

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 分子構造化学研究室
職・氏名 助教・加藤 巧馬

研究テーマ：

非天然型アミノ酸を用いた膜透過性ペプチドの創製

研究期間：

2018 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 加藤 巧馬 (大阪薬科大学・薬学部・助教)

研究分担者 土井 光暢 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

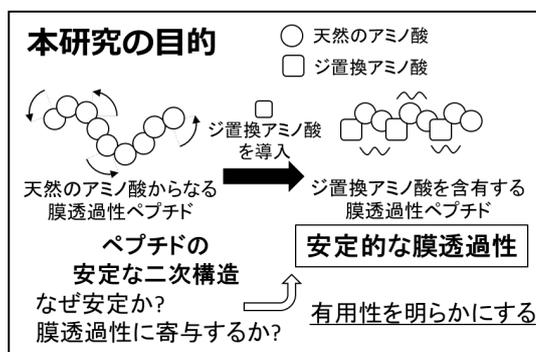
<共同研究機関>

研究代表者 田中 正一 (長崎大学・薬学部・教授)

研究分担者 大庭 誠 (長崎大学・薬学部・准教授→京都府立医科大学・医学部・教授)

研究目的：

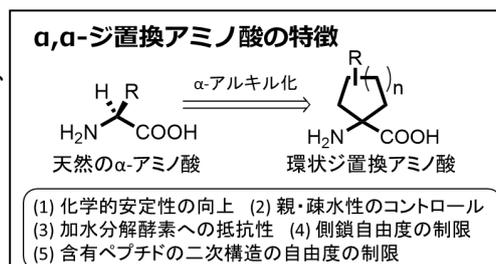
α,α -ジ置換アミノ酸は、天然の L- α -アミノ酸の α 位水素をアルキル基に置換した非蛋白質構成アミノ酸であり、ペプチド中に含有することでその二次構造制御、特にヘリックス構造の形成に影響を与えることが知られている。しかしながら、自然界に存在するジ置換アミノ酸は少なく、ジ置換アミノ酸がペプチド二次構造やその機能に与える影響についての検討が十分に行われていたとは言えない。本研究では膜透過性ペプチドにジ置換アミノ酸を含有させることで、ペプチド二次構造の観点からジ置換アミノ酸の有用性を明らかにすることを目的として研究を行った。



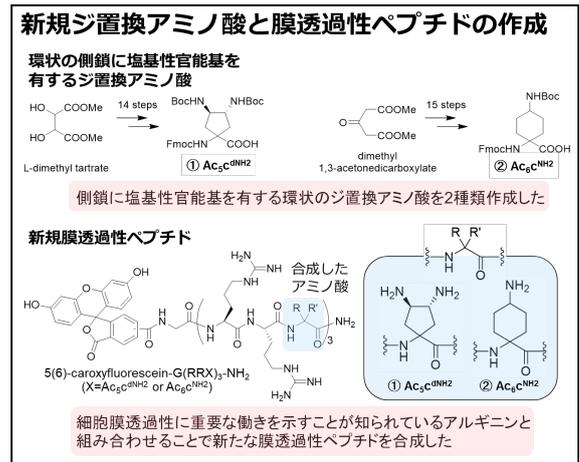
研究内容および研究成果：

1. 新規ジ置換アミノ酸の設計・合成とそれらを含む細胞膜透過性ペプチドの開発

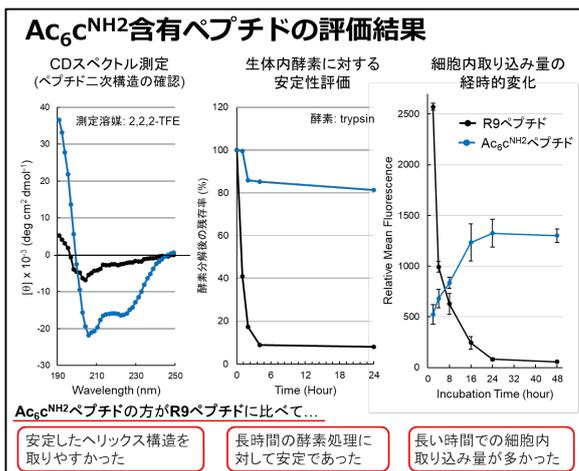
これまでの研究より、側鎖に環状構造を有するジ置換アミノ酸が高い膜透過性を有することを明らかにしているが、これらのアミノ酸の有用性を明らかにするためにはより多様な構造のジ置換アミノ酸に関するデータが必要であると考えた。そこで、側鎖の環構造を変化させた新たなジ置換アミノ酸を設計し、これらを合成することにした。



L-酒石酸ジメチルエステルを出発原料として、有機合成反応による 14 段階の反応工程を経て、右図の①に相当する側鎖に 2 つの塩基性官能基を有する五員環状ジ置換アミノ酸(**Ac_{5c}^dNH₂**)と、1,3-アセトンジカルボン酸ジメチルを出発原料として、有機合成反応による 15 段階の反応工程を経て、右図の②に相当する側鎖に 1 つの塩基性官能基を有する六員環状ジ置換アミノ酸(**Ac_{6c}^dNH₂**)を、それぞれ合成した。これらのジ置換アミノ酸を、膜透過性ペプチドの構成アミノ酸として比較的良好に利用されているアルギニンと組み合わせることで、新しい細胞膜透過性ペプチドを固相合成法により合成した。これまでの研究期間で主に研究を進めているのは **Ac_{6c}^dNH₂** を含有する膜透過性ペプチドであり、ペプチド二次構造などの物理学的な性質を調べると共に、細胞膜透過量、細胞毒性、生体内酵素に対する安定性、膜透過経路などの性質について、以前に報告しているジ置換アミノ酸を含有する膜透過性ペプチドや天然のアミノ酸のみからなる膜透過性ペプチドとの比較を行いながら調査した。



右の図では成果を分かりやすく示すために、実験結果の一部を抜粋する形で、**Ac_{6c}^dNH₂** を含有するペプチド(**Ac_{6c}^dNH₂** ペプチド)と天然のアミノ酸のみからなる膜透過性ペプチド(**R9** ペプチド)の結果のみを示している。**Ac_{6c}^dNH₂** ペプチドは、**R9** ペプチドに比べて、ペプチド二次構造においては安定したヘリックス構造を取りやすいという傾向があり、また生体内酵素の一種であるトリプシンによる酵素処理に対する安定性も向上していることが明らかになった。また、細胞膜透過性については、細胞との接触時間が長くなるにつれて継続的に細胞内へ取り込まれるという、天然のアミノ酸のみからなる膜透過性ペプチドには見られない性質を有することが明らかになった。細胞内へ取り込まれる経路についてもジ置換アミノ酸の有無による違いが示唆される結果が得られているが、詳細についてはさらなる調査が必要である。

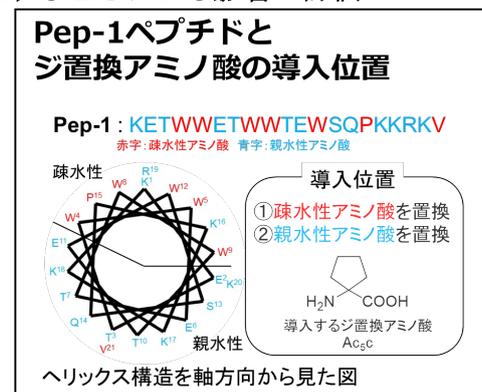


本研究の目的を達成するためには、継続して実験を進める必要があると考える。

2. 既存の膜透過性ペプチド配列中へジ置換アミノ酸を導入することによる影響の評価

ジ置換アミノ酸を用いることで膜透過性ペプチドにどのような影響を与えられるか調査するために、既存の膜透過性ペプチド配列中にジ置換アミノ酸を導入した改変型の膜透過性ペプチドを合成することとした。こちらの実験では、市販のジ置換アミノ酸を用いて、まずはどのような影響を与えることができるかスクリーニングをするという目的で行っている。

その中でも **Pep-1 (KETWWETWWTESQPKKRKY)** という既存の膜透過性ペプチドをモデルとした配列中にジ置換アミノ酸を導入した場合に興味深い結果を得ることができた。



ジ置換アミノ酸は、市販されている 1-アミノシクロペンタンカルボン酸 (Ac₅c) という、側鎖が五員環状になっているものを用い、その導入位置は①疎水性アミノ酸からジ置換アミノ酸への置換、②親水性アミノ酸からジ置換アミノ酸への置換、という大きく分けて二つのテーマで行った。Pep-1 は二次構造として、親水性のアミノ酸と疎水性のアミノ酸がそれぞれ同じような面に集中する両親媒性ヘリックス構造と呼ばれる二次構造を取ることが知られている。

今回用いた Ac₅c は疎水性のアミノ酸であるため、②のテーマに沿ってアミノ酸を置換した場合、疎水性アミノ酸の数が増えることになる。種々作成したジ置換アミノ酸置換ペプチドの中でも、Pep-1 配列のグルタミン酸(E)を置換したペプチド(ペプチド 1)を用いて膜透過性などを評価したところ興味深い結果を得ることができたので、その結果を右の図に示す。ペプチドの二次構造はジ置換アミノ酸の有無で大きく変化することはなかったが、トリプシンによる酵素処理に対する安定性が向上していることが明らかになった。また、ペプチド 1 は 2, 4, 24 時間の全ての接触時間において、ジ置換アミノ酸を導入していないモデルペプチドに比べて高い膜透過性を有していることが明らかになった。膜透過性を確認しているペプチド濃度においては目立った細胞毒性も確認されていないことから、この高い膜透過性を用いて細胞内への薬物やタンパク質のデリバリーなどに応用することも可能ではないかと考えられる。

ジ置換アミノ酸を既存の膜透過性ペプチド配列中に導入することの有用性について示すことができたと考えるが、今後もこのテーマの内容を発展させることでより有用なデータを得られるように引き続き研究を進める予定である。

成果発表：

<学会発表>

・ Design and Synthesis of Cyclic Disubstituted Amino Acids for Development of Cell Penetrating Peptide, T. Kato, A. Asano, M. Oba, M. Tanaka, M. Doi, 10th International Peptide Symposium, 2018 年 12 月 4 日

・ Cell permeability evaluation of helical cell penetrating peptides using cyclic disubstituted amino acids having basic functional groups, T. Kato, J. Yasukiyo, Y. Kita, K. Iwanari, A. Asano, M. Oba, M. Tanaka, M. Doi, 第 56 回ペプチド討論会、2019 年 10 月 24 日

・ Pep-1 ペプチド配列をモデルとしたジ置換アミノ酸含有膜透過性ペプチドの開発、加藤 巧馬、中町 瑞穂子、浅野 晶子、土井 光暢、日本薬学会第 140 年会、2020 年 3 月 26 日

