

平成21年 5月 29日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19550167  
 研究課題名(和文) ミメティックプローブによるN末端メチオニン認識機構の解明と生体防御への応用  
 研究課題名(英文) Elucidation of recognition mechanism on N-terminal methionine residue by means of mimetic probe molecules and application to biological defense  
 研究代表者  
 長田 聡史 (Satoshi Osada)  
 佐賀大学・理工学部・助教  
 研究者番号：50284609

## 研究成果の概要：

メチオニン残基に含まれるチオエーテル側鎖は様々な相互作用形式をとることが知られており、その柔軟性が多様な分子認識を可能にしていると考えられる。本研究では個々の生物学的応答に対する相互作用様式を探るため、メチオニン側鎖の相互作用形式を制限した疑似モデル(ミメティック)としてフッ素化アミノ酸を利用し、生体防御にかかわる生物活性応答を引き起こすのに必要な標的タンパクとチオエーテル側鎖の相互作用形式を見いだした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生理活性，生物有機化学，フッ素化合物，受容体，分子認識，好中球活性化，生理活性ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

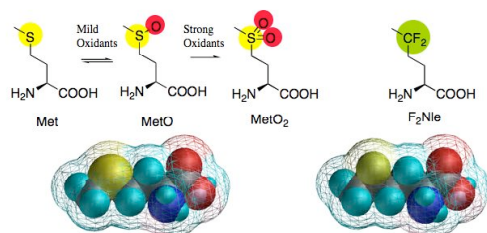
タンパクの生合成においてメチオニンは必ず開始コドンとして導入され、後に翻訳後修飾によって成熟タンパクへ移行する際に当該残基が切断される。さらにバクテリアなどにおいてはホルミル化と異なり、N末端がホルミル化されてタンパク生合成が行われていく。この際、メチオニン残基を認識してホルミル化/脱ホルミル化する機構が存在する。ホルミル化は生体防御においてこの機構を利用し、ホルミル化されたメチオニンをバクテリ

ア存在の指標として好中球などの表面に存在するレセプターで認識し、攻撃の対象としている。

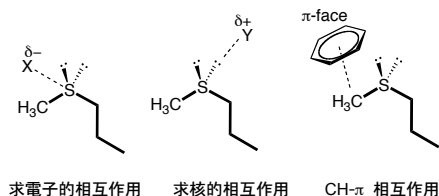
メチオニンはタンパク合成において重要な役割を果たしているにもかかわらず、その側鎖を認識するメカニズムについてあまり注視されていない。チオエーテルは生理学条件下で酸化を受けやすいため、多くのタンパク研究でノルロイシンに置換されるが、生理活性の減少あるいは失活が認められる。

ジフルオロメチレン基がイオウに近いことに着目して、メチオニンのイオウをジフル

オロメチレン基で置換した化合物  $F_2Nle$  を独自の手法で合成した。また、白血球遊走、活性酸素や酵素放出による生体防御システムを稼働させる走化性因子 N-ホルミルペプチド、とりわけ for-Met-Leu-Phe-OH (fMLP) の第一残基メチオニンに  $F_2Nle$  を導入し、生理活性実験を行った結果、fMLP と同等以上の活性を観測した。この結果はジフルオロメチレン基がイオウの等電子構造体として機能しうることを示した。さらにこのアナログを含むアンタゴニストを合成したところ、天然アミノ酸で構成された拮抗剤よりも明確なアンタゴニスト作用を発現した。



チオエーテルの硫黄原子は相互作用する相手により求電子的あるいは求核的な非結合性相互作用をするうえ、末端メチル基の  $CH-\pi$  型の相互作用も知られている。またメチオニン側鎖の *gauche* 型, *anti* 型の配座のエネルギー差がほとんどないことが知られており、この柔軟性が相互作用の型式をさらに複雑にしている。



## 2. 研究の目的

タンパク質中に出現する数あるアミノ酸の中でも単一コドンのアミノ酸であるメチオニンが開始コドンとして機能してきたことは極めて興味深い。多くの場合はアミノペプチダーゼの作用による翻訳後修飾によって最終的にメチオニンは除去される。

単純な側鎖ながらイオウ電子雲を明確に分子認識する相互作用の存在が示唆されているが、標的タンパク/酵素において共通した側鎖認識機構を利用しているか否かに興味を持たれる。そこでメチオニンの相互作用形式を制限した疑似側鎖化合物を利用することによりメチオニン残基を認識する主たる相互作用を見いだすことを計画した。ヒトにおける生体防御機構としてバクテリア由来ホルミルメチオニンを認識する好中球と

バクテリアに存在するホルミルメチオニンの脱ホルミル化を行うバクテリアペプチドデホルミラーゼ (PDF) の双方でメチオニン側鎖の認識機構の相違を調べ、選択的あるいは二重標的の薬剤開発につなげることを最終的に目指すこととした。

## 3. 研究の方法

fMLP における構造活性相関研究によりイオウ原子が  $CF_2$  ユニットで模倣できるという実験結果は。チオエーテルがかかわる相互作用のうち標的タンパクに対して側鎖が求電子的に相互作用する形式は関与していないこと意味する。この点を踏まえて以下の方法で研究を進めた。

- (1) 分子認識におけるイオウ電子雲のベクトル情報を得るため、モノあるいはジフルオロメチレン基で置換した化合物をデザイン・合成する。また、末端メチル基での  $CH-\pi$  相互作用の寄与などを見積もるために末端メチル基を排除した含フッ素アミノ酸群を合成する。
- (2) 合成したメチオニンを認識する生理活性ペプチド fMLP に組み込む。それぞれのペプチド群における生理活性の評価に基づいてメチオニン側鎖の作用様式を評価する。
- (3) 抗炎症作用を持つ化合物へつなげるためにアンタゴニストデザインを行う。末端ホルミル基を嵩高い Boc 基で置換した化合物はアンタゴニスト能を示す事が知られているが有効濃度が高いため、さらなる高活性の探索を並行して行う。

## 4. 研究成果

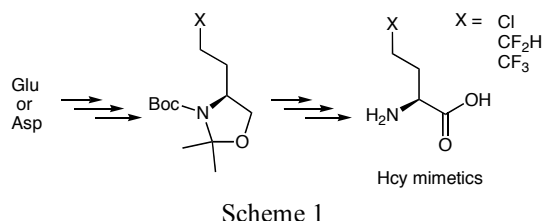
- (1) メチオニンミメティックの合成：

まず末端メチル基を排除したメチオニン (ホモシステイン: Hcy) ミメティック分子に、硫黄原子に対する等電子構造として、ジフルオロメチレン基、トリフルオロメチル基、クロロ基をデザインして合成を試みた。

アミノ酸の合成はグルタミン酸、アスパラギン酸あるいは D-セリンから容易に誘導できる *N,O*-アセトニド誘導体を保護アミノ酸合成ブロックとして使い、適切な化学変換によって側鎖を構築する計画を進めた。しかしながら、当初のフッ素化物合成過程において求核性フッ素導入試薬 DAST の反応性の高さにより保護アミノ酸誘導体が分解し、ペプチド合成に必要なアミノ酸の確保には問題があった。

合成経路の再検討の結果、ジフルオロメチレン基を含む誘導体については Wittig 型反応を利用した合成ルートへの変更により目的のミメティックアミノ酸を収率よく得ることに成功した。また、トリフルオロメチル置

換の化合物については既知化合物を応用して合成し、当初の目的であった末端メチル基排除ミメティックを得ることに成功した。さらに同様な手法でイオウのサイズに近いクロロ基を導入したクロロエチルグリシンの光学活性体を合成した。



(2) ホルミルペプチドへの組み込みと生理活性評価：

得られた一連の合成アミノ酸はロイシルフェニルアラニンとの液相カップリングによりBocMLPアナログとした後、ギ酸-EEDQ処理によってホルミル基を導入してfMLPアナログへと誘導した。合成したfMLP誘導体の生理活性能はチトクロームc還元法を用いたヒト好中球の活性酸素放出能ならびにマイクロチャンバーを用いた細胞遊走能によって評価した。

活性酸素放出能において、チオメチル基をクロロ基に変えた場合では、母体のfMLPと比してほとんど活性を示さず、 $10^{-6}$  Mの濃度においてさえfMLP活性の20%程度の応答しか示さなかったのに対して、ジフルオロメチレン基を導入した場合には母体のfMLPとほぼ同等であるという十分な活性を示した (Fig. 1)。

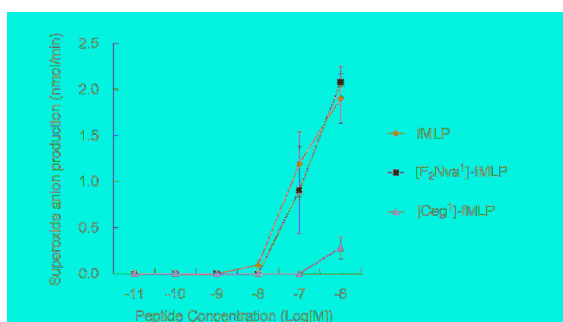


Fig. 1. ペプチドアナログによる好中球活性酸素放出能

さらにトリフルオロメチル基を持つ化合物においても十分な活性酸素放出能を維持していた。メチオニンの末端メチル基が生理活性に重要であれば、ミメティックを用いた活性評価の結果は矛盾したものとなる。これらの知見から、活性酸素放出能では、チオエーテルの末端メチル基の寄与は硫黄原子の非共有電子対の方向性をもった求核

的相互作用に比べると副次的なものであると示唆された。

興味深いことに、細胞遊走能の活性においてはいずれの誘導体とも活性の減弱度が著しく、末端メチル基のかかわる相互作用が細胞遊走能の活性に少なからず関与しているのではないかと考えられた。

本研究の結果は、メチオニン側鎖位置での些末な構造変化で、生理活性のアウトプットを区別することが出来ること示した重要な知見と考えられる。

(2) N末端修飾fMLP誘導体のアンタゴニスト能評価：

fMLPの末端ホルミル基を高いBoc基で置換した化合物はアンタゴニスト能を示す事が知られている。さらなる構造的知見を得るためN末端に有機合成で用いられる含ハロゲン保護基であるTroce基とより高い脂肪族保護基であるTeoc基を導入した誘導体を合成し、アンタゴニスト能の評価を行ったところ、Boc保護基に比べて明確なアンタゴニスト作用を示す事が明らかとなった。しかも、そのアンタゴニスト活性は10倍程度強く、ハロゲン置換基がvan der Waals相互作用に有効に寄与しているものと考えられる。またTeoc基の利用により、予想していたより嵩高くてもアンタゴニスト作用可能な事がわかり、アンタゴニスト設計においてこの位置での化学修飾は比較的寛容であると判断した。

以上の結果を踏まえると、メチオニン側鎖の相互作用の形式を制限するモデルを構築することによって、生物学的なアウトプットを制限できることが示された。言い換えると、ミメティックモデルを活用することによって選択的な細胞情報伝達を達成することが可能であることを意味する。他の酵素などに対する認識機構との差異を利用することによって選択的あるいは二重標的の薬剤開発につなげることは十分可能と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. S. Osada, D. Sugiyama, M. Sato, Y. Hamasaki, I. Fujita, and H. Kodama, Insight into Methionine Side-Chain Recognition by the FPR Utilizing Sulfur Mimitics, *Peptides Science* 2008, 249-252 (2009), 査読有

2. D. Sugiyama, Y. Hirakawa, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, and H. Kodama, Synthesis and Biological Activity of Dimeric Chemotactic Peptide Antagonist, *Peptides Science* 2008, 253-256 (2009), 査読有
3. M. Onai, D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, and H. Kodama, Synthesis and Priming Activities of Cyclic Peptides, Hymenamides, *Peptides Science* 2008, 239-242 (2009), 査読有
4. D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, and H. Kodama, Synthesis and biological activity of synthetic peptide MMK-1 analogs, *Peptides Science* 2007, 269-272 (2008), 査読有
5. J. Taira, M. Jelokhani-Niaraki, S. Osada, F. Kato, and H. Kodama, Ion-channel formation assisted by electrostatic interhelical interaction in covalently dimerized amphiphilic helical peptides, *Biochemistry*, **47**, 3705-3714 (2008), 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. 杉山大輔, 平河雄喜, 長田聰史, 浜崎雄平, 藤田一郎, 兒玉浩明, fMLP アンタゴニストの二量化とヒト好中球での生物活性, 日本化学会第 89 春季年会, 日本大学船橋キャンパス(千葉) 2009 年 3 月 27-30 日
2. 平河雄喜, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, Boc-Phe-(D-Leu-Phe)<sub>2</sub> の二量化と生物活性, 日本化学会第 89 春季年会, 日本大学船橋キャンパス(千葉) 2009 年 3 月 27-30 日
3. 長田聰史, 高島亮, 杉山大輔, 藤田一郎, 浜崎雄平, 大庭英樹, 兒玉浩明, 脂肪族アミノ酸のフッ素スキランによる生理活性評価, 第 11 回連携大学院産学官交流セミナー, 佐賀大学(佐賀市) 2009 年 2 月 6 日
4. 長田聰史, 杉山大輔, 田崎皓, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, 含フッ素ミメティックプローブを用いたメチオニン側鎖認識機構の解析, 2008 年日本化学会西日本大会, 長崎大学(長崎), 2008 年 11 月 15-16 日
5. 杉山大輔, 平河雄喜, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, ホルミルペプチドアンタゴニスト Boc - Met - Leu - Phe 二量体の合成と性質, 2008 年日本化学会西日本大会, 長崎大学(長崎), 2008 年 11 月 15-16 日
6. 長田聰史, 杉山大輔, 佐藤桃子, 浜崎雄平, 藤田一郎, 兒玉浩明, イオウミメティックを利用した FPR メチオニン側鎖認識に関する洞察, 第 45 回ペプチド討論会, タワーホール船堀(東京) 2008 年 10 月 29-31 日
7. 杉山大輔, 平河雄喜, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, 二量化遊走ペプチドアンタゴニストの合成と生物活性, 第 45 回ペプチド討論会, タワーホール船堀(東京) 2008 年 10 月 29-31 日
8. 杉山大輔, 林良, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, ヒト好中球受容体由来疎水性ペプチドの合成と活性酸素放出への影響, 日本農芸化学会 2008 年度西日本支部大会, 長崎大学(長崎), 2008 年 9 月 19-20 日
9. 長田聰史, 杉山大輔, 田崎皓, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, 含フッ素アミノ酸によるメチオニン側鎖認識への影響, 第 25 回有機合成化学セミナー, 阿蘇市(熊本), 2008 年 9 月 8-10 日
10. Daisuke Sugiyama, Satoshi Osada, Ichiro Fujita, Yuhei Hamasaki and Hiroaki Kodama, Neutrophil Priming with Transmembrane Peptides Derived from Formyl Peptide Receptor Subtypes, 22<sup>nd</sup> Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, CA, U.S.A, July 19-23, 2008
11. 平河雄喜, 柴田大介, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, FPR アンタゴニスト二量体の合成と生物活性, 第 45 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場(北九州), 2008 年 7 月 5 日
12. 佐藤桃子, 柴田大介, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, fMLP N 端修飾アナログによる生理活性への影響, 第 45 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場(北九州), 2008 年 7 月 5 日
13. 杉山大輔, 柴田大介, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, 二量化ホルミルペプチドアンタゴニストの合成と生物活性, 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回

年会, 学術総合センター (東京都), 2008  
年 5 月 19-20 日

14. 柴田大介, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, 二量化 FPR アンタゴニストの合成とヒト好中球への作用, 日本化学会第 88 春季年会, 立教大学 (東京), 2008 年 3 月 26-30 日
15. 杉山大輔, 長田聰史, 浜崎雄平, 藤田一郎, 兒玉浩明, GPCR 由来膜貫通ペプチドアナログの合成と好中球活性化, BMB2008, 神戸ポートアイランド(神戸), 2008 年 12 月 9-12 日
16. 杉山大輔, 柴田大介, 長田聰史, 浜崎雄平, 藤田一郎, 兒玉浩明, ホルミルペプチド受容体由来膜貫通ペプチドの合成とヒト好中球での生物活性, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会, パシフィコ横浜, 神奈川県, 2007 年 12 月 11-15 日
17. 杉山大輔, 林良, 長田聰史, 浜崎雄平, 藤田一郎, 兒玉浩明, Effects of subtype selective agonists for primed neutrophils by FPR transmembrane peptides, 第 4 回武田科学振興財団薬科学シンポジウム, シェラトン都ホテル東京, 2007 年 12 月 3-4 日
18. 長田聰史, 含フッ素アミノ酸側鎖ミメティック分子による細胞機能制御, 有機合成化学講演会, 大分大学 (大分), 2007 年 11 月 29 日
19. 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, ホルミルペプチド受容体選択的リガンドを用いた好中球プライミングの検討, 2007 年日本化学会西日本大会, 岡山大学 (岡山), 2007 年 11 月 10-11 日
20. 平河雄喜, 柴田大介, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, サブタイプ選択的 fMLP アンタゴニストの合成と好中球への影響, 2007 年日本化学会西日本大会, 岡山大学 (岡山), 2007 年 11 月 10-11 日
21. 佐藤桃子, 柴田大介, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, fMLP アンタゴニスト BocMLF における N 端保護基の生理活性への影響, 2007 年日本化学会西日本大会, 岡山大学 (岡山), 2007 年 11 月 10-11 日
22. 柴田大介, 杉山大輔, 長田聰史, 藤田一郎, 浜崎雄平, 兒玉浩明, ホルミルペプチド受

容体選択的アンタゴニストの二量化と生物活性, 2007 年日本化学会西日本大会, 岡山大学 (岡山), 2007 年 11 月 10-11 日

23. 杉山大輔,長田聰史,藤田一郎,浜崎雄平,兒玉浩明, 合成ペプチド MMK-1 アナログの合成と生物活性, 第 44 回ペプチド討論会, 富山国際会議場 (富山), 2007 年 11 月 7-9 日

[その他]

解説記事

長田聰史, フッ素化でジグザグ分子をつくり分け - 部分フッ素化による配座チューニング, 化学, **63** (11), 61-62 (2008).  
査読無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 聡史 (OSADA SATOSHI)  
佐賀大学・理工学部・助教  
研究者番号: 50284609

### (2) 研究分担者

兒玉 浩明 (KODAMA HIROAKI)  
佐賀大学・理工学部・教授  
研究者番号: 80205418