

「ペプチド科学の最近の進展」に資する合成技術 ～作れないと始まらない，作ろうとしないと始まらない～

岡田 洋平

1. はじめに

少なくとも筆者が携わる領域において，サイエンスは「100%」が苦手である。遠い昔の学生時代，有機化学の反応機構に関する論文を投稿した際に「解明された (elucidated)」と書いて，査読者から「何をもって『解明された』と言えるのか？」と指摘を受けたことを懐かしく思い出す。若い頃のような経験は得てしてその後の考え方や価値観に大きな影響を及ぼすもので，サイエンスの世界で「解明された」や「確立された」といった100%を想起させる表現は注意して使わなければならないのだと肝に銘じた。最終的にその論文は，「elucidated」を削除した形で採択された¹⁾。その2年後，今度は逆に査読者からの指摘に従って，投稿論文に「完全に確立された (fully established)」と書いた²⁾。当時の筆者がカルチャーショックを受けた「完全に確立された」ものとは，ペプチドの固相合成 (SPPS: Solid-Phase Peptide Synthesis) であった。

我々人間にとって，何をもって「完全に確立された」と言えるだろうか？ 哲学的な議論は別の機会に譲るとして，サイエンスの世界における1つの判断基準は「全自動」になるのではないかと思う。試しに検索エンジンで「全自動」と入力すると，これに続く予測変換の第1位は「洗濯機」であった。全自動洗濯機であれば「完全に確立された」と言っても，異論反論が噴出することはないだろう。SPPSの fully established 感も，自動化されたことに依るところが大きいように思う。本特集でも，多くの記事はペプチドを機能性材料として「使う」ことに主眼を置いており，その背景には，既に「作る」ステージは終えているという雰囲気を感じられる。おそらく，巻頭言を除き本特集における記事のトップバッターを務めることになるであろう本稿においては，「ペプチド科学の最近の進展」に資する合成技術について，

筆者らの研究 (経験) を中心に紹介する。本稿では，短く「ペプチド合成」という用語も使っているが，全て「化学合成」のことであって「生合成」は出てこない。

2. SPPS とは

ペプチドとはアミド結合を介して2～50個のアミノ酸が繋がったものであり，いわば小さなタンパク質である。長さ (アミノ酸の個数) に応じてオリゴペプチドやポリペプチドなどと呼ばれることもあるが，明確な線引きはない。化学合成は一般にカルボキシ末端 (C末端) からアミノ末端 (N末端) に向けて対応するアミノ酸を1つずつ伸ばしていく様式で進められるものの，どういうわけか紙の上ではC末端を右に置いてN末端から書くことが慣例である (理由をご存じの方，ぜひご一報を！)。無用な誤解を招く記載であり，筆者らの研究室では過去にC末端とN末端を取り違えて逆向きに合成を達成してしまうという悲劇が起こったこともあるが，慣れとは恐ろしいもので筆者はすっかり違和感を覚えなくなってしまった。アミノ酸AとBを繋ぎ合わせる際には， $A + A$ や $B + B$ といった副反応が起こることを避けるため，一方のカルボキシ基と他方のアミノ基をそれぞれ何らかの保護基でブロックしておく (図1)。アミノ基とカルボキシ基はそのままでは反応性が不十分であるため，縮合剤と呼ばれる試薬を用いてカルボキシ基を活性化することでアミド結合の形成を促進する (このプロセスを縮合と呼ぶ)。AとBを繋ぎ合わせた後は，ジペプチドB-AのN末端の保護基を除き (このプロセスを脱保護と呼ぶ)，ここにアミノ酸Cを取り付けることでトリペプチドC-B-Aが得られる。以降，脱保護と縮合を繰り返すことによって，目的とするアミノ酸配列を有するペプチドを合成する。実際には，特にグリーンケミストリーの観点において，脱保護にも縮合にもまだまだ課題は残されている。そもそも保護基や縮合剤は生成物であるペプチドには組み込まれないため，役割を全うした後は全て廃棄物となる。すなわち，本質的にはこれらを使っていること自体が課題なのである。また，筆者がパッと思い付くだけでも優に10を超える縮合剤が知られており，現在も活発な研究開発が続けられている。これは，縮合が決して「完全に確立された」プロセスとは言えないことを示す証左と言える。ただし紙面の都合上，本稿で



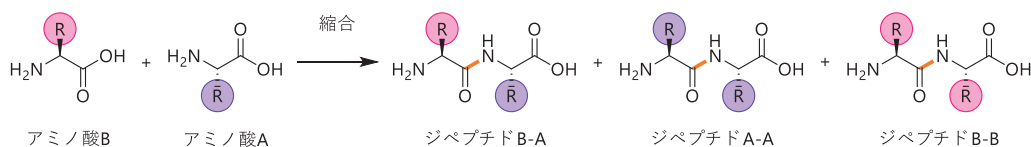
Synthesis Technology Contributing to "Recent Advancements in Peptide Science" – When It Isn't Synthesized, It Doesn't Start. When I Don't Try to Synthesize, It Doesn't Start – Yohei OKADA (正会員)

2011年 東京農工大学大学院連合農学研究科 応用生命科学専攻修了
現在 東京農工大学大学院農学研究院応用 生命化学部門 准教授

連絡先：〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

2023年11月20日受理

(a) 保護基を用いないペプチド合成



(b) 保護基を用いるペプチド合成

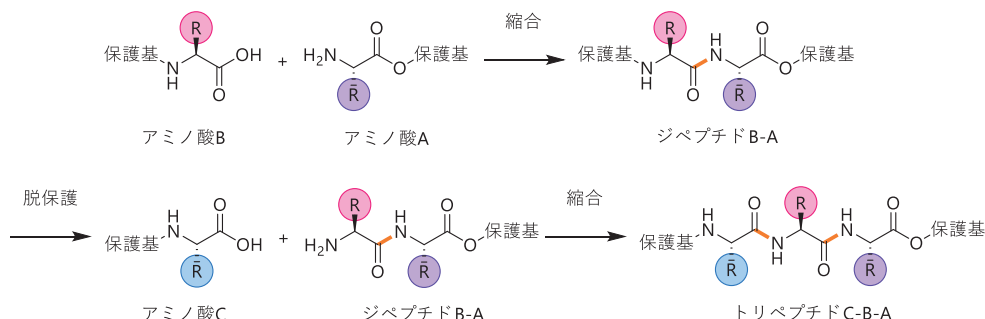


図1 ペプチド合成の概略

は脱保護と縮合についてはひとまず完成されたものとして話を進める。

上述したように、ペプチドの化学合成は脱保護と縮合を繰り返すことによって進められる。均一な溶液中で反応をおこなう液相合成では、各段階終了後にカラムクロマトグラフィーや再結晶などの分離精製操作をおこない、目的とする生成物だけを取り出す必要がある。すなわち、僅か5個のアミノ酸からなるペプチドE-D-C-B-Aを合成する(4つのアミド結合を形成する)だけで7回もの分離精製が求められるということである。有機化学の教科書では紙面の大半が「反応」に割かれているが、実際には分離精製(および解析)に多くの時間と労力、それに費用が投じられている。脱保護と縮合が(ひとまず)完成されたものであるならば、次に考えるべきは分離精製操作の簡略化である。そう考えてみると、改めてSPPSの登場がペプチド合成の研究にブレイクスルーをもたらしていることが分かる。これは不溶性の樹脂を担体兼C末端の保護基として用いる手法であり、各段階終了後に求められる分離操作(精製ではない)はカラムクロマトグラフィーでも再結晶でもなく、単なる樹脂の洗浄である(図2)。樹脂上に担持されていない余剰のア

ミノ酸や縮合剤などの試薬は全て洗い流されるため、脱保護と縮合を連続的に繰り返すことができる。操作が簡略化されれば単純な機械でも実施可能なのではないかという話になり、果たしてSPPSは自動化され、合成機が世界的に普及した。この発明がペプチド合成の研究を飛躍的に推進したことは紛れもない事実であるが、筆者は、ある部分では逆に当該分野の発展を停滞させることにも繋がってしまったのではないかと感じている。全自動で機械が作ってくれるのであれば、最早それは「完全に確立された」ものであり、これ以上の研究開発の余地はないように思われる。ペプチドを作ることに興味関心は薄れ、使う方へとシフトしていったとしても無理はない。かくして、長きに亘りペプチドとはfully establishedなSPPSによって全自動で作られるものだとして広く認識されてきたし、特にアカデミアにおいては、2023年現在においても実情が劇的に変わったとは言いがたい。しかしながら、風向きは確かに変わりつつある。

3. LPPS とは

後に筆者が所属することになる研究室からペプチド合成

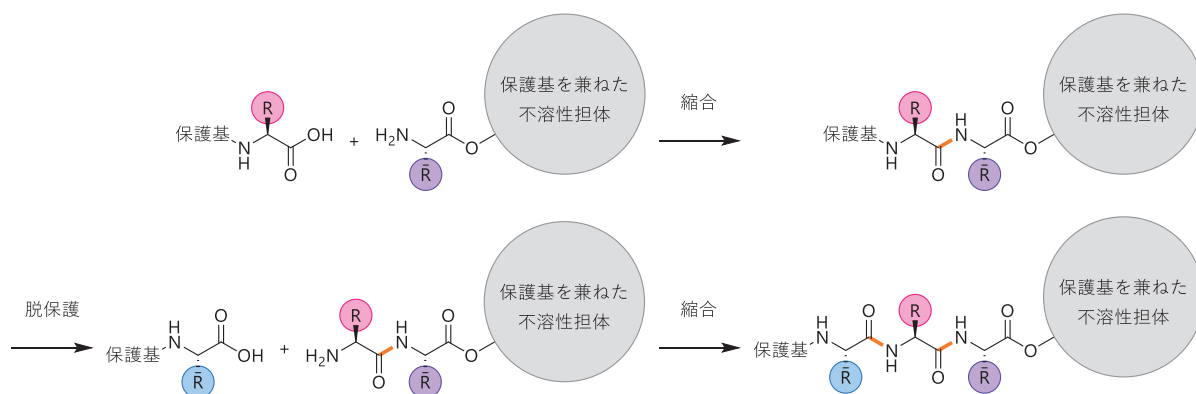


図2 SPPSの概略

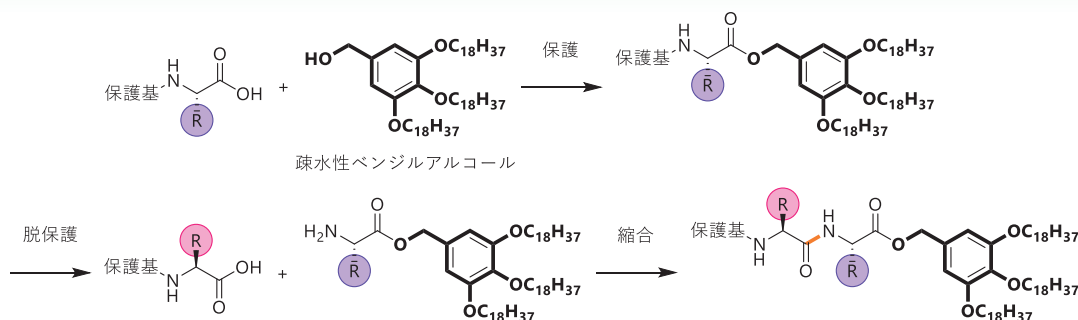


図3 疎水性ベンジルアルコールを活用するLPPSの概略

に関する初めての論文が発表されたのは、2002年のことである³⁾。ただし、この論文の主演はあくまでもシクロヘキサンを活用した液液分離プロセスであり、ペプチドは脇役に過ぎない。分離プロセスの素晴らしさをアピールするための論文であるから反応は完成されたものであることが望ましく、それゆえにペプチド合成が選ばれた。ペプチドを疎水化してシクロヘキサンに溶かすために、C末端は長いアルキル鎖を有する疎水性のベンジル基で保護された(図3)。この疎水性ベンジルアルコールは2001年に民秋らによってペプチド合成用の保護基として報告されたもので、後述するように、現在密かなブームとなっているペプチドの液相合成(LPPS: Liquid-Phase Peptide Synthesis)における「タグ」のベンチマークとなっている⁴⁾。しかしながら、当時の我々の論文において「less-polar platform」と呼ばれているこの疎水性ベンジルアルコールもまた、ペプチドと同様にシクロヘキサンを活用した分離プロセスの素晴らしさをアピールするために用いられた脇役であった。時は流れて、2010年に発表された筆者にとって初めてのペプチド合成に関する論文ではシクロヘキサンは姿を消し、less-polar platform改めhydrophobic tagが主演の座を射止めている⁵⁾。ただし、この論文もまた分離プロセスの素晴らしさをアピールすることに重きが置かれており、ペプチドは引き立て役に過ぎない。また、今となっては驚くべきことだが、この論文ではペプチドに対する医薬品としての期待も全く語られていない。2012年になって、ついに筆者はtherapeuticやbioactiveを冠してペプチドそのものにスポットライトを当てた論文を投稿したのだが、待ち受けていたのは冒頭で紹介したエピソードである。「SPPSが確立されているにもかかわらず、なぜ今更手間のかかるLPPSでペプチドを作らなければいけないのか？」という痛烈なコメントに見舞われた論文は、紆余曲折を経て、最終的にSPPSがfully establishedであることを書き加えた形で採択された²⁾。ペプチド合成においてSPPSが絶大な信頼を得ていることを強く認識した経験である。しかしながら、大学の研究室に所属する一学生であった筆者にはリアリティーを持って語ることはできないものの、丁度この頃、アカデミアより一足先に産業界では少しずつLPPSに対する期待が高まっていたようだ。

4. SPPS vs. LPPS

「グラムスケール」という表現を聞いて本誌の読者はどのような印象を持つだろうか。有機化学を専門とする筆者にとって、これはグラムという「大きな」規模において合成を達成したという自慢にほかならない。キログラム、あるいはトンに及ぶ規模のプロセスを取り扱う化学工学の範疇では「たったそれだけ？」と思われるだろうが、ミリグラムをグラムにスケールアップすると言えば、その苦労が(多少は)理解してもらえるはずだ。たとえSPPSがfully establishedであったとしても、それはミリグラムスケールの場合である。グラムスケールでペプチドを作るとなると別の話であり、キログラムやトンは想定さえされていない。加えて、規模が大きくなればなるほど、廃棄物の蓄積も良くない意味で目立つようになる。サイエンスとは別次元の感情論にはなるものの、筆者としては「1ミリグラムのペプチドを作る際に1グラムの廃棄物が生じる」と言われるよりも「1キログラムのペプチドを作る際に1トンの廃棄物が生じる」と言われた方が圧倒的に深刻な問題に聞こえてしまう。ペプチドに対する医薬品としての期待が高まれば高まるほど、化学合成は高純度大スケールを求められることになる。更にSDGsが叫ばれる今の時代においては、コスト面だけでなく広い意味での「持続可能性」まで問われてしまう。ミリグラムを超えてグラムあるいはキログラムのスケールでペプチドを作りたいというニーズが産業界で生まれたことにより、筆者の知らないところでLPPSが少しずつ注目を集めるようになっていった。

誤解を恐れずに書けば、SPPSがLPPSに優る部分は分離操作が容易であるという1点に尽きる。分子と分子の衝突を前提とする反応において、一方あるいは他方が不溶性の樹脂に固定されて運動が制限されていることはデメリットでしかない。言い換えれば、分離操作さえ簡略化できれば、LPPSが圧倒的に多くのメリットを享受できる。LPPSでは用いるアミノ酸や縮合剤などの試薬の量が大幅に低減されるため、これに伴う廃棄物の蓄積を抑えることができる。単位体積当たりの製造スケールを飛躍的に向上させることも可能であり、大学の研究室レベルの設備でも問題なくグラムスケールの合成が達成できる。加えて、ペプチドが溶

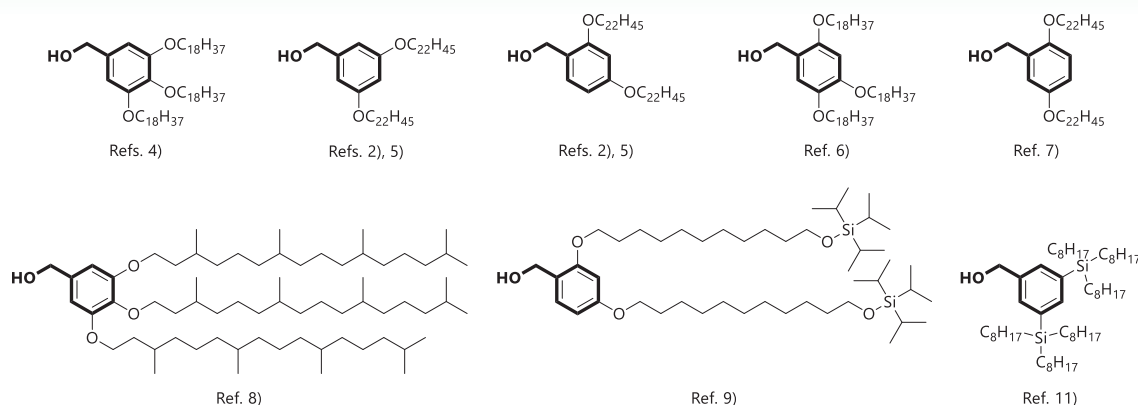


図4 LPPSで「タグ」として用いられる疎水性ベンジルアルコールの例

けているため脱保護ならびに縮合を繰り返す各段階をリアルタイムでモニタリングすることができ、これは最終生成物の純度向上に繋がる。だからこそ、分離操作の簡略化がLPPSのブレイクスルーになるというわけだ。幸い、疎水性ベンジルアルコールを活用するLPPSでは分離操作が至ってシンプルであり、目的とするペプチドと余剰のアミノ酸や縮合剤などの試薬の極性に差を付けていることがポイントになっている。疎水化されたペプチドは、高極性溶媒を添加することで沈殿させて濾過で回収したり、低極性溶媒を用いて抽出したりするだけで「それなりに」綺麗に取り出すことができる。ここで重要なことは、脱保護ならびに縮合を繰り返す各段階においては、必ずしも高い純度は求められていないということである。後続反応に影響を及ぼさない程度に(それなりに)綺麗であれば、脱保護と縮合を連続的に繰り返すことができる。最終生成物が得られた上で、これを精製して高純度品とすれば良い。

いずれも単純な疎水性ベンジルアルコールであるにもかかわらず、筆者らはアルキル鎖の置換様式を変えるだけで意外な発色性や蛍光性が発現することを見出してきた(図4)^{6,7)}。これらの論文を投稿する過程で、真に重要なのはペプチドの「疎水化」ではなく「可溶化」なのではないかと考えるようになり、徐々にhydrophobic tagよりもsoluble tagと呼ぶことが増えてきた。更に、今こうして本稿を書きながら、「可溶性」ではなく「可溶化」が重要なのだとすればsoluble tagよりもsolubilizing tagの方が適切だったかもしれない、などと思いを巡らせている。名前を付けることは難しい。最近では筆者らのグループ以外からも様々な「タグ(tag)」が報告されており、LPPSが少しずつ知名度を獲得していくことを喜ばしく思っている⁸⁻¹⁰⁾。しかしながら、これらの報告は企業が主体となっているものが多く、アカデミアでは依然として「ペプチドはSPPSで作られるもの」という認識が根強い。

5. おわりに

前述の通り縮合剤には様々な種類があり、それぞれに一応の違いがあるものの、正直なところ著者にはよく分からない。技術者の好みで使い分けているケースも多く、目的

とするアミノ酸配列に応じて合理的に選ぶことは(少なくとも筆者には)極めて困難である。筆者の知る限り、2023年現在のペプチド合成において最も優れた縮合剤の1つは「COMU」と呼ばれているものである¹¹⁾。これはペプチド合成の世界的権威であるFernando Albericio教授らによって2009年に報告されたもので、筆者らの研究室でもペプチド合成における縮合剤のファーストチョイスとして用いている。「ファーストチョイス」と書いてはみたものの、ほとんどの場合はCOMUで問題なく目的とするペプチドの合成が達成できてしまうため、他の縮合剤を検討するケースはそれほど多くない。長きに亘り、筆者はAlbericio教授のことを「SPPSの研究者」と認識してきたし、事実として教授のこれまでの論文は多くがSPPSに関するものである(あまりにも教授の論文数が多すぎて正確な数字までは把握できない!)。そのようなAlbericio教授らが2022年に「Liquid-Phase Peptide Synthesis (LPPS): A Third Wave for the Preparation of Peptides」と題する総説論文を発表したことは、筆者にとっては青天の霹靂であった¹²⁾。タイトルを見れば明白のように、これはLPPSの素晴らしさをアピールする論文にほかならない。驚くべきことに、全182件の参考文献における29件を筆者らの仕事が占めており、この数字はAlbericio教授自身のもの(19件)よりも多い。筆者はAlbericio教授とは何の面識もなく、決してお願いして書いてもらったものではない(むしろお願いしても書いてくれないだろう)。アカデミアにおけるSPPSの研究者であり、しかもペプチド合成の世界的権威であるAlbericio教授がLPPSを評価してくれたことの持つ意味は絶大である。虎の威を借りているのは百も承知だが、この論文をきっかけに、産業界だけでなくアカデミアでもLPPSの注目度が高まることに期待している。

参考文献

- Okada, Y. et al. : *Electrochim. Acta*, **56**(3), 1037-1042(2011)
- Okada, Y. et al. : *J. Org. Chem.*, **78**(2), 320-327(2013)
- Chiba, K. et al. : *Chem. Commun.*, 1766-1767(2002)
- Tamiaki, H. et al. : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**(4), 733-738(2001)
- Tana, G. et al. : *Chem. Commun.*, **46**(43), 8219-8221(2010)
- Okada, Y. et al. : *Org. Lett.*, **17**(17), 4264-4267(2015)
- Wakamatsu, H. et al. : *Asian J. Org. Chem.*, **6**(11), 1584-1588(2017)
- Takahashi, D. et al. : *Angew. Chem., Int. Ed.*, **56**(27), 7803-7807(2017)
- Yano, S. et al. : *Molecules*, **26**(12), 3497(2021)
- Wu, A. et al. : *Org. Biomol. Chem.*, **20**(44), 8685-8692(2022)
- El-Faham, A. et al. : *Chem. Eur. J.*, **15**(37), 9404-9416(2009)
- Sharma, A. et al. : *Chem. Rev.*, **122**(16), 13516-13546(2022)