

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：37102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08381

研究課題名(和文) 側鎖間架橋ヘリカルペプチドの完成形の構築

研究課題名(英文) Development of cross-linked, helical peptides in final form

研究代表者

藤本 和久 (FUJIMOTO, KAZUHISA)

九州産業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：40334718

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)：1) 酵素耐性の向上；側鎖間架橋ヘリカルペプチドのアミノ末端に数残基のD-アミノ酸を導入するとエンドペプチダーゼに対する耐性が著しく向上した。これまでと同様にアポトーシス誘導能を評価するとD-アミノ酸導入以前と比較して大きく改善された。
2) 膜透過性に対する検証；細胞壁を有する酵母に対してもエンドサイトーシスを経由して、側鎖間架橋ヘリカルペプチドが取り込まれることが明らかになった。
3) ペプチド骨格を利用した新規機能性分子の開発；光活性化基であるソラレンをペプチド側鎖に導入することにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アミノ酸導入による酵素耐性の向上は、その手法のシンプルさが故に酵素耐性向上のためのモデルケースとなる可能性がある。単にD-アミノ酸をペプチド配列に加え、連結するだけで達成できるという簡便さが非常に重要である。酵母における膜透過性に関しては、今後の展開次第であるが、ペプチドの膜透過性の根幹となる知見に繋がる可能性を秘めている。
光活性化基であるソラレンを組み込んだペプチド分子は、G4との結合力次第では医薬品への展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：1) Improvement of the stability of cross-linked, helical peptide against exopeptidases; Introduction of a few D-amino acid residues into the N-terminus of cross-linked, helical peptides not only improved their stabilities against exopeptidases but also enhanced their abilities for inducing apoptosis in cell.
2) investigation of the cell permeability of cross-linked, helical peptides; The cross-linked, helical peptides were incorporated into budding yeasts by endocytosis irrespective of the presence of cell walls.
3) Development of a new class of peptide-based functional molecules; We are going to synthesize psoralen-modified peptides.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：架橋ペプチド ヘリックス 酵素耐性 膜透過性 酵母 ソラレン

1. 研究開始当初の背景

2017年当時、ペプチドリームという一部上場企業が非常に大きな注目を集めていることでわかるように創薬分野におけるペプチドの存在がクローズアップされた時期である。2021年現在においてもその重要性は変わることなく、むしろ増大していると言える。

ペプチドは、タンパクほど分子量が大きくなく、化学修飾や扱いが比較的容易であり、合成小分子ではほぼ不可能とされるタンパク-タンパク間相互作用を制御できるというメリットがある。それゆえ、標的タンパクの機能を制御可能な分子標的薬としての利用が期待される。これを実現するためには主に三つの課題が存在し、 α -ヘリックス構造をはじめとする高次構造の保持、細胞膜の透過性、ならびに酵素耐性の向上であった。に関しては、我々によるクロスリンク剤を用いてペプチド側鎖間を架橋することによる α -ヘリックス構造の安定化や G. L. Verdine らによるオレフィンメタセシスを利用した“Stapled Peptide”の開発によって克服されていた。に関しては、二木(京大化研)らによって Tat ペプチドをはじめとするアルギニン(Arg)リッチ配列がペプチドの膜透過性に大きく寄与していることが報告されていた。一方、我々による側鎖間架橋ヘリカルペプチドや Stapled Peptide は、Arg 残基が存在しなくても、膜透過性を示し、機能を発現する。この膜透過性が架橋部位の疎水性に起因しているのか、それとも安定な α -ヘリックス構造に起因しているのかは、現時点でも明らかになっていない。このことに加えて興味深いのが、 α -ヘリックス構造の酵素耐性であった。我々はアポトーシス関連タンパクである Bad の α -ヘリックスドメインをモチーフとした側鎖間架橋ヘリカルペプチドを合成し、これを HeLa 細胞の培地に加えるとアポトーシスが誘導されることを報告していた。このペプチドはエンドサイトーシスにより細胞内に入り、後期エンドソーム(もしくはリソソーム)を經由して、ミトコンドリア表面に存在する Bcl-X_L に結合し、アポトーシスを誘導する。側鎖間架橋ヘリカルペプチドは、*in vitro* でトリプシンやキモトリプシンに対してある程度の耐性を示すことから、上記の結果は細胞内に存在する酵素の攻撃に耐えたことを示唆していた。ところが、実際にアポトーシスを誘導するためには、側鎖間架橋ヘリカルペプチドを最低でも 5 μ M 程度添加する必要があり、*in vitro* で評価した Bcl-X_L との解離定数(nM レベル)とは大きな乖離があった。この大きな乖離は、側鎖間架橋ヘリカルペプチドの細胞膜透過能と酵素耐性に起因していると考えられた。創薬へと展開するためには有効濃度を少なくとも sub- μ M レベルに引き下げる必要があり、そのためには側鎖間架橋ヘリカルペプチドの細胞膜透過能と酵素耐性の双方の向上が必要不可欠であった。そこで本研究において、これらを達成するために側鎖間架橋ヘリカルペプチドの化学的改変を多角的視点から行い、側鎖間架橋ヘリカルペプチドの完成形を構築することを目指すことになった。

2. 研究の目的

側鎖間架橋ヘリカルペプチドに種々の化学的改変を施し、細胞膜透過性において何が重要なのか、酵素耐性を向上させるためには何が重要なのかを検証し、明らかにすることを目的とする。得られた知見をもとに、すでに実績のある Bad をモチーフとした側鎖間架橋ヘリカルペプチドを設計、合成し、有効濃度が sub- μ M となる側鎖間架橋ヘリカルペプチドの完成形を構築するために研究を行った。本研究を遂行している過程で新たな知見を見出したので、それを基に残りの期間の研究を遂行することにした(3. 研究の方法、4. 研究成果を参照)。

3. 研究の方法

側鎖間架橋ヘリカルペプチドを創薬へと展開するには、細胞膜透過性と酵素耐性の向上が必要不可欠であると考えた。まず酵素耐性の向上のための化学的改変を行うことにした。

酵素耐性の向上

それまでに合成した側鎖間架橋ヘリカルペプチドの酵素耐性を順次に評価した。各種エキソペプチダーゼ(タンパクやペプチドの末端のアミノ酸を切り取る)、エンドペプチダーゼ(タンパクやペプチドの内部を切断する)を様々な pH で使用することで(後期エンドソームやリソソーム内は酸性環境)、側鎖間架橋ヘリカルペプチドの酵素耐性を調べた。側鎖間架橋ヘリカルペプチドは、トリプシンをはじめとするエンドペプチダーゼに対しては比較的高い耐性を示す。おそらく、高いヘリックス含有率と架橋部位の存在が寄与していると考えられる。そこで、エキソペプチダーゼへの耐性を向上させるために D アミノ酸を側鎖間架橋ヘリカルペプチドの末端に導入した。天然に存在するのはほとんどが L アミノ酸であり、D アミノ酸からなるペプチドは酵素による分解を受けない。実際、D アミノ酸のみからなる側鎖間架橋ヘリカルペプチドはほぼ完全な酵素耐性を示し、側鎖間架橋ヘリカルペプチドの一部に D アミノ酸を導入した場合においても相当の効果を示すことが分かっていた。末端に1、2残基程度の D アミノ酸を導入するのであれば、ヘリックス含有率や相互作用部位に与える影響は最小限に抑えることができるはずである。また、あまり多くの D アミノ酸を導入すると、代謝されなくなる危険性があり、薬剤として好ましくないことから数残基程度が最適であると考えた。酵素耐性の評価は、主に HPLC を用いて行った。D アミノ酸を末端に有する側鎖間架橋ヘリカルペプチドを用

いて、これまでと同様にアポトーシスを誘導させることでペプチドの機能評価を行った。

膜透過性に対する検証

酵素耐性の向上がほぼ確立されたこともあり、膜透過性に対する検証を行うことにした。通常の生細胞で詳細を調べることは非常に困難を極めると考え、細胞分裂が極めて速い酵母を用いて実験を行うことにした。研究開始当初想定していた側鎖間架橋ヘリカルペプチドに対する化学修飾は、研究の進捗状況や今後の展開を鑑みた結果、行わなかった。

ペプチド骨格を利用した新規機能性分子の開発

側鎖間架橋ヘリカルペプチドに更なる化学修飾を行わなかったのは、側鎖間架橋ヘリカルペプチドがある程度の完成形に至ったと考えたためである。そこでこれまでの知見を活かし、ペプチド鎖を骨格とする機能性分子の創成に着手した。具体的には、ペプチド側鎖に光活性化基で知られるソラレン骨格を導入するというものである。現在も合成中であり、将来的には核酸用クロスリンク剤、テロメア領域に存在する G4 に対するバインダーとして展開していく予定である。

4. 研究成果

酵素耐性の向上

これまでに開発していた側鎖間架橋ヘリカルペプチドは、エンドペプチダーゼに対しては十分な耐性を示すことがわかった。側鎖間架橋ヘリカルペプチドのアミノ末端はアセチルキャッピングしていることに加え、架橋部位が存在するので酵素耐性は十分にあると考えた。そこでカルボキシ末端に D-アミノ酸を導入した。3-4 個程度の D-アミノ酸の存在で最大限の効果、すなわち酵素耐性が達成されることがわかった。当初想定した通り、細胞内においてもアポトーシス誘導能が向上した。この結果は、従来の側鎖間架橋ヘリカルペプチドが酵素による代謝を受けているため、*in vitro* での結果に相当するような結果をもたらせなかったことを示唆している。

膜透過性に対する実験

酵母を用いて膜透過性の検証を試みたのは、酵母の遺伝子がほぼ解析済みである点にある。ほぼ全ての遺伝子の役割が明らかになっている酵母においては、遺伝子制御を比較的容易に行うことができる。膜透過性を検証する際、膜透過に関与している遺伝子操作を行えば、今まで見れなかった知見を見いだせると考えた。しかしながら酵母には細胞壁が存在するという問題があり、側鎖間架橋ヘリカルペプチドが細胞膜を透過できないのではないかと危惧された。実際に用いた出芽酵母においてもエンドサイトーシスにより側鎖間架橋ヘリカルペプチドが酵母内に取り込まれることがわかった。残念ながら膜透過に対する詳細は明らかになっていない。もう一つ興味深いのは、酵母の液胞に対する染色剤と側鎖間架橋ヘリカルペプチドを共存させると側鎖間架橋ヘリカルペプチドが液胞に局在するというものである。この事実に対しては機構とは明らかになっていない。

ペプチド骨格を利用した新規機能性分子の開発

ペプチドの膜透過性に関しては、膜内にはどのようなものでも取り込まれるが、後期エンドソームやリソソームから脱出することなく代謝を受けるか、もしくはエキソサイトーシスによって吐き出されていると我々は考えている。現時点で、どのような場合に後期エンドソームやリソソームからペプチドが脱出できるのかは明らかでない。その点は非常に大きな問題ではあるが、光活性化基を側鎖に導入したペプチドを合成すれば、細胞内で機能させることができると期待した。現時点で、ソラレンをペプチド鎖に連結する段階まで合成が完了している。合成できた暁には、まず G4 との結合や光反応を検証する予定である。

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 0件）

1. 著者名 Shuma Kaneyoshi Tingting Zou Shunsuke Ozaki Ryusuke Takeuchi Ayano Udou Takumi Nakahara Kazuhisa Fujimoto Satoshi Fujii Shinobu Sato Shigeori Takenaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Cyclic Naphthalene Diimide with a Ferrocene Moiety as a Redox Active Tetraplex DNA Ligand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 139-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201903883	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 Nogami Kagayaki, Tokumaru Hiroshi, Isokawa Gouchi, Oyoshi Takanori, Fujimoto Kazuhisa, Inouye Masahiko	4. 巻 53
2. 論文標題 Bcl-XL-binding helical peptides possessing d-Ala residues at their C-termini with the advantage of long-lasting intracellular stabilities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12104 ~ 12107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CC06904A	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 Ikumi Sakaguchii, Toshiaki Fukasawa, Fujimoto Kazuhisa, Inouye Masahiko	4. 巻 47
2. 論文標題 Immobilization of Crosslinked Peptides that Possess High Helical Contents and Their Binding to Target DNAs on Au Surfaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 365 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.171153	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金好 秀馬・藤本 和久・佐藤 しのぶ・竹中 繁織
2. 発表標題 電気化学がん診断試薬としての新規環状フェロセン化ナフタレンジイミドの設計
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshizawa A., Fujimoto K, Matsumoto S, Shiro M, Inouye M.
2. 発表標題 [3]Rotaxanes consisting of an alkynylpyrene and two permethyl -CDs as an extremely photo-stable fluorophore
3. 学会等名 3rd International Symposium on Center of Excellence for Innovative Material Sciences Based on Supramolecules
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 由澤敦史、藤本和久、佐方拓馬、松本真哉、城始勇、井上将彦
2. 発表標題 分子被覆により高い光耐久性を有する[3]ロタキサン型蛍光色素の合成
3. 学会等名 第34回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 由澤敦史、藤本和久、佐方拓馬、松本真哉、城始勇、井上将彦
2. 発表標題 シクロデキストリンでの被覆を利用した高光耐久性ロタキサン型蛍光色素の開発
3. 学会等名 第7回CSJ化学フェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 由澤敦史、藤本和久、松本真哉、城始勇、井上将彦
2. 発表標題 シクロデキストリンによる包接を利用した超耐光性蛍光色素の開発とその生体分子標識への応用
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会
4. 発表年 2017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
---------	---------