

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08157

研究課題名(和文) / -ヘテロペプチドを基盤とした新規構造と機能の創出

研究課題名(英文) Generation of regular structure with function based on alpha/beta-heteropeptides

研究代表者

尾谷 優子 (Otani, Yuko)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・講師

研究者番号：60451853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コンホメーションを制限した二環性 α -アミノ酸Ah2c誘導体を様々な天然の α -アミノ酸に連結させ、近傍の α -アミノ酸に対する構造効果を調べた。Ah2cのN末側に結合した α -アミノ酸は対応する α -アミノ酸ジペプチドに比べて取りうるコンホメーションが制限され、伸張型の α -構造を取りやすくなることを明らかにした。 α -アラニンとAh2c誘導体を交互に連結させた α -ハイブリッドペプチドを8残基ペプチドの長さまで合成し構造解析を行った結果、ハイブリッドペプチドは α -アラニン部分において局所的な構造変化があるにもかかわらず、全体として特徴的な伸張型のカーブ型構造を取ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、創薬分野では抗体医薬や環状ペプチドが注目されている。これらはタンパク質の精密な分子認識を利用することで高い活性を持ちうるが、合成法や細胞膜透過性などに改善の余地がある。非天然アミノ酸を組み込んだ人工の短いペプチドやペプチド類縁体は、活性に重要な天然ペプチドの構造を保持しつつ、コンホメーションを安定化し物性の改善に役立つことが期待される。本研究成果より堅牢な骨格を持つ二環性アミノ酸を非天然アミノ酸として用いる際の基礎的な構造情報を得ることができ、将来ペプチドやミニサイズ化したタンパク質のデザインに応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this work we focused on conformationally constrained proline-type bicyclic α -amino acids whose amide cis-trans equilibrium of these amides is completely tipped to one side. Various kinds of α -amino acids were connected to the bicyclic amine. It was found that all hetero-dimers take only cis-amide structure. It was found that the bicyclic scaffold have potential ability to constrain the conformation of neighboring α -amino acids. α -Heterooligomers from the dimer to the octamer were synthesized by coupling of the bicyclic α -amino acid and L-Ala. It is suggested that the heterooligomers take extended helical structures.

研究分野：有機化学

キーワード：非天然アミノ酸 二環性 α -プロリン タンパク質-タンパク質相互作用 構造解析 分子動力学計算 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、創薬分野では抗体医薬や環状ペプチドが注目されている。これらはタンパク質の精密な分子認識を模倣することで高い活性を持ちうるが、合成法や細胞膜透過性などに改善の余地がある。一方、非天然アミノ酸を組み込んだ人工の短いペプチドやペプチド類縁体を用いることで、活性に重要な構造を保持しつつ、コンホメーションを安定化し物性を改善することが期待される。今日までに多くの種類の非天然アミノ酸が報告されている。天然の α -アミノ酸のN-メチル化体等の誘導体のように比較的単純な構造のものから、より複雑な骨格を有するものまで、種々の非天然アミノ酸が報告されている。またアミノ基とカルボキシル基の間に炭素1つを余分に持つ β -アミノ酸は、そのペプチドオリゴマーがヘリックス構造などの特徴的な規則構造をとり、天然の α -ヘリックスミミック(模倣体)として生物活性を持つことが報告されている。一方、短いペプチドで安定な規則構造を作る際には環構造を持つアミノ酸が有用である。代表的な天然の環状アミノ酸はプロリンである。環骨格を持つプロリン型 α -および β -アミノ酸が報告されている。多くは堅い二環性骨格を持ち、コンホメーション固定化能が高いと予想されるが、ペプチドやたんぱく質に組み込んだ構造研究は少ない。その理由の一つに、二級アミンを有し三級アミドを形成するため、プロリンと同様にトランスアミド体とシスアミド体の両方が平衡で存在し、構造が複雑になる点が挙げられる。

本研究では環状の非天然アミノ酸として β -プロリンのコンホメーションを架橋により固定した二環性の β -アミノ酸 (Ah2c) を合成し、その構造特性を明らかにしてきた。この誘導体のうち、二環性骨格の橋頭位に置換基を導入した誘導体cAh2c およびtAh2cは、三級アミドを形成するにもかかわらずそのアミド回転異性体はそれぞれシスアミド体、トランスアミド体の一方に偏る。これらを非天然アミノ酸として天然の β -アミノ酸と連結させた場合の構造効果を見積もることとした。

2. 研究の目的

研究では、以下の目的のもと研究を行った。(1)天然の β -アミノ酸を各種Ah2c誘導体に連結させた場合に β -アミノ酸が受ける構造固定化効果について詳細に調べる。(2) β -アラニンとtAh2cを互い違いに連結させた β -ハイブリッドペプチドの合成と構造解析。(3)非天然型架橋 β -プロリンホモオリゴマーによる細胞のがん化に関するタンパク質-タンパク質相互作用 (p53-MDM2/MDMX 相互作用) の阻害作用を調べる。(4) Ah2cホモオリゴマーの溶液構造について分子動力学計算を用いて調べる。

3. 研究の方法

(1)天然の β -アミノ酸を各種 Ah2c 誘導体に連結させた場合に β -アミノ酸が受ける構造固定化効果について詳細に調べた。NMR による結合定数の温度依存性やラマン分光法、分子動力学計算を行った。

(2) β -アラニンと tAh2c を交互に連結させた β -ハイブリッドペプチドを 8 残基体まで合成し、各種分光学的測定や計算化学的検討により構造解析を行った。

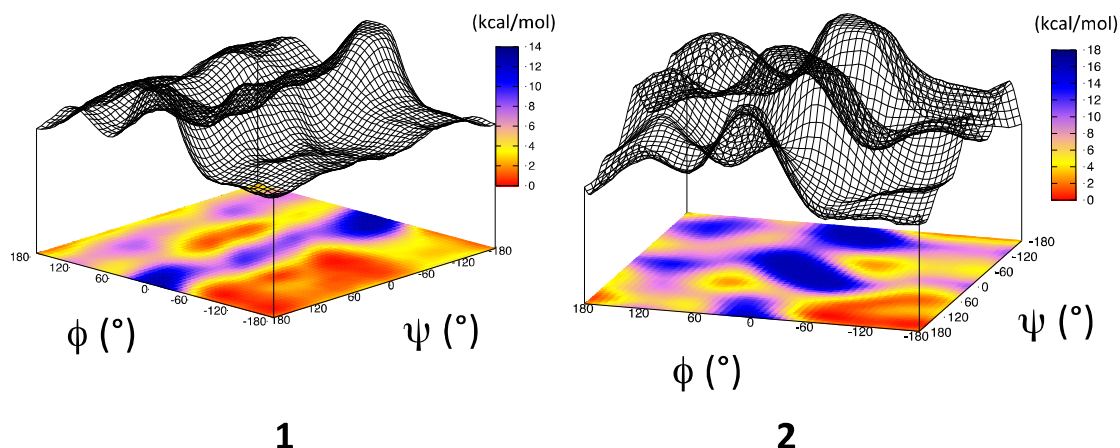
(3)天然にはないヘリックス構造を持つ架橋 β -プロリンホモオリゴマーを合成し、ELISA 法により p53-MDM2/MDMX 相互作用阻害活性を調べた。

(4)アミド結合にシス-トランス平衡が存在する二環性アミノ酸 Ah2c のホモオリゴマーの規則構造化の可能性について分子動力学計算を行い調査した。アミド結合は高い回転障壁を有す

るため、この障壁を越えてシス-トランス平衡を解析するために、アンブレラサンプリング法を用いた。

4. 研究成果

(1) Ah2c の N 末側に結合した α -アミノ酸は対応する β -アミノ酸ジペプチドに比べて取りうるコンホメーションが制限され、伸張型の β -構造を取りやすくなることを明らかにした(下図)。



(図) メタダイナミクスシミュレーションにより得られたアラニンジペプチド(1)と Ah2c 誘導体の N 末端に結合させたアラニン(2)の主鎖二面角 (ϕ 、 ψ) における自由エネルギー地形

(2) ハイブリッドペプチドは β -アラニン部分において局所的な構造変化があるにもかかわらず、全体として特徴的な伸張型のカーブ型構造を取ることを明らかにした。

(3) tAh2c ホモオリゴマーに p53-MDM2/MDMX 相互作用阻害活性が見られ、活性はオリゴマーの長さに依存することが分かった。

(4) 鎖長が長くなるにつれトランスアミド体を多く含む伸長した構造がより安定化されることが分かった。

(5) さらに研究の過程で、堅牢な骨格をもつ本非天然アミノ酸を用いたラクタムアミドの興味深い性質を見出した。すなわち、剛直な構造を持つ cAh2c の 2 量体を側鎖を環化することにより合成したラクタムアミドは、通常のアミドと異なり 360 度回転することができ、また、アミドのシス/トランス比やシス-トランス変換の速度(回転速度)が環の大きさに依存して変化することを見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

1. [Yuko Otani](#), Xin Liu, Hisashi Ohno, Siyuan Wang, Luhan Zhai, Aoze Su, Masatoshi Kawahata, Kentaro Yamaguchi, Tomohiko Ohwada
Amide nitrogen pyramidalization changes lactam amide spinning
Nature Communications, 2019, 10, article No. 461. DOI: 10.1038/s41467-018-08249-9. 査読あり

2. Luhan Zhai, Siyuan Wang, Masayuki Nara, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Yuko Otani, and Tomohiko Ohwada
Application of C-terminal 7-azabicyclo[2.2.1]heptane to stabilize β -strand-like extended conformation of a neighboring α -amino acid
The Journal of Organic Chemistry, 2018, 83, 13063-13079. DOI: 10.1021/acs.joc.8b01756 査読あり
3. Diego Antonio Ocampo Gutierrez de Velasco, Aoze Su, Luhan Zhai, Satowa Kinoshita, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Unexpected Resistance to Base-catalyzed Hydrolysis of Nitrogen Pyramidal Amides Based on the 7-Azabicyclic[2.2.1]heptane Scaffold
Molecules, 2018, 23(9), 2363. doi:10.3390/molecules23092363 査読あり
4. Akinari Sumita, Jinhee Lee, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Facile Synthesis of 2,3-Benzodiazepines Using One-pot Two-step Phosphate-Assisted Acylation-Hydrazine Cyclization Reactions
Organic & Biomolecular Chemistry, 2018, 16, 4013 – 4020. DOI: 10.1039/C8OB00708J 査読あり
5. Michiko Sasaki, Rumiko Shimabara, Tomo Takegawa, Yuri Kotomori, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada, and Kei Takeda
Steric Course of Deprotonation/Substitution of Chelating/Dipole-Stabilizing Group- Substituted α -Amino- and α -Oxynitriles
European Journal of Organic Chemistry, 2018, 30, 4128-4134. DOI: 10.1002/ejoc.201800484 査読あり
6. Yingtang Ning, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Synthesis, Structure and N-N Bonding Character of 1,1-Disubstituted Indazolium Hexafluorophosphate
Chemical Communications, 2018, 54, 1881-1884. DOI: 10.1039/C8CC00183A 査読あり
7. Yingtang Ning, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Contrasting C- and O-Atom Reactivities of Neutral Ketone and Enolate Forms of 3-Sulfonyloxyimino-2-Methyl-1-Phenyl-1-Butanones
The Journal of Organic Chemistry, 2018, 83, 203–219. DOI: 10.1021/acs.joc.7b02573. 査読あり
8. Akinari Sumita, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Electrophilic activation of aminocarboxylic acid by phosphate ester promotes Friedel-Crafts acylation by overcoming charge-charge repulsion
Organic & Biomolecular Chemistry, 2017, 15, 9398-9407. DOI: 10.1039/C7OB02158E 査読あり
9. Yuka Takahashi, Hirota Ikeda, Yuki Kanase, Kosho Makino, Hidetsugu Tabata, Tetsuta Oshitari, Satoshi Inagaki, Yuko Otani, Hideaki Natsugari, Hideyo Takahashi, Tomohiko Ohwada
Elucidation of the E-Amide Preference of N-Acyl Azoles
The Journal of Organic Chemistry, 2017, 82, 11370-11382. doi: 10.1021/acs.joc.7b01759. 査読あり
10. Reiya Taniguchi, Asuka Inoue, Misa Sayama, Akiharu Uwamizu, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Masahito Yoshida, Yoshiki Tanaka, Hideaki E. Kato, Yoshiko Nakada-Nakura, Yuko Otani, Tomohiro Nishizawa, Takayuki Doi, Tomohiko Ohwada, Ryuichiro Ishitani, Junken Aoki, Osamu Nureki
Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA6

Nature, **2017**, *548*, 356-360. DOI: 10.1038/nature23448 査読あり

11. Misa Sayama, Asuka Inoue, Sho Nakamura, Sejin Jung, Masaya Ikubo, Yuko Otani, Akiharu Uwamizu, Takayuki Kishi, Kumiko Makide, Junken Aoki, Takatsugu Hirokawa, Tomohiko Ohwada
Probing the Hydrophobic Binding Pocket of G-Protein-Coupled Lysophosphatidylserine Receptor GPR34/LPS1 by Docking-Aided Structure-Activity Analysis
The Journal of Medicinal Chemistry, **2017**, *60*, 6384-6399. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00693
査読あり
12. Yingtang Ning, Yuko Otani, Tomohiko Ohwada
Base-Induced Transformation of 2-Acyl-3-alkyl-2H-azirines to Oxazoles: Involvement of Deprotonation-Initiated Pathways
The Journal of Organic Chemistry, **2017**, *82*, 6313-6326. DOI: 10.1021/acs.joc.7b00904. 査読あり
13. Yingtang Ning, Tomoya Fukuda, Hiroataka Ikeda, Yuko Otani, Masatoshi Kawahata, Kentaro Yamaguchi, and Tomohiko Ohwada
Revisiting Secondary Interactions in Neighboring Group Participation, Exemplified by Reactivity Changes of Iminylium Intermediates
Organic & Biomolecular Chemistry, **2017**, *15*, 1381-1392. DOI: 10.1039/C6OB02719A 査読あり
14. Akinari Sumita, Yuko Otani, and Tomohiko Ohwada
Chemoselective Generation of Acyl Phosphates, Acylium Ion Equivalent, from Carboxylic Acids With Organophosphate Ester in the Presence of Bronsted Acid
Chemical Communications, **2017**, *53*, 1482-1485. DOI: 10.1039/C6CC09618B 査読あり
15. Yuko Otani, Satoshi Watanabe, Tomohiko Ohwada, and Akio Kitao
Molecular Dynamics Study of Nitrogen-Pyramidalized Bicyclic β -Proline Oligomers: Length-Dependent Convergence to Organized Structure
The Journal of Physical Chemistry B, **2017**, *121*, 100-109. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10668 査読あり
16. Sejin Jung, Asuka Inoue, Sho Nakamura, Takayuki Kishi, Akiharu Uwamizu, Misa Sayama, Masaya Ikubo, Yuko Otani, Kuniyuki Kano, Kumiko Makide, Junken Aoki, and Tomohiko Ohwada
Conformational Constraint of the Glycerol Moiety of Lysophosphatidylserine, an Emerging Lysophospholipid Mediator, Affords Compounds with Receptor Subtype Selectivity
The Journal of Medicinal Chemistry, **2016**, *59*, 3750-3776. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01925
査読あり

〔学会発表〕(計4件)

研究代表者の行った招待講演および国際学会での発表のみを記す。

- 1) Yuko Otani, Chain Length-dependent Acceleration of Rotation of Tertiary Amide Lactams, 10th International Peptide Symposium (2019)
- 2) 尾谷優子, 環状骨格を持つ非天然アミノ酸を基盤とする構造研究と応用、第16回有機合成化学談話会(湯河原セミナー2018)(2018年)
- 3) 尾谷優子, 非天然型規則構造をもつペプチドミミックの構造特性と応用、日本薬学会第138年会一般シンポジウムS09 フォルダマーの魅力-設計・構造・機能(2018年)

4) 尾谷 優子、柔らかなアミド結合を有するプロリン型非天然アミノ酸によるペプチドの構造制御、日本薬学会第137年会一般シンポジウムS05 分子の柔らかさを創薬研究に生かす 理論・計測・創製の協奏 (2017年)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
研究室のホームページ <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~yakka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。