

## 刺激応答型アミノ酸の開発とケミカルバイオロジー分野への展開

重永 章

## Development of Stimulus-responsive Amino Acids and Their Application to Chemical Biology Use

Akira Shigenaga

*Institute of Health Biosciences and Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima; 1-78-1 Shomachi, Tokushima 770-8505, Japan.*

(Received May 25, 2012)

An understanding of the physiological significance of peptides and proteins is indispensable in the fields of life sciences and drug development. Recently, methods for controlling peptide and protein activities using stimuli such as UV irradiation have been attracting much attention because of their potential for clarifying the physiological roles of the peptides/proteins. In this context, we have developed a stimulus-responsive amino acid that induces peptide-bond cleavage after exposure to a stimulus. Although it has previously been reported that stimulus-responsive units can respond to a specific stimulus, our stimulus-responsive amino acid is potentially applicable to any stimulus simply by changing the protective group. In this review, the design and synthesis of stimulus-responsive amino acids are described. Their applications in chemical biology, including their use for spatiotemporal control of the activity of peptides in living cells, are also reported.

**Key words**—peptide bond cleavage; stimulus-responsive amino acid; trimethyl lock

## 1. はじめに

ペプチドやタンパク質の機能解明研究において、その活性を外部から制御する方法論が求められている。<sup>1-5)</sup> 特に外部刺激によるペプチド・タンパク質の主鎖切断は活性の劇的変化が期待できることから、近年、盛んに研究が行われている。<sup>6-17)</sup> これら手法では、刺激にตอบสนองして主鎖切断を誘起する部位をペプチド・タンパク質中へ導入し、ここへ刺激を与えることによりその不活性化若しくは活性化を行う (Fig. 1)。その後、刺激前後での表現型変化などを比較することにより、対象とするペプチド・タンパク質の機能を解明する。これまでに開発された刺激応答部位は、特定の刺激にだけ応答するよう設計されている。このため、当然ながら他の刺激に応用することはできない。つまり新しい刺激にตอบสนองするペプチド・タンパク質を調製しようとする場合、

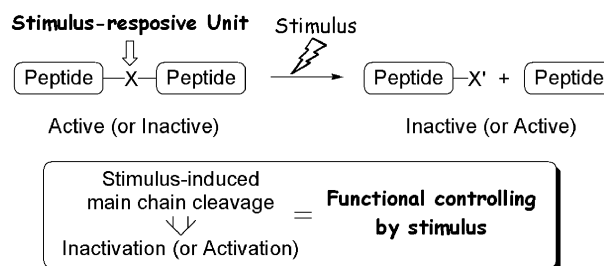


Fig. 1. Concept of Stimulus-responsive Control of Peptidyl Function

刺激応答部位を一から設計・合成しなおす必要があった。これに対し筆者らは、保護基を置換するのみで様々な刺激にตอบสนอง可能な人工アミノ酸、すなわち刺激応答型アミノ酸を開発し、これを基盤としたペプチド・タンパク質機能制御法の開発を行うこととした。本総説では、筆者らの開発した刺激応答型アミノ酸の分子設計・合成及びケミカルバイオロジー分野への展開などについて紹介する。

## 2. 刺激応答型アミノ酸の分子設計と合成

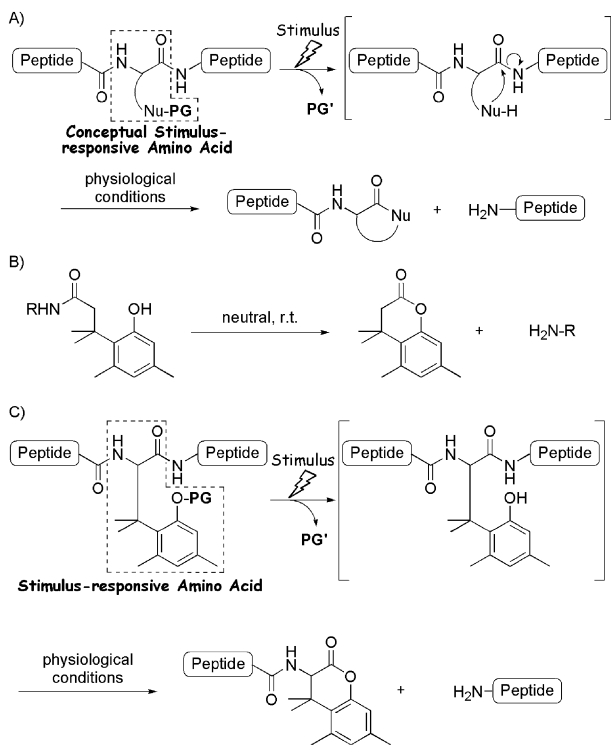
**2-1. 分子設計** 刺激応答型アミノ酸の概念図を Scheme 1(A)に示す。Scheme 中の Nu は求核性

The author declares no conflict of interest.

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 (薬学系) (〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1)

e-mail: ashige@ph.tokushima-u.ac.jp

本総説は、平成 23 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。



Scheme 1.

A) Concept of stimulus-responsive amino acid that can potentially respond to any stimuli. B) Trimethyl lock system. C) Design of stimulus-responsive amino acid. PG: protective group removable by stimulus.

官能基を，PG は刺激により除去可能な保護基を表す。刺激応答型アミノ酸を含むペプチドへ対応する刺激を与えると，まず PG 部分が除去される。この結果生じる Nu 基が近傍のペプチド結合を分子内求核攻撃すれば，ペプチド結合の切断が誘起されるという設計である。本アミノ酸は基本骨格を変更することなく，PG 部分を置換するのみで種々の刺激に応答可能となる。刺激応答型アミノ酸を含むペプチドは生体内や細胞中での使用を想定していることから，ペプチド結合切断は生理的条件下で進行する必要がある。温和な条件下において進行する非酵素的アミド結合切断反応はあまり報告例がないものの，稀有な例の1つとしてトリメチルロックが挙げられる [Scheme 1(B)].<sup>18,19)</sup> この化合物は，メチル基間の立体障害を解消するため容易にラクトン化し，温和な条件下においてもアミド結合の切断を誘起する。そこで筆者らは，トリメチルロックを基盤とした刺激応答型アミノ酸を設計した [Scheme 1(C)]. 刺激応答型アミノ酸はフェノール性水酸基上に，任意の刺激により除去可能な保護基 (PG) を有する。この PG 部分が刺激により除去されると生理的条件

下トリメチルロック部位のラクトン化反応が進行し，ペプチド結合が切断される設計である。次節では刺激応答型アミノ酸の合成とペプチドへの導入について説明する。

## 2-2. 紫外線応答型アミノ酸の合成とペプチドへの導入

筆者らは刺激応答型アミノ酸の一例として，紫外線応答型アミノ酸誘導体 **6** を合成することとした (Scheme 2).<sup>20)</sup> まず文献既知のアルデヒド **1**<sup>21)</sup> のカルボニル基  $\alpha$  位へヒドラジン部位を導入した後アルデヒドを還元し，生じたアルコールを TBS 基で保護することで **2** を得た。続いて N-N 結合を還元的に切断した後，接触還元によりベンジル基を除去し，種々の刺激応答型アミノ酸の共通中間体となるフェノール **3** とした。次に紫外線照射により除去可能な保護基として *o*-ニトロベンジル基を導入して **4** とした後シリル基を除去し，生じた水酸基を順次酸化することによりアミノ酸 **5** へ誘導した。この実験では Fmoc 固相合成法への適用を念頭に置き，アミノ基の保護基を Boc 基から Fmoc 基へと置換することで紫外線応答型アミノ酸誘導体 **6** を合成することに成功した。続いて Fmoc 法によるペプチドへの導入について検討したところ，高純度にて紫外線応答型モデルペプチド **7** を得ることができた。なお最初の論文ではラセミ体アミノ酸の合成について報告したが，ヒドラジン部位導入の際に不斉有機触媒を用いることで不斉合成が可能であることも既に報告している (Scheme 3).<sup>22)</sup>

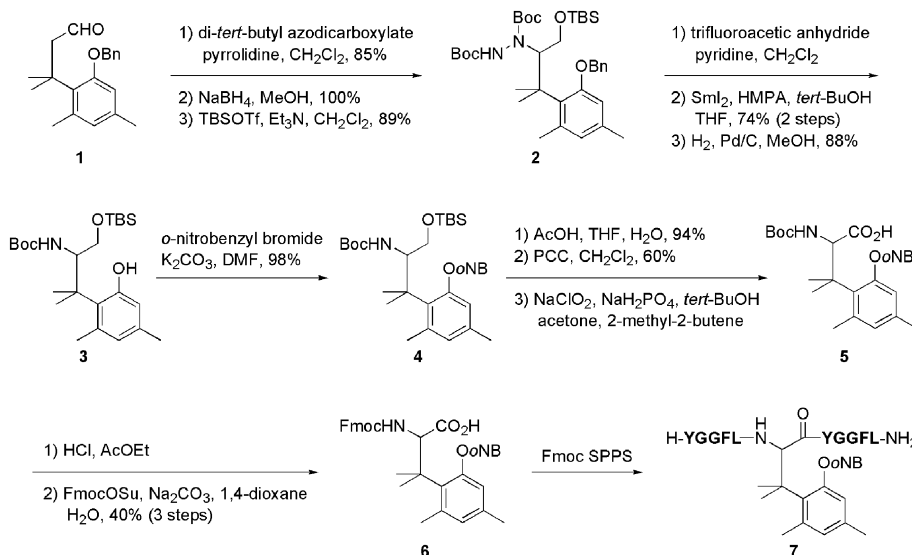
## 2-3. 紫外線応答性の検証

続いて紫外線応答型アミノ酸の紫外線応答性について検討することとした (Scheme 4).<sup>20)</sup> 紫外線応答型アミノ酸を含むモデルペプチド **7** へ紫外線照射した後，中性条件下，37°C にてインキュベートした。反応を HPLC にて追跡したところ，紫外線照射直後に *o*-ニトロベンジル基の除去された中間体 **9** が生じた後，2 時間以内にペプチド結合切断反応が完了し，設計通り切断

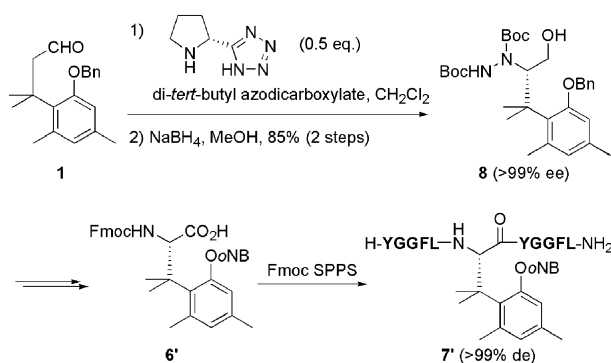


重永 章

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教。博士 (薬学)。2004 年徳島大学大学院薬学研究科博士後期課程修了，同年スクリプス研究所化学科博士研究員，'05 年徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教務員を経て '07 年より現職。専門：有機合成化学，ペプチド・タンパク質化学，ケミカルバイオロジー。

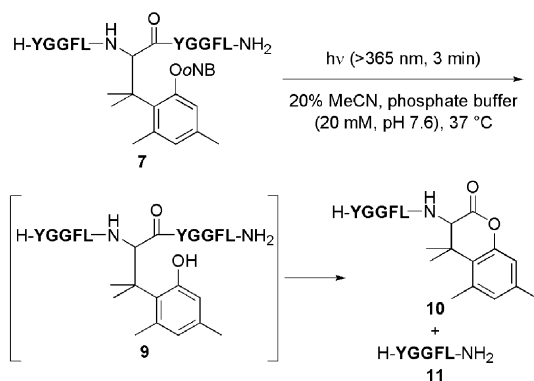


Scheme 2. Synthesis of UV-responsive Amino Acid Derivative **6** and Its Incorporation into Model Peptide **7**  
 oNB: *o*-nitrobenzyl; SPPS: solid phase peptide synthesis; F: phenylalanine; G: glycine; L: leucine; Y: tyrosine.



Scheme 3. Asymmetric Synthesis of UV-responsive Amino Acid and Its Incorporation into Model Peptide

oNB: *o*-nitrobenzyl; SPPS: solid phase peptide synthesis; F: phenylalanine; G: glycine; L: leucine; Y: tyrosine.



Scheme 4. UV-induced Peptide Bond Cleavage of Peptide **7**  
 oNB: *o*-nitrobenzyl; F: phenylalanine; G: glycine; L: leucine; Y: tyrosine.

成績体 **10** 及び **11** を高純度にて生成することが明らかとなった (Fig. 2). なおペプチド **7**, **9** 及び **10** に対応するピークがそれぞれ 2 本ずつ検出されているのは、ラセミ体紫外線応答型アミノ酸由来のジアステレオマー混合物を基質 **7** として用いたためである。

以上の結果から、筆者らの開発した刺激応答型アミノ酸は設計通り、フェノール性水酸基の脱保護をトリガーとしてペプチド結合切断反応を誘起することが証明された。続いて、ペプチド結合切断反応の速度論的検討を行うこととした。

**2.4. ペプチド結合切断反応の速度論的検討** 刺激応答型アミノ酸によるペプチド結合切断反応速度にアミノ酸配列が与える影響を評価するため、

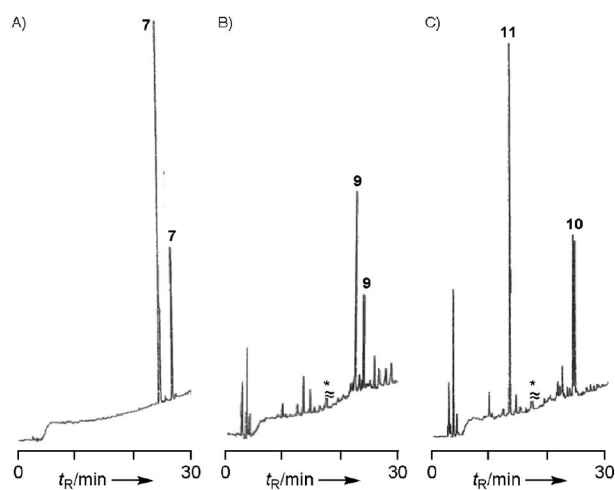
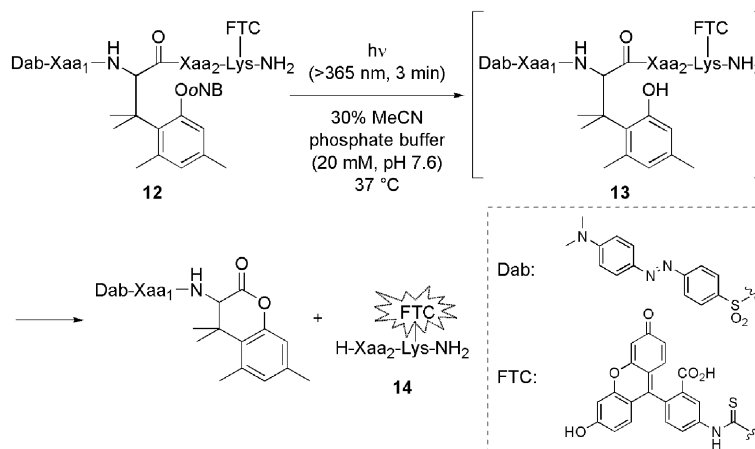


Fig. 2. HPLC Profiles

A) Before UV irradiation. B) After 3 min of UV irradiation. C) After 3 min of UV irradiation followed by 2 h of incubation at 37 °C. \*Non-peptidic peak.



Scheme 5. FRET-based Kinetics Study of Peptide Bond Cleavage  
oNB: *o*-nitrobenzyl.

FRET (fluorescence resonance energy transfer : 蛍光共鳴エネルギー移動) を利用した系を構築した (Scheme 5).<sup>23)</sup> すなわち, まず基質 **12** に紫外線照射をして中間体 **13** を生成させる. 基質 **12** 及び中間体 **13** は分子内に消光部位 (Dab) を有するため, 蛍光部位 (FTC) を励起しても FRET により消光される. しかしペプチド結合切断により生じる **14** は消光部位を持たないため, 蛍光を発する. すなわち逐次蛍光を測定することにより, ペプチド結合切断反応が簡便かつリアルタイムに追跡可能となる.

まず **12** ( $\text{Xaa}_1 = \text{Gly}$ ,  $\text{Xaa}_2 = \text{Tyr}$ ) のペプチド結合切断反応を蛍光測定及び HPLC にて追跡したところ両者の結果が一致したことから, 蛍光測定による反応追跡が可能であることが示された. さらに本反応は擬一次反応であったことから, アミノ酸配列が反応速度に与える影響は半減期の比較により評価することとした. まず  $\text{Xaa}_2$  の影響について比較するため  $\text{Xaa}_1$  をグリシンに固定し,  $\text{Xaa}_2$  へ種々のアミノ酸を導入した基質について実験を行った (Fig. 3). この結果,  $\text{Xaa}_2$  へ立体的に小さい若しくは極性の高いアミノ酸を導入した場合, 半減期が短くなることが明らかとなった. 続いて  $\text{Xaa}_1$  の影響について評価したところ,  $\text{Xaa}_1$  が立体的に小さい場合に半減期が短くなるものの, 極性の影響は  $\text{Xaa}_2$  ほど受けないことが明らかとなった. これら結果は, 刺激応答型アミノ酸前後の配列を適切に選択することにより, 用途に応じてペプチド結合切断速度が調節可能であることを意味している.

#### 2-5. その他の刺激応答型アミノ酸への展開

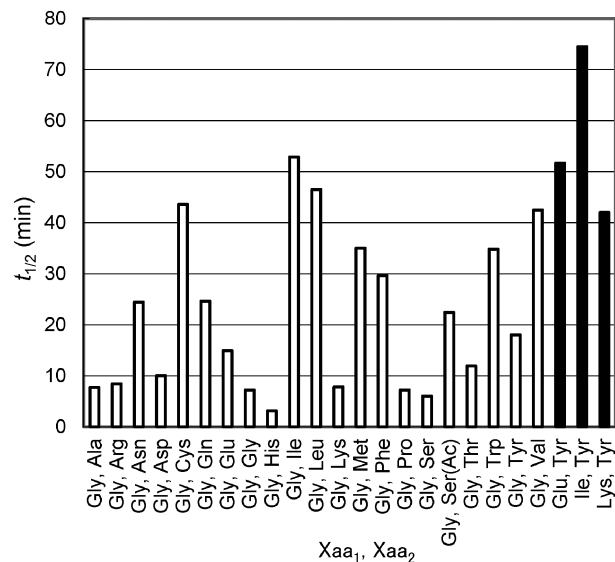


Fig. 3. Half-lives of Peptide 13  
Ser (Ac) : *O*-acetyl serine.

ここまで, 紫外線応答型アミノ酸について述べてきた. 続いて, フェノール性水酸基上の保護基を置換した他の刺激応答型アミノ酸の開発を行った. 詳細については割愛するが, Fig. 4 に示す各種刺激応答型アミノ酸を開発した. すなわち, 紫外線応答型アミノ酸より高度な時空間的制御を可能とする近赤外二光子励起応答型アミノ酸,<sup>24)</sup> 脱リン酸化酵素により間接的にペプチド結合が切断されるホスファターゼ応答型アミノ酸,<sup>20)</sup> 細胞外より細胞内のグルタチオン濃度が高いことを念頭に置いて設計したチオール応答型アミノ酸,<sup>25)</sup> 及びがん悪性化に低酸素環境下のがん細胞が関与することに着目して設計した低

酸素環境応答型アミノ酸の開発に成功した。<sup>26)</sup>

以上の結果から刺激応答型アミノ酸は当初の設計通り、保護基を置換するのみで任意の刺激に応答可能であることが明らかとなった。現在、他の刺激応答型アミノ酸の開発についても種々検討を行っているところである。

### 3. 刺激応答型アミノ酸のケミカルバイオロジー分野への展開

**3-1. ペプチド機能制御法への応用** ケミカルバイオロジー分野において、ペプチドやタンパク質の活性を細胞外部から制御する方法論が求められている。既存の活性制御法は、活性型から不活性型への変換若しくはその逆、つまり“ON→OFF”若しくは“OFF→ON”制御を可能とするものであった (Fig. 1)。これに対し筆者らは、従来困難であったペプチド活性の“ON→ON”制御、すなわち刺激によりある活性を有するペプチドを別の活性を有するペプチドへと変換する方法論を確立することとした。<sup>20)</sup> 分子設計を Scheme 6 に示す。ペプチド **15**

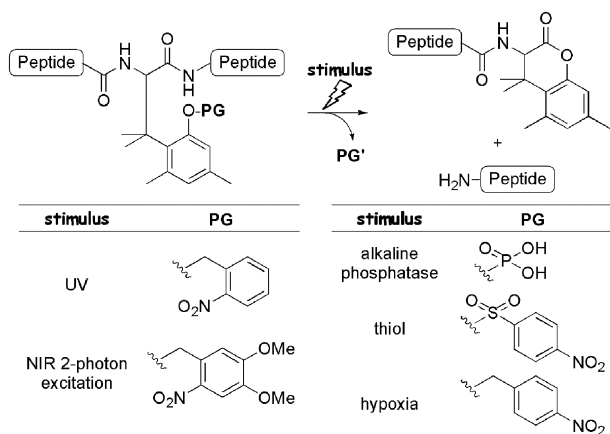
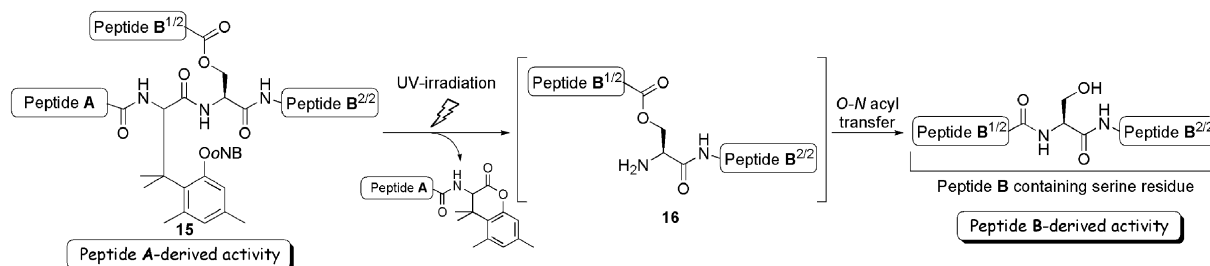


Fig. 4. Stimulus-responsive Amino Acids Developed by Us  
NIR: near infrared.

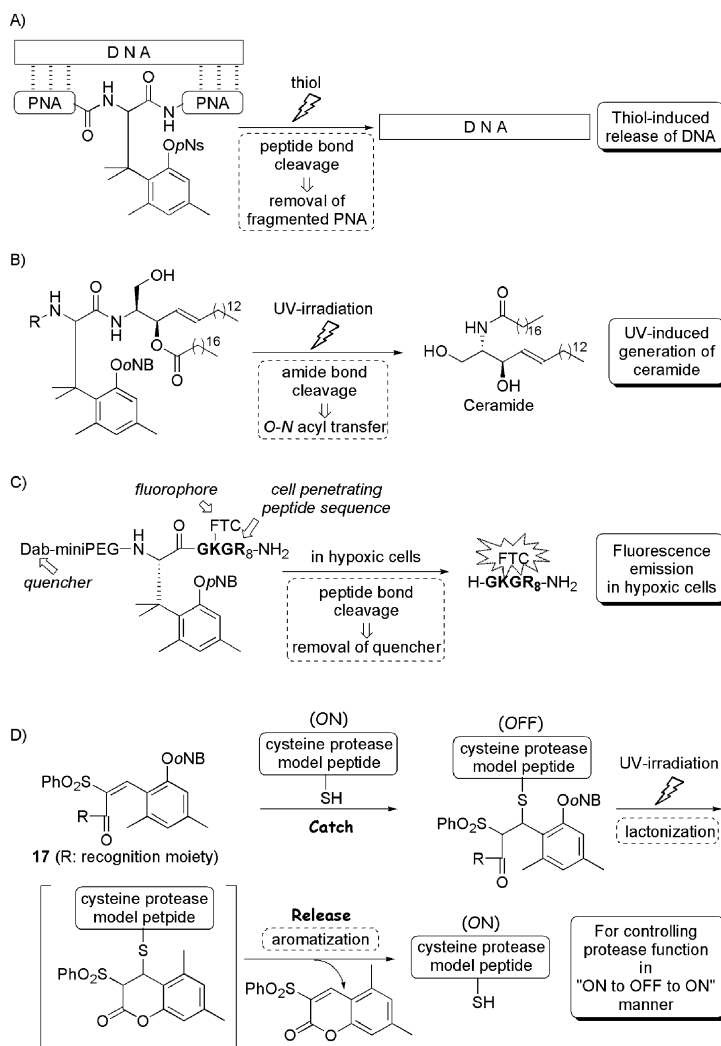


Scheme 6. “ON to ON” Switching System of Peptidyl Function  
oNB: *o*-nitrobenzyl.

は、紫外線応答型アミノ酸の N 末端側に活性型ペプチド **A** を、C 末端側にセリン残基を介したイソペプチド化により失活させたペプチド **B** を有する。このためペプチド **15** は、ペプチド **A** 由来の活性を示す。ここへ紫外線を照射すると、ペプチド結合切断を経てイソペプチド中間体 **16** が生成する。この中間体はクリックペプチド<sup>2)</sup>同様に、直ちに O-N アシル基転移反応を起こし、セリン残基を含む直鎖状活性型ペプチド **B** を生じる。つまり本ペプチドは、紫外線照射をトリガーとした活性の“**A**”から“**B**”への変換、すなわちペプチド活性の“ON→ON”制御を可能にするという設計である。

本設計に基づき、核-細胞質シャトルペプチドを設計した。核-細胞質シャトルペプチドとは細胞への添加によりまず核内へ移行し (活性 **A**)、紫外線照射をトリガーとして細胞質へ再移行する (活性 **B**) ペプチドを意味する。ペプチド **A** として細胞膜透過ペプチド及び核局在化シグナル配列を、ペプチド **B** として核外移行シグナル配列を導入した当該シャトルペプチドを合成し、その細胞内局在について検討した。この結果、シャトルペプチドは設計通りまず核内へ濃縮され、紫外線照射をトリガーとして細胞質へ移行することが明らかとなった。本研究結果は細胞内局在制御のためのツールの開発につながるのみではなく、筆者らの設計したペプチド機能“ON→ON”制御法が生細胞中においても実用可能であることを証明するものである。

**3-2. DNA 送達システムへの応用** 遺伝子治療においては核酸を標的細胞内へ輸送するのみではなく、輸送後に放出する必要がある。筆者らは細胞内グルタチオン濃度が細胞外より高いことに着目し、チオール応答型 DNA 放出システムの開発を行った [Scheme 7(A)].<sup>25)</sup> このシステムではまず、



Scheme 7.

A) Thiol-responsive DNA-releasing system. B) Caged ceramide. C) Hypoxia-responsive fluorophore. D) Catch-and-release system for functional control of thiol protease. Dab: dabsyl; FTC: fluoresceine-4-yl thiourea; miniPEG: 8-amino-3,6-dioxaoctanoyl; oNB: *o*-nitrobenzyl; pNB: *p*-nitrobenzyl; pNs: *p*-nitrobenzenesulfonyl; PNA: peptide nucleic acid; G: glycine; K: lysine; R: arginine.

チオール応答型アミノ酸をペプチド核酸 (PNA) 中へ導入した後、相補的 DNA と結合させる。ここへチオールを加えると、PNA の切断に伴い相補的 DNA が放出されるというシステムである。筆者らは  $T_m$  値の測定から、チオール応答型アミノ酸を含む PNA が相補的 DNA と結合し、チオールの添加により解離することを明らかにした。

**3-3. 小分子機能制御への応用** 刺激応答型アミノ酸が低分子化合物の機能制御へも展開可能であることを示すため、ケージドセラミドの開発を行った [Scheme 7(B)].<sup>27)</sup> ケージドセラミドとは、紫外線照射をトリガーとしてセラミドを生成する前駆体化合物を意味する。ケージドセラミドへ紫外線照射するとシャトルペプチド同様、ペプチド結合の切

断と続く *O-N* アシル基転移反応がおり、セラミドを生成するという設計である。現在までに、ケージドセラミドの合成と紫外線照射によるセラミド生成の確認に成功している。

**3-4. 低酸素環境応答型蛍光プローブへの応用** がんの悪性化には、低酸素環境下のがん細胞が深く関与することが知られている。そこで、低酸素環境下で機能発現するペプチドの一例として、低酸素環境下の細胞中で蛍光を発するペプチドの開発を行った [Scheme 7(C)].<sup>26)</sup> このペプチドは低酸素環境応答型アミノ酸の N 末端側に消光団を、C 末端側に蛍光団及び細胞膜透過ペプチドを有する。このため、非低酸素環境下では FRET により蛍光を発しないものの、低酸素環境下でペプチド結合が切断

されると蛍光を発するようになるという設計である。細胞アッセイの結果、設計通り本ペプチドは低酸素環境下の細胞中で強く蛍光を発することが明らかとなった。

**3-5. タンパク質活性制御法への応用** 刺激応答型アミノ酸は直接的には用いないものの、その基本骨格である刺激応答型トリメチルロック部位を利用したチオールプロテアーゼ活性制御法の開発にも挑戦している [Scheme 7(D)].<sup>28)</sup> 活性制御試薬 **17** はチオールプロテアーゼに認識される部位 (R) と共役付加受容体を有する。このため R 部分を認識するプロテアーゼへ本試薬を加えると、活性中心のチオールがアルキル化されて活性が“OFF”となる。ここへ紫外線を照射すると、*o*-ニトロベンジル基の除去を経たラクトン化に続き、 $\beta$ -脱離が進行する。この結果、再び活性型チオールプロテアーゼが放出される。すなわち本試薬は、添加によりチオールプロテアーゼの活性を“OFF”とし、紫外線照射により“ON”とする高度な活性制御を可能とする設計である。現在までに活性制御試薬 **17** の合成に加え、モデルペプチドの *S*-アルキル化及び紫外線照射によるモデルペプチドの放出に成功している。今後のチオールプロテアーゼ活性制御への展開が期待される。

#### 4. おわりに

以上、刺激応答型アミノ酸の開発とケミカルバイオロジー分野への展開の可能性について概説した。本総説ではペプチドや小分子、酵素の機能制御への応用を中心に紹介したが、このほかにもプロテオーム中タンパク質の精製・ラベル化を可能とする機能性リンカーの開発への展開なども試みている (unpublished result)。これら研究より得られる成果はケミカルバイオロジー分野に新たなツールを提供し、その発展に寄与するものと信じている。今後、これら研究成果を真に実用的なツールへと昇華させるべく研究を進めたい。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり終始温かいご指導を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 大高 章教授に深く感謝いたします。あわせて、引用文献に記載しました共同研究者の諸先生方及び学生の皆様にご心よりお礼申し上げます。本研究の一部は科学研究費補助金 若手研究

(B)、基盤研究 (C)、新学術領域研究「融合マテリアル」(領域番号 2206)、アステラス病態代謝研究会、武田科学振興財団、国際科学技術財団、三菱化学研究奨励基金、及び有機合成化学協会味の素研究企画賞の助成を受け行われたものであり、ここに感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Goguen B. N., Imperiali B., *ACS Chem. Biol.*, **6**, 1164–1174 (2011).
- 2) Fehrentz T., Schonberger M., Trauner D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 12156–12182 (2011).
- 3) Beharry A. A., Woolley A., *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 4422–4437 (2011).
- 4) Shao Q., Xing B., *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 2835–2846 (2010).
- 5) Kiso Y., Taniguchi A., Sohma Y., “Wiley Encyclopedia of Chemical Biology,” Vol. 1, ed. by Begley T. P., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009, pp. 379–383.
- 6) Umezawa N., Noro Y., Ukai K., Kato N., Higuchi T., *ChemBioChem*, **12**, 1694–1698 (2011).
- 7) Bindman N., Merckx R., Koehler R., Herrman N., van der Donk W. A., *Chem. Commun.*, **46**, 8935–8937 (2010).
- 8) Peter F. B., Brock A., Wang J., Schultz P. G., *Chem. Biol.*, **16**, 148–152 (2009).
- 9) Celie P. H. N., Toebes M., Rodenko B., Ovaas H., Perrakis A., Schumacher T. N. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 12298–12304 (2009).
- 10) Eastwood A. L., Blum A. P., Zacharias N. M., Dougherty D. A., *J. Org. Chem.*, **74**, 9241–9244 (2009).
- 11) Katayama K., Tsukiji S., Furuta T., Nagamune T., *Chem. Commun.*, 5399–5401 (2008).
- 12) Toebes M., Coccors M., Bins A., Rodenko B., Gomez R., Nieuwkoop N. J., van de Kastele W., Rimmelzwaan G. F., Haanen J. B. A. G., Schumacher T. N. M., *Nat. Med.*, **12**, 246–251 (2006).
- 13) Parker L. L., Kurutz J. W., Kent S. B. H., Kron S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 6322–6325 (2006).
- 14) Pellois J.-P., Muir T. W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 5713–5717 (2005).

- 15) Endo M., Nakayama K., Kaida Y., Majima T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5643–5645 (2004).
- 16) Bosques C. J., Imperiali B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7530–7531 (2003).
- 17) England P. M., Lester H. A., Davidson N., Dougherty D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11025–11030 (1997).
- 18) Milstien S., Cohen L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1143–1147 (1970).
- 19) Levine M. N., Raines R. T., *Chem. Sci.*, **3**, 2412–2420 (2012).
- 20) Shigenaga A., Tsuji D., Nishioka N., Tsuda S., Itoh K., Otaka A., *ChemBioChem*, **8**, 1929–1931 (2007).
- 21) Amsberry K. L., Borchardt R. T., *J. Org. Chem.*, **55**, 5867–5877 (1990).
- 22) Shigenaga A., Yamamoto J., Nishioka N., Otaka A., *Tetrahedron*, **66**, 7367–7372 (2010).
- 23) Shigenaga A., Yamamoto J., Hirakawa H., Yamaguchi K., Otaka A., *Tetrahedron*, **65**, 2212–2216 (2009).
- 24) Shigenaga A., Yamamoto J., Sumikawa Y., Furuta T., Otaka A., *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2868–2871 (2010).
- 25) Shigenaga A., Yamamoto J., Hirakawa H., Ogura K., Morishita K., Maeda N., Otaka A., *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2525–2528 (2010).
- 26) Shigenaga A., Ogura K., Hirakawa H., Yamamoto J., Ebisuno K., Miyamoto L., Ishizawa K., Tsuchiya K., Otaka A., *Chem-BioChem*, **13**, 968–971 (2012).
- 27) Shigenaga A., Hirakawa H., Yamamoto J., Ogura K., Denda M., Yamaguchi K., Tsuji D., Itoh K., Otaka A., *Tetrahedron*, **67**, 3984–3990 (2011).
- 28) Shigenaga A., Morishita K., Yamaguchi K., Ding H., Ebisuno K., Sato K., Yamamoto J., Akaji K., Otaka A., *Tetrahedron*, **67**, 8879–8886 (2011).