

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560226

研究課題名(和文)還元環境に反応して可逆的に二次構造を変化させる人工ペプチドの創製

研究課題名(英文)Development of artificial peptides reversibly changing their secondary structures in response to reductive condition

研究代表者

大庭 誠(OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：20396716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：側鎖にジスルフィド(SS)結合を有する七員環状ジ置換アミノ酸を設計し、その含有ペプチドを合成した。SS結合は還元環境に反応して開裂し、環状から鎖状へとアミノ酸側鎖構造を変化させた。また、その側鎖構造の変化に伴い、含有ペプチドの二次構造が変化することが明らかとなった。一方で、環状から鎖状へと側鎖構造が変化することで、ヘリックス構造からランダム構造へと二次構造が変化することを期待したが、そのような明確な変化は見られなかった。

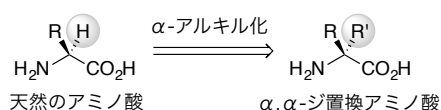
研究成果の概要(英文)：I designed seven-membered ring amino acid with disulfide (SS) bond in the side chain and synthesized its-containing peptides. SS bond was cleaved in response to reductive condition, resulting in structural change from cyclic to acyclic side chain. Furthermore, structural change of side chain led to the change in peptide secondary structure of its-containing peptides. We expected that its change would be from helical structure to random structure, however, we could not find such unambiguous change.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：機能性ペプチド 非天然型アミノ酸 刺激応答性材料

1. 研究開始当初の背景

天然の α -アミノ酸の α 位水素をアルキル基で置換した α,α -ジ置換アミノ酸は、図1のような特性を持つことから、創薬ツールや生体機能解明のためのプローブとして用いられている。 α -メチル化ジ置換アミノ酸や環状ジ置換アミノ酸をペプチドに導入するとヘリックス構造を形成する。一方、エチル基以上の大きな置換基を2つ有する鎖状ジ置換アミノ酸からなるペプチドは、ペプチド主鎖が完全に伸びたプラナー構造を形成する(M. Oba et al, *Chem. Eur. J.* **2003**, 3082)。申請者はこれまでに、光学活性ジ置換アミノ酸の不斉合成法ならびに新規環状ジ置換アミノ酸の合成法を開発し(*J. Org. Chem.* **2001**, 2667, *Tetrahedron* **2005**, 593)、ジ置換アミノ酸含有ペプチドの二次構造解析に関する研究に従事してきた(*Helv. Chim. Acta* **2002**, 3197)。本研究ではジ置換アミノ酸含有ペプチドの二次構造に関する学術的背景を基盤に、DDSキャリア研究(*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 6001, **2008**, 16287, **2011**, 15524)から得られた知見・技術を駆使し、研究を推進する。



- 1) 化学的安定性の向上
- 2) 親・疎水性のコントロール
- 3) 生体内での加水分解への抵抗性
- 4) 側鎖自由度の制限
- 5) 含有ペプチドの二次構造の自由度の制限

図1. α,α -ジ置換アミノ酸とその含有ペプチドの特性

2. 研究の目的

特定の環境変化や外部刺激に応答してペプチド・タンパク質の立体構造を変化させることができれば、機能のON/OFF制御へとつながる。そのような人工的なペプチド・タンパク質の構造制御は創薬ツールとしての可能性を秘めている。本研究では、還元環境に応答して側鎖構造を可逆的に変化させる非天然型アミノ酸を合成する(図2)。これは、環状ジ置換アミノ酸と鎖状ジ置換アミノ酸がもつ、含有ペプチドの構造特性を狙った設計である。非天然型アミノ酸の1つであるジ置換アミノ酸の導入により細胞内還元環境で二次構造を変化させ機能を発現するペプチドの開発を目的とする(図2)。

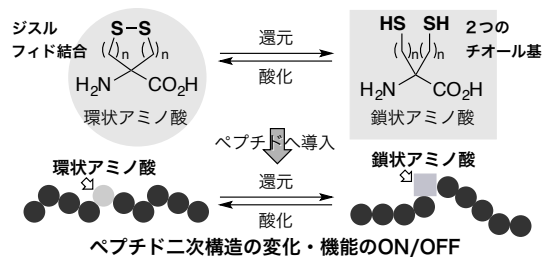


図2. 還元環境応答性の非天然型アミノ酸とその含有ペプチド

3. 研究の方法

還元環境に応答して側鎖構造を可逆的に変化させるジ置換アミノ酸として、非還元状態でジスルフィド(SS)結合を有する環状側鎖を、還元状態で2つのチオール基を有する鎖状側鎖を持ったジ置換アミノ酸を合成する(図2)。また、このジ置換アミノ酸を含有するペプチドを合成する。合成したペプチドの溶液中および結晶状態での二次構造解析を行い、還元環境に応答してヘリックスもしくはシート構造から、プラナーもしくはランダム構造へとペプチド二次構造が変化しているかを明らかにする(図3)。また、実際に細胞内でも還元環境に応答して構造が変化しているかを明らかにするとともに、構造変化に伴い効果的な薬物放出を達成するシステムを構築する。

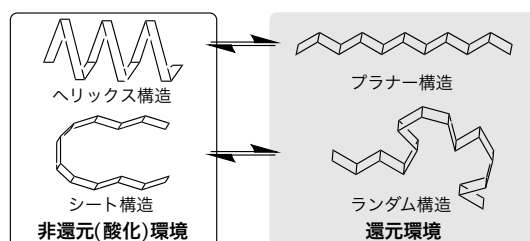


図3. 還元環境に応答したペプチド二次構造の変化

4. 研究成果

(1) ジ置換アミノ酸の合成

側鎖にSS結合を有する七員環状ジ置換アミノ酸($\text{Ac}_7\text{c}^{\text{SS}}$)の合成に関して、種々の反応ルートについて検討した。その結果、全4工程にて、目的とする $\text{Ac}_7\text{c}^{\text{SS}}$ を良好な収率で合成することができた。また、SS結合が還元環境に応答して開裂し、環状から鎖状へと変化しているかを精査した。 ^1H NMRスペクトルにより経時変化を追跡したところ、細胞内を模倣した還元環境条件下、時間とともに徐々に構造が変化していることを明らかにした(図4)。また、空気雰囲気下、鎖状ジ置換アミノ酸溶液を静置しておくも環状ジ置換アミノ酸 $\text{Ac}_7\text{c}^{\text{SS}}$ へと変化し、その構造変化が可逆的であることも確認できた。

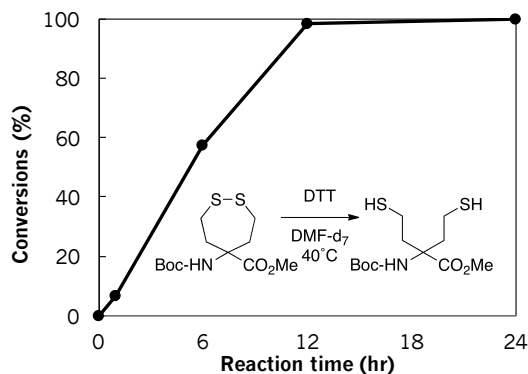


図4. 還元環境下における溶液中でのアミノ酸側鎖構造の経時変化

(2) ペプチドの合成

今回設計・合成した Ac_7c^{SS} 、環状ジ置換アミノ酸のコントロールとして安定な七員環状側鎖構造を有する Ac_7c 、鎖状ジ置換アミノ酸のコントロールとして側鎖にプロピル基を2つ有する Dpg 、3種類それぞれを含有するペプチドの合成を行った。具体的には、L-ロイシンからなるペプチドにジ置換アミノ酸を2残基導入したオクタペプチドである(図5)。合成は液相法により行い、N末端はBoc、C末端はメチルエステル保護した。

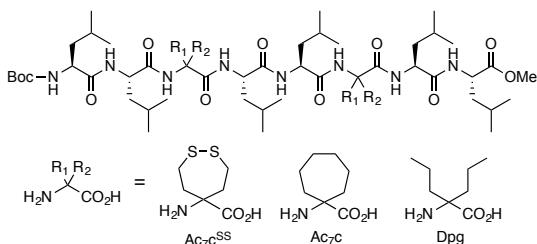


図5. 今回使用したジ置換アミノ酸とその含有ペプチドの構造

(3) ペプチド二次構造解析

1H NMR・FT-IR・CD スペクトル測定による溶液中、X線結晶構造解析による結晶状態におけるペプチドの二次構造解析を行った。 Ac_7c^{SS} を含有するペプチドは、還元環境にตอบสนองして溶液中での二次構造が変化することがわかった。これは、ジ置換アミノ酸の側鎖構造が環状から鎖状へと変化していることに起因するものであった(図6)。しかしながら、当初期待していたような、ヘリックス構造からランダム構造のような明確なペプチド二次構造の変化は見られなかった。また、コントロールとして合成した Ac_7c と Dpg をそれぞれ含有した2種類のペプチドの二次構造には大きな違いは見られなかった(図7)。すなわち、側鎖の炭素数が同じで、環状と鎖状の違いのみでは、今回合成したペプチドの二次構造に変化をもたらすことはできなかった。これらの結果より、環状→鎖状の側鎖構造の変化だけではペプチド二次構造の制御は難しく、官能基の有無もしくは親・疎水性の変化が、ペプチド二次構造に与える影響が大きいことが明らかになった。

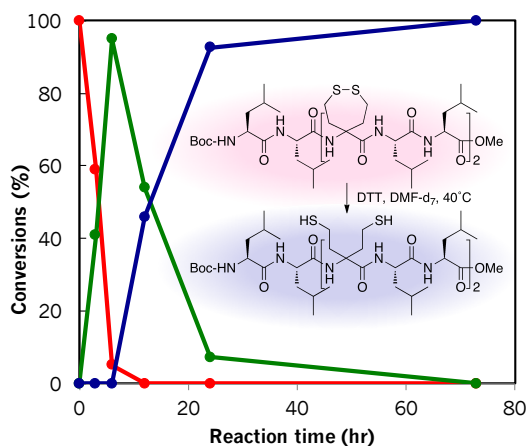


図6. Ac_7c^{SS} 含有ペプチドの還元環境にตอบสนองした側鎖構造の変化(赤： Ac_7c^{SS} 2残基；緑： Ac_7c^{SS} 1残基；青： Ac_7c^{SS} 0残基)

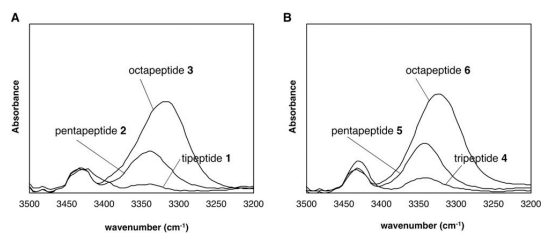


図7. FT-IR スペクトル A: Dpg 含有ペプチド B: Ac_7c 含有ペプチド

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Takuma Kato, Masakazu Tanaka, Makoto Oba, Protein transfection study using multicellular tumor spheroids of human hepatoma Huh-7 cells, PLoS ONE, 査読有, Vol. 8, 2013, e82876. DOI: 10.1371/journal.pone.0082876
- ② Makoto Oba, Hikaru Nonaka, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka, Conformational studies on peptides having dipropyl glycine (Dpg) or 1-aminocycloheptane carboxylic acid (Ac_7c) within the sequence of L-leucine (Leu) residues, Biopolymers (Pept. Sci.), 査読有, Vol. 106, 2016, 210-218. DOI: 10.1002/bip.22810

[学会発表] (計6件)

- ① 農中ひかる, 土井光暢, 大庭 誠, 田中正一, 環境変化にตอบสนองして側鎖構造を変化させるジ置換アミノ酸とその含有ペプチドの合成, 日本薬学会第135年会, 神戸学院大学(兵庫県・神戸市), 2015年3月25日~28日.
- ② 農中ひかる, 土井光暢, 大庭 誠, 田中正一, 環境変化にตอบสนองして側鎖構造を変化させるジ置換アミノ酸とその含有ペプチドの合成および構造解析, 日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会, 東北大学(宮城県・仙台市), 2015年6月10日~12日.
- ③ 農中ひかる, 土井光暢, 大庭 誠, 田中正一, 酸化・還元反応にตอบสนองして側鎖構造を変化させるジ置換アミノ酸の合成, 第39回有機電子移動化学討論会, 長崎大学(長崎県・長崎市), 2015年6月25日~26日.
- ④ Hikaru Nonaka, Makoto Oba, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka, Synthesis of peptides having an α, α -disubstituted amino acid with a variable side chain structure, 第52回ペプチド討論会, 平塚中央公民館(神奈川県・平塚市), 2015年11月16日~18日.

- ⑤ 農中ひかる, 土井光暢, 大庭 誠, 田中正一, 還元反応に応答して側鎖構造を変化させるジ置換アミノ酸の合成とその含有ペプチドの二次構造解析, 第 32 回日本薬学会九州支部大会, 九州保健福祉大学(宮崎県・延岡市), 2015 年 11 月 28 日～29 日.
- ⑥ Makoto Oba, Hikaru Nounaka, Kaori Furukawa, Kotomi Toyama, Masakazu Tanaka, Environmentally-responsive cyclic α, α -disubstituted α -amino acids for controlling peptide secondary structures, Pacificchem 2015 (Honolulu, Hawaii, USA), 2015 年 12 月 15 日～20 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/biomic/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大庭 誠 (OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・
准教授

研究者番号：20396716