

G4 結合タンパク質の活性部位を基に設計した環状ペプチドに関する研究

工学研究科 産業技術デザイン専攻
物質生命化学分野 博士前期課程
2025年3月修了

山口 朋也

主査 藤本 和久 副査 中山 素一 高橋 芳弘

研究背景

テロメア領域を中心に存在するグアニン四重鎖構造 (G4) DNA に結合する分子群は、テロメアが老化、不死化に大きく関与していることから、ガン創薬分野において大きく期待されている。これまでに合成された G4 結合分子は水溶性に問題があり、昨今のトレンドである抗体は選択肢となるが、開発費が高コストであるがゆえに医薬品になった際の高額な薬価が不可避という問題点がある。そこでそうした問題点を克服すべく小分子ではない、抗体でもない、環状ペプチドを主骨格とする G4 結合分子の開発というのが本研究の命題である。

研究概要

染色体の末端に存在するテロメア領域は一本鎖 DNA で構成され、グアニン塩基が多く含まれている。このグアニン塩基群によって形成されるグアニン四重鎖構造 (G4) には様々なタンパク質が結合し、生体内における機能や疾患に深く関わっているとされる。そこで本修士論文研究において G4 結合タンパク質の一つである TLS/FUS の活性部位を基に分子設計した環状ペプチド群を開発した (図1)。ほとんどの G4 結合タンパク質は構造上の揺らぎが大きいいため、結晶構造解析されたものがほとんど無いのが現状である。その中で TLS/FUSの活性部位は、各種スペクトル解析により β ターン構造を形成している可能性が高いことがわかっている (図2)。

環状ペプチドの一つである c(dRGGdYK) を ROESY、TOCSYといった二次元 NMR解析を基に構造解析を行ったところ、Type II の β ターン構造を形成している可能性が極めて高いことがわかった。環状ペプチドと G4 との結合は MicroScale Thermophoresis (MST) 法で評価した。環状ペプチドの一つである c(dRGGdFK) が G4 RNA に対して約 $3 \mu\text{M}$ という解離定数を示した。この値は分子量 500 程度の小分子としては驚くべき値である。また環状でない直鎖ペプチドはいずれの核酸に対してもほぼ結合性を示さなかったことから、環状ペプチドとの G4 との結合に選択性があることもわかった。これらの結果には二つほど特徴が見られる。一つは総じて G4 DNA より G4 RNAの方が環状ペプチドと強く結合している。もう一つは環状ペプチドにおけるアミノ酸残基が Y よりも F の場合の方が強い結合性を示している。これらの結果より結合様式を考察したところ、TTA ループと G4 の積層構造とで形成される溝 (グループ) で環状ペプチドがグループバインダーとして嵌まり込んでいると予想される (図3)。

細胞内に存在する G4 と環状ペプチドとの結合を調べるためには、環状ペプチドを蛍光標識する必要がある。そこでリシン残基の側鎖へ FITC を導入することにした。その際、環状ペプチド合成後の導入、アミノ酸延伸過程における樹脂上での導入、側鎖保護基がついた状態での環状ペプチドへの導入の三つの手法を試みた。これらの手法で蛍光標識を行ったところ、環状ペプチド合成後の導入においてはリシンだけでなくアルギニンも標識されてしまい、アミノ酸延伸過程における樹脂上での導入においては環状生成物を得ることができなかった。側鎖保護基がついた状態での環状ペプチドへの導入に関しては、現在精製中である。

将来的には蛍光標識した環状ペプチドを細胞内に導入し、細胞内での G4 や G4 結合タンパク質の機能解明に繋げていく予定である。また環状ペプチドユニットを連結することにより、医薬品としての可能性も模索していく。

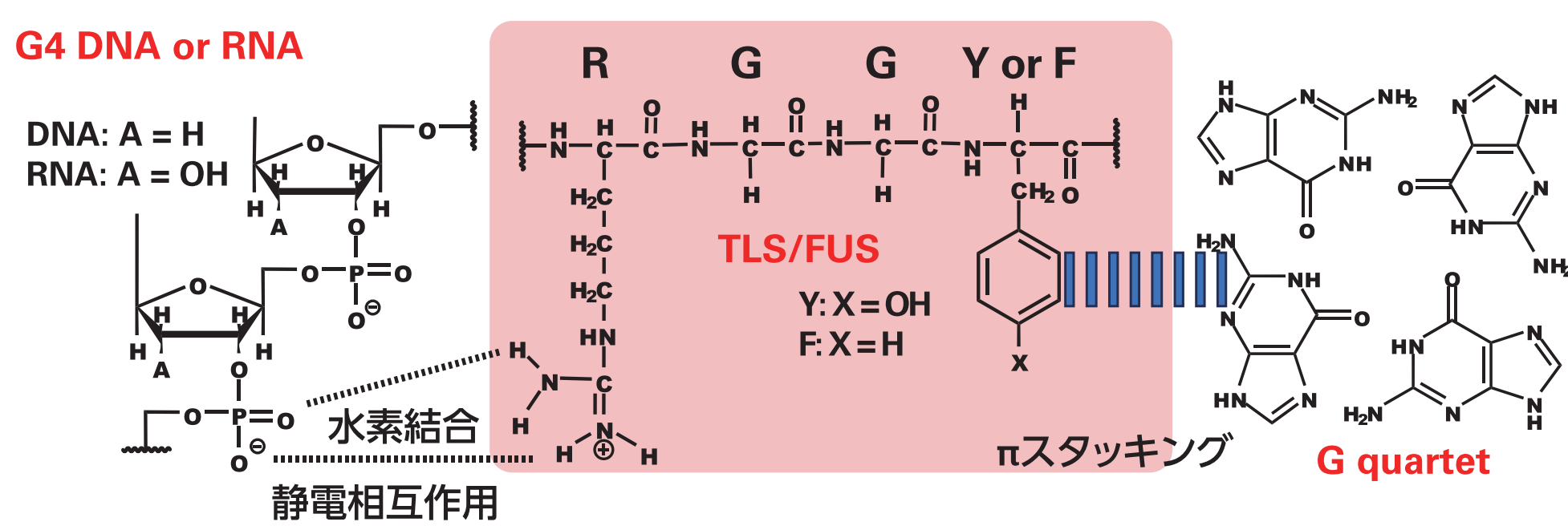


図1 TLS/FUS における G4 との相互作用

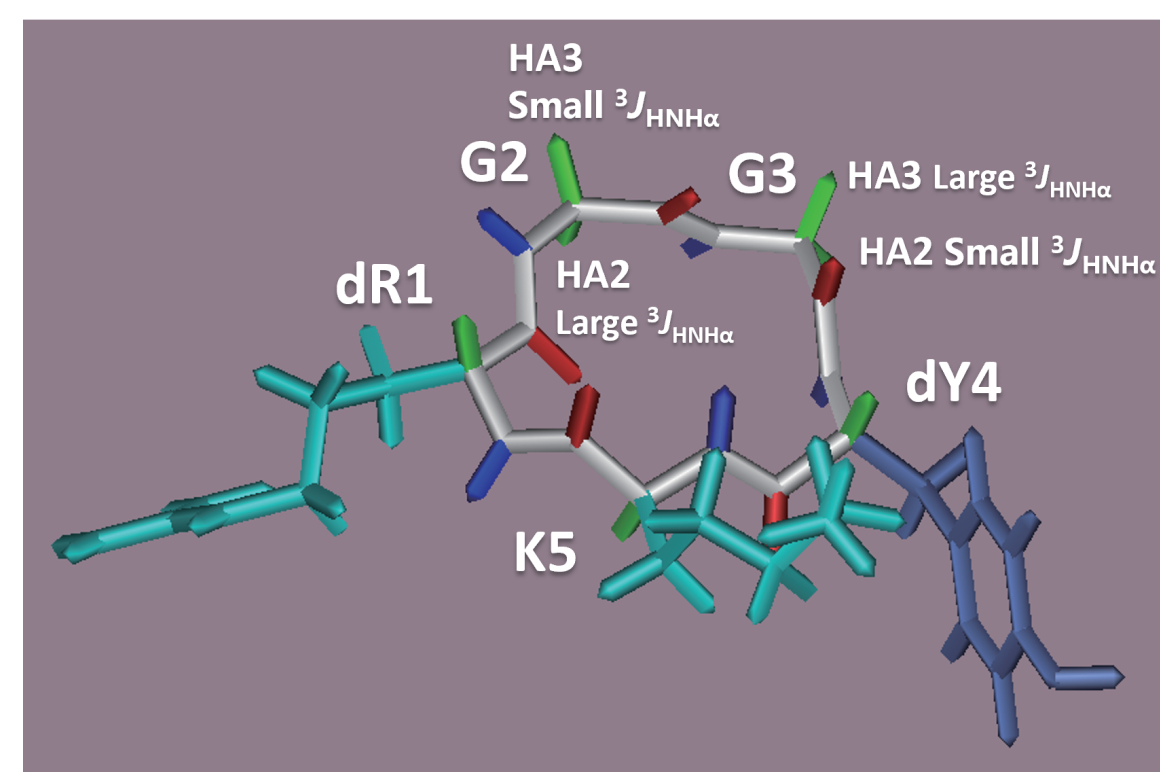


図2 NMR より算出された環状ペプチドの構造

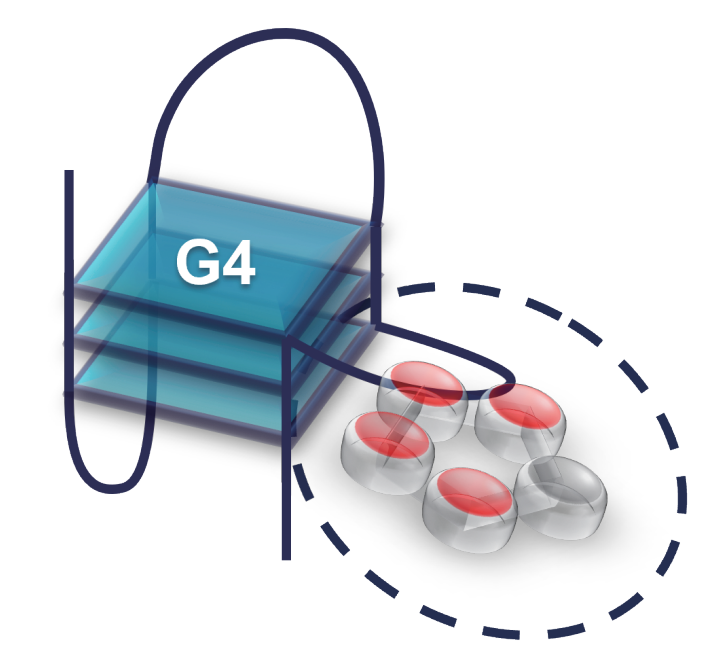


図3 環状ペプチドと G4 との予想される結合様式

総括

合成した環状ペプチドは NMR 解析により β ターン構造を形成している可能性が極めて高いことがわかった。分子量が 500 程度の小分子であるが、G4との解離定数は数 μM という高い結合性を示した。G4 や G4 結合タンパク質がガン化や老化に深く関係していることが示唆されることから、G4 結合タンパク質の機能解明や医薬品創製を十分に期待させる。

point

指導教員コメント

これまでに核酸やタンパク質に結合する分子が数多く合成されてきたが、結合力がさほど強くない、水溶性が低いなどといった問題があった。そのため阻害剤として、医薬品として細胞内や生体内にアプローチすることが困難であった。今回開発された環状ペプチド群はそうした問題を全て克服し、細胞内や生体内への展開を可能にするものである。また様々な疾病に関係していると考えられている G4 結合タンパク質の機能解明への貢献が期待される。

藤本 和久