

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13265

研究課題名(和文)細胞内タンパク質の阻害剤創出を指向したN置換型ペプチドの研究

研究課題名(英文) Synthesis and conformational studies of N-substituted beta-peptides toward development of inhibitors against intracellular proteins

研究代表者

森本 淳平 (Morimoto, Jumpei)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：70754935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜透過性の低さなどペプチドが抱える課題を克服する中分子として、ペプチドが新たな創薬の種として注目されている。

本研究では、一般的に用いられているN置換グリシン型のペプチドの主鎖を拡張したN置換ペプチドに着目し、新規合成法の開発と主鎖炭素上への置換基の導入に基づく配座制御を実現する分子設計に取り組んだ。その結果、特定の二次構造を安定に形成する新規N置換ペプチドの開発に成功した。

今後、この新規オリゴマー分子が様々な細胞内のタンパク質に対する阻害剤探索の骨格として利用されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたN置換ペプチドの構造解析に関する知見は、人工オリゴマーの化学構造と配座制御の関係について新たな知見を与えるものであり、今後様々な生体模倣型のオリゴマー分子のフォールディング研究していく上での設計指針を与えるものとして学術的意義がある。

また、本研究で開発したN置換ペプチドは、生体膜透過性が高いことから、近年注目を集めるペプチドの課題を克服し新たな創薬の可能性を拓く分子として社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Peptoid is emerging as a new therapeutic candidate that potentially overcomes the limitations of peptides for therapeutic applications such as poor membrane permeability.

In this study, we conducted a study on N-substituted β -peptide that is a derivative of regular peptoid. We established a new synthetic method for N-substituted β -peptide and developed a molecular design in which substituents are introduced on backbone carbons of the oligomers to realize conformationally constrained N-substituted β -peptides. As a result, we successfully produced new N-substituted β -peptides that form stable secondary structures.

The new synthetic oligomers produced in this study are potentially useful as scaffolds for inhibitors of intramolecular proteins.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ペプチド N置換ペプチド 配座制御 構造解析 固相合成法 生体膜透過性 フォルダマー 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

ペプチドのような中程度の大きさの分子が中分子医薬と呼ばれ、次世代の医薬品として注目されているが、その生体膜透過性の低さゆえに、細胞内のタンパク質を阻害することが困難であるという課題を抱えている。ペプチドの細胞膜透過性を克服する分子として、ペプトイドと呼ばれる *N* 置換グリシンのオリゴマーが有望であるが (R. J. Simon, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367-9371)、そのコンフォメーションが柔軟であることや三次元構造多様性が乏しいことから、薬剤として重要な性質である生体分子に強く相互作用するという能力が十分でないという課題を抱えていた。

2. 研究の目的

本研究では、*N* 置換ペプチドの主鎖骨格を β アミノ酸へと拡張した *N* 置換 β ペプチド (B. C. Hamper, *et al., J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 708-718) に着目し、この分子の配座制御に取り組むことで、ペプチドでは実現が困難であった細胞内タンパク質を阻害する中分子の実現を目指した。

3. 研究の方法

特定の立体配座を安定に形成するような *N* 置換 β ペプチドを実現するために、主鎖炭素上に不斉置換基を導入する戦略をとることとし、下記のような4つの研究を実施した。

- (1) 主鎖炭素上に不斉置換基を有する *N* 置換 β ペプチドを合成するために、*N* 置換 β ペプチドの新規合成法の開発を行なった。
- (2) 合成した *N* 置換ペプチドの三次元構造を明らかにするために、NMR スペクトルの測定や結晶構造解析を行なった。また、配座制御の理論的考察を行うために、量子化学計算も行なった。
- (3) 通常のペプチドに対する *N* 置換ペプチドの有用性を示すために、生体膜透過性の評価を行なった。また、この評価を通して、より簡便な生体膜透過性評価系の必要性を感じ、蛍光増大型反応を利用した簡便かつ迅速な生体膜透過性評価系の構築も行なった。
- (4) 本研究で合成法の開発や構造解析を行なった *N* 置換 β ペプチドについて、大規模ライブラリーからの細胞内タンパク質阻害剤の探索を実現することを見据え、マイクロビーズを用いた非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドのスクリーニングにも取り組んだ。

4. 研究成果

上記の研究方法に対応する主な成果として以下の4つのものを得た。

- (1) *N* 置換 β ペプチドの新規合成法の開発：Fmoc 保護された β アミノ酸の縮合とアルデヒドを用いた還元的アミノ化を繰り返すことで、*N* 置換 β ペプチドを合成する新規合成法を開発した。この手法を用いることで、主鎖炭素上やアミド窒素上に様々な置換基を有する β ペプチドのオリゴマーを合成できることを示した。(図1) (雑誌論文③) また、*N* 末端と *C* 末端を連結した大環状型の β ペプトイドを合成する手法も開発した。我々の報告と前後して、Lim らが福山アミン合成を利用した *N* 置換 β ペプチドの我々とは異なる合成法を報告した。(K. J. Lee, *et al. Org. Lett.* **2016**, *18*, 3678-3681. G. A. Sable, *et al. Org. Lett.* **2018**, *29*, 2526-2529. G. A. Sable, *et al. Molecules* **2019**, *24*, 178.) 我々の手法とこれらの手法を併用することでさらに構造多様性の高い *N* 置換 β ペプチドの合成が可能になると期待される。

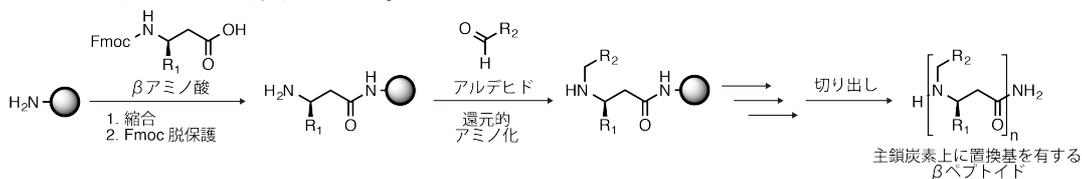


図1. β アミノ酸の縮合とアルデヒドの還元的アミノ化による β ペプトイドの合成法

- (2) *N* 置換 β ペプチドの NMR 測定を行うことによって、主鎖二面角 ω のシス・トランス比を決定し、置換基とこの二面角の制御の関係を明らかにした。具体的には、¹H NMR スペクトル上の 4-5 ppm 付近に観測される主鎖の β 炭素上のプロトンの積分比からシス・トランス比を決定した。シス・トランスの帰属は、核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用して決定した。(図2) 結晶構造解析においては、いくつかのペプチドで針状結晶が得られたものの、質の高い回折データを得ることができず、結晶構造を明らかにすることはできなかった。一方で、CD スペクトル測定により、合成した *N* 置換 β ペプチドが特有の二次構造を安定に形成することが示唆された。特に、大環状化したペプチドについては、CD スペクトルより、熱安定性の高い二次構造を形成していることが示唆された。また、量子化学計算により、最小単位の再安定配座を決定し、オリゴマーが形成する立体構造の予測構造を得た。

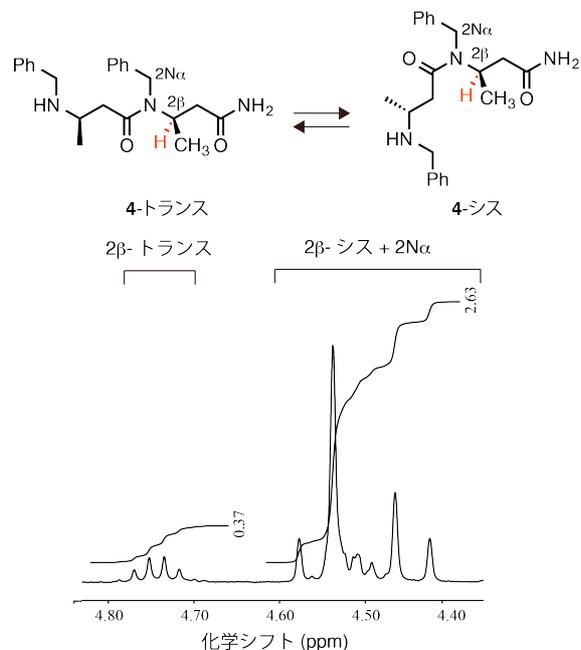


図 2. *N*置換βペプチドの主鎖のβ炭素上のプロトンによるシス・トランス比の決定例

- (3) *N*置換βペプチドの膜透過性を人工膜透過性評価系 (PAMPA) により評価し、*N*置換βペプチドが通常のペプチドよりも高い膜透過性を示すことを明らかにした。また、このようなペプチドおよびペプチドミメティクスの膜透過性評価をより迅速かつ簡便に行うことを可能とするために、蛍光増大型反応を利用した新規膜透過性評価系の構築を行なった。これにより、多数のペプチドの膜透過性を、生体分子が共存する夾雑系においても、簡便かつ迅速に評価することが可能となった。(図 3) (雑誌論文①)

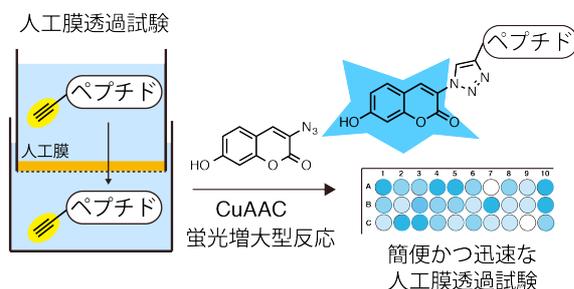


図 3. 蛍光増大型反応を利用した新規膜透過性評価系

- (4) 非天然型ペプチドのスクリーニング系を確立するために、One-Bead One-Compound 法 (K. S. Lam, *et al.*, *Nature* **1991**, *354*, 82–84) を用いて、非タンパク質性アミノ酸の代表例である D アミノ酸と α,α -二置換アミノ酸を含むペプチドの大規模ライブラリーを構築し、がん関連タンパク質である MDM2 に対するリガンドを取得した。(雑誌論文②)

今後の展望として、本研究を通して習得した技術を活用して、*N*置換βペプチドの大規模ライブラリーの構築とスクリーニングが実施され、細胞内のタンパク質機能を阻害する化合物が取得されていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Jumpei Morimoto, Rei Amano, Shinsuke Sando, A Parallel Permeability Assay of Peptides across Artificial Membrane and Cell Monolayers Using a Fluorogenic Reaction, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **17**, **2019**, 2887–2891.
- ② Jumpei Morimoto, Yuki Hosono, Shinsuke Sando, Isolation of a peptide containing D-amino acid residues that inhibits the α -helix-mediated p53-MDM2 interaction from a one-bead one-compound library, *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, **28**, **2018**, 231–234.
- ③ Jumpei Morimoto, Yasuhiro Fukuda, Shinsuke Sando, Solid-Phase Synthesis of β -Peptoids with Chiral Backbone Substituents Using Reductive Amination, *Org. Lett.* **19**, **2017**, 5912–5915.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Jumpei Morimoto, Yasuhiro Fukuda, Takumu Watanabe, Shinsuke Sando, Oligo(*N*-substituted

alanines) as a Peptoid with Defined Shape in Water: Synthesis and Conformational Studies, *10th International Peptide Symposium, 2018*.

- ② Yasuhiro Fukuda, Jumpei Morimoto, Shinsuke Sando, Conformational Studies of Oligo(*N*-substituted alanines) by X-ray Crystallographic Analysis, *10th International Peptide Symposium, 2018*.
- ③ Yuki Hosono, Yui Sakurai, Jumpei Morimoto, Shinsuke Sando, Evaluation of the Effect of Amide-to-ester Substitution on Membrane Permeability and Tertiary Structure of Peptides, *10th International Peptide Symposium, 2018*.
- ④ Jumpei Morimoto, Jungyeon Kim, Yasuhiro Fukuda, Shinsuke Sando, Design and Synthesis of Conformationally Constrained β -Peptoids with Chiral Backbone Substituents and Macrocyclization, 日本化学会第 98 春期年会, 2018 年
- ⑤ 福田泰啓、森本淳平、山東信介、配座制御されたオリゴ *N* 置換アラニンの合成、第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017、2017 年
- ⑥ Yasuhiro Fukuda, Jumpei Morimoto, Shinsuke Sando, Solid-phase synthesis of oligo-*N*-substituted peptides with chiral backbone substituents using reductive amination, *The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2017*

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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。