



## セリンプロテアーゼ阻害剤マリノスタチンの構造と機能

### 1. はじめに

マリノスタチン (MST, 1) は、海洋細菌 *Pseudoaltero-*

*monas sagamiensis* より産生される 12 残基から成るペプチドで、セリンプロテアーゼ、特にサブチリシンを強力に阻害する<sup>1,2)</sup>。構造の特徴として、Thr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup> および Ser<sup>8</sup>-Asp<sup>11</sup> の側鎖間に 2 本のエステル結合を有している<sup>3)</sup> (図 1)。前者のエステル結合のカルボニル酸素と Arg<sup>5</sup> の N<sup>ω</sup>H プロトン間で形成される水素結合が、酵素により切断されるアミド結合 (Met<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup>) を安定化すると考えられている。一般に、ペプチド性セリンプロテアーゼ阻害剤 (14~190 アミノ酸からなるポリペプチド) は、ジスルフィド架橋や水素結合を援用して構築する特徴的かつ典型的な立体構造の中に、反応中心ループを固定している<sup>4)</sup>。これを基質と同様のメカニズムで酵素の活性中心に提示して作用を発現する。ループのアミノ酸配列は多様性が高いものの、それらが構築する立体構造は生物界に広く共通している。最小のセリンプロテアーゼ阻害剤である MST が、先述の典型的な立体構造を備え、しかも強力な阻害剤として機能するた

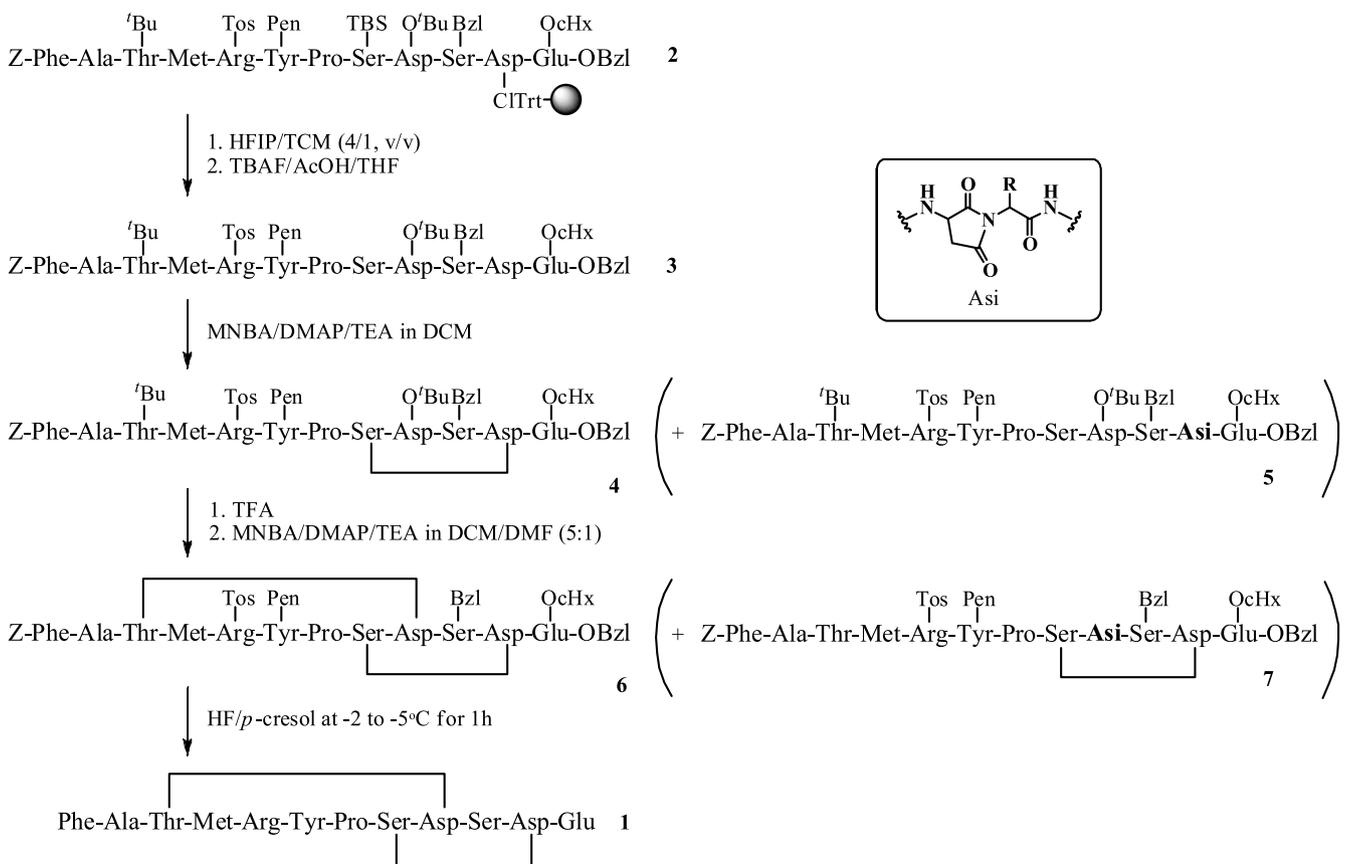


図 1 位置選択的エステル形成反応による MST の合成経路

略語: AcOH, 酢酸; cHex, シクロヘキシル; DMAP, 4-ジメチルアミノピリジン; DMF, *N,N'*-ジメチルホルムアミド; HFIP, ヘキサフルオロイソプロパノール; Pen, 3-ペンチル; TBAF, テトラ-*n*-ブチルアンモニウムフルオリド; TCM, クロロホルム; TEA, トリエチルアミン; THF, テトラヒドロフラン; Tos, トシル。

めには、MSTの構造を規定するエステル結合を始めとした特定の構造因子の寄与が示唆される。化学合成のアプローチから、これら構造因子の解明を目指した。

## 2. MSTの化学合成<sup>5)</sup>

MSTを構成する2本のエステル結合を段階的、すなわち位置選択的に形成させるには、各エステル結合に関わるアミノ酸側鎖の水酸基とカルボキシル基に導入する保護基の組み合わせが二組必要となる。また、これらは互いに選択的に除去できる組み合わせでなければならない。今回、Thr<sup>3</sup>とAsp<sup>9</sup>の側鎖官能基は $t$ -ブチル(Bu)基で、Ser<sup>8</sup>とAsp<sup>11</sup>のそれらはそれぞれ $t$ -ブチルジメチルシリル(TBS)基と2-クロロトリチル[Trt(2-Cl)]基で保護した。Trt(2-Cl)基を介して固相樹脂に担持し、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)法でペプチド鎖を伸長した。残るアミノ酸側鎖官能基とN/C末端には、Fmoc法でのペプチド合成並びに上記二組の保護基を除去する際の反応条件に安定なベンジル(Bzl)型保護基を導入した。保護ペプチド2からTrt(2-Cl)樹脂とTBS基を除去した後、Ser<sup>8</sup>-Asp<sup>11</sup>間での分子内エステル環化反応を行った。この反応は、目的とする分子内エステル環化体4と共に、コハク酸イミド(Asi)体5と直鎖および環状の二量体を与えた。前者副反応の抑制には、2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物(MNBA)をジクロロメタン(DCM)中で適用した縮合条件が有効であった<sup>6)</sup>。また、上記反応混合物に出発ペプチドを徐々に滴下することにより、擬似的な高希釈反応条件を設定し、二量体の生成を抑制した。続くThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>のエステル環化反応は、トリフルオロ酢酸(TFA)処理で対応するBu基を除去した後、先と同様の反応条件で行った。この場合にもAsi体7と二量体の副生が効果的に抑制された。得られた保護MST(6)に残るBzl型保護基は、無水フッ化水素(HF)処理によりエステル結合を損なうことなく除去した。合成MSTの各種スペクトルデータおよびサブチリシンCarlsbergに対する阻害活性( $K_i=0.6$  nM)は、天然物の報告値( $K_i=1.5$  nM)<sup>7)</sup>と良い一致を示した。

## 3. MSTの構造活性相関研究

MSTの強力なプロテアーゼ阻害活性を規定する因子として、構造の特徴であるエステル結合の寄与が一番に予想される。これに加え他の構造因子を解明する目的で、MSTの構造活性相関研究を行った<sup>8)</sup>。すなわち、①どちらか一方のエステル結合または両者を開環(アナログ9, 10, 11)、②エステル結合の位置を非天然型に改変(12)、③二

つのエステル結合をジスルフィド結合またはアミド結合にそれぞれ置換(13, 14)、④Pro<sup>7</sup>をAlaに置換(15)、⑤主鎖を削除した短鎖アナログ(16, 17)を化学合成した。①~③は、何れもエステル結合がプロテアーゼ阻害活性に及ぼす影響を検討するものである。Pro<sup>7</sup>は、MST(3-9)のN端側環状構造の中であって主鎖がシス配座を取ることがNMR構造解析から示されている(図2A)。このシス配座が環状構造の維持、安定化に重要な役割を果たしていることが示唆される。これを確認する目的で、Pro<sup>7</sup>をAlaに置換して主鎖構造をトランス配座に改変した。合成アナログのサブチリシンCarlsbergに対する阻害活性を表1に示した。

一つまたは二つのエステル結合を開環したアナログ(9, 10, 11)において、Ser<sup>8</sup>-Asp<sup>11</sup>間のエステル結合が開環してもThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>のそれを備えてさえいれば、活性は有意に保持されている。しかし、後者エステル結合を開環した10, 11およびエステル結合の位置を非天然型のThr<sup>3</sup>-Asp<sup>11</sup>に変え環状構造を拡大した12では、活性が完全に消失することからも、Thr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>エステル結合の重要性が明らかである。一方、7位アミノ酸の主鎖がトランス配座を取る15は、活性に必須であるThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>エステル結合を有しているにも関わらず、阻害活性は天然のそれと較べると二桁低下した。両者の溶液構造を比較すると、小さい環状構造MST(8-11)には殆ど差違を認められないが、大きい環状構造MST(3-9)は著しく異なっている。すなわちMSTではTyr<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>配列がタイプVI $\beta$ -ターンであるのに対し(図2A)、15はArg<sup>5</sup>-Tyr<sup>6</sup>配列でタイプII $\beta$ -ターンを形成している(図2B)。15は2本の天然型エステル結合を備えているにも関わらず、7位アミノ酸がトランス配座になることによって、環状構造MST(3-9)に歪みが生じ、分子内水素結合を消失している。Arg<sup>5</sup>のN<sup>H</sup>プロトンとThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>エステル結合のカルボニル酸素の距離は、MSTでは2.2 Åであったものが15では6.8 Åとなり、もはや水素結合が形成し得ない。7位アミノ酸の配座が阻害活性に及ぼす影響は、エステル結合をジスルフィド結合、アミド結合に置換した13, 14においても同様に観測された。これらアナログのPro<sup>7</sup>の配座は、シス/トランス比が7/3の組成となり、シス体の減少を反映して活性が低下している。特にジスルフィド体13は、シス配座を取る場合でも、トランス配座を取る15と同様に分子内水素結合が形成されないため、結果として更なる活性低下を招いたと考えられる。次に主鎖を短縮したアナログ16, 17は、活性発現に必須なThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>エステル結合を持ち、かつPro<sup>7</sup>のシス配

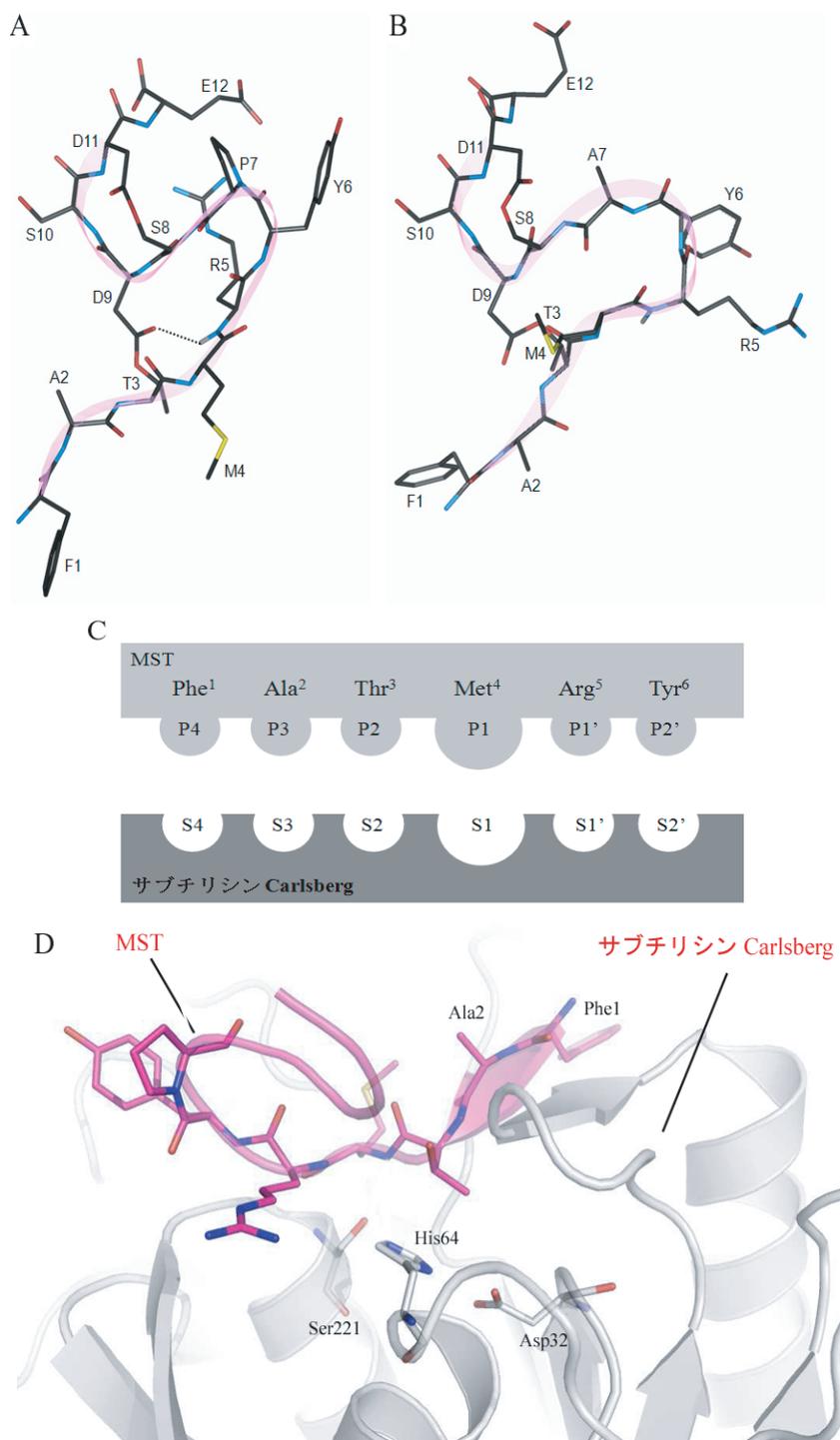
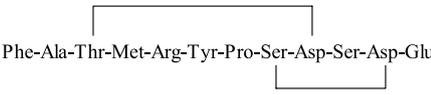
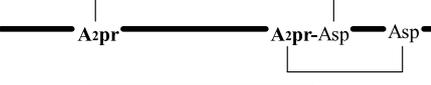
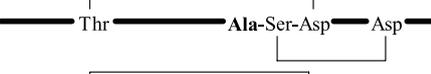
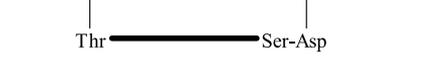


図 2 MST の立体構造と酵素との結合様式

A. MST (1) の NMR 溶液構造, B. [Ala<sup>7</sup>]-MST (15) の NMR 溶液構造, C. MST が酵素に結合する模式図 (MST の P4-P2' 部位が酵素の S4-S2' ポケットに結合している), D. MST-サブチリシン Carlsberg 複合体の結晶構造.

A 図中の点線は, Arg<sup>5</sup> の N<sup>H</sup> プロトンと Thr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup> エステル結合のカルボニル酸素間の水素結合を表す.

表1 MSTアナログのサブチリシン Carlsberg に対する阻害活性  
 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA を基質として,  $K_i$  値を測定した.

| Peptide   |    | $K_i$ (nM) | Conformation of AA <sup>7</sup> |
|---|----|------------|---------------------------------|
|    | 1  | 0.6        | <i>cis</i>                      |
|    | 9  | 14         |                                 |
|    | 10 | 41000      |                                 |
|    | 11 | 84000      |                                 |
|    | 12 | 17000      |                                 |
|    | 13 | 98         | <i>cis : trans = 7 : 3</i>      |
|   | 14 | 16         | <i>cis : trans = 7 : 3</i>      |
|  | 15 | 84         | <i>trans</i>                    |
|  | 16 | 16         | <i>cis : trans = 85 : 15</i>    |
|  | 17 | 61000      | <i>cis : trans = 85 : 15</i>    |

A<sub>2</sub>pr: 2,3-ジアミノプロピオン酸

座の低下も軽微(シス/トランス, 85/15)である。しかし, 阻害活性を有意に保持する 16 から更に N 末端 Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup> を削除した 17 は, 活性を完全に消失した。一般に, サブチリシンと基質の結合は, 主に主鎖間の水素結合に起因する逆平行  $\beta$ -シート構造, および基質の P1 と P4 部位の側鎖がそれぞれ酵素の S1 と S4 ポケットに認識される疎水的な相互作用によって成立する<sup>9)</sup>(図 2C)。従って, MST の P4-P3 に相当する Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup> は, MST を酵素に繋留し P1 部位をその活性中心に提示する役割を果たしている。以上の結果より, MST の阻害活性発現に必要な構造最小単位は, 16 である。Thr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup> エステル結合, Pro<sup>7</sup> の配座および N 末端 Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup> が, 最小のセリンプロテアーゼ阻害剤である MST に阻害作用を発現する典型的な立体構造を賦与し

ていることが明らかになった。

#### 4. MST-サブチリシン Carlsberg 複合体の結晶構造

前項の構造活性相関研究で得られた知見は, 以下に示す MST-サブチリシン Carlsberg 複合体の結晶構造解析の結果により明快に説明できる。サブチリシンとセリンプロテアーゼに対する典型的な阻害剤, 例えば *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI) や turkey ovomucoid third domain (OMTKY3), の複合体に認められる典型的な相互作用の全てが, サブチリシンと MST のそれにも観測された(図 2D)。さらに MST (1-6) のペプチド結合面同士の二面角, すなわち主鎖の立体構造は, 酵素の活性中心に結合している OMTKY3 のループ構造部分のそれとも良く一致している。

これはMST (1-6) がサブチリシンの活性中心に、OMTKY3と同じ様式で直接的に結合していることを示す。環外のN末端Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup> (P4-P3) が、サブチリシンのGly<sup>100</sup>-Gly<sup>102</sup>と逆平行β-シートを形成し、環状構造で固定された反応中心を含む配列 (P2-P2') を、酵素の活性中心に提示している様子が良く判る。酵素で切断されるアミド結合 (Met<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup>) は、Pro<sup>7</sup>に起因するTyr<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>配列のターンとエステル結合によって固定されている。これら両構造因子が、Arg<sup>5</sup>のN<sup>α</sup>HプロトンとThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>エステルのカルボニル酸素間の水素結合形成を促進している。この環状構造と分子内水素結合が、MST分子の立体構造を安定化している (図2A)。溶液構造では、N末端アミノ酸 (Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>) はフレキシブルである。しかし、これを除いた二環状部分MST (3-11) の立体構造は、溶液と複合体結晶の両者において顕著な差異は認められない。

### 5. MST構造をモチーフとした阻害剤の開発

MSTを始めとした典型的なセリンプロテアーゼ阻害剤は、基質と同様の様式で酵素に結合する。従って、殆どの酵素による基質/阻害剤の認識は、溶媒に露出したP1部位をS1ポケットに収容することにより達成される。この側鎖官能基の性質が、酵素との相互作用と特異性を決定する。MSTは、サブチリシン、エラスターゼ等のセリンプロテアーゼを阻害するが、同じくセリンプロテアーゼであるトリプシンには作用しない。P1部位のアミノ酸特異性をサブチリシンのMet/Leuから、トリプシンのそれであるArg/Lysに置換したMSTアナログは、トリプシン阻害剤として作用すると予想される。果たして、MSTのP1部位とP1部位を入れ替え、P1部位にArgを配したアナログは、サブチリシンに対する阻害活性を消失した。そして、トリプシンに対してロイペプチンよりも強い阻害活性を新たに発現した。酵素阻害剤を設計するに当たり、MSTの構造モチーフが有用なツールとなり得ることを実証した。

### 6. おわりに

位置選択的なエステル結合形成反応を援用した化学合成およびNMR・結晶構造解析による、MSTの構造活性相関研究を紹介した。化学合成のアプローチからの研究が、ペプチド・タンパク質の生理機能解明、更にはそれらが関連する病態を解明する研究の一助になれば幸いである。

### 謝辞

本稿で紹介した研究は、以下の方々との共同研究で行わ

れたものです。NMR構造解析は、山崎俊正博士 (農業資源研究所)、X線結晶構造解析は、河原一樹博士、元岡大祐氏、中村昇太博士、大久保忠恭准教授 (大阪大学大学院薬学研究科)、小林祐次教授 (大阪薬科大学) の御尽力により成し得ることができました。この場を借りまして、心より御礼申し上げます。

- 1) Imada, C., Maeda, M., Hara, S., Taga, N., & Simidu, U. (1986) *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 469-476.
- 2) Imada, C., Hara, S., Maeda, M., & Simidu, U. (1986) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1455-1459.
- 3) Kanaori, K., Kamei, K., Taniguchi, M., Koyama, T., Yasui, T., Tanaka, R., & Imada, C. (2005) *Biochemistry*, **44**, 2462-2468.
- 4) Bode, W. & Huber, R. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433-451.
- 5) Taichi, M., Yamazaki, T., Kimura, T., & Nishiuchi, Y. (2009) *Tetrahedron Lett.*, **50**, 2377-2380.
- 6) Shiina, I., Ibuka, R., & Kubota, M. (2002) *Chem. Lett.*, 286-287.
- 7) Taniguchi, M., Kamei, K., Kanaori, K., Koyama, T., Yasui, T., Takano, R., Harada, S., Tajima, K., Imada, C., & Hara, S. (2005) *J. Pept. Res.*, **66**, 49-58.
- 8) Taichi, M., Yamazaki, T., Kawahara, K., Nakamura, S., Motooka, D., Harada, S., Teshima, T., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., & Nishiuchi, Y. (2010) *J. Pept. Sci.*, **16**, 329-336.
- 9) Bech, L., Sørensen, S.B., & Breddam, K. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2835-2852.

泰地 美沙子, 西内 祐二

((株)ペプチド研究所, 大阪大学大学院理学研究科)

Structure and function of marinostatin, a serine protease inhibitor

Misako Taichi and Yuji Nishiuchi (PeptideInstitute, Inc., Osaka University, Graduate School of Science, SAITO Research Center, Peptide Institute, Inc., Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan)

## ウミホタル生物発光を用いた生体イメージング

### 1. はじめに

ウミホタルは節足動物門甲殻綱介形目ウミホタル科に分類され、米粒のような形をしている夜行性海洋生物である。発光性ウミホタルは日本海沿岸に幅広く棲息し、これまで *Vargula* 属, *Cypridina* 属, *Conchoecia* 属から三つの発光種が見つかっている。 *Vargula* 属や *Cypridina* 属の発光ウミホタルは水深2~3メートルの浅い海に棲息し、外