



核酸結合性機能化タンパク質を得るための合成化学の追究

我々は、生命の化学的イロハを学ぶために、これまで核酸化学研究に力を置いてきた。これまでの *in vitro* の核酸反応研究では単に緩衝液中に溶解した DNA や RNA に対する反応が観察されてきたが、細胞の中で核酸が置かれた環境はそれらとは大きく異なっており、常にタンパク質が寄り添った複雑な構造を形成した状態で核酸は反応している。したがって、細胞内の核酸反応制御を議論するためには、核酸に結合するタンパク質の構成原子の一つ一つの役割もまた明らかにされるべきであり、そのためにタンパク質もまた核酸同様に丹念に化学合成されなければならない。また、今世紀に入ってエピジェネティクス研究が急激に伸長しており、核酸やタンパク質の修飾が俄然注目されるようになった。タンパク質表面には数多くのエピジェネティック修飾が機能して分子間・分子内でさまざまなクロストークを誘起しているが、それらを調べるためには箇所特異的な修飾を持つタンパク質を純度良くかつ *in vitro* 実験に費やせる量を得なければならず、やはり化学合成に着目せざるを得ない。既に核酸の箇所特異的な化学修飾の方法は確立されており、化学修飾された後の構造も二重らせん構造が土台になっている限りは予測可能である。一



岡本 晃充

方、タンパク質の箇所特異的な化学修飾の方法は限られており、化学修飾された後の構造の変化も気がかりだった。しかし、近年の研究を通して、ペプチド自動合成法とネイティブケミカルライゲーション (NCL) の進化とともに化学合成でポリペプチドが得られるようになり、また、システインを含まない鎖であればいくつ化学修飾したとしても野生型のタンパク質構造と大差ない構造で再構成できそうであることがわかってきた。

私は理研在職中に、エピジェネティックな修飾としてよく知られる 5-メチルシトシンを含む DNA を配列特異的に認識する方法を探索していた。既にバイサルファイトシーケンシングや我々が開発した「ICON プロブ」などがあったが、いずれも DNA を 1 本鎖へ分解する工程の効率が低く、改善が求められていた。そこで、我々は、2 本鎖のままメジャーグループにあるシトシン 5 位のメチル基を化学的に認識するべく、核酸をメジャーグループから認識できる亜鉛フィンガーを化学的に改変する研究に着手した。幸い、亜鉛フィンガー研究の第一人者である杉浦幸雄先生の研究室を出た野村章子博士が所属していたので、これを早速設計してもらった。5-メチルシトシンを認識する箇所は我々の手でアミノ酸をデザインすることを条件にしたので、亜鉛フィンガーを核酸からの翻訳ではなく化学合成で作成してもらった。5-メチルシトシンのメチル基と効果的に CH- π 結合を形成できる箇所にパラ置換フェニルアラニンを含むタンデム亜鉛フィンガーペプチドを種々検討した結果、リン酸化チロシンを導入することによってメチル化特異的な認識を実現

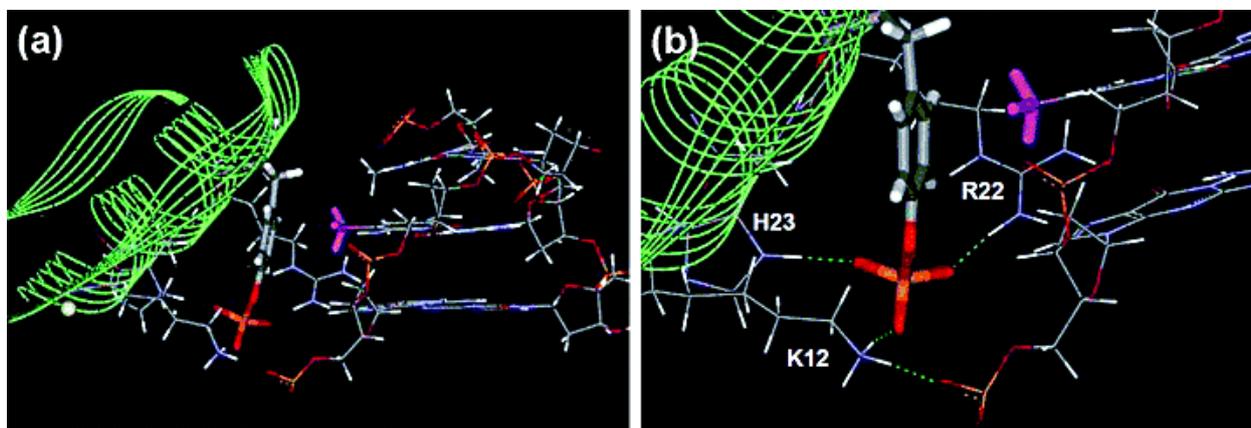


図1 リン酸化チロシンを含む化学合成亜鉛フィンガーによる 2 本鎖 DNA 内の 5-メチルシトシン (紫がメチル基) の認識。(a) サイドビュー、(b) 相互作用に着目した拡大図 (Biochemistry 2011, 50, 3376-3385., ACS から転載許可済)

した^{1,2} (図 1)。このリン酸化ペプチドは 2 本鎖 DNA を変性させることなく 5-メチルシトシンを検出できるので、その後のエピジェネティクス研究へ大きく展開できそうな結果であったが、59 アミノ酸長のポリペプチドを一度に化学合成することは当時は容易ではなかった。ジャンクばかりの HPLC フラクションから目的のポリペプチドを拾い出すことができたのは野村博士の卓越した力であって、この時点では残念ながらこの研究を長く継続することは難しいと実感していた。

こうした問題を抱えながら、2012 年に私が東京大学へ移動して、そこへ林剛介助教 (現・名古屋大学准教授) が研究室に加わった。彼は、菅裕明先生の研究室でポスドクを経験しており、ペプチド化学に造詣が深かった。エピジェネティクス研究に関わりたいという本人の希望もあり、エピジェネティクス機構のメインプレーヤーであるヒストンタンパク質の合成を標的としてその化学合成法の確立にとりかかってもらった。例えば、合成標的タンパク質の一つ、ヒストン H2A は、前述のタンデム亜鉛フィンガーペプチドの 59 アミノ酸長をはるかに超える 129 アミノ酸長であり、ペプチド合成機で到底合成することができない。当時大学院学生だった末岡拓馬博士が中心になって、まずは既報のタンパク質化学合成の一連の工程、(i) 短鎖ペプチド合成、(ii) NCL、(iii) 脱硫反応を我々の研究室内で実施できるように整備し、化学修飾を含むヒストン H2A を作り上げた³。また、Y57 をリン酸化した H2A を合成して、このリン酸化が H2A-H2B ヘテロ二量体が不安定化することを実証した⁴。この研究を進めるうちに、多数のペプチド鎖を連結する必要があるタンパク質化学合成がルーティンで用いられるよ

うになるにはまだ多くの問題が残されていることに我々は気づいた。例えば、(1) 繰り返される NCL ごとに精製工程を必要とすること、(2) NCL において Asp などのカルボン酸側鎖を有するアミノ酸のチオエステルを用いるとき副反応生成物が生じること、(3) チオエステルが加水分解されやすいこと、(4) 脱硫反応がアセチレンユニットや色素を損傷することなどが挙げられた。つたない我々の研究に対して大阪大学北條裕信先生や川上徹先生から大変貴重なご助言いただきながら、梁瀬将史博士、神山健太君、加茂直己君ほか研究室の多くの大学院生がこれらの問題に取り組み、この数年でタンパク質化学合成法は大きく改良されたと考えている。例として、パラジウムによる迅速 Alloc 基除去と 4-メルカプトフェニル酢酸の触媒毒効果を併用したワンポット NCL の開発は、タンパク質化学合成の収率を劇的に向上させた⁵。既報のワンポット法ではチアゾリジン型やトリフルオロアセトアミドメチル基で保護された Cys 末端を都度メトキシアミンの量や pH を厳密に調整して脱保護、連結を繰り返してきたが、我々の方法は一定時間ごとに順次パラジウム錯体とペプチドセグメントを加えていくだけで良い。ポイントは、Pd/TPPTS 錯体による Cys 末端からの迅速な Alloc 除去と並行して、NCL 活性化のために加えられた 4-メルカプトフェニル酢酸によって緩やかに Pd/TPPTS 錯体の失活が進むことである (図 2)。一つの容器の中で一見矛盾した反応が並行しているが、それらの反応速度の差を上手に活用することによって、連結ペプチド末端の Alloc 基除去に用いられた残存パラジウムが次に添加されるペプチドセグメントの Alloc 基まで除去してしまうことがなくな

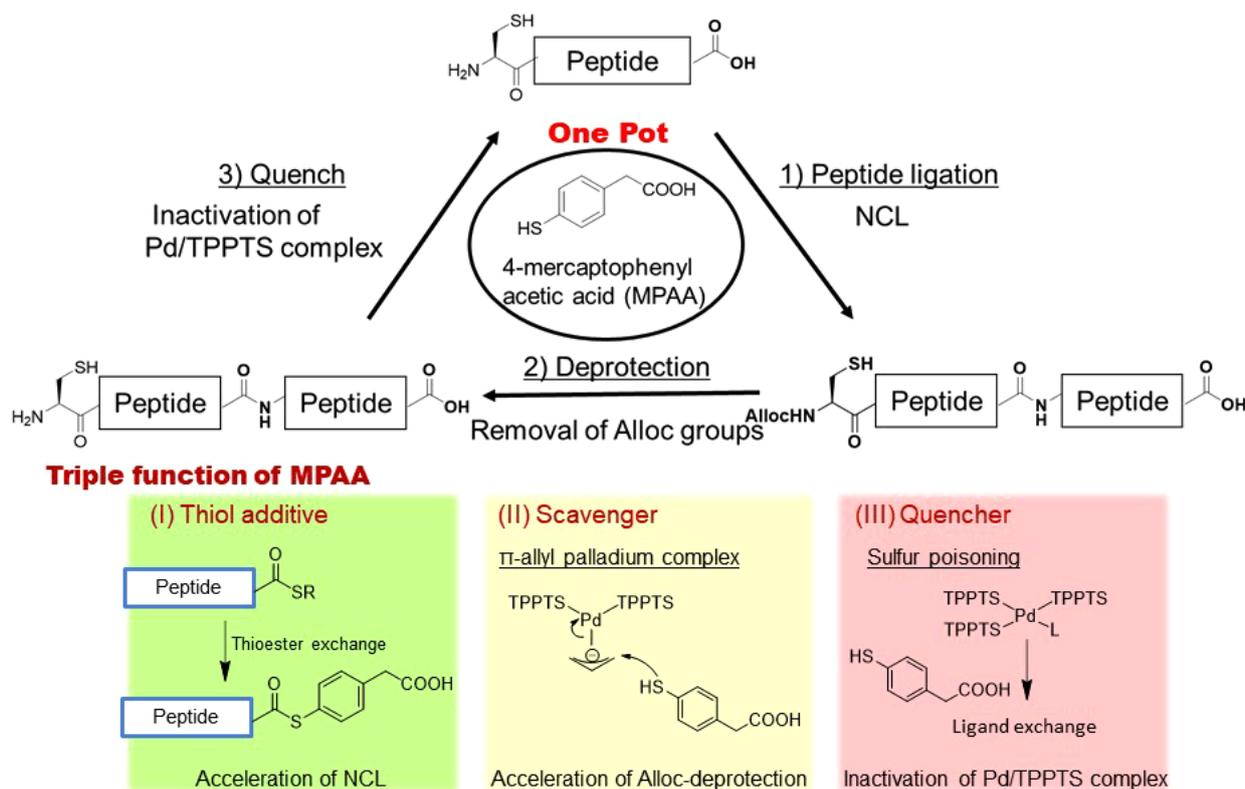


図 2 ワンポット NCL 系へ加えられる 4-メルカプトフェニル酢酸の 3 つの役割

る。失活したパラジウムは反応系の外に追いやられるので、工程ごとに精製する必要がない。本法は、十分に効率的な合成法であり、実際にヒストンバリエント H2AX などを合成することによって実証した(図 3)。しかし、まだなおペプチドの 2 当量以上の Pd/TPPTS 錯体を各連結工程で追加投与する必要があり、錯体の使用を触媒量まで減らすことがコスト面での課題として残された。この課題に対して加茂君が精力的にワンポット NCL に最適な金属触媒を探索したところ、ルテニウム錯体 [CpRu(η^3 -allyl)(L)]PF₆ (L = 4-dimethylaminoquinoline-2-carboxylate) が上記パラジウム錯体に代わって触媒的 (0.2 当量) に働くことを見つけた。このルテニウム錯体は、Alloc 基の除去においてパラジウムの時の 50 倍の触媒活性を示し、5,000 倍の 4-メルカプトフェニル酢酸が混在しても触媒活性を維持し続ける。これを用い

て、アセチル化、リン酸化、シトルリン化、ユビキチン化を含むヒストン H1.2 (212 アミノ酸長) やヘテロクロマチンタンパク質 HP1 α (191 アミノ酸長) を効率的に合成し、これらの合成タンパク質におけるそれぞれのエピジェネティック修飾が DNA への結合へ及ぼす効果を明らかにした⁶。

ここでもう一つタンパク質化学合成を紹介するならば、チオエステル前駆体 (crypto-thioester) の設計について取り上げたい。NCL の準備段階において Cys による求核攻撃を受けるチオエステル末端をどうやって準備するかが NCL 成功の重要なカギになる。活性化チオエステルが Cys による求核攻撃の前に分解すると NCL の収率が大幅に下がる (上述問題点の (2)と(3))。また、連続して NCL を行う場合には C 端側からペプチドセグメントを順次連結していくことが多いが、NCL 系中でも安定なチオエステル前駆体を

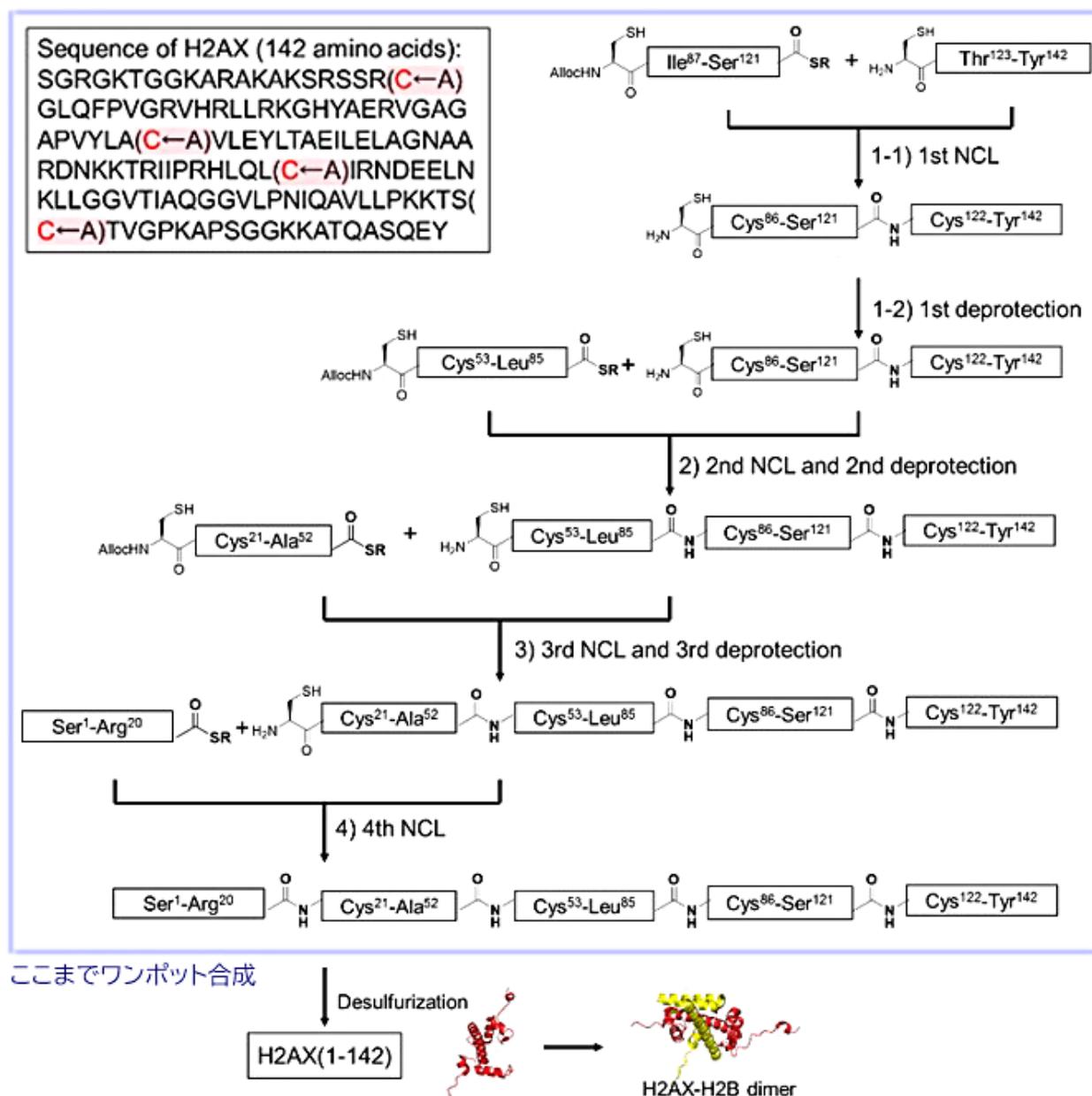


図 3 ワンポット NCL を用いた H2AX 合成の例

用意することができれば N 端側からペプチドセグメントを順次連結することが可能になる。つまり、直線的な合成工程よりも効率的である収束型の合成工程を選択できるようになる。チオエステル前駆体の研究はすでに川上先生と相本三郎先生によってシステイニルプロリルエステルを原料とするチオエステル生成法が精力的に研究されており、我々は先生がたの論文を参考にして上述の課題の解決に取り組んだ。我々のアプローチでは、中性条件でのシステイニルプロリルイミドの N-S アシルシフトによるジケトピペラジンチオエステルの効率的な形成がカギになる。林助教や梁瀬博士らが精力的に探索したところ、固相担体上で合成できるとともに加水分解耐性があり、かつ簡便な活性化工程でチオエステルへ変換できるユニットとして、システイニルプロリルイミド「CP-MeOxd-Tle」を見出した⁷。ペプチド自動合成後に合成ペプチド C 端の(保護) Cys-Pro-Thr-Tle-Resin に対してカルボニルジイミダゾールを処置して、それから担体から切り出すことによって(保護) CP-MeOxd-Tle ユニットの C 端に持つペプチドセグメントが得られる。Cys 側鎖の保護基を除くことによって N-S アシルシフトを経由するジケトピペラジンチオエステルの形成が進行し、続いて N 端に Cys を有するペプチドセグメントを系中へ与えることによって速やかに NCL 産物が得られた。脱保護の方法として上述のパラジウム錯体とその失活のサイクルを用いることによってヒストンバリアント H2A.Z の合成も実現することができた。さらに、大学院生の中津幸輝君が効率的なシステイニルプロリルイミドを詳細に探索したところ、「CP-Thd-Ile」を見出した⁸(図 4)。CP-Thd-Ile ユニットの(保護) Cys-Pro-Cys-Ile-Resin から作成することができ、活性化後のジケトピペラジンチオエステルの形成が極めて速い。

このように核酸と相互作用するタンパク質を構成する一つ一つの原子の役割を知りたいという欲求から始まり、そのために必要な修飾タンパク質の簡便化学合成法を提案するに至った。我々はそろそろタンパク質による遺伝子発現制御の研究へこの技術を生かしたいと考えている。一方で、人工核酸の合成法と比べて人工タンパク質の合成法は多くの研究者から要望されている割にはまだ人口に膾炙されていない。我々が開発した方法も含めて簡便合成法をペプチド合成を専門としない科学者や企業でもさらりと使えるように、その環境を整えていくことが開発者の責務だと考えてい

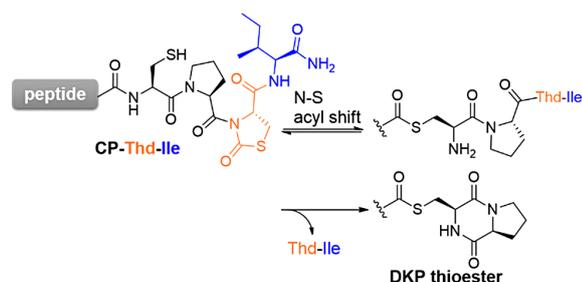


図 4 CP-Thd-Ile から活性チオエステルへの効率的変換 (Org Lett 2020, 22, 4670–4674., ACS から転載許可済)

る。自分でデザインした機能性タンパク質がこれらの合成法を使って手軽に一定量得られるようになれば、タンパク質構造化学から創薬まで分子デザインのアイデアの自由度が爆発的に広がるだろう。

本研究成果は、文中に示したスタッフや学生を始めとする東京大学および理研の岡本研究室メンバーの日々の努力の賜物であり、ここに深謝したい。また、研究を進めるにあたって多くのご助言をくださった文中の先生がたやサンプル供与してくださった東京大学定量研の胡桃坂仁志先生に感謝いたします。

参考文献

1. Nomura, A.; Okamoto, A. *Biochemistry* 2011, 50, 3376–3385.
2. Nomura, A.; Sugizaki, K.; Yanagisawa, H.; Okamoto, A. *Chem Commun* 2011, 47, 8277–8279.
3. Hayashi, G.; Sueoka, T.; Okamoto, A. *Chem Commun* 2016, 52, 4999–5002.
4. Sueoka, T.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Biochemistry* 2017, 56, 4767–4772.
5. Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Angew Chem Int Ed* 2018, 57, 16533–16537.
6. Kamo, N.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Murakami, H.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem Sci* 2021, DOI: 10.1039/D1SC00731A.
7. Yanase, M.; Nakatsu, K.; Cardoso, C. J.; Konda, Y.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem Sci* 2019, 10, 5967–5975.
8. Nakatsu, K.; Yanase, M.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Org Lett* 2020, 22, 4670–4674.

おかもと あきみつ
 東京大学 先端科学技術研究センター
 (大学院工学系研究科 化学生命工学専攻・
 先端学際工学専攻)
 okamoto@chembio.t.u-tokyo.ac.jp
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/okamoto/>

N-Sulfanylethylanilide (SEAlide) を 基盤としたアフィニティーラベル化技術の開発 — ペプチド業界に戻ってきました! —

1. はじめに

徳島大学大学院医歯薬学研究部 機能分子合成薬学分野 (大高研究室) の傳田将也です。この度は、本ニュースレターへの寄稿の機会を頂きましたこと、大変光栄に感じるとともに、お声かけ頂きました九州大学 巢山慶太郎先生に厚く御礼申し上げます。



傳田 将也

私は、徳島大学大高先生ご指導の下、ペプチド業界に足を踏み入れ、2016年博士号取得しました。その後、京都大学医学部附属病院薬剤部において臨床薬剤師業務、臨床研究そして京都大学薬学研究科においては臨床薬学教育に携わってきました。その間、ペプチドからはしばらく足を洗っていましたが、恩師大高先生から「ペプチド化学の修業が足らん!」とのお叱りを受け、2020年4月、徳島大学大高研究室に助教として着任、「ペプチド業界」に復帰いたしました。ペプチド学会の皆様、これからもご指導の程、何卒よろしくお願い致します。さて、赴任後に始めた研究は、未発表データがほとんどであるため、本稿では学生時代に取り組んだアフィニティーラベル化を基盤とした新規タンパク質ラベル化技術の開発とその応用展開について紹介させていただきます。

2. アフィニティーラベル化を基盤とした新規ラベル化技術の開発

タンパク質機能解析法の一つに、機能解析対象タンパク質選択的に蛍光色素などの標識でラベル化し、その標識の動的挙動を足掛かりとする方法が挙げられます。そのため標的選択的なラベル化技術はタンパク質機能解析研究の基盤技術の一つと考えられます。これまでに報告されたラベル化法としては、タンパク質-リガンド間相互作用を利用したアフィニティーラベル化法が挙げられ、多くの研究グループが多様なアフィニティーラベル化技術の開発に向け研究を行っています¹。アフィニティーラベル化法では一般的に、蛍光色素などの「標識部位」とタンパク質特異的に相互作用する「リガンド部位」およびタンパク質と結合を形成する「反応部位」を持つラベル化試薬が利用されます。これまでに報告された技術はどれも高汎用性であるとともに、化学的に大変興味深い「反応部位」を利用しています。その一例として京都大学の浜地先生らの研究グループは、トシル基やアシルイミダゾール基を反応部位として利用したラベル化試薬を報告しています^{2,3}。これら背景から我々は、タンパク質機能解析研究の更なる発展に貢献する事を目標に、新規アフィニティーラベル化技術の開発に向け研究を行いました。

さて我々の研究グループではこれまでに、チオエステル等価体として機能する *N*-sulfanylethylanilide (SEAlide) を開発しました⁴。SEAlide を用いたタンパク質化学合成研究の過程において佐藤 (現 静岡大学) らが行った研究から、SEAlide は求核反応に対して有機化学的に安定なアニリド型として存在するがリン酸などの酸塩基触媒の添加をトリガーとしてチオエステル型へ活性化される事が明らかになっています⁵ (図 1 (A))。我々は、タンパク質

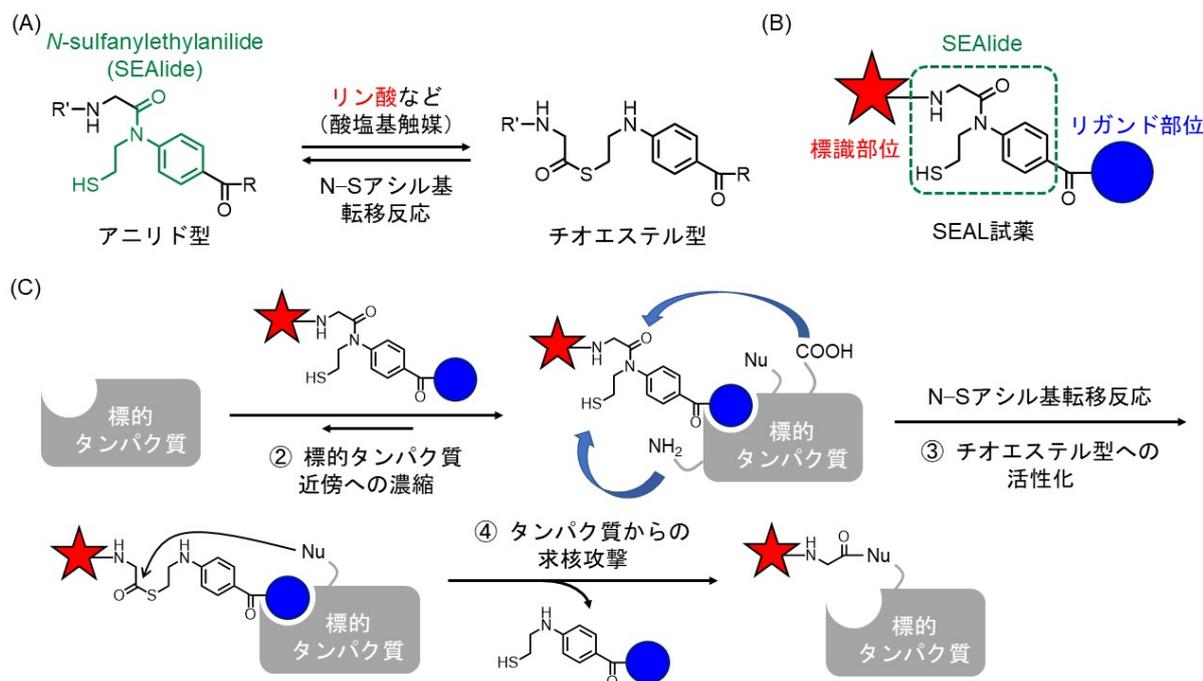


図 1 *N*-sulfanylethylanilide (SEAlide) と SEAlide を用いた SEAL 技術の概念図。(A) 酸塩基触媒による SEAlide の N-S アシル基転移反応スキーム、(B) SEAL 試薬の分子概念図、(C) SEAL 試薬を用いたタンパク質ラベル化ストラテジー

表面には多数の酸性、塩基性官能基が存在することからタンパク質もリン酸同様に酸塩基触媒様機能を有すると考え、SEAlide を基盤としたラベル化 *N*-sulfanylethlanilide-based labeling (SEAL) 技術の開発に取り組むことにしました⁶。

3. SEAL 試薬の設計とラベル化ストラテジー

SEAL 技術を用いたラベル化試薬 (SEAL 試薬) では、タンパク質を可視化する「標識部位」とタンパク質と特異的に相互作用する「リガンド部位」を SEAlide で連結しました (図 1 (B))。本技術を利用したラベル化ストラテジーは、

- ① タンパク質混合物中への SEAL 試薬の添加
- ② リガンドを介した標的タンパク質近傍への SEAL 試薬の濃縮
- ③ 標的タンパク質による SEAL 試薬のチオエステル型への活性化
- ④ チオエステル型 SEAL 試薬への標的タンパク質からの求核攻撃

です (図 1 (C))。本試薬が有する最大の特徴は、標的の近傍に接近するまでは求核反応に対して不活性型 (アニリド型) で存在し、標的タンパク質近傍へ濃縮されることで活性化型 (チオエステル型) へ変換される点です。そのため非特異的なラベル化が抑制可能な設計となっています。

4. SEAL 技術を利用した標的タンパク質選択的なラベル化の検証

我々は、SEAL 技術を用いた標的タンパク質選択的なラベル化ストラテジーを検証するため、ヒト炭酸脱水素酵素 (hCA) をモデル標的タンパク質として検証

を行いました。hCA ラベル化用の SEAL 試薬リガンド部位にはその阻害剤である benzenesulfonamide (BS) を、標識としてはビオチンを導入しました (図 2 (A))。赤血球細胞内に存在する hCA のラベル化について検証したところ、すべてのタンパク質を可視化する銀染色の結果では多数のタンパク質が存在する事が分かります (図 2 (B), silver stain, lane 1)。一方、ビオチンでラベル化したタンパク質を化学発光イメージングにより可視化したところ hCA 選択的にラベル化されることが明らかになりました (図 2 (B), streptavidin-horseradish peroxidase (HRP), lane 1)。また BS の競合阻害剤である ethoxzolamide (EZA) 共処置条件では、ラベル化が確認されなかったことから BS を介したアフィニティラベル化が進行している知見を得ることも成功しました (図 2 (B), streptavidin-HRP, lane 2)。続いて、hCA 中のラベル化されるアミノ酸残基の同定を行いました。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動でラベル化された hCA を分離後、トリプシン消化によるペプチドフラグメント化と続く LC-MS/MS 解析を行ったところ、BS が結合するリガンドポケット近傍の Lys137 が選択的にラベル化されていることを明らかにし、新規アフィニティラベル化試薬 SEAL 試薬の開発を達成しました。

5. SEAL 技術と *in silico* ドッキングスタディを組み合わせたリガンド結合ポケットの探索

SEAL 試薬を利用した hCA ラベル化実験の結果から、リガンド結合ポケット近傍の特定アミノ酸残基選択的にラベル化されることを明らかにしました。そこで SEAL 技術の新たな利用法を確立するため、「*in silico* ドッキングシミュレーション」と「SEAL 技術」を組み合わせることでリガンド結合ポ

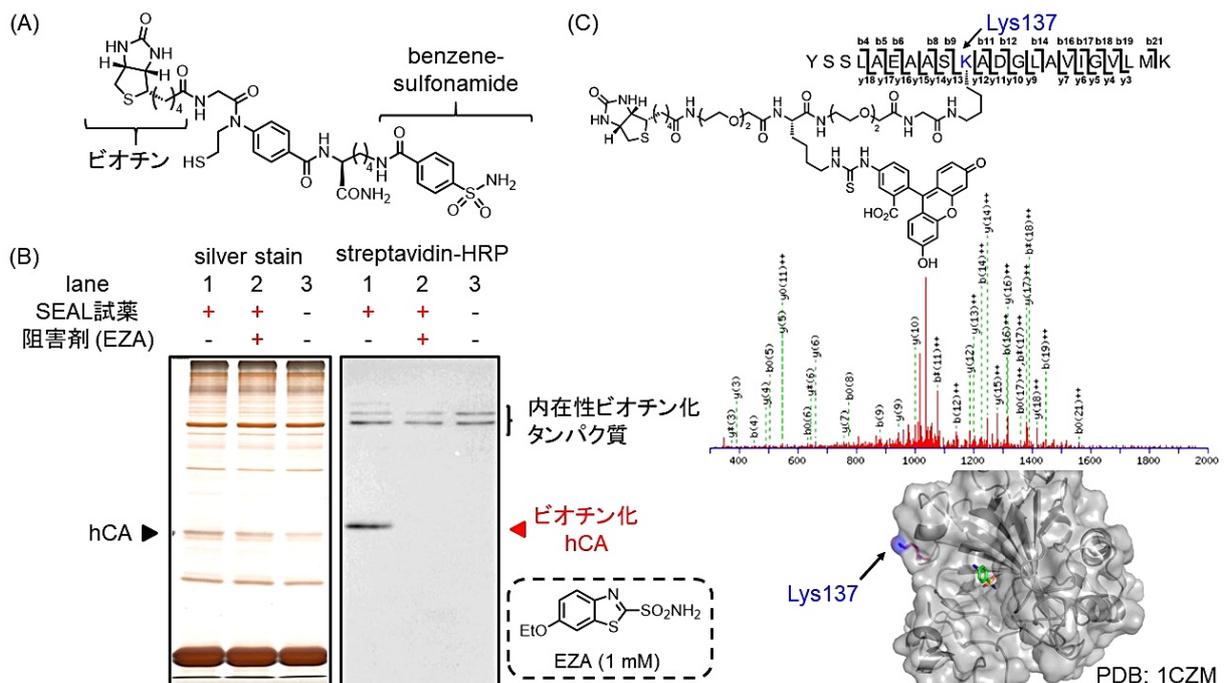


図 2 SEAL 技術を用いた hCA 選択ラベル化。(A) hCA ラベル化用 SEAL 試薬の分子構造、(B) 赤血球細胞内の hCA ラベル化実験結果、(C) ラベル化 Lys 残基の同定

ケット探索研究を行うこととしました。本研究では、D-amino acid oxidase (DAO) に対するその阻害剤 4-bromo-3-nitro-benzoic acid (BNBA) の結合ポケットについて探索を行いました。DAO は 2 量体で存在し、flavin adenine dinucleotide (FAD) 存在下、D 体アミノ酸の酸化的脱アミノ化反応を触媒することが報告されています⁷。そこで FAD 存在下および非存在下条件に付いて、DAO と BNBA の *in silico* ドッキングシミュレーションを AutoDock Vina を利用し行いました。ドッキングシミュレーションの結果、BNBA 結合ポケットが二か所存在する可能性が示唆されました。BNBA 結合ポケット 1 か所目は、従来の報告通り基質となる D 体アミノ酸と FAD の結合ポケットでした。しかし示唆された 2 か所目の結合ポケットは、これまでに報告例がない 2 量体 DAO 境界部分に存在するポケットでした。そこで本ドッキングシミュレーション結果を裏付けるべく、SEAL 技術を用いて DAO のラベル化を行うこととしました。リガンド部位に BNBA 誘導体を導入した SEAL 試薬 (図 3 (A)) を用いてラベル化実験を行ったところ、ドッキングシミュレーション結果で示唆された結合ポケット近傍の Lys163, Lys204 残基がラベル化されることを明らかにし、これら結果より DAO 阻害剤 BNBA の結合ポケットが二か所あることを示す事に成功しました⁸ (図 3 (B))。本結果は、SEAL 技術の新たな利用法を示す結果であると考えています。

6. おわりに

本研究では、我々の研究グループが独自に開発した SEALide をラベル化試薬「反応部位」として利用した SEAL 技術について紹介させて頂きました。SEAL 試薬は、標的タンパク質近傍に濃縮された際にチオエステル型に活性化されラベル化機能が ON になる特徴を有する新たなラベル化試薬です。本特徴により、非選択的なラベル化を抑制できるため、アフィニティラベル化試薬を利用する際の新たな選択肢の一つにな

るものと我々は考えています。また *in silico* ドッキングシミュレーションと組み合わせて利用することでアフィニティラベル化技術の更なる可能性を示す事も出来たと考えています。

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部機能分子合成薬学分野において実施されたものであり、ご指導いただきました大高章教授ならびに研究当時講師であられた福山大学 重永章教授に心から感謝申し上げます。また本研究遂行にあたり、科研費 (JP13J07086) のご支援を頂きました。この場をお借りして感謝申し上げます。

最後になりましたが、本稿執筆の機会を頂きました、ペプチドニュースレター編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Siraiwa, K.; Cheng, R.; Nonaka, H.; Tamura, T.; Hamachi, I. Cell Chem Biol 2020, 27, 970-985.
2. Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takao, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Nat Chem Biol 2009, 5, 341-343.
3. Fujishima, S.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. J Am Chem Soc 2012, 134, 3961-3964.
4. Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Bando, K.; Otaka, A. Org Lett 2009, 11, 823-826.
5. Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Sumikawa, Y.; Otaka, A. ChemBioChem 2011, 12, 1840-1844.
6. Denda, M.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Yamamoto, J.; Sato, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Org Biomol Chem 2016, 14, 6244-6251.
7. Varrall, L.; Burnet, P. W. J.; Betts, J. F.; Harrison, P. J. Mol Psychiatr 2010, 15, 122-137.

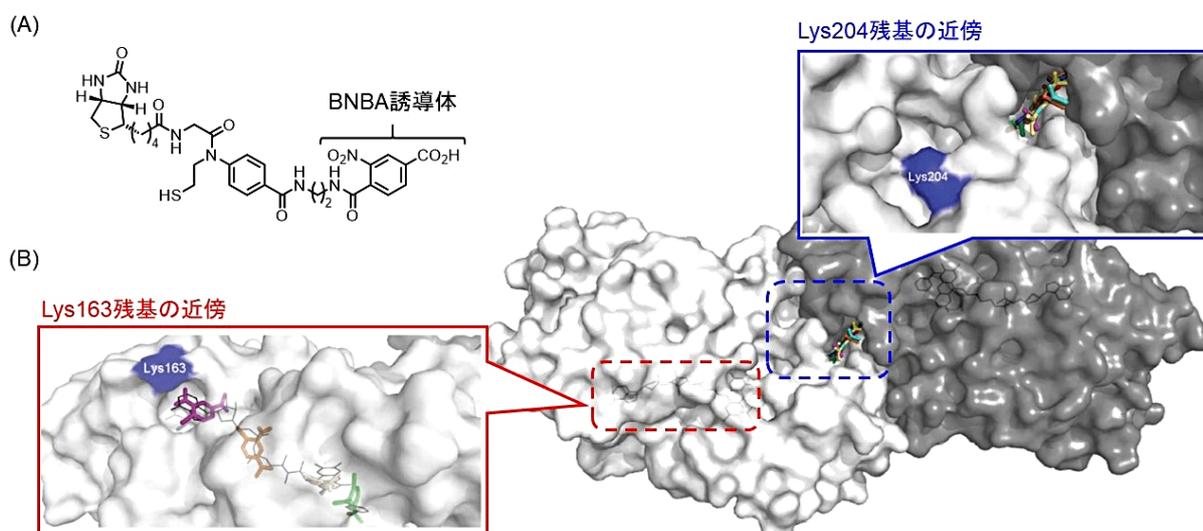


図3 SEAL 技術と *in silico* ドッキングシミュレーションの組み合わせによる BNBA 結合ポケットの探索。(A) DAO ラベル化用の SEAL 試薬の分子構造、(B) DAO 中のラベル化 Lys と BNBA 結合ポケット

8. Kohiki, T.; Kato, Y.; Nishikawa, Y.; Yorita, K.; Sagawa, I. Denda, M.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Fukui, K.; Otaka, A. *Org Biomol Chem* 2017, 15, 5289–5297.

でんだ まさや
徳島大学 大学院医歯薬学研究部
機能分子合成薬学分野
denda.masaya@tokushima-u.ac.jp
<https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/syn/otaka/>

Tau 由来ペプチドを基盤とした 微小管内部の機能開拓

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いただきました九州大学の巢山慶太郎先生に厚く御礼申し上げます。2016年に現職に着任してからペプチドに触れた若輩者ではありますが、本稿ではこれまで進めて参りました、微小管内部結合ペプチドの開発と応用に関する一連の研究についてご紹介いたします。



稲葉 央

細胞骨格の一種である微小管は、チューブリンタンパク質からなる一般的な内径が 15 nm、全長が数 μm から数百 μm におよぶチューブ状構造体です (図 1a)。微小管は細胞の形状、強度、運動、分裂などの多様な機能を担っており、これらを達成するために

様々な興味深い性質を有します¹。例えば、その強度は他の細胞骨格よりも非常に高い一方で、必要に応じて形成(重合)と解離(脱重合)を繰り返す構造の可逆性を有します。また、キネシンやダイニンといったモータータンパク質は、ATP をエネルギー源として微小管上を一方方向に運動することで細胞分子輸送を達成しています。このような生体内での機能や物質としての特性から、微小管は生体応用・材料応用の観点で注目を集めています。一方、微小管は細胞骨格の中で唯一中空の構造体であるものの、その内部空間については不明な点が多く、応用に用いる試みもなされてきませんでした。近年、絨毛や鞭毛の構成要素の一つである微小管が 2 つ連なったダブルレット微小管の内部にタンパク質が多数結合していることが確認され、微小管の構造安定化に重要な役割を持つと推定されています^{2,3}。したがって、微小管内部に様々な人工分子を導入できれば、微小管の構造や機能を制御する新しい方法となる可能性があります。微小管内部に結合する分子として、抗がん剤であるタキソールをはじめとするタキサン系分子がよく知られています。しかし、その複雑な構造や溶解性の低さなどから、微小管内部に分子を導入するためには別の設計が必要だと考えました。そこで、まずは微小管内部に結合するペプチドの開発に着手しました。

2. Tau 由来ペプチドの開発

微小管内部結合ペプチドを設計するにあたり、微小管内部に結合する天然のタンパク質を参考にしました。近年は微小管内部に結合するタンパク質が次々と報告されていますが、2016年当時はその詳細はほとんど不明でした。唯一、微小管関連タンパク質 Tau の繰り返し配列の一部が微小管内部のタキソールと同

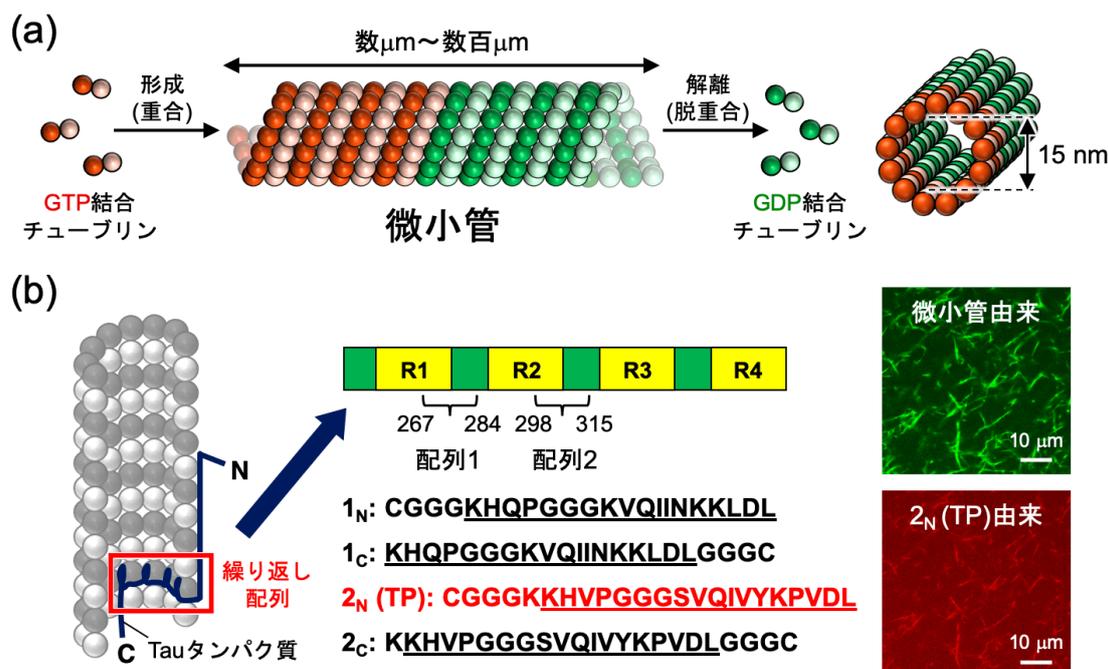


図1 (a) 微小管の構造、(b) 微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド (TP) の設計。下線部が Tau の繰り返し配列由来であり、1_N、1_C は配列 1 を、2_N、2_C は配列 2 をもとに設計した。CLSM 像より、緑色蛍光ラベルした微小管と赤色蛍光ラベルした 2_N の局在が一致していることから、2_N が微小管に結合していることがわかる。文献 6 より許可を得て一部改変して転載。

βチューブリンのポケットに結合することが示唆されてきました^{4,5}。そこで、この配列の一部を切り出し、リンカーを介して反応点として Cys を N 末端または C 末端に導入した 4 種類の Tau 由来ペプチドを合成し、微小管への結合評価に用いました⁶ (図 1b)。蛍光ラベルしたこれらのペプチドが全て微小管に結合することを共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) により確認しました。特に、タキソールとの競合阻害実験で結合位置を評価した結果、4 種類のうちの 1 つ (CGGGCGGGKHKHVPGGGSVQIVYKPVLDL, 以降 Tau-derived Peptide から TP と表記) が微小管内部に結合することが明らかとなりました。ここで重要なのが、先に微小管を作ってから TP を加えると、TP は微小管の外部に結合してしまうということです。微小管の内部に TP を導入するためには、まずチューブリンと TP を複合化し、その後 GTP や GTP アナログを加えて重合することが必要となります。この方法を利用することで、以下に示すような様々な分子導入が可能となってきました。

3. 微小管内部へのナノ構造体導入

TP を用いることで、これまで金ナノ粒子⁶や GFP⁷, 磁性ナノ粒子⁸などを微小管内部に導入することに成功しています。また、TP が細胞内の微小管にも結合

できること⁹や、環状化した TP がより強く微小管に結合してその構造を安定化すること¹⁰を示しています。ここでは GFP と磁性ナノ粒子内包の例についてご紹介します。

前述のように、ダブルレット微小管内部には様々なタンパク質が結合していることが明らかとなってきています。このことは、TP を用いて人工的にタンパク質を微小管内部に導入できれば、微小管の構造や性質を改変できる可能性を示唆しています。そこで、まずはモデルタンパク質として GFP の内包を試みました⁷。まず、GFP の N 末端から 11 番目の β ストランド (GFP11) と TP を連結した TP-GFP11 を合成し、残りの GFP1-10 と再構成することで、TP を C 末端側に有する TP-GFP を構築しました。TP の時と同様に、TP-GFP をチューブリンと複合化後、重合することによって微小管内部への導入を試みました (図 2a)。CLSM により TP-GFP の微小管への結合が明らかとなり、抗 GFP 抗体および抗チューブリン抗体を用いた競合実験により、TP-GFP が微小管内部に結合していることが明らかとなりました。興味深い点として、TP-GFP を内包した微小管は通常の微小管に比べて全長が 1.7 倍増大、剛直性の指標となる持続長が 4.0 倍増大、キネシン固定基板における運動速度が 1.2 倍増大、という特徴を持つことが明らかとなりました (図 2b)。また、溶液の濁度を測定することで微小管

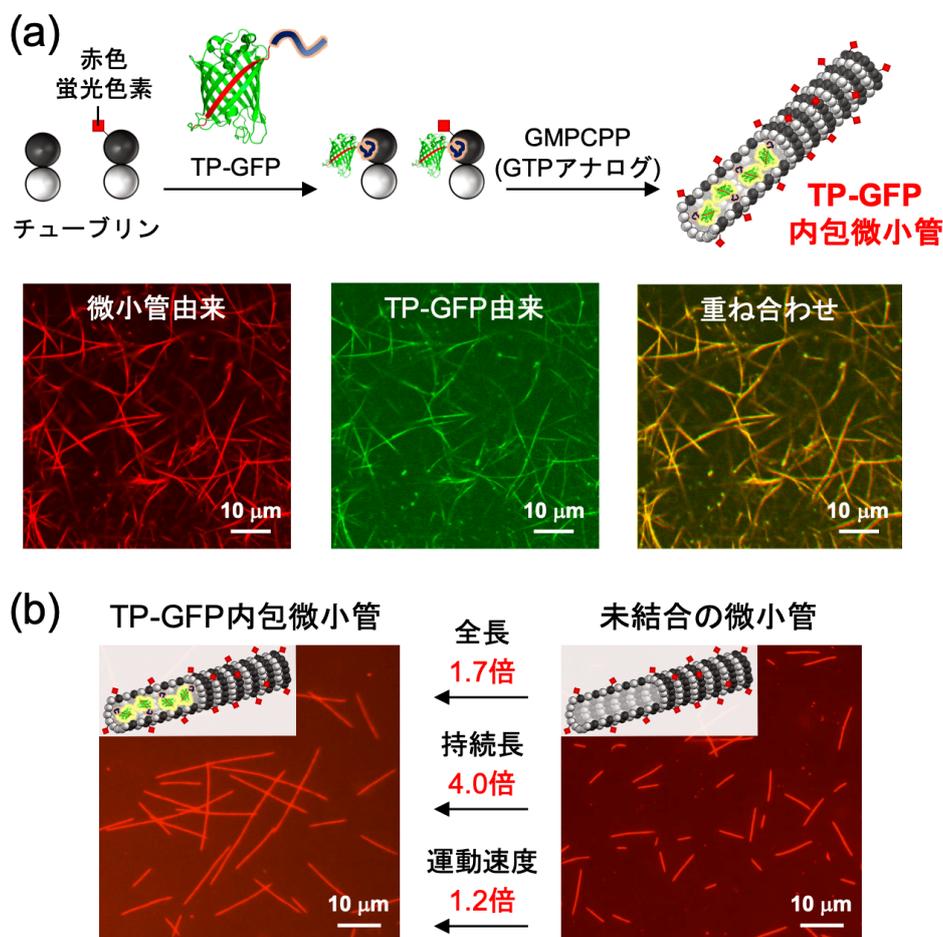


図2 (a) TP-GFPの微小管への内包と CLSM 像, (b) TP-GFP 内包微小管と未結合の微小管の比較。文献 7 より許可を得て一部改変して転載。

の安定性を評価したところ、TP-GFP はタキソールと同程度微小管を安定化することが判明しました。これは、天然のダブルレット微小管内部におけるタンパク質の結合を機能的に模倣した結果である可能性があります。現在様々なタンパク質を内包してその影響を評価しています。

天然の磁性細菌は、体内に有する複数の磁性ナノ粒子の配列（マグネトソーム）をコンパスとして利用し、地磁気を感知して運動方向を決定します。微小管はモータータンパク質を組み合わせることで運動性を有するため、磁性細菌のように微小管内部に磁性ナノ粒子を導入できれば、磁場に応答して運動方向が変わる新規磁性材料になると考えました。そこで、磁性ナノ粒子として知られる CoPt ナノ粒子を内包した微小管の構築を行いました⁸。まず、CoPt ナノ粒子形成を促すペプチド（CBP）と TP を連結した CBP-TP を合成し、チューブリンと複合化しました。GTP アナログを加えて微小管を作製した後、Co イオン、Pt イオンを加え、さらに還元剤である NaBH₄ を加えることで、微小管内部で CoPt ナノ粒子の形成を試みました（図 3a）。透過型電子顕微鏡（TEM）で観察したところ、微小管の内部に一部 CoPt ナノ粒子と思われる粒子が連続して配列している様子が確認されました。得られた CoPt ナノ粒子内包微小管を 0.37 T（テスラ）の磁束密度を有する市販のネオジム磁石存在下でプレートに固定化したところ、磁場の方向である水平方

向に非常に規則正しく配列化することが明らかとなりました（図 3b）。一般的に磁性材料の配列化には 10 T 以上の磁場が用いられており、このようなごく弱い磁場で微小管が配列化したのは興味深い結果です。一方、CoPt ナノ粒子をチューブリン上で合成してから微小管を作製した場合や、微小管外部表面に CoPt ナノ粒子を修飾した場合は磁場応答性を示しませんでした。このことは、微小管内部の連続した CoPt ナノ粒子の配列がナノワイヤーのように働き、磁場応答性が向上したことを示唆しています。また、キネシン固定基板上での微小管の運動速度を解析したところ、外部表面に CoPt ナノ粒子を修飾した場合は速度が低下しましたが、CoPt ナノ粒子内包微小管は通常の微小管に比べて速度が 1.2 倍増大しました。このように、TP を用いて微小管内部で CoPt ナノ粒子を形成することで、磁場応答性と運動性を両立する磁性微小管の構築に成功しました。今後、磁性細菌のように微小管の運動方向を磁場で制御することで、効率的な分子輸送や微小管の集団運動制御などに応用できると考えています。

4. おわりに

本稿では、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドの開発およびその応用として GFP や磁性ナノ粒子の内包についてご紹介しました。微小管はその構造の

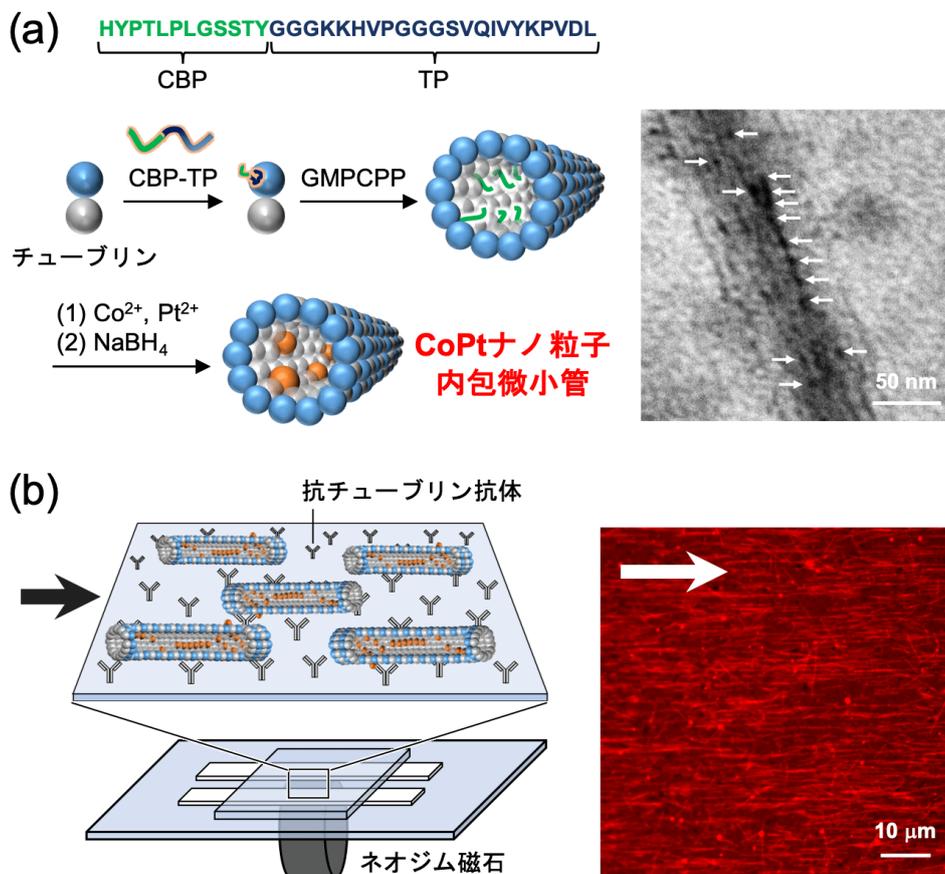


図 3 (a) CoPt ナノ粒子内包微小管の構築と TEM 像。白矢印の黒いドットが CoPt ナノ粒子を表している、(b) ネオジム磁石存在下での CoPt ナノ粒子内包微小管の配列化と CLSM 像。矢印が磁場の方向を表しており、微小管が磁場の方向に配列化していることがわかる。文献 8 より許可を得て一部改変して転載。

複雑さから未だ不明な点が多く、特に内部は未知の領域です。今後はペプチドを用いた分子内包技術を基盤とし、微小管の高次構造を制御する要素の理解を深めるとともに、生体応用および材料応用への展開を進めていきたいと考えております。最後になりましたが、本研究は鳥取大学学術研究院工学系部門の松浦研究室で実施されました。松浦和則教授および研究室の学生の皆様に深く感謝申し上げます。また、チューブリンの提供や微小管の運動性評価などについていつもお世話になっている北海道大学大学院理学研究院の Arif Md. Rashedul Kabir 特任助教、角五彰准教授、佐田和己教授に感謝申し上げます。タンパク質発現や細胞実験については鳥取大学農学部の岩崎崇准教授にご協力いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- Hess, H.; Ross, J. L. *Chem Soc Rev* 2017, 46, 5570–5587.
- Ichikawa, M.; Bui, K. H. *Bioessays* 2018, 40, 1700209.
- Ma, M.; Stoyanova, M.; Rademacher, G.; Dutcher, S. K.; Brown, A.; Zhang, R. *Cell* 2019, 179, 909–922.
- Kar, S.; Fan, J.; Smith, M. J.; Goedert, M.; Amos, L. A. *EMBO J* 2003, 22, 70–77.
- Kadavath, H.; Jaremko, M.; Jaremko, L.; Biernat, J.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M. *Angew Chem Int Ed* 2015, 54, 10347–10351.
- Inaba, H.; Yamamoto, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Chem Eur J* 2018, 24, 14958–14967.
- Inaba, H.; Yamamoto, T.; Iwasaki, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Chem Commun* 2019, 55, 9072–9075.
- Inaba, H.; Yamada, M.; Rashid, M. R.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Nano Lett* 2020, 20, 5251–5258.
- Inaba, H.; Yamamoto, T.; Iwasaki, T.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *ACS Omega* 2019, 4, 11245–11250.
- Inaba, H.; Nagata, M.; Miyake, K. J.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A.; Sada, K.; Matsuura, K. *Polym J* 2020, 52, 1143–1151.

いなば ひろし
鳥取大学 学術研究院 工学系部門
hinaba@tottori-u.ac.jp
<http://www.chem.tottori-u.ac.jp/~matsuura/>

非タンパク質構成アミノ酸の α,α -ジ置換アミノ酸を利用した細胞膜透過性ペプチドの開発

1. はじめに

大阪薬科大学・分子構造化学研究室の加藤巧馬と申します。この度は、本ニュースレターへの寄稿の機会をいただきましたことを大変光栄に存じます。お声をかけてくださった編集委員の九州大学の巢山慶太郎先生をはじめ、編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。まず初めに簡単に自己紹介を



加藤 巧馬

させていただきますと、私は 2017 年に現在の大阪薬科大学に赴任するまでは、長崎大学の田中正一先生のもとで非タンパク質構成アミノ酸である α,α -ジ置換アミノ酸を化学合成し、そのアミノ酸を用いた細胞膜透過性ペプチドの研究を行ってまいりました。大阪薬科大学においては土井光暢先生のもとでペプチドの X 線結晶構造解析を利用した非天然型のアミノ酸を含有するペプチドの二次構造解析とその機能性ペプチドへの応用をテーマに研究を行っていますが、今回の PNJ のテーマは「ペプチドと化学合成」をテーマにしていることですので、本稿では主に長崎での研究テーマと関連する内容についてご紹介させていただきます。

2. α,α -ジ置換アミノ酸とは

α,α -ジ置換アミノ酸とは、天然の L- α -アミノ酸の α 位水素をアルキル基に置換した非タンパク質構成アミノ酸であり、そのかさ高い側鎖構造から、含有ペプチドのヘリカル構造を安定化することや、生体内酵素による分解への抵抗性が得られることが知られていま

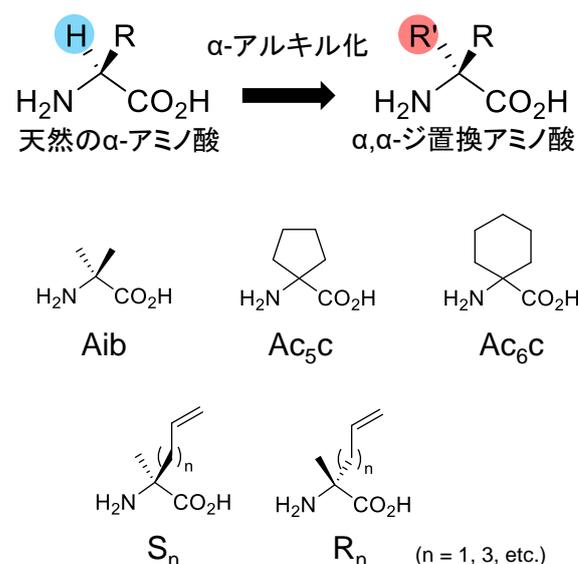


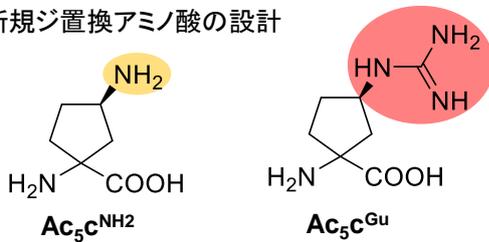
図1 機能性ペプチドへ応用されているジ置換アミノ酸の例

す¹ (図 1)。最も単純で代表的なものはジメチルグリシン (α -アミノイソ酪酸, Aib) が挙げられますが, このほかにもペプチドの構造活性相関の研究, 特にヘリックス構造を安定化させることにメリット見出すことができる研究などにも用いられることが増えてきています。例えば, Verdine 先生らはステーブルペプチドの作製のために, 側鎖に二重結合を有する α -メチル化ジ置換アミノ酸 (S_n , R_n) を利用しています², 出水先生らによる抗菌ペプチドの開発にも Aib や側鎖が環状になったジ置換アミノ酸 (1-アミノシクロペンタンカルボン酸: Ac_5c , 1-アミノシクロヘキサンカルボン酸: Ac_6c) が利用されています³。さらに, 不斉反応における有機分子触媒としての応用についても, 工藤先生らによる Aib の利用や⁴, 田中先生らによる Ac_5c の利用が報告されています⁵。

3. 有機合成化学によるジ置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの膜透過性ペプチドへの応用⁶

このようなジ置換アミノ酸含有ペプチドの機能性ペプチドへの応用の一つに, 私が研究テーマとしてきた細胞膜透過性ペプチドも位置します。細胞膜透過性ペプチドの詳細については私が紹介するよりも他の先生方の総説など⁷にお任せしたいと思います, アルギニンなどの塩基性アミノ酸が大きな役割を果たしています。我々もこれまでの研究より, ジ置換アミノ酸をアルギニンと組み合わせることで, 天然のアミノ酸のみからなるペプチドとは異なる膜透過性を有することを明らかにしていました⁸。その知見をもとに新たなペプチドの設計を考えた際に, せっきく化学合成を行うことができる環境にあるのだからということで, 膜

・新規ジ置換アミノ酸の設計



側鎖上に膜透過に重要であるとされる アミノ基ないしグアニジノ基を有する

・膜透過性ペプチドの設計

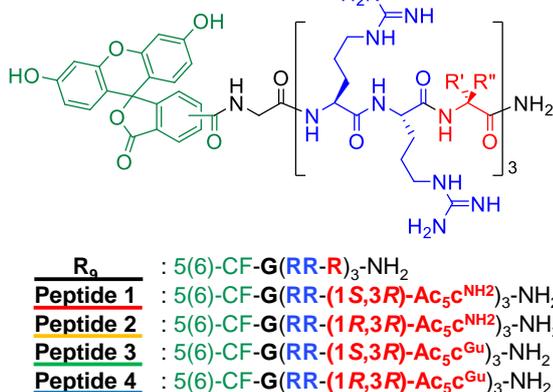
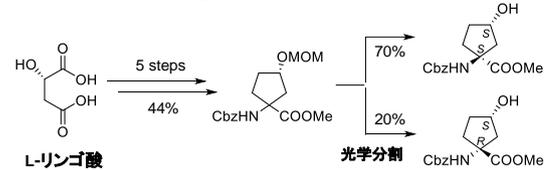


図2 ジ置換アミノ酸とペプチドの設計

透過性ペプチドの膜透過機能において重要な要素である塩基性官能基としてアミノ基とグアニジノ基を導入したジ置換アミノ酸 (Ac_5cNH_2 , Ac_5cGu) を設計しました。このアミノ酸を利用することで, ペプチドの二次構造や酵素に対する安定性に寄与するというジ置換アミノ酸の特徴に加えて, 膜透過性にもプラスの影響を与えるという, 一石二鳥の効果を狙ったデザインです。膜透過性ペプチドの配列としては, アルギニン 9 量体 (**R9**) をモデル配列として, その中のアルギニン残基をジ置換アミノ酸に 3 残基置き換えたようなペプチド (**Peptide 1~4**) を設計・合成することとしました (図 2)。

ジ置換アミノ酸の合成は L-リンゴ酸を出発原料とし, 12 工程を経て, 目的とするジ置換アミノ酸 Ac_5cNH_2 , Ac_5cGu を合成しました。このアミノ酸は α 位と側鎖上の γ 位炭素上に不斉中心が存在するジアステレオマーとして得られますが, これらについてもそれぞれを単離しています (図 3)。これらを利用して **Peptide 1~4** を合成し, その細胞膜透過性を評価し

・ジアステレオマーの分割



・各ジアステレオマーの

側鎖水酸基から塩基性官能基への変換

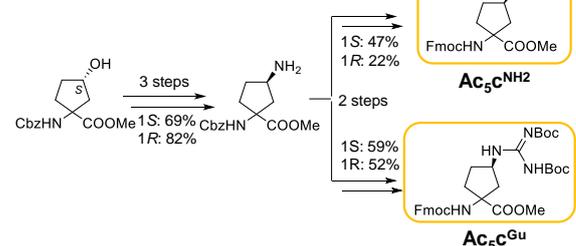
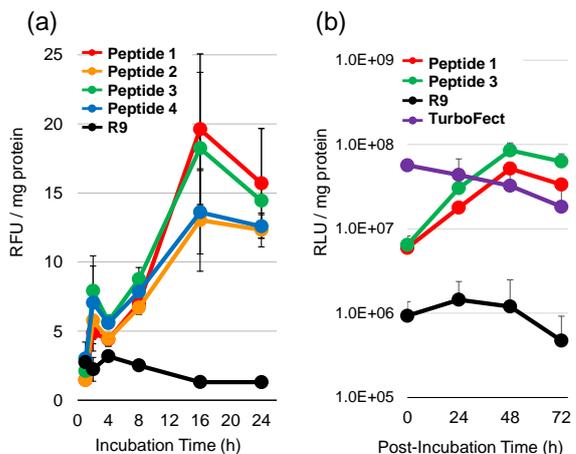


図3 ジ置換アミノ酸の合成スキーム



長時間の接触時間において, R9よりPeptide 1~4の方が高い細胞内取り込み量を示した

Peptide 1, 3を利用したpDNAデリバリーにおいて, 持続的な遺伝子導入効果が得られた

図4 膜透過性評価とその応用

たところ、比較的短時間の細胞との接触においては天然のアミノ酸のみからなる **R9** の方が高い細胞膜透過性を示しましたが、細胞との接触時間が長くなるにつれて、ジ置換アミノ酸を含有するペプチドの方が高い細胞膜透過性を示すことが明らかになりました (図 4a)。ジ置換アミノ酸を含有するペプチドには加水分解酵素などに対して抵抗性を示すことが知られており、**Peptide 1~4** では酵素との長時間にわたる接触においても高い安定性を有したことが、長時間の細胞との接触における持続的な細胞内取り込みにつながったのではないかと考えています。また、この長時間の細胞との接触における高い膜透過性を活かして、ドラッグデリバリーシステムへの応用ができないか検討するために、プラスミド DNA (pDNA) の細胞内への導入実験も行いました。その結果、長時間の細胞との接触においては市販の遺伝子導入試薬 (TurboFect) では達成できなかった持続的な遺伝子導入がジ置換アミノ酸を導入した **peptide 1, 3** では可能であり (図 4b)、細胞毒性についても遺伝子導入試薬を用いた場合に比べて低減されていました。このメカニズムの詳細については明らかにできていませんが、**Peptide 1~4** をキャリアとして利用した場合、細胞内へ取り込まれたのちの後期エンドソームからの脱出が促進されているようなデータが得られています。ジ置換アミノ酸を導入したペプチドは、比較的短い鎖長においてもペプチドの二次構造がヘリックス構造に制御されることが分かっており、**Peptide 1~4** についても、**R9** がランダム構造をとることに対して、ジ置換アミノ酸を導入したペプチドでは比較的安定なヘリックス構造をとることが明らかになっています。この安定したヘリックス構造が細胞膜透過性に与える影響について明らかにすることができれば、ジ置換アミノ酸の有用性についてさらに説得力を持たせることができ、今後の創薬シーズとしての応用につなげられるのではないかと考えています。

4. おわりに

本稿では、ジ置換アミノ酸を用いた研究のご紹介をさせていただきましたが、ペプチド化学の面白いところは、その構成パーツであるアミノ酸を組み合わせて無限の可能性を持つ分子を創出できる点にあると考えます。既存のアミノ酸に化学合成のひと手間を加えることでも、その性質を大きく変化させることが可能あり、有機合成化学の知識を利用し「ペプチドと化学合成」を組み合わせた学術分野は今後大きく発展すると信じております。

現在、私は引き続きジ置換アミノ酸の特徴を活かした細胞膜透過性ペプチドの研究を行いつつ⁹、X線結晶構造解析なども利用して様々なペプチドの二次構造解析などを行っています。もし、ペプチドのX線結晶構造解析にご興味をお持ちの方がいらっしゃれば、非タンパク質構成アミノ酸の有無にかかわらず、共同研究なども積極的に行いたいと考えておりますので、お声がけいただければ幸いです。

最後に、本研究の大部分は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の薬化学研究室で行った成果であり、研究

をご指導くださいました田中正一先生、大庭誠先生にこの場をお借りして改めて御礼申し上げます。

参考文献

1. Tanaka, M. Chem Pharm Bull 2007, 55, 349-358.
2. Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. J Am Chem Soc 2000, 122, 5891-5892.
3. Misawa, T.; Imamura, M.; Ozawa, Y., Haishima, K.; Kurihara, M.; Kikuchi, Y.; Demizu, Y. Bioorg Med Chem Lett 2017, 27, 3950-3953.
4. Akagawa, K.; Kudo, K. Angew Chem Int Ed 2012, 51, 12786-12789.
5. Umeno, T.; Ueda, A.; Doi, M.; Kato, T.; Oba, M.; Tanaka, M. Tetrahedron Lett 2019, 60, 151301.
6. Kato, T.; Oba, M.; Nishida, K.; Tanaka, M. ACS Biomater Sci Eng 2018, 4, 1368-1376.
7. Nakase, I.; Takeuchi, T.; G.; Futaki, S. Adv Drug Deliv Rev 2008, 60, 598.
8. Kato, T.; Oba, M.; Nishida, K.; Tanaka, M. Bioconj Chem 2014, 25, 1761-1768.
9. Kato, T.; Kita, Y.; Iwanari, K.; Asano, A.; Oba, M.; Tanaka, M.; Doi, M. Bioorg Med Chem 2021, in press.

(かとう たくま)
 (大阪医科薬科大学 分子構造化学研究室)
 (takuma.kato@ompu.ac.jp)
 (http://msc.oups.ac.jp/)

2021 年度行事予定

2021 年 4 月

Peptide Newsletter Japan No. 120 発行

2021 年 4 月 24 日 (土)

第 107 回理事会 (オンライン)

2021 年 7 月

Peptide Newsletter Japan No. 121 発行

2021 年 8 月 9 日 (月) ~ 10 日 (火)

第 53 回若手ペプチド夏の勉強会 (オンライン)

世話人: 門之園 哲哉 (東工大),

三木 卓幸 (東工大),

小松 徹 (東京大)

2021 年 10 月

Peptide Newsletter Japan No. 122 発行

2021 年 10 月 (予定)

第 108 回理事会・第 40 回評議会合同会議

(オンライン)

2021年10月20日(水)～22日(金)
第58回ペプチド討論会(オンライン)
世話人: 林 良雄(東京薬科大)

2021年10月21日(木)
2021年度日本ペプチド学会通常総会(書面総会)

2021年10月23日(土)
日本ペプチド学会市民フォーラム 2021(中止)

2021年11月(予定)
第17期評議員選挙公告

2021年12月(予定)
第17期評議員選挙開票

2022年1月
Peptide Newsletter Japan No. 123 発行

2022年1月(予定)
第109回理事会

編集後記

ペプチドニュースレター No. 120 号をお届けいたします。本号は「ペプチドと化学合成」をテーマとして、タンパク質・ペプチドの化学合成、分子標識や機能開拓の研究を行っている先生方にご執筆をお願いしました。今回初めて編集を担当させて頂きましたが、ペプチドの分子構造の知見に基づいた精緻な研究の数々に、改めて感動しました。新年度に向けてご多忙な中、ご執筆を頂きました先生方に心より感謝申し上げます。また、本号でも読者アンケートを実施いたしますので、ご協力のほどよろしくお願いいたします。

新しい年度が始まろうとしているものの、新型コロナウイルス関連はまだ予断を許さない状況が続いております。本年度も先行きを見通すのが難しい年となりそうですが、日本ペプチド学会に関わる皆様方にとって、実りある一年になりますようお願いしております。

120号アンケートフォーム URL:
<https://forms.gle/VSkbBTiURM5vuADh8>

(編集委員: 巢山 慶太郎)

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: 2021年4月20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
巢山 慶太郎(九州大学 基幹教育院)
TEL 092-802-5849
E-mail: suyama@artsci.kyushu-u.ac.jp
矢野 義明(武庫川女子大学 薬学部)
TEL 0798-45-9961
E-mail: yyano@mukogawa-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: 巢山 慶太郎)