



医薬応用のためのエピトープ指向性 抗原結合分子デザイン

1. はじめに

東京工業大学生命理工学院の門之園哲哉と申します。このたびは、本ニュースレターへの執筆の機会を頂き、お声かけ頂いた後藤佑樹先生に心より感謝申し上げます。筆者は、細胞・抗体・小型抗体・ペプチドをモダリティとするバイオ医薬設計を専門としており、合成生物学的手法と計算科学・情報科学的手法を組み合わせた高性能バイオ医薬デザイン技術の開拓を目指しています。特に近年は、遺伝子組み換えにより1細胞膜上で抗原と結合分子を結合させる技術を開発し、抗原結合領域（エピトープ）を指標とする分子デザイン研究を進めています。まだまだ発展途上ではありますが、これまでに得られている研究成果の概要などをご紹介します。



門之園 哲哉

2. 抗原親和性を指標とする分子探索技術

人工的な抗原結合分子を取得したい場合、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、cDNAディスプレイといった分子ディスプレイのプラットフォームがよく利用されます¹。これらは、抗原結合分子候補とそれをコードする核酸とが1つの複合体となって

おり、核酸の塩基配列を解析することで抗原結合分子候補のアミノ酸配列を同定することができます。この特徴を利用して、様々な抗原結合分子候補をディスプレイしたライブラリーの中から抗原に結合する複合体を濃縮して回収し、その塩基配列の解析によりアミノ酸配列を同定する、という探索手法がとられます。抗原への結合を指標としているため、抗原親和性の強い複合体が選択的に濃縮され、得られた抗原結合分子は期待通り強い抗原親和性を示すことが多いです。一方で、抗原のどこに結合しているのかは分からないため、エピトープマッピングやエピトープビニングと呼ばれる解析により、抗原結合分子のエピトープを調査する必要があります^{2,3}。

バイオ医薬の開発においては、同程度の抗原親和性を持つ分子であってもエピトープが異なれば薬効が変化するため、エピトープ情報は極めて重要です。しかし、これまでにエピトープを指標とする分子探索技術は存在していませんでした。そこで筆者らは、既存の抗体のエピトープと同じエピトープを持つ抗原結合分子を探索する新技術の開発に取り組みました。

3. エピトープを指標とする分子探索技術の開拓

新たに開発した分子探索技術は、「既存抗体に基づくライブラリーデザイン」と「既存抗体によるエピトープ評価」を特徴とするもので、monoclonal antibody guided peptide identification and engineering (MAGPIE) システムと名付けました(図1)。CD25を抗原とする抗体医薬 Daclizumab をモデルとして、MAGPIE システムにより CD25 結合

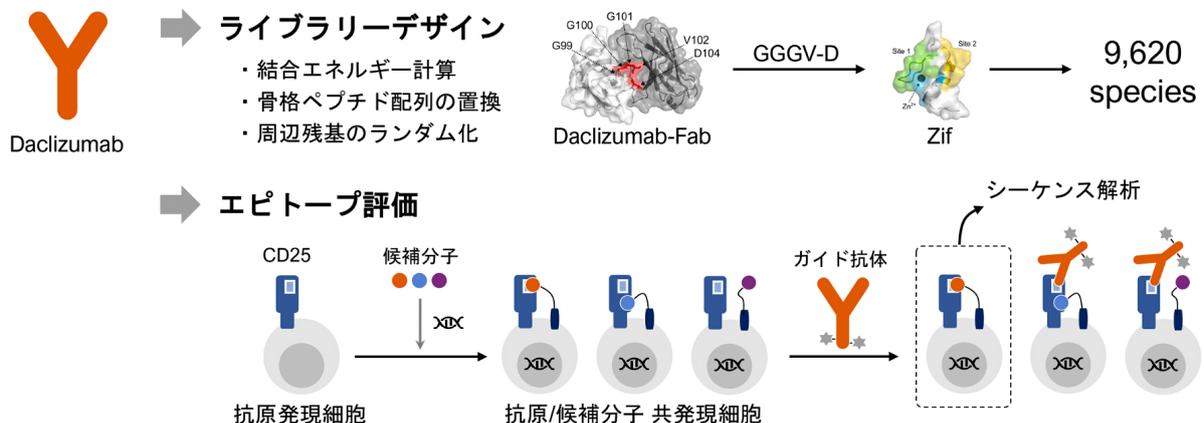


図1 MAGPIE システムによる抗原結合分子探索

ペプチドを開発した例をご紹介します⁴。

「既存抗体に基づくライブラリーデザイン」ではまず、Daclizumab と CD25 の結合エネルギー計算により、CD25 との結合に重要なペプチド配列を同定しました。続いて、ヒト Zif268 タンパク質の Zinc finger ドメインを骨格ペプチド Zif (33 アミノ酸長) とし、Zif の分子表面に存在するループ領域の配列を CD25 結合ペプチド配列に置換し、さらに構造を最適化するために周辺の 1~3 残基をランダム配列化したライブラリーを設計しました。その結果、9,620 種類の分子で構成されるライブラリーが得られました。

「既存抗体によるエピトープ評価」の原理は極めて単純です。抗原 CD25 を発現させた細胞に候補分子をディスプレイする遺伝子を 1 種類ずつ組み込み、細胞膜上で CD25 と候補分子が結合するようにしました。この変異細胞ライブラリーと蛍光標識した Daclizumab (ガイド抗体) を反応させると、候補分子が Daclizumab と同じエピトープに結合している場合は、ガイド抗体は CD25 に結合できません。一方、候補分子が異なるエピトープに結合している場合やそもそも CD25 と結合していない場合は、ガイド抗体が CD25 に結合します。そこで変異細胞ライブラリーを 1 細胞ずつフローサイトメトリーで高速解析し、ガイド抗体が結合していない細胞を回収してゲノムを次世代シーケンサーで解析することにより、Daclizumab と同じエピトープに結合するペプチドの配列を同定できます。実際に MAGPIE システムにより、比較的親和性の強い ($K_D = 30$ nM 程度) 3 種類の CD25 結合ペプチドを同定することに成功しました。

4. 機械学習による抗原結合分子の高性能化

エピトープを指標とする分子探索では、抗原親和性の点では必ずしも強いものが得られるとは限りません。一方、エピトープが同じ抗原結合分子群の情報は、機械学習の教師データとして利用可能だと期待されます。そこで次に、北里大学の齋藤裕教授との共同研究で、機械学習によって抗原親和性の強い分子を予測できるか検討しました。Zif の分子表面に位置する 14 残基をランダム配列化したライブラリーを設計し、抗原 HER2 を発現させた細胞にディスプレイし、細胞膜上で結合させました。ライブラリーサイズ

の理論値は 1.6×10^{18} と既存のスクリーニング技術では解析不可能な大きさですが、機械学習で補完することを念頭に、そのうち 1×10^6 サイズの変異細胞ライブラリーを作製して使用しました。抗 HER2 抗体医薬 Pertuzumab を蛍光標識してガイド抗体とするスクリーニングで候補ペプチドを探索し、無細胞合成でペプチドを調製して ELISA で評価した結果、130 種類のペプチドのアミノ酸配列と HER2 結合親和性のデータを取得できました。

得られたデータを用いて学習モデルと特徴量を最適化し、HER2 結合親和性予測モデルを構築しました (図 2)。続いて、 1.6×10^{18} という広大な分子空間をイン・シリコスクリーニングで探索し、HER2 結合ペプチド配列のリストを作製しました。予測された上位 2 種のペプチドを合成して評価したところ、HER2 結合親和性は教師データに用いたペプチドよりも 6 倍程度強くなり ($K_D = 6 \sim 7$ nM)、また Pertuzumab と同様に HER2 発現がん細胞の増殖抑制作用を持つことが分かりました。つまり、機械学習による高性能化が可能であることが示されました。

5. 多数の抗原結合分子群の一括エピトープビニング

最後に、MAGPIE システムを応用した抗体分類法をご紹介します⁵。最初にも少し述べた通り、抗体医薬開発の初期段階においては、動物免疫等で得られた抗原結合抗体 (試験抗体) のエピトープを既存の抗体 (参照抗体) と比較して分類する「エピトープビニング」という工程があります。これまでにいくつかのエピトープビニング法が開発されていますが、いずれも試験抗体を調製する必要があるため、多数の試験抗体の同時評価は難しいという課題がありました。そこで、MAGPIE システムの原理を応用し、ペプチドライブラリーの代わりに試験抗体ライブラリー、ガイド抗体の代わりに蛍光標識した参照抗体を利用することで、多数の抗体群を一括分類する新技術 Epitope Binning-seq 法を構築しました (図 3)。この方法では、試験抗体を調製する必要はなく、それらをコードする遺伝子を抗原発現細胞に導入するだけで評価が可能です。そのため、大学研究室レベルの実験環境でも 1000 万種類程度の試験抗体を一括分類できるようになりました。本手法は試験抗体を試験ペプチド、参照

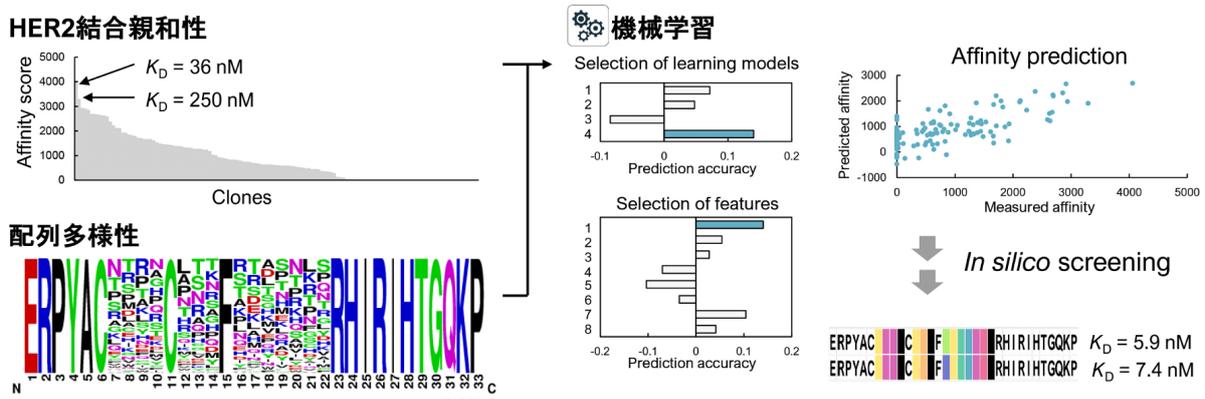


図 2 機械学習を使用した HER2 高親和性ペプチドの予測

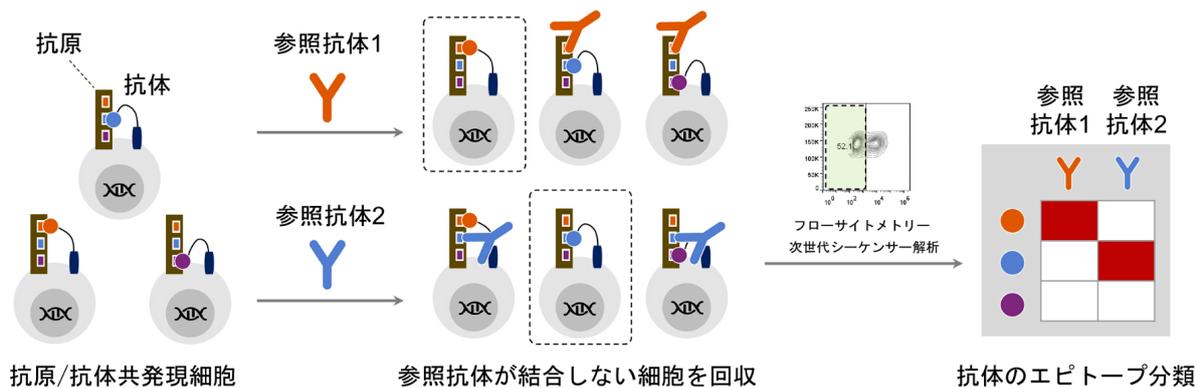


図3 Epitope Binning-seqによる抗体分類

抗体を参照ペプチドに代えることでペプチドのエピトープビニングにも利用可能です。例えば生理活性ペプチドを参照ペプチドとして分類を行えば、アゴニストペプチドやアンタゴニストペプチドの開発にも応用できると期待しています。

6. おわりに

本稿では、筆者らが独自開発した抗原結合分子のエピトープ評価技術を中心に、最近の研究成果をご紹介しました。特に本特集のトピックにも関連しますが、機械学習の教師データを取得可能であることが明らかになったことは極めて重要であると考えています。これにより、数百種類の抗原結合分子群を解析することができれば、機械学習を利用して高精度なイン・シリコスクリーニングが実施できます。進化し続ける機械学習に合わせて最適な教師データが取得できるように、今後も技術の高度化を進めていく予定です。

最後になりましたが、これまでにご協力頂いた全ての共同研究者、学生諸氏に本紙をお借りして深く感謝申し上げます。本研究は、AMED 創薬基盤推進研究事業、AMED 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業など、多くの支援により推進させて頂きました。また、本稿執筆の機会を与您頂きましたペプチドニュースレター編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Smith, G.P.; Petrenko, V.A. Chem Rev 1997, 97, 391-410.
- Gershoni, J.M.; Roitburd-Berman, A.; Simantov, D.D.; Freund, N.T.; Weiss, Y. BioDrugs 2007, 21, 145-156.
- Harvey, W.T.; Carabelli, A.M.; Jackson, B.; Gupta, R.K.; Thomson, E.C.; Harrison, E.M.; Ludden, C.; Reeve, R.; Rambaut, A.; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium; Peacock, S.J.; Robertson, D.L. Nat Rev Microbiol 2021, 19, 409-424.
- See, K.; Kadonosono, T.; Miyamoto, K.; Tsubaki, T.; Ota, Y.; Katsumi, M.; Ryo, S.; Aida,

K.; Minegishi, M.; Isozaki, T.; Kuchimaru, T.; Kizaka-Kondoh, S. Sci Rep 2021, 11, 22098.

- Lin, N.; Miyamoto, K.; Ogawara, T.; Sakurai, S.; Kizaka-Kondoh, S.; Kadonosono, T. Commun Biol 2024, 7, 652.

かどのその てつや
東京工業大学 生命理工学院
tetsuyak@bio.titech.ac.jp
<http://kadonosonolab.bio.titech.ac.jp/>

細胞内タンパク質に対するペプチド型リガンドの de novo 設計とその検証

1. はじめに

この度は、我々の研究を紹介する機会を与您いただき誠にありがとうございます。お誘いくださった編集委員の後藤佑樹教授（京都大学）に心よりの感謝を申し上げます。機能性分子の de novo 設計は、分子化学研究の醍醐味の 1 つです。私たちは、細胞内タンパク質を標的としたリガンド創



森本 淳平

出のために、ペプチドと呼ばれる人工ペプチドに着目して機能性分子の設計を行なってきました。本稿では、ペプチドを用いた細胞内タンパク質リガンド設計の簡単なお紹介とその設計妥当性の検証に関する我々の最近の研究を紹介させていただきます。

2. ペプチドを基盤としたタンパク質リガンドの設計

1992年に、Zuckermann らが、N 置換グリシンのオリゴマーをペプチドと名付けて報告し¹、その後、ペプチドは、膜透過性とプロテアーゼ耐性の高い人工ペプチドとして注目を集めていきました。N 置換グリシンは、主鎖二面角の回転自由度が高いため特定の 3 次元構造を安定に形成させることが難しい分子です。そのため、タンパク質に高結合親和性で結合

するペプチドを創出することは難しいと考えられてきました。そこで、このような欠点を克服するために、ペプチド化学の研究者は、ペプチドの配座安定性を向上させる工夫を行ってきました。その成果として、特定の 3 次元構造を安定に形成するペプチドが創出されるようになり、peptoid data bank (<https://databank.peptoids.org/>) と名付けられた構造情報のデータベースが整備されるなど²、様々な 3 次元構造を安定に形成するペプチドが創出されてきました。

こうしてペプチドの配座制御手法が成熟してきた中、Kirshenbaum らのグループと我々のグループは、細胞内の標的タンパク質に結合するペプチドを *de novo* で設計できることを、2018 年と 2019 年に相次いで報告しました。Kirshenbaum らは、配座制御された環状ペプチドを骨格として用いることで、細胞内タンパク質のリガンドを設計できることを示しました³ (図 1a)。一方で、我々は、N メチルペプチドの構造研究⁴や Kodadek らの研究⁵に着想を得て、ペプチドの主鎖をグリシン残基からアラニン残基に変更することで剛直なペプチド主鎖骨格を実現し、これを足場としてタンパク質間相互作用 (PPI) のホットスポット残基を模倣する形で阻害剤の設計を行ってきました^{6,7} (図 1b)。具体的には、MDM2 を標的として、その PPI 相手である p53 transactivation domain (p53-TAD) のホットスポットを模倣する形でペプチドを設計し、MDM2 に結合するペプチド

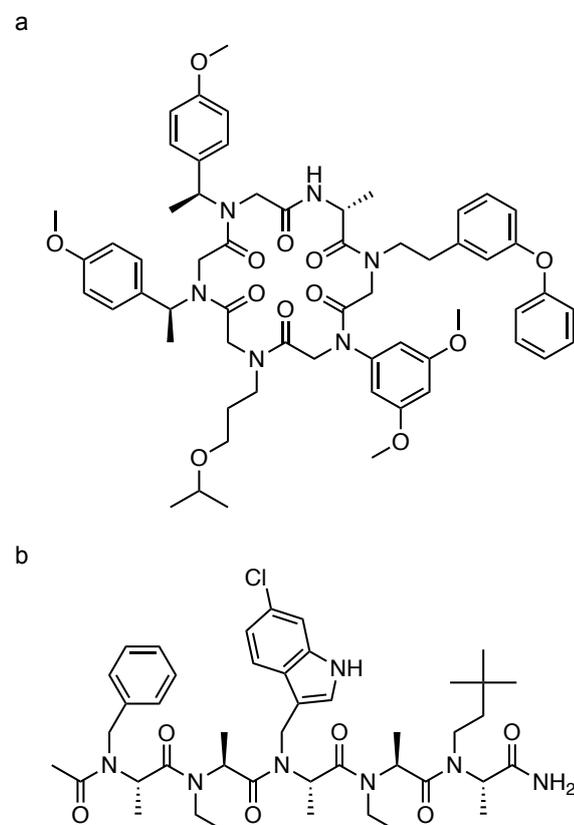


図 1 剛直なペプチドを基盤とした細胞内タンパク質リガンド。(a) Kirshenbaum らにより設計された環状ペプチド。(b) 我々が設計した MDM2 に結合する主鎖アラニン型の直鎖状ペプチド。

ドを創出しました。このペプチドは、実際に細胞内で MDM2 に結合することが示されています⁸。分子設計の詳細については、ペプチドニュースレター No. 123 などに寄稿した記事に記載しているため、ここでは割愛させていただきます。本稿の残りの部分では、ペプチドを用いたタンパク質リガンドの設計指針が妥当であったのかどうかについての検証研究について紹介させていただきたいと思います。

3. ペプチドを用いた細胞内 PPI 阻害剤開発

前項で述べたように、我々は MDM2 に結合するペプチドの合理的な設計を行いました。しかしながら、このペプチドが本当に設計通りに MDM2 の p53-TAD 結合サイトと同じ場所に結合しているのかどうかについては、確からしいという実験的傍証は得ていたものの、確証はありませんでした。そのため、複合体の結晶構造を解くなど、結合状態の構造を高解像度で明らかにすることで、設計の正しさを証明したいと考えていました。長年の取り組みの末、2022 年ようやくこの複合体の結晶構造の解明に成功し、ペプチドがどのように MDM2 に結合しているのかを明らかにすることができました (図 2) (この成果については、その後、様々な検証実験を行った末、今年ようやく学術論文として発表することができました⁹)。大変嬉しかった (と同時にほっと安堵した) ことに、ペプチドは当初の設計通りに MDM2 の p53-TAD 結合ポケットに結合していることがわかりました。そ

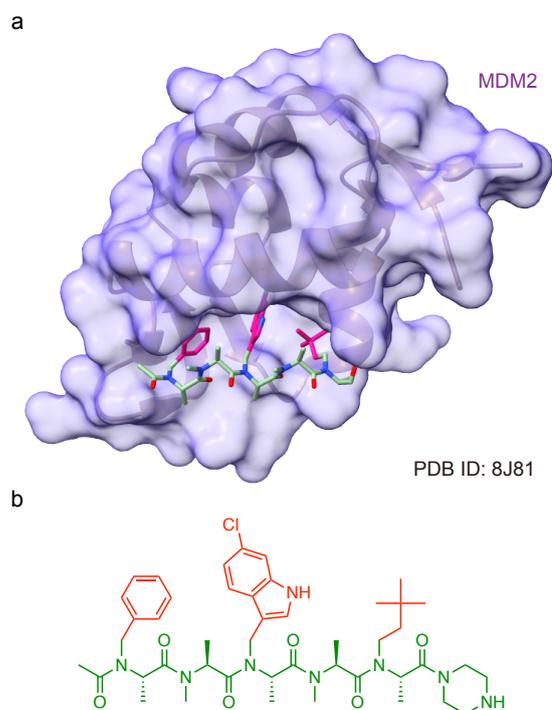


図 2 (a) ペプチドと MDM2 の複合体の結晶構造。MDM2 は紫で示した。ペプチドは、主鎖の構造を緑色で、MDM2 の結合に寄与する側鎖の官能基部分を赤色で示している。(b) 複合体中のペプチドの構造式。a と同じ形式で色分けしている。水溶性を上げるために図 1b のペプチドから構造を一部変更している。

して、p53-TAD の 3 つのホットスポットを模倣したペプチド上の官能基は、p53-TAD のホットスポット残基が結合するポケットにしっかりと収まっています。こうして、剛直なペプチド骨格を足場とした我々のタンパク質リガンド設計指針が正しいことが示されました。また、ペプチド型のオリゴマーとタンパク質との複合体の結晶構造はこれが世界で初めての例であり、ペプチドという人工ペプチドがタンパク質をどのように分子認識するかについての理解を進める重要な知見を与える成果となったと考えています。

こうして明らかとなった結晶構造中のペプチドと MDM2 の相互作用様式を詳しく見ていくことで、このペプチドがどのようにタンパク質を認識しているのかについて次のような 3 つの知見が得られました。①ペプチド側鎖の官能基と MDM2 の間の相互作用のほとんど全てが van der Waals 相互作用であり、水素結合はペプチドのインドル環の N-H と MDM2 の Leu54 のカルボニル酸素との間に 1 つあるのみである。②これらのペプチド上の官能基は p53-TAD のホットスポット残基と同様の相互作用を MDM2 と形成しているが、インドル環の 6 位のクロロ基やネオヘキシル基のメチル基など、p53-TAD には存在しないペプチド特有の官能基が付加的な相互作用をすることで MDM2 との結合親和性を高めている。③ペプチドの主鎖を構成する原子は MDM2 とほとんど相互作用を形成しておらず、ホットスポットを模倣して導入した窒素上の官能基を提示する足場として働いている。

これまで、ペプチド構造の剛直化は、タンパク質結合親和性の向上につながると考えられてきており、私たちもそのような考えに則ってペプチドの設計をしてきましたが、果たしてこのような考えは正しかっ

たのでしょうか。また、正しいとするならば、ペプチドの剛直性はどのようにタンパク質結合親和性に寄与するのでしょうか。私たちは、この点についても検証を行いたいと考え、結晶構造解析と並行して、相互作用の物理化学的解析を行うこととしました。

まず、先にご紹介した MDM2 結合型ペプチドについて、その主鎖を構成するアラニン残基をグリシン残基に置換して剛直性を低下させた誘導体を設計・合成しました。そして、これらの誘導体と MDM2 との結合親和性の測定、さらには、結合の熱力学的パラメーターやキネティクスの解析を行いました (図 3)。その結果、まず、ペプチドの剛直性が上がるほど MDM2 との結合親和性が向上することがわかりました。また、ペプチドの剛直性が高くなるほど MDM2 結合におけるエンタルピーの寄与が大きくなり、また、結合速度定数は大きく、解離速度定数は小さくなることがわかりました。これらのことから、ペプチド構造の剛直性の向上は、次の 2 つの理由によって、タンパク質への結合親和性の向上につながることを示唆されました。①溶液中でのペプチドの構造が MDM2 に結合する形にプレオーガナイズされることで、MDM2 に速く結合できるようになる。②ペプチドがタンパク質に結合した状態でも構造が安定化しているため、より強固に相互作用が形成されタンパク質から解離しにくくなる。

こうして、我々の研究から、タンパク質に高親和性で結合するペプチドを創出する上で、ペプチドの剛直化が有効な戦略であることが示されました。ただし、リガンド側の剛直化の有効性は、標的タンパク質の性質にも依存すると考えられるため、今後、多様なタンパク質に対してリガンド設計とその検証が行われていくことで、ペプチドの剛直化戦略の妥当性がさ

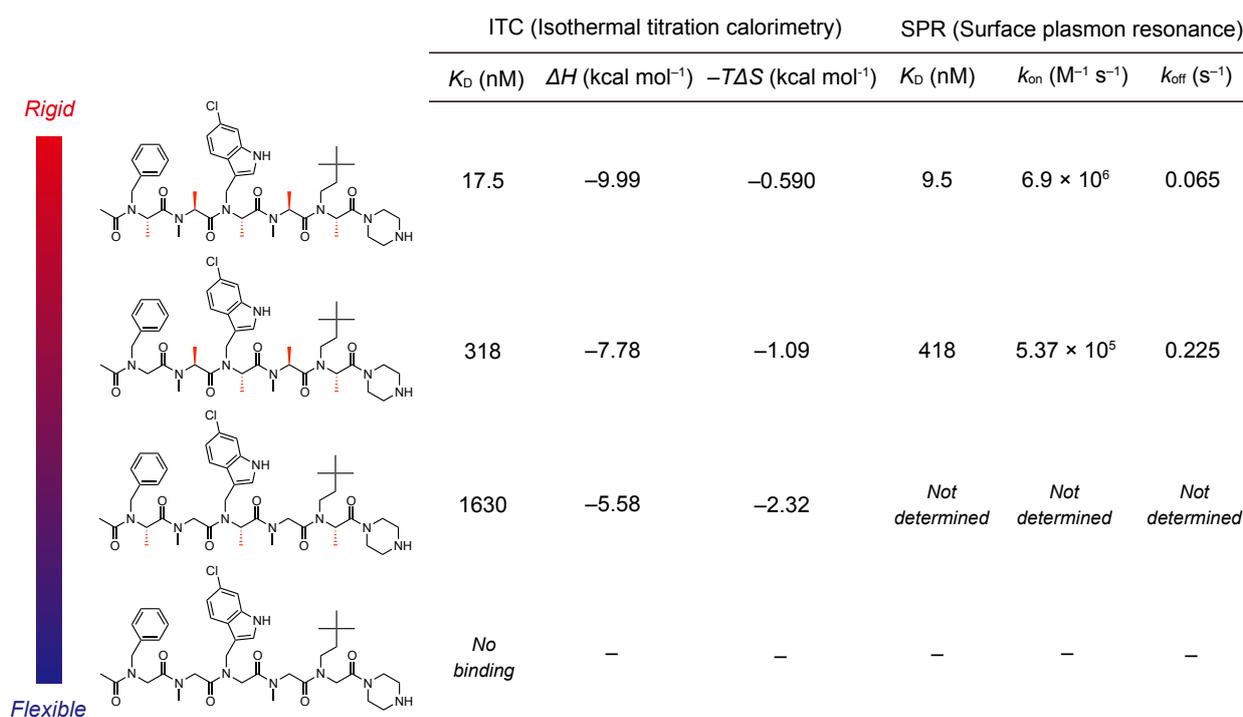


図 3 剛直性を变化させた MDM2 結合性ペプチドの構造と結合に関する熱力学的パラメーターおよび速度論の解析結果 (Reproduced from Ref. 9 with permission from the Royal Society of Chemistry)。

らに検証されていく必要があると考えています。

4. おわりに

これまで示してきた通り、我々は、膜透過性が高いペプチド構造を剛直化することで、細胞内タンパク質に結合するリガンドの合理設計を達成してきました。現在、我々は、このコンセプトの拡張に取り組み、MDM2 以外にも様々な細胞内タンパク質に結合するペプチドの創出に取り組んでいます。ペプチド以外にも、最近では、剛直な小型環状ペプチド骨格に基づくタンパク質リガンド設計なども報告されてきています¹⁰。今後、こうした剛直な分子骨格がさらに拡張していくことで、これまで困難であった細胞内タンパク質阻害剤の創出が加速していくと期待しながら、学生たちと一緒に、日々研究を続けています。

本稿でご紹介した研究は、東京大学の山東信介教授の研究室で実施されました。本研究に関して深い議論を交わしながら一緒に研究を進めてくださった山東教授に深く感謝申し上げます。また、ペプチドの研究と一緒に取り組んでくれた横峰真琳氏と福田泰啓博士をはじめとした全ての学生の皆様に感謝申し上げます。この研究を進めるにあたっては、実験科学・計算科学の両面で多数の専門家と共同研究を行わせていただきました。一緒に研究してくださった全ての方に感謝申し上げます。本研究は、科研費 (JP 19K15692)、AMED (21ak010117h)、JST さきがけ (JPMJPR21AF) の支援を受けて実施されました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

1. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 9367-9371.
2. Eastwood, J. R. B.; Weisberg, E. I.; Katz, D.; Zuckermann, R. N.; Kirshenbaum, K. *Pept Sci* 2023, 115, e24307.
3. Schneider, J. A.; Craven, T. W.; Kasper, A. C.; Yun, C.; Haugbro, M.; Briggs, E. M.; Svetlov, V.; Nudler, E.; Knaut, H.; Bonneau, R.; Garabedian, M. J.; Kirshenbaum, K.; Logan, S. K. *Nat Commun* 2018, 9, 4396.
4. Zhang, S.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Arvidsson, P. I. *Chem Commun* 2006, 497-499.
5. Gao, Y.; Kodadek, T. *Chem Biol* 2013, 360-369.
6. Morimoto, J.; Fukuda, Y.; Kuroda, D.; Watanabe, T.; Yoshida, F.; Asada, M.; Nakamura, T.; Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Tsumoto, K.; Sando, S. *J Am Chem Soc* 2019, 141, 14612-14623.
7. Yokomine, M.; Morimoto, J.; Fukuda, Y.; Shiratori, Y.; Kuroda, D.; Ueda, T.; Takeuchi, K.; Tsumoto, K.; Sando, S. *Angew Chem Int Ed* 2022, 61, e202200119.
8. Fukuda, Y.; Yokomine, M.; Kuroda, D.;

Tsumoto, K.; Morimoto, J.; Sando, S., *Chem Sci* 2021, 12, 13292-13300.

9. Yokomine, M.; Morimoto, J.; Fukuda, Y.; Ueda, T.; Takeuchi, K.; Umezawa, K.; Ago, H.; Matsuura, H.; Ueno, G.; Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Tsumoto, K.; Sando, S. *Chem Sci* 2024, 15, 7051-7060.
10. Salveson, P. J.; Moyer, A. P.; Said, M. Y.; Gökçe, G.; Li, X.; Kang, A.; Nguyen, H.; Bera, A. K.; Levine, P. M.; Bhardwaj, G.; Baker, D. *Science* 2024, 384, 420-428.

もりもと じゅんぺい
東京大学 大学院工学系研究科
化学生命工学専攻 山東研究室
jmorimoto@chembio.t.u-tokyo.ac.jp
https://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sandolab/Morimoto_Jumpei.html

主鎖配座制御による 二次構造ミメティクスの開発

1. はじめに

皆様、初めまして。北海道大学大学院薬学研究院の渡邊瑞貴と申します。私が日本ペプチド学会に入会したのは2017年と比較的最近のことです。この度、伝統あるペプチドニュースレターに寄稿するという貴重な機会を頂きましたこと、京都大学の後藤佑樹先生に心より御礼申し上げます。



渡邊 瑞貴

私は北海道大学大学院薬学研究院で周東智教授(現・同大名誉教授)のご指導のもと、2008年に学位を取得しました。その後、約2年間の米国留学、京都大学 iCeMS / 化学研究所(上杉志成教授の研究室)を経て、2015年の秋に北海道大学に戻りました。学生時代からこの時まで、私は主に生理活性を有する小分子リガンドを基盤とした創薬化学研究・ケミカルバイオロジー研究に従事しており、ペプチド性化合物を扱うことはほとんどありませんでした。そのため、ペプチド学会とは無縁でした。しかし、北海道大学への異動を契機に、研究対象の化合物のサイズを少し大きくすることに挑戦し、ペプチドに手を出し始めました。そのような折、とある学会にて小松徹先生(東京大学)から「若ペプ」の存在を教えて頂き、2017年に長崎で開催された「若ペプ」に初めて参加したことが、ペプチド学会に加わったきっかけです。この時に受けた衝撃的なまでの「若ペプ」の“熱気”は、今でも忘れられません(特に夜の部・笑)。

本稿では、私が取り組んでいる配座制御されたアミノ酸ユニットを基盤とした二次構造ミメティクス開発の概要について紹介させていただきます。

2. タンパク質二次構造と δ -ペプチドフォルダマー

皆様ご存知のことで恐縮ですが、タンパク質の機能発現にはその秩序ある二次構造 (α -ヘリックス, β -シート, β -ターンなど) が重要な役割を果たしています。新たな創薬モダリティとして注目される中分子ペプチドミメティクスの開発において、タンパク質二次構造の模倣・安定化を図る分子設計は基本戦略の一つとなりえます。この設計戦略に基づいたとき、特定の二次構造に折り畳まれる人工オリゴマー分子“フォルダマー”の開発・機能化が一つの分子リソースになります。国内では、田中正一先生、大庭誠先生、出水庸介先生らを中心に α, α -二置換アミノ酸を効果的に用いた機能性 α -ペプチドフォルダマーの開発が精力的に進められています¹。また、脂肪族 β -および γ -アミノ酸を構成単位に用いた β -および γ -ペプチドフォルダマーも数多く開発されており、特定のタンパク質間相互作用を阻害する分子としての応用例も報告されています²。さらに、 δ -アミノ酸を構成単位に用いた δ -ペプチドフォルダマーも開発されていますが、そのほとんどはキノリンオリゴマー³やトリスピリジン⁴を基盤とした芳香族オリゴアミドであり、脂肪族 δ -ペプチドフォルダマーの報告例は限られます。オキセタンやフラノース骨格の δ -糖アミノ酸のオリゴマーを除けば、私が本研究に着手した当時、脂肪族ホモ δ -ペプチドフォルダマーの報告はわずか2例しかありませんでした^{5,6}。その構造解析も、円偏光二色性 (CD) または NMR 測定によって溶液中で一定の二次構造を形成していることを示唆するにとどまっていた。

δ -アミノ酸の骨格長 (NH-C-C-C-C-CO) は、天然ジペプチド単位 (NH-C-CO-NH-C-CO) とほぼ同一です。すなわち、安定した二次構造をもつ δ -ペプチドは、天然 α -ペプチドの効果的なミメティクスとして機能する可能性があります。一方で、前述のように、脂肪族 β -または γ -ペプチドのフォルダマーに比べて脂肪族ホモ δ -ペプチドフォルダマーの報告数は著しく少なく、その詳細な三次元構造解析に至った例は皆無です。この事実は、 β -および γ -アミノ酸に比べて長い骨格をもつ脂肪族 δ -アミノ酸の配座を効果的に制御し、安定な二次構造をもつフォルダマーの

構成単位とすることが容易ではないことを示唆しています。そこで私は、フォルダマーの拡張、さらにはペプチドミメティクスとしての応用を視野に入れ、シクロプロパン骨格を主鎖にもつアミノ酸を構成単位に用いることで、脂肪族ホモ δ -ペプチドフォルダマーを合理的に設計・開発できるのではと考えました。

3. シクロプロパンによる配座制御

私は、周東智先生のもので、シクロプロパンの構造的特徴を活かして分子の三次元構造を厳密に制御する分子設計戦略に基づく、生理活性小分子リガンドの開発をしてきました⁷。シクロプロパンは化合物の配座をシス型またはトランス型に制限でき、かつ、最小の環構造のため標的タンパク質と結合する際の立体障害になりにくいという特徴があります。さらに、四員環以上のシクロアルカンと異なり環反転が起こらず、配座の自由度が全くありません。そのため、シクロプロパン環上のシス位置換基はエクリプス配座で固定され、置換基間に強い立体反発 (シクロプロパン歪み, 図 1a) が生じます⁸。この立体的効果は、シクロプロパン炭素 (C1) と隣接位 sp^3 炭素 (C1') 間の C-C 結合回転を制限し、C1' 位上の最小置換基をシクロプロパン側に配向させます。これらシクロプロパンの配座制御効果より、シクロプロパンと隣接する二つの不斉炭素を有する α, δ -二置換シクロプロパン δ -アミノ酸 (5-アミノ-3,4-メタノ-2,5-二置換ペンタン酸, **1**, 図 1b) の配座 (主鎖二面角) は、その立体化学に依存して厳密に制御されます。モデリング計算に基づき、特定の立体異性体 ($\alpha R, \beta S, \gamma S, \delta R$)-**2** (図 1c) を構成単位としたホモ δ -ペプチドを、ヘリカル構造を自発的に形成する分子として設計しました。

4. ヘリカル構造を形成する δ -ペプチドフォルダマーの開発

まず、光学活性グリシドール (**3**) から 19 工程で、($\alpha R, \beta S, \gamma S, \delta R$)-**2** の *N*-Boc 体 (**4**) および Me-エステル体 (**5**) を立体特異的に合成しました (図 2)。これら δ -アミノ酸ユニットの NOE 実験の結果、 α 位と δ 位の最小置換基 (すなわち H 原子) がともにシクロ

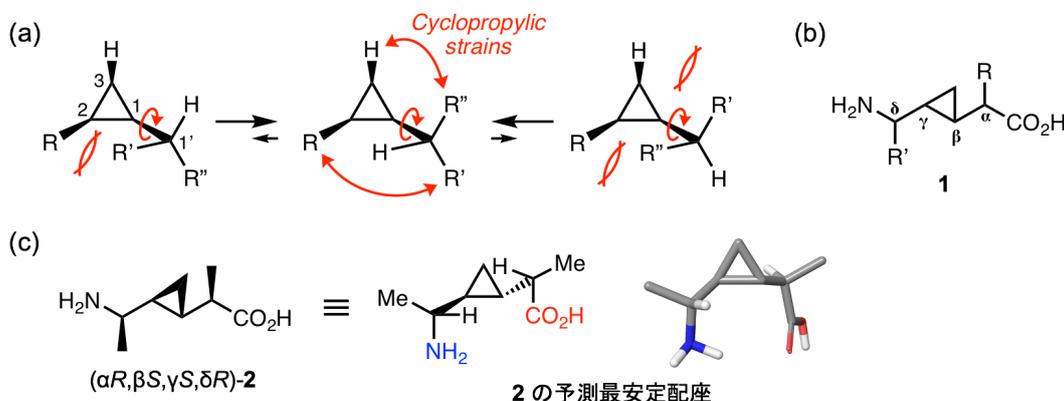


図 1 (a) シクロプロパンの構造特性 (シクロプロパン歪み) の立体的効果によって生じる配座制限; (b) α, δ -二置換シクロプロパン δ -アミノ酸 (**1**) の化学構造; (c) **1** の 16 個ある立体異性体の一つ、($\alpha R, \beta S, \gamma S, \delta R$)-**2** の化学構造および MacroModel 10.9 (Schrödinger 社) を用いてモンテカルロ構造探索 (力場: MMFFs, 溶媒: H_2O) により求めた **2** の最安定配座。 α 位と δ 位以外の非極性水素原子は省略している。

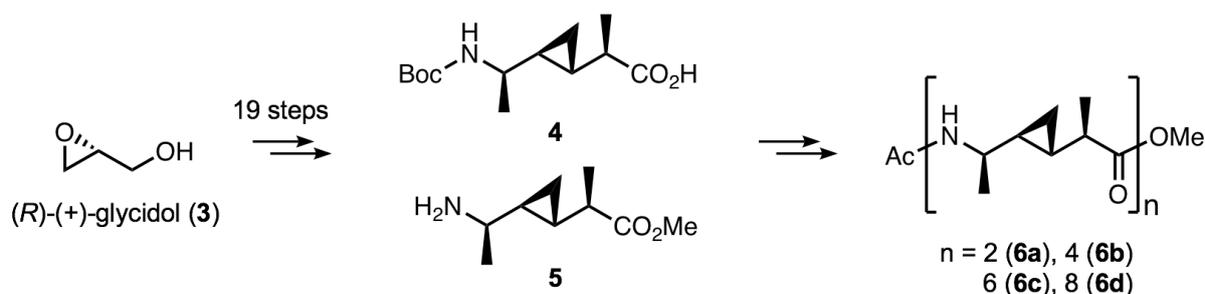


図2 ホモ δ -ペプチド (6a-d) の合成経路の概略

プロパン側を向いていることが分かりました。すなわち、期待通りにシクロプロパン歪み効果が働き、計算結果 (図 1c) に一致する配座であることが確認できました。このモノマーを液相にて順次縮合し、二、四、六および八量体のホモ δ -ペプチド 6a-d を得ました。

合成したホモ δ -ペプチドの MeOH 溶液の CD を種々の濃度 (0.01–0.1 mM)・温度 (0–60 度) 下で測定しました。その結果、四、六、および八量体 6b-d は濃度や温度による影響を受けずに安定かつ同一の二次構造をとることが示されました。

さらに NMR 測定による詳細な構造解析を行いました。その結果、このペプチドがヘリカル構造を形成していることを支持する、化学構造的に離れたプロトン間での NOE 相関が複数観測されました。さらに、NOE 情報や 3J カップリング定数を拘束条件に用いた分子モデリング計算からも、本ペプチドが溶液中でヘリックスであることが推定されました。

また、MeOH を用いた溶媒拡散法により四量体 6b の単結晶が得られ、X 線結晶構造解析に成功しました (図 3)。この 6b は、分子設計で期待した通りの右巻きヘリカル構造であり、14 員環水素結合もすべて観察されました (図 4)。また、結晶構造中の主鎖の二面角は、四残基すべてにおいて非常に均一であり (θ , $-81.2^\circ \sim -89.2^\circ$; ζ , $141.2^\circ \sim 146.7^\circ$; ρ , $-79.0^\circ \sim -85.4^\circ$)、また、分子設計のモデリング計算で得られた三次元構造における二面角とほぼ同一でした。四量体という長さであっても、溶液中および結晶中の両方で安定な右巻き 14-ヘリカル構造を形成する脂肪族 δ -ペプチドフォルダマーの開発に成功しました⁹。

5. ストランド構造を形成する γ -ペプチドフォルダマーの開発

ヘリックスの開発に成功したので、次に私は、ストランドフォルダマーの開発を計画しました。ヘリカル構造分子と異なり、ストランド構造を形成する機能性フォルダマーの報告例は非常に少なく、六員環構造を直接連結させたオリゴマーの例がわずかにあるのみです。私は、キラルな γ -置換シクロプロパン- γ -アミノ酸を用いることで、単一分子で β -ストランドのように側鎖を同一面に配向する β -ストランド様フォルダマーを開発できました¹⁰。すなわち、シクロプロパン- γ -アミノ酸の配座は、前述のシクロプロパンの構造特性に加え、シクロプロパンに隣接するカルボニ

ル基がシクロプロパンを二等分する配座を優先する性質によって制御されます⁸。安定なストランド構造の形成を期待したシクロプロパン γ -アミノ酸オリゴマーを分子モデリング計算に基づき設計し、二量体 (7, 図 4a) を実際に合成しました。微小結晶電子回折 (Micro ED) 法による結晶構造解析に成功し、7 は同じ面に側鎖を配向した β -ストランド様構造であることを確認できました (図 4b)。また、溶液中の三次元構造も、ROE および NOE 相関シグナルから、ストランド構造であることが示唆されました。

6. おわりに

私は、シクロプロパンの構造的特徴によって主鎖二面角が厳密に制御されたシクロプロパンアミノ酸を構成単位に用いることで、ヘリカル構造およびストランド構造をとるペプチドフォルダマーを合理的に設計し、創出しました。ペプチド主鎖に含めたシクロプロ

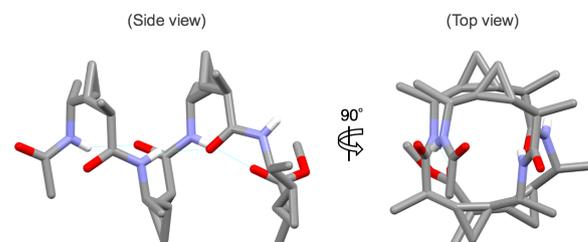


図3 6b の X 線結晶構造の側面図および上面図。溶媒和分子と非極性水素は省略している。

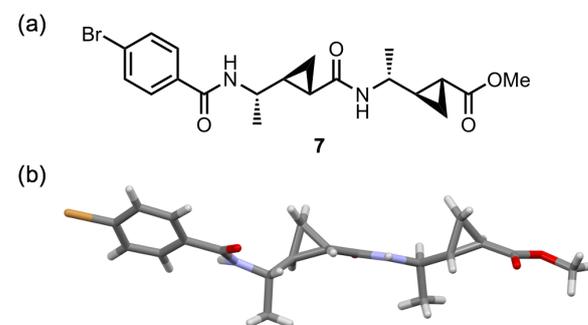


図4 (a) シクロプロパン γ -アミノ酸の二量体 (7) の化学構造; (b) 7 の Micro ED 法で得られた結晶構造。側鎖のメチル基が同一面に配向したストランド構造になっている。

パンで、ペプチド分子全体の三次元構造を高い精度でコントロールできることを意味します。さらに様々な二次構造ミメティクスを開発し、機能化および三次構造の構築へと展開できればと思っています。

本稿で紹介した内容は、北海道大学 周東智 名誉教授のご指導のもと、同大学院薬学研究院・創薬有機化学研究室の学生諸氏と共に行った研究の成果です。彼らの努力に敬意と謝意を表します。周東先生のご退官に伴い同研究室は閉じられてしまいましたが、同研究室のマインドを引き継いでいければと思っています。また、諸先生方から多大なご協力を賜りました。この場を借りて心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Misawa, T.; Ohoka, N.; Oba, M.; Yamashita, H.; Tanaka, M.; Naito, M.; Demizu, Y. Chem Commun 2019, 55, 7792-7795.
2. Grison, C. M.; Wilson, A. J.; Aitken, D. J. et al. Angew Chem Int Ed 2016, 55, 11096-11100.
3. Jiang, H.; Leger, J. M.; Huc, I. J Am Chem Soc 2003, 125, 3448-3449.
4. Ernst, J. T.; Becerril, J.; Hamilton, A. D. et al. Angew Chem Int Ed 2003, 42, 535-539.
5. Arndt, H.-D.; Ziemer, B.; Koert, U. Org Lett 2004, 6, 3269-3272.
6. Zhao, X.; Jia, M.-X.; Chen, G.-J. et al. J Org Chem 2004, 69, 270-279.
7. Watanabe, M.; Hirokawa, T.; Shuto, S. et al. J Med Chem 2010, 53, 3585-3593.
8. Mizuno, A.; Matsui, K.; Shuto, S. Chem Eur J 2017, 23, 14394-14409.
9. Nagata, M.; Watanabe, M.; Shuto, S. et al. Org Biomol Chem 2023, 21, 970-980.
10. Unpublished data

わたなべ みずき
北海道大学 大学院薬学研究院
(mwatanab@pharm.hokudai.ac.jp)

新編集委員長



北條 裕信

ペプチドニュースレターの
新編集委員長を務めます大阪
大学蛋白質研究所の北條です。
私が以前に編集委員をしていたのはもう 15 年以上前です。
現在の状況をあまり理解できて
いませんが、編集委員や森川
さんのご尽力により、ニュース
レターの編集が以前よりずっ
と効率化されているように感
じます。この 4 月より出版担当理事を中心に Peptide
Science のあり方が議論されつつあり、それにともな
いニュースレターもどのような存在であるべきか、今

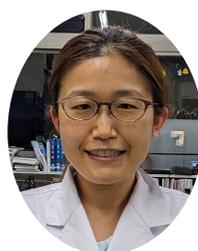
後、会員の皆さまと一緒に考えていきたいと考えて
おります。これからどうぞよろしくお願い申し上げます。

新編集委員



中川 夏美

北海道大学大学院理学研究
院の中川夏美です。4 年間 PNJ
の編集委員をお務めになった
巢山慶太郎先生から引き継ぎ
ました。ペプチド学会に入会
してから今年で 11 年目、よう
やく皆様のお役に立てるこ
とを大変嬉しく思います。不慣
れではございますが、編集委
員の皆様と協力して、ペプチ
ド科学に関連する多彩な研究内容および情報をお届け
いたしたいと思っています。どうぞよろしくお願いいたし
ます。



大橋 南美

昭和薬科大学医薬分子化学
研究室の大橋南美と申します。
本年より、薬師寺文華先生
に代わって PNJ の編集委員を
担当させていただくこととな
りました。編集委員として、ペ
プチド関連研究や学会の情
報を皆さまにお届けすることで、
日本ペプチド学会の益々の発
展に貢献できるよう努めたい
と思っています。どうぞよろしくお願い申し上げます。

日本ペプチド学会からのお知らせ

《日本ペプチド学会 第 18 期役員》

- 会 長** 大高 章 (徳島大)
副会長 二木 史朗 (京都大)
理 事 玉村 啓和 (東京医科歯科大) [庶務担当]
伊東 祐二 (鹿児島大) [会計担当]
北條 裕信 (大阪大) [広報担当]
坂口 和靖 (北海道大) [渉外担当]
小出 隆規 (早稲田大) [産学連携担当]
林 良雄 (東京薬科大)
[会員・ダイバーシティ推進担当]
松浦 和則 (鳥取大) [若手担当]
向井 秀仁 (長浜バイオ大) [出版担当]
- 監 事** 藤井 郁雄 (大阪公立大)
松崎 勝巳 (京都大)
- 評議員** 赤路 健一 (京都薬科大)
大石 真也 (京都薬科大)
大角 幸治 (国産化学)
岡松 亨 (味の素)

金井 和昭 (JITSUBO)
栗山 尚浩 (ワイエムシィ)
今野 博行 (山形大)
後藤 佑樹 (京成大)
佐竹 炎 (サントリー生命科学財団)
重永 章 (福山大)
菅 裕明 (東京大)
相馬 洋平 (和歌山県立医科大)
高山 健太郎 (京都薬科大)
出水 庸介 (医薬品食品衛生研究所)
土井 隆行 (東北大)
中瀬 生彦 (大阪公立大)
鳴海 哲夫 (静岡大)
関 正博 (神戸天然物化学)
野村 涉 (広島大)
長谷 俊治 (蛋白質研究奨励会)
平井 雅寛 (長瀬産業)
深瀬 浩一 (大阪大)
松島 綾美 (九州大)
村上 裕 (名古屋大)
森脇 浩樹 (浜理薬品工業)
薬師寺 文華 (長崎大)
吉矢 拓 (ペプチド研究所)
渡邊 路維 (渡辺化学工業)

《2024 年度行事予定》

2024 年 8 月 7 日 (水) ~ 9 日 (金)
第 56 回若手ペプチド夏の勉強会
場 所：皆生温泉 三井別館
世話人：稲葉 央, 岩崎 崇 (鳥取大)

2024 年 10 月
Peptide Newsletter Japan No. 134 発行

2024 年 10 月 28 日 (月)
第 117 回理事会・第 43 回評議員会合同会議

2024 年 10 月 29 日 (火) ~ 31 日 (木)
第 61 回ペプチド討論会
場 所：名古屋大学 豊田講堂
世話人：村上 裕, 林 剛介 (名古屋大)

2024 年 10 月 30 日 (水)
2024 年度日本ペプチド学会通常総会

2024 年 11 月 2 日 (土)
市民フォーラム 2024
場 所：名古屋大学 工学部 1 号館

2025 年 1 月
第 118 回理事会

2025 年 1 月
Peptide Newsletter Japan No. 135 発行

《海外関連学会 (2024 年度トラベルアワード対象)》

2024 年 8 月 25 日 ~ 30 日
37th European Peptide Symposium/14th International Peptide Symposium
Florence, Italy
<https://eps2024.com/>

編集後記

ペプチドニュースレター No. 133 号はいかがでしたでしょうか？ 本号では「rational design による de novo 機能性ペプチドの創製」をテーマとして、3 本の研究紹介記事をお届けいたしました。本学会には生物活性・生理活性をはじめとした機能性ペプチドの創製を指向した研究を展開されている研究者が多くいらっしゃいます。天然由来のペプチドの誘導化や大規模ライブラリーのスクリーニングに頼った方法論も広く行われていますが、今回は「人の手でイチから設計することで機能性ペプチドを開発」しようとする研究例に絞って紹介させていただきました。計算化学・機械学習・高度な合成化学など幅広い手法を駆使した最先端の挑戦的研究の特集になったと自負しております。改めて執筆者の先生方にこの場を借りて感謝申し上げます。

133 号アンケートフォーム URL：
<https://forms.gle/idQbeu22uTw7X3BB9>

(編集委員：後藤 佑樹)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN
編集・発行：日本ペプチド学会
〒562-0015 箕面市稲 4-1-2
一般財団法人蛋白質研究奨励会内
発行日：2024 年 7 月 31 日

編集委員
北條 裕信 (担当理事) (大阪大学 蛋白質研究所)
TEL 06-6879-8601
E-mail: hojo@protein.osaka-u.ac.jp
中川 夏美 (北海道大学 大学院理学研究院)
TEL 011-706-2712
E-mail: n-nakagawa@sci.hokudai.ac.jp
後藤 佑樹 (京都大学 大学院理学研究科)
TEL 075-753-4002
E-mail: goto.yuki.4x@kyoto-u.ac.jp
武居 俊樹 (大阪大学 蛋白質研究所)
TEL 06-6879-8602
E-mail: toshiki.takei@protein.osaka-u.ac.jp
大橋 南美 (昭和薬科大学 医薬分子化学研究室)
TEL 042-721-1581
E-mail: ohashi@ac.shoyaku.ac.jp

(本号編集担当：後藤 佑樹)