

最終報告

## 膜タンパク質合成が拓く創薬新技術「ミラーイメージ創薬」

研究代表者：大高 章 徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授

共同研究者：奥平桂一朗 大阪医科薬科大学 教授  
重永 章 福山大学薬学部 教授



**1. 研究の背景と達成目標** 内因性ペプチドは、膜タンパク質受容体に結合し多彩な生理活性を示し、魅力的な創薬シードである。しかし、プロテアーゼにより分解されるため創薬展開は困難である。内因性ペプチド、プロテアーゼは、ともにL-アミノ酸から構成されるL-ペプチド、L-タンパク質でありL vs Lの関係が成立し、分解される。一方、内因性ペプチドの鏡像体であるD-ペプチドは、プロテアーゼとはD vs Lの関係となり、分解されない。そこで、D-ペプチドの創薬展開があるが、これに活性はない。これは、D-ペプチドがL-タンパク質のL-細胞膜タンパク質受容体には、D vs Lの関係のため、結合しないためである。ここで視点を変え、もしD-膜タンパク質受容体に結合するL-ペプチドが取得できれば（D vs Lの関係が成立するが結合）、取得したL-ペプチドの鏡像体であるD-ペプチドは、生体が本来有するL-膜タンパク質受容体に結合し、さらに生体内では安定に存在するため、極めて有望な創薬シードとなる。この概念は、「ミラーイメージ創薬」であり、同概念の可溶性タンパク質への展開が近年進みつつあるが、最大の創薬標的である膜タンパク質への展開は皆無である。これは、膜タンパク質の化学合成がまだ達成されていないことが最大の理由である。そこで、下記に示すような達成目標を掲げた。

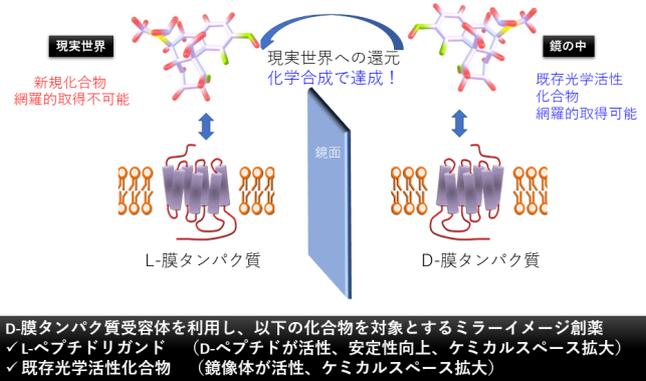


図1 ミラーイメージ創薬の概念図

① 膜タンパク質の化学合成を行う

不溶性タンパク質に適した新たな反応場の開発  
新反応場を利用した膜タンパク質合成

② 合成膜タンパク質の活性評価とリガンド取得と「ミラーイメージ創薬」への展開

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

膜タンパク質は難水溶性であり、これまで汎用されてきた合成手法を用いることができない点が大きな問題であった。新たな反応場の開発とならび膜タンパク質を構成するペプチドフラグメントの合成や縮合に資する方法論の開発も併せて行った。

① 難水溶性タンパク質合成のための反応場開発 反応場の開発という観点から、難水溶性タンパク質の合成に取り組んだ試みは殆どない。我々は、脂質ナノディスクを反応場とする方法論を開発した。これにより、膜貫通ペプチドの合成が可能となった。学術的には意義深いと考えているが、その一般化には、周辺関連技術の開発が不可欠であることが明らかとなった。

② ペプチド結合形成促進触媒の開発 脂質ナノディスクに組み込んだ難溶性ペプチドフラグメント

への縮合反応を促進する触媒を開発した。本触媒はアミド形成を促進するのみならず、反応後、不要となった Cys のチオール基を脱硫除去する反応を妨害しない、従来にない優れた触媒であることを明らかにした。本触媒は一般のペプチド・タンパク質合成においても有用な触媒であることが明らかとなった。

③ 脂質ナノディスク担持フラグメントの N 末 Cys 脱保護法の開発 脂質ナノディスク担持フラグメントの

N 末には、続くペプチド鎖の伸長のために保護基のない Cys 残基が必要となる。すなわち、脂質ナノディスク上での保護 Cys 残基 (Thz) の脱保護が必要となる。本反応が中性緩衝液中で二価銅塩により進行することを見出した。また、本新反応の発見を契機として、ペプチド・タンパク質の Trp, Tyr あるいは S-保護システイン残基側鎖を酸化修飾する新反応を見出した。これらは、学術的に意味深いのみならず、ペプチド創薬において有用な方法論を提供するものである。

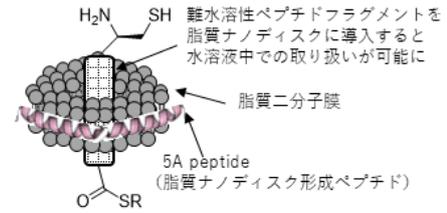


図2 難溶性ペプチドのナノディスクへの担持

3. 研究成果

本研究課題における最大の課題は、膜タンパク質化学合成法の開発であった。膜貫通ペプチドフラグメントが、タンパク質合成法である NCL 法の必須反応溶媒 (水系 Buffer) に溶解しないことが最大の問題であった。そこで、難水溶性の膜貫通フラグメントを脂質ナノディスクに組み込み (図 2)、水溶性物質に見せかけ、脂質環境下での NCL 反応によるフラグメント縮合について検討を加えた。

まず、脂質ナノディスク中で難水溶性フラグメントが、水溶性物質として挙動することを確認した。次いで、脂質ナノディスク担持ペプチド同士の NCL 反応を検討したが、全く進行しなかった (図 3A)。一方、担持ペプチドに対して、水溶性フラグメントを NCL 法で縮合したところ、反応は進行した (図 3B)。

そこで、この知見を利用してインフルエンザウイルスが有する 97 残基からなる 1 回目膜貫通 M2 タンパク質 6 の合成を行った (図 4)。脂質ナノディスク担持膜貫通フラグメント 1 に対し、まず、その C 末側に NCL 法で水溶性フラグメント 2 を縮合、次いで N 末 Cys の Thz を脱保護し、これに N 端側フラグメント 5 を NCL 法で縮合することで、膜担持型インフルエンザ M2 タンパク質 6 の合成を達成した。さらに、脂質ナノディスクに反応パートナーとなる 2 種類のペプチドを担持すると、ペプチド間同士の NCL 反応の円滑な進行を確認した。本

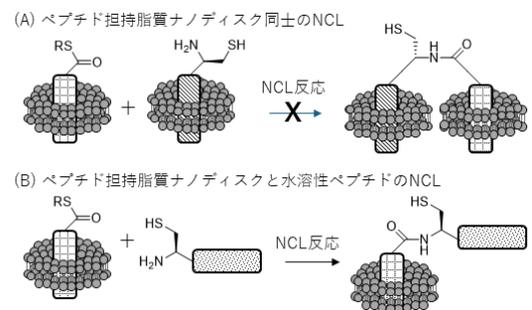


図3 脂質ナノディスクを利用した NCL 反応

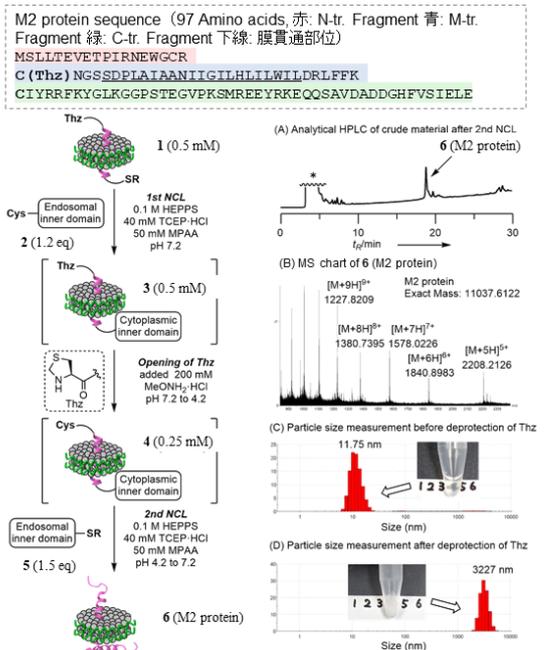


図4 インフルエンザ M2 タンパク質合成

合成過程において、脂質ナノディスクの崩壊（リポソームへの融合）そして脂質ナノディスク再構成現象が起こることを見出した。本現象を利用することで、個別の脂質ナノディスクに組み込んだ難水溶性フラグメント（7,8）を、上記の崩壊—再構成システムに付すことで、単一脂質ナノディスク上で二つのフラグメントの縮合が可能で、おそらく2回膜貫通型タンパク質9が生成しているであろうと予想した（図5）。

そこで、ミラーイメージ創薬への展開を目標として、ミトコンドリア内膜に存在するATP synthetaseのF<sub>0</sub>ドメインの合成を開始した。本タンパク質は79アミノ酸からなる2回膜貫通型であり、これが膜中で10量体

となり、この複合体がイオンチャンネルを形成することが知られている。そこで、F<sub>0</sub>ドメインを2つのフラグメントに分割し、個々のフラグメントの合成について検討を行ったが、極めて溶解性が悪く、脂質ナノディスク上での縮合に必要なフラグメントの取得に至っていない。難溶性ペプチドを水溶性にすべく、可溶性タグをペプチドに導入、本ペプチドのナノディスクへの導入を行い、ナノディスク上でのタグ除去を行っているが、最適条件を見出すには至っていないのが現状である。ここまですべてを簡単に総括すると、本研究を通じて、従来不可能とされていた難水溶性のペプチドフラグメントの縮合が脂質ナノディスクを利用することで可能であることまでは確認できた。しかし、あらゆる難水溶性ペプチドフラグメントの縮合に適応可能であるかという点で、まだまだ検討すべき課題が山積している。

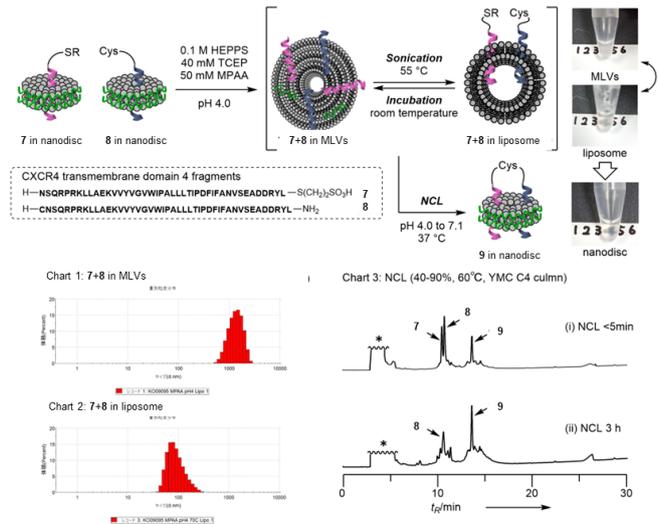


図5 二回膜貫通モデルの合成

#### 4. 今後の展開

本研究における最大の難関である難水溶性膜タンパク質の化学合成について、当初計画した脂質ナノディスクを反応場とする方法論のみでは、この難題を解決するには至らないことが明らかになってきた。いかに問題点及び検討すべきことを列挙する。

##### ① 脂質反応場の安定性および脂質環境下におけるペプチドの運動性の問題

条件により縮合反応が進行する場合がある一方、全く進行しないケースがあるなど、個々のペプチドフラグメントごとに状況が大きく異なり、合成戦略の一般化に至っていない。安定性に優れ、かつペプチドの運動性を担保できるような、脂質ナノディスクに代わる環境が必要と考えている。

##### ② 膜貫通フラグメントの水溶性改善の問題

難水溶性ペプチドの可溶化ならびに合成効率の向上に関する事項は、ペプチド合成化学における大きな検討課題である。これに資する方法論がF<sub>0</sub>ドメインの合成においても記述したペプチドへの可溶性タグの導入である。我々も可溶性タグの導入による解決を目指したが、脂質環境下でのタグ切断に至っていないのが現状である。この課題解決に向けてもおそらく、安定かつペプチドの運動性を担保できる脂質環境の開発が不可欠と考えられる。

最終的には、膜タンパク質の化学合成を経て、ミラーイメージ創薬への展開に到達することはできなかったが、本研究を推進する過程で、ペプチド・タンパク質科学の発展に資する有機化学的方法論を開発することができた。これらは、ペプチド・タンパク質化学の発展に大いに貢献できるものと考えている。

## 5. 発表実績

### 【論文】

1. Ohkawachi, K.; Kobayashi, D.; Morimoto, K.; Shigenaga, A.; Denda, M.; Yamatsugu, K.; Kanai, M.; Otaka, A. Sulfanylmethyl dimethylaminopyridine as a Useful Thiol Additive for Ligation Chemistry in Peptide/Protein Synthesis. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5289-5293.
2. Kobayashi, D.; Naruse, N.; Denda, M.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Deprotection of S-acetamidomethyl cysteine with copper(ii) and 1,2-aminothiols under aerobic conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 8638-8645.
3. Kobayashi, D.; Kohmura, Y.; Hayashi, J.; Denda, M.; Tsuchiya, K.; Otaka, A. Copper(ii)-mediated C–H sulphenylation or selenylation of tryptophan enabling macrocyclization of peptides. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 10763-10766.
4. Kobayashi, D.; Kohmura, Y.; Sugiki, T.; Kuraoka, E.; Denda, M.; Fujiwara, T.; Otaka, A. Peptide Cyclization Mediated by Metal-Free S-Arylation: S-Protected Cysteine Sulfoxide as an Umpolung of the Cysteine Nucleophile. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 14092-14099.
5. Kobayashi, D.; Kuraoka, E.; Hayashi, J.; Yasuda, T.; Kohmura, Y.; Denda, M.; Harada, N.; Inagaki, N.; Otaka, A. S-Protected Cysteine Sulfoxide-Enabled Tryptophan-Selective Modification with Application to Peptide Lipidation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 1125-1130.
6. Otaka, A. Development of Naturally Inspired Peptide and Protein Chemistry. *Chem. Pharm. Bull.* **2022**, *70*, 748-764.
7. Sato, D.; Denda, M.; Tsunematsu, H.; Tanaka, N.; Konishi, I.; Komiyama, C.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Late-stage macrolactonisation enabled by tandem acyl transfers followed by desulphurisation. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 2918-2921.
8. Ohkawachi, K.; Anzaki, K.; Kobayashi, D.; Kyan, R.; Yasuda, T.; Denda, M.; Harada, N.; Shigenaga, A.; Inagaki, N.; Otaka, A. Residue-Selective C–H Sulphenylation Enabled by Acid-Activated S-Acetamidomethyl Cysteine Sulfoxide with Application to One-Pot Stapling and Lipidation Sequence. *Chem. Eur. J.* **2023**, e202300799.
9. Kota Hidaka, K.; Kobayashi, D.; Hayashi, J.; Denda, M.; Otaka, A. Advanced Insulin Synthesis by One-pot/stepwise Disulfide Bond Formation Enabled by Acid-activated S-Protected Cysteine Sulfoxide in the Presence of Chloride Anion. *Chem. Eur. J.* **2023**, e20241003.
10. Kobayashi, D.; Deda, M.; Hayashi, J.; Hidaka, K.; Kohmura, Y.; Tsunematsu, T.; Nishino, K.; Yoshikawa, H.; Ohkawachi, K.; Nigorikawa, K.; Yoshimaru, T.; Ishimaru, N.; Nomura, W.; Katagiri, K.; Kosako, H.; Otaka, A. Sulfoxide-mediated Cys-Trp-selective bioconjugation that enables protein labeling and peptide heterodimerization. *ChemistryEurope* **2024**, e202400014.
11. Hayashi, J.; Kobayashi, D.; Namikawa, C.; Denda, M.; Otaka, A. Synthesis of N-Glyoxylyl Peptides Enabled by a Lossen Rearrangement-Induced Intramolecular Redox Reaction of N-Terminal Glycyl Hydroxamic Acid. *Org. Lett.* **2024**, 4246-4250.
12. Hayashi, J.; Kobayashi, D.; Denda, M.; Otaka, A. Late-Stage Formation of a Sactionine Linkage Enabled by Lossen Rearrangement of Glycyl Hydroxamic Acid. *Org. Lett.* **2024**, *26*, 5167-5171.

### 【学会発表】

江口 亜希, 大川内 健人, 大平 実佳, 傳田 将也, 大高 章、脂質ナノディスクを利用した難溶解性膜タンパク質化学合成法の開発、第 62 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2023 年 10 月

### 【その他】

- 大高 章 2022 年度 日本薬学会賞 受賞
- 大高 章 2023 年度 日本ペプチド学会賞 受賞