

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15692

研究課題名(和文) 生体分子の精密認識を実現する人工オリゴマー分子ペプチドの研究

研究課題名(英文) Research on synthetic oligomer, peptoid, that realizes selective biomolecular recognition

研究代表者

森本 淳平 (Morimoto, Jumpei)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：70754935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体分子とくにタンパク質の精密認識を実現する人工オリゴマー分子の創出を目標に研究を実施した。ペプチド(ペプチドもどき)として知られる分子の主鎖を改変するアプローチにより、特定の3次元構造を安定に形成する人工オリゴマー分子を創出することに成功した。この分子を用いることで、実際にタンパク質表面を認識する分子を創出することに成功し、分子生物学研究に有用なケミカルツールや創薬研究におけるシーズを提供する分子技術の基盤を築いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は、生体機能の発現に主要な役割を果たしており、その機能の自在に制御できる分子の創出は、分子生物学などの基礎研究や創薬のような応用研究において重要な研究課題である。本研究では、ペプチドと呼ばれる人工分子の研究に着手し、最終的に、タンパク質表面を認識して結合する分子を創出することに成功した。このペプチドの研究を今後さらに発展させることで、タンパク質機能を自在に制御可能となれば、生命科学分野の基礎研究および創薬における大きな波及効果があると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop synthetic oligomers that realizes selective recognition of biomolecules, especially proteins. We modified backbone of peptoids, and thereby succeeded in generating synthetic oligomers that stably form particular three-dimensional structures. Using the peptoids, we succeeded in generating molecules that recognize protein surface. This study established a basis of a peptoid-based new molecular technology that provides useful chemical tools for molecular biology and seeds for drug discovery.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ペプチド ペプチド 人工オリゴマー タンパク質 分子認識

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドは、配列に応じて多様な3次元構造を形成し、これによって高精度な分子認識能を発揮する。こうしたペプチドの高い分子認識能を発揮しながら、ペプチドには達成できない機能を発揮するオリゴマー分子を生み出すことは、生体関連化学における大きな目標である。

N置換グリシンのオリゴマーは、ペプトイドと呼ばれ、そのN置換構造に由来してプロテアーゼ耐性と生体膜透過性に優れるため、ペプチドよりも分子生物学や創薬などの生体応用に優れた分子として注目されてきた。(R. J. Simon, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 9367-9371)しかし、優れた生体分子認識能を示すペプトイドはこれまでほとんど報告されていない。この原因は、ペプトイドの主鎖の柔軟性が高く、特定の3次元構造を安定に形成することができないことにある。

本研究では、ペプトイドの主鎖二面角の回転を制限して特定の3次元構造を安定に形成させることで、高い分子認識能を示すペプトイドを創出することを考えた。我々は最近、ペプトイドの主鎖をグリシンからアラニンに変えたN置換アラニンのオリゴマーが高い水溶性を保ちながら特定の立体配座を安定に形成することを示した(J. Morimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14612-14623.)。この分子は、擬似的1,3-アリル歪みの効果により、主鎖の二面角が特定の角度に制限されるため、N置換基の構造によらずまっすぐに伸びたかたちをとる。また、N置換アミド骨格からなるため、高いプロテアーゼ耐性と生体膜透過性を発揮すると期待できる。一方で、これまでのところ、このオリゴマーの3次元構造は直線的な単純なものに限られており、ペプチドのような多様な3次元構造の形成は実現できていない。主鎖骨格のさらなる拡張により多様な3次元構造を水中で安定に形成するペプトイドを実現することができれば、ペプチドを超える生体応用に優れた人工オリゴマー分子となると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、多様な3次元構造を形成することのできるペプトイドを開発し、高い生体分子認識能を発揮する人工オリゴマー分子を創出することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- ① βアミノ酸の利用による多様な3次元構造を形成するペプトイドの開発: 本研究では、ペプトイドの主鎖骨格中にβアミノ酸を導入することを中心に研究に取り組んできた。このような分子は、βペプトイドと呼ばれ、αアミノ酸を主鎖骨格とするペプトイドよりも多様な3次元構造を実現できる分子として期待されてきた。しかしながら、主鎖に回転可能な結合が複数存在するために、特定の3次元構造を形成することが、αアミノ酸を主鎖にもつペプトイドよりもさらに困難であることがわかっている。実際に、直鎖状のβペプトイドで、結晶構造が明らかになっているものは、研究開始当初わずか一例に限られていた。

申請者らは、βペプトイドの主鎖炭素上に嵩高い置換基を導入することによって、βペプトイドの3次元構造を安定化することを考えた。以前の研究で我々は、βペプトイドのβ炭素上にメチル基を導入しただけでは、十分な立体配座安定化の効果が得られないことを明らかにしていた(J. Morimoto, *et al. Org. Lett.* **2017**, *19*, 5912-5915)。この先行研究を通じた合成法を用いることで、本研究では、β炭素上により嵩高い置換基を導入し、その結果得られる配座制御効果について検証した。合成したβペプトイドについては、円偏光二色性(CD)の測定、核磁気共鳴法(NMR)、単結晶X線構造解析、分子動力学(MD)計算など、複数の実験・計算の手法を用いて多面的に検証した。

- ② タンパク質を認識するペプトイドのインシリコ設計: 我々がこれまでに開発してきた剛直なペプトイドは、タンパク質認識に重要な官能基を3次元空間の望みの位置に提示する足場骨格として利用できる有用な分子であると考えられる。申請者らは、これを利用して、これまでに、MDM2に結合するリガンドの設計に取り組んできた。本研究では、対象を拡張し、BCLファミリータンパク質の複数のタンパク質に対して、結合するペプトイドの設計に挑戦した。具体的には、BCLファミリータンパク質に結合するヘリックス性のタンパク質構造に着目し、そこに提示されてタンパク質認識に重要と考えられる3~4つの疎水性残基を、ペプトイドを足場骨格として提示することを考えた。適切な提示パターンをインシリコで設計し、設計したペプトイドを数十種類実際に合成して、競合的な蛍光偏光法によって標的タンパク質に対する結合親和性を評価した。

#### 4. 研究成果

- ① βアミノ酸の利用による多様な3次元構造を形成するペプチドの開発：βペプチドを構成するβアミノ酸のβ位に、メチル基、フェニル基、ナフチル基の3種類の置換基を導入し、それによって、主鎖二面角がどのように制御されるかを検証した。βペプチドを構成する4つの二面角のうち、二面角 $\omega$ に着目して、NMRの測定により、その二面角がどのように制御されるかを定量的に評価した。 $\omega$ は、 $180^\circ$  もしくは  $0^\circ$  付近を安定に形成するが、β炭素上にナフチル基のような嵩高い置換基を導入すると、 $\omega$ が強く  $180^\circ$  に偏ることが示唆された。また、量子化学計算によるモノマーの安定立体配座の検証を行ったところ、β炭素上の置換基の導入によって、 $\omega$ 以外の二面角も回転が強く制限され、特定の立体配座を安定に形成することが示唆された。そこで、我々は、このナフチル基をβ位に有するβペプチドについて、5残基のオリゴマーを合成し、その単結晶 X線構造解析を行った。その結果、このオリゴマーは結晶中でループ型のユニークな3次元構造を形成していることが明らかとなった（**図1**）。さらに、我々は、この構造が溶液中でも安定に維持されるかどうかを検証するために、NMRの測定を行った。NOEシグナルの情報から、オリゴマー中で近接する水素原子の情報を取得したところ、結晶構造で見られたループ型の3次元構造が溶液中でも主要な立体配座であることが示唆された。NMRによる解析は、分子の溶液中での平均的な構造情報しか与えないため、最後に我々は、MD計算によるペプチドの動的挙動に関する評価を行った。MD計算中、時間の経過に伴って、ループ型の構造が開き、直線型の構造になる様子が観測された。これらの結果から、我々が開発したβペプチドは、平均的にはループ型の構造をとるものの、数十ナノ秒～数百ナノ秒の時間スケールで、ループ型の構造と直線型の構造との間を変化する分子であることが示唆された（*J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 2277–2284）。この研究によって、βペプチドの複数の二面角を同時に制御する分子設計が初めて確立されたことになる。一方で、MD計算から示唆されるように、このβペプチドは1つの3次元構造だけを安定に形成するものではないため、今後、さらにβアミノ酸骨格を拡張していくことで、さらなるβペプチドの3次元構造の制御がなされることが期待される。実際に、我々は、そのような試みを続けている途中である。

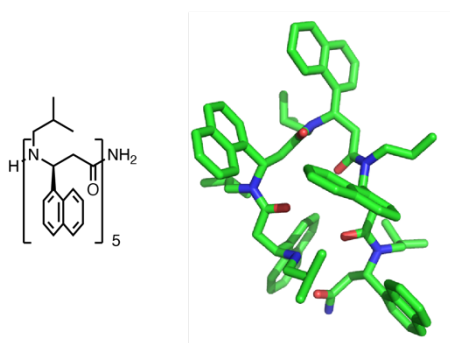


図1. ループ型構造を形成するβペプチドの化学構造と結晶構造

- ② タンパク質を認識するペプチドのインシリコ設計：我々が以前から取り組んできた Nメチルアラニン基本骨格とするペプチドは、理論上は、アミド窒素上とα炭素上の両方に置換基を提示することが可能であり、1つの分子上の様々な位置に置換基を提示できる足場骨格として有用である。実際に、これまで申請者らは、アミド窒素上に適切に置換基を提示することで、MDM2に結合するペプチドを実現することに成功してきた。本研究で我々は、まず、このペプチドのα炭素上の置換基を導入しても、主鎖骨格の3次元構造が大きな影響を受けないかどうかを確かめることにした。DFT計算やMD計算などの計算化学の情報、そして、結晶構造・NMRなどの実験で得られる情報から、α炭素上に置換基を導入してもペプチドの主鎖の3次元構造は大きく影響を受けないことが示唆された。この知見に基づき、我々は、5残基のペプチドのアミド窒素上およびα炭素上に置換基を導入することで、BCLファミリーに属する2つのタンパク質に対するリガンドの設計を行った。標的タンパク質への結合に重要な3～4つの疎水性残基を、適切な位置に配置する置換基のパターンをインシリコで網羅的に評価し、強く結合すると期待されるペプチドを数十種類選択して実際に合成した。これらのペプチドについて、標的タンパク質に対する結合能を、競合的な蛍光偏光法により測定したところ、複数のペプチドについて標的との結合が確認された。しかし、その結合能は、 $K_D$ が数十μM程度と非常に弱く、分子生物学研究や創薬に利用するケミカルプローブ・薬剤シーズとしては不十分であった。今後、構造情報に基づく設計やライブラリースクリーニングなどのアプローチによって置換基構造を最適化することで、標的タンパク質を強く認識するペプチドが創出されていくことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jumpei Morimoto, Jungyeon Kim, Daisuke Kuroda, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Shinsuke Sando	4. 巻 142
2. 論文標題 Per-Residue Program of Multiple Backbone Dihedral Angles of $\alpha$ -Peptoids via Backbone Substitutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 2277-2284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b10496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jumpei Morimoto, Yasuhiro Fukuda, Daisuke Kuroda, Takumu Watanabe, Fumihiko Yoshida, Mizue Asada, Toshikazu Nakamura, Akinobu Senoo, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Shinsuke Sando	4. 巻 141
2. 論文標題 A Peptoid With Extended Shape in Water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 14612-14623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.9b10496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jumpei Morimoto, Shinsuke Sando	4. 巻 78
2. 論文標題 Peptoids with Substituents on the Backbone Carbons as Conformationally Constrained Synthetic Oligoamides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1076-1084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5059/yukigoseikyokaishi.78.1076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jungyeon Kim, Jumpei Morimoto, Shinsuke Sando
2. 発表標題 A Design Strategy for $\alpha$ -Peptoids with Constraint on Multiple Backbone Dihedral Angles
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Fukuda, Jumpei Morimoto, Daisuke Kuroda, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Shinsuke Sando
2. 発表標題 Development of Inhibitors for Intracellular Protein-protein Interactions Using Peptoids with Alanyl Backbones
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本淳平、福田泰啓、黒田大祐、渡邊拓夢、吉田文彦、浅田瑞枝、中村敏和、妹尾暁暢、長門石暁、津本浩平、山東信介
2. 発表標題 主鎖アラニン型ペプチドの配座安定性評価と生体分子認識への応用
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本 淳平
2. 発表標題 予測可能な立体構造を形成する人工オリゴアミドの開発と生体分子操作への展開
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横峰真琳、福田泰啓、黒田大祐、津本浩平、森本淳平、山東信介
2. 発表標題 N置換ペプチドを足場とするMDM2リガンドの設計
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jumpei Morimoto
2. 発表標題 Oligo(N-substituted alanine) as a peptoid with a defined shape in water
3. 学会等名 Online Peptoid Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本淳平
2. 発表標題 細胞内タンパク質機能を操作するための中分子設計
3. 学会等名 GTR Chemistry Workshop 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本淳平、福田泰啓、山東信介
2. 発表標題 水中で特定の立体配座を形成する人工オリゴアミドの開発とタンパク質リガンド設計への応用
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質相互作用を阻害するペプチドの合理的創出法	発明者 山東信介、森本淳平、福田泰啓、渡邊拓夢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/27010	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------