

令和元年6月6日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18905

研究課題名(和文)多様な活性の付与を指向した安定化ヘリカルテンプレートペプチドの開発

研究課題名(英文)Development of helical template peptides for post-functionalization

研究代表者

三澤 隆史(Misawa, Takashi)

国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・主任研究官

研究者番号：40709820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドを利用したペプチド医薬品の開発を志向した場合、ペプチドが正しく機能するためには、適切な構造を形成する必要がある。しかし、合成したペプチドが正確に構造を形成することができるかは実際に合成し、その構造を評価する必要がある。そのためには多大な労力と時間を要する。この問題点を解決すべく、安定なヘリカル構造を形成するペプチドをテンプレートとして、置換基を後から導入することができれば、一つのペプチドから様々なペプチドの開発が可能になる。本研究では、ヘリカルな構造を形成し、さらに様々な置換基を導入・機能化が可能なヘリカルテンプレート分子の合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、高度に空間制御されたペプチドをテンプレートとして、post-modificationを行うことで様々な生理活性の付与を達成する点である。従来のペプチド合成手法では生理活性に応じて個別に合成しなければならないが、本手法では一つのテンプレートペプチドを合成すれば、様々な生理活性を有するペプチドを得ることが出来る。また、必要な官能基を後から導入することが出来るため、誘導体合成が簡便になる等の利点も挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Helical structures in proteins and synthetic bioactive peptides play pivotal roles in biochemistry and chemistry. Methods that regulate the helical structures of peptides are required in order to develop well-defined functional peptides. In this study, we herein developed post-functionalizable helical peptides composed of Leu, Aib, and Azl residues. We show that the synthesized peptides 1 and 2 form helical structures, and may be modified using specific side chain or several functional groups by the click reaction without influencing their secondary structures.

研究分野：医薬化学

キーワード：ヘリカルペプチド post-modification ジ置換アミノ酸 細胞膜透過性 抗菌活性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドは人体の構成要素の一つであり、受容体やホルモンなどの機能性分子として生体内で様々な機能を果たしている。そのため、ペプチドに着目した化学・生化学的研究が広く進められている。近年では、タンパク質間の相互作用を阻害するペプチドの開発や、膜透過ペプチド(CPP, Cell-penetrating peptide)を利用したマクロ分子の細胞内導入法といった応用研究が報告され(*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 5836.)、ペプチド分子の機能化は魅力的な研究課題の一つである。

ペプチドが機能を発揮するためには機能発現に必要な官能基が空間的に適切な位置に配置されることが必要である。そのため、ペプチド自体の構造を制御する方法論の確立は機能性ペプチドの開発のために必須である。天然タンパク質の構造モチーフを合成ペプチドを用いて具現化するアプローチについて、最も進められているのがヘリックス構造の構築である。これまでに様々な手法を用いたヘリックス構造制御法が開発されており、架橋構造の導入、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸等の導入が報告されている。上述の研究から安定なヘリックス構造をとったペプチドは膜透過性の向上や、タンパク質との親和性が向上すること等が報告されており、ヘリックス構造の安定化はペプチド構造の模倣のみならず機能化にも重要であることが示唆されている。一方、ペプチドの側鎖に着目した場合、特定のアミノ酸を持つことで機能を示す場合が知られている。中でも最も広く知られているのが、アルギニンのグアニジノ基による膜透過性である。HIV-1(Human immunodeficiency virus type 1)に存在する tat タンパク質由来の塩基性ペプチド(tat ペプチド)が細胞膜透過能を有し、tat ペプチドを結合させたタンパク質は容易に細胞膜を透過することが報告されている(*J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 5836.)。Tat ペプチド等の代表的な CPP の特徴としてはアルギニンなどの塩基性ペプチドを多く含んでいることが挙げられる。グアニジノ基は細胞表面上の酸性官能基との間に2個の水素結合を介して相互作用することで膜透過性を示す(*J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9506)。また、マガイニン2に代表される抗菌活性を有すペプチドは塩基性アミノ酸であるリシンや疎水性アミノ酸であるロイシン等を多く含んでいることが知られており、両親媒性が抗菌活性に重要であることが報告されている(*J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 29115)。上述の通り、ペプチドの構造・官能基に着目した研究は盛んに行われているが、これらのペプチドはその用途毎に合成しなければならず、合成の煩雑さも有り多種類のペプチドを合成するためには多大な労力と時間が必要であった。

### 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸を用いたペプチドの構造制御や生理活性物質への応用研究を行ってきた。その中で、tat ペプチドのアルギニンを環状ジ置換アミノ酸上にグアニジノ基を導入した pip(Gu)に置換したペプチドはヘリックス構造が安定し、優れた膜透過能を示すことを見出した。これらの知見から、申請者は合成したペプチド鎖上に官能基を化学的に修飾することで特定の活性を付与出来るのではないかと考えた。そこで、本研究は高度に空間制御されたテンプレートペプチドの開発と post-modification による多様な生理活性の付与を目的とする。本手法が成功すれば、一つのヘリックス分子(テンプレート)を用いて、post-modification を選択することで様々な生理活性ペプチドの開発を達成することが可能となり、上述の問題点の解決に繋がると考えた。

### 3. 研究の方法

上述の通り、申請者は代表的な  $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸である 2-アミノイソ酪酸(Aib)からなる短鎖ペプチド Boc-(L-Leu-L-Leu-Aib)<sub>3</sub>-OH(A)が安定なヘリカル構造を形成していることを見出している。ペプチドAをテンプレートとして、各種修飾を加えることで様々な生理活性を付与できるのではないかと考えた。そこで、リシンの $\epsilon$ 位にアジ

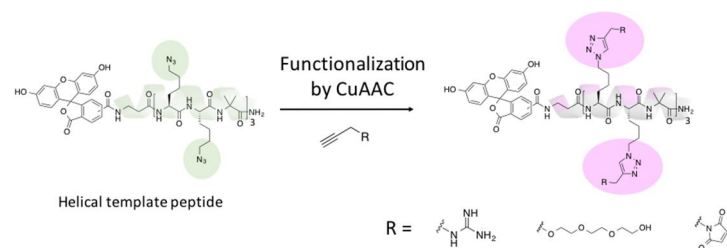


Figure1. ヘリカルテンプレートに対する post-modification

ド基を有するアミノ酸(Azidolysin:Azl)に置換したペプチド(L-Azl-L-Azl-Aib)<sub>3</sub>-OHをデザインした。合成したペプチドの二次構造を CD スペクトルから評価し、ヘリカル構造を形成したペプチドに対しクリック反応を利用することで多様な官能基や生理活性物質の導入を目指した。

### 4. 研究成果

液相および固相法により合成した。CD スペクトルを用いて合成したペプチドの溶液中での二次構造を評価した。その結果、208 および 222nm 付近に負の吸収極大を示し、安定なヘリカル構造を形成することが明らかになった。次に、本ペプチドをテンプレートとして、post-modification を行うことで多様な機能の付与が可能であるかを検討した。修飾する官能基としては、細胞膜透過性ペプチドに重要とされるグアニジノ基や生体内安定性効果を示す PEG 鎖、あるいはチオール基と選択的に反応するマレイミド基の導入を目指した。その結果、全ての官能基を、ヘリカル構造を維持したままペプチドに導入することが可能であることが明らかになった。さらに、グアニジノ基を導入したペプチドはアルギニンを含むペプチドと同程度の細胞膜透過性を示し、細胞膜透過性を付与することに成功した。

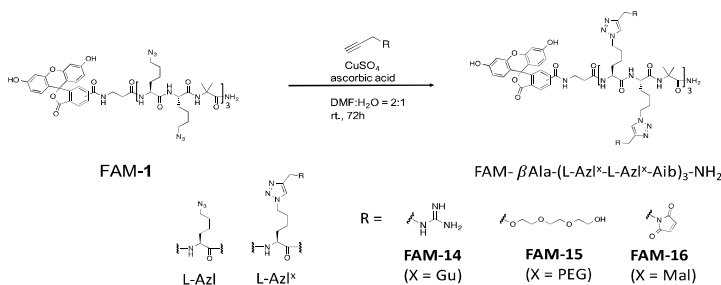


Figure 2. ヘリカルテンプレートに対する post-modification.

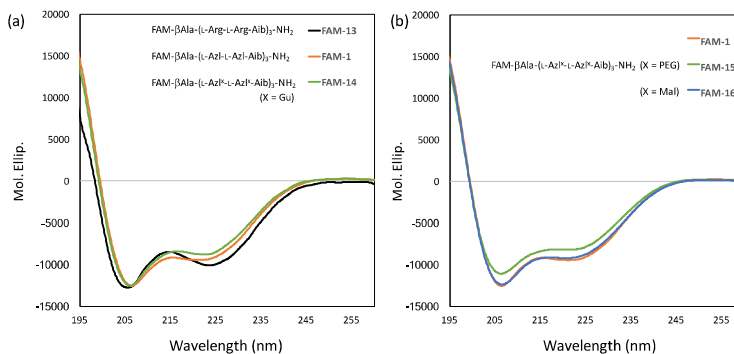


Figure 3. post-modification による二次構造への影響

アルギニンのグアニジノ基が細胞膜透過性に重要であるように、アミノ基を有するリシンは抗菌ペプチドに多く含まれていることが知られている。そこで、同様に、ペプチド A のロイシンをリシンに置換したペプチドをデザインし、ジ置換アミノ酸部位の抗菌活性への影響を検討した。その結果、リシンに置換したペプチドは弱いながらも抗菌活性を示すことを見出した。また、その構造を精査すると、ジ置換アミノ酸としてより脂溶性が高い環状型ジ置換アミノ酸を導入することで、その抗菌活性が工場することを見出した。

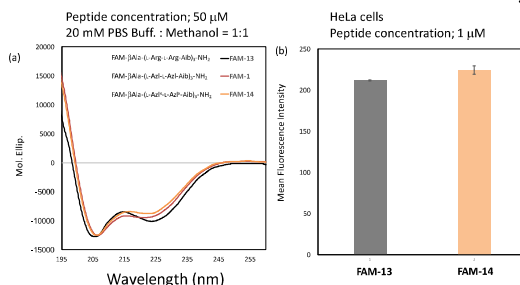
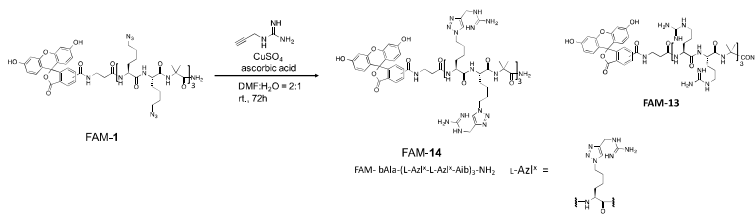


Figure 4. グアニジノ基の導入による細胞膜透過性の付与

これらの結果から、ヘリカルテンプレートは安定な二次構造を形成し、ヘリカルペプチドを足場として多様な機能を付与できる。今後はより幅広い構造展開を志向したヘリカルテンプレート的设计と合成を行っていく。

<引用文献>

- J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 5836.  
*J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9506.  
*J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 29115.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Rational design and synthesis of post-functionalizable peptide foldamers as helical templates.  
**Takashi Misawa\***, Yasunari Kanda, Yosuke Demizu\*  
*Bioconj. Chem.* **28**, 3029-3035 (2017).

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) ヘリカルテンプレートペプチドの合成と post-modification による機能化  
**三澤隆史**、出水庸介  
日本薬学会第 139 年会 千葉 2019
- 2) 多様な官能基修飾を志向したヘリカルテンプレートペプチドの開発  
**三澤隆史**、諫田泰成、出水庸介  
日本薬学会第 138 回年会 石川 2018
- 3) Development of post functionalizable foldamers as helical template.  
**Takashi Misawa**, Yosuke Demizu  
第 54 回ペプチドシンポジウム 大阪 2017
- 4) 多様な生理活性付与を志向した安定化ヘリカルテンプレートペプチドの開発  
**三澤隆史**、出水庸介  
第 61 回日本薬学会関東支部会 東京 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。