



アミロイドの凝集を標的とした創薬志向研究

1. はじめに

まずは、この度研究紹介のチャンス頂きました新潟大学の中馬吉郎先生に感謝申し上げます。研究紹介の後、学生さんへのメッセージを少し書かせていただこうと思います。

通常、タンパク質はフォールディングすることにより、特異的なネイティブ構造を形成して生命機能を担うが、一方でミスフォールディングすることでクロスβシート構造に富んだ線維へと凝集（アミロイド化）することがある。このアミロイド化の過程で産生する凝集体（オリゴマー、プロトフィブリル、線維）は様々な機能障害を引き起こすことが知られており（アミロイド病）、現在までに20種類以上のタンパク質がアミロイド病の原因物質として同定されている¹⁾。これらアミロイドタンパク質は、クロスβシート構造モチーフの形成を伴う共通したアミロイド化プロセスを辿る。アミロイドにより引き起こされる疾患は一般に難治性であること、またアミロイド化を標的とした医薬品上市例がないことを考えると、本過程を標的とした治療戦略は次世代創薬において重要な課題であると思われる。アルツハイマー病におけるアミロイドβペプチド（Aβ）は代表的な例であり、近年我々はAβの凝集を標的とし、病的な凝集を阻害できる人工分子や人工反応系の開発研究を行っている。



相馬 洋平

2. Aβの凝集に対する阻害分子の同定

Aβ1-42の凝集はアルツハイマー病の発症・進行に深く関わっているため、本過程を標的とする治療戦略はアルツハイマー病の克服に繋がると期待される。一つとして、Aβ1-42の凝集を阻害することのできる化合物は治療薬として貢献できる可能性があると考えられる。

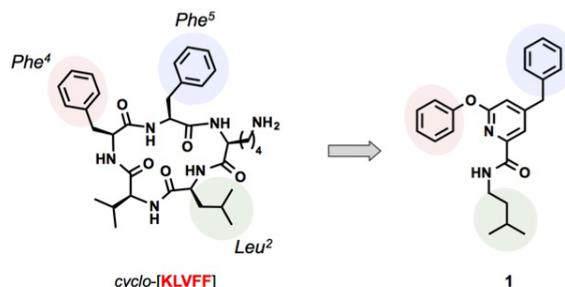
Aβの16-20位に相当する部分ペプチドフラグメント、KLVFFは弱いながら全長Aβに対する凝集阻害活性を有する²⁾。我々は、本ペプチドを環化誘導したcyclo-[KLVFF]（図1）が鎖状KLVFFと比べて強い凝集阻害活性を有することに気づいた。また、そのエナンチオマーであるcyclo-D-[KLVFF]も同等の阻害活性を示すことに着目し、分子モデリングや誘導体合成によって構造活性相関を種々検討した結果、環状KLVFF誘導体においては主鎖のアミド結合よりも

しるLeu², Val³, Phe⁴, Phe⁵における側鎖構造とそれらの空間配置が活性発現に寄与していることが明らかとなった。

そこで次に、このファーマコフォアモチーフを基に非ペプチド性低分子阻害剤の設計を試みた。（図1）すなわち、ピリジンを中心骨格として用い、Leu², Phe⁴, Phe⁵の側鎖官能基を配置した低分子阻害剤**1**を設計・合成した。その結果、化合物**1**は、もとの環状ペプチドと比べてやや劣るものの、濃度依存的な凝集阻害活性を示した。その後、**1**のピリジン環をピリミジンに変換し、イソベンチル基をアダマンチル基に変換した化合物では、もとのcyclo-[KLVFF]と同程度まで活性が向上した。このようにして我々は、Aβの凝集阻害剤としては初めて、ペプチドをもとに論理的デザインにより非ペプチド化・低分子化することに成功した³⁾。

3. 人工触媒反応によるAβの無毒化

我々は、触媒を用いた酸素化反応（酸素原子を化学的に挿入）によりAβを無毒化する治療戦略を考案・検討した。酸素化は反応ドナーとして生体内の分子酸素を利用できる可能性があること、またペプチド・タンパク質への酸素原子の導入により構造や機能に劇的な変化が期待できることから、我々は酸素化反応に着目した。触媒としては、リボフラビン（**2**, 図2）を選択した。リボフラビンは分子酸素を酸化剤として利用し、可視光照射下で酸化反応を起こす光触媒である⁴⁾。Aβ1-42を中性のリン酸緩衝液中、20 mol%のリボフラビン存在下、37°C、光照射の条件において反応したところ、ほとんどのAβ1-42が酸素化され、反応は、10位 Tyr, 13, 14位 His および35位の Met において進行した。13, 14位 His においてはデヒドロオキ



Aβ1-42:

DAEFRHDSGY EVHHQ**KLVFF** AEDVGSNKGAI IGLMVGGVV IA

図1 cyclo-[KLVFF]を基盤とした低分子型阻害剤（**1**）の創出

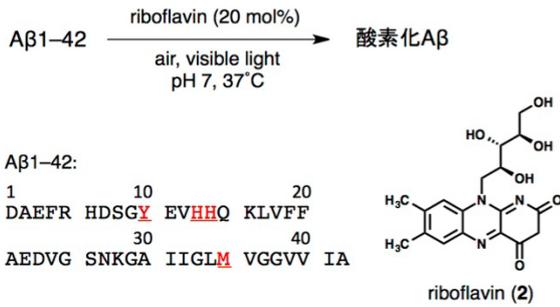


図2 リボフラビン(2)によるA β の触媒的酸化改変(赤字下線は酸化を受けたアミノ酸残基を示す)

ソヒスチジン構造への酸化, 10位 Tyr においては3,4 ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)への酸化がそれぞれ示唆された。

得られた酸化A β 1-42の凝集性について調べたところ, ネイティブA β 1-42では, 凝集の程度と相関するチオフラビンT蛍光が経時的に上昇するのに対し, 酸化A β 1-42では蛍光強度の変化が認められなかった。原子間力顕微鏡においても酸化A β 1-42では線維化が認められなかった。(図3)二次構造は, ネイティブA β 1-42では β シート構造を形成するのに対して酸化A β 1-42ではランダムコイル構造を維持した。このことから, 酸化A β 1-42の凝集性は顕著に低いことが明らかとなった。さらに, 細胞を用いた評価より, 酸化A β 1-42はネイティブA β 1-42と比べて細胞毒性が低いことも分かった。

次に, 細胞存在下でのA β 選択的な酸化反応について検討を進めた。A β 選択的な酸化を達成するために, A β に対して高い親和性を持つペプチドD-[Lys-Leu-Val-Phe(4-phenyl)-Phe]を同定し, これをA β 親和性タグとしてフラビン分子に結合した触媒**3**を設計・合成した。(図4a)リボフラビン(2)を光照射条件下で使用した際, A β 1-42の有無に関わらずほとんどの細胞は死滅した一方, A β 1-42非存在下で触媒**3**を用いた際, 光照射後, 50%以上の細胞が生存した。A β 1-42存在下では, 光照射した場合, 光がない時と比べ細胞生存率が有意に上昇した。これは, 生細胞存在下でA β 1-42が酸化反応を受けて無毒化したために, 細胞死が回避されたためと考えられる。このように, 触媒**3**を用いることによって, 細胞存在下, A β 1-42選択的な酸化反応により毒性を低減することに成功した⁵⁾。

しかしながら, 本フラビン触媒はA β 非存在下においても酸化活性を有するため, 例えば医薬品としての応用を考えた場合, 様々な生体分子(オフターゲット)への非特異的な反応が免れないと考えられる。そこで, 我々はA β が存在するときのみ光酸化活性を発現することのできる触媒の開発を目指した。我々は触媒開発にあたり, アミロイドタンパク質の凝集体に対する蛍光プローブであるチオフラビンT⁶⁾の構造(図4b)及び発光機構に着目した。チオフラビンTはN,N-ジメチルアニリン部位(電子ドナー)とベンゾチアゾール部位(電子アクセプター)からなり, 光照射によって励起されると, ドナー-アクセプター間の単結合を軸とした分子内回転を起こして速やかに基

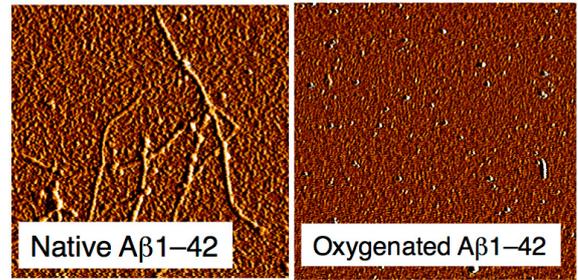


図3 原子間力顕微鏡による酸化A β 1-42の解析

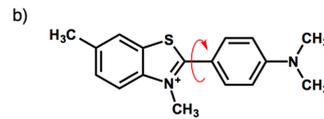
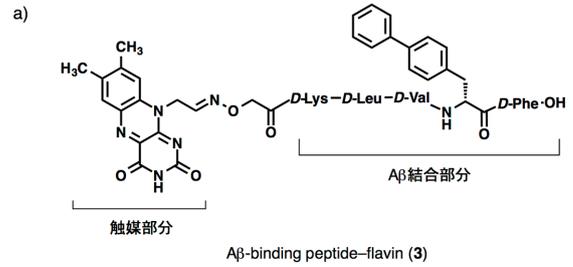


図4 a) 酸化触媒**3**およびb) チオフラビンTの構造(赤矢印はドナー-アクセプター間の単結合を軸とした分子内回転を示す)

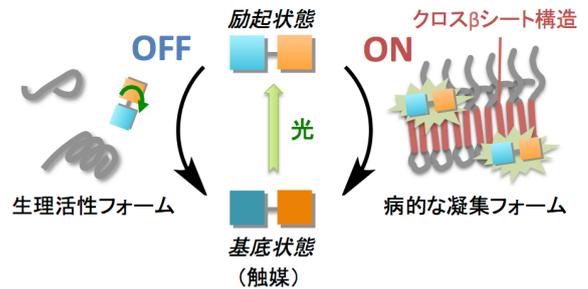


図5 ON/OFF スイッチ可能な酸化触媒のコンセプト

底状態へ緩和されるため, 蛍光を発しない。一方, チオフラビンTが凝集体のクロス β シート構造に結合すると, この結合によって分子内回転が抑制されるため, 蛍光を発して緩和する。我々はチオフラビンTの構造を基盤として, アミロイドタンパク質の凝集体に結合した時のみ, 酸化反応を起こす光酸化触媒を開発した。すなわち, 凝集体に結合した本触媒は, 分子内回転を介する緩和経路が抑制されるため, 励起状態の寿命が長くなり, その結果三重項状態に移り一重項酸素を産生すると考えた。

実際本触媒は, 可視光照射によってA β 1-42を酸化した。それに対して, 非アミロイド性ペプチドとはほとんど反応しなかった。このように, 本触媒は凝集体のクロス β シート構造を検知して酸化活性のオン/オフを切り替えることができ, 他のペプチド基質や生細胞存在下においてA β 1-42高選択的な酸化改変を可能とした。(図5) 加えて, 本手法によって他のアミロイドタンパク質である2型糖尿病に関連するアミリン, インスリン注射部位の限局性アミロイド

シスに関連するインスリン、透析アミロイドーシスに関連する β 2-ミクログロブリン、老人性全身性アミロイドーシスに関連するトランスサイレチン、パーキンソン病に関連する α -シヌクレインに対して、それらの生理機能フォームには反応することなく、クロス β シート構造を有する病原性の凝集体に対して選択的に酸素化を起こすことができた。現在、*in vivo* において機能する触媒を目指して検討を進めている。

4. おわりに

我々は $A\beta$ の病的な凝集を阻害することのできる人工分子や人工反応系の開発を進めている。これらの成果は、現在治療が難しい、アルツハイマー病を始めとする様々なアミロイド病に対して、新たな治療戦略の端緒を開く可能性を示すものであると考えられる。

今回紹介した研究は、東京大学大学院薬学系研究科有機化学教室において、ERATO 金井触媒分子生命プロジェクトとして、金井求教授および多数の共同研究者とともに行ったものである。特に、酸素化触媒に関する研究は谷口敦彦博士が主に行った成果である。たくさんの方々の共同研究者の方々にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

将来研究者を目指す学生さん達へのメッセージも含めてということでしたので、少しだけ書かせていただこうと思います。現在の私個人の周りの状況を鑑みて、ペプチドは異分野の研究者の方々にとっても、様々な意味でとても魅力的な標的であると認識されているように感じます。おそらくこのことは長い将来にわたって変わることがないようにも思います。ブレイクスルーが望まれているペプチド化学関連分野もまだまだ山積しているように思います。したがって、将来どのような研究展開になったとしても現在携わっているペプチド研究の基盤を多に活かせると思いますので、学生さん達には日々骨太にペプチドを学んでいただくのが良いのではと感じる今日この頃です。

参考文献

- 1) F. C. Chiti, M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333 (2006).
- 2) L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.*, **271**, 8545 (1996).
- 3) T. Arai, T. Araya, D. Sasaki, A. Taniguchi, T. Sato, Y. Sohma, M. Kanai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 8236 (2014).
- 4) S. Fukuzumi, K. Tani, T. Tanaka, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 816 (1989).
- 5) A. Taniguchi, D. Sasaki, A. Shiohara, T. Iwatsubo, T. Tomita, Y. Sohma, M. Kanai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 1382 (2014).
- 6) N. Amdursky, Y. Erez, D. Huppert, *Acc. Chem. Res.* **45**, 1548 (2012).

そうま ようへい
東京大学大学院薬学系研究科有機合成化学教室
JST-ERATO
ysohma@mol.f.u-tokyo.ac.jp

焦らず、たゆまず、楽しんで

<はじめに>

時が経つのは早いもので静岡大学大学院工学研究科に准教授として着任し、1年半が経過しようとしている。筆者は2008年に京都大学大学院薬学研究科・藤井信孝教授のもとで学位を取得し、米国ペンシルバニア大学の Jeffrey W. Bode 教授（現スイス工科大）の研究室で博士研究員として、東京医科歯科大学学生体材料工学研究所・玉村啓和教授のもとで助教として研鑽を積み、2013年10月より静岡大学浜松キャンパスにて教育・研究に従事している。



鳴海 哲夫

今年（2015年）の寒さ厳しい2月初旬に居室の電話がなり、PNJ 編集委員の新潟大学・中馬吉郎先生からペプチドニュースレター No. 96の4月号にて若手特集の執筆依頼をいただいた。2006年のペプチドニュースレターで大分酔ったことを書いた記憶を思い出し、背筋に嫌な汗をかくのを感じつつ（詳細は No. 60「やれるかどうかではなく“やる”をご覧ください）、貴重な機会なので寄稿させていただくことにした。今回の依頼は、将来研究者を目指す学生たちへのメッセージを含めた研究紹介というもので、なかなか難しいお題である。そこで、まだ駆け出しの筆者が書けるものとして、学位取得後の9年間を振り返り、ライフワークになりそうなイソスター研究に関して紹介するとともに、後進の学生諸君にイソスター研究の面白さを少しでもご理解頂き、今後の研究のヒントとまでは行かなくても、明日実験しようという気持ちになるきっかけになれば幸いである。

<イソスターとは？>

さて、「イソスター (isostere)」という言葉はご存知だろうか？ 筆者は早稲田大学在学中に初めて耳にしたが、いまいち理解できなかったのでこの場を借りて簡潔に説明したい。等価性 (isosterism) に由来するイソスターという概念は、1932年に界面化学の功績をもとにノーベル賞を受賞した米国研究者 Irving Langmuir 教授に端を発する。1919年 Langmuir は、原子または原子団の物理化学的性質に関する類似性に着目し、同じ数の電子または電子配置を持つ原子や原子団を21のイソスターグループに分類した（例えば、group 1: H^- , He, Li^+ , group 8: N_2 , CO, CN^- , group 9: CH_4 , NH_4^+ , など)¹。その後、Grimm による水素付加による擬原子 (pseudoatoms) や²、Erlenmeyer による最外殻電子に着目したイソスターが報告されている³。1951年には Friedman によって類似した分子構造や生物活性を示す「バイオイソスター (生物学的等価体)」へ拡張され⁴、近年では創薬研究において最も重要な分子設計手法の一つとなっている⁵。

<アミド結合を二重結合へ>

筆者は数あるバイオイソスターの中でも、加水分解酵素により切断されやすいアミド結合を、酵素に対し安定な二重結合に置換したアルケン型ジペプチドイソ

スターを基盤とした創薬研究を展開してきた⁶。アルケン型ジペプチドイソスターは、ペプチド結合の共鳴構造に基づいて考案されたペプチドミメティックであり、天然のジペプチドとの高い構造的相同性や加水分解酵素に対する抵抗性、疎水性の向上など、ペプチドリード創薬において重要な生物学的等価体である。これまでに筆者らは、アルケン型⁷、フルオロアルケン型⁸、トリフルオロメチルアルケン型ジペプチドイソスター⁹の立体選択的合成法を確立し、CXCR4アンタゴニスト¹⁰やHIV膜融合阻害剤¹¹をはじめとする種々の生理活性ペプチドへと応用し、普遍的なアミド結合等価体の開発を目指し研究を進めてきた。その過程において、アミド結合を模倣することがいかに難しいか痛感し、それと同時に水素結合能や大きな双極子モーメントなど多機能性を有するアミド結合に魅力を感じていた。そこで、このアミド結合の構造や機能を応用することで、既存の分子に新たな機能を付与したり、機能を向上したりできるのでは？と漠然と考えるようになっていた。

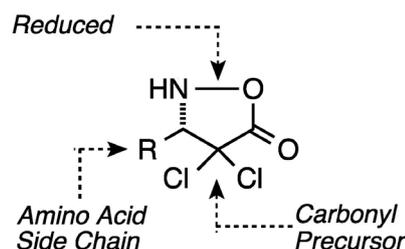
<少し脱線して留学体験記>

学位取得後は、含窒素複素環式カルベン (NHC) を有機分子触媒とする分子変換に関する研究に興味を抱き、当時 NHC 触媒による反応開発を精力的にやられていた Bode 教授にお世話になった。藤井研究室の自由と責任を両立しながら自分が納得のいくまでやる研究生活とは打って変わって、Bode 教授との濃密な議論にもとづいた計画的な研究生活は新鮮で、改めて自分の未熟さを認識しつつも、フィラデルフィアという土地柄もあり刺激的な毎日を過ごしていた。配属して4ヶ月間は NHC 触媒に関する研究に没頭したが、計画した反応が想像以上に難しい反応系で全くと言っていいほど進行しなかった(今でも成功例は報告されていない)。しばらくすると複数のテーマを並行し、気づいた時には2006年に Bode 教授が見出した α -ケト酸とヒドロキシアミンのライゲーション法 (KetoAcid-HydroxylAmine Ligation: KAHA Ligation)¹²によるペプチド合成がメインテーマとなり、やはり自分はアミド結合とは縁があると感じた。本ライゲーション法では、アミノ酸の側鎖を無保護のまま、さらに補助基や添加剤なしに α -ケト酸とヒドロキシアミンが化学選択的に反応し、対応するアミド化合物が得られる。当時、Bode 研では KAHA Ligation の応用研究も精力的に進めており、筆者は本ライゲーション法を基盤とした連続的な α -ペプチド合成研究に着手した。

KAHA Ligation を鍵反応とすることは、汎用される保護アミノ酸から脱却しなければならないことを意味しており、新たな α -アミノ酸モノマー(ある意味これもイソスターである)の設計からはじめた。新規 α -アミノ酸モノマーに必要な条件として、以下の三つが挙げられる。

- 1) α -ケト酸と化学選択的に反応しアミド化合物を与える
 - 2) α -ケト酸との縮合生成物がヒドロキシアミンとの縮合反応前駆体 (α -ケト酸前駆体) である
 - 3) 光学活性体がグラムスケールで合成可能である
- これら条件を満たすものとして、 α,α -ジクロロイソ

キサゾリジノン型モノマーを合成した¹³。本化合物は期待した通り、 α -ケト酸と円滑に反応し、 α -ケト酸前駆体である α,α -ジクロロカルボン酸を与え、加水分解により α -ラクトンを経由して α -ケト酸へと変換可能である。しかし、残念なことに α -ケト酸への加水分解の時点で光学純度の低下が認められ、帰国時期も迫っていたためさらなる展開は困難となったが、後に KAHA Ligation の反応機構に関する研究で、 α -ラクトン中間体を経由することが明らかとなり¹⁴、とても驚いたことを覚えている。この研究はペプチドを古典的な縮合反応以外で合成するという今までにないチャレンジングなテーマで、アミド結合の奥深さを体感した研究であり、改めてアミド結合の虜になるきっかけとなった。

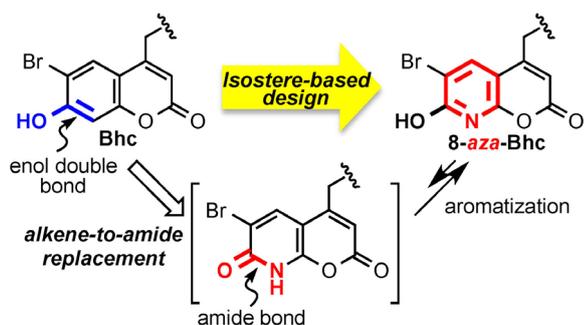


<二重結合をアミド結合へ>

帰国後、玉村研究室の助教として着任し、ケミカルバイオロジー研究のいろはを学んでいるときに、クマリニルメチル型光感受性保護基を使ったケージドケミストリーに出会った。玉村研では、がんや神経変性疾患に関与するプロテインキナーゼ C (PKC) を標的とした創薬研究の一つとして、光制御型 PKC リガンド (ケージド DAG- γ -lactone) を用いた PKC の機能解析研究を進めていた¹⁵。このケージド DAG- γ -lactone を用いると、光照射によってリガンドが脱保護 (アンケージング) され、経時的な PKC の細胞内局在の変化を確認することができたが、期待していたより反応速度が遅く、その原因はリガンドの高い疎水性に起因するものと考えていた。

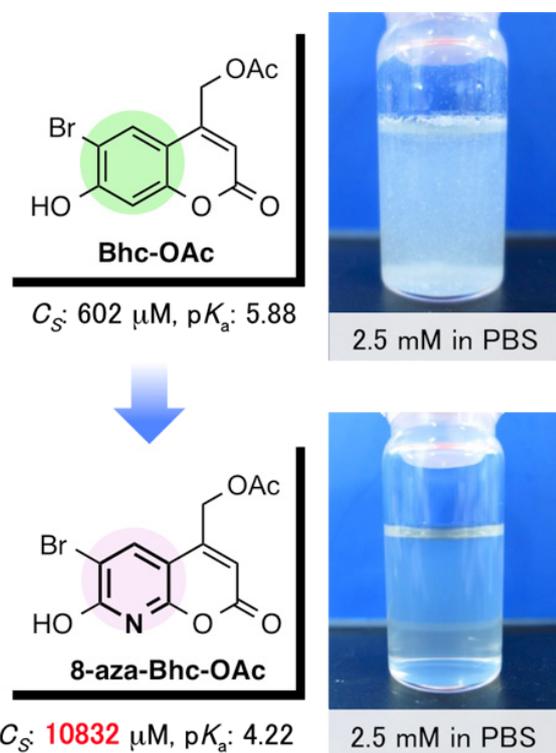
この結果を見たときに極性の高いアミド結合を応用することを考え、分子内にある二重結合を極性の高いアミド結合に置換する、いわゆる逆転の発想という驚くほどシンプルな青写真を描いた。すなわち、クマリン骨格の C7-C8 位間のエノール二重結合をアミド結合に置換し、続く芳香環化により 8-アザクマリン構造をクロモフォアとする計画を立てた。設計した 8-アザクマリン型クロモフォアでは、窒素原子の導入により水素結合能が付与されることから親水性が向上すると考えた。この分子設計のポイントは、二重結合とアミド結合の構造的等価性、つまりイソスターにこだわった点であり、エノール二重結合をアミド結合に置換することで得られるラクタム構造は、形式的にクマリンのアミド型イソスターといえる。

8-アザクマリン誘導体は 2,6-ジクロロピリジンを出発原料として 6~8 工程の分子変換によりグラムスケールで合成可能である。これら 8-アザクマリン誘導体の特徴を以下に示す。



- (1) 水によく溶ける
- (2) クロモフォアの酸性度が高い
- (3) モル吸光係数が大きい
- (4) 重原子を導入することで光反応効率が上がる

特に、親水性については大幅に向上し、8-アザクマリン誘導体の飽和濃度は最大で親化合物に比べ約18倍となった¹⁶。また、8-アザクマリン誘導体の興味深い知見として、臭素原子の置換様式によって光化学的特性が変化することがわかった。つまり、3位に臭素を導入した3位臭素置換体と6位臭素置換体を比べると、3位臭素置換体は極大吸収波長の超波長化やモル吸光係数の増大、光反応の量子収率も向上することが明らかになった¹⁷。この親水性や光反応性の向上は、窒素原子の特性や誘起効果などによるものであり、これら化合物の分子設計のヒントとなったイソスター手法にさらなる可能性を感じる瞬間であった。



<おわりに>

ここまで書いていて一つ気付いたことがある。将来研究者を目指す学生たちへのメッセージが何もない。そこで今回のタイトルを「アミド結合に惹かれて」(←今思えばセンスの欠片もない) から「焦らず、たゆまず、楽しんで」に変えることにした。インター

ネットで「焦らず、たゆまず」と検索すると、「焦らず、たゆまず、怠らず」と出てくる。学問の神様として有名な太宰府天満宮や湯島天神の必勝鉛筆にも書かれているようで、何をするにも決して焦ることなく、気持ちがゆるむことなく、毎日を精一杯生きる、ということと理解できる。しかし、今回のタイトルは「焦らず、たゆまず、楽しんで」である。これは筆者が早稲田大学在学中にパールハーバー・コンプレックスを見出した山本明夫先生よりいただいた言葉で、教育研究に大切なものを表しているように思うが、いかがだろうか？

鳴海研ではたまに「気持ちいい〜！」という絶叫を耳にすることがある(決して筆者は強制していない)。何かミスをしてやり直さなければならない時の心の叫びと理解しているが、前向きに状況を捉え、楽しんでいようと思いはない。このやり方が正しいとは断言できないが、原料合成だけの退屈な日々、最先端の検討が全くうまくいかない忍耐の日々、化合物の精製に苦労する日々、面白いことが思いつかず考える日々など、どんな状況でも「楽しんで」毎日を過ごすことは何より大切なことに思う。

<研究室紹介>

最後に少しだけ研究室紹介。2013年10月に研究室を立ち上げ、2014年4月から初代学生が配属され、先の絶叫する輩もいるおかげで大分賑やかな研究室になりつつある。筆者らの研究室が所属する静岡大学大学院総合科学技術研究科工学専攻化学バイオ工学コース・ケミカルバイオロジグループは、渡辺修治教授、間瀬暢之教授、戸田三津夫准教授と筆者の四研究室からなり、それぞれ独立した研究基盤をもとに有機的につながるシームレスな研究グループを目指している。筆者らの研究室では、“Organic Chemistry-Driven Drug Discovery (有機化学が先導する創薬研究)”をスローガンに有機合成化学や医薬品化学、光化学、ケミカルバイオロジーを取り入れた創薬研究を進めている。研究テーマを大きく分けると、先に紹介させていただいた①イソスター手法による機能性分子の創製研究、②ヒト免疫不全ウイルス HIV を標的とする阻害剤の創製研究、③含窒素複素環式カルベンを進化させた多機能性アゾリウムカルベンの創製と創薬を指向した新たな分子変換への応用の3つであり、詳細はHPをご覧ください。いずれの研究テーマもまだこれからというところであるが、焦らず、たゆまず、楽しい教育研究を通じて、社会が求める“人財”の輩出、そして人類の健康と福祉に有機化学で貢献していきたい。



<謝辞>

本稿で紹介した多くの研究成果は、玉村啓和教授、野村渉准教授の激励のもと、玉村研・高野君、小早川君をはじめとした院生諸氏の日夜に渡る実験で得られたものである。8-アザクマリンに関する研究は、東邦大学理学部の古田寿昭教授、鈴木商信博士との共同研究の賜であり、この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、2014年10月にご逝去されました早稲田大学理工学部・清水功雄教授にはイソスター研究のきっかけを与えていただき、深く感謝申し上げます。さらに、研究室立ち上げにあたり、国内外の多くの方々より多大なご支援とご指導を賜りました。関係各位ならびに鳴海研の学生諸氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1 Langmuir I, J Am Chem Soc 1919; 41: 1543.
- 2 Grimm HG, Z. Electrochem 1925; 31: 474.
- 3 Erlenmeyer H, Leo M, Helv Chim Acta 1932; 15: 1171.
- 4 Friedman HL, NASRAS 1951; 206: 295.
- 5 Patani GA and Lavoie EJ, Chem Rev 1996; 96: 3147.
- 6 大石真也, 鳴海哲夫ら, 有機合成化学協会誌 2008; 66: 846.
- 7 Tamamura H, et al. J Med Chem 2005; 48: 380.
- 8 Narumi T, et al. Chem Commun 2006; 4720.
- 9 Kobayashi K, et al. J Org Chem 2009; 74: 4626.
- 10 Narumi T, et al. Org Biomol Chem 2010; 8: 616.
- 11 Oishi S, et al. Org Biomol Chem 2009; 7: 2872.
- 12 Bode JW, et al. Angew Chem, Int Ed 2006; 45: 1248.
- 13 Narumi T, Bode JW, Heterocycles 2011; 82: 1515.
- 14 Pusterla I, Bode JW, Angew Chem, Int Ed 2012; 51: 513.
- 15 Nomura W, et al. ChemBioChem 2011; 12: 535.
- 16 Narumi T, et al. Org Lett 2014; 16: 1184.
- 17 Narumi T, et al. Tetrahedron 2014; 70: 4400.

なるみ てつお
静岡大学大学院 総合科学技術研究科
工学専攻 化学バイオ工学コース
バイオ応用工学分野
E-mail: narumi.tetsuo@shizuoka.ac.jp
HP: <http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~tnarum/top.html>

ヘキサペプチド型ヒトニューロメジン U 受容体アゴニストの創製研究

1. はじめに

ヒトニューロメジン U (hNMU) は、25残基のアミノ酸から成り、C末端がアミド化された生理活性ペプチドである(図1)。その受容体として、1型および2型の2つのGタンパク質(G_q)共役型受容体が報告されており、1型は腸管や肺などの末梢に、2型は中枢神経系に高発現している¹⁻³⁾。ラットにおいてリガンドであるNMUのmRNA



高山 健太郎

発現量は、腸管や下垂体で強くみられる²⁾。一方で、2005年にラット脳から発見されたニューロメジン S (NMS) は視床下部の視交叉上核で顕著に発現している(図1)⁴⁾。NMUやNMSの生体内での多様な活性がこれまでに報告されており、具体的には、摂食抑制、体重減少、異化機能亢進作用などが挙げられる^{5,6)}。これらの作用は抗肥満につながることから、NMUは創薬分子として近年注目を集めている。

実際の創薬例として、製薬大手のメルク社のグループは、hNMUの生体内での安定性(体内動態特性)を改善するために、高分子(PEG, アルブミン)修飾したhNMUコンジュゲート体を作製し、静脈内注射により持続的な摂食抑制作用がみられることを報告した^{7,8)}。ここでは、1型、2型の各受容体ノックアウトマウスを用いた検討も行っており、コンジュゲート体静注時の当該活性に対する両受容体の関与が示唆された。これは、両受容体を強力に活性化し且つ生体内で持続的に活性構造を維持できる小型分子の創製ができれば、医薬候補化合物となり得る可能性を示すものである。

NMUやNMSの構造に着目すると、図1に示すようにC末端7残基(FLFRPRN-amide, **1**)は高度に保存されており、アゴニスト活性のコアとされている。本部位を基にした構造活性相関(SAR)研究は、佐倉らのグループにより既に、トリ平滑筋の収縮活性を指標(avian NMU受容体を標的)に実施されている。同グループは、ヘプタペプチド**1**のN末端をピログルタミン酸修飾(dog NMU-8)あるいはコハク酸修飾した誘導体などが高い収縮活性を示すことを中心に報告している^{9,10)}。しかしながら、ヒトNMU受容体を標的とした網羅的なSAR研究は未着手であり、特徴的な活性を示す小型のペプチドアゴニストが潜在している可能性が大いにあった。そこで筆者らのグループは、上述のように**1**のN末端修飾が可能であることから、N末端Phe残基のアミノ基はアゴニスト活性に不要であると考え、それを除去した3-phenylpropionyl-Leu¹-Phe²-Arg³-Pro⁴-Arg⁵-Asn⁶-NH₂(**2**, アシル化ヘキサペプチド, 図2, Leuをposition 1とした)をリードとしたSAR研究に着手することにした。尚、ペプチド**2**は、1型および2型受容体に対して、それぞれhNMUの20倍、3~4倍程度弱いが、共に10⁻⁸ MオーダーのEC₅₀値を示しており比較

Neuromedin U (NMU)

porcine NMU-8	YFLFRPRN-amide
porcine NMU-25	FKVDEEFQGPVIVSQNRRYFLFRPRN-amide
rat NMU	YKVNE-YQGP-VAPSGGFFLFRPRN-amide
mouse NMU	FKA--EYQSPVSGQSKGYFLFRPRN-amide
human NMU (hNMU)	FRVDEEFQSPFASQSRGYFLFRPRN-amide
dog NMU-8	pEFLFRPRN-amide
dog NMU-25	FRLDEEFQGPVIVSQNRRYFLFRPRN-amide
rabbit NMU	FPVDEEFQSPFASQSRGYFLFRPRN-amide
guinea pig NMU	GYFLFRPRN-amide
chicken NMU	YKVDLEDLQAGGIIQSRGYFFFRPRN-amide
frog NMU-8	LKPEDEELQGGVLSRGYVFVRPRN

Neuromedin S (NMS)

rat NMS	LPRLLHTDSRMTIDFPKPKDPTTSLGRPFLLFRPRN-amide
mouse NMS	LPRLLRLDSRMTVDVFPKPKDPTTSLGRPFLLFRPRN-amide
human NMS	ILQRGSGTAAVDFTKDKDHTATWGRPFLLFRPRN-amide
toad NMS-17	DSGIVGRPFLLFRPRN-amide
toad NMU-33	FLFQFSRAKDPKSLKIGDSGIVGRPFLLFRPRN-amide

図1. NMUおよびNMSのアミノ酸配列

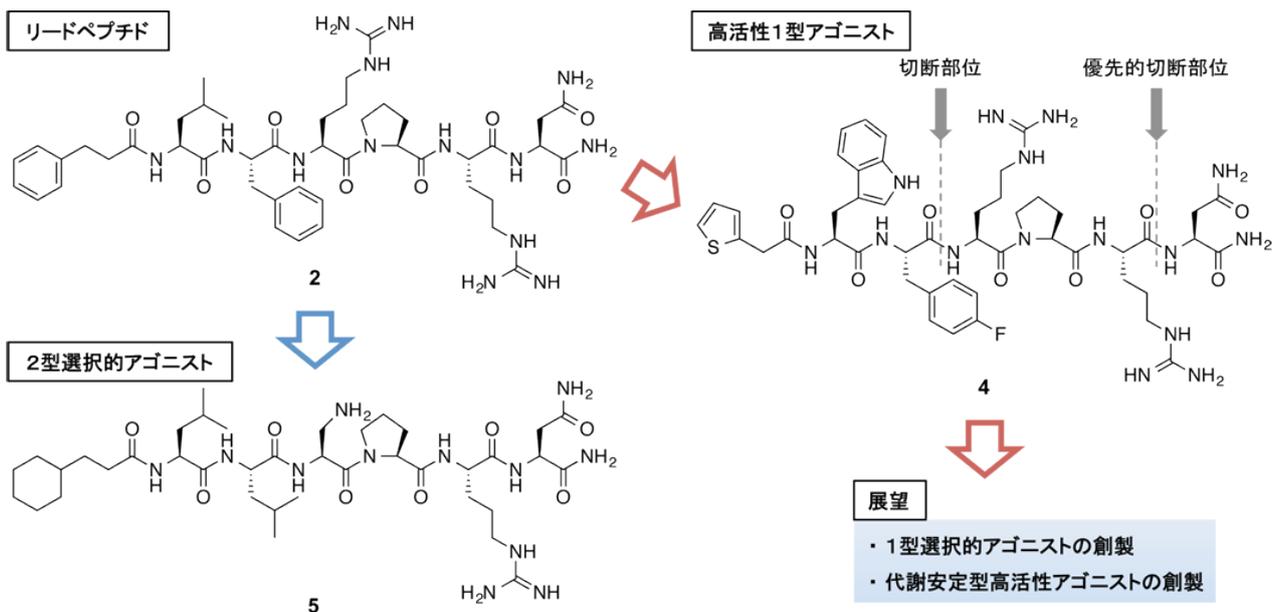


図2. 独自 NMU 受容体アゴニストの創製とその代謝解析に関する概要

的良好な活性を有していることが確認できた。本稿では、筆者らのグループ独自のヘキサペプチドアゴニスト獲得の経緯と、血清中における代謝解析に関して簡単に紹介する（概要：図2）^{11,12)}。

2. 1型受容体を強力に活性化するアゴニストの獲得

まず、ペプチド **2** の N 末端 3-phenylpropionyl 基のベンゼン環に各種置換基 (-F, -Cl, -OMe など) を導入した誘導体を Fmoc 固相ペプチド合成法により合成し、受容体安定発現 CHO 細胞を用いて細胞内カルシウム濃度変動を指標にアゴニスト活性を評価した。しかしながら、**2** を凌駕する活性を示す誘導体は得られなかった（未公表）。一方で、Leu¹ を芳香族アミノ酸である Phe¹ に置換することで、1型受容体に対するアゴニスト活性が向上することがわかってきたことから、これを基本に N 末端アシル基部位に複素環の導入を試みた。その結果、N 末端を 2-thienylacetyl 化した誘導体 **3c** において高いアゴニスト活性が得られたことから、更に Phe¹ を各種芳香族アミノ酸へ置換し、hNMU に匹敵する 1 型活性化能を有する誘導体 **3d** を得た（図3）。ペプチド **3d** の Phe² のパラ位にフッ素を導入した誘導体 **4** も同様に高い 1 型アゴニスト活性（**3d** よりもわずかに強い）を有しており（図3）、hNMU とほぼ同等のシグモイド（1型）を示す高活性ヘキサペプチドアゴニストの獲得に成功した（図4）。他にも多くの誘導体を合成し、1型受容体に着目した SAR を実施した結果、その活性化には 1) N 末端にチオフェン環、2) position 1 にはかさ高い芳香族アミノ酸、3) position 2 には含窒素芳香環を除く芳香族アミノ酸が構造的に好ましいことが明らかとなった。

3. 血清中における代謝解析

筆者らは、独自 NMU 誘導体の *in vivo* への適用を視野に入れ、上述 2. で得られた 1 型受容体に対す

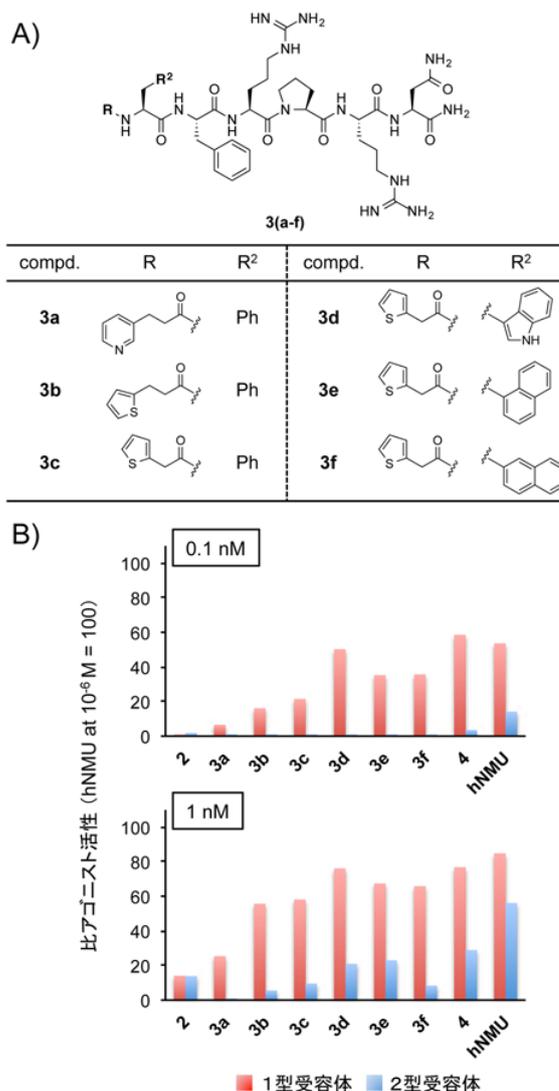


図3. 1型受容体を強力に活性化するヘキサペプチド誘導体の獲得

る高活性アゴニスト **4** に関して、ラット血清を用いた代謝解析を実施した。25%ラット血清中、37℃で一定時間インキュベートし、ペプチド **4** およびその代謝物を ODS 固相カートリッジにより回収した後、HPLC により解析した (C18 reverse-phase column [4.6 x 150 mm; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II] with a binary solvent system: a linear gradient of CH₃CN [10–60%, 100 min]

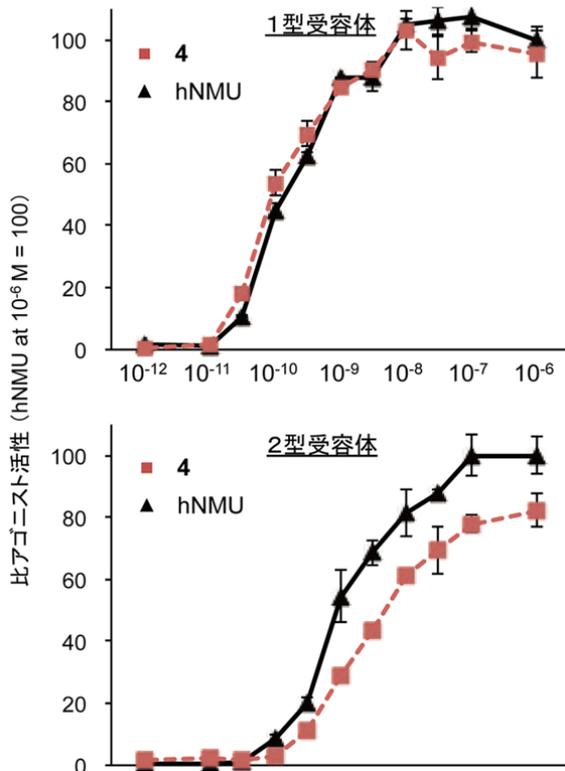


図4. ヘキサペプチド誘導体 **4** の濃度依存的アゴニスト活性

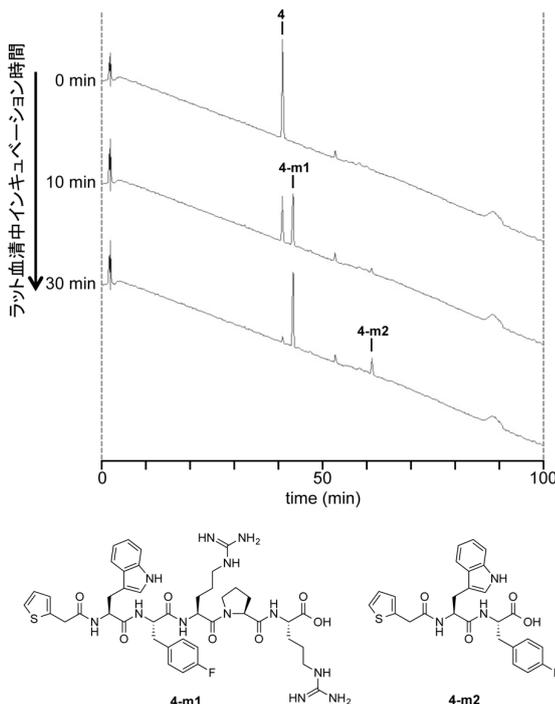


図5. ラット血清中におけるペプチド **4** の分解

in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1.0 mL/min, detected at UV 220 nm)。その経時的なチャートを図5に示した。ペプチド **4** を25%血清に添加後10分で、新たなピーク (**4-m1**) が出現し、加えて30分の時点では別の新たなピーク (**4-m2**) が出現した。それぞれをMS解析したところ、図5に示すような構造の各代謝物が確認された。また、リードペプチド **2** においても同様の代謝物同定に成功している。これらの結果より、1) Arg⁵-Asn⁶間および Phe(4-F)²-Arg³間 (**2** の場合、Phe²-Arg³間) のペプチド結合が切断部位であること、更に2) 前者が優先的に切断を受けることが明らかとなった。更に、ヒト血清中でのペプチド **4** の安定性についても解析し、ラットの場合と同様の代謝パターン (代謝物: **4-m1**, **4-m2**) が確認できた。

最近、33rd EPS (ブルガリア・ソフィア) でも発表があったように、ヨーロッパの Gubra ApS 社のグループが血漿中における hNMU の代謝安定性を評価し、同様の C 末端 Arg-Asn 間部位の切断が起こることを報告しているが¹³⁾、Phe²-Arg³間に相当する部位の切断を明らかにしたのは筆者らが初めてである。尚、同グループは、hNMU を脂肪酸修飾することにより代謝安定性を向上させ、体内動態特性を改善している。

4. 2型受容体を選択的に活性化するアゴニストの獲得

1型受容体に着目した上述2. の SAR の一方で、N 末端側 position 3までの各部位の誘導により2型受容体に対する選択的アゴニスト活性を示すものがいくつか得られてきた。芳香環を多く含むペプチド **4** とは対照的に aliphatic な構造に収束した (図2)。N 末端は3-cyclohexylpropionyl 基へ、position 2は Leu²へ、position 3は α,β -diaminopropanoic acid (Dap³) へ変換することにより、2型受容体への反応性を改善しつつ、1型受容体への反応性が劇的に低下していった。これらの構造を盛り込んだ誘導体 **5** (図2) は、1 μ M 以下の濃度において1型受容体を活性化せず、2型受容体に対して高選択的なアゴニスト活性を示した (図6)。hNMU と比較しても2~3倍劣る程度の顕著な2型活性化能を有していた。受容体選択的なアゴニストの創製は、期待しない作用の発現などのリスクを減らすことができる面で創薬的意義あると共に、NMU に関連した内分泌学研究を進展させる面でも大きく貢献できるものと言える。

5. おわりに

本研究では、活性コアとされた構造 (FLFRPN-amide) を基盤とした SAR により、1型受容体を強力に活性化するヘキサペプチド誘導体 **4** および、選択的ヒト2型 NMU 受容体ヘキサペプチドアゴニスト **5** の創製に成功した。紹介していない誘導体は多くあるが、残念ながら、C 末端3残基 (Pro⁴, Arg⁵, Asn⁶) の誘導化において特徴的な活性を示すものは見出せていない。だが、代謝解析により Arg⁵-Asn⁶間のペプチド結合が優先的に切断されることが判明し、活性を維持しつつ本部位を安定化するような構造変換

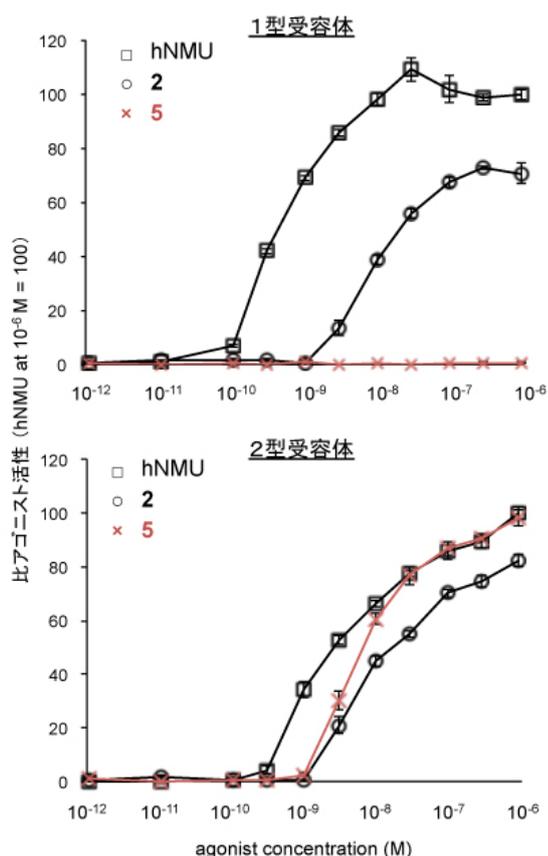


図6. 選択的ヒト2型NMU受容体ヘキサペプチドアゴニスト5の獲得

が、今後の *in vivo* 応用にあたっての重要な課題として挙がってきた。一方で、ヘキサペプチドのN末端側の構造を変換することで、受容体に対する選択性あるいは活性化能を変化させることができることが明らかとなったことは、本研究の大きな成果である。ペプチド4を基本に、2型受容体活性化能もhNMUに匹敵する活性を有するヘキサペプチド誘導体(hNMUの完全小型化)、あるいは、1型受容体に高選択的な活性を示す誘導体を得るためのSARは今後も継続して実施していきたいところである。

堅い文章を書きましたので、最後に学生へのメッセージをフランクに。ペプチドの分野で研究に足を踏み入れた学生さんは、若手ペプチド夏の勉強会に参加して、普段の研究室生活や学会では見えてこない研究者の人間味を体感してみるのがいいのでは?と思います。特に、研究に対してハードルが高く感じている人にとっては、「自分でも研究やっつけていけるかな・・・」と思えるようにしてくれる貴重な機会だと思います。M1から皆勤賞の筆者が、今、思うことです。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたりましては、(独)国立循環器病研究センター研究所の寒川賢治所長、同生化学部の宮里幹也部長および森健二室長、同分子薬理部の南野直人部長(現:創薬オミックス解析センター長)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、当研究室においては、精力的な誘導

体合成に尽力して頂いた学生の方々、多方面から研究を御支援いただきました林良雄教授、薬師寺文華助教、田口晃弘助教に感謝申し上げます。最後になりましたが、このような寄稿の機会を与えて頂いた編集委員の新潟大学・中馬吉郎先生に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) Kojima, M.; Haruno, R.; Nakazato, M.; Date, Y.; Murakami, N.; Hanada, R.; Matsuo, H.; Kangawa, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 435-438.
- (2) Fujii, R.; Hosoya, M.; Fukusumi, S.; Kawamata, Y.; Habata, Y.; Hinuma, S.; Onda, H.; Nishimura, O.; Fujino, M. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21068-21074.
- (3) Raddatz, R.; Wilson, A. E.; Artymyshyn, R.; Bonini, J. A.; Borowsky, B.; Boteju, L. W.; Zhou, S.; Kouranova, E. V.; Nagorny, R.; Guevarra, M. S.; Dai, M.; Lerman, G. S.; Vaysse, P. J.; Branchek, T. A.; Gerald, C.; Forray, C.; Adham, N. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32452-32459.
- (4) Mori, K.; Miyazato, M.; Ida, T.; Murakami, N.; Serino, R.; Ueta, Y.; Kojima, M.; Kangawa, K. *EMBO J.* **2005**, *24*, 325-335.
- (5) Ida, T.; Mori, K.; Miyazato, M.; Egi, Y.; Abe, S.; Nakahara, K.; Nishihara, M.; Kangawa, K.; Murakami, N. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4217-4223.
- (6) Nakazato M.; Hanada, R.; Murakami, N.; Date, Y.; Mondal M. S.; Kojima, M.; Yoshimatsu, H.; Kangawa, K.; Matsukura, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *277*, 191-194.
- (7) Ingallinella, P.; Peier, A. M.; Pocai, A.; Marco, A. D.; Desai, K.; Zytka, K.; Qian, Y.; Du, X.; Cellucci, A.; Monteagudo, E.; Laufer, R.; Bianchi, E.; Marsh, D. J.; Pessi, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4751-4759.
- (8) Neuner, P.; Peier, A. M.; Talamo, F.; Ingallinella, P.; Lahm, A.; Barbato, G.; Marco, A. D.; Desai, K.; Zytka, K.; Qian, Y.; Du, X.; Ricci, D.; Monteagudo, E.; Laufer, R.; Pocai, A.; Bianchi, E.; Marsh, D. J.; Pessi, A. *J. Pept. Sci.* **2013**, *20*, 7-19.
- (9) Sakura, N.; Kurosawa, K.; Hashimoto, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1148-1153.
- (10) Hashimoto, T.; Kurosawa, K.; Sakura, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1154-1157.
- (11) Takayama, K.; Mori, K.; Taketa, K.; Taguchi, A.; Yakushiji, F.; Minamino, N.; Miyazato, M.; Kangawa, K.; Hayashi, Y. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6583-6593.
- (12) Takayama, K.; Mori, K.; Sohma, Y.; Taketa, K.; Taguchi, A.; Yakushiji, F.; Minamino, N.; Miyazato, M.; Kangawa, K.; Hayashi, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *in press*.
- (13) Dalbøge, L. S.; Pedersen, S. L.; van Witteloostuijn, S. B.; Rasmussen, J. E.; Rigbolt, K. T. G.; Jensen, K. J.; Holst, B.; Vrang, N.; Jelsing, J. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 85-94.

たかやま けんたろう
東京薬科大学薬学部
薬品化学教室
ktaka@toyaku.ac.jp

酸感受性保護基, 4-メチルベンジル (MBn) 基を用いたコア1型糖アミノ酸の合成と糖ペプチド合成への応用

1. はじめに

タンパク質は翻訳後修飾の際、グリコシル化を受けることで、細胞の分化、がん化、接着などの様々な機能が付加される [1]。しかし、天然に存在する糖タンパク質糖鎖は一般的に不均一化して存在しており、糖鎖の構造と機能との相関が明確に得られていない。これら背景から、数多くの研究グループが均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質の合成を試みている [2]。その中、我々が行ってきたベンジル保護戦略による糖アミノ酸合成と、糖タンパク質合成の概略図を図1に示す。まず、液相法にて単糖誘導体から順次グリコシル化を行い、Fmoc糖アミノ酸ビルディングブロックを構築する。次に得られた誘導体を固相法により導入した後、糖ペプチドチオエステルへと導く。最後に、種々のペプチドライゲーション法によりペプチドセグメント同士を縮合することで、目的の糖タンパク質へと導いていく。この際、我々は糖水酸基の保護基として、ベンジル (Bn) 基を一貫して用いてきた。汎用されるアシル系保護糖と比べ、Bn系保護糖は高い反応性を持ち、収率よくグリコシル化体を与える。この恩恵により、複雑な糖鎖骨格をもつ糖アミノ酸の構築を可能にしている。また、塩基性条件下で安定であり、ピペリジンを用いるFmoc固相法によるペプチド伸長中でも、アシル転移などの副反応を回避することができる。脱保護時には、酸性条件下で除去することができるため、強塩基処理などで生じる α 位のエピ化や β -脱離による糖鎖部位の脱落などの懸念を必要もない。加えて、ペプチドライゲーション法における鍵中間体であるペプチドチオエステルを得ることができることも大きい利点である。このBn保護戦略を用いて我々は、様々な糖ペプチド、並びに糖タンパク質の合成に成



朝比奈 雄也

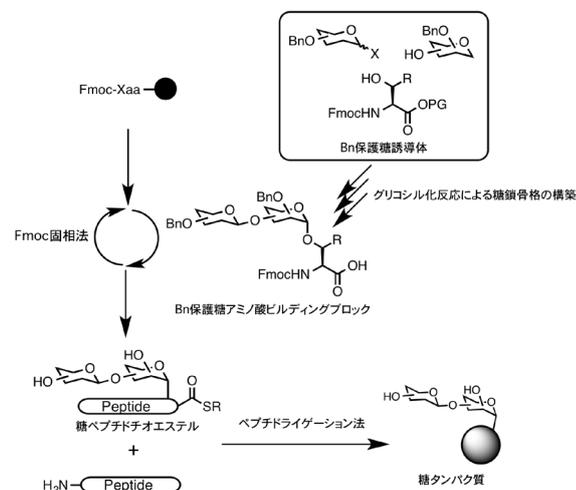


図1. ベンジル保護戦略による糖アミノ酸、ペプチド、タンパク質合成。

功してきた [3]。しかし、本手法では、固相合成後に2度の脱保護工程を要し、煩雑性があった。それは、1) TFAカクテルによるペプチド保護基の脱保護、2) Low-TfOH [4] 処理によるベンジル基の除去である (図2)。加えて、糖鎖骨格が複雑化するにつれて、Low-TfOH 処理中にグリコシド結合が一部切断される副反応が生じることも見出された [5]。これは Bn 基の酸に対する高い抵抗性のためであると考えられる。そこで、従来の Bn 基から、より酸感受性の高い置換型 Bn 系保護基へ置き換えることが、単純な解決法であると考えられる。しかし、糖鎖合成で一般的に汎用されてきた酸感受性保護基である4-メトキシベンジル (MPM) 基では、酸性条件下で行われるグリコシル化反応に耐えることができず、多工程の誘導を要するオリゴ糖の合成には適さない。すなわち、Bn 基の様に糖鎖合成中では堅牢で、なおかつ、Bn 基よりも酸に対して感受性の高い、糖水酸基の保護基を模索する必要がある。そこで我々は、4-メチルベンジル (MBn) 基を糖水酸基の保護基として用いて、コア1型2糖アミノ酸合成と、その糖ペプチド合成を行い、上記の条件に満たす、有用性のある保護基であるかどうか検証することにした。

2. 4-メチルベンジル (MBn) 基により保護されたコア1型糖アミノ酸の合成

まず、MBn 保護コア1型糖アミノ酸の合成に着手した。この合成経路を図3に示す。既知のチオガラクトシド **1** の遊離水酸基を4-メチルベンジルプロマイドを用いて MBn 化した。得られたガラクトース供与体 **2** とガラクトサミン受容体 **3** を、ニトリル溶媒効果を用いた β -ガラクトシル化法 [6] により2糖へと誘導することにした。供与体 **2** は -78°C 下でも速やかに活性化された後、 α -ニトリウム中間体を経て、望む β -グリコシド **4** を優先して与えた。得られた2糖はフッ化糖 **6** へと変換された後、 $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2\text{-AgClO}_4$ を活性化剤とした鈴木法 [7] 条件下で Fmoc-スレオニン誘導体 **7** とのグリコシル化反応に処された。その結果、目的の α -グリコシド **8** を高立体選択的かつ、高収率で得ることに成功した。得られた糖アミノ酸 **8** はアジド基の還元、続くアセチル化により、アセタミド **9** へと誘導された。最後に、アリルエステルを Pd⁰ 触媒により除去し、目的の MBn 基により保護された

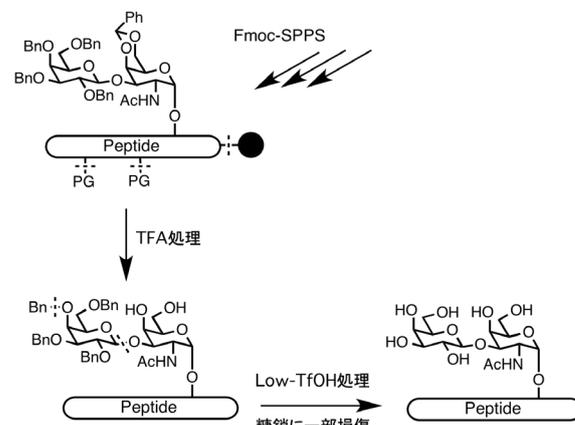


図2. ベンジル保護糖ペプチドの脱保護とその副反応。

Fmoc アミノ酸ビルディングブロック**10**の合成に成功した。これら各種の誘導化条件で、終始 MBn 基は安定であった。並んで、グリコシル化の効率も Bn 保護糖と比較しても遜色ないことが明らかになった。

3. MBn 基の脱保護の検討

固相合成法に応用する前に、得られた糖アミノ酸ビルディングブロック**10**を用いて、MBn 基の脱保護条件の検討を行うことにした。糖アミノ酸**10**を、各種 TFA カクテルによる処理を室温で1時間行った(図4)。その結果、予想以上に MBn 基の酸感受性は高く、TFA カクテルを用いた温和な条件下でも脱保護できることが見出された(図5)。特に、カチオンスキャベンジャーとして、H₂O、トリイソプロピルシラン(TIS)、1,2-エタンジチオール(EDT)を加えた系では、ほぼ完全に脱保護が進行した。この3種のスカベンジャーは Fmoc 法の脱保護においてもよく用いられる試薬であり、これら結果から、TFA カクテルによる一段階の脱保護処理が可能であることが確約された。

4. 糖タンパク質、ヒトインターロイキン(IL)-2(1-27)の合成への応用

目的の Fmoc 糖アミノ酸ビルディングブロック**10**が得られたため、次に、ヒトインターロイキン(IL)-2(1-27)のペプチドチオエステル合成に応用した。ヒトインターロイキン(IL)-2は細胞性免疫に関わるサイトカインの一種であり、Thr³にO-結合型糖鎖が付加している。合成経路を図6に示す。ペプチドチオエステルを得るために、N-アルキルシステイン(NAC) [8]が担体された樹脂からペプチド鎖の伸長

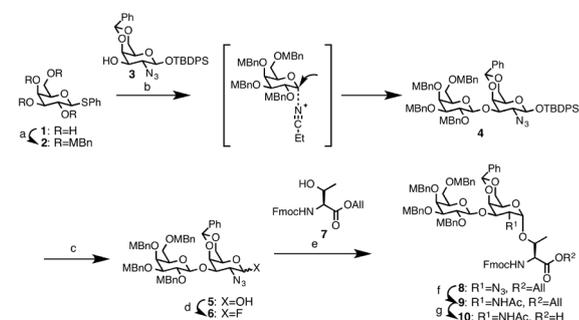


図3. 4-メチルベンジル保護糖アミノ酸ビルディングブロックの合成。反応条件：(a) 4-methylbenzyl bromide, NaH, CsI, DMF, 0 °C to r.t., 1.5 h, 81%; (b) 1-benzenesulfonyl piperidine, 2,4,6-tri-*t*-butylpyridine, Tf₂O, MS4A, EtCN, -78 °C, 10 min, 68%; (c) TBAF, AcOH, THF, r.t., 18 h, 98%; (d) (diethylamino)sulfur trifluoride, THF, 0 °C, 15 min, 77% (α -isomer), 16% (β -isomer); (e) AgClO₄, Cp₂ZrCl₂, MS4A, CH₂Cl₂, -20 °C to r.t., 30 min, 79%. (f) (1) Zn, AcOH, CH₂Cl₂, r.t., 30 min; (2) Ac₂O, CH₂Cl₂, r.t., 30 min, 94% in 2 steps; (g) Pd(Ph₃P)₄, dimedone, THF, r.t., 2 h, 91%.

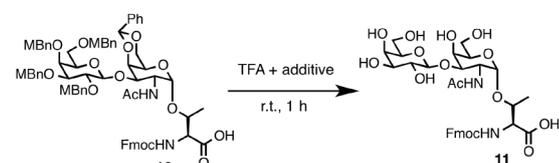


図4. 4-メチルベンジル基の脱保護検討。

を自動合成機により行った。リシン残基では、Fmoc-Lys(*i*Noc)-OHをDIC-HOBt法により、手動で導入した。糖鎖付加部位であるThr³には、合成した糖アミノ酸**10**を先と同様にDIC-HOBt法により導入した。ペプチド鎖伸長後、得られた糖ペプチド樹脂をH₂O, TIS, EDT, チオアニソール(TA)を含むTFAカクテルで2時間、室温にて処理した。その結果、一段階の脱保護処理で糖水酸基を含めたすべての保護基が除去された糖ペプチド**12**が望み通りに得られた(図7)。次に、得られた粗生成物を6 M 尿素と5% 3-ヒドロキシチオフェノールを含むアセトニトリル水溶液中で

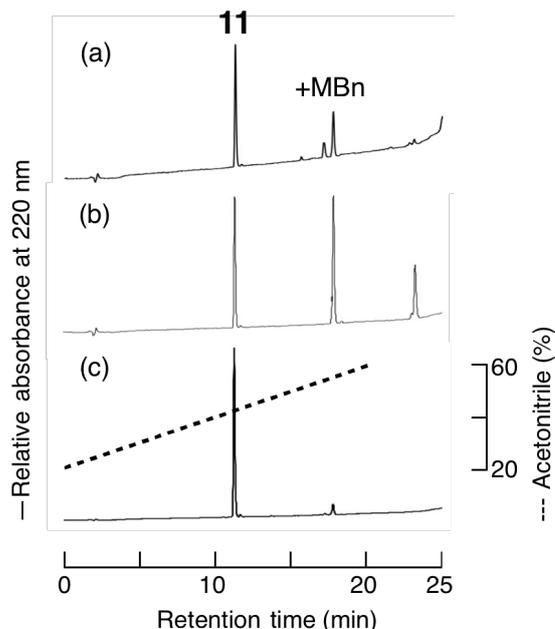


図5. 糖アミノ酸**10**の脱保護 HPLC チャート。添加剤：(a) H₂O, (b) H₂O, TIS, (c) H₂O, TIS, EDT。添加量はそれぞれ2.5%で処理を行った。

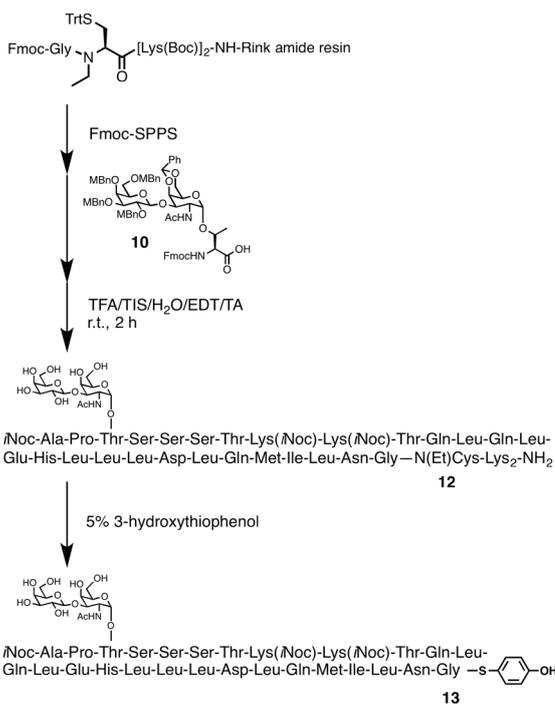


図6. 糖アミノ酸**10**を用いた、インターロイキン-2(1-27)ペプチドチオエステル**13**の合成。

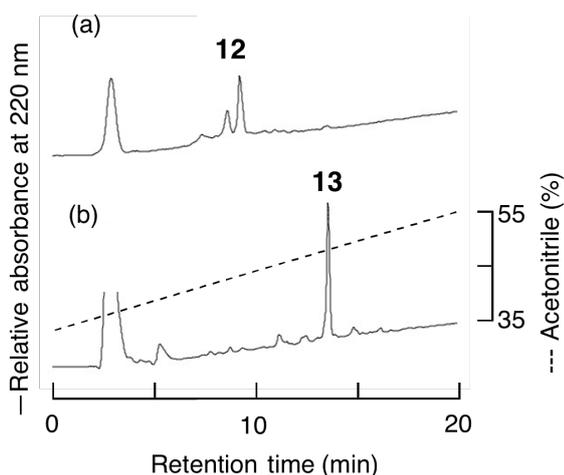


図7. チオエステル化のHPLCチャート。(a) 反応開始直後、(b) 18時間後。

チオエステル化反応を行った。37℃で1日間反応させることで、目的とする糖ペプチドチオエステル**13**を収率10%で得ることに成功した。これら結果から、MBn基は一段階脱保護を実現する、有用な保護基であることが示された [9]。

5. 結論

MBn基を用いた糖アミノ酸ビルディングブロックの合成と、その糖ペプチド合成への応用に成功した。MBn基はBn基と同じように糖に高い反応性を与え、高効率な糖アミノ酸合成を実現した。また、固相合成後の脱保護では、TFAカクテルによる一段階の処理で無保護糖ペプチドチオエステルを与えた。今後は、このMBn基を用いて、複雑な骨格を有するオリゴ糖アミノ酸の合成とその糖ペプチド合成へと展開していきたい。

6. 学生の皆様へ

著者は、学生時代にやっておけばよかったと思うことが多すぎるので、それをお話しているとキリがありません。なので、今回はやっておいてよかったことをお話ししたいと思います。それは、色々な学会や、発表会などに参加し、研究者の方々とお話や議論を交わすことで、その研究者の思想や哲学を学べたことです。決して自分の研究分野の“オタク”にならず、色々な人に出会って、学び、自分の研究哲学を磨いてください。

7. 最後に

学生時代に終始、ご指導ご鞭撻頂きました大阪大学蛋白質研究所、北條裕信教授に深く御礼申し上げます。また、緻密な糖鎖化学を伝授して下さった東海大学、中原義昭、元教授に深く感謝いたします。

参考文献

- Supiro, R. G. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43–56.
- Payne, R. J. *et al. Chem. Commun.* **2010**, *46*, 21–43; Unverzagt, C. *et al. Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4408–4420.
- Nakahara, Y. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 257–273; Hojo, H. *et al. Ibid.* **2010**, *128*, 269–279.

- Tam, J. P. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5242–5251.
- Ueki, A. *et al. Tetrahedron* **2010**, *66*, 1742–1759.
- Ueki, A. *et al. Ibid.* **2008**, *64*, 2611–2618.
- Matsumoto, T. *et al. Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3567–3570.
- Hojo, H. *et al. Ibid.* **2007**, *48*, 25–28.
- Asahina, Y. *et al. J. Carbohydr. Chem.* **2015**, *34*, 12–27.

あさひな ゆうや
大阪大学蛋白質研究所 助教
asahina@protein.osaka-u.ac.jp

PNJ 研究室紹介「北海道大学大学院理学研究院化学部門坂口研究室」

はじめに

北海道大学大学院理学研究院の坂口和靖教授のもとに2014年5月に助教として着任しました。今回、研究室紹介を執筆する機会を頂きましたので、北海道大学・坂口研究室をご紹介します。



鎌田 瑠泉

研究室の構成

2015年3月10日現在の坂口研究室メンバーは、坂口和靖教授を筆頭に、准教授：今川敏明、助教：鎌田瑠泉、特任助教：北原圭、博士課程4名（内3名は学振



photo by K. Sakaguchi



photo by K. Sakaguchi

特別研究員), 修士課程 8 名, 学部学生 8 名の計 25 名で構成されています。学部学生は 3 年生の 12 月に研究室へと分属されます(翌 4 月までは仮分属です)。坂口研ではほとんどの学生は修士課程へと進学しています。また, そのまま博士課程へと進学する学生も多く, 今年は 2 名が博士課程へ進学することが決まっています。

研究室の概要

北海道大学は札幌駅から徒歩約 7 分という札幌市の中心部に, 自然にあふれる広大なキャンパスを有しています。この広いキャンパスを移動するために, 構内には循環バスが通っています。自然豊かなキャンパスでは四季折々に様々な姿を見ることができます。春には, 北海道大学の校章の基になっているオオバナノエンレイソウをはじめとした花々や木々を楽しむことができます。夏はそれほど気温が上がることもなく(北海道出身の著者にとっては暑いですが), 快適な日々を過ごすことができます。秋には黄色に色づいたイチョウ並木を楽しむことができます。北海道大学では, イチョウ並木が一番見ごろになる週末に, イチョウ並木の道路を歩行者天国として解放しており, 多くの市民や観光客が訪れています。また, 冬には一面の雪景色を楽しむことができます。

北海道大学理学部は, 札幌キャンパス内の南寄り, 札幌駅から徒歩 10 分程度に位置し, 本館から 8 号館までの建物があります。理学部本館は, 理学部設立一年前の 1929 年に建てられた札幌でも最古の鉄筋コンクリート建築で, 現在は総合博物館としても利用されて



photo by K. Sakaguchi



photo by K. Sakaguchi

います。理学部の近くには, 北海道大学内の観光地としても有名なポプラ並木があります。2004 年の台風によりポプラ並木の約 4 割が倒れてしまい, 一時は存続が危ぶまれる事態となりましたが, 札幌市民や全国からの寄付金により, 現在は全長 250 メートルの並木道になっています。

理学部化学科は 15 の基幹研究室と 6 つの協力的研究室から構成され, 広く化学の分野を包含したグローバルな研究・教育を行っています。生物化学研究室は, 1930 年(昭和 5 年)の北海道大学理学部開設時に化学科第三講座(生物化学)として設立されました。2003 年に坂口先生が教授に就任され, 坂口研として今年 12 年目を迎えます。一昨年 2013 年 11 月には, 長く研究室を支えて下さっていた助教の中馬吉郎先生が新潟大学の准教授として栄転されました。

研究室の様子

坂口研では, 週 2 回のペースで論文紹介(Journal Club)と研究テーマの進捗状況を発表する Data Club が開かれています。これら以外にも, 週 1 回研究グループ毎に Group Meeting を実施し, Data Club ではできない実験条件等についての詳細な Discussion をしています。研究データを報告する Data Club では, 英語で発表する試みがなされています。発表前の準備は大変ですが, 学生たちは自ら積極的に英語を学んでいくことで, TOEIC 800 点越えが 3 名など研究室全体の英語力が上がってきていると思います。研究室では海外での学会発表や短期留学を推奨しています。ほとんどの博士課程の学生は 1-2 ヶ月の短期留学を経験しており, 現在も博士課程 1 年の学生がアメリカの National Institutes of Health (NIH) に留学しています。

研究内容

坂口研では, 「“化学反応”の集積がいかにして“生命”となりうるか」の理解を目指して, 4 つの研究テーマ: 1. 癌抑制タンパク質 p53 の多量体形成および翻訳後修飾を介した機能制御機構, 2. 脱リン酸化酵素 PPM1 ファミリータンパク質による生命現象の制御機構, 3. 自己組織化生体分子を構造制御素子としたナノマテリアルの創成, 4. 鏡像体生体分子の機能解明, を介して, 化学的な視点から生命の包括的な理解を目指し, 日々研究を行っています。



photo by K. Sakaguchi



1. 癌抑制タンパク質 p53の多量体形成および翻訳後修飾を介した機能制御機構

p53タンパク質をコードしている *TP53* 遺伝子は、悪性腫瘍のなかで最も多くの変異が報告されている遺伝子です。p53は種々の遺伝毒性ストレスに応答して活性化・安定化・四量体化し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導することで遺伝子の恒常性を維持しています。坂口研では、p53の機能発現に必須である四量体形成と翻訳後修飾を基軸にした p53の制御機構の解明およびバイオ関連機能性分子の開発を実施しています。

各種四量体形成ドメインペプチドを用いた p53多量体形成能の解析から、悪性腫瘍において報告されている四量体形成ドメイン中の変異や、翻訳後修飾が四量体形成に及ぼす効果を解析し、四量体形成を介した p53の機能制御や進化過程について解明を進めています。さらには、生細胞内において p53の四量体形成量および転写活性を同時にモニターできる新規解析手法の開発や開発した系を用いた p53の機能解析を実施しています。

2. 脱リン酸化酵素 PPM1ファミリータンパク質による生命現象の制御機構

Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は DNA 損傷やストレス依存的に発現誘導され、細胞周期停止・アポトーシスを誘導する p53, ATM を脱リン酸化・不活性化して細胞を元の恒常的状态に戻しています。PPM1D の過剰発現が乳癌や神経芽細胞腫、白血病などの様々ながんにおいて報告されており、癌治療の新規ターゲットとして注目されています。坂口研では、PPM1D に対して強い阻害活性を有するペプチド性阻害剤や低分子阻害剤の開発を実施しています。また、PPM1D の新規結合タンパク質の同定や細胞内局在解析を介して、PPM1D 過剰発現による細胞癌化メカニズムの解明を行っています。

PPM1D は精巣および白血球に特異的なスプライシングバリエーション PPM1D430 を有しており、精子形成や免疫応答において重要な役割を果たしていることが示唆されています。研究室では、正常細胞における免疫応答や精子形成に関わる PPM1D の機能解明についての研究も進めています。

リン酸化ペプチドを用いた PPM1ファミリーの基質認識機構の解析や各アイソフォームの特異的阻害剤の開発を行うとともに、PPM1ファミリータンパク質の遺伝子異常と疾患メカニズムの関係の解明を実施しています。

3. 自己組織化生体分子を構造制御素子としたナノマテリアルの創成

ペプチドの多量体形成能やペプチド-DNA ハイブリット構造体の自己組織化能を介して、機能性ペプチドの多量体化と配向制御によるナノマテリアルの構造制御を目指した研究を行っています。機能性ペプチドとして、無機物の粒子形成を促進するバイオミネラリゼーションペプチドを利用し、無機ナノマテリアルの作製を行っています。また、特徴的な構造を持つナノマテリアルが、細胞に対する増殖抑制能の効果にナノ構造依存的な強さを示すことを見出しています。

4. 鏡像体生体分子の機能解明

生命は L 型アミノ酸から構成されるタンパク質と D 型デオキシリボースを含む DNA から構成されています。このように、生物学的経路の中心の役割を担うタンパク質と DNA はホモキラリティーが確立しており、その選択性が厳密に制御されています。しかしながら、生命の起源において、どのように L 体アミノ酸と D 体のデオキシリボースが選択されたかは解明されていません。坂口研では、D 型および L 型ペプチドを用いた構造解析を介して、キラル特異的な機能性についての研究を進めています。

おわりに

坂口研ではナノマテリアルに関する研究から抗がん剤の開発、免疫応答の制御についてなど、幅広いテーマの研究を行っています。「化学反応」の集積がいかにして「生命」となりうるかを解明するという壮大な目標のもと、研究が進められています。私も、北海道の地から新しい成果を発信していけるよう研究と教育に邁進していく所存です。

今回、PNJ 編集委員の中馬吉郎先生より、研究室紹介を執筆させていただく機会を頂きました。編集委員の先生方には、この場をお借りして御礼申し上げます。札幌駅から研究室まで徒歩で10分です。北海道にお越しの際には是非一度、坂口研究室にお立ち寄り下さい。

かまだ るい
北海道大学大学院理学研究院 助教
kamadar@sci.hokudai.ac.jp

第20回ペプチドフォーラム開催報告

2015年3月13日（金）、長浜バイオ大学・命江館3階中講義室3において、第20回ペプチドフォーラム「生命分子・ペプチド機能に学ぶ医薬品」（主催：日本ペプチド学会，生命分子機能研究会，共催：長浜バイオ大学）を開催し，次の先生方にご講演いただきました。

小出隆規先生（早稲田大学）：
「コラーゲン3重らせんを模倣するペプチドのエンジニアリングと応用」

野水基義先生（東京薬科大学）：
「人工基底膜の創成をめざして」
深水昭吉先生（筑波大学大学院）：

「妊娠と高血圧－モデルマウスから学ぶこと－」

谷口敦彦先生（ERATO, 東京大学）：
「アミロイド病治療を目指したアミロイド選択的酸素化触媒の開発」

後藤佑樹先生（東京大学大学院）：
「擬天然物の創成を見据えたアズリンペプチド人工合成系の確立」

田口博明先生（鈴鹿医療科学大学）：
「抗体医薬開発ツールとしてのリン酸ジエステル含有ペプチドの開発」

藤井郁雄先生（大阪府立大学）：
「ポスト抗体医薬：進化分子工学による分子標的ペ



木曾 良明



向井 秀仁

チドの創出」

下東康幸先生（九州大学大学院）：
「ヒト核内受容体の非リガンド性阻害ペプチド創薬をめざして」

坂口和靖先生（北海道大学大学院）：
「発癌性プロテインホスファターゼの細胞癌化機構と阻害剤」

大日向耕作先生（京都大学大学院）：
「構造－活性相関情報を基盤とした食品由来の生理活性ペプチド探索」

夏目徹先生（産業技術総合研究所）：
「分子プロファイリングから展開する創薬加速」

今回のフォーラムは，午前10時30分にまず木曾良明・長浜バイオ大学客員教授による開会の挨拶ではじまり，昼食をはさんで上記11名の先生方にご講演いただき，最後に向井秀仁・長浜バイオ大学准教授が閉会の挨拶を行いました。本フォーラムでは，ペプチドや様々な生体由来化合物について，合成やスクリーニング法，最近の再生医療研究とその応用の基盤となるような足場材料技術や，医薬・機能食品への新たな応用，開発へのロボット技術の導入など，様々な視点にたった講演が行われました。本フォーラムは，2012年に第15回ペプチドフォーラムを初めて長浜バイオ大学で開催して以来，長浜では3年ぶりの開催となりましたが，全国の大学・公的研究所や製薬，化学，食品などの様々な企業から120名以上の参加者を得て活発な討論が行われました。またフォーラム終了後，場所を長浜ロイヤルホテルに移して情報交換会が開かれ，その際も演者を囲んで活発な討論が行われていました。最後にこの場をお借りして，ご講演いただいた諸先生



方、ご参加いただいた皆様方、さらにご支援いただいたペプチド学会の皆様方に厚く御礼申し上げます。

きそ よしあき
長浜バイオ大学客員教授
y_kiso@nagahama-i-bio.ac.jp

むかい ひでひと
長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科
hmukai-endo@umin.ac.jp

第47回若手ペプチド夏の勉強会開催のお知らせ

2015年8月9日(日)から11日(火)までの2泊3日で、第47回若手ペプチド夏の勉強会を長野県塩尻市にて開催いたします。今回の会場は、北アルプスが一望できる豊かな自然に囲まれた「信州塩尻・天然温泉アスティカたおか」です。この勉強会では、若手ペプチド研究者が中心となって、ペプチド研究の基礎から始まりケミカルバイオロジー、創薬などの高度な研究領域に挑戦している先輩先生方との活発な討論を通じて、今後のペプチド研究を担う若手研究者を育成することを目的としており、現在準備を鋭意進めております。日々の研究の悩みを分かち合い、大切な仲間を作ることができる貴重な場です。皆様のご参加を楽しみにしております。

日時：2015(平成27)年8月9日(日)～11日(火)

場所：信州塩尻・天然温泉 アスティカたおか

〒399-0711 長野県塩尻市片丘東山9215-1401

TEL: 0263-52-7600, FAX: 0263-52-0074

URL: <http://ast-kataoka.com/>

(JR塩尻駅下車、車で20分)

世話人：中村浩蔵、小山正浩(信州大学 農学部 食品分子工学研究室)、

山田圭一(群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門)

*参加方法等の詳細に関しては、追ってメールにてお知らせ致します。

(お問い合わせはE-mail: 47waka pep@shinshu-u.ac.jpまでお願い致します)

新編集委員



保住 建太郎

この度、編集委員に加えていただくことになりました。編集委員を通して、ペプチド学会の発展に微力ながら貢献して参りたいと思います。どうぞよろしくお願い申し上げます。



中瀬 生彦

新編集委員として加わることになりました。微力ながら日本ペプチド学会の皆様のお役に立てるよう尽力する所存です。どうぞ宜しくお願い申し上げます。



中馬 吉郎

この度、新たに編集員に加わることになりました。ペプチド研究の現状をリアルタイムで発信できるように心掛け、学会の発展に微力ながら貢献できればと思っております。どうぞよろしくお願い申し上げます。

編集後記

皆さんこんにちは、花が咲き緑が芽吹き新年度が始まりました。研究室でも新たな仲間を迎え、新たな研究が始まっていると存じます。本PNJ96号は、新潟大学の中馬先生に編集をご担当いただきました。私も編集の取りまとめを担当して一年が経ちましたが、編集委員ならびにご執筆者の皆様の多大なご協力のおかげで、発行もスムーズに進むようになってきました。また、本誌の編集を担っていただいている株式会社イセブ様でも、本号よりご担当が篠崎さんから東(あずま)さんに代わりました。篠崎さんこれまで本当にありがとうございました。さて、本号には編集担当の中馬先生の熱い思いが込められています。本号は新進気鋭の若いペプチド研究者に焦点をあてています。質の高い研究活動報告のみならず、ペプチド研究を志す学生諸君への熱いメッセージが込められています。世界をリードする本邦のペプチド研究の系譜を脈々と紡ぎ、ペプチド学の新潮流を拓き築く若い力に益々期待したいと思います。皆さん頑張りましょう。さて、本編集委員も4月より3人の委員が入れ替わりました。小野慎先生、日高雄二先生、今野博行先生、長い間編集委員としてご尽力下さりありがとうございました。今年度は、下記の5人の編集委員で頑張っていきたいと思っておりますので、どうぞよろしくお願い申し上げます。(林 良雄)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会
〒562-8686 箕面市稲4-1-2
(株)千里インターナショナル内

編集委員

林 良雄 (担当理事)
(東京薬科大学薬学部薬品化学教室)
TEL・FAX 042-676-3275

e-mail: yhayashi@toyaku.ac.jp

中馬 吉郎 (新潟大学理学部化学科)
TEL・FAX 025-262-6160

e-mail: chuman@chem.sc.niigta-u.ac.jp

中瀬 生彦 (大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター)

TEL・FAX 072-254-9895

e-mail: i-nakase@21c.osakafu-u.ac.jp

保住 建太郎 (東京薬科大学薬学部)
TEL・FAX 042-676-5670

e-mail: hozumi@toyaku.ac.jp

松島 綾美 (九州大学大学院理学研究院)
TEL 092-642-4353, FAX 092-642-2607

e-mail: ayami@chem.kyushu-univ.jp

(本号編集担当：中馬 吉郎)