

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750138

研究課題名 (和文) 安定なヘリックス構造を分子部品とする機能性ペプチドの開発

研究課題名 (英文) Development of functional peptides based on stable helical structures

研究代表者

藤本 和久 (FUJIMOTO KAZUHISA)

富山大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：40334718

研究成果の概要：安定なヘリックス構造を構築する手法を用いて、三種類の機能性ペプチドを開発した。

① 外部刺激応答性分子を骨格とするクロスリンク剤で架橋したペプチド

② 末端にチオール残基を有するクロスリンク剤で架橋したペプチド

③ アミノ末端側を蛍光色素でラベル化した架橋ペプチド

①においては、フェロセンを骨格とするクロスリンク剤によるヘリックス構造の制御に成功した。②・③においては、DNA と相互作用するタンパクの α -ヘリックス領域をもとにこれら架橋ペプチドを合成し、DNA との相互作用を評価した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能利用、生体分子、ペプチド、二次構造、 α -ヘリックス、構造制御

1. 研究開始当初の背景

原子レベルで、もしくは分子レベルで自由自在に化合物の構造を制御することは、科学者の窮極的な目標であり、分子機械 (Molecular Machine) の創製や、今までにない機能性材料の開発へとつながる。多彩な構造・機能を発現している最も身近な例に「タンパク質」がある。その多彩な機能発現は、高次構造に依存している。高次構造は二

次構造が集積されることで形成され、最も一般的な二次構造として α -ヘリックス構造がある。 α -ヘリックス構造の1ピッチのラセンは3.6残基のアミノ酸で形成され、側鎖が一定の間隔、かつ同一方向に配向している。この事実は、ヘリックス構造を有するペプチド鎖の側鎖に機能部位を導入することで、ヘリックス構造の狙った位置に機能部位を配置させ、配向させることができることを意味する。つまり、ヘリックス構造を“分子部品”

として用いることで、多彩な機能を発現する機能性分子へと展開できると考えた。

そこで本若手研究において、本研究代表者が既に開発済みのクロスリンク剤による α -ヘリックス構造の安定化の手法を基に (*Chemical Communications*, **2004**, 1280–1281)、安定なヘリックス構造を分子部品とする機能性ペプチドの開発を目指すことにした。本研究代表者は、本若手研究を開始する以前において光応答性クロスリンク剤を用いた光による α -ヘリックス構造を制御に成功している (*Organic Letters*, **2006**, 8, 285–287)。このように機能性クロスリンク剤で短鎖ペプチドを架橋するか、架橋部位とは重ならない位置の側鎖に機能部位を導入することで、狙った機能性ペプチドを構築できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の最大の目的は、非常に単純な骨格の分子部品を基に機能性分子を創製することにある。なぜなら、単純な骨格は他の研究者の利用を促進させ、そこから汎用性・一般性が生まれると考えるからである。クロスリンク剤で架橋することで安定なヘリックス構造を有するペプチドは、そのような目的を体現できる最も有力な分子の一つである。その理由として以下のようなことがあげられる。

- 1) 規定された構造 (α -ヘリックス構造) をプラットフォームとしているので、構造の拡張ならびに機能の付与が比較的容易
- 2) 分子量が数千程度であり、タンパクに比べ扱いが容易で量の確保も可能
- 3) 安定なヘリックス構造を保持しているので、タンパクの代用品としての応用
- 4) 生体機能関連における応用のみならず、規定された構造をもとに機能性材料への応用も可能

安定な α -ヘリックス構造を有するペプチドを骨格とすることで、生体機能関連に加え材料科学での応用を目指して機能性ペプチドを開発する。

3. 研究の方法

架橋ヘリカルペプチドへの機能導入部位として、1) 架橋部位以外のアミノ酸残基の側鎖、2) クロスリンク剤骨格、3) ペプチドのアミノ末端 が考えられる。そこで、以下に示すような機能性ペプチドを合成することにした。図1に安定なヘリックス構造を有する架橋ペプチド鎖における側鎖の配向を示す。

- ① 外部刺激応答性分子を骨格とするクロスリンク剤で架橋したペプチド (ヘリックス構造を光等の外部刺激で制御するため)
- ② 末端にチオール残基を有するクロスリンク剤で架橋したペプチド (金基板に固定化するため)
- ③ アミノ末端側を蛍光色素でラベル化した架橋ペプチド (生体分子との相互作用を蛍光で解析するため)

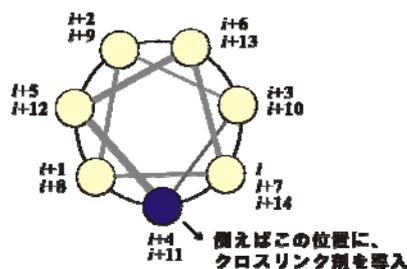


図1 架橋ヘリカルペプチドにおける側鎖の配向

4. 研究成果

以下に、本研究期間に達成した成果について記す。

- 1) 安定なヘリックス構造を構築するための一般的な手法の確立
アセチレン、ジアセチレン、ベンゼン、ナフタレンといったある程度の堅さを持った分子を骨格とする種々のクロスリンク剤を開発した。これらクロスリンク剤を用いて様々な配列の短鎖ペプチドの側鎖間を架橋することで、その配列に関係なく α -ヘリックス構造を安定化できることがわかった (図2)。さらに、HIV-1に含まれる配列をもとに安定なヘリックス構造を有するヘリカルペプチドの構築にも成功した。



図2 ジアセチレンを骨格とするクロスリンク剤による α -ヘリックス構造の安定化

- 2) 外部刺激応答性分子を骨格とするクロスリンク剤で架橋したペプチド
酸化還元活性種であるフェロセンや光異性化色素であるジアリールエテンを骨格とするクロスリンク剤を開発した (図3)。これらクロスリンク剤で短鎖ペプチドのアミノ末端側で架橋すると、その α -ヘリックス構造が安定化された。フェロセンの場合、酸化剤や還元剤を加えることで α -ヘリックス構造を可

逆的に制御することができた。ジアリールエテンの場合、紫外光・可視光照射によって α -ヘリックス構造制御を可逆的に繰り返し行えることがわかった。

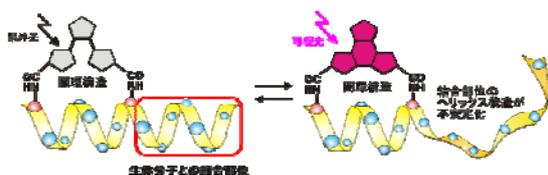
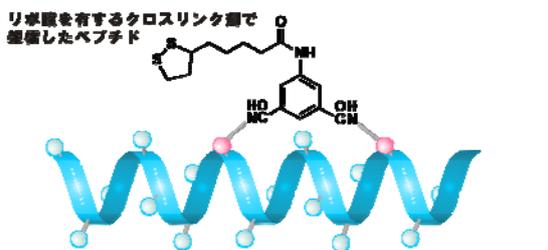


図3 ジアリールエテン架橋ヘリカルペプチドとそのヘリックス構造の光による制御

3) 末端にチオール残基を有するクロスリンク剤で架橋したペプチド

架橋ペプチドを金基板上に固定化するために、イソフタル酸からなるクロスリンク剤に末端チオール基を有する置換基を導入した(図4)。チオール導入型クロスリンク剤で短鎖ペプチドを架橋するとその α -ヘリックス構造が安定化されることがわかった。この架橋ペプチドの溶液を金基板上に塗布することで、架橋ペプチドが金基板上に化学吸着することを電気化学測定により確認した。この結果より、ペプチドチップへの展開が期待できる。



Ac-(Ala)₂-Glu-Ala-Trp-Ala-Om-Ala-Glu-(Ala)₂-Glu-Ala-Om-(Ala)₂-NH₂
図4 金基板固定用架橋ヘリカルペプチド

4) アミノ末端側を蛍光色素でラベル化した架橋ペプチド

他の生体分子との相互作用を蛍光で調べるために、架橋ペプチドの末端にペリレンを導入した。DNA と相互作用可能な配列を基に蛍光架橋ペプチドを合成し、それと DNA との相互作用を蛍光や蛍光偏光で評価した。その結果、架橋ペプチドが非架橋ペプチドに比べて極めて強力に相互作用することが明らかとなった。

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2件)

- ① Kazuhisa Fujimoto, Hirokazu Kawai, Miwo Amano, and Masahiko Inouye; Redox

Regulation of Helical Structures in Short Peptides with an Intramolecular Ferrocenyl Cross-linking Agents, *J. Org. Chem.*, 73 巻, 5123–5126, 2008 年, 査読有.

- ② Kazuhisa Fujimoto, Masaoki Kajino, and Masahiko Inouye; Development of a Series of Cross-Linking Agents that Effectively Stabilize α -Helical Structures in Various Short Peptides, *Chem. –Eur. J.*, 14 巻, 857–863, 2008 年, 査読有.

[学会発表] (計17件)

- ① 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、様々な配列を持つ蛍光ラベル化ヘリカルペプチドの構築と生体分子との相互作用、日本化学会第 89 春季年会、2009. 3. 27、日本大学船橋キャンパス。
- ② 河合博和・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテン架橋ペプチド-DNA 間相互作用の光制御、日本化学会第 89 春季年会、2009. 3. 27、日本大学船橋キャンパス。
- ③ 藤本和久・梶野雅起・井上将彦、短鎖ヘリカルペプチドの蛍光標識化、日本薬学会北陸支部第 119 回例会、2008. 11. 9、北陸大学。
- ④ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、アミノ末端で蛍光標識されたヘリカルペプチドの開発、平成 20 年度有機合成化学北陸セミナー、2008. 10. 10、港のホテル(福井県坂井市)。
- ⑤ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、様々な蛍光分子で修飾したヘリカルペプチドの開発、第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008. 9. 18-20、東京工業大学すずかけ台キャンパス。
- ⑥ 河合博和・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテンで架橋した短鎖ペプチドのヘリックス構造の光制御、2008 年光化学討論会、2008. 9. 11、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス。
- ⑦ 岡田洋平・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテン骨格を有する非天然アミノ酸の合成、第 20 回生体機能関連化学若手の会サマースクール、2008. 8. 6、小原温泉 かつらや(宮城県白石市)。
- ⑧ 深澤聡晃・藤本和久・井上将彦、安定なヘリックス構造を有する短鎖ペプチドの基板上への固定化、第 20 回生体機能関連化学若手の会サマースクール、2008. 8. 6、小原温泉 かつらや(宮城県白石市)。
- ⑨ 河合博和・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテンの光異性化を利用したペプチドの二次構造制御、ケミカルバイオロジ

一研究会第3回年会、2008.5.19-20、学術総合センター（東京都千代田区）。

- ⑩ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、蛍光ラベル化された安定な α -ヘリックス構造を有する架橋ペプチドの開発、ケミカルバイオロジー研究会第3回年会、2008.5.19-20、学術総合センター（東京都千代田区）。
- ⑪ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、安定なヘリックス構造を有する短鎖ペプチドの蛍光ラベル化、日本化学会第88春季年会、2008.3.29、立教大学池袋キャンパス。
- ⑫ 河合博和・藤本和久・井上将彦、ジアルールエテン骨格で架橋した短鎖ペプチドの α -ヘリックスの光制御、日本化学会第88春季年会、2008.3.29、立教大学池袋キャンパス。
- ⑬ 藤本和久・河合博和・井上将彦、ジアルールエテン・スピロピランを利用した短鎖ペプチドの α -ヘリックス構造の制御、第1回有機フォトクロミズムシンポジウム、2007.11.16、東京大学山上会館。
- ⑭ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、生体分子の制御を目指した短鎖ペプチドの高効率 α -ヘリックス化、第21回生体機能関連化学シンポジウム、2007.9.29、東北大学多元物質科学研究所。
- ⑮ 河合博和・藤本和久・井上将彦、フォトクロミック分子により架橋した短鎖ペプチドの光による二次構造制御、2007年光化学討論会、2007.9.27、信州大学松本キャンパス。
- ⑯ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、様々な短鎖ペプチドのヘリックス構造を安定化するクロスリンク剤の開発、ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007.5.10、京都大学時計台記念館。
- ⑰ 河合博和・藤本和久・井上将彦、フェロセンにより架橋したペプチド鎖の酸化還元による高次構造制御、ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007.5.10、京都大学時計台記念館。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/yakka/index-j.html>（研究室ホームページ）

http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=200901013658317736&t=1&d=1&q=10

00370583 (ReaD 研究者情報)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 和久 (FUJIMOTO KAZUHISA)
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：40334718

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし