

氏名（本籍）	<small>おかもと ひでゆき</small> 岡本 英之（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 336 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	光酸素化によるマイオスタチン不活化法の開発研究
論文審査委員	（主査）教授 林 良雄 教授 松本 隆司 教授 三浦 剛

論文内容の要旨

TGF- β (transforming growth factor- β) スーパーファミリーに属するマイオスタチンは、骨格筋量を負に制御する。そのため、マイオスタチン活性の阻害は筋量増大をもたらし、筋ジストロフィーを始めとする、各種筋萎縮性疾患の治療法として期待されている。筆者の所属教室では、マイオスタチンを可逆的に阻害する 23 残基のマイオスタチン結合ペプチド **1** (図 1) を見出した。このペプチド **1** の阻害様式を不可逆的なものにするこ



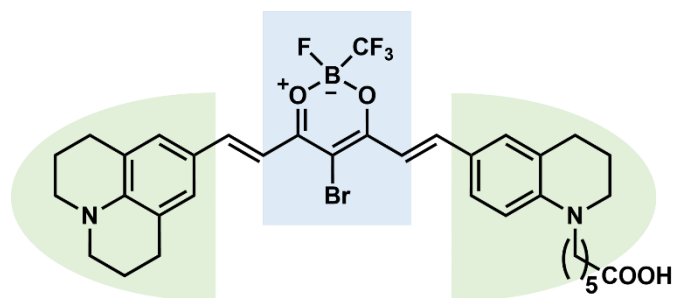
Myostatin-binding peptide 1

図 1. マイオスタチン結合ペプチド **1** の構造

で、強力なマイオスタチン不活化剤の創製が可能だと考えた。

ここで、筆者は外部刺激として光を用いる光酸素化反応に着目した。光酸素化反応では、光酸素化触媒に光照射することで生成した一重項酸素とタンパク質中のアミノ酸残基が不可逆的に共有結合を形成する。その結果、酸素化されたタンパク質は、その活性発現に重要な高次構造を崩し、不活化される。このように、光酸素化反応は、生体内に多く存在する酸素分子を利用可能である点や光照射による反応の時空間的制御が可能である点から、生体でのタンパク質の不活化に適すると考える。

一方、東京大学 金井教授らは、オン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **3** を開発した (図 2)。触媒 **3** は、単結合を軸とした回転運動に基づいて、標的タンパク質との相互作用を起こした場合 (オン状態) にのみ光酸素化反応を起こす、標的選択性の高いユニークな特徴を有する。さらに、本触媒は、組織透過性が高く、毒性が低い近赤外 (near-infrared light、NIR) 光で励起されるため、生体応用が可能である。



On/off switchable photooxygenation catalyst 3

図 2. オン/オフスイッチ型光酸素化触媒 **3** の構造

以上のことから、筆者はペプチド **1** と光酸素化触媒 **3** からなるコンジュゲートの創製が、光酸素化反応によってマイオスタチンを強力に不活化する、全く新しい戦略の開発に繋がると考えた (図 3)。本博士論文において、本不活化戦略の有用性を示すとともに、生体応用を指向したコンジュゲートの獲得を目指した。

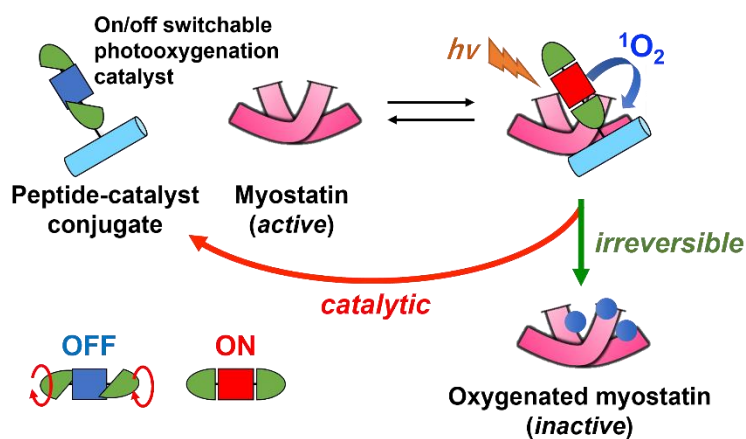
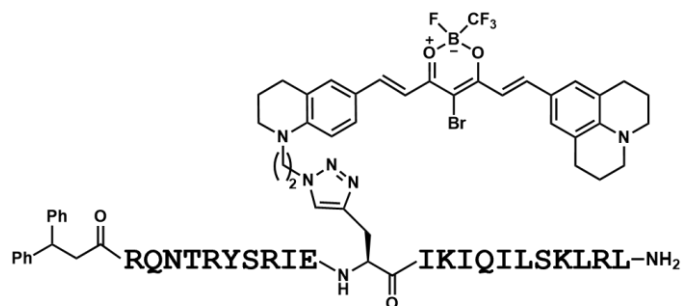


図 3. 考案したマイオスタチン不活化戦略

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

以前に実施されたマイオスタチン結合ペプチドの構造活性相関研究を基に、ペプチド **1** のアミノ酸 12 位にオン/オフスイッチ型光触媒 **3** を導入し、コンジュゲート **4** を合成した (図 4)。この **4** は、オン/オフスイッチ機能を有しており、



Conjugate 4

図 4. コンジュゲート **4** の構造

、NIR 光 (730 nm) 照射下でマイオスタチンを選択的かつ触媒的に酸素化した。加えて、マイオスタチンの活性 (relative myostatin activity) は、**4** の光酸素化反応によって減弱された (図 5、レーン g)。このコンジュゲート **4** を用いた光酸素化によるマイオスタチンの阻害効果 ($IC_{50} = 3.9 \pm 0.4$ nM)

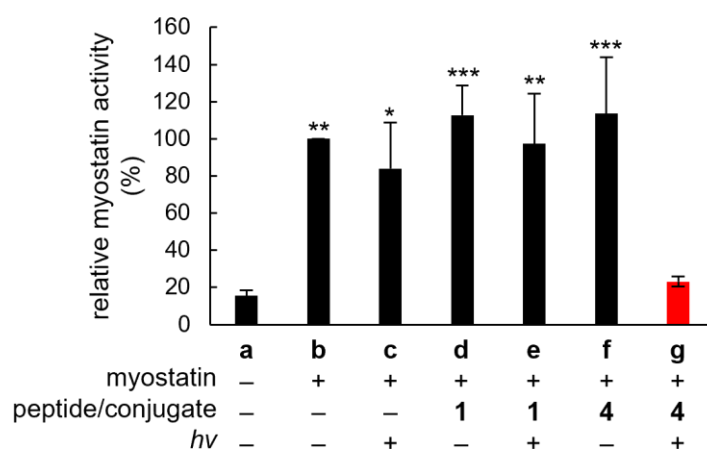


図 5. コンジュゲート **4** によるマイオスタチンの不活化、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. lane g by Tukey's test.

は従来のペプチド **1** ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.3$ μ M) よりもはるかに強力であったため、不可逆的かつ触媒的なマイオスタチン不活化の有効性が示唆された。

第二章 光酸素化触媒を導入する位置の最適化

マイオスタチン不活性化能の向上を目的として、ペプチド鎖における触媒導入位置を検討した。新たに、ペプチド鎖のアミノ酸 1 位、8 位、16 位、C 末端に触媒を導入したコンジュゲート **19–22** を獲得した (図 6)。それらは **4** と同様に光照射

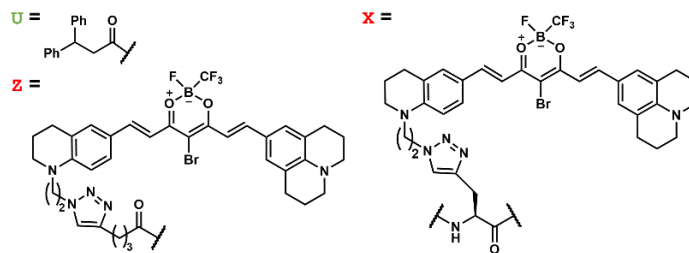
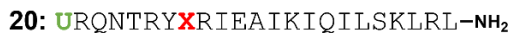


図 6. 触媒導入位置の異なるコンジュゲート **19–22** の構造

によってマイオスタチンを選択的に酸素化し、不活性化した。その中でも、特に、16 位に触媒を導入したコンジュゲート **21** (IC₅₀ = 2.1 ± 0.5 nM) は **4** (IC₅₀ = 3.9 ± 0.4 nM) よりも 2 倍程度強力なマイオスタチン不活性化能を有していることが示唆された。このことから、**21** は獲得したコンジュゲートの内、触媒導入位置が最適化されたコンジュゲートだと言える。

第三章 酵素分解耐性型コンジュゲートの獲得

最近、見出された 16 残基の D-アミノ酸からなる MID-35 (図 7) を基盤として、酵素分解に安定なコンジュゲートの創製に着手した。そして、光触媒導入位置が異なる 5 種類の D-ペプチドコンジュゲート **28–32** を獲得した。これらはマ

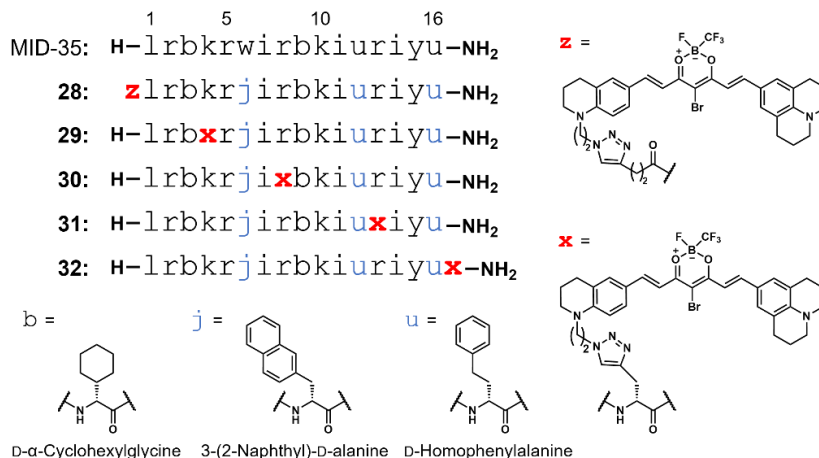


図 7. MID-35 と D-ペプチドコンジュゲート **28–32** の構造

イオスタチンを光酸素化し、不活性化した。加えて、**28–32** は有意な細胞毒性および光毒性を示さず、高い標的選択性を有すると考えられる。また、N 末

端に触媒を導入したコンジュゲート **28** のマイオスタチン不活性化能は、他のコンジュゲートと比較して最も強い傾向にあった。この **28** の IC₅₀ 値は 0.89 ± 0.1 nM であり、**28** は、L-ペプチドコンジュゲート **21** よりもペプチド鎖が短いにも関わらず、2 倍以上高いマイオスタチン不活性化能を示した。この結果は、リガンド分子の変更によりコンジュゲートの小型化に成功したことを示す。さらに、**21** はキモトリプシン処理後、1 時間で残存率 (remaining rate) が 13% に減少した。一方、**28** は減少しなかった (図 8)。また、**28** は **21** と比較してトリプシンに対しても安定であった。以上の結果から、**28** はその D-ペプチド鎖に起因して高い酵素分解耐性を有するため、生体内での安定性も高いと考えられる。これは、生体応用が可能なコンジュゲートの獲得に成功したと言える。

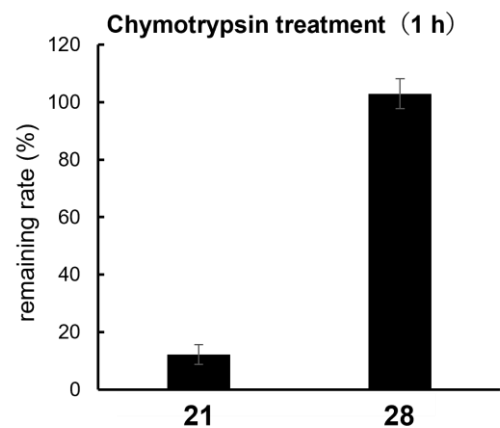


図 8. コンジュゲート **21** および **28** の酵素耐性評価

本研究は、光酸素化反応によるマイオスタチンの不活性化を基盤とした、全く新しいマイオスタチン阻害戦略を提案するものである。今回筆者が開発したペプチド-光酸素化触媒コンジュゲートは、マイオスタチンを酸素化することで強力に不活性化した。そして、リガンド分子の変更によって、酵素耐性を有するコンジュゲートの開発に至った。本結果は、包括的な筋萎縮性疾患治療薬の創出に繋がり得るものだと考える。

- (1) H. Okamoto, A. Taniguchi, S. Usami, A. Taguchi, K. Takayama, Y. Hayashi, *Chem. Commun.*, 55, 9108-9111 (2019).
- (2) H. Okamoto, A. Taniguchi, S. Usami, M. Katsuyama, S. Konno, A. Taguchi, K. Takayama, Y. Hayashi, *Org. Biomol. Chem.*, 19, 199-207 (2021).
- (3) H. Okamoto, S. A. Murano, K. Ikekawa, M. Katsuyama, S. Konno, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, *RSC Med. Chem.*, 14, 386-392 (2023).

【論文審査の結果の要旨】

岡本英之氏の博士学位申請論文は「医化学」の分野に申請されたものである。氏は、光酸素化反応によって強力にマイオスタチンを阻害するペプチド-光酸素化触媒コンジュゲートを創製し、3報の学術論文として報告している。本学位申請論文は、これらの研究成果を3章にわたってまとめたものである。

マイオスタチンは骨格筋量を負に制御するタンパク性因子であるため、本タンパク質の阻害は筋萎縮性疾患の治療戦略として注目されている。所属教室では、潜在的マイオスタチン複合体におけるプロドメインタンパク質のN末端領域から23残基のマイオスタチン結合ペプチドを見出している。本ペプチドはマイオスタチンを可逆的に阻害する。一方、東京大学の金井教授らの研究グループはオン/オフスイッチ型の光酸素化触媒を開発した。本触媒は、ねじれ型電荷移動(TICT)によって、標的と相互作用した場合(オン状態)にのみ一重項酸素を生成するユニークな触媒である。岡本氏は、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触媒を利用し、マイオスタチンを選択的かつ強力に阻害するコンジュゲートの創製に着手した。

第一章では、以前の構造活性相関研究の結果を基に、マイオスタチン結合ペプチドの12位に触媒を導入したコンジュゲートを合成した。本コンジュゲートは、組織透過性が高く毒性の低い近赤外光(730 nm)照射下でマイオスタチンを触媒的に酸素化した。さらに、本酸素化反応にはオン/オフスイッチ機能が関与することが示唆され、高いマイオスタチン選択性を有することが明らかとなった。加えて、酸素化されたマイオスタチンの活性は減弱した。このコンジュゲートによるマイオスタチン阻害効果($IC_{50} = 3.9 \text{ nM}$)は、触媒を持たないペプチド($IC_{50} = 3.5 \mu\text{M}$)よりも遥かに強力であり、光酸素化による阻害戦略の有用性が示された。

第二章では、より高いマイオスタチン阻害能を有するコンジュゲートの獲得を目指して、ペプチド鎖における触媒導入位置の最適化を実施した。新たに、ペプチド鎖のアミノ酸1位、8位、16位、C末端に触媒を導入した5種類のコンジュゲートを獲得した。それらは光照射によってマイオスタチンを選択的に酸素化し、不活化した。中でも、特に、16位に触媒を導入したコンジュゲートは $IC_{50} = 2.1 \text{ nM}$ であり、第一章のものよりも2倍程度強力なマイオスタチン阻害能を有していることが示唆された。このように、岡本氏は触媒導入位置の最適化されたコンジュゲートを獲得した。

第三章では、最近、新たに見出された16残基のD-アミノ酸からなるMID-35をリガンド部位として用いることで、酵素分解されにくいコンジュ

ゲートの創製に着手した。そして、光触媒導入位置が異なる 5 種類の D-ペプチドコンジュゲートを獲得した。これらはマイオスタチンを光酸素化し、不活化した。加えて、各コンジュゲートは有意な細胞毒性および光毒性を示さず、高い標的選択性を有すると考えられる。また、N 末端に触媒を導入したコンジュゲートのマイオスタチン阻害能は、他のコンジュゲートと比較して最も強い傾向にあった。加えて、本コンジュゲートの IC₅₀ 値は 0.89 nM であり、第二章にて獲得した L-ペプチドコンジュゲートよりもペプチド鎖が短いにも関わらず、2 倍以上高いマイオスタチン不活化能を示した。さらに、L-ペプチドコンジュゲートはキモトリプシンおよびトリプシン処理で容易に分解したが、D-ペプチドコンジュゲートは両酵素による分解物は確認されなかった。このことから、本コンジュゲートは、その D-ペプチド鎖に起因して非常に高い酵素分解耐性を有することが明らかとなった。すなわち、生体内での安定性も高いと考えられ、今後の生体応用に適していると言える。

以上、岡本氏の本博士学位申請論文は、マイオスタチン結合ペプチドと光酸素化触媒を組み合わせた新たなマイオスタチン阻害戦略の基盤構築および生体応用可能なコンジュゲートの獲得を達成した研究である。岡本氏が提案した本技術の標的分子は、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様々な生理活性分子に応用可能であると考えられる。すなわち、本技術は今後の創薬モダリティーになり得るものであり、大変意義深い成果である。したがって、本論文は博士（薬学）の学位論文として相応しい内容を有するものと判断する。