

天然由来ペプチドの活性発現に係わる三次元構造の解明と応用



三重大学大学院生物資源学研究所 増田 裕一

はじめに

天然由来のペプチドには、特異な三次元構造を形成することにより生物活性を示すものがある。その活性発現に係わる三次元構造の解明は、薬剤の合理的設計につながる。しかしながら、ペプチドの骨格は柔軟であるため、化学構造から三次元構造を予測することは難しい。

筆者は、ペプチドの三次元構造を各種機器分析法により精密に解析し、生物活性との関係を綿密に調べることにより、薬剤の分子設計につながる知見を見出してきた。本講演では、以下に述べる3つの天然由来ペプチドの研究について紹介する。

1. アルツハイマー病因ペプチドの毒性配座の解明

アルツハイマー病の原因物質である42残基のアミロイドβ (Aβ42, 図1A)は、凝集することにより神経細胞毒性を示すことから、Aβ42の凝集機構の解明ならびにそれに基づく薬剤開発が強く望まれていた。しかしながら、Aβ42は不溶性かつ非結晶性であるため、溶液NMRやX線結晶構造解析などの高分解能立体構造解析法を用いることができない。筆者らは、粉末試料の構造解析に適用可能な固体NMRを用いて、Aβ42凝集体の三次元構造を解析し、アミノ酸残基の25, 26番目と22, 23番目にそれぞれターン構造を有する2種類の配座異性体の存在を明らかにした(図1B)。それぞれの配座固定アナログ(図1C)を設計・合成し、神経細胞毒性を評価した結果、22, 23番目でターン構造を有する配座が、毒性発現に大きく寄与することを明らかにした¹⁾。

以上の知見を元に、22, 23番目にターン構造を有する毒性配座を特異的に認識する抗体が作製され、アルツハイマー病の病態解明ならびに早期診断へと応用されている²⁾。また、Aβ42凝集体の三次元構造モデルは、凝集阻害剤の結合部位解析の基盤データとして役立てられている³⁾。

2. apratoxin類の三次元構造解析とミメティクスの創製

apratoxin類(図2A)は、海洋シアノバクテリアから単離、構造決定された環状デプシペプチドであり、様々な癌細胞株に対して強力な細胞毒性を示す。しかしながら、apratoxin類の

環状骨格は柔軟であるため、化学構造の変換が三次元構造に影響を与えることがあり、ミメティクス(活性を模倣した人工類縁体)の合理的設計が困難であった。筆者らは、NMRによる三次元構造解析と計算化学を用いた分子モデリングにより、高精度の三次元構造モデル(図2B)を提示し、Dtena部位の置換基の立体反発が三次元構造の維持に重要であることを示唆した⁴⁾。本知見は、これまで解釈が困難であったapratoxin類の構造-活性相関の一部を明快に説明した。

apratoxin類のmoCys部位は不安定であるため、合成難度が高いだけでなく、非特異的な毒性発現の一因ともなっていた。筆者らは、moCys部位の折れ曲がり構造(図2B)を模倣し、かつ安定で容易に合成可能なミメティクス16種類を設計した(図2C)。これら全てを固相法により合成し、細胞毒性を評価した結果、moCys部位を4ピペリジニカルボン酸に、Tyr(Me)の側鎖をビフェニルに置換したミメティクス(図2D)が、apratoxin Aを上回る細胞毒性を示した。NMR解析の結果、本ミメティクスはapratoxin Aの特徴的な折れ曲がり構造を模倣しており、全体の三次元構造もほとんど同じであった⁵⁾。本研究成果は、環状ペプチドのミメティクス創製において、三次元構造に着目する重要性を強く指摘している。

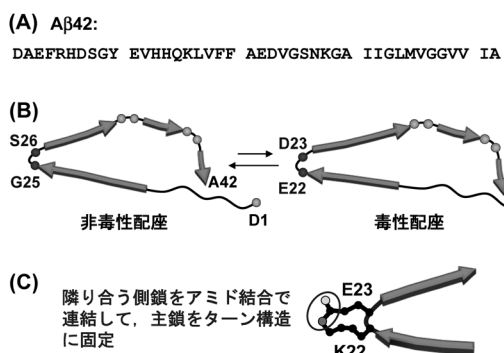


図1. (A) Aβ42のアミノ酸配列。(B) Aβ42凝集体に存在する2種類の立体配座。(C) 毒性配座固定アナログの設計。

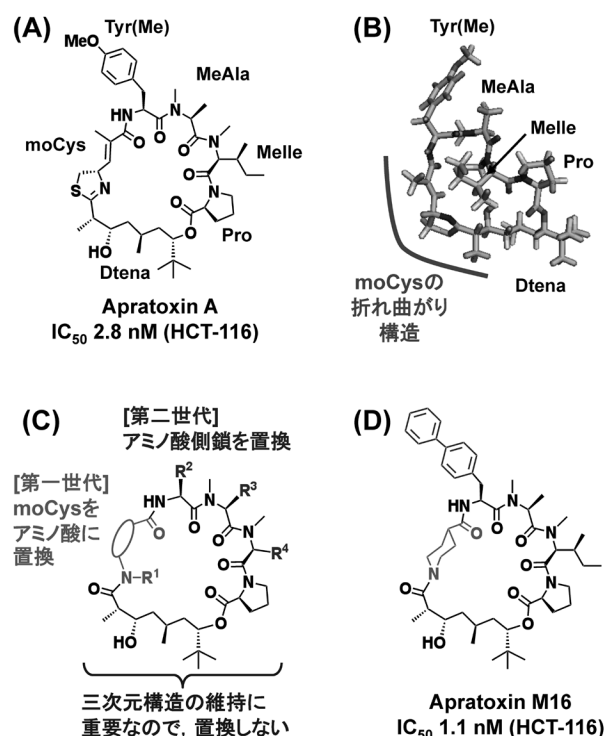


図2. (A) apratoxin Aの化学構造。(B) NMR解析により提示された三次元構造。(C) apratoxin A ミメティクスの設計。(D) 創製された高活性ミメティクス。

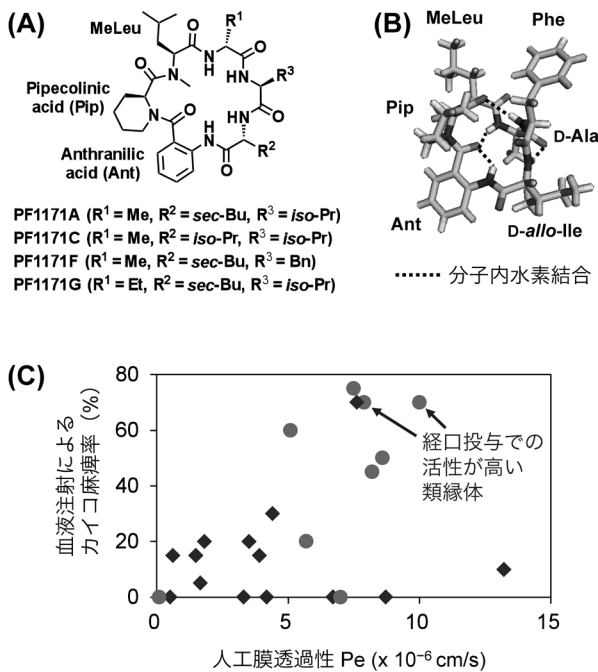


図3. (A) PF1171類の化学構造. (B) PF1171FのX線結晶構造. (C) 三次元構造に着目したカイコ麻痺活性-人工膜透過性-経口吸収性の相関の考察. 人工膜透過性を横軸に、血液注射によるカイコ麻痺率を縦軸にして、各類縁体をプロットした. ●: 結晶構造と同様の三次元構造を形成している類縁体, ◆: 結晶構造とは異なる三次元構造を形成している類縁体.

3. PF1171類の三次元構造-生物活性-体内動態に関する系統的解析

近年、細胞膜透過性や経口吸収性が高い中分子環状ペプチドの創薬研究が脚光を浴びているが、環状ペプチドのどのような構造がこれらの性質に係わっているかの知見は少ない。筆者はモデル化合物として、子囊菌が生産する環状ペプチドであり、カイコに対して経口投与で麻痺を引き起こすPF1171類(図3A)に注目した。固相法を用いたペプチド鎖の伸長と液相での環化により、PF1171A, C, F, Gの全合成を初めて達成した⁶⁾。合成したPF1171FのX線結晶構造解析を行い、4本の分子内水素結合が三次元構造の維持に大きな役割を果たしていることを示唆した(図3B)。NMRを用いた三次元構造解析ならびに水素結合の解析により、PF1171Fの有機溶媒中(CDCl_3 , CD_3OH , DMSO など)の主な立体配座が結晶構造と類似していることを確認した。

PF1171類の活性発現に係わる三次元構造を明らかにするため、経口投与での麻痺活性が最も高かったPF1171Fを元に23種類の類縁体を系統的に設計・合成し、NMRで解析した三次元構造、血リンパ注射および経口投与でのカイコ麻痺活性、人工膜透過性試験の結果を綿密に比較した。その結果、図3Bの三次元構造を維持している類縁体が活性を維持している傾向が見られた。さらに、図3Bの構造を維持している類縁体は人工膜透過性が高く、経口投与でも高いカイコ麻痺活性を示した(図3C)。その要因として、分子内水素結合の形成により疎水性が向上するとともに、分子サイズがコンパクトになっていることが考えられた⁷⁾。本研究成果は、環状ペプチドの三次元構造-生物活性-体内動態の関係を系統的に論じたものであり、生物活性環状ペプチドの合理的設計法に新知見を与えるものである。

おわりに

以上のように、ペプチド性化合物の構造-活性相関を正確に理解するためには、化学構造(図1A, 2A, 3A)だけではなく、三次元構造(図1B, 2B, 3B)を観る必要がある。このことが、生物活性ペプチド研究の大変なところであり、面白くやりのあるところだと筆者は考えている。特に、天然由来のペプチドの三次元構造は、様々な相互作用の絶妙なバランスにより形成された複雑なものが多い。その洗練された三次元構造デザインを学び、分子認識や体内動態に係わる立体構造を明らかにし、薬剤設計への応用へと繋げていきたい。

(引用文献)

- Masuda Y, Uemura S, Ohashi R, Nakanishi A, Takegoshi K, Shimizu T, Shirasawa T, Irie K. *ChemBioChem* Vol. 10, p 287-295, (2009)
- Murakami K, Horikoshi-Sakuraba Y, Murata N, Noda Y, Masuda Y, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Shirasawa T, Shimizu T, Irie K. *ACS Chem. Neurosci.* Vol. 1, p 747-756, (2010)
- Masuda Y, Fukuchi M, Yatagawa T, Tada M, Takeda K, Irie K, Akagi K, Monobe Y, Imazawa T, Takegoshi K. *Bioorg. Med. Chem.* Vol. 19, p 5967-5974, (2011)
- Masuda Y, Suzuki J, Onda Y, Fujino Y, Yoshida M, Doi T. *J. Org. Chem.* Vol. 79, p 8000-8009, (2014)
- Onda Y, Masuda Y, Yoshida M, Doi T. *J. Med. Chem.* Vol. 60, p 6751-6765, (2017)
- Masuda Y, Tanaka R, Kai K, Ganesan A, Doi T. *J. Org. Chem.* Vol. 79, p 7844-7853, (2014)
- Masuda Y, Tanaka R, Ganesan A, Doi T. *J. Org. Chem.* Vol. 82, p 11447-11463, (2017)

謝辞 本研究は、筆者が渡り歩いてきた複数の研究室において、多くの先生方、学生、共同研究者に支えられて達成されたものです。A β 2の研究は、京都大学大学院農学研究科生命有機化学分野で行ったものであり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました入江一浩教授に厚く御礼申し上げます。また、同研究室の大東肇先生(京都大学名誉教授、福井県立大学名誉教授)、平井伸博先生(京都大学名誉教授)、村上明先生(現兵庫県立大学環境人間学部教授)、村上一馬博士(現准教授)には、多くの助力を頂きました。固体NMRを用いた研究は、京都大学大学院理学研究科分子構造化学研究室の竹腰清乃理教授、大橋竜太郎博士(現金沢大学理工学域助教)、中西梓博士のご協力が不可欠であり、大変感謝しております。apratoxin類とPF1171類の研究は、東北大学大学院薬学研究科反応制御化学分野で行ったものであり、多大なご支援とご助言を賜りました土井隆行教授、塚本裕一博士(現横浜薬科大学薬学部教授)、吉田将人博士(現筑波大学数理工学系化学域准教授)に心から感謝申し上げます。PF1171類の研究について貴重なご助言を頂いた、イースト・アングリア大学のGanesan教授に深謝致します。また、apratoxin類の実験を担当した藤野雄太氏、鈴木淳氏、恩田勇一博士、PF1171類の実験を担当した田中鍊氏に、心より御礼申し上げます。

現所属の三重大学大学院生物資源学研究所生理活性化学・創薬化学研究室において、協力して教育・研究を進められる環境を与えて頂いた稲垣稜教授に深く感謝しております。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長の名古屋大学教授人見清隆先生、ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。