

実施課題名: N-メチルペプチドの立体構造解析基盤としてのKarplus係数の決定およびその応用

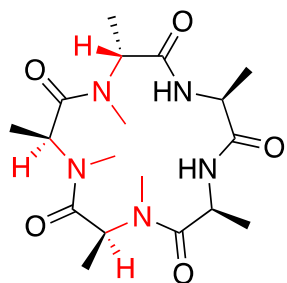
【背景】

近年、Nメチルアミド構造を含む環状ペプチドが、高い細胞膜透過性を示すことから、創薬研究において注目されている。環状Nメチルペプチドがどのような立体構造を形成して高い膜透過性を示すかを理解することは重要な研究課題である。しかしながら、Nメチルアミド構造を有するペプチドは、通常のペプチドのように、 $^3J_{\text{NMeHa}}$ の値から二面角 ϕ を求めることができないため、NMRによる立体構造解析が困難である。そこで本研究では、Nメチルアミド用のKarplus係数の決定などNメチルペプチドの立体解析技術の確立を目的とする。

【実施内容】

Nメチルアミド構造を有する7種類の環状ペプチド(Fig. 1)について、 ^1H , HSQC, HMBC, ROESY等の各種スペクトルを測定し、環状ペプチド中のプロトン全てを帰属した上で、XPLOR-NIHにより立体構造を計算した。続いて、デカップリングを行わない条件で ^{13}C -1Dスペクトルを測定し、環状ペプチド中に含まれるNメチルアミド部分の $^3J_{\text{NMeHa}}$ の値を決定した。こうして得られた $^3J_{\text{NMeHa}}$ の値と環状ペプチドの立体構造情報から得られた二面角 ϕ の値の相関からKarplus式の導出を試みた。また、Nメチルアミド構造周辺に特徴的な残基内・残基間のNOEが、Nメチルペプチドの立体構造解析において有用であることも明らかとなった。さらに、NMRを用いたNメチルペプチドの立体構造解析手法の応用として、膜透過性を示す環状Nメチルペプチド1種のNMR構造を決定して(Fig. 2)、通常の環状ペプチドやエステル結合を含む環状デブシペプチドの立体構造との比較を行い、その成果を投稿論文として発表した(Hosono et al. *Nat. Commun.* 2023)。また、直鎖状のNメチルペプチドの構造解析についても実施し、その結果の一部はプレプリントとして発表した(J. Morimoto, et al. *ChemRxiv*. 2023)。測定はすべて東京大学に設置された ^{13}C 直接観測用クライオプローブを有する800MHz測定装置で行った。

Fig. 1



Nメチルアミド構造を含む
6残基環状ペプチドの1種

Fig. 1. 測定したNメチルペプチドの構造の一例。

Fig. 2

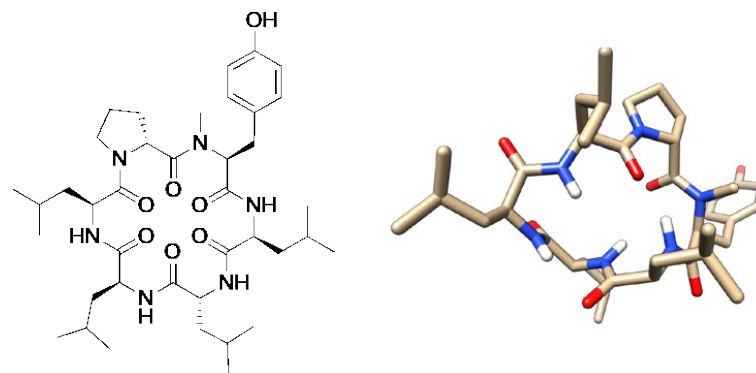


Fig. 2. NMRにより決定した環状Nメチルペプチドの立体構造。
(*Nat. Commun.* 2023, 14, 1416より一部改変して転載)

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF22-01-044		
利用課題名	N-メチルペプチドの立体構造解析基盤としての Karplus 係数の決定およびその応用		
所属機関	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻		
所属部署	山東研究室		
役職・氏名	役職	講師	氏名 森本 淳平
利用実施時期、及び期間	2022年 5月 1日～2024年 4月 30日 総利用日数: 14日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) N-メチルペプチドとの比較により構造-膜透過性相関の研究 (<i>Nat. Commun.</i> 2023 , <i>14</i> , 1416)に発展させるために、N-メチルアミドを含まない通常の環状ペプチドやエステル結合を含むデプシペプチドのNMR構造解析を行ったため、利用日数は当初予定(10日)より多い14日となった。		

1. 本課題の概要・目的

アミド結合の N-メチル化は、ペプチドの膜透過性や生体安定性を向上させることができるため、ペプチド創薬において重要な修飾法である。N-メチル化されたペプチドが高い膜透過性を発揮する構造基盤やタンパク質に結合する際の構造などを理解することは、ペプチド創薬を進展させる上で重要である。しかしながら、N-メチルアミドは、タンパク質性アミノ酸から構成されるタンパク質やペプチドにはみられない構造であるため、N-メチルアミドを有するペプチドのNMRを用いた構造解析においては、タンパク質の構造解析に用いられる Karplus 式を適用することができないという課題がある。そこで、本研究では、N-メチルアミド構造を有するペプチド(N-メチルペプチド)を合成してそれらのNMR測定データを蓄積し、これらのデータを用いて、N-メチルペプチドの構造解析のための Karplus 係数の決定や特徴的な NOE 情報の取得などを行うことを目指した。さらに、得られた知見を活用することで、実際に、N-メチルアミド構造を有するペプチドの構造解析を実施することとした。

2. 成果の概要

実施内容

N-メチルアミド構造を有する7種類の環状ペプチドについて、 ^1H , HSQC, HMBC, ROESY 等の各種スペクトルを測定し、環状ペプチド中のプロトン全てを帰属した上で、XPLOR-NIHにより立体構造を計算した。続いて、デカップリングを行わない条件で ^{13}C -1D スペクトルを測定し、環状ペプチド中に含まれる N-メチルアミド部分の $^3J_{\text{NMeHa}}$ の値を決定した。こうして得られた $^3J_{\text{NMeHa}}$ の値と環状ペプチドの立体構造情報から得られた二面角 ϕ の値の相関をプロットし、フィッティングを行うことで Karplus 係数の算出を行った。また、N-メチルアミド構造周辺に特徴的な残基内・残基間の NOE 情報を取得することを試みた。続いて、NMRを用いた N-メチルペプチドの立体構造解析手法の応用として、膜透過性を示す環状 N-メチルペプチド1種のNMR構造を決定して、通常の環状ペ

プチドやエステル結合を含む環状デプシペプチドの立体構造との比較を行った。また、直鎖状の N メチルペプチド 3 種についても NMR 測定を行い、分子動力学計算や DFT 計算で推定された構造との整合性を検証した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

複数種のペプチドの NMR データの解析結果を用いることで、本課題で目的としていた Karplus 係数の推定を行うことができた。ただし、本課題では、N メチルペプチドに関して得られた NMR データに対して、信頼性の高い参照構造を準備することが難しいという課題が残った。そのため、今後、解析方法の向上によって、Karplus 係数の精度が向上していくことが望まれる。また、得られた N メチルペプチドに関する NMR 情報を活用することで、種々の N メチルペプチドの構造解析を促進することができた。こうして解析した N メチルペプチドの構造のうち、膜透過性を示す 6 残基環状 N メチルペプチドの構造解析については、N メチルアミドを含まない通常の環状ペプチドやエステル結合を含むデプシペプチドの立体構造との比較を行い、構造-膜透過性相関の研究の一環として、その成果を論文にまとめて報告した (*Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1416)。また、直鎖状の N メチルペプチドの構造解析の結果については、分子動力学計算や DFT 計算で推定された構造と矛盾がないことを確認し、その一部をプレプリントの形で発表した (*ChemRxiv* **2023**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2023-c4mw6)。

成果発表

1. Yuki Hosono, Satoshi Uchida, Moe Shinkai, Chad E. Townsend, Colin N. Kelly, Matthew R. Naylor, Hsiau-Wei Lee, Kayoko Kanamitsu, Mayumi Ishii, Ryosuke Ueki, Takumi Ueda, Koh Takeuchi, Masatake Sugita, Yutaka Akiyama*, Scott R. Lokey*, Jumpei Morimoto* and Shinsuke Sando*, "Amide-to-ester substitution as a stable alternative to N-methylation for increasing membrane permeability in cyclic peptides", *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1416. DOI: 10.1038/s41467-023-36978-z
2. Jumpei Morimoto*, Yota Shiratori, Marin Yokomine, Takumi Ueda, Takayuki Nakamuro, Kiyofumi Takaba, Saori Maki-Yonekura, Koji Umezawa, Koichiro Miyanishi, Yasuhiro Fukuda, Takumu Watanabe, Wataru Mizukami, Koh Takeuchi, Koji Yonekura, Eiichi Nakamura, Shinsuke Sando*, "Bottom-up design of peptide nanoshapes in water using oligomers of N-methyl-L/D-alanine", *ChemRxiv* **2023**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2023-c4mw6.

今後の展開

本課題で得られた N メチルペプチドの NMR データに関する知見は、本課題で測定対象としたペプチドに限らず、多様な配列のペプチド構造の解析に対して有用である。そのため、今後、本課題の成果を活用して、様々な N メチルペプチドの構造解析が促進され、ペプチド創薬などの研究の発展に資することが期待される。一方で、本課題で実施した N メチルペプチドに関する Karplus 係数の決定に関しては、NMR データに対して、信頼性の高い参照構造をどのように準備するかという点に課題が残っている。今後、剛直で構造のゆらぎが少なく結晶構造が明らかになっている N メチルペプチドを活用することや高度な計算技術を用いて 3 次元構造を精密に決定した N メチルペプチドなどを参照構造とすることで、精度の高い Karplus 式を確立していくことが望まれる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題で得られた N メチルペプチドの NMR データに関する知見、具体的には NMR データから取得できる二面角やプロトン間距離の情報が、学术界や産業界で活用されていくことで、生体膜透過性や生体内安定性に優れた生理活性ペプチドの機能発現の構造基盤の理解が進むことが期待される。これにより、生体内で機能するような生理活性ペプチドの設計指針が確立していき、生体機能を調べるための分子プローブの開発や疾患関連タ

ンパク質の機能を制御する薬剤シーズになるようなペプチドの創出が加速すると期待される。特に、通常のペプチドでは困難であった細胞内に存在するタンパク質機能の制御を実現するようなペプチドが、N メチルペプチドの高い膜透過性を活かすことで実現されていくことが期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

高い分解能を持つ高磁場マグネットと ^{13}C 直接観測における高感度を実現する専用プローブを有する東京大学のNMR装置を利用することで、分子量が大きく複雑な構造の環状および直鎖状のペプチド複数種について精密な構造解析を迅速に行うことができました。また、同キャンパス内の施設を利用できたことで、サンプルの調製から測定・解析までのプロセスをスムーズに行うことができました。

5. 今後のNMRプラットフォームに対する期待

引き続き、質の高い現状の支援を続けていただけますことを期待しております。

6. 成果公開延期の希望の有無

()あり : (○)なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

東京大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2022年5月10日～2022年5月11日

利用期間 2: 2022年6月11日～2022年6月12日

利用期間 3: 2022年6月28日～2022年6月29日

利用期間 4: 2022年8月3日～2022年8月4日

利用期間 5: 2022年9月9日～2022年9月9日

利用期間 7: 2022年10月14日～2022年10月15日

利用期間 10: 2022年12月26日～2022年12月27日

利用期間 11: 2023年2月24日～2023年2月24日

9. その他の利用施設

該当するものはございません。