

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：37102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750184

研究課題名（和文） 光反応基を有する側鎖間架橋ヘリカルペプチドのバイオツールとしての応用

研究課題名（英文） Application of side-chain cross-linked helical peptides having photoreactive groups to biotools

研究代表者

藤本和久（FUJIMOTO KAZUHISA）

九州産業大学工学部・准教授

研究者番号：40334718

研究成果の概要（和文）：DNA 結合性タンパクの結合ドメインをモチーフとしたジアリールエテン架橋ヘリカルペプチドを開発した。架橋ヘリカルペプチドと DNA を相互作用させた際、水晶発振子マイクロバランス（QCM）を用いて解析したところ、相互作用が光制御されることをリアルタイムで観測することに成功した。また、ジアリールエテンを骨格とする非天然アミノ酸を合成し、短鎖ペプチドの主骨格に光反応部位を導入することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：I developed photoresponsive helical peptides bridged with a diarylethene-based cross-linking agent on the basis of the binding domains of DNA-binding proteins. Quartz crystal microbalance (QCM) analysis showed real-time monitoring that DNA-peptide interaction was photoregulated with a fluorescent lamp. Additionally, diarylethene-based non-natural amino acids were developed and were introduced into short peptides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、架橋ペプチド、光反応部位、ジアリールエテン、光制御

1. 研究開始当初の背景

タンパクの α -ヘリックス構造は、その活性中心部位や膜タンパクの膜貫通ドメインに多く見られ、生体機能を司る鍵構造の一つである。この構造を制御することは、生体機能の解明ならびに制御、さらには次世代医薬品の創製につながる。ならば、タンパク中で

α -ヘリックス構造を形成しているアミノ酸配列を抽出し、短鎖ペプチドを合成すれば、目的は達せられるのか？答えは、「否」である。主な理由として二つ考えられ、一つは、合成した短鎖ペプチドはタンパク中で形成していた α -ヘリックス構造ではなくランダムコイル構造をとってしまうことにある。タンパク中では、幾つかの二次構造を形成し

ているドメインがお互い支えあうことで自身の二次構造が安定化されるが、短鎖ペプチド単独ではヘリックス構造を形成するためのエントロピー損失の方が大きくなってしまふ。もう一つは、天然アミノ酸のみからなるランダム構造のペプチドは *in vivo* で酵素による分解を受けてしまうことにある。よって上記の目的を達するためには、安定な α -ヘリックス構造を形成し、かつ酵素耐性を示す短鎖ペプチド、もしくはそれに準ずるミメティック分子が要求される。本申請者らは、種々のクロスリンク剤を合成し、短鎖ペプチドの側鎖間を架橋することで α -ヘリックス構造を安定化させることに成功している。側鎖間を架橋されたペプチドは、安定なヘリックス構造と酵素耐性という二つの要件を満たし、他の研究者らが開発したヘリカルペプチドやミメティック分子に比べ格段に化学修飾が容易である (図1)。

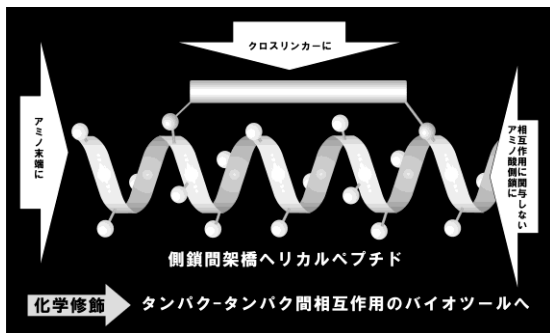


図1 研究開始時における研究構想

2. 研究の目的

本若手研究において、この化学修飾の容易さを活かしてバイオツールを開発し、実例をもってその有用性を示す。具体的には、光反応基の導入に焦点を絞り、その導入法・導入位置を検討し、架橋ペプチドのヘリックス構造やその機能に与える影響を詳細に調べる。光反応基を有するヘリカルペプチドは相互作用する分子との間に共有結合を形成することが可能で、相互作用の解析、会合体の結晶化への応用が考えられる。さらには、難治疾患に関係するタンパク-タンパク相互作用に適用する場合、次世代医薬品への応用が期待される。

研究期間内において、アミノ末端、クロスリンク剤骨格、アミノ酸側鎖における光反応基の導入手法を確立させる。光反応基を導入した側鎖間架橋ヘリカルペプチドに関しては、実例を持ってその有用性を実証し、これを用いた共同研究を期間内に立ち上げることを最終目標とする。

3. 研究の方法

図1に示した“クロスリンカー”、“アミノ末端”、“相互作用に関与しないアミノ酸側鎖”のうち、“クロスリンカー”、“アミノ末端”に光反応基を導入することにした。

ジアジリン等の光反応基を導入する前に、クロスリンカーとして代表的なフォトクロミック色素であるジアリールエテンを導入し、光反応基を導入したペプチドの光物性を評価することにした。また、アミノ末端には種々の蛍光団を導入することでその光物性を調べることにした。

4. 研究成果

以下に、本若手研究期間に達成した成果について記す。

1) ジアリールエテンをクロスリンカーとするDNA結合性架橋ヘリカルペプチドの開発と相互作用の光制御

図2 a) に示したように、両端にスクシンイミジルエステル基を有するジアリールエテンクロスリンク剤を合成した。このクロスリンク剤を用いて、b) に示す架橋ペプチドを合成した。参照ペプチドとして同じ配列からなる非架橋ペプチドを用いた。

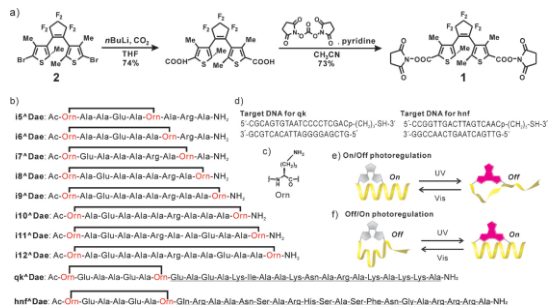


図2 a) ジアリールエテンクロスリンク剤の合成、b) 合成した架橋ペプチドのアミノ酸配列、c) オルニチンの化学構造、d) 標的DNAの配列、e) on/off型制御、f) off/on型制御

DNA結合部位を有する二種類の架橋ペプチド $qk^{\Delta Dae}$ と $hnf^{\Delta Dae}$ を用いて、これらの高次構造を照射光によって制御した。いずれの場合も紫外光を照射することで、ジアリールエテン部位が開環体から閉環体構造へ異性化し、可視光を照射することで開環体構造に戻る。紫外可視吸収スペクトルからわかった (図3)。同様の照射実験をCDスペクトル測定時に行うと、ジアリールエテン部位が開環体構造の時に架橋ペ

チドは安定なヘリックス構造を形成し、紫外を照射することでヘリックス構造が不安定化されることがわかった (図4)。すなわち、ジアリールエテン部位が開環構造をとると、全体のヘリックス構造が不安定化される。

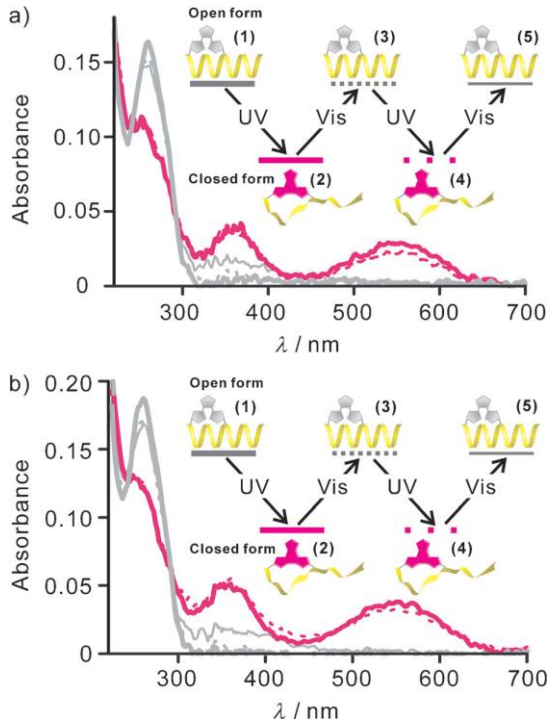


図3 光照射による a) qk^ΔDae と b) hnf^ΔDae の UV/vis スペクトル変化

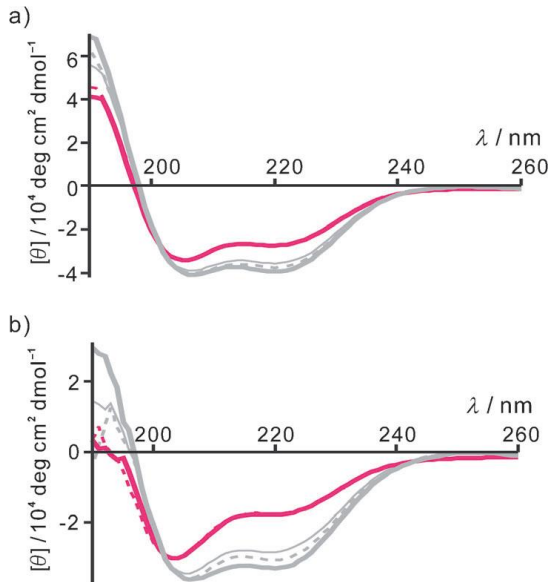


図4 光照射による a) qk^ΔDae と b) hnf^ΔDae の CD スペクトル変化

qk^ΔDae と DNA との相互作用を光照射によって制御することを試みた。相互

作用の評価には、水晶発振子マイクロバランス (QCM) を用いた。センサーチップに DNA を固定化し、そこにジアリールエテン部位が開環構造を取った qk^ΔDae を加えたところ、周波数の減少が観測された。測定途中に可視光を照射すると、周波数はさらに減少した (図5)。図5は、可視光照射によってジアリールエテン部位が開環体へと異性化することでヘリックス構造が安定化され、相互作用が強められたことを示す。今回、DNA・ペプチド間相互作用の光制御をリアルタイムでモニターすることに成功した。

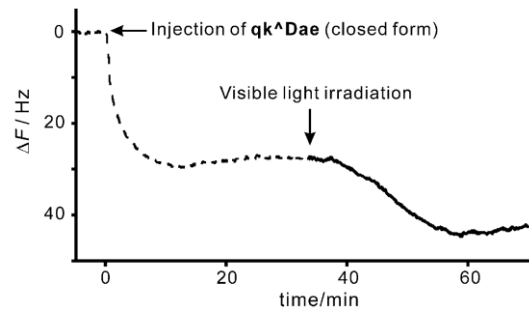


図5 qk^ΔDae と DNA との相互作用の光制御の QCM による観測結果

2) ジアリールエテンを骨格とする非天然アミノ酸の開発とそのペプチド骨格への導入

ジアリールエテンを骨格とする新規非天然アミノ酸 (Daa) を合成し、これをペプチド鎖の主鎖に組み込むことに成功した (図6)。固相合成、液相合成のどちらにも適用可能で、鎖状ペプチドだけでなく環状ペプチドにも Daa を容易に導入することが可能である。

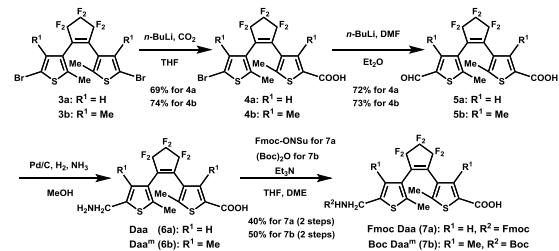


図6 Daa の合成スキーム

図7に示す鎖状、ならびに環状の光応答性ペプチドを合成した。これらのペプチドは、ジアリールエテンに由来するフォトクロミック特性を示すことがわかった。

Peptide 1: Ac-Ala-Lys-Ala-Daa-Ala-Glu-Ala-NH₂

Peptide 2: -Daa^m-Gly-Gly-Daa^m-Gly-Gly-

図7 Daa を含む光応答性ペプチドの配列

3) アミノ末端を蛍光団で修飾した架橋ヘリカルペプチド

ジイン骨格からなるクロスリンク剤で架橋したヘリカルペプチドのアミノ末端を種々の蛍光団で化学修飾することに成功した(図8)。疎水性の高い蛍光団の場合、架橋ヘリカルペプチドが自己集積してしまうが、ほとんど蛍光分子に関して蛍光特性が大きく変化することはない。

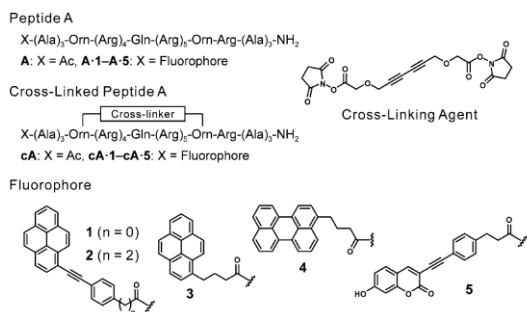


図8 蛍光性架橋ヘリカルペプチドの構造

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 Kazuhisa Fujimoto, Tatsuya Maruyama, Yohei Okada, Tatsuya Ito, and Masahiko Inouye; Development of a New Class of Photochromic Peptides by Using Diarylethene-based Non-natural Amino Acids., *Tetrahedron*, doi.org/10.1016/j.tet.2013.05.044, 査読有.
- ② Kazuhisa Fujimoto, Masaoki Kajino, and Masahiko Inouye; Versatile Synthesis of Fluorescent Peptides as Biological Probes with the Advantage of High Helical Contents, *Res. Chem. Intermed.*, 18 巻, 311-319, 2013 年, 査読有.
- ③ Kazuhisa Fujimoto, Masaoki Kajino, and Masahiko Inouye; Photoswitchable, DNA-Binding Helical Peptides Assembled with Two Independently Designed Sequences for Photoregulation and DNA

Recognition, *Chem. -Eur. J.*, 18 巻, 9834-9840, 2012 年, 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 丸山達也・岡田洋平・藤本和久・井上将彦、ジアリールエテン骨格を含む環状ペプチドの合成とその機能評価、平成24年度有機合成化学北陸セミナー、2012.10.5-6、富山.
- ② 新川貴久・藤原匡志・藤本和久・井上将彦、フェロセンを電気化学的レポーターとする金基板上でのペプチドの挙動解析、平成24年度有機合成化学北陸セミナー、2012.10.5-6、富山.
- ③ 坂口育美・野上暁生・藤本和久・井上将彦、水晶発振子マイクロバランスを用いるDNAとヘリカルペプチドとの相互作用の解析、日本化学会第93春季年会、2013.3.22-25、草津(滋賀).
- ④ 野上暁生・高濱謙太郎・藤本和久・大吉崇文・井上将彦、側鎖間架橋ペプチドと抗アポトーシスタンパク Bcl-xL との相互作用評価、日本化学会第93春季年会、2013.3.22-25、草津(滋賀).

[その他]

http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGL_OBAL_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)
九州産業大学・工学部・准教授
研究者番号: 40334718

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし