aminoacyl analog of puromycin and peptidyl tRNA exist in ribosomal A site and P site, respectively. Nonnatural amino acids carrying benzene rings in regions B, E, G, H and I can adapt to the active center of A site, whereas those carrying benzene rings in other regions do not adapt.

phenylazophenylalanine, AzOC₅, AzOC₆, CarC₃ and CarC₅ do not adapt.

The next question was why some nonnatural amino acids adapt to the active center but others do not. In previous studies, the analogs with aromatic amino acids containing one benzene ring have been found to adapt to the active center [6–8]. However, the adaptability does not depend only on the size of aromatic group, because 2-naphthylalanine adapts but 1-naphthylalanine does not. Therefore, the active center may discriminate nonnatural amino acids not only by their size but their geometry. From a consideration of the results in Table IA, a simple model for the adaptability of aromatic nonnatural amino acids to the active center can be proposed as shown in Fig. 3. The benzene rings of arylalanine-type amino acids denoted as A, B, C, etc., can be divided into allowed regions (B, E, G, H, I) and disallowed regions (A, C, D, F). The amino acids that adapt to the active center contain benzene rings only in the allowed regions. On the other hand, those that do not adapt contain benzene rings in the disallowed regions.

Based on this model, nonnatural amino acids that adapt to the active center can be predicted. For example, L-2-phenanthrylalanine that occupies regions B, E and H may adapt, whereas L-1-phenanthrylalanine that occupies regions A, B and D will not. This model explains that the analogs with benzyl derivatives of L-serine and L-cysteine are active [7,8], because the benzene rings of these derivatives are located in region E.

The present results predict what type of nonnatural amino acids can be incorporated into proteins when they are attached to tRNA and added to the *in vitro* protein biosynthesizing system [1–3]. In the case of naphthylalanine, for instance, L-2-naphthylalanine may be incorporated into proteins but L-1-naphthylalanine may not. Similarly, L-2-phenanthrylalanine is a proper amino acid for the incorporation of phenanthryl group.

The results in Table IB suggest that spacer length is also an important factor in determining the adaptability. In the case of the azobenzene derivatives, spacers with $n \geq 5$ are clearly unfavorable, suggesting that azobenzene groups very remote from C^α atom do not adapt to the ribosomal A site. In the case of carbazole derivatives, however, no proper spacer length was found for the incorporation of 9-substituted carbazole group.

The incorporation of the photofunctional nonnatural amino acids into proteins is now in progress, and will appear in future reports.

Acknowledgements: The authors wish to thank professor Norikazu Nishino of Kyushu Institute of Technology for the gift of nonnatural amino acids carrying carbazole or azobenzene group (13–18).

REFERENCES

- [1] Baldini, G., Martoglio, B., Schachenmann, A., Zugliani, C. and Brunner, J. (1988) *Biochemistry* 27, 7951–7959.
- [2] Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. and Schultz, P.G. (1989) *Science* 244, 182–188.
- [3] Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R. and Diala, E.S. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8013–8014.
- [4] Heckler, T.G., Zama, Y., Naka, T. and Hecht, S.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4492–4495.
- [5] Heckler, T.G., Chang, L.-H., Zama, Y., Naka, T., Chorghade, M.S. and Hecht, S.M. (1984) *Biochemistry* 23, 1468–1473.
- [6] Nathans, D. and Niedle, A. (1963) *Nature* 197, 1076–1077.
- [7] Symons, R.H., Harris, R.J., Clarke, L.P., Wheldrake, J.F. and Elliott, W.H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 179, 248–250.
- [8] Harris, R.J., Hanlon, J.E. and Symons, R.H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 240, 244–262.
- [9] Guarino, A.J., Ibershof, M.L. and Swain, R. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 72, 62–68.
- [10] Lichtenthaler, F.W., Cuny, E., Morino, T. and Rychlik, I. (1979) *Chem. Ber.* 112, 2588–2601.
- [11] Sisido, M. (1992) *Progr. Poly. Sci.* 17, 699–764.
- [12] Pratt, J.M. (1984) in: *Transcription and Translation* (Hames, B.D. and Higgins, S.D., Eds.) pp. 179–209, IRL Press, Oxford.
- [13] Mans, R.J. and Novelli, G.D. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 48–53.

異常アミノ酸類の合成とペプチドへの取り込み

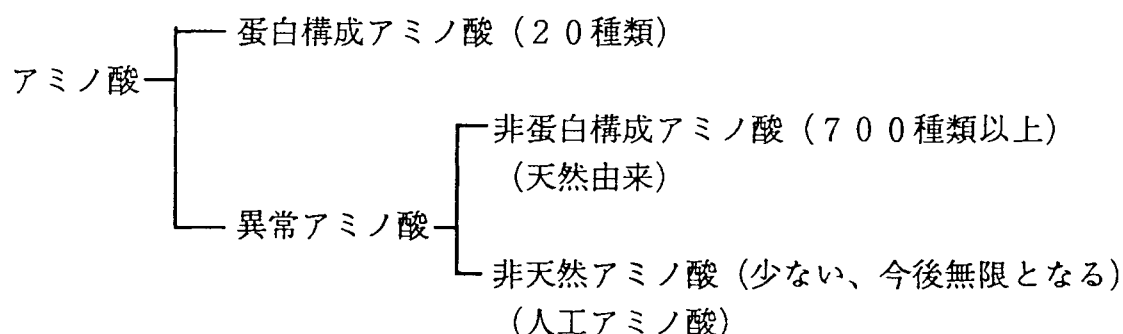
(財) サントリー生物有機科学研究所

大 船 泰 史

1. 異常アミノ酸とは

蛋白を構成する20種類のアミノ酸のほかに、天然から遊離の状態やペプチド類の構成成分として数多くのアミノ酸類が見いだされている。^{1,2)} その種類は700以上にもおよび、これらを総称して、非蛋白構成アミノ酸あるいは異常アミノ酸という。これらのアミノ酸類は天然に存在することが確認されたアミノ酸であり、非天然アミノ酸と称するのは明らかに誤りである。むしろ、天然には存在しない人工的に設計、合成されたアミノ酸類を非天然アミノ酸と呼ぶべきであろう。日本語における混乱もある。正常の反対は異常である。これを英語になおすnormalとabnormalである。アブノーマルというのはどうも性格異常みたいで耳ざわりがよくない。英語では異常アミノ酸類はunusual and/or non-proteinous amino acidでありabnormal amino acidとは呼ばない。unusualの反対語はusualである。最初の日本語訳に適切さを欠いた。

さて、理屈をこねるのはこのくらいにして、蛋白を構成する20種類のアミノ酸以外のアミノ酸類を天然産、人工合成物を問わず総称して異常アミノ酸類と呼ぶことにする。そうすると、アミノ酸類はつぎのように分類できる。



従来、科学者は天然由来のアミノ酸類の生理機能（活性）やその構造に注目して研究を展開してきた。有機合成化学においては古くから炭素源、光学活性原料、光学分割試薬としてアミノ酸類を用いてきた。

一般に、異常アミノ酸類は天然から微量成分として単離されるケースが多く、また、特異な構造や興味ある生理作用をしめすことが知られている。したがって、この四半世紀にわたって有機合成化学は異常アミノ酸類にたいして次のような役割を果たしてきた。

(1) 全合成（構造への貢献も含めて）

- (2) 合成の方法論の開発と展開
- (3) 合成品の供給
- (4) 類縁体の合成による活性相関研究

これらの研究は主に、天然由来の異常アミノ酸類を対象にしたものである。機能研究と関連ずけた人工的な異常アミノ酸の設計、合成は(4)に幾つかの例はみられるものの、われわれのグルタミン酸アゴニストの設計や、³⁾ 穴戸らの光電変換機能を狙ったアミノ酸設計にみられる人工アミノ酸類の合成のアプローチ⁴⁾は先駆的な例であろう。今後、無限のバリエーションが考えられる人工異常アミノ酸類の設計と合成には、精密有機合成化学に立脚した異常アミノ酸の簡単で効率の高い合成方法が基礎として重要であることは自明である。ここでは、天然から得られた異常アミノ酸類についてその分類、合成法、ペプチドへの取り込みについて概説する。

2. 異常アミノ酸の分類

ほとんど全ての異常アミノ酸類はDNAにコードされ生成するのではなく、むしろ蛋白構成アミノ酸類のpost-translational modification によって生成するものと考えられている。異常アミノ酸類の起源と特徴は次の3種類に分類される。¹⁾

(1) 微生物起源

主にペプチドの構成成分として単離、最も種類が多い。

抗生物質

脂肪族化合物、芳香族化合物、ヘテロ環化合物

(2) 植物起源

主に遊離の状態で存在

金属キレート、神経毒

脂肪族化合物、芳香族化合物

(3) 動物起源

少ない

芳香族化合物

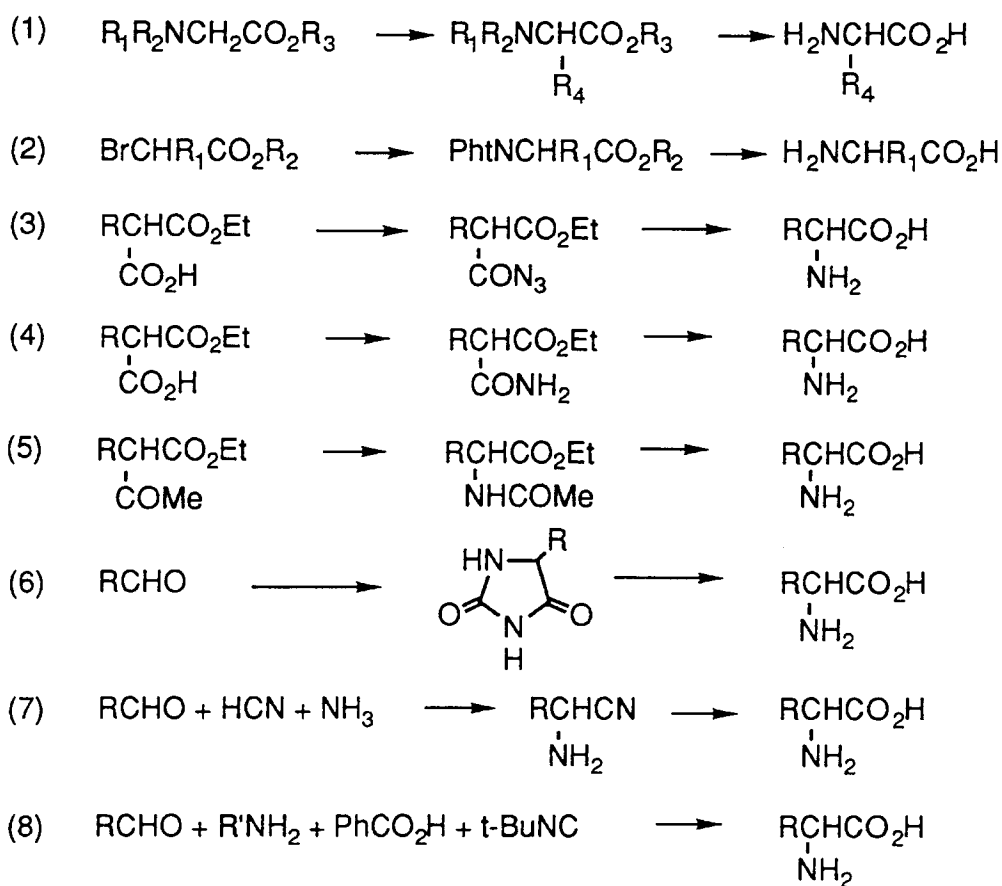
神経活性

3. アミノ酸類の一般的な合成法

アミノ酸類の合成の基本的な考えかたは確立した手法の使用、確立した手法の改良、さらには新手法の開発(確立した手法が摘要できない場合を含む)などがある。標的とするアミノ酸の構造に応じて合成の作戦を練ればよい。但し、光学活性体を合成することが肝要である。アミノ酸合成には数多くの例があり、それらについては成書や総説を参考文献に記した。ここには、従来確立している代表的な手法についてのべる。ほとんどの異常アミノ酸類の合成はこれらの方法の応用である。

古典的合成方法

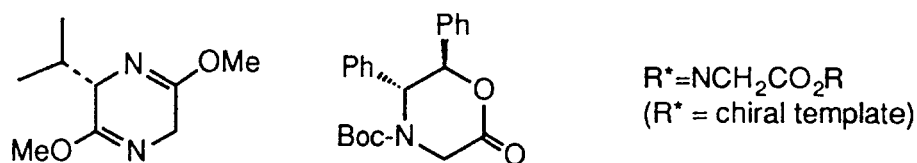
- (1) グリシン誘導体のアルキル化
- (2) Gabriel合成
- (3) Curtius 転位
- (4) Hoffmann転位
- (5) Schmidt転位
- (6) Bucherer-Berg合成 (ヒダントイン法)
- (7) Strecker合成
- (8) Ugi四成分縮合法
- (9) その他



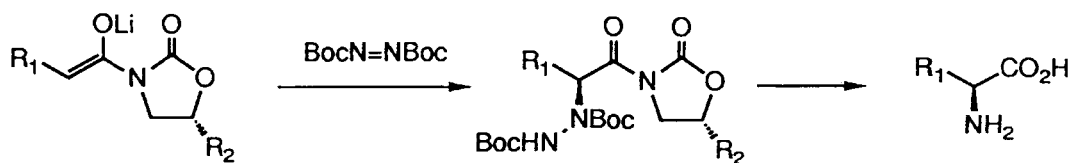
アミノ酸類の不斉合成⁵⁻⁷⁾

光学活性アミノ酸類の合成については不斉合成の舞台で盛んに検討されている。しかしながら、一長一短があり確立した方法は少ない。その概略を紹介する。

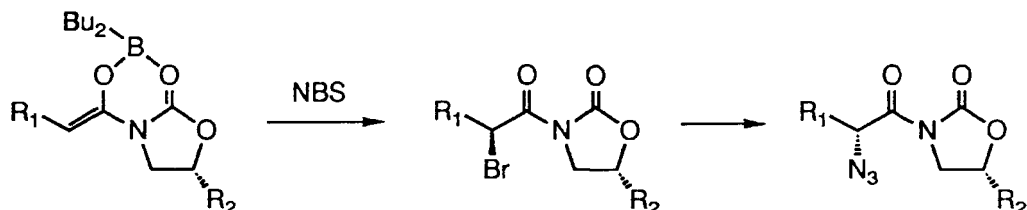
- (1) 不斉グリシン誘導体法



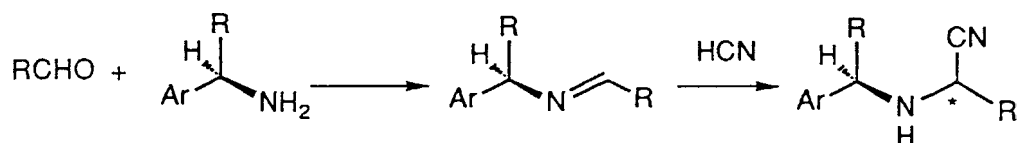
(2) 不斉エノラートの親電子的アミノ化



(3) 不斉エノラートの求核的アミノ化



(4) 不斉ストレッカー合成



(5) デヒドロアミノ酸類の不斉水素化

この方法は不斉テンプレートのついたデヒドロアミノ酸類の水素化と不斉触媒を用いたデヒドロアミノ酸類の水素化に分けられる。後者は触媒的不斉合成研究の最先端であるが、酵素合成と同様に基質に特異的な長所ゆえにいろいろな系に応用できない欠点もある。

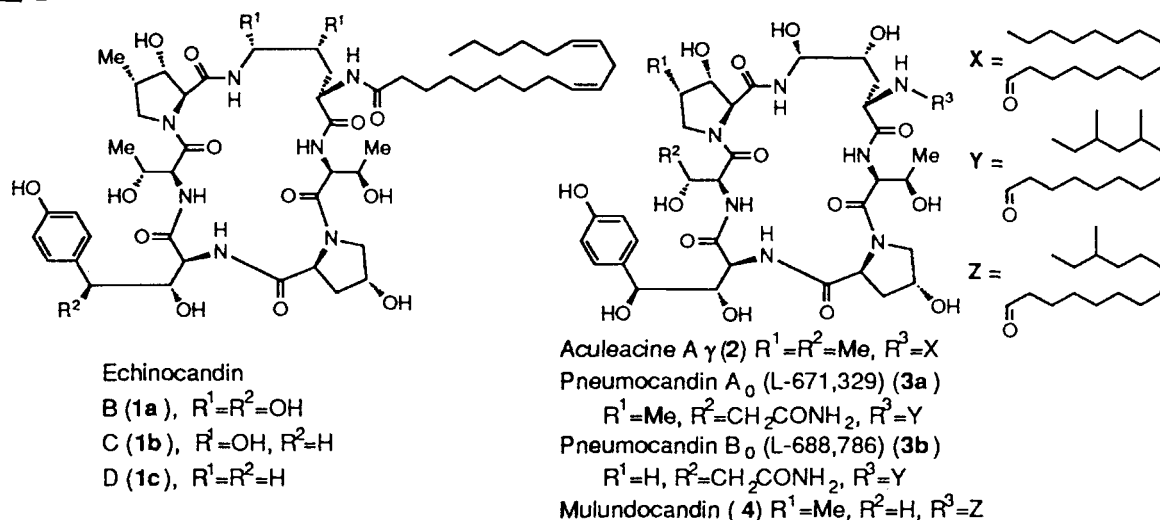
(6) アミノ酸類の酵素合成

ここでは述べなかったが触媒的不斉合成研究もいくつか報告されている。

4. 異常アミノ酸の合成とペプチドへの取り込み

環状ペプチド抗生物質エキノカンジン類の合成を例として

図 1

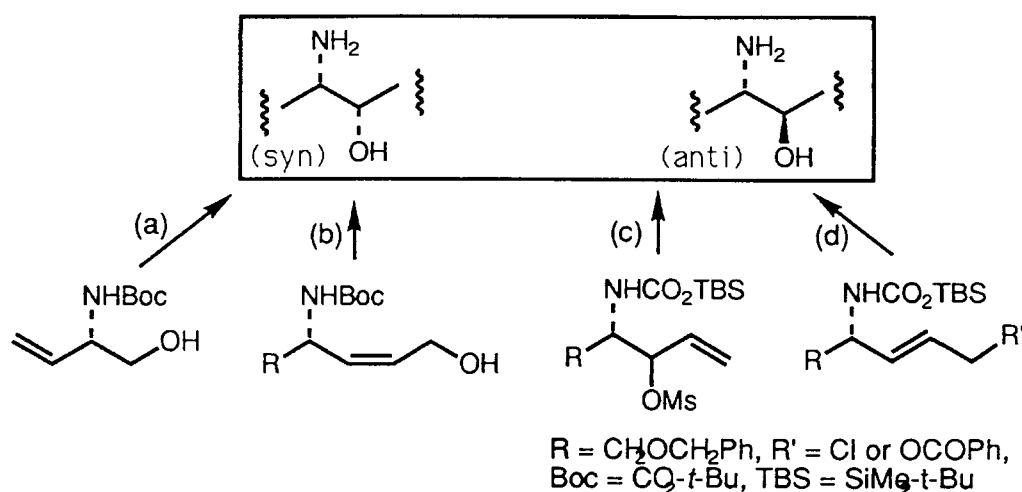


異常アミノ酸類はその構造上の特徴の一つとしてβ位やγ位に水酸基をもつ場合が多い。例えば、有望な抗真菌剤として、現在、医薬開発が活発に行われているエキノカンジン類はこのようなアミノ酸類の集合体のような構造をもっており⁸⁾

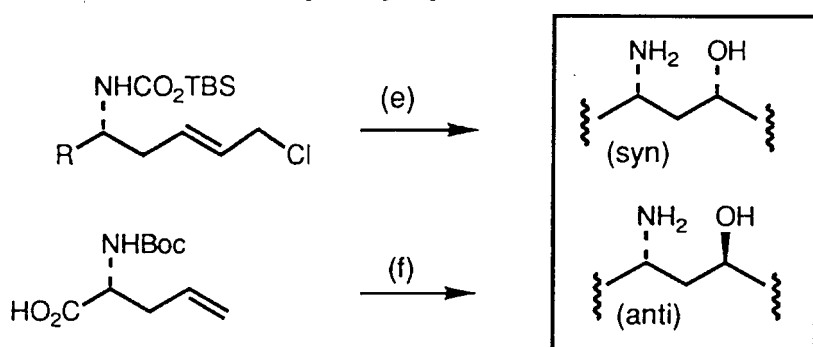
(図1)、構成アミノ酸の合成には上述の手法に加えて新しい合成方法の確立が必要である⁹⁾(概略を図2に示した)。さらに、高度に水酸化したアミノ酸類のペプチド縮合には温和な反応条件が必要であり、異常アミノ酸類のペプチドへの取り込みに関する取り組みについてもエキノカンジン類の合成を通じて紹介したい。¹⁰⁾

図2

Synthesis of 1,2-amino hydroxyl system.



Synthesis of 1,3-amino hydroxyl system.



(a), (b) epoxidation with MCPBA; (c) S_N2 type cyclic carbamate formation;
 (d), (e) $S_{CN'}$ type cyclic carbamate formation; (f) halolactonization.

5. 人工設計アミノ酸類の将来展望

Man/woman-made amino acidは今まで述べてきたように種類にも期待される役割においても無限の広がりがある。合目的性を備えた分子設計がすべてであり、自然に学び、それを展開することが将来をひらく鍵と考えている。例えば次のようなアプローチがある。

- (1) 機能と構造の相関研究
- (2) 新しい活性物質／機能性物質の開発
- (3) α -アミノ酸部位をペプチド結合の「つぎ手」とした新材料への展開

6. 参考文献

- (1) *Amino acids, peptides and proteins*; The Chemical Society: 1968-1992, vol 1-23.
- (2) Hunt, S. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*; Barrett, G. C. Ed.; Chapman and Hall: London, 1985; pp 55.
- (3) Ohfuné, Y.; Shimamoto, K. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1991**, *49*, 302-313.
- (4) 穴戸昌彦「非天然アミノ酸の合成と生化学系への取り込み」ペプチド工学研究会講演要旨
- (5) Coppola, G. M.; Shuster, H. F. *Asymmetric Synthesis, Construction of Chiral Molecules Using Amino Acids*; John Wiley & Sons: New York, 1987.
- (6) Williams, R. M. *Synthesis of Optically Active α -Amino Acids*; Pergamon Press: London, 1989.
- (7) *α -Amino Acid Synthesis*; Tetrahedron Symposium-in-Print; O'Donnell, M. J. Ed.; *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5253.
- (8) (a) Benz, F.; Knüsel, F.; Nuesch, J.; Treichler, H.; Voser, W.; Nyfeler, R.; Keller-Schierlein, W. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 2459. (b) Keller-Juslen, C.; Kuhn, M.; Loosli, H.-R.; Petcher, T. J.; Weber, H. P.; von Wartburg, A. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 4147. (c) For a review, see: Inoue, S.; Sezaki, M. *J. Synth. Org. Chem. Jpn* **1993**, *51*, 73.
- (9) (a) Ohfuné, Y.; Kurokawa, N. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1986**, *44*, 647-659. (b) Ohfuné, Y. *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 360.
- (10) (a) Kurokawa, N.; Ohfuné, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6041. (b) Kurokawa, N.; Ohfuné, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6043. (c) Evans, D. A.; Weber, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7151. (d) Kurokawa, N.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron* in press.

非天然アミノ酸を含むペプチド

(財) 蛋白質研究奨励会

瀬戸保彦

平成6年 3月 22日

調査事項: 非コードペプチドおよびアミノ酸 30 残基以下の天然ペプチドの調査

調査結果には印刷したリスト及びフロッピーが添付されています。

リスト	1. str30n, reps	フロッピー	1. str30n, seq30n
	2. seq30n, repq		2. str30ref, seq30ref

目次 1. 序 2. 非コードペプチド 3. 短鎖ペプチド 4. まとめ 5. 付表

1 序

自然界における“もの”の生成や動きには階層構造が見られる。その最下層の成分は分子といえる。“もの”の構築は分子の組織化で始まる。組織化は分子の選択的な相互作用に基づく。“もの”の動きは分子の熱運動に始まる。このような意味で、蛋白質は自然界の原点の姿を持つ。分子は無機、有機分子に分けることができ、蛋白質は有機分子であるが、無機分子の組織化にも蛋白質が関与している例が多々みられる。海に生きる貝が、波に洗われながら磯の岩に接着している。この接着にも蛋白質が関わっている。土に生きる木々が生存に必要な微量の金属をかき集めるのも蛋白質を利用している。動物の骨が、磷酸カルシウムの塊ではなく、生き物の骨たる由縁はそれを取り巻く様々な分子と情報のやり取りをしつつ、成長する点にある。これも蛋白質が深く関与している。

本年度は遺伝子にコードされていないペプチドおよび、コードされている 30 残基以下のペプチドのデータ調査を昨年度に引き続き行った。更に、データ内容の解析と、これらを統合的に利用するための解説をしている。利用の方法は調査 II に記載した。

2 非コードペプチド:str30n,str30ref

遺伝子である核酸の情報にコードされないで生成するペプチドをここでは非コードペプチドと呼ぶ。自然界におけるペプチド、蛋白質は遺伝子の情報にもとづいてその翻訳により、20 種類のアミノ酸を次々に繋いで合成されている。しかしこのようにして生ずるペプチドとは別に生物によって合成されるペプチドがある。その骨格は前者のペプチドと同様

に、形の上ではアミノ酸の脱水縮合で生じたアミド結合を持っているが、合成の機構はおよそ異なったものである。その一つは複合酵素系で、巨大な分子の上で一つ一つのアミノ酸を活性化したペプチドのカルボキシル基に結合させてゆくものである。

生物の長い進化の過程で非コードペプチドがどのように生じてきたのか興味ある。DNA-RNA-蛋白質の流れで生成する現在のシステムの出来る前の、太古の合成システムのなごりであるというのも一つの考えである。セントラルドグマの確立された後、ペプチド類似体を生成するために生じてきたシステムであるというのも一つの考えである。システム生成の歴史がどうであれ、生物、特に微生物の持っている分子構築のデザインシステムといえる。我々が分子のデザインを行う上で、示唆に富む情報を提供してくれるシステムである。

これらの非コードペプチドは文献データベース (LITDB) から情報を抽出し、整理した。付表に記載されているデータ内容を次に示す。各項目は区切り文字 “:”, “tab” で区切られている。内容は str30n ではペプチド名のアルファベット順、str30ref では文献番号順に並んでいる。

```
str30n   文献番号:ペプチド名:構造:性質
str30ref 文献番号 tab 書誌事項 tab 抄録
```

非コードペプチドの中には蛋白質構成アミノ酸のみを成分とするものがある。付表 str30n で文献番号の後に文字 “p” を記載してあるものがそれらである。非コードペプチド 394 件の中 48 件がそのようなペプチドである。通常アミノ酸を構成成分としているにも関わらず、遺伝情報に基づく合成系ではない系で生合成される事は合成システムとしてまた、進化的にも興味ある。通常アミノ酸からなる非コードペプチドはオリゴペプチドが修飾を受けているものか、環状ペプチドである。例外的に鎖状の比較的長いペプチドがある。lantibiotic がその例である。

```
1414692 :lanthiopeptin:aRQaaXFGPFUFVadGNUX U=Abu d=3-OH Asp
1509414p:lantibiotic:TAGPAIRASVKQCQKTLKATRLFTVSCKGKNGCK
```

ペプチドによっては異常なアミノ酸を含んでいるが、後に遺伝情報に基づいて合成されていることが明らかになる場合もある。異常アミノ酸は翻訳後の修飾で蛋白質構成アミノ酸の構造が変化したものである。例えば lantibiotic の例ではデヒドロアミノ酸や、ランチオニン、ヒドロオキシアミノ酸などを含む。このようなペプチドの場合、対応する前駆体がコードペプチドのリスト seq30n にも記載されている。

非コードペプチドの多くは異常アミノ酸や、D-型アミノ酸を含んでいる。同じ炭素にアミノ基、カルボキシル基を持つ α -アミノ酸ばかりでなく、遠く離れた所に、或は特定の配置を持つような相互の立体的位置にこれらの官能基を持つ場合もある。また、アミノ酸の側鎖も単純な炭化水素のものから、様々な官能基をもつもの、複雑な異節環を含むものなど変化に富んでいる。

今回の調査ではデータをテキスト形式の書式で整理する必要上、図で表示したほうが解りやすいような、文字列で表すと分子の骨格が解りにくい様な構造はそれを記載していない。また、ひとつのデータを一行に示したいため、長い記述が必要な場合は省略し、原報を参照する事とした。幾つかの典型的な例を次に示す。

文献番号:蛋白名:構造:活性

1515251p:labaditin:cyclo(AGVWTVWGTT):immunoact

1916685p:phakellistatin:cyclo(PIPIFPY):inhibit growth

0503208 :ristocetin:glycopeptide:antibiotic

0507218 :echinocandine:cyclo-6-peptide:antibiotic

0606153 :malonichrome:cyclo-6-peptide Ala,Gly,Orn(OH):Fe chelater

1916532 :astin:cyclo-5-peptide Abu,Ser,beta Phe,aThr,Pro(Cl2):antitumor

1922481d:microcystin:D-Ala,Arg,D-Glu,Leu,3-Me D-Asp,Tyr

1907616n:microcolin::immunosuppressive

1. ペプチドの名前、構造、活性の全てが記載されている。

例:labaditin,phakellistatin

2. 構造がどのような性質であるか示唆的に示されている。

例:ristocetin,echinocandine,malonichrome,astin,microcystin

それぞれ糖ペプチド或は環状ペプチドである事が示されている。3例ではその組成アミノ酸の記載があるが、いずれの場合も構造の詳細を知るためには原報をみる必要がある。最後の例では活性は不明である。

3. 活性の記載があるだけで、その構造については何の記載もない。

例:microcolin

新しいペプチドの構造を決めている論文でも、それが既知のペプチドの類似体であるような場合には構造の詳細は引用文献に記載されている事が多い。このような場合に、引用文献にまで遡って見る事をしていないため、文献データベースでは構造の情報が欠落している。従って、文献データベースを利用した本調査では情報の足りないものもある。

今回の調査では非コードペプチドを活性や機能に着目して次のように分類した。データの一覧は付表 reps に記載されている。

1. アルカロイド他
2. アンタゴニスト
3. 抗生物活性
4. 金属結合
5. 生物の応答
6. 免疫活性
7. 酵素阻害
8. 生物成長阻害
9. 化合物生成への影響
10. 膜輸送への効果
11. 毒性
12. 蛋白質の翻訳後修飾に対する効果

分類された各項目のペプチドは付表 reps のキーワードを利用して検索できる。

金属結合の機能に関連したペプチドはキーワード“bind”で検索する。重金属や、カドミウム、鉄に結合する Glu(Cys) 関連ペプチドがある。

生物の応答 5 の項目には心筋への作用、昇血圧作用、学習記憶に対する効果などに関連したペプチドがある。

生物の成長阻害 8 の項目は、成体としての生物、植物、細胞、腫瘍の成長に関連して様々な活性を示すペプチドを含む。

化合物の生成に関与した活性を示すペプチドは項目 9 にあり、グリカン、メラニン或は過酸化生成に効果を示すものがある。

3 アミノ酸 30 残基以下の天然ペプチド:seq30n

このライブラリーは遺伝子の情報に基づいて合成される蛋白質のうち残基数 30 以下のものを配列データベース (SEQDB) から集めたものである。蛋白質の配列は現在、全体的に見るとその 9 割以上は核酸の配列から決められている。遺伝子である核酸の配列に基づいて合成されるからといって、全ての蛋白質の配列が核酸の配列から決められているというわけではない。特に短い蛋白質であるペプチドに関しては、むしろ古典的な蛋白質化学の手法で単離され、そのアミノ酸配列が決められるものが多い。従ってそれらは GenBank, EMBL の核酸配列データベースに登録されていない。

一方、ある生物のペプチドのアミノ酸配列がひとまづ決められると、その情報を利用して遺伝子工学的に容易に関連配列或は別の生物の同様のペプチド配列を決める事が出来る。短いアミノ酸配列をコードしているオリゴヌクレオチドをプローブにしたり、プライマーにして相補的な DNA の配列を決める手法を利用する。この方法で決められた配列は生物が機能を発揮しているときのペプチドの前駆体のものである。従って、30 残基以下といった短い事は殆どなく、通常は 100 残基以上、数 100 或は、1000 残基を越える事もある。この前駆体が生物内で酵素によるプロセシングや修飾を受けて活性を示す姿となる。次に示すホルモンの TRH(残基数 3) や MSH(残基数 13) は典型的な例である。MSH の前駆体はその中に更に機能の単位となる ACTH やリポトロピンを含む。

```
-----trh-----trh-----trh-----trh-----trh----- (255)
-----msh-----acth-----lph----- (260)
```

更に別の例として、核酸の配列から決められた蛋白質の長い配列の中にプロセシングで生ずる短い機能性のペプチドを予想できる場合もある。

```
----- (431); chromogranin
      | |               || | || | ; dibasic site
```

Chromogranin は 431 残基の配列であるが、その中に 8ヶ所の Arg-Lys, Arg-Arg といった塩基アミノ酸の続くところがある。これらの場所で切断して生ずるペプチドは高い確率で生物活性のペプチドになる事が期待できる。これらの事は天然に存在する短いペプチドの情報を得るために実際は長い配列も調査する必要がある事を意味する。

また、似たような機能を持ったペプチドでもそれを単離した生物が異なると配列が同じとは限らない。むしろ多くはその配列が異なる。名前も様々な表現で表されている事があるため同族のものを調査する事が難しい。

angiotensin		oxytocin	CYIQNCPLG
ox	DRVYVHPFHL	vasopressin	--F----R-
rat	-----I-----	mesotocin	-----I-
chicken	-----S-	isotocin	---S---I-
snake	-----Y-	glumitocin	---S---Q-
turtle	-----	valitocin	-----V-
alligator	-----A-	aspartocin	---N-----
bullfrog	-----N-	vasotocin	-----R-
goosefish	N-----	phenypressin	-FF----R-
salmon	N-----N-	conopressin	-F-R---K-
eel	N-----G-	cephalotocin	--FR---I-
dogfish	N-P-I---Q-	annetocin	-FVR---T-

上の表の左欄はアンジオテンシンの例で名前は共通にアンジオテンシンであるが、配列は得られた生物により異なる。一方右欄はオキシトシン関連ペプチドの例である。単離された生物により配列が異なるばかりでなく、生物により各種の名前がつけられている。

似ている配列を調査する事は比較的簡単である。例えば次のように電算機で出来る。

```
A:\agrep -2 "DRVYVHPFHL" seq30n > out
```

配列データのはいっているファイル seq30n から 2 残基の違いを許して配列 “DRVYVHPFHL” を検索する事ができる。調査報告 II の “データの利用” の欄でこのような幾つかの例について説明する。しかし、名前の異なる同種類のペプチドを探す事は専門家の知識に頼る事になり、調査は手間隙のかかる仕事となる。本調査では昨年度に作成したリストに、新たに加わったデータを配列データベースから抽出し、追加した。

今回の調査では短鎖ペプチドをその性質や機能に着目して以下の 9 項目に分類した。

1. ホルモン様
2. 毒素
3. 酵素阻害
4. 機能性
5. その他
6. 未分類
7. 蛋白質
8. 遺伝子翻訳物
9. ペプチド

詳細は付表 repq に記載されている。付表のキーワードを利用して各分類項目のペプチドを検索する事が出来る。短いペプチドの多くはホルモン様 1 のものである。歴史的にはオキシトシンやインシュリンなど、哺乳類のホルモンとして配列が決められてきた。微量成分の検索手法の発展に応じて、実利的な面から生物活性、生理活性のあるペプチドの配列が続々と決められている。

毒素 2、酵素阻害ペプチド 3 も検索系の開発に伴い多くの配列が決められた。

機能性の項目 4 は 1,2,3 に該当しない活性、機能を示すペプチドを含む。ペプチド固有の名前ではなく、活性を示す言葉を利用してその名前としている。“素敵な味を示すペプチド”、“睡眠惹起ペプチド”、“腫瘍の侵略阻害ペプチド”といった具合である。

その他の項目 5 は、ペプチドの存在場所、単離場所などをその名前としているものを含む。“脳ペプチド”、“His 高含量ペプチド” などである。活性、機能は更に調査する必要がある。

未分類の項目 6 は固有の名前を持つペプチドを含み、活性、機能に応じて今後整理する予定である。

蛋白質の項目 7 は短い蛋白質を含む。

遺伝子翻訳の項目 8 は翻訳産物としての蛋白質が推定されているもので、その多くは性質が不明である。

ペプチドの項目 9 も多くは性質が不明であるか、更に調査を必要である。

4 まとめ

天然に存在して、構造の決められた短鎖ペプチドの情報を文献データベース及び配列データベースから収集した。それらは非コードペプチドおよび遺伝子にコードされたペプチドに分けてある (str30n,seq30n)。str30n は 394 件、seq30n は 1379 件である。コードペプチドの特徴は柔らかい構造にあり、アミノ酸を取り替える事によって構造や活性に変化を引き起こす。一方非コードペプチドは固い構造を持つ。この両者の関係は示唆に富、興味ある。非コードペプチドについては構造の表記が困難なものをどうするか今後の問題である。コードされた短鎖ペプチドについては完全な情報を収集する為に、類似配列の検索やキーワード検索の工夫等が必要である。本年度は更に、これらペプチドの活性や性質を調べて、それぞれについて大まかな分類を行った (reps,repq)。

付表 reps 非コードペプチドの分類

1. alkaloid, peptaibol, biosurfactant
2. antagonist; blasticidin, C5a, CaM, endothelin, substance P, synaptic, tachykinin
3. antibacterial, antibiotic, antifungal, antimicrobial, insecticidal, nematocidal, anthelmintic
4. bind; Cd, Fe, heavy metal, Fe chelater, siderophore, ferribactin
5. cardioact, pressor act, impair learning retention
6. immunoact, immunopotentiator, immunosuppressive
7. inhibit; ACE, acyltransferase, alkaline phosphatase, APase, apase M, ATPase, carboxyl protease, enkephalinase, farnesyl transferase, Cys protease, HIV protease, phosphatase, phosphodiesterase, phospholipase, protease, Pro endopeptidase, thiol protease, thrombin, trypsin, tyrosinase
8. inhibit growth; cell growth, plant growth, antineoplastic, antitumor, promote Serratia growth
9. inhibit glycan syn, melanin syn, superoxide prodn
10. inhibit; K channel, ion channel, Ca blocker, ion transporter act, increase membrane permeability
11. toxin; insect toxin, phytotoxic, phytotoxin, mycotoxin, cytostatic, cytotoxic, toxin prodn, hepatotoxic, hepatotoxin, leaf spot disease pathogen, Cd resistance
12. posttranslational modification

付表 repq 短鎖ペプチドの分類

hor, tox, inh, fuc, mic, not, pro, orf, pep

1. hor:hormonal;
adipokinetic hormone, adrenorphin, AKH, allatostatin, allatotropin, alpha bag cell peptide, alpha factor, alytesin, amidorphin, ANF, angiotensin, ANP, antho RFamide, antho RIamide, antho RName, antho RWamide, APGWamide, apidaecin aspartocin, atria peptide, atriopeptin, BNP, bombesin, bombinin, bombolitin, bombyxin, bradykinin, buccalin, bursin, caerulein, calliFMRamide, calliMIRamide CCK-PZ, chromogranin A-derived peptide, color change hormone, conantokin, conopressin, corticotropin like interm lobe peptide, deltorphin, dermenkephalin, dermorphin, diapuase hormone, diuretic hormone, dynorphin, egg assocd peptide, egg laying peptide, eledoisin, endorphin, endothelin, enkephalin, F sex factor, FMRamide, galanin, gastric proventricular peptide, gastrin, gastrin releasing peptide, germ specificity regulating peptide, glucagon, glucagon like peptide, glumitocin, glycentin related peptide, gonadotropin releasing peptide, granulin, head activator peptide, hypertrehalosemic peptide, hypothalamic peptide, hypotrehalosemic hormone, insulin, isotocin, kallidin, kassinin, kinin, kyotorphin, leucokinin, leucosulfakinin, leukopyrokinin, litorin, locustakinin, locustapyrokinin, locustatachykinin, luliberin, mating factor, melanin concentrating hormone, melanostatin,

melanotropin, mesotocin, mosact, motilin, MSH, neo-endorphin, neurokinin, neuromedin, neuropeptide, neurotensin, opioid peptide, ornitho kinin, oxyntomodulin, oxytocin, pancreatic polypeptide, peptide BAM12P, peptide HI, peptide PHI, perisulfakinin, phenypressin, pheromonotropic neuropeptide, phyllocaerulein, phyllokinin, phyllolitorin, phyllomedusin, physalaemin, pigment dispersing hormone, Pol-RFamide, polisteskinin, polyphemusin, proctolin ranakinin, ranatachykinin, ranatensin, red pigment-concentrating hormone, relaxin, resact, rhodotorucine, rimorphin, RPCH neuropeptide, SADPNFLRFamide, SALMFamide, secretin, sex pheromone, somatoliberin, somatostatin, speract, sperm activating peptide, substance P, tachykinin, tachyplesin, thymic factor, thymic humoral factor, thymosin, thyroliberin, thyroliberin-like peptide, tremmerogen, urokinase, urotensin, valitocin, valosin, vasoactive intestinal peptide, vasoactive peptide, vasopressin, vasotocin, vespakinin, vespulakinin, VIP, waspkinin, xenopsin,

2. tox:toxin;
conotoxin, conus toxin, crotoxin, delta-like toxin, enterotoxin, halo toxin, lethal toxin, omega agatoxin, sarafotoxin, toxic peptide, toxin
3. inh:inhibitor;
ACE, alpha1 protease, galactose oxidase, PI, protease, trypsin
4. fuc:functional;
anorexigenic peptide, antiarrhythmic peptide, antigonadotropic peptide, antimicrobial peptide, ATPase accelerating peptide, bioact hydrophobic peptide, bradykinin potentiating peptide, carbohydrate carrying peptide, cardio-excitatory peptide, cardioactive peptide, cardioactive peptide, cardioexcitatory peptide, catch relaxing peptide, chemotactic peptide, cholinergic neurostimulating peptide, conditioned avoidance response peptide contraceptive peptide, corticostatic peptide, corticotropin releasing peptide CRF active peptide, delicious taste peptide, delta sleep inducing peptide, DFT stimulating peptide, diuretic peptide, encephalitogenic peptide, enkephalin releasing peptide, growth blocking peptide, growth modulating peptide, growth/mitosis inhibitory peptide, histamine releasing peptide, inhibitory peptide, light adapting hormone, locustamyoinhibiting peptide, locustamyotropin, Lom-AG-myotropin, lymphocyte stimulating peptide, macrophage chemotactic factor, mast cell degranulating peptide, mitosis inhibiting peptide, morphogenetic peptide, mytilus inhibitory peptide, paragonial peptide paralytic peptide, pedal peptide, proliferation inhibiting peptide, redox active peptide, sleeper peptide, somatotropin releasing 10-peptide, sperm activating peptide, steroidogenesis activator, thymocyte growth peptide, trpEG attenuator peptide, trypsinogen activation peptide, tumor invasion inhibiting factor, uremic peptide
5. mic:miscellaneous;
adrenal medullary peptide, brain peptide, chromaffin granule peptide, ganglion peptide, gastric peptide, glutathione, internal peptide, intestinal peptide, learning induced brain peptide, locusta peptide, myelin peptide, neutrophil granule peptide, pancreatic islet peptide, posterior pituitary peptide, salivary His rich peptide, salivary peptide, seminal peptide, spermatozoal antigen, spinal cord 3-peptide, synaptosomal peptide
6. not:
achatin, acrosin, ameletin, anantin, apamine, bactenecin, califin, carassin, cationic Cys-rich peptide, cephalotocin, cerebellin, cinnamycin, cionin, clupeine, corazonin, crabrolin, cycloleonurinin, defensin, duramycin, ferritin, fulicin, gallidermin, gelsolin,

guanylin, histatin, hydrin, hylambatin, indolicidin, kinetensin, marinostatin, mastoparan, melittin, metallothionein, metorphamide, microcin, myomodulin, myotropin, nephritogenoside, periplanetin, pneumadin, Pro rich peptide, protaminerigin, Pyr-Glu-Pro-NH₂, scyliorhinin, secapin, sillucin, stellin, sturine, systemin, tertiapin, tryptophyllin, tuftsin, uperolein, vitellogenin,

7. pro:protein;

agglutinin, albumin prepiece, albuminamide, alpha2HS glycoprotein B, amylase alpha, antifreeze glycoprotein, antioncogene protein pt27, ATPase 9, F0 ATPase beta, capsid protein, casomorphin beta, collagen signal peptide, complement C3f, creatine kinase B, dopa decarboxylase, early leader protein, fibrinogen alpha, fibrinopeptide, fibroin peptide, fibronectin Cys region, flavoprotein, G protein, genome linked protein VPg, gliadin, globin, hemolysin, histone H1, histone H3, Ig, immunostimulating casein 6-peptide, maltodextrin phosphorylase, MHC, myeloma protein, pepsinogen major glycopeptide, phosphoglycerate kinase, phosphoribosyl transferase, phycobiliprotein, phycocyanin, placental lactogen, polysialo glycoprotein, protein C, pyruvate carboxylase biotin peptide, reaction center protein, regulatory protein araE, replication initiation protein, ribosomal protein, RNA polymerase, terminal protein, tropomyosin, Zn finger protein

8. orf: gene;

leader peptide ermG, shl leader peptide, trp operon leader peptide, trpGDC operon leader peptide

9. pep: peptide;

peptide 2, peptide A, peptide A12d, peptide A17c, peptide aPY, peptide B, peptide B12, peptide HR, peptide I, peptide II, peptide OA24b, peptide POL236, peptide PYF, peptide SCP,

Molecular Conformation of Porcine Amelogenin in Solution: Three Folding Units at the N-Terminal, Central, and C-Terminal Regions¹

Yuji Goto,* Eiichi Kogure,** Toshio Takagi,** Saburo Aimoto,** and Takaaki Aoba***,2

*Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 530; **Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka 565; and ***Forsyth Dental Center, 140 Fenway, Boston, MA 02115, U.S.A.

Received for publication, June 29, 1992

Circular dichroism (CD) studies were conducted to gain a better insight into the conformation of amelogenins, which were isolated from developing enamel of piglets. The intact porcine amelogenin and its degraded products were purified chromatographically. The 25-residue peptide corresponding to the segment at the C-terminus was synthesized. CD spectra of these samples were measured at pH 5.0–5.3 in the temperature range between 4 and 90°C. The most remarkable finding was that the CD spectrum of the intact amelogenin was accounted for by the sum of the spectra of the three fragments at the N-terminal, central, and C-terminal regions, supporting the hypothesis that the structure of the whole protein consists of discrete folding units. Furthermore, low-angle laser light scattering analysis provided evidence that the 20 kDa amelogenin, the most abundant extracellular matrix protein in forming enamel tissue, exists in a monomeric form at pH 5.3 and 25°C. It was tentatively concluded that the N-terminal region contains β -sheet structures, while the spectral characteristics of the C-terminal region are similar to those of a random coil conformation. The conformation of the central region was characterized by a strong negative ellipticity at 203 nm, although its nature remains to be defined.

Tooth enamel is the hardest tissue in mammals and is composed of the largest calcium apatite crystals in the body. It is believed that enamel matrix proteins, secreted by the ameloblasts, play a regulatory role in the process of enamel crystal formation, but the mechanism has not yet been defined. In developing enamel, the secreted matrix proteins have been classified into two groups, amelogenins and enamelines (1). The amelogenins are major matrix constituents, corresponding to 90% or more of the total proteins secreted during developmental stages. The primary structure of the intact (*i.e.*, secreted) amelogenin has already been determined in human, porcine, murine, and bovine (see below). The intact amelogenin is degraded shortly after secretion, decreasing in quantity dramatically with developmental advancement, finally leaving the hardest tissue, composed almost exclusively (95 wt%) of inorganic crystals.

Concerning the functional roles of the amelogenins in enamel mineralization, it has been postulated that the amelogenins, which are hydrophobic in nature, may contribute passively to the growth of enamel crystals by filling the intercrystallite space and providing a space for further growth upon their removal (2). However, recent work (3) showed that intact amelogenin is adsorbed selectively onto

apatite crystals and that adsorbed amelogenin inhibited the crystal growth of hydroxyapatite in media, as found *in vivo*. More importantly, the high adsorption affinity and inhibitory activity of the intact amelogenin were weakened by enzymatic cleavage of the hydrophilic segment at the C-terminus and almost completely lost with the subsequent cleavage at the N-terminus (4). These observations support the contention that the expression and modulation of functions of the amelogenins are intimately related to their molecular structures. However, there is a paucity of information about the molecular structures of the amelogenins in solution and in the solid state.

In the present study, circular dichroism (CD) and low-angle laser light scattering (LALLS) were utilized to gain a better insight into the molecular conformation of porcine amelogenin in solution. The intact porcine amelogenin consists of 173 amino acid residues (5) and has an apparent molecular mass of 25 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It was demonstrated that, following the cleavages of segments, the 25 kDa porcine amelogenin gives rise to products having molecular masses of 20, 13, and 5 kDa (6). As mentioned above, the degradation of porcine amelogenin occurring in a programmed manner appears to modulate the functions of amelogenin prior to massive loss from the formed enamel. An intriguing hypothesis is that the intact amelogenin may consist of independent folding domains having unique properties and that the cleavage sites may correspond to sites linking the independent folding domains. To test this hypothesis, we analyzed CD spectra of intact amelogenin and its fragments. The results were consistent with the presence of three independent folding units at the N-terminal, central,

¹ This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (YG, TT, and SA) and USPHS Research Grant DE07623 from the National Institute of Dental Research (TA).

² To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: CD, circular dichroism; LALLS, low-angle laser light scattering; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate.

and C-terminal regions.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Porcine Enamel Samples—Enamel matrix proteins were isolated from the secretory enamel of permanent teeth of a 6-month-old freshly slaughtered piglet. Tooth germs were dissected out of the mandible. After removal of the covering soft tissues, the exposed enamel surface was wiped gently with a paper tissue dipped in cold saline containing protease and phosphatase inhibitors. The secretory enamel was dissected with fine spatulas and then dissolved in 0.5 M acetic acid containing protease and phosphatase inhibitors. All procedures for extraction of proteins from the dissected enamel samples were conducted at 0°C; details of the procedures were reported previously (3). The proteins extracted in the acid solution were desalted through a YM-5 ultrafiltration membrane (M_r cut-off 5,000, Amicon) and then freeze-dried. The obtained proteins were stored at -30°C until used for analyses.

Figure 1 shows the primary sequences of human (7), porcine (5), murine (8), and bovine (9) amelogenins. As indicated by asterisks in the figure, the amelogenin sequences are highly conserved among the mammalian species, particularly at the N- and C-termini. The primary structures in the central region of the proteins are species-dependent but are commonly characterized by the presence of repeated sequences of -Pro-X-Pro- or -Pro-X-X-Pro-. Table I shows the amino acid sequences of intact porcine amelogenin and its degraded products. Enzymatic cleavages of porcine amelogenins occur at the sites between Trp45 and Leu46, and Ser148 and Met149 (6), yielding the protein of 20 kDa (by SDS-PAGE) lacking the last 25 amino

acid residues at the C-terminus, the 13 kDa fragment corresponding to the central region, and the N-terminal 5 kDa fragment. Following the degradation of the intact 25 kDa amelogenin shortly after its secretion, the 20 kDa polypeptide exists as a major matrix constituent in secretory porcine enamel. Those porcine amelogenins of 25, 20, 13, and 5 kDa were purified by chromatography as described in the following section.

Chromatography—Gel filtration chromatography of the matrix protein extracted from the secretory enamel was conducted at 4°C on a Sephadex G-100 (Pharmacia-LKB) equilibrated with 50 mM carbonate buffer (pH 10.8). Each protein fraction was eluted with the same alkaline buffer, and concentrated using the YM-5 membrane. Further purification of each of the 25, 20, and 13 kDa amelogenins was carried out by seven cycles of chromatography under the same conditions. Following the final chromatography, the fractionated sample was titrated with 0.5 M acetic acid to a pH of around 4, desalted by ultrafiltration with the YM-5 membrane and then freeze-dried. The 5 kDa amelogenin corresponding to the N-terminal 45-residue fragment was most sparingly soluble and tended to associate with other minor fragments having similar molecular masses. Thus, following the Sephadex G-100 chromatography, the fraction corresponding to 5 kDa fragment was further separated on a DEAE-cellulose column using 10 mM Tris buffer (pH 8.3) in the presence of 6 M urea. The proteins were eluted with a 0.05 to 0.15 M NaCl gradient in the buffer. Finally, the 5 kDa polypeptide fraction was purified on an SP-Sephadex C-25 column with a pH gradient from 3.6 to 6.5; the buffer used was 1 M citrate in the presence of 6 M urea. Details of the experimental procedures and typical chromatograms obtained for porcine amelogenins were reported previously (10). The purity of the separated sample was determined by amino acid analysis, electrophoresis (15% polyacrylamide gels containing SDS for the 25, 20, and 13 kDa proteins and 5% gel in the presence of 6 M urea for the 5 kDa fragment), and partial sequencing at the N- and C-termini.

Since the fragment corresponding to the C-terminal 25 amino acid residues has not been identified *in vivo* (the reason is unknown), the corresponding 25-residue peptide (C25) was synthesized by a standard solid-phase method. The crude product was purified by reversed-phase HPLC. The purity of the final product was determined by amino acid analysis and Fab mass spectrometry (JEOL, Tokyo).

Circular Dichroism Measurements—CD spectra of the purified protein and peptide samples were recorded using a JASCO spectropolarimeter (model J-500A) equipped with a thermostatically controlled cell holder. Prior to measurements, a weighed amount of the sample was dissolved in deionized water to yield concentrations of 0.1–0.3 mg protein (or peptide)/ml. Since some acetate (used in the solvent for protein/fragment purification) still remained in

	1	10	20	30	40	50
Human	MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWKYS-IRPPYPSYGYEPMGGWLHHQI					
Porcine	MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWKYQNMIRHPYTSYGYEPMGGWLHHQI					
Murine	MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWKYQSMIRHPYPSYGYEPMGGWLHHQI					
Bovine	MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWKYQSMIRHPYPSYGYEPMGGWLHHQI					

	60	70	80	90	100	
Human	IPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVPAAQPVIPQQPMMPVPGHSMPTPIQHH					
Porcine	IPVVSQQTQSHALQPHHHIPVMPAAQPGIPQQPMPLPGHSMPTPTQHH					
Murine	IPVLSQQHPFSHTLQPHHHLPVVPAAQPVAPQQPMMPVPGHSMPTPTQHH					
Bovine	IPVVSQQTQSHALQPHHHIPVMPAAQPVVPQQPMMPVPGHSMPTPTQHH					
	***	***	***	***	***	***
	110	120	130	140	150	
Human	QPNLPPPAQQPY----	QPQPVQFPQHQPMPQPP-----				
Porcine	QPNLPLPAQQPF----	QPQPVQFPQHQPMPQPP-----				
Murine	QPNLPPPAQQPF----	QPQPVQFPQHQPMPQPP-----				
Bovine	QPNLPLPAQQPF----	QPQSIQFPQHQPMPQPP-----				
	***	***	***	***	***	***
	160	170	180	190	200	
Human	-----VHPMQPLPPQPLPPMFPMQPLPPLPDLTLEAWPSTDKTKREEVVSIF					
Porcine	-----PMHPIQLPLPQPLPPMFPMQSL---LPDLPLEAWPATDKTKREEVD					
Murine	-----LHPMQPLAPQPLPPLFSMQPLSPILPELPLEAWPATDKTKREEVD					
Bovine	QPQPPVHPIQLPLPQPLPPIFPMPQPLPPLPDLPLEAWPATDKTKREEVD					
	***	***	***	***	***	***

Fig. 1. Amino acid sequence of human, porcine, murine, and bovine amelogenins. (*) indicates homology in these four sequences. The sequences of human, porcine, murine, and bovine amelogenins are taken from Shimokawa *et al.* (7), Yamakoshi *et al.* (5), Snead *et al.* (8), and Shimokawa *et al.* (9), respectively.

TABLE I. Structure of porcine amelogenin and its fragments.

Species	Structure	
25-kDa	1	173
5-kDa	1	45
20-kDa	1	148
13-kDa	46	148
C25		149
		173

the freeze-dried samples, the resulting experimental solutions were about 5 mM with respect to acetate (the concentrations were determined by Dionex ion chromatography). It was demonstrated (6) that the amelogenin proteins are sparingly soluble at neutral pH and room temperature but become soluble on cooling or by decreasing the pH below 6. Thus, the present CD measurements were always conducted at pH 5.0 to 5.3. Weighed samples of 25, 20, and 13 kDa amelogenins and synthetic peptide were solubilized without any visible clouding in the solution, whereas the solution of the 5 kDa fragment was slightly turbid. In order to examine thermal transitions of the molecular structures of the amelogenins, CD spectra were recorded at various temperatures. In addition, the change in ellipticity at 230 nm with increase in temperature was followed at a rate of 1°C/min. Temperature was monitored with a Sartorius Model BAT-12 thermometer. The reversibility of the thermal transition was checked by measuring the ellipticity after lowering the temperature to 20°C.

All CD spectra were recorded with a 1 mm cell in the far UV range of 250 to 190 nm. The instrument was calibrated with ammonium *d*-10-camphorsulfonate. At the end of each experiment, the actual concentration of the sample used was determined by amino acid analysis. The CD data obtained were expressed as mean residue ellipticity $[\theta]$, which is defined as $[\theta] = 100 \times \theta_{\text{obsd}} / (lc)$, where θ_{obsd} is the observed ellipticity in degrees, c and l are the concentration in residue moles per liter and the length of the light path in centimeters, respectively.

Low-Angle Laser Light Scattering Analysis—The system used was reported previously (11, 12). According to this technique, the molecular weight (M_r) of a protein can be determined by the equation,

$$M_r = K \frac{(\text{output})_{\text{LS}}(\text{output})_{\text{RI}}^{-1}}{(dn/dc)} \quad (1)$$

where K is a constant determined by the instrumental and experimental conditions, dn/dc is the specific refractive index increment, and $(\text{output})_{\text{LS}}(\text{output})_{\text{RI}}^{-1}$ is the ratio of the outputs of the detectors of the scattering photometer and differential refractometer. The value of dn/dc can be assumed to be virtually constant for proteins of which the

amino acid composition is not markedly biased. The amelogenin fragments and the proteins used as molecular weight standards were judged to be such proteins. The value of $K \cdot (dn/dc)^{-1}$, unique to the experimental set-up, was determined from the slope of a plot between the values of $(\text{output})_{\text{LS}}(\text{output})_{\text{RI}}^{-1}$ obtained for standard proteins and their molecular weights. The standard proteins used were: bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000), α -chymotrypsinogen (25,000), and RNase A (13,700).

In practice, an aliquot (100 μ l) of the sample solution, adjusted to a concentration of 1 to 5 mg/ml, was injected into a column of either TSK-GEL G3000-XL (Tosoh) packed with modified silica gel particles or Superdex 75 packed with dextran particles (Pharmacia-LKB). The column was equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer at pH 5.3. The protein was eluted with the same buffer containing various concentrations of NaCl (50, 200, and 500 mM), at a flow rate of 0.2 ml/min at 25°C. The elution profile was monitored with a LALLS photometer (model LS-8000, Tosoh), which was connected serially with a precision differential refractometer (model RI-8000).

RESULTS AND DISCUSSION

Circular Dichroism Spectra of Porcine Amelogenins—

Figure 2A shows CD spectra of porcine amelogenins and synthetic peptide at pH 5.3 and 20°C. The CD spectrum of the intact 25 kDa amelogenin had a minimum at 203 nm with an ellipticity of $-22,500$, suggesting the presence of some conformational structures. Similar characteristic features, showing the minimum ellipticity at 203 nm, were also recognized in CD spectra of the 20 and 13 kDa amelogenins. As compared to the value of minimum ellipticity obtained for the 25 kDa intact protein, the 20 kDa amelogenin showed a slightly smaller value ($-20,000$) but, interestingly, the 13 kDa fragment showed a significantly greater value ($-30,000$). Those spectra of the porcine amelogenins were similar in shape to that of bovine amelogenin reported by Renugopalakrishnan *et al.* (13), who proposed that the CD spectrum of bovine amelogenin in acidic solutions resembled the CD spectra of "unorder-

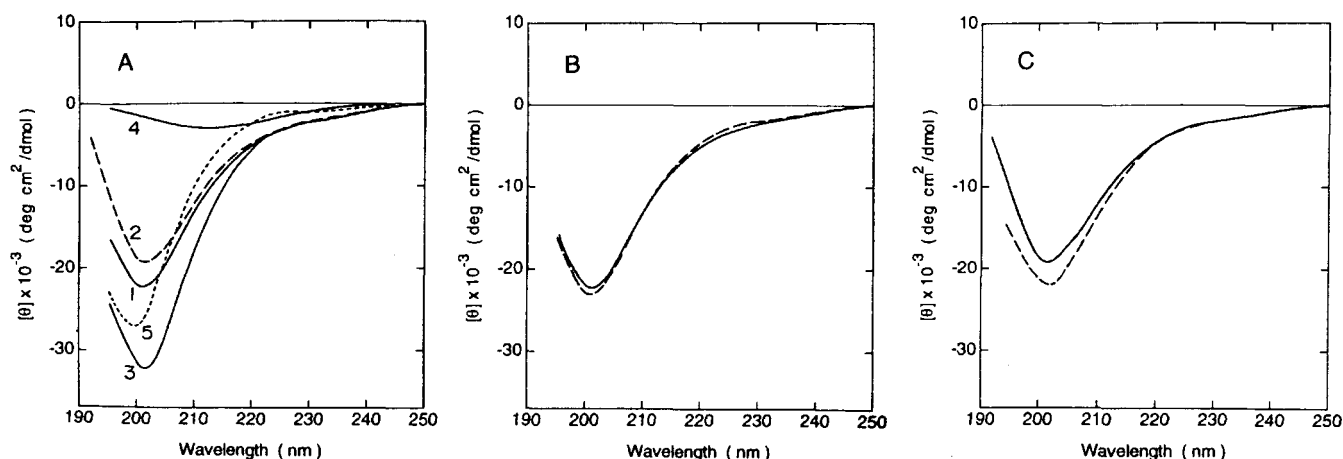


Fig. 2. Far-UV CD spectra of the porcine amelogenins in 5 mM acetate buffer at pH 5.3 and 20°C. Panel A: the 25 kDa (1), 20 kDa (2), 13 kDa (3), and 5 kDa (4) amelogenins and the C-terminal synthetic peptide (5). Panel B: Measured (solid line) and calculated (broken line) spectra of the 25 kDa amelogenin. Panel C: Measured (solid line) and calculated (broken line) spectra of the 20 kDa amelogenin.

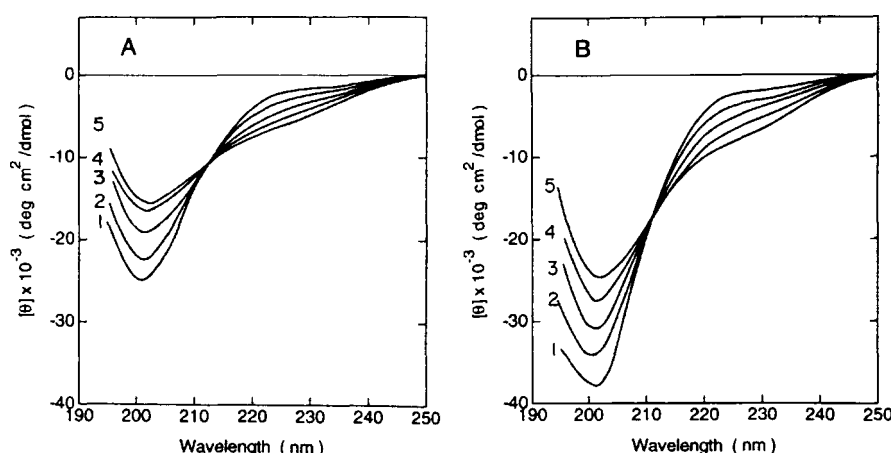


Fig. 3. Far-UV CD spectra of the 25 kDa (A) and 13 kDa (B) amelogenins in 5 mM acetate buffer at pH 5.3 at various temperatures. Temperatures were 6 (1), 20 (2), 40 (3), 60 (4), and 79 (5) °C.

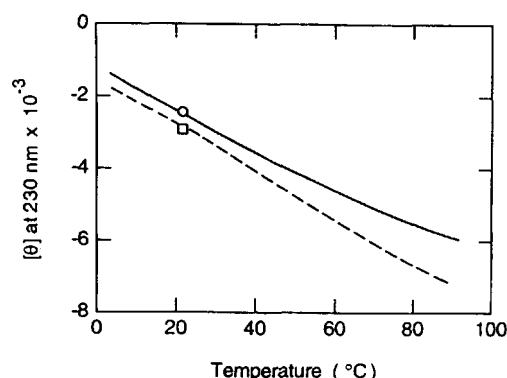


Fig. 4. Dependence on temperature of the ellipticity at 230 nm of the 25 kDa (solid line) and 13 kDa (broken line) amelogenins in 5 mM acetate buffer at pH 5.3. The circle and square show the signal obtained after heating the 25 kDa and 13 kDa amelogenins, respectively, to 90 °C.

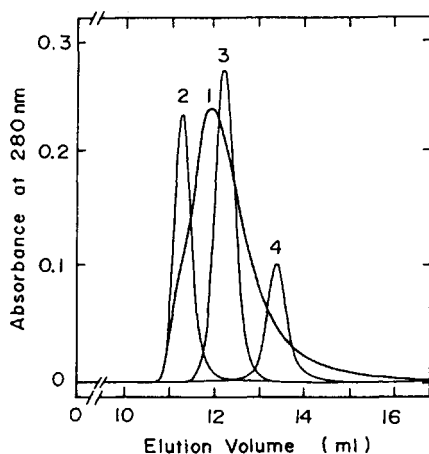


Fig. 5. Elution pattern from Superdex 75 of the 20 kDa amelogenin (1), carbonic anhydrase (2), α -chymotrypsinogen (3), and RNase A (4) monitored by measuring the absorbance at 280 nm.

ed" structures.

The CD spectrum of either the 45-amino acid residue fragment at the N-terminus or the synthetic peptide corresponding to the last 25 amino acid residues at the

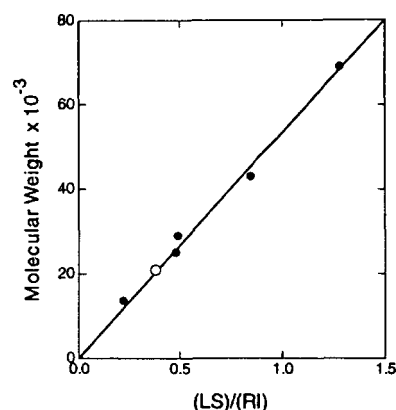


Fig. 6. Determination of the molecular mass of the 20 kDa amelogenin (square) by the low-angle laser light scattering method. The calibration line was obtained by a plot of $(\text{output})_{\text{LS}}/(\text{output})_{\text{RI}}$ against the molecular weights of standard proteins (circles). Standard proteins were bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000), α -chymotrypsinogen (25,000), and RNase A (13,700). The values of $(\text{output})_{\text{LS}}/(\text{output})_{\text{RI}}$ were obtained on the basis of the peak area.

C-terminus, was distinct from those of the porcine amelogenins of 25, 20, and 13 kDa. The spectrum of the N-terminal fragment showed a weak minimum ($[\theta] = -3,000$) at around 215 nm, typical of a β -sheet conformation. This finding is in good agreement with the observations by Fourier-transform infrared and Raman spectroscopy (14), suggesting that bovine amelogenin has a low α -helical content, and high β -turn and β -sheet composition. On the other hand, the CD spectrum of the 25-residue peptide corresponding to the segment at the C-terminus showed a sharp minimum at 200 nm ($[\theta] = -35,000$). The overall spectral features of the peptide fragment resembled those of a fully unfolded protein observed at pH 2 in the absence of salt (15). Thus it is likely that the C-terminal fragment itself has a random coil conformation in solution.

Next, we examined whether the CD spectra of the 25 and 20 kDa porcine amelogenins could be predicted from those of the degraded products. Assuming that the CD spectra originating from the fragments contribute additively to the CD spectrum of the whole molecule, the ellipticities of

the 20 and 25 kDa proteins, $[\theta^*]_{20\text{kDa}}$ and $[\theta^*]_{25\text{kDa}}$ respectively, are calculated on the basis of the experimental $[\theta]$ values of the 5 and 13 kDa fragments and the synthetic peptide C25 according to the following equations:

$$[\theta^*]_{20\text{kDa}} = \frac{45}{148}[\theta]_{5\text{kDa}} + \frac{103}{148}[\theta]_{13\text{kDa}} \quad (2)$$

$$[\theta^*]_{25\text{kDa}} = \frac{45}{173}[\theta]_{5\text{kDa}} + \frac{103}{173}[\theta]_{13\text{kDa}} + \frac{25}{173}[\theta]_{\text{C25}} \quad (3)$$

Figure 2B shows the results of $[\theta^*]$ calculation with respect to the 25 kDa intact amelogenins. Interestingly enough, the calculated spectrum (shown by the dotted line) was very close to the experimental spectrum (shown by a solid line). The excellent agreement lends support to our hypothesis that the intact amelogenin consists of three independent folding units at the N-terminal, central, and C-terminal regions. It should be pointed out that the putative folding units appear to work in a cooperative manner to realize the postulated function of the protein in enamel mineralization. Indeed, previous studies (4) demonstrated that the whole molecular structure, involving both the N- and C-termini, was required to maximize the adsorption of porcine amelogenin onto apatite crystals.

In the case of the 20 kDa porcine amelogenin shown in Fig. 2C, there was a small discrepancy between the experimental and calculated spectra. A plausible explanation for the obtained discrepancy is that, following the cleavage of the hydrophilic fragment at the C-terminus, the folding structures of the N-terminal and central regions (now the latter is the C-terminal region of the 20 kDa degraded product) might be modulated slightly. Some evidence for this was obtained in previous $^1\text{H-NMR}$ studies using photo-CIDNP (chemically induced dynamic nuclear polarization), showing that accessibility of flavin probes to the His residues (11 out of the 14 residues are localized in the central region, see Fig. 1) differed significantly between the 25 and 20 kDa proteins (16).

Thermal Transitions—Figure 3A shows typical CD spectra of the intact amelogenin measured at various temperatures. With increasing temperature from 4 to 90°C, the negative band at 203 nm decreased in magnitude and, concomitantly, the ellipticity at 220 nm increased. The increase in $[\theta]$ at 220 nm suggests an increase in the α -helix content. As can be seen in the figure, careful examination of the spectra measured at different temperatures disclosed the presence of an isodichroic point at 214 nm, supporting a two-state transition between the low- and high-temperature forms. As shown in Fig. 2B, similar results including the isodichroic point at 214 nm were obtained using the 13 kDa fragment. The finding that both the 25 and 13 kDa amelogenin samples displayed similar thermal transitions, further demonstrates that the central region of the whole amelogenin molecule constitutes a relatively isolated domain having little interaction with the folding units at the N- and C-termini. Considering the high content of proline residues or the presence of Pro-x-Pro or Pro-x-x-Pro sequences in the central region of porcine amelogenin (see Fig. 1), it is interesting to note that the overall characteristics of the thermal transitions of the amelogenin protein resemble those of collagen and related proteins (17, 18).

Figure 4 shows changes of the ellipticity $[\theta]$ determined

at 230 nm as a function of temperature. A plot of the experimental data for the 25 kDa intact protein yielded a continuously descending line, indicating that the thermal transition taking place in the structure of the 25 kDa intact amelogenin was a gradual process without a cooperative transition. Again, the data points obtained for the 13 kDa fragment yielded a line almost parallel to that of the 25 kDa protein. It is also notable that the thermal transition of the amelogenins was fully reversible, as supported by the reproducible value of $[\theta]$ (indicated by the circle and square), which was re-measured at 20°C after heating the sample to 90°C.

Putative Oligomeric State of Porcine Amelogenin—Since porcine (as well as other mammalian) amelogenins tend to form intermolecular association in solution (6), we attempted to determine monomeric or oligomeric state of porcine amelogenin in solution by LALLS coupled with high-performance gel chromatography. A specific point to be tested was whether CD spectral features of porcine amelogenins common with those of collagens originate from the presence of collagen-like triple helical structure in the former.

In pilot experiments, it was found that neither the 25 nor 20 kDa protein was eluted from the TSK-G3000SW-XL column (silica gel) with 20 mM acetate buffer (pH 5.3) containing various concentrations of NaCl from 0.05 to 0.5 M. When the dextran-base Superdex 75 column was used, the 25 kDa protein was still adsorbed strongly to the column but the 20 kDa protein was eluted with the same acetate buffer. The remarkable difference in adsorption property between the 25 and 20 kDa amelogenins is consistent with the finding (3) that the 25 kDa amelogenin is adsorbed selectively onto apatite crystals, whereas its degraded product of 20 kDa, lacking the C-terminal segment, has lost the adsorption affinity for apatite surfaces.

Figure 5 shows typical elution patterns of the 20 kDa amelogenin and the standard proteins monitored by measuring the absorption at 280 nm, obtained at pH 5.3 in the presence of 0.2 M NaCl. The 20 kDa amelogenin comprises 148 amino acid residues and its theoretical molecular mass, calculated on the basis of its amino acid composition, is 17,065 Da; it was also determined (19) that the 20 kDa porcine amelogenin is not glycosylated. The elution profile of the 20 kDa amelogenin was broader than those of the standard proteins. We also found that elution profiles of the 20 kDa amelogenin became much broader in the presence of NaCl at 50 and 500 mM. A comparison of the chromatograms showed that this amelogenin was eluted slightly earlier than chymotrypsinogen (25 kDa). This observation does not imply that the real molecular mass of the 20 kDa amelogenin is larger than that of chymotrypsinogen because it is known (20) that amelogenins do not behave in solution like a globular protein.

Figure 6 shows plots of $(\text{output})_{\text{LS}}/(\text{output})_{\text{RI}}$ versus molecular weight, M_r , according to Eq. 1. The values of $(\text{output})_{\text{LS}}/(\text{output})_{\text{RI}}$ were obtained on the basis of the peak area. The data points obtained with the standard proteins yielded a line having the slope value of 53,300, which corresponds to $K \cdot (dn/dc)^{-1}$. Based on this calibration line, it was estimated that the molecular mass of the 148-residue amelogenin was 20.9 kDa. Since the peak profile of this porcine amelogenin was broadened, the values of $(\text{output})_{\text{LS}}/(\text{output})_{\text{RI}}$ were also obtained from

multiple points around the peak on the basis of the signal intensities. By using the calibration line of Fig. 6, the molecular mass was estimated to be 19.8 ± 2.1 kDa. The good agreement between the weight-average molecular mass determined for the 20 kDa amelogenin and the molecular mass of its monomeric unit indicates that the amelogenin exists as a monomer and not as an oligomer. The agreement between the above weight-average value and the molecular weights obtained one by one around the peak maximum also supports the above conclusion.

In conclusion, the present CD studies support the hypothesis that the intact porcine amelogenin consists of three independent folding units, *i.e.*, the N-terminal, central, and C-terminal regions. Possible secondary structures existing in the central region of the intact porcine amelogenin or in the 13 kDa fragment remain to be determined. It is most likely that the hydrophilic segment at the C-terminus has a random coil structure. An important observation, relevant to the functional significance of amelogenin, is that the corresponding region affects markedly the adsorption properties of the whole protein. On the other hand, the assumed β -sheet conformation in the N-terminal region may mediate the intermolecular association of the cleaved fragments or the amelogenin proteins as commonly found at neutral pH. Further investigation using LALLS is needed to elucidate the aggregation process of the amelogenins in physiological media.

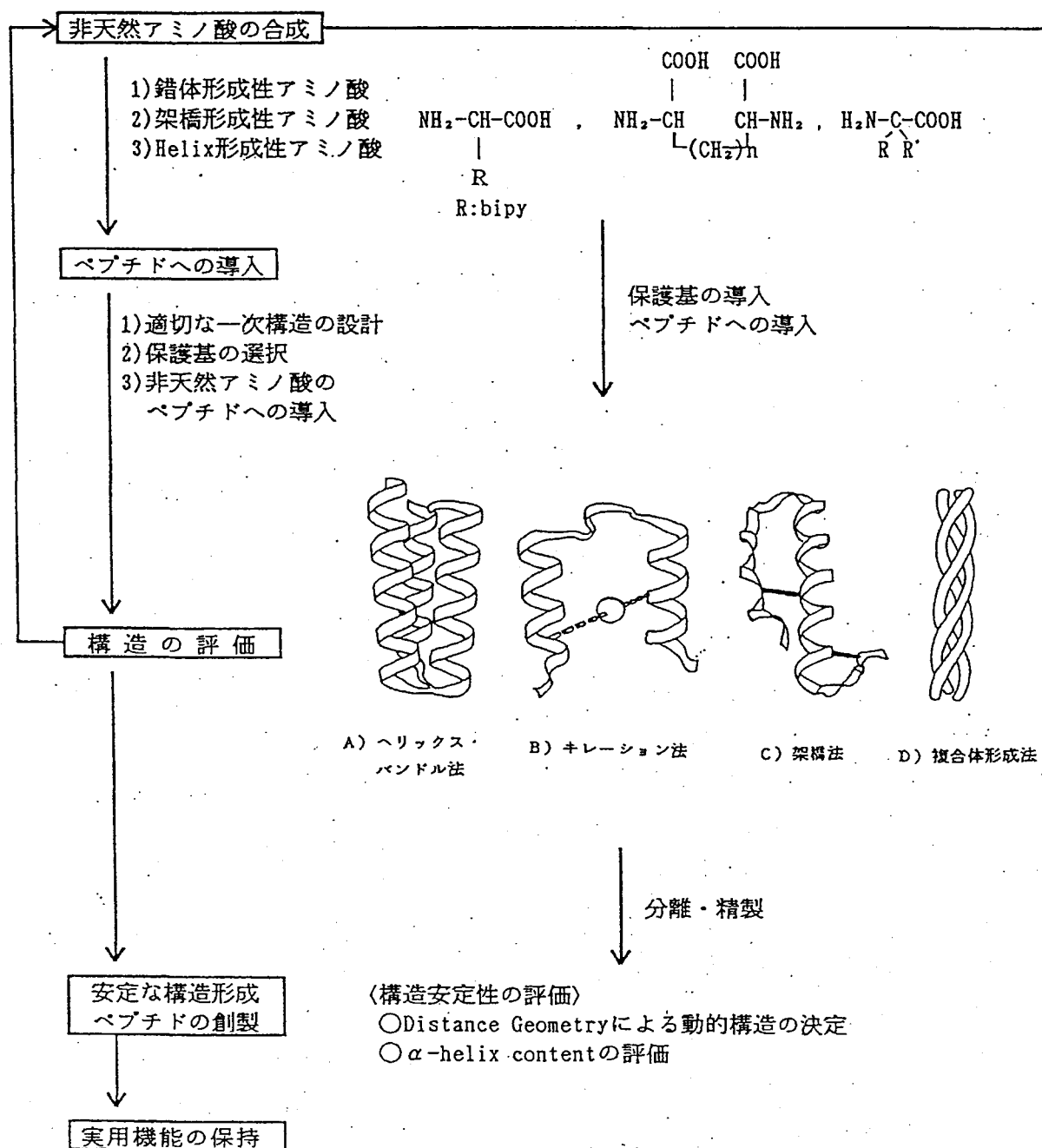
REFERENCES

1. Termine, J.D., Belcourt, A.B., Christner, P.J., Conn, K.M., & Nylen, M.V. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 9760-9768
2. Warshawsky, H. (1984) in *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues* (Butler, W.T., ed.) pp. 33-45, Ebsco Media, Birmingham, AL
3. Aoba, T., Fukae, M., Tanabe, T., Shimizu, M., & Moreno, E.C. (1987) *Calcif. Tissue Int.* **41**, 281-289
4. Aoba, T., Moreno, E.C., Kresak, M., & Tanabe, T. (1989) *J. Dent. Res.* **68**, 1331-1336
5. Yamakoshi, Y., Tanabe, T., Fukae, M., & Shimizu, M. (1989) in *Tooth Enamel V* (Fearnhead, R.W., ed.) pp. 314-318, Florence Publ., Yokohama
6. Shimizu, M. & Fukae, M. (1983) in *Mechanisms of Tooth Enamel Formation* (Suga, S., ed.) pp. 125-141, Quintessence Publ., Tokyo
7. Shimokawa, H., Tamura, M., Ibaraki, K., & Sasaki, S. (1989) in *Tooth Enamel V* (Fearnhead, R.W., ed.) pp. 301-305, Florence Publ., Yokohama
8. Snead, M.L., Lau, E.C., Zeichner-David, M., Fincham, A.G., Woo, S.L.C., & Slavkin, H.C. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 812-818
9. Shimokawa, H., Sobel, M.E., Sasaki, S., Termine, J.D., & Young, M.F. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4042-4047
10. Tanabe, T., Aoba, T., Moreno, E.C., Fukae, M., & Shimizu, M. (1990) *Calcif. Tissue Int.* **46**, 205-215
11. Maezawa, S. & Takagi, T. (1983) *J. Chromatogr.* **280**, 124-130
12. Takagi, T. (1990) *J. Chromatogr.* **506**, 409-416
13. Renugopalakrishnan, V., Strawich, E.S., Horowitz, P.M., & Glimcher, M.J. (1986) *Biochemistry* **25**, 4879-4887
14. Zheng, S., Tu, A.T., Renugopalakrishnan, V., Strawich, E.S., & Glimcher, M.J. (1987) *Biopolymers* **26**, 1809-1813
15. Goto, Y., Calciano, L.J., & Fink, A.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 573-577
16. Aoba, T., Kawano, K., & Moreno, E.C. (1990) *J. Biol. Buccale* **18**, 189-194
17. Brodsky-Doyle, B., Leonard, K.R., & Reid, K.M.B. (1976) *Biochem. J.* **159**, 279-286
18. Hayashi, T., Curran-Patel, S., & Prockop, D.J. (1979) *Biochemistry* **18**, 4182-4187
19. Akita, H., Fukae, M., Shimoda, S., & Aoba, T. (1992) *Arch. Oral Biol.* **37**, 953-962
20. Strawich, E.S., Poon, P.H., Renugopalakrishnan, V., & Glimcher, M.J. (1985) *FEBS Lett.* **184**, 188-192

ペプチドの構造形成技術

大阪工業技術試験所
吉川 暹

1. 構造形成の意義
 - 1) 立体構造保持 2) 官能基の空間配置制御 3) 複数構造間のスイッチ
2. 構造形成手法
 - 1) α -ヘリックス形成性アミノ酸の導入
 - a) γ -アミノ酸の導入 b) α, β -不飽和結合の導入 c) α, α -2置換アミノ酸の導入
 - 2) プロリン isologの導入
 - 3) 立体的に束縛されたジペプチドユニットの利用
 - 4) 金属キレート結合の利用
 - 5) ヘリックスバンドルの利用
 - 6) 分子複合体形成
3. 天然ペプチドの構造



6-2 コンフォメーションに強く影響するアミノ酸の導入

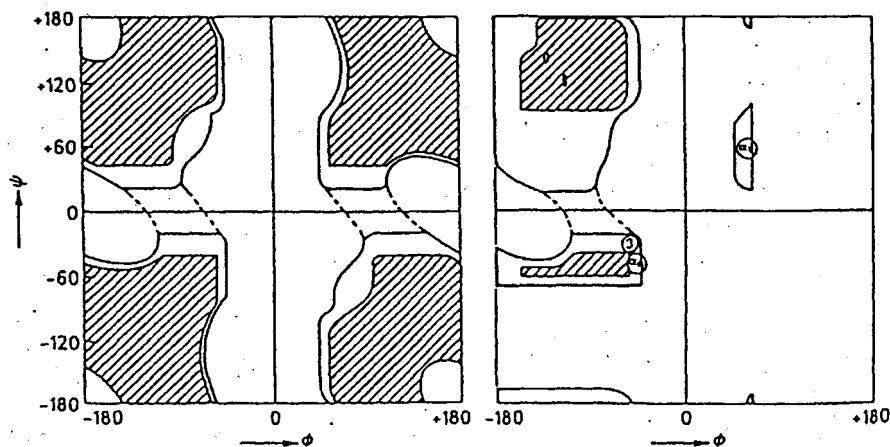


Fig. 19.3. Ramachandran plots illustrating the sterically allowed regions for Φ , ψ for glycine (left) and for the other 19 amino acids (right). The fully allowed regions are indicated by shading, the partially allowed regions by thick lines; the connecting region enclosed by the dashed lines is permissible with slight bond angle distortion. Secondary-structure conformations are α_R , α -helix; 3_1 , 3_{10} helix; α_L , left-handed α -helix; $\diamond$ antiparallel and $\circ$ parallel β -sheet [586]

図1 Ramachandran map^{2,3)}

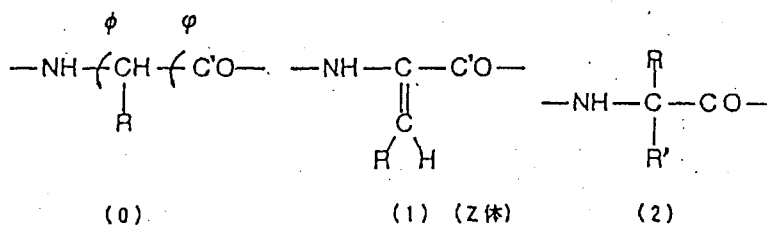
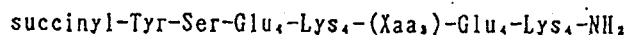


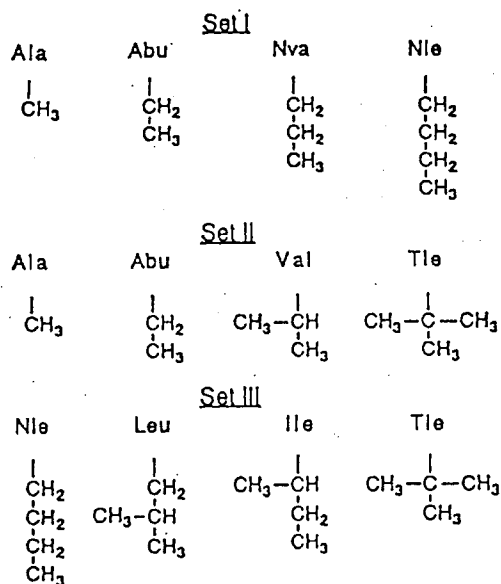
図2 α, β -不飽和体 (Z体) (1) と α, α -2置換体 (2) の構造

6-2-1 アルキルアナログ基の導入

各アミノ酸が α ヘリックス形成にどの程度寄与するかを調べるために下記の一次構造を持つペプ



チドのXaa部分に各種脂肪族アミノ酸を導入し、そのヘリックス形成の程度が調べられている。その結果、Ala>Leu>Ile>Valの順に不安定となる事が解った⁴⁾。さらに、非天然のアミノ酸の導入による効果が表2のSet I, II, IIIの3種類のグループのアミノ酸の導入によりCD測定より調べられた。表2よりNle, Nva, Abuはいずれもヘリックスを安定化するのに対しC β が3級のTleではGly以上に α ヘリックスを不安定化する事が解る。計算によれば残基の疎水性が大きいほど安定化に寄与するはずであるが、実験的にはアルキル基の長さは大きな影響を及ぼさず、 β 位の枝分かれが主たる因子であることがわかっている⁴⁾。



Peptide	$-\langle\theta\rangle_{222}$	$f, \%$	$\Delta\Delta G, \text{kcal/mol}$
Ala ₃	$27,300 \pm 800$	85 ± 3	-0.74 ± 0.07
Abu ₃	$27,000 \pm 900$	84 ± 4	-0.70 ± 0.08
Nva ₃	$27,520 \pm 800$	86 ± 3	-0.76 ± 0.07
Nle ₃	$27,370 \pm 600$	85 ± 2	-0.74 ± 0.06
Leu ₃	$24,100 \pm 700$	75 ± 3	-0.55 ± 0.04
Ile ₃	$17,800 \pm 500$	56 ± 2	-0.32 ± 0.02
Val ₃	$16,000 \pm 450$	50 ± 2	-0.27 ± 0.02
Tle ₃	$4,800 \pm 300$	15 ± 4	0.22 ± 0.04

$-\langle\theta\rangle_{222}$, Mean residue ellipticity (degree-cm²/dmol) of peptides at 222 nm. $f = [\theta]_{\text{obs}} - [\theta]_0 / [\theta]_{\text{max}} - [\theta]_0$ = the fraction of helix. $[\theta]_{\text{obs}}$, $[\theta]$ observed from a previous column; $[\theta]_0 = 0 \pm 500$ degree-cm²/dmol, obtained by titrating a series of peptides with the denaturing solvent guanidine hydrochloride (23); $[\theta]_{\text{max}} = (n - 4/n)[\theta]_{\infty}$ = the maximal mean residue ellipticity value for chain length where n = the number of residues and $[\theta]_{\infty} = -40,000$ degree-cm²/dmol (24). $\Delta\Delta G$ = free energy for helix formation of each guest amino acid related to glycine. $\Delta\Delta G_x = \Delta G_x - \Delta G_{\text{Gly}}$, where $\Delta G_{\text{Gly}} = 0.31$ kcal/mol (12).

表2 アルキルアナログを導入したペプチドの
ヘリックス含量と自由エネルギー変化⁴⁾

6-2-2 α 、 β -不飽和結合の導入

α 、 β -不飽和アミノ酸(1)はZ体と呼ばれ、天然のペプチド中にも見いだされている。これまで α 、 β -不飽和アミノ酸は微生物由来の抗生物質の中に数多く見いだされている。また、histidine ammonia lyase などのタンパク質にも認められている。これらは先駆タンパク質の酵素的変化により生じることが知られている⁷⁾。このアミノ酸が含まれるとC α に結合する2つの結合の回転を阻害することからコンフォメーション形成に寄与する事が知られている。

天然由来のZ体には Δ Phe、 Δ Leu、 Δ Ala、 Δ Proの4つが知られており、通常C β の置換基はアミノ基に対して cis 位を取る。19種類のZ体の結晶解析によりこれが一般に平面構造を取り、タイプ2の β ターン構造が(i+1)または(i+2)位置のコーナーにくるときに形成され易い事を示している⁸⁾。 Δ Phe含有オリゴペプチドでは、 β ターンのNH(i)とCO(i+3)との間に水素結合を取る傾向が強いことがわかっている。もしもZ体が続くと右巻きと左巻きの順次の α ヘリックス構造を規制する事となる。 β ターンはi番目のCOとi+3番目のNHの間での水素結合形成により安定化する。これらのN-C α は1.421Åと飽和結合の1.45Åに比べかなり短くなっている。C-C結合の1.504Åも飽和の1.53Åより短くなっている。逆にカルボニル基は長くなり、骨格のN-C-Cへの二重結合の広がりを見せている。またN-C-Cは120°より小さく、置換基の立体効果によるものと考えられている。複数の Δ Pheを含む比較的長いペプチドではヘリックス構造を取り易いことが報告されている⁹⁾。また、 Δ Leuは β ターン構造を取り易く Δ Alaは、 γ -ターン構造を取り易いことが知られている。

6-2-3 α 、 α -2置換アミノ酸基の導入

D- α -アミノ酸の(ϕ , ψ)許容領域はL- α -アミノ酸の反転対称領域となることから、 α 、 α -2置換アミノ酸では、D、L共通部分のみが許容となり、通常 α -ヘリックス構造が優位となることが知られている¹¹⁾。この領域はまた、タイプⅢの β -ターン構造領域とも一致するため、i及びi+3のアミノ酸の種類によっては、この構造が安定化される例も知られている¹²⁾。

天然に存在する α 、 α -2置換アミノ酸としては α -アミノイソ酪酸(Aib: $R=R'=\text{CH}_3$)が知られている。AibのRamachandran plotから 3_1 / α -ヘリックスが安定である事が解っており8残基以上のAib含有ペプチドでは右巻き或いは左巻きの α -ヘリックス構造を取ることが知られている。

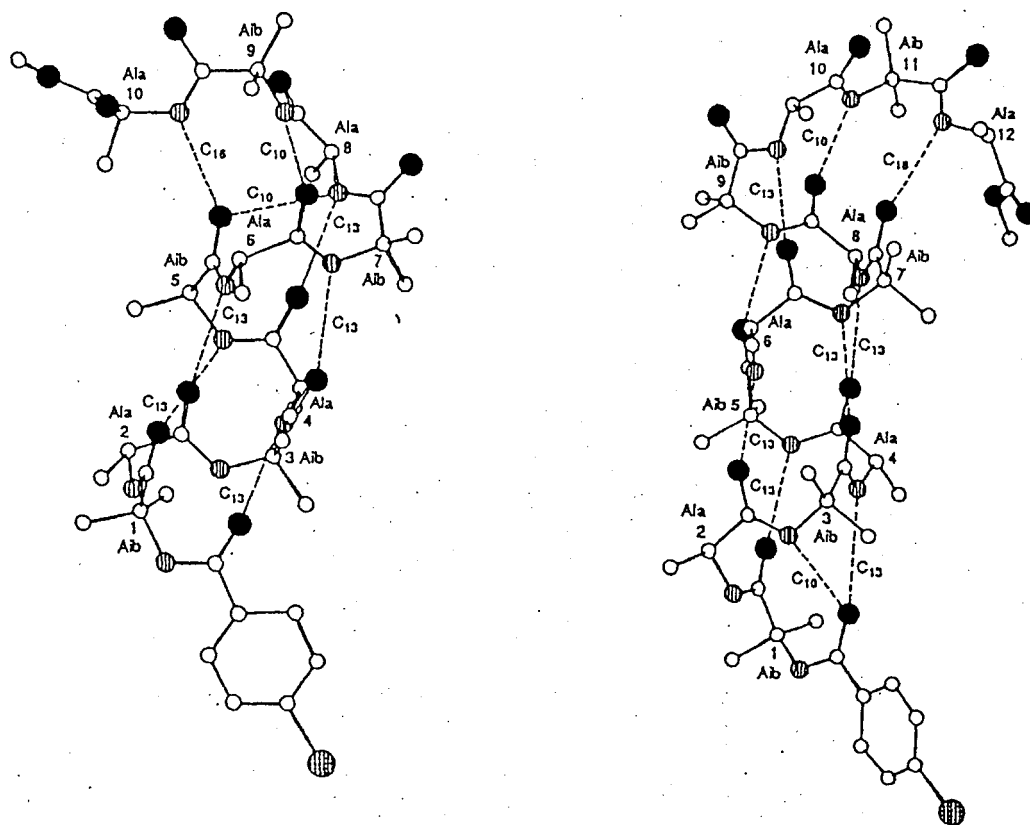
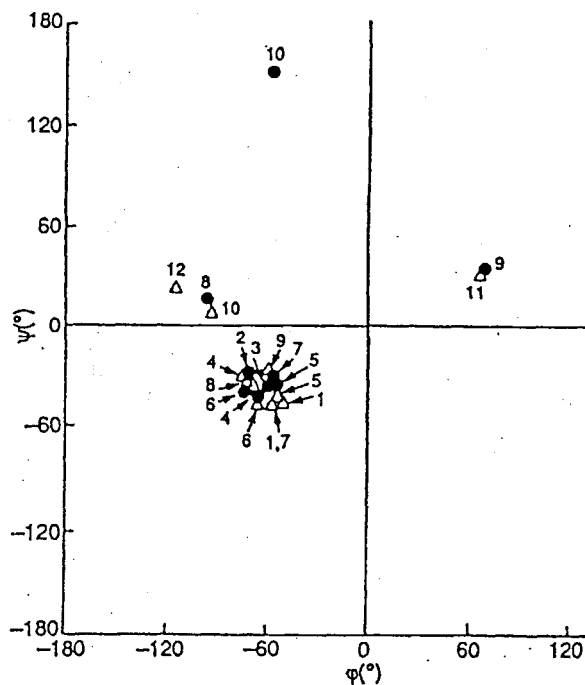
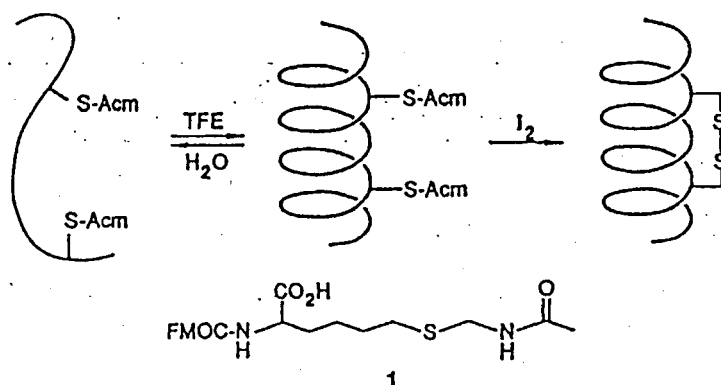


図5 pBrBz-(Aib-L-Ala)₈-OMe-4,4,2H₂Oの分子内水素結合とそのRamachandran Plot¹²⁾

Scheme I

Table I. $[\theta]_{222\text{nm}}$ for Peptides 2-5 (15-30 μM) in Water (0.1% TFA) at 0 and 60 $^{\circ}\text{C}$ ^a

peptide	0 $^{\circ}\text{C}$		60 $^{\circ}\text{C}$	
	$-\langle\theta\rangle_{222}$	$f, \%$	$-\langle\theta\rangle_{222}$	$f, \%$
2	Ac-A-A-A-(D)I-K-A-A-A-K-(L)I-A-A-A-K-A-NH ₂			
oxidized	29 600	99	15 800	53
protected	8400	28	5100	25
3	Ac-(D)I-K-A-A-A-A-K-(L)I-NH ₂			
oxidized	21 000	105	13 300	59
protected	3100	16	2500	13
4	Ac-A-E-(D)I-A-A-A-K-F-L-(L)I-A-H-A-NH ₂			
oxidized	29 000	105	16 800	48
protected	7000	25	4500	16
5	Ac-A-N-E-A-A-D-(D)I-I-A-Y-L-K-Q-(L)-T-K-NH ₂			
oxidized	31 100	104	14 900	49
protected	8900	30	4500	15

^a $-\langle\theta\rangle_{222}$, mean residue ellipticity (degree-cm²/dmol) of peptides at 222 nm. $f = [\theta]_{\text{obsd}} - [\theta]_0 / ([\theta]_{\text{max}} - [\theta]_0)$ = the fraction of helix. $[\theta]_{\text{obsd}}$, $[\theta]$ observed from a previous column. $[\theta]_0 = 0 \pm 500$ deg-cm²/dmol. $[\theta]_{\text{max}} = ((n-4)/n)[\theta]_{\infty}$ = the maximal mean residue ellipticity value for chain length where n = the number of residues and $[\theta]_{\infty} = -40000$ deg-cm²/dmol.¹⁷

図6 i/i+7 間の S-S 架橋による α helix の安定化¹⁹⁾

Schultz らは最近小さなペプチドに安定な α ヘリックス構造を取らせるのに 1 番目と 1+7 番目のアミノ酸にジスルフィド架橋を形成させる事により安定な 2 次構造形成が可能である事を示している¹⁹⁾。このペプチドでは D, L の N-Fmoc-S-(acetamidomethyl)-2-amino-6-mercaptohexanoic acid (図 6 中 1) が固相法により図 6 中 2~5 のペプチドの、それぞれ 1 及び 1+7 残基目に導入され acetamidomethyl (Acm) グループの酸化によりジスルフィドブリッジが形成された。これらのペプチドはいずれも、60 $^{\circ}\text{C}$ においても高いヘリックスコンテンツを示した。興味深い事に、L, D 体及び L, L 体では大きな効果は認められなかった。

Table Helix content (pH 7.0, 1°C)

Peptide	- $[\theta]_{222}$, degree·cm ² ·dmol ⁻¹		Helix dipole interaction
	0.01 M NaCl	1.0 M NaCl	
(i+4)E,K	29,000	24,800	+
(i+4)K,E	25,300	25,700	-
(i+3)E,K	17,600	17,400	+
(i+3)K,E	8,500	12,000	-

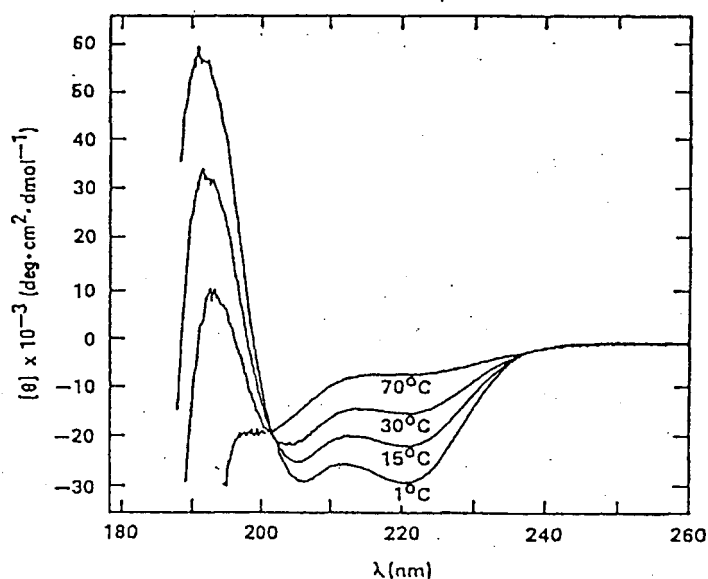
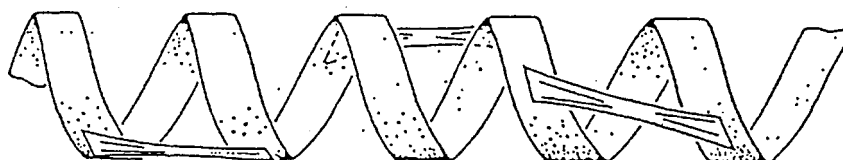
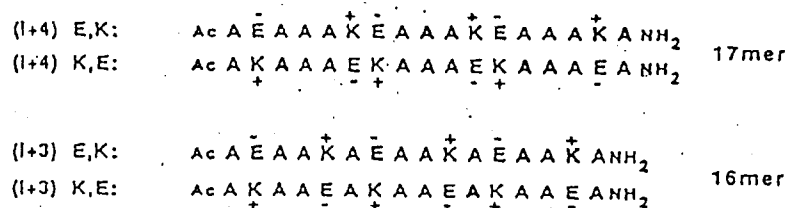


FIG. CD spectra of peptide (i+4)E,K (17 μM) at four temperatures in 0.01 M KF (pH 7.0). deg, Degree.



(Upper) Sequences of the four peptides designed. Ac, acetyl; A, alanine; E, glutamic acid; K, lysine. (Lower) Diagram illustrates the potential helix-anchoring effect caused by salt bridges or ion pairs for the *i*+4 peptides. Note that the charged groups spiral around the surface of the helix.

図7 Glu-Lys間の塩橋の形成によるαヘリックス構造の安定化²⁰⁾

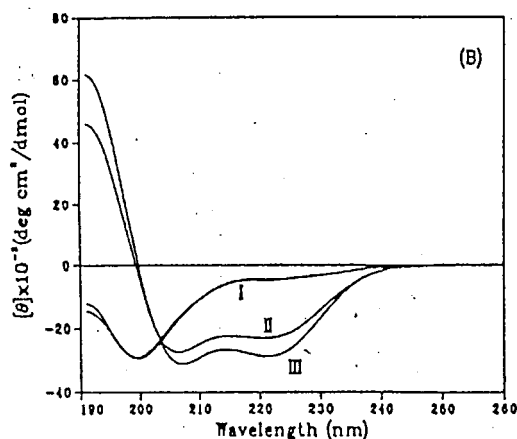
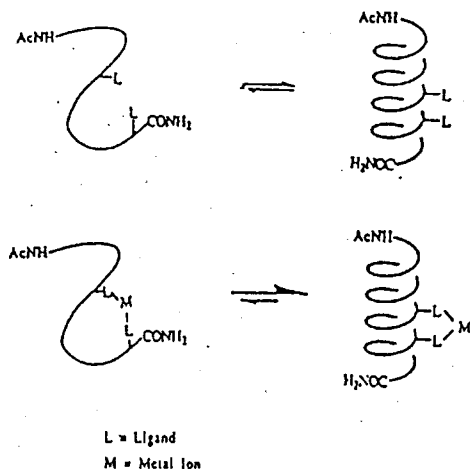


Figure 9 CD spectra of (A) peptide 2a (12 μM) in the absence of metal ions (I) and in the presence of Cd²⁺ (III) or Ni²⁺ (I) (200 μM in metals) at 25 °C and (B) peptide 5a (36 μM) in the absence of metals at 4 and 25 °C (I) and in the presence of Cd²⁺ (200 μM) at 25 (II) and 4 °C (III)

図9 メタロペプチドによるαヘリックスの安定化²³⁾

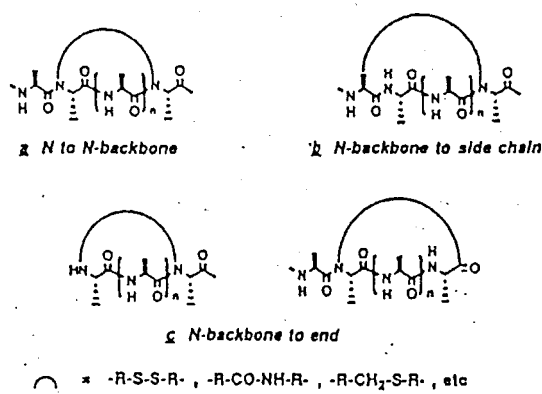


Figure The concept of N-backbone cyclization.

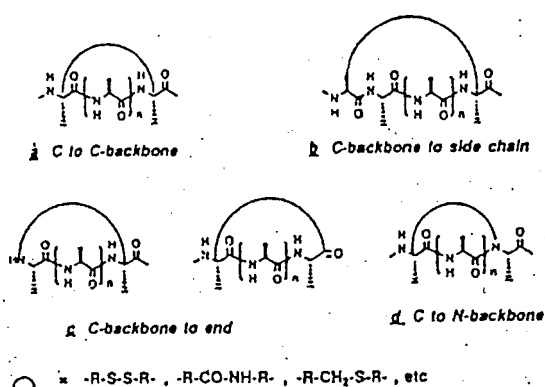


Figure The concept of C-backbone cyclization.

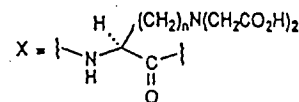
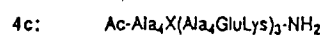
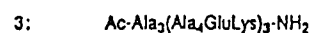
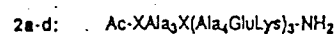
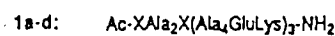
図10 Nα-backbone cyclizationと Cα-backbone cyclizationによる構造安定化戦略²⁴⁾

Table Summary of Changes in $[\theta]_{222}$ on Addition of Metal Ions to Peptides 1a-d, 2a-d, 3, and 4c

peptide	$[\theta]_{222}^a$ deg cm ² /dmol	change in $[\theta]_{222}$ with additive, %				
		Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺
1a	20 000	-45	-57	-17	-41	-26
1b	14 200	-5	-14	50	-1	4
1c	15 500	31	-5	0	3	-22
1d	13 800	26	-43	48	-8	-16
2a	18 600	-30	-48	-34	-34	-50
2b	18 300	50	35	32	28	11
2c	18 400	26	-7	56	22	43
2d	17 800	33	23	18	23	24
3	17 500	-2	-5	0	-3	-8
4c	19 300	-10	-10	-20	-15	-13

^a Peptide, 6-14 μM, pH 7.9 (200 mM aqueous sodium borate), 25 °C. ^b Metal ion, 200 μM.

Peptides 1 and 2 were designed to probe the structural optimum for helix stabilization by simultaneous chelation of two amino acid bearing side chains.



ペプチドの構造形成とその評価

大阪工業技術試験所

山本 仁

【技術概要】

1) はじめに

ペプチドや蛋白質は、それらの1次構造から4次構造まで立体構造の様々な部分に機能発現の秘密が隠されている。現在、天然のペプチド、蛋白質は数万種が知られているが、そのうち立体構造の知られているものはわずかに数百種程度である。これは立体構造の解析が大変に労力と時間がかかるものであるからである。ペプチド、蛋白質の構造解析手法として最も一般的に用いられてきたものは、X線結晶解析法と円偏光二色性スペクトル(CD)であろう。これらの手法うちで原子レベルの分解能で立体構造を決定できるX線結晶解析法は結晶の作製から構造の精密化までに年単位の時間を必要とする。

しかし近年、超伝導マグネット技術の発達とハード、ソフト両面でのコンピュータ技術の発展にともない、NMRを用いた構造解析法が重要な手段として注目を集め、利用されるようになってきた。以下にNMRを用いた構造解析を概観する。

2) NMR距離解析法

核磁気共鳴法(NMR)を利用した蛋白質の構造決定の研究は、1960年代に既に始められている。近年の超伝導マグネットの発達やコンピュータ技術の飛躍的な進歩、多彩な多次元NMR測定解析技術の急速な発展は、NMRを蛋白質研究の必要不可欠なものとしている。

NMRより得られる情報を表1にまとめた。分子中の各原子の原子核をとりまく電子によりつくられた局所磁場が原子核の核磁気を遮蔽し、各々固有の周波数で共鳴するために起こる化学シフトをはじめ、様々な測定量が構造研究に利用されている。化学シフトは分子の構造を反映し、その変化により蛋白質やペプチドの構造比較は容易に行える。また、構造解析上さらに重要なパラメーターとしてスピン結合定数と核オーバーハウザー効果(NOE)がある。

スピン結合定数は図1にある ϕ 、 ψ 、 ω 、 χ の二面角によって決まり、NHとC α Hの場合の値 $^3J(\phi)$ は次式のような関係が経験的に求められている。

$$^3J(\phi) = 1.9 - 1.4 \cos(\phi - 60) + 6.4 \cos(\phi - 60)$$

NOEは、分子のあるプロトンとその共鳴周波数のラジオ波で照射したときに、そのプロトンと空間的に近くに存在するプロトンの共鳴吸収強度が変化する現象で、次式で表される。

$$NOE = K \frac{f(\tau)}{r^6}$$

表1 高分解能NMRからのパラメータと分子情報

測定量 \ 状態		溶 影 響 要 素
化学シフト (σ)	低分子性	構成分子組成 (アミノ酸、ヌクレオチド) 分子表面官能基のpK値
	高分子性	局所構造 水素結合、S-S結合の有無 特殊な核間の相対距離 電子スピン密度 隣接基効果、高分子雰囲気による官能基の異常pK値 協同的転移現象の平衡論 (ヘリックス-コイル転移、蛋白変性、側鎖配向) 低分子の結合部位とその付近の構造 (基質、常磁性イオン、安定ラジカル)
スピン結合 (J)	定数	局所構造 固定した高分子主鎖の結合角 いくつかの側鎖構造の存在比結合 基質の結合角
強度・強度変化 I	低分子性	構成分子の組成比 柔らかい側鎖の構造の分布
	高分子性	水素-重水素置換の経時変化 近接した固定核間の相対距離 (NOEより) 構造移転の平衡論
緩和 (T_1 和 T_2 時 $T_1\rho$ 間 T_{1D})		側鎖の束縛回転 分子全体の並進、回転拡散 (異方的拡散も含む) 協同的構造転移の速度 高分子-低分子の反応速度 (基質、イオン) 結合低分子の量 ラベル物質と高分子接近核との距離
吸収線形の解 (単一緩和でない場合)		化学交換速度 プロトン化 協同的転移の速度 不安定中間状態の寿命 (パルス法)

Kは定数であり、 $f(\tau)$ は分子の運動性を表すパラメータ τ の関数、 r はプロトン間の相対距離であり、空間的に近いプロトン対(約5 Å以内)について観測される。

表2に構造解析に主に利用される2次元NMR測定法の名称とその応用を示した。

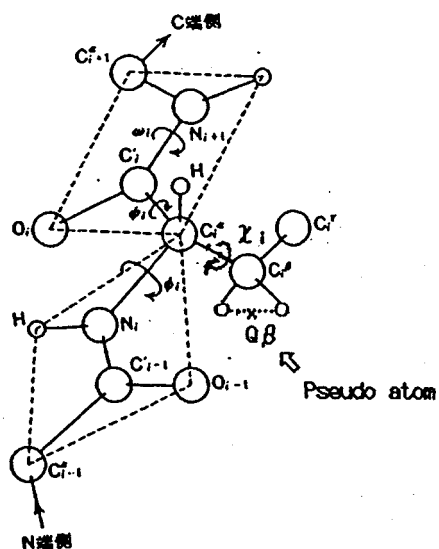


図1 原子と二面角の定義

表2 二次元NMRの名称とその応用

	名 称	略 称 例	応 用
分 解 法	^1H 同種核J分解	2DJ (-resolved)	Jの測定
	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 異種核J分解	H-C 2DJ	Jの測定と隣接水素数
	双極子分解	2D dipole	核間距離
相 関 法	^1H シフト相関	COSY	スピン系同定と分類
		DQF-COSY	スピン系同定と分類 (改良)
	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関	H-C COSY	結合水素核の同定(^{13}C 測定)
		HMBC	異種核間ロングレンジ・スピン系の同定 (^1H 測定)
		HMQC	異種核間シフト相関 (^1H 測定)
	NOE相関	NOESY	核間距離、核スピン交換
	リレー相関	RELAY	大きなスピン系の同定と分類
多量子遷移	回転系 ^1H シフト相関	HOHAHA	多重スピンネットワークの解析
	2次元間接測定	MQ コヒーレンス	多量子遷移によるスピン系の同定と分類
	多量子遷移フィルター	MQF-COSY	COSYの分解能向上

3) NMR距離解析法の手順と特徴

図2にNMR距離解析法による立体構造解析の手順を示す。2次元NMRのCOSYとNOESYを組み合わせ、連鎖特定帰属法により原理的には分子中の全水素原子の帰属が可能となり、さらにNOESYより個々のクロスピークの体積より水素原子間の距離情報が得られる。(図3、4)

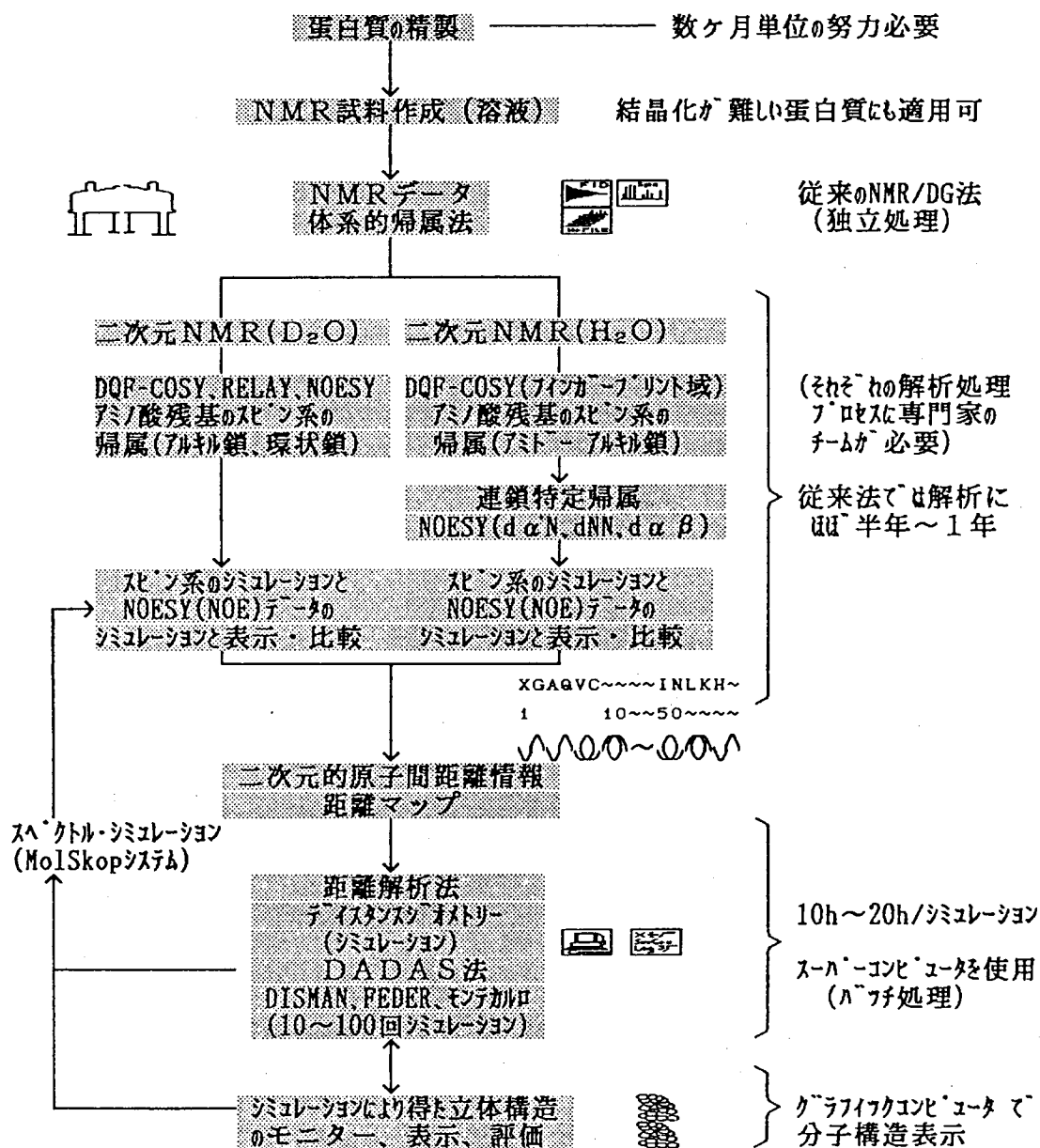


図2 NMR距離解析法による蛋白質立体構造解析手順

NMR/DG法の歴史と発表論文

RD; Restrained Molecular Dynamics

年	NMR/DG (デイス・ジ・マトリ)の論文と発展		論文内容	NMR測定技術の発展
1976				2-Dimension NMR(COSY)
1977	Crippen	J.Comp.Phys. <u>24</u> , 96	Embedding	2DJ(-resolved)
1978	Crippen, Havel	Acta Crystallogr. <u>A34</u> , 282	Metric matrix	H-C COSY
1979				SECSY
1980				NOESY
1981	Crippen et al. Braun, Go, & Wüthrich et al.	Int.J.Pep.Pro.Res. <u>17</u> , 156 B.B.A. <u>667</u> , 377	Bleomycin (7+2) Glucagon (29)	
1982				BPTI sequential assignment
1983	Braun et al. Wüthrich, Billeter & Braun Noguchi, Go	J.Mol.Biol. <u>169</u> , 921 J.Mol.Biol. <u>169</u> , 949 J.Phy.Soc.Japan <u>52</u> , 3685	Glucagon refinement Pseudo atom Derivative in dihearal angle (D.A.)	Pure phase spectra DQF-COSY TOCSY
1984	Havel, Wüthrich Abe, Braun, Go et al.	Bull.Math.Biol. <u>46</u> , 673 Comp.Chem. <u>8</u> , 239	DISGEO (Pascal language) 'DISMAN' algorithm	ROESY Secondary structure from J & NOE
1985	Kaptein, van Gunsteren et al. Havel, Wüthrich Williamson, Havel, J.Mol.Biol. & Wüthrich	J.Mol.Biol. <u>182</u> ,179 J.Mol.Biol. <u>182</u> ,295	Model + RD, Lac repressor head (51) DISGEO, BPTI(58)simulation DISGEO, BUSI IIA (57)	HOHAHA E-COSY
1986	Braun, Go Kline, Braun & Wüthrich ($\longleftrightarrow$ R.Huber, et al., J.Mol.Biol. <u>189</u> ,377) Brunger, Karplus, P.N.A.S. <u>83</u> , 3801 & Gronenborn Clore, Karplus, EMBO J. <u>5</u> , 2729 & Gronenborn, et al.	J.Mol.Biol. <u>186</u> ,611 J.Mol.Biol. <u>189</u> ,377	DISGEO, BPTI simulation DISMAN, Tendamistat (74) $\longleftrightarrow$ X-ray diffraction method RD, Crambin simulation(46)	
1987	Wagner, Braun, J.M.B. <u>196</u> , 611 Havel, Go, & Wüthrich et al. Kraulis, Jones Proteins <u>2</u> , 188 Wako, Go J.Comp.Chem. <u>8</u> , 625		DISGEO + RD, Purothionin (45) DISGEO/DISMAN, BPTI(58) NOEDIA (Ada), Crambin simulation Vectorized derivative in D.A.	PE-COSY
1988	Kline, Braun, & Wüthrich Nilges, Gronen- born et al. Moore, Havel, & Wright et al.	J.Mol.Biol. <u>204</u> , 675 Protein Engineer. <u>2</u> , 27 Science <u>240</u> , 314	DISMAN, Tendamistat refinement Simulated Annealing, Crambin etc. DISGEO + RD, Plastocyanin (97)	3-Dimension NMR
1989	Wüthrich	Science <u>243</u> , 45	Protein Structure Determi- nation by NMR/DG	

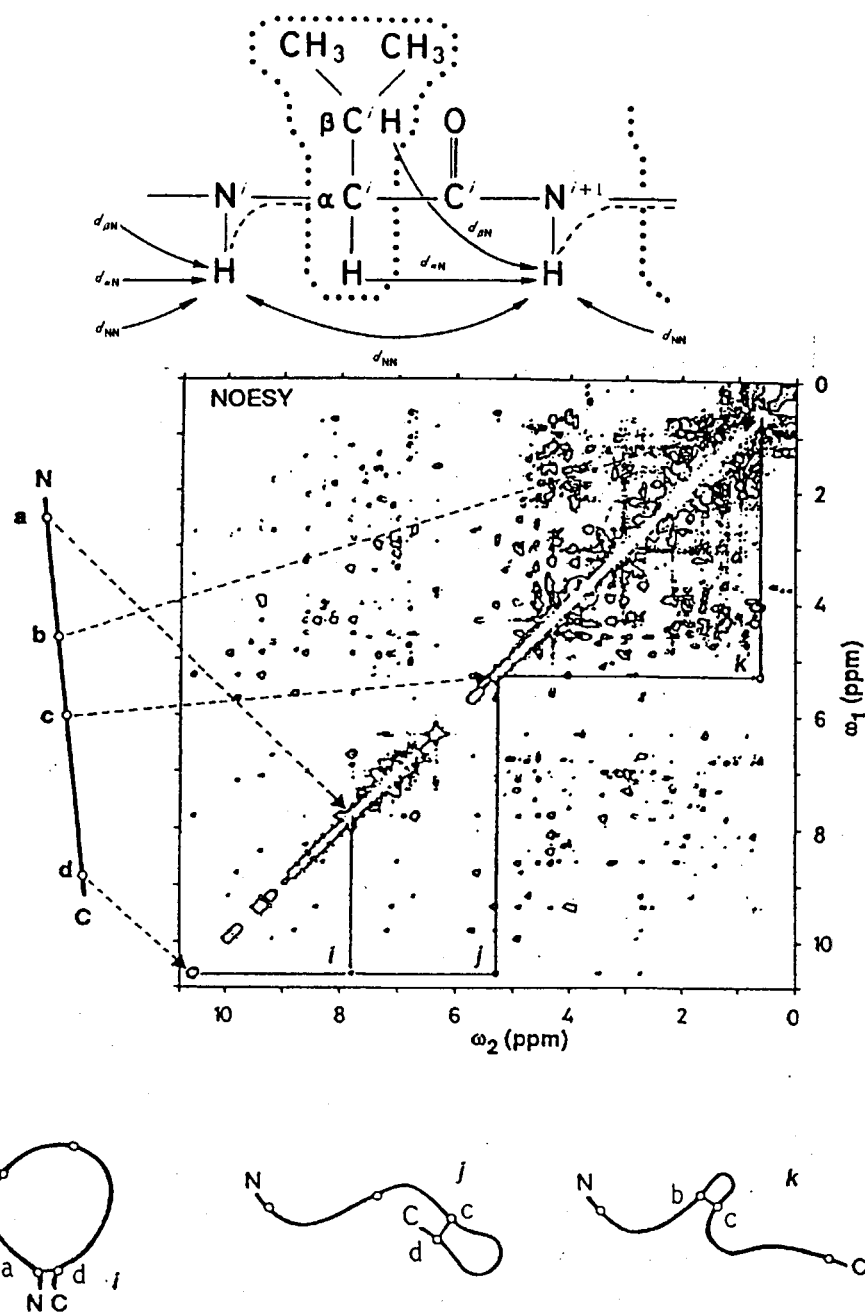


図3 BPTIのNOESYデータ (500MHz) とクロスピークより
得られる距離情報のポリペプチド鎖構造との相関

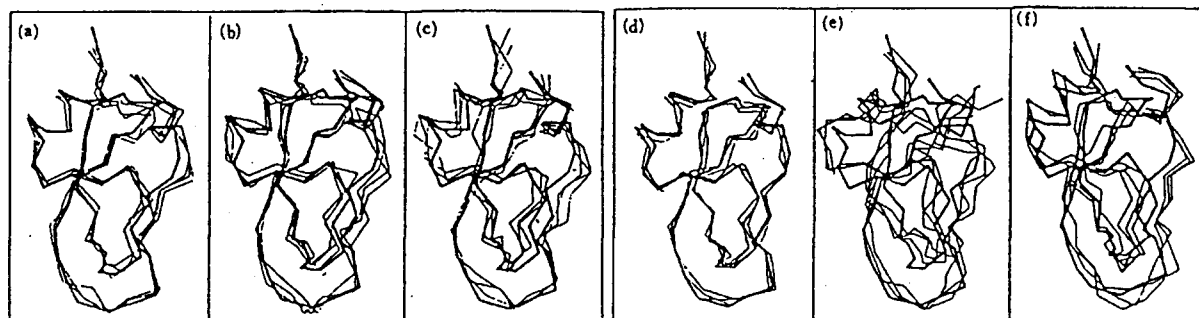


図4 BPTI(Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, 7ミ/酸残基数58)を用いた
NMR/DG法のシミュレーション実験

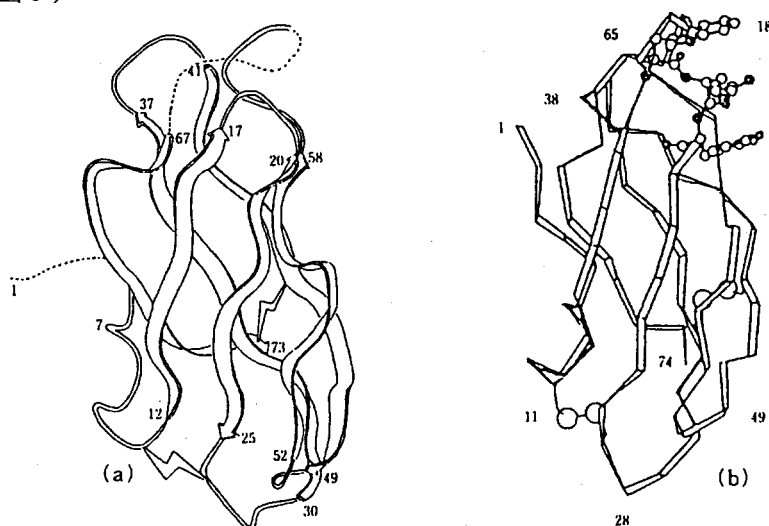
NMR距離解析法では、前述の原理を最大限に利用し、2次元NMRデータからの情報を基に構造計算を行い、立体構造を決定、評価する。利用される2次元NMRデータからの情報は、

- ①NOESYからの特定の水素原子間距離情報
 - ②COSYからのスピン結合定数から得られる二面角の範囲情報
 - ③H-D交換速度から得られる水素結合情報
 - ④化学的見地から得られるS-S結合情報
- などがある。

NMR距離解析法の利点として、

- ①溶液状態での構造解析（生体系に環境が類似）
 - ②比較的短期間に立体構造決定が可能
 - ③構造の揺らぎを原子レベルで解析可能
 - ④構造の部分的解析が可能（局所的構造変化や相互作用部位等）
- が挙げられる。

1986年に全く独立にX線結晶解析法とNMR距離解析法で同一蛋白質、 α -アミラーゼインヒビター、テンダミスタット（Tendamistat）の立体構造解析が同時期に行われ、決定された構造はほとんど一致した。（図5）



(a)NMRより求めた溶液中の構造 [A.D.Kline *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **189**, 380, Fig.3 (1986)]
(b)X線より求めた結晶構造 [J.W.Pflugrath *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **189**, 385, Fig.1 (1986)]

図5 NMR距離解析法とX線結晶解析法より決定された立体構造

NMR距離解析法の問題点として、

- ①ある条件下での明確な構造は求められるが、それがどれほど正確かの判定基準が現在の所確立していない。
 - ②NOEデータの取扱いが難しい。
 - ③分子量が大きくなるにつれピークの分離解析が困難になる場合が多い。（分子量1万程度まで）
- などがある。

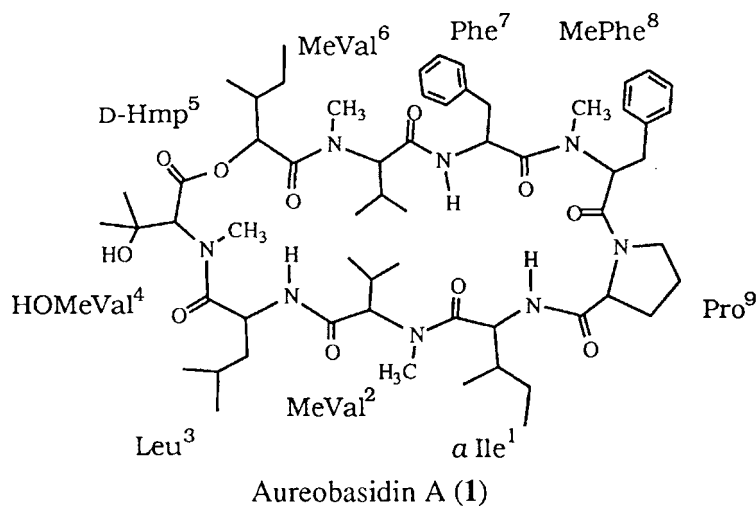
Total Synthesis of Aureobasidin A, an Antifungal Cyclic Depsipeptide

Toru KUROME, Kaoru INAMI,[†] Tetsuya INOUE, Katsushige IKAI, Kazutoh TAKESAKO,*
Ikunoshin KATO, and Tetsuo SHIBA*[†]

[†]Peptide Institute, Protein Research Foundation, 4-1-2 Ina, Minoh, Osaka 562
Biotechnology Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., 3-4-1 Seta, Otsu, Shiga 520-21

A total synthesis of an antifungal cyclic depsipeptide aureobasidin A was first achieved mainly using PyBroP¹⁾ as a coupling reagent. The synthetic cyclized product was completely identical with the natural antibiotic in all respects. Some unexpected reactions due to *N*-methylamino acid were also described.

A new cyclic depsipeptide aureobasidin A (**1**), isolated as a major component from the culture medium of the black yeast *Aureobasidium pullulans* R106, exhibits a strong antifungal activity against pathogenic fungi such as *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and some species of *Aspergillus* with a low toxicity.²⁾ A whole structure of the peptide was determined mainly by the HMBC technique and chemical degradation.³⁾ The structures of more than twenty congeners of aureobasidin were determined in comparison with aureobasidin A.⁴⁾



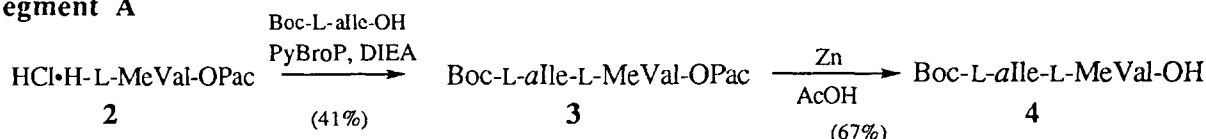
For purpose of investigation of a structure-activity relationship of the aureobasidin family antibiotic, we attempted a total synthesis of aureobasidin A aiming an establishment of a synthetic technique of the cyclic depsipeptide containing *N*-methyl amino acids, which is known to be difficult to condense by usual peptide-coupling methods.

The linkage between *alle*¹ and Pro⁹ was chosen as a site of the final cyclization to avoid the coupling at an *N*-methyl amino acid as an amine component, which otherwise may diminish a yield of the cyclization reaction

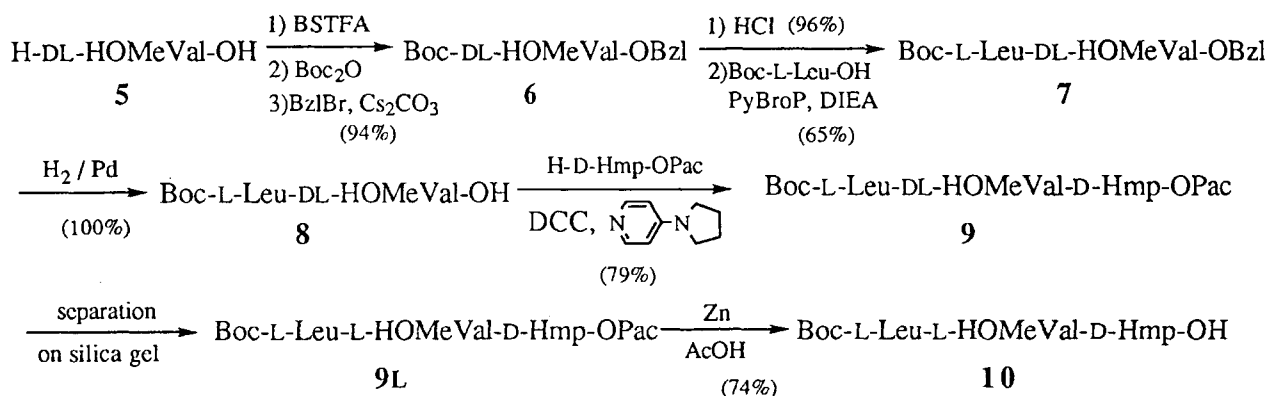
due to its steric characters. A linear nonapeptide(1-9) was synthesized according to the Boc strategy. Thus, a coupling between Leu³-HOMeVal⁴-Hmp⁵ (Segment B) and MeVal⁶-Phe⁷-MePhe⁸-Pro⁹ (Segment C) was first attempted, followed by condensation of the coupling product (3-9) with *α*Ile¹-MeVal² (Segment A) by the fragment condensation as shown below.

Segment C was prepared by a stepwise elongation method starting from Boc-L-Pro-OPac (**11**) as a carboxyl terminus by the successive condensation using PyBroP⁵⁾ and DIEA in dichloromethane.⁶⁾

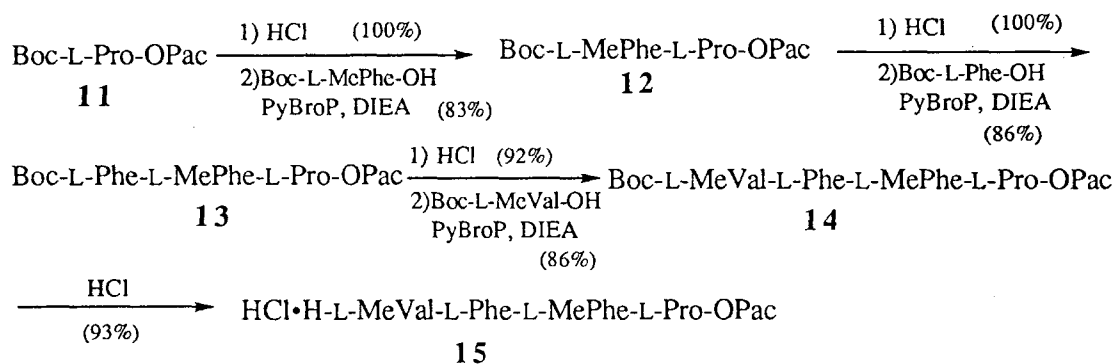
Segment A



Segment B

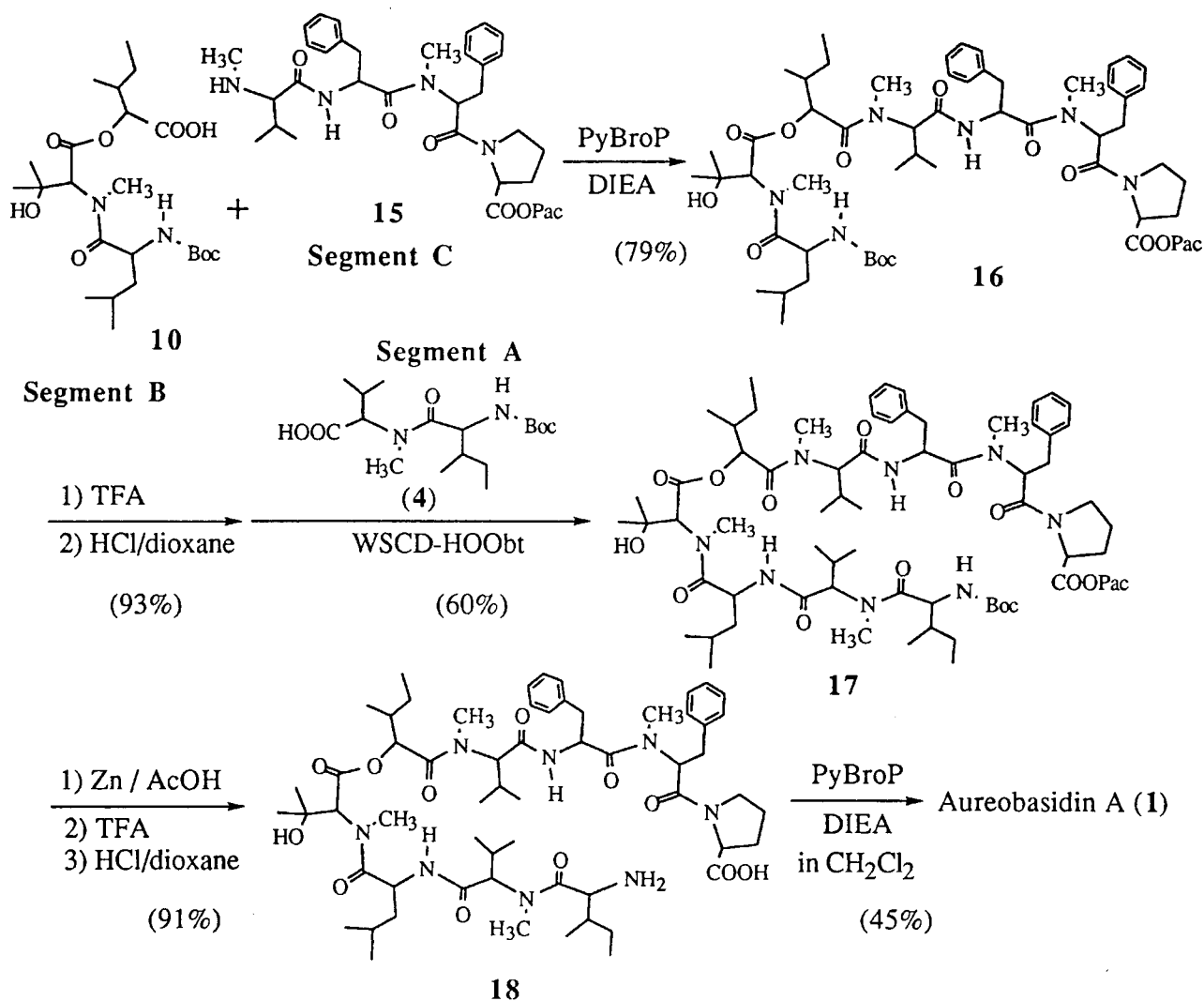


Segment C



DL-β-Hydroxymethylvaline (HOMeVal) in Segment B was prepared according to the method by Izumiya *et al.*⁷⁾ Although HOMeVal could not be protected with the Boc group by the usual manner, the protection could be achieved after activation and solubilization by trimethylsilylation with BSTFA. The introduction of the benzyl group to its carboxyl function and the removal of the Boc group were carried out, followed by coupling with Boc-L-Leu-OH using PyBroP without protection of β-OH group in HOMeVal to afford **7** in a moderate yield. After deprotection of Bzl group, a mixture of the diastereomers of the product **8** was coupled with H-D-Hmp-OPac with DCC and 4-pyrrolidinopyridine as an acylation catalyst. In this condensation reaction, DCC was

superior to PyBroP in the yield. Both coupling reagents without the base catalyst did not afford the desired product owing to the formation of the oxazolinium compound of Boc-Leu-HOMeVal as a main intermediate.⁸⁾ The diastereomers of the product **9** were separated each other by silica gel column chromatography,⁹⁾ and the L-L-D compound (**9L**) was deprotected with zinc/acetic acid to give **10** (Segment B). The coupling of **10**, whose C-terminus is a hydroxy acid, Hmp, with **15** was carried out using PyBroP to avoid a racemization. After removal of the Boc group in the peptide **16** with TFA, a fragment condensation with **4** (Segment A) by the WSCD-HOOBt method was carried out to give the protected linear nonapeptide **17** with a slight racemization as shown in the scheme, although the same condensation by the PyBroP method gave a 1:1 mixture of the completely racemized diastereomers.



The protecting groups of both carboxyl and amino groups in the linear nonapeptide **17**, which was purified diastereomerically, were removed successively, and then the free peptide **18** was cyclized with PyBroP in CH₂Cl₂ under a high-dilution condition (10⁻³ M) to afford predominantly the cyclic monomeric peptide (PD-MS: Found, M⁺ 1100; Calcd for cyclic monomer, 1100). The cyclization of *N*-hydroxysuccinimide ester of the nonapeptide at the same concentration in CH₂Cl₂ as in that of PyBroP reaction gave a cyclic dimer as the major product. In case of PyBroP, the reaction seemed to proceed promptly compared to that in the active ester. There-

Table 1. Minimum Inhibitory Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of Natural and Synthetic Aureobasidin A

	Natural	Synthetic
<i>Candida albicans</i> TIMM 0136	≤ 0.0125	≤ 0.0125
<i>Candida albicans</i> TIMM 0171	≤ 0.0125	≤ 0.0125
<i>Candida kefyr</i> TIMM 0301	0.4	0.4
<i>Candida glabrata</i> TIMM 1062	0.1	0.2
<i>Cryptococcus neoformans</i> TIMM 0354	0.8	0.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	0.2	0.2
<i>Aspergillus fumigatus</i> F48	>25	>25

fore, a condensation in a high-dilution condition was actually achieved preventing the dimerization in that case. On the other hand, the cyclization of the active ester in DMF proceeded very slowly even though the cyclic monomer was obtained as a major product besides the dimer. Such difference depending on the solvent seemed to arise from the solvation feature of the peptide molecule in DMF which may be advantageous to the monomeric cyclization.

The synthetic cyclic monomer thus obtained is completely identical with the natural antibiotic in all respects (TLC, HPLC, $^1\text{H-NMR}$, and antifungal activities). Thus we now achieved the first total synthesis of aureobasidin A with the unique pattern of the antifungal activity.

References

- 1) Abbreviations: PyBroP: bromotris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate; HMBC: heteronuclear multiple-bond connectivity; Boc: *t*-butoxycarbonyl; Pac: phenacyl; DIEA: diisopropylethylamine; BSTFA: *N*, *O*-bistrimethylsilyltrifluoroacetamide; DCC: dicyclohexylcarbodiimide; Hmp: (2*R*)-hydroxy-(3*R*)-methylpentanoic acid; WSCD: water-soluble carbodiimide [*N*-ethyl-*N'*-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)]; HOOBt: 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine; PD-MS: plasma-desorption mass spectroscopy; HOBt: 1-hydroxybenzotriazole; 1M=1 mol dm⁻³.
- 2) K. Takesako, K. Ikai, F. Haruna, M. Endo, K. Shimanaka, E. Sono, T. Nakamura, I. Kato, and H. Yamaguchi, *J. Antibiot.*, **44**, 919 (1991).
- 3) K. Ikai, K. Takesako, K. Shiomi, M. Moriguchi, Y. Umeda, J. Yamamoto, I. Kato, and H. Naganawa, *J. Antibiot.*, **44**, 925 (1991).
- 4) K. Ikai, K. Shiomi, K. Takesako, S. Mizutani, J. Yamamoto, Y. Ogawa, and I. Kato, *J. Antibiot.*, **44**, 1187 (1991); K. Ikai, K. Shiomi, K. Takesako, and I. Kato, *ibid.*, **44**, 1199 (1991).
- 5) J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, and B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 1967 (1991).
- 6) The coupling reaction of Boc-L-MePhe-OH with HCl·H-L-Pro-OPac by the WSCD-HOBt method gave the product in a yield of 87%, accompanying L-D isomer (A ratio of L-L and L-D isomers was 10 : 3). This racemization was due to the intramolecular formation of the charged Schiff base in Pro residue between the imino group and the carbonyl function of the Pac ester. (H. Kuroda, S. Kubo, N. Chino, T. Kimura, and S. Sakakibara, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **40**, 114 (1992). The reaction with PyBroP afforded the desired product without racemization.
- 7) N. Izumiya and A. Nagamatsu, *J. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 336 (1951).
- 8) N. L. Benoiton and F. M. F. Chen, *Can. J. Chem.*, **59**, 384 (1981).
This oxazolinium-forming phenomenon was recently reported in case of *N*-MeVal and some *N*-methylamino acids by B. Castro *et al.* independently. (E. Frérot, P. Jouin, J. Coste, and B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 2815 (1992).
- 9) These diastereomeric peptides (L-L-D or L-D-D) after separation were hydrolyzed with 6N HCl for 19 h to give respectively L-HOMeVal and D-HOMeVal, which were assigned in comparison with the authentic amino acids on Daicel Chiralpak WH.

(Received July 26, 1993)

ペプチドの材料化技術 (1)

鐘淵化学工業(株)

総合研究所中央研究所

谷 紘孝

〔序〕

「ペプチドの材料化」とは、とりもなおさずペプチドの機能や特性を発揮する材料を作ることである。

生物化学的機能（分子識別機能、触媒活性、触感など）および物理的機能（弾性、機械強度、光学的・電気的特性）などのペプチドの多彩な機能のなかでも、ペプチド特有で、ペプチドによってのみ発揮できる機能・特性を材料に付与することが最も望まれている。しかしながら、このような特殊な機能を発揮する材料と言えども、強度、安定性など材料として最低限備えるべき性質をクリアする必要があり、材料をペプチドのみで構成することは現実的ではない。従って、他の材料との複合化、とりわけ材料表面のペプチドによる修飾技術、さらには材料表面でのペプチド機能・特性の発現技術が重要と考えられる。

ここでは材料表面のペプチドによる修飾技術、なかでもペプチドの電気的・光学的特性の発揮に重要と考えられるパターン形成技術に着目し、①光化学反応によるペプチド・タンパク質のパターン形成的固定技術、およびペプチドの高度な機能発現に必須と考えられる②材料表面におけるペプチド集合体形成技術の2点に着目し、それぞれの技術動向について紹介したい。

〔光化学反応によるペプチド・タンパク質のパターン形成的固定技術〕

機能性のペプチドを材料化してデバイスを作製する場合、ペプチドを基板上にパターンニングすることが重要な要素技術になる。パターンニングの手法としては、特に光化学反応を利用する方法が有望と思われる。

光化学反応によるペプチドタンパク質のパターン形成的固定化方法としては、

- 1) 光照射により共有結合を生じる反応を利用する
- 2) 光反応性保護基を利用する
- 3) 光照射による化合物の変性を利用する

方法が知られている。

1) 光照射により共有結合を生じる反応を利用する方法

光照射により共有結合を生じる官能基として、フェニルアジド基／3-トリフルオロメチル-3-フェニル シアジリル基／アジド基・ジアゾケトン基が知られている。

特にフェニルアジド基は、光照射によりナイトレンを経由して近傍の炭素原子と共有結合を形成し、微小領域にタンパク質や合成ペプチドを化学固定する方法としてよく利用されている。

2) 光反応性保護基の利用

S. P. A. Fodorらは、光照射により脱保護されるアミノ保護基を利用して、パターン形成的にガラス表面上でペプチドの固相合成を行った。

光反応性の保護基は、主に以下のものが知られている。

3) 光照射による化合物の変性の利用

特定の物質と高い親和性を持つ化合物を、光照射により露光部のみを失活させることによってパターンニングが可能である。

小谷野らはビオチンとアビジンの特異的結合を応用し、固定化ビオチンに光照射してアビジンとの親和性を失わせ、フォトマスクに従ったアビジンのパターンニングを実現した。

[ペプチド集合体形成技術]

タンパク質の中には二量体などの集合体を形成することによって、はじめて独自の機能を発現するものが少なくない。機能性ペプチドを材料化する際にも、ペプチドを集合化することは、その機能に大きな影響を及ぼすことが予想される。

材料表面でペプチドを集合化させるために、主に以下の方法が考えられる。

- 1) グラフト重合を利用し、材料表面にペプチドを高密度に固定化する
- 2) 機能性ペプチドを、繰り返しつなぎ合わせたシークンシャルポリマーとする
- 3) MAPs(Multiple Antigenic Peptides)を利用する
- 4) TASP(Template Assisted Synthtic Protein)を利用する。

ペプチドの材料化技術 (2)

兵庫県立工業技術センター 藤村 庄

1、はじめに

ペプチドの材料化の観点から報告された例は今までほとんど見られない。材料化することを「特定の機能を持つペプチドを、何らかの、生産もしくは測定装置に組み込み、繰り返し使用が可能な状態にすること」と定義するなら、ペプチドの固定化技術はその要素技術の一つであると考えられる。そこで、ここではペプチドの固定化技術を中心に考えることにする。

ペプチドの固定化技術と類似したものとしては、バイオリアクターにおける酵素タンパク質の担体への固定化、蛋白質表面の化学修飾、アフィニティーラベルなどがあるが、これらの方法はタンパク質構成アミノ酸中の特定のアミノ酸残基の部位で固定化するというような固定化反応の位置指定はできず、タンパク質の特定機能を発揮する機能中心近傍で固定化反応が生じた場合、その機能の発現を疎外する可能性がある。一方、ペプチドは近年の合成技術の長足の発展に伴い、各種の機能をもったアミノ酸、またはその誘導体をペプチドの特定部位に組み込むことを可能にした。そこで、あらかじめ、固定化基板と反応可能な官能基をペプチド中に組み込むことで、固定化反応の反応部位を分子レベルで指定することは可能であると予測される。ここではこの観点からペプチドの固定化に関連した技術、さらに基板への高密度・配向化について報告する。

2、合成樹脂基板へのペプチドの固定化

汎用的な合成樹脂に対して、ペプチド中に2重結合を導入し、合成樹脂表面にペプチドをグラフト重合する方法が考えられる。側鎖に1個の2重結合が導入できるアミノ酸残基は以下の4種である。

①アスパラギン酸やグルタミン酸のようなβ-やγ-カルボキシル基の利用

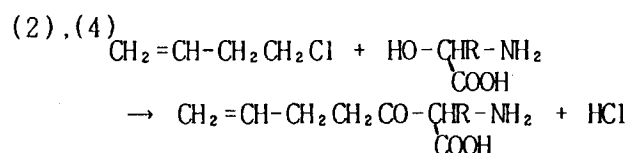
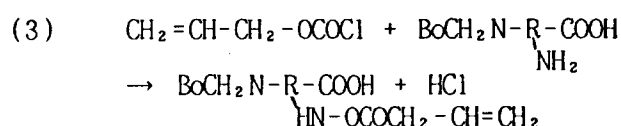
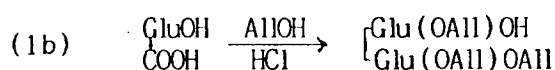
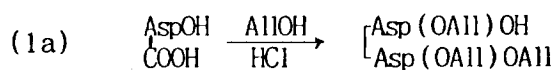
②セリン、スレオニン、およびチロシンのような水酸基の利用

③リジンのようなε-アミノ基の利用

④メチオニンのような硫化アルキル基の利用

これに関連する研究として、われわれはゼラチン中に含まれるグルタミン酸やアスパラギン酸の側鎖カルボキシル基とアリルアルコールのようなアルコールとでエステル化反応を行い、アミノ酸シーケンス中に2重結合の導入を図ったペプチドマクロマーを合成した例、及びこのペプチドマクロマーをポリ乳酸基板上に固定化する方法を報告した。

アミノ基からのエステル化による2重結合導入例はHorst Kunzらがアリルクロロフォルメート($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OCOCl}$)をアミノ基のプロック化剤として用いた研究を行っている。エ



ステル化以外のアリル基の導入は塩化アリル($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$)を用いてセリン、あるいはチロシンのOHと反応させ、導入を図ることも可能である。

3、無機材料であるガラスおよびシリカ基板へのアシル転移酵素によるペプチドの固定化

(1) トランスグルタミナーゼ

転移酵素の1種であるトランスグルタミナーゼ(TGase)はペプチド中のグルタミン(Gln)残基の γ -カルボキシアミド基と1級アミンとの間のアシル転移反応を触媒する。無機材料基板にペプチドを固定化する方法として、TGaseの特性を利用し、アミノ化剤によって化学修飾したガラスおよびシリカ基板にGln残基を含むペプチドを結合する方法が考えられる。

TGaseはタンパク質およびペプチド中のGln残基の γ -カルボキシアミドと1級アミンのアシル転移反応を触媒するだけでなく(図2A)、蛋白質およびペプチド中のリジン(Lys)残基の ϵ -アミノ基もアシル受容体として作用するので、TGaseにより分子内及び分子間に ϵ -(γ -Glu)Lys架橋が形成される(図2B)。また、反応系に充分量のアミンあるいはアミノ基がない場合は、水分子がアシル受容体として作用するのでGlnはグルタミン酸(Glu)残基に変換される(図2C)。

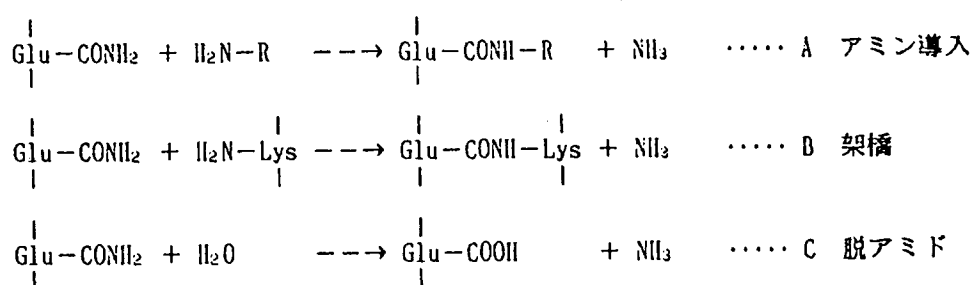
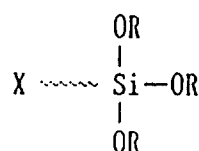


図2 TGaseの触媒する反応¹⁾

(2) ガラス・シリカ基板へのアミノ基の導入

ガラスおよびシリカ基板へのアミノ基の導入は、有機ケイ素化合物であるシランカップリング剤(SCA)による方法が多く報告されている。SCAは下記の化学構造で表され、1分子に少なくとも2種類の反応性のことなる官能基を持っている。

ここで、Xは各種合成樹脂などの有機材料と化学結合する反応基で、ビニル基、エポキシ基、アミノ基、メタクリル基およびメルカプト基である。ORはガラス、金属などの無機質材料と結合する反応基で、メトキシ基およびエトキシ



シランカップリング剤の化学構造式

基である。SCAの反応機構は、SCAのアルコキシシリル基($\text{Si}-\text{OR}$)が水あるいは湿気により加水分解され、シラノール基となり、このシラノール基と無機質表面とが縮合反応により、 $\text{Si}-\text{O}-\text{M}$ (M は金属元素)を形成する。一方の反応基X-は有機物と結合あるいは相溶化し、結果的に無機質と有機質を化学的に結合させることができる。この場合、シラノール基と置換する官能基を分子内に2個以上持っているSCAとの反応においては、反応系中に存在する水によって反応分子の縮重合が引き起こされる。従って、基板上に配向よくペプチドを結合させるためには、基板の表面に単分子層を形成させること、及び表面の充分な

脱水が必要である。

- (3) ペプチドのアミノ化ガラスおよびシリカ板への結合

5mM CaCl_2 と 10mM dithiothreitol を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に ペプチドを溶解し、その液にアミノ化基板を浸漬する。これに ペプチド 1mg に対して 0.03 units の割合で TGase を添加して 37℃ で 1~4 時間反応させる。TGase の基質となる ペプチド に Lys 残基を含む場合には、同種 ペプチド 間の架橋反応が進行するので、ペプチドのアミノ基をシトコニル化により、可逆的にブロックすることが有効である。図 3 に基質タンパク質アミノ基のブロッキングによるアミン導入反応の効率を示した。

4. 金属表面へのペプチドの固定化

- (1) 金表面へのイオウ化合物の吸着

含イオウ化合物が金属に吸着することは良く知られた事実であり、近年、この化合物の中でチオールやジスルフィドの 1 部が金表面に対して単分子吸着されることが明らかになってきた。図 4 に示すようにこれらの化合物の金表面への吸着は S 原子を介しての酸化的付加であり、しかも多くの場合、吸着したこれらの化合物の分子は、自発的に配向性を持つ安定な単分子膜を形成し、S を金表面の方に向け、アルキル鎖などを反対側に向けた構造を取るということが明らかにされてきた。例えば、金表面に吸着した長鎖のアルカンチオール単分子膜の分子配列は、アルキル鎖がトランスジグザグ構造をとり、表面に対する法線からの傾斜角が 27° 、炭素骨格を含む平面のねじれ角が 53° であることが報告されている。

- (2) 金表面に形成された膜の性質

アルキル鎖の末端に官能基を導入した有機チオールやジスルフィドを金表面に吸着させることにより、表面に多様な新しい物性を付与することができる。例えば、図 5 のようにチオールを含む燐脂質の単分子膜を金表面に形成させると pH 応答性が見られるようになる。

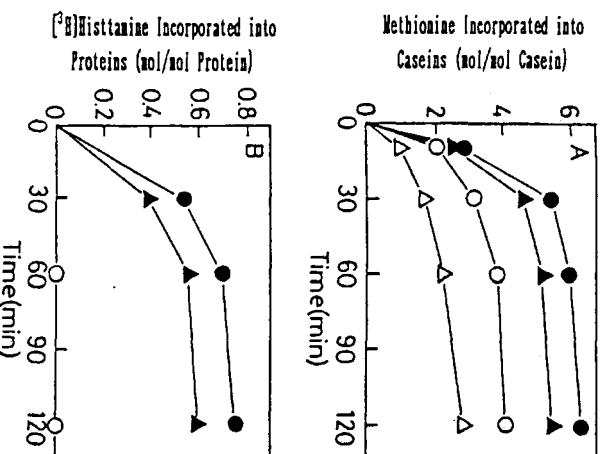


図 3 基質タンパク質アミノ基のブロッキングによるアミン導入反応の効率

A, TGase によるイオウニオキスチンアミンの導入反応。
 (O) α_1 -casein; (A) β -casein; (●) reduced α_1 -casein;
 (Δ) reduced β -casein.
 B, 還元チオールとチオール化チオールへのアミンの導入反応。
 (O) 還元チオール; (A) 還元チオール; (●) reduced α_1 -casein;
 (Δ) reduced β -casein.

(伊藤宏司, Kippa Kageyama, *Anal. Chem.*, 49, 119 (1977).)

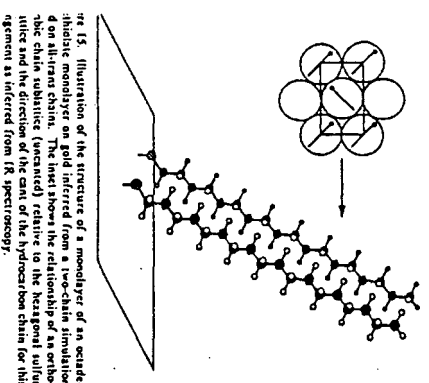


図 4 図 15. Illustration of the structure of a monolayer of an alkanethiol on a gold surface. The inset shows the relationship of an alkanethiol chain to the hexagonal lattice of the gold surface and the direction of the hydrocarbon chain for this segment as inferred from IR spectroscopy.

図 4

電子伝達性に関しては1部のチオールやジスルフィドで修飾した電極がチトクロームCと電極との直接の電子移動を可能にするということで多くの研究が行われている。この電子伝達機構については、チトクロームCがシスチンを介して電極に固定され、この固定化層を通じて電子伝達が生じるとされている。

(3) 金表面上に形成された膜の修飾

金表面に吸着した有機チオールやジスルフィド自己集合型単分子膜は配向性が高く、安定性があることから、機能性表面を構築する上で有益な手段であり、これらを結合剤とする試みが行われている。図6に示したように11-ヒドロキシウンデカン-1-チオールを結合剤として用い、ホスホリル化、 $ZrOCl_2$ 処理、(11-ヒドロキシウンデシル)リン酸処理を繰り返すことにより多分子層を調整できる。また、システアミンなどのチオール基を結合剤にして、これにナフトキノンを結合させて β -NADHの酸化還元に関与する電極を得た例もある。

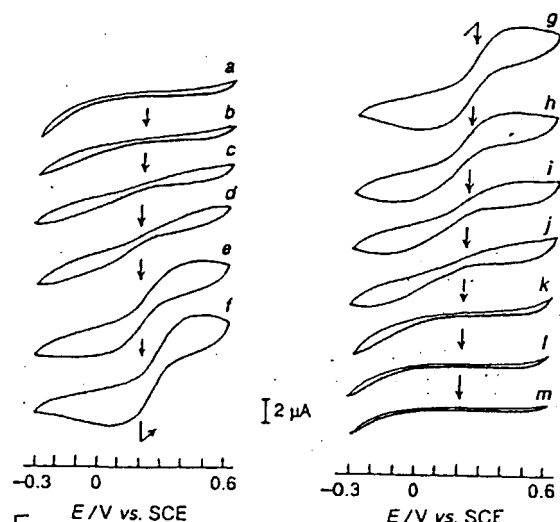
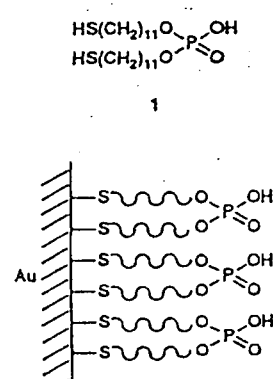


図5 pH dependence of cyclic voltammograms of the electrode C: (a) pH 10.4, (b) 6.1, (c) 5.0, (d) 4.0, (e) 3.0, (f) 2.0, (g) 2.5, (h) 3.6, (i) 4.5, (j) 5.4, (k) 6.9, (l) 8.3 and (m) 10.0. Other experimental conditions are the same as those in Fig. 2.

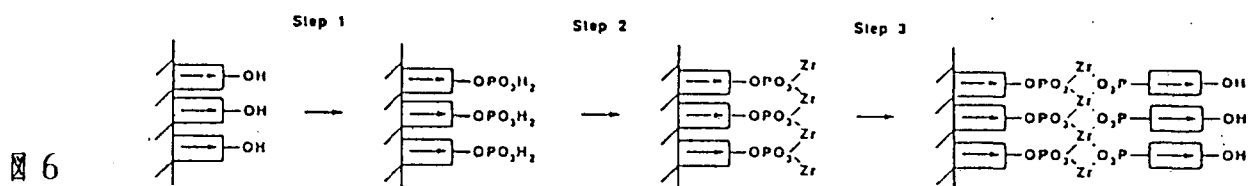


図6 Schematic representation of the monolayer deposition sequence used to form multilayers with polar order.

5、ペプチドの単分子膜作成

ペプチドを固定化基板の上に分子レベルで配向させ、高密度に集積する1つの手法としてLB膜が考えられる。単分子膜、LB膜といった手法を用いた研究でペプチド、ポリペプチドを対象とした研究は少なくない。その研究例の多くは、蛋白質の構造の2次元モデルとして検討したものである。一方、ヘリックス構造を持ったペプチド単分子膜は①熱的、機械的に安定である ②ヘリックス単位の配向が、膜の転写時に流動場によって制御できる ③マイクロエレクトロニクスへの応用が可能である といったような特徴が認められる。また、ペプチド単体の膜のみならず、ペプチドと脂質などとの混合単分子膜についても、生体膜の機能の模倣の観点から多くの研究がなされている。

(1) ペプチドLB膜の配向

一般に高分子物質の単分子膜は、低分子に比べて熱的、機械的に安定であり、LB膜の材料化に当っては、膜の高分子化が必要である。さらに、ペプチドの配向がヘリックスという

特徴的で安定な構造であることは分子を並べる上で望ましい構造である。

糸-(γ -ベンジル-グルタマート)の単分子膜は安定にヘリックス構造を形成し、ペプチド分子は水面に対して並行に、圧縮方向に対して直角に配向することより、一般にペプチドはそのような配向を取ると考えられている。また糸-(γ -ベンジル-グルタマート)の単分子膜は π -A曲線に特徴的な平坦領域が現れ、それが1分子層から2分子層への相転移であることが見だされている(図7)。さらにこのペプチド分子は基板に対して平均35°傾斜し、水面上とは異なった挙動をする。側鎖を変えた場合のヘリックスの安定性に関しては、ペプチドをアルキル鎖で修飾する場合、その鎖長によって π -A曲線曲線のみならず、膜の結晶性も変化する。また、ペプチドを基板に転写する際、ヘリックスの軸方向が基板の引き上げの方向に揃うことが示されている。

(2) 脂質-ペプチド混合単分子膜

ポリペプチドのヘリックスは表面が疎水的なチューブ状構造であるため、脂質-ペプチド混合単分子膜を蛋白質を含む生体膜のモデルとして研究されている。脂質とペプチドの混合性については π -A曲線からの考察がなされている。図8に示すように糸(グルタミン酸-ドデシル)とステアリン酸やコレステロールは混和しないので、ペプチド特有の相転移を示すがミリスチン酸とはよく混和するので、混合比にしたがって、相転移圧が上昇する。また、脂質中のイオノホアペプチドについても検討されている。

(3) タンパク質の単分子膜

タンパク質の単分子化は構造研究の一貫として行われてきており、例えば、 α アルブミンの2次元展開性を調べ、等電点付近のタンパク質膜の A_0 は経時変化をしないことが示された。

一方、タンパク質に相互作用のある物質を用いて単分子化する研究も行われている。例えば、アルキル化したりガンドを2次元に展開し、下層液に溶解した水溶性タンパク質を吸着させて単分子膜を得ることに成功している。

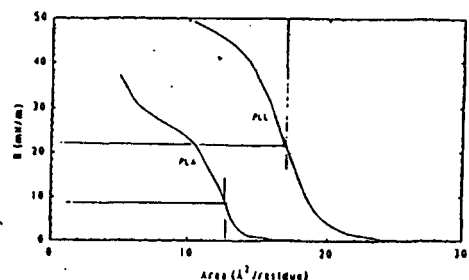


Figure 7. Surface pressure vs residual area isotherms of PLA and PLL ($T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$; subphase, double-distilled water).

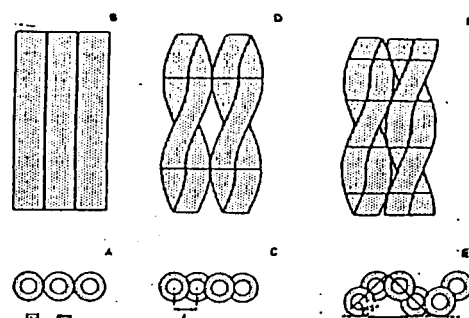


Figure 8. Organization of the α -helices at various steps of the compression isotherms: (A) and (B) side-by-side organization of the helices occurring at the lift-off point (15.0 and 24.0 $\text{\AA}^2/\text{residue}$ for PLA and PLL); (C) and (D) fully interdigitated state found at the inflection point (12.8 and 17.0 $\text{\AA}^2/\text{residue}$ for PLA and PLL); (E) and (F) close-packed structure found at the arrest point (10.4 and 14.5 $\text{\AA}^2/\text{residue}$ for PLA and PLL) (d = inter-helical distance).

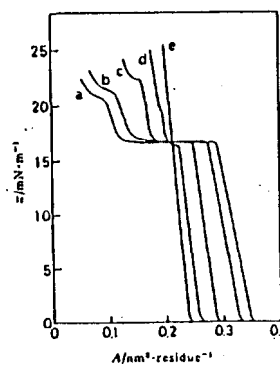


Figure 8a. Surface pressure-area curves of mixed PDOLG-stearic acid monolayers on 0.01 mol/l HCl at 25°C . a: PDOLG:Stearic acid=1:0, b: 4:1, c: 1:1, d: 1:4, e: 0:1 (residue mol: mol).

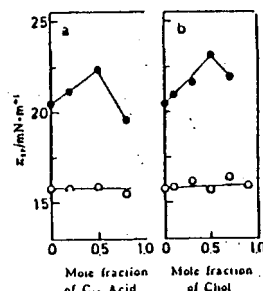


Figure 8b. Transition pressure of mixed monolayers as a function of lipid mole fraction. $\bullet$: Upper transition pressure, $\circ$: Lower transition pressure. a: PDOLG-stearic acid, b: PDOLG-cholesterol.

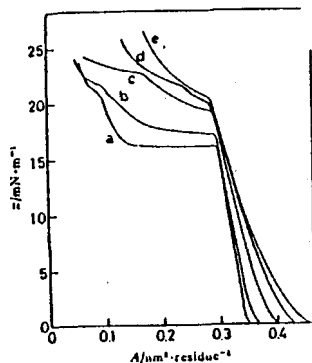


Figure 8c. Surface pressure-area curves of mixed PDOLG-myristic acid monolayers on 0.01 mol/l HCl at 25°C . a: PDOLG:Myristic acid=1:0, b: 4:1, c: 1:1, d: 1:4, e: 0:1 (residue mol: mol).

Figure 8

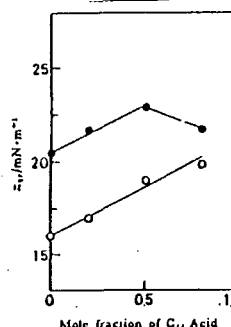


Figure 8d. Transition pressure of mixed PDOLG-myristic acid monolayers as a function of myristic acid mole fraction. $\bullet$: Upper transition pressure, $\circ$: Lower transition pressure.

Synthesis of 2'(3')-*O*-Aminoacyl-pdCpA Carrying a Photofunctional Nonnatural Amino AcidTakaaki NIINOMI and Masahiko SISIDO*[†]Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology
4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227

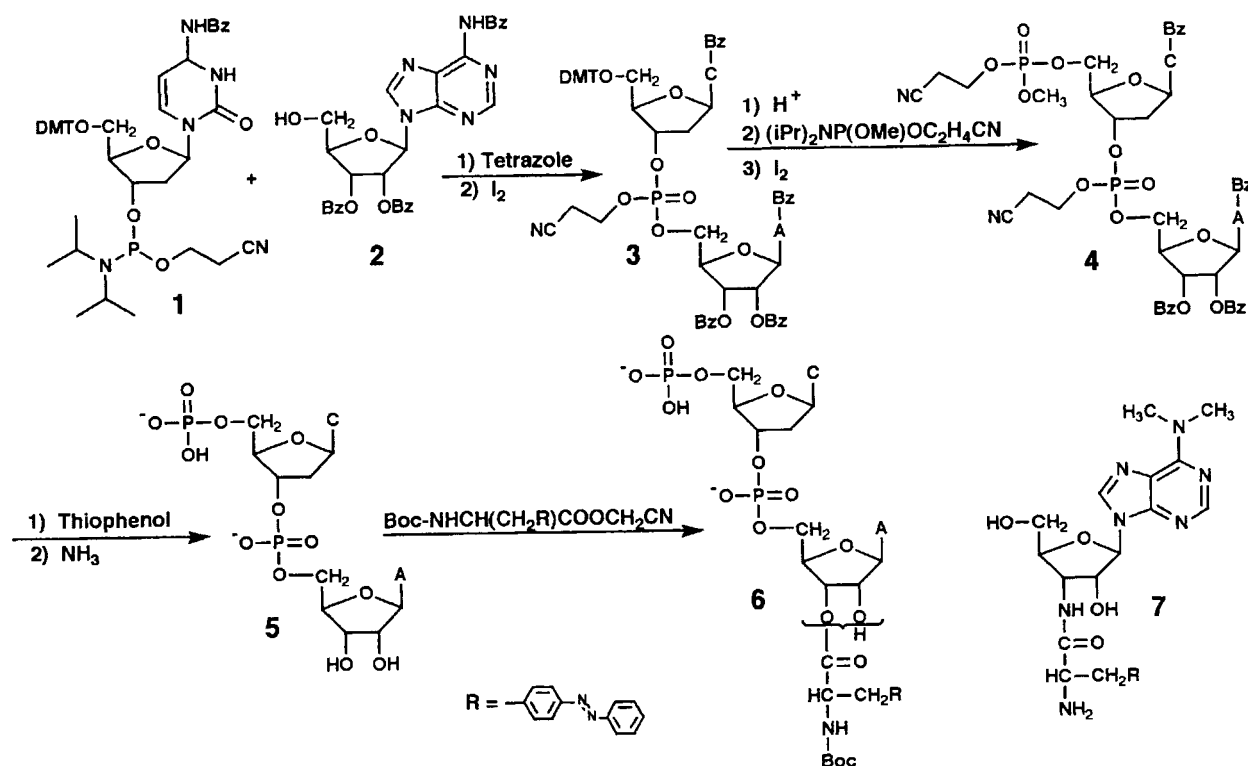
A mixed dinucleotide pdCpA, was synthesized and characterized by spectroscopic as well as enzymic analysis. The dinucleotide was acylated with an *N*-protected nonnatural amino acid (Boc-azoAla). The acylation was found to occur at the 2'(3')-*O* position exclusively.

Transfer RNA misacylated with a noncognate amino acid is known to work in protein biosynthetic system and insert the amino acid into a specific site of a protein.¹⁾ Therefore, if one can acylate a tRNA with a nonnatural amino acid, one will obtain an unusual protein in which the nonnatural amino acid is incorporated at the site that should have been occupied by the amino acid cognate to the tRNA. Since direct aminoacylation of tRNA at the 3'-*O* position of the terminal A unit seems intractable, an alternative pathway using enzymic ligation of 3'-*O*-aminoacylated pCpA with a truncated tRNA missing a terminal pCpA unit, has been proposed.²⁻⁷⁾ The semisynthetic tRNA was actually shown to work for the site-specific incorporation of nonnatural amino acids, by Brunner,⁵⁾ Schultz,⁶⁾ and Chamberlin.⁷⁾ Chamberlin and coworkers⁷⁾ showed that the C unit of pCpA can be replaced by a deoxy C (dC) unit. Although this markedly simplified the synthesis of the dinucleotide-amino acid conjugate, synthesis of the 2'(3')-*O*-aminoacyl-pdCpA is still a key step in the entire process.

In this communication we describe a synthetic route that is much simpler than earlier,³⁻⁷⁾ to an aminoacyl-pdCpA carrying a nonnatural amino acid, *L*-*p*-phenylazophenylalanine, i.e., 5'-*O*-phosphoryl-2'-deoxycytidylyl(3'-5')-[2'(3')-*O*-*L*-phenylazophenylalanyladenosine] = pdCpA-azoAla. The azobenzene units in proteins will photocontrol protein functions.

The synthetic route for pdCpA-azoAla is shown in Scheme 1. As starting materials, a commercially available deoxycytidine derivative, 4-*N*-benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxycytidylyl-3'[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]phosphoramidite **1** (American Bionetics, Inc.) was used as a dC component and 6-*N*,2'-*O*, 3'-*O*-tribenzoyladenosine⁸⁾ **2** was employed as an A component. The coupling of the dC component (480 mg) with the A component (277 mg) was carried out in a usual manner.⁹⁾ The product was fractionated with a silica gel column [MeOH/dichloromethane(DM)] in 61% yield. The 5'-*O* protecting group of the dinucleotide was removed with 5% trichloroacetic acid in DM. The crude product was

[†]Present address: Department of Bioengineering Science, Faculty of Engineering, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-Naka, Okayama 700.



Scheme 1. Synthetic route to pdCpA-azoAla-Boc (6) and structure of puromycin analog (7).

fractionated with a silica gel column (MeOH/DM) in 86% yield. Phosphorylation of the free 5'-O position was achieved with cyanoethyl(diisopropylamino)methoxyphosphine.^{9,10} The crude product was fractionated with a silica gel column (MeOH/DM) in 80% yield. ³¹P NMR showed 4 large peaks that are interpreted by a predominance of two diastereomers among RR, RS, SR, and SS isomers of the two chiral centers on the phosphorus atoms.

The fully protected dinucleotide was deprotected in two steps. The methyl ester at the 5' terminal was removed with thiophenol and the benzoyl group at the nucleic bases and the cyanoethyl esters were deprotected with aqueous ammonia. The product was fractionated with reversed phase HPLC (ODS column, eluent = acetonitrile/0.1 M ammonium acetate, pH 7.0, linear gradient with increasing acetonitrile from 0% to 50% in 50 min). The chromatogram showed three peaks. The first fraction (15%) showed the same ¹H NMR spectrum as pdCpA reported by Schultz and coworkers.⁶ The third fraction (70%) was assigned to pdCpA with cyanoethyl ester remained at the 5' phosphate. When this fraction was further treated with aqueous ammonia for 24 h, the product was identical to the first fraction. The ³¹P NMR spectrum of the first fraction showed two equivalent peaks, indicating the absence of chirality on the phosphorus atoms. The assignment of the first fraction to free pdCpA was further supported by enzymic digestion using snake venom phosphodiesterase or nuclease P1. An HPLC analysis of the products of the enzymic reaction indicated an equimolar amount of

in trifluoroacetic acid at 0 °C for 30 min, and the acid was purged off by a stream of nitrogen. The residue was washed with ether and dried under vacuum. HPLC analysis showed complete removal of the Boc group. The pdCpA-azoAla could be stored for several weeks at -20 °C.

In conclusion, pdCpA aminoacylated with a nonnatural amino acid at the 2'(3')-O position was synthesized from commercially available intermediates. The pdCpA-amino acid will be used to incorporate the nonnatural amino acid into proteins at any specific sites.

The authors appreciate professors T. Hata and M. Sekine of Tokyo Institute of Technology for their suggestions on the synthesis and enzymic analysis of pdCpA. We also wish to thank professor S. Yokoyama of The University of Tokyo for suggesting puromycin analogs.

References

- 1) F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W.J. Ray, and S. Benzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **48**, 1086 (1962).
- 2) S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa, and M. Ubasawa, *Tetrahedron*, **36**, 3075 (1980).
- 3) T.G. Heckler, L.H. Chang, Y. Zama, T. Naka, and S.M. Hecht, *Tetrahedron*, **40**, 87 (1984); T.G. Heckler, Y. Zama, T. Naka, and S.M. Hecht, *J. Biol. Chem.*, **258**, 4492 (1983).
- 4) H. Hotoda, R. Saito, M. Sekine, and T. Hata, *Tetrahedron*, **46**, 1181 (1990); Y. Ueno, T. Mishima, H. Hotoda, and T. Hata, *Chem. Lett.*, **1992**, 595.
- 5) G. Baldini, B. Martoglio, A. Schachenmann, C. Zugliani, and J. Brunner, *Biochemistry*, **27**, 7951 (1988).
- 6) C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, and P.G. Schultz, *Science*, **244**, 182 (1989); S.A. Robertson, C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, and P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2722 (1991); D. Mendel, J.A. Ellmann, and P.G. Schultz, *ibid.*, **113**, 2758 (1991); J.A. Ellman, D. Mendel, and P.G. Schultz, *Science*, **255**, 197 (1992); D. Mendel, J.A. Ellman, Z. Chang, D.L. Veenstra, P.A. Kollman, and P.G. Schultz, *ibid.*, **256**, 1798 (1992).
- 7) J.D. Bain, E.S. Diala, C.G. Glabe, T.A. Dix, and A.R. Chamberlin, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8013 (1989); J.D. Bain, E.S. Diala, C.G. Glabe, D.A. Wacker, M.H. Lyttle, T.A. Dix, and A.R. Chamberlin, *Biochemistry*, **30**, 5411 (1991); J.D. Bain, D.A. Wacker, E.E. Kuo, and A.R. Chamberlin, *Tetrahedron*, **47**, 2389 (1991); J.D. Bain, D.A. Wacker, E.E. Kuo, M.H. Lyttle, and A.R. Chamberlin, *J. Org. Chem.*, **56**, 4625 (1991).
- 8) M. Ikehara, F. Harada, and E. Ohtsuka, *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 1338 (1966).
- 9) M.J. Gait, "Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach," IRL Press, Oxford, Washington, D.C., 1984.
- 10) β -Cyanoethanol (2 g) was dissolved in DM (50 mL) at 0 °C. Diisopropylaminomethoxy-chlorophosphine (5 g) and *N,N*-diisopropylethylamine (26.5 g) were mixed and stirred at 25 °C for 30 min and the precipitate was removed. The filtrate was diluted with ethyl acetate, washed with water, dried over Na₂SO₄, and evaporated. Yield 3.9 g.
- 11) M. Taiji, S. Yokoyama, and T. Miyazawa, *J. Biochem.*, **98**, 1447 (1985).
- 12) T. Hoshaka, M. Sisido, T. Takai, and S. Yokoyama, unpublished work.

(Received May 6, 1993)

5'-dCMP and 5'-AMP, indicating a 1:1 presence of dC and A unit. The total yield of the deprotection was 84%.

Aminoacylation of pdCpA was carried out using an *N*-protected amino acid activated ester in DMF, according to Schultz et al.⁶⁾ Free pdCpA (3×10^{-3} mmol) was converted to a pyridinium form using a Dowex 50 W column (pyridinium form, 3 mL, eluted with pyridine/water = 1/1, 12 mL). The pyridinium salt was then converted to tetrabutylammonium form using a Dowex 50 W (tetrabutylammonium form, 3 mL, eluted with pyridine/water = 1/1, 12 mL). The eluted solution was evaporated and dried under vacuum. The latter was dissolved in anhydrous DMF (75 μ L) containing triethylamine (6 μ L) and mixed with 5 equivalents of *t*-butoxycarbonyl *L*-*p*-phenylazophenylalanine cyanomethyl ester (Boc-azoAla-OCM) under argon

atmosphere. The mixture was stored at room temperature for 4 days and diluted with 50 mM ammonium acetate (pH 4.5)/acetonitrile=1/1 (600 μ L). The resultant mixture was subjected to preparative HPLC under the same condition as described above.

The HPLC chart showed 6 large peaks. Reasonable absorption spectra were obtained only for two fractions that appeared at 22 min (fraction 1) and at 25 min (fraction 2). The two fractions may be assigned to pdCpA-azoAla-Boc's aminoacylated at 2'-*O* and 3'-*O* position of the adenosine unit. This was confirmed by the interconversion of the two peaks. When fraction 1 was lyophilized and analyzed again with HPLC, the chromatogram showed two peaks with the same intensity ratio (1:4) as before. The same phenomenon was observed for the fraction 2. Similar interconversion has been reported on 2'(3')-*O*-phenylalanyladenosine with a preference of the 3'-*O* derivative than the 2'-*O* derivative.¹¹⁾ Therefore, the fraction 1 may be the 2'-*O* derivative and the fraction 2 may be the 3'-*O* isomer. The combined yield of the two isomers was 69%. Both fractions showed trans/cis photoisomerization when they were irradiated with a 350 nm light (trans to cis) or with a 450 nm light (cis to trans), indicating the presence of azobenzene unit. pdCpA-azoAla-Boc showed a characteristic CD pattern at the azobenzene absorption band (Fig.1). The CD pattern is similar to that of a puromycin analog *N*-acylated with azoAla (7).¹²⁾ The resemblance strongly supports that the aminoacylation is occurring at the 3'-*O* position. The *N*-protecting group (Boc) of pdCpA-azoAla-Boc could be removed by an acid treatment. The lyophilized substance was dissolved

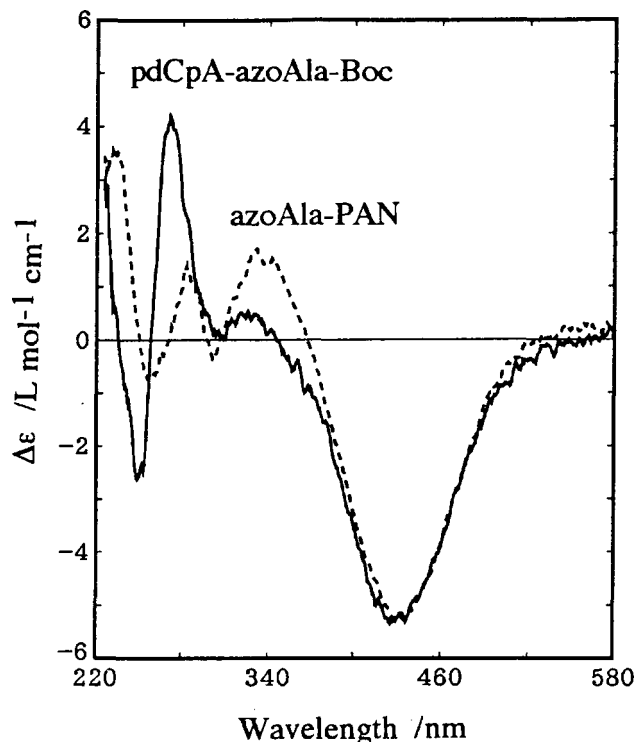


Fig.1. CD spectra of **6** and **7** in 0.1 M ammonium acetate (pH 7).

Photoswitching of NAD⁺-Mediated Enzyme Reaction through Photoreversible Antigen–Antibody Reaction

Takahiro Hohsaka, Kazuo Kawashima, and Masahiko Sisido*

Research Laboratory of Resources Utilization
Tokyo Institute of Technology
4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

Received September 17, 1993

Revised Manuscript Received November 15, 1993

Switching of biological reactions by external signals, such as light irradiation, has been attracting the interest of a number of researchers.^{1–5} On/off switching of enzymic reactions will have a large effect on the yield of final products because of the catalytic reactions of the enzymes. For this idea to be realized, however, it is crucial to attain absolute zero reactivity in the “off” state, since even minor reactivity in the “off” state will be amplified to cause significant total reactivity.

In the past, chemical modification of inhibitors, cofactors, or enzymes to attach photochromic groups, such as azobenzene or spiropyran, has been reported.^{1–8} In these examples, one of the photoisomers shows higher activity than the other, resulting in the photocontrol of biological reactions. In most cases, however, the difference of the activities of the two photochromic states is not large enough, except for a few cases.⁸ To achieve on/off switching, one should design a system in which a large effect is induced from a relatively small change in the molecular shape of photochromic groups. Another factor that may suppress the activity ratio in a system with azobenzene is that a pure *cis* state cannot be attained under UV irradiation. Therefore, the system should be “on” in the *cis* form and “off” in the *trans* form to achieve zero activity in the “off” state.

In this communication, we report a general approach to switching biological reactions using an azobenzene group combined with an antibody against a *trans*-azobenzene group. A monoclonal antibody against a nonnatural amino acid carrying an azobenzene group, *L*-*p*-(phenylazo)phenylalanine,⁹ has been prepared by our group.¹⁰ The antibody binds an azobenzene group when it is in the *trans* form, but releases it when the latter is photoisomerized to the *cis* form. The binding and release could be repeated many times. If one can attach an azobenzene group to some key substances, such as enzymes, substrates, ligands, receptors, etc., the biological activity of these substances can be photocontrolled in the presence of the antibody.¹¹ One of the

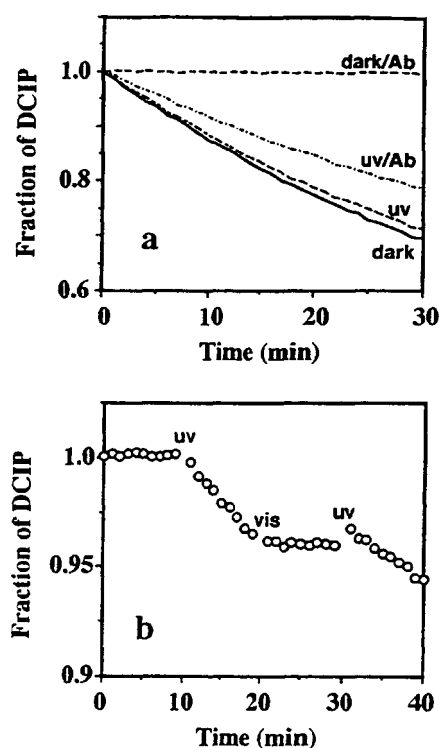


Figure 1. (a) Reduction of DCIP by the coupled enzyme system mediated with azoAla-NAD⁺: (—) in the dark without antibody; (---) after UV irradiation without antibody; (---) in the dark with antibody; (—) after UV irradiation with antibody. (b) A profile of on/off switching of the coupled enzymic reaction.

important features of the azobenzene/antibody system is that the antibody binds and inactivates the *trans* form and can provide the “off” state.

We have chosen NAD⁺ as the key compound and modified it with an azobenzene group. NAD⁺ acts as a common coenzyme for a large number of oxidoreductases in the respiration system. The control of NAD⁺ activity by the binding of antibody has been reported by Carrico et al.¹² They showed that DNP-bound NAD⁺ was inactivated by the addition of anti-DNP antibody.

As an azobenzene-bound NAD⁺ derivative, a conjugate of *L*-*p*-(phenylazo)phenylalanine (azoAla) methyl ester and *N*⁶-carboxymethyl-substituted NAD⁺¹³ (azoAla-NAD⁺, 1) was designed.¹⁴

X-ray crystallographic analysis of several enzyme–NAD⁺ complexes revealed that the amino group of the adenine ring is exposed to the solvent,¹⁵ suggesting that substitution of this amino group will not severely reduce its activity. In fact, *N*⁶-substituted NAD⁺ has been shown to retain high activity.^{12,13,16,17} The azobenzene-bound NAD⁺ was added to a coupled enzyme system

* To whom correspondence should be addressed. Present address: Department of Bioengineering Science, Faculty of Engineering, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700, Japan.

(1) Erlanger, B. F. *Annu. Rev. Biochem.* 1976, 45, 267–283.

(2) Martinek, K.; Berezin, I. V. *Photochem. Photobiol.* 1979, 29, 637–649.

(3) (a) Namba, K.; Suzuki, S. *Chem. Lett.* 1975, 947–970. (b) Aizawa, M.; Namba, K.; Suzuki, S. *Arch. Biochem. Biophys.* 1977, 182, 305–310.

(4) For recent examples of irreversible control of enzyme activities, see: (a) Turner, A. D.; Pizzo, S. V.; Rozakis, G. W.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 1274–1275. (b) Turner, A. D.; Pizzo, S. V.; Rozakis, G. W.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 244–250. (c) Mendel, D.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 2758–2760.

(5) (a) Willner, I.; Rubin, S.; Riklin, A. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 3321–3325. (b) Willner, I.; Rubin, S.; Cohen, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4937–4938.

(6) Westmark, P. R.; Kelly, J. P.; Smith, B. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 3416–3419.

(7) Karube, I.; Nakamoto, Y.; Suzuki, S. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 445, 774–779.

(8) Willner, I.; Rubin, S.; Zor, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4013–4014.

(9) Goodman, M.; Kossoy, A. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 5010–5015.

(10) Harada, M.; Sisido, M.; Hirose, J.; Nakanishi, M. *FEBS Lett.* 1991, 286, 6–8.

(11) Similar experiments have been reported as a method for enzyme immunoassay: Rubenstein, K. E.; Schneider, R. S.; Ullman, E. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972, 47, 846–851.

(12) (a) Carrico, R. J.; Christner, J. E.; Boguslaski, R. C.; Yeung, K. K. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 271–282. (b) Schreder, H. R.; Carrico, R. J.; Boguslaski, R. C.; Christner, J. E. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 283–292.

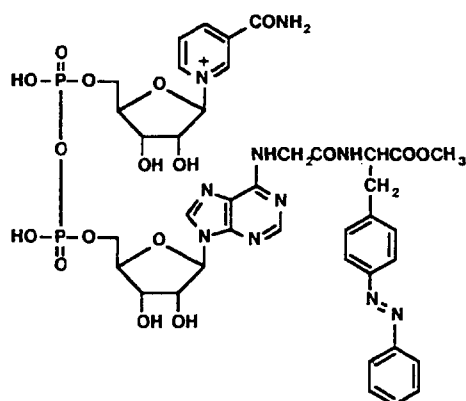
(13) Lindberg, M.; Larsson, P.-O.; Bosbach, K. *Eur. J. Biochem.* 1973, 40, 187–193.

(14) The azoAla-NAD⁺ was synthesized from azoAla methyl ester and *N*⁶-carboxymethyl-substituted NAD⁺ by using water soluble carbodiimide in 50% aqueous dioxane. The crude product was purified to a single peak in reversed-phase HPLC. The product showed 1:1 incorporation of the azobenzene group and NAD⁺ in the absorption spectrum and reasonable enzymatic activity.

(15) Rossmann, M. G.; Liljas, A.; Branden, C.-I.; Banaszak, L. J. In *The Enzymes*, 3rd ed.; Boyer, P. D., Ed.; Academic Press: New York, 1975; Vol. 11, Chapter 2.

(16) Windmueller, H. G.; Kaplan, N. O. *J. Biol. Chem.* 1961, 236, 2716–2726.

(17) As PEG–NAD⁺ conjugates, for example, see: (a) Furukawa, S.; Katayama, N.; Iizuka, T.; Urabe, I.; Okada, H. *FEBS Lett.* 1980, 121, 239–242. (b) Buckmann, A. F.; Kula, M.-R.; Wichmann, R.; Wandrey, C. *J. Appl. Biochem.* 1981, 3, 301–315.



consisting of alcohol dehydrogenase, which reduces NAD^+ to NADH , and diaphorase, which oxidizes NADH to NAD^+ with an appropriate electron acceptor. As the latter acceptor, we have chosen 2,6-dichlorophenol-indophenol sodium salt (DCIP), because the reduction process can be followed by the fading of blue color.

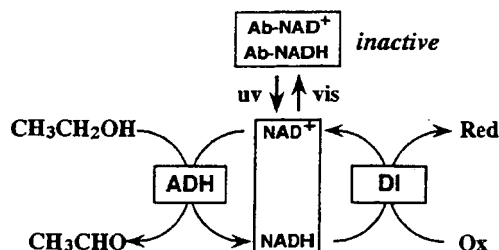
As shown in Figure 1, the reduction of DCIP in the coupled enzyme system¹⁸ is mediated by the azoAla- NAD^+ either in the trans state or in the cis state, with a little smaller rate in the latter state.¹⁹ When the antibody was added to the enzyme system in the dark, the reduction of DCIP was completely stopped. The mediation activity recovered to about 72% of the inherent activity of azoAla- NAD^+ by the UV irradiation.²⁰ The incomplete recovery may be due to incomplete photoisomerization to the cis state. Addition of a large amount of azoAla methyl ester to the

(18) The reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM ethanol, 0.02 mM DCIP sodium salt, 1.25 units/mL yeast alcohol dehydrogenase, and 2.5 units/mL *Clostridium kluyveri* diaphorase. The reaction was initiated by adding azoAla- NAD^+ (total 0.5 μM) with or without the antibody (total 0.25 μM). The reaction was carried out at 25 °C and followed by the absorbance of DCIP at 600 nm.

(19) A Hg-Xe lamp with a bandpass filter (350 $\pm$ 20 nm) was used for UV irradiation of azoAla- NAD^+ . A cutoff filter (>420 nm) was used for visible light irradiation.

(20) NADH is also photoexcited by the UV irradiation, and the excited NADH would reduce DCIP directly. The possible nonenzymatic reduction of DCIP, however, could not be detected in a control experiment in the absence of diaphorase and the antibody.

Scheme 1. Schematic Illustration of Photoreversible NAD^+ -Mediated Coupled Enzyme Reaction. ADH = alcohol dehydrogenase; DI = diaphorase



system in the presence of the antibody in the dark also recovered the mediation activity. This is interpreted in terms of the inhibitory effect of the azoAla methyl ester that competes with the azoAla- NAD^+ for the binding sites of the antibody.

Visible light irradiation of the UV-irradiated mixture again suppressed the mediation effect, and the photocontrol could be repeated many times under alternating photoirradiation with UV (on) and visible (off) light. This is expected since the azobenzene-antibody binding has been shown to be photoreversible.¹⁰

To conclude, the azoAla- NAD^+ -mediated enzyme reaction could be photoswitched reversibly in the presence of the antibody against the *trans*-azobenzene group. The mechanism of the photoswitching may be illustrated as depicted in Scheme 1. There are several advantages in the present system. First, a complete "off" state was attained by the blocking of the *trans*-azobenzene group with the antibody. Second, since NAD^+ is a commonly occurring mediator in a variety of oxidoreductases, this principle can be easily applied to other systems. Furthermore, since the antibody against the azobenzene group may undergo little cross reactions toward other proteins, the azobenzene/antibody couple can be utilized in a wide variety of biological systems, if one can attach an azobenzene group to some key substances, such as enzymes, coenzymes, inhibitors, etc.

Acknowledgment. The authors wish to thank Professor K. Ichimura of the Tokyo Institute of Technology for helpful discussion. They also appreciate Mr. M. Harada for preparing the antibody against *trans*-azobenzene.

分子識別機能 (1)

株式会社クラレ 中路修平

研究例

以下に、タンパク-タンパク相互作用を有するタンパクをモデルとした、ペプチドの分子識別機能についての研究例を報告する。

1. ペプチドによるタンパク分解酵素の分子識別

血液凝固系酵素と結合し凝固活性を阻害するペプチドに関する研究例が多く報告されている。種々のペプチドでの凝固阻害活性の研究例を表1に(文献1)、hirudinに関する研究例を表2に示す(文献2,3)。

図1 thrombinによるfibrinogen分解

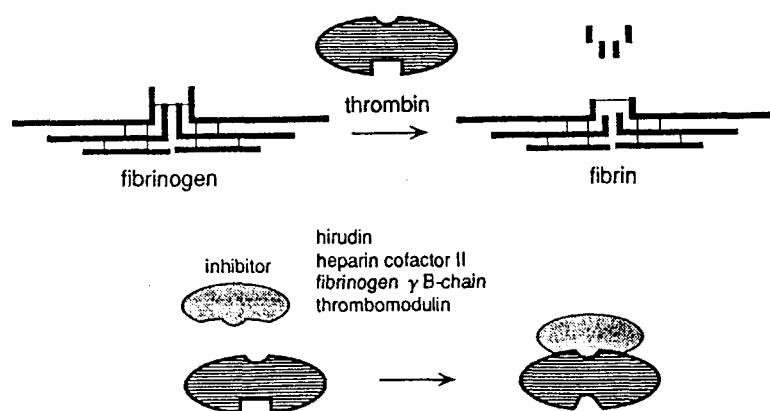


表1 Potencies of synthetic peptides as inhibitors of thrombin's clotting activity

Peptide	IC ₅₀ (μM)
Hirudin(54-65)SO ₄	0.17
Hirudin(54-65)	1.3
HCII(49-75)	28
HCII(54-75)	38
γB-chain(410-427)	130
Tm(426-444)	140
AP-19	>500*
CCK(1-8)SO ₄	>100*

*Highest concentration tested

表2 Fibrin Clot Inhibition

no.	compound	IC ₅₀ , ^a μM
1	hirudin ₅₄₋₆₅ Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH	3.7 ^b
2	hirudin PA ₅₄₋₆₆ Gly-Asp-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Asp-Ala-Tyr-Asp-Glu-OH	2.7 ^b
3	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH	0.15
4	Suc-Tyr(OSO ₃ H)-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH	1.7
5	Suc-Phe(p-NO ₂)-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH	2.8
6	Suc-Phe(p-NH ₂)-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH	1.3
7	Suc-Phe(p-NHSO ₃ H)-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH	13.1
8	Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-D-Glu-OH	1.6
9	Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr(OSO ₃ H)-Leu-D-Glu-OH	0.087
10	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(p-NO ₂)-Leu-D-Glu-OH	2.8
11	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(p-NH ₂)-Leu-D-Glu-OH	0.38
12	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Phe(p-NHSO ₃ H)-Leu-D-Glu-OH	0.12
13	Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Tyr-D-Glu-OH	1.2
14	Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Tyr(OSO ₃ H)-D-Glu-OH	0.30
15	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Phe(p-NO ₂)-D-Glu-OH	0.71
16	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Phe(p-NH ₂)-D-Glu-OH	2.9
17	Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Phe(p-NHSO ₃ H)-D-Glu-OH	2.5
18	Suc-Tyr-Ser-Pro-Ile-Pro-Ser-Ser-Ala-Cha-Ser-OH	>76
19	Suc-Tyr-Ser(OSO ₃ H)-Pro-Ile-Pro-Ser(OSO ₃ H)-Ser(OSO ₃ H)-Ala-Cha-Ser(OSO ₃ H)-OH	0.21

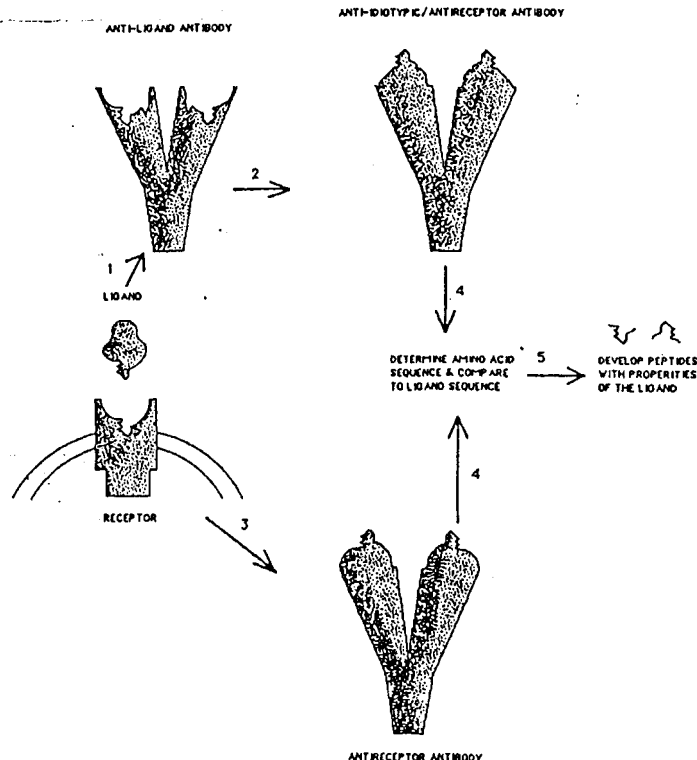
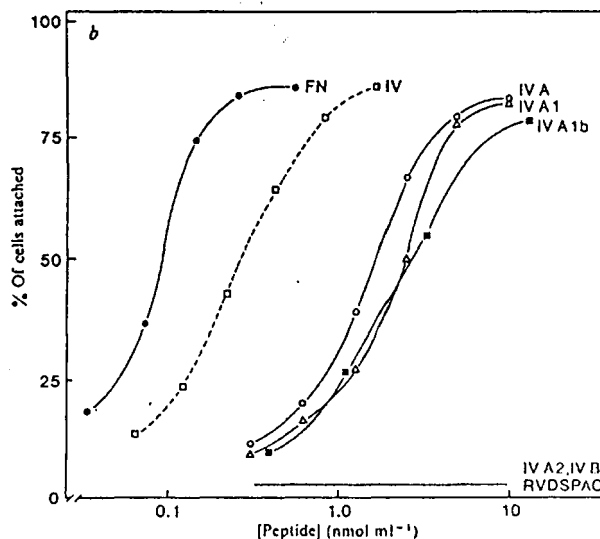
^aIC₅₀ = molar dose of peptide that results in 50% inhibition of fibrin clot formation relative to a blank control after thrombin added to plasma.

2. ペプチドによるレセプタの分子識別

細胞接着タンパクfibronectinと細胞上のレセプタが結合することから、fibronectinの部分ペプチドを作製し、RGD配列がレセプタに結合することを見いだした(図2、文献4,5)。また、Williamsらにより Reo3 virusとReo3Rに結合するモノクローナル抗体のアミノ酸配列の一致する配列から、Reo3Rに結合するペプチドを作製したことが報告されている(図3、表3、文献6)。

Code ^a	Sequence	Concentration for 50% cell attachment
Fibronectin		0.10 nmol ml ⁻¹
IV	Y A V T G R G D S P A S S K P I S I N Y R T E I D K P S Q M (C)	0.25
IVA	V T G R G D S P A S S K P I (C)	1.6
IVB	S I N Y R T E I D K P S Q M (C)	> 50.0
IVA1	V T G R G D S P A (C)	2.5
IVA2	S P A S S K P I S (C)	> 50.0
IVA1a	V T G R G D (C)	10.0
IVA1b	G R G D S (C)	3.0
IVA1c	R G D S P A (C)	6.0
RVDS	R V D S P A (C)	> 50.0

2 Attachment of NRK cells to immobilized fibronectin and synthetic fibronectin peptides. *a*, Peptides were synthesized by Peninsula Laboratories (Belmont, California) according to our specifications, to include a COOH-terminal cysteine (C). The activity of each peptide is indicated on the right of the figure by the concentration necessary to achieve 50% maximal attachment in the assay described below. *b*, The synthetic peptides were assayed for their ability to promote the attachment of NRK cells by first attaching the peptides via the heterobifunctional cross-linker SPDP (*N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate; Sigma) to rabbit IgG which had been immobilized on polystyrene³. By using radio-labelled peptides or antibodies to the larger peptides, we have determined that coupling of the peptides using this method is more than 85% complete (data not shown). Peptides not containing a cysteine are not included in the figure as the methods used to immobilize them appeared to be less efficient (see text). The attachment assay was carried out as described³⁵ using freshly trypsinized NRK cells. After incubation for 1 h at 37°C, those cells which had attached were fixed, stained and quantitated using either an Artek cell counter or a vertical pathway spectrophotometer. In all cases, maximum attachment was ~80-90% of the cells plated. The titration curves for whole fibronectin (FN) and peptide IV (ref. 3) are shown here for comparison.



3 General strategy for the development of receptor binding peptides based on antibody structure. A ligand-receptor interaction is depicted. In (1), the ligand is utilized as an immunogen to develop anti-ligand antibodies. In (2), these anti-ligand antibodies are utilized as an immunogen to develop anti-idiotypic/antireceptor antibodies, which mimic the ligand functionally. In (3), the receptor is utilized directly as the immunogen for the development of antireceptor antibodies, some of which also mimic the ligand. In (4), the amino

acid sequence of the variable regions of the antireceptor antibody are determined. These sequences are compared to the sequence of the ligand to establish areas of sequence similarity. In (5), peptides are developed based on these sequences, and their activities tested. These peptides can be further modified, to investigate specific structural features involved in receptor binding, and the information gained can be utilized to develop novel biologically active compounds that interact with the receptor.

表3 Sequence similarities between amino acids 317-332 of the HA3 and a combined determinant composed of the second complementarity determining regions (CDR II) of both V_H (residues 43-56) and V_L (residues 39-55) of 87.92.6. These sequences are shown here, termed Reo for the HA3 determinant, V_L for the 87.92.7 V_L CDR II, and V_H for the 87.92.6 V_H CDR II. Identities are shown with an (o) while amino acids of the same class are shown with a (+).

V_H: Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly
 Reo: Gln Ser Met --- Trp Ile Gly Ile Val Ser Tyr Ser Gly Ser Gly Leu Asn
 V_L: Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln

3. ペプチドによる抗体の分子識別

ペプチドを用いたエピトープ同定法に関する研究例を示す(文献7,8)。これらの研究は抗原の部分ペプチドを系統的に合成しエピトープを同定したものであり、この方法により抗体を識別するペプチドを得ることが可能である。

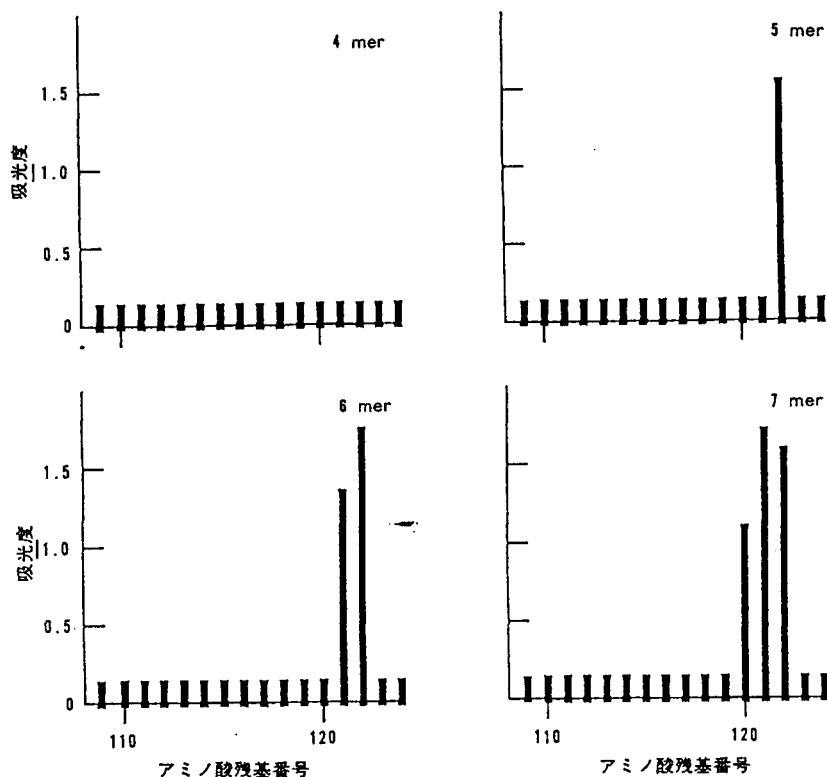
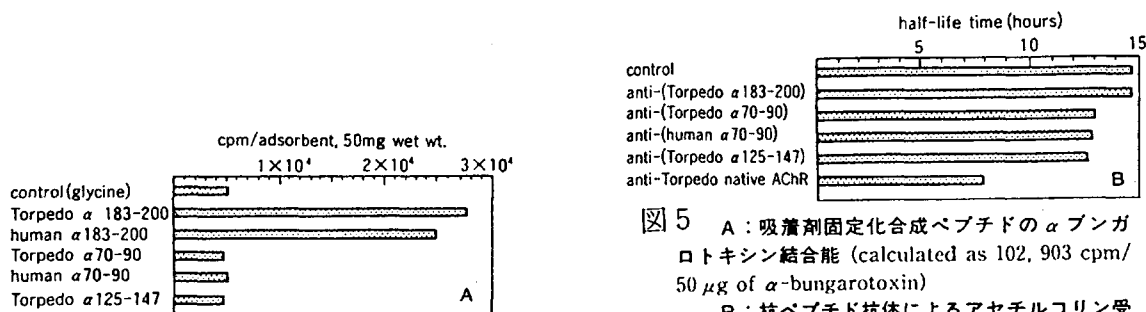


図4 ペプチドのアミノ酸残基数による抗体の反応性の違い
クジラミオグロビンの一次構造をもとに4, 5, 6および7アミノ酸からなるオーバーラップペプチドを合成して、ラット抗血清の反応を調べた

次に重症筋無力症の治療を目的とした抗体識別ペプチドの研究例を示す。重症筋無力症は、アセチルコリン受容体(AChR)に対する自己抗体(抗AChR抗体)ができることにより発症するもので、自己抗体と特異的に結合するペプチドを用いた治療が試みられている(文献9～13)。



5 A: 吸着剤固定化合成ペプチドの α ブンガ
 ロトキシン結合能 (calculated as 102, 903 cpm/
 50 μ g of α -bungarotoxin)
 B: 抗ペプチド抗体によるアセチルコリン受
 容体崩壊速度の修飾

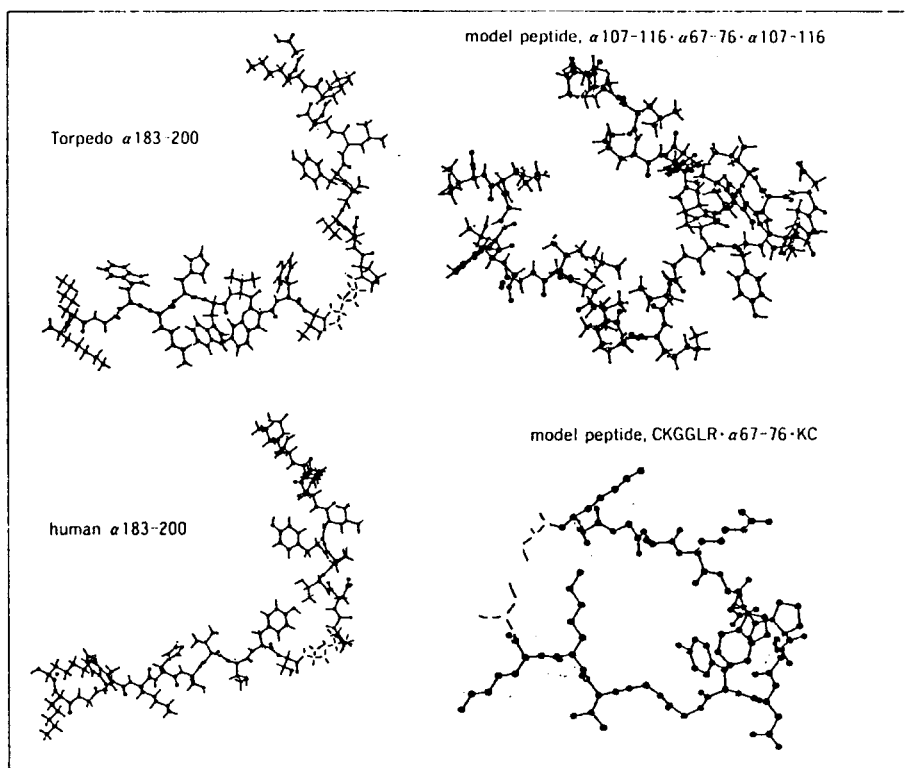


図6 AChR α サブユニット4領域合成ペプチド（2つは人工的アミノ酸配列を連結したモデルペプチド）の水溶液中での立体構造 computer-graphic
核磁気共鳴法（NMR）で0.005M水溶の合成ペプチドを構成する一連のアミノ酸のプロトン間核 overhauser 効果を観測してプロトン間距離を予測，結果を Braun-Go 法によるディスタンス・ジオメトリーで系統的に解析，立体構造を描出した。

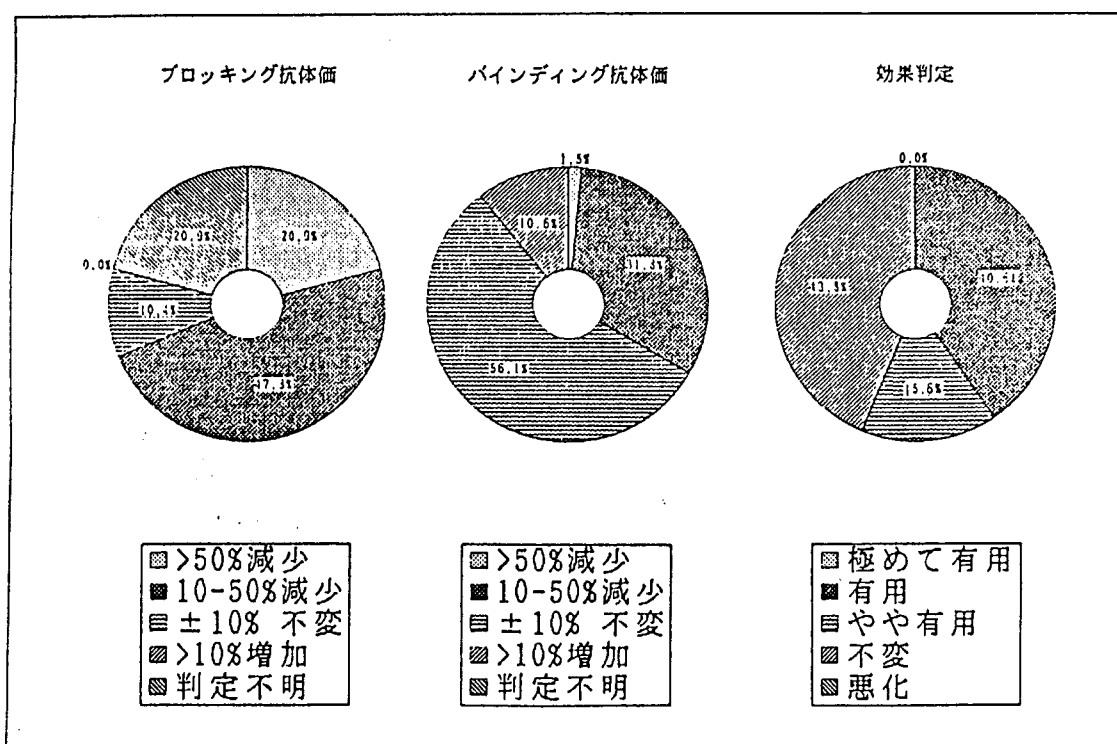


図7 重症筋無力症22例における免疫吸着療法（77回施行）の効果
注：「判定不明」は本治療前値が正常範囲内のもの。

4. その他

MLCKペプチドとカルモジュリン、プロテインAペプチドとIgG、ミオシンペプチドとF-アクチン等多くの報告がある。詳細については文献14、15等を参照していただきたい。

参考文献

- 1) Hortin, L. et al.: Inhibition of thrombin's clotting activity by synthetic peptide segments of its inhibitors and substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 437, 1990
- 2) Krstenansky, J. L. et al.: Design, Synthesis and antithrombin activity for conformationally restricted analogs of peptide anticoagulants based on the C-terminal region of the leech peptide, hirudin. *Biochim. Biophys. Acta*, 957: 53, 1988
- 3) Payne, M. H. et al.: Positional effects of sulfation in hirudin and hirudin PA related anticoagulant peptides. *J. Med. Chem.*, 34: 1184, 1991
- 4) Pierschbacher, M. D. et al.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(3): 30, 1984
- 5) 松田武久: 細胞接着制御の基礎的研究と臓器工学への応用. 生体材料, 10: 18, 1992
- 6) Williams, W. V. et al.: Development and use of receptor binding peptides derived from antireceptor antibodies. *BIO/TECHNOLOGY*, 7: 471, 1989
- 7) 岡橋暢夫, 他: 合成ペプチドを用いたエピトープの同定法—エピトープスキャン法. 実験医学, 10: 2117, 1992
- 8) Geysen, H. M. et al.: Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods*, 102: 259, 1987
- 9) Takamori, M. et al.: A synthetic peptide, torpedo californica α 183-200, of the acetylcholine receptor as a tool for immunoadsorption via plasma perfusion in myasthenia gravis. *Artif. Organs Today*, 1: 53, 1991
- 10) Takamori, M. et al.: Myasthenogenic significance of synthetic α -subunit peptide 183-200 of Torpedo californica and human acetylcholine receptor. *J. Neurol. Sci.*, 85: 121, 1988
- 11) 高守正治: 重症筋無力症の新しい治療の展望. 神経内科治療, 7: 503, 1990
- 12) 岡樹一郎, 他: アセチルコリン受容体合成ペプチドを固定化した重症筋無力症治療用吸着材の開発. 人工臓器, 22: 194, 1993
- 13) 高守正治: アセチルコリン受容体分子構造と抗体. 医学のあゆみ, 165: 102, 1993
- 14) 浅野朗: 合成ペプチドによるタンパク質-タンパク質相互作用の研究. 化学, 43: 202, 1988
- 15) Luckas, T. J. et al.: Calmodulin binding domains: characterization of a phosphorylation and calmodulin binding site from myosin light chain kinase. *Biochemistry*, 25: 1458, 1986

分子識別機能 (2)

大阪工業技術試験所
湯元 昇

【技術概要】

生理活性ペプチド-受容体や抗原ペプチド-抗体の系では非常に特異的かつ高親和的（解離定数、 10^{-9} M以下）な結合がみられる。受容体や抗体は数百のアミノ酸からなるタンパク質であるが、ペプチドどうしがそれぞれを特異的に分子識別して高親和的に結合するためには、どのようなアミノ酸配列で、どの程度の長さが必要なのだろうか？この問題に対して四つの興味深いアプローチが報告されている：

- ①ランダム・ペプチド・ライブラリーのスクリーニング
- ②相互作用タンパク質のフラグメント化
- ③DNA相補的ペプチド法
- ④ハイドロパシー（疎水親水度）相補法。

そこで、以下にそれぞれのアプローチの研究例を示した。

【研究例】

①ランダム・ペプチド・ライブラリーのスクリーニング

アミノ酸5個からなるペプチドを例として考えても、それが天然型の20種類のアミノ酸からのみ成るとした場合に320万種類、D-型を含む40種類のアミノ酸の場合には1億以上という膨大な異なる配列が存在する¹⁾。従って、できるだけ理論値に近い数のペプチドをランダムに発生させてライブラリーを構築すれば、その中に望みの機能をもつものが存在しても不思議ではない。表-1に示したようにペプチド・ライブラリーを構築する方法には、大別するとランダム遺伝子DNAを用いる遺伝子工学による方法と、化学合成による方法とがある。遺伝子工学による方法（図-1）ではスクリーニングによって得られたペプチドの増幅や構造決定は容易であるが、天然型アミノ酸しか組み込めないことと、既存のタンパク質の末端にペプチドを融合させるため、ペプチドの長さに制限がある等の欠点がある。一方、化学合成による方法では非天然型アミノ酸の組み込みは自由であるが、膨大な種類を含むライブラリーでは個々のペプチド量が極めて微量になるためスクリーニングの感度が重要となる。このようなランダム・ペプチド・ライブラリーを用いたこれまでの研究では、スクリーニングが容易な抗体の結合部位（エピトープ）の決定が主である。しかし最近、特定の糖鎖を認識して結合するレクチンの一種であるコンカナバリンA (ConA) に特異的に結合するペプチドがこのペプチド・ライブラリーによる方法によって得られている^{12, 13)}。この結果は、本来はペプチドでない生理活性物質をペプチドに置き換えることが可能であることを示しており、薬理学的にも大きな関心をよんでいる。

表-1. 1000以上のペプチドを含むペプチド・ライブラリーの構築法

	遺伝子工学		化学合成		
	ファージ法	プラスミド法	ピン法	ビーズバッグ法	光制御法
ペプチドの支持体	ファージ頭部 タンパク質	リポソーム タンパク質	ポリスチレン製 ピン	ポリスチレン製 ビーズ	アミノ化 ガラス
方法の概要	①ファージ遺伝子の挿入(NNK)。 ②ファージ・ライブラリーの構築 ③スクリーニング ④DNA塩基配列決定	①ファージ遺伝子の挿入(NNK)。 ②大腸菌での発現 リポソーム・プラスミド複合体の形成 ③スクリーニング ④DNA塩基配列決定	①96穴プレートと合うピンを用意 ②ピン上でのペプチド合成(Fmoc法) ③スクリーニング	①ビーズをポリスチレンバッグに分取 ②複数のバッグを同一瓶内で合成(Fmoc, Boc法) ③スクリーニング	①ガラス表面をアミノ化 ②光感受性保護基を用いたペプチド合成 ③スクリーニング
特 徴					
長 所	増幅可能 配列決定容易	増幅可能 配列決定容易	非天然アミノ酸の取り込み可能	非天然アミノ酸の取り込み可能	非天然アミノ酸の取り込み可能
短 所	ペプチド長に限定 非天然型不可	リポソーム・プラスミド複合体不安定	ピン上の合成量少	超多種類の合成不可	合成量少
応用例	ConA結合ペプチドの検索 (YPY)	抗インフルエンザ抗体の結合配列の決定 (RQFKVV)	抗マラリア抗体の結合配列の決定 (ETTET)	抗ブドウ球菌抗体の結合配列の決定 (RRWWCR)	抗インフルエンザ抗体の結合配列の決定 (YGAFM)
文 献	(12)	(6)	(14)	(8)	(9)

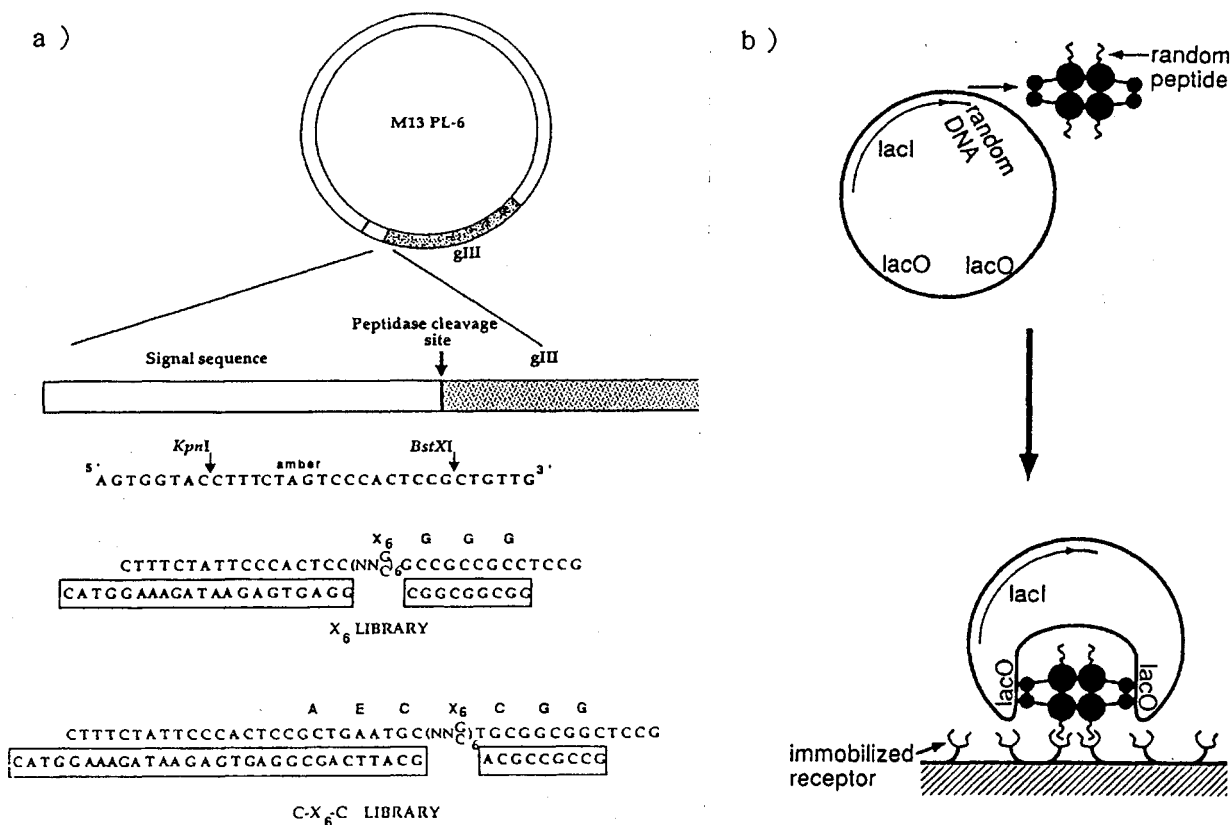


図-1. 遺伝子工学によるランダム・ペプチド・ライブラリーの構築法
a) ファージ法⁵⁾、b) プラスミド法⁶⁾

② 特異的結合タンパク質のフラグメント化

あるペプチドに対して特異的に結合するタンパク質のアミノ酸配列が明らかになっている場合、20残基程度の部分ペプチドを連続的に合成し、生理活性ペプチドと高親和的に結合する部分を探索しようとする方法である。この方法によって、ヘビ毒中に含まれる神経毒である α ブンガロトキシンの結合タンパク質の部分ペプチドの中に2 μ Mの親和性で結合するものが見いだされている(表-2)¹⁸⁾。

③ DNA相補的ペプチド法

あるペプチドをコードするDNAと相補的なDNAによってコードされるペプチド(相補的ペプチドと呼ばれる)はお互いに結合しようという仮説(分子認識仮説)が提唱されている。これはDNAの相補性と翻訳されたペプチドの相補性を直接関連付ける大胆な仮説であり、疑問点も多いが、実例はかなり蓄積してきている(表-2)^{19, 20)}。その中で、ACTHに対して0.3 nMの高親和性で結合するペプチドが見いだされている。

④ ハイドロパシー(疎水親水度)相補法

ペプチドの側鎖のハイドロパシーが相補的になるように相手のペプチドを設計する方法である。例えば、親水性度が高くハイドロパシー値が-4.5と最も低いアルギニンに対してはハイドロパシー値の最も高いイソロイシン(+4.5)、バリン(+4.2)、ロイシン(+3.8)を当てるというような方法である。実例としては、腫瘍壊死因子に対して10 nMの高親和性で結合するペプチド(14残基のペプチドの8量体)が得られている(表-2)²²⁾。

表-2. ペプチド間の分子識別の例

標的ペプチド (残基数)	分子識別ペプチド (残基数)	解離定数 (M)	文献
α ブンガロトキシン (74)	結合蛋白部分ペプチド (20)	2×10^{-6}	(16)
黄体形成ホルモン (LH) β 第7ユニット (116)	α 第7ユニットの部分ペプチド (26)	未決定	(17)
副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) (39)	DNA相補的ペプチド (24)	3×10^{-10}	(19)
γ エンドルフィン (17)	DNA相補的ペプチド (17)	2×10^{-5}	(19)
リボヌクレアーゼ S ペプチド (20)	DNA相補的ペプチド (20)	1×10^{-6}	(19)
サブスタンス P (11)	DNA相補的ペプチド (9)	6×10^{-6}	(19)
インシュリン (21+30)	DNA相補的ペプチド (6)	3×10^{-9}	(21)
腫瘍壊死因子 (TNF) (157)	ハイト・ロハ・シー相補ペプチド (14x8)	1×10^{-8}	(22)
c-ras癌遺伝子産物部分ペプチド (20)	ハイト・ロハ・シー相補ペプチド (20)	8×10^{-6}	(23)

【文献】 (特に重要なものを除き1991年以降の文献を示した)

1. ランダム・ペプチド・ライブラリーのスクリーニング

1) 総説

1. G. Jung & A.G. Beck-Sickinger (1992) Multiple peptide synthesis methods and their applications., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 31, 367-383.

2) ライブラリーの構築法

2. R.N. Zuckermann et al. (1992) Identification of highest-affinity ligands by affinity selection from equimolar peptide mixtures generated by robotic synthesis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4505-4509.
3. R. Frank (1992) Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support., Tetrahedron, 48, 9217-9232.
4. R.B. Christian et al. (1992) Simplified methods for construction, assessment and rapid screening of peptide libraries in bacteriophage., J. Mol. Biol., 227, 711-718.
5. K.T. O'Neil et al. (1992) Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library., Proteins: Structure, Function, and Genetics, 14, 509-515.
6. M.G. Cull et al. (1992) Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor.
7. K.S. Lam et al. (1991) A new type of synthetic peptide library for

identifying ligand-binding activity., *Nature*, 354, 82-84.

8. R.A. Houghten et al. (1991) Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery., *Nature*, 354, 84-86.
9. S.P.A. Fodor et al. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis., *Science*, 251, 767-773.

3) スクリーニングの実例

10. Z. Songyang et al. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences., *Cell*, 72, 767-778.
11. Y.-H. Chu et al. (1993) Using affinity capillary electrophoresis to identify the peptide in a peptide library that binds most tightly to vancomycin., *J. Org. Chem.*, 58, 648-652.
12. K.R. Oldenburg et al. (1992) Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5393-5397.
13. J.K. Scott et al. (1992) A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5398-5402.
14. A.M. Lew et al. (1989) A protective monoclonal antibody recognizes a linear epitope in the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium chabaudi adami*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3768-3772.

2. 特異的結合タンパク質のフラグメント化

15. H.M. Rarick et al. (1992) A site on rod G protein α subunit that mediates effector activation., *Science*, 256, 1031-1033.
16. K.E. McLane et al. (1991) Identification of sequence segments forming the α -bungarotoxin binding sites on two nicotinic acetylcholine receptor α subunits from the avian brain., *J. Biol. Chem.*, 266, 15230-15239.
17. S.R. Krystek, Jr. et al. (1991) Identification of subunit contact sites on the α -subunit of lutropin., *Biochemistry*, 30, 1858-1864.
18. T.A. Santa-Coloma & L.E. Reichert, Jr. (1991) Determination of α -subunit contact regions of human follicle-stimulating hormone β -subunit using synthetic peptides., *J. Biol. Chem.*, 266, 2759-2762.

3. DNA相補的ペプチド法

19. K.L. Bost & J.E. Balalock (1989) Preparation and use of complementary peptides., *Methods Enzymol.*, 168, 16-28.
20. J.E. Balalock et al. (1989) Use of peptides encoded by complementary RNA for generating anti-idiotypic antibodies of predefined specificity., *Methods Enzymol.*, 178, 63-74.
21. V.P. Knutson (1988) Insulin-binding peptide., *J. Biol. Chem.*, 263, 14146-14151.

4. ハイドロパシー (疎水親水度) 相補法

22. G. Fassina et al. (1992) Binding of human tumor necrosis factor α to multimeric complementary peptides., *Arch. Biochem. Biophys.*, 296, 137-143.
23. G. Fassina et al. (1989) Recognition properties of peptides hydropathically complementary to residues 356-375 of the c-raf protein., *J. Biol. Chem.*, 264, 11252-11257.

膜機能とペプチド

大阪工業技術試験所
田口隆久

【技術概要】

生体膜とペプチドとの相互作用には脂質二重膜とペプチド・膜タンパク質とペプチドがある。両者に関して、生体試料から様々な活性を持つペプチドが知られてきている。これらをモデル材料として化学修飾を加えたペプチド機能の研究、あるいは、タンパク質の部分構造をモデル化した機能性ペプチド合成の研究が進められている。これらの知見は生体機能の制御、及び高感度センサーの開発へと結びつくものと期待される。

【研究例】

(1) 脂質二重膜とペプチドの相互作用 (イオノフォア)

A. キャリアータイプ

B. チャンネルタイプ

バリノマイシン (12)

グラミシジン A (15)

アラメチシン (18)

(ノナクチン)

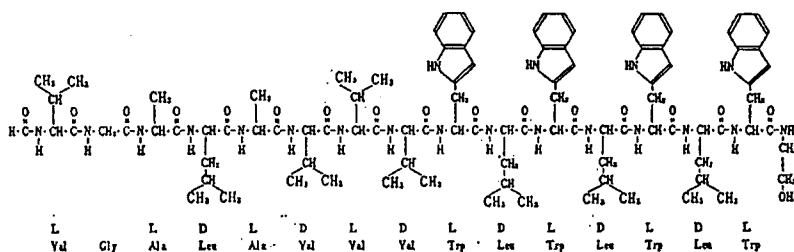
(ナイスタチン)

(A23187)

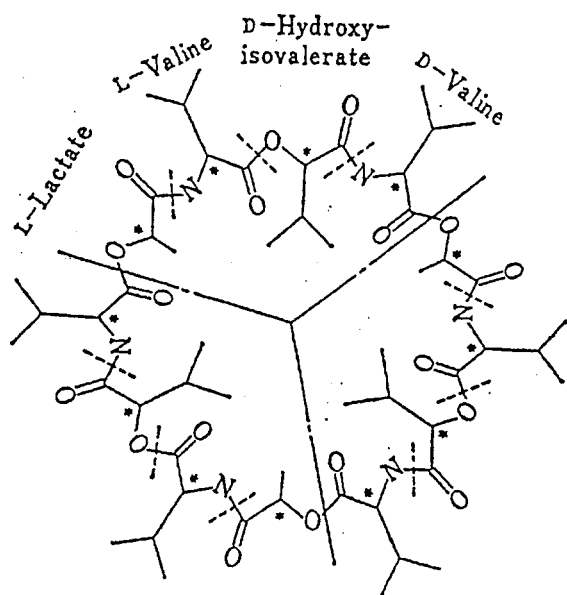
(フィリピン)

(FCCP)

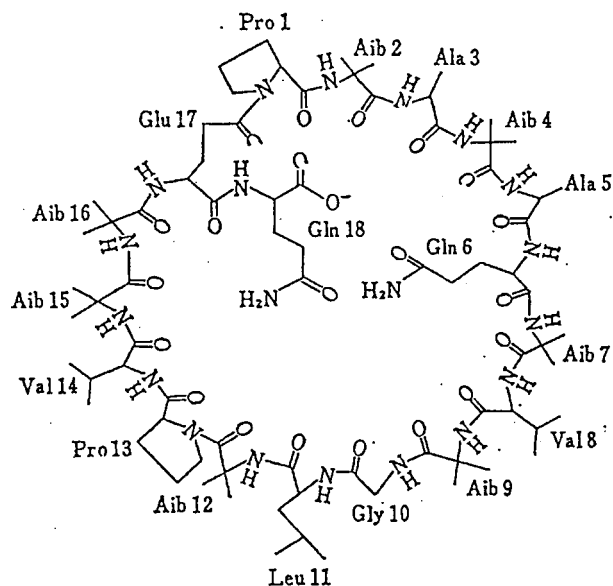
(アンホテリシン B)



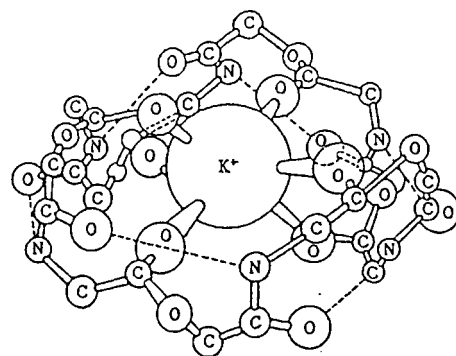
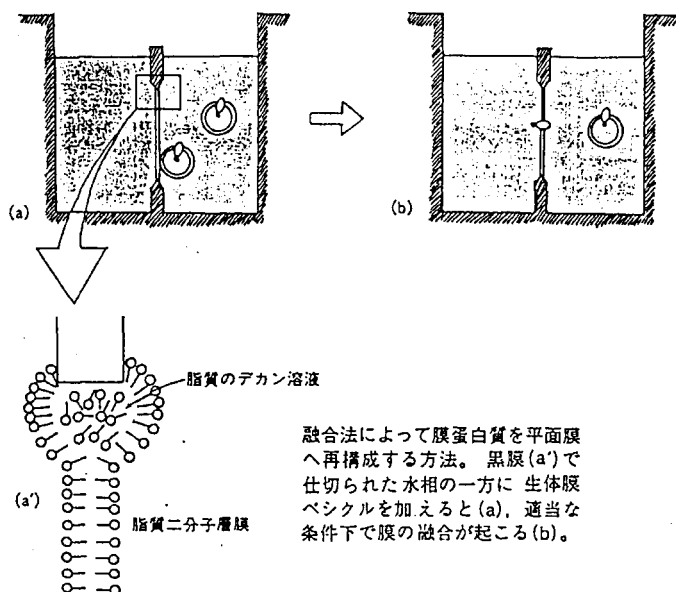
グラミシジン A



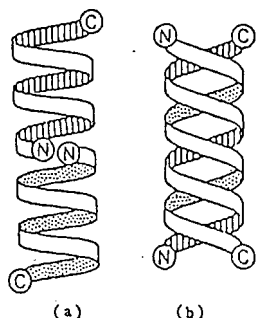
バリノマイシン



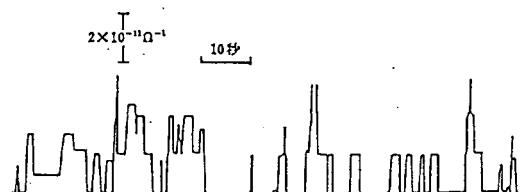
アラメチシン



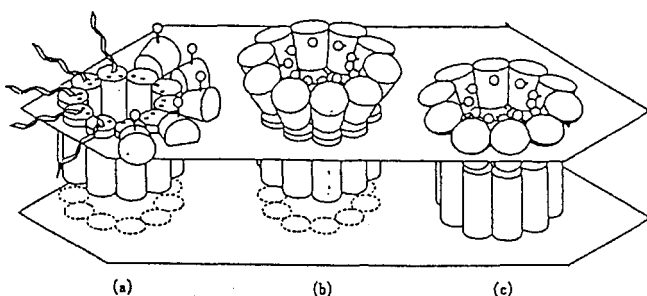
バリノマイシンによる K^+ 包接化合物(香川靖雄: "生体膜", 岩波書店, p.186 (1978) より)。



グラミジシンA 2分子によるチャンネル (Sung, S.S. & Jordan, P.C.: *J. Theor. Biol.*, 140, 369 (1989) より)。

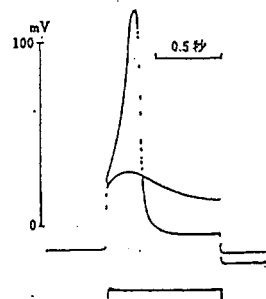
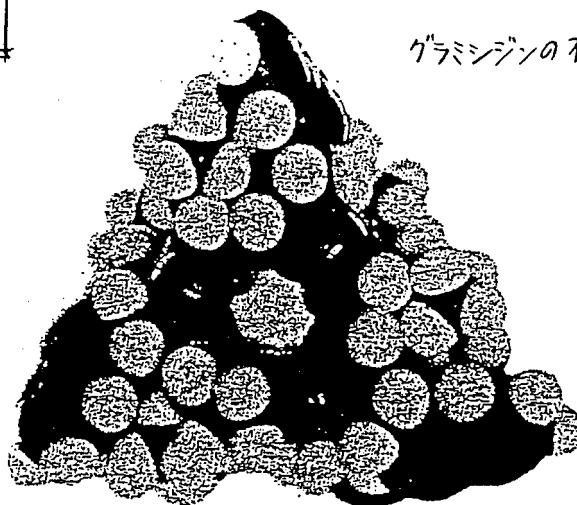


単一チャンネルコンダクタンス現象。膜電位固定下の脂質平面膜の電流ゆらぎを少量のグラミジシンAを加えて追跡したもの (Hladky, S.B. & Haydon, D.A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 274, 294 (1972) より)。

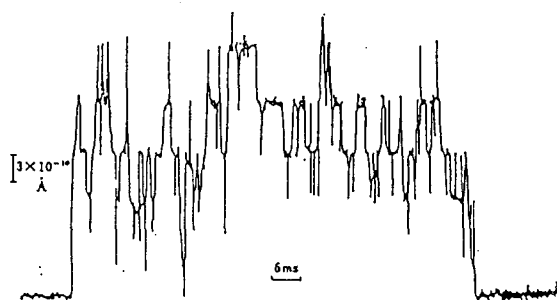


アラメチシンチャンネルの模式図。アラメチシン分子が多く集まって樽形の構造をとる。(a) 静止状態ではチャンネルは膜を貫通していない。(b) 電場が掛かると、分子が膜中に引っ張られて、(c) チャンネルとなる。チャンネルを形成する分子の数は一定ではなく、数が多いときばコンダクタンスが大きくなる (Fox, R.O., Jr. & Richards, F.M.: *Nature*, 300, 325 (1982) より)。

グラミジシンの構造



アラメチシンによる活動電位 (Muller, P. & Rudin, D.O.: *Nature*, 217, 713 (1968) より)。



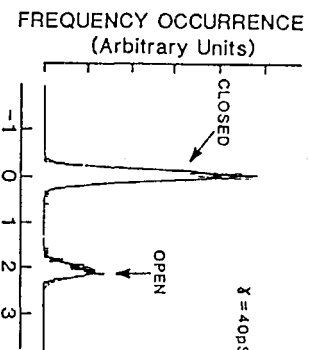
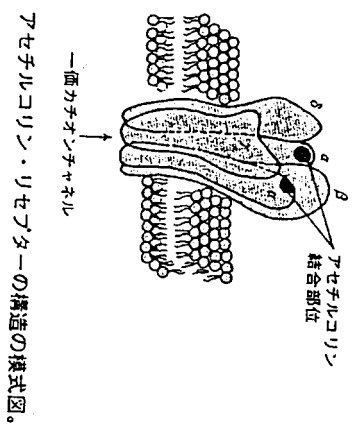
少量のアラメチシン存在下での電流ゆらぎ。KCl 濃度 2M, 電圧 210mV を与えてある (Gordon, L.G. & Haydon, D.A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 1014 (1972) より)。

アセチルコリン受容体由来ペプチド

A

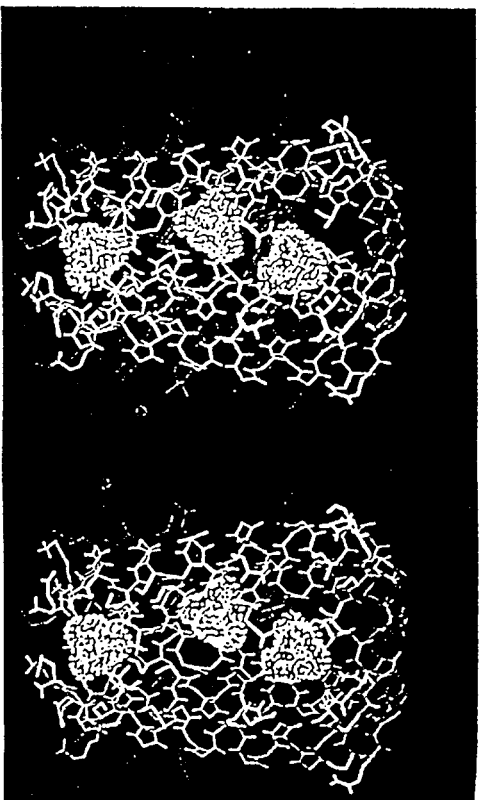
TORPEDO M2	
Alpha	E K M T L S I S V L L S L T V F L L V I V E L
Beta	E K M S L S I S A L L A V T V F L L L A D K
Gamma	Q K C T L S I S V L L A Q T I F L F L I A O K
Delta	E K M S T A I S V L L A Q A V F L L L T S Q R

DELTA M2	
Torpedo	E K M S T A I S V L L A Q A V F L L L T S Q R
Chicken	E K M T L V I S V L L A Q S V F L L L V S Q R
Mouse	E K T S V A I S V L L A Q S V F L L L I S K R
Bovine	E K T S M A I S V L L A Q S V F L L L I S K R



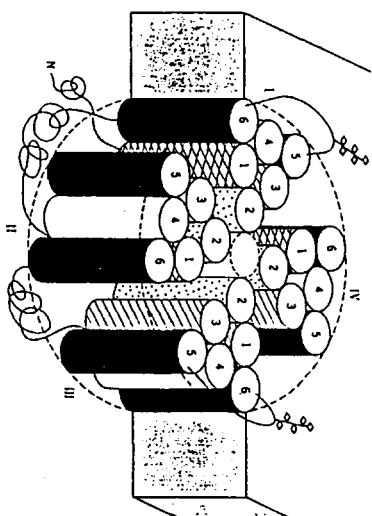
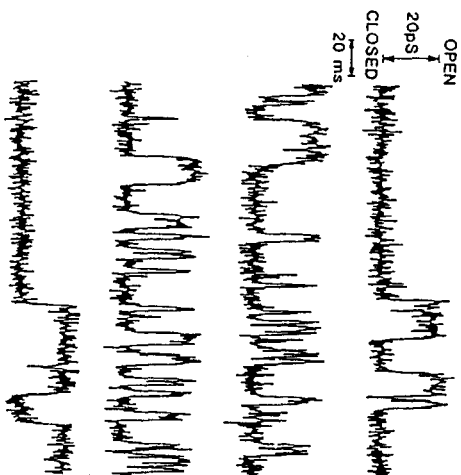
ACNR	a7	234	236	237	240	251	254	255	256
ACNR	a7	D	S	G	(E)	K	I	(S)	L
GLYR	a1	D	A	A	P	A	R	V	G
GLYR	β	D	A	S	A	A	R	V	P
GABAR	a1	E	S	V	P	A	R	T	V
GABAR	β 1	D	A	S	A	A	R	V	A

Type	236 237	Sequence	251	256	selectivity
a7-WT	DSC-EKIS	LCITVLLSLT	VFM	LVAE	A
a7.1	...PA...C	...T...SC...N			C
a7.2	...PA...	...T...			A
a7.3	...PA...	...T...			C
a7.4	...PA...	...T...			C
a7.5	...A...	...T...			C
a7.6	...A...	...T...			C
a7.7	...P...	...T...			C
a7.8	...A...C	...T...SC...N			C
a7.9	...AA...C	...T...SC...N			A

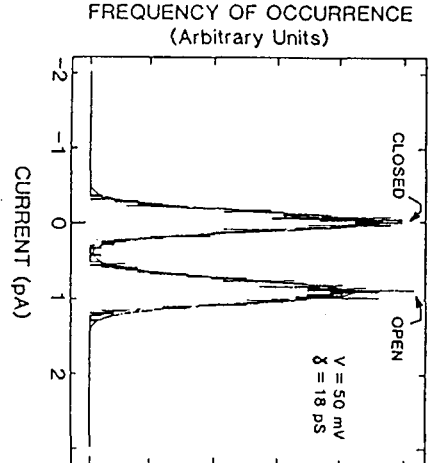


Stereo, side-view of the M25 pentamer with three Tris⁻ ions. The N-terminus is at the bottom of the structure.

電位依存性Na⁺チャンネル由来ペプチド

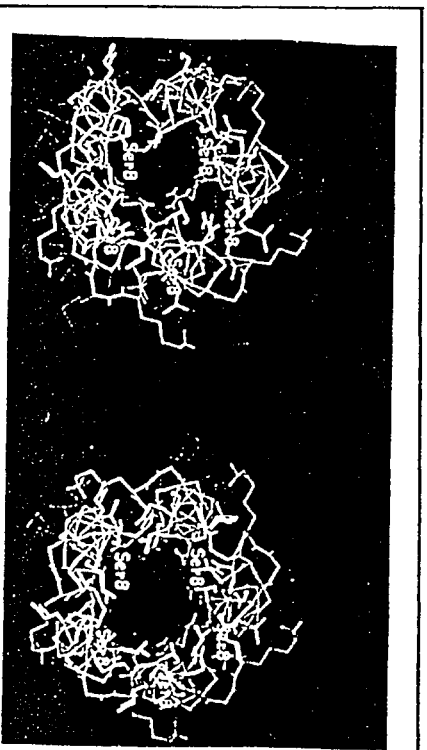


Na⁺チャンネルの膜内配置の推定モデル。I—IVはドメイン構造の繰り返しユニットで、各セグメント(1—6)は図で示してある。NはN末端、選択結合の予想部位は◇を付けて示してある。

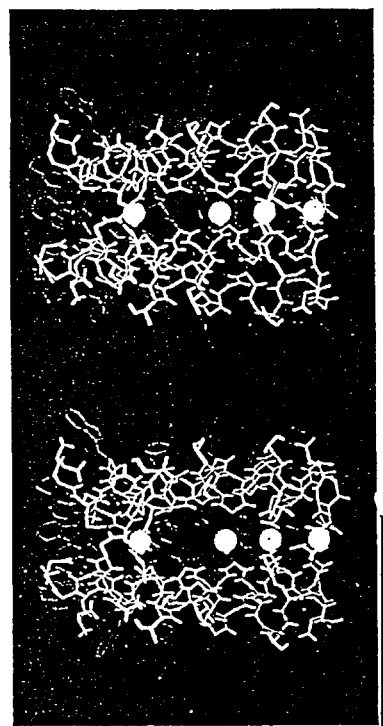


Sci

RAT BRAIN I	D	P	W	N	W	L	D	F	T	V	I	T	F	A	V	V	T	E	F	V	D	L
RAT BRAIN II	N	P	W	N	W	L	D	F	T	V	I	T	F	A	V	V	T	E	F	V	N	L
FLY	N	P	W	N	W	L	D	F	T	V	I	T	M	R	Y	A	T	I	G	M	E	V
EEL	D	P	W	N	W	L	D	F	S	V	T	M	T	Y	I	T	E	F	I	D	L	



NaChR channel



Na⁺ channel

Side view

レセプター-リガンド (アゴニスト、アンタゴニスト)

α bungarotoxin

erabutoxin b

(v - dep.)

（160）

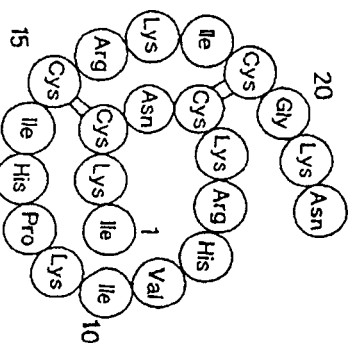
(Ca-dep.)

カリブドトキシ

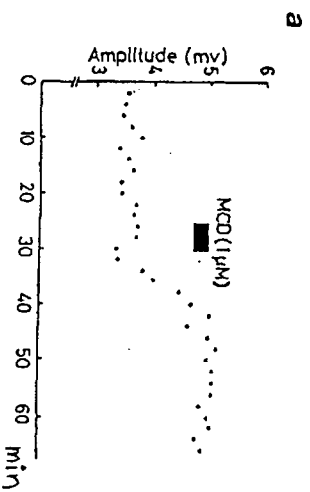
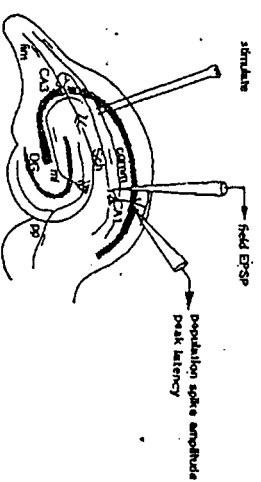
モルヒネ受容体

エシケフアリシ

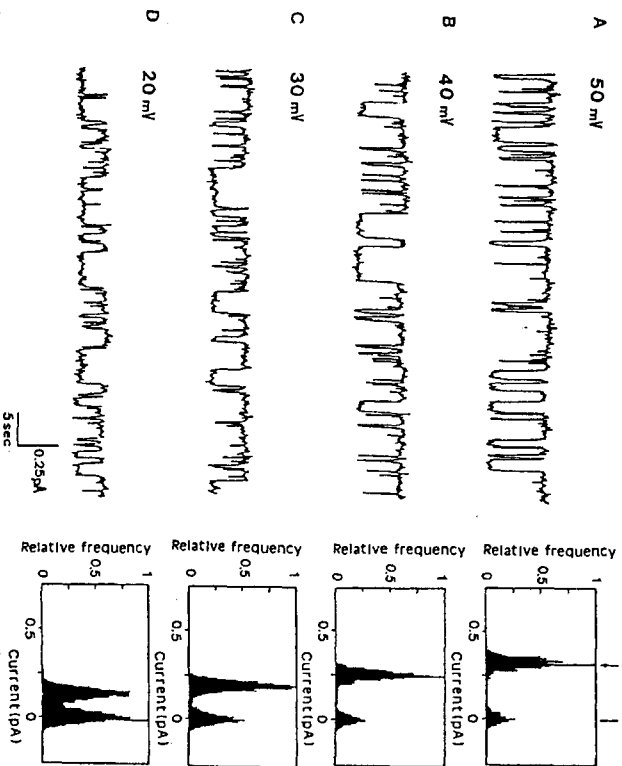
MC D プチドの構造と機能



MCD ベイズ法の構造



MCDが形成したアンドロ活性



LTP INDUCIBILITY AND OTHER FUNCTIONS OF MCD DERIVATIVES AND ITS ANALOGUES

	LTP	Binding activity (K ⁺ -channel)	Channel formation	G-protein activation
MCD	+	+	+	+
I-MCD	+	+	+	+
D-MCD	-	-	-	+
Apamin	-	-	+	-
DTX-1	+	+	-	+
Mastoparan	-	-	NT	+

【文献】

(イオノフォア ペプチド)

(参考図書) 生命科学の基礎 6. 生体膜の分子素子・分子機械
学会出版センター (1990)

K.S.Akerfeldt, et al. (1993) "Synthetic peptides as models for
ion channel proteins" *Acc.Chem.Res.* 26:191-197

(アセチルコリン受容体)

S.Oiki, et al. (1988) "M2 δ , a candidate for the structure
lining the ionic channel of the nicotinic cholinergic
receptor" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:8703-8707

S.Oiki, et al. (1990) "Bundles of amphipathic transmembrane
 α -helices as a structural motif for ion-conducting channel
protein" *Protein: Structure, Function, and Genetics* 8:226-236

J.-L.Galzi, et al. (1992) "Mutations in the channel domain of a
neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from
cationic to anionic" *Nature*, 359:500-505

(Na⁺ チャンネル)

S.Oiki, et al. (1988) "Channel protein engineering: Synthetic
22-mer peptide from the voltage-sensitive sodium channel
forms ionic channels in lipid bilayers" *Proc.Natl.Acad.Sci.
USA*, 85:2392-2397

M.T.Tosteson, et al. (1989) "Voltage-gated channels formed in
lipid bilayers by a positively charged segment of the Na-
channel polypeptide" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86:707-710

(M C D ペプチド)

E.Cherubini, et al. (1987) "Long-term potentiation of synaptic
transmission in the hippocampus induced by a bee venom peptide"
Nature, 328:70-73

T.Ide, et al. (1989) "Mast cell degranulating peptide forms
voltage gated and cation selective channels in lipid bilayers"
Biochem.Biophys.Res.Comm. 163:155-160

T.Kondo, et al. (1992) "K channel involvement in induction of
synaptic enhancement by mast cell degranulating peptide"
Neurosci.Res. 13:207-216

池中一裕ら (1990) "ハチ毒ペプチドによるシナプス伝達効率長期増強作用
生物物理 30:22-27

(デンドロトキシン)

H.Rehm, et al. (1989) "Dendrotoxin-binding brain membrane protein
displays a K channel activity that is stimulated by both cAMP-
dependent and endogenous phosphorylations" *Biochemistry* 28:
6455-6460

D.N.Parcej and J.O.Dolly (1989) "Dendrotoxin acceptor from bovine
synaptic plasma membrane" *Biochem.J.* 257:899-903

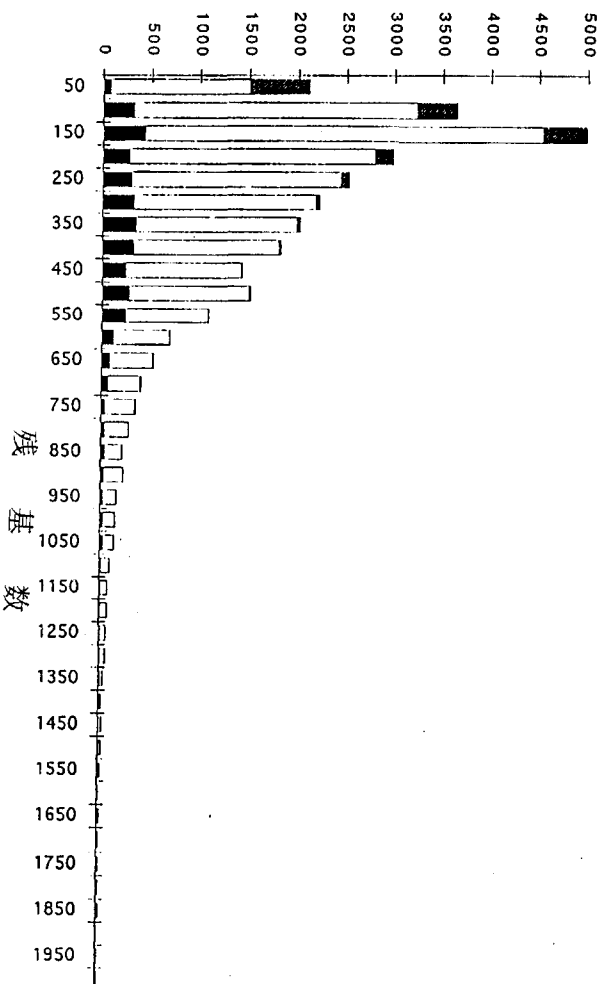
(D-enantiomer)

D.Wade, et al. (1990) "All-D amino acid-containing channel-forming
antibiotic peptides" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:4761-4765

ペプチドの触媒作用 (1)

大阪工業技術試験所 達 吉郎

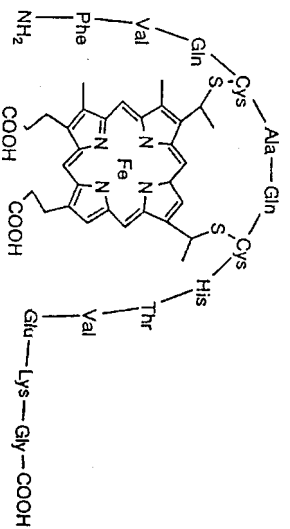
- ・ 酵素の活性中心のフラグメント
- ・ 酵素の活性中心の模倣
- ・ 分子認識ペプチド + 触媒
- ・ その他



データーベース中のペプチド

> 酵素の活性中心のフラグメントの例

micro peroxidase



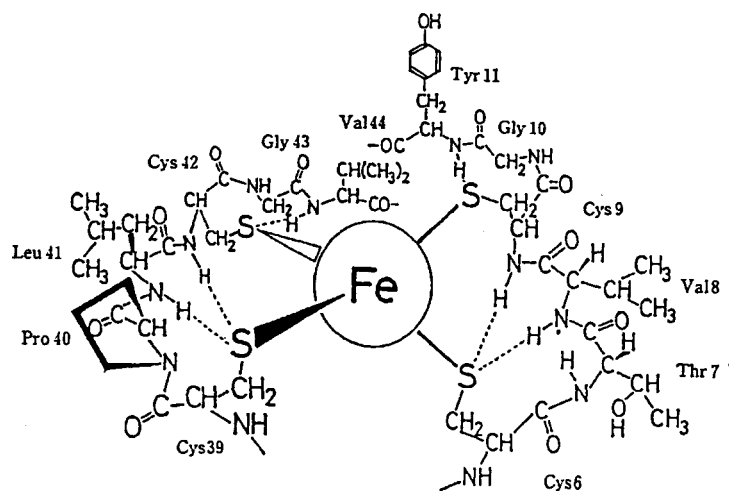


図 3.1 ルブレドキシンでの鉄イオン周辺のペプチド鎖の水素結合.

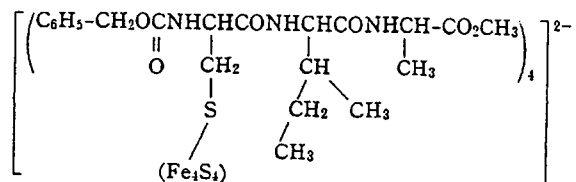
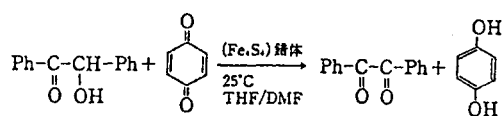


図 3.2 高電位鉄・硫黄蛋白質モデルとしてのペプチド錯体の 1 例,
[Fe₄S₄(Z-Cys-Ile-Ala-OMe)₄]²⁻.

表 3.2 高電位鉄・硫黄蛋白質のモデルとなる Fe₄S₄ 錯体のレドックス電位 (DMF 中, アルゴン下)^{a)}

錯 体	レドックス電位 (V vs. SCE)	
	2-/1-	3-/2-
[Fe ₄ S ₄ (Z-Cys-Ile-Ala-OMe) ₄] ²⁻	+0.12	-1.00
[Fe ₄ S ₄ (Z-Cys-Pro-Leu-OMe) ₄] ²⁻	-0.02 ^{a)}	-1.19
[Fe ₄ S ₄ (Z-Cys-Pro-Val-OMe) ₄] ²⁻	不可逆 ^{a)}	-1.18
[Fe ₄ S ₄ (Z-Cys-Pro-Gly-OMe) ₄] ²⁻	n.o. ^{a)}	-1.07
[Fe ₄ S ₄ (S-2,4,6-トリメチルベンゼンチオラート) ₄] ²⁻	+0.02	-1.27
[Fe ₄ S ₄ (S-2,4,6-トリイソプロピルベンゼンチオラート) ₄] ²⁻	-0.03	-1.38

a) Me₂SO 中.



Helichrome: Synthesis and Enzymatic Activity of a Designed Hemeprotein†

Tomikazu Sasaki* and Emil T. Kaiser†

Laboratory of Bioorganic Chemistry and Biochemistry
The Rockefeller University
New York, New York 10021

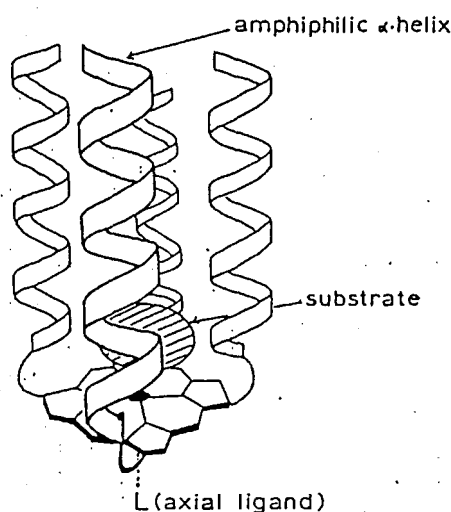


Figure 1. Proposed structure of helichrome 1 after folding of the peptide chains.

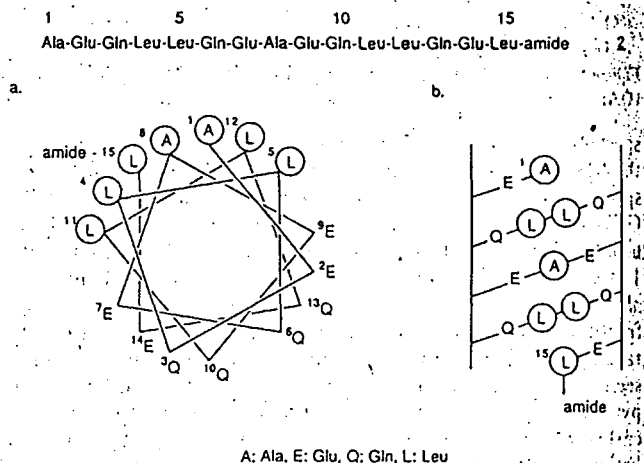


Figure 2. Amino acid sequence of peptide: (a) helix wheel and (b) helix diagram, in which the circle represents hydrophobic amino acids.

Biopolymers, Vol. 29, 79-88 (1990)

Synthesis and Structural Stability of Helichrome as an Artificial Hemeproteins

TOMIKAZU SASAKI†* and EMIL THOMAS KAISER

Laboratory of Bioorganic Chemistry and Biochemistry, The Rockefeller University, New York, New York 10021

SYNOPSIS

A detailed procedure is described for the synthesis of helichrome, which is the first successful example of polypeptide-based artificial hemeprotein. The segment synthesis-condensation approach used for the assembly of small proteins has proven to be extremely useful for protein mimetics as well. The final deprotection was performed using the TMSOTf-thioanisole method instead of the less-convenient hydrogen fluoride method. The unfolding transition of the α -helical conformation of helichrome induced by guanidine hydrochloride was studied to understand the stability and dynamics of the folded structure. The resulting parameters ($C_{0.5} = 5.2M$ and $\Delta G^{H_2O} = -4.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) characterizing helichrome denaturation were comparable to that of native globular proteins.

Synthesis of a Sequence-Specific DNA-Cleaving Peptide

JAMES P. SLUKA, SUZANNA J. HORVATH, MICHAEL F. BRUIST, MELVIN I. SIMON, PETER B. DERVAN

A synthetic 52-residue peptide based on the sequence-specific DNA-binding domain of *Hin* recombinase (139–190) has been equipped with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at the amino terminus. In the presence of Fe(II), this synthetic EDTA-peptide cleaves DNA at *Hin* recombination sites. The cleavage data reveal that the amino terminus of *Hin*(139–190) is bound in the minor groove of DNA near the symmetry axis of *Hin* recombination sites. This work demonstrates the construction of a hybrid peptide combining two functional domains: sequence-specific DNA binding and DNA cleavage.

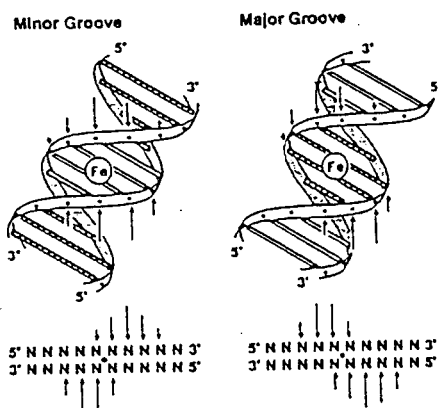


Fig. 1. Cleavage patterns produced by a diffusible oxidant generated by EDTA · Fe localized in the minor and major grooves of right-handed DNA. The edges of the bases are shown as open and crosshatched bars for the minor and major grooves, respectively.

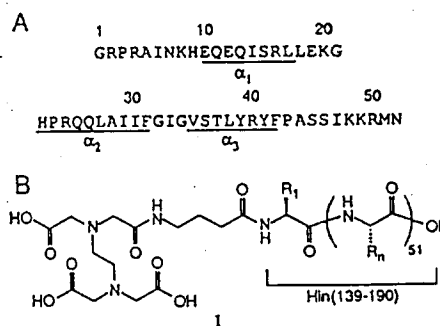
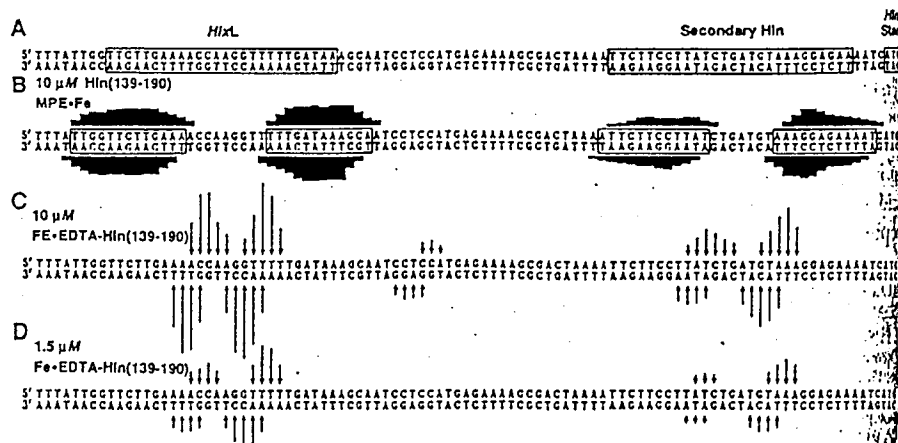


Fig. 2. (A) The 52-residue peptide is the COOH-terminus of *Hin*, amino acids 139 to 190. Tentative α helix assignments are underlined; helices α_2 and α_3 are from alignment with CAP and λ -cro, α_1 was assigned using the Garnier algorithm (21). (B) Synthetic peptide 1, EDTA-*Hin*(139–190).

Fig. 4. The sequence left to right represents the cleavage data from the bottom to the middle of the gel in Fig. 3. (A) Boxes are the 26-bp *hixL* binding site, secondary *Hin*-binding site, and start of the *hin* gene. (B) Bars represent extent of protection from MPE · Fe cleavage in the presence of *Hin*(139–190) (Fig. 3, lanes 5 and 14). (C) Arrows represent extent of cleavage for Fe · EDTA-*Hin*(139–190) at 10 μ M (Fig. 3, lanes 9 and 10). (D) Cleavage patterns for Fe · EDTA-*Hin*(139–190) at 1.5 μ M (Fig. 3, lanes 7 and 12). Extent of cleavage was determined by densitometric analysis of the gel autoradiogram.



光学活性環状ペプチドおよび環状アミドによる シアノヒドリンの不斉合成

(1986年8月13日受理)

林 裕 晃・小林 良 之・宮 路 浩 二・井 上 祥 平*

七員環アミド L - α -ジメチルアミノ- ϵ -カプロラクタムを触媒として、アルデヒドへのシアン化水素の付加によるシアノヒドリンの不斉合成を種々のアルデヒドを基質として行なったところ、脂肪族アルデヒドを基質とした場合に最高 26.3% の不斉収率が得られた。

また、光学活性シアノヒドリンを合成する他の方法として、アルデヒドとアセトンシアノヒドリンとのシアノヒドリン交換反応を取り上げ、この反応におけるシクロ(L -フェニルアラニル- L -ヒスチジル)および L - α -ジメチルアミノ- ϵ -カプロラクタムの不斉触媒作用について種々のアルデヒドを基質として検討したところ、最高 62.7% の不斉収率が得られた。これは、アルデヒドとアセトンシアノヒドリンとの不斉シアノヒドリン交換反応の初めての例である。

(日本化学会誌, 1987, (3), p.378~385)
© 1987 The Chemical Society of Japan

機能性分子集合体によるエナンチオマー識別反応 ——ミセル系エステラーゼモデルについて——

(1986年8月20日受理)

上 岡 龍 一*・吉 野 公 繁**・松 本 陽 子

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド (CTACl) を用いたミセル分子集合体反応場で、酵素モデルとして用いた N -ベンジルオキシカルボニル- L -フェニルアラニル- L -ヒスチジル- L -ロイシンが長鎖エナンチオマー基質 (N -ドデカノイル- D -および- L -フェニルアラニン- p -ニトロフェニルエステル) の加水分解において、反応種間の有効な二分子間の相互作用にもとづく L -体優位の不斉認識機能を発現することが明確になった。

そこで、これらの触媒および基質を用いて、ミセル系による立体制御を試みたところ、(1) 臨界ミセル濃度の2倍量以上で安定で大きな立体識別を可能にし、(2) 長鎖エナンチオマー基質の鎖長 (C_{12}) や構造 (ベンジル基) に対し、適切なアルキル鎖長 (C_{16}) およびヘッドグループ (ベンジル基) をもつ界面活性剤が鏡像異性体速度比 ($k_{\text{obsd}}^L/k_{\text{obsd}}^D$) をいちじるしく大きくし、さらにキラリティーを有する (−)-ヘキサデシルジメチル [(S)- α -メチルベンジル] アンモニウム=ブロミドは速度比 (L/D) を 58 倍にまで高めた。また、(3) CTACl ミセルとジヘキサデシルジメチルアンモニウム=クロリド ($2C_{16}N$ $2C_4Cl$) ベシクルの混合比を系統的に変えたところ、23 mol% CTACl/77 mol% $2C_{16}N$ $2C_4Cl$ 混合比で分子集合体の大きさが最大となり、同時に立体識別をもっとも大きくすることができた。

以上のことは、動的平衡にあるやわらかなミセル反応場を用いても立体識別に有利な触媒-基質の配向性を微調整できることを実証した興味ある知見である。

ペプチドの触媒作用（２）

（財）大阪科学技術センター

川原田 肇、大嶋 健、駒田伊知朗

１．はじめに

ペプチド（本稿ではアミノ酸数50に下の狭義のものを指す）は生体成分として広く生物界に存在し、その作用は多様であるが、高等動物の場合は主にホルモンとして存在する。ホルモンの作用は、そのホルモンに対する細胞のリセプターにホルモンが結合することにより発現するが、そのことはリセプターを構成する蛋白質が高い分子認識能を有することを意味する。逆に、ホルモンがリセプターを認識する能力があると見られなくもないが、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンの場合を考えると、この反応は受け身を判断せざるを得ない。ペプチドは、１次構造上は小型の蛋白質であり、酵素や抗体における蛋白質の精妙な分子認識能の何分の１かの能力を有していても不思議ではないと考えられるが、ホルモンの場合のように、天然にはそのような例はなさそうである。

本プロジェクトは、小型蛋白質であるペプチドに、蛋白質に近い、さらにはそれを超える高機能を賦与し、新しい機能性材料を創製することを目的とする。蛋白質の機能として代表的なものに酵素としての触媒作用があるので、今回はペプチドの触媒作用創出の試みについて調査することにした。

酵素は、その優れた機能により広く工業用、医療用などに利用されており、今後さらにその応用分野は広がるであろう。ただ酵素にも欠点はある。非常な高分子であり、複雑な高次構造を持っているため安定性に欠ける点と、微生物起源のもの以外は高価である点である。このような欠点を解消した理想的な触媒を求めて、小型化した蛋白であるペプチドを含む非蛋白性の人工酵素の開発の試みが今までにも行われてきた。本プロジェクトの対象物質はペプチドであるので、調査の主対象はあくまでペプチドとしたが、非ペプチド性物質による取り組み状況も本プロジェクトの活動に少なからず資するところがあると考え、これらの研究状況についても調査した。

２．人工酵素について

酵素は一種の触媒であるが、常温常圧で機能する高効率性（高活性）と基質および反応に対する高特異性によって、通常の触媒と一線を画す極立った特徴を持っている。その秘

密は、活性中心の高い分子認識能に基づく基質との特異的結合性にある。その結合によって高い基質特異性がもたらされる。さらに活性中心の触媒基となるいくつかのアミノ酸残基の官能基の協奏的相互作用や、酵素によっては補酵素や金属などの補欠分子族の働きによって極めて高い活性と反応特異性が示される。補欠分子族を必要としない、蛋白のみからなる酵素の場合、活性中心のアミノ酸と基質との相互作用は、基質特異性、反応特異性、活性のいずれにも関係するので、特異性と活性とは切り離しては考えられない。したがって、人工的に酵素をデザインするに当たって、これらの特性を同時に発揮させるような設計戦略は立てるのが困難である。そこで、人工酵素開発の研究においては、多くの場合基質結合性と触媒機能について別々に設計し、両者を結合することによって酵素様特性を持たせる戦略が採用されている。

基質結合性については、酵素の活性中心の内側は疎水的環境となっており、そこに基質が入って結合する「鍵と鍵穴」の関係で結合するので、それをmimicして内側に疎水的空間を持つ物質がホストとして使用される。シクロデキトリンのような包接化合物やミセルがその代表例である。

以下に、ホスト化合物別に人工酵素の研究例を紹介する。なお、人工酵素全般については次のような多くの総説があるので参照されたい。

(1), (2)(3), (4), (6), (7), (8), (13), (14), (16), (24), (26), (31), (34)

(1) シクロデキストリン (CD)

CDは内側に疎水性空間を持ち、水溶中で種々のゲスト化合物を内部の空洞に取り込んで包接化合物を形成する。また、その際水酸基によってそのものでも触媒作用を示すことがあるので、古くから人工酵素としての利用が試みられた。

非修飾のCDそのものの応用例としては、エステル水解、V. Kの合成、カーボニックアンヒドラーゼ、RNase様活性などがある。

さらに修飾により特異性を高めたり、触媒官能基を導入して活性を高めた例もある。イミダゾールの導入によるキモトリプシンモデルの構築、ピリドキサミンの導入によるアミノ基転移反応、Fe₄S₄による人工フェレドキシン等の研究例がある。

CDの総説を中心とする文献は(1), (2), (3), (5), (6), (7), (8), (9), (11), (12), (13), (14), (16), (18), (21), (22), (24), (28), (34)などがある。

(2) シクロファン

シクロファンとは芳香環を持つ大環状化合物の総称で、包接化合物を形成するようにデザイン、合成され、触媒作用が検討されている。利用例としてエステルの分解、トランスアミナーゼがある。

シクロファンの総説を中心とする文献は、(1), (3), (14), (17), (19), (20), (25), (29), (31), (34)などがある。

(3) クラウンエーテル

有機および金属カチオンを取り込むイオノフォアとしての作用があり、アミノ酸エステル誘導体の不斉水解、アミノ酸の光学分割、カルボニル化合物の不斉還元の研究例がある。環状ペプチドであるバリノマイシンにも同様の作用がある。

文献は、(1), (2), (3), (34)。

(4) ミセル、ベシクル

界面活性剤などの両親媒性物質が水中で親水基を外に、親油基を内に向けて会合したものをミセル、より難溶性で2分子膜となったものをベシクルといい、ミセルの内側やベシクルの膜内部は疎水性空間となるため、人工酵素のホストとして利用される。ただ構造として上記のものと比べると極めてフレキシブルなので分子認識性は弱いですが、逆に広く使えるメリットはある。

ミセルについては、C T A B ミセルとある種の疎水性ヒドロキサム酸の組み合わせでキモトリプシン酵素モデルを作製した例がある。

ベシクルについては、村上らを始めとして、我国で多くの研究が報告されており、補酵素を使用した例が多い。ペプチドを触媒基として使用しているものもあるがこれらについては後述する。

文献は、(1), (3), (10), (13), (15), (17), (20), (23), (24), (25), (26), (27), (29), (30), (31), (32), (33), (34)。

(5) 機能性高分子

有機系高分子やシリカゲル、アルミナなどの無機系高分子についてかつて研究されたが、特異性に乏しい欠点がある (1)。

(6) 抗体酵素

抗体酵素は、1986年にLernerらにより始めて報告された革新的でかつ極めて興味深い技術であるが、本調査の目的である、人工的に触媒機能を有する化合物（ペプチド）をデザインすることには余り参考にはならないと考えられているので省略する。

以上、ペプチド以外の人工酵素の研究例について物質と応用例を列挙したが、研究の目的である酵素にどれくらい近づいたかには触れなかった。そのことに関しては、残念ながら特異性、効率性のいずれにおいても天然の酵素に遙かにおよばないのが現状である。ただ目的によっては酵素と必ずしも同レベルである必要はないので、実用性のあるものはいくつかあると考えられる。

3. ペプチドの触媒作用

本題のペプチドの触媒作用であるが、前項で述べたように、特異性をもたらす立体構造の形成と触媒機能を同時に実現することは至難の技である。そこで、非ペプチド性の人工酵素開発の場合と同様に、これらを分割して人工酵素の構築を試みた研究例が多い。すなわち、触媒機能を有するアミノ酸を含むペプチドを利用し、非ペプチド性のミセル、ベシクルなどを会合させて酵素様構造物を作った例と、ペプチドをアポ酵素またはキャリアーとして利用してホロ酵素様の触媒を作った例である。

これとは別に、アミノ酸の触媒機能を利用し、同時にペプチドを環状にしたり、 α -ヘリックスを形成して立体構造を安定させることにより機能の向上を図った研究例もあり、ごく最近になって画期的な成果が発表された。

以下にこれら3つのアプローチについて研究例を紹介する。

ペプチドの触媒作用に関する、1980年以降の文献について表1にまとめた。以下の文中の文献番号は表中のものを指す。表は、年代の古い順に並べてあり、中には蛋白に属するものも含まれているが、参考までに示した。

(1) ペプチドの触媒機能を利用した例

ヒスチジンのイミダゾリル基の求核性を利用したものが圧倒的に多い。イミダゾールだけでもエステルの水解能があるが、その活性と特異性の向上が試みられている。特に、特異性の重要なメルクマールとなり、かつ実用性の点からかエナンチオマー特異的な反

応を狙った研究が多い。特異性の向上のためにはミセルまたはベシクルが使われている。

ヒスチジン含有ペプチドとミセルまたはベシクル利用の例は、文献番号 8、10、11、13、15、20、24、25、27、29、30において示されている。

10は総説であるが引例として、N-ドデカイルフェニルアラニンエステルで $k(L)/k(D)=27$ の立体特異性が示されている。

11では表にある基質で、 $L/D=148.2$ が、13では表の基質で $L/D=167\pm 21$ と非常に高い立体特異性が得られている。同様に研究成果が20、24、25、29において報告されている。

9はかなりユニークな研究で、リジンを触媒基として使用し、その周辺に疎水基を付加して基質と結合しやすくし、さらに水溶性にするためPEGを結合して酵素モデルを構築した。この研究では立体選択性ではなく、活性の向上を企図しており、かなりの向上が認められたが、キモトリプシンに比べるとやはり遙かに低い。

16は、細菌の生産する抗生物質で環状デカペプチドであるグラミシジンSを利用したものである。膜作用性のグラミシジンSに触媒基としてヒスチジンを付加し、ベシクルと併用することによりその相互作用で活性の向上を狙って効果を上げている。

(2) 補欠分子族を使用した例

この場合、ペプチドを α -ヘリックス構造をとるようデザインして酵素様構造を形成する研究と単にキャリアーとしてペプチドを使用しているものとがある。

前者には12、19があるが、同一研究者による同様の内容のものである。15ペプチドで片側に親水性、もう一方の側に疎水性アミノ酸が配置するように配列して α -ヘリックスを形成させ、4つのヘリックスを内側に疎水アミノ酸、外側に親水アミノ酸を向けて疎水性のポケットができるようにし、C末をポルフィリンに共有結合した。形成された人工ヘリクロームはアニリンからp-アミノフェノールへの酸化反応で天然のものと同様の活性を示した。

後者の例として23、28、32がある。

23は、鉄-硫黄クラスターを含む蛋白で酸化還元反応の電子伝達体となるフェレドキシンの作用を模したものであり、 Fe_4S_4 とペプチドの錯体を使用して、ベンゾキノンによるベンゾインの酸化の触媒作用を研究している。

28は、グルタチオンにセレンを結合したもので、GSH peroxidase様作用を示したことを報告している。

32は、補酵素チアミンピロリン酸の活性部分のチアゾリウム塩を有効に機能させるためにペプチドに担持させ、ペンタアルデヒドのアシロイン縮合を試みて活性を観察した。

(3) ペプチドそのもので機能発現を試みた例

ペプチドだけで酵素様の機能発現を狙う、最も困難なアプローチで、3、4、5、21、26、33の例がある。

3、4、5は同一研究グループによるもので、ヒスチジンを含む環状ペプチドを使用している。

3、4は、環状ジペプチドに触媒基としてヒスチジンを側鎖に導入したトリペプチドによる、エナントオマー選択的加水分解の研究であるが、余り有効な結果は得られていない。

5はヒスチジンを含む環状ヘキサペプチドを用いており、活性はイミダゾールに比べて向上したが、立体選択性は余り認められなかった。

21は、ヒスチジンを含む環状ジペプチドによるアルデヒドのヒドロシミア化反応に関するものである。ペンタアルデヒドからアソデロニトリルへの変換では収率、立体選択性とも高い結果が得られている。

26は、リジンを含む塩基性ペプチドによるオリゴリボヌクレオチドの水解に関するものである。α-ヘリックス構造のポリペプチドを非ヘリックス性のものとを比較してヘリックス性のものが遙かに強い活性を示すことを報告しているが、同時にトリペプチドのテトラマー（計16マー）のペプチドがヘリカル構造をとり、活性を示すことを報告している。

33は、従来の研究例とは全く異なった発想によってデザインし、画期的な成功を収めたものである。キモトリプシンおよびトリプシンの活性部位を模して、29残基の環状ペプチドを作ったもので、いずれも天然のものに比べて遜色がない活性と特異性を示したので、著者らはこれらをpepzymeと命名した。29残基でこのような機能を示したのは驚くべきことであるが、環状にしたことが成功のポイントであろう。

4. おわりに

触媒作用を有するペプチドの開発とその周辺技術として人工酵素全般について文献調査した。

酵素は、その効率性（活性）と特異性において通常の触媒にはない優れた特性を持っており、人工的に同様の機能のものを合成することは研究者にとって挑戦する価値のあるターゲットである。そして今までに多くの試みがなされ、ある程度酵素様の機能を発現するものも得られているが、1992年までのものは残念ながら活性、特異性何れにおいても酵素には遙かにおよばない状況であった。酵素は、生命の発生以来、生物が長い進化の過程で改良を重ねてきた触媒の芸術品であり、複雑な構造がその機能発現に必須であるので、その模倣が容易でないことは当然でもある。

従来の人工酵素の構築の戦略は、触媒部位と基質結合部位を分割設計して後で結合する方法や、 α -ヘリックスバンドルの形成による酵素様の構造形式など、オーソドックスな、言い換えれば常識的なアプローチのものがほとんどであった。ところが1993年に、従来の環状ペプチドの考え方とは全く発想の異なる革新的な技術（pepzyme）が生まれた。この成功は、ペプチドの限らない可能性を示したもので、当分野の研究者に衝撃を与えると同時に新しい挑戦意欲を起こさせる。

本プロジェクトはペプチドに新しい機能を創出することを目的にしているが、さらに革新的な技術開発の夢をペプチドは与えてくれるものである。

文献

(1) 人工酵素系

田伏岩夫（京大工）

化学増刊

NO.89 PAGE.71-84 1981

(2) 酵素モデル反応設計

新海征治（長崎大工）

VOL.33, NO.10 PAGE.887-892 1982

(3) 酵素利用技術の発展と課題 人工酵素の開発状況と利用をめぐる諸問題

田伏岩夫（京大工）

食品工業

VOL.27, NO.18 PAGE.32-38 1984

(4) バイオミメティックと分子設計

戸田不二緒（東京工大工）

ファインケミカル

VOL. 13, NO. 18 PAGE. 3-14 1984

- (5) Synthesis and evaluation of a miniature organic model of chymotrypsin.

D'SOUZA V T, HANABUSA K, O'LEARY T, GADWOOD R C, BENDER M L (Northwestern Univ., IL)

Biochem Biophys Res Commun

VOL. 129, NO. 3 PAGE. 727-732 1985

- (6) 生体機能への物理有機化学的アプローチ

村上幸人 (九大工)

化学と工業

VOL. 39, NO. 2 PAGE. 102-105 1986

- (7) 人工アミノ基転移酵素の最近の進歩 生体触媒の人工化へのアプローチ

村上幸人 (九大工)

発酵と工業

VOL. 4, NO. 2 PAGE. 114-123 1986

- (8) Artificial enzymes and enzyme models.

BRESLOW R (Columbia Univ., New York)

Adv Enzymol

VOL. 58 PAGE. 1-60 1986

- (9) Reduction of ninhydrin with Cyclodextrin-1,4-

dihyronicotinamides as NADH models.

YOON C-J, IKEDA H, KOJIN R, IKEDA T, TODA F (Tokyo Inst. Technology)

J Chem Soc Chem Commun

NO. 14 PAGE. 1080-1081 1986

- (10) 分子認識と人工酵素

平井英史、小宮山真 (東大 工)

VOL. 35, NO. 10 PAGE. 930-933 1986

- (11) ミセルを利用した選択反応 ミセル系人工酵素の分子設計

太垣和一郎 (大阪市大 工)

高分子

VOL. 35, NO.10 PAGE. 938-941 1986

(12) Thermal and pH stability of " β -benzyme"

D' SOUZA V T, LU X L, GINGER R D, BENDER M L (Northwestern Univ., IL, USA)

Proc Natl Acad Sci USA

VOL. 84, NO. 3 PAGE. 673-674 1987

(13) 生体反応の化学的シミュレーション

戸田不二緒、中村朝夫、池田宰 (東京工大 工)

旭硝子工業技術奨励会研究報告

VOL. 49 PAGE. 123-129 1986

(14) 人工酵素と超酵素

田伏岩夫 (京大 工)

蛋白質、核酸、酵素

VOL. 32, NO. 9 PAGE. 1102-1112 1987

(15) 蛋白質ハイブリッド 有機ホスト分子 人工酵素の設計と結合

黒田裕久 (京大 工)

Bio Ind

VOL. 5, NO. 7 PAGE. 535-541 1988

(16) 人工酵素の研究はここまできた

青山安宏 (長岡技術大 工)

化学技術誌 M O L

VOL. 26, NO. 11 PAGE. 30-35 1988

(17) 配位化学 疎水ビタミン B₁₂ を用いた有機合成

村上幸人、久枝良雄 (九大 工)

化学工業

VOL. 39, NO. 11 PAGE. 948-954 1988

(18) シクロデキストリン化学の新展開

小宮山真 (筑波大 物質工学系)

科学

VOL. 59, NO. 2 PAGE. 105-112 1989

(19) シクロファン 人工レセプター・人工酵素としての分子認識能

村上幸人、菊池純一（九大 工）

有機合成化学協会誌

VOL. 47, NO. 6 PAGE. 484-492 1989

(20) 反応場効果を組み込んだビタミン B₁₂ 人工酵素の分子設計

村上幸人（九大 工）

触媒

VOL. 31, NO. 6 PAGE. 322-323 1989

(21) Artificial enzymes: Synthesis of imidazole substituted at c(2) of

β -cyclodextrin as an efficient enzyme model of chymotrypsin.

RAO K R, SRINIVASAN T N, BHANUMATHIN, SATTUR P B (Indian Inst. Chemical
Technology, Hyderabad, IND)

J Chem Soc Chem Commun

NO. 1 PAGE. 10-11 1990

(22) 人工区お園合成と応用

高橋圭子、服部憲治郎（東京工芸大 工）

旭硝子工業技術奨励会研究報告

VOL. 55 PAGE. 197-203 1989

(23) ビタミン B₁₂ 人工酵素の開発

村上幸人（九大）

化学と工業

VOL. 43, NO. 5 PAGE. 786-789 1990

(24) 加水分解金属酵素モデル

太垣和一郎、荻野健治（大阪市大 工）

油化学

VOL. 39, NO. 10 PAGE. 744-752 1990

(25) 理論背景とその将来展望 人工酵素の分子設計と触媒作用

村上幸人、久枝良雄（九大 工）

化学増刊

NO. 119 PAGE. 133-144 1991

(26) 特集 自然に学ぶ化学 生体との対話 ここまできた人工酵素

村上幸人（九大）

化学

VOL. 45, NO. 7 PAGE. 442-445 1990

(27)二分子模型人工酵素の開発

村上幸人、久枝良雄（九大 工）

九州産業技術

NO. 13 PAGE. 3-10 1991

(28)特集 最近の触媒研究動向 シクロデキストリンを用いる人工酵素の開発

小宮山真（東大 工）

化学工業

VOL. 42, NO. 8 PAGE. 615-619 1991

(29)特集「生体関連触媒」 ビタミン B₁₂人工酵素の分子設計

村上幸人、久枝良雄（九大 工）

触媒

VOL. 32, NO. 5 PAGE. 287-293 1990

(30)ビタミン B₆および B₁₂に類似の触媒機能をもつ二分子模型人工酵素

村上幸人、久枝良雄（九大 工）

月刊組織培養

VOL. 17, NO. 8 PAGE. 298-303 1991

(31)超分子化学と人工酵素

村上幸人（九大 工）

化学と工業

VOL. 65, NO. 6 PAGE. 250-264 1991

(32)二分子模型ビタミン B₆人工酵素によるアミノ酸合成

村上幸人（九大 工）；菊池純一（佐賀大 理工）

Bio Ind

VOL. 8, NO. 9 PAGE. 637-642 1991

(33)Catalytic Functions of Artificial Enzyme Composed of Simple Vitamin B₁₂Model and Synthetic Bilayer Membrane.

MURAKAMI Y. HISAEDA Y, SONG X-M, FAN S-D, OHNO T(Kyushu Univ., Fukuoka)

Bull chem Soc Jpn

VOL. 64, NO. 9 PAGE. 2744-2750 1991

(34)分子認識複合系の構造化学研究

三角 荘一 (福井工大)

学術月報

VOL. 46, NO. 3 PAGE. 208-213 1993

表 1 ペプチドの触媒作用に関する文献一覧

No. 1

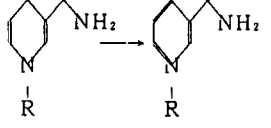
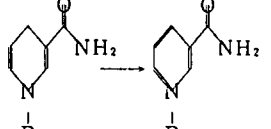
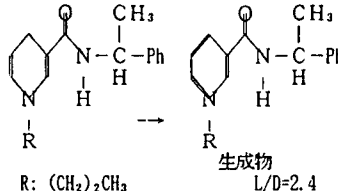
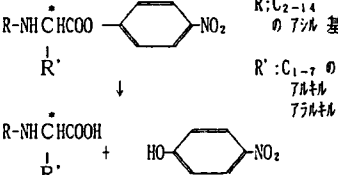
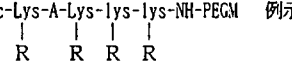
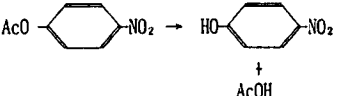
No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
1	Howard L. Levin E. T. Kaiser (シカゴ大学 化学科)	フラボノバインによるジヒドロニコチン アミドの酸化 J. Am. Chem. Soc., <u>100</u> (24)7670-7677(1978)	ババインの活性部位 Cys-25 に酸化還元 の補酵素であるフラビンのアナログを共 有結合で導入した半合成の“フラボリン”	酸化	各種 N-7-alkyl-flavonamide → 当該酸化物 	なし	212 個のアミノ酸からなる天然バインの活性 部位に 7- α -formyl-10-fluoranthene を導入 した半合成酵素フラボリンの触媒作用を検討 した。 ジヒドロニコチンアミドを上記のフラボバ バインで酸化
2	James T. Slama Subba Rao Organti E. T. Kaiser (シカゴ大学 化学科)	半合成酵素; 高い触媒活性を有した新規 フラボノバインの合成 J. Am. Chem. Soc., <u>103</u> (20)6211-6213(1981)	ババインの活性部位 Cys-25 に酸化還元 の補酵素であるフラビンのアナログを共 有結合で導入した半合成の“フラボリン”	酸化	N-7-alkyl-flavonamide (基質) → その酸化物 	なし	天然の蛋白加水分解酵素ババイン活性部位 Cys-25 に酸化還元反応の補酵素であるフラ ビンのアナログを共有結合で導入した半合 成酵素“フラボノバイン”による N-7-alkyl- flavonamide の酸化反応を検討した。 アルキル鎖の最も長い左図 R = (CH ₂) ₁₁ CH ₃ 疎水性の高い 11 番を基質としたときに、非 酵素反応の 621 倍という酸化触媒活性を示 した。
3	谷原 睦 菊地 伸 今西幸男 (京大 工学部高分子化学科)	キラルな側鎖をもつヒスチジン含有の環状 ジペプチドを触媒として用いた、エナンチ オマー選択性のソルボリシス Int. J. Biol. Macromol., <u>4</u> , 297-304(1982)	cyclo-[L-Glu-(L-Leu-OBzl)-L-His] cyclo-[L-Glu-(L-Leu-OH)-L-His]	ソルボリシス = 加水分解	例示 CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOPh(NO ₂) → CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH + Ph(NO ₂) D- α -L-Leu-OPh(NO ₂) · HCl	なし	環状ジペプチドにキラルな側鎖を付けたヒ スチジン含有のトリペプチド等の触媒を用 い、p-ニトロフェニルラウレート塩酸塩等 の加水分解で、左記のトリペプチド使用す ると D-型エナンチオマーがより迅速に加水 分解された。 直鎖状のトリペプチドではエナンチオマー 選択性の加水分解を認めなかった。
4	菊地 伸 谷原 睦 今西幸男 (京大 工学部高分子化学科)	環状ジペプチド骨格を有したトリペプチド の立体配座的な特性とエナンチオマー選択 性の加水分解におけるその触媒特性 Int. J. Biol. Macromol., <u>4</u> , 305-312(1982)	cyclo-[L-Glu-(L-Leu-OBzl)-L-His] cyclo-[L-Glu-(L-Leu-OH)-L-His]	加水分解	D-Leu-OPh(NO ₂) · HCl L-Leu-OPh(NO ₂) · HCl	なし	環状ジペプチド骨格を有するトリペプチド の立体配座と触媒活性について検討した。 cyclo-[L-Glu-(L-Leu-OBzl)-L-His]等の環 状ジペプチドは旗竿付きボートの形をとっ ていて、側鎖のヒスチジンはボートと同一 平面上に位置している。 D-Leu-OPh(NO ₂) · HCl カルシ型のそれよりも 加水分解がされやすいことに敷衍している 。
5	谷原 睦 今西幸男 (京大 工学部高分子化学科)	ヒスチジンを含む環状ヘキサペプチド を用いた活性 α -アミノ酸塩化水素化物 の高効率でエナンチオマー選択性のある 加水分解 Polymer Journal, <u>15</u> (7)499-507(1983)	cyclo(D-Leu-L-Glu-L-His) ₂	加水分解	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOPh(NO ₂) → CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH + Ph(NO ₂) CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOPh(NO ₂) → CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH + Ph(NO ₂) Val-OPh(NO ₂) · HCl → D-Val + L-Val + Ph(NO ₂) Leu-OPh(NO ₂) · HCl → D-Leu + L-Leu + Ph(NO ₂)	なし	ヒスチジンを含む環状ヘキサペプチドを用 いて、各種のカルボン酸 p-ニトロフェニル エステルの加水分解における触媒活性を検 討した。 左記長鎖カルボン酸の場合上記ペプチドは イミダゾールに比べて 3 ~ 20 倍の加水分解 能を示した。Cu(ClO ₄) ₂ を添加すると左記 Val や Leu とのエステルの加水分解は 40-150 倍で D-型エナンチオマー的加水分解が認められた。

表 1 ペプチドの触媒作用に関する文献一覧

No. 2

No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
6	Barry Robson (マンチスター大学 生化学科)	生物学的に活性なポリペプチドの設計 CRC Crit. Rev. Biochem., 14 (4)273-296(1983)					生理活性のあるポリペプチド設計についての総説。 人工酵素、医薬品などの分子を構築する場合のデザインの意義、目的とする機能の解析などを解説、紹介した。(引用文献数 127 件) ペプチドの触媒作用には余り立ち入ってはいない。 (参考のため収録した)
7	E. T. Kaiser D. S. Lawrence (シカゴ大学 化学科)	酵素の活性部位の化学変性 Science 226, 505-511(1984)	ババインの活性部位 Cys-25 に酸化還元 の補酵素であるフラビンのアナログを共 有結合で導入した半合成の"ババイン"	酸化	 R: (CH₂)₂CH₃ 生成物 L/D=2.4	なし	天然の蛋白加水分解酵素ババイン活性部位 Cys-25に酸化還元反応の補酵素であるフラ ビンのアナログを共有結合で導入した半合 成酵素"フラボババイン"によるN-7-メル カプトコチナールをN-7-メルカプトコチナール に酸化 立体規則性 L/D=2.4の結果を得た。 (ババインを加水分解酵素としてではなく 基質をつかまえるためのポケットとして利 用している)
8	大久保捷敏 柳 茂好 緒方春美 (熊本大 工学部合成化学科)	光学活性アミノ酸入手のための高基質 立体選択触媒の開発と応用 旭硝子工業技術奨励研究報告 46 233-243(1985)	例示 ババイン系: Z-(L)-Leu-(L)-His トリババイン系: Z-(L)-Leu-(L)-His-(L)-Leu	加水分解	 R: C₂₋₁₄ のアシル基 R': C₁₋₇ のアシル基	なし	光学活性アミノ酸入手のためのホスト-ゲスト型 金属酵素型、ババイン型酵素の3種のホスト-ゲスト型 触媒活性をアミノ酸エステルのエナンチオ選択的加 水分解で調べた。その結果、光学活性アミ ノ酸の入手には、効率の良いババイン型 触媒を用い、キラル触媒とアミノ酸基質と の強い相互作用を分子会合系で可能となる 。本研究でババイン型触媒は二分子膜ババインの共 存を必要とし今後ババイン型界面活性剤と想定
9	Manfred Mutter Karl-Heinz Altmann Juelgen Schmitt (バーゼル大学 有機化学科)	酵素類似の触媒作用の単一中心モデルとし てのポリ(エチレングリコール)結合ペプ チド Makromol Chem Rapid Commun 6, (11)785-789(1985)	Boc-Lys-A-Lys-lys-lys-NH-PEGM 例示  Boc=tert-butyloxycarbonyl A=Lys(ε-NH ₂)---- 活性中心 PEGM=poly(ethylene glycol)monomethyl -ether (MW=約5000) R=Ph-CO-系誘導体	加水分解	p-ニトロフェニルアセート(例示)  注)p-ニトロフェニルアセートの場合も検討している	なし	疎水性効果の強いPEG-ババイン-A-ババイン型の求 核試薬でペプチド成分がLys-Lys または Phe- Phe, A が Lys(ε-NH ₂) または ヒスチジン残基 の存在で酵素類似の触媒作用のp-ニトロフェニルアセ ートの加水分解速度定数を求めた。これら求核 試薬の触媒活性は酵素の場合よりもはるかに 劣るので、酵素モデル系の組み立てに際 しては疎水性効果以外の各種パラメーター の検討が必要である。(de novo設計蛋白)
10	武石 誠 (山形大 工学部高分子化学科)	高分子触媒による加水分解 高分子加工, 35(10)486-492(1986)	引例1. L-Leu-L-His のババイン 側鎖をもつトリバ バイン 引例2. L-Phe-L-His-L-Leu のトリババイン (但しベンジル系)	加水分解	引例1. アラニンエステル→その加水分解物 引例2. N-デカイルフェニルアラニンエステル →その加水分解物	なし	高分子触媒総説(引用数 39 件)にババイン触 媒の立体選択的加水分解の部分も採録す。 引例1. (Y. Kimura ら Chem. Lett. 1984 429) はその加水分解速度比k(L)/k(D)=3.6 引例2. (R. Ueno ら Chem. Lett. 1984 1807) はN-デカイルフェニルアラニンエステルの場合 その加水分解速度比k(L)/k(D)=27 と極めて大きい。

No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
1 1	大久保捷敏 三宅しげのぶ (熊本大 工学部合成化学科)	ジペプチドトリペプチドヒスチジン触媒を含む二層ベシクラー系によるエナンチオマーアミノ酸エステルの効率的な立体選択性の加水分解 J. Chem. Soc. Perkin Trans II .. 1987, 995-1001 (1987)	Z-(L)-Phe-(L)-His ; (2a) Z-(L)-Leu-(L)-His ; (2c) Z-(L)-Leu-(L)-His-(L)-Leu	加水分解	$\text{Me}(\text{CH}_2)_n \text{CONH} \underset{\text{R}}{\overset{\bullet}{\text{C}}} \text{HCOO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2$ $\downarrow$ $\text{Me}(\text{CH}_2)_n \text{CONH} \underset{\text{R}}{\overset{\bullet}{\text{C}}} \text{HCOOH} + \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	なし	ヒスチジンを含むジペプチドトリペプチドの二層ベシクラー系における光学活性アミノ酸エナンチオマーエステルの効率的な立体選択性の加水分解を検討した。 n=8, R=PhCH ₂ の基質でZ-Leu-L-Hisのジペプチド触媒を用いた場合、最も良い結果が得られた。即ち4℃の条件でL/D=148.2のエナンチオマー比であった。 界面活性剤; (Me(CH ₂) ₁₁) ₂ NMe ₂ Br を使用した。
1 2	佐々木としゆ Emil T. Kaiser (ロンドン大 生物有機化学)	ヘリクロム; 設計ヘム蛋白の合成とその酵素活性 J. Am. Chem. Soc., 1989, (111)380-381(1989)	Ala-Glu-Gln-Leu-Leu-Gln-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Leu-Gln-Glu-Leu-amide 上記15ペプチドをポルフィリンの4 隣に1 個導入し、疎水性ポケットをヘリクロム ポルフィリンにFeを導入し、NADPH, フラビン補酵素とした。	酸化	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2 \rightarrow \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$	なし	ポルフィリンに4つのペプチドを導入したヘリクロムでアニリンからp-アミノフェノールへの酸化反応の触媒活性を検討した。結果は天然のヘリクロムと比べて決して見劣りするものではなかった。 ヘリックスは疎水性基が内側に向かい、基質を捕らえる疎水性ポケットが出来る。
1 3	大久保捷敏 河田正彦 石田 斉 (熊本大 工学部合成化学科)	エステル分解酵素モデルに基づく短鎖のN-アセチルアミノ酸p-ニトロフェニルエステルの非常に効率的なエナンチオ選択性のある加水分解 J. Chem. Soc. Perkin Trans I., 1989, 666-667(1989)	ベンジル系 N-(N-benzoyloxycarbonyl-L-Leucyl)-L-histidine ; 即ち Z-L-Leu-L-His N, N-ditetradecyl-N, N-dimethyl ammonium bromide を用いたベシクラー系で加水分解させる	加水分解	$\text{N-acetylphenylalanine p-nitrophenyl ester}$ $\text{MeCONH} \underset{\text{R}}{\overset{\bullet}{\text{C}}} \text{HCOO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2 \quad \text{R}; \text{CH}_2\text{Ph}$ $\rightarrow \text{N-acetyl-Phe} + \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	なし	N, N-ジテトラデシル-N, N-ジメチルアモニウムブロマイドを用いたジペプチド触媒 Z-L-Leu-L-Hisを用いたベシクラー系でN-アセチルアミノ-p-ニトロフェニルエステルの加水分解を検討した。 上記条件の場合、L/D=167 ±21 のエナンチオマ活性の加水分解結果を得た。
1 4	William F. DeGrado Zelda R. Wasserman James D. Lear (デュポン 中央研究所)	蛋白設計 最短のアプローチ Science 243, 622-628(1989)				なし	蛋白(ペプチド)設計のアプローチ方法の総説。(引用文献数 79 件) より単純化したde novo モデルに重点指向している。 立体配座でヘプタペプチドが2つ集合した場合や、4つが集合した場合の疎水性ポケットの場所など先行文献を紹介
1 5	上岡龍一 松本陽子 原田久美子 杉井 篤 (熊工大 工学部化学科) (熊大 薬学部 薬学科)	人工酵素のコンホメーションと不斉加水分解制御 有機合成化学 47 (1)53-61(1989)	Z-His-Phe Z-Phe-His Z-Phe-His-Leu	加水分解	$\text{R}' \text{CONH} \underset{\text{R}}{\overset{\bullet}{\text{C}}} \text{HCOO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2 \quad \text{R}; \text{CH}_2\text{Ph}$ $\downarrow$ $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 + \text{R}' \text{CONH} \underset{\text{R}}{\overset{\bullet}{\text{C}}} \text{HCOOH}$	なし	顕著に大きな不斉加水分解機能をもつペプチド触媒のコンホメーションやミクロ環境をコントロールすることによる立体制御のメカニズムについて円偏光二色性(CD)スペクトルからの情報を基に論じた。 ミセル系、ベシクラー系での不斉加水分解

表 1 ペプチドの触媒作用に関する文献一覧

No. 4

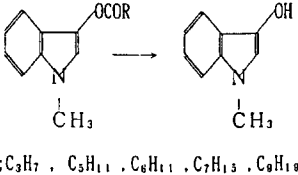
No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
16	八木よしこ 木村俊作 今西幸男 (京大 工学部高分子化学科)	グラミジジンS類似体と脂質二層膜との相互作用 Int. J. Peptide Protein Res 36, 18-25(1990)	環状ペプチドであるグラミジジンS アナログ Pro-Val-Orn-Leu-Phe Phe-Leu-Orn-Val-Pro His (11ペプチド) 略称 HGS	加水分解	 R: C ₃ H ₇ , C ₅ H ₁₁ , C ₆ H ₁₃ , C ₇ H ₁₅ , C ₉ H ₁₉	なし	DPPC(dipalmitoylphosphatidylchlorine)のベシクラー系で左記化合物の加水分解をグラミジジンS アナログを用い検討した。 左記加水分解はN-メチル 3-ヒドロキシインドールの生成に基づく420 nmの蛍光強度の増加で確認された。
17	大久保捷敏 石田 斉 河田正彦 川畑隆志 東 千江 清武耕三 (以上 熊本大 工学部) 森安真津子 (御付けファームボトリクス) 曾根久雄 (" ")	ヒスチジン誘導体および抗体を用いた アミノ酸エステルの立体選択的加水分解 日本化学会第59春季年会生体機能関連化学 シンポジウム講演要旨集 13-16(1990)	Z-L-Leu-L-His Z-L-Leu-L-His-L-Leu	加水分解	長鎖アルキル基を有する p-ニトロフェニルエステル 例示 C ₁₀ -Phe-PNP + L-Tyr-OEt → Z-Phe-L-Tyr-OEt + HO-C ₆ H ₄ -NO ₂	なし	ヒスチジン誘導体によるアミノ酸エステルの立体選択的加水分解反応を検討した。 Z-L-Leu-L-His のジペプチドを触媒としたとき、C ₁₀ -Phe-PNP の加水分解における生成物 L/D = 23 を得た。
18	大矢裕一 (関西大学 工学部応用化学科)	ポリペプチドを用いた生体模倣機能性分子 の設計 関西大学工学会誌 工学と技術 9 (4)63-70(1990)					筆者が京大在学中に今西教授指導のもと 実施した関連分野の研究をまとめたもの。 引用文献数 30 件 総説。
19	佐々木とみかず (7シフト 大)	酸化還元触媒として De Novo 設計された ヘムタンパク Proc. Ann. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Bio. Sci 12th 4 1735-1736(1990)	例示 Ala-Glu-Gln-Leu-Gln-Glu-Ala-Glu-Gln- -Leu-Leu-Gln-Glu-Leu-CONH ₂ などがポリフィリン-Zn ²⁺ 等配位した ヘム蛋白(ヘリクロム)	酸化還元		なし	レドックス触媒作用を有するZn(II)のヘリクロムを合成した。 基質を取り込む疎水性のポケットをもつヘリクロムを得た。 このものはイミダゾールと選択的に結合する。 レドックス作用の具体例なし。
20	大久保捷敏 石田 斉 桂井 好和 河田正彦 (熊本大 工学部合成化学科)	二層ベシクラー系におけるトリペプチド型 の L-ヒスチジン誘導体によるN-7アルキル 酸エステルのエナンチオ選択的加水分解 Chem. Letters 1991, 1723-1726(1991)	Z-L-Leu-L-His-L-Leu Z;benzyloxycarbonyl 基	加水分解	N-7アルキルフェニルアミン p-ニトロフェニルエステル C _n - L(D)Phe-PNP (n=2, 10, 16) → 該当加水分解物 (CH ₃ (CH ₂) ₁₁) ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ Br ⁻ を使用した 2層膜ベシクラー系で実施		N-7アルキルフェニルアミン p-ニトロフェニルエステル 即ち C _n - L(D)Phe-PNP (n=16) を Z-L-Leu-L-His-L-Leu のトリペプチド 触媒を用い、 (CH ₃ (CH ₂) ₁₁) ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ Br ⁻ の二層膜 ベシクラー系で加水分解させて、 L/D=52 とエナンチオマー選択性の加水分解結果を得た。

表 1 ペプチドの触媒作用に関する文献一覧

No. 5

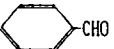
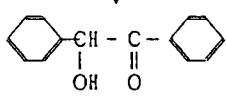
No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
2 1	井上洋平 森 敦志 (東大 工学部)	人工酵素にも不斉シフト合成法の開発と応用-- 環状ジペプチドを触媒に用いる α , β -不飽和アルデヒドの不斉ヒドロシアン化反応など 平成元年度科学研究費補助金成果報告書 92 J. Org. Chem., 55 181(1990) ほか	環状ペプチド 1 cyclo-(L-Phe-L-His) 環状ペプチド 2 cyclo-(L-Leu-L-His)	ヒド/7/化 反応	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CHO} + \text{HCN} \xrightarrow{1} \text{Ph-C(OH)(CN)} \quad \text{R 型 } 97\% \text{ ee}$ $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CHO} + \text{HCN} \xrightarrow{2} \text{Ph-C(OH)(CN)} \quad \text{S 型 } 55\% \text{ ee}$	97 %	cyclo-(L-Phe-L-His) などの環状ジペプチドを用いて、各種のアルデヒドへのHCNの付加反応(ヒド/7/化反応)を実施した。高収率で不斉収率の高い結果を得た。アルデヒドとしては脂肪族アルデヒド、芳香族アルデヒド、チオフェンアルデヒドなども検討している。
2 2	今西幸男 木村俊作 伊藤嘉浩 (京大 工学部高分子化学科)	生体機能材料の合成と機能制御 高分子論文集 48 (4)185-199(1991)					蛋白質の設計と合成に関しては、i) 化学的手法による人工酵素 ii) 蛋白質の化学修飾による人工酵素など4通りのアプローチについて最近の研究の展開を紹介した総説。 引用文献数 71 件
2 3	菅原 正 上山のけい 中村あけみ (阪大 理学部高分子化学科)	高ばった7-アミノ酸は システイン含有トリペプチド配位子をもつ[Fe ₄ S ₄] 錯体の共存下におけるp-ベンゾキノンによるベンゾインの生体模倣的酸化の触媒機構 J Chem Soc Dalton Trans 1991(2)249-253(1991)	ペプチド錯体 1 [Fe ₄ S ₄ (Z-CysS-Pro-Val-OMe) ₄] ²⁻ ペプチド錯体 2 [Fe ₄ S ₄ (Z-CysS-Pro-Gly-OMe) ₄] ²⁻ など 注) CysS ; S-deprotonated cystteinate	酸化	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH(OH)-C(=O)-C}_6\text{H}_5 + \text{ベンゾイン} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{-C(=O)-C(=O)-C}_6\text{H}_5 + \text{H}_2\text{O}$	なし	酸化の速度定数はペプチド配位子またはチオラートの高ばり度に依存した。 高い錯体 1 の方が、錯体 2 よりも5 倍の活性を示した。
2 4	上岡龍一 松本陽子 加藤康夫 (熊工大 工学部工業化学科)	ミセル系エステラーゼモデルの構築 化学工学論文集 17 (3)518-523(1991)	ヒスチジン含有ジ- トリペプチド Z-L-His-L-Leu Z;N-BOC Z-L-Phe-L-His Z-L-Phe-L-His-L-Leu ヘキサデシルベンジルジメチルアモニウム(CBzAC) ミセル系	加水分解 (エステラーゼ)	N-dodecanoyl L(D)-phenylalanine p-nitrophenyl ester $\text{C}_{11}\text{CONHCH(R)COO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 \quad \text{R:CH}_2\text{Ph}$ $\rightarrow \text{該当加水分解物} + \text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$	なし	エステラーゼモデルにカチオン性界面活性剤とペプチド触媒との混合ミセル系を選び長鎖アミノ酸エステル C ₁₂ -L(D)-Phe-PNPの加水分解を行わせた。触媒とL-体基質間の有効な疎水性認識効果とともに、界面活性剤(CBzAC)の疎水性効果の加わり、臨界ミセル濃度以上でL/D=38 と顕著な不斉識別が発現された。
2 5	上岡龍一 松本陽子 加藤康夫 (熊工大 工学部工業化学科)	ハイブリッド液体膜の形態と 酵素学的利用 化学工学シンポジウムシリーズ 26 180-186(1991)	Z-Phe-His-Leu Myr-His-Leu	加水分解	例示 $\text{R'CONHCH(R)COO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 \quad \text{R:CH}_2\text{Ph}$ $\rightarrow \text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2 + \text{R'CONHCH(R)COOH}$	なし	ベシクル分子とミセル分子を適切な割合で混合したハイブリッド液体膜はイオン強度により大きさが変化することが分かった。この系にZ-Phe-His-Leu などのペプチド人工酵素を組み込み、7% 酸基質の不斉加水分解を試みた。ハイブリッド液体膜の相転位温度でL/D を最大にし、適切なイオン強度条件下でL-体基質にのみ触媒作用を示す酵素類似機能の発現に成功した。

表 1

No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
26	Margarita Perello Bernard Barbier Andre Brack (フランス CNRS 分子生物物理)	α -ヘリックス性塩基性ペプチドによる オリゴボヌクレオチドの加水分解 Int. J. Peptide Protein Res. <u>38</u> 154-160(1991)	ポリペプチド 1 poly-(Leu-Lys-Lys-Leu) _n - α -helical ポリペプチド 2 poly-(Pro-Lys-Lys-Leu) _n - non-helical ポリペプチド 3 Ac-(Leu-Lys-Lys-Leu) _n -NH ₂ $n=1\sim4$	加水分解	オリゴボヌクレオチド → 該当加水分解物	なし	オリゴボヌクレオチドの加水分解は α -ヘリックス構造をとる左記ポリペプチド1が加水分解反応を顕著に加速した。ヘリックス構造をとっていないポリペプチド2はその活性が非常に低かった。左記オリゴペプチド $n=1$ のものは加水分解活性を示さなかったが、 $n=4$ と長鎖のものは α 構造をとり得て活性を示した。
27	大久保健敏 石田 斉 (熊本 工学部応用化学科)	立体選択的分子認識機能を有する人工 酵素の分子設計 高分子 <u>41</u> (3) 196-199(1991)	Z-Leu-His 2C ₁₄ N ₂ C ₁ ベシクル分子	加水分解	N-アセチルアミノ酸エステル 即ち N-アセチル(10)-7- α -アミノ- β - アミノ酸 C ₂ -Phe-PNP → HO-C ₆ H ₄ -NO ₂ + R' CONH CHCOOH ↓ R	なし	プロテアーゼ活性を発現するペプチド触媒ジオキシゲナーゼ活性を発現する金属酵素モデル及び抗体触媒などについて述べて、一方向の触媒-基質間多点相互作用を通じて、一方のエナンチオマー(螺旋状態を含む)のみ反応を行う人工酵素の分子設計、分子設計に伴う分子軌道・分子動力学解析の導入の重要性を示唆した。
28	老川典夫* 左右田健次** (関西大学*, 京大化研**)	セレンを含むアミノ酸 ペプチド、酵素 バクテリアとインフラ 50. (12) 1197-1201(1992)	グルタチオン(Glu-Cys-Gln) N-ペプチドの Cys をセレノシステイン(下図参照) で置換したペプチド(グルタチオンと称す) COOH H ₂ N-CH-CH ₂ - SeH	(グルタチオン ペプチド)の 加水分解 過酸化水素 存在下で還元的に分解する (本誌には具体例示なし)	過酸化水素 又は 有機過酸化水素 をグルタチオンの存在下で還元的に分解する (本誌には具体例示なし)	なし	セレンを含むアミノ酸、ペプチド、酵素の総説。(引用文献数 24 件) グルタチオン(Glu-Cys-Gln) N-ペプチドのシステインにセレノシステインを置換したグルタチオンペプチドはグルタチオンペプチドと同等の活性を示す(老川** 微量要素研究 8 75-80(1991)) 筆者らの研究を紹介している。推定反応機構を紹介しているが、現段階では明確な証拠は得られていない。
29	大久保健敏 石田 斉 (熊本 工学部応用化学科)	分子認識機能性触媒の分子設計 --最近の生体関連触媒も 光触媒も 中心として-- 有機合成化学 <u>50</u> (3) 234-243(1992)	ジペプチド Z-Leu-His トリペプチド Z-Leu-His-Leu 2C ₁₄ N ₂ C ₁ ベシクル分子	加水分解	C ₁₄ N ₂ C ₁ 酸-PNP n=2, 10, 16 → HO-C ₆ H ₄ -NO ₂ + R' CONH CHCOOH ↓ R	なし	最近の生体関連触媒の総説。 (引用文献数 18 件) ペプチド誘導体を触媒とする立体選択的アミノ酸エステルの加水分解を紹介。 C ₁₄ -Phe-PNP をジペプチドよりも更に流水性の大きな左記トリペプチド触媒において極めて高い立体選択性 L/D=52 が発現した。
30	大久保健敏 (熊本 工学部応用化学科)	人工酵素を分子設計する --多点相互作用の分子動力学解析-- 化学 <u>47</u> (7) 466-472(1992)	ジペプチド Z-Leu-His トリペプチド Z-Leu-His-Leu 2C ₁₄ N ₂ C ₁ ベシクル分子	加水分解	C ₁₄ N ₂ C ₁ 酸-PNP n=2, 10, 16 → HO-C ₆ H ₄ -NO ₂ + R' CONH CHCOOH ↓ R	なし	触媒・基質は既に発表しているものと同じだが、多点相互作用の分子動力学(MD)解析を試みた。 即ち、Z-Leu-His と N-ベンチル-L-Phe 基質との多点相互作用反応、NOESY 実験に基づく計算による 2C ₁₄ N ₂ C ₁ 二分子膜中の Z-Leu-His 触媒のエネルギー最小化構造、触媒と基質との距離(A) vs 時間(t) の MD モシミュレーション等で検討している。

表 1 ペプチドの触媒作用に関する文献一覧

No. 7

No.	研究者 (研究機関)	タイトル 並びに 出典	物質・補酵素など	反応の種類	基質と生成物	(%) 反応収率	抄 録
3 1	R. C. deL. Milton S. C. F. Milton S. B. H. Kent (Scripps 研究所 USA)	D-型酵素の全化学合成; HIV-1 プロテアーゼのモノマー は相反するキラル な基質に特異性を示す。 Science, <u>256</u> 1445-1447(1992)	D-HIV protease (全化学合成) L-HIV protease	プロテアーゼ	L- 型蛋白 D- 型蛋白	なし	D 型酵素と L 型酵素の HIV プロテアーゼ を全化学的に合成して特性が全く相反して おり、その構造は立体的に鏡像関係にある。 L-型酵素は L 型の基質にのみ反応するの に対して、D 型酵素は D 型基質にのみ作用す る。D 型酵素は天然に無い特殊な基質に作 用し生体内で D 型は分解されないで長時 間機能しうることなどから、D-型 HIV-1 プ ロテアーゼ治療への応用の可能性を潜めている。
3 2	山下啓司 佐々木伸一 寺井智彦 戸田雅啓 南後 守 津田和一 (名工大 応用化学科)	チアゾリウム塩担持ペプチドの合成とその 触媒能 Polymer Preprints, Japan <u>42</u> , (3) 1051(1993)	Boc-Th-Ala-Phe-OMe 略MTFI MeI Boc-Th-Ala-Phe-Phe-OMe 略MTFFI (補酵素アミノ酸の活性中心である チアゾリウム (=Th と略記) 塩ペプチドを検討した)	アシロイン 縮合 (= ペンタイン 縮合)	2  CHO ↓ 	(MTFI) 44.0 (MTFFI) 36.2 (PThAla) 11.6	チアゾリウム塩基を担持させたオリゴペプ チド、ポリペプチドを合成してアシロイン 縮合活性について検討した。 触媒活性は MTFI, MTFFI, PThAla (=チアゾリウ ム塩基担持ペプチド) と低分子量の方が良か った。 なお僅かながら (数% 程度) 不斉選択性が 観察された。
3 3	M. Zouhair Atassi Taghi Manshouri (Baylor医科大学 生物化学科)	ペプチド酵素 "Pepzyme" 設計 トリプシン 及びトリプシンの活性部位を模倣した 表面ディスプレイの合成ペプチドと各酵素の 特性 Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>90</u> 8282-8286(1993)	ChPepz ; α-トリプシン 活性面を模倣した 29 ペプチド TrPeps ; トリプシン 活性面を模倣した 29 の ペプチド 何れも SS 結合で環状構造をとっている	加水分解	N-benzoyl-L-trypsine ethyl ester (略 BTEE) → 該当加水分解物 (但し触媒 ChPepz) N-Tosyl-L-arginine-methyl ester (略 TAME) → 該当加水分解物 (但し触媒 TrPepz)	なし	α- トリプシン (αCT) の活性部位を模倣し た ChPepz とトリプシン (Trypsin) を模倣し た TrPepz を合成して加水分解機能を検討した。 何れも 29 の ペプチドで、S-S 結合で環状構造である。 αCT の基質である BTEE を合成酵素の ChPepz で 加水分解しても αCT と同程度の分解速度を示 した。Trypsin の基質である TAME を TrPepz で加 水分解すると天然酵素 Trypsin の約 40% の分 解速度であった。
3 4							
3 5							

「先進バイオ材料の創製加工技術の研究開発
(ペプチド応用二酸化炭素固定化・有効利用技術)」
成 果 報 告 書
(第2巻：総合調査研究)

平成6年3月発行

編集・発行 財団法人 大阪科学技術センター

〒550 大阪市西区靱本町1-8-4

財団法人 大阪科学技術センター

TEL (06)443-5321

FAX (06)443-5319

禁無断転載