環状βアミノ酸を含むペプチドフォルダマーによる 血液凝固因子FXIIa阻害の構造基盤

横浜市立大学医学部 仙石 徹

Toru SENGOKU: Structural Basis for FXIIa Inhibition by a Peptide Foldamer Containing Cyclic β-Amino Acids

Cyclic β-amino acids, such as (1R,2R)-2-aminocyclohexane carboxylic acid (ACHC), are known to induce compact conformation of peptides by forming turns and helices. Recently, a method to incorporate cyclic β-amino acids into peptides using ribosomes has been reported. Combining this method with the mRNA display method enabled the de novo discovery of macrocyclic peptides that contain cyclic β-amino acid residues and efficiently inhibit human coagulation factor XIIa (FXIIa). One such peptide, F3, potentially inhibits FXIIa (K_i : 1.5 nM) and contains two ACHC residues. In the co-crystal structure of FXIIa-F3, F3 adopts an antiparallel β-hairpin structure stabilized by two ACHC residues. Despite its smaller size, F3 engages its target in a manner similar to that of natural protein-based inhibitors of serine proteases, demonstrating the utility of foldamer library consisting of macrocyclic peptides containing cyclic β-amino acids.

フォルダマーは特定の立体構造を形成するオリゴマーを指し、¹⁾ 機能性分子のモダリティとして注目を集めている。環状βアミノ酸はペプチド中に取り込まれるとヘリックスやシートのような二次構造を誘導し、ペプチドフォルダマーを形成することが知られていた。

筆者の共同研究者である菅裕明教授(東京大学)らは、遺伝暗号リプログラミングと *in vitro* selection法を組み合わせ、さまざまな非天然アミノ酸を含み標的分子に強く結合する特殊環状ペプチドを取得する方法(RaPID法)を開発してきた。²⁾ 近年、菅教授と同研究室の加藤敬行准教授はRaPID法を改変し、(1R,2R)-2-aminocyclohexane carboxylic acid (図1a, 以下ACHCと略記)などの環状βアミノ酸を効率良くペプチドに取り込ませることに成功し、さらにFXIIa(血液凝固に関与するセリンプロテアーゼの一種)を強く阻害し環状βアミノ酸を含む特殊環状ペプチドを取得した。³⁾ 本稿では、18残基からなり約

1.5 nMの K_i 値でFXIIaを阻害するペプチドF3(図1b)とFXIIaとの複合体のX線結晶構造について報告する。なお、ここで「環状」という言葉が2通りの意味で使われているが、F3はチオエーテル化反応により大環状構造をとり、かつ6員環を含む環状βアミノ酸であるACHCを2カ所に含む。

市販FXIIaとF3の混合物を用いて結晶化スクリーニングを行い、薄い板状結晶が積み重なった多結晶を得た。通常の放射光ビームラインX線を用いて回折実験を行ったところ、約7.5 Å分解能程度のブロードな回折点が多数得られたが、それらを処理して解析可能なデータを得ることはできなかった。そこで、SPRING-8の平田邦生博士の助力を得てBL32XUビームラインのマイクロビームを用いて回折実験を行ったところ、ビーム照射部位によって異なる回折パターンが得られ、良質な部位は処理可能な回折点を与えることが確認された。合計10個の結晶から得られた回折データをプログラムKAMO⁴⁾を用いて10度ずつ分断処理しクラスタリングとマージを行うことで、約3.0 Å分解能の回折データを得ることができた。ビームラインと全自動測定法の進歩がこれまで不可能であった構造決定を可能にした好例と思われる。

FXIIa-F3複合体の全体構造を図1cに示す。F3は2本のβストランドがヘアピン様の逆並行βシート構造を形成し、そのターン部分にACHC(ACHC8)が位置していた。先行研究からACHCがターンを誘導することは知られており、ACHC8はヘアピンの先端でターンを誘導することでF3の構造安定化に寄与していると考えられ

図1 FXIIa-F3複合体構造。(Structure of F3-FXIIa complex.) (a) ACHCの構造。(b) F3の構造。1, Acy, cはそれぞれACHC, アセチル化D-チロシン, D-システインを表す。(c) FXIIa-F3複合体の構造。

図2 相互作用の詳細。(Details of interaction.) (a) Arg6とACHC8の近傍。(b) ACHC13の近傍。(c) Arg6と上流領域が関与する相互作用。

る。また、ACHC8の側鎖はFXIIaのTyr515, His507と疎水性相互作用を形成していた。一方、ACHC13の主鎖酸素原子と窒素原子は分子内水素結合を形成していた。また、その側鎖はAla3やTyr16と分子内の疎水性相互作用を形成することでF3の構造安定化に寄与し、かつFXIIaのTrp586と分子間の疎水性相互作用を形成していた。

上記のような分子内・分子間相互作用は、ACHCのユニークな化学構造により初めて達成されるものである。環状βアミノ酸であるACHCは大きな疎水性側鎖をもち、周辺ペプチド主鎖構造に制約をもたらす上に、主鎖窒素原子が水素結合の供与基となり得る。天然アミノ酸ではもたないACHCのユニークな化学構造のおかげで、F3は安定した折り畳み構造をもち(ペプチドフォルダマー)、FXIIaへの強い結合が可能になっていると考えられる。

FXIIaの活性中心とF3との相互作用を図2に示す。F3のArg6はFXIIaの基質認識ポケットであるS1部位にはまり込み、Asp557と分子間イオン結合を形成していた。また、F3のArg6-Arg7間のペプチド結合がFXIIaの触媒基であるSer563の近傍に位置しており、Arg6のN末端側残基はFXIIaと分子間βシートを形成していた。これらの特徴は、F3がFXIIaの基質と類似した様式で相互作用する“standard mechanism inhibitor”であることを示す。

生体内のプロテアーゼ活性は厳密に制御される必要があり、さまざまなタンパク質性のセリンプロテアーゼ阻害剤が天然に存在する。⁵⁾これらのタンパク質性阻害剤とF3の阻害メカニズムを比較したところ、興味深い類似点と相違点が見出された(図3)。まず、両者ともに塩基性残基がプロテアーゼのS1部位に結合し、そのN末端領域がプロテアーゼと分子間βシートを形成する。また、F3がFXIIaとの間で形成する相互作用面積は703 Å²であり、タンパク質性阻害剤のもの(700~900 Å²)と同程度であった。一方、塩基性残基とその近傍領域を分子間βシート形成に好ましいコンフォメーションに固定し、標的プロテアーゼに対して提示する方法は大きく異なっていた。F3においては前述のとおりACHC8とACHC13がコンパクトなβヘアピン構造の安定化に寄与してい

図3 タンパク質性阻害剤との比較。(Comparisons with protein-based protease inhibitors.)

る。一方、タンパク質性阻害剤は大きなドメイン構造をとり、ドメイン上のループ領域に含まれる塩基性残基がプロテアーゼのS1部位に挿入されていた。塩基性残基の近傍にS-S結合が形成される例もしばしば見られたが、これはF3のACHC13と空間的に対応しており、塩基性残基近傍の構造安定化に寄与していると考えられる。ドメイン構造のフォールドや大きさは阻害剤の種類によってさまざまであった。おそらく、さまざまな天然のセリンプロテアーゼ阻害剤は効率良く標的プロテアーゼを阻害する共通のメカニズム(S1部位への塩基性残基結合と分子間βシート形成)に収斂進化によって到達したのであろう。わずか数サイクルの*in vitro* selectionにより得られたF3は天然のタンパク質性プロテアーゼ阻害剤と同様の阻害メカニズムを使い、かつそれをはるかに小さな分子サイズで実現している。この事実は、環状βアミノ酸を用いたRaPID法が機能性ペプチドフォルダマーを取得する強力な方法であることを示している。

文 献

- 1) S. H. Gellman: *Acc. Chem. Res.* **31**, 173 (1998).
- 2) A. A. Vinogradov, Y. Yin and H. Suga: *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 4167 (2019).
- 3) T. Katoh, T. Sengoku, K. Hirata, K. Ogata and H. Suga: *Nat. Chem.* **12**, 1081 (2020).
- 4) K. Yamashita, K. Hirata and M. Yamamoto: *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **74**, 441 (2018).
- 5) C. J. Farady and C. S. Craik: *Chem. Eur. J. Chem. Bio.* **11**, 2341 (2010).

プロフィール

仙石 徹 Toru SENGOKU
 横浜市立大学医学部
 School of Medicine, Yokohama City University
 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9
 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa
 236-0004, Japan
 e-mail: tsengoku@yokohama-cu.ac.jp
 twitter: @torusengoku
 最終学歴：東京大学大学院理学系研究科修士、博士(理学)
 専門分野：構造生物学
 現在の研究テーマ：転写制御機構の構造生物学