

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07001

研究課題名（和文）選択的光酸化を用いた革新的タンパク質間相互作用阻害戦略の開発

研究課題名（英文）Inhibition of protein interaction with selective photooxygenation

研究代表者

谷口 敦彦（Taniguchi, Atsuhiko）

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30790125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マイオスタチンは筋肉量を負に制御するタンパク質である。よって、マイオスタチンを阻害することは筋肉量の増大を起し、筋ジストロフィー等の筋萎縮性疾患の治療法となる。本研究では、光酸化触媒を導入したマイオスタチン結合ペプチドを用いることで、マイオスタチンを選択的に光酸化し、不活化できることを明らかにしてきた。本成果は、マイオスタチンを光酸化によって効率的に阻害するという、新しい治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マイオスタチンを標的タンパク質とし、その選択的光酸化および効率的阻害を可能にする手法を開発した。このマイオスタチン阻害は、現在治療法が少ない筋ジストロフィー等の、筋萎縮性疾患に対する新しい治療法につながると期待される。また、本手法を応用することで、マイオスタチン以外のタンパク質を標的にすることも可能である。したがって、本成果は、将来他の疾患に対しても適用できる可能性があり、非常に汎用性の高い手法を提供すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Myostatin is a negative regulator of muscle mass. Inhibition of myostatin causes the increase of muscle mass, and could be a therapeutic strategy of amyotrophic diseases including muscular dystrophy. This study has disclosed that myostatin-binding peptides with a photo-oxygenation catalyst induced myostatin-selective photooxygenation and inactivation. This could be a novel therapeutic strategy which efficiently inhibits myostatin by photooxygenation.

研究分野：医薬品化学

キーワード：光酸化 ペプチド マイオスタチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質-タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) は、生体内で様々な生命現象を制御している¹。よって、PPI の阻害は創薬において注目されているが、PPI の広く浅い相互作用面のために困難を極める²。

一方、我々は、標的タンパク質の光酸化を基盤とした研究を展開してきた^{3,4}。光酸化では、光で励起された阻害剤が酸素分子を活性化し、その酸素原子をタンパク質の構造に化学的に導入する。このような化学修飾は、タンパク質の高次構造や疎水的相互作用に大きな影響を与えるため、PPI の新しい阻害戦略になると考えられた。

そこで、当研究室で以前より研究を進めてきたマイオスタチンの PPI に着目した。マイオスタチンは、TGF- β (transforming growth factor- β) スーパーファミリーに属するタンパク質であり、109 残基のペプチド鎖がジスルフィド結合を介してホモダイマーを形成している⁵。マイオスタチンは、生体内で筋肉の増殖を抑制する因子として働いている⁶。したがって、マイオスタチンの活性を阻害することは筋量の増大につながり、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法になると考えられている^{7,8}。本課題では、マイオスタチンを標的とした選択的光酸化による効率的阻害を試みた^{3,4}。

2. 研究の目的

当研究室では、マイオスタチン前駆体のアミノ酸配列から、23 残基で構成されるマイオスタチン結合ペプチド 1 (図 1) を見出している⁹。本ペプチドはマイオスタチンと可逆的に相互作用することで、その阻害効果を示すが、より高い阻害効果を獲得するために、ペプチド 1 に光酸化触媒 2¹⁰ (図 1) を導入した。このペプチド-光酸化触媒コンジュゲートを用いて、マイオスタチンを選択的に酸化し、ひいては不活化することを目的とした。

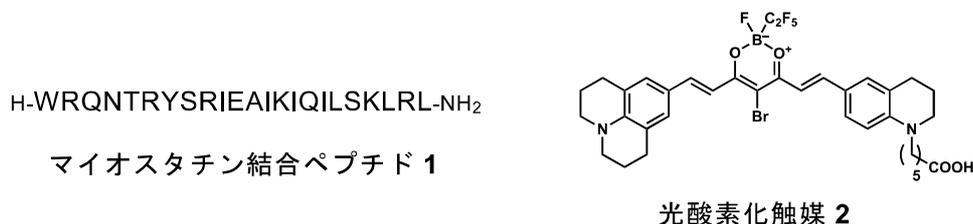


図 1 マイオスタチン結合ペプチド 1 と光酸化触媒 2

3. 研究の方法

(1) ペプチド-光酸化触媒コンジュゲートの創製³

マイオスタチン結合ペプチド 1 の 1 位トリプトファンは酸化される懸念があったため、当研究室で代替可能と分かっていた 3,3-ジフェニルプロピオン酸¹¹ に置換した (図 2)。また、12 位アラニンプロパルギルグリシンに置換することで、ペプチド鎖に末端アルキンを導入した。一方、光酸化触媒 2 のアジド誘導体を合成し、両者の銅触媒アルキン-アジド環化付加反応にてコンジュゲート 3 を合成した (図 2)。

(2) マイオスタチンの光酸化および不活化³

pH 7.4 緩衝水溶液中のコンジュゲート 3 とマイオスタチンに対して、LED を用いた近赤外光照射を行った。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を検出した。

また、マイオスタチンの活性を、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^{9,11} によって評価した。

(3) 光酸化触媒導入位置の最適化⁴

マイオスタチン結合ペプチド 1 の 1 位を 5-ヘキシン酸に置換することで、N 末端にアルキンを持つペプチドを合成した。また、8 位、16 位をプロパルギルグリシンに置換した各ペプチドも合成した。さらに、C 末端にプロパルギルグリシンを追加したペプチドも合成した。これらの各ペプチドと光酸化触媒 2 のアジド誘導体を反応させることで、1 位、8 位、16 位及び C 末端に光酸化触媒を有する一連のコンジュゲート 4-7 を獲得した (図 2)。以上のコンジュゲート 3-7 を用いて、マイオスタチンの光酸化及び不活化を比較検討した。

4. 研究成果

(1) マイオスタチンの光酸化と不活化³

コンジュゲート 3 存在下で照射することによって、酸化マイオスタチンが検出された。一方、3 非存在下及び非照射下では、その酸化体は検出されなかった。さらに、3 は一般的な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として用いたサブスタンス P やアミロイド β₁₋₄₂ に対して、酸化を起こさなかった。これらのことから、コンジュゲート 3 はマイオスタチン選択的な酸化を起こすことが示された。

コンジュゲート 3 によって酸化されたマイオスタチンは、顕著に活性を失っていた。3 のマイオスタチン阻害効果は、マイオスタチン結合ペプチド 1⁵ より 1500 倍以上大きかった。これは、コンジュゲート 3 が酸化によって不可逆的かつ触媒的にマイオスタチンを阻害したためと考えられる。

(2) 酸化触媒導入位置の最適化⁴

ペプチド鎖上の異なる位置に酸化触媒を有する一連のコンジュゲート 3-7 を用いて、マイオスタチンの酸化能を比較したところ、全て同程度の酸化能を示した。一方、マイオスタチン阻害能を比較したところ、16 位に酸化触媒を有する 6 が最も高い阻害効果を示した。具体的には、6 の阻害効果は 3 より約 2 倍大きかった。これは、6 がマイオスタチンの PPI において特に重要な部位を酸化したためと考えられる。

以上より、マイオスタチン結合ペプチドと酸化触媒からなるコンジュゲートを創製し、これを用いた選択的な酸化によってマイオスタチンを効率的に阻害する手法を開発することに成功した。

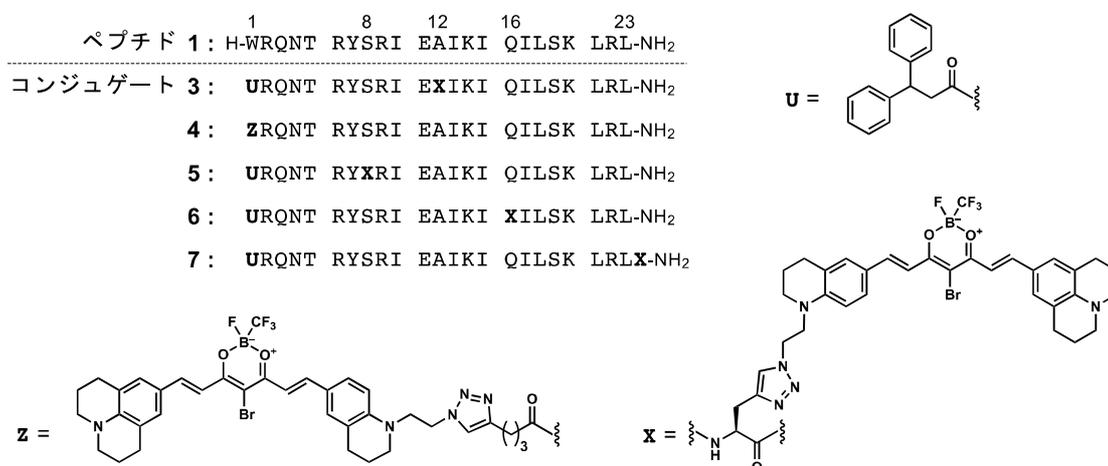


図 2 ペプチド-酸化触媒コンジュゲート 3-7

< 引用文献 >

- S. Jones, J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13 (1996)
- M. R. Arkin *et al.*, *Chem. Biol.*, **21**, 1102 (2014)
- H. Okamoto *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 9108 (2019)
- H. Okamoto *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **19**, 199 (2021)
- A. C. McPherron *et al.*, *Nature*, **387**, 83 (1997)
- S. J. Lee, A. C. McPherron, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9306 (2001)
- S. Bogdanovich *et al.*, *Nature*, **420**, 418 (2002)
- E. Latres *et al.*, *Skelet. Muscle*, **5**, 34 (2015)
- K. Takayama *et al.*, *J. Med. Chem.*, **58**, 1544 (2015)
- J. Ni *et al.*, *Chem*, **4**, 807 (2018)
- K. Takayama *et al.*, *ChemMedChem*, **11**, 845 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16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 Okamoto Hideyuki, Taniguchi Atsuhiko, Usami Shoya, Katsuyama Masahiro, Konno Sho, Taguchi Akihiro, Takayama Kentaro, Hayashi Yoshio	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of functionalized peptides for efficient inhibition of myostatin by selective photooxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 199 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob02042g	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 Okamoto Hideyuki, Taniguchi Atsuhiko, Usami Shoya, Taguchi Akihiro, Takayama Kentaro, Hayashi Yoshio	4. 巻 55
2. 論文標題 Inactivation of myostatin by photo-oxygenation using catalyst-functionalized peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 9108 ~ 9111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc04368c	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14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 谷口敦彦
2. 発表標題 標的タンパク質を光酸化化するテイラーメイド機能化ペプチド
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本英之、谷口敦彦、宇佐美翔哉、勝山雅大、田口晃弘、高山健太郎、林良雄
2. 発表標題 マイオスタチンを阻害するペプチド-光酸化触媒コンジュゲートの開発
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本英之、谷口敦彦、宇佐美翔哉、勝山雅大、今野翔、田口晃弘、高山健太郎、林良雄
2. 発表標題 光酸化を利用してマイオスタチンを阻害する機能化ペプチドの開発
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Okamoto, A. Taniguchi, S. Usami, A. Taguchi, K. Takayama, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Inhibition of myostatin activity by peptide-photooxygenation catalyst conjugate
3. 学会等名 26th American Peptide Symposium and 11th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Taniguchi, H. Okamoto, S. Usami, A. Taguchi, K. Takayama, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Selective photooxygenation of myostatin using peptide-catalyst conjugate
3. 学会等名 11th Joint Meeting of Medicinal Chemistry 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Taniguchi, H. Okamoto, S. Usami, A. Taguchi, K. Takayama, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Inactivation of myostatin using photooxygenation catalyst-peptide conjugate
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Taniguchi, H. Okamoto, S. Usami, A. Taguchi, K. Takayama, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Inactivation of myostatin by photooxygenation using catalyst-peptide conjugate
3. 学会等名 12th Asian Federation for Medicinal Chemistry (AFMC) International Medicinal Chemistry Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口 敦彦、岡本 英之、宇佐美翔哉、田口 晃弘、高山健太郎、林 良雄
2. 発表標題 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不活化
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Taniguchi, H. Okamoto, S. Usami, A. Taguchi, K. Takayama, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Inactivation of Myostatin Using Peptide Functionalized by Photooxygenation Catalyst
3. 学会等名 第56回 ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇佐美翔哉、岡本 英之、谷口 敦彦、田口 晃弘、高山健太郎、林 良雄
2. 発表標題 光酸化触媒による機能化ペプチドを用いたマイオスタチン阻害
3. 学会等名 第37回 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学薬学部薬品化学教室
<https://www.hinka-toyaku.com>

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
---------	---------