

第59回Spring-8 先端利用技術ワークショップ/ 大阪大学蛋白研究所セミナー

# 環状ペプチドのヒト血清アルブミン に対する結合様式

長岡工業高等専門学校 電気電子システム工学科 助教 和久井直樹

E-mail: [wakui@nagaoka-ct.ac.jp](mailto:wakui@nagaoka-ct.ac.jp)

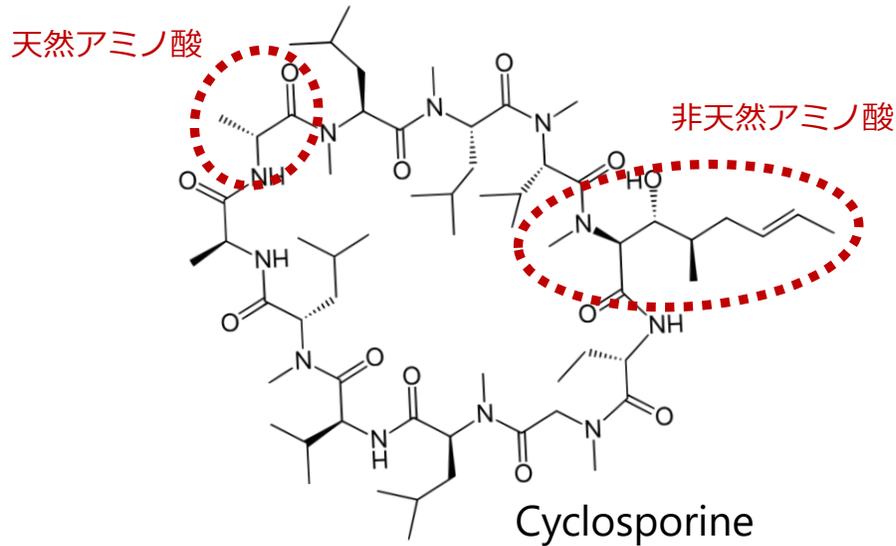
## 本日の話の元になっている論文

Structural Basis for the Binding Mechanism of Human Serum Albumin Complexed with Cyclic Peptide Dalbavancin

Sho Ito\*, Akinobu Senoo, Satoru Nagatoishi, Masahito Ohue, Masaki Yamamoto, Kouhei Tsumoto, and Naoki Wakui\*

*J. Med. Chem.* 2020, 63, 22, 14045–14053

# 注目を集めている環状ペプチド



環状ペプチド：天然アミノ酸と非天然アミノ酸によって構成される環状構造のペプチド

## 環状ペプチドの特徴

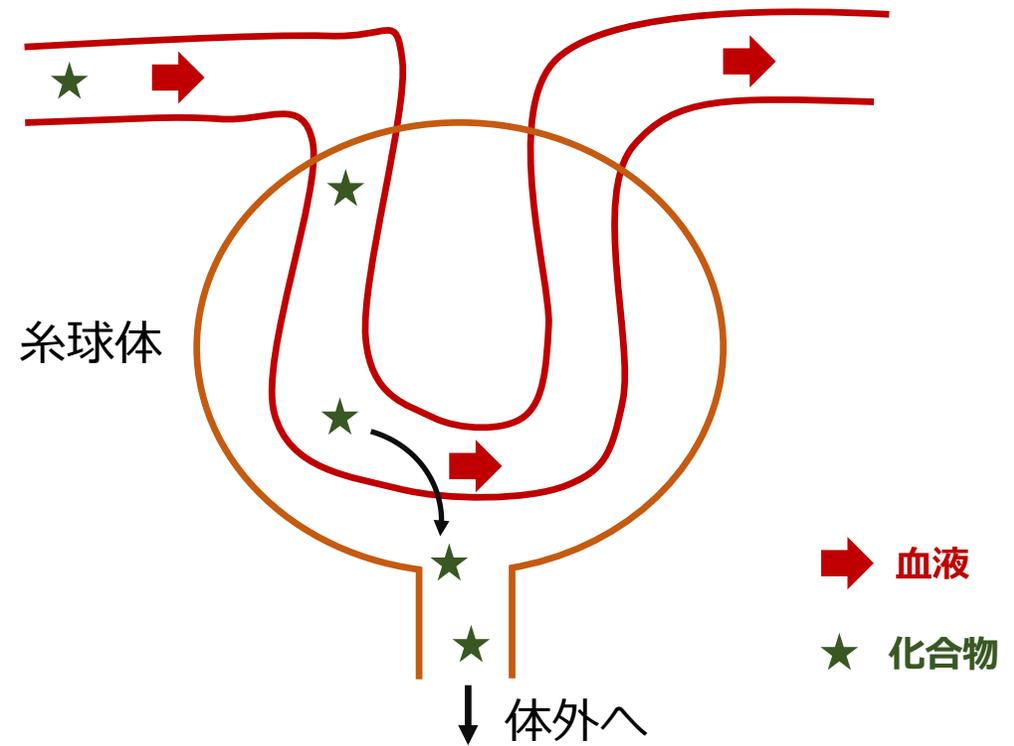
	低分子 医薬品	環状 ペプチド	抗体 医薬品
標的への結合能	△	◎	◎
標的特異性	△	◎	◎
細胞内標的	◎	○	×
経口投与	◎	○	×

## 2006-2015に承認された環状ペプチド医薬品

Anidulafungin (2006)	Linacotide (2012)
Lanreotide (2007)	Pasireotide (2012)
Telavancin (2009)	Dalbavancin (2014)
Romidepsin (2009)	Oritavancin (2014)
Peginesatide (2012)	

# 環状ペプチド創薬の課題

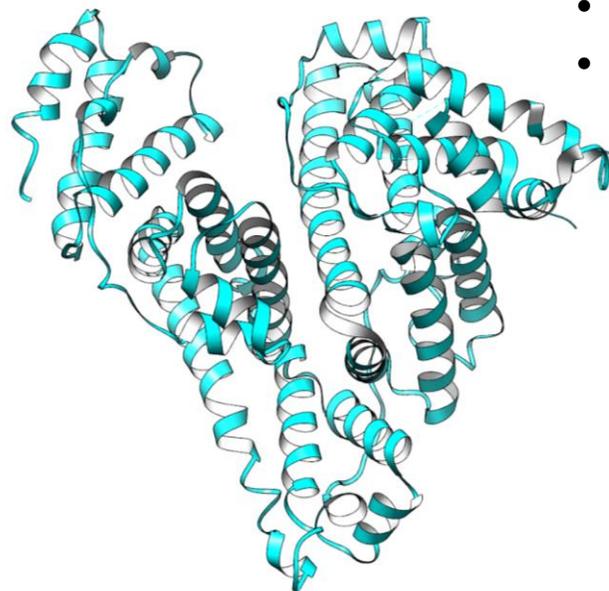
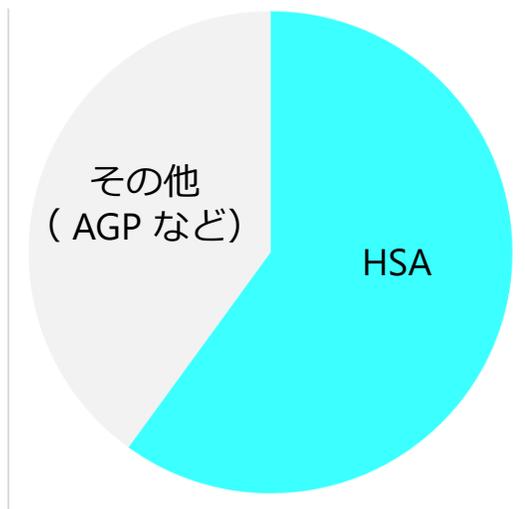
- 細胞内取り込み
- 経口投与
- 代謝安定性
- 免疫原性
- 腎排出



腎臓の糸球体によって5-10 kDa以下の分子はろ過され、体外に排出されてしまう。

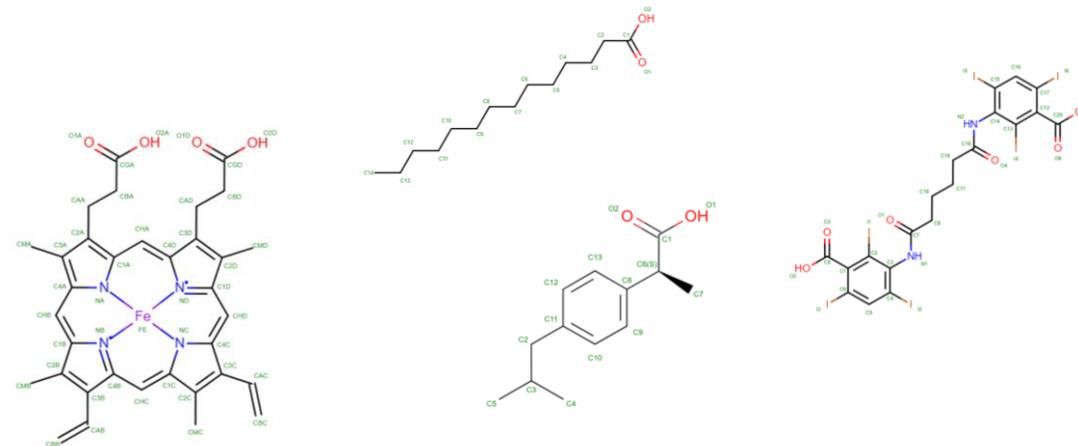
# 腎排出克服の鍵を握る分子：ヒト血清アルブミン（HSA）

血漿タンパク質の組成

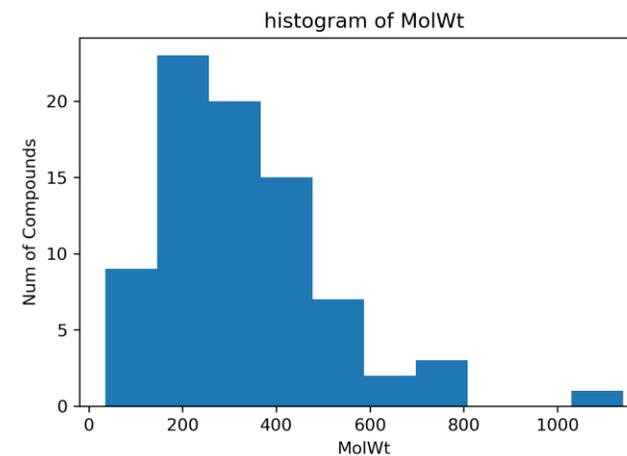


- 分子量は66 kDa
- 輸送体

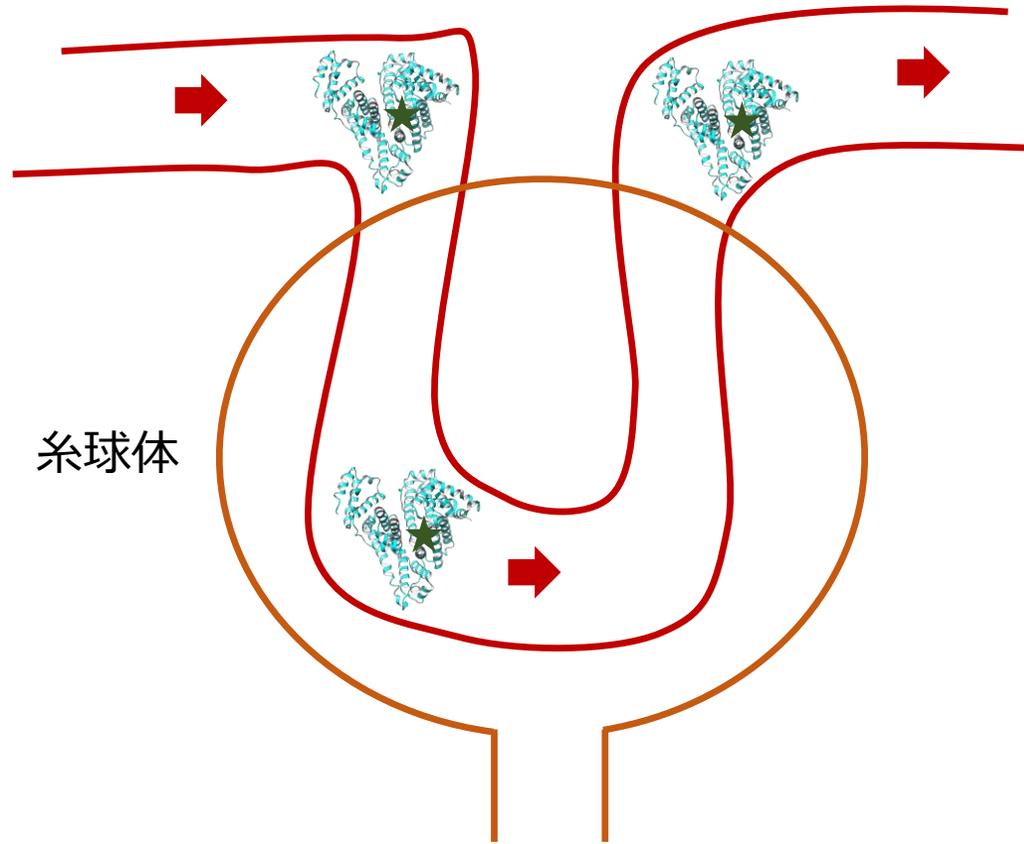
HSAが輸送する様々な物質



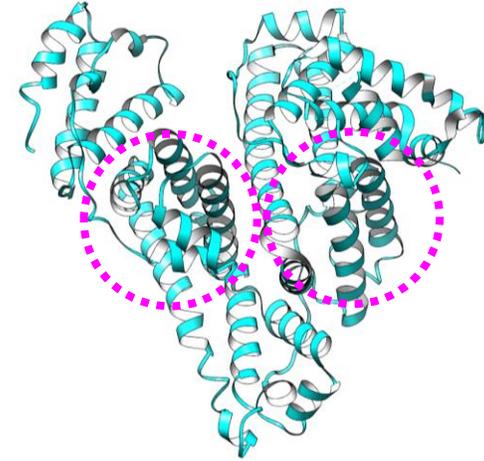
PDB中でHSAと結合している化合物の分子量分布



# HSAに結合することで腎排出を回避

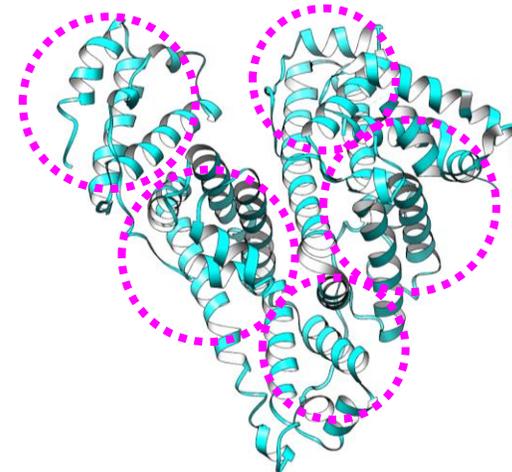


Sudlow's site



Sudlow, G., *et al.* (1975).

脂肪酸結合部位



Curry, S., *et al.* (1998).

# 問い

- 環状ペプチドはHSAのどこに結合しているか？
- 環状ペプチドの結合様式はどうなっているか？

# 炭化水素鎖の有無がPPBに影響を与えている？

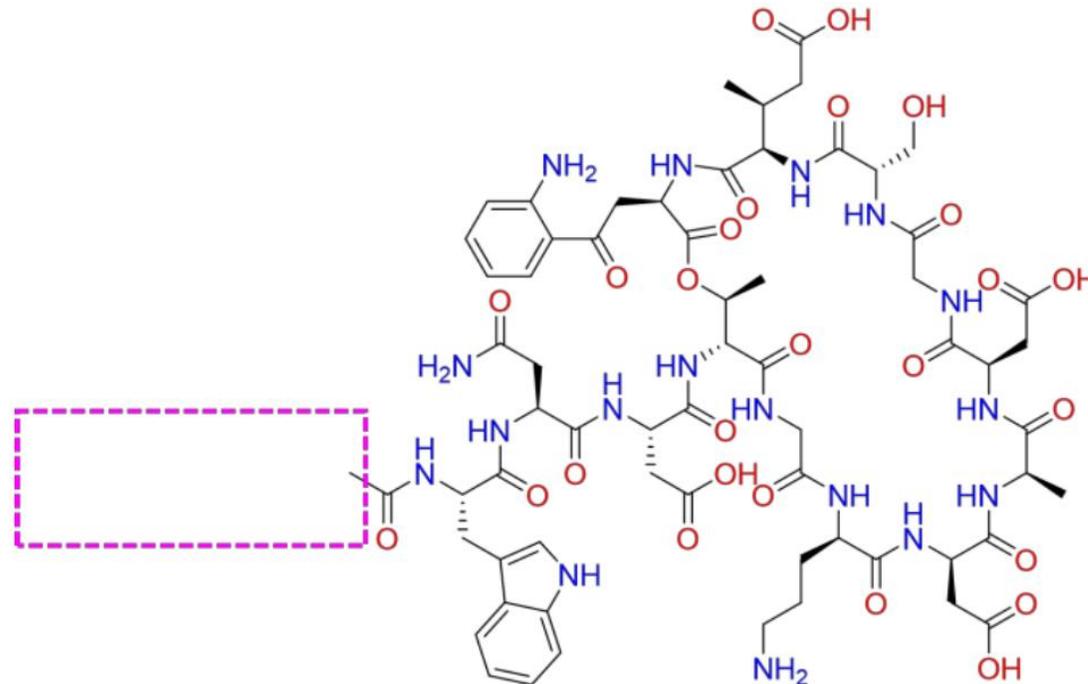
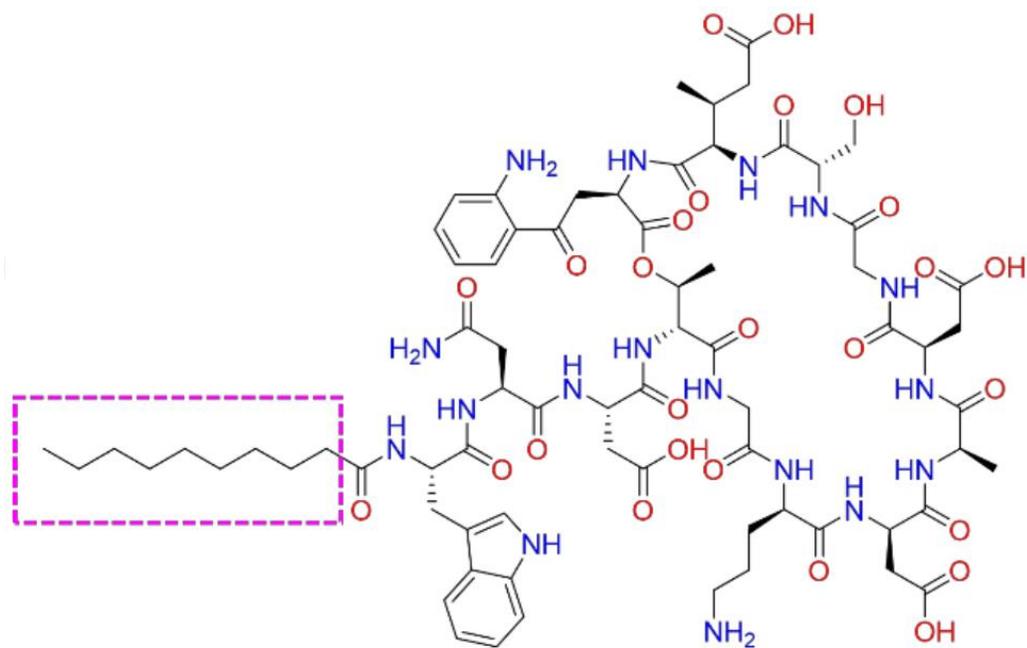
Plasma Protein Binding (PPB)

化合物がどの程度血漿タンパク質に結合するかを表した指標

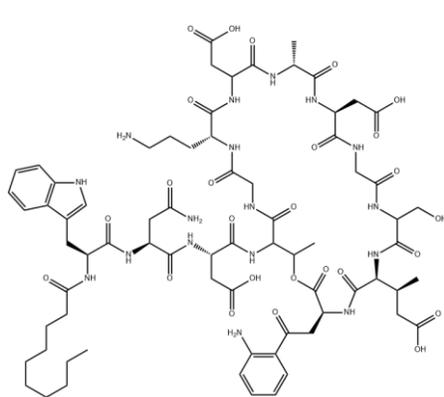
$$\text{PPB} = \frac{[\text{Bound drugs}]}{[\text{Free drugs}] + [\text{Bound drugs}]} \times 100$$

Daptomycin (PPB:85%)

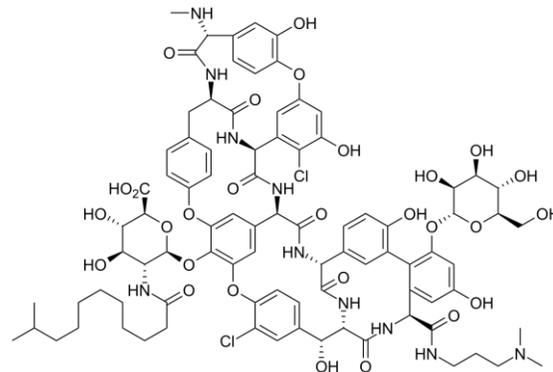
Acetyl-daptomycin (PPB:12%)



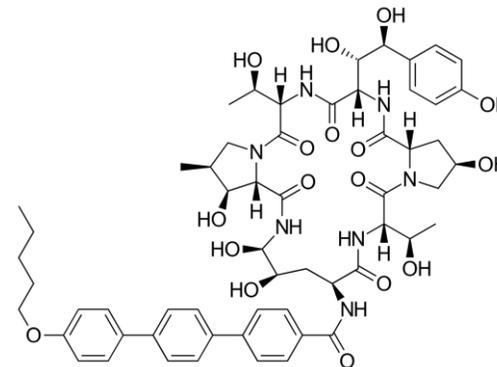
# 環状ペプチドとHSAの結晶化スクリーニング



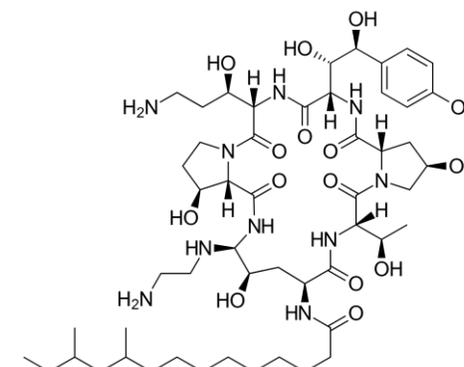
Daptomycin  
PPB:85%



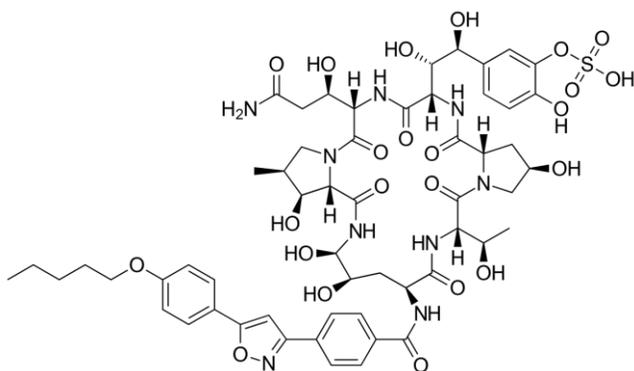
Dalbavancin  
PPB:93%



Anidulafungin  
PPB:99%



Caspofungin  
PPB:99%



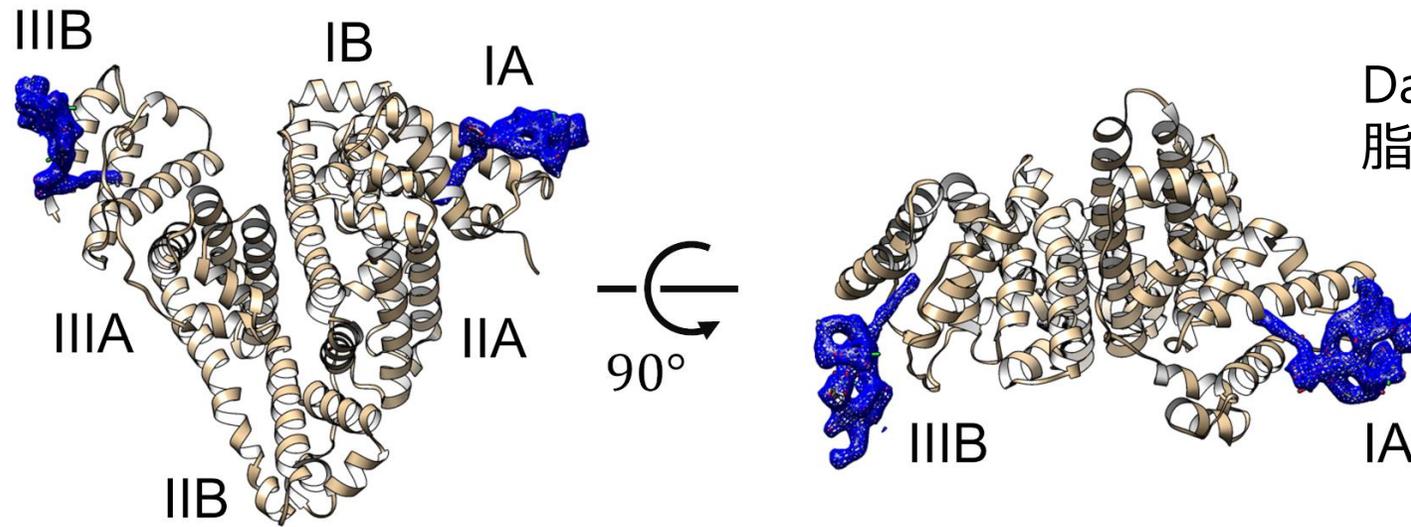
Micafungin  
PPB:85%

BL26B2とBL32XUを用いて回折実験を実施。  
ZOOシステムやDeepCenteringを利用。

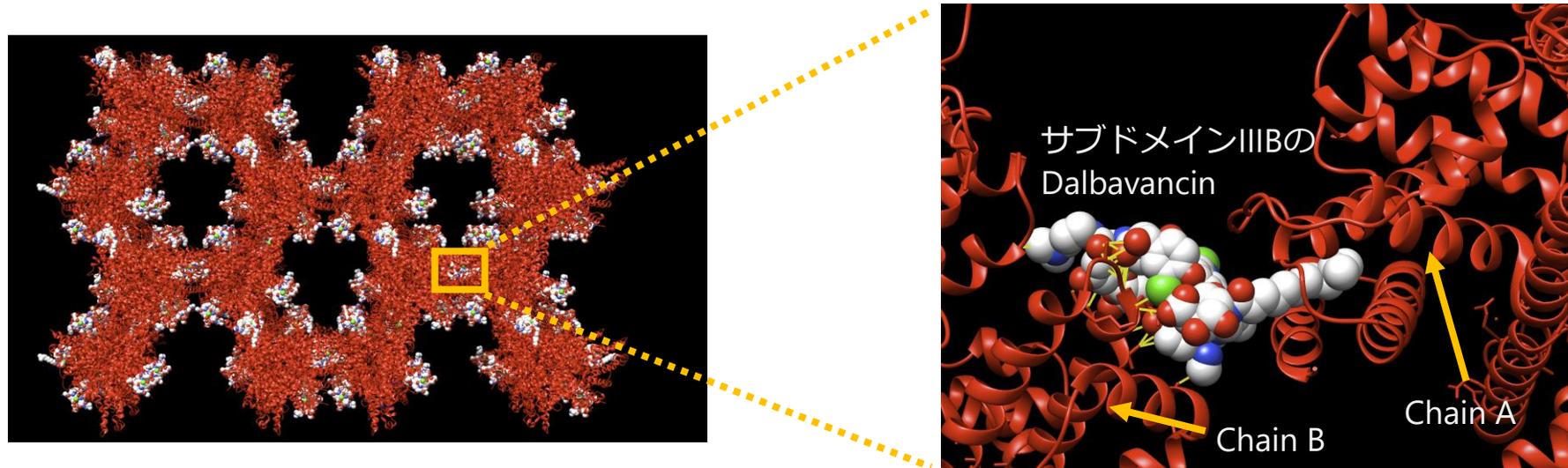


DalbavancinとHSAの複合体構造を得た。

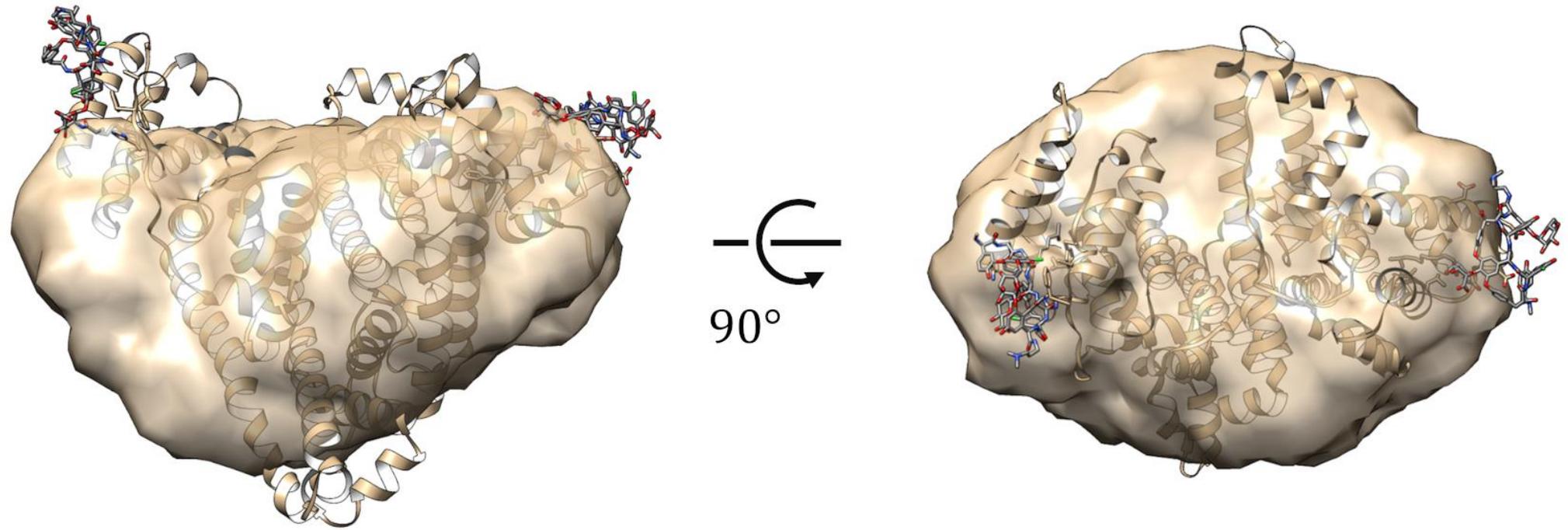
# DalbavancinとHSAの複合体構造



Dalbavancinの炭化水素鎖は  
脂肪酸結合部位に結合していた。

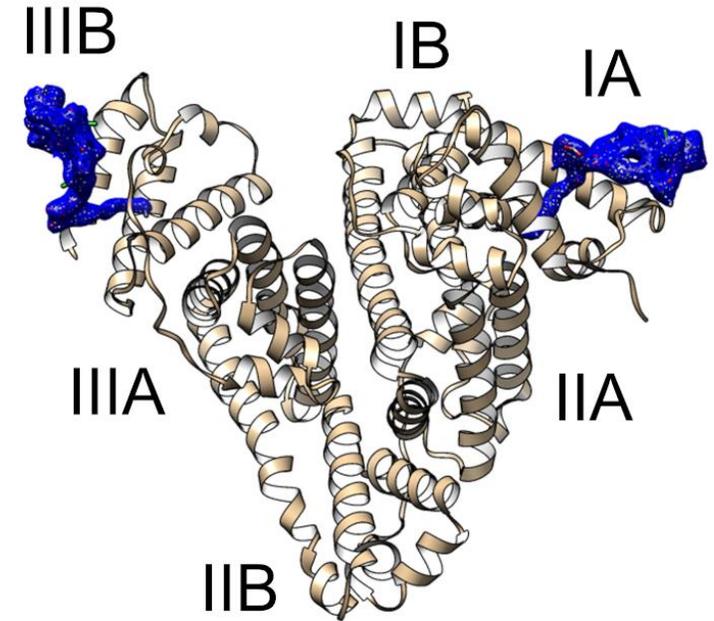
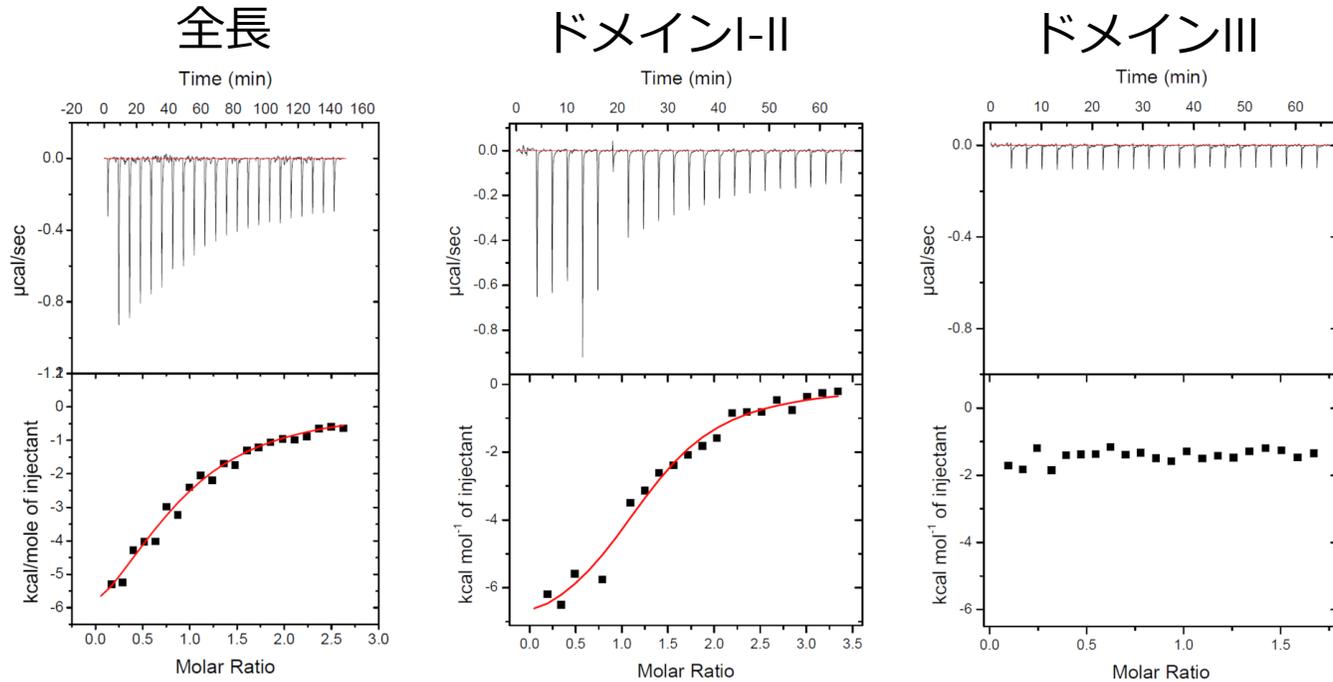


# SAXSを用いた水溶液中の状態確認



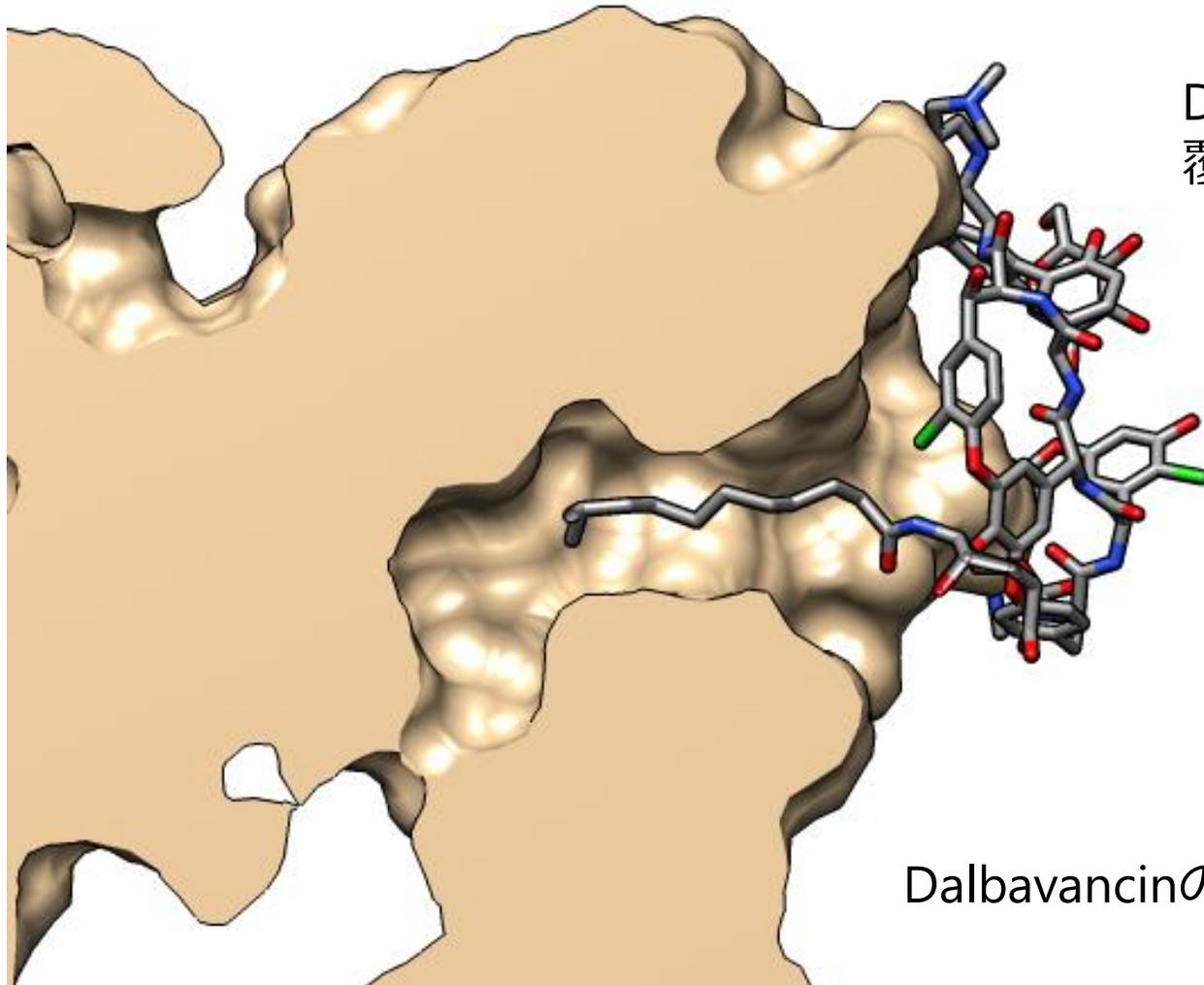
水溶液中ではモノマーで存在することが明らかになった。

# DalbavancinはサブドメインIAにのみ結合



	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$-T\Delta S$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$n$
full length	11.6	-8.9	1.9	0.84
domain I-II	5.0	-7.7	0.17	1.27

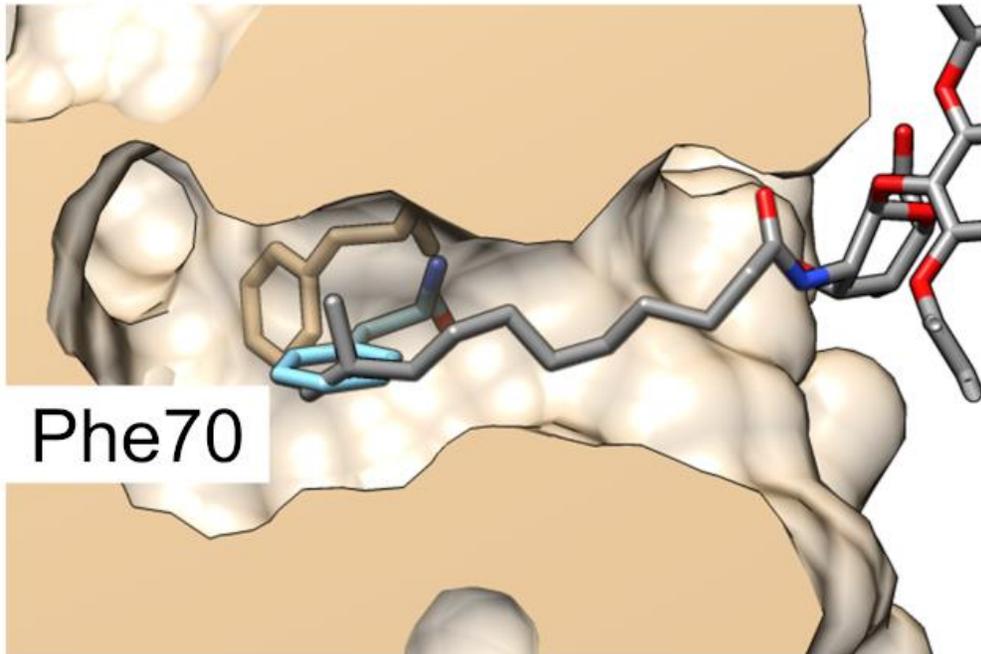
# DalbavancinとHSAの結合様式



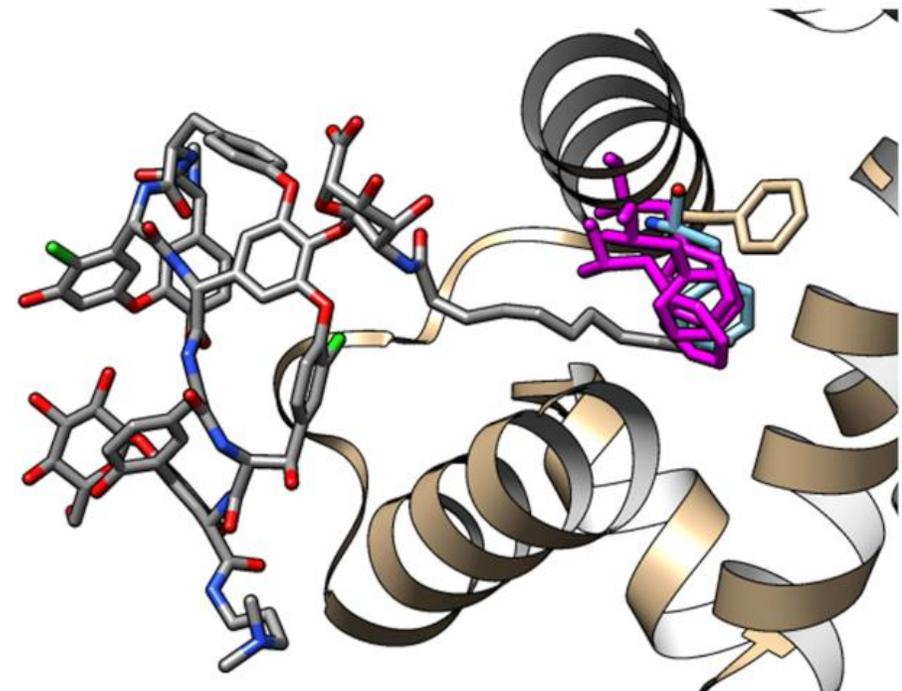
Dalbavancinの環構造は水素結合を形成  
覆いかぶさるように結合

Dalbavancinの炭化水素鎖は疎水性相互作用を形成

# Dalbavancinの結合に伴う構造変化



炭化水素鎖の結合に合わせてPhe70がスイングする。

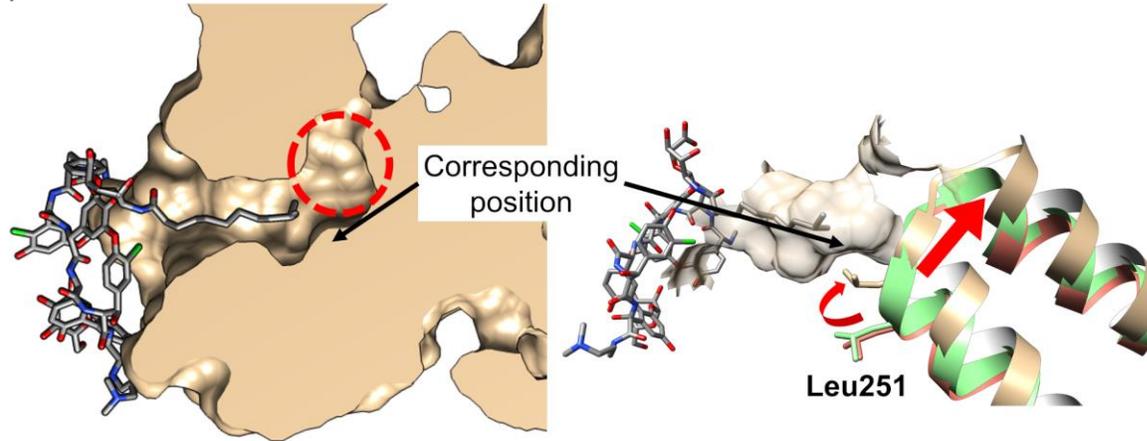


複合体からDalbavancinを削除した構造でMDを行うと、Phe70が元の位置にもどる。

**Induced-fitを示唆。**

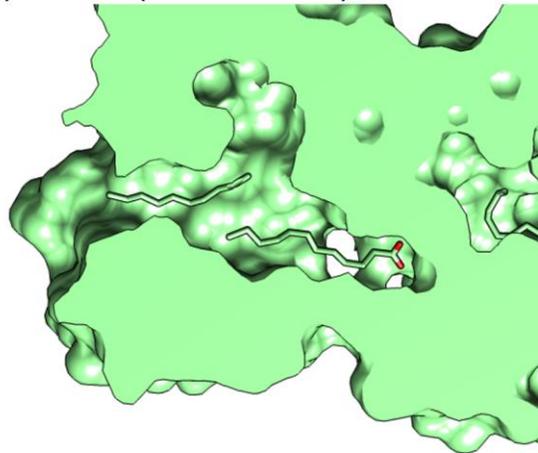
# 脂肪酸が結合したアルブミンとの比較

(a) Dalbavancin

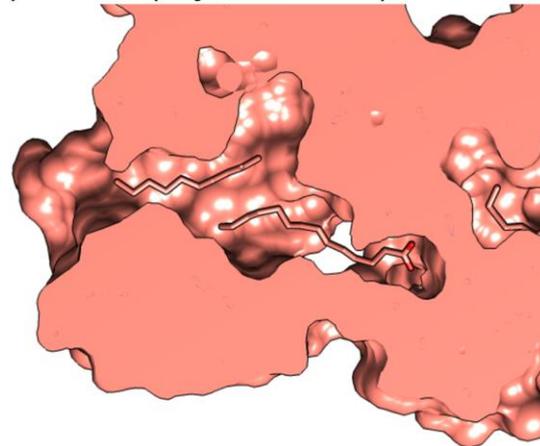


サブドメインIIAのヘリックス移動とLeu251のフリップが見られた。

(b) 1E7F (Lauric acid)

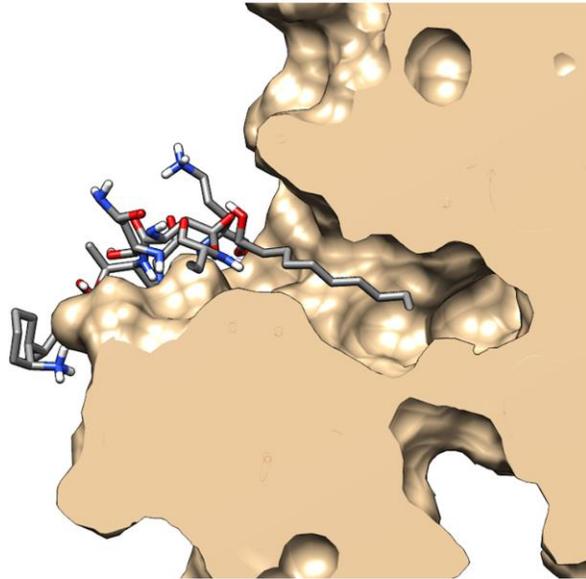


(c) 1E7G (Myristic acid)

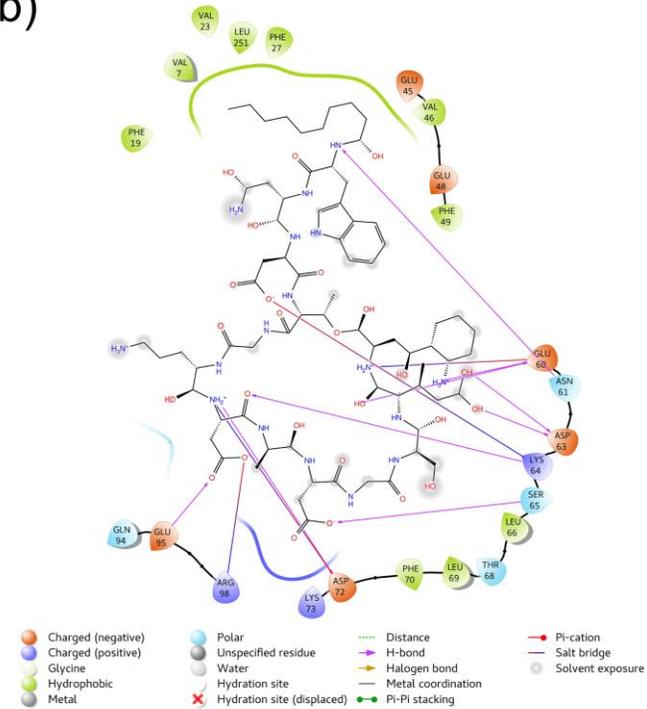


# サブドメインIAは炭化水素鎖を持つ環状ペプチドの普遍的結合部位なのか？

(a)



(b)



DaptomycinのドッキングシミュレーションではサブドメインIAへの結合が示唆された。



結晶構造解析を含め、他の炭化水素鎖を持つ環状ペプチドでも検証が必要。

## まとめ

- DalbavancinはHSAのサブドメインIAに結合する。
- Dalbavancinの炭化水素鎖の結合に合わせてPhe70のスイングが起きる。
- 炭化水素鎖は疎水性相互作用を形成する。
- 環構造は水素結合を形成し、サブドメインIAに覆いかぶさるように結合する。

# 謝辞

本研究は日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業「創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化（SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化）(JP20am0101070)」、「リード創製を指向した物理化学的品質評価技術の開発と支援(JP20am0101094)」および日本学術振興会（JSPS）から交付を受けた科研費（20K19926）の助成を受けて実施されました。