

Figure 2. CLSM images of T47D cells that had been treated with FAM-2 or FAM-5 (peptide concentration: $1 \mu\text{M}$, incubation time: 3 h). (a) Bright-field images, (b) nuclei stained with Hoechst 33342 (blue), (c) the intracellular distribution of the FAM-conjugated peptides (green), and (d) merged images.

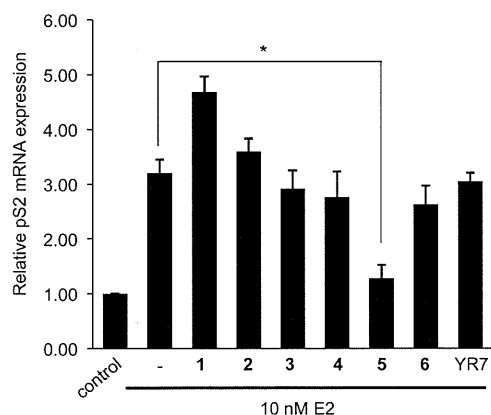


Figure 3. Inhibition of ER α -mediated gene expression in T47D cells. Peptide concentration: $3 \mu\text{M}$. The error bars represent standard deviation, $n = 3$. * $p < 0.05$.

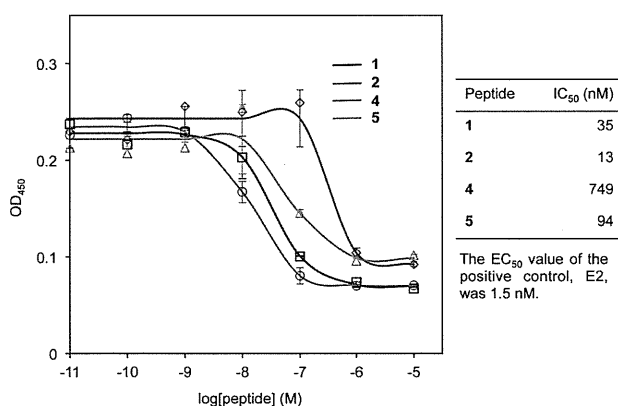


Figure 4. IC₅₀ values of peptides against ER α -cofactor interactions according to RCAS.

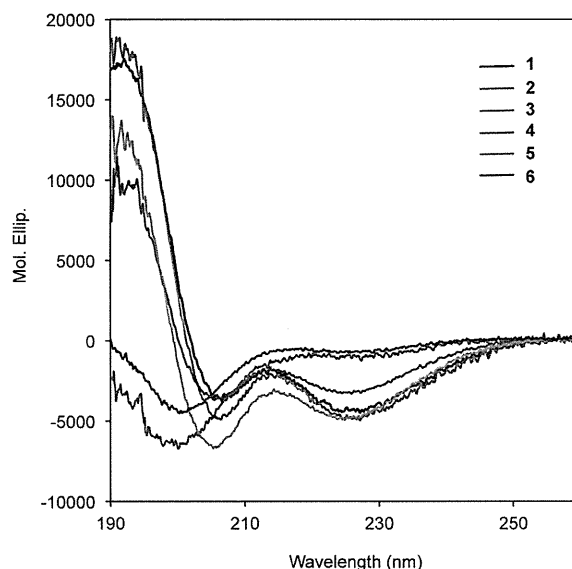


Figure 5. CD spectra of peptides 1–6 in the 190–260 nm region. Peptide concentration: $100 \mu\text{M}$ in 20% aqueous TFE solution.

their CD spectra, and it was found that **5** formed a right-handed α -helical structure similar to that of the R7-unconjugated peptide **2**. The R7-conjugation of the PERM did not disrupt their helical structures. These results indicate that the conjugation of PERM to R7 would aid the development of novel inhibitors of ER-mediated transcription at the cellular level. The derivatization of further helical peptides and detailed studies of their inhibitory mechanisms are currently underway.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Information about the synthesis and purification of the peptides and the protocols of the in vitro assays. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: demizu@nihs.go.jp. Tel: + 81-3-3700-1141; Fax: + 81-3-3707-6950.

*E-mail: masaaki@nihs.go.jp. Tel: + 81-3-3700-1141; Fax: + 81-3-3707-6950.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

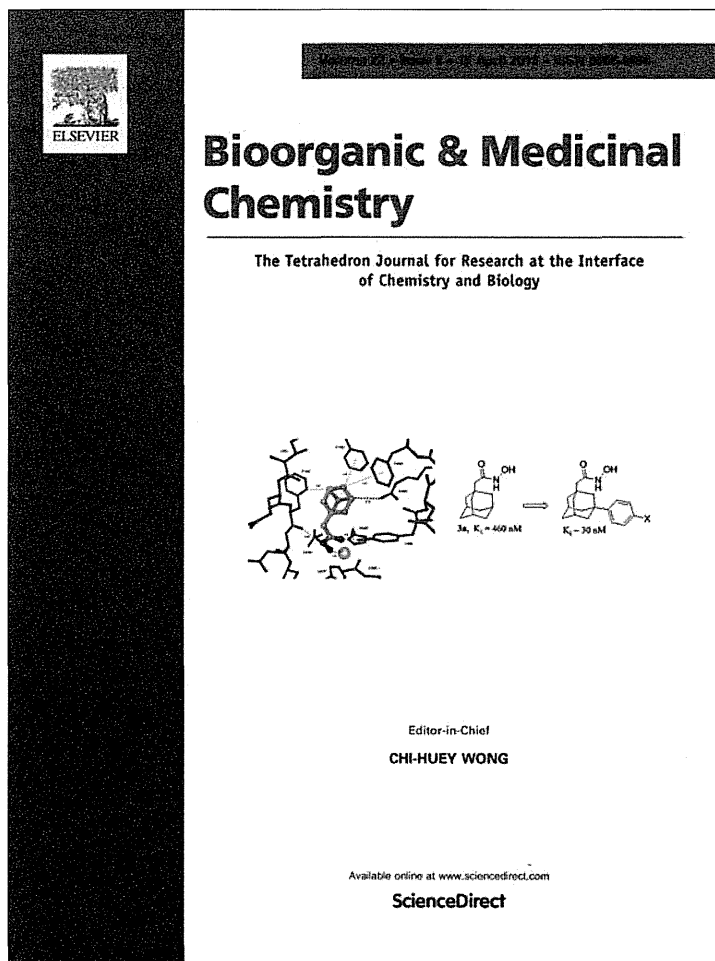
This study was supported, in part, by JSPS KAKENHI Grant Numbers 26460169 (Y.D.), 26670041 (Y.K.), and 25893038 (T.M.) and by a Grant-in-Aid from the Tokyo Biochemical Research Foundation (Y.D.).

ABBREVIATIONS

Akt, protein kinase B; CD, circular dichroism; CLSM, confocal laser scanning microscopy; ER, estrogen receptor; E2, 17 β -estradiol; PERM, peptidomimetic estrogen receptor modulators; RCAS, receptor cofactor assay systems; R7, heptaarginine; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol

REFERENCES

- Holst, F., Stahl, P. R., Ruiz, C., Hellwinkel, O., Jehan, Z., Wendland, M., Lebeau, A., Terracciano, L., Al-Kuraya, K., Jänicke, F., Sauter, G., and Simon, R. (2007) Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat. Genet.* 39, 655–660.
- Doisneau-Sixou, S. F., Cergio, C. M., Carroll, J. S., Hui, R., Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. (2003) Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* 10, 179–186.
- Foster, J. S., Henley, D. C., Bukovsky, A., Seth, P., and Wimalasena, J. (2001) Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Mol. Cell. Biol.* 21, 794–810.
- Howell, S. J., Johnston, S. R., and Howell, A. (2004) The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 18, 47–66.
- Deroo, B. J., and Korach, K. S. (2006) Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 116, 561–570.
- Baumann, C. K., and Castiglione-Gertsch, M. (2007) Estrogen receptor modulators and down regulators. *Drugs* 67, 2335–2353.
- Demizu, Y., Okuhira, H., Motoi, H., Ohno, A., Shoda, T., Fukuhara, K., Okuda, H., Naito, M., and Kurihara, M. (2012) Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1793–1796.
- Shoda, T., Okuhira, K., Kato, M., Demizu, Y., Inoue, H., Naito, M., and Kurihara, M. (2014) Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 87–89.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1992) Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. *Lancet* 339, 71–85.
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., and Wolmark, N. (1998) Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 90, 1371–1388.
- Bernstein, L., Deapen, D., Cerhan, J. R., Schwartz, S. M., Liff, J., McGann-Maloney, E., Perlman, J. A., and Ford, L. (1999) Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1654–1662.
- Shang, Y., and Brown, M. (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295, 2465–2468.
- Arpino, G., Wiechmann, L., Osborne, C. K., and Schiff, R. (2008) Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr. Rev.* 29, 217–233.
- Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Zhang, X.-T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.-Y., Sheng, J., and Sun, Q.-Y. (2010) ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One* 5, e9013.
- Demizu, Y., Nagoya, S., Shirakawa, M., Kawamura, M., Yamagata, N., Sato, Y., Doi, M., and Kurihara, M. (2013) Development of stapled short helical peptides capable of inhibiting vitamin D receptor (VDR)-coactivator interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 4292–4296.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733–736.
- Hall, J. M., and McDonnell, D. P. (2005) Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol. Interventions* 5, 343–357.
- Hall, J. M., Chang, C., and McDonnell, D. P. (2000) Development of peptide antagonists that target estrogen receptor β -coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* 14, 2010–2023.
- Leduc, A.-M., Trent, J. O., Wittliff, J. L., Bramlett, K. S., Briggs, S. L., Chirgadze, N. Y., Wang, Y., Burris, T. P., and Spatola, A. F. (2003) Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11273–11278.
- Galante, A. K., Bramlett, K. S., Trent, J. O., Burris, T. P., Wittliff, J. L., and Spatola, A. F. (2005) Protein inhibitors of LXXLL-based protein-protein interactions. *ChemBioChem* 6, 1991–1998.
- Phan, T., Nguyen, H. D., Göksel, H., Möcklinghoff, S., and Brunsveld, L. (2010) Phage display selection of miniprotein binders of the Estrogen receptor. *Chem. Commun.* 46, 8207–8209.
- Phillips, C., Roberts, L. R., Schade, M., Bazin, R., Bent, A., Davies, N. L., Moore, R., Pannifer, A. D., Pickford, A. R., Prior, S. H., Read, C. M., Scott, A., Brown, D. G., Xu, B., and Irving, S. L. (2011) Design and structure of stapled peptides binding to estrogen receptors. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 8207–8209.
- Carraz, M., Zwart, W., Phan, T., Michalides, R., and Brunsveld, L. (2009) Perturbation of estrogen receptor α localization with synthetic nona-arginine LXXLL-peptide coactivator binding inhibitors. *Chem. Biol.* 16, 702–711.
- Tints, K., Prink, M., Neuman, T., and Palm, K. (2014) LXXLL peptide converts transportan 10 to a potent inducer of apoptosis in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 5680–5698.
- Nakase, I., Akita, H., Kogure, K., Gråslund, A., Langel, Ü., Harashima, H., and Futaki, S. (2012) Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides. *Acc. Chem. Res.* 45, 1132–1139.
- Yamashita, H., Demizu, Y., Shoda, T., Sato, Y., Oba, M., Tanaka, M., and Kurihara, M. (2014) Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2403–2408.
- A tyrosine residue was attached to the N-terminus of the heptaarginine fragment, as it enabled the concentrations of the peptides to be determined.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

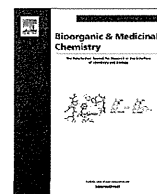
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability



Hiroko Yamashita^{a,b}, Yosuke Demizu^{a,*}, Takuji Shoda^a, Yukiko Sato^a, Makoto Oba^c, Masakazu Tanaka^c, Masaaki Kurihara^{a,b,*}

^a Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

^b Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8501, Japan

^c Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2014

Revised 28 February 2014

Accepted 4 March 2014

Available online 13 March 2014

Keywords:

Cell-penetrating peptide

Helical structure

Conformation

DDS carrier

ABSTRACT

We synthesized four types of arginine-based amphipathic nonapeptides, including two homochiral peptides, R-(L-Arg-L-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: **FAM-1**; R = Ac: **Ac-1**) and R-(D-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: *ent*-**FAM-1**; R = Ac: *ent*-**Ac-1**); a heterochiral peptide, R-(L-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: **FAM-2**; R = Ac: **Ac-2**); and a racemic mixture of diastereomeric peptides, R-(*rac*-Arg-*rac*-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: **FAM-3**; R = Ac: **Ac-3**), and then investigated the relationship between their secondary structures and their ability to pass through cell membranes. Peptides **1** and *ent*-**1** formed stable one-handed α-helical structures and were more effective at penetrating HeLa cells than the non-helical peptides **2** and **3**.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Helices in peptides and proteins play an important role in a variety of fields such as biology, chemistry, and medicinal chemistry; therefore, the development of helical peptide foldamers has received increasing attention in recent years.¹ Non-proteinogenic amino acids, such as α,α-disubstituted α-amino acids (dAA) and cyclic β-amino acids, are often utilized as templates for the helical stabilization of short peptides.² In particular, α-aminoisobutyric acid (Aib) is the simplest achiral dAA, and has been found to be a useful helical promoter.³ We have recently reported that the insertion of achiral Aib residues into short Leu-based homochiral L-peptides and heterochiral LD-peptides with alternating L-Leu and D-Leu residues is useful for controlling their helical structures.⁴ That is to say, the nona-L-peptide Boc-(L-Leu-L-Leu-Aib)₃-OMe (**A**) formed a stable right-handed (P) 3₁₀-helix,^{4b} whereas the nona-LD-peptide Boc-(L-Leu-D-Leu-Aib)₃-OMe (**B**) preferred a (P) α-helix (Fig. 1).^{4c,d}

Among helical peptides, some amphipathic peptides containing hydrophobic and cationic amino acid residues have unique properties such as antimicrobial activity and the ability to enter cells.⁵ Cell-penetrating peptides (CPP) are capable of efficiently delivering hydrophilic molecules, such as peptides, proteins, and DNA, into cells.⁶ The hydrophobic amino acid residues and cationic amino acid

residues that comprise the helices found in amphipathic CPP are usually aligned in the direction specified for the helix itself. However, natural CPP are not sufficiently stable in the bloodstream as they are susceptible to degradation by proteases. Conversely, non-natural peptides containing D-amino acids and dAA would be expected to have stable helices and be resistant to proteolytic degradation.^{5c,7} In addition, stabilized helical amphipathic peptides containing non-proteinogenic amino acids are known to be capable of passing through cellular membranes. As part of our ongoing research into controlling the secondary structures of short peptides, we designed four types of amphipathic nonapeptides containing L-Arg, D-Arg, and achiral Aib residues. Namely, two homochiral peptides, R-(L-Arg-L-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: **FAM-1**; R = acetyl group (**Ac**): **Ac-1**; FAM: fluorescein) and R-(D-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: *ent*-**FAM-1**; R = Ac: *ent*-**Ac-1**); a heterochiral peptide, R-(L-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: **FAM-2**; R = Ac: **Ac-2**); and a racemic mixture of diastereomeric peptides, R-(*rac*-Arg-*rac*-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM-β-Ala: **FAM-3**; R = Ac: **Ac-3**), were synthesized and then the relationship between their secondary structures and cell-penetrating ability was investigated.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of peptides

The **FAM-1-3** and *ent*-**FAM-1** peptides, which contained N-terminal fluorescein (6-FAM) labels, as well as N-terminal acetylated

* Corresponding authors. Tel.: +81 3 3700 1141; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail addresses: demizu@nihs.go.jp (Y. Demizu), masaaki@nihs.go.jp (M. Kurihara).

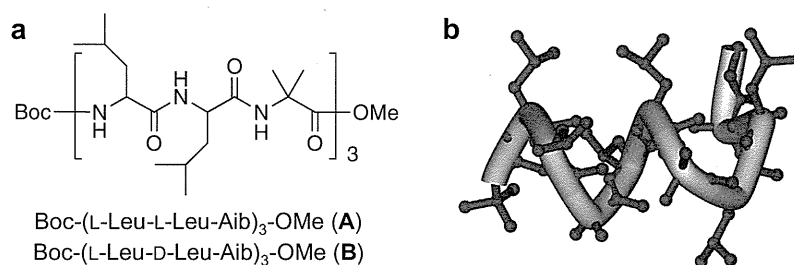


Figure 1. (a) Chemical structures of the nona-L-peptide A and the nona-D-peptide B. (b) X-ray diffraction structure of B.

Ac-1-3 and *ent*-**Ac-1** peptides were synthesized using a microwave-assisted solid-phase method based on Fmoc protection of their main chain amino groups. All of the peptides were purified by reversed-phase high performance liquid chromatography and characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (Fig. 2).

2.2. Biological evaluation

We examined the ability of **FAM-1-3** and *ent*-**FAM-1** to pass through the membranes of HeLa cells. After incubating the cells for 2 h at 37 °C, the fluorescence intensity of the resultant cell lysate was measured with a spectrofluorometer. The homochiral

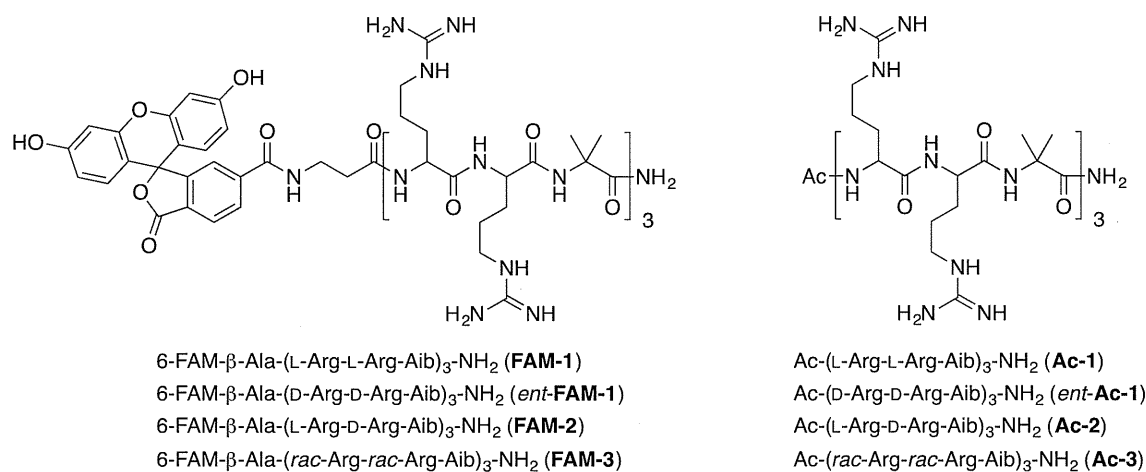


Figure 2. Chemical structures of the designated peptides.

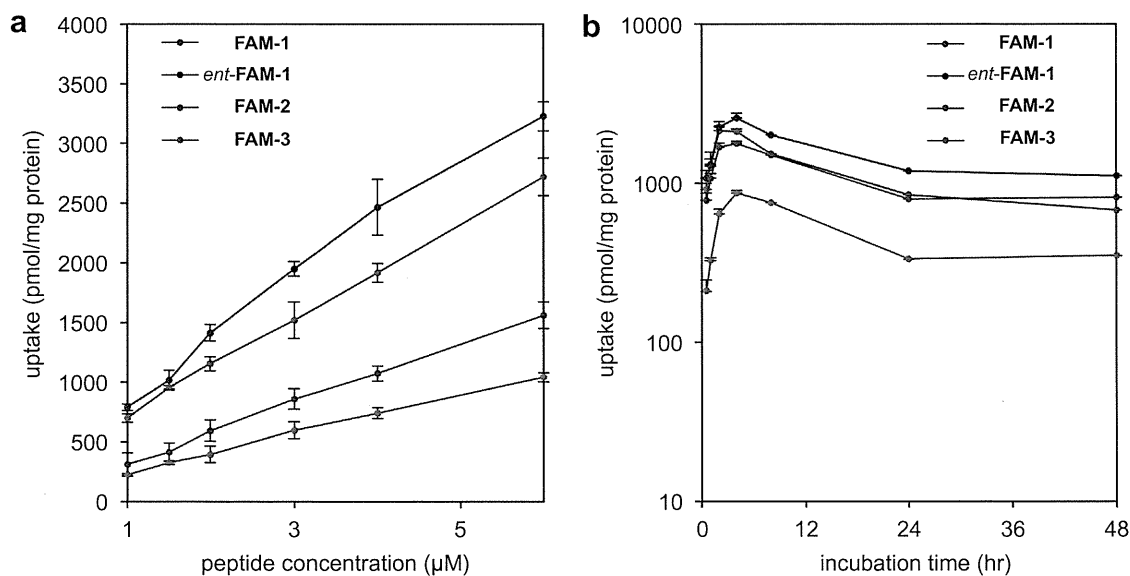


Figure 3. Cellular uptake of **FAM-1-3** and *ent*-**FAM-1** (a) at concentrations of 1–6 μM (incubation time: 2 h), and (b) for incubation periods of 0.5–48 h (peptide concentration: 1 μM). The error bars represent standard deviation, $n = 4$.

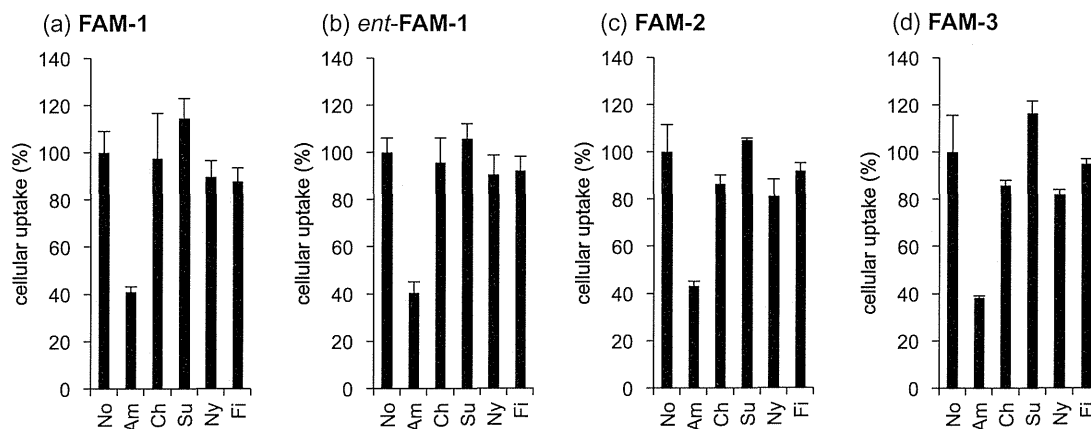


Figure 4. Effects of various inhibitors on the internalization of **FAM-1-3** and **ent-FAM-1** (peptide concentration: 1 μ M). The error bars represent standard deviation, $n = 4$.

peptides **FAM-1** and **ent-FAM-1** penetrated the cells more efficiently than the other peptides, whereas the heterochiral peptide **FAM-2** and the racemic peptide **FAM-3** were poorly taken up by the cells (Fig. 3a). Figure 3b shows the uptake of **FAM-1-3** and **ent-FAM-1** by HeLa cells following incubation at 37 °C for 0.5–48 h. The cellular uptake of all peptides increased up to 4 h incubation, but further incubation gradually decreased their uptake.

Figure 4 shows the effects of various endocytosis pathway inhibitors [amiloride (Am), an inhibitor of macropinocytosis; chlorpromazine (Ch), an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis; sucrose (Su), an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis; nystatin (Ny), an inhibitor of caveolae-mediated endocytosis; or filipin (Fi), an inhibitor of caveolae-mediated endocytosis] on the internalization of **FAM-1-3** and **ent-FAM-1** into HeLa cells.⁸ The uptake of all peptides was inhibited by treatment with amiloride, whereas none of the other inhibitors affected the uptake of the peptides. This suggests that these four peptides were mainly transported into the cells via macropinocytosis.

The results of a cytotoxicity analysis in which HeLa cells were treated with **FAM-1-3** or **ent-FAM-1** for 2 h at concentrations of 1, 2, and 4 μ M are shown in Figure 5. None of the peptides exhibited significant cytotoxicity under these experimental conditions, indicating the low cellular toxicity of each peptide.

The intracellular distribution of **ent-FAM-1** (green) in HeLa cells was assessed using confocal laser scanning microscopy (CLSM) after the cells' late endosomes/lysosomes had been stained with LysoTracker Red (red) and their nuclei had been stained with Hoechst 33342 (blue) (Fig. 6). **ent-FAM-1** was mainly observed as small green spots and spreading green regions (Fig. 6d), and only $21.6 \pm 9.6\%$ of **ent-FAM-1** was localized in the late endosomes/lysosomes. The four examined peptides including **ent-FAM-1** were mainly transported into the cells via macropinocytosis (Fig. 4). However, it is considered that macropinosomes do not fuse with lysosomes and are inherently leaky compared with other types of endosomes.⁹ Thus, it is unlikely that **ent-FAM-1** that is internalized via macropinocytosis is transported into late endosomes/lysosomes. No **ent-FAM-1** was detected in the nuclei of the HeLa cells.

2.3. Conformational analysis of peptides

The conformations of the **Ac-1-3** and **ent-Ac-1** peptides were analyzed based on their CD spectra, which were obtained at a peptide concentration of 100 μ M in 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) solution. The spectra of the acetylated peptide **Ac-1**, which contained the sequence L-Arg-L-Arg-Aib, exhibited negative maxima at around 208 and 224 nm, indicating that the helix had a

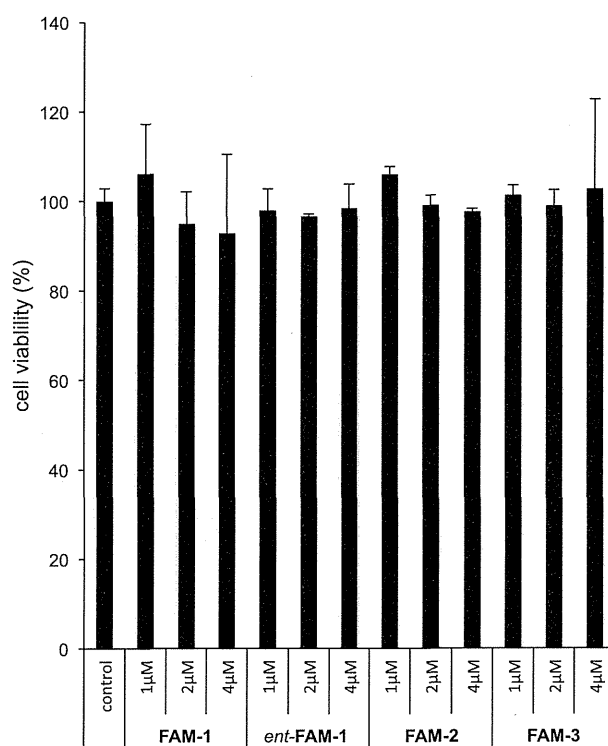


Figure 5. Cellular toxicity of **FAM-1-3** and **ent-FAM-1** at concentrations of 1, 2, and 4 μ M. The error bars represent standard deviation, $n = 4$.

right-handed (*P*) screw sense (Fig. 7).^{4a,b} The *R* ratio of **Ac-1** ($\theta_{224}/\theta_{208}$) suggested that its dominant structure was an α -helix ($R = 0.7$).¹⁰ The CD spectrum of the **ent-Ac-1** peptide was a mirror-image of that of **Ac-1**; i.e., it indicated that **ent-Ac-1** formed a left-handed (*M*) α -helix. On the other hand, the spectra of heterochiral **Ac-2** did not display the characteristics of helical structures. The racemic peptide **Ac-3** did not show CD signal because of racemic mixtures of several isomers.

MacroModel was used together with the OPLS_2005 force field to calculate (20,000 times for each calculation) the global-minimum energy conformation of the homochiral peptide **Ac-1** and the heterochiral **Ac-2**. Their minimized structures are shown in Figure 8. **Ac-1** (Fig. 8a) was found to form a (*P*) α -helix, the Arg and Aib residues of which were aligned in the specified direction. On the other hand, **Ac-2** did not form a helical structure, but rather,

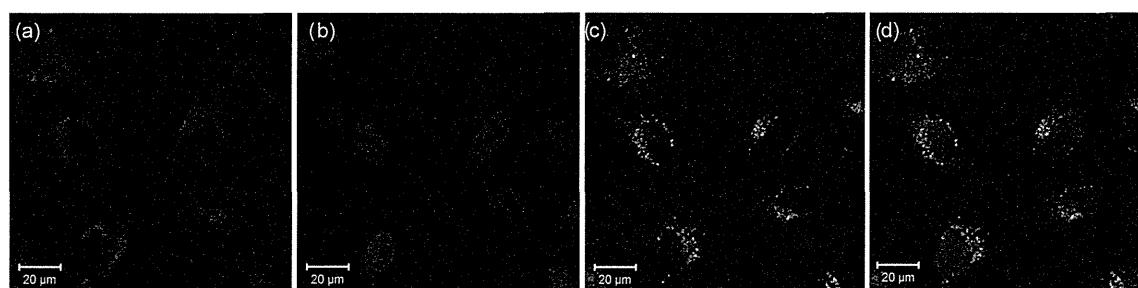


Figure 6. CLSM images of HeLa cells that had been treated with *ent*-FAM-1 (peptide concentration: 4 μ M, incubation time: 2 h). (a) Acidic late endosomes/lysosomes stained with LysoTracker Red (red), (b) nuclei stained with Hoechst 33342 (blue), (c) the intracellular distribution of *ent*-FAM-1 (green), and (d) merged image. The scale bars represent 20 μ m.

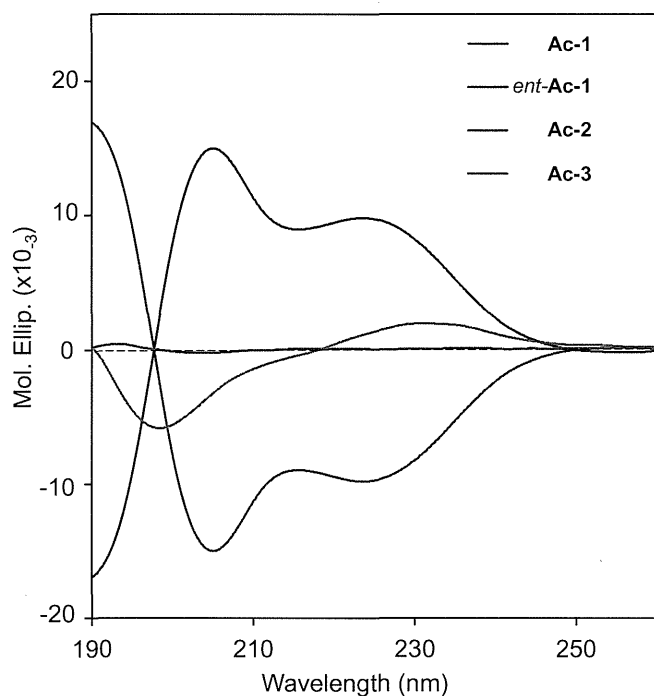


Figure 7. CD spectra of Ac-1–3 and *ent*-Ac-1 in the 190–260 nm region. Peptide concentration: 100 μ M in TFE solution.

produced a random coil as its global-minimum energy conformation (Fig. 8b).

3. Conclusion

We synthesized four types of amphipathic nonapeptides; i.e., two homochiral peptides, R-(L-Arg-L-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM- β -Ala: **FAM-1**; R = Ac: **Ac-1**) and R-(D-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM- β -Ala: *ent*-**FAM-1**; R = Ac: *ent*-**Ac-1**); a heterochiral peptide, R-(L-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM- β -Ala: **FAM-2**; R = Ac: **Ac-2**); and a racemic mixture of diastereomeric peptides, R-(*rac*-Arg-*rac*-Arg-Aib)₃-NH₂ (R = 6-FAM- β -Ala: **FAM-3**; Ac: **Ac-3**) to investigate the relationship between their secondary structures and cell-penetrating ability. The homochiral peptides **1** and *ent*-**1** both formed one-handed α -helices and were able to efficiently penetrate HeLa cells. The D-Arg-based peptide *ent*-**1** exhibited slightly higher activity than the L-Arg-based peptide **1** because *ent*-**1** was only composed of non-proteinogenic amino acids and hence was more resistant to proteolytic degradation than peptide **1**, which contained natural L-Arg residues. Conversely, the heterochiral peptide **2** did not form a helical structure, but rather formed a random structure and displayed lower cell permeability than the homochiral peptides **1** and *ent*-**1**. The heterochiral hydrophobic nonapeptide Boc-(L-Leu-D-Leu-Aib)₃-OMe preferred a right-handed (*P*) α -helix,^{4c,d} but the heterochiral amphipathic nonapeptide **2** could not form a helical structure. This was probably because the cationic guanidine moieties of the L-Arg and D-Arg residues of **2** collided with each other to destabilize its helical structure. The peptide **3** composed of racemic mixtures of several isomers could

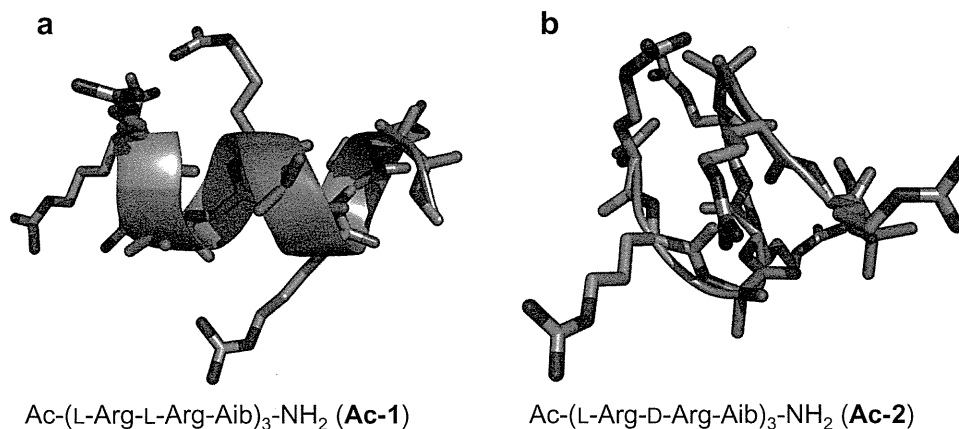


Figure 8. The calculated minimum-energy conformations of (a) Ac-1 and (b) Ac-2. Arg residues are shown in gray, and Aib residues are shown in magenta.

not enter HeLa cells efficiently. All of the peptides were mainly transported into the cells via macropinocytosis in the same way as oligoarginines (Arg)_n, and none of them exhibited significant cytotoxicity. The Aib-containing homochiral Arg-based peptides **1** and *ent-1* exhibited a strong propensity to form short helical sequences and penetrated HeLa cells more efficiently than the non-helical peptides **2** and **3**. Our results indicate that stabilized amphipathic short helical peptides could be used to deliver hydrophilic molecules into cells, as they are resistant to proteolytic degradation and exhibit low cytotoxicity.

4. Experimental section

4.1. General

CD spectra were recorded with a *Jasco J-720W* spectropolarimeter using a 1.0 mm path length cell. The data are expressed in terms of $[\theta]_R$; that is, total molar ellipticity (deg cm² dmol⁻¹). 2,2,2-Trifluoroethanol was used as a solvent.

4.2. Synthesis and characterization of peptides

The peptides were synthesized using Fmoc-solid phase methods on NovaPEG Rink amide resin. Microwave irradiation was used for the coupling-deprotection cycle. The following describes a representative coupling and deprotection cycle at a 25 μmol scale. First, 65 mg NovaPEG Rink amide resin (loading: 0.5 mmol/g) were soaked for 1 h in CH₂Cl₂. After the resin had been washed with *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP), Fmoc-amino acid (4 equiv), and HBTU (4 equiv) dissolved in 1.5 mL NMP were added to the resin. Then, *N,N*-diisopropylethylamine (4 equiv) and hydroxybenzotriazole (1.0 mL, 0.1 M solution in NMP) were added for the coupling reaction. Deprotection was carried out using 20% piperidine in dimethylformamide (2 mL). After the peptide synthesis, the resin was suspended in cleavage cocktail (1.9 mL trifluoroacetic acid [TFA], 50 μL water, 50 μL triisopropylsilane; final concentration: 95% TFA, 2.5% water, 2.5% triisopropylsilane) for 3 h at rt. The TFA solution was evaporated to a small volume under a stream of N₂ and dripped into cold ether to precipitate the peptides. The dried crude peptides were dissolved in 2 mL of 50% acetonitrile in water and then purified by reversed-phase HPLC using a Discovery[®] BIO Wide Pore C18 column (25 cm × 21.2 mm). After being purified, the peptide solutions were lyophilized. Peptide purity was assessed using analytical HPLC and a Discovery[®] BIO Wide Pore C18 column (25 cm × 4.6 mm), and the peptides were characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

4.3. Biology

4.3.1. Representative cellular uptake

HeLa cells were seeded onto 24-well culture plates (40,000 cells/well) and incubated overnight in 400 μL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). The medium was then replaced with fresh medium containing 10% FBS, and a solution containing one of the examined peptides was added to each well at an appropriate concentration. After the cells had been incubated with the peptides, the medium was removed, and the cells were washed 3 times with ice-cold phosphate buffer saline (PBS) supplemented with heparin (20 units/mL) and treated with cell lysis buffer M (Wako Pure Chem. Co., Ltd, Osaka, Japan). The fluorescence intensity of each lysate was measured using a spectrofluorometer (ND-3300, NanoDrop, Wilmington, DE, USA). The amount of protein in each well was concomitantly determined using a micro bicinchoninic acid

(BCA) protein assay reagent kit. The results are presented as the mean and standard error values obtained from 4 samples.

4.3.2. Inhibition of endocytosis

HeLa cells were seeded onto 24-well culture plates (40,000 cells/well) and incubated overnight in 400 μL of DMEM containing 10% FBS. After the medium had been replaced with fresh medium containing 10% FBS in the absence or presence of amiloride (5 mM), chlorpromazine (10 μg/mL), sucrose (0.4 M), nystatin (25 μg/mL), or filipin (5 μg/mL), the cells were pre-incubated at 37 °C for 30 min. Peptide solution was applied to each well at a concentration of 1 μM. After the cells had been incubated for 2 h, the medium was removed, and the cells were washed 3 times with ice-cold PBS supplemented with heparin (20 units/mL) and treated with cell lysis buffer M. The fluorescence intensity of each lysate was measured using a spectrofluorometer (ND-3300, NanoDrop). The amount of protein in each well was concomitantly determined using a micro BCA protein assay reagent kit. The results are presented as the mean and standard error values obtained from 4 samples.

4.3.3. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations

HeLa cells were seeded onto 8-well chambered cover glasses (Iwaki, Tokyo, Japan) (20,000 cells/well) and incubated overnight in 200 μL of DMEM containing 10% FBS. The medium was then replaced with fresh medium containing 10% FBS, and peptide solution was applied to each well at a concentration of 4 μM. After the cells had been incubated for 2 h, the medium was removed, and the cells were washed 3 times with ice-cold PBS supplemented with heparin (20 units/mL). The intracellular distribution of the complexes was observed by CLSM after staining late endosomes/lysosomes with LysoTracker Red and nuclei with Hoechst 33342. The CLSM observations were performed using an LSM 710 (Carl Zeiss, Oberlochen, Germany) equipped with a 63X objective lens (Plan-Apochromat, Carl Zeiss) at excitation wavelengths of 405 nm (UV laser) for Hoechst 33342, 488 nm (Ar laser) for the peptides, and 543 nm (He-Ne laser) for LysoTracker Red. The rate of colocalization of peptides with LysoTracker Red was quantified. Colocalization was quantified as follows: colocalization ratio (%) = peptide pixels colocalization/peptide pixels total × 100, where peptide pixels colocalization represents the number of peptide pixels colocalizing with LysoTracker Red in the cell, and peptide pixels total represents the number of all the peptide pixels in the cell. The results are presented as the mean and standard deviation obtained from 15 cells.

Acknowledgments

This study was supported, in part, by a Grant-in-Aid from the Tokyo Biochemical Research Foundation (Y.D.), and by JSPS KAKENHI Grant Number 25713008 (M.O.).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.005>.

References and notes

- (a) Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173; (b) Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111; (c) Goodman, C. M.; Choi, S.; Shandler, S.; DeGrado, W. F. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252; (d) Crisma, M.; Formaggio, F.; Moretto, A.; Toniolo, C. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, *84*, 3.
- (a) Royo, S.; Borggraefe, W. M. D.; Peggion, C.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Toniolo, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2036; (b) Demizu, Y.; Doi, M.; Kurihara, M.; Maruyama, T.; Suemune, H.; Tanaka, M. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 2430; (c) Anan, K.; Demizu, Y.; Oba, M.; Kurihara, M.; Doi, M.; Suemune, H.; Tanaka, M. *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 1694; (d) Price, J. L.

- Horne, W. S.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12378; (e) Boersma, M. D.; Haase, H. S.; Peterson-Kaufman, K. J.; Lee, E. F.; Clarke, O. B.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Fairlie, W. D.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 315; (f) Haase, H. S.; Peterson-Kaufman, K. J.; Lan Levensgood, S. K.; Checco, J. W.; Murphy, W. L.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7652; (g) Johnson, L. M.; Gellman, S. H. *Methods Enzymol.* **2013**, *523*, 407.
3. (a) Karle, I. L. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2001**, *60*, 351; (b) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131; (c) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2004**, *76*, 162; (d) Oba, M.; Demizu, Y.; Yamagata, N.; Sato, Y.; Doi, M.; Tanaka, M.; Suemune, H.; Okuda, H.; Kurihara, M. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2293.
 4. (a) Demizu, Y.; Tanaka, M.; Nagano, M.; Kurihara, M.; Doi, M.; Maruyama, T.; Suemune, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 840; (b) Demizu, Y.; Doi, M.; Kurihara, M.; Okuda, H.; Nagano, M.; Suemune, H.; Tanaka, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3303; (c) Demizu, Y.; Doi, M.; Sato, Y.; Tanaka, M.; Okuda, H.; Kurihara, M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11107; (d) Demizu, Y.; Yamashita, H.; Yamazaki, N.; Sato, Y.; Doi, M.; Tanaka, M.; Kurihara, M. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12106.
 5. (a) Potocky, T. B.; Menon, A. K.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3686; (b) Oehlke, J.; Birth, P.; Klauschenz, E.; Wiesner, B.; Beyermann, M.; Oksche, A.; Bienert, M. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4025; (c) Wada, S.; Tsuda, H.; Okada, T.; Urata, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5688.
 6. (a) Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. *J. Controlled Release* **2014**, *174*, 126; (b) Wada, S.; Hashimoto, Y.; Kawai, Y.; Miyata, K.; Tsuda, H.; Nakagawa, O.; Urata, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7669; (c) Nakase, I.; Akita, H.; Kogure, K.; Gråslund, A.; Langel, Ü.; Harashima, H.; Futaki, S. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1132; (d) Hyman, J. M.; Geihe, E. I.; Trantow, B. M.; Parvin, B.; Wnder, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 13225; (e) Seward, G. K.; Wei, Q.; Dmochowski, I. J. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2129; (f) Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637.
 7. (a) Yamaguchi, H.; Kodama, H.; Osada, S.; Kato, F.; Jelokhani-Niaraki, M.; Kondo, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2269; (b) Yeo, D. J.; Warriner, S. L.; Wilson, A. J. *Chem. Commun.* **2013**, 9131.
 8. (a) Rejman, J.; Bragonzi, A. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 468; (b) Lai, S. K.; Hida, K.; Man, S. T.; Chen, C.; Machamer, C.; Schroer, T. A.; Hanes, J. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2876; (c) Mudhakir, D.; Akita, H.; Tan, E.; Harashima, H. *J. Controlled Release* **2008**, *125*, 164; (d) Oba, M.; Tanaka, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 1064.
 9. (a) Conner, S. D.; Schmid, S. L. *Nature* **2003**, *422*, 37; (b) Mayor, S.; Pagano, R. E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 603.
 10. (a) Toniolo, C.; Polese, A.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Kamphuis, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2744; (b) Yoder, G.; Polese, A.; Silva, R. A. G. D.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Broxterman, Q. B.; Kamphuis, J.; Toniolo, C.; Keiderling, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10278; (c) Mammì, S.; Rainaldi, M.; Bellanda, M.; Schievano, E.; Peggion, E.; Broxterman, Q. B.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11735; (d) Pengo, P.; Pasquato, L.; Moro, S.; Brigo, A.; Fogolari, F.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Scrimin, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3388.

短鎖ペプチドのヘリカル構造制御と機能化

出水 庸介*
三澤 隆史
栗原 正明*

Development of Stabilized Short Helical Peptides and Their Functionalization

Yosuke Demizu*, Takashi Misawa, and Masaaki Kurihara*

Helices in proteins play an important role in a variety of fields such as biology, medicinal chemistry, and organic chemistry. Therefore, stabilized helical peptides have been developed in recent years. As tools for peptide-helix stabilization, non-proteinogenic amino acids such as α,α -disubstituted α -amino acids, cyclic β -amino acids, and cross-linked side chains are often utilized. Herein we report secondary structural control of short peptides using L-amino acids, D-amino acids, α,α -disubstituted α -amino acids, and cross-linked side chains. Furthermore, we applied the stabilized short helical peptides to the catalytic enantioselective epoxidation of α,β -unsaturated ketones, to the inhibitors of vitamin D receptor (VDR)-coactivator interaction, and to the efficient cell-penetrating molecules.

Key words: non-proteinogenic amino acid, peptide, secondary structure, organocatalyst, α,β -unsaturated ketone, enantioselective epoxidation, protein-protein interaction, vitamin D receptor, VDR-coactivator interaction inhibitor, cell penetrating peptide

はじめに

タンパク質はDNAの塩基配列に書き込まれた遺伝情報より発現し、それが精密な立体構造を形成することによって多種多様な機能を発揮する。ヒトに存在する約10万種類のタンパク質のなかで、医薬品開発に有用なものは3,000個程度であるといわれているが、これらのタンパク質は一次構造から始まり、 α -ヘリックス、 β -シートなどの二次構造をとり、さらに折り畳まれた立体的な三次構造、また複数のサブユニットが会合してできた四次構造を形成する。特にタンパク質中の二次構造は、DNAや他のタンパク質を認識する上で重要な役割を果たしている。これらの機能をオリゴペプチド単位で発現させるためには、安定な二次構造を形成できるペプチド分子を設計することが重要である。また、固相合成手法(縮合剤、保護基、レジン、マイクロウェーブ合成機)の進歩により、簡便、迅速にオリゴペプチドの合成ができるようになった。

近年、新規な低分子を設計・合成し、そのオリゴマーで安定な立体構造を構築し、機能を持たせようという研

究が国内外で活発に行われている。そのような特異かつコンパクトな立体構造をとる分子は、総じて「フォルダマー」と呼ばれており¹⁾、筆者の一人が留学していたウィスコンシン大学のGellman教授は、この領域のトップランナーとして世界をリードしている。特に、ヘリカル構造を模倣したフォルダマーによる、有機分子触媒やタンパク質-タンパク質相互作用阻害剤としての応用研究が盛んに行われている。例えば、ペプチドのヘリカル構造を制御するツールとしては、2-アミノイソ酪酸(Aib)に代表される α,α -ジ置換アミノ酸(二置換アミノ酸、 $C\alpha$ -アルキル化アミノ酸)²⁾、2-アミノシクロペンタンカルボン酸(ACPC)に代表される環状 β -アミノ酸³⁾、共有結合型のアミノ酸側鎖架橋⁴⁾が汎用される(図1)。

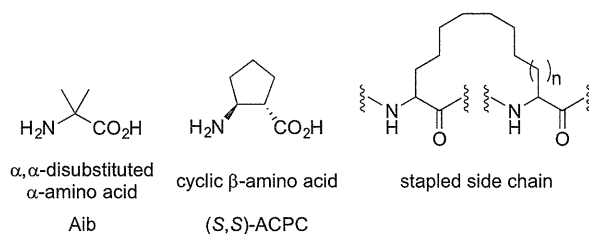


Fig. 1 Representative tools for peptide-helix stabilization.

α,α -ジ置換アミノ酸を含有するペプチド二次構造に関する研究は最も構造の簡単なAibから始まり、天然のL-アミノ酸から構成されるL-ペプチドには見られな

* 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部(158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

* Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences(1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

い特性を有することが報告された⁵⁾。そのなかでも、Aibを含有する短鎖ペプチドは 3_{10} -ヘリカル構造(アミノ酸3残基で1回転を形成し、10個の原子を介して分子内水素結合を形成するらせん構造)を形成することが知られている。タンパク質中に見られる α -ヘリカル構造(3.6_{13} -ヘリックス)が、アミノ酸3.6残基で1回転し、13個の原子を介して分子内水素結合したヘリカルホイールを形成するのと比較して、 3_{10} -ヘリカル構造は締まったらせん構造であり、軸方向から見るとペプチド主

鎖が三角形を形成している(図2)。

筆者らはこれまでに、短鎖ペプチドの二次構造(ヘリカル構造)の制御と機能化を目指し、以下の研究を行ってきた(図3)。二次構造制御に関する研究では、光学活性環状ジ置換アミノ酸^{2b,6)}、1) L-アミノ酸、D-アミノ酸、ジ置換アミノ酸の組み合わせ、2) 側鎖架橋、ジ置換アミノ酸の組み合わせ、によって短鎖ペプチドのヘリカル構造を高度に制御できることを見出している。機能化に関する研究では、安定化ヘリカルペプチドを利用することで、3) α,β -不飽和ケトンの不斉エポキシ化触媒、4) タンパク質間相互作用阻害剤、5) 細胞膜透過性ペプチド、の開発に成功している。以下、これらの研究成果について紹介する。

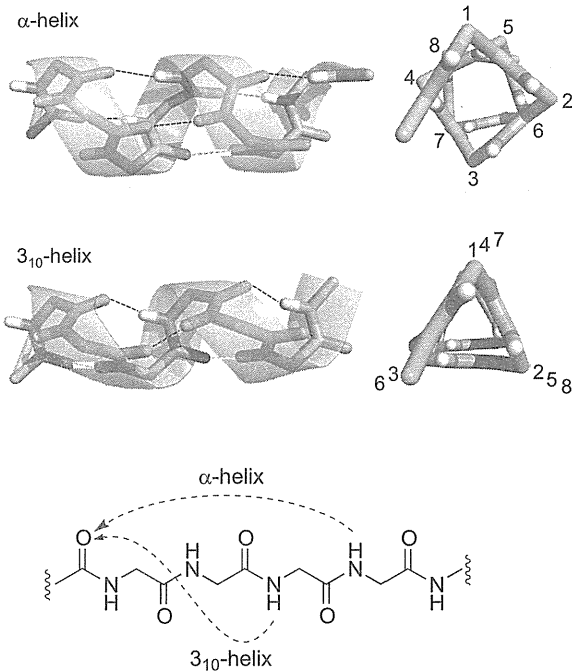


Fig. 2 Molecular models and hydrogen-bonding patterns in α -helix and 3_{10} -helix.

1. L-アミノ酸, D-アミノ酸, およびジ置換アミノ酸の組み合わせによる二次構造制御

ヘリカル構造はタンパク質中では安定に存在することができるが、その配列をペプチドとして取り出してみると、同じ二次構造を維持することが困難である。これは、オリゴペプチド単位になってしまうと、安定な二次構造を形成する際に不可欠なペプチド主鎖間の水素結合によるエンタルピーの稼ぎが少なくなるためである。しかしながら、Aibに代表されるジ置換アミノ酸は、ペプチド主鎖の二面角(ϕ, ψ)を固定化することができるため、短鎖ペプチドのヘリカル構造を安定化できることが知られている⁷⁾。筆者らもこれまでに、ジ置換アミノ酸を短鎖ペプチドに導入することでヘリカル構造を制御できることを報告している。例えば、オリゴL-ロイシン(oligo-L-Leu)にAibや環状ジ置換アミノ酸を導入する

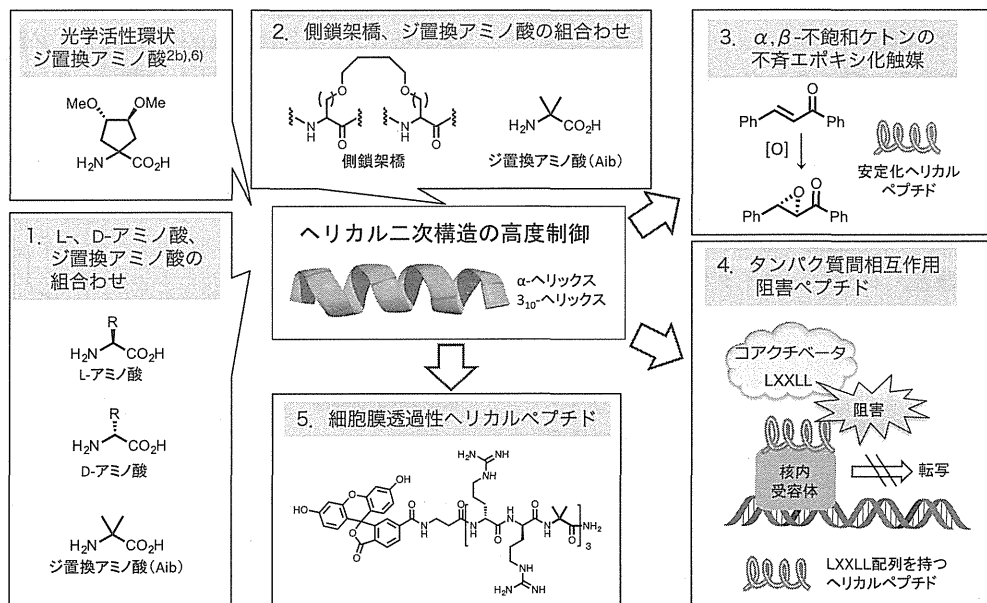


Fig. 3 Development of stabilized short helical peptides and their functionalization.

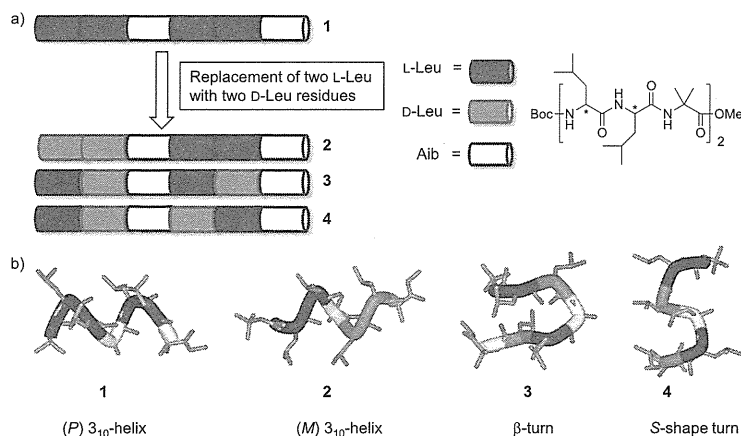


Fig. 4 a) Sequences of diastereomeric hexapeptides, and b) their crystal structures.

ことで、短いシーケンスで 3_{10} -ヘリカル構造や α -ヘリカル構造を制御できることを見出している^(6b,c)。

そこで、右巻き(*P*)の 3_{10} -ヘリカル構造を形成するヘキサペプチド Boc-(L-Leu-L-Leu-Aib)₂-OMe(1)に着目し、このシーケンスのL-LeuをD-Leuに置換したジアステレオメリックなペプチド2-4を設計した。これらの構造解析を行うことで、ペプチド内の特定残基の位置および配列の違いによる二次構造制御が可能であることを調べた。すなわち、L-Leu、D-Leu、Aibを同数含む3種類のヘキサペプチド Boc-L-Leu-L-Leu-Aib-D-Leu-D-Leu-Aib-OMe(2)、Boc-L-Leu-D-Leu-Aib-L-Leu-D-Leu-Aib-OMe(3)、Boc-L-Leu-D-Leu-Aib-D-Leu-L-Leu-Aib-OMe(4)を合成した。X線による構造解析の結果、D-ロイシンの挿入位置によりペプチド二次構造が劇的に変化し、それぞれが特異的な構造を形成していた。すなわち、ペプチド2は左巻き(*M*)の 3_{10} -ヘリカル構造、3は β -ターン構造、4はS字型のターン構造を形成していた(図4)⁽⁸⁾。

さらにペプチド3の環化体 *cyclo*(L-Leu-D-Leu-Aib)₂(5)は、溶液中ならびに結晶中においてユニークな8の字型の構造を形成していた(図5)⁽⁹⁾。

ところで、ヘリカルL-ペプチドが右巻きを形成するのは、グリシンを除いたアミノ酸が α 位に不斉炭素を持つためであり、左巻きにするとカルボニル酸素とC β 炭素間で反発が起きるためである。当然のことながら、D-アミノ酸から構成されるヘリカルD-ペプチドは左巻きを形成する。それでは、L-アミノ酸とD-アミノ酸が交互に並んだLD-ペプチドはどのような二次構造を形成するのか？ これまでに、いくつかのLD-ペプチドのコンホメーション解析が報告されている⁽¹⁰⁾。オリゴペプチド単位では、溶液中では π -ヘリックス(4.4残基で1回転し、16個の原子を介して分子内水素結合を形成するらせん)を、結晶中では β -ヘリックス(2つの逆平行 β -

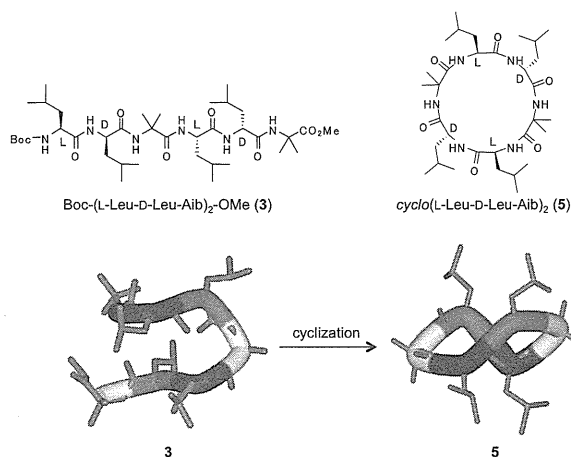


Fig. 5 Chemical and crystal structures of linear and cyclic hexapeptides.

シートから構成される二重らせん)を形成する傾向があるが、そのヘリシティー(右巻きor左巻き)を制御するには至っていない。そこで筆者らは、オリゴLD-ペプチドに 3_{10} -、あるいは α -ヘリックスを安定化できるジ置換アミノ酸Aibを導入すれば、ヘリシティーを含むヘリカル構造を制御できるのではないかと考えた。

すなわち、L-ロイシンとD-ロイシンの繰り返し配列 [(L-Leu-D-Leu)_n]にジ置換アミノ酸を導入したノナペプチド Boc-(L-Leu-D-Leu-Aib)₃-OMe(6)、および鏡像体 Boc-(D-Leu-L-Leu-Aib)₃-OMe(*ent*-6)を設計した(図6)。ジ置換アミノ酸を含有するLD-ペプチドがヘリカル構造を形成した際には、そのヘリシティーに影響を与えないことを考慮してアキラルなAibを選択した。合成したペプチドのコンホメーションはCDスペクトルとX線解析で行った。

CDスペクトルは分子全体の平均的な性質を見るため、X線結晶解析やNMRには及ばないが、測定が簡便でありタンパク質やペプチドの溶液状態での二次構造について有用な情報を与える。タンパク質のアミド結合は

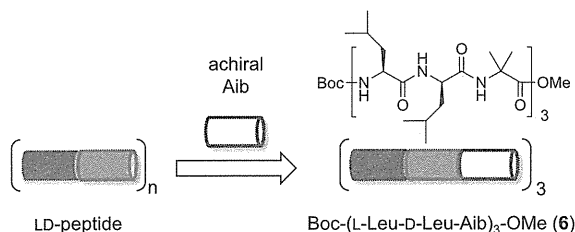


Fig. 6 Structure of nonapeptide 6.

240 nm より短波長の遠紫外外部波長領域にいくつかの電子遷移を持っているが、これらはアミド結合の状態によって異なる。そのため、この波長領域(190–240 nm)で観測されるCDスペクトルはタンパク質主鎖の基本構造である α -ヘリックス、 β -シート、ランダム構造などによって異なる。右巻き(*P*)の α -ヘリカル構造では、208 nm と 222 nm 付近に負の極大($R = [\theta]_{222} / [\theta]_{208}$ の値、 $R > 0.7$ 、ただし短いシーケンスによっては R 値が 1 より大きくなることもある)と、192 nm 付近に正の極大を示す。また、左巻き(*M*)ヘリカル構造では右巻きと符号が逆転したスペクトルを与える。一方で、右巻き(*P*)の 3_{10} -ヘリカル構造を形成するペプチドは、208 nm と 222 nm に負の極大を示すが、比較的小さい R 値($R = 0.3-0.4$)を与える¹¹⁾。これらの情報をもとに、ノナペプチドの2,2,2-トリフルオロエタノール(TFE)中でのCDスペクトル測定を行った。ノナペプチド6は、208 および 222 nm 付近に負の極大を示し R 値が 0.7 となったことより、TFE 溶液中では主に右巻きの α -ヘリカル構造を形成していることが示唆された。当然のことながら、*ent*-6 は対称的なスペクトルを与えたことから、左巻きの α -ヘリカル構造を形成していた。さらにペプチド6は、結晶中においても右巻きの α -ヘリカル構造を形成していた(図7)。このことから、短鎖LD-ペプチドにアキラなAibを導入することで α -ヘリカル構造を制御できること、さらにジペプチドセグメントL-Leu-D-LeuがL-アミノ酸と同じように右巻きヘリシティーを誘起することが示唆された¹²⁾。

さらにLD-ペプチドのヘリシティーとAib挿入位置との関係について詳細に調べるために、Aib挿入位置の異なる4種類のドデカペプチド Boc-(L-Leu-D-Leu-Aib)₄-OMe(7)、Boc-(L-Leu-Aib-D-Leu)₄-OMe(8)、Boc-(Aib-L-Leu-D-Leu)₄-OMe(9)、Boc-(L-Leu-Aib-D-Leu-Aib)₃-OMe(10)を設計した(図8)。

TFE 溶液中でのCDスペクトルでは、ペプチド7は右巻きの α -ヘリカル構造、8は左巻きの α -ヘリカル構造、9は右巻きの

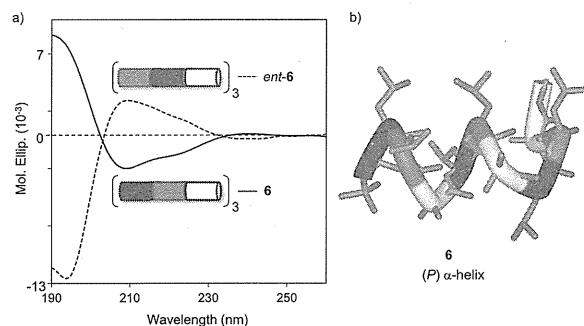


Fig. 7 a) CD spectra of nonapeptides 6 and *ent*-6. b) Crystal structure of 6.

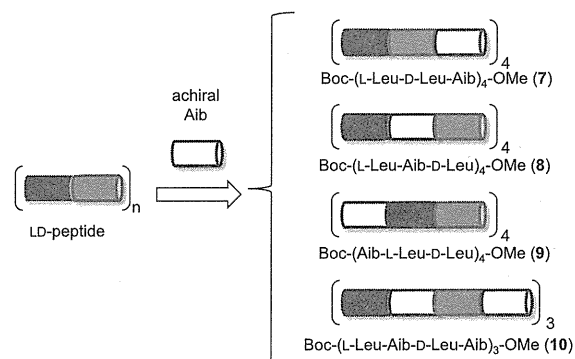


Fig. 8 Structures of dodecapeptides 7–10.

3_{10} - α -ヘリカル構造を形成していた。一方で、連続したL-Leu-D-Leuセグメントを持たないペプチド10は、片巻きのヘリカル構造特有のスペクトルを示さなかった(NMRとIRスペクトルによりペプチド10はヘリカル構造を形成していた)。このことから、LD-ペプチドのヘリシティーは、連続したジペプチドセグメント(L-Leu-D-Leu、あるいはD-Leu-L-Leu)によって優先されることが示唆された¹³⁾。また結晶中においては、ペプチド7は右巻きの α -ヘリカル構造、8は左巻きの α -ヘリカル

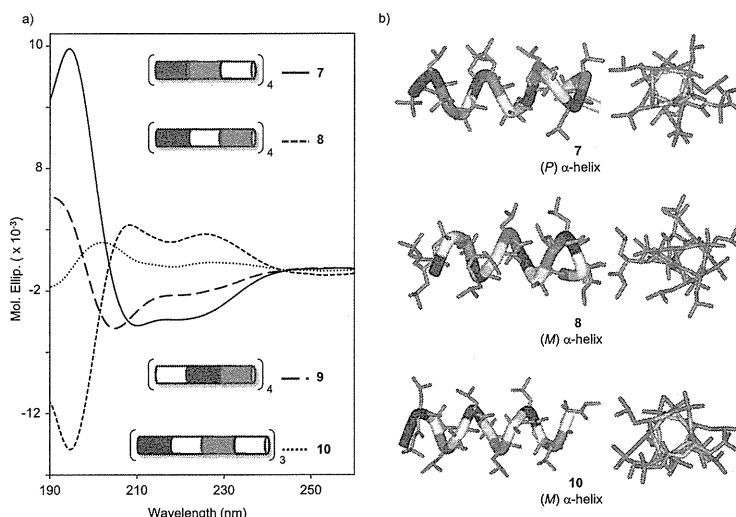


Fig. 9 a) CD spectra of dodecapeptides 7–10. b) Crystal structure of dodecapeptides 7, 8, and 10.

構造を形成しており溶液中でのコンホメーションとよい一致を示した。一方でペプチド 10 は結晶中においては左巻きの α -ヘリカル構造を形成していたが、これは結晶化の際に左巻きのヘリックスが優先的に析出したと考えている (図 9)¹⁴⁾。

次に、L-Leu-D-Leu セグメントのヘリシティーの強さについて調べるために、左巻きのヘリカル構造を形成するノナペプチド Boc-(D-Leu-L-Leu-Aib)₃-OMe (*ent*-6) の N 末端に右巻きを誘起する L-Leu を導入したデカペプチド Boc-L-Leu-(D-Leu-L-Leu-Aib)₃-OMe (11) を設計した。ペプチド 11 は L-Leu の数が D-Leu の数よりも多いにもかかわらず、溶液中ならびに結晶中において左巻きのヘリカル構造を形成していた。このことから、D-Leu-L-Leu セグメントが 3 回連続することで誘起される左巻きのヘリシティーは、右巻きを誘起する N 末端の L-Leu のヘリシティーよりも強いことが明らかとなった (図 10)¹⁴⁾。

以上、同数の光学活性な L-アミノ酸 (L-Leu)、D-アミノ酸 (D-Leu) とアキラルなジ置換アミノ酸 (Aib) の配列を組み合わせることで、ヘリシティーを含むペプチドの

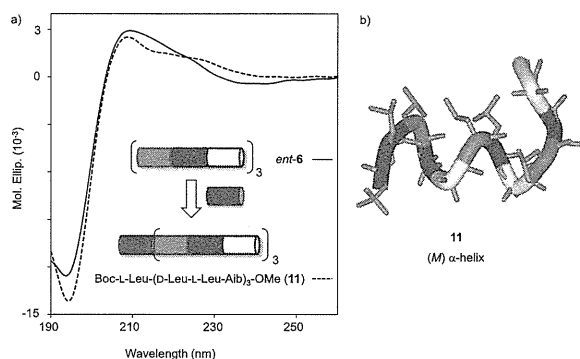


Fig. 10 a) CD spectra of nonapeptide *ent*-6 and decapeptide 11. b) Crystal structure of decapeptide 11.

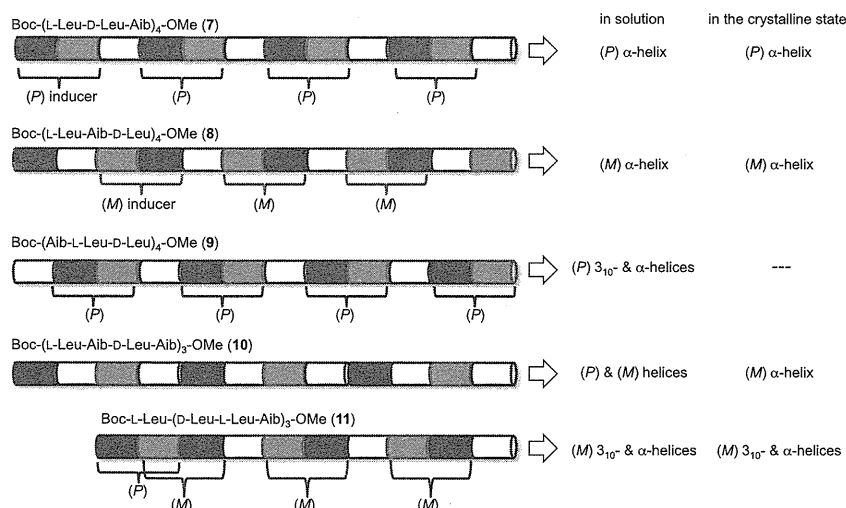


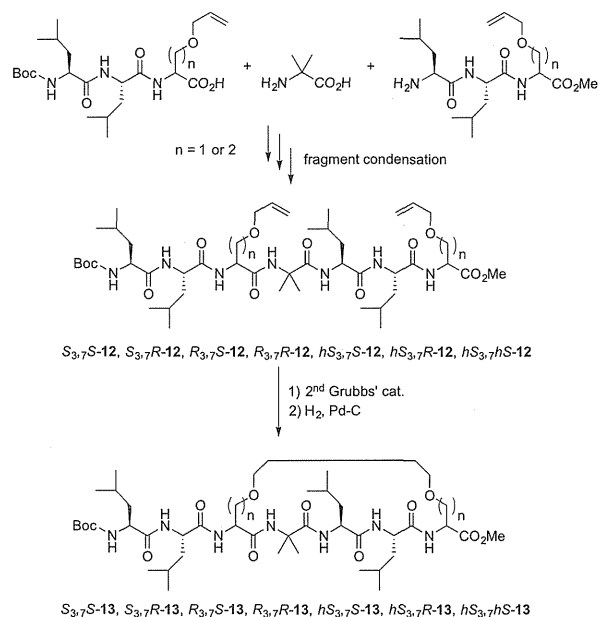
Fig. 11 Cylindrical models of the sequences of dodecapeptides 7-10 and decapeptide 11.

ヘリカル構造を制御できることを紹介した (図 11)。

2. アミノ酸側鎖架橋、ジ置換アミノ酸の組み合わせによるヘリカル構造制御

短鎖ペプチドのヘリカル構造を安定化させるツールとして、これまでに記述してきたジ置換アミノ酸の利用以外に、ペプチドの側鎖を架橋 (ステープル) する手法が知られている¹⁵⁾。架橋の種類としては、Cys-Cys 間のジスルフィドや Glu(Asp)-Lys 間のラクタム、閉環メタセシスを利用した炭素架橋がよく用いられる。特に、炭素架橋を導入したペプチドは、そのヘリカル構造だけでなく化学的にも安定化される (加水分解されにくい) ので、近年、医薬品開発での利用の期待が高まっている¹⁶⁾。そこで、ジ置換アミノ酸として汎用される Aib と炭素架橋の両方を導入すれば、ヘリカル構造がより安定化されたペプチドを開発できるのではないかと考えた。すなわち、L-ロイシンから構成されるヘプタペプチドを設計し、N 末端から 4 残基目に Aib を、3 残基目と 7 残基目の間に炭素架橋を導入した。はじめに、フラグメント縮合による液相法で鎖状のペプチド $S_{3,7}S$ -12, $S_{3,7}R$ -12, $R_{3,7}S$ -12, $R_{3,7}R$ -12, $hS_{3,7}S$ -12, $hS_{3,7}R$ -12, $hS_{3,7}hS$ -12 を合成した。さらに、第 2 世代 Grubbs 触媒による閉環メタセシス、水素化により側鎖架橋を構築することで、環状ペプチド $S_{3,7}S$ -13, $S_{3,7}R$ -13, $R_{3,7}S$ -13, $R_{3,7}R$ -13, $hS_{3,7}S$ -13, $hS_{3,7}R$ -13, $hS_{3,7}hS$ -13 を合成した (スキーム 1)。

合成したペプチドの溶液中 (¹H NMR, IR, CD スペクトル) ならびに結晶状態 (X 線) でのコンホメーション解析を行った。FT-IR を用いたペプチドの二次構造は、C=O 伸縮領域である 1,600–1,700 cm⁻¹、あるいは N-H 伸縮領域である 3,250–3,500 cm⁻¹ における吸収により解析することができる。N-H 伸縮領域においては、



Scheme 1 Preparation of stapled peptides 13. The nomenclature $S_{3,7R}$ refers to a peptide with an *S* configuration at its 3rd position and an *R* configuration at its 7th position. The nomenclature *hS* indicates a *L*-homoserine (*L*-Hse) derivative.

3,420–3,440 cm^{-1} の吸収帯がフリーな(溶媒和した)ペプチド N-H 基, 3,320–3,370 cm^{-1} の吸収帯が N-H \cdots O=C 型の分子内水素結合したペプチド N-H 基を示すことが報告されている¹⁷⁾。ヘリカルペプチドでは, N 末端から 2 目 (3_{10} -ヘリックス)あるいは 3 目 (α -ヘリックス)のアミドプロトンまでがフリーな N-H 基として存在し, それ以降のアミドプロトンは分子内水素結合を形成しているので, 3,420–3,440 cm^{-1} 付近と 3,320–3,370 cm^{-1} 付近にそれぞれの吸収が見られる。これらの情報を基にペプチド $R_{3,7R-13}$ の重クロロホルム (CDCl_3) 溶液 (1.0 mM) 中での IR を測定した結果, 3,430 cm^{-1} と 3,330 cm^{-1} 付近にそれぞれ特徴的な吸収が現れたことからヘリカル構造の形成が示唆された(図 12)。

¹H NMR を用いてペプチドの二次構造解析を行う際には, 2D COSY, NOESY スペクトルより得られる距離情報を基に, ディスタンスジオメトリー法を用いて予測する方法が汎用される。しかしながら, ジ置換アミノ酸には α プロトンが存在しないため, これらの測定により得られる情報が限られるので代替法が用いられる。例えば, アミドプロトン領域におけるペプチドの濃度変化, 強い水素結合受容体であるジメチルスルホキシド (DMSO) や安定ラジカルである 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシドラジカル (TEMPO) の添加がアミドプロトンに与える影響について調べることで, 二次構造を解析することができる¹⁸⁾。DMSO のスルホキシ酸素は水素結合受容体となるため, CDCl_3 溶液中に添加するとアミドプロトンのシグナルを低磁場にシフトさせる

ことが知られている。分子内水素結合を形成しているアミドプロトンよりも水素結合に関与していないフリーなアミドプロトンに DMSO が接近しやすいため, この影響がより顕著にあらわれる。図 12 のグラフでは, DMSO 濃度 (0–10%) の上昇に伴い低磁場にシフトした分子内水素結合に関与していないフリーな 3 つのアミドプロトン [N(1)-H, N(2)-H, N(3)-H] と, 化学シフトに大きな変化が見られない分子内水素結合を形成した 4 つのアミドプロトン [N(4–7)-H] の存在が示唆されることから, ペプチド $R_{3,7R-13}$ は CDCl_3 溶液 (1.0 mM) 中において主に α -ヘリカル構造を形成していることが示唆された(図 12)。

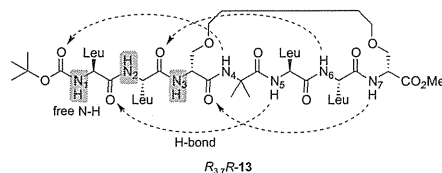
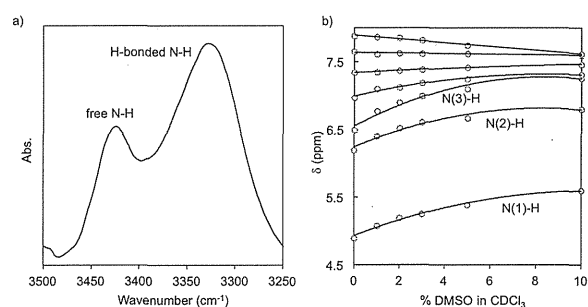


Fig. 12 a) FT-IR spectrum (3,250–3,500 cm^{-1} region) of peptide $R_{3,7R-13}$ in CDCl_3 solution. b) Plots of NH chemical shifts in the ¹H NMR spectrum of $R_{3,7R-13}$ as a function of increasing concentrations of DMSO (*v/v*) being added to the CDCl_3 solution.

また, 鎖状および環状ペプチドの TFE 溶液 (0.5 mM) 中での CD スペクトルを測定したところ, すべてのペプチドにおいて鎖状よりも環状ペプチドがより安定な右巻きヘリカル構造を形成していることが示唆された。そのなかでも, $R_{3,7R}$ ペプチドは, 鎖状 ($R_{3,7R-12}$) では 3_{10} -ヘリカル構造 (R 値: 0.3) を形成しており, 環化 ($R_{3,7R-13}$) すると α -ヘリカル構造 (R 値: 0.8) に変化することが明らかとなった(図 13)。

また, $R_{3,7R-13}$ はクロロホルム/*n*-ヘキサンから再結晶することで良質な単結晶を得ることができ X 線解析を行った結果, 右巻きの α -ヘリカル構造を形成しており, 溶液中でのコンホメーションとよい一致を示した(図 14)。

以上のように, *L*-ロイシンシーケンスに Aib と側鎖架橋を導入することで安定なヘリカル構造を形成できる短鎖ペプチドの開発に成功した¹⁹⁾。次に, これらの安定化ヘリカルペプチドを用いて, 有機合成化学的および

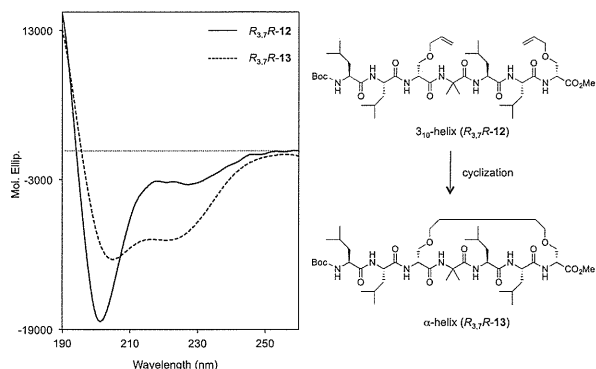


Fig. 13 a) CD spectra of the linear peptide $R_{3,7}R-12$ and the stapled peptide $R_{3,7}R-13$ in TFE solution.

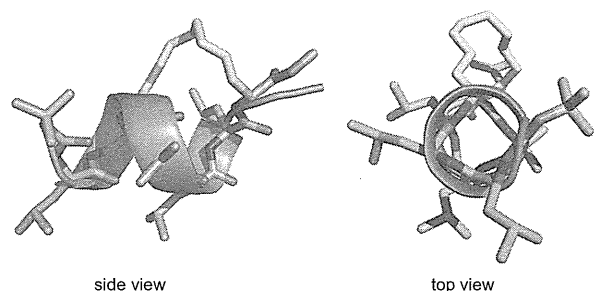


Fig. 14 a) Crystal structure of stapled peptide $R_{3,7}R-13$.

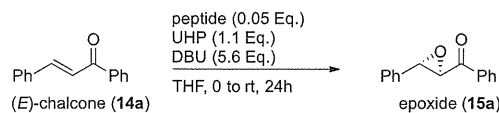
創薬化学的応用研究へと展開した。

3. 安定化ヘリカルペプチドを触媒とした α,β -不飽和ケトンの不斉エポキシ化反応の開発

ヘリカルペプチドを触媒とした α,β -不飽和ケトンの不斉エポキシ化は、Julia-Colonna エポキシ化反応として知られており、右巻きのヘリカルペプチドを触媒として用いた場合は、(2*R*,3*S*)-エポキシドが優先的に得られる²⁰⁾。この反応を高効率に行うためには、触媒として用いるペプチドの α -ヘリカル構造を安定化する必要がある。これまでに、種々の方法によりヘリカル構造を安定化させた高い触媒能を持つペプチドが開発されている²¹⁾。そこで、これまでに筆者らが開発したL-Leuを含む安定化ヘリカルペプチドもこの反応を効率よく触媒するのではないかと考え、(*E*)-カルコン(14a)をモデル化合物として検討を行った。反応は、N末端を脱保護したヘプタペプチド(5 mol%)を触媒として²²⁾、THF 溶媒中、酸化剤として尿素-過酸化水素付加体(UHP, 1.1 eq.)、塩基としてDBU(5.6 eq.)を用いて室温にて行った。すべてのペプチドにおいて、鎖状よりも対応する環状ペプチドを用いたときに反応が効率的に進行した。そのなかでも、環状ペプチドH-*hS*_{3,7}*hS*-13が最も高い触媒活性を示し、10 mol%用いることで99% eeの(2*R*,3*S*)-エポキシ体(15a)が定量的に得られた(表1)。

ついで、10 mol%のペプチドH-*hS*_{3,7}*hS*-13を用いて、

Table 1 Asymmetric epoxidation of (*E*)-chalcone (14a) using the N-terminal free peptides.

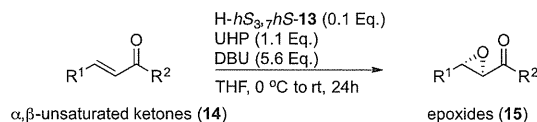


entry	peptide	yield (%) of 15a	ee (%) of 15a
1	H- <i>S</i> _{3,7} <i>S</i> -12	90	58
2	H- <i>S</i> _{3,7} <i>S</i> -13	89	65
3	H- <i>S</i> _{3,7} <i>R</i> -12	91	57
4	H- <i>S</i> _{3,7} <i>R</i> -13	89	64
5	H- <i>R</i> _{3,7} <i>S</i> -12	82	35
6	H- <i>R</i> _{3,7} <i>S</i> -13	86	37
7	H- <i>R</i> _{3,7} <i>R</i> -12	93	30
8	H- <i>R</i> _{3,7} <i>R</i> -13	89	69
9	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>S</i> -12	94	77
10	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>S</i> -13	96	79
11	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>R</i> -12	96	71
12	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>R</i> -13	95	75
13	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>hS</i> -12	97	79
14	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>hS</i> -13	93	87
15 ^{a)}	H- <i>hS</i> _{3,7} <i>hS</i> -13	99	>99

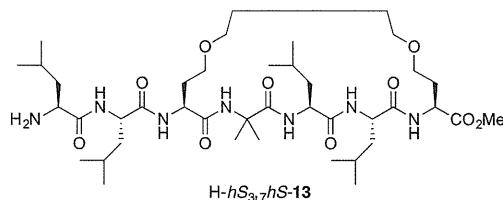
a) 10 mol% catalyst was used.

鎖状 α,β -不飽和ケトン(14)の不斉エポキシ化を検討した。置換基 R^2 の種類によっては満足できる収率で生成物が得られなかったが、すべての(2*R*,3*S*)-エポキシ体(15)は中程度から良好な鏡像体過剰率を示した(表2)。

Table 2 Asymmetric epoxidation of α,β -unsaturated ketones (14) using the stapled peptide H-*hS*_{3,7}*hS*-13.



entry	substrate	yield (%) of 15	ee (%) of 15
1	14a: $R^1 = \text{Ph}, R^2 = \text{Ph}$	98	99
2	14b: $R^1 = \text{Ph}, R^2 = \text{Me}$	49	72
3	14c: $R^1 = \text{Ph}, R^2 = i\text{-Pr}$	78	86
4	14d: $R^1 = \text{Ph}, R^2 = t\text{-Bu}$	60	88
5	14e: $R^1 = \text{Ph}, R^2 = 2\text{-furyl}$	99	99
6	14f: $R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{Ph}$	99	72
7	14g: $R^1 = 4\text{-Cl-Ph}, R^2 = \text{Ph}$	99	85
8	14h: $R^1 = 4\text{-MeO-Ph}, R^2 = \text{Ph}$	87	74



Julia-Colonna エポキシ化の推定反応機構は Roberts らにより以下のように提唱されている²³⁾。すなわち、(*E*)-カルコン(14a)にペルオキシアニオンが1,4-付加した(3*R*)-中間体を(*P*)-ヘリカルペプチドが水素結合(N末端から2,3,4残基目のアミドプロトン)により安定化し、水酸化物イオンの脱離を促進することで、(2*R*,3*S*)-エポキシ体(15a)が得られる(図15)。

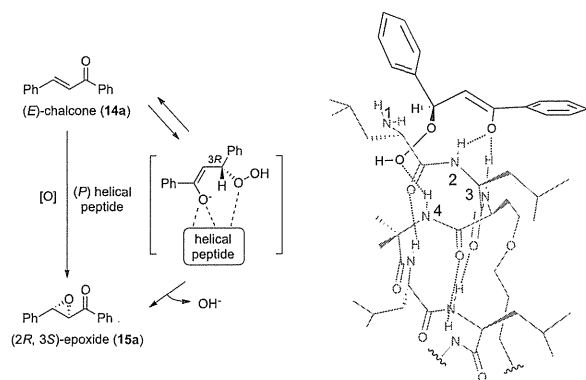


Fig. 15 Plausible reaction mechanisms for Juliá-Colonna epoxidation catalyzed by the stapled peptide H-*hS*_{3,7}*hS*-13.

4. 安定化ヘリカルペプチドを利用したビタミン D 受容体-コアクチベータ結合阻害剤の開発

核内受容体(NRs)は遺伝子調節、発生、恒常性、代謝などに関与し、ステロイド、甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミンなどをリガンドとする転写因子である。NRsにリガンドが結合することによって転写共役活性化因子(コアクチベータ)がリクルートされ転写が促進する。NRsに対するアンタゴニストや転写阻害剤の開発は、様々な疾患の治療薬[アンドロゲン受容体(AR):前立腺がん, エストロゲン受容体(ER):乳がん, ビタミンD受容体(VDR):骨パジェット病]として期待されている。NRs転写活性化にはリガンドの結合だけではなく、コアクチベータのLXXLL配列を含むヘリカルモチーフ(L:ロイシン, X:任意の amino 酸)を介したNRsへの結合が重要である。よって、このコンセンサス配列を含むペプチドを用いてNRsとコアクチベータ間の結合を阻害することができれば、転写活性化を抑制でき新たな治療薬の開発へとつながる^{24,25)}。そこでVDRを標的とし、VDRに結合するコンセンサス配列を含む安定化ヘリカルペプチドを用いて、VDR-コアクチベータ間の結合阻害を評価した(図16)。

N末端とC末端を脱保護したペプチド16-21を液相法で合成し、VDR-コアクチベータ結合阻害活性を評価した。その結果、ペプチド21が弱いながらも活性を示

Table 3 IC₅₀ values of peptides 16-21 against human VDR-coactivator interactions.

entry	peptide	IC ₅₀ (μM)
1	16 (H- <i>S</i> _{3,7} <i>S</i> -OH)	610
2	17 (H- <i>S</i> _{3,7} <i>R</i> -OH)	430
3	18 (H- <i>R</i> _{3,7} <i>S</i> -OH)	610
4	19 (H- <i>R</i> _{3,7} <i>R</i> -OH)	600
5	20 (H- <i>hS</i> _{3,7} <i>S</i> -OH)	520
6	21 (H- <i>hS</i> _{3,7} <i>hS</i> -OH)	220

した(表3)。

ペプチド21はすべてが疎水性のアミノ酸で構成されているため、側鎖架橋に水酸基を導入することでペプチドの水溶性を向上させ、VDRの親水性領域での安定性を高めることで親和性が向上するのではないかと考え、ペプチド22を設計、合成した(図17)。その結果、結合阻害活性が飛躍的に向上(IC₅₀: 3.2 μM)した²⁶⁾。

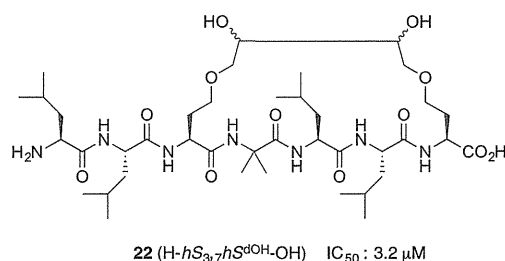


Fig. 17 Chemical structure and IC₅₀ value of 22.

続いて、固相法によりペプチドを伸長し側鎖修飾を固相上で行うことで、側鎖架橋を含む安定化ヘリカルペプチドの迅速で簡便な合成法の開発を行った。すなわち、ペプチドのN末端をアセチル基、C末端をアミド基で保護することでヘリカル構造を、より安定化させた23を設計した。また、23側鎖上のジオール基の立体を制御することが困難なため、Aibをヒドロキシメチルセリ

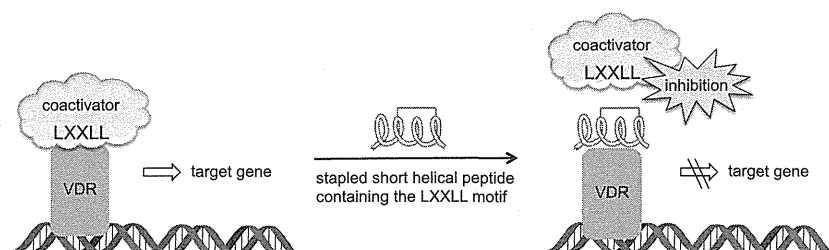
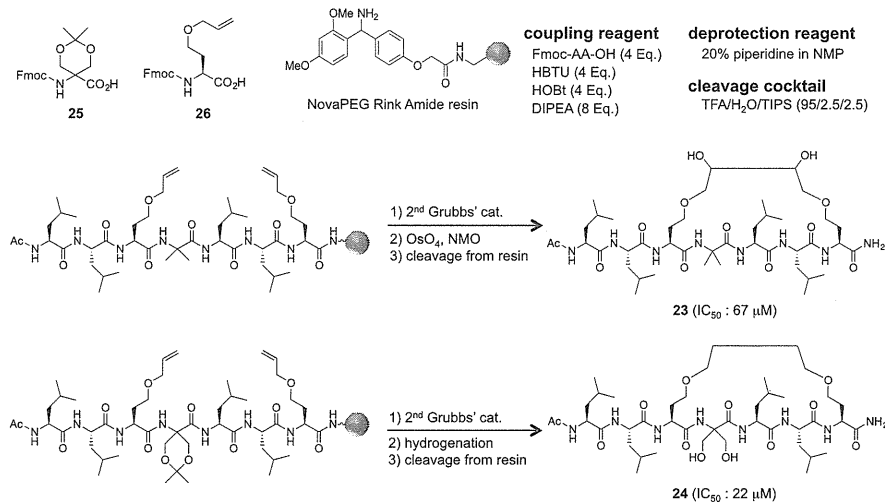


Fig. 16 Illustration of the mechanism by which the stapled short helical peptides inhibited VDR-coactivator interactions.



Scheme 2 Preparation of 23 and 24.

ンに置き換えた 24 を新たに設計した。固相合成のための Fmoc-アミノ酸 25 および 26 を合成し、マイクロ波を利用することでヘプタペプチドまでを迅速(縮合 8 分, 脱保護 6 分)かつ効率的に伸長した。続いて, 樹脂上で閉環メタセシス, オスミウム酸化した後, 切り出しを行うことでペプチド 23 を, 閉環メタセシス, 水素化, 樹脂からの切り出しを行うことでペプチド 24 を合成した(スキーム 2)。VDR-コアクチベータ結合阻害評価の結果, N 末端, C 末端を保護した 23 (IC₅₀: 67 μM) は 24 (IC₅₀: 3.2 μM) と比較して活性が減弱した。このことから, ペプチドの末端構造が阻害活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。また, Aib をヒドロキシメチルセリンに置換した 24 (IC₅₀: 22 μM) は 23 よりも強い活性を有していた²⁷⁾。

ペプチド 23 および 24 と VDR (PDB: 3AUN²⁸⁾) とのドッキングスタディーを行った結果, 3 つのロイシン残基 (2, 5, 6 番目) が VDR の疎水性領域 (Ile234, Ile238, Leu259, Ala263, Val417) に収まり, 23 側鎖のジオール基および 24 のヒドロキシメチルセリンが VDR の外側に配置された構造が最安定構造として得られた(図 18)。現在, さらなる構造修飾による高活性ペプチドの探索と HL-60 細胞を用いた転写阻害剤への展開を行っている。

5. 細胞膜透過性ヘリカルペプチドの開発

HIV-1 由来の Tat ペプチドやオリゴアルギニン (Arg_n), MAP (Model Amphipathic Peptide) に代表される膜透過性オリゴペプチドは, グアニジノ基を有するアルギニン (Arg) を多く含んでおり, タンパク質や核酸, ナノ粒子などの様々な分子を細胞内へと輸送することが知られている²⁹⁾。これまでに, 膜透過性を有するペプチドの開発に関する研究は数多く報告されているが, ペプチドの二次構造を固定化することで透過能を高めた

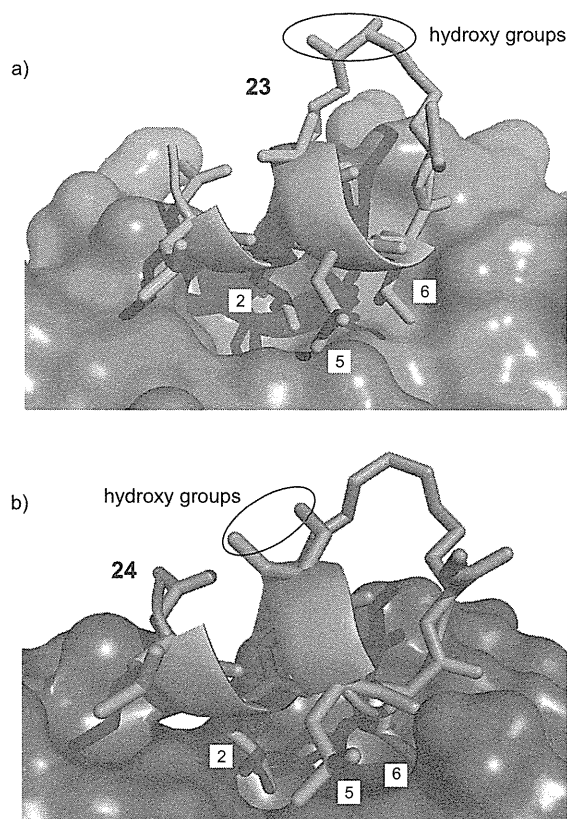


Fig. 18 Modeled structures of a) peptide 23 and b) peptide 24 bound to the VDR.

オリゴペプチドの開発に関する報告は少ない³⁰⁾。そこで, アルギニンと Aib から構成される MAP を設計し, ペプチド二次構造と細胞膜透過性の相関関係について調べた。すなわち, N 末端をフルオレsein でラベル化し, L-Arg, D-Arg, Aib から構成されるホモキラル L-ペプチド 6-FAM-β-Ala-(L-Arg-L-Arg-Aib)₃-NH₂ (FAM-27), ホモキラル D-ペプチド 6-FAM-β-Ala-(D-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH (ent-FAM-27), ヘテロキラ

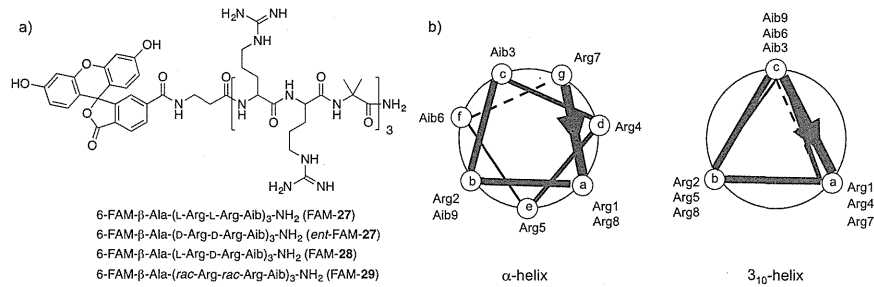


Fig. 19 a) Chemical structures of the designated peptides. b) Helical wheels of amphipathic peptide.

ル LD-ペプチド 6-FAM-β-Ala-(L-Arg-D-Arg-Aib)₃-NH₂(FAM-28), およびジアステレオマー混合物のラセミペプチド 6-FAM-β-Ala-(rac-Arg-rac-Arg-Aib)₃-NH₂(FAM-29)を設計した。これらの MAP ペプチドが α-ヘリカル構造, あるいは 3₁₀-ヘリカル構造を形成した際のカチオン性(Arg)残基と疎水性(Aib)残基は図 19 のように配置される。

合成したそれぞれのペプチドについて HeLa 細胞への細胞膜透過性を比較した。1–6 μM の各ペプチドを細胞に添加して 37℃ で 2 時間培養することで, 各ペプチドの膜透過性を評価した結果, ホモキラルな L-ペプチド FAM-27, D-ペプチド ent-FAM-27 が, ヘテロキラル LD-ペプチド FAM-28 およびジアステレオマー混合物のラセミペプチド FAM-29 と比較して高い膜透過性を示した(図 20)。次に, 0.5–48 時間後における, 各ペプチド(1 μM)の細胞内への取り込みを評価した。すべてのペプチドにおいて 4 時間まで膜内への取り込みが増加し, その後, 徐々に取り込み量が減少したが 48 時間後においても一定量の取り込みが継続した。これは, すべてのペプチドが非天然アミノ酸である Aib をシークエンス内に含むため, 細胞内で長時間にわたり安定に存在できることを示唆している。

次に, 各エンドサイトーシス阻害剤 {マクロピノサイトーシス阻害剤 [アミロライド(Am)], クラスリン介在型エンドサイトーシス阻害剤 [クロルプロマジン(Ch),

スクロース(Su)], カベオラ介在型エンドサイトーシス阻害剤 [ナイスタチン(Ny), フィリピン(Fi)]} を用いてペプチドの細胞内への取り込み経路を調べた。その結果, すべてのペプチドにおいて Am 存在下で取り込み量が減少した。このことから, これらのペプチドは主にマクロピノサイトーシスによって細胞内へ取り込まれていることが明らかとなった(図 21)。また, 共焦点顕微鏡によってペプチドの細胞内局在を観察した結果, すべてのペプチドは主に細胞質に存在していた。

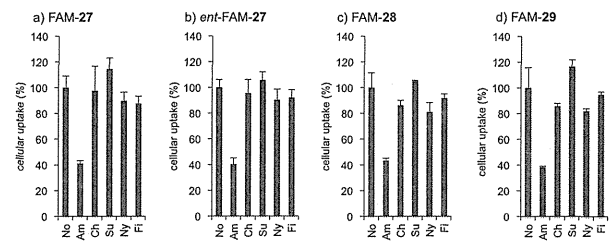


Fig. 21 Effects of various inhibitors on the internalization of FAM-27-29 and ent-FAM-27. The error bars represent standard deviation, n = 4.

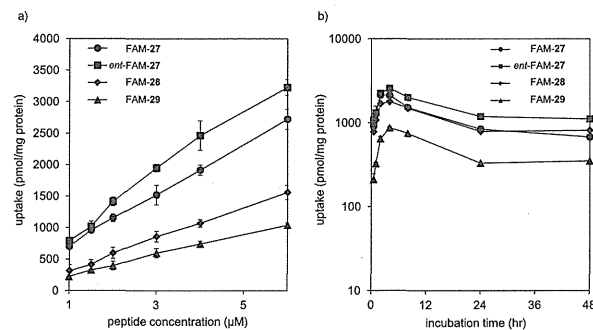


Fig. 20 Cellular uptake of FAM-27-29 and ent-FAM-27 a) at concentration of 1–6 μM, and b) for incubation periods of 0.5–48 h. The error bars represent standard deviation, n = 4.

CD スペクトルによるペプチドの二次構造解析(0.1 mM, TFE)では, ホモキラルな L-ペプチド(Ac-27), および D-ペプチド(ent-Ac-27)がそれぞれ安定な右巻きおよび左巻きの α-ヘリカル構造を形成していたのに対して, ヘテロキラル LD-ペプチド(Ac-28)はランダム構造を形成していた。また, ジアステレオマー混合物のラセミペプチド(Ac-29)は特徴的なスペクトルを示さなかった(図 22)。計算化学によるホモキラル L-ペプチド(Ac-27)とヘテロキラル LD-ペプチド(Ac-28)の最安定構造予測を行った。その結果, Ac-27 は右巻きの α-ヘリカル構造, Ac-28 はランダムコイル構造が最安定構造として得られ, 溶液中でのコンホメーションとよい一致を示した(図 22)。以上の結果から, 同じ組成から構成される MAP では, 安定なヘリカル構造を形成しているペプチドが高い膜透過性を持つことが明らかとなった³¹⁾。

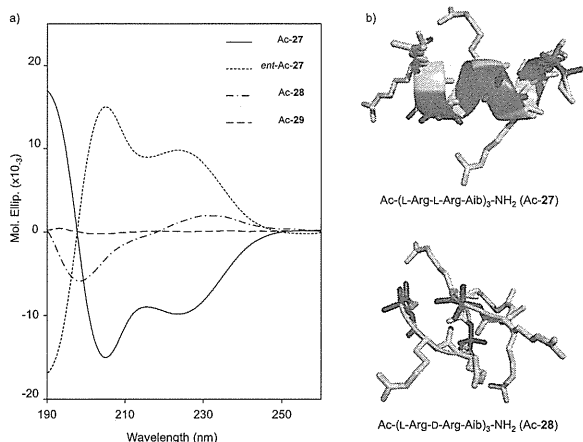


Fig. 22 a) CD spectra of Ac-27–29 and *ent*-Ac-27 in TFE solution. The calculated minimum-energy conformations of b) Ac-27 and c) Ac-28.

おわりに

この5年間に行ってきた短鎖ペプチドのヘリカル構造制御と機能化に関する研究成果を紹介した。近年、様々な手法によって安定化されたヘリカルペプチドを用いた応用研究が世界中で活発に行われているが、筆者らもまた、これまでに開発した手法を用いて、標的タンパク質分解誘導ペプチドの開発、細胞内タンパク質のイメージング剤の開発、DDSキャリアペプチドの開発を進めているので別の機会にぜひ紹介させていただきたい。これらの研究が、アミノ酸やペプチドを素材とした先端医療や生命科学研究の発展に役立てば幸いである。

謝辞 本論文で紹介させていただいた研究は国立医薬品食品衛生研究所有機化学部で行われたものであり、研究に多大なご協力をくださった土井光暢教授(大阪薬科大学)、田中正一教授(長崎大学)ならびに大庭誠准教授(長崎大学)に厚く御礼申し上げます。またこれらの研究成果は、外部研究生として献身的に研究活動を行ってくださった大学院生、学部学生の努力の賜物であり、心より感謝致します。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金、有機合成化学協会「研究企画賞」、倉田記念日立科学技術財団「倉田奨励金」、ならびに東京生化学研究会「研究奨励金」の助成により行われたものであり深謝致します。

(2014年7月22日受理)

文献

- (a) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **31**, 173 (1998); (b) S. Hecht, I. Huc, "Foldamers: Structure, Properties, and Applications", Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007
- (a) M. Crisma, F. Formaggio, A. Moretto, C. Toniolo, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **84**, 3 (2006); (b) M. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 349 (2007); (c) N. Ousaka, Y. Inai, R. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12266 (2008); (d) M. Oba, Y. Demizu, N. Yamagata, Y. Sato, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, H. Okuda, M. Kurihara, *Tetrahedron*, **66**, 2293 (2010); (e) R. A. Brown, V. Diemer, S. J. Webb, J. Clayden, *Nat. Chem.*, **5**, 853 (2013)
- (a) D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity*, **1**, 1111 (2004); (b) C. M. Goodman, S. Choi, S. Shandler, W. F. DeGrado, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 252 (2007); (c) W. S. Horne, S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.*, **41**, 1399 (2008); (d) Y. Imamura, N. Umezawa, S. Osawa, N. Shimada, T. Higo, S. Yokoshima, T. Fukuyama, T. Iwatsubo, N. Kato, T. Tomita, T. Higuchi, *J. Med. Chem.*, **56**, 1443 (2013); (e) S. Wang, Y. Otani, X. Liu, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *J. Org. Chem.*, **79**, 5287 (2014)
- (a) H. E. Blackwell, J. D. Sadowsky, R. J. Howard, J. N. Sampson, J. A. Chao, W. E. Steinmetz, D. J. O'Leary, R. H. Grubbs, *J. Org. Chem.*, **66**, 5291 (2001); (b) Y.-W. Kim, T. N. Grossmann, G. L. Verdine, *Nat. Protoc.*, **6**, 761 (2011)
- (a) Y. Paterson, S. M. Rumsey, E. Benedetti, G. Nemethy, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2947, (1981); (b) E. Benedetti, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 3, (1996)
- (a) Y. Demizu, M. Doi, M. Kurihara, T. Maruyama, H. Suemune, M. Tanaka, *Chem. Eur. J.*, **18**, 2430 (2012); (b) Y. Demizu, M. Doi, M. Kurihara, H. Okuda, M. Nagano, H. Suemune, M. Tanaka, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 3303 (2011); (c) Y. Demizu, M. Tanaka, M. Doi, M. Kurihara, H. Okuda, H. Suemune, *J. Pept. Sci.*, **16**, 621 (2010); (d) Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 840 (2007); (e) M. Tanaka, Y. Demizu, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5360 (2004)
- ジエチル基より長い側鎖を持つ鎖状 α,α -ジ置換アミノ酸を含むペプチドはブラナー構造を形成しやすい傾向にある。(a) C. Toniolo, G. M. Bonora, A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, V. Barone, F. Lejl, M. T. Leplawy, K. Kaczmarek, A. Redlinski, *Biopolymers*, **27**, 373 (1988); (b) N. Imawaka, M. Tanaka, H. Suemune, *Helv. Chim. Acta*, **83**, 2823 (2000); (c) M. Tanaka, S. Nishimura, M. Oba, Y. Demizu, M. Kurihara, H. Suemune, *Chem. Eur. J.*, **9**, 3082 (2003)
- Y. Demizu, M. Doi, Y. Sato, M. Tanaka, H. Okuda, M. Kurihara, *J. Org. Chem.*, **75**, 5234 (2010)
- Y. Demizu, S. Nagoya, M. Doi, Y. Sato, M. Tanaka, M. Kurihara, *J. Org. Chem.*, **77**, 9361 (2012)
- (a) E. Benedetti, B. Di Blasio, C. Pedone, G. P. Lorenzi, L. Tomasic, V. Gramlich, *Nature*, **282**, 630 (1979); (b) S. Durani, *Acc. Chem. Res.*, **41**, 1301 (2008)
- C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2744 (1996)
- Y. Demizu, M. Doi, Y. Sato, M. Tanaka, H. Okuda, M. Kurihara, *Chem. Eur. J.*, **17**, 11107 (2011)
- Y. Demizu, H. Yamashita, N. Yamazaki, Y. Sato, M. Doi, M. Tanaka, M. Kurihara, *J. Org. Chem.*, **78**, 12106 (2013)
- R. A. Brown, T. Marcelli, M. De Poli, J. Sola, J. Clayden, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 1395 (2012)
- V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, *Nat. Chem.*, **5**, 161 (2013)
- (a) J. L. LaBelle, S. G. Katz, G. H. Bird, E. Gavathiotis, M. L. Stewart, C. Lawrence, J. K. Fisher, M. Dodes, K. Pitter, A. L. Kung, L. D. Walensky, *J. Clin. Invest.*, **122**, 2018 (2012); (b) T. Okamoto, K. Zobel, A. Fedorova, C. Quan, H. Yang, W. J. Fairbrother, D. C. S. Huang, B. J. Smith, K. Deshayes, P. E. Czabotar, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 297 (2013); (c) W. Nomura, H. Aikawa, N. Ohashi, E. Urano, M. Métifiot, M. Fujino, K. Maddali, T. Ozaki, A. Nozue, T. Narumi, C. Hashimoto, T. Tanaka, Y. Pommier, N. Yamamoto, J. A. Komano, T.