

新機能創出をめざした新規アミノ酸・ペプチドの化学合成

長田 聡史・兒玉 浩明*

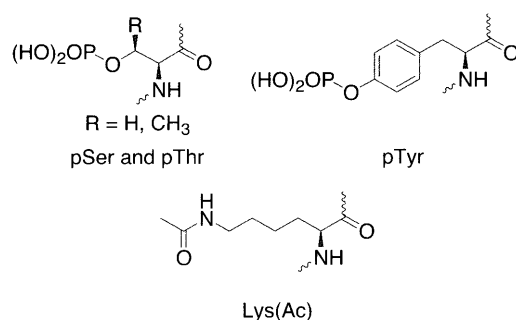
多様な生理活性を発現するペプチドは医薬品のリード化合物として最も注目されているが、プロテアーゼ耐性の欠如、脂溶性の低さ、複数のレセプターへの作用といった問題点があり、実用レベルの天然ペプチドは数少ない。いわゆる標準アミノ酸20種の組み合わせからは、生理活性に必須のアミノ酸残基を探し当てることはできても、機能改善に向けた問題点をクリアするのは困難だからと言える。標準アミノ酸にとらわれず、 α アミノ酸ユニットをもつ化合物であれば、すでに確立されているペプチド化学合成を適用できる。本来の機能の改善あるいは新たな機能を創出でき、さらには新たな医薬品のリード化合物となることも可能である。ただ、やみくもに側鎖を変化させても生理作用は期待できない。タンパク質の部分ペプチドに、生体内でタンパク質に施される化学修飾を模倣することは最も期待できる機能化であろう。タンパク質には多種類の可逆的な翻訳後修飾反応が存在し、タンパク質の機能を調節している。翻訳後修飾反応にはペプチド鎖の切断、糖鎖や脂肪酸の付加といった不可逆反応と、リン酸化、アセチル化、メチル化等の可逆的反応が存在する (Fig. 1)。これらの修飾反応は細胞内の情報伝達に主要な役割を担っている。これらの修飾体を化学的に模倣して酵素耐性を持つ側鎖に変換できれば、生

体内における生理活性ペプチドとして最も期待でき、それぞれの翻訳後修飾に対してのミミック (模倣) アミノ酸の構築が試みられている。本稿では異常アミノ酸ユニットの化学合成と異常アミノ酸のペプチドへの導入例について紹介したい。

リン酸化アミノ酸

最もよく知られたタンパクの機能調節は、セリン、スレオニン、チロシン残基のプロテインキナーゼによるリン酸化である。リン酸エステルはプロテインホスファターゼにより加水分解を受け、未修飾体に戻るが、これをホスホン酸誘導体に変えると加水分解は起こりえない。ホスホン酸型アミノ酸はタンパクの動的側面を押さえるツールとなることが期待され、メチレン基置換ミミックが次々と登場した。メチレン基置換によりリン酸基の酸解離定数が変化するため、その後、フッ素によりpKa調節を施した化合物が合成された (Fig. 2)。チロシンCF₂ミミックインヒビターはチロシンホスファターゼ (PTP1B) に対する阻害活性がCH₂ミミックの2000倍となり生理活性に明らかな改善が認められている。¹⁾ 特筆すべきは、東元らがこのセリンCF₂ミミックを用いることにより、天然ペプチドではホスファターゼの影響を受けて作成し難い癌抑制タンパク p53 のSer⁶リン酸化体の抗体を得ていることである。²⁾ もっとも天然に近いpKaをもつのはCHFアナログであると期待されているが、CHFの立体化学が生理活性に驚くべき差を示した例が

Post-translational Modification of Amino Acid Residues



Non-coded Amino Acids



Fig. 1. Selected structures of post-translational amino acid residues and non-coded amino acids.

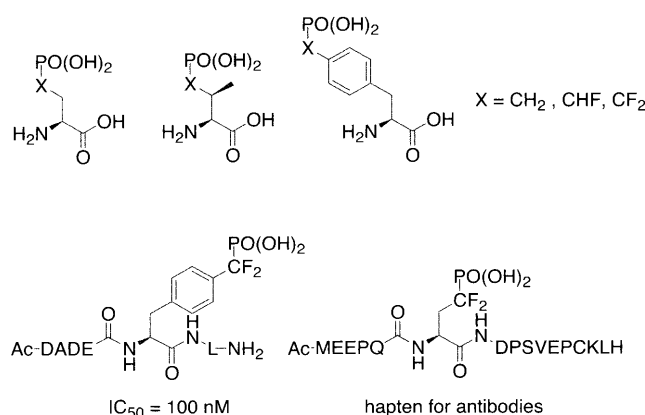


Fig. 2. Phospho-serine, threonine, and tyrosine mimics and their peptides.

* 著者紹介 (代表) 佐賀大学理工学部機能物質化学科 (助教授) 〒840-8502 佐賀市本庄町1番地
TEL. 0952-28-8562 FAX. 0952-28-8548 E-mail: hiroaki@cc.saga-u.ac.jp

グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) 阻害活性で報告され、タンパク質のリン酸基認識がpKaという物理量のみではなく、極性置換基のベクトルも重要な因子であると指摘された。³⁾ 今後、一連のホスホン酸化合物の利用が多くの調節機構解明に利用されることを願って止まないが、合成過程が煩雑であることからより簡便な合成法が望ましい。我々はこの点においてペプチド合成にたやすく供給できるルートの構築を目指し、ホスホン酸ミミックの求電子置換フッ素化を利用した合成ルートを構築しつつある。

アセチル化リジン

アミド結合の非加水分解モデルとしてフッ化ビニル基が提案され、ペプチド結合のミミックとして同等に機能することがサブスタンスPの類縁体において示された。⁴⁾ 以来、ペプチドミメティクスの骨格として用いる多くの試みがなされている。ヒストンタンパクのアセチラーゼ-デアセチラーゼによるリジン側鎖のアセチル化が転写制御に関わっていることが古くから知られているが、近年ヒストンのみならず、種々のタンパク質でアセチル化がリン酸化と同様に重要な役割を果たしているとの認識が深まっている。⁵⁾ 我々は同様な観点からアミド結合の代わりにフッ化ビニル基をミミックとして用いたアセチルリジンミミック分子 (Afn) を合成した (Fig. 3)。合成段階数の多さからペプチドへの導入の課程にやや難があるため生理活性ペプチドにおいての有効性については今後さらなる検討が必要である。

メチオニンスルホキシド

タンパクのメチオニン残基 (Met) は老化・疾患による生理学的条件下でメチオニンスルホキシドへ酸化される。またこの酸化はシグナル伝達にかかわる可逆的な翻訳後修飾でもあるとも言われている。⁶⁾ メチオニンスル

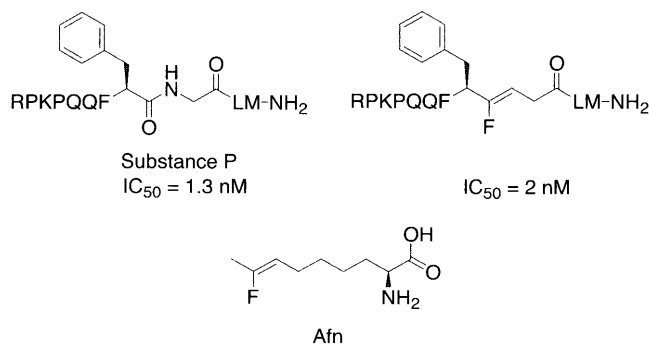


Fig. 3. Fluorovinyl group as an amide surrogate.

ホキシド還元酵素 (MSRA) により再びメチオニンへと修復されるが、MSRAの遺伝子発現がハエの寿命を左右したとの報告もあり、老化に関する知見としてはきわめて興味深い。⁷⁾ メチオニンが酸化されることなくその機能を維持できるならば、耐久性を持つペプチドの構築が可能である。CF₂基は先のリン酸化ミミックで酸素イソスターとして見なされているが、むしろサイズはイオウに近く、MetのイオウをCF₂基で置換したアナログは、生理学的条件下で酸化を受けないMetミミックとして機能すると期待できる。我々は独自の手法で光学活性 F₂Nleの合成を行い、Metを含む走化性ペプチドfMLPのMet残基を置換したペプチドアナログを合成した。ヒト好中球の遊走活性と活性酸素放出を評価したところ、置換アナログはfMLPとほぼ同等の活性を示し、Metミミックとして機能することが示された (Fig. 4)。Metをノルロイシンで置換したアナログは同等の活性を維持できていない。この事例だけで一概に評価することはできないが、酸化を受けやすいイオウ原子をもつ生理活性物質のCF₂置換アナログの挙動は興味深い。

AibとPeptaibol

視点を変え生物種を超えたアミノ酸ユニットを考えると、植物や真菌類には250を超える非標準アミノ酸が存在する。これらのアミノ酸は非リボソーム系合成でペプチドに導入される。これらの中でAibやAcc (Fig. 1)を例とする α, α -ジアルキルアミノ酸は真菌類の産生するpeptaibolや果実ホルモンの成分として知られている。このような異なる生物種のアミノ酸ユニットの利用は興味深い。

Aibは2つのメチル基の影響で、ペプチド骨格の構造が制約され、ヘリックス構造を誘導しやすい性質がある。⁸⁾

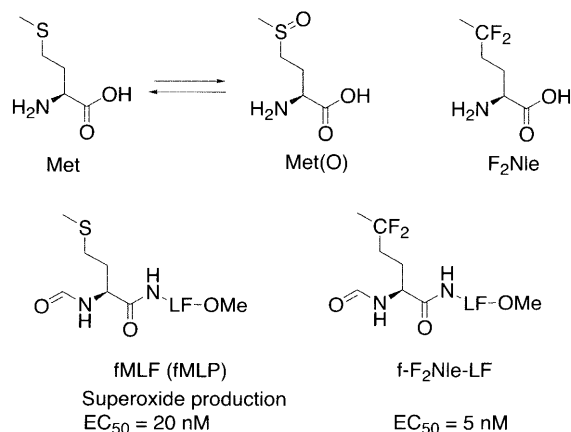


Fig. 4. Methionine mimic F₂Nle and its peptide.

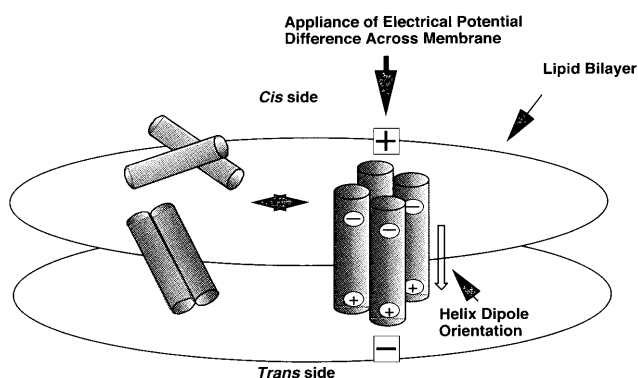


Fig. 5. Scheme of a possible dynamic model for the interaction of BKBA-20 with lipid bilayers.

Aib ペプチドの研究は、もっぱら Aib の構造特性を反映したペプチドを期待したもので、種々の生理活性ペプチドの構造固定や酵素耐性誘導体を中心である。これらはペプチド構造のうち数個のアミノ酸を Aib に変換したもので、一般に母体ペプチドの性質を決める重要な残基は置換されない。Aib を中心とするペプチド研究としては Peptaibol 類とそれらの抗菌活性、イオンチャンネル形成であろう。Peptaibol は種々の微生物が産生する 10 ～ 20 残基のペプチドで、C 末端にアミノアルコールをもつ。Peptaibol 類はリン脂質膜上でヘリックス構造をとる分子が数個束となりイオンを通すポアを形成する (Fig. 5)。

イオンの選択性やゲートの開閉制御といったチャンネルに必須の機能因子については未だ解明されていない。Peptaibol の代表アラメチシンは最初環状構造と考えられていた。合成的研究から、アラメチシンが直鎖状ペプチド (Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol) であることが明らかとされ、Peptaibol 類研究の第一期を迎えた。しかし、Peptaibol 中で Aib は活性中心などとして働くものでなく、さらに Aib ペプチド合成が容易でなかったため、Peptaibol の Aib を Leu などの疎水性の高いアミノ酸に置換したアナログ研究に移行した。これらのいくつかはチャンネルペプチドとして機能したが、Peptaibol 本来の機能ではなかった。

Aib ペプチドの合成

最初の Aib ペプチド合成は 1960 年に発表されたが、1995 年まで Peptaibol の合成は、Gisin らなどによる液相法が主体であった。近年、Carpino らの酸フッ素化物法や新しい縮合剤、Morten らのアジド酸法が報告され、Aib

含有ペプチドやアラメチシンの固相合成が可能となり、Peptaibol の固相合成への道が開かれた。我々はイオンチャンネル活性の構造要因の解明を目的として、グラミシジンアナログの液相合成による研究を行っていたが、Aib を含むペプチドを得る合成法の検討を行い、イオンチャンネルモデルペプチド研究を開始した。

アラメチシンタイプのモデルペプチドは、まず膜を貫通し整列できるペプチド分子の設計が必要である。Peptaibol 類の配列を参考に Aib 残基を 1 残基おきに配置、さらにペプチドの水溶性を保つために、電荷を持つアミノ酸を導入した。さらにヘリックスバンドルの鎖長依存性を検討するため、このテトラペプチドを 1 ～ 5 回繰り返したモデル Ac-(Aib-Xxx-Aib-Ala)_n-NH₂ (n=1-5; BXBA-N) を合成した。⁹⁾

Aib ペプチドのイオンチャンネル形成

BXBA ペプチドのチャンネル活性を、合成脂質膜上で測定した。BKBA の鎖長依存性について検討した結果、ペプチド鎖長が長くなるに従い、安定なチャンネルが観測された (Fig. 6)。

その時のコンダクタンスも鎖長に依存して大きくなった。また、チャンネルは、20 残基のペプチドで、ほぼ 100% の頻度でチャンネルが観測され、そのパターンは単一の状態 (single state) であった。これに対して、16 残基のものは 10 回中 6 回、12 残基のものは 10 回中 3 回程度と、鎖長が短くなるにつれて、チャンネルの観測頻度は低下した。これらのことから、膜貫通には 16 残基では不十分だが、20 残基になるとより安定にシングル

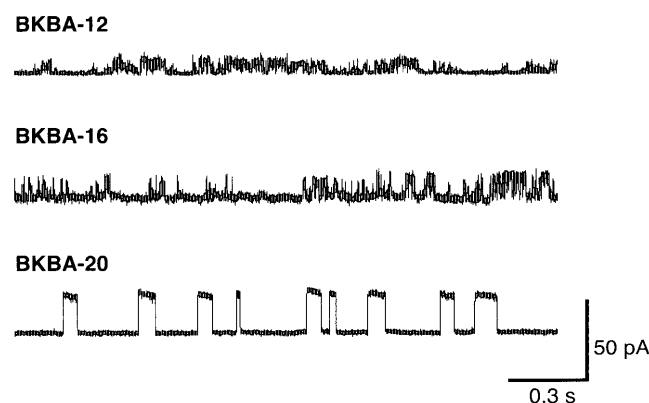


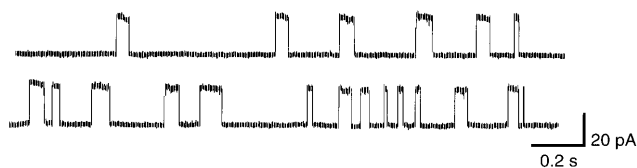
Fig. 6. Conductance patterns of BKBA-12, 16 and 20 in DPhPC. Electrolyte solution was 0.5 M KCl buffered with HEPES at pH 7.4. The electrolyte composition was symmetrical for both sides of the membrane, and peptide concentrations were at 100 nM. The applied membrane potential was +100 mV.

ステートのチャンネルを形成することが示唆された。さらに膜の反対方向から電圧をかけると、不安定なチャンネルパターンになったことから、このチャンネルペプチドには整流機能らしきものがあることが判った。一方、電荷を持つアミノ酸として、Arg や Glu を導入したペプチドは、同一条件で複雑なチャンネルパターンを与えた。¹⁰⁾ 測定膜上で複数のチャンネルポアが開いた様子はないことから、特に Glu をもつペプチドはアラメチン同様にチャンネル形成に参加するペプチド分子の数がさまざまに変化していると考えられた。さらに Peptaibol 中の Aib 残基の役割を調べるため、Aib ペプチド BKBA-20 と Ala を母体にしたペプチド Ac-(Ala-Lys-Ala-Ala)₅-NH₂ (AKAA-20) との比較を行った。その結果、BKBA-20 は低濃度、低電圧で安定なチャンネルを示したのに対し、AKAA-20 は同一の条件下で安定なチャンネルは観測されなかった (Fig. 7)。

さらに Aib 残基の役割を検討するため、BKBA-20 の繰り返し Aib 残基をそれぞれ Ala に置換した、Ac-(Aib-Lys-Ala-Ala)₅-NH₂ と Ac-(Ala-Lys-Ala-Ala)₅-NH₂ を調べたところ両者は類似の構造をとるものの、イオンチャンネル形成能に著しい違いを示した。¹¹⁾ これまで Aib は構造保持のため交互に配置されていると考えられていたが、繰り返しの Aib の役割には違いのあることが判明した。さらに、両者の酵素耐性と抗菌活性にも興味ある違いが見られ、Peptaibol の単純な構造の意味が少しずつ理解されるようになってきた。¹²⁾

Peptaibol の会合制御に関し、タンパク質の機能ドメインを利用した二本木の研究を始め、よりダイナミックで多機能なペプチドを目指した研究が行われている。¹³⁾ 標準アミノ酸の 20 種を超えたペプチドの合成と機能解析の繰り返しにより、天然ペプチド中の異常アミノ酸の存在意義を理解するとともに、天然ペプチドを超えた新たな生理活性機能の創出に寄与できるものと期待される。

BKBA-20 (100 nM, +100 mV)



AKAA-20 (100 nM, +100 mV)

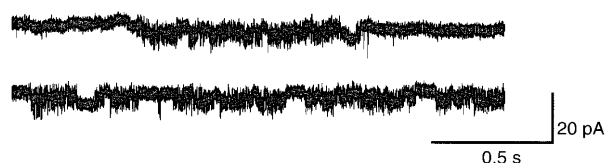


Fig. 7. Conductance patterns of BKBA-20 and AKAA-20 in DPhPC. Electrolyte solution was 0.5 M KCl buffered with Hepes at pH 7.4. The electrolyte composition was symmetrical for both sides of the membrane, and peptide concentrations were at 100 nM. The applied membrane potential was +100 mV.

文 献

- 1) Burke, T. R. Jr. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 129 (1994).
- 2) Higashimoto, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **275**, 23199 (2000).
- 3) Berkowitz, D. B. and Bose, M.: *J. Fluorine Chem.*, **112**, 13 (2001).
- 4) Allmendinger, T. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **31**, 7301 (1990).
- 5) Kouzaride, T.: *EMBO J.*, **19**, 1176 (2000).
- 6) Hoshi, T. and Heinemann, S. H.: *J. Physiol.*, **531**, 1 (2002).
- 7) Ruan, H. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **99**, 2748 (2002).
- 8) 田中正一：有機合成化学協会誌, **60**, 35 (2002).
- 9) Higashimoto, Y. *et al.*: *J. Biochem.*, **125**, 705 (1999).
- 10) Hara, T. *et al.*: *J. Biochem.*, **130**, 749 (2001).
- 11) Yamaguchi, H. *et al.*: *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **75**, 1563 (2002).
- 12) Yamaguchi, H. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.* (2003). in press.
- 13) Futaki, S. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12127 (2001).