



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シクロプロパン型アミノ酸を用いた配座制御による膜透過性環状ペプチドの創製と三次元構造-膜透過性相関の解明
Author(s)	山崎, 祐季
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第16792号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16792
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99637
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Yamazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博士(薬科学) 氏 名 山崎 祐季

学 位 論 文 題 名

シクロプロパン型アミノ酸を用いた配座制御による膜透過性環状ペプチドの創製と三次元構造-膜透過性相関の解明

中分子環状ペプチドは、高い構造多様性と比較的広い分子表面を兼ね備え、タンパク質間相互作用にみられる多点間相互作用に基づく分子認識が可能であることから、“アンドラッグブル”な創薬標的に対する有効な分子として医薬応用が期待されている。しかし、所望の薬理活性と優れた体内動態を併せ持つ中分子環状ペプチドを合理的に創出することはいまだ困難であり、現在臨床応用されている環状ペプチドの大半は、天然物や内因性ペプチドに由来している。特に、細胞膜透過性の低さが、合成環状ペプチド医薬の実現における大きな課題の一つである。

環状ペプチドの膜透過性には、主鎖の三次元構造(配座)が大きく関わる事が知られている。優れた膜透過性と薬理活性を示す大環状ペプチド Cyclosporin A の研究から、膜内外の環境に応じて主鎖配座が大きく変化する“構造カメレオン性”が、高い膜透過性に寄与することが示されてきた。一方で、プロリンやヘテロ環の導入により主鎖配座を固定化し、特定の三次元構造へ誘導・安定化することによって膜透過性が向上する例も報告されている。このように、化学構造と主鎖配座の双方が膜透過性に重要であることは明らかであるものの、主鎖配座はアミノ酸配列や側鎖構造のわずかな違いによっても容易に変化する。したがって、配座と膜透過性との純粋な関係性を体系的に理解することは困難である。

そこで筆者は、環状ペプチドの主鎖にシクロプロパン型アミノ酸を導入して配座を制限することで、主鎖配座と膜透過性との関係性をより直接的かつ体系的に明らかにすることを目指した。筆者の所属研究室ではこれまでに、シクロプロパンの構造特性により、立体異性体ごとに主鎖の配座が異なる形に制御される α,δ -二置換シクロプロパン δ -アミノ酸 (**Cp δ AA**) を環状ヘキサペプチドに導入すると、**Cp δ AA** の立体化学に応じて主鎖配座が大きく変化する事を見出している。中でも、シス形で N-C δ および C α -C(O) 結合が folded 配座をとる ($\alpha S,\beta R,\gamma S,\delta R$)-異性体が、環状ペプチド主鎖を屈曲した“閉じた”配座に制御し、環状ペプチドの細胞膜透過性を大幅に向上させた。

本研究では、この知見をふまえ、($\alpha S,\beta R,\gamma S,\delta R$)-**Cp δ AA** を組み込んだ環状ヘキサペプチド 48 種からなるフォーカスライブラリーを設計・合成した。先行研究のアミノ酸配列を基本骨格とし、親水性アミノ酸の種類や導入位置を変更した配列、ならびに疎水性アミノ酸のみの配列を設計することで、疎水性 (CLogP) に幅を持たせた。一般的に環状ペプチドは非常に柔軟で配列に応じて配座が変化するが、本ライブラリーでは、($\alpha S,\beta R,\gamma S,\delta R$)-**Cp δ AA** によって主鎖配座がある程度一定に制限されることで、配列の違いに応じて配座分布や膜透過性に差異が生じると考えた。これら環状ペプチドの受動的膜透過性の評価と三次元構造の詳細な解析を行い、両者の関係性を評価することで、膜を“通る形”と“通らない形”の特徴をより明確に見出すことができ、膜透過性と三次元構造の関係性の新たな理解につながるのではないかと期待した。

まず、既知の合成方法を参考に、(*R*)-Epichlorohydrin から計 23 工程で、*N*-Fmoc 体とした ($\alpha S,\beta R,\gamma S,\delta R$)-**Cp δ AA** を立体選択的に合成した。次に 2-Chlorotrityl Chloride 樹脂を用いた Fmoc 固相合成法により、**Cp δ AA** を含む所望の配列の鎖状ペプチドを伸長した。樹脂から切り出した後、液相での環化と側鎖保護基の除去を行い、HPLC で精製して目的の環状ペプチドを得た。

合成した環状ペプチドの膜透過性を並行人工膜透過性試験により評価した。その結果、

Cp δ AA 含有環状ペプチド 48 種のうち、20 種のペプチドが非常に高い膜透過性を、15 種が中程度の膜透過性を示し、疎水性が高いペプチドほど膜透過性が高くなる傾向が認められた。一方で、疎水性アミノ酸のみのからなる配列と比較すると、親水性アミノ酸を 1 残基含むペプチドでは、CLogP 値が同程度であっても膜透過性が約 10 分の 1 に低下した。さらに、**Cp δ AA** を鎖状 δ -アミノ酸やプロリンに置換した場合には膜透過性が消失した。これらの結果から、膜透過性の獲得には疎水性だけでなく主鎖配座の制御も不可欠であることが示された。

次に、膜透過性が高い 10 種、中程度の 6 種、低い 4 種の計 20 種の **Cp δ AA** 含有環状ペプチドを対象に、DMSO- d_6 および CDCl₃ 中で各種 NMR 測定を行い、遠距離 ROE 相関を解析した。DMSO- d_6 中では、**Cp δ AA** のシクロプロパン上のプロトン (H β , H γ) と向かいに位置するアミノ酸残基 (AA³) の H α との遠距離 ROE 相関が 17 種で共通して観測され、先行研究の結果と一致していた。このうち 13 種では、NH-H α 間や側鎖間の ROE 相関も数多く観測された。CDCl₃ 中でも 15 種で同様の遠距離 ROE 相関が観測され、複数の側鎖間相関も確認された。

これらの遠距離 ROE 相関を距離拘束条件としたモデリング計算により、DMSO と CHCl₃ 中における 9 種のペプチドの主鎖配座を比較した。その結果、いずれのペプチドも **Cp δ AA** と向かいのアミノ酸残基が近接し、主鎖が折れ曲がった“閉じた”配座をとることが明らかとなった。各ペプチドについて溶媒間で構造を重ね合わせたところ、主鎖重原子の RMSD 値は 0.36~0.96 Å であり、溶媒環境や膜透過性に依らず主鎖配座が類似していることが示された。さらに、膜透過性に 100 倍の差がある 2 種のペプチド間でも主鎖配座はほぼ同一であった (RMSD = 0.206 Å)。

さらに、膜透過性が 10 倍もしくは 100 倍異なる 3 種のペプチドについて、REST/REUS 法を用いた分子動力学 (MD) シミュレーションにより、水中および膜内における主鎖配座分布を解析した。水中ではいずれも多様な配座を示したが、3 種のペプチド間で配座分布はほぼ一致していた。膜内では、3 種のペプチドで共通する 2 つのクラスターが観測され、高透過性のペプチドはこれらに収束していた一方、他 2 種のペプチドは追加のクラスターが存在した。注目すべき点は、水中と膜内の配座分布は異なっていたものの、各環境において膜透過性が 100 倍異なるペプチド間で配座分布が共通していたことである。また、MD シミュレーション解析により、3 種のペプチド間で側鎖構造に起因する水分子との相互作用に差があり、その違いが膜内における脱水和の程度に差を生じさせ、その結果として膜透過性の違いが現れることが示唆された。

以上より、本研究では **Cp δ AA** を環状ペプチドに組み込むことで、アミノ酸配列や膜透過性、溶媒環境に関係なく主鎖配座を同一の形に制御することに成功した。その結果、高い膜透過性の獲得には、主鎖配座の適切な制御に加えて、アミノ酸側鎖の疎水性や導入位置といった側鎖の最適化が不可欠であることを明らかにした。さらに MD シミュレーションから、主鎖配座が共通する場合、側鎖構造に起因する水分子との相互作用の違いが膜透過性の差を生む要因となることが示唆された。本研究の成果は、膜透過性環状ペプチドの合理的設計および膜透過性予測シミュレーションの構築に資する基盤的知見を提供する。