

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293002

研究課題名(和文) タンパク質表面での反応を制御するペプチドの構造機能化

研究課題名(英文) Peptide mimics to control protein functions on the surface of proteins

研究代表者

大和田 智彦 (OHWADA, Tomohiko)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20177025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質表面での反応を制御するペプチドの構造機能化をめざし、橋頭位置換基の水素結合による窒素ピラミッド化構造の変化の基礎的な構造論の研究を推進した。非平面アミドのカルボニル酸素上の電子密度は平面アミドと比べて減少しているため、水素結合(プロトン化)は主に窒素上で起こると考えられていた。7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタンアミドは、二環性骨格の架橋C-N-C原子で形成される平面からアミドが傾き窒素がピラミッド化した非平面アミド構造を取る。溶液構造の検討を行った。NMRを用いて橋頭位のヒドロキシル基の水素の温度依存性を求めると、水素結合を形成していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The amide bond is a key linkage in proteins, peptides and peptide mimics, serving to connect two neighbouring amino acids or analogues. Most amide bonds are planar, but nonplanar amide structures have been suggested to occur even in proteins and peptides. Although the magnitude of nonplanarity found in proteins and peptides is not large, some nonplanar amides with distinct ground states have been reported. In such non-planar amides, the nitrogen atom gains a partial sp³-character (i.e., nitrogen-pyramidalization), and at the same time bond-twisting occurs. While hydrogen-bonding to the pyramidalized electron-rich nitrogen atom has been experimentally and computationally investigated, there has been little study on the possibility of hydrogen bonding to the electron-deficient carbonyl oxygen atom of non-planar amides. We studied hydrogen bonding of 7-azabicyclo[2.2.1]heptane amides, which are chemically stable and intrinsically nonplanar.

研究分野：化学系薬学(有機化学)

キーワード：ペプチド 水素結合 ヘリックス S-NO化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質表面の特定のシステイン残基のS-ニトロソ化(S-ニトロシル化)がタンパク質の機能やタンパク質間相互作用の調節など生命現象に深く関与することが近年解明されてきた(Hess *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6,150)。S-ニトロソ化されたシステインを表面にもつタンパク質が他のタンパク質と相互作用して、相手のタンパク質のシステイン残基にトランスニトロソ化を起こす酵素様の作用が提案されている(Lipton *et al.*, *Antioxid. Redox Sign.* **2013**, 18, 239.)。またS-ニトロソ化されるタンパク質がNOを生合成するNO合成酵素(NOS)とクラスターを形成している(Stamler *et al.*, *J. Mol. Med.* **2012**, 90, 233.)。このことはタンパク質間相互作用を介してタンパク質表面で特異的な化学反応が起きていることを意味する。タンパク質-タンパク質相互作用の多くは、タンパク質表面上の広い面積の形状相補性や疎水性相互作用、特に α -ヘリックスの部分構造同士の間が足場になっている。

2. 研究の目的

本研究課題では、1)タンパク質-タンパク質間で起きるタンパク質表面認識(特にヘリックス-ヘリックス相互作用)と2)それに引き続くタンパク質表面反応(特にトランスニトロソ化反応)を、それぞれ制御する生体アミノ酸の機能を超越したプロリン様アミノ酸の構造機能化を研究し、タンパク質表面認識と反応を人工的に制御する化学基盤を構築することにある。

3. 研究の方法

本研究者は、S-ニトロソシステインより安定でトランスニトロソ化能を有するプロリン誘導体のN-ニトロソアミンの創製に成功した(Yanagimoto *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 736.)。創製したプロリン誘導体のN-ニトロソアミン**1**がタンパク質の機能を制御可能であることを、膜タンパク質Gタンパク質共役型受容体(GPCR)である β_2 -アドレナリンレセプターのアゴニスト刺激における受容体脱感作阻害作用で示した(文献3, *Circulation Research* **2013**, 112, 327.)。本研究成果はLefkowitz(2012年ノーベル化学賞受賞者)らの結果(*Cell*, **2007**, 129, 511.)の曖昧な点を解明した。一方、生体分子である α -アミノ酸が作るヘリックスとは異なる構造特性(環境依存性、ピッチ長や直径、残基の配向角度など)を有するヘリックス分子の創製を研究し一部実現した(発表文献:Hosoya *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14780)。どちらの分子も本研究者が見いだした窒素非平面化を引き起こす7-アザピシクロ[2.2.1]ヘプタン構造(**1**および**2**)を用いて実現した(Otani *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15191)。

4. 研究成果

環構造を持つプロリンは、ペプチドやタンパク質において特異な構造を形成可能である一方、三級アミド結合を持つため、他の α -アミノ酸に見られない、アミドのシス-トランス異性平衡混合物を与えるため、プロリンが存在すると構造が多様化する(Figure 1)。

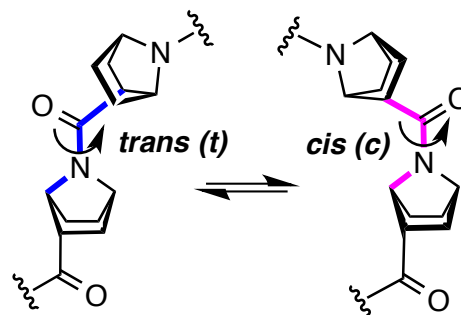


Figure 1. 二環性 β -プロリンオリゴマーアミドのcis/trans異性化

本研究では、コンホメーションを制御した人工のプロリン型アミノ酸、特に天然にはない、 β -アミノ酸を用いて効果的にペプチドの構造を制御する方法論を開拓することを目的とし、アミノ酸レベルの詳細な構造特性を調査するとともに新たな構造規則性の創出を行った。なお本研究課題にはシステインのS-NO化によるタンパク質機能の改変も含まれるが、特許、論文化のため、この報告書では触れない。

(1) 二環性 β -プロリンオリゴマーの規則構造化原理の解明

橋頭位無置換の二環性 β -プロリンオリゴマーはアミドのシス-トランス異性化のため詳細な溶液構造は明らかにされていないがホモオリゴマーにおいて残基数の増加に伴ってCD強度の増加から規則構造の誘起(規則構造の濃度の増大)が示唆された。[参考文献1]今回、このオリゴマーの溶液の規則構造化について調査するため、分子動力学計算を行った。AMBER力場を用い、あらゆるメタノール溶媒存在下、アンブレラサンプリングの手法を用いてアミド異性化を含む構造探索を行った。単量体や2量体の実験データを再現するように再重み付けしたところ、2量体ではトランスアミド体とシスアミド体の割合に大きな違いがないものの、3、4、5量体と長くなるにつれてトランスアミド体を多く持つ構造が安定化され、鎖長依存的に規則構造化が起こっていることが分かった(発表論文参照)。

(2) 二環性 β -プロリンオリゴマーにおける分子内水素結合による窒素ピラミッド化構造の変化

アミド結合は通常平面構造が安定である。タンパク質やペプチド中でアミドが非平面化を起こすことが示唆されているが、非平面化が起こってもその程度が小さいこと、また検

出す手段が限られていることから、関連研究は少ない。また、非平面アミドのカルボニル酸素上の電子密度は平面アミドと比べて減少しているため、水素結合（プロトン化）は主に窒素上で起こると考えられていた。

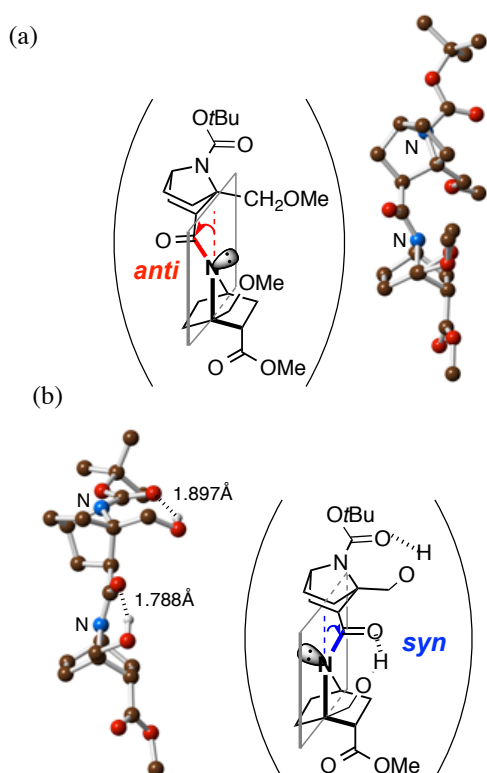


Figure 2. Crystal structures of (a) (*S*)-**2** and (b) (*S*)-**2^h**.

本研究者が発見した二環性β-プロリン、7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタンアミドは、二環性骨格の架橋C-N-C原子で形成される平面からアミドが傾き窒素がピラミッド化した非平面アミド構造を取る。橋頭位に置換基を持つ二環性β-プロリンはアミドの平衡がトランス体の一方に制御されるが[参考文献2]、-CH₂OMe基を導入した2量体((*S*)-**2**)と-CH₂OH基を持つ2量体((*S*)-**2^h**)の結晶構造においてアミド窒素の非平面化の方向に違いが見られた(**Figure 2**)。(*S*)-**2**の場合、C-N-C平面に対してアミドがC末カルボニル基と反対側に傾いており(*anti* inversion)、-CH₂OMe基とアミドは反対の方向をとっていた。一方、(*S*)-**2^h**では2つの側鎖ヒドロキシ基とカーバメートまたはアミドのカルボニル酸素の間に分子内水素結合が観測された。C-N-C平面に対してアミドはC末カルボニル基と同じ側に傾いていた(*syn* inversion)。次に、溶液構造の検討を行った。NMRを用いて(*S*)-**2^h**のヒドロキシル基の水素の temperature coefficient を求めると、水素結合を形成していることが分かった。また、赤外円二色性(VCD)分光法を適用することにより、溶液中でアミド窒素が非平面化しており、またアミドの傾きの方向は結晶と同様の傾向をとることが強く示唆された。このよ

うに、置換基の種類を変化させることで分子内水素結合により窒素ピラミッド化の方向が変化することを見出した。

本研究者が発見した二環性β-プロリン、7-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタンアミドは、タンパク質との相互作用を視野に入れて、機能化の土台になる構造論を本研究課題では進展させた。応用面の実現に向けてさらに研究を継続中である。

参考論文

[1] Otani, Y.; Futaki, S.; Kiwada, T.; Sugiura, Y.; Muranaka, A.; Kobayashi, N.; Uchiyama, M.; Yamaguchi, K.; Ohwada, T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11635.

[2] Wang, S.; Otani, Y.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Ohwada, T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5287.

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3件)

(1) Trans-nitrosylation directs TRPA1 selectivity in N-nitrosamine activators
Daisuke Kozai, Yoji Kabasawa, Maximilian Ebert, Shigeki Kiyonaka, Firman, Yuko Otani, Tomohiro Numata, Nobuaki Takahashi, Yasuo Mori, Tomohiko Ohwada
Molecular Pharmacology, **2016**, *85*, 175-185. doi:10.1124/mol.113.08886.

(2) Hydrogen Bonding to Carbonyl Oxygen of Nitrogen-Pyramidalized Amide-Detection of Pyramidalization Direction Preference by Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy.
Siyuan Wang, Tohru Taniguchi, Kenji Monde, Masatoshi Kawahata, Kentaro Yamaguchi, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Chemical Communications, **2016**, *52*, 4018 - 4021, DOI: 10.1039/C6CC00284F.

(3) Molecular Dynamics Study of Nitrogen-Pyramidalized Bicyclic β-Proline Oligomers: Length-Dependent Convergence to Organized Structure
Yuko Otani, Satoshi Watanabe, Tomohiko Ohwada, and Akio Kitao
J. Phys. Chem. B, **2017**, *121* (1), pp 100-109. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10668
Publication Date (Web): December 5, **2016**

[学会発表] (計20件)

(1) 第59回日本薬学会関東支部大会 (日本大学薬学部・船橋 千葉県) 2015年9月12日口頭発表 B-05
アルカリ加水分解に対する二環性β-プロリンアミドの安定性
○ディエゴアントニオオカンボグティエレ

スデベラスコ、ザイルーハン、劉シン、王思遠、尾谷優子、大和田智彦 (東大院薬)

(2) 第 59 回日本薬学会関東支部大会 (日本大学薬学部・船橋 千葉県) 2015 年 9 月 12 日 口頭発表 B-06

二環性プロリン誘導体のヘテロジペプチドのコンホメーション解析

○ザイルーハン、ディエゴ オカンポ、劉シン、王思遠、尾谷優子、大和田智彦 (東大院薬)

(3) 第 26 回基礎有機化学討論会 (愛媛大学・松山 愛媛県) 2015 年 9 月 24 日 ポスター発表 1P119

タンパク質 S-トランスニトロソ化反応のモデル系構築

○猪股 悟・フィルマン フィルマン・尾谷優子・大和田智彦 (東大院薬)

(4) 第 52 回ペプチド討論会 The 52nd Japanese Peptide Symposium (平塚中央公民館 神奈川県平塚市) November 16, 2015 Young Investigator's Oral Presentation: Session 1 Y-03

New helical foldamer with 1:1 alpha/beta amino acid residue patterns

Siyuan Wang, Yuko Otani, Masatoshi Kawahata, Kentaro Yamaguchi, Tomohiko Ohwada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Research Foundation ITSUU Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University)

(5) 第 52 回ペプチド討論会 The 52nd Japanese Peptide Symposium (平塚中央公民館 神奈川県平塚市) November 16, 2015 Poster Presentations P-001

Alkaline hydrolysis of nonplanar bicyclic β -proline amides

Diego Antonio Ocampo Gutierrez de Velasco, Zhai Liuhan, Siyuan Wang, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

(6) 第 52 回ペプチド討論会 The 52nd Japanese Peptide Symposium (平塚中央公民館 神奈川県平塚市) November 17, 2015 Poster Presentations P-004

Synthesis and conformational study of hetero-dimers of bicyclic proline derivatives

Luhan Zhai, Diego Ocampo, Siyuan Wang, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

(7) 第 45 回複素環化学討論会 (早稲田大学国際会議場 東京) 2015 年 11 月 19 日 口頭発表 10-20

可視光感受性二環性ニトロソアミンを用いる Caged NO 化合物の生細胞応用のための構造最適化

○フィルマン・中嶋隆浩・猪股悟・尾谷優子・浦野泰照・佐藤守俊・大和田智彦 (東大院薬・東大院総合)

(8) 第 45 回複素環化学討論会 (早稲田大学国際会議場 東京) 2015 年 11 月 20 日 ポスター発表 2P-32

二環性 β -プロリンオリゴマーの規則構造化の鎖長依存性

○尾谷優子・王思遠・北尾彰朗・渡辺恵・大和田智彦 (東大院薬・東大分生研・東北大院工)

(9) 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 28 日 一般口頭発表 28U-pm19

橋頭位置換二環性プロリン誘導体のヘテロペプチドオリゴマーの構造解析

○ザイルーハン, オカンポ ディエゴ, 王思遠, 尾谷優子, 大和田智彦 (東大院薬, 乙卯研究所)

(10) 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 28 日 一般口頭発表 28U-pm10

アルカリ加水分解に対する二環性 β プロリンアミドの安定性

○DIEGO Ocampo, ザイルーハン, 王思遠, 尾谷優子, 川幡正俊, 山口健太郎, 大和田智彦 (東大院薬, 乙卯研究所, 徳島文理大香川薬)

(11) 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 28 日 一般口頭発表 28U-pm09

タンパク質 S-トランスニトロソ化反応解析のためのモデル反応の開発

○猪股悟, フィルマン, 尾谷優子, 大和田智彦 (東大院薬)

(12) 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 28 日 一般口頭発表 28U-pm21

プロリン型人工アミノ酸ペプチドの規則構造化における置換基効果の計算科学的検討

○尾谷優子, 王思遠, 渡辺恵, 北尾彰朗, 大和田智彦 (東大院薬, 乙卯研究所, 東北大院工, 東大分生研)

(13) The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (仙台国際センター, Sendai) May 22, 2016, Oral talk S18-2

Development of Bicyclic N-Nitrosamines as Photo-triggered Small-Molecule NOS Mimics: Controllable Concentration of Released NO and High Cellular Retention Ability

○Tomohiko Ohwada (Graduate School of

Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Japan)

(14) The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (仙台国際センター, Sendai) May 22, 2016, Poster talk. B01-3 Chemical characterization of Transnitrosylation. Study of model system.
○Satoru Inomata, Tomohiko Ohwada (Graduate school of Pharmaceutical Science The University of Tokyo, Japan)

(15) 第60回日本薬学会 関東支部大会 (東京大学大学院薬学系研究科、山上会館 本郷) 2016年9月17日口頭発表 D-29 二環性プロリン誘導体結合による α -アミノ酸のコンフォメーションへの効果
○ザイルーハン, 尾谷優子, 竹内恒, 嶋田一夫, 大和田智彦, (東大院・薬, 産業技術総合研究所)

(16) 第60回日本薬学会 関東支部大会 (東京大学大学院薬学系研究科、山上会館 本郷) 2016年9月17日ポスター発表 P-23
S-トランスニトロソ化反応の特異性と生体内モデル反応の解析
○猪股 悟, フィルマン, 尾谷優子, 大和田智彦 (東大院・薬)

(17) 第54回日本生物物理学会年会 (つくば国際会議場 つくば市・茨城県) 2016年11月26日 ポスター発表 2Pos020
プロリン型人工アミノ酸を含むペプチドの分子動力学計算
Molecular dynamics simulation of peptide oligomers bearing the proline-type artificial amino acid
○ Yuko Otani, Satoshi Watanabe, Akio Kitao, Tomohiko Ohwada (Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo, IMCB, Univ. Tokyo)

(18) 日本薬学会第137年会 (仙台国際センター・東北大学川内地区 仙台) 2017年3月25日 一般シンポジウム S05-1
柔軟なアミド結合を有するプロリン型非天然アミノ酸によるペプチドの構造制御
○尾谷 優子 (東大院薬)

(19) 日本薬学会第137年会 (仙台国際センター・東北大学川内地区 仙台) 2017年3月25日 一般口頭発表 25U-pm17S
二環性ニトロソアミンが引き起こすS-トランスニトロソ化反応の化学的特徴付け
○猪股悟, フィルマン, 尾谷優子, 大和田智彦 (東大院薬)

(20) 日本薬学会第137年会 (仙台国際セ

ンター・東北大学川内地区 仙台) 2017年3月26日 一般口頭発表 26U-pm10S
二環性プロリンが結合した α -アミノ酸ペプチドの構造解析
○ザイルーハン, 尾谷優子, 竹内恒, 嶋田一夫, 大和田智彦 (東大院薬, 産業技術総合研究所)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
(日本語)
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~yakka/>
(English)
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~yakka/english/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大和田智彦 (OHWADA, Tomohiko)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号: 20177025

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者
フィルマン (FIRMAN)
猪股悟 (INOMATA, Satoru)

ザイルーハン (ZHAI, Luhan)
オカンポ デイエゴ (OCAMPO, Diego)
尾谷優子 (OTANI, Yuko)
池田博隆 (IKEDA, Hirotaka)
川幡正俊 (KAWAHATA, Masatoshi)
山口健太郎 (YAMAGUCHI, Kentaro)
