

学位論文

光酸素化によるマイオスタチン不活化法の開発研究

2024 年 1 月

岡本 英之

目次

略号	4
序論	6
第一章 マイオスタチン結合ペプチド-光酸化触媒コンジュゲートの合成 および機能評価	15
序説	15
第一節 マイオスタチン結合ペプチド-光酸化触媒コンジュゲートの設計	16
第二節 コンジュゲート 4 および 5 の合成	17
第三節 コンジュゲート 4 および 5 の吸収スペクトル	22
第四節 コンジュゲート 4 、 5 によるマイオスタチンの光酸化	23
第五節 オン/オフスイッチ機能の確認	30
第六節 光酸化によるマイオスタチンの不活化	34
第七節 酸化部位の同定	36
小括	38
第二章 光酸化触媒を導入する位置の最適化	39
序説	39
第一節 種々のコンジュゲートの合成	41
第二節 コンジュゲート 4 および 19-22 の吸収スペクトル	44
第三節 各コンジュゲートによるマイオスタチンの酸化	45
第四節 各コンジュゲートのマイオスタチン選択性比較	47
第五節 各コンジュゲートのオン/オフスイッチ機能評価	49
第六節 各コンジュゲートによるマイオスタチンの不活化	51
第七節 コンジュゲートの細胞毒性評価	53
小括	55
第三章 酵素分解耐性型コンジュゲートの獲得	56
序説	56
第一節 光酸化反応に適応可能な MID-35 誘導体の獲得	58
第二節 酵素耐性型コンジュゲートの合成	60
第三節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の吸収スペクトル	62
第四節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 によるマイオスタチンの光酸化	63
第五節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 のマイオスタチン選択性評価	65
第六節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の細胞毒性評価	66
第七節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 を用いた光酸化による マイオスタチン不活化評価および IC ₅₀ 値の算出	67
第八節 D-ペプチドコンジュゲート 28 の酵素分解耐性評価	69
小括	72

総括.....	73
実験の部.....	75
実験材料.....	75
実験および測定に用いた機器・器具.....	76
第一章.....	78
第二章.....	87
第三章.....	92
引用文献.....	98
掲載文献.....	101
参考文献.....	102
謝辞.....	103

略号

本論文中に記載した略号を以下に示す。

A β : amyloid beta

ActR II B: activin receptor type II B

Ala: alanine (A)

CALI: chromophore-assisted light inactivation

CuAAC: copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition

DIPCI: *N,N'*-diisopropylcarbodiimide

DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

DMB: 1,3-dimethoxybenzen

DMEM: dulbecco's modified eagle medium

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DTT: 1,4-dithiothreitol

ESI: electrospray ionization

FALI: fluorophore-assisted light inactivation

FBS: fetal bovine serum

FITC: fluorescein isothiocyanate

FlAsH-FALI: 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)-fluorescein-FALI

Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

GDF-8: growth differentiation factor-8

GFP: green fluorescent protein

HATU:

1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium3-oxide
hexafluorophosphate

HEK-293: human embryonic kidney-293

His: histidine (H)

HOAt: 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-ol

HOBt: 1-hydroxybenzotriazole monohydrate

HPLC: high performance liquid chromatography

HRMS: high-resolution MS

IC₅₀: half maximal (50%) inhibitory concentration

LAH: lithium aluminum hydride

LED: light emitting diode
Leu: leucine (L)
LRMS: low-resolution MS
MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry
MB: methylene blue
MeOH: methanol
Met: methionine (M)
MG: malachite green
MM: mature myostatin
NEAA: nonessential amino acids
NIR: near-infrared
PBS: phosphate-buffered saline
PDB: protein data bank
PDT: photodynamic therapy
pHPLC: preparative HPLC
PIT: photoimmunotherapy
ReAsH-CALI: 4,5-bis(1,3,2-dithiarsolan-2-yl)-resorufin-CALI
ROS: reactive oxygen species
RT: room temperature
SAR: structure-activity relationship
sm-CALI: small molecule-based CALI
SP: substance P
TBTA: tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TEA: triethylamine
TFA: trifluoroacetic acid
TGF- β : transforming growth factor- β
THF: tetrahydrofuran
TIS: triisopropylsilane
Trp: tryptophan (W)
UV: ultraviolet
Val: valine (V)

序 論

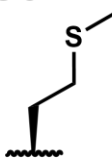
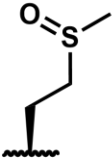
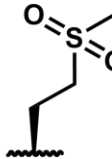
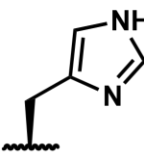
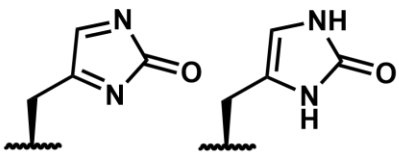
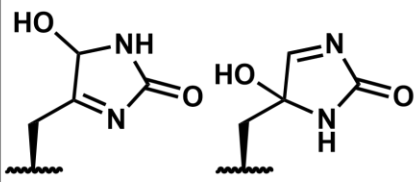
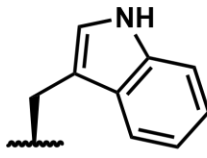
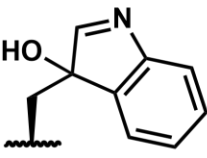
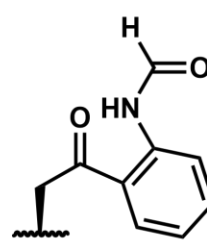
日常生活において、歩く、座るなどの動作や姿勢の保持に骨格筋が使われる。さらに、骨格筋は糖や脂質の代謝調節、マイオカインの分泌等の役割も担う。このように、骨格筋は我々の日常生活に密接に関わる組織であり、生命活動やその維持に大変重要な役割を担っている。一方、病的な状況、すなわち筋ジストロフィー、がん悪液質、サルコペニア、廃用性筋萎縮などの筋萎縮性疾患では、この骨格筋の量が減少する。したがって、骨格筋量の増大は患者の生活の質を大幅に改善することができる。しかし、現在、直接的に筋量増大をもたらす筋萎縮性疾患の治療薬は存在しない。骨格筋量は、生体内において数多くの因子によって調節されている。中でも、1997年に McPherron らによって見出されたマイオスタチン (GDF-8, growth differentiation factor-8) は、筋肉量を負に制御する因子である^{1,2)}。そのため、マイオスタチンの過剰発現は、重度の筋萎縮を引き起こす一方、その機能低下あるいは不活性化は骨格筋量の増大に繋がる¹⁾。このことから、マイオスタチンの阻害は各種筋萎縮性疾患の包括的な治療戦略として注目されている。

マイオスタチンは TGF- β (transforming growth factor- β) スーパーファミリーに属するタンパク質であり、アクチビン II B 型受容体 (ActR II B) およびアクチビン I 型受容体 (ALK4/5) に作用することで骨格筋量の減少を引き起こす。これまでに、マイオスタチンの作用を抑制する阻害剤として、抗マイオスタチン中和抗体 (stamulumab³⁾、domagrozumab⁴⁾、landogrozumab⁵⁾、trevogrumab⁶⁾、可溶性デコイ受容体 (ramatercept⁷⁾⁸⁾、抗 ActR II B 受容体抗体 (bimagrumab⁹⁾) などが開発されてきた。しかし、いずれの抗マイオスタチン中和抗体は、臨床試験において期待した成果が得られず、開発は中止となった^{10,11)}。可溶性デコイ受容体も、看過できない重大な副作用が確認されたために臨床試験は中止された¹²⁾。抗 ActR II B 受容体抗体については、全ての被験者において一定の筋肉量の増大が認められた。しかし、歩行速度に関しては、治験開始前から歩行速度の遅い患者では改善が見られたものの、その他の被験者では改善されなかった¹³⁾。このように、既存の阻害剤は臨床試験等において期待した効果が得られず、医薬品の創製に至らなかった。また、いずれの阻害剤もタンパク質のため大分子に分類される。したがって、非タンパク質の新規なマイオスタチン阻害戦略を見出すことは意義深い。

生体内において、生理活性を発揮する成熟マイオスタチン (mature myostatin、MM) は、プロドメインタンパク質に包まれた不活性な潜在的マイオスタチン複合体 (latent myostatin complex) ¹⁴⁾として、細胞外マトリックス上に貯蔵される (図 1a)。筆者の所属教室では、潜在的マイオスタチン複合体において、プロドメインタンパク質の N 末端領域が MM と相互作用することに着目し、相当するアミノ酸配列から 23 残基のマイオスタチン結合ペプチド **1** (myostatin-binding peptide **1**) を見出している (図 1a) ¹⁵⁾。中分子であるペプチド性のマイオスタチン阻害剤は報告例がないことから、本発見は画期的であったが、当該ペプチド **1** の MM 阻害活性は IC₅₀ が 3.5 μM¹⁵⁾ と弱い。また、**1** による MM の阻害様式は可逆的である (図 1b)。そこで、これを不可逆的な阻害形式に変換できれば、マイオスタチン阻害能の向上に繋がると、筆者は考えた。

タンパク質の不可逆的な不活化法の一つに光酸素化反応が挙げられる。本反応では、光増感剤への光照射によって、反応性の高い活性酸素 (reactive oxygen species、ROS) の一種である一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が発生する。この $^1\text{O}_2$ はタンパク質中のメチオニン (Met)、ヒスチジン (His)、トリプトファン (Trp) 等のアミノ酸残基と反応し、酸素化修飾する (図 2a) ¹⁶⁾。酸素原子の導入はタンパク質の活性発現に重要な高次構造に大きな影響を与えるため、タンパク質を不可逆的かつ強力に失活させることができる (図 2b)。また、本反応は生体内に存在する酸素分子 (溶存酸素) を修飾源として利用できる。一方、光増感剤は、活性酸素発生後には基底状態に戻ることから、触媒的に酸素化修飾反応を起こすことができる。加えて、光照射を適度に調整することで、所望の時間と場所で反応を起こすことが可能であり、過剰な反応を起こしにくい。これらの複数の利点から、光酸素化反応は生体内でのタンパク質の不活化に適していると考えられる。

a)

Amino acid	1[O] adducts	2[O] adducts
Met 		
His 		
Trp 		

b)



図 2. a) アミノ酸の酸素化様式、b) 光酸素化によるタンパク質の不活化の概念図

光酸素化反応によるタンパク質の不活化を利用した技術として、光照射分子不活性化法（CALI : chromophore-assisted light inactivation / FALI : fluorophore-assisted light inactivation 法）がある^{17,18)}。本手法では、光増感剤を付加した抗体を用い、抗原抗体反応を利用して、標的タンパク質の近傍で ROS を産生し、ROS の酸化反応によって標的タンパク質の選択的な不活化を実現する（図 3）。1988 年、CALI 法はハーバード大学分子細胞生物学部（現タフツ大学医学部生理学教室）の Daniel G. Jay らによって初めて報告された¹⁷⁾。当初は、光増感剤としてマラカイトグリーン（MG）が使用された。その 10 年後の 1998 年にフルオレセインイソチオシアネート（FITC）を光増感剤として用いた FALI 法が報告された¹⁸⁾。今日までに、CALI 法は多様に改変されており、様々な応用が報告されている。リガンドとして抗体の代わりに低分子を用いた small molecule-based CALI (sm-CALI) 法¹⁹⁾や光増感剤を他の分子へと変換した GFP-CALI 法²⁰⁾、FlAsH-FALI 法²¹⁾、ReAsH-CALI 法²²⁾、KillerRed-CALI 法²³⁾などである。このように CALI/FALI 法は、リガンド分子や光増感剤を変更可能な汎用性の高い選択的タンパク質不活化法と言える。

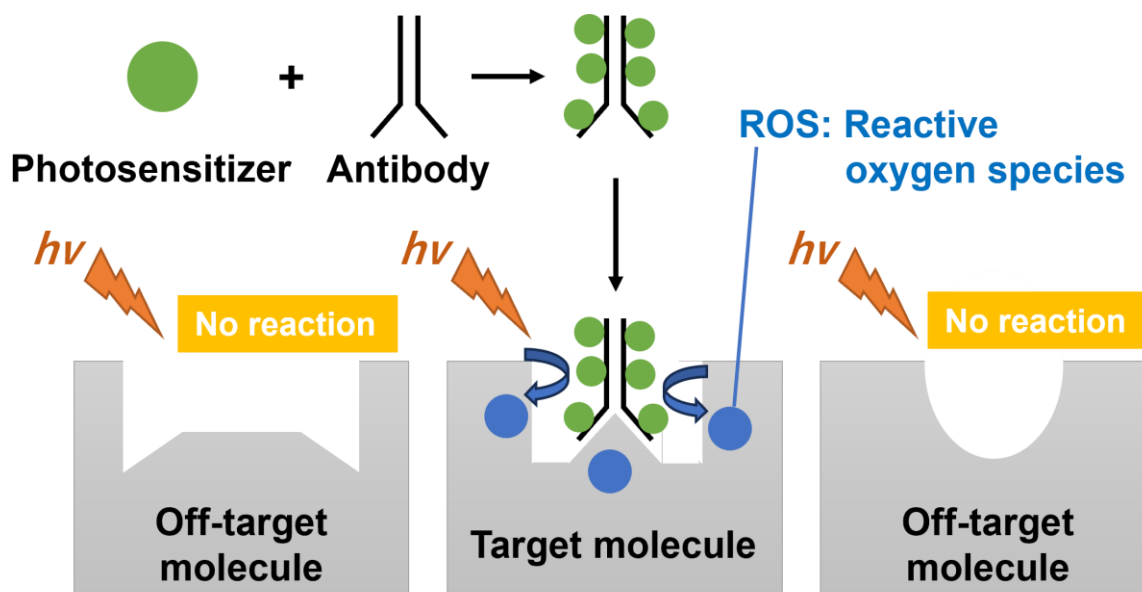
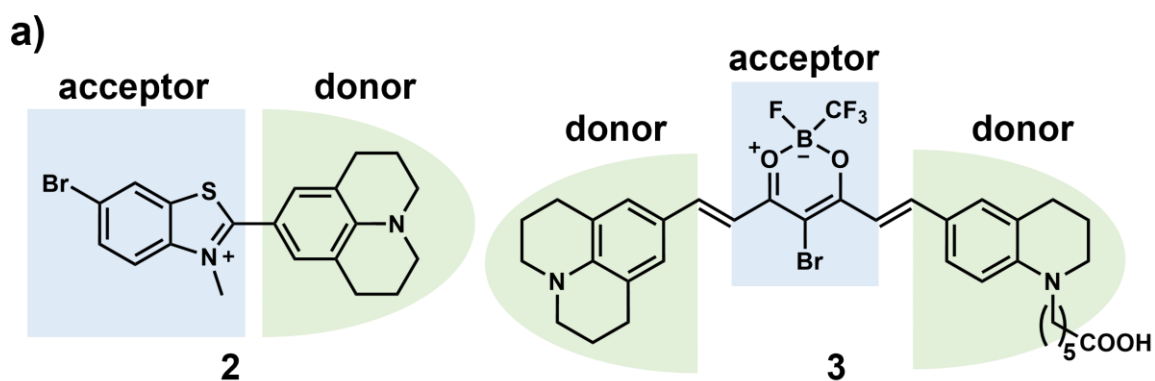


図 3. CALI 法の概念図

臨床では外部刺激として光を用いる治療法がある。癌に対しては、古くから組織集積性を有する光感受性物質を用いた光線力学療法 (PDT) が実施されている。一方、2020 年に CALI 法のようにリガンド分子として抗体を用い、さらに光反応性薬剤を利用する光免疫療法 (PIT)²⁴⁾が新たに確立され、癌治療における光の利点が再認識された。しかしながら、PIT および PDT に共通して用いられる光反応性物質は光照射下では常に励起され、化学反応を起こしてしまう欠点がある。すなわち、副作用に繋がる危険性を有している。

この課題を解決する方法として、2016 年に東京大学 金井求教授らのグループは、オン/オフスイッチ型光酸素化触媒と呼ばれるユニークな光増感剤を開発した (図 4a)^{25,26)}。本触媒は、標的分子と相互作用していない場合 (オフ状態) では、光励起されても酸素化反応を起こさない。一方、標的分子と相互作用している場合 (オン状態) では、光励起によって酸素化反応を引き起こすことができる。このオン/オフスイッチの機構は次のように説明できる。すなわち、本触媒は単結合を介した電子アクセプタードナー構造からなるため、オフ状態で光励起されると (図 4b ①に相当)、電子アクセプター構造とドナー構造が単結合を軸とした回転運動を起こして、速やかにエネルギーが消費され (②)、何も反応を起こさない。一方、標的分子が近接するオン状態では、標的分子との相互作用により前述の回転が抑制される。その結果、触媒は三重項状態へ遷移し (③)、そのエネルギーで近傍の酸素分子を一重項酸素へと活性化することで (④)、標的分子の酸素化を引き起こす。このオン/オフスイッチ機能によって、本触媒は非常に高い標的選択性を発揮する光増感剤として機能する訳である。

金井らは蛍光色素チオフラビン T を基にオン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **2** を報告した (図 4a 左)²⁵⁾。触媒 **2** を用いて、500 nm の光照射下におけるアミロイド β 1-42 (A β) の選択的な光酸素化を達成している。その後 2018 年により長波長光で励起可能なオン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **3** を報告している (図 4a)²⁶⁾。触媒 **3** は、780 nm の近赤外 (near-infrared、NIR) 光照射によって、A β を選択的に酸素化した。生体での利用を志向した場合、励起波長は組織透過性が高く、細胞毒性が低い「Optical Window」と呼ばれる 650–1200 nm の範囲であることが望ましい^{27–29)}。その中でも特に、650–800 nm の光は臨床で広く用いられている波長である^{30–33)}。以上のように、触媒 **3** は、励起波長の観点から生体応用に適していると言える。



b) **[Jablonski diagram]**

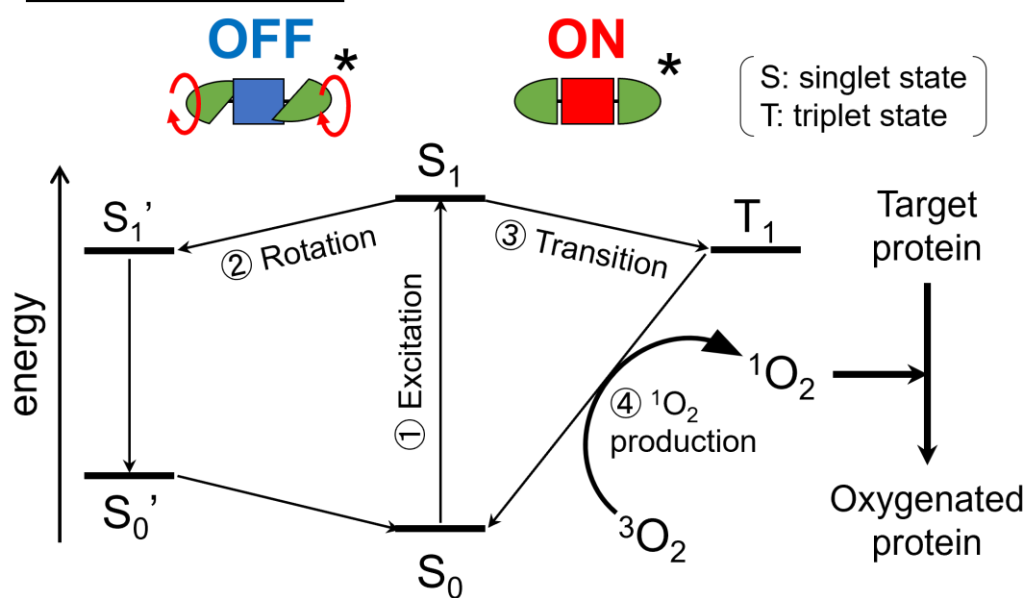


図 4. a) オン/オフスイッチ型光酸化触媒 **2** および **3** の構造、b) オン/オフスイッチのメカニズム

そこで筆者は、先述のマイオスタチン結合ペプチド **1** (図 1a) とオン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **3** からなるコンジュゲートを創製することで、酸素化修飾によるマイオスタチン選択的な不活化法の開発が可能と考えた (図 5)。本コンジュゲートにおいては、ペプチド部位のマイオスタチン親和性によって、触媒部位がマイオスタチン近傍に運ばれ、疎水性相互作用等によりオン状態となることで、マイオスタチンを選択的に酸素化できると考えた。また、本コンジュゲートはマイオスタチンを不可逆的のみならず触媒的にも不活化できると考えられ、従来のマイオスタチン結合ペプチド **1** よりも強力なマイオスタチン阻害を達成できると考えた。

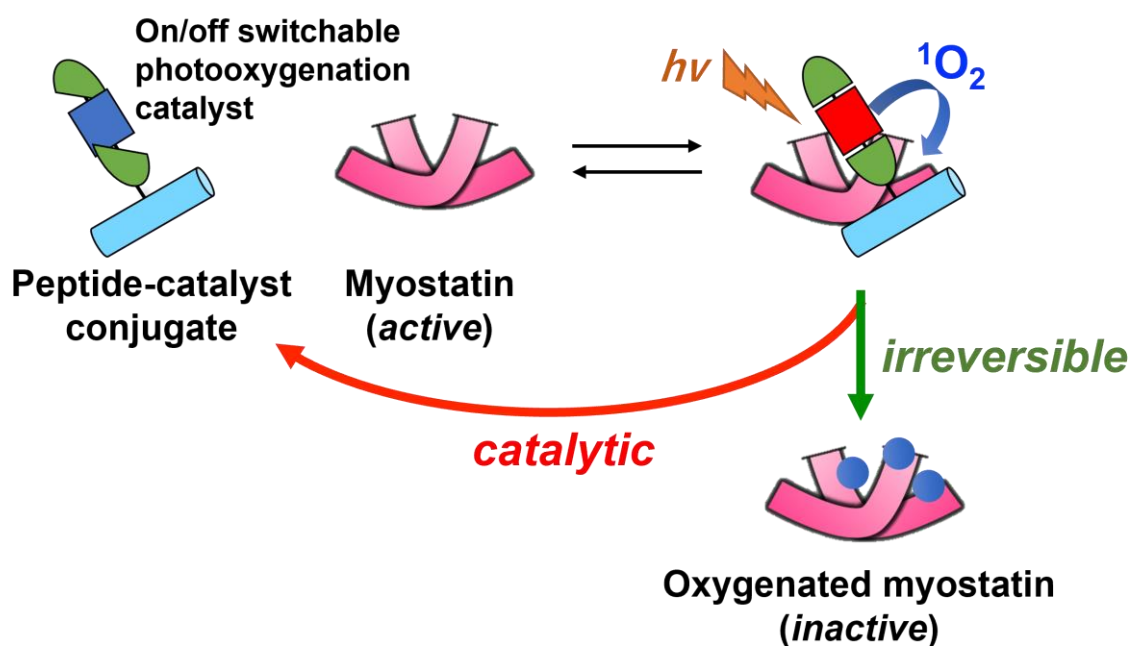


図 5. コンジュゲートによるマイオスタチン不活化戦略

筆者は、本博士論文研究において、先ずペプチド並びに光酸素化触媒の合成、次いでコンジュゲートの合成を実施した。そして、得られたコンジュゲートについては、その光学的特性を解析した。また、本コンジュゲートによるマイオスタチン光酸素化および不活化を評価した (第一章)。次に、コンジュゲートにおける光酸素化触媒の導入位置を検討し、各コンジュゲートの機能評価および比較を行った (第二章)。最後に、酵素分解に対して耐性を有するコンジュゲートを創製し、そのマイオスタチン不活化能等の機能を評価した (第三章)。以下、第一章から第三章までを詳述する。

第一章 マイオスタチン結合ペプチド-光酸素化触媒コンジュゲートの合成 および機能評価

序説

序論で述べたように、マイオスタチンは筋委縮性疾患の有望な治療標的であり、多様な当該疾患の一元的治療を目的に、多様なマイオスタチン阻害剤が開発されてきた。中でも、筆者の所属教室で開発されたペプチド性阻害剤は、抗体型阻害剤等の大分子と異なり、安価に大量合成が可能なため、医療経済の観点からも非常に魅力的である。高山らは、マイオスタチン結合ペプチドに関する構造活性相関 (**structure-activity relationship**、**SAR**) 研究を精力的に実施し、マイオスタチン結合ペプチド **1** (図 1a) を創製した³⁴⁻³⁶⁾。当該ペプチド **1** は、主要な二次構造として α -ヘリックスを形成する傾向が強いことから、その立体構造において阻害活性に重要な二つの疎水面を形成すると考えられる³⁴⁾。また、ペプチド **1** の 12 位アラニン (**Ala**) は、バリン (**Val**)、ロイシン (**Leu**)、メチオニン (**Met**) 等、種々のアミノ酸残基へ置換することで、それらペプチド誘導体のマイオスタチン阻害活性を維持あるいは向上させた³⁵⁾。すなわち、この 12 位 **Ala** は非常に置換許容性の高いアミノ酸残基であると考えられる。また、1 位トリプトファン (**Trp**) は、**3,3-diphenylpropionic acid** や **2-(2-naphthyloxy)acetic acid** に置換することで阻害活性が向上した³⁶⁾。

筆者は、これらの **SAR** 結果を基に、マイオスタチン結合ペプチド **1** と光酸素化触媒 **3** (図 4a 右) からなるコンジュゲートの創製に着手した。

第一節 マイオスタチン結合ペプチド-光酸化触媒コンジュゲートの設計

コンジュゲートを合成するにあたり、筆者はペプチド **1** における 12 位 Ala に着目した。先述の通り、この Ala は置換許容性が高く、かつマイオスタチン阻害に重要な疎水面の逆側に位置している。すなわち、この疎水面に影響を与えずに光酸化触媒の導入が可能だと考えた。さらに、Trp は光酸化を受けるインドール構造を有するアミノ酸であるため、1 位 Trp を 3,3-diphenylpropionic acid に置換することとした。また、ペプチドと触媒の距離がコンジュゲートのマイオスタチン光酸化活性に影響を及ぼす可能性があるため、リンカー長の異なるコンジュゲートを準備することとした。以上を踏まえ、コンジュゲート **4** と **5** をデザインした (図 6)。コンジュゲート **4** および **5** の合成において、ペプチドと触媒は、汎用されている銅触媒アジド-アルキン環化付加 (copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC) 反応で架橋することとした。

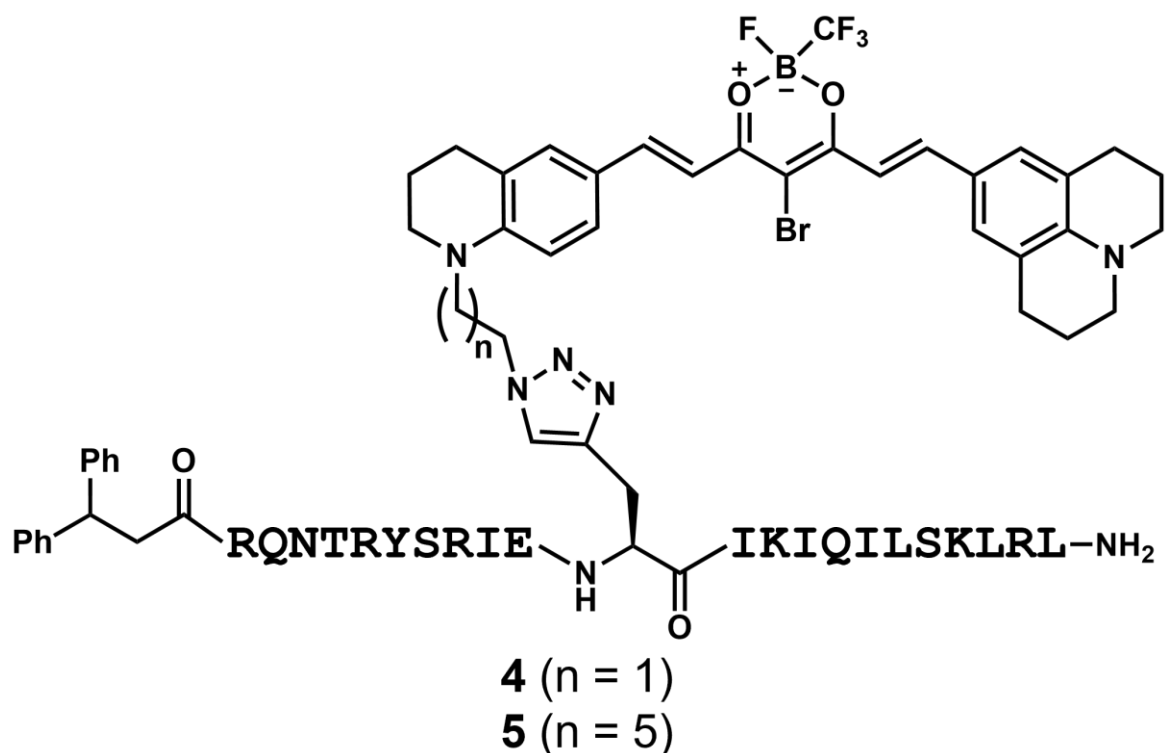
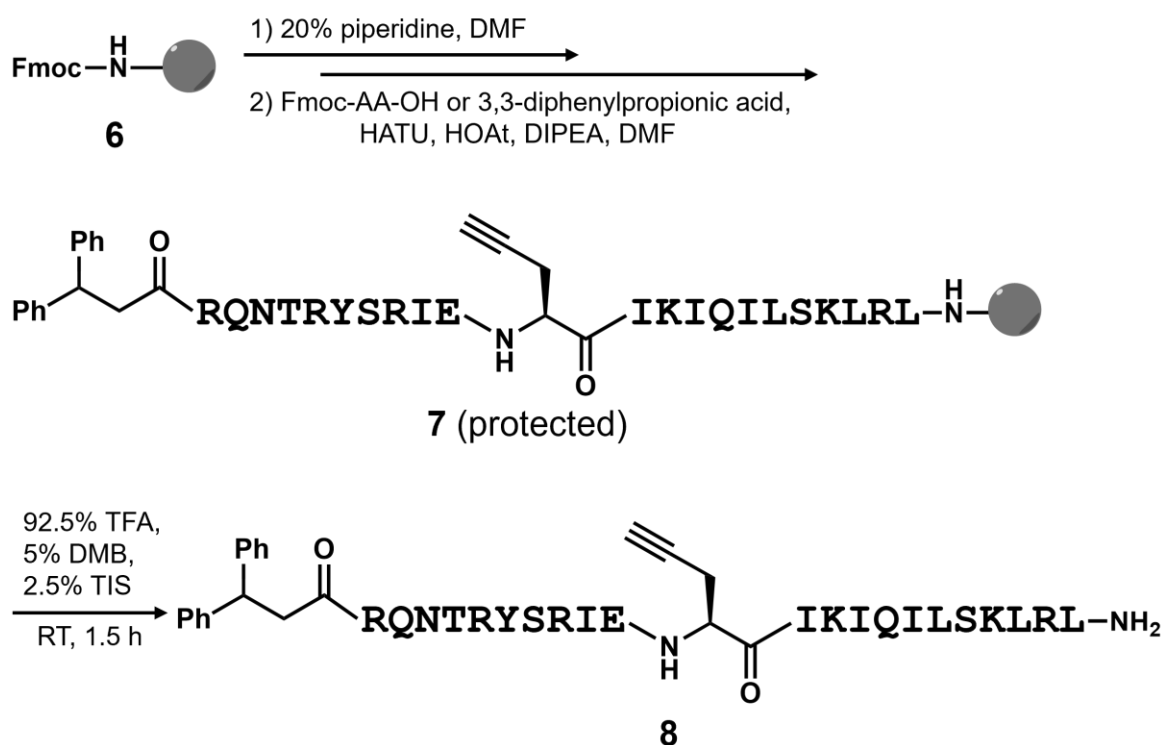


図 6. コンジュゲート **4** および **5** の構造

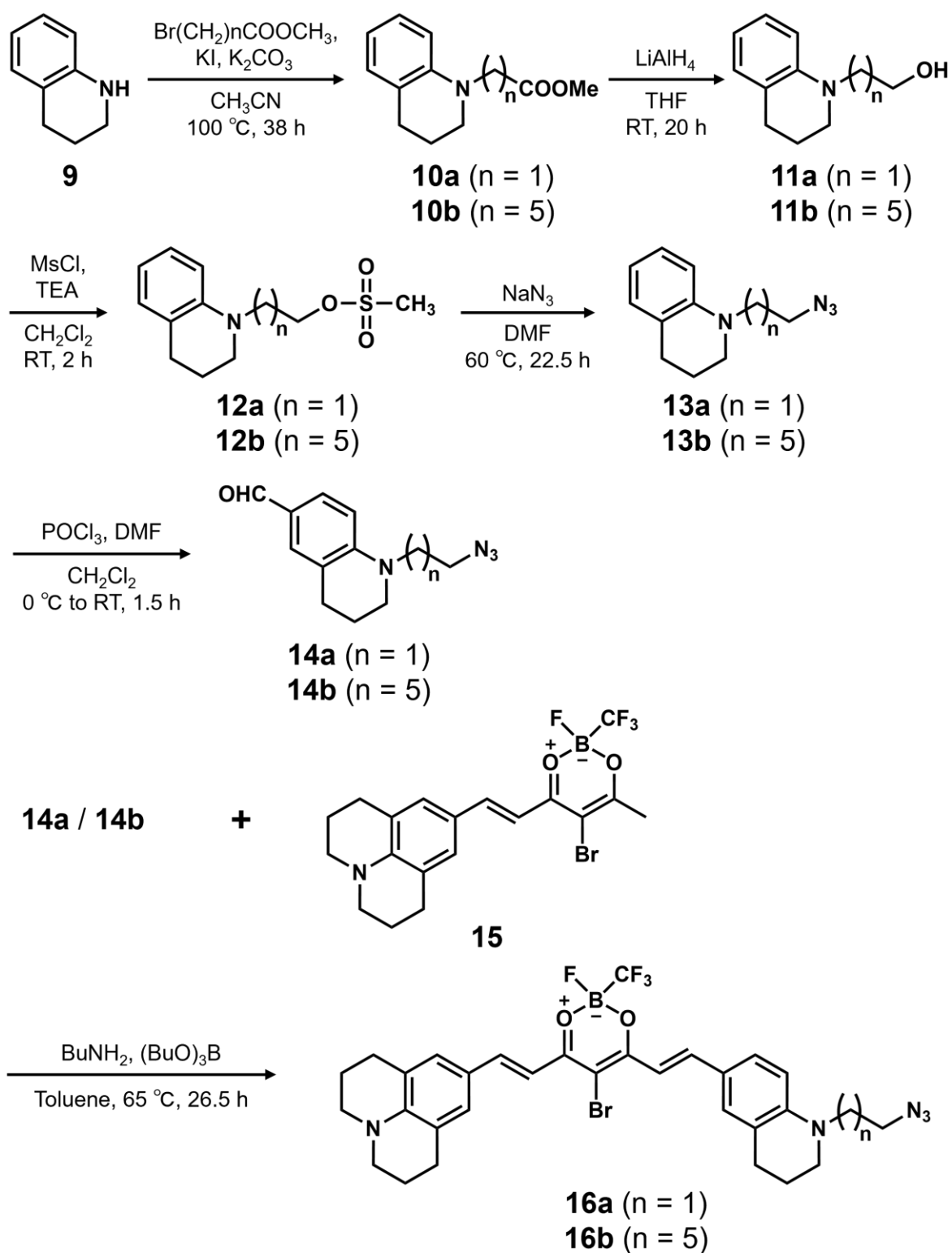
第二節 コンジュゲート 4 および 5 の合成

コンジュゲート 4 および 5 の合成にあたり、まず初めに 12 位 Ala を L-propargylglycine および 1 位 Trp を 3,3-diphenylpropionic acid に置換したペプチド 8 を合成した (Scheme 1)。Rink amide resin (6) を用い、標準的な Fmoc 固相ペプチド合成法³⁷⁾により、各種アミノ酸を逐次縮合してペプチド鎖を伸長させた後、N 末端に 3,3-diphenylpropionic acid を縮合した (7)。そして、92.5% trifluoroacetic acid (TFA)、5% 1,3-dimethoxybenzen (DMB)、2.5% triisopropylsilane (TIS) による脱樹脂を行い、8 を得た。



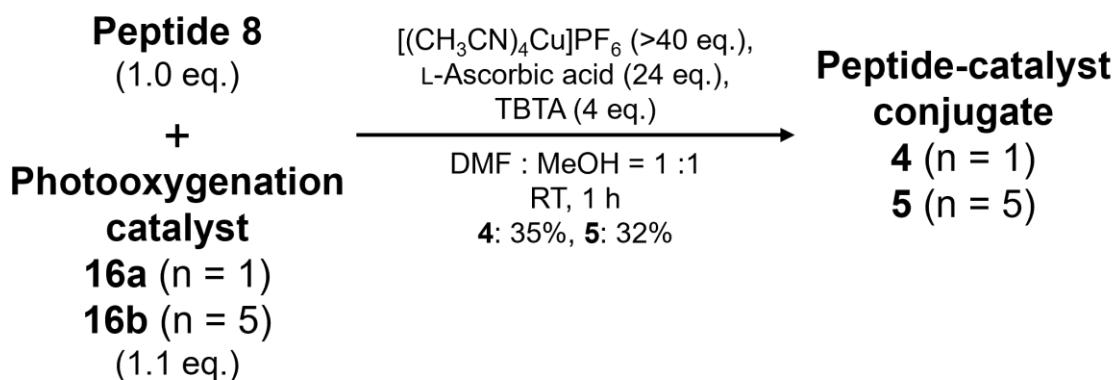
Scheme 1. ペプチド 8 の合成

続いて、アジド基を有する光酸素化触媒 **16a** および **16b** の合成を実施した (Scheme 2)。1,2,3,4-Tetrahydroquinoline (**9**) を出発物質として、N-アルキル化を行い、炭素数の異なるエステル **10a**、**10b** をそれぞれ合成した。次に、lithium aluminum hydride (LiAlH_4) にてメチルエステル部を還元し (**11a**、**11b**)、生じたヒドロキシ基をメシル化 (**12a**、**12b**)、続くアジド化によってアジド体 **13a**、**13b** へと誘導した。最後に、Vilsmeier-Haack 反応にて、ベンゼン環部にホルミル基を導入し、アルデヒド体 **14a**、**14b** をそれぞれ合成した。**14a**、**14b** と別途合成した **15**²⁶⁾ を縮合し、目的化合物 **16a**、**16b** を収率 64% (**16a**) および 45% (**16b**) で合成した。



Scheme 2. 光酸素化触媒 **16a** および **16b** の合成

最後に、アルキニル基含有ペプチド **8** およびアジド基含有の光酸素化触媒 **16a** あるいは **16b** を、DMF:MeOH=1:1 の混合溶媒中、アスコルビン酸、一価銅、tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) の存在下、CuAAC 反応に附すことで、コンジュゲート **4** および **5** を TFA 塩として収率 35% (**4**) および 32% (**5**)、純度 **4,5** 共に >95% で獲得した (Scheme 3)。本反応の進行は、HPLC による反応追跡により行った (図 7)。すなわち、230 nm に吸収を示すペプチド **8** (図 7、赤線、retention time = 20.4 min) と 730 nm に吸収を示す触媒 **16a** および **16b** (図 7、緑線、retention time = 37.8 および 40.1 min) から新たに両波長の吸収を示すコンジュゲート **4** および **5** のピーク (retention time = 25.7 および 27.3 min) の出現をもって確認した。



Scheme 3. コンジュゲート **4** および **5** の合成

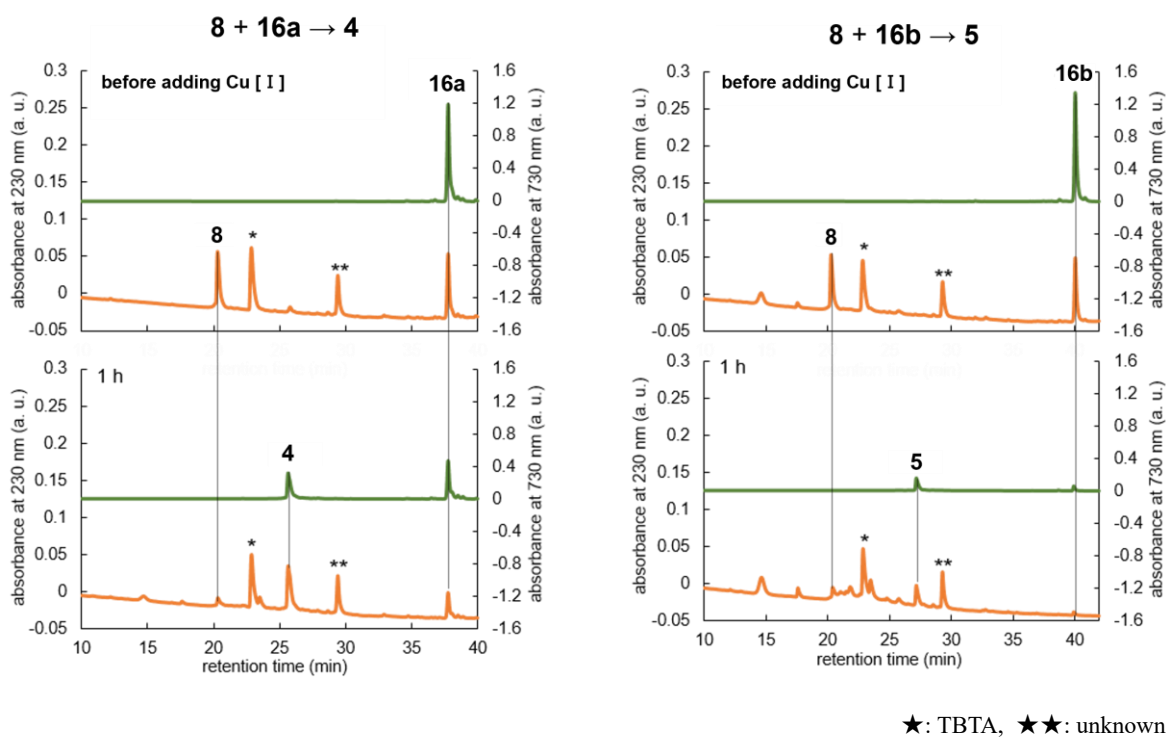


図 7. HPLC による CuAAC 反応の追跡

第三節 コンジュゲート 4 および 5 の吸収スペクトル

獲得したコンジュゲート 4、5 および光酸素化触媒 16a、16b の吸収スペクトルを測定した (図 8)。その結果、コンジュゲート 4 と 5 の最大吸収波長 (λ_{\max}) は 650 nm であり、触媒 16a、16b の λ_{\max} と同様であった。本結果から、コンジュゲート 4 および 5 は 600–850 nm という長波長光に吸収を示すことが確認され、既存の光酸素化触媒 3 (図 4a) と同様に、組織透過性の高い NIR 光で励起可能であることが示唆された。なお、コンジュゲート 4 および 5 の吸光度 (absorbance) は 16a、16b よりも低い、これはペプチド部位の影響による。

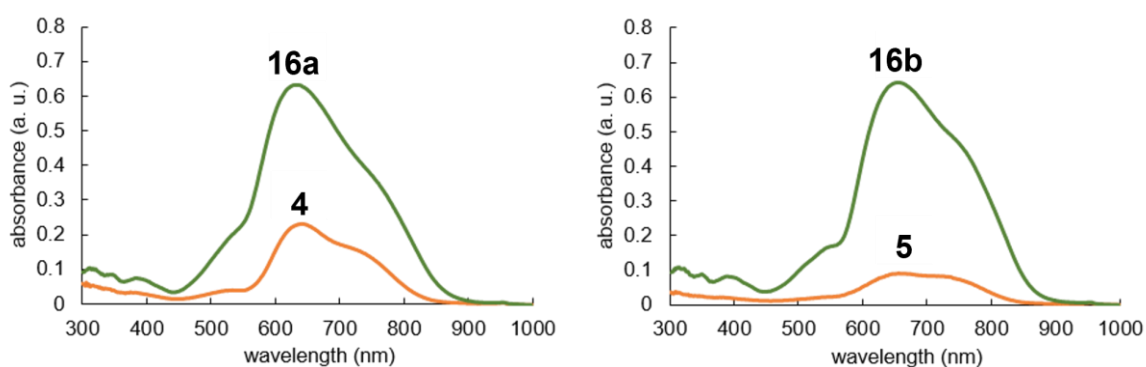


図 8. コンジュゲート 4、5 および光酸素化触媒 16a、16b の吸収スペクトル

第四節 コンジュゲート 4、5 によるマイオスタチンの光酸素化

コンジュゲート 4 および 5 を用いてマイオスタチン光酸素化活性を評価した。各コンジュゲート (1 μ M) をマイオスタチン (3 μ M) 存在下、LED パネル (λ_{\max} = 730 nm) を用いて 30 分間照射した。照射後、混合物を 1,4-dithiothreitol (DTT) 処理によりジスルフィド結合を還元し、エンドペプチダーゼである Lys-C にて順次処理することでマイオスタチンを限定加水分解によりフラグメント化した。次いで、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization、MALDI) –飛行時間 (time-of-flight、TOF) 質量分析 (mass spectrometry、MS) によって、各フラグメントを検出した。その中で、マイオスタチン 79–90 というフラグメントに着目した。本フラグメントは酸素化され得る Met を二つ含有し、かつ MS のピーク強度が比較的高いため、酸素化の評価に適していると考えた。その結果、コンジュゲート 4 の場合、未酸素化マイオスタチン 79–90 フラグメントの MS 強度 (MS intensity) は、照射によって減少し、新たに 1–3 個の酸素原子を有する酸素付加体の MS ピークが出現した (図 9)。本結果より、マイオスタチンはコンジュゲートによって照射下に酸素化されていることが示唆された。

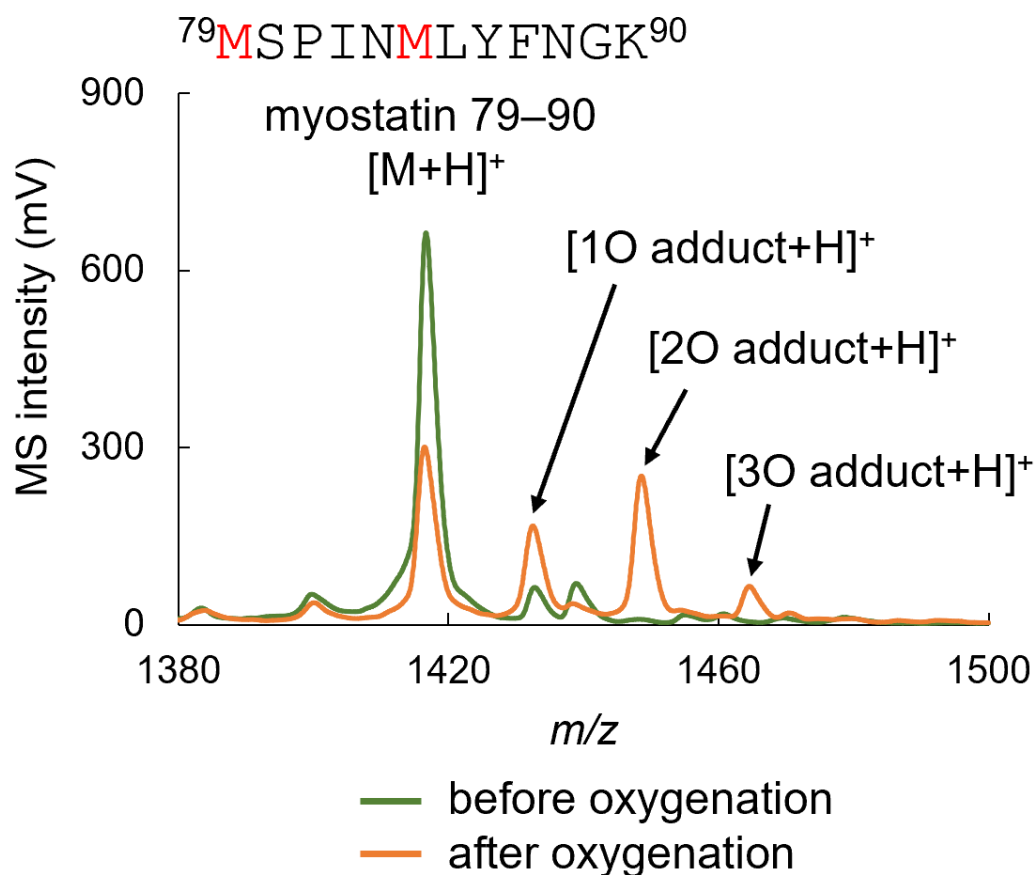


図 9. MALDI-TOF MS によるマイオスタチン 79–90 フラグメントの検出

一方、酸素化可能なアミノ酸を含まないマイオスタチン 40–54 フラグメントでは、酸素化体が確認されなかった (図 10a、赤線)。さらに、酸素化され得る His を三つ含むマイオスタチン 55–78 フラグメントは、1 または 2 個の酸素原子が付加した生成物が検出された (図 10b、赤線)。また、コンジュゲート 4 よりもペプチド–触媒間のリンカーが長いコンジュゲート 5 においても、4 と同様の結果を与えた (図 10a–c、緑線)。以上のことから、炭素数 4 個のリンカー長の違いは、本コンジュゲートのマイオスタチン光酸素化能に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。そこで、以降の実験ではコンジュゲート 4 を用いることとした。

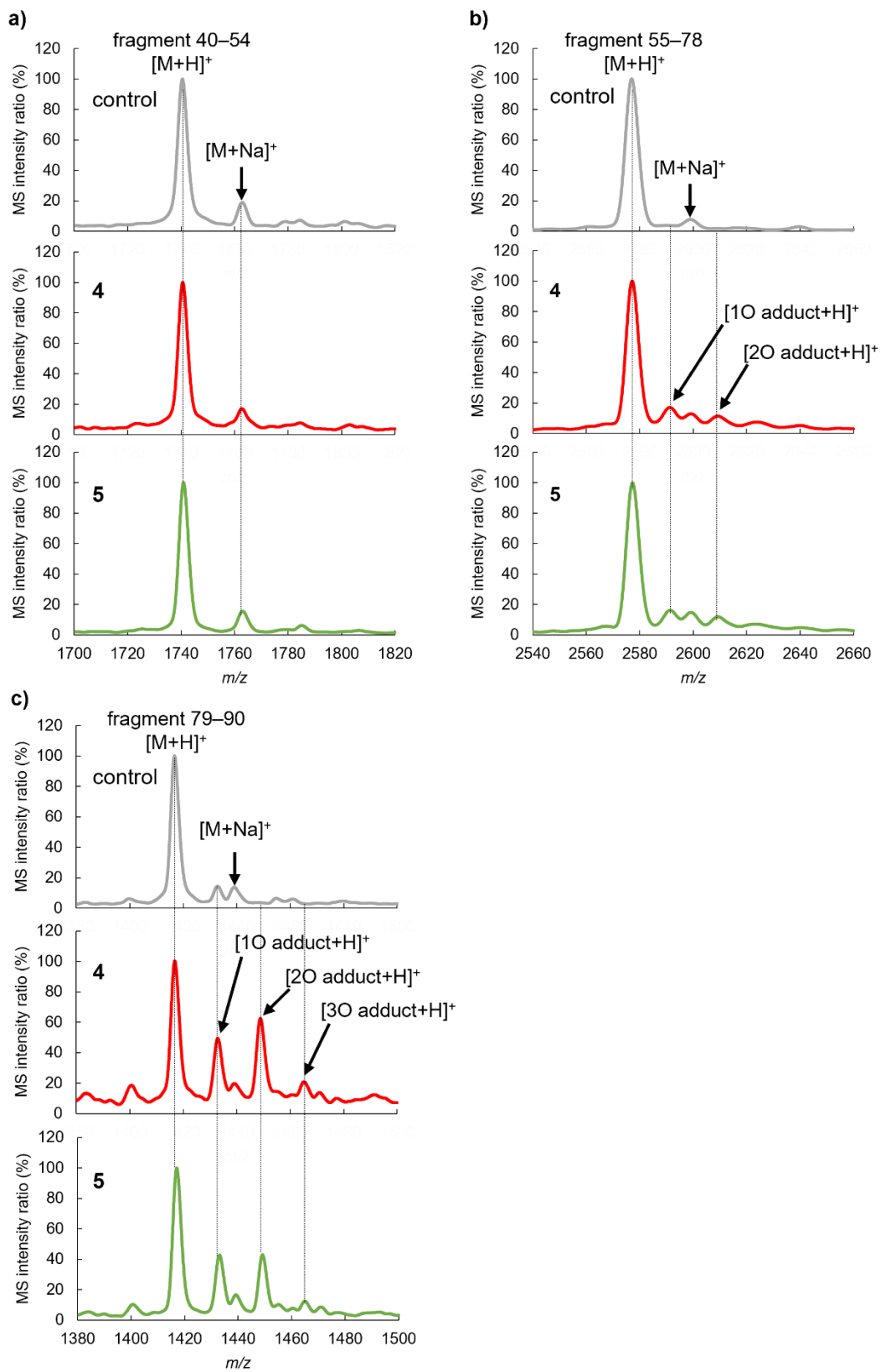


図 10. MALDI-TOF MS による各マイオスタチンフラグメントの検出 a) フラグメント 40–54、b) フラグメント 55–78、c) フラグメント 79–90

より詳細なマイオスタチン光酸素化の評価を行うために、マイオスタチン 79-90 フラグメントにおける未酸素化体および酸素化体の MS ピークから MS 強度比を計算し、酸素化比 (oxygenation ratio) を算出した。本結果より、コンジュゲート **4** による酸素化は光照射時間依存的であった (図 11a)。また、**4** の濃度に依存して酸素化比が増大することも示唆された (図 11b)。なお、この酸素化比がある程度の定量性を有していることも示唆された。

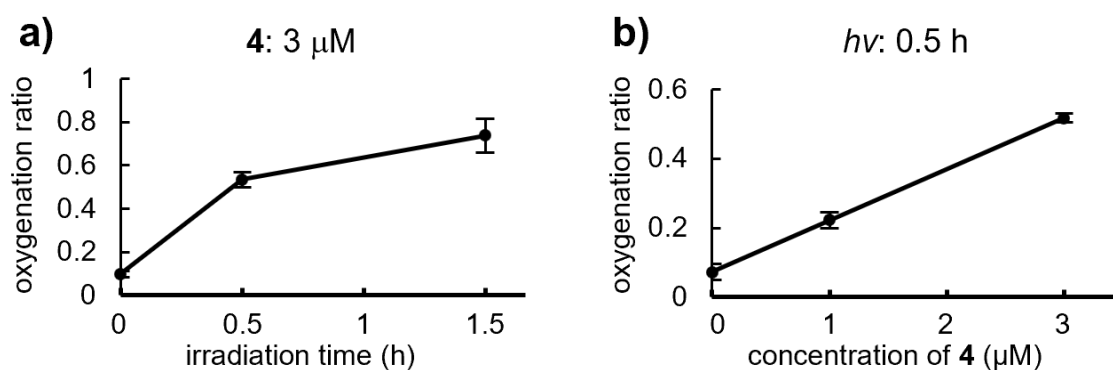


図 11. a) 光照射時間依存的な光酸素化、b) **4** の濃度依存的な光酸素化

次に、種々の条件におけるマイオスタチンの光酸素化を試みた。その結果、マイオスタチンを 3 μM の **4** で 30 分間光照射した場合、酸素化比は 0.53 であった (図 12a、レーン d)。対照的に、**4** が存在しない場合 (レーン b) または光照射をしない場合 (レーン c) の比は、両者を用いない場合 (レーン a) と同様、低い値を与えた (酸素化比比 < 0.1)。さらに、脱気処理により、この比は有意に減少した (図 12b)。これらの結果は、マイオスタチンの酸素化がコンジュゲート **4**、光照射、溶存酸素分子によって引き起こされたことを示唆している。すなわち、マイオスタチンの光酸素化反応であると言える。

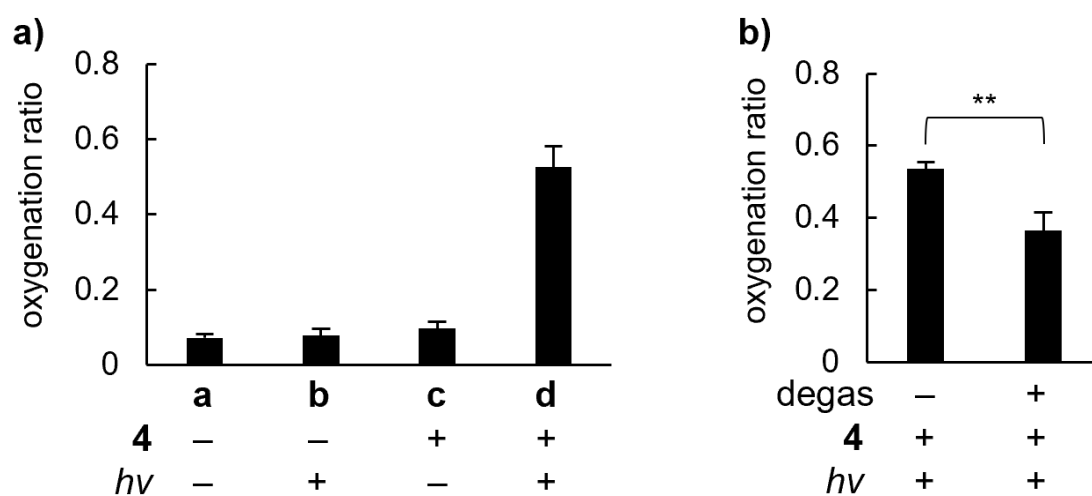


図 12. a) コンジュゲート **4** を用いたマイオスタチン光酸素化、b) 脱気条件での光酸素化、** $p < 0.01$ by Student's *t*-test

次に、触媒量のコンジュゲート **4** によるマイオスタチンの光酸素化を検討した。マイオスタチン (1 μM) に対して、**4** (0.3 μM) を用いて、照射を 3 時間行った後、同様にマイオスタチン 79-90 フラグメントを解析した。その結果、大部分の当該フラグメントが酸素化された (図 13)。本結果から、**4** によるマイオスタチンの光酸素化は触媒的であることが示唆された。

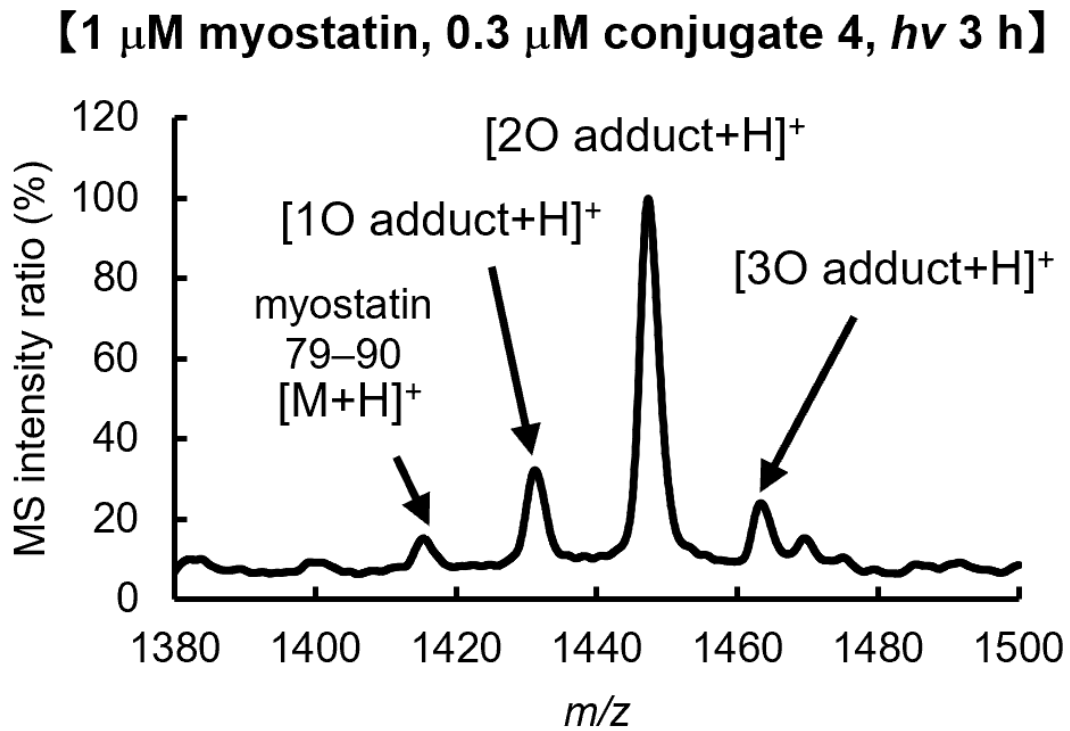


図 13. 触媒的な光酸素化

最後に、コンジュゲート **4** による光酸素化がマイオスタチン選択的であるかどうかを検討した (図 14)。すなわち、マイオスタチン (1 μM) の他に、比較的入手しやすいサブスタンス P (SP、20 μM) と アミロイド β 1-42 ($\text{A}\beta$ 、20 μM) をオフターゲットモデルとして用いて、それぞれの酸素化比 (oxygenation ratio) を算出した。また、オン/オフスイッチ機能を有さず、NIR 光で励起可能なメチレンブルー (MB) をポジティブコントロールとして用いた。その結果、MB には選択性がなく、波長 730 nm の光を 30 分間照射することによって、マイオスタチン、SP、 $\text{A}\beta$ の全てを酸素化した。一方、コンジュゲート **4** は MB と比較してマイオスタチンの酸素化比は同程度あり、かつ SP および $\text{A}\beta$ の酸素化比が低いため、マイオスタチンを選択的に酸素化した。本結果より、**4** は比較的に高いマイオスタチン選択性を有していることが示唆された。この高い選択性の発現には、コンジュゲートにおけるペプチド部位のマイオスタチン親和性に加え、光酸素化触媒部位のオン/オフスイッチ機能が寄与しているものと考えられる。

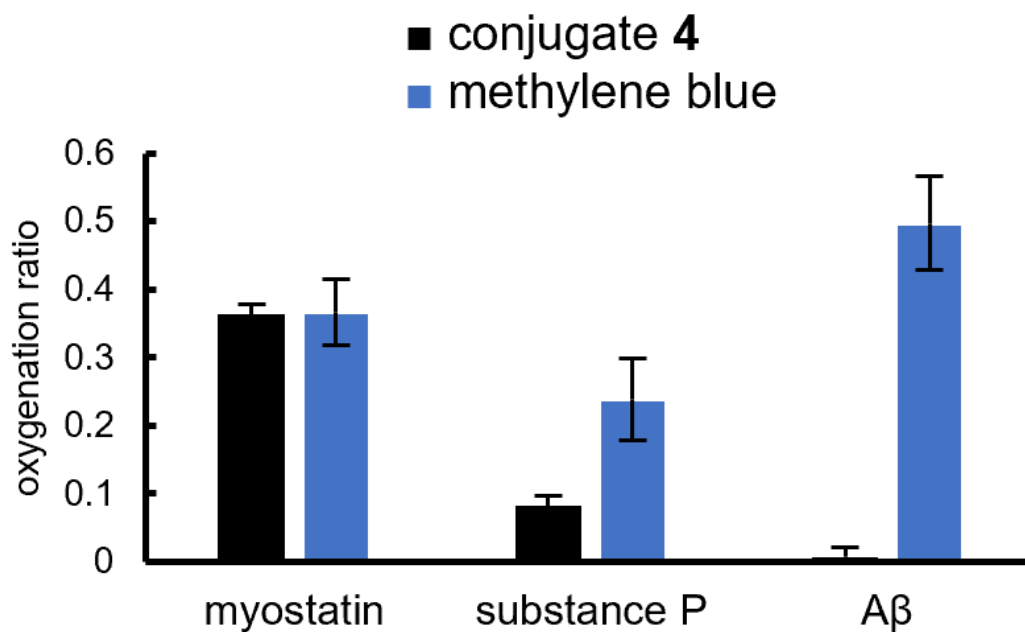
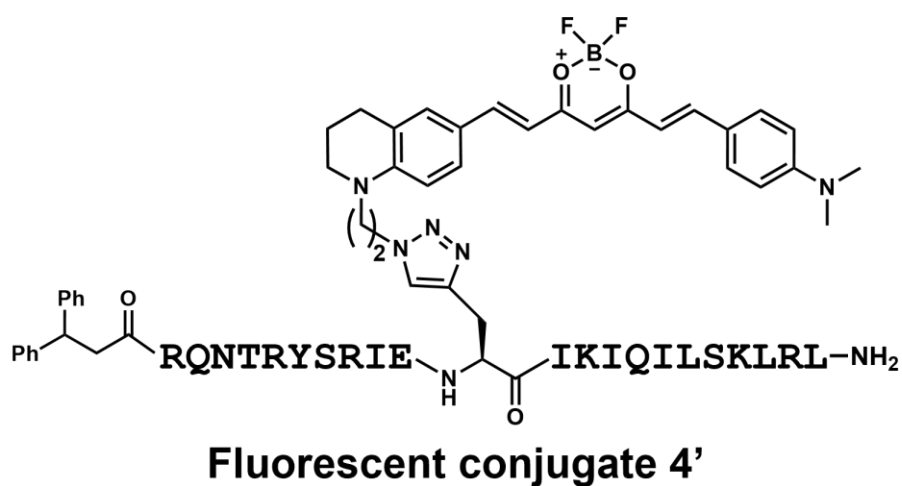
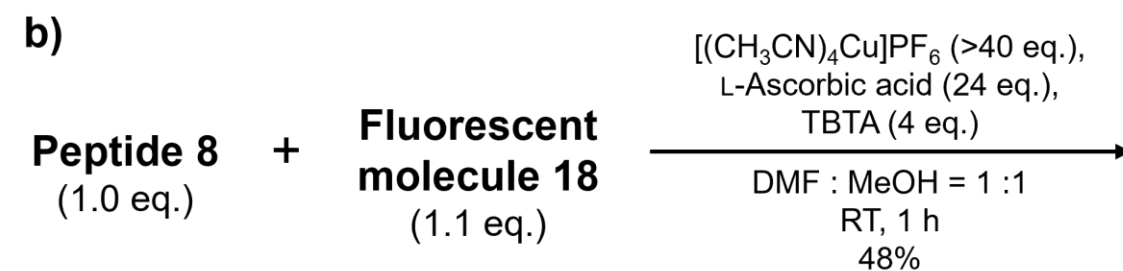
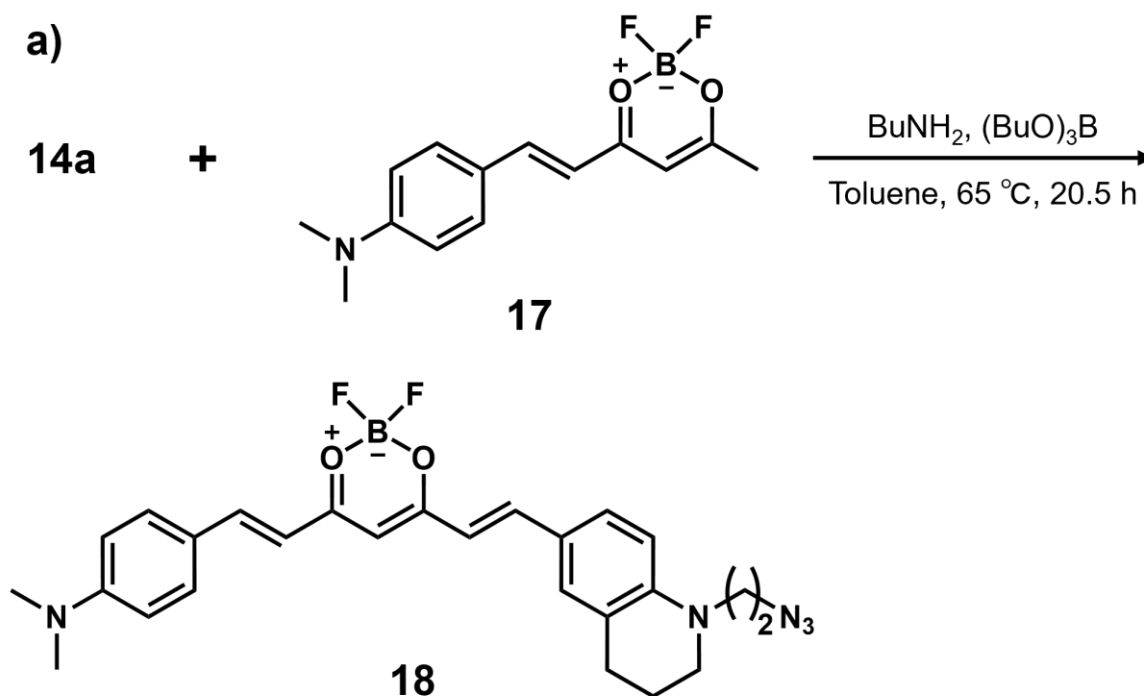


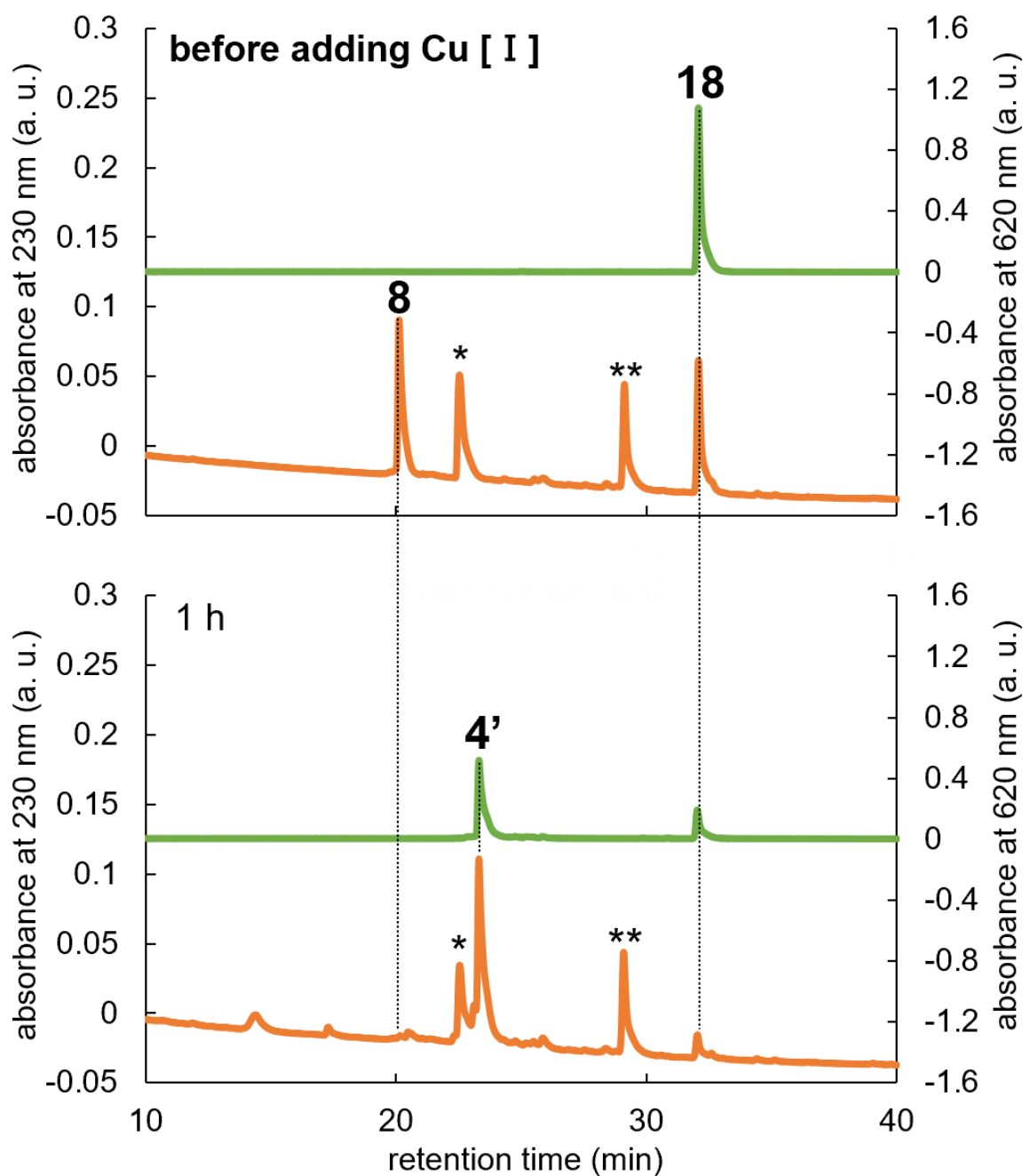
図 14. コンジュゲート **4** によるマイオスタチン選択的酸素化

第五節 オン/オフスイッチ機能の確認

光酸素化触媒のオン/オフスイッチ機能を確認するために、酸素化能を持たない蛍光分子 **18** を **16a** と同様の方法で合成した (Scheme 4)。本蛍光分子 **18** は、光酸素化触媒 **16a** から臭素原子を取り除き、かつホウ素の配位子である CF_3 を F に置換し、juloridine 構造を *N,N*-dimethylaniline 構造に変換した化学構造を有している。光酸素化触媒において、光照射に伴う一重項酸素の生成は臭素原子による重原子効果が大きく寄与している。そのため、臭素原子を持たない **18** は励起エネルギーを蛍光発光に消費する。さらに、構造内に電子ドナー部位と電子アクセプター部位が単結合によって連結しているため、蛍光発光においてオン/オフスイッチ機能を有する。すなわち、本蛍光分子 **18** はオン状態でのみ蛍光を発する分子である。合成した蛍光分子 **18** (図 15、retention time = 32.1) を、コンジュゲート **4** と同様の CuAAC 反応にてペプチド **8** に連結し、ペプチド-蛍光分子コンジュゲート **4'** を合成した (Scheme 4、図 15、retention time = 23.3 min)。



Scheme 4. a) オン/オフスイッチ型蛍光分子 18 と b) 蛍光コンジュゲート 4' の合成



★: TBTA, ★★: unknown

図 15. HPLC による CuAAC 反応の追跡

続いて、獲得した蛍光コンジュゲート **4'** を用いて、オン/オフスイッチ機能を評価した (図 16a)。3 μM の蛍光コンジュゲート **4'** に対してマイオスタチン (1 μM) を添加、あるいは添加しない場合の蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 630 \text{ nm}$) を測定したところ、マイオスタチンを添加した場合のみ、蛍光強度の増加が確認された。本結果より、蛍光コンジュゲート **4'** はマイオスタチンとの結合によってオン状態となり、蛍光強度が増加したと考えられ、オン/オフスイッチ機能を有することが示唆された。さらに、蛍光分子 **18** と光酸素化触媒 **16a** は構造が類似しているため、触媒コンジュゲート **4** にもマイオスタチンとの結合に伴うオン/オフスイッチ機能が働いていると推察される。また、本蛍光コンジュゲート **4'** を用いて、コンジュゲートとマイオスタチンの平衡解離定数 K_D 値を算出したところ、見かけ上の K_D 値は $3.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ であった (図 16b)。

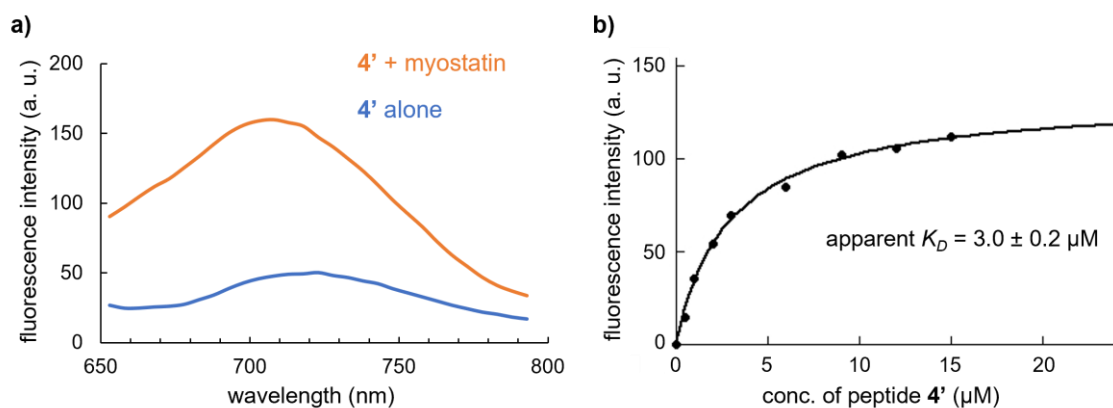


図 16. a) 蛍光コンジュゲート **4'** を用いたコンジュゲートのオン/オフスイッチ機能評価、b) 平衡解離定数 K_D 値の算出

第六節 光酸素化によるマイオスタチンの不活化

マイオスタチンの生物活性を測定することで、酸素化によるマイオスタチン不活性化を評価することとした (図 17)。すなわち、マイオスタチン活性の測定には培養細胞を用いた既報のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ³⁴⁻³⁶⁾を用い、その活性を相対値として算出した (relative myostatin activity)。まず、第四節と同様の条件 (1 μM マイオスタチン、3 μM コンジュゲート **4**、30 分間、光照射 (730 nm)) でマイオスタチンを処理した。その後、マイオスタチンを 0.6 nM となるように希釈したサンプルを、あらかじめプラスミドを導入したヒト胎児腎細胞 293 (HEK-293) 細胞へ添加した。4 時間後、細胞ライセートを作製し、ルシフェラーゼの基質を添加した時の発光強度を測定した (図 17a)。その結果、マイオスタチンの活性 (図 17a、レーン e) は、光照射のみ (レーン f) あるいはコンジュゲート **4** の添加のみ (レーン g) の処理では維持された。一方、**4** と光照射の両方の処理では有意に低下した (レーン h)。以上の結果より、酸素化されたマイオスタチンは、その生物活性を失っていることが示唆された。次に、既存のマイオスタチン結合ペプチド **1** の阻害活性を比較した (図 17b)。0.6 nM のマイオスタチンと 1 nM のペプチド **1** あるいはコンジュゲート **4** の共存下、30 分間の光照射を行い、同様に相対的マイオスタチン活性を測定した。その結果、**4** を添加し、かつ光照射した場合 (レーン g) にのみ、有意にマイオスタチン活性が低下した。一方、ペプチド **1** の添加のみの場合 (レーン d)、あるいはペプチド **1** を添加し、かつ光照射処理をした場合 (レーン e) には、マイオスタチン活性は低下しなかった。これは、測定時の濃度である 1 nM がペプチド **1** の IC_{50} $3.53 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ³⁶⁾ よりも十分に低い濃度であるためだと考えられる。すなわち、コンジュゲート **4** で観察されたマイオスタチン活性の阻害は、同じ低濃度であっても、光酸素化によって不可逆的かつ触媒的にマイオスタチンを不活化したことに起因すると思われる。

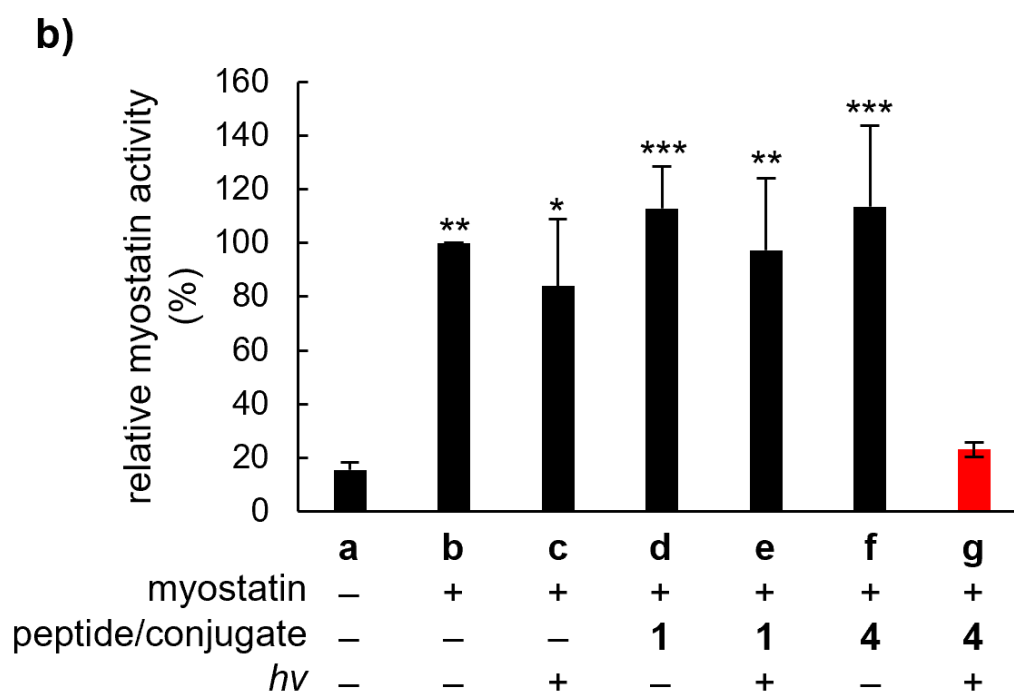
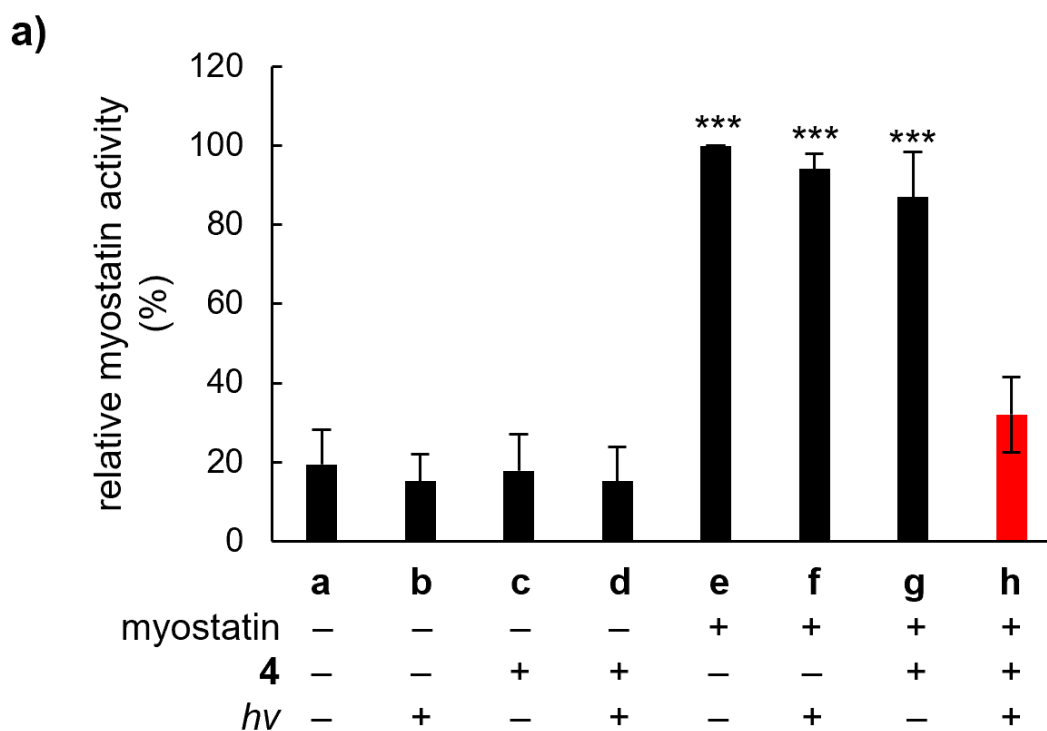


図 17. a) 酸素化マイオスタチンの活性評価、b) ペプチド **1** とコンジュゲート **4** のマイオスタチン阻害効果の比較、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. (a) lane h or (b) lane g by Tukey's test.

第七節 酸素化部位の同定

マイオスタチンにおける酸素化部位の同定を試みた(図 18)。Lys-C の他に trypsin、Glu-C 等の種々のエンドペプチダーゼを用いて、光酸素化後のマイオスタチンを酵素消化した。その後、各フラグメントを MALDI-TOFMS で検出し、酸素化の有無等を解析した。図 18a において、検出されたフラグメントには下線を引き、その中でも酸素化体が検出されたフラグメントを実線、酸素化体が検出されなかったフラグメントを点線で表した。さらに、 $^1\text{O}_2$ は Met、His、Trp と反応することを踏まえると¹⁶⁾、赤色のアミノ酸は確実に酸素化されており、オレンジ色のアミノ酸は酸素化されている可能性がある。そして、図 18b は、それらのアミノ酸残基をマイオスタチンの立体構造 (protein data bank、PDB: 3HH2) に反映したものである。コンジュゲート **4** はマイオスタチンを全体的に酸素化していることが確認された。これは、生成された一重項酸素がある一定の範囲に拡散するためだと考えられる。また、マイオスタチンにおけるアクチビン受容体との推定結合部位 (図 18b、水色で囲った部分) の周辺が酸素化されていた。このことは、コンジュゲート **4** による強力なマイオスタチン不活化の要因となっていると考えられる。

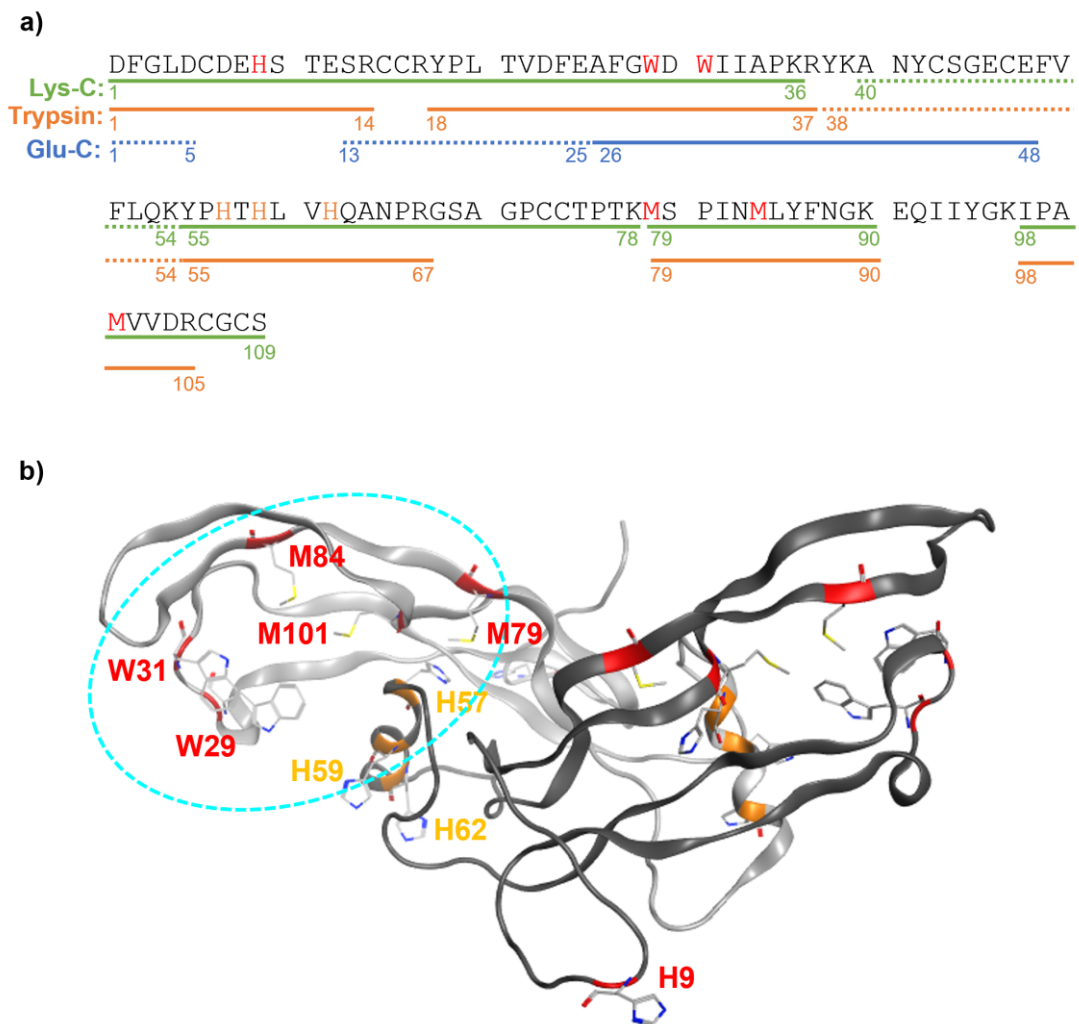


図 18. a) マイオスタチンのアミノ酸配列と種々のエンドペプチダーゼによる酵素消化で得られたフラグメント（実線：酸化されているフラグメント、点線：酸化されていないフラグメント）、b) マイオスタチンの立体構造（赤文字：酸化されているアミノ酸、オレンジ色：酸化されている可能性のあるアミノ酸、水色の円：アクチビン受容体との結合部位）

小括

第一章では、マイオスタチン結合ペプチド **1** と光酸素化触媒 **16a**、**16b** とのコンジュゲート **4** および **5** の合成とその機能評価について述べた。ペプチド **1** の 12 位 Ala 部分へ触媒を導入したコンジュゲート **4** および **5** は、近赤外光 (730 nm) 照射下でマイオスタチンを酸素化した。また、炭素数 4 個ほどのリンカー長の違いはマイオスタチンの酸素化に大きな影響を与えないことが示唆された。一方、コンジュゲート **4** による酸素化は、非特異的な光増感剤である MB と比較して、マイオスタチン選択的であった。そして、光酸素化触媒と類似した蛍光コンジュゲート **4'** を用いた実験によって、マイオスタチンとの結合に伴うコンジュゲート **4** のオン/オフスイッチが機能していると考えられた。さらに、培養細胞を用いたマイオスタチン活性評価の結果から、マイオスタチンは **4** を用いた光酸素化反応によって、従来のペプチド **1** よりも強力に不活化されることが示された。これは、**4** がマイオスタチンを不可逆的かつ触媒的に不活化するためと考えられる。本章で、筆者は、光酸素化反応を利用した選択的マイオスタチン不活化法の実現可能性を示した。これらの結果は、本手法の創薬化学における発展の基盤形成に寄与するものと思われる。

第二章 光酸素化触媒を導入する位置の最適化

序説

第一章において、筆者はマイオスタチン結合ペプチド **1** (図 1a) の 12 位 Ala (Ala12) にオン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **16a** (Scheme 2) を導入したコンジュゲート **4** (図 6) を獲得し、マイオスタチンの選択的な光酸素化による強力な不活化を達成した。そこで、よりマイオスタチン不活化能の高いコンジュゲートの獲得を目的として、ペプチド **1** における触媒導入位置の最適化を行うことにした。以前に、高山らによって報告されたペプチド **1** の Ala スキャン結果に基づき³⁴⁾、筆者は阻害活性に重要でないアミノ酸残基の内、8 位セリン (Ser8) および 16 位グルタミン (Gln16) に着目した。触媒を導入する上で、これらのアミノ酸残基は、先述したペプチド **1** が形成する α -ヘリックスにおいて、マイオスタチン親和性に重要な二つの疎水面に存在しない。そのため、修飾してもマイオスタチン親和性に影響を与えにくいと思われた。加えて、ペプチド両末端への触媒導入も α -ヘリックス傾向の維持への影響が少ないと考えた。以上の理由から、筆者は、Trp1、Ser8、Gln16 および C 末端に光酸素化触媒 **16a** を導入することにし、コンジュゲート **19-22** をデザインした (図 19)。

19: ZRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-NH₂

20: URQNTRYXRIEAIKIQILSKLRL-NH₂

21: URQNTRYSRIEAIKIXILSKLRL-NH₂

22: URQNTRYSRIEAIKIQILSKLRLX-NH₂

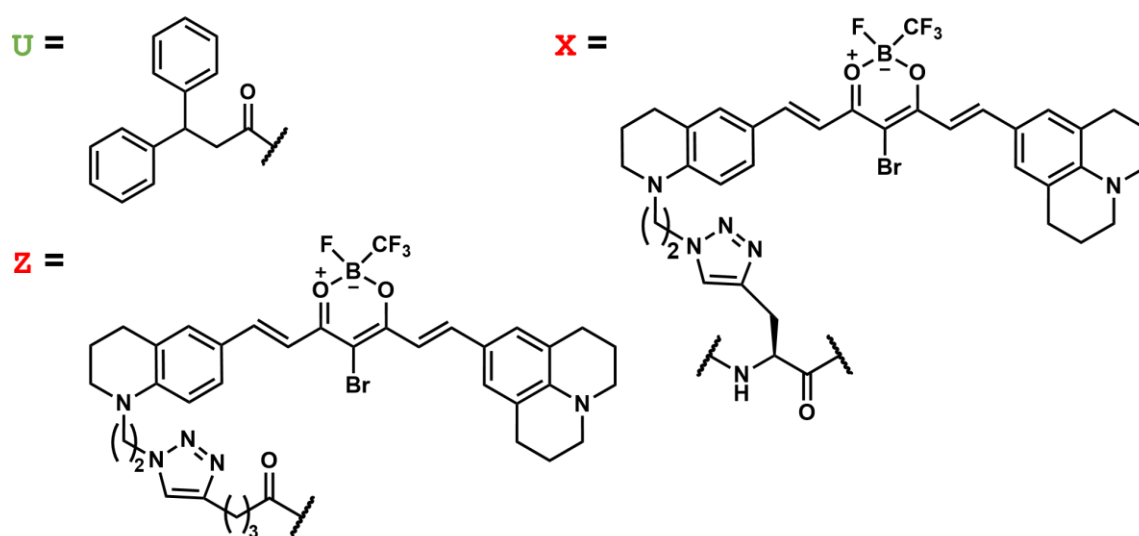
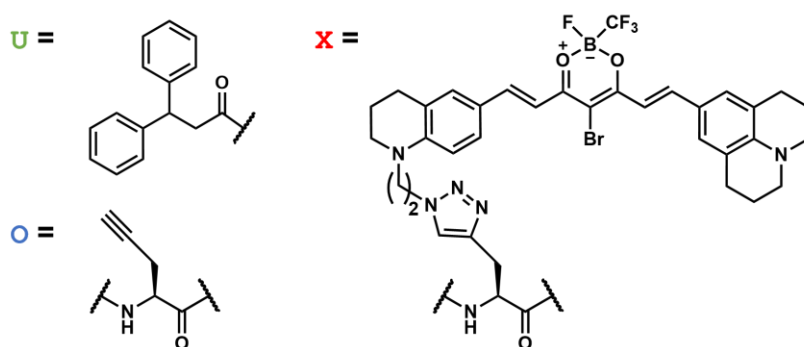
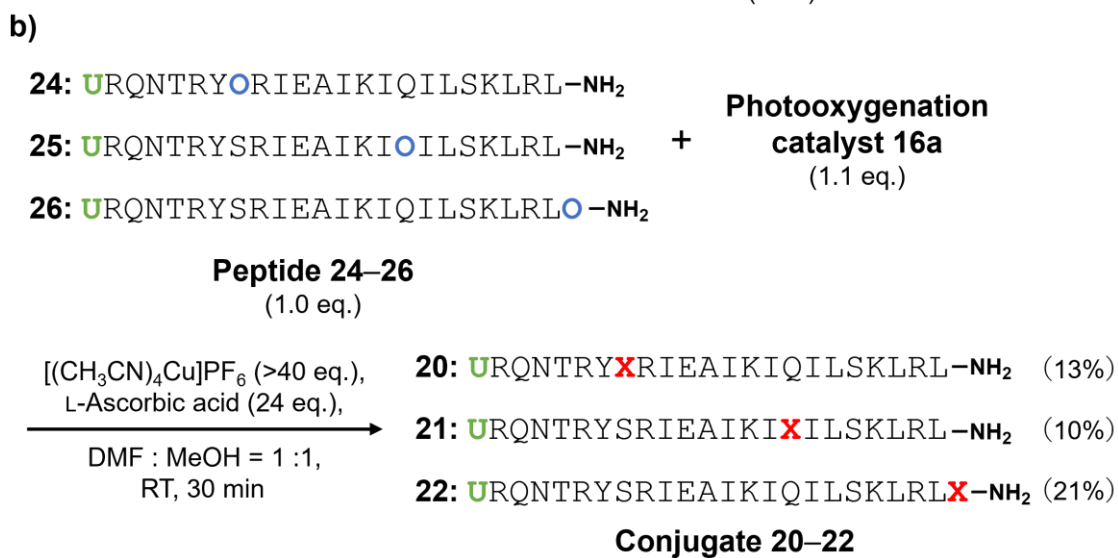
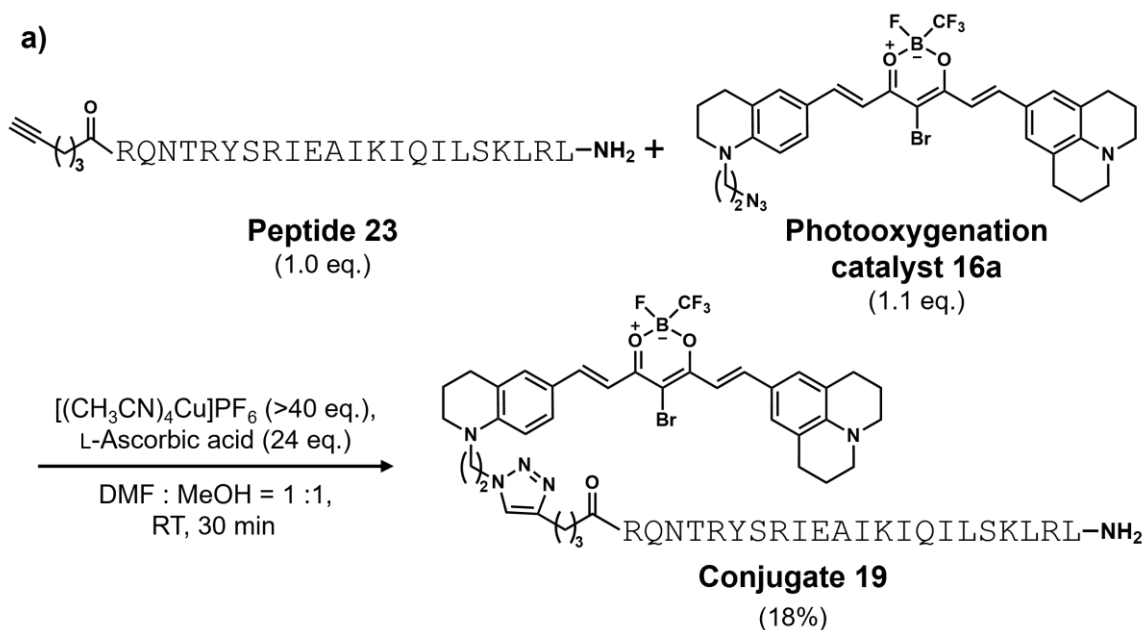


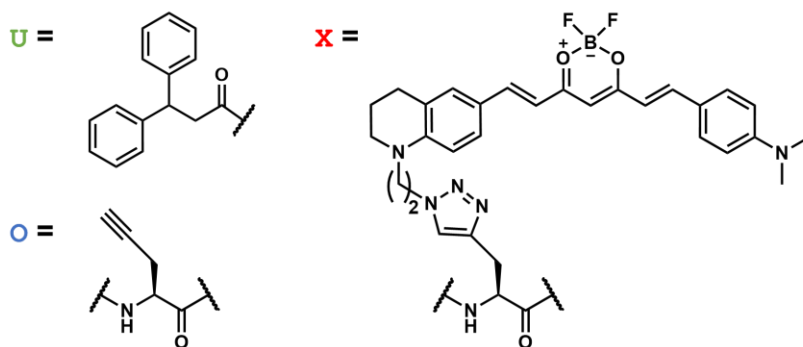
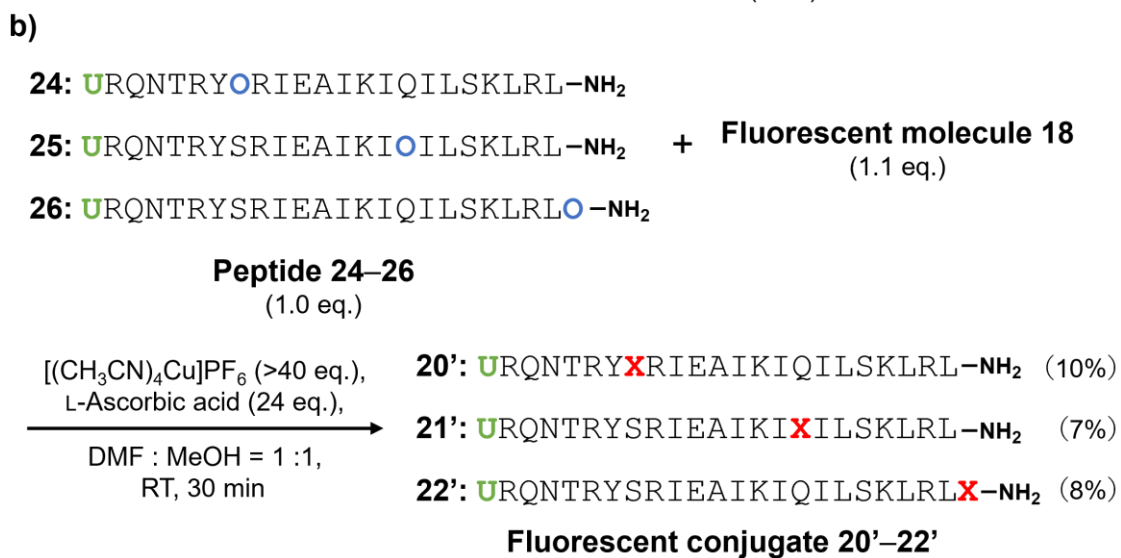
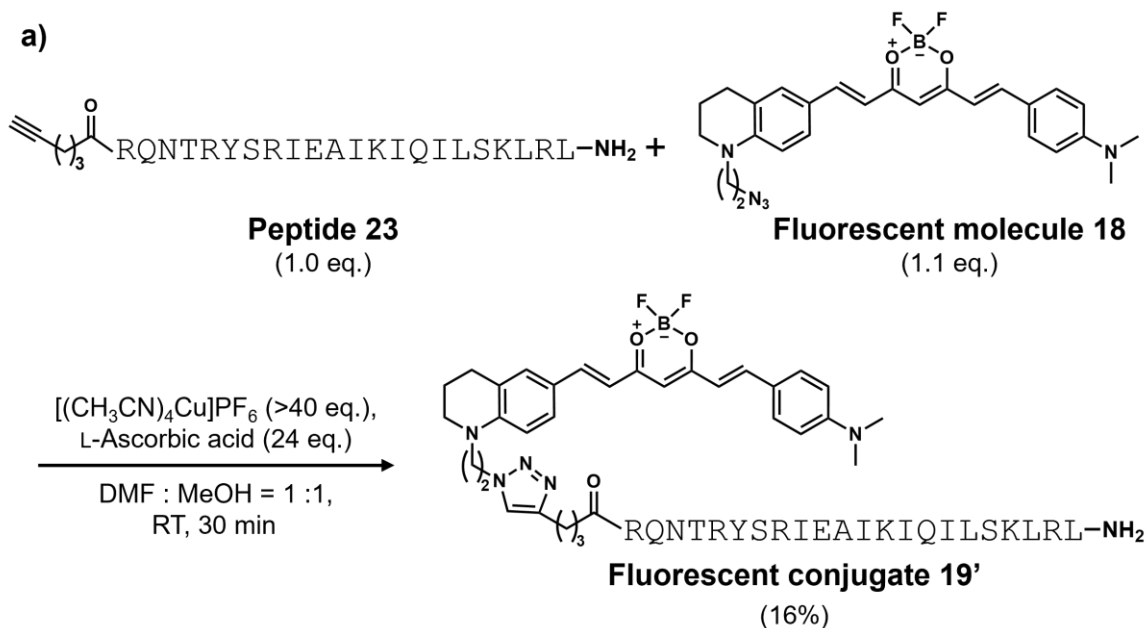
図 19. コンジュゲート 19-22 の構造

第一節 種々のコンジュゲートの合成

ペプチド **8** と同様の方法で Trp1、Ser8、Gln16、C 末端部分にアルキニル基を有するペプチド **23–26** を合成した。獲得したペプチド **23–26** を CuAAC 反応によって、光酸素化触媒 **16a** と架橋し、コンジュゲート **19–22** を新たに得た (Scheme 5)。また別途、それぞれの部位へ蛍光分子 **18** を導入した蛍光コンジュゲート **19'–22'** を合成した (Scheme 6)。



Scheme 5. a) コンジュゲート 19、b) 20–22 の合成



Scheme 6. a) 蛍光コンジュゲート 19', b) 20'–22' の合成

第二節 コンジュゲート 4 および 19-22 の吸収スペクトル

新たに獲得したコンジュゲート 4 および 19-22 の吸収スペクトルを測定した (図 20) 。コンジュゲート 19-22 は 4 と同様の結果を与えた。すなわち、19-22 は組織透過性の高い NIR 光で励起可能であることが示唆された。

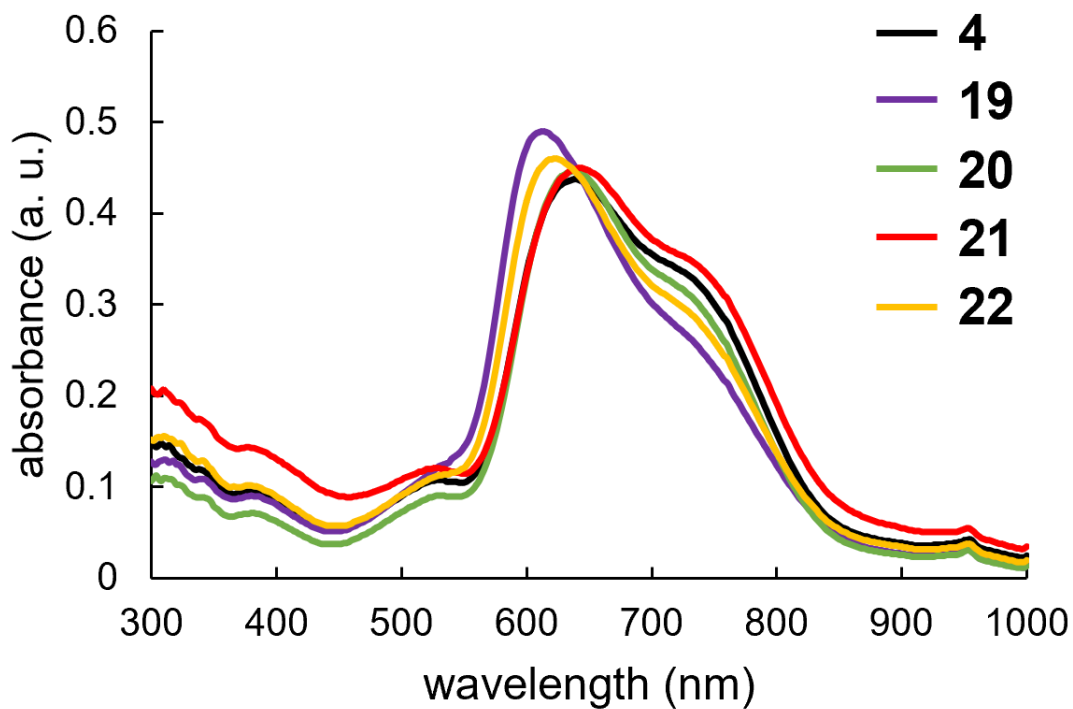


図 20. コンジュゲート 4 および 19-22 の吸収スペクトル

第三節 各コンジュゲートによるマイオスタチンの酸素化

コンジュゲート **4** および **19-22** を用いてマイオスタチンの光酸素化を実施した。マイオスタチン ($1\ \mu\text{M}$) に対し、各コンジュゲート ($4\ \mu\text{M}$) を添加した後、 $730\ \text{nm}$ の光を 15 分間照射した。そして、第一章 第四節と同様に DTT および Lys-C によるフラグメント化処理を行い、それらのフラグメントを MALDI-TOFMS にて検出した (図 21)。コンジュゲート未添加かつ遮光条件 (図 21 上、青色の線) と比較して、コンジュゲート存在下に光照射を実施することで、マイオスタチン 79-90 フラグメントと 55-78 フラグメントにおいて、一酸素化体あるいは二酸素化体が確認された (図 21、黒・紫・緑・赤・黄色の線)。一方、酸素化され得るアミノ酸残基を含まないマイオスタチン 40-54 フラグメントでは、どのコンジュゲートを用いても酸素化体は確認されなかった。このように、全てのコンジュゲート **4** および **19-22** はマイオスタチンを光酸素化することが示された。

また、図 21 の結果から酸素化比 (oxygenation ratio) を算出した (図 22a)。各コンジュゲート間でマイオスタチンの光酸素化能に有意な差はなかったが、16 位に触媒を導入したコンジュゲート **21** の酸素化能は、他のコンジュゲートよりも強い傾向であることが示唆された。

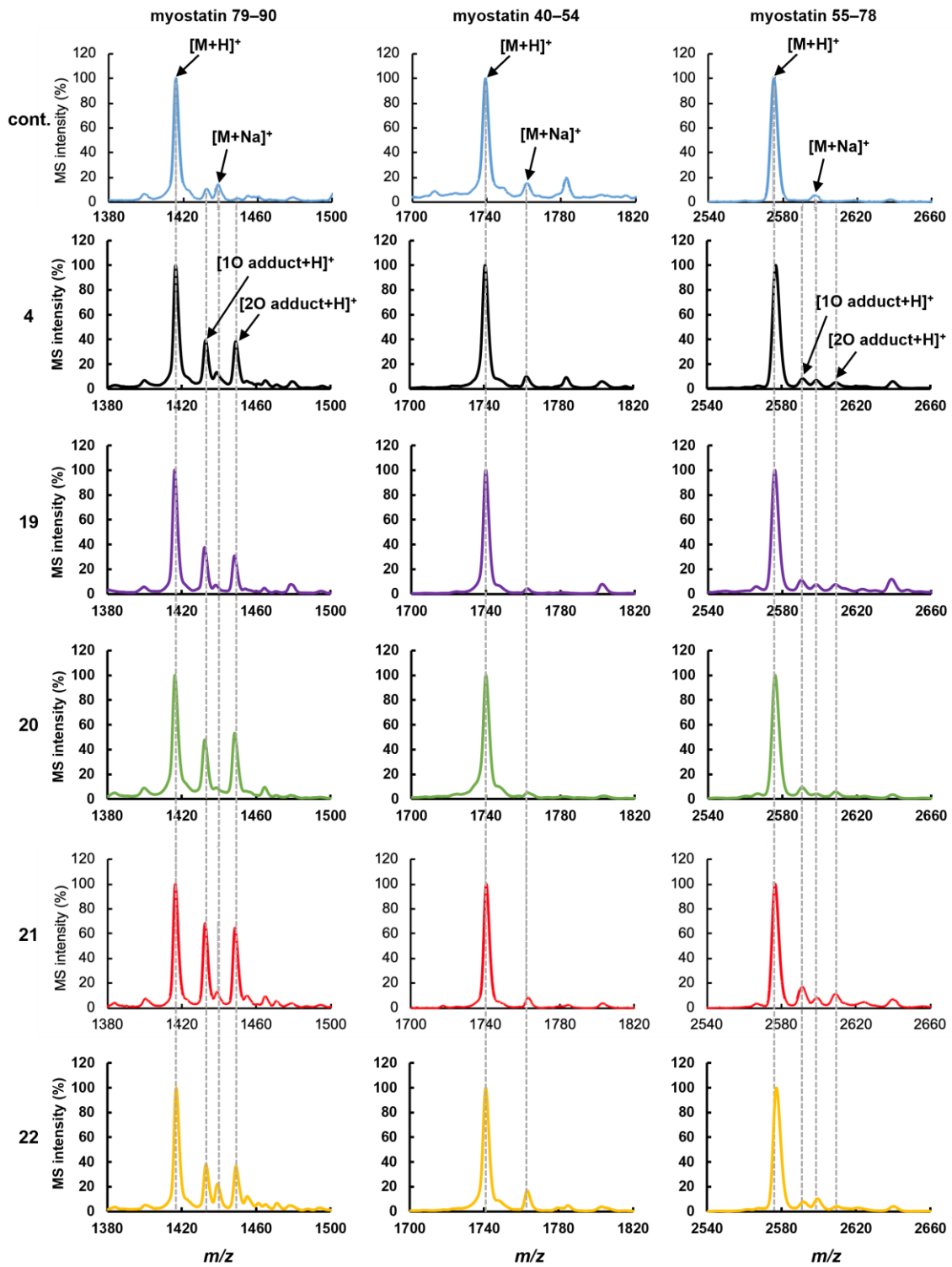


図 21. MALDI-TOF MS による酸化マイオスタチンの各フラグメント検出

第四節 各コンジュゲートのマイオスタチン選択性比較

各コンジュゲートによる光酸素化反応のマイオスタチン選択性を評価した(図 22)。第一章 第四節と同様に、オフターゲットモデルとして、サブスタンス P (SP) およびアミロイド β 1-42 (A β) を、非特異的な光増感剤としてメチレンブルー (MB) を用いた。その結果、各コンジュゲートはマイオスタチンに対して MB と同等の酸素化比を示した一方(図 22a)。しかし、MB と比較して SP および A β の酸素化比が低く、マイオスタチン選択性を有していることが示された(図 22b、c)。一方、ペプチド鎖の末端に触媒を導入したコンジュゲート **19** と **22** は他のコンジュゲートよりも SP に対する酸素化比が高かった(図 22b)。光酸素化触媒は平面性並びに疎水性が高いため、非特異的相互作用を起こしやすい。**19** と **22** ではオフターゲットがアクセスしやすいペプチド末端に触媒を導入したため、触媒自身の非特異的相互作用が顕著に現れた可能性がある。

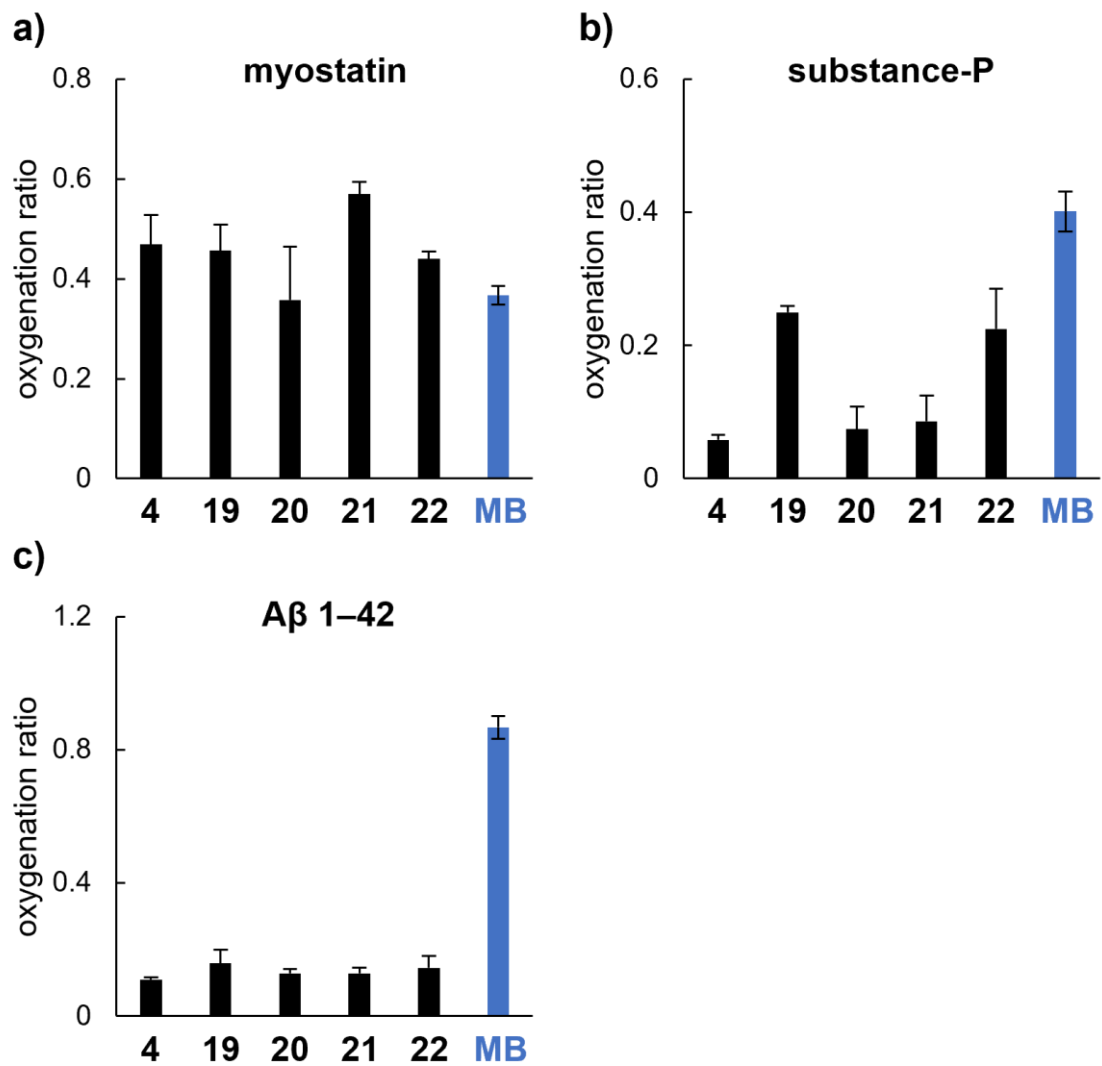


図 22. コンジュゲート 4 および 19-22 のマイオスタチン選択性、a) マイオスタチンの酸素化比、b) SP の酸素化比、c) Aβ の酸素化比

第五節 各コンジュゲートのオン/オフスイッチ機能評価

蛍光コンジュゲート **4'** および **19'-22'** を用いて、コンジュゲートにおけるオン/オフスイッチ機能の評価を行った (図 23)。各蛍光コンジュゲート ($2\ \mu\text{M}$) に対して、マイオスタチンあるいは **SP** ($0.5\ \mu\text{M}$) を添加した時の蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 626\ \text{nm}$) を測定した (図 23a)。その結果、各蛍光コンジュゲートの蛍光強度はマイオスタチン添加によって増加した。また、その増加量は **SP** 添加による蛍光強度の増加量と比較して、遥かに大きかった。本結果から、蛍光コンジュゲート **4'** および **19'-22'** は、マイオスタチンとの結合によってオン状態となったことが示唆された。すなわち、蛍光コンジュゲートと構造の類似した触媒コンジュゲート **19-22** も同様にオン/オフスイッチ機能を有していると考えられる。さらに、蛍光コンジュゲート **4'** および **19'-22'** を用いて見かけの K_D 値を算出した (図 23b)。その結果、各コンジュゲート間で K_D 値に大きな差はなかったが、蛍光コンジュゲート **19'** および **22'** は他のコンジュゲートと比較して K_D 値が低かった ($K_D = \mathbf{19'} : 0.68 \pm 0.30\ \mu\text{M}$, $\mathbf{22'} : 0.85 \pm 0.32\ \mu\text{M}$)。これは、ペプチド末端に導入した蛍光分子がペプチドのマイオスタチン親和性に影響を与えなかったため、ペプチド部分のマイオスタチン親和性が維持されたと考えられる。

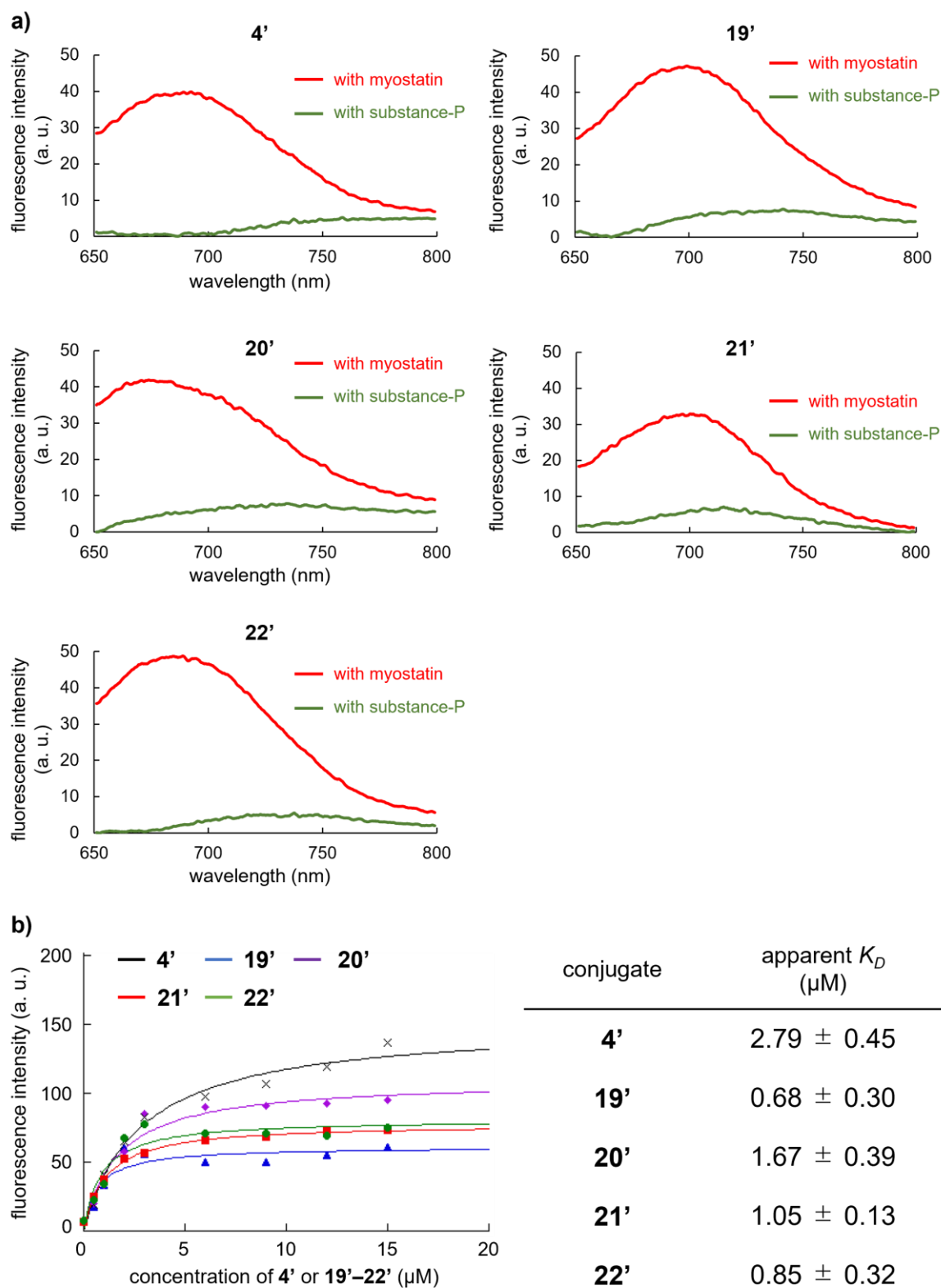


図 23. コンジュゲートのオン/オフスイッチ機能評価、a) マイオスタチンあるいは SP を添加した時の蛍光強度の増加、b) 見かけの K_D 値の算出

第六節 各コンジュゲートによるマイオスタチンの不活化

各コンジュゲート **4** および **19–22** の光酸素化反応によるマイオスタチンの不活化を評価した。第一章 第六節と同様に、マイオスタチン (0.6 nM) に対し、コンジュゲート **4** および **19–22** (1 nM) を添加した後、30 分間の光照射 (730 nm) を行い、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて相対的マイオスタチン活性 (relative myostatin activity) を測定した (図 24)。その結果、各コンジュゲートを用いた処理によって、マイオスタチンの活性は減弱した (図 24a)。特に、ペプチド鎖の 16 位に触媒を導入したコンジュゲート **21** は、他のコンジュゲートよりもマイオスタチン不活化能が強い傾向を示した (図 24a、レーン e)。この結果は、前述の光酸素化評価 (第三節) において、**21** が他のコンジュゲートより強いマイオスタチン酸素化能を示したことに一致した。そこで、**21** を用いて、種々の条件下におけるマイオスタチンの不活化を評価した (図 24b)。マイオスタチンは、**21** の存在下、光照射により不活化された (図 24b、レーン f)。これは、**21** が光酸素化反応によってマイオスタチン活性を阻害したことを示す。さらに、コンジュゲート **4** と **21** の濃度依存的なマイオスタチン阻害能を評価し、 IC_{50} 値を算出した (図 24c)。コンジュゲート **21** は、**4** と比較して、マイオスタチンの不活化能が約 2 倍程度向上したことが示された ($IC_{50} = \mathbf{4} : 3.9 \pm 0.4 \text{ nM}$ 、 $\mathbf{21} : 2.1 \pm 0.5 \text{ nM}$)。したがって、**21** は触媒導入位置の最適化を達成したコンジュゲートだと言える。また、従来のペプチド **1** (図 1a) の IC_{50} は $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ³⁶⁾ であるため、**21** のマイオスタチン阻害効果は **1** よりも約 1500 倍以上向上したことが確認された。これは、光酸素化反応を利用してマイオスタチンを不可逆的かつ触媒的に不活化できたためと考えられる。加えて、マイオスタチンの内因性阻害因子で、243 残基からなるポリペプチドの二量体であるプロドメインタンパク質の IC_{50} 値は $2.5 \pm 0.3 \text{ nM}$ であった。すなわち、**21** は 22 残基のアミノ酸からなるペプチドであるにも関わらず、タンパク質性の阻害剤であるプロドメインタンパク質よりもマイオスタチンを効率的に阻害した。リガンド分子に光酸素化能を付与することで、その阻害効果を飛躍的に向上させる本手法の有効性が示されたと言える。

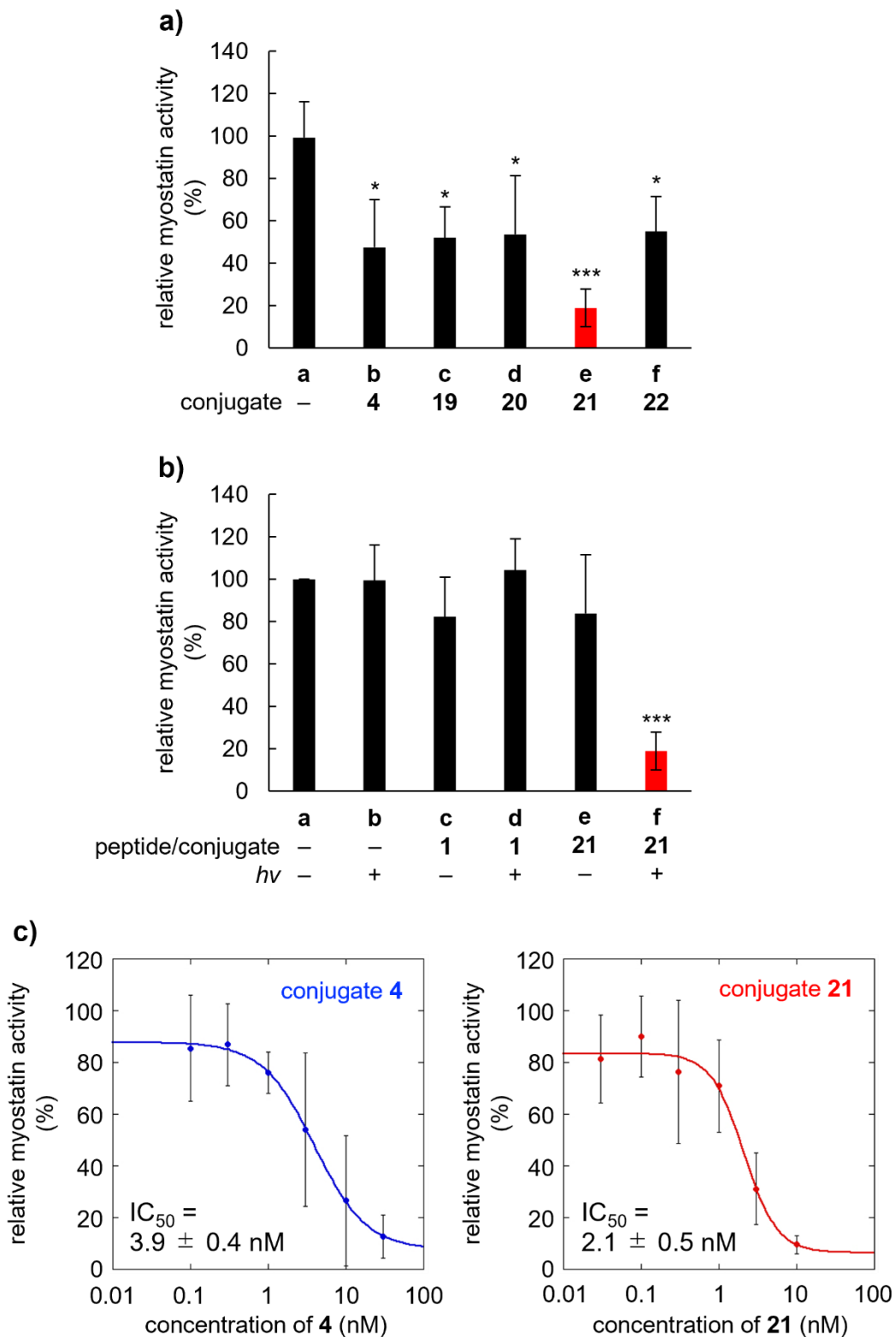


図 24. コンジュゲート **4** および **23–26** を用いたマイオスタチンの不活化、a) **4**, **19–22** のマイオスタチン不活化能比較、b) ペプチド **1** とコンジュゲート **21** の比較、c) **4** および **21** の濃度依存的なマイオスタチン不活化、* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. lane a by Tukey's test.

第七節 コンジュゲートの細胞毒性評価

コンジュゲート **4** および **19-22** の細胞毒性評価を WST-1 アッセイにて実施した (図 25)。96 ウェルプレートへ 20000 cells/well となるように HEK-293 細胞を播種し、37 °C で 48 時間インキュベートした。その後、各コンジュゲートあるいは MB (3 μM) を添加し、15 分間の光照射 (730 nm) を行った。24 時間後、WST-1 を添加し、生成されるホルマザン色素の吸光度を測定し、相対的な細胞生存比 (relative cell viability) を算出した。各コンジュゲートは、遮光条件下において細胞毒性を示さなかった (図 25、黒いバー)。一方、光照射条件では、MB は有意な光毒性を示したのに対して、各コンジュゲートは光毒性を示さなかった (白いバー)。すなわち、コンジュゲート **4** および **19-22** は、マイオスタチン不活化能が見られた濃度 (1 nM、第六節) より高濃度 (3 μM) において、細胞毒性および光毒性を示さなかったことから、有効濃度と毒性濃度の差が極めて大きいと言える。すなわち、コンジュゲートは生体で利用する上で安全域が広いことが示唆された。このようなコンジュゲートの低い細胞毒性は、ペプチド部位のマイオスタチン親和性および触媒部位のオン/オフスイッチ機能に伴う、高いマイオスタチン選択性に起因すると考えられる。

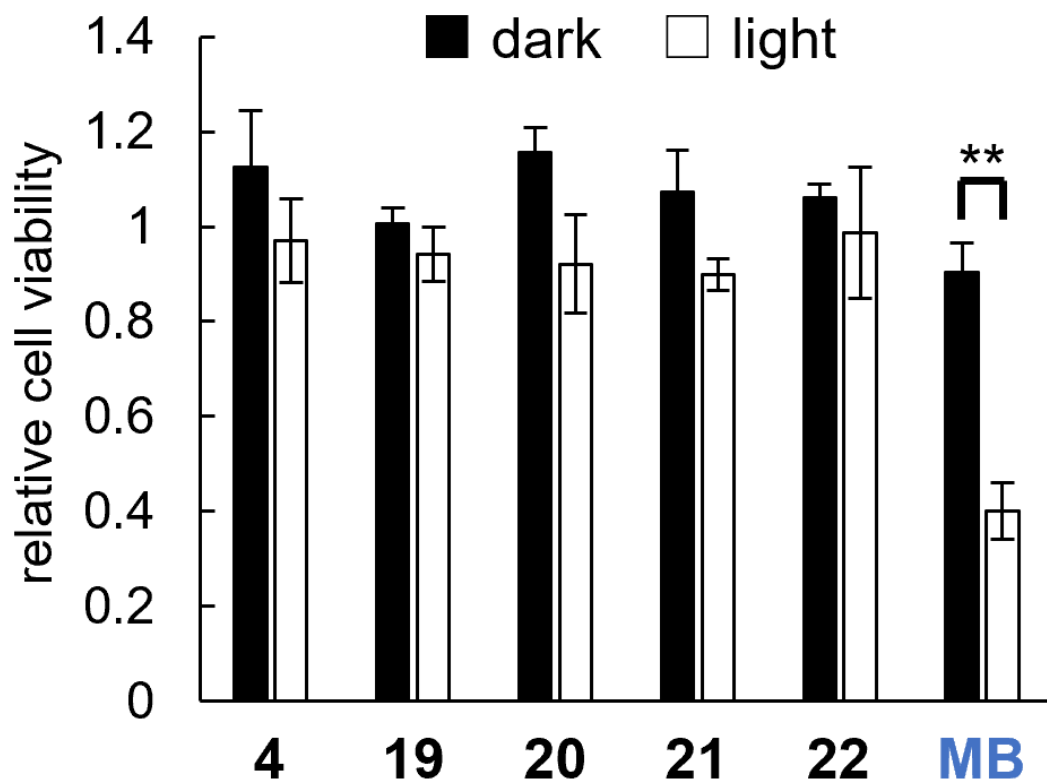


図 25. コンジュゲート 4 および 19–22 の細胞毒性および光毒性（黒いバー：遮光条件、白いバー：光照射条件）、** $p < 0.01$ by Student's *t*-test

小括

第二章では、触媒導入位置の最適化を目的として、ペプチド鎖上の異なる位置（1位、8位、16位、C末端）に光酸化触媒を有するコンジュゲート **19–22** を新たに合成した。これら全てのコンジュゲートは、**4** と同様に近赤外光照射下でマイオスタチンを選択的に酸素化し、不活化した。一方で、触媒導入位置によって選択性が低下する可能性があることも示唆された。中でも、16位に触媒を導入したコンジュゲート **21** は他のコンジュゲートよりもマイオスタチン光酸化能および不活化能が強い傾向にあった。**21** のマイオスタチン阻害効果 ($IC_{50} = 2.1 \pm 0.5 \text{ nM}$) は、12位に触媒を導入したコンジュゲート **4** よりも約2倍程度強力であった。この阻害効果は、触媒部位を持たないペプチド **1** よりも1500倍以上強力であり、さらに内因性マイオスタチン阻害因子である高分子のプロドメインタンパク質に匹敵するものだった。また、コンジュゲート **4** および **19–22** は、有意な細胞毒性および光毒性を示さなかった。これは、ペプチド部位のマイオスタチン親和性と触媒部位のオン/オフスイッチ機能による良好な標的選択性に起因するものと考えられる。以上の結果から、筆者は触媒導入位置の最適化によって、より優れたペプチド–触媒コンジュゲートの獲得を達成した。

第三章 酵素分解耐性型コンジュゲートの獲得

序説

第二章では、ペプチドにおける光酸素化触媒の導入位置を検討し、不活化能の高いコンジュゲート **21** (図 19) を獲得した。しかしながら、**21** のペプチド部分はほとんど天然型の L-アミノ酸からなるため、生体内で酵素分解を受けやすい可能性がある。酵素によってペプチド部位が分解されると、マイオスタチン親和性が低下すると考えられる。これは、コンジュゲートのマイオスタチン選択性の低下を引き起こすため、生体応用に適していない可能性があった。一方、最近、高山らはマイオスタチン結合ペプチドの SAR 研究によりペプチドの短鎖化に成功し³⁸⁾、16 残基の MID-35 を獲得した (図 26 一番上)³⁹⁾。この MID-35 は全て D-アミノ酸で構成されたペプチドのため、酵素分解に対して非常に高い耐性を示した³⁹⁾。そこで、MID-35 と光酸素化触媒を架橋することで、酵素によって分解されにくいコンジュゲートの創製が可能であると考えた (図 26)。

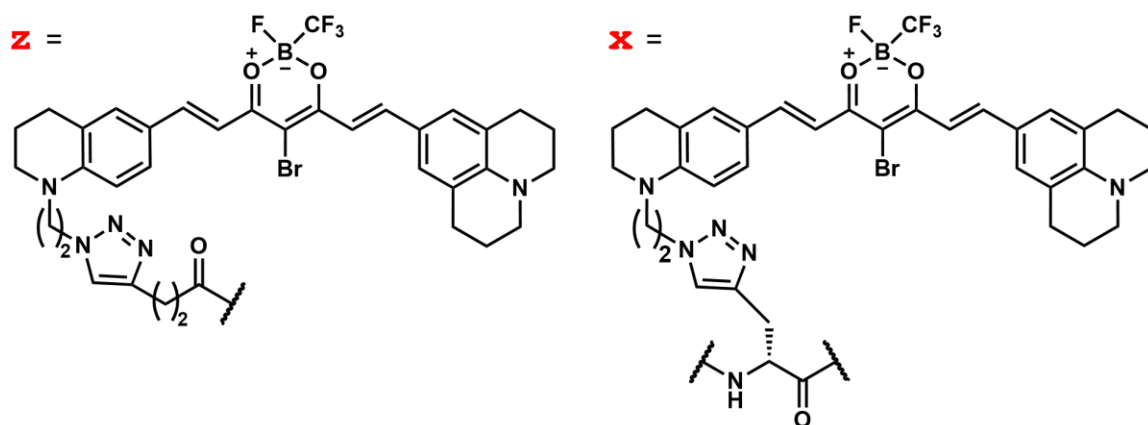
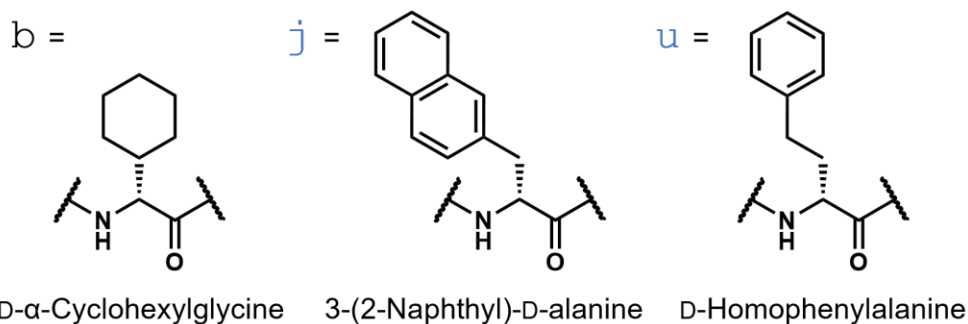
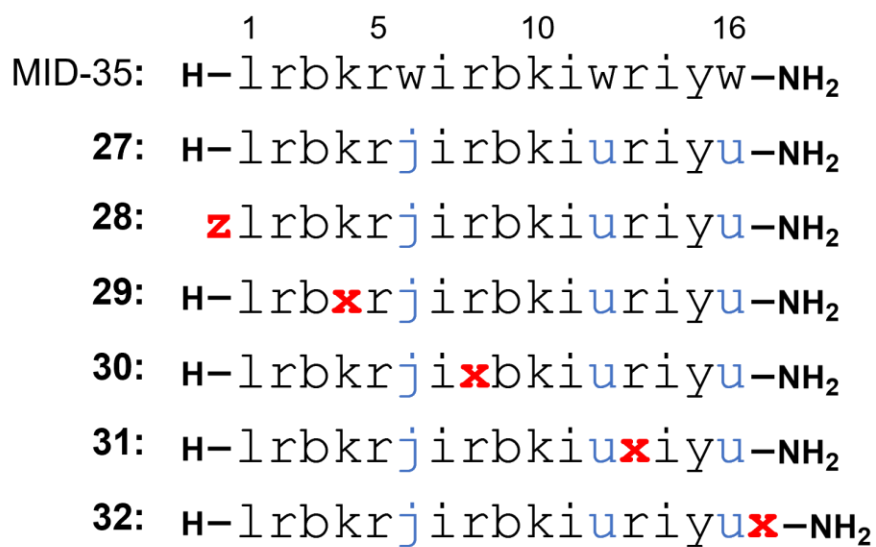


図 26. MID-35 およびその誘導体 27、D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の構造

第一節 光酸素化反応に適応可能な MID-35 誘導体の獲得

MID-35 の 6 位、12 位、16 位には、酸素化され得る D-Trp 残基が含まれるため、光酸素化によって自己酸素化される可能性がある。そのため、以前得られた短鎖化したマイオスタチン結合ペプチドの SAR 研究における知見³⁸⁾を基に 6 位には 3-(2-naphthyl)-D-alanine、12 および 16 位には D-homophenylalanine を置換したペプチド **27** を合成した (図 26)。なお、本合成は通常の Fmoc 固相合成法で行った。そして、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって、**27** のマイオスタチン阻害活性を評価した (図 27)。ペプチド **27** は MID-35 に匹敵するマイオスタチン阻害活性を有していたため、マイオスタチン親和性を有することが示唆された。よって、**27** を基盤として、D-ペプチド-光酸素化触媒コンジュゲートをデザインすることにした。

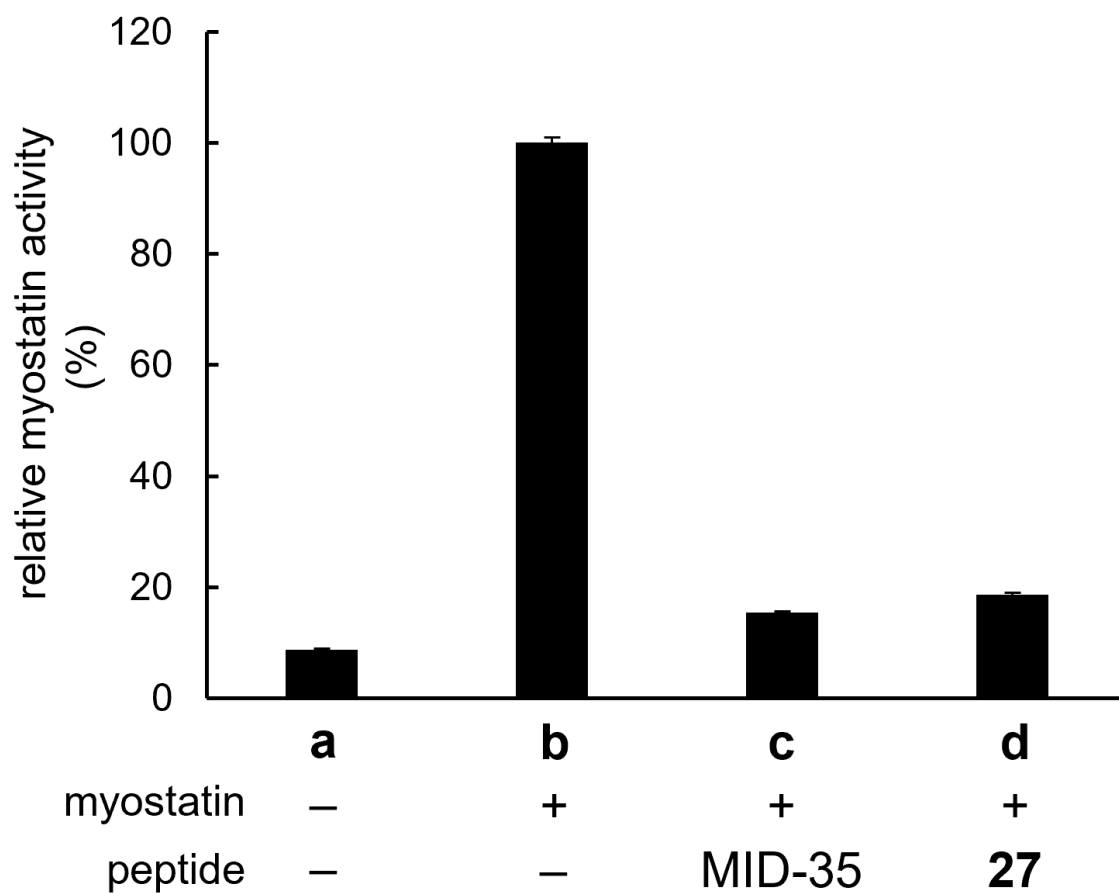
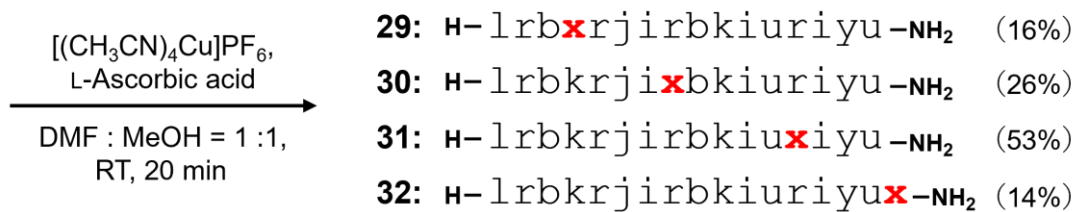
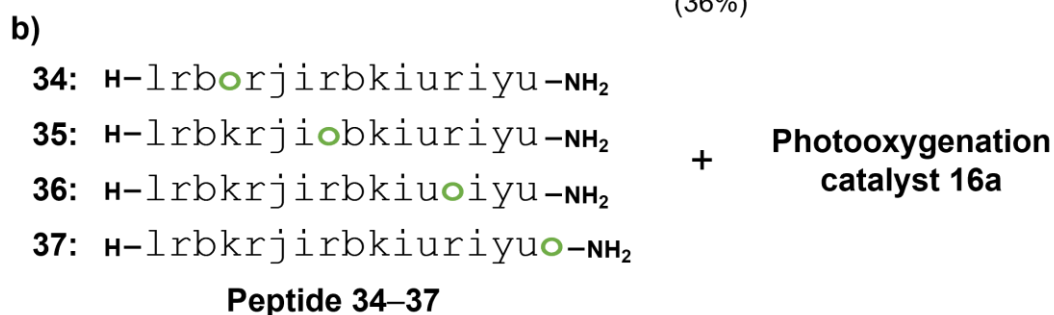
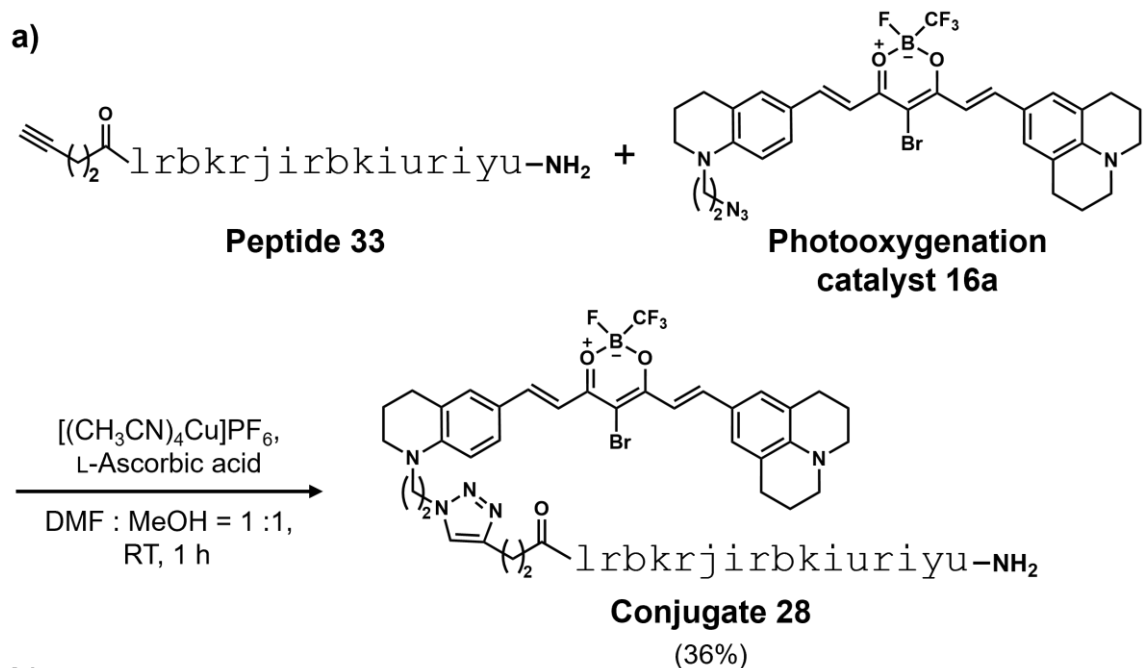


図 27. MID-35 とペプチド 27 のマイオスタチン阻害活性

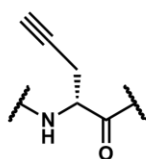
第二節 酵素耐性型コンジュゲートの合成

第二章にて、コンジュゲートにおける触媒導入位置によってマイオスタチン不活性化および選択性に違いが見られたことから、D-ペプチド **27** のどこに触媒を導入するかを検討する必要がある。まず、マイオスタチン結合ペプチドの疎水性アミノ酸は、マイオスタチン阻害活性に重要である^{34, 35}。一方、MID-35 の 4 位リジン (Lys) や 8 位および 13 位のアルギニン (Arg) は、水溶性向上を目的に用いられたアミノ酸残基で、マイオスタチン阻害活性に重要ではなく、他のアミノ酸に置換可能である³⁹。次に、ペプチド末端の N 末端、C 末端もマイオスタチン親和性に影響することなく、触媒を導入することが可能であると考えられる。以上を基に、筆者は、ペプチド **27** の N 末端、4 位、8 位、13 位、C 末端に触媒を導入することとした。そして、通常の Fmoc 固相合成法を用いて、N 末端には 4-pentynoic acid を、その他の部位には D-propargyl glycine を縮合して、アルキニル基を有するペプチド **33–37** を合成した。その後、コンジュゲート **4** と同様に CuAAC 反応に附すことで、D-ペプチドコンジュゲート **28–32** を獲得した (Scheme 7)。

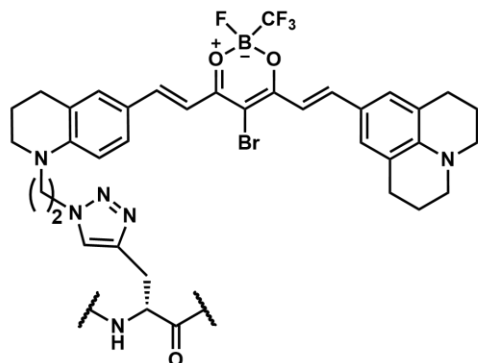


b = D- α -Cyclohexylglycine
 j = 3-(2-Naphthyl)-D-alanine
 u = D-Homophenylalanine

o =



x =



Scheme 7. a) D-ペプチドコンジュゲート 28、b) 29–32 の合成

第三節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の吸収スペクトル

獲得した D-ペプチドコンジュゲート **28-32** の吸収スペクトルを測定した (図 28)。その結果、**28-32** の最大吸収波長 (λ_{\max}) は、およそ 650 nm であった。加えて、600-800 nm に吸収を示したことから、**28-32** は NIR 光 (730 nm) で励起可能であることが示唆された。

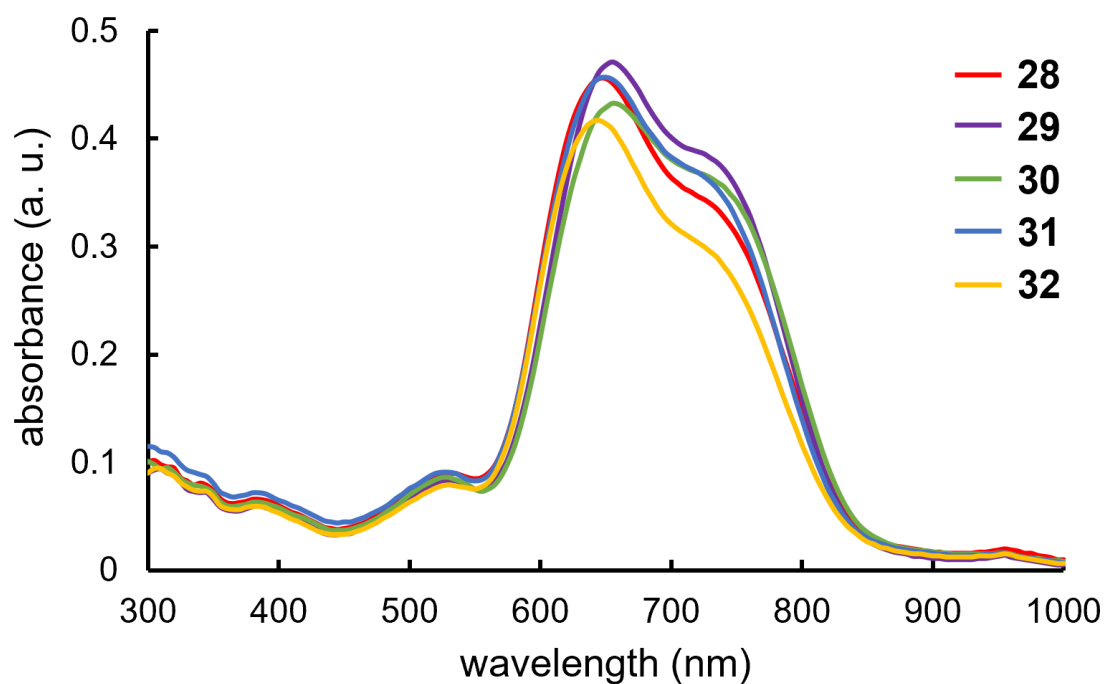


図 28. D-ペプチドコンジュゲート **28-32** の吸収スペクトル

第四節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 によるマイオスタチンの光酸素化

D-ペプチドコンジュゲート **28-32** を用いてマイオスタチンの光酸素化反応を行った (図 29)。マイオスタチン (1 μM) と **28-32** (3 μM) の共存下、730 nm の光を 30 分間照射した。そして、第一章 第四節と同様、DTT によるジスルフィド結合の開裂および Lys-C エンドペプチダーゼによるフラグメント化を行い、そのフラグメントを MALDI-TOFMS にて検出した。その結果、コンジュゲート未添加かつ光を照射していない場合 (図 29、一番上、青色の線) には、各フラグメントで酸素化体は検出されなかった。一方、コンジュゲートを添加し、光照射を行った場合には、酸素化され得るアミノ酸を含むマイオスタチン 79-90 および 55-78 フラグメントの酸素化体が確認された (赤、黒、紫、緑、黄の線)。このことから、マイオスタチンは、光照射下、コンジュゲート **28-32** によって酸素化されたことが示された。

また、図 29 から算出された D-ペプチドコンジュゲート **28-32** のマイオスタチン酸素化比は、L-ペプチドコンジュゲート **21** と同程度であり、強い酸素化能を有することが示唆された (図 30a)。さらに、各コンジュゲート間でマイオスタチンの酸素化能に大きな差はないことが確認された。

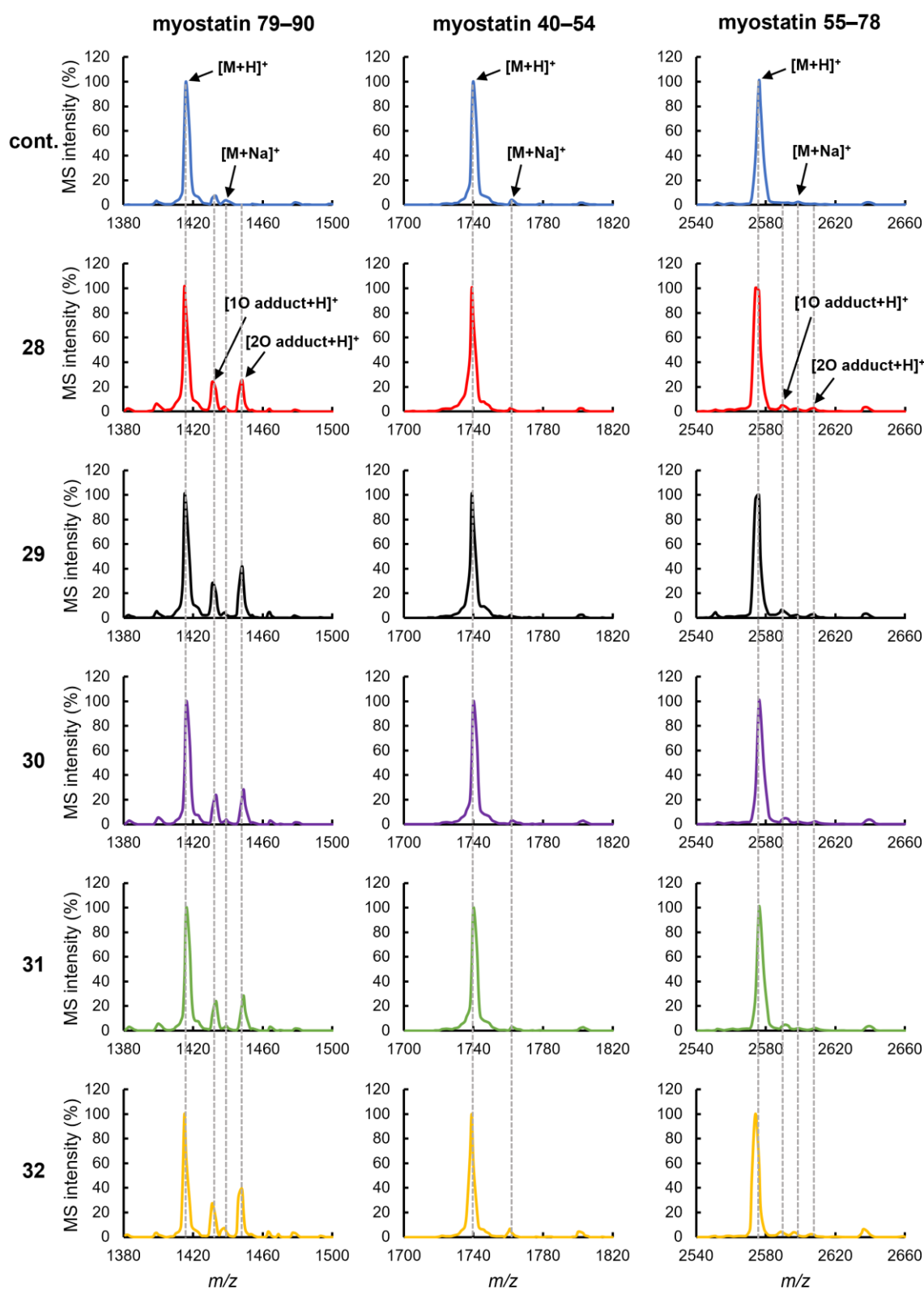


図 29. D-ペプチドコンジュゲート **28–32** を用いたマイオスタチンを酸素化した後の MALDI-TOF MS による各フラグメントの検出 (一番上、青色の線: コントロール条件)

第五節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 のマイオスタチン選択性評価

マイオスタチンおよびアミロイド β 1-42 ($A\beta$) を用いて、28-32 による光酸素化反応のマイオスタチン選択性を評価した。また、コントロールとして L-ペプチドコンジュゲート 21 およびメチレンブルー (MB) を用いた。21 および 28-32 ($3\ \mu\text{M}$) あるいは MB ($1\ \mu\text{M}$) をマイオスタチン ($1\ \mu\text{M}$) または $A\beta$ ($20\ \mu\text{M}$) に添加し、30 分間の光照射を行い、第一章 第四節と同様にそれぞれ MALDI-TOFMS にて検出した。得られた結果から、酸素化比 (oxygenation ratio) を算出した (図 30)。その結果、MB と比較して、マイオスタチンの酸素化比は同程度であった (図 30a)。一方、 $A\beta$ の酸素化比は遥かに低かった (図 30b)。このことから、各コンジュゲートは比較的高いマイオスタチン選択性を有していることが示唆された。

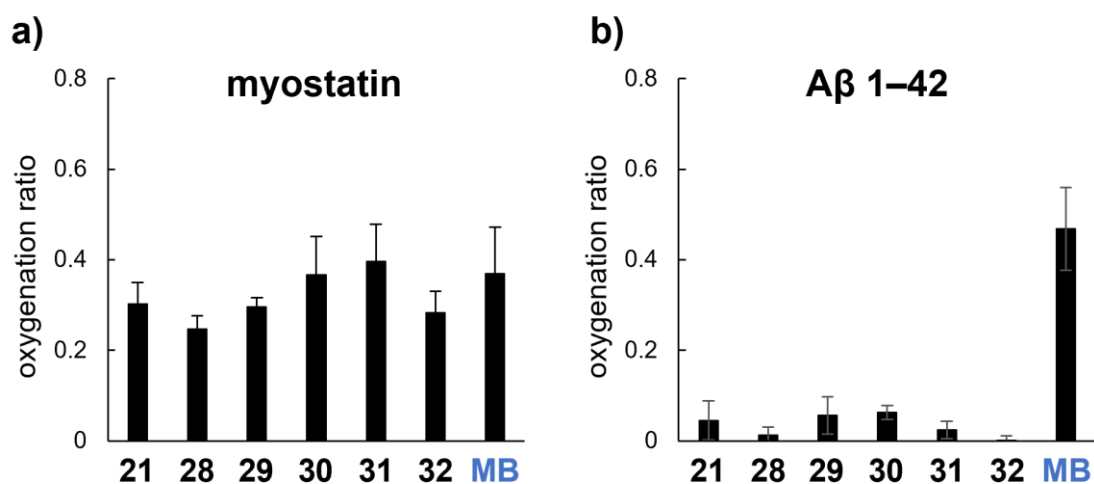


図 30. コンジュゲート 21 および 28-32 を用いたマイオスタチン選択的光酸素化、a) マイオスタチンの酸素化、b) $A\beta$ 1-42 の酸素化

第六節 D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の細胞毒性評価

D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の細胞毒性を第二章 第七節と同様の WST-1 アッセイにて評価した (図 31)。HEK-293 細胞 (20000 cells/well) を播種した 96 ウェルプレート を 37 °C で 48 時間インキュベートした。その後、コンジュゲート 28-32 (3 μ M) を添加し、30 分間の光照射 (730 nm) を行った。そして、37 °C で 24 時間インキュベートした後に、WST-1 を添加し、吸光度を測定した。得られた吸光度から、相対的細胞生存率 (relative cell viability) を算出した。その結果、黒いバーで表された遮光条件 (図 31、dark) において、28-32 は細胞毒性を示さなかった。このことから、28-32 は 3 μ M という高濃度条件においても細胞毒性を持たないことが確認された。白いバーで表された光照射条件 (light) においても 28-32 は細胞毒性を示さなかったが、MB では有意に細胞生存率が低下した。すなわち、28-32 は MB と比較して光毒性を有さないと言える。この低い細胞毒性・光毒性は、28-32 の高い標的選択性に起因するものと考えられる。

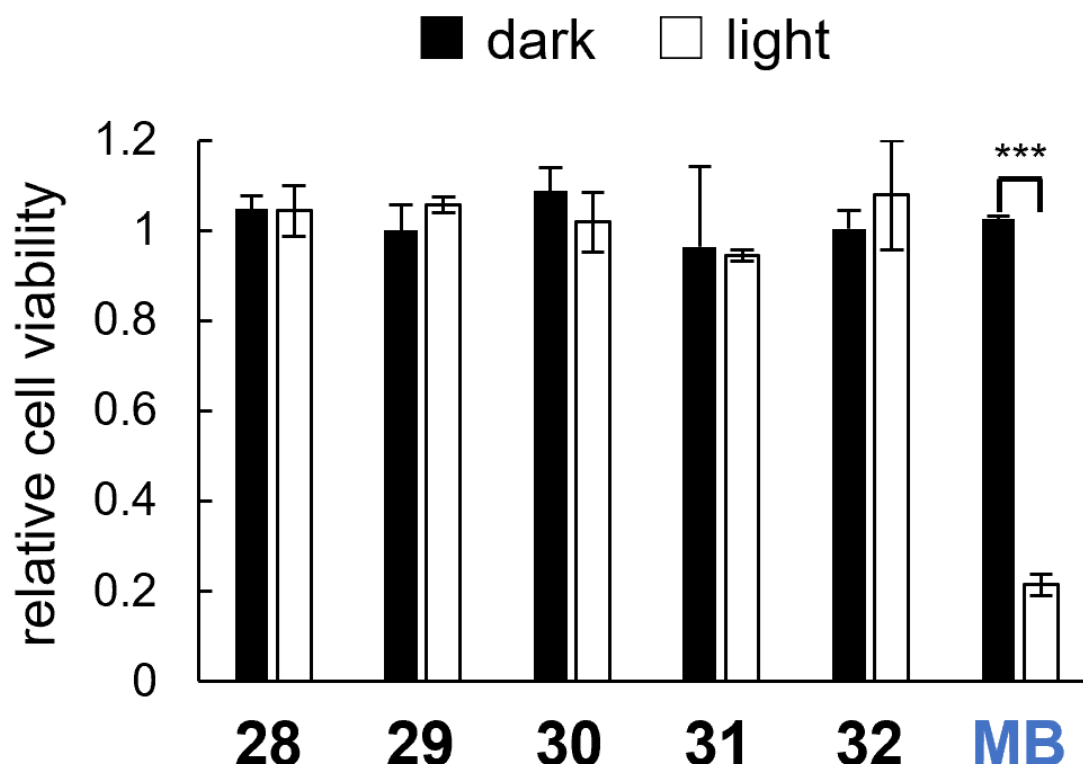


図 31. D-ペプチドコンジュゲート 28-32 の細胞毒性および光毒性 (黒いバー：遮光条件、白いバー：光照射条件)、*** $p < 0.001$ by Student's t -test

第七節 D-ペプチドコンジュゲート **28-32** を用いた光酸素化によるマイオスタチン不活化評価および IC_{50} 値の算出

D-ペプチドコンジュゲート **28-32** の酸素化反応によるマイオスタチン不活化能を第二章 第六節と同様のルシフェラーゼレポーターアッセイにて評価した (図 32)。マイオスタチン (0.6 nM) と **28-32** (3 nM) の共存下、30 分間 730 nm の光を照射した。マイオスタチンの生物活性 (relative myostatin activity) は、光照射下での **28-32** の添加で低下した (図 32a)。本結果より、**28-32** はマイオスタチン不活化能を有することが確認されたが、その不活化能に有意な差は見られなかった。しかし、N 末端に触媒を導入したコンジュゲート **28** は他のコンジュゲートよりもマイオスタチンを強く不活化する傾向にあったため (図 32a、レーン b)、**28** に着目し、以降の実験を行うことにした。

次に、コンジュゲート **28** と触媒を持たない D-ペプチド **27** を用いて、種々の条件におけるマイオスタチン活性を測定した (図 32b)。その結果、マイオスタチンの生物活性は **28** (3 nM) を添加し、かつ光照射した場合 (レーン f) に有意に低下したが、遮光条件 (レーン e) では低下しなかった。このことから、マイオスタチンの不活化は、コンジュゲート **28** の光酸素化反応に起因することが示唆された。一方、**27** (3 nM) の添加では、遮光条件 (レーン c) および光照射下 (レーン d) においても有意なマイオスタチン活性の低下が確認されなかった。以上の結果より、**28** は光酸素化反応によって、触媒を持たない **27** よりも強力なマイオスタチン阻害効果を発揮することが示唆された。

また、**28** の濃度依存的なマイオスタチン不活化を評価することで、 IC_{50} 値を算出した (図 32c)。結果として、**28** の IC_{50} 値は 0.89 ± 0.1 nM であった。これは、第二章 第六節で算出された L-ペプチドコンジュゲート **21** の IC_{50} 値 (2.1 ± 0.5 nM) と比較して、**28** のマイオスタチン不活化能が二倍以上強力であることを示す。このことから、**28** は 16 残基のペプチドでありながら、23 残基のペプチドに匹敵するマイオスタチン不活化能を有することが示唆された。

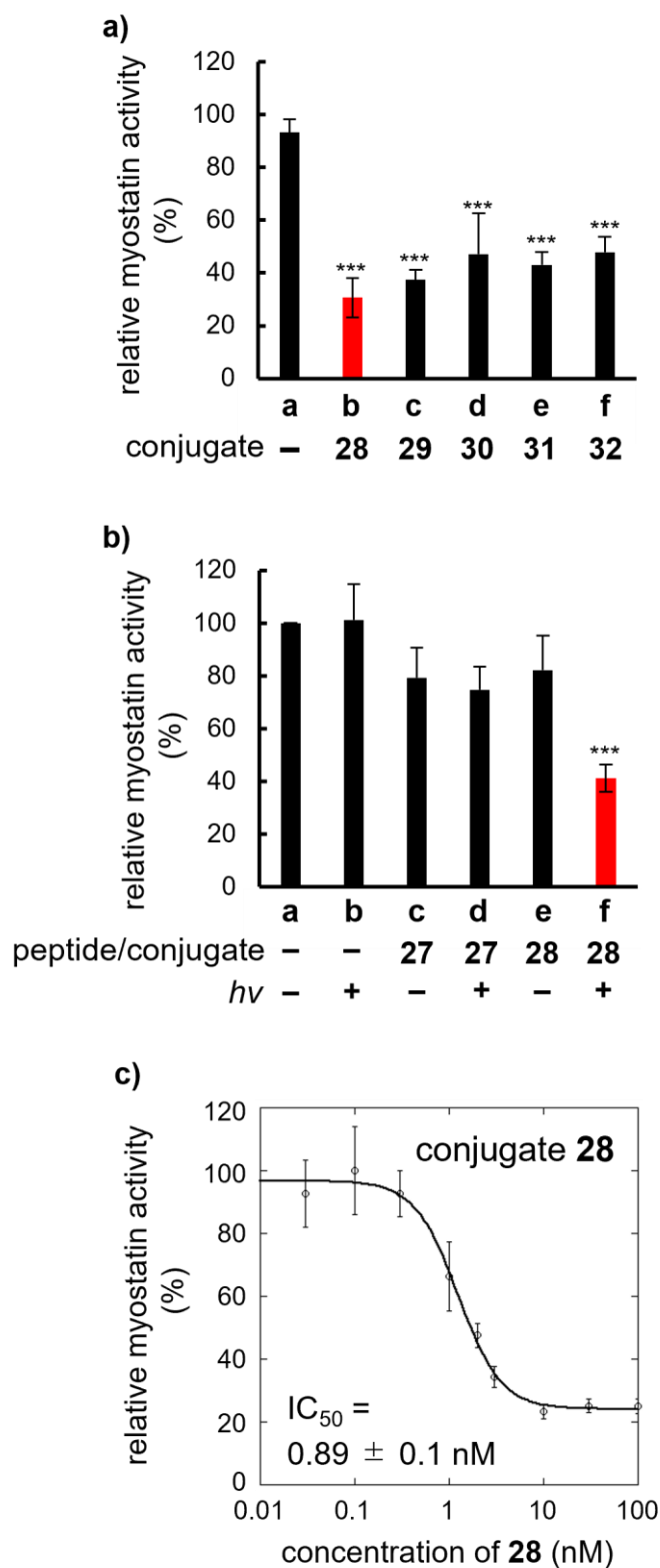


図 32. D-ペプチドコンジュゲート **28–32** を用いたマイオスタチンの不活化、a) **28–32** のマイオスタチン不活化能比較、b) ペプチド **27** とコンジュゲート **28** の比較、c) コンジュゲート **28** の濃度依存的なマイオスタチン不活化、*** $p < 0.001$ vs. lane a by Tukey's test.

第八節 D-ペプチドコンジュゲート 28 の酵素分解耐性評価

D-ペプチドコンジュゲート 28 の酵素分解に対する安定性を評価した (図 33、34)。D-ペプチドコンジュゲート 28 または L-ペプチドコンジュゲート 21 (100 μ M) に対し、生体内酵素であるキモトリプシン (chymotrypsin, 5 μ g/mL) あるいはトリプシン (trypsin, 5 μ g/mL) を添加し、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。そして、0、1、3 時間における酵素分解物を HPLC にて検出した (図 33a-d)。なお、キモトリプシンは、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met) の C 末端側を、トリプシンは、リジン (Lys)、アルギニン (Arg) の C 末端側を加水分解する酵素である。結果として、L-ペプチドコンジュゲート 21 のピーク (retention time = 24.4 min) は、キモトリプシン処理によってインキュベート時間依存的に減少し、新たに酵素分解物が出現した (図 33a)。このキモトリプシンによる分解物は、Tyr7-Ser8 間および Leu21-Arg22 間が加水分解された生成物 (図 31a, e, i-iii に相当) であった。加えて、21 は、トリプシン処理においてもインキュベート時間依存的に減少し、酵素分解物が出現した (図 33b)。このトリプシンによる分解物は、Arg6-Tyr7 間、Arg9-Ile10 間、Lys14-Ile15 間、Lys20-Leu21 間、Arg22-Leu23 間の加水分解体であった (図 33b, f, iv-ix に相当)。一方、D-ペプチドコンジュゲート 28 のピーク (retention time = 26.5 min) は、キモトリプシンおよびトリプシン処理によって減少せず、分解物は確認されなかった (図 33c, d)。そして、キモトリプシン処理における 21 と 28 のピーク面積から、1 時間後の残存率 (remaining rate (%)) を算出した (図 34)。その結果、21 は酵素処理後 1 時間の時点で 13% に減少したが、28 の残存率は約 100% であり、全く分解されていないことが確認された。以上の結果は、28 のペプチド部位が D-アミノ酸で構成されていることに起因すると考えられ、28 が L-ペプチドコンジュゲート 21 よりも遥かに高い酵素分解耐性を有することが示唆された。

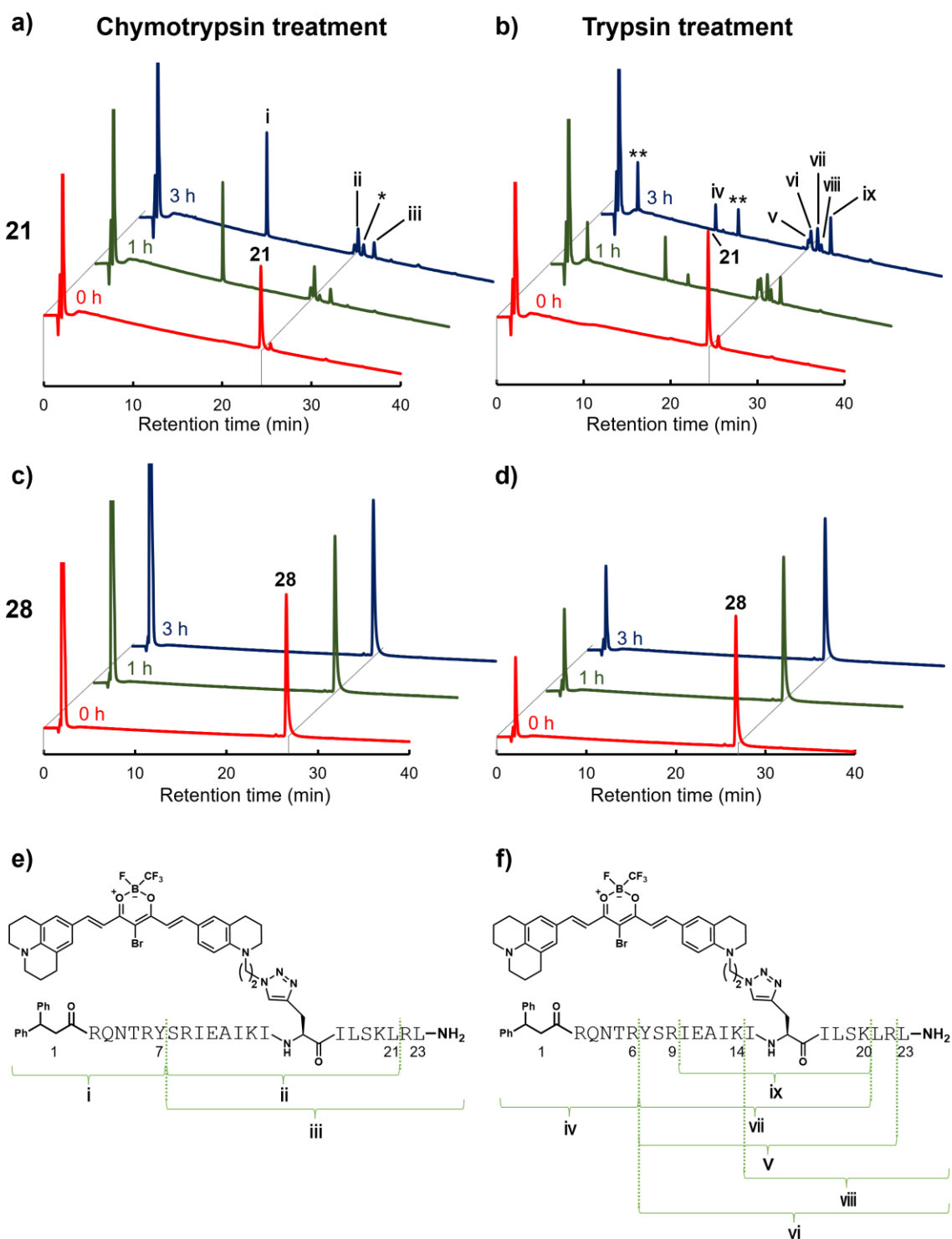


図 33. コンジュゲート **21** および **28** の酵素分解に対する安定性評価、a-d) HPLC による追跡 (a, b : **21** のキモトリプシンまたはトリプシン処理、c, d : **28** のキモトリプシンまたはトリプシン処理)、e, f) **21** のキモトリプシンまたはトリプシンによる分解生成物の構造

Chymotrypsin treatment (1 h)

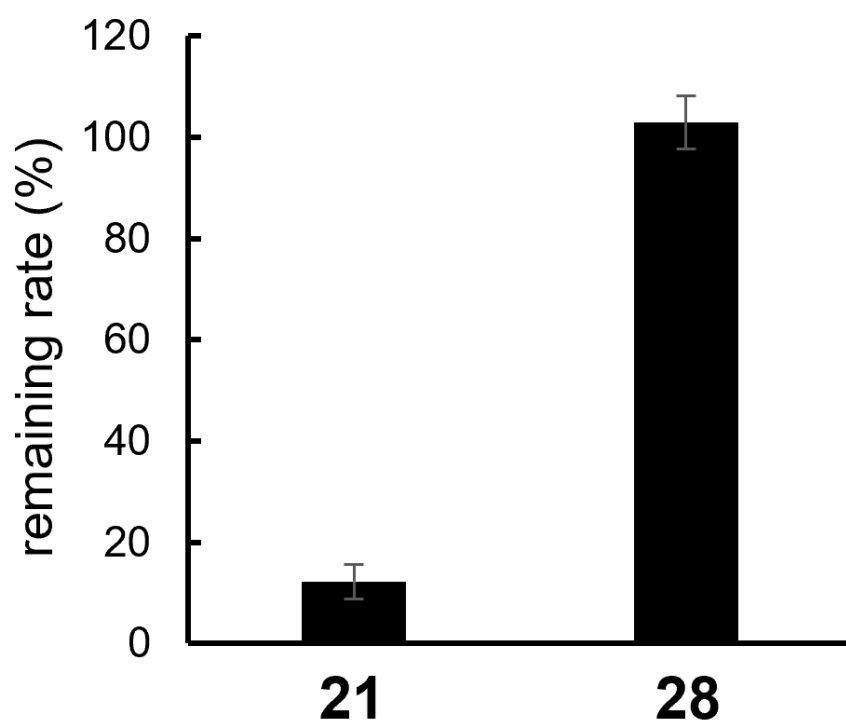


図 34. キモトリプシン処理 1 時間後のコンジュゲート **21** および **28** の残存率 (remaining rate (%))

小括

第三章では、近年、所属教室で見出された D-アミノ酸からなる 16 残基のマイオスタチン結合ペプチド MID-35 を基盤として、酵素分解に耐性を有するコンジュゲートの獲得に着手した。そして、新たに D-ペプチドコンジュゲート **28-32** を合成した。これらのコンジュゲートは、NIR 光 (730 nm) の照射下でマイオスタチンを選択的に酸素化し、不活化した。また、各コンジュゲートは細胞毒性・光毒性を示さず、比較的高い標的選択性を有していることが示唆された。特に、N 末端側に光酸素化触媒を導入した D-ペプチドコンジュゲート **28** は、L-ペプチドコンジュゲート **21** よりも 2 倍以上強力なマイオスタチン不活化能を有することが示された ($IC_{50} = 0.89 \pm 0.1$ nM)。さらに、**28** の酵素分解耐性は **21** よりも遥かに高いことが示された。そのため、**28** は生体内においても安定性が高いことが考えられる。以上の結果より、筆者は、マイオスタチンを光酸素化によって不活化する酵素分解耐性型コンジュゲートを獲得した。この結果は、コンジュゲートの生体応用をより実現的可能なものにすると考えられる。

総括

本博士研究論文では「光酸素化によるマイオスタチン不活化法の開発研究」と題し、マイオスタチンを選択的光酸素化反応によって不活化するペプチド-光酸素化触媒コンジュゲートの獲得と、その高活性化および酵素分解耐性化を目的とした構造誘導について三章にわたって述べたものである。

第一章では、所属教室で見出されたマイオスタチン結合ペプチド **1** の阻害活性向上を志向した機能化を図り、**1** の 12 位にオン/オフスイッチ型光酸素化触媒を導入した。ペプチド **8** と触媒 **16a** または **16b** からなるコンジュゲート **4** と **5** をデザインし、合成した。この **4** と **5** は、組織透過性の高い NIR 光 (730 nm) 照射下において、選択的かつ触媒的にマイオスタチンを酸素化した。また、この酸素化反応は触媒部位のオン/オフスイッチ機能が関与していることが示唆された。さらに、酸素化マイオスタチンは活性を失っており、この **4** によるマイオスタチンの不活化は、従来のペプチド **1** よりも強力であった。これは、**4** の光酸素化反応によって、不可逆的かつ触媒的にマイオスタチンが不活化されたためだと考えられる。

第二章では、より強力なマイオスタチン不活化能を有するコンジュゲートの獲得を目的として、ペプチドにおける触媒導入位置の検討を実施した。そして、ペプチド鎖の 1 位、8 位、16 位、C 末端のそれぞれに触媒を導入したコンジュゲート **19–22** を新たに獲得した。コンジュゲート **19–22** は、**4** と同様、NIR 光照射下でマイオスタチンを選択的に酸素化し、不活化した。特に、16 位に触媒を導入したコンジュゲート **21** のマイオスタチン不活化能は最も高く ($IC_{50} = 2.1 \pm 0.5 \text{ nM}$)、**4** ($IC_{50} = 3.9 \pm 0.4 \text{ nM}$) よりも約 2 倍程度強力であった。すなわち、**21** は触媒導入位置の最適化を達成したコンジュゲートだと言える。このように、触媒導入位置は、コンジュゲートのマイオスタチン不活化能および選択性に影響を与える可能性があることも示唆された。加えて、**21** のマイオスタチン不活化能はペプチド **1** ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}^{36)}$ よりも 1500 倍以上強力であり、243 残基ポリペプチドの二量体からなるプロドメインタンパク質 ($IC_{50} = 2.5 \pm 0.3 \text{ nM}$) に匹敵する。この結果から、筆者の提案した本手法のように、リガンド分子に光酸素化能を付与することで、強力な阻害剤の創製が可能だと考える。さらに、**21** は $3 \mu\text{M}$ という IC_{50} よりも遥かに高い濃度域において、細胞毒性および光毒性を示さなかった。このことから、生体に適応した際の安全域が非常に大きいと考えられる。この **21** の低い細胞毒性は、ペプチド部分のマイオスタチン

親和性に加えて、触媒部位のオン/オフスイッチ機能に伴う、高い標的選択性に起因することが示唆された。

第三章では、コンジュゲートの酵素分解に対する安定性向上を目的として、全て D-アミノ酸からなる MID-35 を利用したコンジュゲートの創製に着手した。MID-35 の誘導体 **27** と触媒 **16a** からなる種々の D-ペプチドコンジュゲート **28-32** を合成した。**28-32** は、有意な細胞毒性および光毒性を示さず、NIR 光照射下でマイオスタチンを選択的に酸素化し、不活化した。特に、N 末端に触媒を導入したコンジュゲート **28** は、マイオスタチン不活化能が他のコンジュゲートよりも高い傾向にあり、その IC₅₀ 値は 0.89 ± 0.1 nM であった。これは、23 残基のペプチドからなる L-ペプチドコンジュゲート **21** よりも 2 倍以上強力である。すなわち、小型化コンジュゲートを獲得した。この **28** は **21** と比較して、キモトリプシンやトリプシンなどの生体内酵素で分解されなかったため、生体内での安定性も比較的高い可能性があった。以上のように、筆者は、マイオスタチンを強力に不活化する酵素耐性型コンジュゲートの創製を達成した。

以上のように、筆者はマイオスタチン結合ペプチドとオン/オフスイッチ型光酸素化からなるコンジュゲートを用いることで、光酸素化反応によってマイオスタチンを強力かつ選択的に不活化することが可能であることを示した。このような手法によるマイオスタチン不活化剤は未だに例がなく、本コンジュゲートが将来的に包括的な筋萎縮性疾患治療薬の創出に繋がることを期待する。

また、本手法の標的タンパク質はマイオスタチンに限らず、リガンド分子を変更することで、いかなるタンパク質でも選択的かつ強力に不活化することが可能だと考える。すなわち、本手法は汎用的なタンパク質不活化法として創薬モダリティの一つになるポテンシャルを秘めている。このような意義深い研究の立ち上げに携わることが出来て、大変光栄であるとともに、本研究成果を基に本手法がさらに発展されることを強く期待する。

実験の部

実験材料

マイオスタチンは R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) または富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。サブスタンス P (SP) とアミロイド β 1–42 イソペプチド (A β) は株式会社ペプチド研究所 (Osaka, Japan) から購入した。A β 1–42 イソペプチドは Gly25-Ser26 間がエステル結合であり、pH が中性の場合、素早く *O*-to-*N* intramolecular acyl migration を起こし、通常の A β 1–42 に変換される ($t_{1/2} = \sim 10$ s)⁴⁰。メチレンブルー (MB) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。その他の合成試薬および溶媒は富士フィルム和光純薬工業株式会社、ナカライテスク株式会社、株式会社ペプチド研究所、Sigma-Aldrich (St, Louis, MO)、渡辺化学工業株式会社 (Hiroshima, Japan)、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、関東化学株式会社 (Tokyo, Japan)、から購入した。

Fmoc 固相ペプチド合成は、渡辺化学から購入した Fmoc-NH-SAL Resin および以下の保護アミノ酸を用い、自動合成機は Prelude (Gyros Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ) を使用した。

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Ala(2-Naph)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Chg-OH, Fmoc-D-Gly(Propargyl)-OH, Fmoc-D-homoPhe-OH, Fmoc-D-Ile-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly(Propargyl)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

ウシ胎児血清 (fetal bovine serum、FBS) はLife Technologies (Carlsbad, CA) から購入した。ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium、DMEM) はナカライテスクから購入した。非必須アミノ酸 (non-essential amino acids、NEAA) は Life Technologies から購入した。血清フリーの DMEM はナカライテスク株式会社から購入した。プラスミド (pGL4.48[luc2P/SBE/Hygro], pGL4.74[hRluc/TK])、FuGENE® HD、Dual-Luciferase® Reporter Assay System は Promega 社 (Madison, WI) から購入した。マウス myostatin 由来の組換え prodomain タンパク質は R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) から購入した。

滅菌済み 100 mm ディッシュは BD Biosciences (Franklin Lake, NJ) から購入した。
96 ウェルクリアウォールポリ D-Lys コートプレート は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) または Greiner Bio-One GmbH (Kremsmunster, Austria) から購入した。
96 ウェルホワイトウォールプレートは Corning (Cambridge, MA) から購入した。

ヒト胎児腎 (human embryonic kidney、HEK) -293 細胞は川崎医科大学の砂田教授から提供された。

実験および測定に用いた機器・器具

¹H-NMR スペクトル : Bruker AVANCE-III (400 MHz)
内標準物質として tetramethylsilane (0.00 ppm) を用いた。
NMR スペクトルの記載は、次の略号に従うものとする。
s : singlet, d : doublet, t : triplet, q : quartet, m : multiplet

¹³C-NMR スペクトル : Bruker AVANCE-III (400 MHz)
内標準物質として CDCl₃ (77.05 ppm) を用いた。

LRMS、HRMS スペクトル : Shimadzu Biotech LCMS-2020、Waters MICRO MASS LCT premier

MALDI-TOF MS スペクトル : Shimadzu Biotech AXIMA Assurance using α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α -CHCA) as a matrix

カラムクロマトグラフィー : シリカゲル 60N (spherical, neutral, 40–50 μ m, Kanto Chemical Co., Inc.)

自動カラムクロマトグラフィーシステム : Biotage Isolera One with SNAP Ultra column

薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography、TLC) : Merck TLC silica gel 60 F245 (0.25 mm)

分析 HPLC (analytical high performance liquid chromatography、aHPLC) : reverse-phase column (Nacalai Tesque COSMOSIL Protein-R or 5C18-AR- II, 4.6ID × 150 mm, or Hitachi LaChrom II C18, 4.6ID × 150 mm)

CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% aqueous TFA のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 or 200–800 nm で検出した。

分取 HPLC (Preparative HPLC) : reverse-phase column (Waters SunFire Prep C18 OBD, 19ID × 150 mm)

0.1 % TFA/CH₃CN in 0.1% aqueous TFA 系のリニアグラジエント、流速 5.0 mL/min、UV 230 or 700 nm で検出した。

吸収スペクトル : Shimadzu UV-1700 UV-visible spectrophotometer

蛍光スペクトル : Hitachi F-7100 fluorescence spectrophotometer

光照射用 LED パネル : light-emitting diode (LED) ISLM-150X 150-FF ($\lambda = 730$ nm, 14 mW: CCS Inc., Kyoto, Japan)

サンプルの脱塩および濃縮 : ZipTip U-C18 (Millipore Co.)

Infrared (IR) スペクトル : JASCO FT/IR 4100 spectrometer

融点 (melting points、MP) 測定 : Yanaco MP-500P melting point apparatus

第一章

Fmoc 固相ペプチド合成³⁷⁾

自動合成機 Prelude を用いて合成した。Fmoc-NH-SAL Resin (官能基置換率 0.37 mmol/g) を専用の反応容器に量り取り、次の反応条件で合成を実施した。Fmoc-NH-SAL Resin に DMF を加え、30 分間攪拌し樹脂を膨潤した。溶媒を濾去し、20% ピペリジン/DMF 溶液を加え、20 分間攪拌することで Fmoc 基を脱保護した。溶媒を濾去し、DMF で樹脂を 30 秒間 × 6 回洗浄した後、HOAt・HATU/DMF 溶液 (5 eq.) と DMF に溶解された α -アミノ基が Fmoc 基で保護されたアミノ酸 (5 eq.) あるいは 3,3-diphenylpropionic acid (5 eq.) を反応容器に入れ、DIPEA/DMF 溶液 (10 eq.) を加え縮合した。溶媒の濾去後、樹脂を DMF で 30 秒間 × 6 回洗浄した。脱保護とアミノ酸の縮合を繰り返すことで、ペプチドを合成した。これら Fmoc 基の脱保護とアミノ酸縮合のサイクルを C 末端から N 末端に向けて任意の回数繰り返した。N 末端までペプチドの伸長が完了した後、メタノールとジエチルエーテルで樹脂の洗浄と乾燥を行った。この保護ペプチドが結合した乾燥樹脂に TFA/DMB/TIS (92.5:5:2.5 v:v:v) を加えて、2.5 時間振盪することで樹脂からの切り出しおよび各アミノ酸側鎖の脱保護を行った。反応後、窒素圧により濾過し、樹脂を除去した後、窒素を吹き付けることで TFA を揮発させ、粗ペプチド溶液を濃縮した。濃縮された残渣にジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを析出させ、遠心沈殿させることで回収した。上澄み液を捨て、ジエチルエーテルで洗浄後風乾することで白色の乾燥粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを pHPLC にて分取精製し、目的ペプチドを獲得した。精製したペプチドは aHPLC にて純度を分析した。

吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル測定

吸収スペクトル測定には Shimadzu UV-1700 UV-visible spectrophotometer および石英セル (光路長: 10 mm) を用い、コンジュゲート **4, 5** およびオン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **16a, 16b** (各 10 μ M) を含む 10 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.4) で測定した。蛍光スペクトル測定には Hitachi F-7100 fluorescence spectrophotometer および石英セル (光路長 5 mm) を用い、マイオスタチン (1 μ M) およびコンジュゲート **4'** (0–15 μ M) を含む 10 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.4) で測定した ($\lambda_{\text{ex}} = 630 \text{ nm}$)。結合曲線は KaleidaGraph 4.5 を使用して描画され、 K_D 値を算出した。

光酸素化反応 (MALDI-TOF MS での検出)

マイオスタチンはストックソリューション (8 μM /1 mM HCl aq.) を 20 mM リン酸バッファーおよび 1 mM HCl aq. で希釈し、1 μM とした (10 mM リン酸バッファー、pH 7.4)。サブスタンス P (SP) およびアミロイド β 1-42 イソペプチド (A β) のストックソリューション (SP : 100 μM /超純水、A β : 250 μM /0.1% TFA aq., 超遠心処理済み⁴⁰⁾) は 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) および超純水で 20 μM (10 mM リン酸バッファー、pH 7.4) とした。それぞれの溶液に、コンジュゲート **4**、**5**、MB (50 μM /CH₃CN : DMSO = 9 : 1) を最終濃度 0, 0.3, 1, 3 μM となるように添加した。この溶液に、37 °C で LED パネル (λ = 730 nm) を用いて、3~5 cm の距離から 0, 0.5, 1.5, 3 時間、光を照射した。その後、反応溶液は 50 mM DTT による還元処理を 37 °C で 30 分間行い、Lys-C または trypsin、Glu-C (タンパク質の質量の 1/20 量) によるフラグメント化を、37 °C で 2.5 時間実施した。その後、ZipTip U-C18 による脱塩および濃縮を行い、MALDI-TOF MS にて検出した。

脱気条件での光酸素化反応

先述のマイオスタチン (1 μM) と **4** (3 μM) を含む 10 mM リン酸バッファーに凍結脱気処理を実施し、アルゴン (Ar) または空気を置換した。その後、光 (730 nm) を 30 分間照射し、上記と同様のフラグメント化処理を行い、MALDI-TOF MS にて検出した。各実験は 3 回繰り返して行っており、得られた値は平均値 \pm 標準偏差表す ($n=3$)。統計解析はスチューデントの t 検定 (Student's t -test) を用いて実施した。

光酸素化反応 (細胞評価用)

先述のマイオスタチン (1 μM) と **4** (3 μM) を含む 10 mM リン酸バッファーを光照射前あるいは光照射後 (730 nm, 37 °C, 30 min) に血清フリーの DMEM で希釈し、最終マイオスタチン濃度を 0.6 nM とし、細胞培養した 96 ウェルプレートに添加した (100 μL /well)。

ルシフェラーゼレポーターアッセイによるマイオスタチン活性評価

HEK-293 細胞を 10% FBS および 1×NEAA を含む DMEM 中で培養した (5% CO₂ 雰囲気下、37 °C)。その細胞を 96 ウェルクリアウォールポリ D-Lys コートプレートに播種した (20000 cells/well)。37 °C で 24 時間インキュベート後、レポーターベクター (pGL4.48[luc2P/SBE/Hygro]) とコントロールベクター (pGL4.74[hRluc/TK]) を FuGENE 存在下でトランスフェクションすることで、細胞内に導入した。その 24 時間後、培地を血清フリーの DMEM で置換し、37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で 8 時間インキュベートした。その後、0.57 nM に調製した各サンプル溶液で置換し、再度、37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で 4 時間インキュベートした。そして、リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline、PBS) でウェル内を洗浄した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System のプロトコルに沿って、細胞溶解液 (セルライセート) を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。各実験は 3 回繰り返して行っており、得られた値は平均値 ± 標準偏差表す (n = 3)。統計解析はテューキー検定 (Tukey's test) を用いて実施した。

以下に、獲得した化合物の合成法およびケミカルデータを示す。

ペプチド **8** (3,3-diphenylpropanoyl-RQNTRYSRIEOIKIQILSKLRL-NH₂, O = propargyl glycine)

上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.37 mmol/g、108 mg、0.04 mmol、1 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸または 3,3-diphenylpropionic acid (0.20 mmol、5 eq.)、HATU および HOAt、DIPEA (0.20 mmol、5 eq.) を用いて、アミノ酸を順次縮合した。この保護ペプチド結合樹脂 **7** を脱樹脂することで得られた粗ペプチドを pHPLC にて精製することで、目的のペプチド **8** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、34.1 mg、24%)。

HRMS m/z [M+H]⁺ found 2930.7212 (calcd. for C₁₃₆H₂₂₅N₄₀O₃₂ 2930.7209); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 19.0 min)

化合物 10a

室温 (room temperature, RT) で、1,2,3,4-テトラヒドロキノリン (**9**, 1.0 mL, 8.0 mmol) と 2-ブロモ酢酸メチル (0.9 mL, 9.6 mmol) をアルゴン (Ar) 雰囲気下、アセトニトリル (4 mL) に溶解し、ヨウ化カリウム (KI, 3.2 g, 19.1 mmol) と炭酸カリウム (K_2CO_3 , 2.2 g, 15.9 mmol) を添加した。その懸濁液を 38 時間加熱還流した。室温まで冷ました後、その反応混液をフィルター後、減圧下で濃縮し、酢酸エチル (AcOEt) で希釈し、水および飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) で乾燥した。乾燥後、フィルターろ過し、減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン (hexane)/AcOEt = 95/5 to 60/40) で精製することで、目的化合物 **10a** を得た (黄色のオイル、1.5 g, 93%)。

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.05 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.64 (td, $J = 7.3, 0.8$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.42 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.99-2.05 (m, 2H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ 206.1, found 206.1.

化合物 10b

化合物 **10a** と同様の方法で合成した。**9** (500 μ L, 4.0 mmol)、6-ブロモヘキサン酸メチル (750 μ L, 4.8 mmol)、KI (1.6 g, 9.6 mmol)、 K_2CO_3 (1.1 g, 8.0 mmol) を用いて、目的化合物 **10b** を得た (赤茶色のオイル、897 mg, 91%)。

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.06 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.55-6.58 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.21-3.30 (m, 4H), 2.77 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.93-1.99 (m, 2H), 1.58-1.72 (m, 4H), 1.35-1.43 (m, 2H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ 262.1, found 262.1.

化合物 11a

化合物 **10a** (2.2 g, 10.6 mmol) をテトラヒドロフラン (THF, 8 mL) に溶解し、水素化リチウムアルミニウム (lithium aluminum hydride, LAH, 501 mg, 13.2 mmol) の dry THF (8 mL) 懸濁液を Ar 雰囲気下、0 $^{\circ}C$ で添加した。その混合物を RT で 20 時間攪拌した。反応後、その溶液を AcOEt で希釈し、飽和ロッシェル塩水溶液で洗浄後 (10 mL \times 3)、硫酸マグネシウム ($MgSO_4$) で乾燥した。乾燥後、フィルターろ過し、減圧下で濃縮した。その残渣をシリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc = 2/1) で精製し、目的化合物 **11a** を得た (黄色のオイル、

1.6 g, 86%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.07 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.63 (td, $J = 7.3, 0.9$ Hz, 1H), 3.84 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.34 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.96-2.02 (m, 2H), 1.74 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 178.1, found 178.0.

化合物 11b

化合物 **11a** と同様の方法で合成した。**10b** (2 g, 7.7 mmol)、LAH (868.4 mg, 3.72 mmol) を用いて、目的化合物 **11b** を得た (黄色のオイル、2.4 mg、65%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.06 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.24-3.30 (m, 4H), 2.77 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.93-1.99 (m, 2H), 1.58-1.64 (m, 5H), 1.38-1.46 (m, 4H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 234.1, found 234.2.

化合物 13a

ジクロロメタン (CH_2Cl_2 、10 mL) に **11a** (0.1 g, 0.6 mmol) を溶解し、そこにトリエチルアミン (triethylamine、TEA、157 μL 、1.13 mmol) とメタンスルホニルクロライド (66 μL 、0.85 mmol) を Ar 雰囲気下、0 $^\circ\text{C}$ で添加した。その後、RT で 2 時間攪拌した。その混合物を 0.1 M 塩酸水溶液を 0 $^\circ\text{C}$ で添加し、 CH_2Cl_2 で抽出した。その有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 による乾燥、フィルターろ過、減圧下濃縮を経てメシル体 **12a** の粗生成物を得た。**12a** の粗生成物 (173 mg) をジメチルホルムアミド (DMF) で溶解し、アジ化ナトリウム (183 mg, 2.8 mmol) を RT および Ar 雰囲気下で添加し、60 $^\circ\text{C}$ で 2.5 時間攪拌した。その後、混合物を RT に冷やし、DMF を減圧下、留去した。その残渣をシリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc = 95/5 to 60/40) にて精製し、目的化合物 **13a** を得た (54.5 mg、2 steps: 42%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.08 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.58-6.65 (m, 2H), 3.47-3.52 (m, 4H), 3.38 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.96-2.02 (m, 2H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 203.1, found 203.1.

化合物 13b

化合物 **13a** と同様の方法で合成した。**11b** (868 mg, 3.7 mmol)、メタンスルホニルクロライド (866 μ L, 11.2 mmol)、TEA (2.1 mL, 14.9 mmol) を用いて、メシル体 **12b** の粗生成物を得た (茶色のオイル、1.16 g)。**12b** の粗生成物とアジ化ナトリウム (1.21 mg, 18.6 mmol) から目的化合物 **13b** を得た (オレンジ色のオイル、647 mg, 2 steps: 67%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.06 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.55-6.58 (m, 2H), 3.24-3.31 (m, 6H), 2.77 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.93-1.99 (m, 2H), 1.61-1.68 (m, 4H), 1.36-1.48 (m, 4H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 259.1, found 259.1.

化合物 14a

ジクロロメタンに **13a** (875 mg, 4.3 mmol) を溶解し、DMF (3.4 mL, 43.2 mmol) および塩化ホスホリル (POCl_3 , 1.33 mL, 14.3 mmol) を添加し、その混合物を Ar 雰囲気下、室温で 90 分間攪拌した。その反応混合物を水で希釈し、氷上で水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液で中和した。そして、AcOEt で希釈後、有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 による乾燥を行い、減圧下、濃縮した。その残渣をシリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc = 95/5 to 60/40) で精製し、目的化合物 **14a** を得た (黄色のオイル、304 mg, 31%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.72 (s, 1H), 7.59 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.52 (broad, 1H), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.54-3.62 (m, 4H), 3.50 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.84 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.99-2.05 (m, 2H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 231.1, found 231.0.

化合物 14b

化合物 **14a** と同様の方法で合成した。**13b** (647 mg, 2.5 mmol)、DMF (1.9 mL, 25 mmol)、 POCl_3 (768 μ L, 8.3 mmol) を用いて、目的化合物 **13b** を得た (黄色のオイル、284 mg, 40%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.67 (s, 1H), 7.56 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.48 (broad, 1H), 6.58 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.41 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.29-3.37 (m, 4H), 2.81 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.95-2.01 (m, 2H), 1.61-1.71 (m, 4H), 1.39-1.51 (m, 4H); LRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$ 287.1, found 287.1.

化合物 16a

化合物 **15**²⁶⁾ (103 mg, 0.224 mmol)、**14a** (112 mg, 0.487 mmol)、ホウ酸トリブチル (1.2 mL, 4.48 mmol) をトルエン (7 mL) に溶解し、*n*-ブチルアミン (17.8 μ L, 0.179 mmol) を Ar 雰囲気下で添加した。その混合物を 65 °C で 20.5 時間攪拌した。その後、減圧下で濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィー (hexane/EtOAc=1/1) にて精製し、目的化合物 **16a** を得た (暗青色の固体、92.7 mg、62%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 15.1 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 8.7, 1.1 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.07-7.20 (m, 4H), 6.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.50-3.61 (m, 6H), 3.37 (t, J = 5.6 Hz, 4H), 2.77-2.84 (m, 6H), 1.97-2.05 (m, 6H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 172.50, 171.16, 151.16, 148.65, 148.36, 131.18, 130.97, 130.72, 123.27, 123.01, 121.89, 121.44, 113.80, 111.40, 110.30, 77.24, 50.77, 50.59, 50.35, 48.44, 27.88, 27.56, 21.57, 21.16; LRMS(ESI): *m/z* calcd for [M+H]⁺ 672.1, found 672.2; HRMS(ESI): *m/z* calcd for [M+Na]⁺ 694.1583, found 694.1589; IR (film, cm⁻¹) 3433, 2927, 2852, 2101, 1571, 1516, 1452, 1430, 1314, 1237, 1204, 1152, 1077, 1011, 967; mp. decomp. 203.6 °C.

化合物 16b

化合物 **16a** と同様の方法で合成した。**15** (444 mg、1.0 mmol)、**14b** (614 mg、2.0 mmol)、ホウ酸トリブチル (4.5 mL、16.8 mmol)、*n*-ブチルアミン (128 μ L、1.3 mmol) を用いて、目的化合物 **16b** を得た (暗青色の固体、348 mg、45%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J = 14.6 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.07-7.18 (m, 3H), 6.56 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.43 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.29-3.39 (m, 7H), 2.76-2.81 (m, 6H), 1.99-2.03 (m, 6H), 1.62-1.69 (m, 5H), 1.41-1.47 (m, 4H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 171.89, 171.37, 150.43, 149.33, 149.24, 147.51, 131.72, 130.95, 130.42, 122.50, 122.37, 121.91, 121.35, 112.66, 111.71, 110.36, 77.23, 51.44, 51.33, 50.30, 50.02, 28.82, 27.96, 27.58, 26.70, 26.63, 26.48, 21.55, 21.21; LRMS(ESI): *m/z* calcd for [M+H]⁺ 728.2, found 728.2; HRMS(ESI): *m/z* calcd for [M+Na]⁺ 750.2209, found 750.2216; IR (film, cm⁻¹) 3466, 2932, 2853, 2092, 1615, 1571, 1518, 1436, 1314, 1143, 1009, 960, 844, 803, 706; mp. 158.2-158.7 °C.

化合物 18

化合物 **16a** と同様の方法で合成した。**17**²⁶⁾ (26.8 mg、0.1 mmol)、**14a** (48.4 mg、0.2 mmol)、ホウ酸トリブチル (771 μ L、663 mmol)、*n*-ブチルアミン (11.4 μ L、0.2 mmol) を用いて、目的化合物 **18** を得た (暗青色の固体、29.9 mg、63%)。

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 7.86 (t, *J* = 15.7 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.50 (dd, *J* = 8.8, 1.3 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 6.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.19 (s, 1H), 3.64-3.72 (m, 4H), 3.57 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.12 (s, 6H), 2.79-2.83 (m, 2H), 1.99 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 172.50, 171.16, 151.16, 148.65, 148.36, 131.18, 130.97, 130.72, 123.27, 123.01, 121.89, 121.44, 113.80, 111.40, 110.30, 77.24, 50.77, 50.59, 50.35, 48.44, 27.88, 27.56, 21.57, 21.16; LRMS(ESI): *m/z* calcd for [M+H]⁺ 492.2, found 492.1; HRMS(ESI): *m/z* calcd for [M+Na]⁺ 514.2198, found 514.2202; IR (film, cm⁻¹) 3747, 2927, 2859, 2360, 2333, 2099, 1588, 1505, 1370, 1323, 1286, 1183, 1128, 1050, 1007, 817; mp. 113.0-113.6 °C.

コンジュゲート 4

ペプチド **8** (10 mM、30 μ L、1.0 eq.) および **16a** (11 mM、30 μ L、1.1 eq.)、tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA、20 mM、60 μ L、4.0 eq.)、L-ascorbic acid (120 mM、60 μ L、24 eq.) の DMF/MeOH (1:1 v:v、300 μ L) 溶液に tetrakis(acetonitrile)copper(I) hexafluorophosphate (1.4 mg、excess) を添加し、RT で 1 時間攪拌した。その後、0.1% TFA aq. と 0.1% TFA/CH₃CN 溶媒系を用いた pHPLC にて精製し、目的化合物 **4** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.9 mg、35%)。

HRMS *m/z* [M+H]⁺ found 3601.8933 (calcd. for C₁₆₇H₂₅₆N₄₅O₃₄BrF₄B 3601.8899); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 25.5 min)

コンジュゲート **5**

コンジュゲート **4** と同様の方法で合成した。**4** (10 mM、60 μ L、1.0 eq.)、**16b** (11 mM、60 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **5** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.8 mg、32%)。

HRMS m/z $[M+H]^+$ found 3657.9524 (calcd. for $C_{171}H_{264}N_{45}O_{34}BrF_4B$ 3657.9525); purity >95% (純度分析は、 CH_3CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 27.3 min)

コンジュゲート **4'**

コンジュゲート **4** と同様の方法で合成した。**4** (10 mM、60 μ L、1.0 eq.)、**18** (11 mM、60 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **4'** を TFA 塩として得た (紫色のアモルファス、1.2 mg、48%)。

HRMS m/z $[M+H]^+$ found 3421.9521 (calcd. for $C_{162}H_{253}N_{45}O_{34}F_2B$ 3421.9513); purity >95% (純度分析は、 CH_3CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 23.0 min)

第二章

Fmoc 固相ペプチド合成

各ペプチドは自動合成機 Prelude (Gyros Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ) を用いて、第一章と同様の方法で合成した。

吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル測定

第一章と同様の機器および方法で測定した (吸収スペクトルの測定条件: コンジュゲート **4**, **19-22** (10 μM)、10 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.4, 1% DMSO)、蛍光スペクトルの測定条件: マイオスタチン (1 μM) またはサブスタンス P (0.5 μM)、コンジュゲート **4'**, **19'-22'** (2 μM)、10 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.4, 1% DMSO)、 $\lambda_{\text{ex}} = 626 \text{ nm}$)。結合曲線は KaleidaGraph 4.5 を使用して描画され、 K_D 値を算出した。

光酸素化反応 (MALDI-TOF MS での検出)

第一章と同様の方法でサンプルを調製し、マイオスタチンフラグメントを MALDI-TOF MS にて検出した。マイオスタチン (1 μM) または SP、A β (20 μM) およびコンジュゲート **4**, **19-22** (4 μM) あるいは MB (12 μM) を用いて、光酸素化を行った (光照射条件: $\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$, RT あるいは 37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min)。

光酸素化反応 (細胞評価用)

第一章と同様の方法で細胞評価に用いる光酸素化サンプルを調製した。血清フリーの DMEM 中、マイオスタチン (0.6 nM) とペプチド **1** またはコンジュゲート **4**, **19-22** (3 nM) の共存下で光照射を実施した (730 nm, RT, 30 min)。

細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ

第一章と同様の方法で測定した。シグモイド曲線は KaleidaGraph 4.5 を使用して描画し、 IC_{50} 値を算出した。各実験は 3 回繰り返して行っており、得られた値は平均値 \pm 標準偏差表す ($n = 3$)。統計解析はテューキー検定 (Tukey's test) を用いて実施した。

細胞毒性評価

DMEM (10% FBS, 1×NEAA) 中、37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で培養した HEK-293 細胞を 96 ウェルクリアウオールポリ D-Lys コートプレートに播種した (20000 cells/well)。そして、48 時間後、コンジュゲート **4** あるいは **19–22**、MB (3 μM) を含む血清フリーの DMEM で各ウェル内を置換した。その細胞に対し、LED パネルを用いて光を照射した (λ_{\max} = 730 nm, 15 min)。それを 37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で 24 時間インキュベートし、WST-1 を添加することで細胞生存率を測定した。各実験は 3 回繰り返して行っており、得られた値は平均値 ± 標準偏差表す (n = 3)。統計解析はスチューデントの *t* 検定 (Student's *t*-test) を用いて実施した。

以下に、獲得した化合物の合成法およびケミカルデータを示す。

コンジュゲート **19**

ペプチド **23** (10 mM、60 μL、1.0 eq.) および **16a** (11 mM、60 μL、1.1 eq.)、L-ascorbic acid (120 mM、120 μL、24 eq.) の DMF/MeOH (1:1 v:v、600 μL) 溶液に tetrakis(acetonitrile)copper(I) hexafluorophosphate (4.1 mg、excess) を添加し、RT で 30 分間攪拌した。その後、0.1% TFA aq. と 0.1% TFA/CH₃CN 溶媒系を用いた pHPLC にて精製し、目的化合物 **19** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.5 mg、18%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3463.8345 (calcd. for C₁₅₆H₂₅₀N₄₅O₃₄BrBF₄ 3463.8349); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 21.4 min)

コンジュゲート **20**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**24** (10 mM、60 μL、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、60 μL、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **20** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.3 mg、13%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3585.8945 (calcd. for C₁₆₇H₂₅₆N₄₅O₃₃BrBF₄ 3585.8950); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 20.1 min)

コンジュゲート **21**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**25** (10 mM、60 μ L、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、60 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **21** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.3 mg、10%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3544.8679 (calcd. for C₁₆₅H₂₅₃N₄₄O₃₃BrBF₄ 3544.8684); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 20.7 min)

コンジュゲート **22**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**26** (10 mM、60 μ L、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、60 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **22** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.5 mg、21%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3672.9241 (calcd. for C₁₇₀H₂₆₁N₄₆O₃₅BrBF₄ 3672.9270); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 20.4 min)

コンジュゲート **19'**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**23** (10 mM、30 μ L、1.0 eq.)、**18** (11 mM、30 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **19'** を TFA 塩として得た (暗紫色のアモルファス、0.2 mg、16%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3283.9072 (calcd. for C₁₅₁H₂₄₇N₄₅O₃₄BF₂ 3283.9043); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 23.0 min)

コンジュゲート **20'**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**24** (10 mM、90 μ L、1.0 eq.)、**18** (11 mM、90 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **20'** を TFA 塩として得た (暗紫色のアモルファス、0.3 mg、10%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3405.9568 (calcd. for C₁₆₂H₂₅₃N₄₅O₃₃BF₂ 3405.9564); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 23.9 min)

コンジュゲート **21'**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**25** (10 mM、60 μ L、1.0 eq.)、**18** (11 mM、60 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **21'** を TFA 塩として得た (暗紫色のアモルファス、0.2 mg、7%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3364.9285 (calcd. for C₁₆₀H₂₅₀N₄₄O₃₃BF₂ 3364.9298); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 24.0 min)

コンジュゲート **22'**

コンジュゲート **19** と同様の方法で合成した。**26** (10 mM、60 μ L、1.0 eq.)、**18** (11 mM、60 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **22'** を TFA 塩として得た (暗紫色のアモルファス、0.2 mg、8%)。

HRMS m/z [M + H]⁺ found 3492.9895 (calcd. for C₁₆₅H₂₅₈N₄₆O₃₅BF₂ 3492.9884); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 24.6 min)

ペプチド **23** (hex-5-ynoyl-RQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-NH₂)

ペプチド **8** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.37 mmol/g、108 mg、0.04 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸または 5-hexynoic acid (0.20 mmol、5 eq.)、HATU および HOAt、DIPEA (0.20 mmol、5 eq.) を用いて、アミノ酸を順次縮合した。この保護ペプチド結合樹脂 **7** を脱樹脂することで得られた粗ペプチドを pHPLC にて精製することで、目的のペプチド **23** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、14 mg、10%)。

LRMS(MALDI) m/z [M + H]⁺ found 2791.5 (calcd. for C₁₂₅H₂₁₈N₄₀O₃₂ 2791.7); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 17.0 min)

ペプチド **24** (3,3-diphenylpropanoyl-RQNTYORIEAIKIQILSKLRL-NH₂, O = propargyl glycine)

ペプチド **8** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.37 mmol/g、108 mg、0.04 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸または 3,3-diphenylpropionic acid (0.20 mmol、5 eq.) を用いて、目的のペプチド **24** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、40 mg、28%)。

LRMS(MALDI) m/z [M + H]⁺ found 2912.7 (calcd for C₁₃₆H₂₂₄N₄₀O₃₁ 2913.7); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 21.5 min)

ペプチド **25** (3,3-diphenylpropanoyl-RQNTYRSRIEAIKIOILSKLRL-NH₂, O = propargyl glycine)

ペプチド **8** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.37 mmol/g、108 mg、0.04 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸または 3,3-diphenylpropionic acid (0.20 mmol、5 eq.) を用いて、目的のペプチド **25** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、40 mg、28%)。

LRMS(MALDI) m/z [M + H]⁺ found 2872.7 (calcd. for C₁₃₄H₂₂₁N₃₉O₃₁ 2872.7); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 18.5 min)

ペプチド **26** (3,3-diphenylpropanoyl-RQNTYRSRIEAIKIQILSKLRLO-NH₂, O = propargyl glycine)

ペプチド **8** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.37 mmol/g、108 mg、0.04 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸または 3,3-diphenylpropionic acid (0.20 mmol、5 eq.) を用いて、目的のペプチド **26** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、35 mg、24%)。

LRMS(MALDI) m/z [M + H]⁺ found 3001.2 (calcd. for C₁₃₉H₂₂₉N₄₁O₃₃ 3000.8); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 18.2 min)

第三章

Fmoc 固相ペプチド合成

Fmoc-NH-SAL Resin (0.35, 0.37, 0.40, 0.49 mmol/g, 1 eq.) に DMF を加え、1 時間攪拌することで樹脂を膨潤した。溶媒を濾去し、20% ピペリジン/DMF 溶液を加え、10 分間 × 2 回攪拌することで Fmoc 基を脱保護した。溶媒を濾去し、DMF で樹脂を 30 秒間 × 10 回洗浄した後、1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 3 eq.) と α -アミノ基が Fmoc 基で保護されたアミノ酸 (3 eq.) を反応容器に入れ DMF で溶解し、*N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (*N,N'*-diisopropylcarbodiimide, DIPCI, 3 eq.) を加え 3 時間反応に附すことで、アミノ酸を順次縮合した。Kaiser 試験が陰性であることを確認し、溶媒を濾去後、樹脂を DMF で 30 秒間 × 10 回洗浄した。これら Fmoc 基の脱保護とアミノ酸縮合サイクルを C 末端から N 末端に向けて任意の配列繰り返した。N 末端までペプチド伸長が完了した後 20% ピペリジン/DMF 溶液で Fmoc 基を除去し、メタノールとジエチルエーテルで樹脂の洗浄と乾燥した。この保護ペプチド結合樹脂を TFA/m-cresol/thioanisole/1,2-ethanedithiol (100 : 2.5 : 2.5 : 1 = v : v : v : v) 溶液中、2.5 時間振盪することで樹脂からの切り出しおよび各アミノ酸側鎖の脱保護を行った。反応後、窒素圧により濾過し、樹脂を除去した後、窒素を吹き付けることで TFA を揮発させ、粗ペプチド溶液を濃縮した。濃縮された残渣にジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを析出させ、遠心沈殿させることで回収した。上澄み液を捨て、ジエチルエーテルで洗浄後風乾することで白色の乾燥粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを pHPLC にて分取精製し、目的ペプチドを獲得した。精製したペプチドは aHPLC にて純度を分析した。

吸収スペクトル測定

第一章と同様の機器および方法で測定した (コンジュゲート **28–32**: 10 μ M、10 mM リン酸緩衝液中 (pH 7.4, 1% DMSO)) 。

光酸素化反応 (MALDI-TOF MS による酸素化比の算出用)

第一章と同様の方法でサンプルを調製し、マイオスタチンフラグメントを MALDI-TOF MS にて検出した。マイオスタチン (1 μ M) または A β (20 μ M) およびコンジュゲート **21**、**28–32** (3 μ M) あるいは MB (1 μ M) を用いて、光酸素化を行った (光照射条件 : λ_{\max} = 730 nm, RT, 30 min) 。

光酸素化反応（マイオスタチン活性評価用）

第一章と同様の方法で光酸素化サンプルを調製した。血清フリーの DMEM 中、マイオスタチン (0.6 nM) とペプチド **27** あるいはコンジュゲート **28–32** (3 nM) の共存下で光照射を実施した (730 nm, RT, 30 min)。

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたマイオスタチン活性評価

本章の「光酸素化反応（マイオスタチン活性評価用）」にて調製したサンプルを用いて、第一章と同様の方法で測定した。各実験は 3 回繰り返して行っており、得られた値は平均値 ± 標準偏差表す (n=3)。統計解析は、テューキー検定 (Tukey's test) を用いて実施した。シグモイド曲線は KaleidaGraph 4.5 を使用して描画し、IC₅₀ 値を算出した。

細胞毒性評価

第二章と同様の方法で細胞生存率を測定した (コンジュゲート **28–32** または MB の濃度 : 3 μM、光照射条件 : λ_{max} = 730 nm, 30 min)。各実験は 3 回繰り返して行っており、得られた値は平均値 ± 標準偏差表す (n=3)。統計解析はスチューデントの *t* 検定 (Student's *t*-test) を用いて実施した。

酵素分解耐性評価

トリスバッファー (Tris buffer, 80 mM, pH 7.8) 中、コンジュゲート **21** あるいは **28** (100 μM) にキモトリプシン (chymotrypsin, 5 μg/mL) またはトリプシン (trypsin, 5 μg/mL) を添加し、37 °C でインキュベートした。そして、規定時間後 (0, 1, 3 時間後)、20 μL のサンプル溶液を HPLC にて分析した。酵素分解物は、それぞれのピークから MALDI-TOFMS を用いて分析し、同定した。また、残存率 (residual ratio) は、インキュベート後、0 および 1 時間後における **21** および **28** のピーク面積から算出した。

以下に、獲得した化合物の合成法およびケミカルデータを示す。

コンジュゲート **28**

ペプチド **33** (10 mM、180 μ L、1.0 eq.) および **16a** (11 mM、360 μ L、2.2 eq.)、L-ascorbic acid (120 mM、360 μ L、24 eq.) の DMF/MeOH (1:1 v:v、1.8 mL) 溶液に tetrakis(acetonitrile)copper(I) hexafluorophosphate (3.1 mg、4.6 eq.) を添加し、RT で 20 分間攪拌した。その後、0.1% TFA aq. と 0.1% TFA/CH₃CN 溶媒系を用いた pHPLC にて精製し、目的化合物 **28** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、2.3 mg、36%)。

HRMS m/z [M+H]⁺ found 3062.6755 (calcd. for C₁₅₄H₂₂₃N₃₆O₂₀BrBF₄ 3062.6752); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 26.3 min)

コンジュゲート **29**

コンジュゲート **28** と同様の方法で合成した。**34** (10 mM、90 μ L、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、90 μ L、1.1 eq.) を用いて、目的化合物 **29** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.5 mg、16%)。

HRMS m/z [M+H]⁺ found 2949.5952 (calcd. for C₁₄₈H₂₁₂N₃₅O₁₉BrBF₄ 2949.5911); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 26.4 min)

コンジュゲート **30**

コンジュゲート **28** と同様の方法で合成した。**35** (10 mM、90 μ L、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、180 μ L、2.2 eq.) を用いて、目的化合物 **30** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.9 mg、26%)。

HRMS m/z [M+H]⁺ found 2921.5811 (calcd. for C₁₄₈H₂₁₂N₃₃O₁₉BrBF₄ 2921.5850); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 26.6 min)

コンジュゲート **31**

コンジュゲート **28** と同様の方法で合成した。**36** (10 mM、145 μ L、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、290 μ L、2.2 eq.) を用いて、目的化合物 **31** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、2.8 mg、53%)。

HRMS m/z $[M+H]^+$ found 2921.5886 (calcd. For $C_{148}H_{212}N_{33}O_{19}BrBF_4$ 2921.5850); purity >95% (純度分析は、 CH_3CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 27.7 min)

コンジュゲート **32**

コンジュゲート **28** と同様の方法で合成した。**37** (10 mM、90 μ L、1.0 eq.)、**16a** (11 mM、180 μ L、2.2 eq.) を用いて、目的化合物 **32** を TFA 塩として得た (暗青色のアモルファス、0.5 mg、14%)。

HRMS m/z $[M+H]^+$ found 3077.6870 (calcd. for $C_{154}H_{224}N_{37}O_{20}BrBF_4$ 3077.6861); purity >95% (純度分析は、 CH_3CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 26.3 min)

ペプチド **33** (pent-4-ynoyl-lrbkrjirbkiuriyu-NH₂, b = D- α -cyclohexylglycine, j = 3-(2-naphthyl)-D-alanine, u = D-homophenylalanine)

上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.35 mmol/g、200 mg、0.07 mmol、1 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸または 4-pentynoic acid (0.22 mmol、3 eq.)、DIPCI および HOBt (0.22 mmol、3 eq.) を用いて、アミノ酸を順次縮合した。この保護ペプチド結合樹脂を脱樹脂することで得られた粗ペプチドを pHPLC にて精製することで、目的のペプチド **33** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、33 mg、29%)。

LRMS(MALDI) m/z $[M+H]^+$ found 2392.6 (calcd. for $C_{123}H_{192}N_{32}O_{18}$ 2393.1); purity >95% (純度分析は、 CH_3CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 18.7 min)

ペプチド **34** (H-lrborjirbkiuriyu-NH₂, b = D- α -cyclohexylglycine, j = 3-(2-naphthyl)-D-alanine, o = D-propargyl glycine, u = D-homophenylalanine)

ペプチド **33** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.40 mmol/g、101 mg、0.04 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸 (0.12 mmol、3 eq.) を用いて、目的のペプチド **34** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、2.3 mg、11%)。

LRMS(MALDI) m/z [M+H]⁺ found 2279.7 (calcd for C₁₁₇H₁₈₁N₃₀O₁₇ 2279.9); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 20.0 min)

ペプチド **35** (H-lrbkrjiobkiuriyu-NH₂, b = D- α -cyclohexylglycine, j = 3-(2-naphthyl)-D-alanine, o = D-propargyl glycine, u = D-homophenylalanine)

ペプチド **33** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.49 mmol/g、103 mg、0.05 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸 (0.15 mmol、3 eq.) を用いて、目的のペプチド **35** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、8.1 mg、20%)。

LRMS(MALDI) m/z [M+H]⁺ found 2251.4 (calcd. for C₁₁₇H₁₈₁N₂₈O₁₇ 2251.9); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 19.6 min)

ペプチド **36** (H-lrbkrjirbkiuoiyu-NH₂, b = D- α -cyclohexylglycine, j = 3-(2-naphthyl)-D-alanine, o = D-propargyl glycine, u = D-homophenylalanine)

ペプチド **33** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.40 mmol/g、99 mg、0.04 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸 (0.12 mmol、3 eq.) を用いて、目的のペプチド **36** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、11 mg、28%)。

LRMS(MALDI) m/z [M+H]⁺ found 2251.9 (calcd. for C₁₁₇H₁₈₁N₂₈O₁₇ 2252.6); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 20.0 min)

ペプチド **37** (H-lrbkrjirbkiuriyuo-NH₂, b = D- α -cyclohexylglycine, j = 3-(2-naphthyl)-D-alanine, o = D-propargyl glycine, u = D-homophenylalanine)

ペプチド **33** と同様に、上述の Fmoc 固相合成法を用いて合成した。Fmoc-NH SAL resin **6** (0.48 mmol/g、104 mg、0.05 mmol、1.0 eq.) を出発原料として、Fmoc アミノ酸 (0.15 mmol、3 eq.) を用いて、目的のペプチド **37** を TFA 塩として獲得した (白色のアモルファス、7.5 mg、25%)。

LRMS(MALDI) m/z [M+H]⁺ found 2408.1 (calcd. for C₁₁₇H₁₈₁N₂₈O₁₇ 2408.6); purity >95% (純度分析は、CH₃CN (5–85%, 40 min) in 0.1% TFA aq. のリニアグラジエント、流速 1.0 mL/min、UV 230 nm で検出した。retention time = 20.1 min)

引用文献

1. McPherron AC., Lawler AM., Lee SJ., *Nature*, **1997**, 387, 83-90.
2. Harrison CA., Al-Musawi SL., Walton KL., *Growth Factors.*, **2011**, 29, 174-186.
3. Bogdanovich S., Krag TO., Barton ER., Morris LD., Whittemore LA., Ahima RS., Khurana TS., *Nature*, **2002**, 420, 418-421.
4. St Andre M., Johnson M., Bansal PN., Wellen J., Robertson A., Opsahl A., Burch PM., Bialek P., Morris C., Owens J., *Skelet Muscle*, **2017**, 7, 25.
5. Becker C., Lord SR., Studenski SA., Warden SJ., Fielding RA., Recknor CP., Hochberg MC., Ferrari SL., Blain H., Binder EF., Rolland Y., Poiraudeau S., Benson CT., Myers SL., Hu L., Ahmad QI., Pacuch KR., Gomez EV., Benichou O; STEADY Group., *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **2015**, 3, 948-957.
6. Latres E., Pangilinan J., Miloscio L., Bauerlein R., Na E., Potocky TB., Huang Y., Eckersdorff M., Rafique A., Mastaitis J., Lin C., Murphy AJ., Yancopoulos GD., Gromada J., Stitt T., *Skelet Muscle*, **2015**, 9, 5:34.
7. Cadena SM., Tomkinson KN., Monnell TE., Spaits MS., Kumar R., Underwood KW., Pearsall RS., Lachey JL., *J Appl Physiol.*, **2010**, 109, 635-642.
8. Attie KM., Borgstein NG., Yang Y., Condon CH., Wilson DM., Pearsall AE., Kumar R., Willins DA., Seehra JS., Sherman ML., *Muscle Nerve.*, **2013**, 47, 416-423.
9. Morvan F., Rondeau JM., Zou C., Minetti G., Scheufler C., Scharenberg M., Jacobi C., Brebbia P., Ritter V., Toussaint G., Koelbing C., Leber X., Schilb A., Witte F., Lehmann S., Koch E., Geisse S., Glass DJ., Lach-Trifilieff E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2017**, 114, 12448-12453.
10. Singh P., Rong H., Gordi T., Bosley J., Bhattacharya I., *Clin Transl Sci.*, **2016**, 9, 302-310.
11. Walpurgis K., Thomas A., Thevis M., *Drug Test Anal.*, **2019**, 11, 1714-1723.
12. Campbell C., McMillan HJ., Mah JK., Tarnopolsky M., Selby K., McClure T., Wilson DM., Sherman ML., Escolar D., Attie KM., *Muscle Nerve.*, **2017**, 55, 458-464.
13. Daniel R., Jens P., Sam H., Didier L., Olivier P., Robert GP., Estelle L-T., Ronenn R., *J. Am. Geriatr. Soc.*, **2017**, 65, 9, 1988-1995.
14. Lee SJ., McPherron AC., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2001**, 98, 9306-9311.
15. Takayama K., Noguchi Y., Aoki S., Takayama S., Yoshida M., Asari T., Yakushiji F.,

- Nishimatsu S., Ohsawa Y., Itoh F., Negishi Y., Sunada Y., Hayashi Y., *J Med Chem.*, **2015**, 58, 1544-1549.
16. Pattison D. I., Rahmanto A. S., Davies M. J., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2012**, 11, 38.
 17. Jay D. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1988**, 85, 5454-5485.
 18. Surrey T., Elowitz B. M., Wolf E. P., Yang F., Nedelec F., Shokat K., Leibler S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, 95, 4293-4298.
 19. Inoue T., Kikuchi K., Hirose K., Iino M., Nagano T., *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 9-15.
 20. Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L., Jacobson K., *Nat. Cell Biol.*, **2002**, 4, 286-293.
 21. Marek K. W., Davis G. W., *Neuron*, **2002**, 36, 805-813.
 22. Tour O., Meijer R. M., Zacharias D. A., Adams S. R., Tsien R. Y., *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 1505-1508.
 23. Bulina M. E., Chudakov D. M., Britanova O. V., Yanishevich Y. G., Staroverov D. B., Chepurnykh T. V., Merzlyak E. M., Shkrob M. A., Lukyanov S., Lukyanov K. A., *Nat. Biotechnol.*, **2006**, 24, 95-99.
 24. Mitsunaga M., Ogawa M., Kosaka N., Rosenblum L. T., Choyke P. L., Kobayashi H., *Nat. Med.*, **2011**, 17, 1685-1691.
 25. Taniguchi A., Shimizu Y., Oisaki K., Sohma Y., Kanai M., *Nature Chem.*, **2016**, 8, 974-982.
 26. Ni J., Taniguchi A., Ozawa S., Hori Y., Kuninobu Y., Saito T., Saido T. C., Tomita T., Sohma Y., Kanai M., *Chem*, **2018**, 4, 807-820.
 27. Ronald W.W., Marwood N.E., **2000**, *Electro-optics Handbook, Second Edition* (McGraw Hill).
 28. Kobayashi H., Ogawa M., Alford R., Choyke P.L., Urano Y., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2620-2640.
 29. Hong G., Antaris A.L., Dai H., *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, <https://doi.org/10.1038/s41551-016-0010>.
 30. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K., *Nat. Rev. Cancer* **3**, **2003**, 380-387.
 31. Celli J.P., Spring B.Q., Rizvi I., Evans C.L., Samkoe K.S., Verma S., Pogue B.W., Hasan T., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 5, 2795-2838.

32. Lovell J.F., Liu T.W., Chen J., Zheng G., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 5, 2839–2857.
33. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y., *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 4, 1990–2042.
34. Asari T., Takayama K., Nakamura A., Shimada T., Taguchi A., Hayashi Y., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, 8, 113-117.
35. Takayama K., Rentier C., Asari T., Nakamura A., Saga Y., Shimada T., Nirasawa K., Sasaki E., Muguruma K., Taguchi A., Taniguchi A., Negishi Y., Hayashi Y., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, 8, 751-756.
36. Takayama K., Nakamura A., Rentier C., Mino Y., Asari T., Saga Y., Taguchi A., Yakushiji F., Hayashi Y., *ChemMedChem*, **2016**, 11, 845-849.
37. Chang C. D., Meienhofer J., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1978**, 11, 246–249.
38. Takayama K., Asari T., Saitoh M., Nirasawa K., Sasaki E., Roppongi Y., Nakamura A., Saga Y., Shimada T., Ikeyama H., Taguchi A., Taniguchi A., Negishi Y., Hayashi Y., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2019**, 10, 985–990.
39. Takayama K., Hitachi K., Okamoto H., Saitoh M., Odagiri M., Ohfusa R., Shimada T., Taguchi A., Taniguchi A., Tsuchida K., Hayashi Y., *ACS Med. Chem. Lett.*, **2022**, 13, 492–498.
40. Taniguchi A., Sohma Y., Hirayama Y., Mukai H., Kimura T., Hayashi Y., Matsuzaki K., Kiso Y., *ChemBioChem*, **2009**, 10, 710-715.

掲載文献

本論文の内容は以下の論文に発表した。

- 1) **Hideyuki Okamoto**, Atsuhiko Taniguchi, Shoya Usami, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi. Inactivation of myostatin by photo-oxygenation using catalyst-functionalized peptides., *Chem. Commun.*, 55, 9108-9111 (2019).
- 2) **Hideyuki Okamoto**, Atsuhiko Taniguchi, Shoya Usami, Masahiro Katsuyama, Sho Konno, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi. Development of functionalized peptides for efficient inhibition of myostatin by selective photooxygenation., *Org. Biomol. Chem.*, 19, 199-207 (2021).
- 3) **Hideyuki Okamoto**, Shuko Amber Murano, Kaoru Ikekawa, Masahiro Katsuyama, Sho Konno, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi. Inactivation of myostatin by photooxygenation using functionalized D-peptides., *RSC Med. Chem.*, 14, 386-392 (2023).

参考文献

- 1) Kentaro Takayama, Keisuke Hitachi, **Hideyuki Okamoto**, Mariko Saitoh, Miki Odagiri, Rina Ohfusa, Takahiro Shimada, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Kunihiro Tsuchida, Yoshio Hayashi. Development of Myostatin Inhibitory D-Peptides to Enhance the Potency, Increasing Skeletal Muscle Mass in Mice., *ACS Med. Chem. Lett.*, 13, 492-498 (2022).

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬品化学教室 林 良雄教授に心より深謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 松本隆司教授、三浦 剛教授に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、種々有益なる御指導、ご協力下さいました東京薬科大学薬品化学教室 谷口敦彦准教授、高山健太郎客員准教授（現京都薬科大学生命薬科学系衛生化学分野准教授）、田口晃弘講師、今野 翔助教に心より感謝申し上げます。

本研究の実験にご協力くださいました東京薬科大学薬品化学教室 宇佐美翔哉氏、勝山雅弘氏、村野周子アンバー氏、池川 馨氏に心より感謝申し上げます。また、多方面からサポートして下さいました東京薬科大学薬品化学教室の諸氏ならびに多数の化合物の質量分析を行なっていただきました東京薬科大学中央分析センターの諸氏に感謝申し上げます。

特別研究員（DC2）に採用していただき、特別研究員奨励費（22J10632）および研究奨励金により、公私に渡り支援していただきました日本学術振興会に感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活において、常に支えて下さいました両親並びに家族に深く感謝申し上げます。

2023 年 1 月 10 日

岡本 英之