

3重らせん構造を骨格とするペプチド創薬

早稲田大学 先進理工学部 化学・生命化学科 生物分子化学教室
小出 隆規

1. 目的

これまでに上市されている医薬品の大部分は、低分子量医薬品、あるいは抗体医薬である。低分子量医薬品は、その合成が容易である一方で、標的特異性の低さが課題である。抗体医薬は数万以上の巨大な分子であることから、標的分子に対して広い相互作用面で相互作用するため(タンパク-タンパク間相互作用, PPI)、標的特異性がきわめて高く、副作用の比較的少ない医薬品として注目されている。しかしながら、その調製の難しさから、コストが高いのが課題である。

その中間の分子量(数百~数千程度)を有するペプチドは、双方の利点をあわせ持つことのできる中分子医薬品の候補として有力である。これまでのペプチド創薬のアプローチとしては、まず薬理活性を有するリード化合物を探索した後、構造活性相関研究によりその活性を向上させる手法が一般的であった。しかしながら、一般にペプチドはプロテアーゼによって容易に分解されてしまうため、さらに生体内安定性を向上させるための改変や修飾をくわえなければならず、in vivoでの利用に耐えうるペプチド性医薬品の開発に至るまでの歩留まりは悪かった。

筆者はこのアプローチを逆転させ、まずin vivoでも安定なペプチド骨格をテンプレートとしたライブラリを構築し、その中から薬理活性を有するペプチドを探索することを考えた。我々はこれまでに、Xaa-Yaa-Gly (Xaa, Yaaは任意のアミノ酸残基)の繰り返し構造からなり、コラーゲン様の3重らせん構造を形成するペプチドを、経静脈あるいは経口で投与すると、それらは代謝を受けることなく尿中あるいは糞便中に排泄されることを見出している。^{1,2}この結果は、3重らせんペプチドが生体内でも安定に存在できることを示している。そこで筆者は、3重らせん構造がペプチド医薬品のテンプレートとして有用であると考えた。我々はこれまでに、3重らせんペプチドに塩基性アミノ酸であるアルギニンを複数導入することで、血清中でも安定な細胞透過性ペプチドを開発している。³この報告は、3重らせんペプチドに生物活性を付与することが可能であることを示している。本研究では、細胞透過性ペプチドと抗菌ペプチドの多くが塩基性かつ両親媒性という共通構造を取っている点に着目し、抗菌性の3重らせんペプチドを探索・開発することとした。

2. 方法

・単鎖ペプチドの合成

単鎖ペプチドの合成はFmoc固相合成法によって行った。ペプチドの精製は逆相HPLCによって行った。それぞれのペプチドの同定には、MALDI-TOF-MSをもちいた。

・3量体ペプチドの合成

単鎖ペプチドを一旦加熱した後に、4°Cで一晩放置することで3重らせん構造を形成させた。つづいて、空気酸化により、3重らせん内でジスルフィド架橋を行った。その後、逆相HPLCによって精製を行った。それぞれのペプチドの同定には、MALDI-TOF-MSをもちいた。

・Colony-forming unit (CFU) アッセイ

大腸菌を含むミュラーヒントン(MH)培地にペプチド溶液をくわえて、15°Cで6時間振盪した。振盪後、ルリアベルターニ(LB)プレート上にサンプル液を播種し、37°Cで一晩放置した後に、コロニー数をカウントした。

・微量培地希釈法

菌を含むMH培地にペプチド溶液をくわえて、37°Cで10時間振盪した。振盪後、目視で培地が濁らなかつたサンプルの最小のペプチド濃度を、最小発育阻止濃度(MIC)とした。比較対照群として、既知の抗菌ペプチドであるマガイニン2をもちいた。

・膜作用性の評価

過去の報告にしたがって、大腸菌のスフェロプラストを調製した。⁴スフェロプラストにHEPESバッファー(pH 7.4)中で、3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide [Disc3(5)]を作用させた。その後ペプチドをくわえて10分後の蛍光強度を観察した。ポジティブコントロールに膜破壊ペプチドとして知られるメリチン、ネガティブコントロールとして電荷を持たない3重らせんペプチドPOG10((Pro-Hyp-Gly)₁₀, Hyp: 4-hydroxyproline)をもちいた。

・顕微鏡による菌の形態観察

10 μMのRR4存在下、MH培地中で大腸菌を37°Cで6時間培養した。その後、グラム染色を行い、顕微鏡で観察

した。

・ゲルシフトアッセイ

化合物とプラスミドベクターpGEX-3Xを混合し、PBS中で24時間、室温で放置した。ポジティブコントロールとしてシスプラチン水溶液をもちいた。その後、3.5%アクリルアミドゲルをもちいて電気泳動し、エチジウムブロミドでDNAを染色し、UVでバンドを観察した。

・血清中安定性評価

ヒト血清中にペプチドをくわえて、37°Cでインキュベーションした。その後、TFAをくわえて除タンパクした後に、上清中に含まれる残存ペプチドの量を逆相HPLCにより定量した。

・溶血活性評価

ペプチドを含むPBS中で、ヒト赤血球を、1時間、37°Cの条件で振盪した。その後、サンプルを遠心し、上清の540 nmにおける吸光度を測定することで、溶血活性を評価した。

・細胞毒性評価

ペプチドを含む無血清DMEM中でHDFを24時間、37°C、5%CO₂の条件でインキュベートした。その後、cell-counting kit-8を用いて生細胞数を定量した。

3. 結果

まず、塩基性で両親媒構造を持つ3重らせんペプチドを合成するために、図1(a)に示すような3種類のペプチドを設計した。それぞれの配列中のBaaには塩基性アミノ酸であるArgあるいはLys、Φaaには疎水性アミノ酸であるPro、Ile、Val、4-fluoroproline、あるいは中性アミノ酸であるHypを配置した。またC末端のCysは3重らせんペプチド内でジスルフィド架橋を行い3重らせん構造を安定化させるため、Tyrは濃度を定量するために導入した。これらのペプチドを組み合わせて3重らせん構造を組ませることとした。

コラーゲンの3重らせん構造は、3本のペプチド鎖が1残基ずつずれながら縊り合わさることで形成される。そのため、3重らせん構造内でそれぞれのペプチドは等価ではない。つまり、3種類のペプチドを混合すると、理論上27種類の3重らせんペプチドが生成する。申請者はこの性質を利用して、理論上189種類の3重らせんペプチドを含むコンビナトリアルライブラリを構築し、その中から抗菌活性を有する3重らせんペプチドをCFUアッセイにより探索した。その結果、抗菌活性を有するペプチドとしてR3を同定した。さらなる構造活性相関研究を経て、より強力な抗菌活性を有するRR4を開発した(図1(b), (c))。

RR4の様々な菌に対する抗菌活性を微量培地希釈法により評価した(表1)。RR4は、大腸菌 ATCC25922株を除いて、R3およびマガニン2よりも強い活性を示した。くわえて、RR4はメシチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)や多剤耐性緑膿菌(VRE)に対しても抗菌活性を示した。

RR4を作用させた大腸菌をグラム染色後に顕微鏡で観察したところ、異常に細胞が伸長していた(図2(a))。

つづいて、RR4の作用機序について検討した。まず、RR4の膜に対する作用を評価した(図2(b))。その評価には脱分極の指標薬となるDisc3(5)をもちいた。Disc3(5)は細菌が分極している状態では、膜中に蓄積し、Disc3(5)自身が持つ蛍光が消光する。その後、脱分極が起きると膜内からDisc3(5)が漏出し、蛍光が回復する。Disc3(5)を処理した大腸菌のスフェロプラストにRR4を作用させると、若干の蛍光回復が確認された。一方でマガニン2を作用させると、蛍光は大きく回復した。

また、ある種の抗菌ペプチドは、DNAと相互作用することで細菌の分裂を阻害し、細胞の異常な伸張を誘

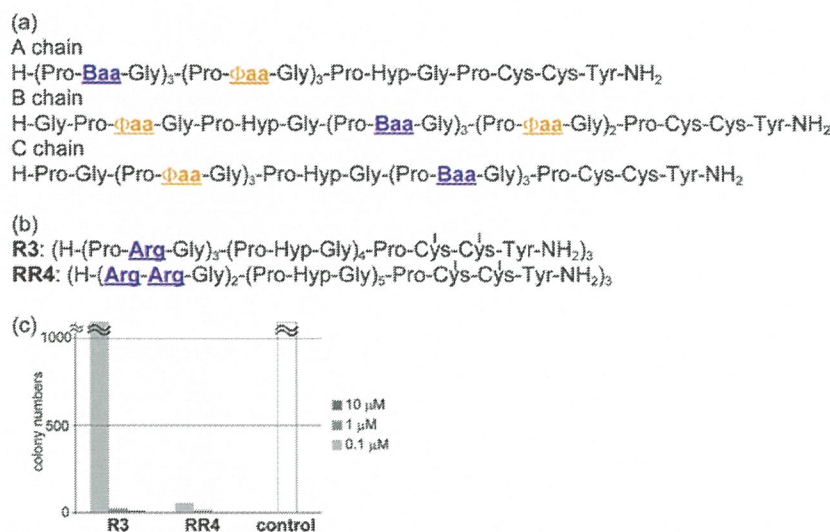


図1: (a) ペプチド鎖の設計。(b) R3 および RR4 の構造式。(c) CFU アッセイの結果。

表1: R3, RR4, マガニン2 の抗菌活性

bacteria	MIC (μM)		
	R3	RR4	Magainin 2
<i>E. coli</i> B	20.0	2.50	5.00
<i>E. coli</i> ATCC25922	>20.0	>20.0	20.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	>20.0	10.0	40.0
MDRP	>20.0	20.0	40.0
<i>B. subtilis</i> IFO13719	1.25	1.25	40.0
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	10.0	5.00	>160
<i>S. aureus</i> 209P FDA	>20.0	10.0	80.0
<i>S. aureus</i> ATCC29213	>20.0	20.0	>160
MRSA	>20.0	20.0	>160

導することが知られている。⁵そのため、RR4とDNAとの相互作用をゲルシフトアッセイで観察した(図2(c))。RR4はDNAに対して重量比1:10でDNAの泳動を有意に阻害し、3:10の重量比で完全に阻害した。一方でマガイニン2では、DNAとの相互作用は観察されなかった。

RR4の血清中での安定性を評価した(図3(a))。90%ヒト血清でRR4を37°Cで6時間処理したところ、50%程度が残存していた。一方でマガイニン2は、1時間の処理でほぼ全量が分解されていた。

さらにRR4の溶血活性と細胞毒性を評価した(図3(b))。RR4は30 μMにおいても、溶血活性はほとんど示さなかった。またヒト皮膚線維芽細胞(HDF)にRR4を作用させたところ、RR4は30 μMで20%程度の細胞死を誘導したが、3 μMではほとんど毒性が観察されなかった(図3(c))。

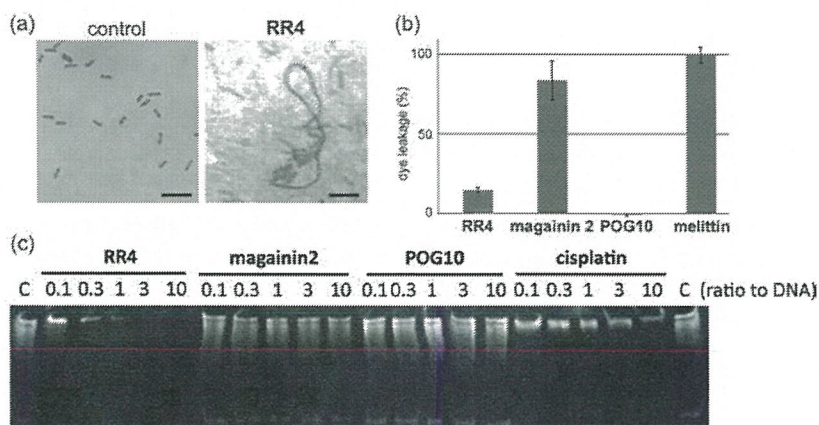


図2 : (a) RR4 を作用させた大腸菌。バー : 5 μm。 (b) RR4 を作用させた後の大腸菌スフェロプラストの脱分極。 (c) RR4 と DNA の相互作用。

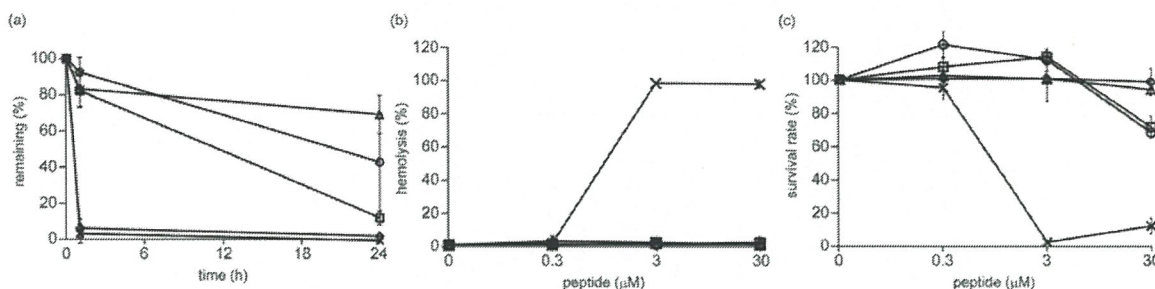


図3 : (a)RR4 の血清中安定性。 (b) RR4 の溶血活性。 (c)RR4 の HDF に対する細胞毒性。○ : RR4、◇ : マガイニン 2、△ : POG10、× : メリチン。

4. 考察

様々な3重らせんペプチドを含むコンビナトリアルライブラリから、抗菌活性有するペプチドを探索し、さらなる構造活性相関研究を経て、RR4を開発した。RR4は多剤耐性菌を含むグラム陰性菌、およびグラム陽性菌に抗菌活性を発現し、R3およびマガイニン2よりも強力な活性を有していた。くわえて、RR4が作用した大腸菌では細胞の異常な伸長が観察された。RR4の細菌膜を破壊活性は強くなかったが、一方でDNAに対する結合能を有していた。以上の結果より、RR4は細菌中のDNAと相互作用することで細胞分裂を阻害するというユニークな作用機序で抗菌活性を発現していることが示唆された。また、RR4はマガイニン2よりも血清中で安定であり、溶血活性や細胞毒性もほとんど観察されなかった。

本研究によって、薬理活性を付与した3重らせんペプチドの開発に成功した。この結果は、コラーゲン様3重らせん構造が生体中でも安定なペプチド医薬のスキファールドとなりえることを示唆している。

5. 参考文献

1. H. Yasui, C. M. Yamazaki, H. Nose, C. Awada, T. Takao, T. Koide. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 100, 705-713 (2013).
2. T. Koide, N. Yamamoto, K.B. Taira, H. Yasui. *Biol. Pharm. Bull.* in press.
3. C. M. Yamazaki, I. Nakase, H. Endo, S. Kishimoto, Y. Mashiyama, R. Masuda, S. Futaki, T. Koide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 5497-5500 (2013)
4. M. Wu, E. Maier, R. Benz, R. E. Hancock. *Biochemistry* 38, 7235-7242 (1999).
5. C. Subbalakshmi, N. Sitaram. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 91-96 (1998).