

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06958

研究課題名（和文）ヘリカルプロモータ配列の開発とその生理活性ペプチドへの応用

研究課題名（英文）Development of helical promoter sequence and its application for bioactive peptides.

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・室長

研究者番号：40709820

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヘリカル構造は天然のタンパク質の構造で最も多く認められ、細胞内での生理機能に深く関与している。そのため、生理活性ペプチドの創出には、ペプチドのヘリカル構造を制御する方法が重要である。本研究課題では、ヘリカル構造を制御する非天然アミノ酸である α,α -ジ置換アミノ酸や側鎖架橋構造を導入したヘリカルテンプレート構造を組み合わせることで、新たなヘリカル構造制御法の開発に成功した。また、それらの応用として生理活性ペプチドの開発研究を行い、ドラッグデリバリーシステムや抗菌ペプチド、タンパク質間相互作用阻害ペプチドを見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ペプチド医薬品をはじめとした中分子医薬品が新たな創薬モダリティとして注目を集めている。そのため、ペプチド医薬品の候補化合物の迅速な導出が期待されている。本研究では、ヘリカル構造に着目し、生理活性ペプチドの開発を志向したヘリカル構造制御手法の開発とその応用研究として、生理活性ペプチド開発のための構造活性相関研究を目指した。本研究課題で見出したヘリカル構造制御手法は従来とは異なり、ペプチド配列中に修飾することなくヘリカル構造を安定化することを可能にした。上記成果は新たな生理活性ペプチドのデザインを可能にし、学術的・社会的意義が大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The helical structure is the most commonly recognized structure of natural proteins and is deeply involved in physiological functions within cells. Therefore, methods to control the helical structure of peptides are crucial for creating physiologically active peptides. In this research project, we succeeded in developing new methods for controlling helical structures by combining helical template structures incorporating non-natural amino acids, such as α,α -disubstituted amino acids and side-chain crosslinking structures, which are known to control helical structures. Furthermore, as an application of these methods, we conducted research on the development of physiologically active peptides. We successfully discovered peptides for drug delivery systems, antimicrobial peptides, and peptides that inhibit protein-protein interactions.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：生理活性ペプチド 中分子創薬 構造活性相関

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(Futaki et al. *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。合成ペプチドを用いて天然タンパク質の構造モチーフを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カル構造の構築である。これまでに様々な手法を用いたヘリカル構造制御法が開発されており、架橋構造の導入、 α,α -ジ置換アミノ酸等の非天然アミノ酸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。しかし、上述の非天然アミノ酸をペプチドに修飾することで、生理活性の減弱や水溶性などの物性悪化が危惧される。そのような場合、活性配列中に非天然アミノ酸を導入することなくそのヘリカル構造を安定化する方法が求められる。

2. 研究の目的

申請者は不安定な二次構造を形成するペプチドに対し、 α,α -ジ置換アミノ酸を導入することでヘリカル構造の形成を誘導できることを報告している。その中で代表的なジ置換アミノ酸である Aib と Leu からなる短鎖ペプチド(1: H-(Leu-Leu-Aib)_n-OH) が安定なヘリカル構造を形成することを見出している。申請者は上記のヘリカルペプチドのヘリカル構造誘導効果に着目し、ランダム構造を形成するオリゴアルギニン(R_n)に対しペプチド 1 を連結した Block ペプチド (FAM- β Ala-(Leu-Leu-Aib)_n-(Gly)₃-(Arg)₉-NH₂) をデザイン・合成し、その二次構造および細胞膜透過性について評価を行った。その結果、Block ペプチドは安定なヘリカル構造を形成し、高い細胞膜透過性を示すことが明らかになった(Figure1)。本結果から、ペプチド 1 はヘリカルプロモータとしてオリゴアルギニンにヘリカル構造を形成させることが示唆された。本研究では、ペプチド 1 に認められたヘリカル構造誘導効果に着目した構造展開を行うことで新たなヘリカル構造制御法に関する研究を行う。ペプチド活性配列に対して化学修飾することなく、ヘリカルプロモータ配列を末端に連結するだけでヘリカル構造を形成させることが可能になり、ヘリカル構造を基盤とするペプチド医薬品の開発に貢献すると期待される。

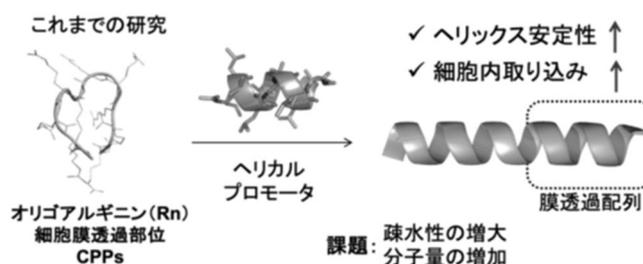


Figure 1. ヘリカルプロモータ配列による二次構造制御

3. 研究の方法

申請者はこれまでにペプチド 1 を利用したヘリカル構造制御に関する研究を行ってきた。短い配列でヘリカル構造を誘導するためには、より安定なヘリカル構造を形成させる必要がある。そこで、高いヘリカル構造安定化作用を有する非天然アミノ酸の導入や側鎖上への架橋構造を導入することで、より安定なヘリカル構造を形成できると考えた。つまり、Aib 残基を安定化作用の強い環状ジ置換アミノ酸である Ac_{5c} や Ac_{6c} あるいは -アミノ酸に置換するあるいは側鎖のステーブル化を行うことでより高いヘリカル構造安定化作用の獲得を目指す。合成したペプチドの二次構造は CD スペクトルや NMR、X 線結晶構造解析を行うことで評価する。

合成したペプチドは Block ペプチドと同様にノナルギニンあるいは生理活性ペプチドに連結し、その二次構造を CD スペクトルにより評価する。ヘリカルプロモータ単独と Block ペプチドの二次構造を比較することでヘリカル構造の形成を判断することが可能である。さらに、ヘリカル構造を形成したペプチドに関しては、細胞膜透過性をフローサイトメトリーや蛍光顕微鏡で評価すると共に、タンパク質や核酸などの生体高分子の細胞内デリバリーをそれぞれ評価する。次に、タンパク質間相互作用阻害剤への応用も行い、ヘリカルプロ

モータ配列の有用性を検討する。標的としては、これまでに当研究室で行っているビタミン D 受容体とコアクチベータの相互作用を阻害するペプチドの開発を行う。具体的には、ビタミン D 受容体とコアクチベータを阻害するペプチドとして SRC2-3 (H-KENALLRYLLDKD-NH₂)が報告されている (Yamamoto et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 25, 568.)。SRC2-3 に対し、ヘリカルプロモータ配列を連結させ、CD スペクトルを用いてペプチド二次構造解析を行う。また、ビタミン D 受容体への結合力や細胞内での転写活性化試験を VDR のレポーターアッセイによってそれぞれ評価し、ヘリカルプロモータの効果を検討する予定である。

4. 研究成果

上記の Block ペプチドでは、siRNA の効率的な siRNA の導入効果が認められている。さらなる応用研究として、Block ペプチドを用いたプラスミド DNA の細胞内デリバリーを目指した。本研究では、Block3 のヘリカルテンプレートの長さや連結位置の異なるペプチドをデザイン合成し、そのプラスミド導入効果を検討した。その結果、ヘリカルテンプレートの繰り返し配列は、ノナルギニンに対し 3 回繰り返し程度の長さが求められること、および連結位置はノナペプチドの N 末端側に連結した方が C 末端側に連結したペプチドよりも効率的なデリバリー効果を示した (Figure 2)。

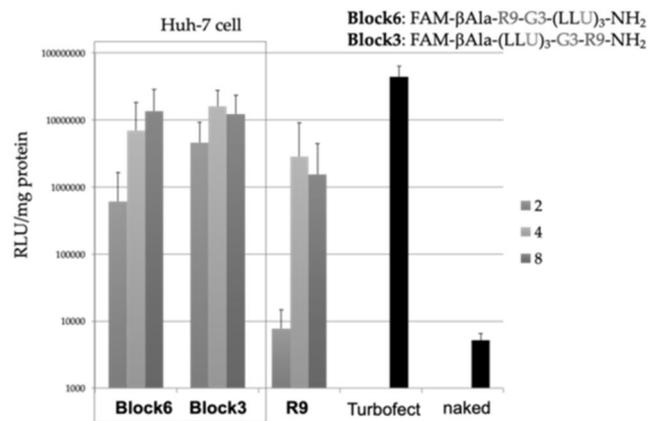


Figure 2 Block3 誘導体による pDNA デリバリー

ペプチドのヘリカル構造を安定化する非天然アミノ酸および化学修飾として、 α -アミノ酸あるいは側鎖架橋構造を導入したペプチドを合成した (Figure 2)。次に、CD スペクトルを用いた二次構造解析から、合成したペプチドは安定なヘリカル構造を形成していることが明らかになった。さらに、Fluorescein polarization (FP) アッセイを用いて合成したペプチドの VDR への結合活性を評価した。

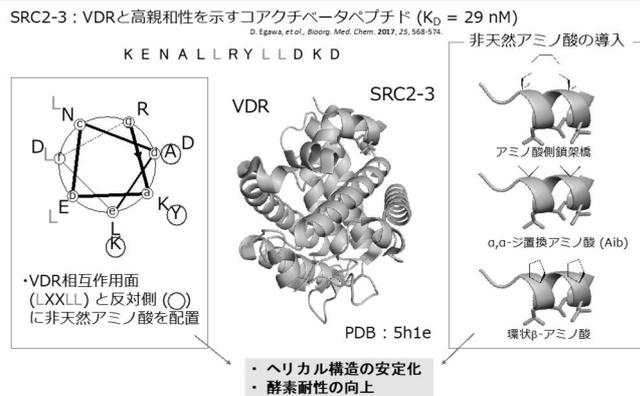


Figure 2. VDR-coactivator 相互作用阻害ペプチドのデザイン

その結果、VDR に対し、SRC2-3 と同程度の結合活性を示すペプチドを見出した。しかし、これらのペプチドは細胞膜を透過することができず、細胞内での VDR 転写活性化を阻害することはできなかった。そこで、上記ペプチドに対し、細胞膜透過性ペプチド (Cell penetrating peptide; CPP) を連結したペプチドを新たに合成した。CPP はカチオン性アミノ酸から構成され、カージオ分子を細胞内へ輸送するキャリア分子として注目を集めている。CPP を連結したペプチドは細胞内に効率的に取り込まれ、細胞質に広く分布することが明らかになった。さらに、細胞内での VDR 転写活性化試験を行ったところ、3 μM 処理下において、VDR 転写活性化阻害活性を示すことを明らかにした。さらに、本ペプチドをヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 に処理することで、VDR の下流遺伝子の転写を抑制すること、HL-60 の分化を抑制可能であることを明らかにした。以上の結果から、SRC2-3 リードとした二次構造制御および CPP の付加を行うことで細胞内の VDR 転写活性化を阻害するペプチドの開発に成功した。

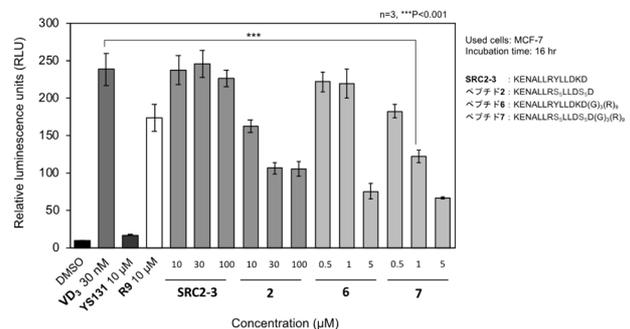


Figure 3. 合成したペプチドの細胞内 VDR 阻害評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takyo Mami, Sato Yumi, Hirata Naoya, Tsuchiya Keisuke, Ishida Hiroaki, Kurohara Takashi, Yanase Yuta, Ito Takahito, Kanda Yasunari, Yamamoto Keiko, Misawa Takashi, Demizu Yosuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Oligoarginine-Conjugated Peptide Foldamers Inhibiting Vitamin D Receptor-Mediated Transcription	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 46573 ~ 46582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c05409	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 -
1. 著者名 Tsuchiya Keisuke, Kiyoshi Masato, Hashii Noritaka, Fujita Minami, Kurohara Takashi, Ishii-Watabe Akiko, Fukuhara Kiyoshi, Misawa Takashi, Demizu Yosuke	4. 巻 73
2. 論文標題 Development of a penetratin-conjugated stapled peptide that inhibits Wnt/ β -catenin signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117021 ~ 117021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.117021	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 Tsuchiya Keisuke, Kurohara Takashi, Fukuhara Kiyoshi, Misawa Takashi, Demizu Yosuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Helical Foldamers and Stapled Peptides as New Modalities in Drug Discovery: Modulators of Protein-Protein Interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 924 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pr10050924	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 -
1. 著者名 Keisuke Tsuchiya, Takashi Kurohara, Kiyoshi Fukuhara, Takashi Misawa, Yosuke Demizu	4. 巻 10
2. 論文標題 Helical Foldamers and Stapled Peptides as New Modalities in Drug Discovery: Modulators of Protein-Protein Interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pr10050924	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 -

1. 著者名 Yokoo Hidetomo, Misawa Takashi, Kato Takuma, Tanaka Masakazu, Demizu Yosuke, Oba Makoto	4. 巻 72
2. 論文標題 Development of delivery carriers for plasmid DNA by conjugation of a helical template to oligoarginine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116997 ~ 116997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116997	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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 三澤隆史、加藤巧馬、伊藤貴仁、大岡伸通、井上貴雄、土井光暢、出水庸介
2. 発表標題 生理活性ペプチドの効率的導出に向けたヘリカルテンプレートの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三澤隆史
2. 発表標題 ビタミンD受容体の転写機能を調節する 新規ペプチドフォルダマーの開発
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三澤 隆史
2. 発表標題 Fundamental Studies on the Development of Next-Generation medium sized peptide drugs
3. 学会等名 Korean protein peptide symposium 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三澤隆史、大岡伸通、平野元春、大庭誠、井上貴雄、出水庸介
2. 発表標題 Structural development of helix-stabilized Block peptides for intracellular delivery of siRNA
3. 学会等名 第59回日本ペプチド学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三澤 隆史
2. 発表標題 次世代中分子ペプチド医薬品創出に向けた基盤技術の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三澤隆史
2. 発表標題 Fundamental Studies on the Development of Next-Generation Medium Sized Peptide Drugs
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------