

平成22年4月1日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790012  
 研究課題名(和文) 核-細胞質シャトルペプチドの開発と疾患関連タンパク質除去システムへの応用  
 研究課題名(英文) Development of nucleocytoplasmic shuttle peptide and its application for controlling distribution of disease related protein  
 研究代表者  
 重永 章 (SHIGENAGA AKIRA)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：10423394

研究成果の概要(和文)：多くの難治性疾患において、疾患関連タンパク質の核内蓄積が観測される。これら疾患の治療法として、核内疾患関連因子の核外輸送法の開発が挙げられる。本研究ではこの基盤技術として、核内へ移行した後、外部からの刺激を受けて核外へ再移行するペプチド、すなわち核-細胞質シャトルペプチドの開発を目的とした。この結果、シャトルペプチド中心骨格となるアミノ酸誘導体の不斉合成、および種々の刺激応答部位の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)： Accumulation of a disease related mutated protein in a nucleus is observed in some intractable diseases. To treat these diseases, elimination of the mutated protein from nucleus is thought to be applicable. Therefore, we decided to develop a nucleocytoplasmic shuttle peptide, which locates inside a nucleus before exposure to a stimulus but it returns to a cytoplasm after exposure to a stimulus, with potential applicability to eliminate the mutated protein from a nucleus. As a results, we successfully developed several stimulus-responsive amino acids which can be used for controlling a peptidyl function by a stimulus, and asymmetric synthesis of a key synthetic intermediate of the stimulus-responsive amino acids was achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：ペプチド、有機合成化学、刺激応答、ペプチド結合切断、ケージド化合物、シャトルペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

多くの難治性疾患において、疾患関連因子の核内への蓄積が観測される。これら疾患の治療法の一つとして、核内疾患関連因子の核外輸送法の開発が挙げられる。さらに、これら疾患を分子レベルで理解するには、疾患関連因子の核外輸送が外部から制御できることが望ましい。これに対するアプローチの一つとして、まず核内へ移行して疾患関連因子を捕捉した後、外部からの刺激を受けて再び核外へ移行する化合物の利用が考えられる。

そこで本研究では、核-細胞質シャトルペプチドによるタンパク質輸送系の確立と、これを利用した疾患関連タンパク質核外輸送システムの構築を目指した。なお、核-細胞質シャトルペプチドとは、細胞へ添加するとまず核内へ移行し、刺激に反応して細胞質へ再移行するペプチドと定義する。

## 2. 研究の目的

本研究では、核-細胞質シャトルペプチドによるタンパク質輸送系の確立と、これを利用した疾患関連タンパク質核外排出システムの構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず紫外線応答型核-細胞質シャトルペプチドによる疾患関連タンパク質除去システムの構築について検討した。この過程において、紫外線の高い細胞傷害性によりアッセイ系確立が困難となった。そこで、紫外線より細胞傷害性の低い近赤外二光子励起応答型核-細胞質シャトルペプチドの合成を目指し、その基盤となる近赤外二光子励起応答型アミノ酸、すなわち近赤外二光子励起によりペプチド結合切断を誘起する人工アミノ酸の合成について検討することとした。この実験と平行し、細胞外部からの刺激ではなく細胞内部の刺激に反応する人工アミノ酸として、チオール応答型アミノ酸の開発についてもあわせて検討することとした。また、これまで刺激応答型アミノ酸としてラセミ体を用いていたが、今回はその不斉合成についても挑戦することとした。さらに、核-細胞質シャトルペプチドと疾患関連タンパク質捕捉部位を連結する際に必要となる新規ペプチドライゲーション法の開発もあわせて行うこととした。

## 4. 研究成果

研究期間内に、近赤外二光子励起応答型アミノ酸[1]およびチオール応答型アミノ酸[2]の開発に成功した。さらに、これら刺激応答型アミノ酸の共通合成中間体の不斉合成も達成している[3]。また、新規ペプチドライゲーション法の開発に

も、あわせて成功している[4]。近赤外二光子励起応答型アミノ酸および新規ライゲーション法については第3回アジア環太平洋国際ペプチドシンポジウムポスター賞や日本ペプチド学会ポスター賞を授与されるなど、国内外の各分野において高い評価を受けている。なお、研究成果の詳細については「5. 主な発表論文等」をご覧ください。

現在、これら成果を統合した近赤外二光子励起応答型核-細胞質シャトルペプチドの開発と、これを基盤とした疾患関連タンパク質除去システムへの展開について検討しているところである。

## 参考文献

- [1] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868-2871.
- [2] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2525-2528.
- [3] Shigenaga, A. et al. manuscript in preparation.
- [4] Shigenaga, A. et al. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3290-3296.

## 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13件)

1. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Sumikawa, Y.; Furuta, T.; Otaka, A. "Development and photo-responsive peptide bond cleavage reaction of two-photon near-infrared excitation responsive peptide" *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868-2871. (査読有)
2. Shigenaga, A.; Sumikawa, Y.; Tsuda, S.; Sato, K.; Otaka, A. "Sequential native chemical ligation utilizing peptide thioacids derived from newly developed Fmoc-based synthetic method" *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3290-3296. (査読有)
3. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Hirakawa, H.; Ogura, K.; Morishita, K.; Maeda, N.; Otaka, A. "Development of thiol-responsive amide bond cleavage device and its application for DNA releasing system based on a peptide nucleic acid" *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2525-2528. (査読有)
4. Fujimoto, Y.; Shiraki, T.; Horiuchi, Y.; Waku, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A.; Ikura, T.; Igarashi, K.; Aimoto, S.; Tate, S.; Morikawa, K. "Proline cis/trans isomerase Pin1 regulates peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  activity through the direct binding to the AF-1 domain" *J. Biol. Chem.* **2010**,

- 285, 3126-3132. (査読有)
5. Shigenaga, A.; Nishiyama, Y.; Maeda, N.; Otaka, A. "Synthesis of cyclic peptides via on resin-intramolecular native chemical ligation followed by reductive release from resin" *Peptide Science* 2009 2010, 147-148. (査読有)
  6. Yamaki, Y.; Shigenaga, A.; Tomita, K.; Narumi, T.; Fujii, N.; Otaka, A. "Synthesis of fluoroalkene dipeptide isosteres by intramolecular redox reaction utilizing *N*-heterocyclic carbenes (NHCs)" *J. Org. Chem.* 2009, 74, 3272-3277. (査読有)
  7. Yamaki, Y.; Shigenaga, A.; Li, J.; Shimohigashi, Y.; Otaka, A. "Synthesis of amide-type fluoroalkene dipeptide isosteres by an intramolecular redox reaction" *J. Org. Chem.* 2009, 74, 3278-3285. (査読有)
  8. Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Bando, K.; Otaka, A. "*N*→*S* acyl-transfer-mediated synthesis of peptide thioesters using anilide derivatives" *Org. Lett.* 2009, 11, 823-826. (査読有)
  9. Shigenaga, A.; Yamamoto, J.; Hirakawa, H.; Yamaguchi, K.; Otaka, A. "FRET-based assay of the processing reaction kinetics of stimulus-responsive peptides: Influence of amino acid sequence on reaction kinetics" *Tetrahedron* 2009, 65, 2212-2216. (査読有)
  10. Shigenaga, A.; Nishioka, N.; Yamamoto, J.; Hirakawa, H.; Sumikawa, Y.; Yamaguchi, K.; Otaka, A. "Influence of an amino acid sequence on kinetics of peptide bond cleavage reaction induced by a stimulus-responsive amino acid" *Peptide Science* 2008 2009, 395-396. (査読有)
  11. Sumikawa, Y.; Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "The application of peptide thioacids to NCL-type sequential condensation of peptide fragments" *Peptide Science* 2008 2009, 175-176. (査読有)
  12. Yamaki, Y.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Synthesis of fluoroalkene dipeptide isostere utilizing intramolecular redox reaction" *Peptide Science* 2008 2009, 49-50. (査読有)
  13. Tsuda, S.; Maeda, N.; Bando, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A. "Synthesis of peptide thioester using *N*-substituted aniline derivatives" *Peptide Science* 2008 2009, 17-18. (査読有)
- [学会発表] (計37件)
1. 重永 章、大高 章「刺激応答型ペプチド結合切断反応を基盤としたペプチド機能制御」日本薬学会第130回年会(岡山市)、2010年3月29日
  2. 森下 巧、山口圭子、重永 章、赤路健一、大高 章「チオールプロテアーゼの機能制御を指向した機能性分子の開発」日本薬学会第130回年会(岡山市)、2010年3月28日
  3. 山本 純、住川栄健、重永 章、古田寿昭、大高 章「近赤外二光子励起応答型ペプチドの開発およびその光反応性の測定」日本薬学会第130回年会(岡山市)、2010年3月29日
  4. 小倉圭司、平川寛子、重永 章、大高 章「AMP化タンパク質の機能解明に向けた非水解性AMP化アミノ酸の創製」日本薬学会第130回年会(岡山市)、2010年3月28日
  5. 佐藤浩平、津田修吾、前田奈美、重永 章、大高 章「N-置換アニリン型補助基の生理活性ペプチド合成への展開」日本薬学会第130回年会(岡山市)、2010年3月28日
  6. 辻 耕平、山本 純、八巻陽子、重永 章、大高 章「分子内 Redox 反応を利用したフルオロアルケンジペプチドイソスターの合成とその $\alpha$ -アルキル化の検討」日本薬学会第130回年会(岡山市)、2010年3月28日
  7. 山本 純、八巻陽子、辻 耕平、重永 章、大高 章「分子内 Redox 反応を利用したフルオロアルケンジペプチドイソスターの合成とクライゼン型転位による $\alpha$ -アリル化の検討」創薬懇話会2009(名古屋市)、2009年12月10日
  8. 森下 巧、山口圭子、重永 章、大高 章「チオールプロテアーゼの活性制御を指向した刺激応答型チオール放出システムの開発」第28回メディスナルケミストリーシンポジウム(東京都文京区)、2009年11月25日
  9. 重永 章「“化学”でペプチド・タンパク質を操る」国際科学技術財団第198回やさしい科学技術セミナー(徳島市)、2009年11月21日
  10. 住川栄健、津田修吾、重永 章、大高 章「ペプチドチオカルボン酸の効率的合成と新規ペプチドフラグメント縮合法への適用」第35回反応と合成の進歩シンポジウム(金沢市)、2009年11月16日
  11. 山本 純、重永 章、住川栄健、古田寿昭、大高 章「Development of near-infrared two-photon excitation responsive peptide bond cleavage device and examination of its photo-reactivity」3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium (Jeju Island, Korea)、2009年11月8日
  12. 重永 章、西山由希子、前田奈美、大高 章「Synthesis of cyclic peptides via on resin-intramolecular native chemical ligation followed by reductive release from resin」第46回ペプチド討論会(北九州市)、2009

- 年 11 月 4 日
13. 重永 章、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発とペプチド機能制御への展開」第 6 回 HBS 月例セミナー(徳島市)、2009 年 10 月 26 日
  14. 重永 章「ペプチド・タンパク質機能制御法について考える」第 4 2 回若手ペプチド夏の勉強会(八王子市)、2009 年 8 月 2 日
  15. 重永 章、津田修吾、住川栄健、大高 章「 $\beta$ -置換アニリン型補助基を用いたペプチドチオエステル合成法の開発」ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会(神戸市)、2009 年 5 月 18 日
  16. 平川寛子、西岡直美、山口圭子、重永 章、大高 章「光刺激応答型アミド結合切断デバイスのケージドセラミド創製への応用」ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会(神戸市)、2009 年 5 月 18 日
  17. 住川栄健、津田修吾、重永 章、大高 章「ペプチドチオカルボン酸の効率的合成と sequential NCL 法への適用」ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会(神戸市)、2009 年 5 月 18 日
  18. 重永 章、山本 純、平川寛子、山口圭子、大高 章「任意の刺激応答型ペプチド結合切断デバイスの反応速度に与えるアミノ酸配列の影響」日本薬学会第 1 2 9 回年会(京都市)、2009 年 3 月 26 日
  19. 前田奈美、津田修吾、石澤祥衣、重永 章、大高 章「分子内 NCL を利用した環状ペプチド合成法の開発(1)」日本薬学会第 1 2 9 回年会(京都市)、2009 年 3 月 26 日
  20. 西山由希子、中本亜樹、重永 章、大高 章「分子内 NCL を利用した環状ペプチド合成法の開発(2)」日本薬学会第 1 2 9 回年会(京都市)、2009 年 3 月 26 日
  21. 住川栄健、津田修吾、重永 章、大高 章「蛋白質化学合成を指向した無保護ペプチドフラグメント順次縮合法の開発」日本薬学会第 1 2 9 回年会(京都市)、2009 年 3 月 26 日
  22. 平川寛子、西岡直美、山口圭子、重永 章、大高 章「光刺激応答型アミド結合切断反応のケージドセラミド創製への応用」日本薬学会第 1 2 9 回年会(京都市)、2009 年 3 月 26 日
  23. 平川寛子、西岡直美、山口圭子、重永 章、大高 章「光刺激応答型アミド結合切断デバイスを利用したケージドセラミドの創製」創薬懇話会 2008(徳島市)、2008 年 12 月 11 日
  24. 八巻陽子、重永 章、大高 章「分子内 redox 反応を利用したフルオロアルケンジペプチドイソスターの合成」第 3 4 回反応と合成の進歩シンポジウム(京都市)、2008 年 11 月 4 日
  25. 平川寛子、西岡直美、山口圭子、重永 章、大高 章「光刺激応答型アミド結合切断反応を利用したケージドセラミドの創製」第 4 7 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(岡山市)、2008 年 11 月 8 日
  26. 前田奈美、津田修吾、重永 章、大高 章「*N-S* アシルシフトを利用した環状ペプチドライブラリー構築の試み」第 4 7 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(岡山市)、2008 年 11 月 8 日
  27. 森下 巧、津田修吾、前田奈美、重永 章、大高 章「ペプチド結合切断能を有する側鎖修飾型アスパラギンの開発」第 4 7 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(岡山市)、2008 年 11 月 8 日
  28. 山本 純、住川栄健、西岡直美、重永 章、古田寿昭、大高 章「近赤外二光子励起応答型ペプチド結合切断デバイスの開発」第 4 7 回日本薬学会病院薬剤師会中国四国支部学術大会(岡山市)、2008 年 11 月 8 日
  29. 重永 章、西岡直美、山本 純、平川寛子、住川栄健、山口圭子、大高 章「Influence of an amino acid sequence on kinetics of peptide bond cleavage reaction induced by a stimulus-responsive amino acid」第 4 5 回ペプチド討論会(東京都江戸川区)、2008 年 10 月 29 日
  30. 住川栄健、津田修吾、重永 章、大高 章「The application of peptide thioacids to NCL-type sequential condensation of peptide fragments」第 4 5 回ペプチド討論会(東京都江戸川区)、2008 年 10 月 29 日
  31. 津田修吾、前田奈美、坂東清美、重永 章、大高 章「Synthesis of peptide thioester using *N*-substituted aniline derivatives」第 4 5 回ペプチド討論会(東京都江戸川区)、2008 年 10 月 29 日
  32. 八巻陽子、重永 章、大高 章「Synthesis of fluoroalkene dipeptide isostere utilizing intramolecular redox reaction」第 4 5 回ペプチド討論会(東京都江戸川区)、2008 年 10 月 29 日
  33. 津田修吾、重永 章、辻 大輔、西岡直美、住川栄健、伊藤孝司、大高 章「Development of UV irradiation-responsive amino acid with peptide bond cleavage ability and its application to a nucleocytoplasmic shuttle peptide」第 22 回内藤コンファレンス(札幌市)、2008 年 9 月 9 日
  34. 住川栄健、津田修吾、重永 章、大高 章「チオカルボン酸を利用した化学的蛋白質合成法の開発に関する研究」第 24 回

35. 若手化学者のための化学道場 (徳島市)、  
2008年9月11日
36. 大高 章、重永 章、西岡直美、辻 大  
輔、伊藤孝司「Cleavage of peptide bonds for  
the preparation of functional peptides」The  
12th Japan-Korea Joint Symposium on Drug  
Design and Development (仙台市)、2008  
年5月14日
37. 八巻陽子、重永 章、大高 章「Synthesis  
of fluoroalkene dipeptide isosteres utilizing  
intramolecular redox reaction catalyzed by  
*N*-heterocyclic carbene」The 12th Japan-  
Korea Joint Symposium on Drug Design and  
Development (仙台市)、2008年5月14  
日
38. 重永 章、西岡直美、山本 純、大高 章  
「任意の刺激応答型ペプチド結合切断デ  
バイスの開発」日本ケミカルバイオロジ  
ー研究会第3回年会 (東京都千代田区)、  
2008年5月19日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.tokushima-u.ac.jp/article/0015008.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

重永 章 (SHIGENAGA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号：10423394