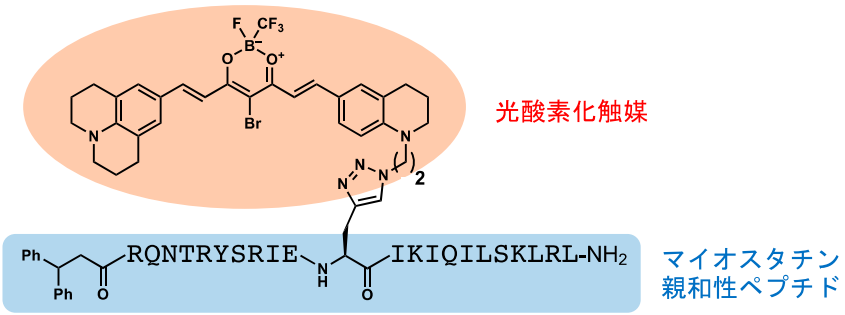
116　受容体タンパク質の機能制御を行う光酸素化分子の創出	谷口　敦彦

【目的】トランスフォーミング増殖因子β（transforming growth factor - β：TGF- β）スーパーファミリーに属するタンパク質であるマイオスタチンは、Ⅱ型アクチビン受容体に結合して、細胞内へシグナル伝達することで、筋肉量を負に制御している。よって、この受容体シグナルを抑制することは筋肉量の増大につながり、筋ジストロフィー、カヘキシア、サルコペニア、廃用性筋萎縮等の筋萎縮性疾患の治療戦略として注目されている。したがって、本受容体シグナルを制御できるツールは有意義であると考えられる。我々は、マイオスタチン前駆体タンパク質の N 末端にあるプロドメイン部分が、マイオスタチンと相互作用していることに着目し、マウス由来プロドメイン配列よりマイオスタチンに親和性を有する 23 残基のペプチド **1** を見出している。ペプチド **1** はマイオスタチンに対して弱い阻害作用を示し、マイオスタチンと可逆的に結合していると考えられた。そこで、このマイオスタチン親和性ペプチド **1** を利用して、マイオスタチンの光酸素化を基盤とした、光照射に応答して受容体シグナルを制御する手法の開発を目指した。

【方法】まず、マイオスタチン親和性ペプチド **1** に光酸素化触媒 **2** を担持したコンジュゲート **3** を合成した。次に、コンジュゲート **3** にマイオスタチン共存下で光を照射し、マイオスタチンの光酸素化反応を MALDI-TOF MS にて追跡した。さらに、本光酸素化が与えるマイオスタチン活性への影響を、HEK293 細胞を用いた *in vitro* ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価した。

【結果】合成した光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲート **3** のみ又は光照射のみの処理では、マイオスタチンの酸素化は認められなかったのに対して、コンジュゲート **3** と光照射で処理した場合は、マイオスタチンが効率的に光酸素化された。さらに、コンジュゲート **3** をマイオスタチンに添加した際は、マイオスタチン活性による受容体シグナルが誘導された一方、そこに光照射を行うことで、本受容体シグナルは誘導されなかった。これは、光照射によって受容体シグナルを制御できる可能性を示唆する。

マイオスタチン親和性ペプチドと光酸素化触媒からなるコンジュゲート **3**



コンジュゲート 3

116. 受容体タンパク質の機能制御を行う光酸素化分子の創出

谷口　敦彦

東京薬科大学 薬学部 薬品化学教室

Key words：コンジュゲート，触媒，光酸素化，ペプチド，マイオスタチン

緒　言

トランスフォーミング増殖因子β（transforming growth factor - β：TGF- β）スーパーファミリーに属するタンパク質であるマイオスタチンは、Ⅱ型アクチビン受容体に結合して、細胞内へシグナル伝達することで、筋肉量を負に制御している［1］。よって、この受容体シグナルを抑制することは筋肉量の増大につながり、筋ジストロフィー、カヘキシア、サルコペニア、廃用性筋萎縮等の筋萎縮性疾患の治療戦略として注目されている［2，3］。したがって、本受容体シグナルを制御できるツールは有意義であると考えられる。

我々は、マイオスタチン前駆体タンパク質の N 末端にあるプロドメイン部分が、マイオスタチンと相互作用していることに着目し、マウス由来プロドメイン配列よりマイオスタチンに親和性を有する 23 残基のペプチド **1**（図 1a）を見出している［4］。ペプチド **1** はマイオスタチンに対して弱い阻害作用を示し、マイオスタチンと可逆的に結合していると考えられた。そこで、このマイオスタチン親和性ペプチド **1** を利用して、マイオスタチンの光酸素化を基盤とした、光照射に応答して受容体シグナルを制御する手法の開発を目指した。

本研究では、マイオスタチン親和性ペプチド **1** に光酸素化触媒 **2**［5］を担持したコンジュゲート **3** を合成し（図 1）、これを用いてマイオスタチンを光酸素化及び不活化させた。コンジュゲート **3** をマイオスタチンに添加した際は、マイオスタチン活性による受容体シグナルが誘導された一方、**3** とマイオスタチンに光を照射することで、本受容体シグナルは誘導されなかった。これは、光照射によって受容体シグナルを制御できる可能性を示唆する［6］。

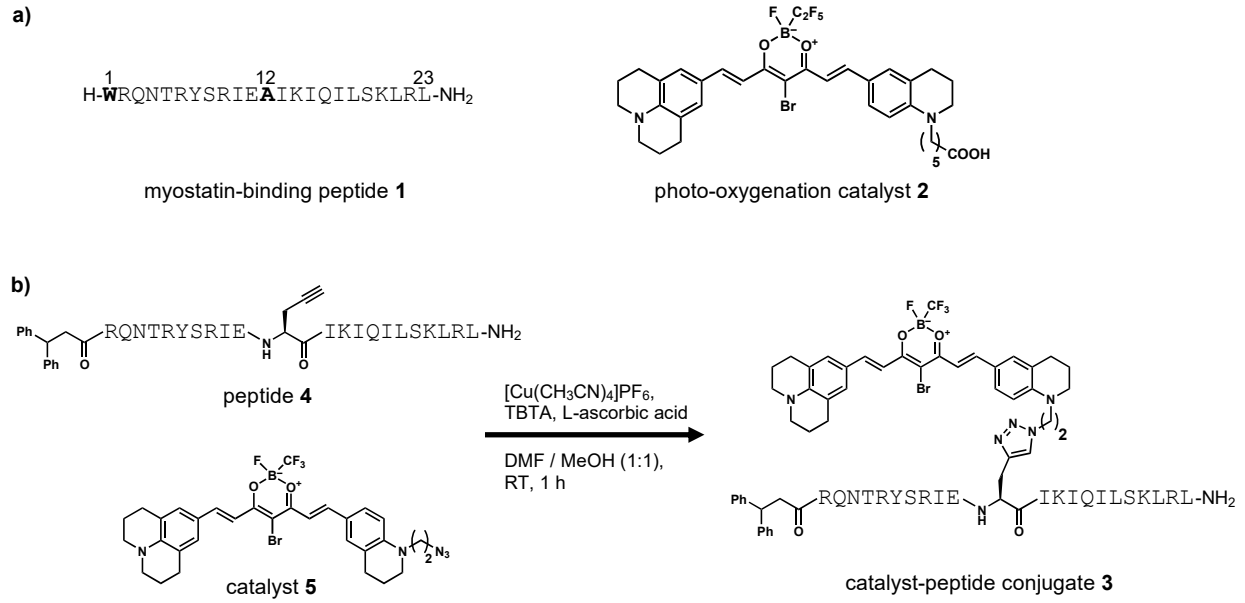


図 1. マイオスタチン親和性ペプチド **1**、光酸素化触媒 **2**、及び触媒ーペプチドコンジュゲート **3**

a）マイオスタチン親和性ペプチド **1** のアミノ酸配列と光酸素化触媒 **2** の化学構造。

b）光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲート **3** の化学構造と合成スキーム。

方　法

1.　光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲートのデザインと合成

当研究室では、マイオスタチン親和性ペプチド **1** の詳細な構造活性相関研究によって、12 位アラニン側鎖（図 1a）の置換許容性が大きいことを既に明らかにしている［7］。よって、この 12 位に光酸素化触媒を導入することとした。一方、ペプチド **1** は、1 位にトリプトファン残基（図 1a）を有しているが、トリプトファンは非常に光酸素化されやすいアミノ酸であるため、本研究では問題となる可能性が予想された。よって、ペプチド **1** の構造活性相関研究において代替可能と分かっていた 3,3-ジフェニルプロピオン酸を適用した［8］。すなわち、12 位にアルキンを有したペプチド **4**（図 1b）を通常の Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて得た。

一方、光酸素化触媒としては、標的分子に結合した時にのみ光酸素化活性を発現する分子 **2**（図 1a）を採用した［5］。この触媒 **2** は、組織透過性が高く、且つ障害性も低い近赤外光（波長：～800 nm）で励起可能であるため、生体適用性が高い。触媒 **2** をペプチドと連結するために、既存の合成方法に倣って、アジドを有する触媒 **5**（図 1b）を合成した。

最後に、ペプチド **4**（1 eq）と触媒 **5**（1.1 eq）を、ジメチルホルムアミド／メタノール（1 : 1）中、$[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$（＞40 eq）、tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine（TBTA、4 eq）、及び L-ascorbic acid（24 eq）存在下、1 時間撹拌することで、ヒュースゲン環化付加反応によりコンジュゲート **3** を得た（図 1b）。

2.　マイオスタチンの光酸素化

リン酸緩衝液（10 mM、pH 7.4）中、光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲート **3**（3 μM）をマイオスタチン（1 μM）に添加し、LED パネル（730 nm、14 mW）を用いて、37℃下 90 分間光照射を行った。ジチオスレイトールによるジスルフィド還元、続くリシルエンドペプチダーゼによる酵素消化の処理後、MALDI-TOF MS を用いて酸素化されたマイオスタチンフラグメントを分析した（図 2）。

3.　酸素化マイオスタチンの受容体に対する活性

マイオスタチンの受容体に対する活性は、HEK293 細胞を用いた *in vitro* ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価した（図 3）［7, 8］。本評価系では、細胞に Smad 応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入しており、マイオスタチンが受容体に結合することで誘導される Smad シグナルに依存してルシフェラーゼが発現することから、そのルシフェラーゼ活性を指標とした。本系に酸素化処理を施したマイオスタチン（終濃度：0.6 nM）を添加し、8 時間インキュベートした後、その細胞溶解液におけるルシフェラーゼ活性を測定した。

結果および考察

1. 光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲートの合成

ペプチド **4** は、Fmoc 固相ペプチド合成、脱樹脂、逆相 HPLC 精製を経て、白色粉末（トリフルオロ酢酸塩、収率：24%）として得た。一方、触媒 **5** は、全 7 工程を経て濃紺色固体として得た。その後、ペプチド **4** のアルキンと触媒 **5** のアジドから、銅触媒存在下ヒュースゲン環化付加反応にて 1,2,3-トリアゾールを形成した。さらに、HPLC 精製を経て、コンジュゲート **3** を濃紺色粉末（トリフルオロ酢酸塩、収率：35%、純度：＞95%）として獲得した（図 1b）。

2. マイオスタチンの光酸素化

光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲート **3** をマイオスタチンに添加し、生理的条件下（pH 7.4、37℃）で光照射を行った。光照射前は、マイオスタチン 79～90 フラグメントの MS ピークが観測された（図 2a）。これに対して、光照射後ではそのピークが減少し、代わりに 16、32、48 Da 増加したピークが検出された（図 2b）。これは、マイオスタチン 79～90 フラグメント中の 79 及び 84 位メチオニン側鎖のスルフィドがスルフォキシド又はスルフォンに酸素化修飾されたことを示唆する。この酸素化は、コンジュゲート **3** を添加しなかった場合、又は光照射しなかった場合では認められなかった。さらに、脱気処理済みの緩衝液中では、この酸素化が抑制された。以上より、マイオスタチンはコンジュゲート **3** によって光酸素化されたことが示された。

3. 酸素化マイオスタチンの受容体に対する活性

In vitro ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、マイオスタチンを細胞に添加した時、ルシフェラーゼ活性が認められ、この値を 100 とした（図 3、レーン e)。光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲート **3** のみ又は光照射のみで処理した場合は、同程度のルシフェラーゼ活性が観測された一方（レーン f、g)、コンジュゲート **3** と光照射の両方で処理した場合のみ、顕著なルシフェラーゼ活性の低下が見られた（レーン h)。これは、マイオスタチンが光酸素化によって失活したことを示唆する。また、コンジュゲート **3** のみでマイオスタチン活性の阻害が認められなかった理由は、コンジュゲート **3** とマイオスタチンの結合が可逆的であるため、コンジュゲート **3** の濃度が低い環境下においては（終濃度：1.7 nM)、十分な阻害効果が得られなかったものと考えられる。以上の結果より、コンジュゲート **3** によるマイオスタチンの光酸素化を利用することで、光照射によって受容体シグナルを制御できる可能性が示された。

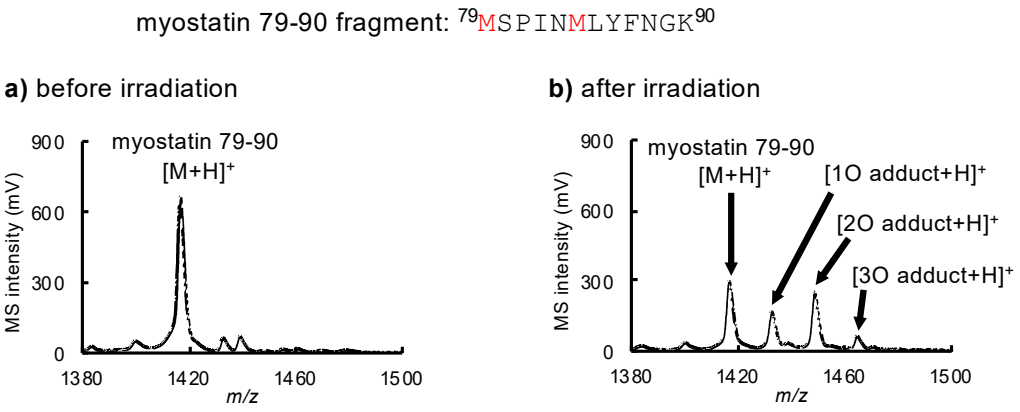


図 2. コンジュゲート **3** によるマイオスタチンの光酸素化

a）光照射前と b）光照射後の MALDI-TOF MS スペクトル。

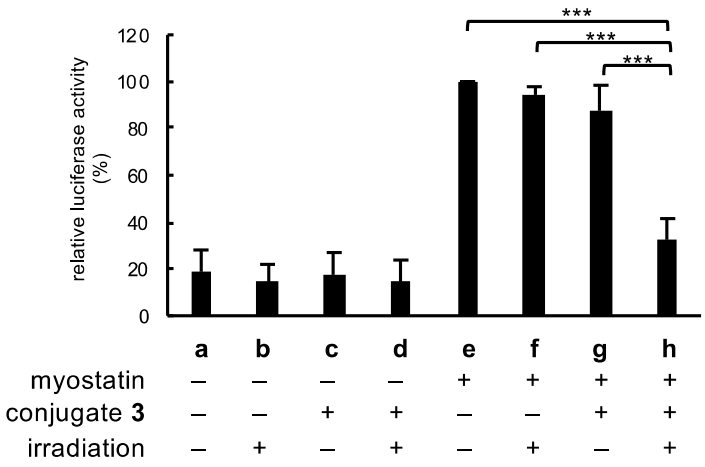


図 3. 光酸素化によるマイオスタチンの不活化

HEK293 細胞を用いた *in vitro* ルシフェラーゼレポーターアッセイ。

（$n = 3$、mean ± s.d.、***$p < 0.001$ in the indicated lanes by Tukey's test)。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、ご助言頂いた東京薬科大学薬学部薬品化学教室の林良雄教授、高山健太郎講師（現京都薬科大学准教授）を始め、ご協力頂いた当研究室の学生の皆様にこの場を借りて深謝したい。

文　献

1) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member. Nature. 1997 May 1;387(6628):83-90. PMID: 9139826 DOI: 10.1038/387083a0

2) Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. Nature. 2002 Nov 28;420(6914):418-21. PMID: 12459784 DOI: 10.1038/nature01154

3) Latres E, Pangilinan J, Miloscio L, Bauerlein R, Na E, Potocky TB, Huang Y, Eckersdorff M, Rafique A, Mastaitis J, Lin C, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Gromada J, Stitt T. Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice. Skelet Muscle. 2015 Oct 9;5:34. eCollection 2015. PMID: 26457176 PMCID: PMC4600334 DOI: 10.1186/s13395-015-0060-8

4) Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. J Med Chem. 2015 Feb 12;58(3):1544-9. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25569186 DOI: 10.1021/jm501170d

5) Ni J, Taniguchi A, Ozawa S, Hori Y, Kuninobu Y, Saito T, Saido TC, Tomita T, Sohma Y, Kanai M. Near-infrared photoactivatable oxygenation catalysts of amyloid peptide. Chem. 2018 Apr 12;4(4): 807-20. Epub 2018 Mar 15. DOI: 10.1016/j.chempr.2018.02.008

6) Okamoto H, Taniguchi A, Usami S, Taguchi A, Takayama K, Hayashi Y. Inactivation of myostatin by photo-oxygenation using catalyst-functionalized peptides. Chem Commun (Camb). 2019 Aug 11;55(62):9108-11. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31298230 DOI: 10.1039/c9cc04368c

7) Takayama K, Rentier C, Asari T, Nakamura A, Saga Y, Shimada T, Nirasawa K, Sasaki E, Muguruma K, Taguchi A, Taniguchi A, Negishi Y, Hayashi Y. Development of potent myostatin inhibitory peptides through hydrophobic residue-directed structural modification. ACS Med Chem Lett. 2017 Jun 6;8(7):751-756. eCollection 2017 Jul 13. PMID: 28740611 PMCID: PMC5512132 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00168

8) Takayama K, Nakamura A, Rentier C, Mino Y, Asari T, Saga Y, Taguchi A, Yakushiji F, Hayashi Y. Effect of N-terminal acylation on the activity of myostatin inhibitory peptides. ChemMedChem. 2016 Apr 19;11(8):845-9. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26954624 DOI: 10.1002/cmdc.201500533