

セレノシステインを含んだペプチド合成におけるマイクロウェーブ加熱の効果

Introduction

セレノシステインはシステインの硫黄(S)がセレン(Se)に置換されたアミノ酸であり、体内では遺伝子コドンにより導入されている。セレノシステインは21番目のアミノ酸であり、抗酸化作用をもつグルタチオンペルオキシダーゼの活性中心などに存在する。グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)¹⁾は、生体内のグルタチオンを補酵素として活性酸素を無毒化している酵素である。

近年、セレノシステインを含んだペプチドが頻繁に合成されており、3残基のペプチドであるグルタチオンをセレン化したセレノグルタチオン、GPxの活性中心の配列が合成されている²⁾。

しかし、セレノシステインはセレン化合物の不安定性や求核性によってペプチド合成が困難であった。

そこで、マイクロウェーブ照射による加熱によりセレノシステインを含む配列のペプチドを合成し、合成時間の短縮とPurityの向上を目指した。合成したペプチドはGPxの活性中心をモデル化した配列である。

Material

セレノシステイン以外の試薬は購入して使用した。セレノシステインは東海大学理学部岩岡研究室から提供を受けた。Fmoc-Glycine、Fmoc-Tryptophan(Boc)、N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)、1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)、Ethanedithiol (EDT)、Trifluoroacetic acid (TFA)、Piperidineは東京化成。Acetonitrile、Diethylether、Thioanisole、PhenolはWako。Fmoc-Glutamine(Trt)、N-methylpyrrolidone (NMP)は渡辺化学。Fmoc-Alanineはメルク。ChemMatrix Rink amide resinはバイオタージ・ジャパン。

Peptide Synthesis

H₂N-Gly-Gln-Ala-Sec-Ala-Trp-Gly-COOH

ペプチドはBiotageのマイクロウェーブ (MW) 合成付きの自動合成装置のSyrowave™を用いて合成した。合成スケールは0.025 mmolスケールで、レジンはChemMatrix Rink amide resin (loading 0.60 mmol/g)を用いた。ペプチドはFmocアミノ酸(4.0 eq., 0.1 M)を用いて合成した。合成条件は、カップリングはDCC/HOBtで行い、シングルカップリングでParallelの室温とマイクロウェーブ照射による75°Cで行った。Fmocの脱保護は40%-Piperidine/NMPで3分間、20%-Piperidine/NMPで10分間、室温で行った。レジンはNMPで3回洗浄した。合成したペプチドは最後のFmoc脱保護の後、DMFで洗浄して乾燥させた。

ペプチドはTFA-Water-Phenol-Thioanisole-EDT (82.5:5:5:5:2.5)を2時間反応させてレジンから切り出した。窒素ガスを吹きつけて濃縮し、ジエチルエーテルで洗浄して凍結乾燥を行った。ペプチドを20%-Acetonitrileに溶かしてHPLCで分析した。



Peptide Analysis

ペプチドはHPLC(島津製作所)で分析し、カラムはResolux C18 column 4.6 x 250 mm(バイオタージ・ジャパン)を用いた。グラジエントは10-25%-Acetonitrile (0.1%-TFA)で15分間、流量は1.0 mL/min、検出は220 nmで行った。

Result

従来法では、反応時間が10時間、Purityは22%だった。MW加熱では、反応時間が5時間であり、Purityは48%だった。

Conclusion

セレノシステインを含んだペプチドの合成はMW加熱をすることで、反応時間を大幅に短縮でき、Purityが向上した。セレノペプチドはMW加熱により効率的に合成することができた。

Reference

- 1) L. Flohe, W. A. Gunzler, H. H. Schock, *FEBS Lett.* **1973**, *32*, 132-134.
- 2) S. Yoshida, F. Kumakura, M. Iwaoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2125-2128.

表1 セレノシステインを含んだペプチド合成:従来法とMW法の比較

Entry	Coupling Temperature	Coupling Time	Coupling Reagent	Synthesis Time	Purity
1	RT	40 min	DCC/HOBt	10 h 10 min	22%
2	75°C	5 min	DCC/HOBt	5 h 3 min	48%

図1 従来の合成法

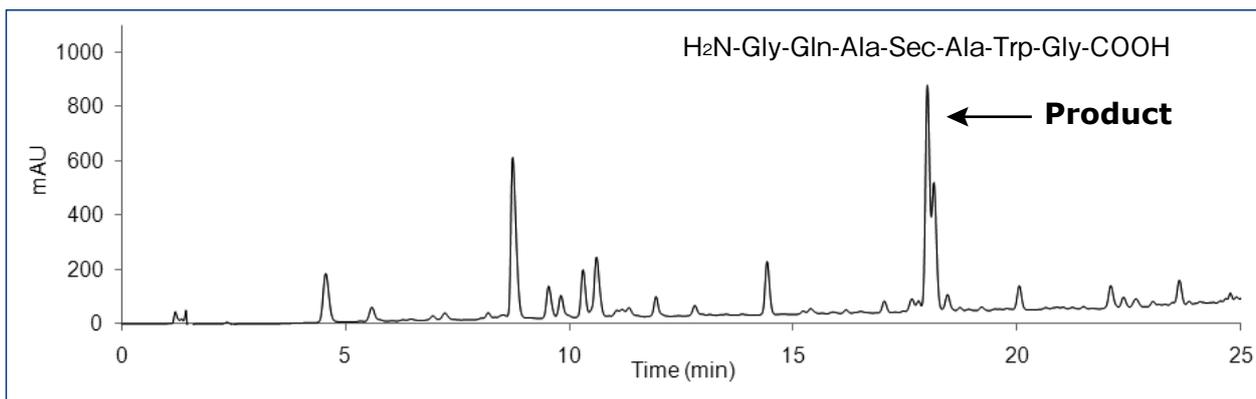
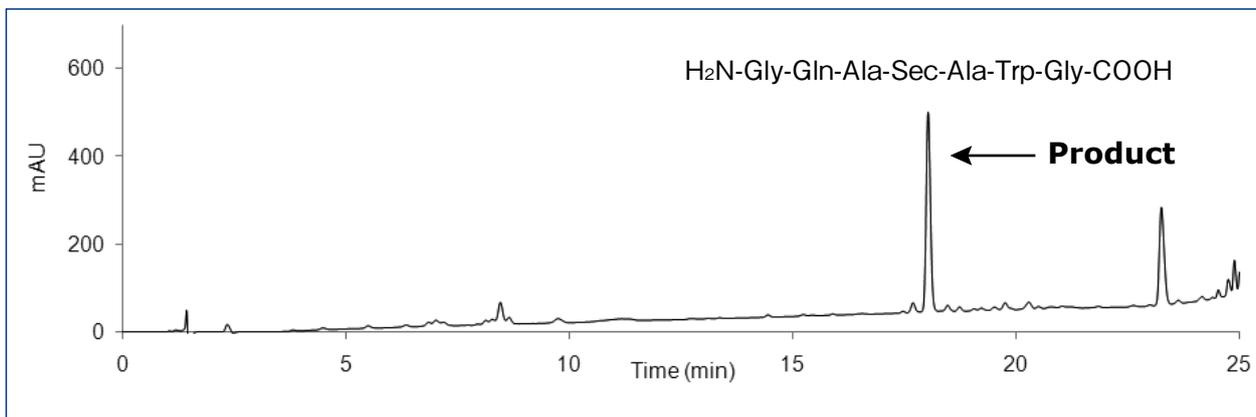


図2 MW合成法



バイオタージ・ジャパン株式会社

本社: 〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F
TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121
大阪: 〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F
TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312
URL: <http://www.biotage.co.jp/> E-mail: Japan_info@biotage.com

© 2011 Biotage. All rights reserved. All brand and product names are trademarks or registered trademarks of their respective companies. The information contained in this document is subject to change without notice.