

令和元年6月4日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13260

研究課題名(和文)高選択的光酸素化を基盤としたTGF- 関連タンパク質の機能制御

研究課題名(英文)Control of TGF-beta related protein based on selective photooxygenation

研究代表者

谷口 敦彦(Taniguchi, Atsuhiko)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30790125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイオスタチンは、TGF- (transforming growth factor- ; トランスフォーミング増殖因子)スーパーファミリーに属し、筋肉を負に制御するタンパク質である。本研究では、マイオスタチン親和性ペプチドと光酸素化触媒の複合体を創製し、それを用いたマイオスタチンの選択的光酸素化に成功した。また、その酸素化によってマイオスタチンの生理活性を劇的に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- (transforming growth factor- ; トランスフォーミング増殖因子)スーパーファミリーに属するマイオスタチンは、筋肉の増殖を抑制する活性をもつ。本研究では、マイオスタチンを選択的に光酸素化し、不活化する分子を創製した。このマイオスタチン阻害法は、筋肉量を増大し、筋ジストロフィーや老年性筋萎縮等の筋萎縮性疾患に対する新しい治療法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Myostatin, one of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily proteins, negatively regulates a growth of muscle mass. In this study, a conjugate which is composed of myostatin-binding peptide and photo-oxygenation catalyst was developed, and the conjugate successfully induced myostatin-selective photo-oxygenation. Moreover, the oxygenation drastically inhibited the activity of myostatin.

研究分野：ペプチド化学、ケミカルバイオロジー、創薬化学

キーワード：光酸素化 触媒 ペプチド マイオスタチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) スーパーファミリーに属するマイオスタチンは、筋肉の増殖を抑制する活性を有する [1]。本活性の阻害は筋量を増大し、筋ジストロフィー、癌カヘキシア、サルコペニア、廃用性筋萎縮等の種々筋萎縮性疾患の治療につながると考えられている [2]。当研究室では以前より、マイオスタチン前駆体のアミノ酸配列からマイオスタチン親和性ペプチド **1** (図 1 左) を同定し、本ペプチドがマイオスタチン阻害作用を示して筋量を増大させることを報告した [3]。また、ペプチド **1** の構造活性相関研究を展開することで、より低分子で高活性なペプチド誘導体を見出している [4, 5]。したがって、さらに強力にマイオスタチン活性を抑制する分子を構築できれば、上記筋萎縮性疾患における新しい治療戦略を提供できると考えた。

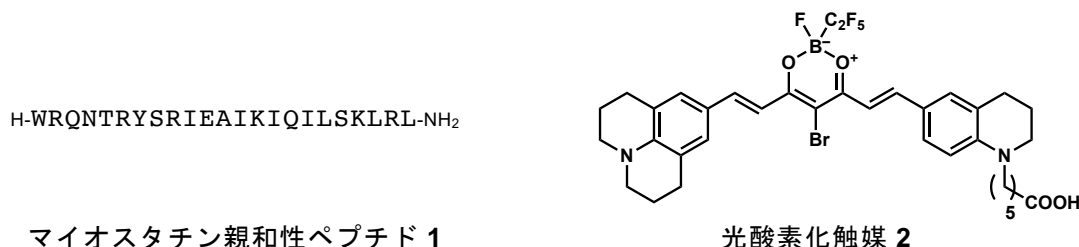


図 1 マイオスタチン親和性ペプチド **1** のアミノ酸配列と光酸化触媒 **2** の化学構造

### 2. 研究の目的

当研究室で見出したマイオスタチン親和性ペプチド **1** は、マイオスタチンと可逆的に相互作用することで、その阻害効果を発揮すると考えられる (図 2 左)。そこで本課題研究では、より高い阻害効果を獲得するために、本ペプチドを機能化することを目的とした。具体的には、本ペプチドに光酸化触媒を導入したコンジュゲートを創製し、本コンジュゲートを用いてマイオスタチンを光酸化修飾することで、不活化することを目指した (図 2 右)。この阻害様式では、マイオスタチンが光酸化反応によって不可逆的に阻害されること、またその反応後コンジュゲート自身は別のマイオスタチン分子に触媒的に作用できることから、従来のペプチドより低用量で大きな阻害効果が得られると期待された。

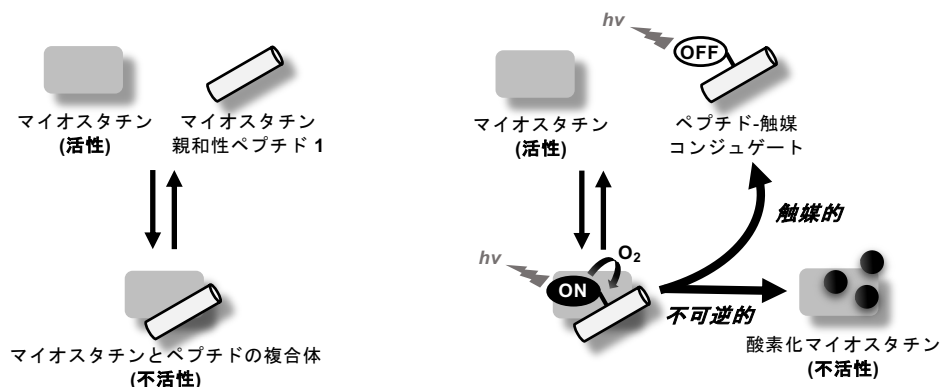


図 2 マイオスタチン親和性ペプチド **1** とペプチド-触媒コンジュゲートによるマイオスタチン阻害

### 3. 研究の方法

#### ① ペプチド-触媒コンジュゲートの創製

マイオスタチン親和性ペプチド **1** に導入する光酸化触媒としては、触媒 **2** (図 1 右) を採用することにした [6]。これは、ターゲット分子に結合した時にのみ分子内回転が抑制されて、光酸化能を発揮するという特徴をもつ触媒である [6, 7]。なお、触媒 **2** は、組織透過性が高く且つ組織障害性が低い近赤外光で励起可能であるため [8]、生体適合性が高い。そこで、目的のコンジュゲートを得るために、アジドを有する触媒 **2** の誘導体と、アルキン基を有するペプチド **1** の誘導体を合成し、両者のヒュッゲン環化付加反応によってペプチド-触媒コンジュゲートを得ることとした。

#### ② マイオスタチン酸化

得られたコンジュゲートをマイオスタチンに添加し、近赤外光で照射を行った。その後、DTT によるジスルフィド結合の還元処理及びエンドプロテイナーゼ Lys-C による酵素消化処理を経て、MALDI-TOF MS にてマイオスタチン酸化体の検出を試みた。

#### ③ マイオスタチン不活化

マイオスタチンの活性評価については、当研究室で立ち上げたルシフェラーゼレポーター細胞アッセイによって評価した [4, 5]。この評価系では、Smad 結合配列下流にコードしたルシフェラーゼレポーターの酵素活性を指標に、マイオスタチン活性を評価する。本評価系を用いて、酸化マイオス

タチンが活性を消失しているかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### ① ペプチド-触媒コンジュゲートの創製

アルキンを有するマイオスタチン親和性ペプチド **1** の誘導体を、通常の Fmoc ペプチド固相合成にて合成した。一方、光酸化触媒 **2** の合成方法をベースにして、アジドを有する触媒誘導体を合成した。ついで、両者より、銅触媒存在下のヒュスゲン環化付加反応によってコンジュゲート体を得た。この時、ペプチドと触媒間のリンカー長が異なるコンジュゲート体も得た。また、マイオスタチン親和性ペプチドについて、より高親和性のペプチドや短鎖化されたペプチド等を得ることに成功した。

##### ② マイオスタチン酸化

上記のコンジュゲート存在下でマイオスタチンを照射すると、時間依存的またコンジュゲート濃度依存的に光酸化反応が進行した。また、本コンジュゲートは、一般的によく知られる光増感剤メチレンブルーと比較してオフターゲットモデルに対する酸化を起しにくかった。

##### ③ マイオスタチン不活化

ルシフェラーゼレポーター細胞アッセイを用いて、本コンジュゲートにより酸化されたマイオスタチンの生理活性を評価したところ、その活性は顕著に低下していることを確認した。また、本コンジュゲートとペプチド **1** のマイオスタチン阻害効果を比較したところ、光酸化によってマイオスタチンの不活化を起こすコンジュゲートの方が大きな阻害効果を示した。

#### <引用文献>

- [1] A. C. McPherron, A. M. Lawler and S.-J. Lee, *Nature*, 1997, **387**, 83-90
- [2] S. Bogdanovich, T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittemore, R. S. Ahima and T. S. Khurana, *Nature*, 2002, **420**, 418-421; E. Latres, J. Pangilinan, L. Miloscio, R. Bauerlein, E. Na, T. B. Potocky, Y. Huang, M. Eckersdorff, A. Rafique, J. Mastaitis, C. Lin, A. J. Murphy, G. D. Yancopoulos, J. Gromada and T. Stitt, *Skelet. Muscle*, 2015, **5**, 34
- [3] K. Takayama, Y. Noguchi, S. Aoki, S. Takayama, M. Yoshida, T. Asari, F. Yakushiji, S. Nishimatsu, Y. Ohsawa, F. Itoh, Y. Negishi, Y. Sunada and Y. Hayashi, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 1544-1549
- [4] K. Takayama, A. Nakamura, C. Rentier, Y. Mino, T. Asari, Y. Saga, A. Taguchi, F. Yakushiji and Y. Hayashi, *ChemMedChem*, 2016, **11**, 845-849
- [5] T. Asari, K. Takayama, A. Nakamura, T. Shimada, A. Taguchi and Y. Hayashi, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2017, **8**, 113-117
- [6] J. Ni, A. Taniguchi, S. Ozawa, Y. Hori, Y. Kuninobu, T. Saito, T. C. Saido, T. Tomita, Y. Sohma and M. Kanai, *Chem*, 2018, **4**, 807-820
- [7] A. Taniguchi, Y. Shimizu, K. Oisaki, Y. Sohma and M. Kanai, *Nature Chem.*, 2016, **8**, 974-982
- [8] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke and Y. Urano, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2620-2640

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kentaro Takayama, Tomo Asari, Mariko Saitoh, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, Yoshimi Roppongi, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, *ACS Med. Chem. Lett.*, accepted, DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00174, 査読有
- ② Cédric Rentier, Kentaro Takayama, Mariko Saitoh, Akari Nakamura, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Design and synthesis of potent myostatin inhibitory cyclic peptides, *Bioorg. Med. Chem.*, 2019, **27**, 1437-1443, DOI: 10.1016/j.bmc.2019.02.019, 査読有
- ③ Kentaro Takayama, Cédric Rentier, Tomo Asari, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, Kyohei Muguruma, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, Development of Potent Myostatin Inhibitory Peptides through Hydrophobic Residue-Directed Structural Modification, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2017, **8**, 751-756, DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00168, 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 岡本 英之、谷口 敦彦、宇佐美 翔哉、田口 晃弘、高山 健太郎、林 良雄、ペプチド-光酸化触媒コンジュゲートを用いたマイオスタチンの活性阻害、日本薬学会第 139 年会、2019
- ② Hideyuki Okamoto, Atsuhiko Taniguchi, Shoya Usami, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Development of Peptide-Catalyst Conjugate for Photooxygenation of Myostatin, 10th International Peptide Symposium / 55th Japanese Peptide Symposium, 2018
- ③ 岡本 英之、谷口 敦彦、宇佐美 翔哉、田口 晃弘、高山 健太郎、林 良雄、マイオスタチン阻害を目指したペプチド-光酸化触媒コンジュゲートの開発、第 36 回メディスナルケミストリーシンポジウム、2018
- ④ 高山 健太郎、浅利 知、齋藤 まりこ、六本木 佳美、中村 明里、嶋田 嵩大、池山 弘晃、田口

- 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、網羅的構造活性相関研究によるマウス由来マイオスタチン阻害ペプチドの高活性化、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2018
- ⑤ 高山 健太郎、浅利 知、齋藤 まりこ、六本木 佳美、中村 明里、佐賀 裕介、嶋田 嵩大、池山 弘晃、田口 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、マイオスタチン阻害ペプチドの小型化と構造活性相関研究、日本筋学会第 4 回学術集会、2018
  - ⑥ 六本木 佳美、高山 健太郎、齋藤 まりこ、中村 明里、嶋田 嵩大、田口 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、小型化マイオスタチン阻害ペプチドの発見と高活性誘導体の創製、創薬懇話会 2018 in 志賀島、2018
  - ⑦ Kentaro Takayama, Tomo Asari, Mariko Saitoh, Yoshimi Roppongi, Akari Nakamura, Takahiro Shimada, Akihiro Taguchi, Atushiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, Structural requirements of mouse myostatin prodomain-derived small peptide for effective myostatin inhibition, 8th Peptide Engineering Meeting, 2018
  - ⑧ Kentaro Takayama, Tomo Asari, Mariko Saitoh, Yoshimi Roppongi, Akari Nakamura, Akihiro Taguchi, Atushiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, Structural requirements for the effective myostatin inhibition of myostatin prodomain-derived peptide derivatives, 256th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2018
  - ⑨ Kentaro Takayama, Tomo Asari, Mariko Saitoh, Yoshimi Roppongi, Akari Nakamura, Akihiro Taguchi, Atushiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi, Structural derivatization for the effective myostatin inhibition of myostatin prodomain-derived peptide derivatives, 11th Japanese-French Workshop “New insights in personalized medicine for neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology”, 2018
  - ⑩ 齋藤 まりこ、高山 健太郎、Cédric Rentier、中村 明里、嶋田 嵩大、六本木 佳美、田口 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、小型化マイオスタチン阻害ペプチドの発見と高活性化、日本薬学会第 138 年会、2018
  - ⑪ 高山 健太郎、池山 弘晃、Cédric Rentier、中村 明里、佐賀 裕介、嶋田 嵩大、齋藤 まりこ、田口 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、マイオスタチン阻害ペプチドの活性強化を目指した網羅的構造活性相関研究、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017
  - ⑫ 高山 健太郎、Cédric Rentier、浅利 知、中村 明里、佐賀 裕介、嶋田 嵩大、齋藤 まりこ、六本木 佳美、田口 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、マイオスタチン阻害ペプチドの活性強化を目指した構造活性相関研究、日本筋学会第 3 回学術集会、2017
  - ⑬ 六本木 佳美、高山 健太郎、Cédric Rentier、中村 明里、佐賀 裕介、嶋田 嵩大、齋藤 まりこ、田口 晃弘、谷口 敦彦、根岸 洋一、林 良雄、マイオスタチン阻害ペプチドの活性強化を指向した構造活性相関研究、日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、2017

[その他]

ホームページ等

<http://hinka-toyaku.s2.weblife.me/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 林 良雄

ローマ字氏名: HAYASHI, Yoshio

研究協力者氏名: 高山 健太郎

ローマ字氏名: TAKAYAMA, Kentaro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。