



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.117

2020年7月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<https://www.peptide-soc.jp/>

会長就任の挨拶

2020年4月に三原久和会長(東京工業大学)から引き継ぎ、第16期日本ペプチド学会長に選任され、就任いたしました。今期2年間の学会活動に皆様とご一緒に誠心誠意努めてまいりますので、よろしくお願いたします。

昨今の新型コロナウイルスの感染拡大により、日本はもとより世界的に大きな被害を受けています。新型コロナウイルス感染症によりお亡くなりになられた方々に謹んでお悔み申し上げますとともに、罹患された方々には心よりお見舞い申し上げます。一日も早い新型コロナウイルス感染症の終息と、社会の正常化を祈っています。日本ペプチド学会の事業においても、新型コロナウイルス感染の影響を受け、本年8月に福島県での開催が予定されていた第52回若手ペプチド夏の勉強会も中止せざるを得ない状況となりました。今後の学会事業においても影響は避けられないものと思われまます。この新型コロナウイルスにより、私たちのこれまでのライフスタイルは一変し、新しいライフスタイルが確立され始めています。日本ペプチド学会においても、第103回理事会をはじめとしてオンラインで行いました。今後の学会事業においても状況に即した様々な対策が必要になってくると思います。新たなライフスタイルによる学会活動が求められてくると思いますが、会員の皆様の役に立つ学会活動を行っていきたくと思います。

私は、1982年に大学院進学とともにペプチド専門の研究室に身を寄せ、以来、ペプチド科学の進歩とともに自分自身も成長してきたのではないかと思います。学生時代は、主流だった液相法でのペプチド合成をマスターすべく日夜修行僧のように実験し、研究成果を当時のペプチド化学討論会で発表して、諸先生方や様々な参加者の方々にご指導ご鞭撻を頂き、大変勉強させていただくとともに次への励みとなっていました。若い研究者や学生にとってペプチド討論会での発表は、同じペプチドを研究している研究者の中での年に一度の大きな発表会であったのではないかと思います。また、インターネットもない時代、ペプチド化学討論会で得る情報はとても新鮮でわくわくするものがありました。その後、固相法の発展や合成機の出現、様々な合成法の進歩により通



野水 基義

常のペプチドであれば以前に比べ容易に合成できる時代となりました。そして、ペプチドを作る時代から使う時代に変遷していきました。ペプチドを使って薬を創る、ペプチドを使ってバイオロジーを展開する、ペプチドをマテリアルとして応用するなど、様々な方向にペプチド科学が拡大しています。時代の流れと科学の進歩とともに、日本ペプチド学会が設立され、ペプチド化学討論会からペプチド討論会に名称が変わり、ペプチド科学に関するほとんどすべての研究領域をカバーする学会へと変遷を遂げてきました。様々な新分野と関連するペプチド科学への期待と可能性は大きく、多様性の中で活動する日本ペプチド学会の役割が大きくなっています。ペプチドがかかわる様々な領域の研究者の方々に積極的にペプチド討論会に参加していただき、ますます内容が充実されることを願っています。

国際的にもペプチド討論会は、2004年と2013年のアジア-太平洋国際ペプチドシンポジウム (APIPS)、2006年のペプチド工学国際会議 (PEM)、2010年と2018年の国際ペプチドシンポジウム (IPS) などの国際学会と併せた開催を行ってきました。このように、ペプチド討論会は広く海外を含めたペプチド研究者を対象とする国際的な学術集会へと進化しつつあり、研究発表のほとんどが英語で行われるようになっていきます。このような対応により、我が国におけるペプチド科学研究の活況を国内外に強く示す機会となっています。

また、若手ペプチド夏の勉強会は本学会の特徴的な事業です。2018年の第51回若手ペプチド夏の勉強会より、それまで50回も続いていた勉強会を日本ペプチド学会主催の事業として継続することになりました。将来のペプチド科学を担っていく若手研究者や学生の勉強の場、情報交換の場、交流の場として重要な役目を果たしています。これまでも多くの会員がこの勉強会を経験され、多大な影響を受けてこられたものと思われまます。若手ペプチド夏の勉強会が、若手の方々のペプチド科学研究の更なる発展に大きく寄与することを期待しています。

日本ペプチド学会ではこれら学術集会とあわせ、学会賞、奨励賞、討論会でのポスター賞の選考と授与を行っています。また、海外関連学会 (APS, EPS, IPS, APIPS, そしてオーストラリア、中国、韓国の討論会) への若手会員の参加・発表を支援する目的で、渡航援助のための JPS Travel Award の授与を行っています。これら Travel Award 事業をとおして、国際的な視野を身につけ新たな研究展開を図っていただ

く機会を支援することも学会の大きな使命と考えています。若手研究者の方々の積極的な応募をお待ちしています。

さらに、日本ペプチド学会では日々の活動の広報を通して、会員間の情報交換と学会活性化をめざし、ホームページやニュースレターによる情報発信を行ってきました。ニュースレターはすでに第117号となり、会員の興味をそそる貴重な内容が盛り込まれた情報誌として発信されています。会員の皆様にもユニークな情報発信の場として積極的にこのニュースレターをご利用いただきたいと考えています。

日本ペプチド学会は、ペプチドおよび関連する基礎ならびに応用科学の発展向上をはかり、社会への理解と普及を深めるとともに、国内外研究者との交流をはかることを目的としています。様々な活動とおして、会員の皆様の研究活動の発展に寄与できる学会、そして皆様とともに歩んでいける学会をめざしていきたいと考えています。今後とも、ご支援の程よろしくお願い申し上げます。

（のみず もとよし）
東京薬科大学 薬学部
nomizu@toyaku.ac.jp

SARS 治療薬を目指したプロテアーゼ阻害剤の設計

1. はじめに

医学・薬学領域で今最も精力的に研究開発が進められている治療薬は抗がん剤であろう。分子標的薬や免疫系に作用する薬剤などが毎年のように画期的新薬として上市されている。一方で、インフルエンザなどの感染症の治療に用いられる新薬も継続的に上市されてはいるものの、その種類は抗がん剤には及ばない。結果的に、想定外（感染症に想定外はないのであろうが）の感染症が発生すると有効な治療薬が未開発である場合が多く、グローバルな移動が極めて容易な現代では容易に世界的パンデミックにつながり得る。2020年に入って発生した新型コロナウイ



赤路 健一

ルスによる感染はそのきわめて典型的な例であろう。筆者達は現在のこのような状況が起こるのであろうと想定して研究を行ってきたわけでは決してないが、たまたま下に紹介するコロナウイルスに由来する重症呼吸器症候群の治療薬を目指した基礎的研究を継続してきた。おそらくそれが編集にあたる先生の目に留まり、筆者たちが行ってきた研究を本ニュースレターで紹介させていただく機会を与えていただいたのであろうと推察する。そこで、本稿ではこれまで進めてきた研究概要とともに、研究を進めるにあたって生じた問題点やその解決の糸口などについても紹介したい。なお、本研究を含む筆者たちのプロテアーゼ阻害剤全般の研究概要については、2017年度ペプチド学会賞受賞業績紹介に簡単に述べさせていただいているため、一部重複があることをあらかじめお詫び申し上げます。

2. 重症呼吸器症候群 SARS (Severe Acute Respiratory Syndromes) とその原因ウイルス

SARS ウイルスのプロテアーゼ阻害剤に関する研究は、筆者が京都府立医科大学で独立した研究室を主宰するようになったときに開始した研究の一つである。京都府立医科大学へ移動する前に在籍していた大阪大学蛋白質研究所では、当初は異常アミノ酸やペプチドの合成と医薬化学への展開研究を行っていた。しかしそれ以上に、タンパク質そのものの最新の研究状況を知ることができたことが蛋白研での最も大きな収穫であった。蛋白質研究所では、“タンパク質”というキーワードで基礎物理から応用生物までをカバーする様々な研究や最新のセミナーが行われており、門前の小僧としてタンパク質研究に触れる最適の環境であった。また、タンパク質の化学全合成や大腸菌による組換えタンパク質合成を自分で行き、得られたタンパク質を結晶化することにも挑戦できた。この一連の経験が本稿で紹介する SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤研究に大きく役立った。

SARS は21世紀初頭に中国広東省で発生し、8500人を超える症例と約800人の死者を出した致死率の高い呼吸器疾患（重症肺炎）である。2002年にこの疾患の原因ウイルスが新種のコロナウイルス（CoV: coronavirus）であることが確認され、2003年にはWHOより終息宣言が発令された。しかしその後も類似コロナウイルスが原因となる感染症の拡大が

```

10          20          30          40          50
SGFRKMAFPS GKVEGCMVQV TCGTTTLNGL WLDDTVYCPR HVICTAEDML
60          70          80          90          100
NPNYEDLLIR KSNHSFLVQA GNVQLRVIGH SMQNCLLRK VDTSNPKTPK
110         120         130         140         150
YKFVRIQPGQ TFSVLACYNG SPSGVYQCAM RPNHTIKGSF LNGSCGSVGF
160         170         180         190         200
NIDYDCVSFC YMHMELPTG VHAGTDLEGK FYGPFVDRQT AQAAGTDTTI
210         220         230         240         250
TLNVLAWLYA AVINGDRWFL NRFTTTLNDF NLVAMKYNIE PLTQDHDVIL
260         270         280         290         300
GPLSAQTGIA VLDMCAALKE LLQNGMNGRT ILGSTILEDE FTPFDVVRQC
306
SGVTFQ

```

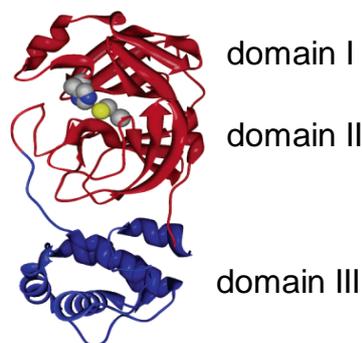


図1 SARS 3CL protease の構造

発生した。2014 年に中東地域から発生した MERS (middle east respiratory syndrome) や、2020 年現在も続く新型コロナウイルス SARS-2 による世界的感染拡大である。にもかかわらず、未だ CoV に対する有効な治療薬やワクチンは開発されていない。

SARS CoV は一本鎖 (+) の RNA を持つウイルスで、その増殖には宿主細胞内でウイルス RNA から翻訳されるプロテアーゼ (SARS 3CL protease) が必須である。したがって、このプロテアーゼ機能を止めることができればウイルスの複製を抑えることができる。このため、SARS 3CL protease 阻害剤は有望な SARS 治療薬として期待され、これまで多くの化合物が報告されてきた。しかし、いずれの化合物も臨床応用にまでは至っていない。筆者たちも高純度プロテアーゼの大量調製と立体選択的有機合成化学を組合わせたアプローチに基づく SARS 3CL protease 阻害剤設計と評価を行ってきたので以下に紹介したい。

3. SARS 3CL protease

SARS 3CL protease は 306 残基のアミノ酸からなるシステインプロテアーゼで、ウイルス由来の前駆体タンパク質をウイルス複製に必要な機能性タンパク質へとプロセッシングする機能を持つ (図 1)。その活性中心部位はキモトリプシン様構造をとるドメイン I と II の間にあり、 α ヘリックスからなるドメイン III は活性型プロテアーゼ二量体形成にかかわっている。

そこでまず、SARS 3CL protease の大腸菌を用いた発現実験を実施した。蛋白質研究所での経験から、高純度蛋白質を大量に調製するシステムを持つことで、活性評価や構造解析を阻害剤合成とシームレスにつながられることを実感していたためである。最初に、常法に従いこのプロテアーゼと maltose binding protein との融合蛋白質の調製を試みたところ、

案に反し目的タンパク質がほとんど取れなかった。SARS 3CL protease 単独の発現も試みたが、結果はほとんど同じで単離蛋白量は極めて少量であった。Maltose binding protein との融合蛋白質はきちんとできていたので、そのあとの操作に原因があると考えられた。ようやくこの SARS 3CL protease が自己分解しやすいということ突き止めるのに約 1 年かかり、分解箇所 188 位を特定し (図 2) 変異を入れることで自己分解抵抗性の変異型 R188I SARS 3CL protease を安定的に大量供給できるようになった。さらに幸運であったのは、この自己分解抵抗性プロテアーゼが天然型プロテアーゼよりも格段に高い酵素活性を持っていたことである。これにより、合成系研究室が普通に持っている分析用逆相 HPLC システムと合成ペプチド基質の組合せで容易に酵素活性の定量が行えるようになり、高価な蛍光誘導体化ペプチド基質を使う必要がなくなった。

4. SARS 3CL protease 阻害剤の設計¹

変異型 SARS 3CL protease を使って最初に見つけることができた阻害剤が、基質配列中の切断部位を His に置き換えたペプチドアルデヒドであった。さらに、量を気にせず変異型 SARS 3CL protease を使えるようになるとその結晶化条件の検討も進み、X 線結晶構造解析に耐えるきれいな単結晶を生成できるようになった。こうして SARS 3CL protease の基質配列をもとにしたペプチドアルデヒド型阻害剤 Ac-Thr-Val-Cha-His-H にたどり着くことができた² (図 3)。“基質配列をもとに” してはいるが、実は得られた阻害剤には元の基質配列は含まれていない。合成した基質型阻害剤候補化合物と SARS 3CL protease との複合体結晶構造解析によって、アミノ酸側鎖構造の最適化をある程度論理的に進めることができるようになり、基質配列にこだわらない構造最適化を

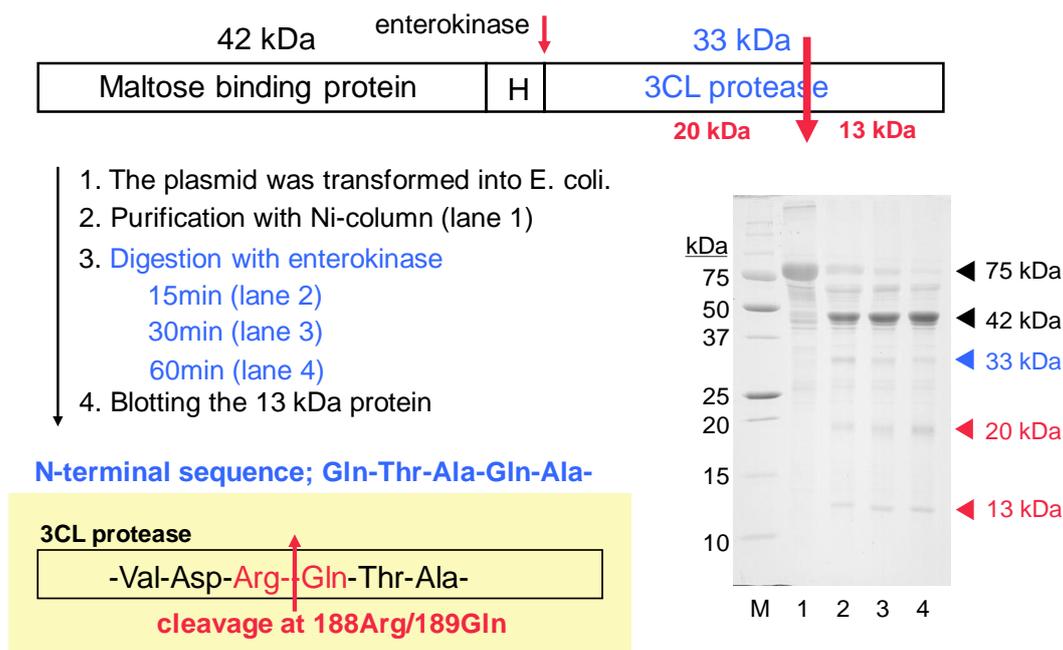


図 2 SARS 3CL protease の分解

効率よく進められるようになったのがこの配列に到達した一つの大きな要因であると考えている。

次に、経口投与が可能なシーズ化合物探索をめざし、最適化されたペプチド配列に基づく非ペプチド化を考えた。図3に示した複合体構造をPC画面上でさまざまに動かしてみると、疎水性相互作用を狙って入れたシクロヘキサン環がペプチド主鎖に近い位置にありその主鎖との推定距離が約 3.5 Å と見積もられた。これは炭素一つを挟んだ共有結合距離にほぼ等しく、シクロヘキサン環炭素を主鎖アミド結合にメチレンを介して結合できるのではないかと考えた(図4)。

単に側鎖と主鎖をつないだだけであるが、出てきた化合物は一見ただけではペプチドとは思えないヘテロ原子を含む縮環骨格を中核とする全体構造を持っていた。実際、この化合物の合成には、縮環部分の立体構造を含めたいくつかの不斉点での立体構造制御が可能な有機合成手法が必要であった。なかでも、縮環構造の立体選択的構築が鍵工程となった。実際の合成では、それまで筆者たちが別途行ってきた含窒素複素環天然物の全合成研究が活かされ、Pd(II)

触媒を用いる縮環構築反応がうまく進行してくれることが分かった。以後の合成ルートについても検討を重ねつつ、何とか目的化合物の合成に成功した。得られたデカリン型化合物は、基質ペプチドアルデヒド型阻害剤には劣るものの想定した阻害活性を確かに示し、ようやく安心して合成条件の最適化と並行してプロテアーゼとの複合体構造解析を行うことができた³(図5)。

この構造解析結果から、最初に合成した非ペプチド型阻害剤の活性低下は、プロテアーゼによって基質が切断される部位のN端側にあたるノンプライム(P3~P4)サイトでの相互作用が欠損したためであろうと推定された。そこでペプチドアルデヒド型阻害剤の相互作用様式と今回得られた縮環型阻害剤の相互作用様式をPC上で重ね合わせ、いろんな角度から再検討した。その結果、ペプチド型阻害剤(図6のグリーンの構造)のCha(cyclohexyl alanine)アミノ基窒素原子と非ペプチド型阻害剤(図6のグレーの構造)のデカリン骨格2位炭素との距離がほぼ共有結合一つ分(1.45 Å)にあたりと推測された。実際に図6に示した構造を持った修飾縮環型阻害剤を

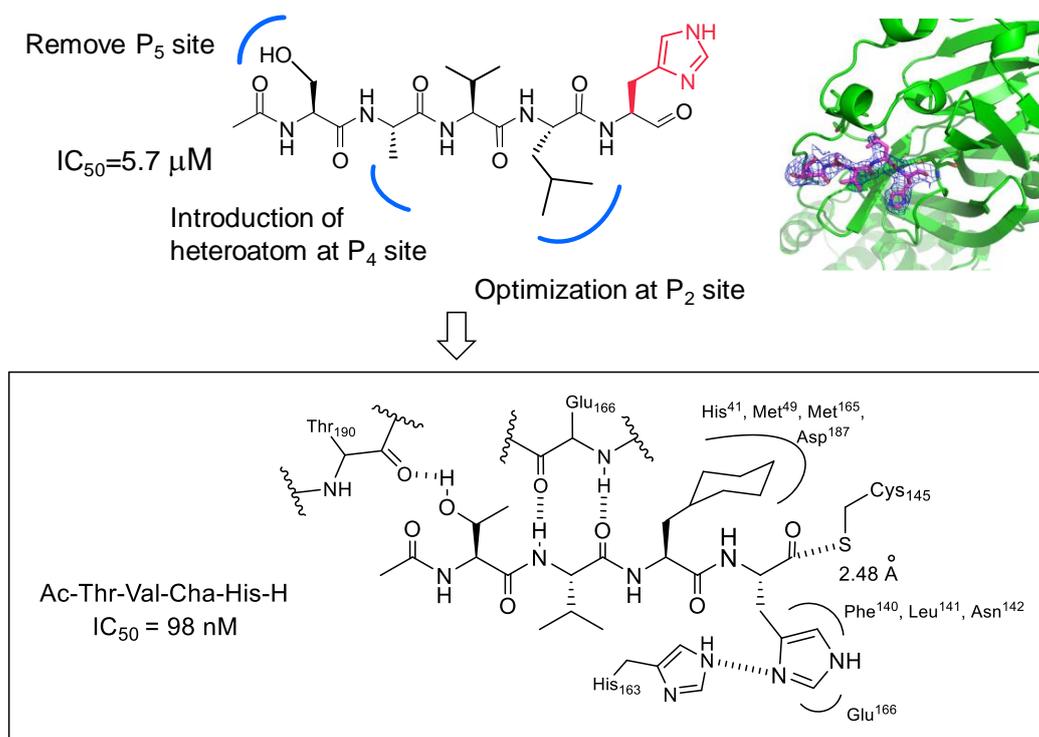


図3 ペプチドアルデヒド型 SARS 3CL protease 阻害剤の開発

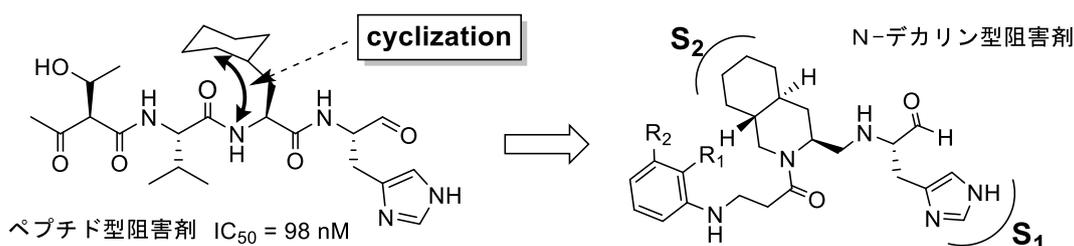


図4 ペプチド型阻害剤から非ペプチド型阻害剤へ

合成して阻害活性を調べたところ、阻害活性が置換基のない化合物の 2.5 倍程度向上することが確認できた⁴。分子レベルでの相互作用様式の解析はこれからの課題であるが、これらの結果は新しい縮環型骨格が適度な疎水性を持ったドラッグライクな新規 SARS 3CL protease 阻害剤のシーズ化合物となり得ることを示している。

5. 謝辞

ここで紹介した SARS 3CL protease 阻害剤研究は、京都府立医科大学および京都薬科大学での研究をまとめたものです。京都府立医科大学では、野坂和人准教授（現・武庫川女子大薬学部教授）、今野博行講師（現・山形大学大学院理工学研究科教授）及び照屋健太准教授（現・東北大学大学院医学研究科准教授）の先生方の協力なくして研究を進めることができませんでした。これらの先生方には、京都薬科大学でも引き続き共同研究でお世話になっております。あらためて厚く御礼申し上げます。

京都薬科大学では、小林数也准教授並びに服部恭尚講師のお二人の協力がなければ本研究を継続することができませんでした。同時に、京都薬科大学大学院生として、本研究に参画してくれた嶋本康広博士、大西康司博士、吉澤慎一郎博士に深く感謝いたします。彼らの献身的な努力と研究チームの学部生に対する的確な指導がなければ非ペプチド型阻害剤の研究遂行は不可能でした。この研究に参画してく

れた学部生や研究生のお名前をすべて上げることができないのは大変心苦しいのですが、これらの方々の努力に厚く御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

最後までお読みいただきありがとうございました。皆様のご研究の益々のご発展を祈念しております。

6. 引用文献

1. Akaji, K. *SPR - Amino Acids Pept Prot* 2018, 42, 229–280.
2. Akaji, K.; Konno, H.; Mitsui, H.; Teruya, K.; Shimamoto, Y.; Hattori, Y.; Ozaki, K.; Kusunoki, M.; Sanjoh, A. *J Med Chem* 2011, 54, 7962–7937.
3. Shimamoto, Y.; Hattori, Y.; Kobayashi, K.; Teruya, K.; Sanjoh, A.; Nakagawa, A.; Yamashita, E.; Akaji, K. *Bioorg Med Chem* 2015, 23, 876–890.
4. Ohnishi, K.; Hattori, Y.; Kobayashi, K.; Akaji, K. *Bioorg Med Chem* 2019, 27, 425–435.

あかじ けんいち
京都薬科大学
akaji@mb.kyoto-phu.ac.jp

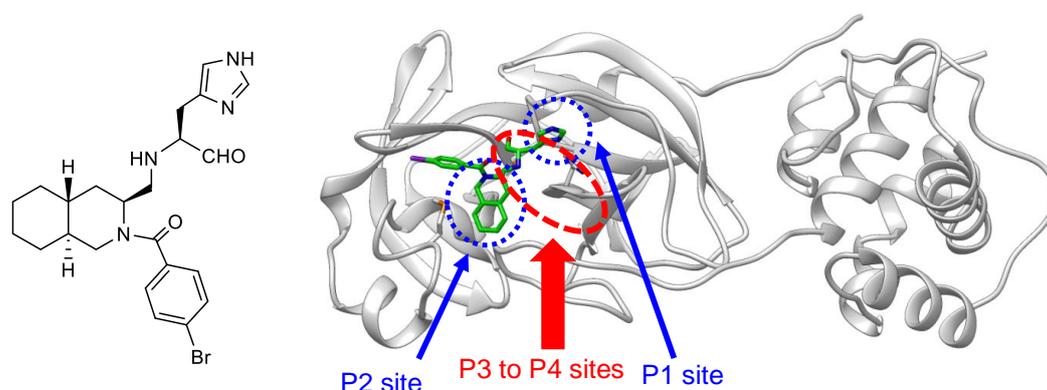


図5 非ペプチド型阻害剤と SARS 3CL protease との複合体 X 線結晶解析

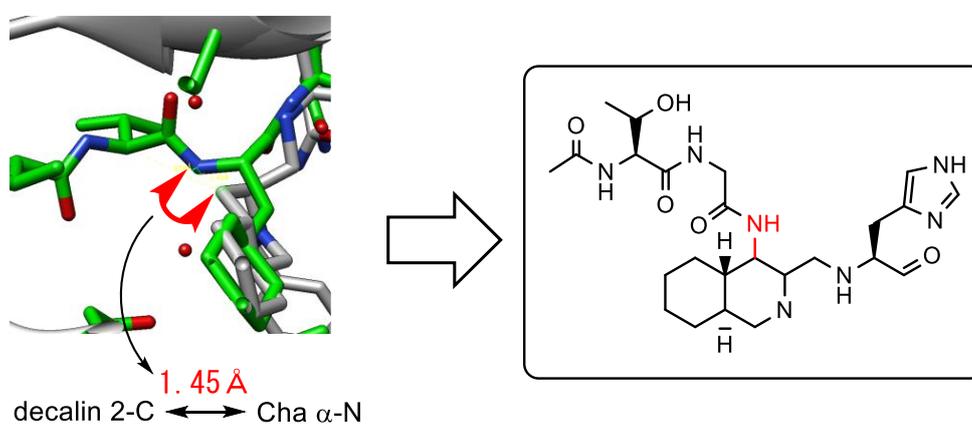


図6 非ペプチド型阻害剤の構造修飾

平面脂質膜システム評価系を用いた ポア形成ペプチドの de novo 設計

1. はじめに

この度ペプチドニュースレターへの寄稿の機会を頂きました京都大学の矢野義明先生に感謝いたします。私はこれまでナノポアと呼ばれる、脂質二分子膜中にナノサイズの孔を形成する膜タンパク質を用いた研究を行ってきました。電気生理で使用するパッチクランプアンプと平面脂質膜を再現良く安定に形成可能とするマイクロデバイスを用い、ナノポアを通過する分子を一分子レベルで分析可能です (図 1a, 1b)。この方法により最近製品化されたナノポアセンサーをご存じの方もいらっしゃるかと思います。短鎖のペプチドの中にも脂質膜中にポアを形成するものが多数あり、抗菌性ペプチドに代表されるこれらのペプチドは主に α ヘリックス構造を形成したモノマー同士が膜中で会合してポアを作ります。膜タンパク質のナノポアも多くは複数のサブユニットが会合してポアを形成しますが、膜外部分に大きな構造を持ち、そこが強く相互作用することでポア構造を安定化させ比較的大きなポア (> 1 nm) を安定に形成します。しかしペプチドが形成するポアはタン



川野 竜司

パク質が形成するような一定のサイズを長い時間にわたって形成することは難しいとわかりました。本稿では私が 2014 年に東京農工大に着任後、短鎖のペプチドを使って脂質膜中にナノポアを形成し、それを用いたナノポア計測を実現しようとしてきた研究についてご紹介致します。

2. 電気生理計測による ペプチドポア形成の評価法確立

はじめに細胞膜にポアを形成する抗菌ペプチドの中で、最も研究が進んでいるマガイニンに関して平面膜を用いた電気計測を行った。ナノポア計測に用いる膜タンパク質の測定では、電流の流れないベースラインから、ポア形成と同時に定常電流 (ポアオープン電流) が観測できる。標的分子がこのナノポアを通過すると、このオープン電流が阻害された阻害電流が観測され、その阻害電流・阻害時間から通過分子種の識別が可能となる¹。マガイニンの場合、ごく短時間の定常的なオープン電流は観測されるものの、ナノポアタンパク質ほど安定な定常電流は観測できず、また定常的なオープン電流以外にノイズ様の不定型な電流も数多く観測された (図 1c)。マガイニン以外のポア形成ペプチドを数十種類調べたが、どれもナノポア計測可能な定常電流を示すものはなかった。しかしながら、得られた電流形状をよく観察すると、4~5 の特徴的な形に分類可能であることに気づいた。ではこの異なる形状の電流波形が意味

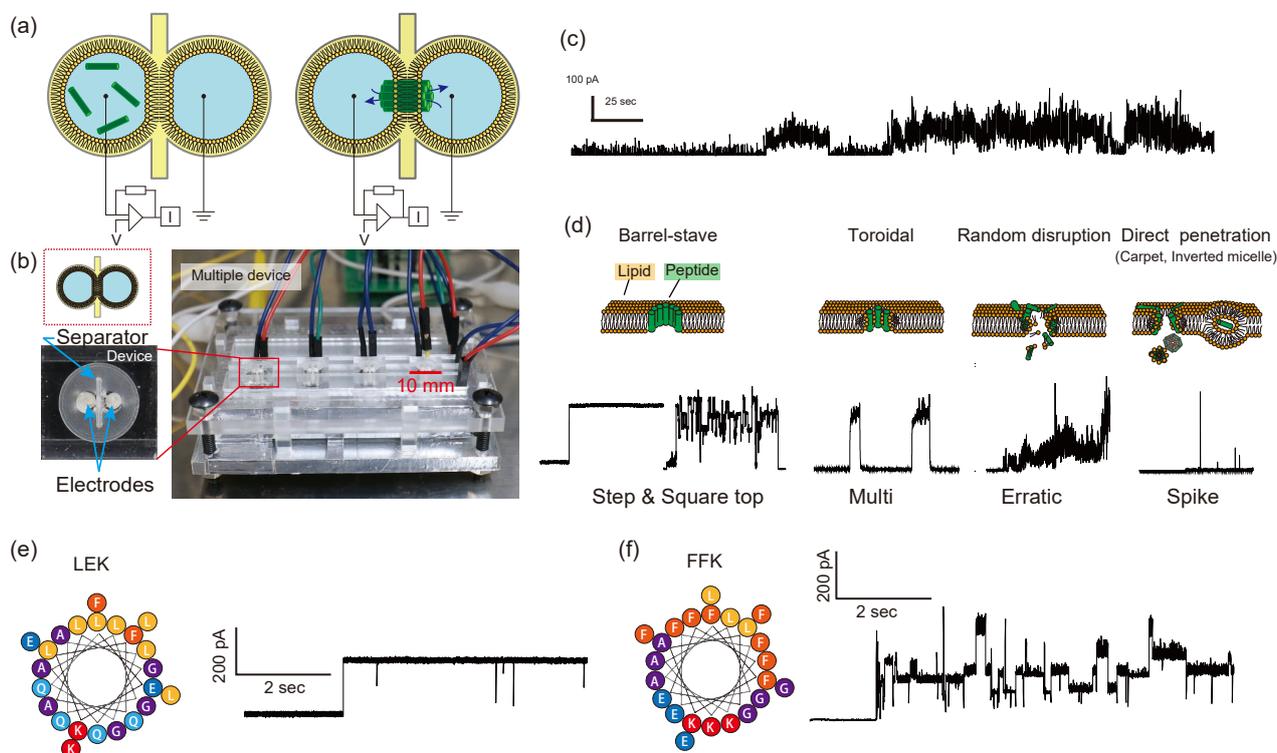


図 1 平面脂質膜システムによる脂質膜中でのペプチド会合状態とナノポア形成ペプチドの評価。(a, b) マイクロデバイス中での液滴接触法 (a) による並列脂質膜作製と電気生理計測システム (b), (c) マガイニンの電気生理計測で得られたシグナル (電流-時間計測), (d) 膜ペプチドが作る 4 種類の膜中構造と、そのときに観測される典型的なチャンネル電流シグナル, (e) Gx3G モチーフを持つ LEK の配列と典型的なチャンネル電流シグナル (step signal), (f) Gx6G モチーフを持つ FFK の配列と典型的なチャンネル電流シグナル (square-top signal)。

するものは何か？ 抗菌ペプチドのような α ヘリックス構造で脂質膜を貫通し会合するペプチドに対し、その膜中構造に関していくつかのモデルが提唱されている²。我々はこの膜中での構造の違いが異なる電流波形に起因するのでは無いかと考え、それぞれの構造モデルに適合する波形の分類を試みた。膜ペプチドの中で、特定のモデルで構造を作るペプチドを選択し、その波形を解析し、下記のように分類・同定を行った (図 1d)^{3,4}。

1. **Step signal & Square top** : 電流がベースラインからステップアップし、定常応答を示す (step)。これはペプチドモノマーが安定な会合状態を形成する barrel-stave model とした。Square top は step signal の派生形と考えられる、オープンレベルが矩形形状に変化する電流。これは barrel-stave model でポア形成後ペプチドモノマーが脱挿入することで起こると考えた。
2. **Multiple signal** : 電流がベースラインからステップアップするが、オープンレベルが不安定。これはペプチドモノマーの間に脂質分子が脱挿入される事でポアサイズが不定になると考え toroidal model に分類した。
3. **Erratic signal** : どの形にも分類できない不定型な電流変化。ペプチドが脂質膜表面に結合し濃度がある閾値を超えると界面活性剤のように膜を乱す carpet (SMH) model や、その他類似の random disruption が起こっていると考えた。
4. **Spike signal** : 電流がベースラインから急激に上昇し、すぐに元のレベルに戻るスパイク状の応答。これはペプチドの瞬間的なポア形成、または逆ミセルなどを作り脂質膜を透過する膜透過とした。

この解析では誰が分類しても同様の分類が可能になるよう電流波形の定義を数値化しており、現在計算機による自動での波形分類にも取り組んでいる。またこの方法はリアルタイム計測の結果を解析可能であるため、同一ペプチドが複数の膜中構造モデルを示した場合、各モデルの存在比や速度論的解析が可能になる。様々なポア形成ペプチドを本手法により解析したが、現在のところナノポア計測に適用可能なペプチドを発見することはできていない。

3. De novo 配列設計によるペプチドナノポア構造の構築

天然に存在するポア形成ペプチドでは所望のポア形成能を有するものを見つけることが難しかったので、ゼロからアミノ酸配列を設計することにした。最近では計算機を用いてタンパク質の高次構造を設計できるようになってきたが、本研究ではペプチドの二次構造および膜中での会合状態を設計する必要があるためマニュアルでの配列設計を行った。ここでは α ヘリックスペプチドのモノマーが脂質膜中で会合し強固な α バレル型のナノポア構造を作らせるよう設計を行った。下記に設計スキームを示す。

1. アミノ酸 23 残基とし、主鎖は α ヘリックス構造

を作るように設定する。

2. 膜タンパク質の膜貫通モチーフである GxxxG (Gx3G), もしくは GxxxxxxG (Gx6G) を導入する。
3. 脂質膜中でイオンを透過するポアを作らせるため、ヘリックスの片側を疎水性 (脂質膜面), もう片方を親水性 (ポア内部面) にするため疎水性, 親水性のアミノ酸を導入する。
4. ペプチド同士が会合するために静電相互作用部位を導入する。
5. 最後にヘリックス構造の安定性のシミュレーションを行い配列の微調整をする。

以上のスキームにより設計した配列 LEK (Gx3G) と FFK (Gx6G) を図 1e, 1f に示す。CD 測定により膜中 α ヘリックス構造を確認した後、チャンネル電流計測を行った。Gx3G モチーフを持つ LEK は barrel-stave 構造形成を示す step シグナルが観測され (図 1e), Gx6G モチーフを持つ FFK も不安定な barrel-stave 構造形成を示す square-top シグナルが観測された (図 1f)。2 次構造が同じペプチドではあるが、異なるポア形成が観測された。この違いはどこからくるのか？ 一般的に α バレル構造はペプチドモノマーが脂質膜の上下軸に対して垂直に膜貫通しているわけではなく、少しねじれた構造を取っている。天然の膜タンパク質の膜貫通部分の構造を詳細に調べた研究によると、Gx3G モチーフで作る α バレル構造は右巻きにねじれた構造に、Gx6G モチーフでは左巻きにねじれているものが多い事がわかっている⁵。このねじれはモノマー同士の接合面の角度が異なるために生じる。我々はこの会合様式の違いがモノマー同士の親和力の差に起因すると考え、シミュレーションによりそれぞれのモチーフの親和力の差を見積もった。その結果 LEK (Gx3G モチーフ) のほうが FEK (Gx6G モチーフ) よりも若干親和力が高いことがわかった。このモノマー同士の親和力の違いが、脂質膜中での会合状態の安定性の差につながっていると考えている。

4. おわりに

本稿では最近著者らが取り組んでいる、電気生理学的手法による膜ペプチドの膜中分子構造の推定、その推定に立脚したナノポア構造を形成するペプチドの de novo 設計について概説した。この知見を基盤に、現在計算機を使った α バレル構造の de novo 設計、 β バレル構造の設計に関して取り組んでいる。さらに最近ではチャンネル電流計測による膜透過ペプチド (CPP) の機能評価、任意の透過性を有する CPP の de novo 設計や脂質膜を変形させるペプチドの配列設計を試みている。また多種の配列のペプチドを簡便に合成するため無細胞翻訳系を用いたペプチド合成にも挑戦中である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、甲南大学の白井健二先生にペプチドの合成を、また脂質膜中でのペプチドの会合状態の動力学シミュレーションおよび固体 NMR 測定に関し横浜国立大の川村出先生からご協

力を頂きました。またペプチド化学に関して素人同然であった筆者に様々なご助力・ご助言を下された京都大学の二木史郎先生、東京工業大学の三原久和先生、埼玉大学の根本直人先生、鳥取大学の松浦和則先生に感謝申し上げます。また最後に実際に研究を進めてくれた研究室の学生さんやスタッフに深く感謝いたします。

文献

1. Bayley, H.; Cremer, P. S. *Nature* 2001, 413, 226–230.
2. Melo, M. N.; Ferre, R.; Castanho, M. A. *Nat Rev Microbiol* 2009, 7, 245–250.
3. Saigo, N.; Izumi, K.; Kawano, R. *ACS Omega* 2019, 4, 13124–13130.
4. Sekiya, Y.; Sakashita, S.; Shimizu, K.; Usui, K.; Kawano, R. *Analyst* 2018, 143, 3540–3543.
5. Walters, R. F. S.; DeGrado, W. F. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103, 13658–13663.

かわの りゅうじ
東京農工大学 工学研究院
生命機能科学部門
rjkawano@cc.tuat.ac.jp
<http://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/>

マウス由来マイオスタチン 阻害ペプチドの構造活性相関研究

1. はじめに

京都薬科大学生命薬科学系衛生化学分野の高山健太郎でございます。まず、この度PNJ 117号への執筆をお声がけいただきました編集委員の矢野義明先生(京都大学)に厚く御礼申し上げます。

さて本稿では、前所属の東京薬科大学薬学部薬品化学教室(林良雄教授主宰)で進めて参りました「マイオスタチン阻害ペプチド創製研究」についてご紹介致します。マイオスタチンは、骨格筋量を負に制御する生体内因子であり、筋萎縮性疾患の治療標的として注目されています¹。中和抗体やデコイ受容体などのタンパク質阻害剤の創製例が報告されている一方で^{2,3}、合成ペプチド阻害剤に関する論文報告は皆無でした。生体内のマイオスタチンは、自身の前駆体由来するプロドメインタンパク質と相互作用することで不活化されていることが知られています⁴。我々はこの不活化メカニズムに着目し、可能な限り分子サイズが小さい合成ペプチド阻害剤の創製を目指しました。分子サイズの小型化は、抗原性の低減、製造コストの低減、プロテアーゼ認識部位の減少につながることを期待してのものです。培養細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系にて阻害ペプチドの探索を実施し、マウスのマイオスタチン



高山 健太郎

前駆体プロドメインタンパク質由来する阻害ペプチド **1** (23 残基, 21–43 位, $IC_{50} = 3.5 \mu M$, 図 1) の同定に成功しました⁵。また、初期の構造活性相関 (SAR, structure–activity relationship) 研究、即ち構造最適化研究により約 10 倍阻害能が向上したペプチド **2** (22 残基, $IC_{50} = 0.32 \mu M$, 図 1) の創製に至りました^{6,7}。ペプチド **2** 獲得の成果は PNJ 111 号で紹介しておりますので、以下ではペプチド **2** を基にした研究展開を中心に、阻害能のみならず二次構造についても言及しながら概説したいと思います。

2. ペプチド側鎖間の架橋

マイオスタチン阻害ペプチド **1** は、マウスマイオスタチン前駆体プロドメインタンパク質の N 末端 α ヘリックス領域由来するペプチドであり、10% TFE (2,2,2-トリフルオロエタノール) を含有するリン酸バッファー (pH 7.4) を用いた円二色性 (CD) スペクトル測定により、 α ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示します⁸。ヘリックスブレイカーとして Pro を導入したペプチド誘導体において、 α ヘリックス性と阻害能の低下が共に認められたことから、ペプチド **1** の効果的なマイオスタチン阻害には α ヘリックス形成能が重要であると示唆されました。そこで、 α ヘリックス構造を固定することでマイオスタチン阻害活性向上を目指す検討を始めました。しかし、常套手段として用いられる側鎖間でのイオン対形成や化学的架橋をペプチド配列中の各所に施したにも関わらず、CD スペクトル測定において α ヘリックス性の明らかな低下が観察されました。一方で、マイオスタチン阻害能の顕著な減弱は認められず、不思議に思っていました。

このような状況下、別途 SAR 研究により阻害能が強化されたペプチド **2** の CD スペクトル解析を実施したところ、 β シート性を示す傾向が見出され (図 1)、マイオスタチン阻害においてペプチドの α ヘリックス形成能は絶対条件ではないことがわかってきました。そこで、このペプチド **2** に対し、($i; i+3$) の位置にそれぞれ D-Cys, Cys を導入して側鎖 SH 基間でジスルフィド架橋を施した誘導体を各種合成し、阻害活性と (α ヘリックス性が再び現れてくるかどうかの期待も込めて) 二次構造への影響を検討しました⁹。図 1 に例示するペプチド **3** は、 β シート性を保持し、ペプチド **2** と同様に効果的なマイオスタチン阻害活性を示しました。更に、ペプチド **3** のジスルフィド架橋 (25 と 28 位) と同じ領域で、Ser (24 と 28 位) の側鎖間をグルタル酸で架橋したペプチド **4** についても同様の結果が得られました (図 1)⁹。

以上の検討結果から、我々が発見・創製したマイオスタチン阻害ペプチドにおいて、側鎖間の架橋は α ヘリックス形成能の担保に基づく阻害活性強化に寄与しないことが明らかとなりました。一方で、アミノ酸置換によって、とりうる二次構造が変化し、阻害活性発現により適した「新たな相互作用様式」でマイオスタチンに作用しうることが示唆されました。

3. 小型化ペプチドの創製と酵素分解耐性

ペプチド **1** の Ala スキャン⁸により阻害活性発現に重要な残基 (図 1 青字) と同定された Trp21 と Tyr27 が欠落した小型化ペプチド **5** (16 残基) は、マイオスタチンに対する効果的阻害を示しません ($IC_{50} > 30 \mu M$, 図 1)⁵。しかし、重要残基とされる 7 残基 (Ile, Leu) がまだ配列中に残っていることに興味を持っていました。そこで、阻害能が向上したペプチド **2** の C 末端側 16 残基からなる小型化ペプチド **6**, 及びその 38 位を Trp に置換したペプチド **7** を合成し (図 1), マイオスタチン阻害能の有無について検討しました。非常に興味深いことに、ペプチド **6** および **7** が共に $10 \mu M$ の濃度においてマイオスタチンを効果的に阻害しました¹⁰。本検討の実施は、ペプチド **2** において、阻害能の強化に加え、上述 2. の検討を通して相互作用様式の変化が示唆されたことが後押しとなっています。獲得した新たなリードペプチド **7** を基にアミノ酸置換による SAR 研究を展開し、最終的に $0.13 \mu M$ の IC_{50} 値を示す MIPE-1686 (16 残基) の創出に成功しました (図 1)¹⁰。二次構造に関しては、ペプチド **1** に由来する不活性ペプチド **5** が α ヘリックス構造を形成する傾向を示したのに対し、ペプチド **6** や **7** は、由来するペプチド **2** と同様に β シート性を保持していました (図 1)。また、高いマイオスタチン阻害活性を示す MIPE-1686 は更に強力な β シート形成能を示しました (図 1)。このように本検討でも、CD スペクトル解析において、 β シート構造を形成しやすいペプチドは高いマイオスタチン阻害能を示す傾向が明らかとなりました¹⁰。

さて、ペプチドの生体利用を考えた場合、大きな課題の一つが生物学的安定性です。MIPE-1686 は、非天然アミノ酸として D-Trp32 とシクロヘキシルグリシン 2 残基 (Chg35, Chg41) を含むが、残りの 13 残基が L 体アミノ酸で構成される N 末端無保護の

直鎖ペプチドであるため、プロテアーゼに対する安定性の悪さが懸念されます。将来的な安定化誘導体の設計に繋げるべく、N 末端から消化するアミノペプチダーゼ N、及びエンドペプチダーゼであるトリプシン 3 とキモトリプシン C の 3 種のリコンビナント酵素溶液中での安定性を評価しました¹¹。ところが、予想に反して MIPE-1686 はいずれの酵素に対しても高い安定性を示し、明確な分解は認められませんでした。図 2 に一例として、アミノペプチダーゼ N ($1.0 \mu g/mL$) 溶液中、270 分間インキュベーションした際の HPLC チャートを示します (ただし、非特異的吸着により残存率が見かけ上下)。一方で、不活性ペプチド **5** はいずれの酵素でも容易に分解されることもわかりました。そこで、課題を「なぜ MIPE-1686 は酵素分解耐性を示すに至ったか?」とし、MIPE-1686 獲得に至るまでの鍵となるペプチド誘導体を用いて、酵素安定性評価を行うことにしました。その結果、酵素切断部位から離れたアミノ酸残基の置換が安定性に影響を与えることが明らかとなり、ここでも β シート形成能と酵素分解耐性との関連が示唆される知見が得られました。この詳細なデータは原著をあたっていただきたいですが¹¹、本研究の成果は、N 末端無保護の直鎖ペプチドにおいて、天然アミノ酸を用いた置換のみでも各種酵素に対する安定性を飛躍的に向上させたペプチドが創出できることを示すものであり、今後、生体利用を指向したペプチドのデザインに有用な情報を与えるものと考えています。

4. おわりに

本研究で創製した小型化マイオスタチン阻害ペプチド MIPE-1686 (16 残基) は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスへの筋注 (30 nmol/muscle) により有意な筋重量増加と握力 (筋機能) 改善効果を示しており¹⁰、また上述 3. の通り高い酵素分解耐

ペプチド	アミノ酸配列	IC_{50} (μM)	structural content (%)			
			α -helix	β -sheet	turn	random coil
ペプチド 1	WRQNT YSRIEAIKIQIL SKLRL-amide (21, 28, 32, 38, 43)	3.56	45	5	14	36
ペプチド 2	XRQNT YSRIEWIKIQII SKLRL-amide (X = 2-naphthoxyacetyl group)	0.32	8	58	0	34
ペプチド 3	XRQNT CRYCRIEWIKIQII SKLRL-amide (c = D-Cys, X = 2-naphthoxyacetyl group)	-	0	50	10	40
ペプチド 4	XRQ STRYSRIEWIKIQII SKLRL-amide (c = D-Cys, X = 2-naphthoxyacetyl group)	0.26	0	52	12	36
ペプチド 5 (不活性誘導体)	S RIEAIKIQIL SKLRL-amide	> 30	31	18	10	41
ペプチド 6	S RIEWIKIQII SKLRL-amide	-	21	46	0	33
ペプチド 7	S RIEWIKIQI W SKLRL -amide	-	11	58	0	31
MIPE-1686	W YIRwIKXQI W SKXRL -amide (w = D-Trp, X = cyclohexylglycine)	0.13	0	76	0	24

図 1 マウス由来マイオスタチン阻害ペプチド **1-7** および MIPE-1686 のアミノ酸配列 [青: ペプチド **1** の阻害能発現に重要な残基, 赤: 置換残基, 緑: 側鎖間架橋に用いた残基 (ペプチド **3**: ジスルフィド架橋, ペプチド **4**: グルタル酸を用いたジエステル架橋)], *in vitro* マイオスタチン阻害活性 (IC_{50} 値), CD スペクトル測定による二次構造解析。

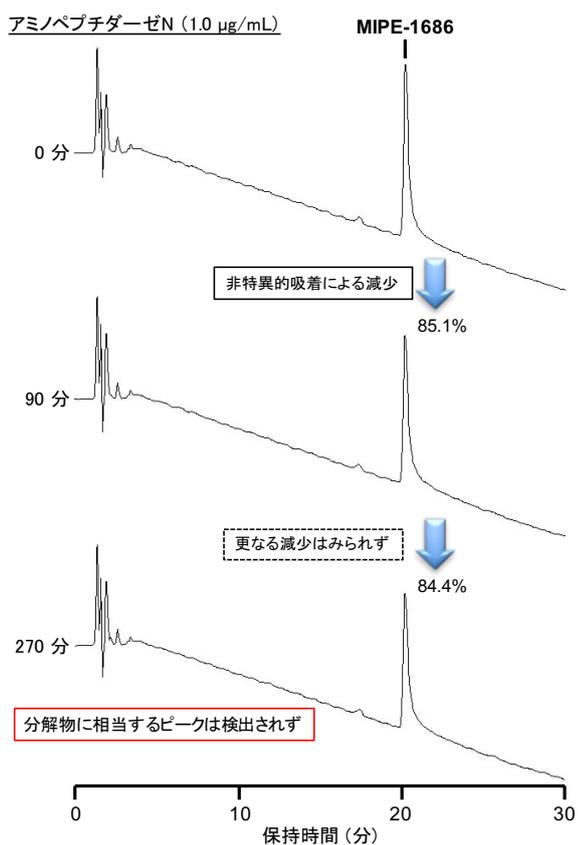


図2 アミノペプチダーゼ N (1.0 µg/mL) 溶液中での MIPE-1686 の安定性 (百分率は 0 分の面積値に対する各時点の相対値)。参考文献 11 の Fig. 1 を一部改変¹¹。

性を有することから、今後の *in vivo* 研究や創薬候補分子として有用性が高い誘導体と言えます。現在も、筋ジストロフィーをはじめとして、筋萎縮病態を伴う様々な疾患に対するマイオスタチン阻害ペプチド創薬の可能性を追求しています。近い将来、*in vivo* 実験で得られる知見を改めて紹介できることを筆者自身が一番楽しみにしています。最後になりましたが、本研究の遂行にあたりましては、東京薬科大学薬学部薬物送達学教室の根岸洋一教授の多大なる御支援を賜りました。この場を借りて深謝申し上げます。また、東京薬科大学薬学部薬品化学教室においては、精力的な誘導体合成や CD 測定、培養細胞実験に尽力して頂いた学生の方々、側鎖間架橋誘導体の合成に注力いただいた Cédric Rentier 博士研究員、多方面から研究を御支援いただきました林良雄教授、谷口敦彦准教授、田口晃弘講師に感謝申し上げます。

参考文献

1. McPherron, A. C.; Lawler, A. M.; Lee, S.-J. *Nature* 1997, 387, 83–90.
2. Becker, C.; Lord, S. R.; Studenski, S. A.; Warden, S. J.; Fielding, R. A.; Recknor, C. P.; Hochberg, M. C.; Ferrari, S. L.; Blain, H.; Binder, E. F.; Rolland, Y.; Poiraudau, S.; Benson, C. T.; Myers, S. L.; Hu, L.; Ahmad, Q. I.; Pacuch, K. R.; Gomez,

- E. V.; Benichou, O. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015, 3, 948–957.
3. Campbell, C.; McMillan, H. J.; Mah, J. K.; Tarnopolsky, M.; Selby, K.; McClure, T.; Wilson, D. M.; Sherman, M. L.; Escobar, D.; Attie, K. M. *Muscle Nerve* 2017, 55, 458–464.
4. Cotton, T. R.; Fischer, G.; Wang, X.; McCoy, J. C.; Czepnik, M.; Thompson, T. B.; Hyvönen, M. *EMBO J* 2018, 37, 367–383.
5. Takayama, K.; Noguchi, Y.; Aoki, S.; Takayama, S.; Yoshida, M.; Asari, T.; Yakushiji, F.; Nishimatsu, S.; Ohsawa, Y.; Itoh, F.; Negishi, Y.; Sunada, Y.; Hayashi, Y. *J Med Chem* 2015, 58, 1544–1549.
6. Takayama, K.; Rentier, C.; Asari, T.; Nakamura, A.; Saga, Y.; Shimada, T.; Nirasawa, K.; Sasaki, E.; Muguruma, K.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Negishi, Y.; Hayashi, Y. *ACS Med Chem Lett* 2017, 8, 751–756.
7. Takayama, K.; Nakamura, A.; Rentier, C.; Mino, Y.; Asari, T.; Saga, Y.; Taguchi, A.; Yakushiji, F.; Hayashi, Y. *ChemMedChem* 2016, 11, 845–849.
8. Asari, T.; Takayama, K.; Nakamura, A.; Shimada, T.; Taguchi, A.; Hayashi, Y. *ACS Med Chem Lett* 2017, 8, 113–117.
9. Rentier, C.; Takayama, K.; Saitoh, M.; Nakamura, A.; Ikeyama, H.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Hayashi, Y. *Bioorg Med Chem* 2019, 27, 1437–1443.
10. Takayama, K.; Asari, T.; Saitoh, M.; Nirasawa, K.; Sasaki, E.; Roppingi, Y.; Nakamura, A.; Saga, Y.; Shimada, T.; Ikeyama, H.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Negishi, Y.; Hayashi, Y. *ACS Med Chem Lett* 2019, 10, 985–990.
11. Takayama, K.; Odagiri, M.; Taguchi, A.; Taniguchi, A.; Hayashi, Y. *Chem Pharm Bull* 2020, 68, 512–515.

たかやま けんたろう
京都薬科大学 生命薬科学系
衛生化学分野
ktaka59@mb.kyoto-phu.ac.jp

第 57 回ペプチド討論会は オンラインでの開催になります

第 57 回ペプチド討論会は本年 11 月 9 日から 11 月 11 日の間、とりぎん文化会館（鳥取県鳥取市）にて開催の予定でしたが、新型コロナウイルス感染拡大防止の観点からオンラインでの開催となりました。詳細は第 57 回ペプチド討論会ウェブサイト (<https://www.peptide-soc.jp/57jps/>) をご参照ください。

海外学会開催情報

第 36 回ヨーロッパペプチドシンポジウム/ 第 12 回国際ペプチドシンポジウム (延期)

新型コロナウイルス感染拡大防止のため、第 36 回ヨーロッパペプチドシンポジウム/第 12 回国際ペプチドシンポジウム (36EPS/12IPS) は 2021 年 8 月 29 日から 9 月 3 日までの開催となりました。会場は Hotel Melià-Sitges (Sitges, Spain) で変更ありません。詳しくは 36EPS/12IPS ウェブサイトをご覧ください。

- 36EPS/12IPS ホームページ
<https://www.eps2020.com/>
- Statement of the EPS 2020 on COVID-19
<https://www.eps2020.com/covid/>

第 16 回中国ペプチドシンポジウム (延期)

新型コロナウイルス感染拡大防止のため、第 16 回中国ペプチドシンポジウム (CPS2020) は 2020 年 11 月まで延期されました。詳しくは CPS2020 ウェブサイト (<http://www.cps2020-international.cn/>) をご覧ください。

第 24 回韓国ペプチドタンパク質学会シンポジウム (韓国国内参加者のみで開催)

新型コロナウイルス感染拡大防止のため、第 24 回韓国ペプチドタンパク質学会シンポジウムは今秋、韓国国内参加者のみで開催されることになりました。日本ペプチド学会員を含め、海外ペプチド学会員の招待はありません。

日本ペプチド学会 第 16 期役員

- 会 長** 野水 基義 (東京薬科大)
副会長 三原 久和 (東京工業大)
理 事 大高 章 (徳島大) (庶務担当)
向井 秀仁 (長浜バイオ大) (会計担当)
玉村 啓和 (東京医歯大) (広報担当)
二木 史朗 (京都大) (渉外担当)
赤路 健一 (京都薬科大) (国際 PS 担当)
藤井 郁雄 (大阪府立大) (海外 PS 担当)
小出 隆規 (早稲田大) (若手担当)
伊東 祐二 (鹿児島大) (会員担当)
監 事 津田 裕子 (神戸学院大)
南野 直人 (循環器病研究センター)
評議員 糸永 全宏 (国産化学)
大石 真也 (京都薬科大)
金井 和昭 (JITSUBO)
川上 徹 (大阪大)
栗山 尚浩 (ワイエムシィ)
黒澤 渉 (味の素)
今野 博行 (山形大)
坂口 和靖 (北海道大)
菅 裕明 (東京大)
相馬 洋平 (東京大)

- 出水 庸介 (医薬品食品衛生研)
土井 隆行 (東北大)
中瀬 生彦 (大阪府立大)
鳴海 哲夫 (静岡大)
関 正博 (神戸天然物化学)
野村 渉 (広島大)
林 良雄 (東京薬科大)
日高 雄二 (近畿大)
平井 雅寛 (長瀬産業)
深瀬 浩一 (大阪大)
北條 裕信 (大阪大)
松浦 和則 (鳥取大)
松崎 勝巳 (京都大)
松島 綾美 (九州大)
南方 宏之 (サントリー生命科学財団)
森脇 浩樹 (浜理薬品工業)
吉矢 拓 (ペプチド研究所)
渡邊 路維 (渡辺化学工業)

2020 年度行事予定

- 2020 年 8 月 10 日 (月) ~ 12 日 (水)
第 52 回若手ペプチド夏の勉強会 (中止)
- 2020 年 10 月 (予定)
2020 年度日本ペプチド学会通常総会 (書面総会)
- 2020 年 11 月 8 日 (日)
日本ペプチド学会市民フォーラム 2020 (中止)
- 2020 年 11 月 (予定)
第 105 回理事会・第 39 回評議会合同会議
- 2020 年 11 月 9 日 (月) ~ 11 月 11 日 (水)
第 57 回ペプチド討論会 (オンライン開催)
世話人: 松浦 和則, 河野 強 (鳥取大学)
- 2021 年 1 月 (予定)
第 106 回理事会

編集後記

ペプチドニュースレター 117 号をお届けします。新型コロナウイルス感染症への対応が大変な中、ご執筆を頂きました先生方に感謝申し上げます。コロナウイルスに関連したトピックとして、赤路先生に SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤のご研究をご紹介頂きました。川野先生には膜と相互作用しポアを作るペプチド、高山先生には骨格筋量を調節するペプチドについて最新の研究をご紹介頂きました。今回初めて編集を担当させて頂き、改めてペプチド研究の幅の広さを感じています。現在学会などの集会活動は大きく制限され皆様と会うこともままならない状況ですが、ニュースレターを通して先生方の「気」も

感じて頂ければと思います。

また、本ニュースレターに関する読者アンケートを行っております。ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

117号アンケートフォーム URL：

<https://forms.gle/bJ1AEQZ92RLsuUdw9>

(編集委員：矢野 義明)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-0015 箕面市稲 4-1-2

一般財団法人蛋白質研究奨励会内

発行日：2020年7月30日

編集委員

玉村 啓和 (担当理事)

(東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

TEL 03-5280-8036, FAX 03-5280-8039

E-mail: tamamura.mr@tmd.ac.jp

鎌田 瑠泉 (北海道大学大学院理学研究院)

TEL 011-706-2721, FAX 011-706-4683

E-mail: kamadar@sci.hokudai.ac.jp

矢野 義明 (京都大学大学院薬学研究科)

TEL 075-753-4529, FAX 075-753-4578

E-mail: yano.yoshiaki.6z@kyoto-u.ac.jp

吉矢 拓 (株式会社ペプチド研究所)

TEL 072-643-4411, FAX 072-643-4422

E-mail: t.yoshiya@peptide.co.jp

児島 千恵 (大阪府立大学大学院工学研究科)

TEL 072-254-8190

E-mail: kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

(本号編集担当：矢野 義明)