

平成23年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750167

研究課題名 (和文) 短鎖ヘリカルペプチドを骨格とするタンパク間相互作用阻害剤の開発

研究課題名 (英文) Development of inhibitors based on short helical peptides for protein-protein interactions

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 (和文) : 安定なヘリックス構造を構築する手法を用いて、生体分子間相互作用に関係するタンパクの相互作用部位を基に短鎖ヘリカルペプチドを開発した。転写因子の一つである Homeodomain の DNA 結合ドメインをもとに合成した短鎖ヘリカルペプチドは非常に強い結合能を有し、その基質特異性はオリジナルのタンパクに匹敵することがわかった。

研究成果の概要 (英文) : I explored the effect of α -helical stabilization upon the binding of short peptides to DNAs. When a cross-linked peptide based on the homeodomain of transcription factor was titrated with a target DNA duplex, its dissociation constant (K_d) was calculated to be ca. 0.5 nM. This value was the double-digit smaller than that of the corresponding non-cross-linked peptide. The cross-linked peptide showed high substrate specificity for DNAs at the same level as the original DNA-binding protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成22年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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： α -ヘリックス、タンパク間相互作用、阻害剤、生体高分子

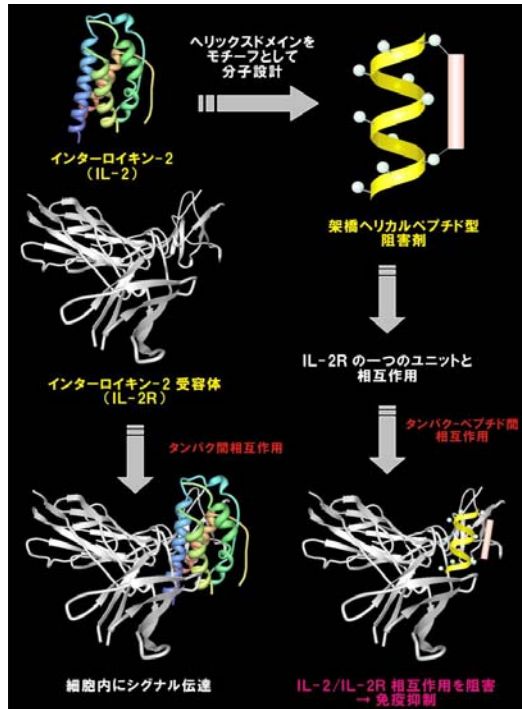
1. 研究開始当初の背景

医薬品開発を過去 (第一世代)・現在 (第二世代)・未来 (第三世代) に分けて考えると、第一世代医薬品は酵素の活性阻害、第二世代医薬品は膜タンパクの活性阻害を目指して開発が行われてきた。酵素や膜タンパクのリガンドの多くが有機小分子であるので、分子量が1,000以下の小分子で活性を十分に

阻害することができる。しかしながら、酵素や膜タンパクに対する阻害剤だけでは手に負えない難治疾患が未だ数多く存在する。そこで第三世代医薬品においては、タンパク間相互作用の阻害が標的になると考えられている。生体の動的機能は複数のタンパクが関与する連鎖反応によって維持されているので、強力なタンパク間相互作用阻害剤は難治疾患の医薬品として期待できる。しかしなが

ら、有機小分子レベルでタンパク間相互作用に対する阻害剤を設計・合成することは極めて難しい。一方、巨大分子であるタンパクそのものをベースとした阻害剤の開発は、その分子サイズに加えてフォールディングや化学修飾の問題があるため容易でない。仮に阻害剤を開発できたとしても、量の確保に問題があり、医薬品としての展開は現実的でない。これらの点を踏まえると、タンパク間相互作用の阻害には、一方のタンパクの相互作用ドメインをペプチドに置き換えて阻害剤とする手法が有望である。強力なペプチドベースの阻害剤の開発には、阻害剤のペプチド骨格がオリジナルのタンパク内で形成している高次構造を取っていることが望ましい。これは、ホスト・ゲスト化学における事前組織化 (preorganization) の概念に相当する。しかしながら、タンパクからドメイン配列を抽出し、別途ペプチド鎖を合成しても、二・三の例外を除いてそのほとんどはランダムコイル構造を形成する。

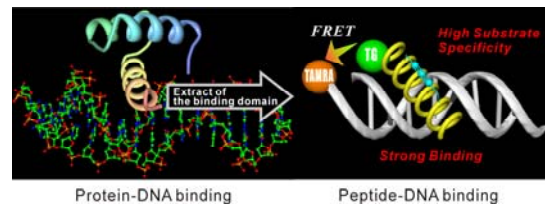
そこで本研究においては、当該研究者がこれまでに確立した α -ヘリックス構造の安定化手法 (Chem. Commun., 2004, 1280-1281, Chem. -Eur. J., 2008, 14, 857-863) を用いて、タンパクの結合ドメインを基に短鎖ヘリカルペプチドを合成し、このタンパク間相互作用阻害剤としての可能性を探ることとした (図1)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、クロスリンク剤によって

架橋された安定なヘリカルペプチドがタンパク間相互作用の阻害剤になりうるかを評価することにある。まず、相互作用の評価が比較的容易であるタンパク-DNA 間相互作用を標的とし、そのタンパクの結合ドメインを基にした架橋ペプチドを作成することにした。続いて、架橋ペプチド-DNA 間の相互作用の強さを定量的に評価し、その基質特異性に関しても調べることにした (図2)。



3. 研究の方法

転写因子である Homeodomain ならびに HNF-3 γ の結合ドメインを基に架橋ペプチドを合成した (図3)。架橋剤として、ジアセチレンを骨格とする **1**、ベンゼンを骨格とする **2** を用いた。結合を定量的に評価するために、ペプチドを Tokyo Green (TG) で DNA を TAMRA で蛍光標識した。蛍光による定量評価は、蛍光エネルギー共鳴移動 (FRET) を利用した。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いて結合を評価した。

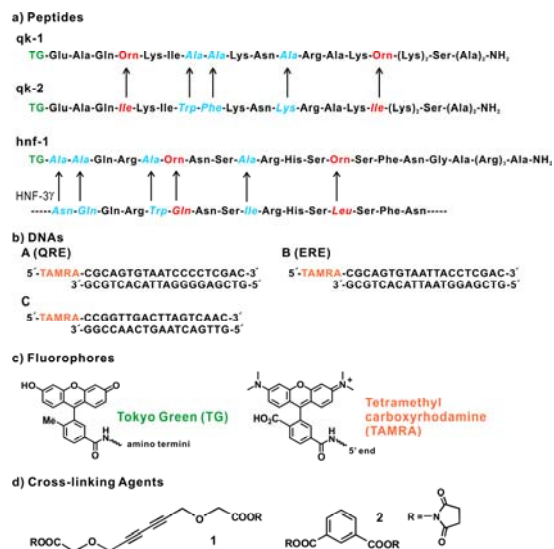


図3 a) 用いたペプチドの配列、b) 用いた DNA の配列、c) 蛍光ラベル化剤の構造式、d) クロスリンク剤の構造式

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) 架橋ペプチドと DNA との結合能

図 3 に示した Homeodomain の結合ドメインを基に設計・合成した架橋ペプチド **qk-1^{Δ1}** (クロスリンク剤 **1** で架橋) を DNA A (QRE) で滴定した (図 4)。FERT を利用して解析を行った結果、解離定数が 0.5 nM と非常に強く、非架橋のペプチドの解離定数 (約 30 nM) と比べると架橋によるヘリックスの安定化が解離定数に大きく寄与することがわかった。これらの傾向は、表面プラズモン共鳴 (SPR) による評価からも支持された。

また、別の転写因子である HNF-3 γ の結合ドメインを基に合成した架橋ペプチド **hnf-1^{Δ2}** (クロスリンク剤 **2** で架橋) も非架橋ペプチドに比べて、強く DNA に結合することが明らかになった。

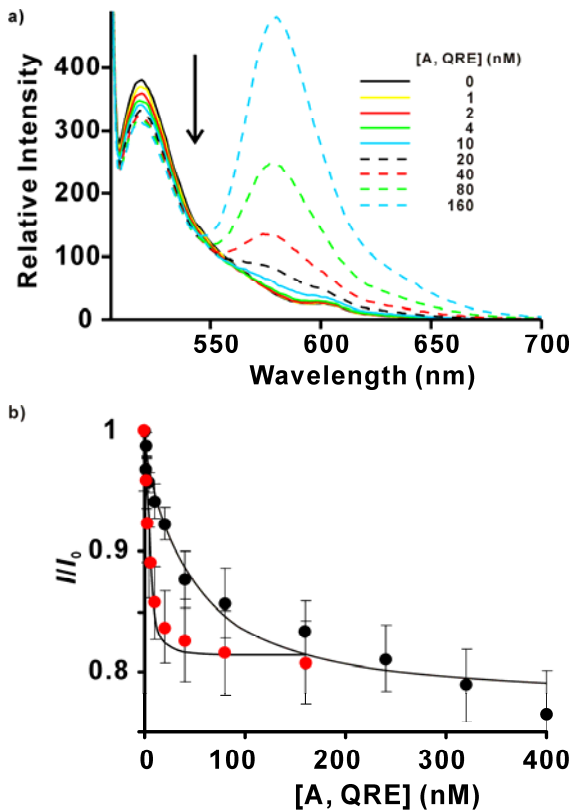


図 4 a) DNA A (QRE) を加えていった際の架橋ペプチド **qk-1^{Δ1}** の蛍光スペクトル変化、b) 架橋ペプチド **qk-1^{Δ1}** と非架橋ペプチド **qk-1** の結合等温曲線

2) 架橋ペプチドの DNA に対する基質特異性

架橋ペプチド **qk-1^{Δ1}** ならびに非架橋ペプチド **qk-1** の DNA 基質特異性を調べた。前項で述べた DNA A (QRE) とは異なる結合部位の配列の DNA B (ERE) を用いて同様の滴定実験を行ったところ、架橋ペプチドにおいてオリジ

ナルのタンパクに匹敵する基質特異性を示すことがわかった (表 1)。

表 1 DNA に対する架橋ペプチド、ならびに非架橋ペプチドの解離定数

	QRE			ERE
	150	300	500	150 (NaCl, mM)
qk-1^{Δ1}	ca. 0.5	3±1	87±5	11±3
qk-1	30±5	165±13	>2500	34±4
qk-2	23±4	—	—	— (nM)

3) 架橋ペプチドの酵素耐性

将来的に架橋ペプチドを細胞内で使用することを想定して、架橋ペプチドと非架橋ペプチドの酵素に対する耐性を比較した。架橋ペプチド **qk-1^{Δ1}** と非架橋ペプチド **qk-1** をトリプシンで処理したところ、半減期は架橋ペプチドにおいて 65 min、非架橋ペプチドにおいて 15 min であった。この結果は、架橋による非天然部位の導入、もしくはヘリックス構造の安定化によって酵素に対する耐性が獲得されたことを示している。

以上の結果より、クロスリンク剤により架橋されたヘリカルペプチドは、タンパク間相互作用に対する有力な阻害剤になりうるということがわかった。

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 6 件)

- ① Masaaki Kajino, Kazuhiisa Fujimoto, and Masahiko Inouye; Side Chain Cross-linked α -Helices That Behave Like Original Proteins in Biomacromolecular Interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 巻, 656–659, 2011 年, 査読有.
- ② Kazuhiisa Fujimoto; Highly emissive pyrene-based fluorophores and highly sensitive fluorescent sensors using pyrene emission switching, *Yakugaku Zasshi*, 130 巻, 1283–1287, 2010 年, 査読有.
- ③ Kazuhiisa Fujimoto, Sayaka Aizawa, Ikko Oota, Junya Chiba, and Masahiko Inouye; Specific Induced Circular Dichroism and

Enhanced B to Z Transitions of Duplexes Stabilized by Chromophore-Linked Alkynylnucleoside Residues, *Chem.-Eur. J.*, 16 巻, 2401-2406, 2010 年, 査読有.

- ④ Kazuhisa Fujimoto, Hisao Shimizu, Masaru Furusyo, Seiji Akiyama, Mio Ishida, Utako Furukawa, Toshiaki Yokoo, and Masahiko Inouye; Photophysical Properties of 1,3,6,8-Tetrakis(arylethynyl)pyrenes with Donor or Acceptor Substituents: Their Fluorescence Solvatochromism and Lightfastness, *Tetrahedron*, 65 巻, 9357-9361, 2009 年, 査読有.
- ⑤ Kazuhisa Fujimoto, Shogo Yamada, and Masahiko Inouye; Synthesis of Versatile Fluorescent Sensors Based on Click Chemistry: Detection of Fatty Acids by their Pyrene-Emission Switching, *Chem. Commun.*, 7164-7166, 2009 年, 査読有.
- ⑥ Hideyuki Shinmori, Hirotohi Furukawa, Kazuhisa Fujimoto, Hisao Shimizu, Masahiko Inouye, and Toshifumi Takeuchi; Characteristic Fluorescence Behavior of Dialkynylpyrene Derivatives in Hydrophobic Cavity of Protein, *Chem. Lett.*, 38 巻, 84-85, 2009 年, 査読有.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 藤原匡志・藤本和久・井上将彦、金基板上に固定化したフェロセンラベル化ペプチドの電子移動、日本化学会第 91 春季年会、2011.3.26-29、神奈川大学.
- ② 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、様々なタンパクをミニチュア化したヘリカルペプチドと DNA との相互作用解析、日本化学会第 91 春季年会、2011.3.26-29、神奈川大学.
- ③ 藤本和久・梶野雅起・井上将彦、ジアリールエテンの光異性化を利用した生体分子間相互作用の制御、平成 22 年度北陸地区講演会と研究発表会、2010.11.19、富山大学五福キャンパス.
- ④ 藤原匡志・藤本和久・井上将彦、金電極上におけるフェロセンラベル化ペプチドのダイナミクスと電気化学応答、平成 22 年度有機合成化学北陸セミナー、2010.10.8-9、石川県青少年総合研修センター.
- ⑤ 藤原匡志・藤本和久・井上将彦、金基板上に固定化したフェロセンラベル化ペプチドの二次構造とその電気化学応答との関係、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010.9.24-26、大阪大学豊中キャンパス.

- ⑥ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、ミニチュア化タンパク”としての架橋ヘリカルペプチドと DNA の相互作用、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010.9.24-26、大阪大学豊中キャンパス.
- ⑦ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、ヘリカルペプチドを用いたペプチド-DNA 間相互作用の安定化、ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会、2010.5.18-19、慶應義塾大学 日吉キャンパス.
- ⑧ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、短鎖ヘリカルペプチドと DNA との相互作用の FRET による定量解析、日本化学会第 90 春季年会、2010.3.26-29、近畿大学本部キャンパス.
- ⑨ 岡田洋平・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテンを骨格とする非天然アミノ酸残基をもつ新規光応答性ペプチドの開発、日本化学会第 90 春季年会、2010.3.26-29、近畿大学本部キャンパス.
- ⑩ 深澤聡晃・藤本和久・井上将彦、フェロセン骨格を有する短鎖ヘリカルペプチドの金基板上への固定化とその電気化学応答、日本化学会第 90 春季年会、2010.3.26-29、近畿大学本部キャンパス.
- ⑪ 藤本和久・梶野雅起・河合博和・井上将彦、ジアリールエテンを利用したヘリカルペプチド/DNA 相互作用の光制御、第 12 回生命化学研究会、2010.1.8-9、芦原温泉 清風荘.
- ⑫ 岡田洋平・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテンを骨格とする非天然アミノ酸を有するフォトクロミックペプチドの開発、平成 21 年度有機合成化学北陸セミナー、2009.10.9-10、富山観光ホテル.
- ⑬ 深澤聡晃・藤本和久・井上将彦、クロスリンク剤で架橋したヘリカルペプチドの基板への固定化とその応用、平成 21 年度有機合成化学北陸セミナー、2009.10.9-10、富山観光ホテル.
- ⑭ 河合博和・藤本和久・井上将彦、光応答性 DNA 結合ペプチドの開発、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、2009.9.14-15、九州大学医系キャンパス・百年記念講堂.
- ⑮ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、短鎖ヘリカルペプチドと DNA との相互作用のスペクトル解析、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、2009.9.14-15、九州大学医系キャンパス・百年記念講堂.
- ⑯ 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ペプチドの DNA 認識能の光制御、ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会、2009.5.18-19、神戸市

産業振興センター.

- ⑰ 梶野雅起・藤本和久・井上将彦、架橋ヘリカルペプチドの蛍光標識化とその核酸との相互作用の評価、ケミカルバイオロジー学会 第4回年会、2009.5.18-19、神戸市産業振興センター.

〔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=1000370583 (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