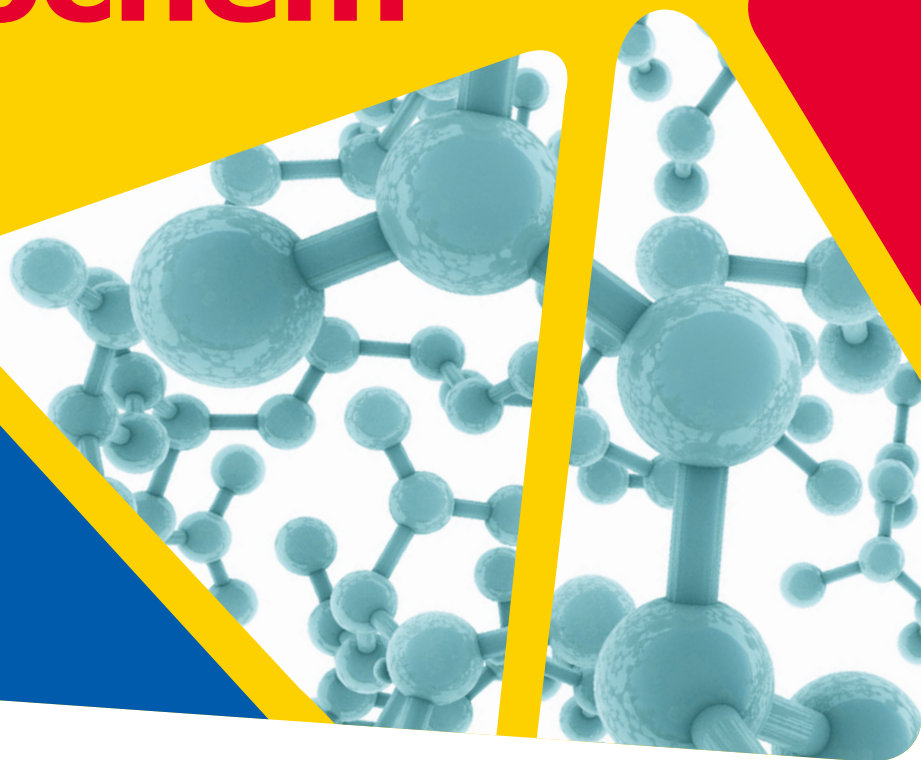


Novabiochem® NEWS

特集：
翻訳後修飾 (PTM) に
焦点を当てる



30年を超えるイノベーション

メルクのNovabiochemブランドは、PTM (Post-Translational Modifications) を含むペプチド合成手法開発のトップランナーであり、Fmoc法によってリン酸化ペプチド、硫酸化チロシン、およびメチル化アルギニンを含むペプチドを合成するための効果的なビルディングブロックを業界で初めて提供しました。以来、30年超の実績を積んでまいりました。

本ニュースレターでは、弊社が提供する関連試薬について、推奨される使用法とその詳細を紹介します。

なお、John Offer博士とNovabiochemの研究者が本レターの内容をレビューしています[1]。

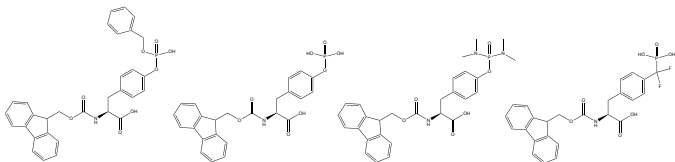
CONTENTS

- 1. リン酸化..... 2
- 2. 硫酸化..... 5
- 3. グリコシル化..... 5
- 4. メチル化..... 6



・リン酸化

Tyr



リン酸化チロシンを含有するペプチドの段階的合成に最も一般的に利用される誘導体は、Fmoc-Tyr(PO(Obzl)OH)-OH [2]、Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH [3]、およびFmoc-Tyr(PO(NMe₂)₂)-OH [4]の3種類であり、それぞれに長所と制約があります。

Fmoc-Tyr(PO(Obzl)OH)-OHは部分的に保護されたリン酸エステルであるため、カップリング反応とペプチド鎖伸長に問題があるものの、最もよく利用されています。これには、HBTUやHATU [5]のようなウロニウムをベースとするカップリング試薬を利用して組み込むのが最も適しています。ウロニウム試薬とともに、通常は2〜3倍過剰に用いるDIPEAの量をさらに過剰に使用するのがよいことが報告されています[6]。部分的に保護されたリン酸エステルは、Fmoc基を除去するときにピペリジンと塩を形成する可能性があります[7]。このピペリジンがアシル化されると、カップリング反応時に過剰に存在する活性化アミノ酸の減少につながります。これは、リン酸化アミノ酸を1つしか含まないペプチドでは大きな問題になりませんが、多くのリン酸化残基を含むペプチドではカップリング反応が不完全になる深刻な問題につながる可能性があります。幸いこの問題は、カップリング試薬をさらに増やすか、またはピペリジンの対イオンを第三級アミンに代えることで解決できます。通常、側鎖のベンジル保護基は標準的な95% TFAでの処理中に1〜2時間で除去されます。時には、この開裂反応中に反応性の高いTyr、Cysといった残基がベンジル化されることがあります。このような場合は、切出し反応混合物にEDTを使用してこの副反応を最小限に抑えなければなりません。

メルクライフサイエンスの 6つのブランドをご存知ですか？



**THE 6
sharpest
perspectives**

for focused science and technology
solutions in life science

Sigma-Aldrich®

研究から製造用まで試薬全般

Milli-Q®

超純水・純水製造装置

Millipore®

フィルター・
微生物検査用製品

Supelco®

分析用製品

SAFC®

医薬品およびバイオ医薬品の
原料・ソリューション

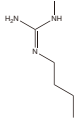
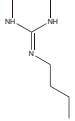
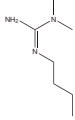
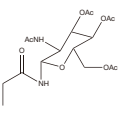
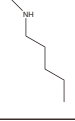
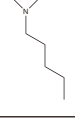
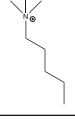
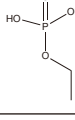
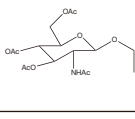
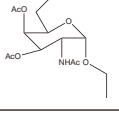
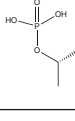
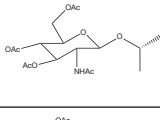
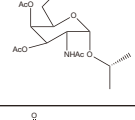
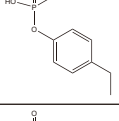
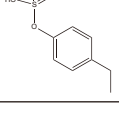
BioReliance®

医薬品およびバイオ医薬品の
製造・試験

Novabiochem製品はSigma-Aldrichブランドに!

製品パッケージ・ラベル等は順次変更されますが、今後も揺るぎない高品質で皆様のペプチド合成をサポートいたします。

表1：一般的なPTMおよび推奨されるビルディングブロック

Amino acid	PTM	side chain	Recommended building block	Product number
Arg	Me		Fmoc-Arg(Me,Pbf)-OH	852105
	s-diMe		Fmoc-SDMA(Boc) ₂ -ONa	852310
	α-diMe		Fmoc-ADMA(Pbf)-OH	852107
Asn	AcNH- β -Glc		Fmoc-Asn(Ac ₃ AcNH- β -Glc)-OH	852135
Lys	Me		Fmoc-Lys(Me,Boc)-OH · HCl	852106
	diMe		Fmoc-Lys(Me) ₂ -OH	852111
	triMe		Fmoc-Lys(Me) ₃ Cl-OH	852112
Ser	PO ₃ H ₂		Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH Fmoc-D-Ser(PO(OBzl)OH)-OH	852069 852244
	AcNH- β -Glc		Fmoc-Ser(Ac ₃ AcNH- β -Glc)-OH	852349
	AcNH- α -Gal		Fmoc-Ser(Ac ₃ AcNH- α -Gal)-OH	852136
Thr	PO ₃ H ₂		Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH Fmoc-D-Thr(PO(OBzl)OH)-OH	852070 852245
	AcNH- β -Glc		Fmoc-Thr(Ac ₃ AcNH- β -Glc)-OH	852350
	AcNH- α -Gal		Fmoc-Thr(Ac ₃ AcNH- α -Gal)-OH	852229
Tyr	PO ₃ H ₂		Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH Fmoc-D-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH	852071 852246
	SO ₃ H		Fmoc-Tyr(SO ₃ nP)-OH	852347

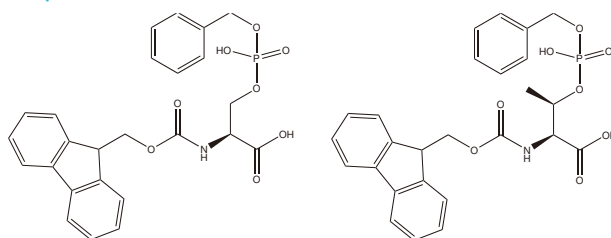
Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OHは、Fmoc合成によってリン酸化チロシンを導入する最も単純で最もコスト効率に優れた誘導体です[3]。リン酸エステル基が保護されていないため、保護基の除去に伴う問題はありませんが、Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OHと同様に、リン酸エステルが保護されていないことがそれ自体および次の残基の導入時に問題になります。一般にカップリングが極めて遅く、HATUを少なくとも3当量のDIPEAと一緒に使うと最良の結果が得られます。さらに、近接する位置にTyr(PO₃H₂)残基を含有するペプチドでピロリン酸エステルが形成されることが報告されています[8, 9]。

潜在的に反応性が高い酸性官能基を側鎖に有するFmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH、Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OHとは対照的に、Fmoc-Tyr(PO(NMe₂)₂)-OH[4]のリン酸エステル基は完全に保護されています。そのため、化合物上の溶解特性が向上するだけでなく、さらに重要なことにFmoc-Tyr(PO₃H₂)-OHやFmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OHを用いた場合に生じる副反応が回避されます。Fmoc-Tyr(PO(NMe₂)₂)-OHは、PyBOP®/DIPEA、TBTU/DIPEA、DIPCDI/HOBtといった標準的なカップリング方法を使って導入できます。

リン酸ジアミドは、酸を触媒とする加水分解によってリン酸化チロシンに戻します[7]。まず、適切なスカベンジャーを含有するTFAを使用した通常の方法でペプチドを樹脂から切出し、側鎖の脱保護を行います。次いで、切出し反応溶液に10体積%の水を加えて一晩放置すると、リン酸ジアミドが加水分解されます。

リン酸化チロシンの安定した等価体(イソスター)であるF₂Pmpを組み込むには、Fmoc-Phe(CF₂PO₃H₂)-OH (Fmoc-F₂Pmp-OH)を使用します[10]。F₂Pmpは、pKaが5.71であるために中性のpHで完全にイオン化し、メチレン基のフッ素原子が水素結合を形成することから、pTyrの極めて優れた模倣体となります。F₂Pmpで置換したペプチドは、SH2ドメインへの極めて高い結合親和性を示します[11]。F₂Pmp含有ペプチドは、非フッ素化Pmpを含有するペプチドと比べて親和性が1,000倍になることがPTPに対するアッセイで報告されています[12]。側鎖が保護されていないFmoc-F₂Pmp-OHを使用してF₂Pmp残基を導入すると、一般にリン酸エステルの保護のための、エチル基の除去に要する厳しい条件を付ける必要がありません[13]。しかし、リン酸エステルが保護されていないため、Fmoc-F₂Pmp-OHと後続のアミノ酸誘導体のカップリングが遅くなります。HATUと3当量のDIPEAを使った一晩かけてのカップリングが有効と考えられます。

Ser/Thr



リン酸化セリンとリン酸化トレオニンを含有するペプチドを段階的に合成する唯一の選択肢は、モノベンジル誘導体Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH [14, 2, 15]、Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH [2, 15]を使用する方法です。これは、これらのアミノ酸の完全に保護されたリン酸トリエステルがピペリジン処理時にβ-脱離を起こすためです。これらの誘導体では、Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OHと同様に側鎖のリン酸エステル基が部分的にしか保護されていないため、導入時の条件に特に配慮しなければなりません。3倍過剰のDIPEAを共存させたウロニウムベースのカップリング試薬を利用した場合に最も良い結果が得られます。

マイクロ波条件でピペリジン触媒によりN-末端のSer(PO(OBzl)OH)残基からFmoc基を除去すると、β-脱離が起こる可能性があります。この問題は、このステップに限ってピペリジンに代えてシクロヘキシルアミンを用いると回避できます[16]。

かんたんカタログ検索！ カタログファインダー

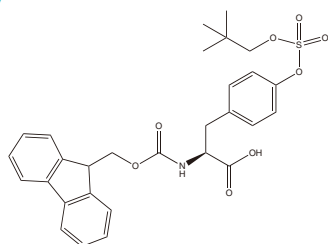
かんたん検索で、PDF のダウンロードや
カタログ請求も一括で行えます。

Novabiochem® カタログは製品紹介にとどまらず、詳細な実験プロトコル、アプリケーション例、実用的なアドバイスも併記されております。また、カタログの技術情報が日本語化された「固相合成ハンドブック」は、ペプチド合成における「バイブル」として、研究者の皆様にご覧いただいております。

ダウンロードはこちらから
<https://bit.ly/2U5aX8A>

・硫酸化

Tyr



真核生物のタンパク質に含まれるすべてのチロシン残基の最大1%が硫酸化されている可能性があると考えられています[17]。硫酸化は、分泌タンパク質と膜貫通タンパク質の細胞外タンパク質-タンパク質相互作用の調節に関わると考えられます。これは、ガストリン-II、コレシストキニン、セルレインなど多くのペプチドホルモンの生物活性を維持する上で不可欠な要件です。

チロシンの硫酸エステルは、酸中および質量分析時に生成されるフラグメント中で急速に分解されるため、部位特異的に硫酸化されたペプチドを得るのが難しいことがチロシンの硫酸化を研究する上での主なハードルの1つであり、その合成と特性評価が大きな問題でした。

NovabiochemのFmoc-Tyr(SO₃nP)-OH [18]の導入によって、現在では硫酸化チロシン含有ペプチドの合成は日常的な作業になりました。Fmoc-Tyr(SO₃nP)-OHを使用すれば標準的ななどの方法でもカップリング可能です。さらに、誘導体はDMFまたはNMPに極めてよく溶解するため、既存のプロトコールを変更することなく自動合成装置で容易に使用できます。nP基はピペリジンとTFAに対して安定しているため、開裂後にアジ化ナトリウムまたは酢酸アンモニウムで除去する必要があります[19]。

TFAとの接触時間が長くなるといくつかのnP基が失われる可能性があるため、切出し時間が延びないようにすべきです。一般に切出し時間が1.5時間であれば、nP基の損失が最小限に抑えられます。切出し反応は、反応のサンプリングとHPLCによる分析の後で進めるのが理想的です。Tyr(SO₃nP)を含有するペプチドは、対応するTyrおよびTyr(SO₃⁻)ペプチドに比べてHPLCカラムに強く保持されます。また、ポジティブモードのES-MSとMALDI-MSでも検出可能です。

nP硫酸エステルはピペリジンに対して安定していますが、アジドやシアン化物のような小さく強力な求核試薬で容易に切出し可能です。ペプチドに対するこの反応は、DMSOまたはDMF中、50℃で行うのが最も簡便であり、反応を完結させるには通常、一晚処理すれば十分です。反応後、過剰のアジドは非酸性緩衝液を使ってSPEまたはHPLCにより除去できます。一部のペプチドは2 Mの酢酸アンモニウム溶液に溶解し、得られた混合物を37℃で一晩加温するだけでnP基を除去できます。

・グリコシル化

Ser/Thr

Novabiochemは、O-グリコシル化されたペプチドのFmoc法によるSPPS向けにFmoc-Ser(Ac₃AcNH-α-Gal)-OH、Fmoc-Thr(Ac₃AcNH-α-Gal)-OH、Fmoc-Ser(Ac₃AcNH-β-Glc)-OH、およびFmoc-Thr(Ac₃AcNH-β-Glc)-OHを提供しています。2-アセトアミド-2-デオキシ-α-D-ガラクトピラノシル (AcNH-α-Gal) をベースとするO結合グリコシドは、生物学的に重要なさまざまな糖タンパク質 (ムチン、腫瘍関連Tn抗原、HIVからのgp120 [20]など) に存在します。一方、2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル (AcNH-β-Glc) によるセリン残基またはトレオニン残基の修飾はリン酸化ととても類似しています[21]。O-AcNH-β-Glcの付加と除去は、転移酵素であるUDPGlcNAcポリペプチドトランスフェラーゼ (OGT) によって制御される動的過程であり、β-N-アセチルグルコサミニダーゼによって除去されます。1分子の糖が付加され、含水炭素はそれ以上伸長しません。O-AcNH-β-Glcグリコシル化過程は転写、シグナルトランスダクション、アポトーシス、およびグルコースホメオスタシスに関連していると考えられています。

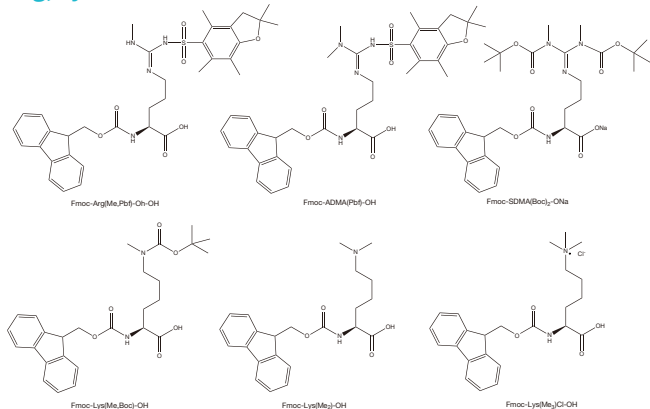
Asn

どのN-結合グリコシドも、β(1→N^β)結合を介してAsnに結合したマンノトリオシド-ジ-N-アセチル-キトビオースのコアを含んでいます。Novabiochemは、Asnの側鎖にN-アセチルグルコサミン部分を1つ結合した、糖ペプチドの前駆体であるFmoc-Asn(Ac₃AcNH-β-Glc)-OH [22]を提供しています。

上述したN-およびO-結合オリゴ糖アミノ酸誘導体のいずれも、Fmoc法による標準的なSPPSプロトコールを適用できます。これらの試薬は高価なため、少量を適宜使って導入し、TNBSテストまたはKaiserテストでカップリングをチェックするのが最適です。これには、標準的なあらゆるカップリング方法を利用できます。ペプチド鎖構築後にアセチル保護基を除去するには、メタノール性アンモニア[23]またはナトリウムメトキシド/DMF/メタノール[24]によりペプチジル樹脂を処理するか、触媒量のナトリウムメトキシド[25]によりメタノール中で開裂ペプチドを処理します。

・メチル化

Arg, Lys



現在、翻訳後のアルギニン残基とリシン残基のメチル化は、真核生物のタンパク質発現を調節する重要な制御機構であると認識されています[26, 27]。モノ、ジ、トリメチル化リシン、モノ、ジメチルアルギニン（非対称性、対称性いずれも）など、考えられるメチル化誘導体の大部分は生体内で起ることが分かっています。このような修飾は、細胞増殖、シグナルトランスダクション、タンパク質輸送、および転写活性化に関係するものと考えられています。

Novabiochemは、Fmoc法に対応する標準的な保護基を有し、側鎖がN-メチル化された広範なアミノ酸を提供しています。また、最も一般的なアルギニン修飾であるモノメチルアルギニン、対称性ジメチルアルギニン（SDMA）および非対称性ジメチルアルギニン（ADMA）を組み込むためのFmoc-Arg(Me,Pbf)-OH、Fmoc-SDMA(Boc)₂-ONa、およびFmoc-ADMA(Pbf)-OHも提供しています。これらの誘導体は標準的な活性化手法を利用してカップリングでき、Pbf基とBoc基は標準的な切出し用TFAカクテルで切出されます。Fmoc-Lys(Me,Boc)-OH、Fmoc-Lys(Me)₂-OH・HCl、およびFmoc-Lys

(Me₃Cl)-OHもそれぞれモノメチル、ジメチル、およびトリメチルリシンを導入するために利用できます。いずれにも標準的なFmoc法によるSPPSプロトコルを適用できますが、ジメチルリシンの側鎖はFmoc基の脱離を促進する可能性があるため、それ自体および次のアミノ酸をペプチド鎖に導入するには短時間のシングルカップリングをお勧めいたします。

参考文献

1. R. Behrendt, et al. (2016) *J. Pept. Sci.*, **22**, 4.
2. P. White & J. Beythien in "Innovations & Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries, 4th International Symposium", R. Epton (Ed.), Mayflower Scientific Ltd., Birmingham, 1996, pp. 557.
3. E.A Ottinger, et al. (1993) *Biochemistry* **32**, 4354.
4. H. G. Chao, et al. (1995) *J. Org. Chem.*, **60**, 7710.
5. J. Perich, et al. (1999) *Lett. Pept. Sci.*, **6**, 91.
6. P. White, Poster 159 presented at the 17th American Peptide Symposium, San Diego, June 2001.
7. R. Pascal, et al. in "Peptides 2000, Proc. 26th European Peptide Symposium", J. Martinez & J.-A. Fehrentz (Eds), Éditions EDK, Paris, 2001, pp. 263.
8. C. Garcia Echeverria (1995) *Lett. Pept. Sci.*, **2**, 93.
9. E. A. Ottinger, et al. (1996) *Pept. Res.*, **9**, 223.
10. T. R. Burke, Jr. (2006) *Curr. Top. Med. Chem.*, **6**, 1465.
11. T. R. Burke, Jr., et al. (1994) *Biochemistry*, **33**, 6490.
12. T. R. Burke, Jr., et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 129.
13. M. F. Gordeev, et al. (1994) *Tetrahedron Lett.*, **35**, 7585.
14. T. Wakamiya, et al. (1994) *Chem. Lett.*, 1099.
15. T. Vorherr, et al. (1995) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 2661.
16. T. Attard, et al. (2009) *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **15**, 69.
17. C. Seibert & T. P. Sakmar (2008) *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **90**, 459.
18. L. S. Simpson & T. S. Widlanski (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1605.
19. L. S. Simpson, et al. (2009) *Chemistry & Biology*, **16**, 153.
20. N. Sharon & H. Lis in "Glycosciences: status & perspectives", H.-J. Gabius & S. Gabius (Eds.), Chapman & Hall, Weinheim, 1997, pp. 133.
21. M. C. Galan, et al. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 3598.
22. L. Otvos, et al. (1989) *Pept. Res.*, **2**, 362.
23. J. Kihlberg in "Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach", W. C. Chan & P. D. White (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 2000, pp. 195.
24. M. Liu, et al. (2005) *Carbohydrate Res.*, **340**, 2111.
25. M. Meldal & K. Bock (1990) *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6987.
26. A. McBride & P. Silver, P. (2001) *Cell*, **106**, 5.
27. T. Kouzarides, T (2002) *Curr. Op. Gen. Dev.*, **2**, 198.



メルク公式アカウント
友だち追加は
コチラ



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
**カタログ
ファインダー**



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年6月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/solvent

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140