



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.132

2024年4月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

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

会長就任のご挨拶

この度、第17期会長北海道大学坂口和靖先生の後任として、第18期の日本ペプチド学会会長に選任されました徳島大学の大高です。微力ながら、理事、監事、評議員の先生方、そして事務局の方々と力を合わせて、学会の発展ならびに会員の皆様の研究推進に貢献する所存です。多くの先生方の

努力により連綿と築かれてきた日本のペプチド科学の成長とさらなる発展を目指して参りたいと思います。何卒ご支援賜りますようよろしくお願いいたします。

学部4回生時に故矢島治明先生が主宰されていた京都大学薬学部薬品製造学教室に配属されて以来、一貫してペプチド研究、特にペプチド合成化学を柱とする研究に携わってきました。これまでを振り返ると、合成法は旧来の液相法から固相法にその主軸を移し、さらに遺伝子工学法の隆盛にも伴い、ペプチド合成化学として取り組むべき課題は何かと、今振り返れば、自問自答する時期もあったように思います。それでは、合成化学的な観点からあらゆるものが可能になったのか、というところを決してそうでないのが実情で、次々に新たな課題の出現により、状況は変わっていないと思っています。今こそNCL法の開発により水溶性タンパク質ならば化学合成も可能となりましたが、実用レベルに確立されてきたのはごく最近のことです。膜タンパク質への展開、タンパク質中の特定残基選択的な反応、さらに、特定残基を超え特定配列を狙った反応、まだまだ開拓の余地に満ち溢れた領域と考えています。一般の小分子に適応される有機反応とペプチドやタンパク質に利用される反応、使用溶媒からして大きな差異があります。例えば遷移金属触媒反応のペプチド・タンパク質への展開もまだその緒に就いたばかりのように感じています。また、最近ではゲノムマイニングの手法により数多くの Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) の構造が明らかにされ、その生合成経路の解明も進みつつあります。その名が示す通り、20種類のアミノ酸から構成される前駆体が、種々の酵素反応を経て、多彩な修飾ペプチドに変換されています。私の浅い知識からの考えで、間違っているかもしれませんが、その



大高 章

修飾反応の多くがラジカル種の生成を起点とするものと理解しています。ラジカル種中間体とペプチド修飾反応への展開、近年の Photoredox 触媒を利用するラジカル反応の隆盛と組み合わせることで、きっと新たな展開があるものと期待しています。ペプチド化学にもまだまだ私たちが気づいていない発展領域が潜んでいるはずで、専らペプチド化学に携わってきた研究者として、新たな課題の発掘を出発点として、大きなウェーブが我が国から発信できればと考えています。

さて、最近米国イーライリリー社の時価総額がEV車で有名なテスラの時価総額を超えたとの報道がなされました。これに一役買っているのが、ペプチド性医薬品です。脂肪鎖修飾 GLP-1 誘導体で二型糖尿病薬として発売されましたが、その体重減少作用や心血管系疾患のリスク改善など予想外の効果が明らかになり、大変注目を集めています。欧米ビッグファーマのペプチドを薬にする執念には驚嘆すべきものがありますが、我が国においてもペプチドの医薬品展開は引き続き増大することが予想されます。ペプチド学会発展のきっかけも、このようなペプチド医薬品開発への基礎科学からの貢献にあるかもしれません。そこで、この18期より理事の担当業務を、従来の庶務、会計、広報、渉外、国際 PS (Peptide Symposium)、海外 PS、若手、会員の各担当から変更し、産学連携推進、出版担当の各理事を新たに配置、会員担当理事にダイバーシティ推進担当業務を担ってもらい、渉外担当理事に国際 PS、海外 PS 業務を行ってもらう計画を立てています。新たに配置する産学連携推進、ダイバーシティ推進担当は、従来ペプチド学会の取り組みとして遅れていた部分ではないかと考えています。出版担当は、通称 Green Book に対する学会員の皆様からの意見集約を含め、今後のその在り方について議論をリードすべく配置しました。本件については、学会員の皆様からの忌憚のないご意見をお待ちいたしております。また、若手夏の勉強会の構成メンバーであり、将来のペプチド学会を先導してくれる若手教員や学生との積極的な意見交換も理事会、評議員会に課せられた重要な責務と考えています。

学会、シンポジウムについてはコロナ前の状況に戻りつつあります。油断はできませんが、ペプチド討論会への参加のお願いはもとより、ペプチドフォーラムの積極的な開催もよろしくお願いいたします。

最後になりますが、日本ペプチド学会およびペプチド討論会の運営に大変なご協力をいただいている賛助会員および企業、財団などの皆様には大変感謝申し上げます。

げるとともに、引き続きより一層のご支援を賜りますよう、心よりお願い申し上げます。また、学会員の皆様におかれましては、学会に対する要望などございましたら学会事務局あるいは大高までお気軽にご連絡ください。会員の皆様のご支援を改めてお願い申し上げますとともに、皆様の研究のご発展を祈念いたしております。

（ おおたか あきら ）
 徳島大学 医歯薬学 研究部
 aotaka@tokushima-u.ac.jp

金元素を選択的に分離回収する 機能分子の開発：ペプチドから 非ペプチド性分子へのデザイン変遷

滋賀県大津市にある龍谷大学先端理工学部応用化学課程の富崎 欣也です。この度は、ペプチドニュースレターへ寄稿する機会を与えてくださり、編集委員をはじめ、関係各位に感謝申し上げます。私は、1994年3月に九州工業大学大学院工学研究科物質工学専攻博士前期課程（西野憲和教授）を修了し、伊藤ハム株式会社中央研究所研究員を経て、2000年3月に九州工業大学大学院工学研究科物質工学専攻博士後期課程を単位取得退学（西野憲和教授）、同年6月に博士（工学・九州工業大学）の学位を取得しました。この間、ペプチドの化学合成、二次構造評価および触媒活性評価に関する研究に従事してきました。その後、米国ノースカロライナ州立大学化学科（博士研究員2000-2003, Prof. J. S. Lindsey）にてポルフィリンやペリレンといった有機色素化合物の化学合成に関する研究、東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻（COE21 助手2003-2007, 三原久和教授）にて分子間相互作用検出バイオチップに関する研究、（公財）地球環境産業技術研究機構（RITE）化学研究グループ（研究員2007-2009）にて高压ガスから二酸化炭素を分離回収する技術開発に従事し、2009年4月に龍谷大学理工学部物質化学科准教授として着任し、このとき初めて単独で研究室を運営することになりました。2012年4月に同学部教授に昇任、改組のため2020年4月より龍谷大学先端理工学部応用化学課程教授となり、現在に至ります。これまでの研究者人生を振り返ってみると、九州工業大学学生時代の生体高分子化学、米国ポスドク時代の有機合成化学・光物理化学、東京工業大学助手時代のバイオ計測化学、RITE 研究員時代の物理化学・プロセス化学と、所属研究機関の特長に応じて様々な「化学」に関する研究に携わってきました。

現在所属する龍谷大学先端理工学部応用化学課程は4つの分野「分析・環境化学系」「無機・セラミックス系」「有機・高分子系」「生物機能分子系」からなり、私は「生物機能分子系」に所属しています。着任当初



富崎 欣也

に気づいたことは、SEM（4台）やTEM（2台）といった電子顕微鏡装置（FIB, EDS, SAED, STEM 付属）やX線を利用する分析装置（XRD, XPS, SAXS, XRF）、ラマン分光装置、熱分析装置（TG-DTA）など、無機材料を対象とする分析装置が充実していることです。そこで私は所属学科の特長を活かして、ペプチドと無機材料を組み合わせた有機-無機複合材料の研究に取り組むことにしました。本ペプチドニュースレターでは、ペプチドを用いる金元素の選択的回収の試みと産業応用を指向した非ペプチド性分子の設計に関する最新の研究成果について紹介します。

金、銀、白金族元素の分離と回収は、「持続可能な化学」の要素として近年大きな注目を集めています。廃棄された電子機器には鉱石に比べて相対的に有価金属の割合が高いため、廃電子部品やその他の資源から金属を抽出することは、一般的な採掘手法よりも質量ベースで好ましい可能性があります。例えば、金やパラジウムなどの貴金属元素は、工業的には鉱山から採掘された鉱石から液液抽出法により水相から順次抽出されます¹。しかし、この技術は、標的とする金属イオンを認識するリガンドの分子設計および環境に影響を与える大量の有機溶剤を必要とします。また、貴金属元素は、電極の電位操作に基づく電解採取法によっても選択的に分離・回収することができます²。ただし、これには特別な反応装置が必要であり、金属イオン低濃度領域（50 μM 程度以下）では副生成物である水素の発生と競合することから、回収率が著しく低下します。そこで、持続可能社会構築の一助となることを期待して、複数種の金属イオンを含む均一希薄水溶液から標的的金属イオンを選択的に還元鉱物化し分離・回収する単純かつグリーンな選択的貴金属回収技術の開発を目指すことにしました。

私たちの研究グループでは、化学的および物理的に興味深い特性を示し、生体適合性の高い金ナノ粒子に着目し、自己集合化ペプチド RU006

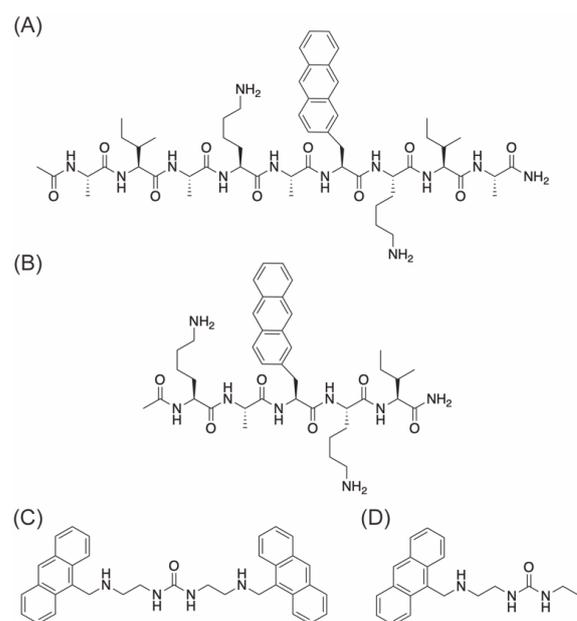


図1 希薄水溶液から金元素を選択的に分離回収するペプチド性および非ペプチド性分子の構造

(Ac-AIAKAX₁KIA-NH₂, X₁ = L-2-ナフチルアラニン (Nal)) と H₂AuCl₄ を水中で混合すると、幅が 50 nm 程度、厚さが数ナノメートル程度、長さが 1 μm 程度の金ナノリボンが生成することを明らかにしました^{3,4}。これは、ペプチドが自己集合化する際に金属イオンを集合体中に取り込むことで局所濃度を上昇させ、ペプチド配列中のナフタレン環が金イオンを効率よく還元するメカニズムであろうと考えています。このため、このプロセスでは還元剤を追加する必要がありません。RU006 のナフタレン環をアントラセン環 (ナフタレン環より強い還元力) に置換した RU065 (Ac-AIAKAX₂KIA-NH₂, X₂ = L-2-アントリルアラニン (Ant), 図 1A) は、ナノリボン状でなく球形に近い金ナノ結晶を生成することがわかりました^{3,4}。

そこで、芳香族側鎖を有する 2 種ペプチド RU006 および RU065 を用いて、金イオンと白金イオンを低濃度含む均一希薄混合水溶液からの選択的金回収に挑戦しました。実験操作としては、H₂AuCl₄ と H₂PtCl₆ の水溶液 (それぞれ終濃度 50 μM) とペプチド (それぞれ終濃度 200 μM) を水中で混合し、40℃で 24 時間反応させ、遠心分離により上澄みと沈殿に分離し、金属イオン濃度の定量を行いました⁵。ICP-OES による金属イオン定量の結果、RU006 では金回収率 95% に対して白金回収率 44% でした。一方、RU065 では金回収率 93% に対して白金回収率 12% でした。いずれの反応系においても、生成した金属金は単純な遠心分離により回収可能であり、金の回収率は 90% を超えていました。しかし、白金の回収率に顕著な差が生じ、アントラセン含有ペプチドの利用は希薄混合水溶液中から金を選択的に分離回収するプロセスの開発に繋がる可能性があると考えました。

しかし、ペプチドの合成にはコストがかかるため、産業応用を目指すためには非ペプチド性のアントラセン誘導体が不可欠です。そこで、金の選択的還元回収に不可欠なペプチド構造中の官能基を特定するために、Ant を中心として元となる RU065 の N 末端と C 末端の両方からアミノ酸残基を 1 つずつ欠損させたフラグメントペプチド (全 23 種) を合成し、同条件にて金の選択的分離回収を行いました。その結果、RU065 の 4 番目から 8 番目までのアミノ酸 5 残基からなる配列 RU065₄₋₈ (Ac-KAX₂KI-NH₂, X₂ = Ant, 図 1B) が、金回収率 97% に対して白金回収率 22% を示し、これが RU065 と同等の回収率および選択性を達成する最小の配列であることがわかりました⁶。このことから、金属金の選択的分離回収に必須の官能基は、アントラセン環と複数のカチオン性官能基、集合化のための水素結合性官能基であることがわかりました。また、汎用金属元素の混入による金選択性への影響を調べるために、RU065₄₋₈ (終濃度 200 μM) を使用して金イオン、白金イオンおよびニッケルイオンの 3 種混合水溶液 (それぞれ終濃度 50 μM) からの金の選択的還元回収を試みたところ、金回収率 96%、白金回収率 18%、ニッケル回収率 1% となり、妨害金属イオン存在下においても高い金選択性が発揮されることがわかりました。

最後に、これらの研究成果を基に、アントラセン環に塩化金酸引きつけのためのカチオンおよび自己集合

化のためのウレア構造を含む非ペプチド性アントラセン誘導体、分子内にアントラセン環を二つ有する diAnt (図 1C) および一つ有する monoAnt (図 1D) をそれぞれ設計・合成しました。それらを前述の条件 (アントラセン誘導体 200 μM, 金属イオンそれぞれ 50 μM) にて反応させ、遠心分離によって沈殿物を回収し、王水に溶解させ、ICP-OES にて金属イオンの定量を行ったところ、diAnt について金回収率 99%、白金回収率 27%、monoAnt について金回収率 99%、白金回収率 11% となり、いずれも高い金回収率と金選択性を達成することができました⁷。

以上より、ペプチドの自己集合化を利用して希薄混合水溶液中から金を選択的に還元回収する方法を基に、ペプチド構造の最小化を通じて、非ペプチド性化合物設計の指針を獲得することができました。今後は、アントラセン誘導体の化学構造の更なる単純化や合成方法の低コスト化を図るとともに、他の貴金属元素選択性の発現にも挑戦したいと思います。

参考文献

1. Cox, M. Solvent Extraction in Hydrometallurgy, *In Solvent Extraction Principles and Practice, Second Edition, Revised and Expanded*, Eds. Rydberg, J.; Cox, M.; Musikas, C.; Chopin, G. R. Marcel Dekker, Inc., New York Basel, 455-505.
2. Kasper, A. C.; Carrillo Abad J.; García Galdón M.; Veit, H. M.; Pérez Herranz V. *Waste Manag Res* 2016, 34, 47-57.
3. Tomizaki, K.-Y.; Wakizaka, S.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, A.; Imai, T. *Langmuir* 2014, 30, 846-856.
4. Tomizaki, K.-Y.; Kishioka, K.; Kobayashi, H.; Kobayashi, A.; Yamada, N.; Kataoka, S.; Imai, T.; Kasuno, M. *Bioorg Med Chem* 2015, 23, 7282-7291.
5. Tomizaki, K.-Y.; Okamoto, T.; Tonoda, T.; Imai, T.; Asano, M. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 5060.
6. Tomizaki, K.-Y.; Tonoda, T.; Teramura, S.; Okazaki, H.; Imai, T.; Asano, M. *Processes* 2021, 9, 2010.
7. Tomizaki, K.-Y.; Teramura, S.; Imai, T.; Asano, M. *Manuscript in preparation*.

とみざき きんや
龍谷大学 先端理工学部
応用化学課程

ペプチド型薬剤の共有結合化と血中安定性獲得

1. はじめに：直鎖状ペプチドによる創薬？



松塚 洸樹



勝木 陸



瀧 真清

ペプチドは生み出すことができる構造の多様さから、潜在的にほとんどの標的分子に対して結合して阻害剤となりうる可能性を持っている。さらに低分子型薬剤と比べて、より多点で標的を認識できるため、一般的に結合特異性は高い。この点では抗体を含む高分子（蛋白質）型薬剤も同様だが、製造コストおよび免疫原性が高分子型と比べて低いことは、中分子であるペプチド型薬剤の強みである¹。

ペプチド型創薬は、20世紀前半にインスリンの単離が行われて以来、約100年の長い歴史を持ち、特に1960年代にペプチド固相合成が確立した²ことと呼応するように上市件数が増えている³。ファージディスプレイ（PD）法⁴のようなペプチドライブラリーからコンビナトリアル選択する手法が1980年代に盛んに開発され、これにより天然資源中に存在しえないペプチド配列も取得可能となった。

ペプチド型薬剤の分子形態は、大雑把には主鎖に大環状（macrocylic）構造を持つものと、持たない直鎖状（linear）構造のものに分類できる。一般的に直鎖状ペプチドは環状ペプチドと比べて柔軟で動きやすい構造を持ち、標的に結合する際のエントロピー損失が大きいため結合親和性が低く、さらに生体内のプロテアーゼによって認識を受け分解され易いという、二重の弱点を持っている。従って今日では、簡易的には天然（ジスルフィド）型の大環状構造を持つように設計されたライブラリーペプチドを用いて、先端的には非天然大環状型のものを用いて⁵、それぞれ多様な標的に対して迅速にコンビナトリアル選択する創薬手法が主流になっている。

このような背景のもと我々は、結合親和性および血中安定性の両面において不利だと思われる直鎖状ペプチドを、共有結合阻害剤（Targeted Covalent Inhibitor; TCI）としてコンビナトリアル選択^{【注】}することで、新たな創薬手法を確立できないかと考えており、本稿ではその試みを紹介する。

【注】 ペプチド型 TCI のコンビナトリアル選択とは？

中分子の標的特異性の高さを生かし、標的蛋白質だけに共有結合を形成し半永久的な薬効を発揮する薬剤取得を目指し、我々は拡張 PD 法によりペプチド型 TCI の取得を行ってきた。当初は、ライブラリーの構築中または選択操作中において、共有結合起点（warhead）の非特異的な共有結合反応の抑制が困難であったが、我々は標的蛋白質とライブラリーペプチドとの組み合わせによって形成される特異な微小環境でのみ反応を活性化できる潜在型 warhead を使用することでこれを解決し、ペプチド型 TCI を直接的に選択した（図 1）。詳細は原著⁶または総説⁷をご覧ください。

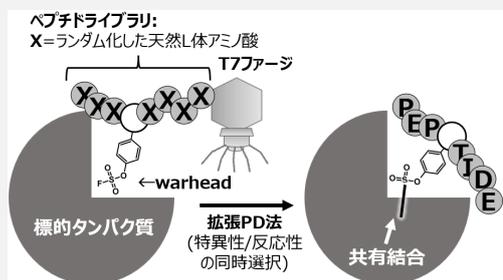


図 1 拡張 PD 法によるペプチド型 TCI のコンビナトリアル選択

2. ペプチド型 TCI の標的への共有結合による分解耐性獲得

中分子薬剤を血中で安定に存在させるための例として、前述した非天然化/環状化に加えて、運搬蛋白質の血清アルブミンと薬剤とを結合させる手法がある。例えば環状ペプチドがヒト血清アルブミン（HSA; 66 kDa）と複合体を形成すると、同ペプチドの見かけの分子量が上がり腎排泄されづらくなる⁸。我々がペプチド型 TCI を作製するにあたり、HSA の代わりに標的と共有結合させることでペプチドの分子量を上げ

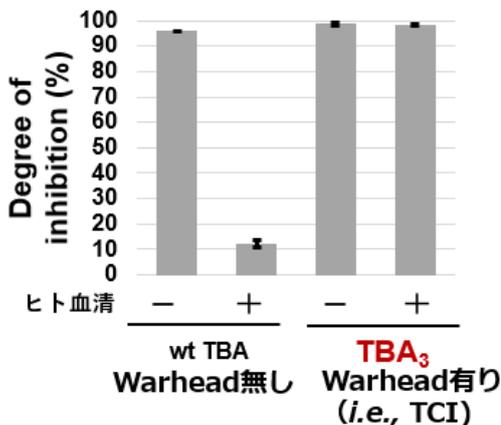


図 2 ヒト血清存在下での DNA 型 TCI (TBA₃) の thrombin 阻害活性

て腎排泄を抑制する着想は当初から持っていたが、実験の過程で意外にも、ペプチドと標的とを共有結合させるだけで、プロテアーゼ分解から逃れ、安定性が向上することが分かった^{6,9}。具体的には、前述のようにコンビナトリアル選択したペプチド型 TCI を、標的である GST 蛋白質と共有結合させた後、血清中に 37°C で 24 時間インキュベートしても同ペプチド型 TCI は加水分解されなかった。なおこの現象は、ペプチドよりも更に生体内での加水分解耐性が低い核酸型 TCI においても確認されている。具体的には、thrombin binding aptamer (TBA) の 5' 末端から数えて 3 残基目を warhead 修飾した TBA₃ において、エクソおよびエンドヌクレアーゼを含む血清中でインキュベートした際に、共有結合前後での明確な差異が見られた¹⁰ (図 2)。

3. ペプチド型 TCI の共有結合反応前の分解耐性向上

上記の通り、warhead 以外の部分は全て天然型モノマーからなる直鎖状ペプチド (または核酸) が、標的と共有結合するだけで酵素分解耐性を獲得することはわかったが、反応前の耐性の問題が残っている。これを解決する方法として、我々は取得したペプチド型 TCI をレトロインバージョン (RI) 化することを考えた。RI 化とは、ペプチドを構成する天然 L 体アミノ酸配列を全て D 体に置換し、その際 N 末端と C 末端とを逆順にして並べなおす方法である¹¹。例えば図 3 に示すように、変換前の配列が ABC (L 体) であるなら、変換後は cba (D 体) となる。その際、アミノ酸残基数が少なければ、RI 化の前後でペプチド側鎖の三次元的な位置関係は保たれているため、変換後の D 体においても元の標的を認識することができる。

その際主鎖は、アミド結合部分の反転によって分解酵素から認識されなくなるため、血中安定性を上げることができる。RI 化の概念は 1970 年代に提唱されており、1990 年代を中心に癌や免疫/神経変性疾患を対象とした治療薬および抗菌剤への応用展開がなされている¹¹。しかしアミノ酸残基数が多くなりすぎると、主鎖アミドの反転の影響により、変換前の L 体ペプチ

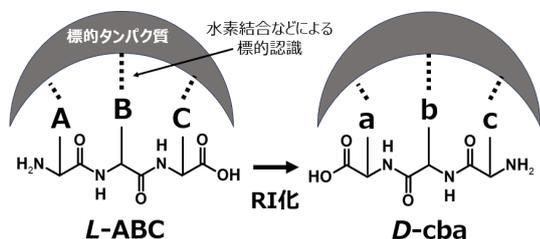


図 3 RI 化前後のアミノ酸配列と標的認識: RI 化後においてペプチド側鎖は RI 化前と同じ向きとなるが、主鎖アミドは反転する。

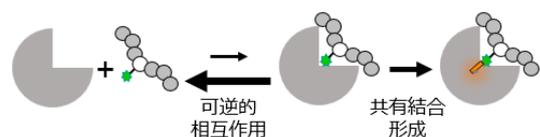


図 4 TCI の反応様式

ドとは異なる複雑な高次構造を形成しやすくなることが知られており、実際に血管内皮細胞増殖因子を標的とした研究で、RI 化により結合親和性が下がる報告例¹²などがある。その反面、アミノ酸残基数が少なすぎると標的との多点認識ができないため、やはり結合親和性が低下してしまう。

我々は、このような結合親和性の高止まりについて、非共有結合性薬剤に固有の問題と考えており、TCI においては除外できるのではないかと仮説を立てている。図 4 に示したように、TCI は非共有結合性薬剤とは異なり、標的生体分子と可逆的相互作用をした後に「非平衡的」に共有結合を形成する。

そのため、仮に直鎖状ペプチドの RI 化およびアミノ酸配列のダウンサイジングによって、TCI の標的親和性が低下したとしても、酵素に分解されない状態を保ったまま十分に時間をかければ、完全に標的を阻害することが原理的には可能である。以上の仮説のもと我々は現在実証実験を行っており、前述した GST 結合性のペプチド型 TCI (配列: LESC*AWY; C*は warhead 修飾システイン) を RI 化して得た D 体ペプチド (配列: ywac*sel) が、加水分解酵素 (Proteinase K) に対する耐性を獲得していること (図 5)、および GST 内の特定のアミノ酸 (¹¹¹Y) へ特

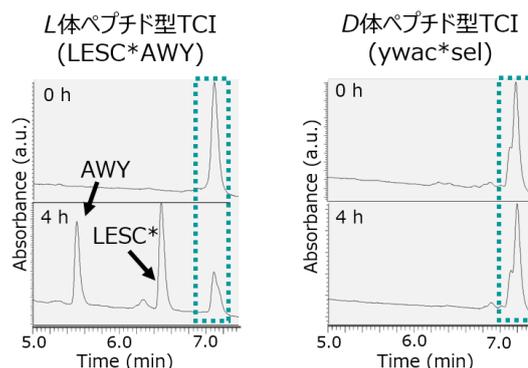


図 5 ペプチド型 TCI の RI 化による酵素分解耐性獲得。Proteinase K 存在下でインキュベートした TCI を LC-MS/MS にて追跡を行った。アスタリスク (*) は潜在型 warhead を表す。

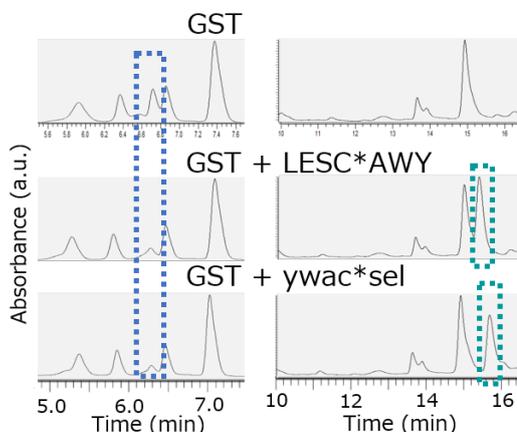


図 6 D 体ペプチド型 TCI の GST への位置特異的共有結合: TCI-GST 共有結合体をトリプシン消化し、LC-MS/MS にてフラグメント同定を行った。

異的な共有結合をすること（図 6）を、それぞれ確認している。

4. おわりに

2018 年までに承認されたペプチド型の医薬品³（約 70 種類）のうち、主鎖が直鎖状のみからなるペプチドが 6 割を占めており、このうちの実に半数が 2000 年以降の上市となっている。目覚ましく発展し続ける特殊環状ペプチド⁵が、近い将来には上市され続けていくであろうことは疑う余地がないが、我々は本稿で述べたニッチな手法を展開していくことで、ペプチド創薬に幅を持たせたい。また、結合特異性が良い反面、結合親和性や血中安定性が低いために薬剤となりえなかったペプチド結合体を創成したことのある創薬研究者の方々に対して、本稿で述べた概念が何らかの気づきをもたらすことができれば望外の喜びである。

文献

1. Wang, L.; Wang, N.; Zhang, W.; Cheng, X.; Yan, Z.; Shao, G.; Wang, X.; Wang, R.; Fu, C., *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7, 48.
2. Merrifield, R. B., *J Am Chem Soc*, 1963, 85, 2149–2154.
3. Lau, J. L.; Dunn, M. K., *Bioorg Med Chem*, 2018, 26, 2700–2707.
4. Smith, G. P., *Science*, 1985, 228, 1315–1317.
5. Vinogradov, A.V.; Yin, Z.; Suga, H., *J Am Chem Soc*, 2019, 141, 4167–4181.
6. Tabuchi, Y.; Watanabe, T.; Katsuki, R.; Ito, Y.; Taki, M., *Chem Commun*, 2021, 57, 5378–5381.
7. Yang, J.; Tabuchi, Y.; Katsuki, R.; Taki, M., *Int J Mol Sci*, 2023, 24, 3525.
8. Ito, S.; Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Ohue, M.; Yamamoto, M.; Tsumoto, K.; Wakui, N., *J Med Chem*, 2020, 63, 14045–14053.
9. Tabuchi, Y.; Katsuki, R.; Ito, Y.; Taki, M., *Pept Sci* 2021, 2022, 15–16.
10. Tabuchi, Y.; Yang, J.; Taki, M., *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 7778.
11. Doti, N.; Mardirossian, M.; Sandomenico, A.; Ruvo, M.; Caporale, A., *Int J Mol Sci*, 2021, 22, 8677.
12. Foy, K. C.; Liu, Z.; Phillips, G.; Miller, M.; Kaumaya, P. T., *J Biol Chem*, 2011, 286, 13626–13637.

まつづか こうき
電気通信大学 大学院
情報理工学研究科
基盤理工学専攻
かつき りく
電気通信大学 大学院
情報理工学研究科
基盤理工学専攻

たき ますみ
責任著者
電気通信大学 大学院
情報理工学研究科
基盤理工学専攻
taki@pc.uec.ac.jp

ピレン修飾ペプチドからの円偏光発光と 標的核酸を検出したピレン修飾 PNA からの 蛍光発光

1. はじめに

以下に紹介する筆者らの研究は、10 年程前に北松が、岡山大学（宍戸昌彦研究室→大槻高史研究室）から近畿大学へ移動した頃に、同じ学科の同僚となった今井喜胤先生が学科内の定例プレゼンで発表された有機小分子に修飾したピレンエキシマーからの円偏光発光（Circularly Polarized Luminescence=CPL）に興味を持ち、漠然とピレンエキシマーからの CPL と北松が専門とするペプチドでコラボレーションできないか？という軽い気持ちで話しを持ちかけたことがきっかけだったと記憶している。つまりこの共同研究は、同世代同志で楽しく研究できれば程度の動機であり、何か特別な目標・ねらいをもって始めたわけではない。しかし、そんな軽い気持ちで始めた共同研究も時とともに（ほぼ今井先生によって）何となくそれらしくなったので記したい¹⁻¹²。

最初にこの研究を始めるかどうかにあたり気になったのが、すでに他の研究者が同じ研究を実施していないか？ということであった。案の定、検索してみるとすでに他の研究者がペプチドとピレンエキシマーからの CPL を組み合わせて研究していることがわかった¹³。それは私の岡山大学のときのボスだった。そういえば 20 年程前にボスの部屋で、 α -ヘリックス構造のペプチドからは強い CPL がでるんや、と伺ったことをこの時点で思い出した。その研究は、当時の研究室では実施しておらず、興味も湧かなかったのも、私はそのことをすっかり忘れていた。

それでもその研究では NCA 法より重合したペプチドで分子量分布があること、また水溶性が低いことが予想されたので、ペプチド固相合成法から調製された構造の明確なペプチドで、将来的に水溶性も保証できる研究ということであれば、二次構造についてはとりあえず置いておいて、先行研究との違いはあるだろうということで、結局のところこの共同研究を始めよう



北松 瑞生



今井 喜胤

ということになった。

2. ピレンを側鎖に含むペプチドからの円偏光発光

ピレンエキシマーを形成するペプチドのデザインは、図 1C に示すようにシンプルである。それは、2つのピレニルアラニンユニット (Pyr) の間にアルキルリンカーを挟んでおり、また、その N と C 末端側にはアルギニンユニットを加えている。このアルギニンユニットの付与は、水溶性の付与をねらいとしているが、将来的には、複数のアルギニンユニットを加えることで細胞膜透過性ペプチドとして利用したいというねらいもある。Pyr 間にアルキルスパーサーなどで距離を与えることは大事で、Pyr を直接連結した構造 (図 1A の **Pyr-Pyr**: 黒の点線) では、CPL はおろかエキシマーの蛍光も得られない。一方で、グリシン (C1) や β -アラニンを Pyr の間に挟むと、うまくピレンエキシマーの蛍光、さらにエキシマー由来の CPL も得られることがわかった。このエキシマー由来の CPL はアルキルスパーサーの鎖長 (Cn) に依存してその強度、さらには符号も変化することがわかった (図 1B)。これは、少々飛躍するかも知れないが、距離を制御することで形成されるエキシマーの2つのピレンの角度が制御でき、その CPL の強度や符号を制御できることを示している、と著者らは考えている。

3. 核酸とハイブリッド形成したピレンを含む PNA ツインプローブからの蛍光発光

著者らは上述したようにピレン修飾ペプチドによるエキシマーからの CPL について、生命科学の分野で役立つことはないかと当初考えていた。そこで著者らのバックグラウンドも踏まえ、ペプチド核酸 (PNA) を使った核酸検出のための発光プローブとして CPL を使いたいという考えに至った。現時点では、CPL

の検出にまで研究は進んでいない (蛍光による検出までに留まっている) が、将来的には、CPL による生細胞内での RNA 検出を期待している。

上述を具体化するために取り急ぎ思いついたのが、以下に示す PNA ツインプローブである (図 2A)。コンセプトとしては、2つの PNA (**P1** と **P2**) の末端側にそれぞれピレンを修飾しておき、DNA 上で双方がハイブリッドを形成したときにピレンが近接して、エキシマーが形成される (図 3 下)、というものである。

最初にその研究を始めるかどうかにあたり気になったのが、すでに他の研究者が同じ研究を実施していないか? ということであった。これも案の定、検索してみるとすでに DNA とピレンエキシマーを組み合わせて研究されていることがわかった¹⁴。それでも、生細胞内での核酸検出を目標にして PNA を使えば差別化できるだろうと考え、こちらも軽い気持ちで研究を始めることにした。なお本研究は、当研究室の博士後期課程に所属する石井康稀君が現在研究に勤しんでいる¹⁵。

初めは、シンプルに PNA の N 末端または C 末端にピレニルアラニンを修飾した DNA 上に隣接するように作成し、DNA と混合したが、エキシマー蛍光はほぼ得られなかった。条件とした濃度と温度ならば、PNA は DNA と容易にハイブリッドを形成することは経験上知っていたので、おやっ? と思い、その理由を想像した結果、ピレンの間がエキシマーを形成するだけの鎖のフレキシブルさが無いのか、ピレンのエキシマー発光に至るまでの距離が足りないように感じた。そこでハイブリッドを形成する DNA 上の PNA の距離を変えたり、PNA とピレンの間の距離を変えるためにアルキルスパーサーを導入したところ、これらの距離の変化によって鋭敏にエキシマー発光の強さが変化することがわかった。結局これらを調整することでモノマー強度と比較してエキシマー強度は 1.5 倍程度

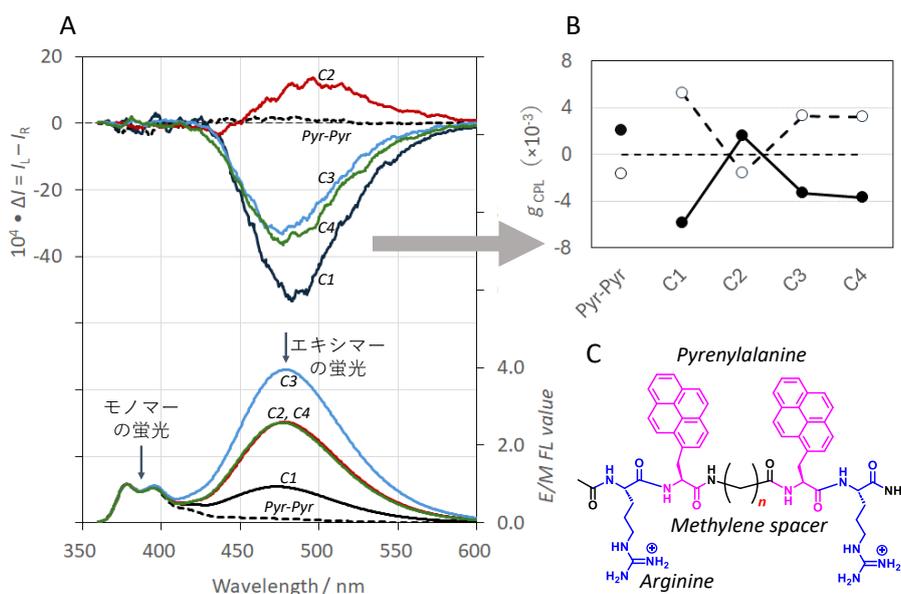


図 1 (A) 水溶液中でのピレン修飾ペプチドの CPL スペクトル (上) および蛍光スペクトル (下)。図内の **Pyr-Pyr** は図 1C のアルキルスパーサーが無いペプチド、**C1~C4** は、図 1C の n がそれぞれ 1~4 のペプチドを示す。(B) 各ペプチドの g_{CPL} 値。実線は図 1A の L 体から成るペプチドで、破線は、D 体から成るペプチドである。(C) ピレン修飾ペプチドの化学構造。

大きくなるようにできた。もう少しエキシマー蛍光が強い方が CPL の観測には良いのかと思うが、一度これで CPL の制御に関して実験しても良いと思う。または、よりエキシマー形成を容易にするように PNA のピレンユニット同士をステイプル化することでより強いエキシマーが形成されないか検討中である。

4. おわりに

本研究は、著者らのバックグラウンドを踏まえた上での足掛かりとしてピレンエキシマーを形成しうるペプチド（ペプチド核酸）の開発を始めたが、前述したようにピレンエキシマーを題材として選んだ特段の理由は無い。研究室にピレニルアラニンの Fmoc 体がたまたまあったからというのが理由としてはむしろ正しい気もする。2つの色素が、近接したときに発光したり、色相が変化すれば、著者らの目的に合うし、さらにはそこから CPL が生成すれば、なお良い。最近我々は、フェニルボロン酸とそのリガンドとの間で生じる発光材料の生成を利用した PNA ツインプローブやピレンとペリレンからの FRET もしくはエキシプレックス形成による PNA ツインプローブの開

発も始めた。

2. で紹介した研究と 3. で紹介した研究は、まだ別々の研究と考える方がはっきりするが、双方の研究は、いずれ一つにつながるものと期待している（図 3）。

あと、冒頭でも触れたが、本研究のキーワードとして水溶性は大事だと考えている。例えば、本ペプチドを塗布できる CPL 材料として用いる場合、水に溶けた方が、有機溶剤に溶かして用いる CPL 材料よりも環境負荷が少ないことが利点となるだろう。また、生細胞内での CPL 検出プローブとして用いる場合、そのプローブが水に溶けることは大事であるからである。

最後になりますが、ペプチドニュースレターへの寄稿の機会を与えて頂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。先生からは、特に制約は無く何を書いても良いですよ、と寛大な言葉をいただき、それを信じて執筆しました。また本研究は、JSPS 科研費 JP20K05714（北松）、JP18K05094（今井）の支援により遂行されました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

1. Imai, Y.; Kitamatsu, M. *Processes* 2023, 11, 2778–2791.
2. Imai, Y.; Mimura, Y.; Motomura, Y.; Ikemura, R.; Shizuma, M.; Kitamatsu, M. *Bull Chem Soc Jpn* 2023, 96, 268–273.
3. Mimura, Y.; Motomura, Y.; Kitamatsu, M.; Imai, Y. *Asian J Org Chem* 2021, 10, 149–153.
4. Mimura, Y.; Motomura, Y.; Kitamatsu, M.; Imai, Y. *Processes* 2020, 8, 1550–1557.
5. Mimura, Y.; Motomura, Y.; Kitamatsu, M.; Imai, Y. *Tetrahedron Lett* 2020, 61, 152238–152242.
6. Mizuno, H.; Kitamatsu, M.; Imai, Y.; Fukuhara, G. *ChemPhotoChem* 2020, 4, 502–507.
7. Mimura, Y.; Sato, T.; Motomura, Y.; Yoshikawa, H.; Shizuma, M.; Kitamatsu, M.; Imai, Y. *RSC Adv* 2020, 10, 2575–2580.
8. Mimura, Y.; Kitamura, S.; Shizuma, M.; Kitamatsu, M.; Imai, Y. *Org Biomol Chem* 2018, 16, 6895–6901.
9. Mimura, Y.; Kitamura, S.; Shizuma, M.; Kitamatsu, M.; Fujiki, M.; Imai, Y. *ChemistrySelect* 2017, 2, 7759–7764.
10. Mimura, Y.; Nishikawa, T.; Fuchino, R.; Nakai, S.; Tajima, N.; Kitamatsu, M.; Fujiki, M.; Imai, Y. *Org Biomol Chem* 2017, 15, 4548–4553.
11. Nishikawa, T.; Kitamura, S.; Kitamatsu, M.; Fujiki, M.; Imai, Y. *ChemistrySelect* 2016, 1, 831–835.
12. Nishikawa, T.; Tajima, N.; Kitamatsu, M.; Fu-

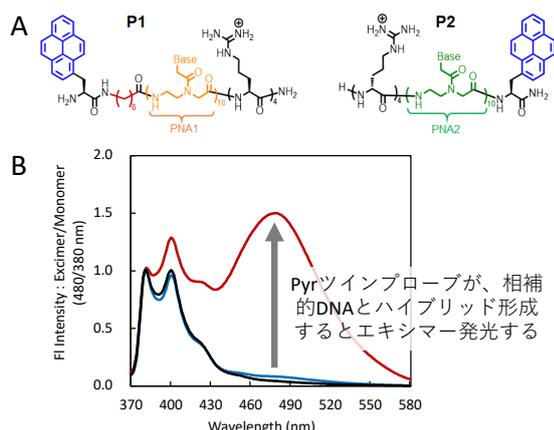


図 2 (A) PNA ツインプローブ（例として P1 と P2）の化学構造。(B) 水溶液中での PNA ツインプローブの蛍光スペクトル。黒線は、PNA ツインプローブのみ。青線は、その PNA ツインプローブにスクランブル配列（非相補的な）の DNA を加えたとき、赤線は、相補的な DNA を加えたとき。

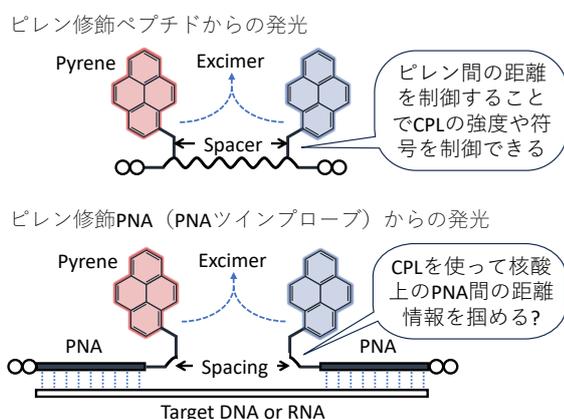


図 3 本研究のここまでのまとめ

- jiki, M.; Imai, Y. *Org Biomol Chem* 2015, 13, 11426–11431.
13. Sisido, M.; Egusa, S.; Okamoto, A.; Imanishi, Y. *J Am Chem Soc* 1983, 105, 3351–3352.
14. Paris, P. L.; Langenhan, J. M.; Kool, E. T. *Nucleic Acids Res* 1998, 26, 3789–3793.
15. Ishii, K.; Tsuchitani, S.; Toyama, M.; Shigeto, H.; Yamamura, S.; Ohtsuki, T.; Imai, Y.; Kitamatsu, M. *Bioorg Med Chem Lett* 2022, 71, 128838–128841.

きたまつ みずき
近畿大学 理工学部
応用化学科 生物物理化学研究室
kitamatu@apch.kindai.ac.jp
<https://www.apch.kindai.ac.jp/laboratory/kitamatsu/>

いまい よしたね
近畿大学 理工学部 応用化学科
y-imai@apch.kindai.ac.jp
<https://www.apch.kindai.ac.jp/laboratory/imai/>

光反応性保護基を用いたペプチドの 受動的膜透過性の向上

このたびはこのような執筆の機会を与えて下さった九州大学の巢山慶太郎先生およびペプチド学会ニューズレター編集委員の皆様にご礼申し上げます。今回は、最近行っている研究である「直鎖ペプチドの立体構造と膜透過性に及ぼすN-*o*-ニトロベンジル化の影響」について概説させていただきます。



尾谷 優子

1. はじめに

膜透過性は薬物設計における重要な指標です。ペプチドは有望な創薬モダリティであり、その受動的膜透過性の向上は、ペプチドの潜在的ターゲット拡大につながります。ペプチドの受動拡散による生体膜透過には分子量、水素結合供与体と受容体の数、極性表面積など、いくつかの物理化学的特性が影響しています。特にペプチドに普遍的に存在するアミド (CONH) 結合の高い親水性は、受動的膜透過性を低下させる主な要因となります。例えばアラニン 4 残基ペプチド (H-Ala-Ala-Ala-Ala-OH) において、アミド結合の NH 1 個をメチレン基に置換する (-CONH- → -COCH₂-) と、疎水性の指標である LogP が 0.7 増加しますが、N-末端と C-末端をアセチル基とメチルエステルでそれぞれ保護しても (Ac-Ala-Ala-Ala-Ala-OMe) LogP は 0.2 しか増加しません。すなわちアミドを修飾して極性を下げること

により、側鎖や N-末端・C-末端の保護より効率的にペプチド全体の膜透過性を改善できる可能性があります。

受動的膜透過性を向上させる誘導化法としてアミドの N-メチル化が知られていますが、不可逆的であり、本来のペプチドの性質を変える可能性があります¹。アミドを一時的に疎水性保護基で修飾し、膜透過後に外部刺激により保護基を除去して元のペプチドに戻すことができれば、細胞内でペプチド本来の機能を果たすことが可能となります。温和な条件で導入・脱保護できるアミド窒素上の保護基の種類は限られています。その中でもオルト-ニトロベンジル (oNB) 基は光照射により脱保護可能な保護基であることから、操作性や細胞への適用性が高いと考えられます²。光反応性の生理活性化合物は「ケージド化合物」と呼ばれ、カルシウムやグルタミン酸など主に低分子化合物のケージド化合物が生物実験において使われてきました。ケージドペプチドの研究は限られていますが、oNB 基で修飾されたケージドペプチドは生物活性の制御^{3,4}や凝集性など物理化学的性質の制御^{5,6}に用いられた例が報告されています。

今回私たちは、ペプチドの主鎖アミド結合の oNB 置換がペプチドの膜透過性に及ぼす影響について、ペプチド長や oNB の置換位置、置換数の影響を系統的に評価しました。

2. 合成と光反応

中性側鎖を持つアミノ酸 (Gly, Ala, Phe) からなるモデルペプチドについて、N-oNB 保護ペプチドと NH (無保護) ペプチド、N-メチル化ペプチドを合成しました (図 1a)。

ペプチドは液相合成により合成しました。**8** (Fmoc-Gly-(oNB)Ala-OMe) の合成例を図 1b に示します。還元的アミノ化反応により、Ala の N 末端に oNB 基を導入した 2 級アミン **17** を合成しました。**17** とアミノ酸との反応性は大きく低下し、HATU などのペプチドカップリング試薬では進行しませんでした。おそらく oNB 基の立体的および電子的効果に起因すると思われます。今回はアミノ酸の酸塩化物 Fmoc-Gly-Cl を反応させることでジペプチド **18** を得ました。続く C-末端への伸長反応により **8** を得ました。

oNB 保護ペプチドの光分解反応は LED 光源 (390 nm, Kessil LED lamp PR160-390 nm) を用いて行いました (図 1c)。NMR や HPLC を用いて反応の進行を確認しました。トリペプチド **8** の場合、5 分間の照射で原料 **8** が消失し、良好な単離収率で NH 体 **6** が得られました。いずれのペプチドも長さ、oNB の数、溶媒によらず効率的に脱保護されることが分かりました。

3. 受動的膜透過性

次に人工膜を用いた試験法 (parallel artificial membrane permeability assay [PAMPA]) により受動的膜透過性を評価しました⁷。トリペプチドとテト

ラペプチドそれぞれについて、同じアミノ酸配列を持つ無保護 (NH) ペプチド、N-メチル化ペプチドおよび N-oNB 化ペプチドを比較すると、N-oNB ペプチドはペプチドの長さによらず透過性が著しく向上することが分かりました。N 末端や C 末端の置換基が異なるペプチド (C 末端カルボン酸体、N 末端アセチル化体) においても、末端置換基に関わらず N-oNB 化は膜透過性を増加させることが分かりました (図 2 (i), **2/3** および **4/5**)。ペプチドの長さが長くなるにつれ、無保護ペプチドの膜透過性は低下しましたが (**6** > **9**), 対応する N-oNB 保護ペプチド **8**, **11** はそれぞれ膜透過性が約 2 倍, 26 倍増加しました (図 2

(ii))。より長いペプチドについては NH 体 **12** では膜透過性を示しませんでした (~ 0 cm/s), oNB 基を 1 個導入すると N-置換の位置にかかわらず増加し (**14**, **15**), さらに, 2つの oNB 基を導入することにより膜透過性は大きく増加しました (**16**) (図 2 (iii))。このことから, 本来膜透過性の低いペプチドにおいても, 複数の oNB 基の導入により膜透過性を上げることが可能であると期待されます。また, 長いペプチドにおいては特に, N-メチル化体 **10**, **13** に比べて対応する N-oNB 化体 **11**, **15** は膜透過性の上昇率が高くなりました。

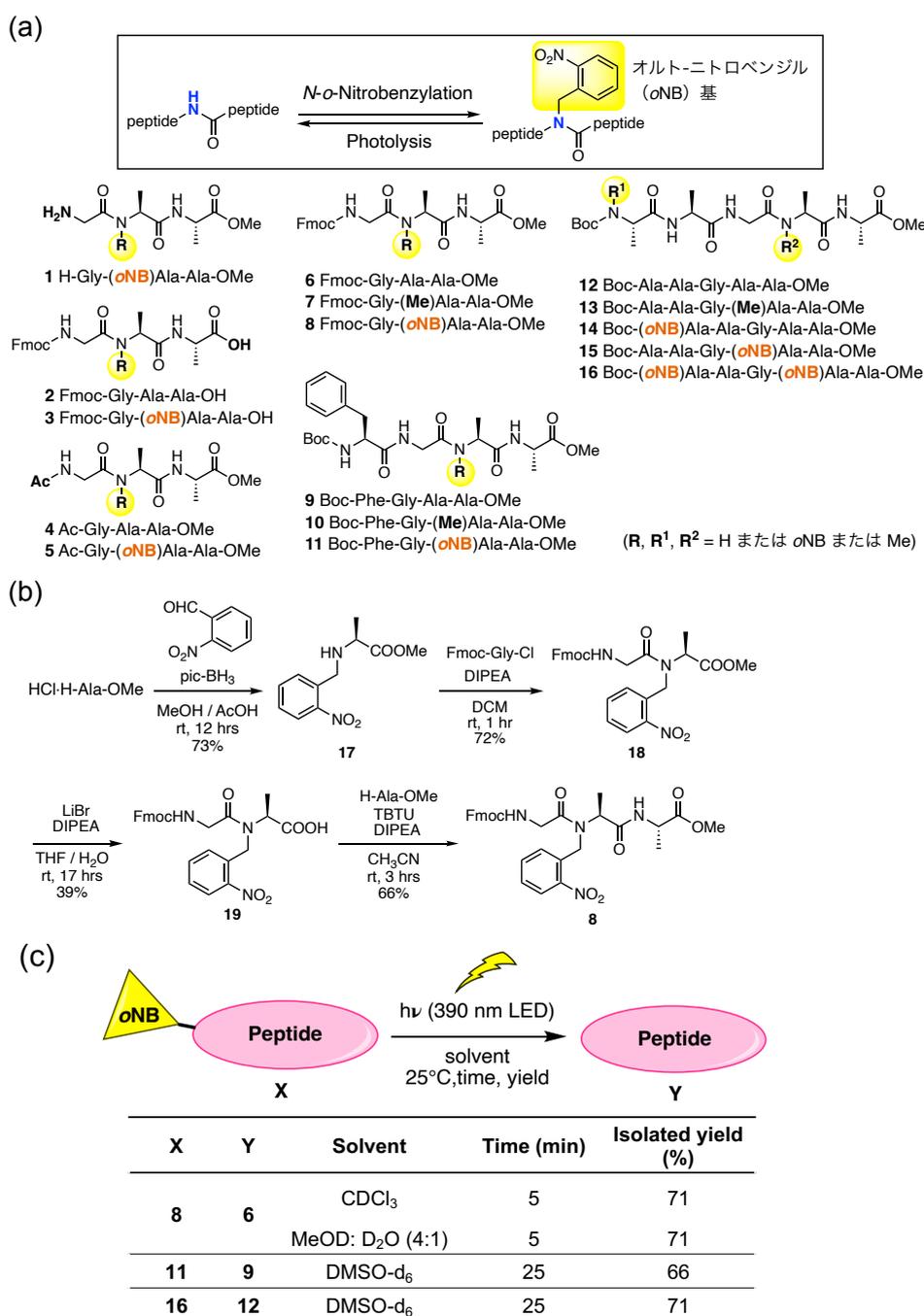


図 1 (a) 合成した, アミド窒素上に保護基を持つペプチドと保護基を持たない参照ペプチド。(b) **8** の合成経路。(c) 光照射による oNB ペプチドの脱保護反応。

4. コンホメーションへの影響

次に、N-oNB 化によって直鎖ペプチドの立体構造（コンホメーション）に与える影響を調べました。プロリンアミドに代表される三級アミドはトランス体だけでなくシス体も取ることが知られています。溶液構造を NMR で調べると、NH ペプチド **6** はトランスアミド体のみを取るのに対し、N-oNB 化ペプチド **8** と N-Me 化ペプチド **7** はいずれも Gly1-Ala2 のアミド結合がトランス体とシス体の両者の平衡混合物となり、トランスアミド体が主要な回転異性体であることが分かりました（図 3a）。

また、Replica exchange with solute tempering (REST) シミュレーションを用いて分子の安定構造を調べました。REST は通常の分子動力学計算と比べて短時間で効率的に構造を発生させることができます。膜中での立体構造を理解するため、極性が低く膜環境

に近い溶媒である CHCl_3 中でシミュレーションしました。**6** は、ゆるく伸びた主鎖コンホメーションを取りやすいのに対し、**7** と **8** はより折りたたまれたターンのようなコンホメーションを取りやすい傾向が示唆されました。得られたコンホメーションのうち代表的な構造について、Conductor-like Screening Model for Realistic Solvation (COSMO-RS) 計算により表面分極電荷密度 (σ 表面) を求めました⁸（図 3b）。**6** のアミド NH 周辺の表面は濃い青で示され高い極性（親水性）を示すのとは対照的に、**7** と **8** の N-置換基周辺の表面は広い範囲で緑色、すなわち電的に中性（疎水性）を示していました。N-置換基の導入によりアミド NH の極性がマスクされ、効果的に膜透過性を高めることが分かりました。

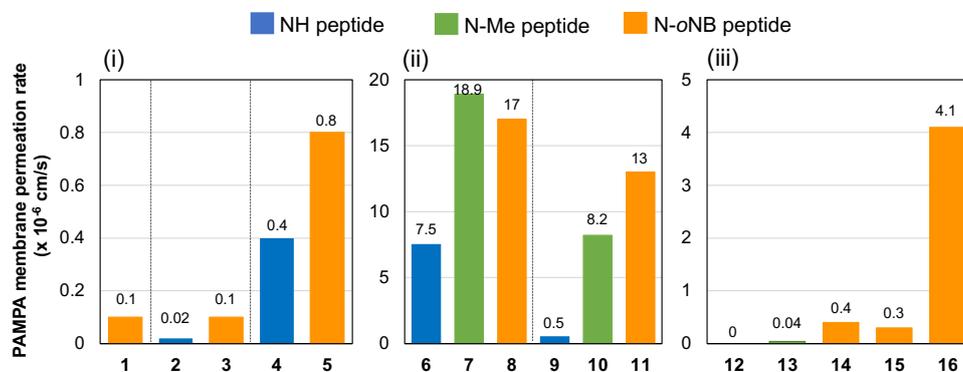


図 2 PAMPA 法による受動的膜透過性。(i) 様々な N/C-末端置換基を持つペプチドの N-oNB 化の影響。(ii) アミド N 上の置換基の影響。(iii) oNB 基の数と位置の影響。

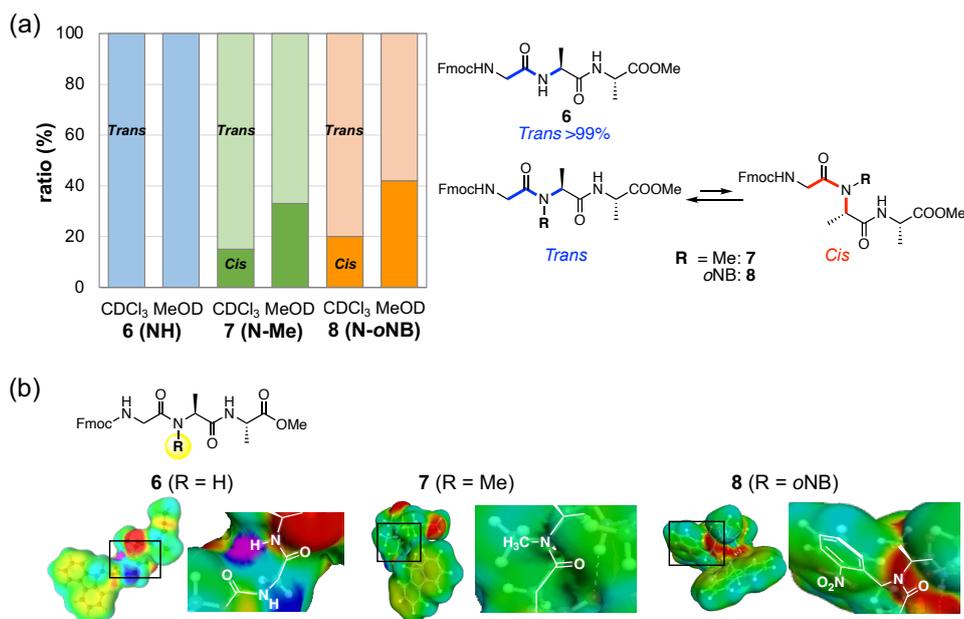


図 3 N-置換によるペプチドの立体構造への影響。(a) NMR から求めた溶液中のペプチドの Gly1-Ala2 アミドのトランス/シス比。(b) REST シミュレーションから得られた、ペプチド **6**, **7**, **8** の代表構造の COSMO 表面分極電荷密度 (σ)。赤は COSMO 電荷密度が正、すなわち分子表面が負に帯電していることを示す。青は COSMO 電荷密度が負、すなわち分子表面が正に帯電していることを示す。緑は電的に中性であることを示す。

5. 終わりに

本研究の結果、ペプチドに光反応性保護基である oNB 基を導入することで、ペプチドの膜透過性が大幅に改善されることがわかりました⁹。この技術を細胞に用いれば、光による脱保護により元のペプチドが生成すると同時に、膜非透過性になり細胞内に滞留することが期待されます。例えば、p53-MDM2 相互作用などの細胞のがん化に関係する細胞内タンパク質-タンパク質相互作用の阻害ペプチドに応用したいと考えております。特に、安定性や膜透過性がより高いことから最近注目されている環状ペプチドにこの手法を応用することにより、さらに高機能なペプチドを開発できると考えています。また幅広い応用を可能にするため、ペプチドカップリング試薬で合成可能な手法の開発も進めています。

ペプチドは新しい創薬モダリティとして期待されながら技術的な困難がありましたが、光反応性保護基を用いることで生理活性ペプチド研究の可能性が広がると考えています。

最後になりましたが、本研究は東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室で実施されました。教授の大和田智彦先生および大学院生の黄芷涵さん、そして研究室の皆様深く感謝申し上げます。また、ペプチドの物理化学的性質の測定でお世話になった共同研究者の先生方に感謝いたします。本研究は JSPS 科研費 (23K06022)、アステラス病態代謝研究会、旭硝子財団、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (JP22ama121053) のご支援を受けて実施しました。この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

1. Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Acc Chem Res* 2008, 41, 1331-1342.
2. Pelliccioli, A. P.; Wirz, J. *Photochem Photobiol Sci* 2002, 1, 441-458.
3. Ohmuro-Matsuyama, Y.; Tatsu, Y. *Angew Chem Int Ed* 2008, 47, 7527-7529.
4. Nandy, S. K.; Agnes, R. S.; Lawrence, D. S. *Org Lett* 2007, 9, 2249-2252.
5. Johnson, E. C. B.; Kent, S. B. H. *Chem Commun* 2006, No. 14, 1557-1559.
6. Salvesson, P. J.; Haerianardakani, S.; Thuy-Boun, A.; Kreutzer, A. G.; Nowick, J. S. *J Am Chem Soc* 2018, 140, 5842-5852.
7. Chen, X.; Murawski, A.; Patel, K.; Crespi, C. L.; Balimane, P. V. *Pharm Res* 2008, 25, 1511-1520.
8. Schwöbel, J. A. H.; Ebert, A.; Bittermann, K.; Huniar, U.; Goss, K. U.; Klamt, A. *J Phys Chem B* 2020, 124, 3343-3355.
9. Huang, Z.; Ishii, M.; Watanabe, E.; Kanamitsu, K.; Tai, K.; Kusuhara, H.; Ohwada, T.; Otani, Y. *Bioorg Chem* 2024, 145, 107220.

おたに ゆうこ
東京大学 大学院薬学系研究科
薬化学教室
otani@mol.f.u-tokyo.ac.jp

ペプチドを構成要素とする 高分子が形成する分子集合体

1. はじめに

我々はペプチドを構成要素とする高分子が形成する分子集合体の構造制御、生体関連材料への応用を中心に研究を行っています。本ニュースレターの読者の方であればよくご存知かと思いますが、ペプチドは N-置換グリシンの重合体です。ペプチドにはアミド基水素が存在しないことから分子内水素結合を形成せず、その物理化学的性質は側鎖に大きく依存します。また、ペプチドは分子内水素結合を取らないために一般的な有機溶媒に可溶であり、固相合成や NCA 重合などのペプチド合成技術を利用可能等のメリットも有しています。今回は執筆の機会をいただきましたので、現在研究を進めている研究の一部をご紹介します。



奥野 陽太



岩崎 泰彦

2. 糖鎖と温度応答性ペプチドのブロックコポリマーが形成するベシクル

側鎖がアルキル鎖であるペプチドはその側鎖長によって水への溶解度が変化します。側鎖炭素数が 2 以下のペプチドは親水性、4 以上では疎水性、3 では LCST 型の温度応答性を示します¹。所属していた研究室の先行研究で LCST 型ポリマーを疎水部としたベシクルは低分子選択的な膜透過性を発現することが知られておりますので^{2,3}、疎水部に側鎖炭素数が 3 の poly(*N*-*n*-propyl glycine) (PNPG) を用いた場合の物質透過選択性に興味を持ち、実験を開始しました。

分子設計は疎水部に PNPG、親水部には 3 糖のマルチトリオースを結合した構造としました (図 1a)。PNPG 部位は NCA 重合法を用い、狙い通りの分子量で分子量分散 1.05 と精密合成に成功しました。糖鎖結合することで得られたブロックコポリマー (S₃-PNPG) は、濁度測定から水中で LCST 型の温度応答性を示しました。そこで S₃-PNPG を 1.0 mg/mL で冷水中に溶解し徐々に水温を上昇させることで分子集合体を作製しました。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察から粒径 50-200 nm の球状集合体が確認でき、これは動的光散乱 (DLS) で測定した流体力学的粒径

の 180 nm と概ね一致しました (図 1b)。また放射光小角 X 線散乱測定から薄膜構造を確認できたため、この分子集合体がベシクルであると結論付けられました。また、放射光広角 X 線散乱測定からこのベシクル疎水性部位が僅かに結晶化していることが明らかとなりました。

得られたベシクル膜の分子透過性を評価するため、S₃-PNPG から薄膜水和法によってジャイアントベシクルを作製しました。ベシクルの外液部分に蛍光色素を添加し、その色素がベシクル内部へと流入する様子を共焦点蛍光顕微鏡により観察しました。はじめにカチオン性色素である Rhodamine 6G、電気的に中性である Rhodamine B、アニオン性である Fluorescein を添加し透過性を比較したところ、Rhodamine 6G は非常に素早くベシクル内部に浸透したのに対して、Fluorescein は時間が経っても殆どベシクル膜を透過しませんでした。Rhodamine B はその中間程度の透過率でした。このことから電荷が透過性に重要な役割を果たしているとわかりましたので、ベシクルのゼータ電位を測定しました。その結果 -39 mV と大きく負の値であり⁴、これが膜透過のイオン選択性の理由であるとわかりました。さらなる検討のため、Rhodamine B 及び Fluorescein に異なる鎖長のアルキル鎖を修飾した誘導体を作製し膜透過性に与える影響を評価しました (図 1c)。いずれにおいてもアルキル鎖が長くなり疎水性が高くなる程膜透過性が向上しましたが、Rhodamine B の方がより顕著な変化がみられました。ピレン蛍光の許容遷移と禁制遷移比 (I₁/I₃) によりベシクル膜の疎水性を評価したところ、その値は 1.06 と従来報告されている LCST 型高分子を用いたベシクル膜よりも疎水性が高く、電荷の影響を受けない Rhodamine B では疎水性によるベシクル膜との親和性が透過性の重要なファクターで

あったと考えられます。これらの結果より分子の電荷と疎水性を見分けて選択的に膜透過させるスマートベシクルの構築に成功しました⁵。

3. 水溶性ペプチドへの糖鎖付加により誘起されるコアセルベート

2 項でご紹介した S₃-PNPG から成るベシクルに比べて親水性の高い物質を透過させる目的で、膜の親水性を向上させる検討を行いました。具体的には親水部に 5 糖であるマルトペンタオース、そして先程の PNPG に代わり親水性ペプチドである poly(sarcosine) (PSar) を結合した両親水性ブロックコポリマーを設計しました。先行研究では両親水性であっても水和能が異なる場合ベシクルを形成し得ることが報告されていたので、このような設計としています⁶。PSar 部は先ほどと同様に NCA 法を用いて、分子量分散 1.04 で平均重合度 86 の分子を精密に重合しました。ここにクリック反応を用いてマルトペンタオースを結合することで目的の分子 (S5-PSar) を得ました。はじめに DLS 測定を行ったところ、PSar ホモポリマーでは 10 nm を超える会合体が存在しなかったのに対して S5-PSar では粒径 149 nm の会合体が確認でき、Psar への糖鎖修飾によって分子の集合化が誘起されたことを確認しました (図 2a)。得られた分子集合体を TEM で観察したところ DLS と概ね一致する 100-200 nm の球状体が見られました。しかしながら膜構造を見いだせなかったため、クライオ電子顕微鏡法を用いてより詳細な観察を行いました。その結果この分子集合体には膜が存在しない、コアセルベート様構造をとっていることが明らかとなりました (図 2b)。

コアセルベート内の極性状態についての知見を得るため、ピレン及び 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホ

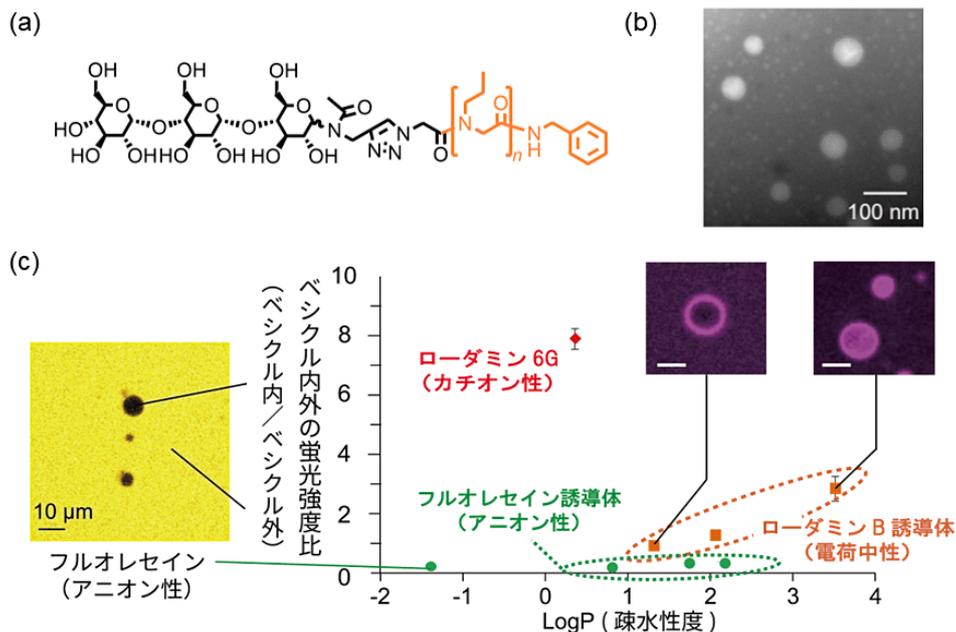


図 1 (a) S₃-PNPG の分子構造及び、(b) 昇温法によって得られたベシクルの透過型電子顕微鏡像。(c) ジャイアントベシクル外部へ蛍光色素を添加した場合、カチオン性の色素はベシクル膜を透過し、アニオン性色素は殆ど透過しない。また、中性色素については疎水性の増加に伴って透過率が向上する。

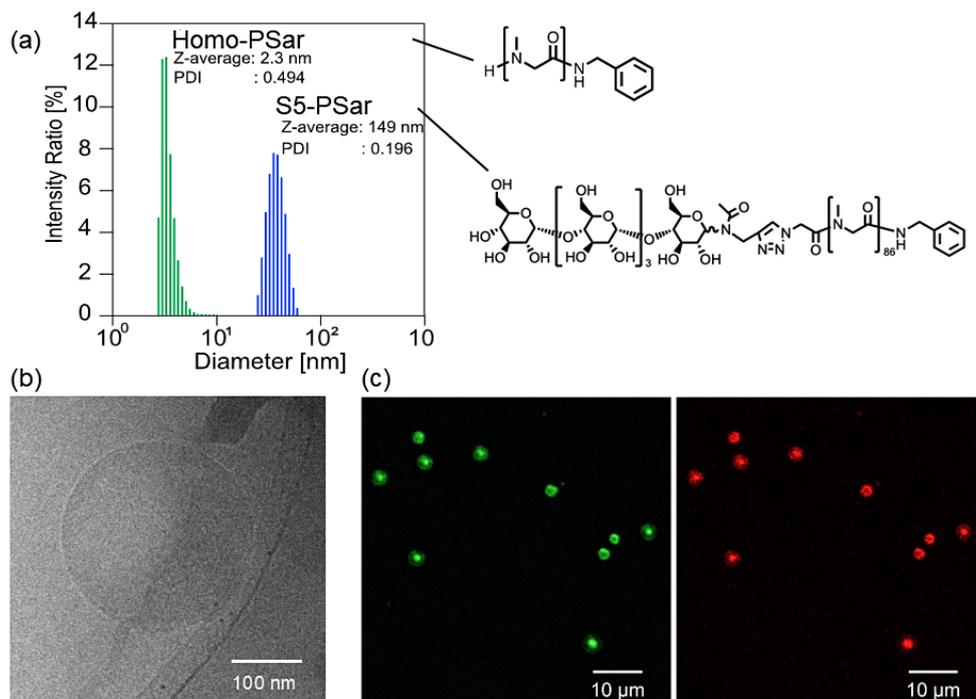


図2 (a) PSar への糖鎖付加によって分子集合体の形成を誘起した。(b) S5-PSar が形成する分子集合体は膜の内コアセルベート構造であった。(c) ジャイアントコアセルベート内部には電荷に依らず低分子化合物が浸透した。

ン酸 (1,8-ANS) を添加し、蛍光分光測定を行いました。ピレンの I_1/I_3 蛍光強度比からは PSar への糖鎖修飾により内部の疎水性が増加していることがわかりました。さらに分子近傍の微小極性環境を反映する 1,8-ANS の蛍光スペクトルからは、コアセルベート内部に疎水性の高い領域と親水性の高い領域の両方が存在していることが示唆され、コアセルベート内部の S5-PSar の一部が脱水とされていると考えられます。このような状態を引き起こした駆動力について評価すべく、塩化ナトリウム及び尿素水溶液中でコアセルベートの作製を試みました。その結果、塩化ナトリウム水溶液中ではコアセルベートは問題なく形成されたのに対して、尿素水溶液中では尿素の濃度増加に伴ってコアセルベートが崩壊の様子が確認できました。ここまでの結果から PSar に糖鎖を付加すると糖鎖ヒドロキシ基と PSar のカルボニル基間で緩やかな水素結合を形成することが、コアセルベート生成の駆動力であると考えられます。

最後にこのコアセルベートは内外で低分子化合物を透過できるかの確認を行いました。S5-PSar 薄膜を静かに水和することでジャイアントコアセルベートを作製し、その外液に Fluoresceine 及び Rhodamine 6G を添加した際のコアセルベート内部への透過挙動を共焦点蛍光顕微鏡で確認しました。結果、イオン性に依らずいずれの蛍光色素もコアセルベート内部へ浸透することが明らかとなりました (図 2c)。

4. 結晶性ペプチドを用いた結晶化誘起分子集合体

両親媒性高分子から形成される分子集合体は、ミセルやベシクルなど等方性の高い構造が一般的です。一方でナノチューブ構造やナノシート構造などの特定の

軸方向に対して異方性を有する分子集合体は様々な特性を有することから近年注目を集めています⁷。このような異方性を有する分子集合体を作製する手法として、疎水性が結晶性である両親媒性高分子を用いることで、疎水性相互作用による会合の後に疎水部の結晶化により更に構造を転移させる結晶化誘起分子集合体 (CDSA) が注目されています。ペプチドは側鎖のアルキル鎖長を調整することで結晶性を容易に制御できる他、その主鎖骨格の動きが制限されているため CDSA 用材料として優れています⁸。

我々は親水性である PSar に疎水性かつ結晶性である poly(*N*-*n*-butyl glycine) (PNBG) または poly(*N*-*n*-hexyl glycine) (PNHG) から成る両親媒性ブロックペプチドを合成し、その集合挙動の解明に挑んでいます⁹。分子はエタノールアミンを開始剤とした NCA 重合によりまず初めに PSar を重合し、これをマクロイニシエーターとして NCA 重合により疎水分率の異なる PSar-*b*-PNBG 及び PSar-*b*-PNHG を合成しました (図 3)。続いて得られたブロックペプチドをヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) に溶解し、超純水にインジェクションし分子集合体を調製しました。いずれの条件でも室温条件下ではミセル様小胞構造を形成するとわかりました。この小胞構造は

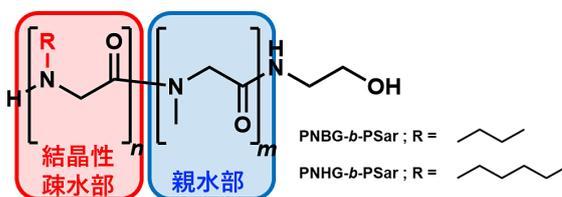


図3 結晶性疎水部を有する両親媒性ブロックペプチドの分子設計

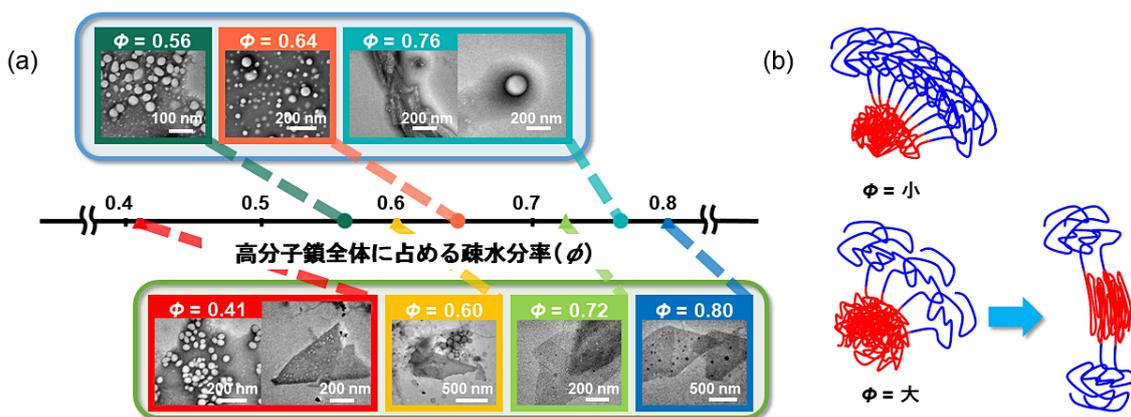


図4 (a) PNBG-*b*-PSar に比べて PNHG-*b*-PSar の方が結晶化相転移によりナノシートを形成しやすかった。(b) 高分子鎖全体に占める疎水分率が高い場合ミセル界面が親水鎖で十分に覆われず不安定なため、相転移し易いものと考えられる。

室温では3週間にわたり安定でした(図4a)。結晶化を進行させるため90°Cで任意の日数加熱した際の形状変化をTEMにより追跡したところ、結晶部おペプトイドの側鎖のアルキル鎖長が長いPSar-*b*-PNHG及び、疎水分率が高い分子程短時間の加熱でナノシート構造に相転移しました。これはPNHGがPNBGに比べて結晶化しやすいこと、また疎水分率が高いほど小胞表面を親水鎖で十分に覆えないことから小胞構造が不安定であったと考えられます(図4b)。現在、さらなる詳細な相転移挙動について解析を進めています。今後、ペプチド討論会などで進捗をご報告できればと思っています。

5. さいごに

側鎖の設計性が高く、その側鎖によって大きく物理化学的特性を制御することができるというペプトイドの性質を利用してわずかに炭素数一つの違いでベシクル、コアセルベート、ミセル、ナノシートなど様々な構造の分子集合体を作製できたことを報告しました。またペプトイドは生体適合性が高い点においても他の一般的なポリマーより優れた特性を有しています。物質を見分けて膜透過させるベシクルは生体内でのオンデマンド薬剤合成技術、精密な異方性形状制御技術は特定の細胞と特異的に相互作用する次世代の薬剤送達システムなどへの応用が期待されます¹⁰。

本研究の一部はJSPS科研費(23K13803, 23KK0204, 23H03750, 16H06313, 18H01845)及びKU-SMARTプロジェクトの支援を受け実施されました。また、最後になりましたが、本ニュースレターの執筆機会をくださいました山慶太郎先生、編集委員の先生方、学会事務局の皆様にご心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Robinson; J. W.; Secker, C.; Weidner, S.; Schlaad, H. *Macromolecules* 2013, 46, 580–587.
2. Nishimura, T.; Sumi, N.; Koda, Y.; Sasaki, Y.; Akiyoshi, K. *Polym Chem* 2019, 10, 691–697.

3. Nishimura, T.; Sasaki, Y.; Akiyoshi, K. *Adv Mater* 2017, 29, 1702406.
4. Banipal, P. K.; Aggarwal, N.; Banipal, T. S. *J Mol Liq* 2014, 196, 291–299.
5. Okuno, Y.; Nishimura, T.; Sasaki, Y.; Akiyoshi, K. *Biomacromolecules* 2021, 22, 3099–3106.
6. Brosnan, S. M.; Schlaad, H.; Antonietti, M. *Angew Chem Int Ed* 2015, 54, 9715–9718.
7. Okuno, Y.; Iwasaki, Y. *ChemMedChem* 2023, 18, e202300217.
8. Greer, D. R.; Stolberg, M. A.; Kundu, J.; Spencer, R. K.; Pascal, T.; Prendergast, D.; Balsara, N. P.; Zuckermann, R. N. *J Am Chem Soc* 2018, 140, 827–833.
9. Fukuda R.; Okuno Y.; Nishimura T.; Kuzuya A.; Iwasaki Y. 第60回日本ペプチド討論会要旨集 p36.
10. Geng Y.; Dalhaimer P.; Cai S.; Tsai R.; Tewari M.; Minko T.; Discher D. *Nat Nanotechnol* 2007, 2, 249–255.

おくのようた
 関西大学 化学生命工学部
 y_okuno@kansai-u.ac.jp
<https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/biomat>
 いわさき やすひこ
 関西大学 化学生命工学部

菅裕明先生が日本学士院賞を受賞

この度、本会会員で評議員の菅裕明教授(東京大学大学院理学系研究科化学専攻/東京大学先端科学技術研究センター)が「特殊ペプチド創薬の開拓への貢献」で日本学士院賞を授与されました。おめでとうございます。

研究題目 特殊ペプチド創薬の開拓への貢献
 受賞理由 菅裕明教授は、独自性が極めて高い「フレキシザイム(人工リボザイム)」、
 「環状特殊ペプチド

の無細胞翻訳合成)、「RaPID プラットフォーム」技術を開発して、鋳型 mRNA からさまざまな非タンパク質性アミノ酸を組み込んだ「環状特殊ペプチド」の調製に世界に先駆けて成功しました。ここで最も注目されるのは普遍的な遺伝暗号を自在に書き換えるリプログラミング技術の発明です。さらに、これらの新技術の効果的な統合により、疾患原因となる標的タンパク質に強く結合する薬剤を高確率かつ極めて迅速に探索することを可能にしました。従来の分子量 500 程度の低分子医薬、巨大な抗体医薬に次ぐ、中分子の新モダリティ分子群の開拓による「特殊ペプチド創薬」分野を創始したものと位置付けられます。本総合技術は多様なタンパク質阻害剤、活性化剤の発見とその作用機序に関わる基礎・応用研究を加速するとともに、空前の汎用性ゆえに現在、国内外の医薬業界における創薬活動に広く活用されています(日本学士院ウェブサイト <https://www.japan-acad.go.jp/japanese/news/2024/031201.html#006> より)。

《海外関連学会 (2024 年度トラベルアワード対象)》

2024 年 6 月 24 日～26 日
27th KPPS Annual Symposium
Busan, South Korea

2024 年 6 月 30 日～7 月 2 日
18th Chinese International Peptide Symposium
Hong Kong
<https://www.cps2024-international.cn/>

2024 年 8 月 25 日～30 日
37th European Peptide Symposium/14th International Peptide Symposium
Florence, Italy
<https://eps2024.com/>

編集後記

ペプチドニュースレター No. 132 号をお届けいたします。本号では、ペプチドの分子構造のアレンジにより、医薬をはじめ様々な応用研究を展開されている先生方にご執筆をお願いしました。また、本会評議員の菅裕明先生が日本学士院賞を受賞されたニュースも合わせてお伝えいたします。年度末・年度始めのご多忙な中、ご執筆を頂きました先生方に心より感謝申し上げます。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。

新年度が始まり、春の到来とともに気分も新たになる時節です。新会長に就任された大高 章先生のもと、本年度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祈念申し上げます。

132 号アンケートフォーム URL :
<https://forms.gle/UMznVTHhRSSMfSED8>

(編集委員：巢山 慶太郎)

日本ペプチド学会からのお知らせ

《2024 年度行事予定》

2024 年 7 月
Peptide Newsletter Japan No. 133 発行

2024 年 8 月 7 日(水)～9 日(金)
第 56 回若手ペプチド夏の勉強会
場 所：皆生温泉 三井別館
世話人：稲葉 央, 岩崎 崇 (鳥取大)

2024 年 10 月
Peptide Newsletter Japan No. 134 発行

2024 年 10 月 28 日(月)
第 117 回理事会・第 43 回評議員会合同会議

2024 年 10 月 29 日(火)～31 日(木)
第 61 回ペプチド討論会
場 所：名古屋大学 豊田講堂
世話人：村上 裕, 林 剛介 (名古屋大)

2024 年 10 月 30 日(水)
2024 年度日本ペプチド学会通常総会

2024 年 11 月 2 日(土)
市民フォーラム 2024
場 所：名古屋大学 工学部 1 号館

2025 年 1 月
第 118 回理事会

2025 年 1 月
Peptide Newsletter Japan No. 135 発行

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：2024年4月25日

編集委員

林 良雄（担当理事）（東京薬科大学 薬学部）

TEL 042-676-3275

E-mail : yhayashi@toyaku.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

後藤 佑樹（京都大学 大学院理学研究科）

TEL 075-753-4002

E-mail : goto.yuki.4x@kyoto-u.ac.jp

武居 俊樹（大阪大学 蛋白質研究所）

TEL 06-6879-8602

E-mail : toshiki.takei@protein.osaka-u.ac.jp

葉師寺 文華（長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科）

E-mail : fyakushiji@nagasaki-u.ac.jp

（本号編集担当：巢山 慶太郎）