

ジフェニルホスホネート誘導体を利用したキモトリプシンの活性部位近傍への糖認識分子の導入

(金沢工大応化¹・石川高専²・摂南大理工³) ○中前 康太郎¹・大河原 輝彦¹・奥出 壱平¹・畔田 博文²・尾山 廣³・小野 慎¹

Introduction of sugar recognition molecule into the vicinity of the active site of chymotrypsin by using diphenyl phosphonate derivatives (¹*Applied Chemistry, Kanazawa Institute of Technology*, ²*Ishikawa National College of Technology*, ³*Faculty of Science and Engineering, Setsunan University*) ○Kotaro Nakamae,¹ Teruhiko Okawara,¹ Ippei Okude,¹ Hirofumi Kuroda,² Hiroshi Oyama,³ Shin Ono¹

Diphenyl 1-amino-2-phenylethylphosphonate [$\text{Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$] acts as an irreversible inhibitor against chymotrypsin due to the specific reaction with the active site Ser195. Recently we reported that Lys175 residue in the vicinity of the active site of chymotrypsin could be selectively modified by using a peptidylphosphonate derivative bearing $\text{Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$. In this study, to construct a modified chymotrypsin having sugar recognition site at Lys175, a peptidyl phosphonate derivative having benzoxaborole (Bob) was designed and synthesized. We will report the preparation of the desired Bob-introduced chymotrypsin and its enzymatic property.

Keywords : *Benzoxaborole; Chymotrypsin; Diphenyl 1-amino-2-phenylethylphosphonate; Site-selective modification; Sugar recognition*

1-アミノ-2-フェニルエチルジフェニルホスホネートは、キモトリプシンの活性 Ser 残基と特異的に反応する不可逆性阻害剤である。当研究室ではこの誘導体を利用して、キモトリプシン(Csin)の活性部位近傍に存在する Lys175 を選択的に化学修飾することで^{1,2)}、Csin に新たな機能を付与する方法の開発を目指している。すなわち、化学修飾分子 [$\text{R-Glu}(\text{NHS})\text{-Ala-Ala-Phe}^{\text{P}}(\text{OPh})_2$]を基本構造に使用して、ダンシル基などの機能性分子の Csin への選択的な導入を検討してきた。本研究では、糖鎖認識能を持つ benzoxaborole 誘導体(Bob-NH₂)を機能性分子として採用し、化学修飾分子 Bob-NH-glutaryl-Glu(NHS)-Ala-Ala-Phe^P(OPh)₂ (Bob-Mol)を合成して、Csin の Lys175 へ糖認識分子が選択的に導入されるか否かを検討した。

合成した Bob-Mol を Csin に作用させ、その反応生成物をカチオン交換カラムに通し、主生成物を分離精製した。得られた主生成物の加水分解作用は、これまでの修飾 Csin と類似していたため、この成分を目的の修飾体 (Bob-MCsin) と判断した。次にこの Bob-MCsin を Suc-Lys-Ala-Phe-pNA (Sub-1)と Suc-Lys-Ala-Ala-Phe-pNA (Sub-2)と反応させて加水分解速度を測定し、Csin の速度パラメータと比較して酵素化学的性質の違いを評価した。さらに、導入された Bob の効果を評価するために、Sub-1 と Sub-2 を mannose 存在下で加熱して糖化基質を調製し、Bob-MCsin の加水分解速度の測定によって機能性評価を行っているの合わせて報告する。

1) S. Ono, J. Murai, T. Nakai, H. Kuroda, Y. Horino, T. Yoshimura, H. Oyama, M. Umezaki, *Chem.Lett.*, **2013**, 42, 860–862.

2) S. Ono, T. Nakai, H. Kuroda, R. Miyatake, Y. Horino, H. Abe, M. Umezaki, H. Oyama, *Biopolymers (Pept Sci)*, **2016**, 106, 521–530.