

Q&A

Q1. α ヘリックス stapling による p53mimic の例で、i+7 が使われているのはなぜか？

論文中では特に理由は示されていませんでした。

一般論として、 α -helix の誘導効率という点では 11 炭素のリンカーを用いた i+7 が最も優れており、i+4 ではやや劣るようです。配列などにも依存するかと思いますが第一選択として i+7 の cross link を行うのはリーズナブルかと思います。

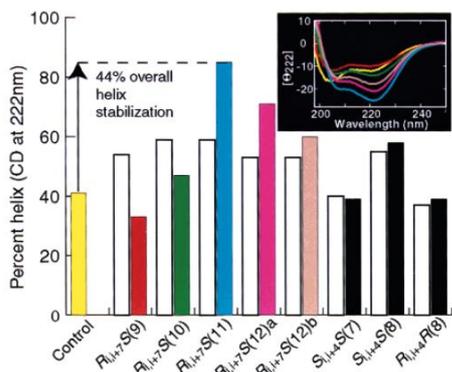
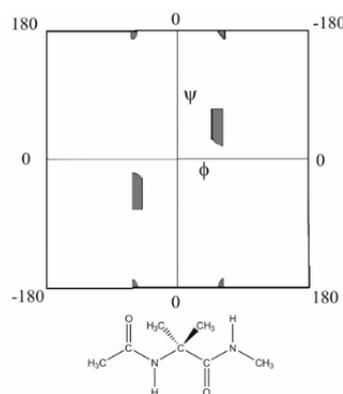


Figure 2. In the $R_{i,i+7}S$ series α -methyl amino acids increase helical structure by $\sim 15\%$. Inducing a cross-link using olefin metathesis has an effect on helicity that depends on the cross-link length. $R_{i,i+7}S(11)$ is the best helix stabilizer. The uncertainties in these measurements are no greater than $\pm 5\%$. (Open bars, unmetathesized; solid bars, metathesized.) Inset: CD spectra for $R_{i,i+7}S(x)$ series, color matched to histogram. $[\theta_{222}]$ units are $(\times 10^2 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1})$.

C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 5891 – 5892

Q2. α ヘリックス stapling による p53mimic の例で、 α, α -二置換アミノ酸を利用するのはなぜか？

一般論として、ヘリックスを誘導する際にアルキルリンカーを結合するアミノ酸としては R, S をペアで使うのが最もヘリックス誘導効率が高いです(Q1 参照)。D-アミノ酸はヘリックスを不安定化し(後述)、 α, α -二置換アミノ酸はヘリックスを安定化する(右図, Aib のラマチャンドラプロット。右巻きまたは左巻きのヘリックスとなる二面角しか取り得ない。)ので、R, S をペアで使うことによる前者の効果を避けつつ、更に後者の効果でヘリックスを安定化する目的で α -メチル化された二置換アミノ酸を利用しているものと思います。

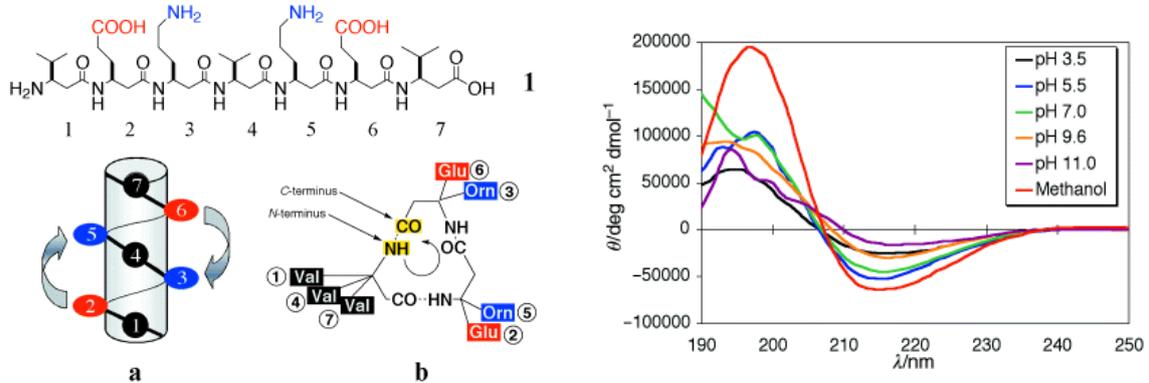


C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 5891 – 5892

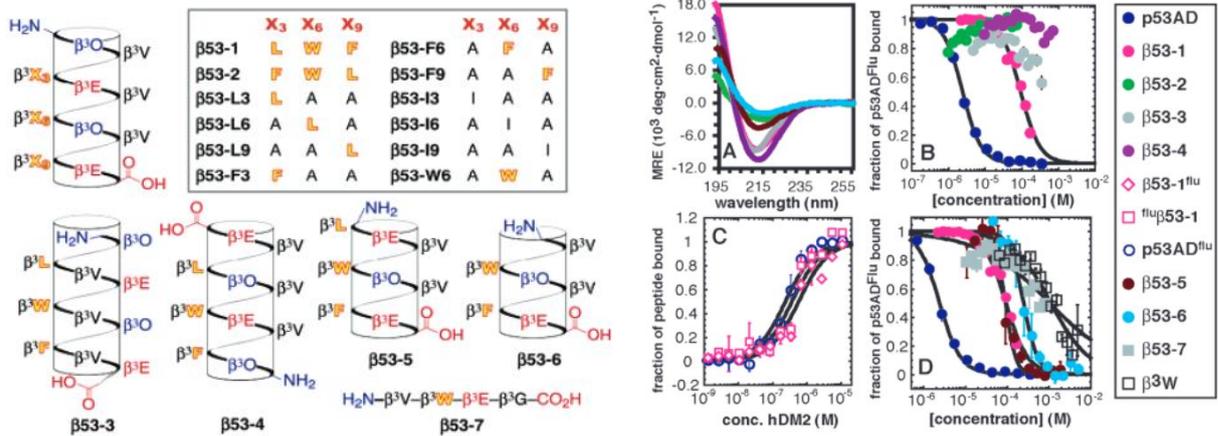
Mahalakshmi; R., Balamam; P., *D-amino Acids: A New Frontier in Amino Acids and Protein Research.*, pp.415

Q3. β ペプチドで酸性アミノ酸により塩橋が形成されるというが、どこの塩橋なのか？

下図のようにして、 β -Glu/ β -Lys, β -Glu/ β -Ornといった組み合わせで利用されます。



P. I. Arvidsson, M. Rueping, D. Seebach, Chem. Commun. 2001, 649 – 650.



Kritzer, J. A.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A.J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 9468.

例としてご紹介した CHR mimic の β -Asp は元の配列の Asp を相互作用部位として mimic したものであり、塩橋の形成を狙ったものではありません。

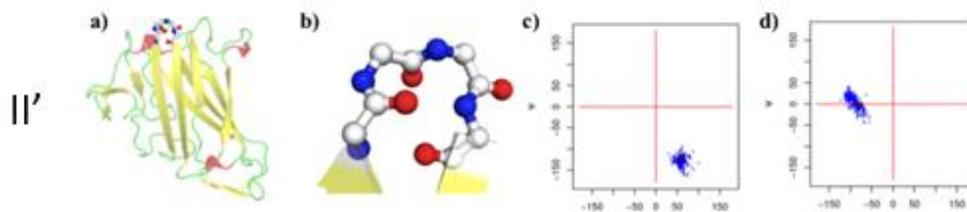
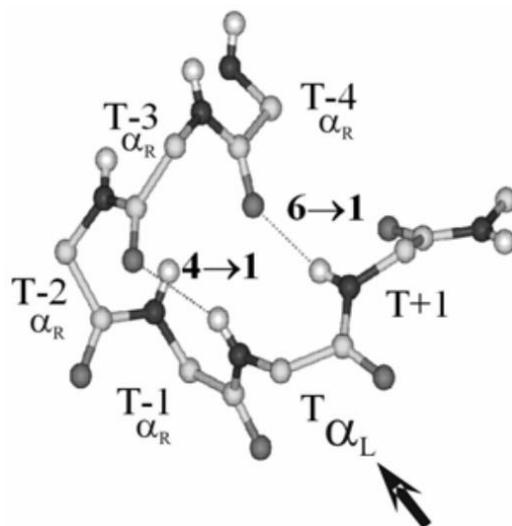
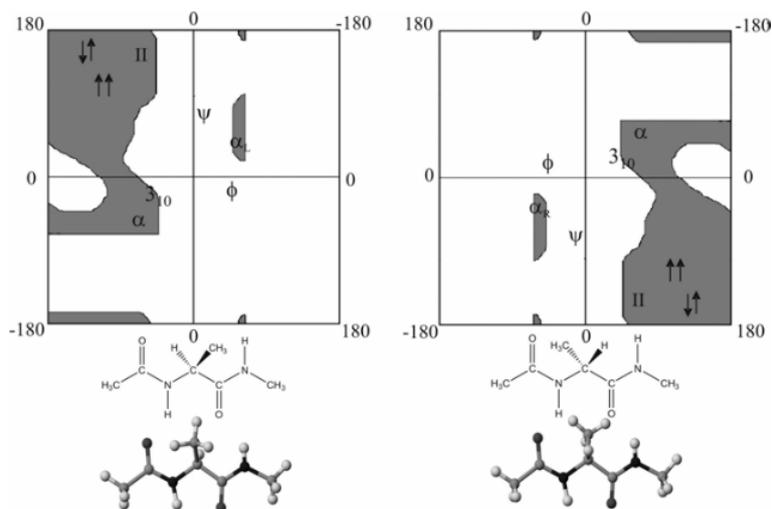
Q4.なぜ D アミノ酸で turn が誘導されるのか？

アラニンのラマチャンドランプロットは右図のようになります。

D アミノ酸は左巻きの helix 構造 (α_L) または β シート構造に至るような二面角 (II の部分) で安定となるのに対し、右巻きの helix をとるような二面角は、許容されるものの好ましくありません。したがって、例えば、ペプチドがヘリックス構造をとっている場合、配列中の D アミノ酸は Helix termination signal としてはたらしません。このような場合に $\alpha_R\alpha_R\alpha_R\alpha_R\alpha_L$ なる配列が現れると、右図のようにして $4 \rightarrow 1$, $6 \rightarrow 1$ の水素結合の形成に至るようで、これは即ちターン構造の誘導に当たります。

このように L アミノ酸とは逆の二面角で安定化するために、その DL あるいは LD といった並びがあるとターン構造が誘導されるものと考えられます。

また、逆に、ヘアピン構造でしばしば見られる Type II' ターンは、DL と並んだ両アミノ酸が安定な二面角をとり得る構造になっています。



Bravern; A.G., *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33191

Mahalakshmi; R., Balam; P., *D-amino Acids: A New Frontier in Amino Acids and Protein Research.*, pp.415

Q5. β II' - β VI 構造の透過性に関して、トランスポーターであるという証拠が弱いのではないか？

セミナー中に示した 2008 年の Kessler らの論文(somatostatin analog)において、筆者らは Apical から basolateral と、その逆の透過性の差を評価した結果、その差はなく、トランスポーターによるアクティブな輸送は関与していないことが示唆されると主張しています。

Active transport は関与していないとすると、輸送は passive diffusion により、可能性としては transcellular pathway または paracellular pathway により透過していると考えられます。さらに、前者では表面積の大きさから、より高い flux が期待されます。

ここで、試した大半のペプチドは Caco-2 assay において mannitol の透過性を超えないのに対して、8 はそれを超える結果になりました。マンニトールは膜を透過せず、paracellular pathway(Tight junction pore などによるもの)のマーカとされています。Tight junction pore は水で満たされたチャネルであり、polar surface を要求するという前提のもとに、メチル化により透過性が改善されたことから、N メチル化によりペプチドの脂溶性を高めたことにより paracellular から transcellular passive diffusion が支配的なものにシフトしたことが示唆されると主張しています。膜との相互作用についても、膜とのコンタクトは必要条件だが十分条件ではないとしつつ、8 では 1 と比べて膜との相互作用が著しく上がっていることを示しています。

5 が他と比べて圧倒的に低い膜とのコンタクトしか示していないのにも関わらず、mannitol より低いものの比較的高い膜透過性を示していますが、これはメチル化あるいは立体構造の変化が paracellular transport を何らかの形で改善したことによるものと説明可能だと考えます。

ただし、MDCK cell assay や side-by-side diffusion chamber など Caco-2 assay 以外の評価系による評価では paracellular transport の範囲を超えなかったとしており、やや疑問が残る部分があるのは確かです。

2018 年の review では、1 から 8 でコンフォメーションが変わっていないにもかかわらず膜透過性が著しく改善していることに言及しており、これは溶媒和可能な NH の遮蔽が脂溶性の向上に働き transcellular passive diffusion にシフトしているという主張を強化するものであると考えます。

2012 年の Kessler らの論文(cyclic hexa-alanine)においては、PAMPA assay により純粋な transcellular passive diffusion を評価した結果、CACO-2 assay において高い透過性を示したものを含めいづれのペプチドも透過性を示さなかったため、cyclic hex-alanine の場合は単純な transcellular passive diffusion ではないとしています。また、Caco-2 assay ではバイオアベイラビリティが 100%近いテストステロンの透過性を超えるペプチドもあるのに、HPLC の retention time をみると testosterone の脂溶性には遠く及ばず、また、ペプチド間での膜透過性の差にもかかわらず、ペプチド間での

retention time には大差なかったとも述べています。

さらに, paracellular pathway や transcellular passive diffusion はそれぞれ polar surface area あるいは lipophilicity など、分子表面の性質には依存するがコンフォメーションには依存しないことなどを根拠に挙げて、結論としては” it is evident to us that the prevailing mechanism of absorption is transporter-mediated permeation.”としています。

結論としては β II' - β VI turn 構造を持つからといって必ずしもトランスポーターによる輸送が行われるとは主張していません。Somatostatin analog は passive transcellular diffusion にシフトし, cyclic hexa-alanine はトランスポーターによる輸送を受けると主張されています。可能性としては、評価系に問題があって、 β II' - β VI turn 構造を持つペプチドが膜を透過する際の支配的なメカニズムを特定し得ていないか、または、 β II' - β VI turn 構造が、transcellular passive diffusion や active transport など複数のパスウェイに有利に働く、生理的・化学的に膜透過に都合の良いコンフォメーションであるかということになります。

詳細は以下論文を参照してください。気が向いたらより詳細にまとめたものをアップロードします。

Biron; E., Kessler; H. et al., *ACIE*, 2008, 47, 2595

Beck; J.G., Kessler; H., et al., *JACS*, 2012, 134, 12125

Räder; A.F.B., Kessler; H., et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, 26, 2766

参考

Rezail; T., Lokey; R.S., et al., *JACS*, 2006, 128, 2510

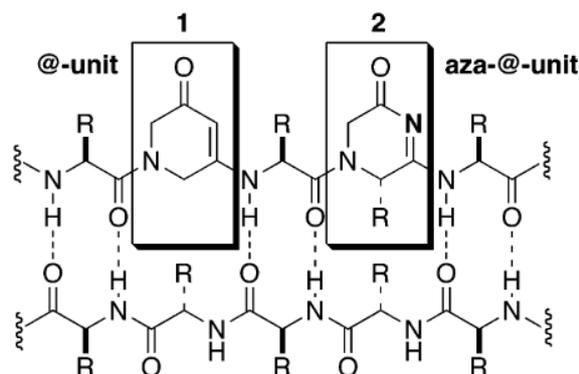
Marelli; U.K., Kessler; H., et al., *Chem. Euro. J.*, 2015, 21, 8023

Jwad; R., Hunter; L., et al., *Chem. Rev.*, 2020, ASAP

Q6.p28 の β sheet mimetics のうち、構造 15 は何を指した構造なのか？

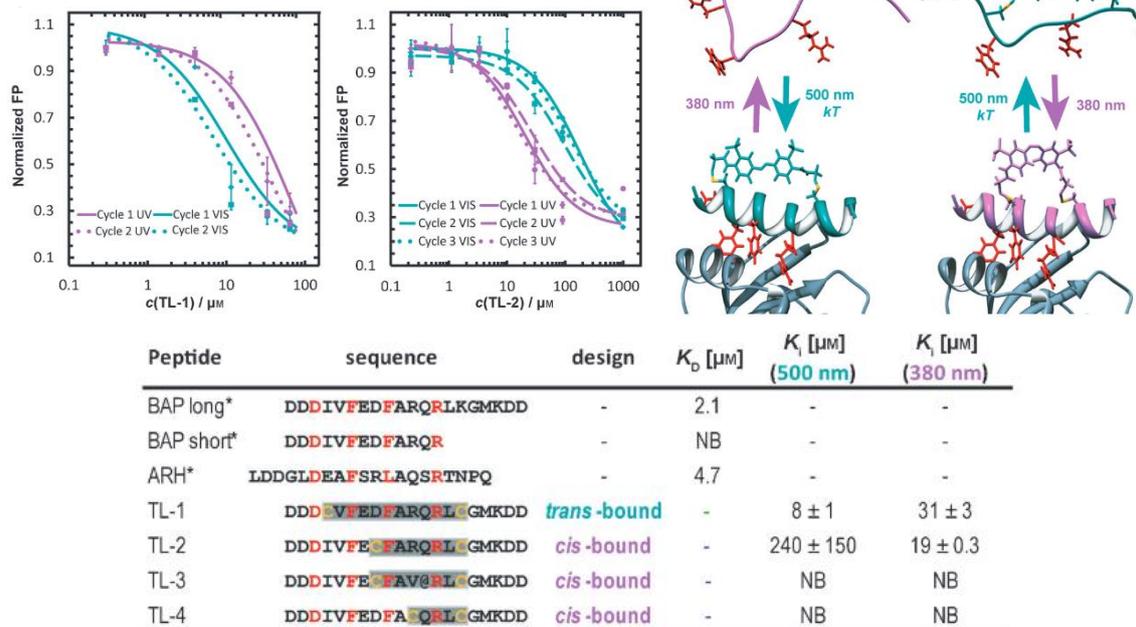
やはり、環や二重結合の存在によりストランドを rigid にすることで、 β -strand の安定化や β -sheet の形成を促す構造のようです。右図のように functionalize することも行われています。

M. C. Hammond, P. A. Bartlett, *J. Org. Chem.* 2007, 72, 3104 - 3107.



Q7. 結合能を弱めたり、保護基のようなものを使ったりしてスイッチングするといったことは可能か？

質疑応答で申し上げた通り、アゾベンゼンでそのような操作をしている例はあります。AP2 の β -appendage に結合した β -arrestin C-terminal peptide に対して、i+11 または i+7 でそれぞれ trans, cis のアゾベンゼンを結合し、光によりヘリックスの形成を制御しています。



L. Nevola, A. Martín-Quirós, K. Eckelt, N. Camarero, S. Tosi, A. Llobet, E. Giralt, P. Gorostiza, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 7704 - 7708