

刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開

重永 章*¹、大高 章*²

*1 Akira Shigenaga 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系) 講師・科学技術振興機構 さきがけ研究者 博士(薬学)

*2 Akira Otaka 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系) 教授 薬学博士

Development of stimulus-responsive amino acids that are potentially applicable to chemical biology use

1. はじめに

ペプチドやタンパク質の機能解明を目指し、これら活性を外部から制御する方法論が盛んに研究されている¹⁾。その中でも外部からの刺激による主鎖切断システムは、ペプチドやタンパク質の機能の劇的変化が期待できることから、近年、特に注目を集めている(図1)²⁾。本手法ではまず、刺激に応答して主鎖切断を誘起する人工アミノ酸を含むペプチドもしくはタンパク質を調製する。続いて、これを細胞内などへ導入したのち、外部から刺激を与えることによりペプチド・タンパク質の活性を変化させる。最後に、刺激前後での表現型を比較することにより、ペプチドやタンパク質の機能を解明する。現在までに開発された刺激応答部位は、特定の刺激にのみ応答するよう設計されてきた。このため当然ながら、他の刺激に応答させたい場合、分子設計を根底から見直す必要があった。これに対し著者らは、保護基を置換するのみで任意の刺激に応答可能となる人工アミノ酸、すなわち刺激応答型アミノ酸を開発し、これを基盤とした様々なツールの設計を行っている^{2,3)}。本稿では、著者らの開発した刺激応答型アミノ酸の化学およびその生命科学分野への展開について紹介する。

2. 刺激応答型アミノ酸の化学

2.1 刺激応答型アミノ酸の分子設計

刺激応答型アミノ酸の設計概念を図2Aに示す。図中のNuは求核性官能基を、PGは刺激により除去可能な保護基を意味する。刺激応答型アミノ酸を導入したペプチド・タンパク質へ対応する刺激を与えると、PG部分が除去される。この結果、無保護となった求核性官能基が主鎖アミド結合の切断を誘起する設計である。本アミノ酸は原理的に、PG部分を置換するのみで、基本骨格を変更することなく様々な刺激に応答可能なはずである。本研究では、刺激応答型アミノ酸を生理的条件下にて使用することを想定している。しかし通常、アミド結合の化学的切断には過酷な反応条件を要する。そこで著者らは、トリメチルロックに注目した(図2B)^{4,5)}。トリメチルロックはCohenらにより開発された化合物であり、立体障害などの影響により温和な条件下においてもラクトンを経てアミド結合を切断する。著者らはこの研究に着目し、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(図2C)。刺激応答型アミノ酸はトリメチルロックをアミノ酸型とした誘導體であり、フェノール性水酸基上に刺激により除去可能な保護基を有する。このアミノ酸を含むペプチド・タンパク質へ対応する刺激を与えると、保護基の除去をトリガーとしたトリメチルロックのラクトン化が起こり、生理的条件下においても主鎖ペプチド結合が切断される設計である。次項からは、刺激応答型アミノ酸の合成およびこれを含むペプチドの調製について説明する。

2. 2 刺激応答型アミノ酸の合成とペプチドへの導入

著者らは最初に、紫外線照射により主鎖切断を誘起する紫外線応答型アミノ酸誘導体**5**の合成を行った(図3)³⁾。まず文献既知化合物**1**から出発し、6工程を経て鍵合成中間体**3**へと誘導した。続いて、紫外線照射により除去可能な*o*-ニトロベンジル基(*o*NB)を刺激応答型保護基として導入し**4**としたのち、5工程を経てFmocアミノ酸型誘導体**5**を合成することに成功した。本アミノ酸誘導体は、通常のFmocペプチド固相合成法によりペプチド**6**へ導入することが可能であった。なお当初は、化合物**5**をラセミ体として得ていた。しかし最近、化合物**1**から**2**への変換に際し不斉有機触媒を用いることにより、立体を制御することに成功している⁶⁾。

2. 3 刺激応答能の検証

続いてペプチド**6**の紫外線応答能を検証した(図4)。中性リン酸緩衝液-アセトニトリル溶媒中のペプチド**6**へ紫外線を照射したのち、37°Cにて反応を行った。この結果、ただちに保護基が除去されて**7**となったのち、2時間以内に主鎖切断生成体である**8**および**9**が高純度で得られた。すなわち著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主鎖の切断を誘起することが証明された。また詳細については割愛するが、アミノ酸配列がペプチド結合切断反応の速度に与える影響についても精査した。この結果、刺激応答型アミノ酸前後のアミノ酸が極性官能基を有する場合は切断反応が速く、疎水性が高く立体的に嵩高いほど反応が遅くなることを明らかにした⁷⁾。

次に、フェノール性水酸基の保護基を置換することにより、種々の刺激に応答可能な刺激応答型アミノ酸の開発を行った。この結果、近赤外二光子励起⁸⁾やアルカリホスファターゼ³⁾、チオール^{9,10)}やフッ化物イオン¹¹⁾、細胞内低酸素環境¹²⁾に応答する刺激応答型アミノ酸の合成に成功している(図5)。さらに現在、他の刺激応答型アミノ酸の研究も精力的に進めているところである。

3. 刺激応答型アミノ酸の生命科学分野への展開

3. 1 ペプチドの機能制御への展開

生命科学分野において、細胞内にある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の開発が盛んに行われている。現在までに開発された活性制御法は、活性型から不活性型への変換(ON→OFF変換)もしくはその逆(OFF→ON変換)を可能とするものであった(図1)。これに対し著者らは、これまでに前例のないペプチド活性のON→ON制御、すなわち刺激をトリガーとし、ある活性を持つペプチドを別の活性を持つペプチドへと変換する新規方法論の確立を目指した³⁾。図6にて分子設計を説明する。ペプチド**10**は紫外線応答型アミノ酸を挟み、N末端側には活性型ペプチド**A**を、C末端側にはセリン部分でのイソペプチド化により失活させたペプチド**B**を持つ。このためペプチド**10**は、まずペプチド**A**由来の活性を示す。続いて紫外線を照射すると、ペプチド結合が切断されイソペプチド**11**が生じる。イソペプチド**11**はクリックペプチド同様¹³⁾、直ちに*O*-*N*アシル基転移反応を起こし、直鎖状の活性型ペプチド**B**を生成する。すなわちこの系は、紫外線照射をトリガーとしてペプチドの活性が**A**から**B**へと変換される、従来のないペプチド活性制御系

である。著者らは概念実証実験として、ペプチド**A**として細胞膜透過ペプチドおよび核内移行シグナル配列を、ペプチド**B**として核外移行シグナル配列を有するペプチドを合成した。本ペプチドを細胞へ添加したところ、ペプチドはまず核内へと濃縮された。続いて細胞へ紫外線を照射したところ、設計通りペプチドの活性が**A**から**B**へと変化し、細胞質へと移行した。本研究成果は、著者らの発案したON→ONペプチド機能制御系が細胞内でも機能することを実証するものである。

3. 2 生命科学分野でのその他の展開

3. 2. 1 環境の可視化

生命科学分野において、生体内や細胞内環境の可視化法は不可欠である。そこで著者らは図7Aに示す環境可視化分子を設計した。この化合物は刺激応答型アミノ酸を挟み、一方に消光団を、他方に蛍光団および本分子の局在を制御する機能性配列を含む。本化合物を生体もしくは細胞へ投与すると、まず機能性配列の働きにより標的部位へ移行する。ここまで、消光団の影響で蛍光は観測されない。続いて環境由来の刺激により、分子が切断される。この結果、消光団が遊離し、蛍光が観測可能になる設計である。著者らはその一例として、細胞内低酸素環境の可視化に挑戦した¹²⁾。本研究では刺激応答型アミノ酸として細胞内低酸素環境応答型アミノ酸を、機能性配列として細胞膜透過ペプチド¹⁴⁾を用いた。本化合物を細胞へ添加したところ、設計通り低酸素環境下の細胞内においてのみ蛍光が観測された。以上の結果から、著者らの設計した環境可視化分子は細胞内でも利用可能であることが明らかとなった。今後、保護基の置換による様々な刺激の可視化が期待される。

3. 2. 2 チオール応答型 DNA 放出システム

核酸医薬品においては核酸を標的細胞内へ送達のための、放出する必要がある。著者らは、細胞外に比べ細胞内のグルタチオン（チオールを含むトリペプチド）濃度が高いことに注目し、チオール応答型DNA放出システムを構築した（図7B）⁹⁾。この系ではまず、チオール応答型アミノ酸をペプチド核酸（PNA）へ導入する。これを相補的DNAに加えると、PNA-DNA複合体が形成される。ここへチオールを添加するとPNAが切断され相補的DNAへの結合能が低下し、DNAが放出される設計である。現在までに著者らは、チオール応答型PNAの合成に成功するとともに、この相補的DNAとの複合体がチオール処理により解離することを明らかにしている。

3. 2. 3 ケージドセラミド

ここまで、刺激応答型アミノ酸による高分子（ペプチドやPNA）の機能制御について述べてきた。続いて著者らは、刺激応答型アミノ酸が低分子の機能制御へも適用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（図7C）¹⁵⁾。なお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放出する前駆体化合物と定義する。ケージドセラミドへ紫外線を照射すると、ペプチドの機能制御の項で述べたのと同様の反応が起こる。すなわちアミド結合の切断と続くO-Nアシル基転移反応が進行し、セラミドが生成する設計である。本反応では脂肪鎖の向きが反応前後で大きく変わることから、その活性も大きく変化することが期待される。現在までに著者らは、ケージドセラミドの合成および紫外線照射によるセラミドの生成の確認に成功している。

3. 2. 4 刺激による酵素の活性制御のための機能性分子

著者らは、刺激応答型アミノ酸の基本骨格を利用した酵素の活性制御法構築にも挑戦している。チオールプロテアーゼの活性“ON→OFF→ON”制御法を図7Dに示した¹⁰。活性制御試薬**12**はチオールプロテアーゼに認識されるR部位およびMichael受容体部位を有する。本試薬をチオールプロテアーゼに添加するとR部分の酵素との会合を経て、酵素活性中心がアルキル化される。この結果、酵素の活性は失われる。続いて紫外線を照射するとラクトン化が誘起されたのち、芳香環形成を推進力としてβ脱離が起こり、活性型のチオールプロテアーゼが再生する設計である。本反応を通じてチオールプロテアーゼが“活性型→不活性型→活性型”と変化することから、著者らはこの系を“ON→OFF→ON”制御系と呼んでいる。本系は未だ構築の途上であり、現在までに制御試薬によるチオール含有ペプチドのアルキル化、および紫外線照射による親ペプチドの放出に成功している。今後、チオールプロテアーゼの活性制御への展開が期待される。

3. 2. 5 創薬標的タンパク質同定のためのリンカー分子

刺激応答型アミノ酸の活性制御以外への展開として、創薬標的タンパク質の簡便な同定を可能とするトレーサブルリンカーの開発を行った^{10,11)}。トレーサブルリンカーとは著者らの造語であり、標的タンパク質の精製およびラベル化を可能とする機能性リンカーを意味する。

まず一般的な標的タンパク質の同定法について説明する¹⁷⁾。定法では最初に、標的を知りたい生物活性分子上へアルキンおよび光親和性部位を導入する。続いてプロテオームへ加えたのち紫外線を照射し、光親和性部位を介して共有結合的に標的タンパク質をアルキニル化する。続いてアジド化ビオチン誘導体とのクリック反応を行い、標的タンパク質にビオチンを導入する。ビオチンはアビジンと強固に結合することから、最後にアビジンビーズを用いて標的タンパク質を精製する。本手法は信頼性および汎用性の高い方法である。しかし、アビジンビーズからの標的タンパク質の溶出に過酷な条件を要し、また溶出液に非特異的吸着由来タンパク質が混入して真の標的の同定が煩雑となる場合がある。

そこで著者らは上記問題点の克服を目指し、温和な条件下での溶出を可能とし、さらに夾雑物存在下においても標的タンパク質のみのラベル化を可能とするトレーサブルリンカーを設計した(図8)。本リンカーは刺激応答型アミノ酸を挟み、N末端側にビオチンを、C末端側にアミノオキシ基およびアジドを有する。使用法を以下に説明する。まず従来のリンカー分子同様、アルキニル化標的タンパク質とのクリック反応に付したのち、アビジンビーズへ吸着させる。続いて刺激を与えることによりリンカーを切断し、温和な条件下で標的タンパク質を溶出させる。この際、標的タンパク質は無保護アミノオキシ基を提示した状態となることから、ここへアルデヒド部分を含むラベル化試薬を加える。すると、夾雑物存在下においても標的タンパク質選択的ラベル化が達成される設計である。

現在までにいくつかのトレーサブルリンカーの合成に成功するとともに、アビジンビーズを用いた標的タンパク質の吸着・溶出に成功した。この際、従来のリンカー分子同様、標的タンパク質への非特異的吸着由来タンパク質の混入が認められたものの、ラベル化試薬の添加により標的のみの選択的可視化が可能であった。現在、本研究より得られた知見

を基に、真に実用的なトレーサブルリンカーを開発しているところである。

4. おわりに

本稿では、刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開に関する著者らの研究成果について概説した。本研究より得られる成果は生命科学研究のための新たなツールの開発につながるものであり、その発展に貢献できるものと信じている。また刺激応答型アミノ酸による活性制御法はペプチドのみならず、原理的にはタンパク質へも適用可能である。このためには刺激応答型アミノ酸を含むタンパク質の調製が必須であり、これにはタンパク質完全化学合成法の確立が不可欠と著者らは考えている。タンパク質合成法の開発に関する著者らの最近の成果については、本号の中村らの稿を参照していただきたい。今後はこれら研究をさらに発展させるとともに、生命科学研究のための真に実用的なツールの創製へとつなげていきたい。

謝辞

共同研究者の山本 純博士をはじめとする引用文献に記載しました諸先生方および学生の皆様に、心より感謝申し上げます。本研究の一部は科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業（さきがけ）、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、日本科学技術財団、三菱化学研究奨励基金、有機合成化学協会味の素研究企画賞および武田薬品工業研究企画賞の助成を受けて行われたものであり、深謝いたします。

参考文献

- 1) Q. Shao, B. Xing, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 2835 (2010)
- 2) 重永 章, *薬学雑誌*, **132**, 1075 (2012)
- 3) A. Shigenaga, D. Tsuji, N. Nishioka, S. Tsuda, K. Itoh, A. Otaka, *ChemBioChem*, **8**, 1929 (2007)
- 4) S. Milstien, L. A. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1143 (1970)
- 5) M. N. Levine, R. T. Raines, *Chem. Sci.*, **3**, 2412 (2012)
- 6) A. Shigenaga, J. Yamamoto, N. Nishioka, A. Otaka, *Tetrahedron*, **66**, 7367 (2010)
- 7) A. Shigenaga, J. Yamamoto, H. Hirakawa, K. Yamaguchi, A. Otaka, *Tetrahedron*, **65**, 2212 (2009)
- 8) A. Shigenaga, J. Yamamoto, Y. Sumikawa, T. Furuta, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2868 (2010)
- 9) A. Shigenaga, J. Yamamoto, H. Hirakawa, K. Ogura, N. Maeda, K. Morishita, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2525 (2010)
- 10) J. Yamamoto, M. Denda, N. Maeda, M. Kita, C. Komiya, T. Tanaka, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otaka, *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 3821 (2014)
- 11) J. Yamamoto, N. Maeda, C. Komiya, T. Tanaka, M. Denda, K. Ebisuno, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otaka, *Tetrahedron*, **70**, 5122 (2014)
- 12) A. Shigenaga, K. Ogura, H. Hirakawa, J. Yamamoto, K. Ebisuno, L. Miyamoto, K. Ishizawa, K. Tsuchiya, A. Otaka, *ChemBioChem*, **13**, 968 (2012)
- 13) Y. Sohma, Y. Kiso, *Chem. Record*, **13**, 218 (2013)
- 14) I. Nakase, T. Takeuchi, G. Tanaka, S. Futaki, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **60**, 598 (2008)
- 15) A. Shigenaga, H. Hirakawa, J. Yamamoto, K. Ogura, M. Denda, K. Yamaguchi, D. Tsuji, K. Itoh, A. Otaka, *Tetrahedron*, **67**, 3984 (2011)

16) A. Shigenaga, K. Morishita, K. Yamaguchi, H. Ding, K. Ebisuno, K. Sato, J. Yamamoto, K. Akaji, A. Otaka, *Tetrahedron*, **67**, 8879 (2011)

17) 重永 章, 山本 純, 大高 章, 実験医学増刊号 驚愕の代謝システム〜メタボロームの階層から解き明かす疾患研究の新たなステージ〜 (末松 誠, 杉浦悠毅 編), 羊土社, 150-156 (2014)

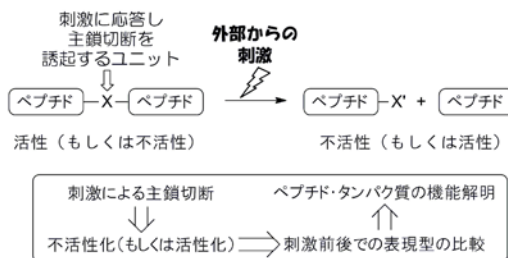


図 1 刺激応答型主鎖切断システムを用いたペプチド・タンパク質機能の解明

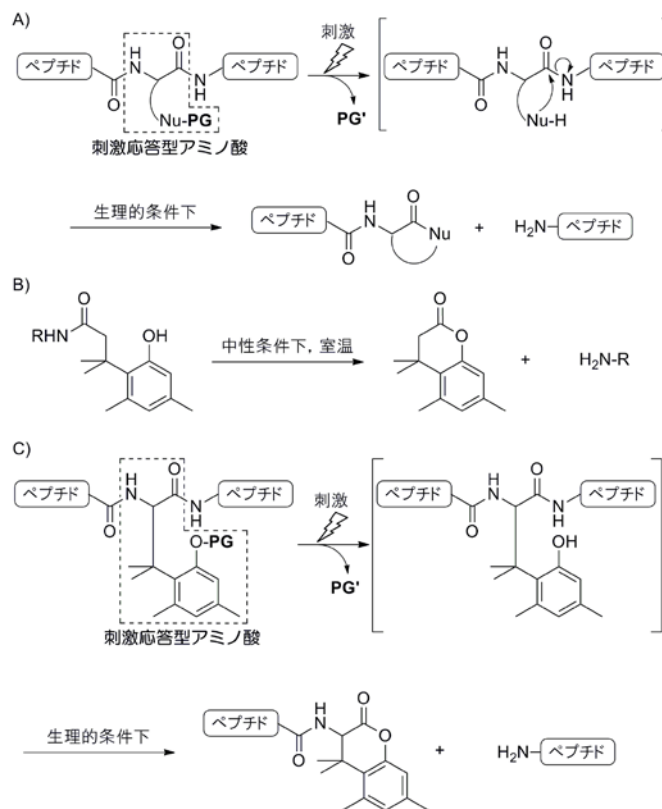


図 2 A) 刺激応答型アミノ酸の設計概念. B) トリメチルロック. C) 著者らの開発した刺激応答型アミノ酸 (Nu: 求核性官能基; PG: 刺激により除去可能な保護基)

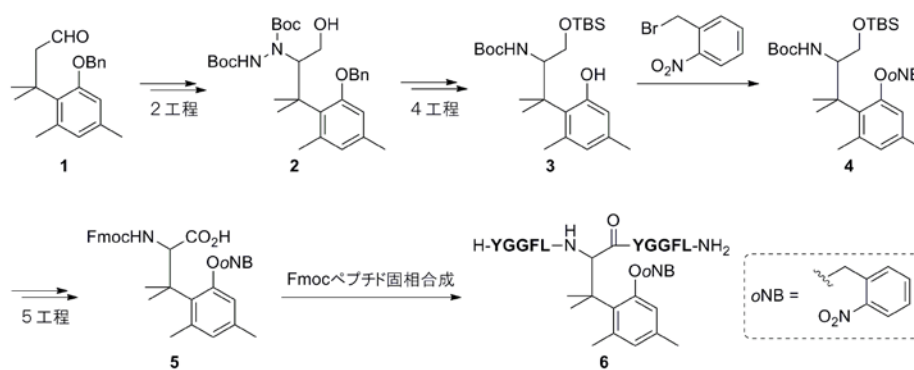


図3 刺激応答型アミノ酸の合成とペプチドへの導入

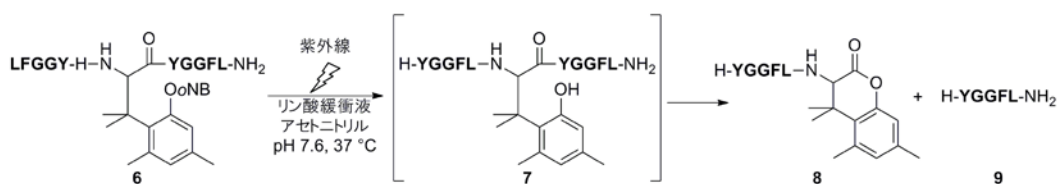


図4 紫外線応答性の検証

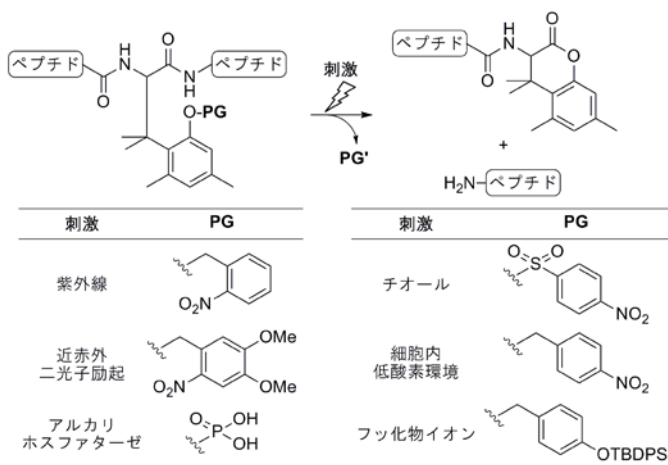


図5 これまでに開発した刺激応答型アミノ酸

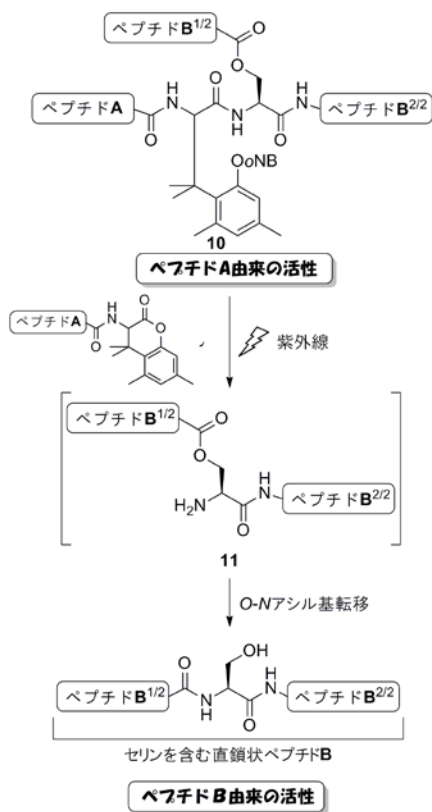


図6 ペプチド機能のON→ON制御法

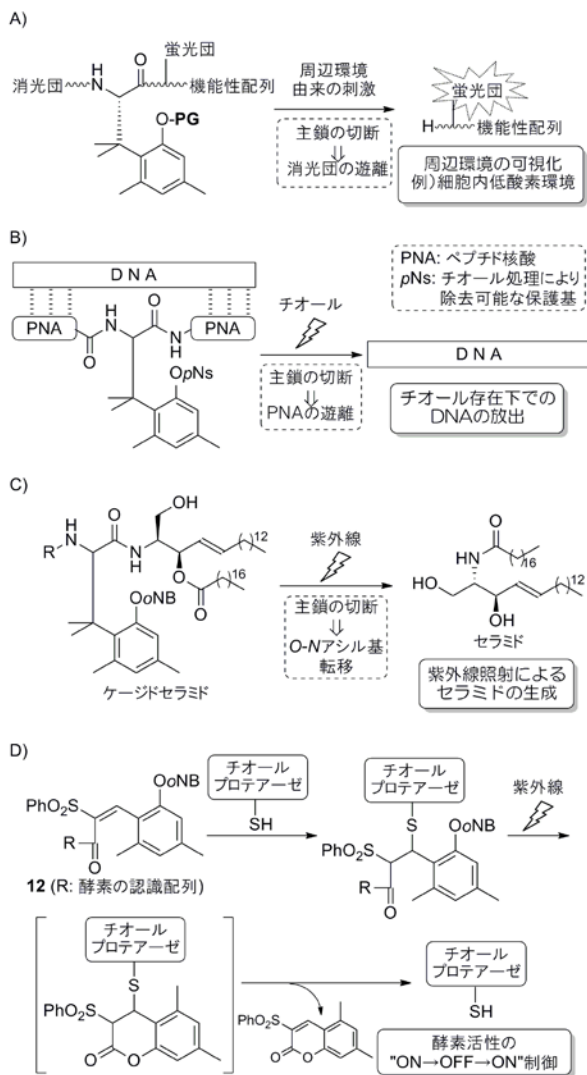


図7 A) 環境の可視化. B) チオール応答型DNA放出システム. C) ケージドセラミド. D) 酵素活性の“ON→OFF→ON”制御

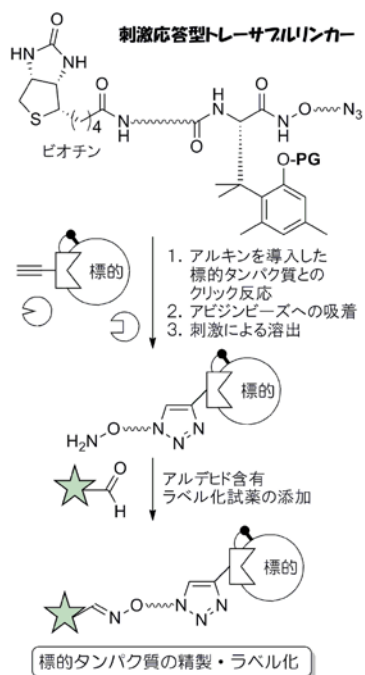


図8 トレーサブルリンカーを用いた標的タンパク質の精製・ラベル化