

論文の内容の要旨

論文題目

RNA 二重鎖を認識するカチオン性人工ペプチドの合成

氏 名 前田 雄介

【緒言】

核酸医薬は疾病治療薬として有用だが、その中でも様々な疾病を標的とした RNAi 医薬の研究が近年注目を集めている。RNAi 医薬とは、RNA 干渉を利用して標的 mRNA と結合、分解することにより疾病関連タンパク質の発現を抑制する医薬品である。RNAi 医薬は、塩基配列を認識するため選択性が高く、創薬開発期間が短いという利点を有する。しかし一方で、生体内での安定性や細胞膜透過性が低く、RNAi 医薬単体では有効な活性を示さない。そのため、実用化に向け、標的細胞への効率的なドラッグデリバリーシステム (DDS) の確立が求められている。

RNAi 医薬の本体は siRNA と呼ばれる短鎖の二本鎖 RNA であり、RNA 二重鎖に結合しかつ、標的細胞へ輸送する機能を有する分子が創製出来れば、RNAi 医薬の DDS への利用が期待される。そこで当研究室では、RNA 二重鎖に効率的に結合する分子の獲得を目指している。RNA は、骨格のリン酸基が規則的に配列した負電荷を有しているため、対応する部位に正電荷を有する化合物は、核酸と静電的相互作用により結合することが期待される。既に当研究室では先行研究として RNA 二重鎖に結合するオリゴジアミノ糖の合成に成功している。本研究では、固相合成法が確立しており、多量体の合成が簡便に行えるペプチド誘導体に着目した。更に、その様なペプチドに分子認識能を有するシグナルペプチドを連続して合成できることに加え、末端のビオチン化や蛍光基の導入など機能化が容易であり、RNAi 医薬の輸送分子としての有用性が期待される。

本研究では、種々の骨格を有するカチオン性ペプチドを合成し、RNA 二重鎖との結合能を比較、検討し、RNA 二重鎖への結合において重要な構造を模索すること目的とした。正電荷をもつアミノ基又はグアニジル基を有するペプチドにおいて、官能基の間隔を制御することで、RNA 二重鎖上のリン酸と相互作用に適した官能基の配置を検討した。また、主鎖及び側鎖の自由度を変化させるため、環状アミノ酸としてプロリン骨格に着目し、アミノプロリンを用いたペプチドを設計した。種々のカチオン性オリゴペプチドと RNA の相互作用比較から有効な相互作用を形成する構造を考察した。

【実験・結果と考察】

カチオン性人工ペプチド設計

官能基の配置と核酸二重鎖との相互作用の相関を検討するため、種々のアミノ酸を用いてペプチドを設計した (Fig. 1, 2)。まず、官能基間距離と相互作用の影響を検討するため、側鎖長の異なるジアミノプロピオン酸 (Dap)、ジアミノブチル酸 (Dab)、オルニチン (Orn)、リジン (Lys) を用いて、異なるアミノ基間距離を有するペプチドを設計した。また、グアニジル基間距離を制御するため、側鎖長の異なるアミノグアニジルプロピオン酸 (Agp)、アミノグアニジルブチル酸 (Agb)、アルギニン (Arg) のオリゴマーを設計した。続いて、ペプチドの自由度と相互作用の影響に着目した。側鎖長による結合力の差は、官能基の自由度の差に起因すると考えられる。それに対して主鎖の自由度を増加させるため、Agps に対して自由度の高い Gly を 1, 2, 3 ヶ所に挿入することで、主鎖の自由度を増大させたペプチド、AgpsG1, G2, G3 を設計した。一方、ペプチドの自由度を制限するため、環状アミノ酸であるアミノプロリン (Amp) を導入したペプチドを設計した。更に、水素結合を形成することが知られているセリン (Ser) やアスパラギン (Asn) と Agp の交互配列を設計し、配列や官能基の組み合わせの影響に関して検討した。これらのペプチドと核酸との結合はペプチド核酸複合体の融解温度

(T_m) から評価した。

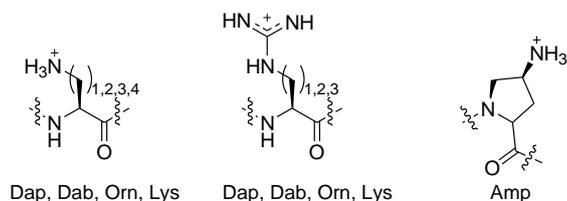


Fig. 1 structures of cationic amino acids

Peptides with amino groups

Dap₈ : Ac-YGG-Dap₈-NH₂
 Dab₈ : Ac-YGG-Dab₈-NH₂
 Orn₈ : Ac-YGG-Orn₈-NH₂
 Lys₈ : Ac-YGG-Lys₈-NH₂

Peptides with amino groups

Agp₈ : Ac-YGG-Agp₈-NH₂
 Agb₈ : Ac-YGG-Agb₈-NH₂
 Arg₈ : Ac-YGG-Arg₈-NH₂

Peptides with flexible main chains

Agp₈G1 : Ac-YGG-Agp₄-G-Agp₄-NH₂
 Agp₈G2 : Ac-YGG-Agp₃-G-Agp₂-G-Agp₃-NH₂
 Agp₈G3 : Ac-YGG-Agp₂-G-Agp₂-G-Agp₂-G-Agp₂-NH₂

Peptides with proline structures

Dab₇Amp1 : Ac-YGG-Dab₄-Amp-Dab₃-NH₂
 Dab₆Amp2 : Ac-YGG-Dab₂-Amp-Dab₂-Amp-Dab₂-NH₂

Peptides with proline structures

AgpG : Ac-YGG-(Agp-G)₄-NH₂
 AgpS : Ac-YGG-(Agp-S)₄-NH₂
 AgpN : Ac-YGG-(Agp-N)₄-NH₂

Fig. 2 sequence of oligocationic peptides

融解温度測定

・アミノ基間距離の検討

分子内のアミノ基間距離が異なるペプチド、Dap₈, Dab₈, Orn₈, Lys₈とRNAの複合体を形成させ、その T_m から RNA に対する結合能を評価した。ペプチド間での T_m 値を比較したところ、側鎖長による有意な差が見られた (Fig. 3)。特に、Dab₈, Orn₈, Lys₈を比較すると、側鎖長が短いほど熱安定性が高い傾向が見られ、Dab₈において最も高い T_m 値が得られた。一方、ペプチドと DNA 複合体を形成したところ、いずれのペプチドにおいても T_m 値の上昇が見られなかった。これらの結果から、アミノ基提示ペプチドは RNA 選択的に結合し、また官能基間距離を制御することにより親和力が向上することが明らかとなった。

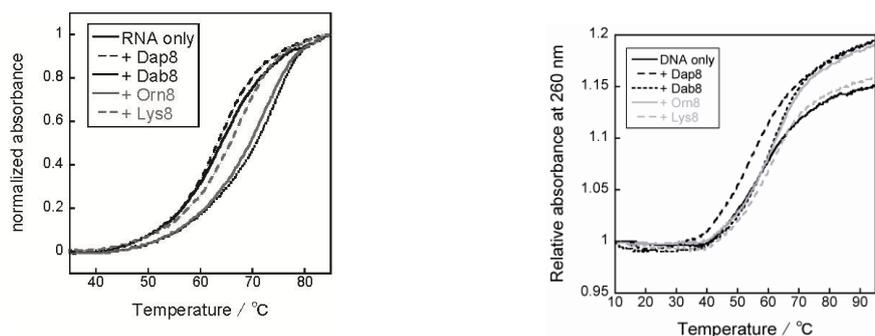


Fig. 3 UV melting profile of nucleic acid duplexes-peptides with amino groups complexes.

・グアニジル基間距離の検討

続いて、リン酸とより強い相互作用を形成することが知られているグアニジル基を提示したペプチドと RNA との結合能を比較した。アミノ基の場合と同様に側鎖長による有意な差が見られ (Fig. 4)、側鎖長が短いほど高い T_m 値を示す傾向が見られた。しかし、アミノ基提示ペプチドとは異なり、最も側鎖長が短い Agp₈ において最も高い T_m 値を示した。以上の結果から、グアニジル基提示ペプチドにおいても、官能基間距離を制御することで親和力が向上することが示された。また、Dab₈ と Agp₈ を比較すると Agp₈ の方が 8-9 °C 高い T_m 値を示すことから、正電荷をもつ官能基間でも RNA に対する結合力が大きく異なることが示唆された。

一方、DNA との複合体においては逆の傾向が見られ (Fig. 4)、グアニジル基間距離が長いほど高い T_m 値を示した。これは、DNA のリン酸基間距離が RNA のリン酸基間距離と比較して 2 倍以上長いいため、側鎖長が長いほどリン酸との相互作用に有利であるためと考えられる。このことから、側鎖長を短くすることにより、リン酸と親和力が強いグアニジル基を提示したペプチドにおいても RNA 選択的に相互作用することが示された。

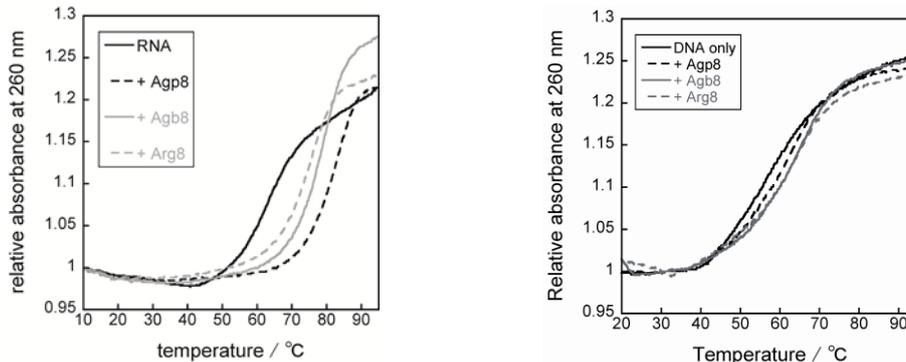


Fig. 4 UV melting profile of nucleic acid duplexes-peptides with guanidine groups complexes.

・自由度の検討

上記の結果より、ペプチド側鎖長を制御したことによる親和力への影響が見られた。これは、リン酸基の間隔と官能基の間隔が適合することによる親和力の変化だけではなく、ペプチド自身の自由度の影響が懸念される。そこで、ペプチドの自由度の影響を検討するため、主鎖の自由度を増大させた各 AgpsG1, G2, G3 と RNA 複合体との T_m 値を比較した。しかし、いずれのペプチドにおいても同程度の熱安定性が見られ、Gly を導入したことによる熱安定性の変化は見られなかった (Fig. 5)。

一方、アミノ基及びグアニジル基提示ペプチドにおいて、RNA に対して最も高い T_m を示した Dab₈ に対して 1, 2 ヶ所を Amp に置換したペプチドを合成した。それぞれ RNA との複合体を形成したところ、官能基によって異なる性質を示した。Dab₈ に対して Amp に置換した Dab₇Amp₁, Dab₆Amp₂ において、Amp 導入による T_m 値の減少が見られた (Fig. 5)。これは、主に側鎖のアミノ基が、直接環構造に提示されているために方向性が制御され、リン酸と有効に相互作用する位置を取れないためと考えている。

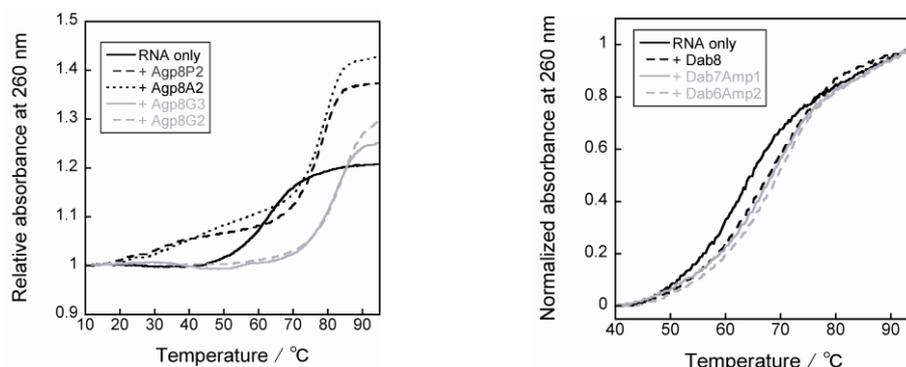


Fig. 5 UV melting profile of nucleic acid duplexes-peptides with flexible main chain or proline structures complexes.

・交互配列

グアニジル基の配置や官能基の組み合わせについて検討するため、交互配列のペプチドを設計した。Agp に対し自由度の高い Gly 及び RNA 結合タンパク質中で RNA のリン酸と水素結合することが知られている Ser, Asn との交互配列、それぞれ AgpG, AgpS, AgpN を設計した。RNA に対して Agp₄ が優位に熱安定性を向上させるのに対して AgpG は T_m 値の変化が見られなかった (Fig. 6)。この結果より、RNA 二重鎖への結合において、Agp の連続した配列が重要な構造単位であることが示唆された。特に上記の Agp₈G₃ においても極めて有効に熱安定性を向上させたことから、Agp の二量体の構造が RNA との結合において重要な構造単位であることが推測される。一方 AgpS, AgpN においても RNA に対する熱安定性の向上が見られなかった。タンパク質中で水素結合を形成する Ser や Asn においても、Agp との組み合わせによる有効な相互作用を形成することができず、RNA 結合分子の設計において正電荷の官能基の配置の重要性が示された。

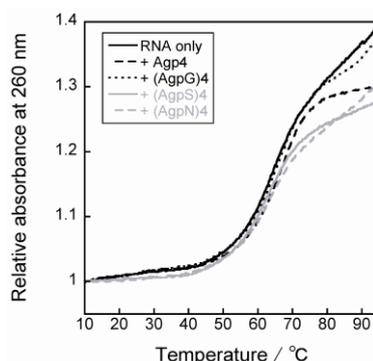


Fig. 6 UV melting profile of nucleic acid duplexes-peptides with alternate arrangement complexes.

等温滴定カロリーメトリー (ITC) 測定

ペプチド-RNA 間の相互作用の詳細な解析を行うため、等温滴定カロリーメトリー (ITC) 測定を試みた。アミノ基及びグアニジル基を提示したペプチドにおいて最も高い T_m を示した Dabs, Agps をそれぞれ RNA, DNA に対して滴定した。しかし、相互作用を測定したところいずれの場合においても静電的相互作用による発熱を伴う相互作用だけではなく、脱水和や脱リン酸和による吸熱を伴う相互作用も観測され、熱力学的パラメータを算出できなかった。しかし、Dabs, Agps は RNA に対して相互作用による熱量変化が観測できたのに対して、DNA に対しては熱量変化が見られず、RNA 選択的に相互作用していることが示唆された。また、RNA の major groove に結合するネオマイシンを用いて結合阻害実験を行った。過剰量のネオマイシン存在下で相互作用を測定したところ、いずれのペプチドにおいても相互作用の阻害が見られた。このことから、Dabs, Agps はネオマイシンが結合する major groove またはその近傍に結合することが示唆された。

CD スペクトル測定

ペプチドの構造及び RNA, DNA-ペプチド複合体の二次構造を確認するため CD スペクトルを測定した。いずれのペプチドにおいてもランダムコイルを示すシグナルが得られ、二次構造による相互作用の差は生じないことが示唆された。続いて、RNA, DNA 二重鎖にペプチドを添加した際の CD スペクトルを測定したところ、いずれの場合においても、ペプチドによる核酸二重鎖の構造変化は見られなかった。核酸の構造がペプチドの構造よりも安定であるため、相互作用による構造変化が見られなかったと考えられる。

【結論】

本研究では、非天然アミノ酸を用いて種々のオリゴカチオン性人工ペプチドを合成し、核酸二重鎖との結合を比較した。官能基間距離を制御することにより、RNA に対して選択的に結合するペプチドを獲得した。特に、Agp の連続した配列が RNA 二重鎖への結合において極めて重要な構造であることが明らかとなった。本研究で設計した Agps は、RNA 二重鎖に結合する分子として有用であり、他の分子との連結により RNAi 医薬の DDS への活用が期待される。

【発表状況】

Maeda, Y. Iwata, R., Wada, T. *Peptide Science* 2011, 2012, 231-232.

Maeda, Y. Iwata, R., Wada, T. *Peptide Science* 2012, in press