

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19495

研究課題名(和文) -トリフルオロメチルアミノ酸含有ペプチドの2次構造からの創薬へのアプローチ

研究課題名(英文) Secondary structure analysis of peptides having alpha-(trifluoromethyl)amino acids and its approach to medicinal chemistry

研究代表者

田中 正一 (TANAKA, Masakazu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：00227175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：鏡像異性体の混ざりであるラセミ体の トリフルオロメチル( CF<sub>3</sub>)-アミノ酸をジアステレオマー(立体異性体の一種)にして分離して、光学活性体とする方法を開発した。また、天然物のキニン由来のキラル相関移動触媒(不斉触媒の一種)を数種類合成し、共役付加アルキル化反応を検討した結果、78% eeの鏡像体過剰率の生成物を得ることができた。光学活性な CF<sub>3</sub>-アラニンを導入した2つのL-Leuペプチドを合成し、X線結晶解析と機器測定により結晶状態と溶液中での立体構造の解析を行い、CF<sub>3</sub>-アラニンがペプチド立体構造へ与える影響について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリフルオロメチル( -CF<sub>3</sub>)化された化合物は、医薬品の探索研究において重要である。しかし、光学活性な -CF<sub>3</sub>-アミノ酸を導入したペプチドについての研究は限られていた。今回、 -CF<sub>3</sub>-アミノ酸の光学活性体の合成法を開発し、光学活性な(S)-あるいは(R)- -CF<sub>3</sub>-アラニン(SとRは光学活性体の鏡像体を意味する)をL-ロイシン中に導入したペプチドの立体構造を調べたところ、導入する鏡像体によりペプチドC末側の立体構造に違いが見られることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The optical resolution method of racemic -trifluoromethyl (CF<sub>3</sub>)-amino acids using chiral BINOL esters was developed. Also, we synthesized several chiral phase-transfer catalysts derived from quinidine. Using a chiral phase-transfer catalyst, we synthesized an optically active CF<sub>3</sub>-amino acid with 78% ee. We synthesized diastereomeric two peptides Cbz-(L-Leu)<sub>2</sub>-{(S)- or (R)-CF<sub>3</sub>-Aib}-(L-Leu)<sub>2</sub>-OMe, and studied the preferred conformation of peptides using <sup>1</sup>H NMR and CD spectra, and also X-ray crystallographic analysis.

研究分野：薬化学

キーワード：有機化学 生体分子 薬学 分子認識 ペプチド タンパク質 2次構造

## 1. 研究開始当初の背景

分子量 500 を超える中分子による創薬研究が注目を集めている。中分子であるペプチドによりリード化合物を探索する際の問題に、ペプチドのフレキシビリティの高さがある。一定の定まったペプチド2次構造を構築するために、ジスルフィド結合-S-S-を利用したり、環状ペプチド構造にする手法がとられている。別の方法として、フォールドマー（構成単位を並べてオリゴマーにすると一定の二次構造を形成する分子）を利用する方法がある。最近、AstraZeneca 社の Valeur らは総説(*J. Med. Chem.*, 2016)にて、フォールドマー創薬化学について、タンパク質-タンパク質相互作用阻害剤やリガーゼ阻害剤や転写因子阻害剤の創薬では、従来の低分子創薬化学では達成困難で、フォールドマーの応用がこの領域で将来性があると述べている。フォールドマーの1つに配座自由度を制限するジ置換アミノ酸をペプチドに導入する方法がある。特に、ジ置換アミノ酸ジメチルグリシン(Aib)は、古くからヘリカルペプチドの構築に用いられており、たくさんの文献が発表されていることから、この Aib のペプチド・創薬化学領域での重要性が分かる。

## 2. 研究の目的

最近の合成化学・有機化学で脚光を浴びているのが、フッ素化あるいはトリフルオロメチル化( $\alpha$ -CF<sub>3</sub>)反応とその化合物である。しかし、アミノ酸・ペプチドへのフッ素の導入に関しては合成研究に限られたものである。そこで、光学活性  $\alpha$ -CF<sub>3</sub>-アミノ酸を導入したペプチドの合成と2次構造特性を研究し、CF<sub>3</sub>-アミノ酸によるフォールドマー創薬化学への応用を行う。具体的には、CF<sub>3</sub>-アミノ酸として CF<sub>3</sub>-Aib 等を不斉合成し（段階1）、このアミノ酸 CF<sub>3</sub>-Aib をペプチドの中に導入する効率的な方法を見つけ出す（段階2）。さらに、CF<sub>3</sub>-Aib 含有ペプチドの2次構造解析を行い、CF<sub>3</sub>-アミノ酸の構造特性を明らかとし（段階3）、創薬研究として細胞膜透過性ペプチドへの利用を検討する（段階4）。特に、CF<sub>3</sub>-アミノ酸では、フッ素 F とアミド HN との間での分子内水素結合が形成され、従来ないペプチド2次構造を形成する可能性が考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 段階1：CF<sub>3</sub>-アミノ酸の不斉合成：

① ラセミ CF<sub>3</sub>-アミノ酸の BINOL エステルによる光学分割： Burger らは、ラセミ体の CF<sub>3</sub>-Aib を 2-アルコキシカルボニルイミン-3,3,3-トリフルオロプロピオネートを原料として合成している。代表者は、予備実験によりラセミ体 CF<sub>3</sub>-アミノ酸を合成し、その後、(R)-BINOL エステルに変換すると、カラムにより光学分割が可能であり光学活性 CF<sub>3</sub>-アミノ酸を合成できることを見つけている。この方法により、CF<sub>3</sub>-Aib の数グラムスケールでの合成が可能か、どのようなアミノ酸に適応できるかを調べる。

② 不斉反応を利用した方法： 基質イミン体にキラル補助剤を導入したジアステレオ選択的 1,2-付加反応あるいはキラルなリガンドを用いた不斉触媒による不斉 1,2-付加反応により、光学活性な CF<sub>3</sub>-アミノ酸の合成ができないかを検討する。また、不斉トリフルオロメチル化に

より光学活性な CF<sub>3</sub>-アミノ酸の合成ができないかなどを検討する。

(2) 段階 2 : CF<sub>3</sub>-Aib 含有ペプチドの合成研究 : キラルな CF<sub>3</sub>-Aib をペプチドの中に導入する反応条件を精査する。N 末端が保護された Pg-CF<sub>3</sub>-Aib-OH の C 末端は、比較的反応し易く予備実験にてペプチドへの導入に成功している。これに対して、H-CF<sub>3</sub>-Aib-OR の N 末端でのペプチド結合形成はアミノ基の求核性が低いため通常の方法では困難である。しかし、Brigaud らは反応中間体として酸無水物を經由することにより Fmoc-AA-{CF<sub>3</sub>-Aib}-O*t*Bu の合成ができることを報告しており、代表者も再現性を得ている。そこで、酸無水物あるいは酸フルオライドを形成してカルボキシ基を活性化する方法を各種精査して、CF<sub>3</sub>-Aib をペプチド中に導入する条件の最適化を図る。最適化されたカップリング条件を用いて、CF<sub>3</sub>-Aib ペプチドを合成する。ペプチドは液相法による合成を検討する。

(3) 段階 3 : CF<sub>3</sub>-アミノ酸含有ペプチドの 2 次構造研究 :

① 溶液状態でのコンフォメーション解析 : FT-IR、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、CD スペクトルにより行う。FT-IR では、NH 伸縮領域(3200-3500 cm<sup>-1</sup>)を調べることにより、水素結合の存在を調べる。<sup>1</sup>H NMR では、ROESY スペクトルの測定により、NH プロトン間の NOE 相関を測定して 2 次構造の確認を行い、<sup>13</sup>C NMR の測定も加えて、さらにダイナミクス NMR の測定によりジアステレオマーのコンフォメーションに相当する右巻きと左巻きの 2 次構造の存在を調べる。CD スペクトルによる 2 次構造解析では、192 nm 並びに 208 nm と 222 nm の極大の正負によりヘリカル構造の左右の巻き方の優先性の決定を行う。

② 結晶状態での 2 次構造解析 : ジ置換アミノ酸からなるペプチドは、配座自由度制限のため単結晶が得られやすい特徴がある。特に、L-Leu ペンタペプチド Cbz-(L-Leu)<sub>2</sub>-{(S)-CF<sub>3</sub>-Aib}-(L-Leu)<sub>2</sub>-OMe の X 線結晶解析を目指し、ジアステレオマーとの比較を行う。

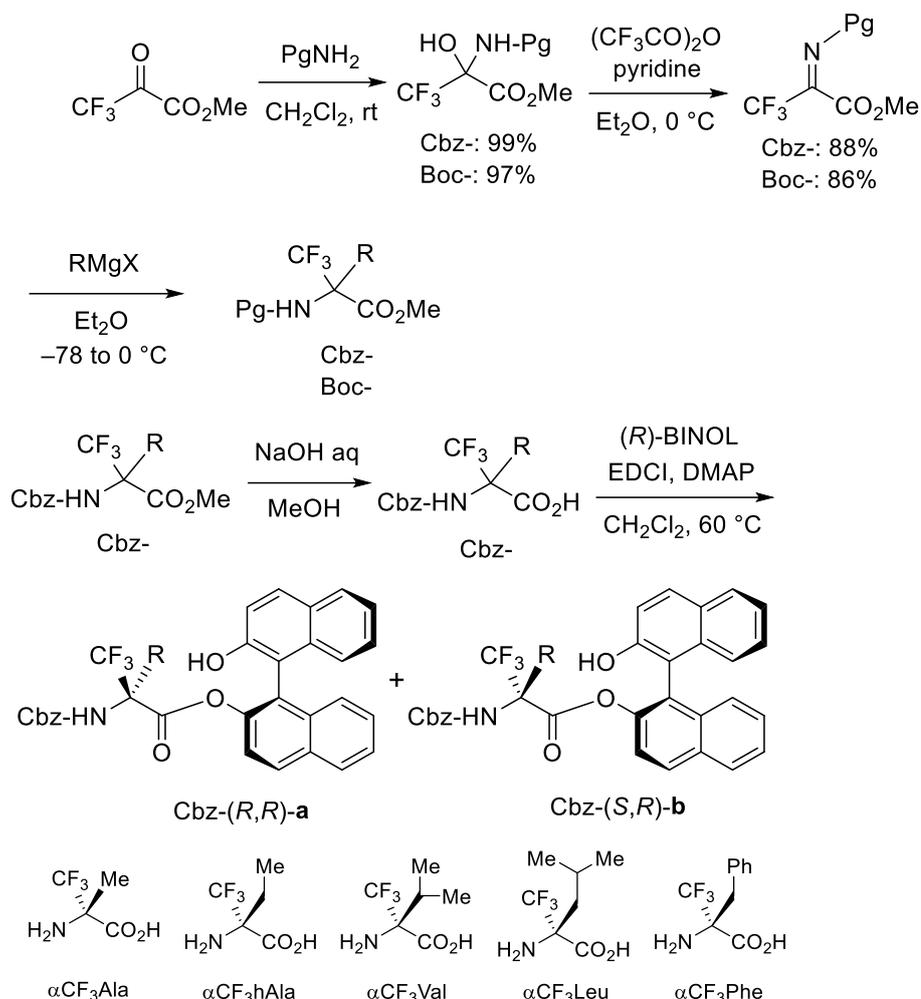
(4) 段階 4 : CF<sub>3</sub>-アミノ酸含有ペプチドの細胞膜透過性 :

2 次構造解析の成果を考慮しながら、細胞移行性ペプチドへの応用を行う予定であった。キラル α-CF<sub>3</sub>-Aib や α-CF<sub>3</sub>-アミノ酸を導入したヘリックスの片側に CF<sub>3</sub> 脂溶性部位がくるペプチドを合成し、その細胞膜透過性を調べる。そして、細胞膜透過性に優れた α-CF<sub>3</sub>-アミノ酸導入ペプチドについては、ルシフェラーゼタンパク質コード pDNA の細胞内への輸送実験を行う予定であった。

## 4. 研究成果

(1) αCF<sub>3</sub>-アミノ酸の不斉合成 :

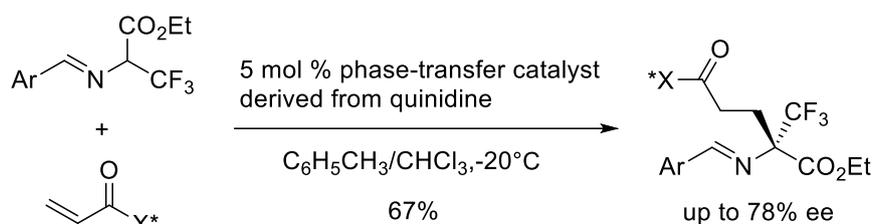
① ラセミ αCF<sub>3</sub>-アミノ酸の BINOL エステルによる光学分割 : Burger らの方法に準じて、ラセミ体の αCF<sub>3</sub>-ジ置換アミノ酸を 2-アルコキシカルボニルイミン-3,3,3-トリフルオロプロピオネートを原料として合成した。そして、(*R*)-BINOL エステルに変換すると、αCF<sub>3</sub> アラニン、αCF<sub>3</sub> バリン、αCF<sub>3</sub> ロイシン、αCF<sub>3</sub> フェニルアラニンなどのジアステレオマーをカラムクロマトグラフィーやプレパラティブ TLC により分離することが可能であり、光学活性 αCF<sub>3</sub> アミノ酸を数種類ほど合成できた。この方法により、αCF<sub>3</sub>-Aib を数百 mg スケールで合成した。しかし、この方法では煩雑な分離操作を必要としており、光学活性 αCF<sub>3</sub> アミノ酸合成の収量等の改善は困難であり、グラムスケールでの合成は大変であった。



スキーム1

② 不斉反応を利用した方法：基質イミン体にキラル補助剤を導入したジアステレオ選択的1,2-付加反応あるいは不斉触媒による不斉1,2-付加反応により、光学活性な $\text{CF}_3$ -アミノ酸の合成ができないかを検討したが、上手く反応が進行しなかった。また、アミノ酸の不斉合成として、8-( $-$ )-フェニルメントールを不斉補助基として利用した方法を検討したが、トリフルオロピルビン酸とフェニルメントール等からエステルの合成ができずこの方法は断念した。

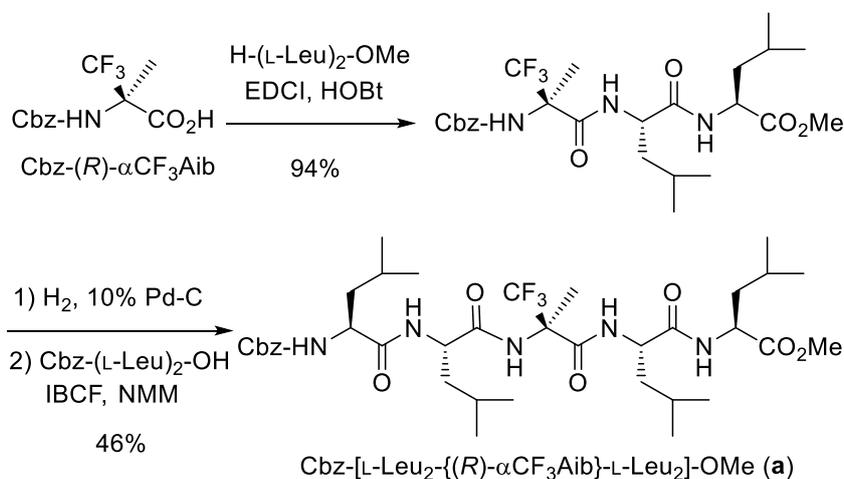
また、不斉トリフルオロメチル化により光学活性な $\text{CF}_3$ -アミノ酸の合成ができないかを検討したが、反応が進行しなかった。さらに、キラル相関移動触媒を用いた不斉アルキル化により光学活性 $\text{CF}_3$ -アミノ酸の合成ができないかを検討した。その結果、アルキルハライドを用いた不斉アルキル化は反応は進行しなかったが、共役付加型のアルキル化が進行し、中程度の鏡像体過剰率の $\text{CF}_3$ -アミノ酸が合成できることが判明した。そこで、既存のキラル相関移動触媒である丸岡触媒のほかに、新規なキニジン由来のキラル相関移動触媒を設計合成した。そして、数種類のキニジン由来キラル相関移動触媒を用いて、反応条件、基質の構造等の条件を変更し鏡像体過剰率を上げることを試みたところ、反応溶媒の影響が大きいことが分かり、 $-20^\circ\text{C}$ の低温にてトルエンとクロロホルムの混合溶媒中にて反応を行うと、78%eeの鏡像体過剰率の生成物が67%で得られることが分かった。さらに、マイケルアクセプターの構造、シッフ塩基の構造などを検討したが、低収率にて生成物は得られるが鏡像体過剰率は15-41% eeと低いものであった。



スキーム2

(2)  $\alpha CF_3$ -Aib 含有ペプチドの合成研究：

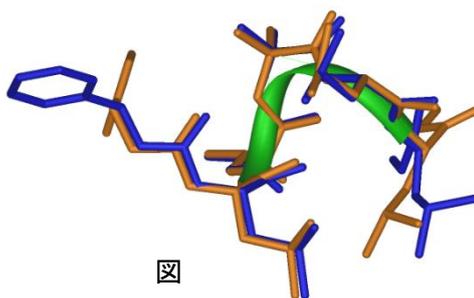
キラルな  $\alpha CF_3$ -Aib をペプチドの中に導入する反応条件を精査した。また、Brigaud らの報告に従い、反応中間体として酸無水物を経由する方法により、液相法により  $\alpha CF_3$ -Aib をペプチド中に導入した2つの L-Leu ペンタペプチド Cbz-(L-Leu)<sub>2</sub>-{(S)- or (R)-CF<sub>3</sub>-Aib}-(L-Leu)<sub>2</sub>-OMe を合成した。



スキーム3

(3)  $\alpha CF_3$ -Aib 含有ペプチドの2次構造解析：

キラルな  $\alpha CF_3$ -Aib を含有する2つの L-Leu ペンタペプチドは、結晶になったのでX線結晶解析を行い、ジアステレオマー間での2次構造の比較を行った(右図)。結晶状態で両ペプチドは右巻きの 3<sub>10</sub>-ヘリックス構造を形成し、N 末側3残基のコンフォメーションは一致していたが、C 末端と C 末端から2番目のアミノ酸残基のねじれ角の相違が見られた。また、F···H-N 型の分子内水素結合は見られなかった。溶液状態でのコンフォメーション解析は、CD スペクトルではペンタペプチドの長さでは解析が不適であった。しかし、FT-IR スペクトルではヘリックス構造の形成が示唆され、NOESY NMR、スペクトルでは、2つのペプチドの NH 相関に違いが見られた。



CF<sub>3</sub>基は、脂溶性の性質を持ち、電子吸引性の性質を有しており、医薬品によくみられる構造である。したがって、 $\alpha CF_3$ -アミノ酸とそのペプチドのコンフォメーション解析の結果はペプチド医薬品の開発において貴重な情報となると思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Atsushi Ueda Misuzu Ikeda Takuya Kasae Mitsunobu Doi Yosuke Demizu Makoto Oba Masakazu Tanaka   | 4. 巻<br>5           |
| 2. 論文標題<br>Synthesis of Chiral Trifluoromethyl , Disubstituted Amino Acids and Conformational Analysis of L Leu Based Peptides with (R) or (S) Trifluoromethylalanine | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>ChemistrySelect   | 6. 最初と最後の頁<br>10882 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/slct.202002888   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Misuzu Ikeda, Takuya Kasae, Atsushi Ueda, Makoto Oba, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka               |
| 2. 発表標題<br>Synthesis of alpha-trifluoromethyl alpha-amino acids and conformational analysis of their peptides |
| 3. 学会等名<br>第56回ペプチド討論会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上田 篤志、池田 美鈴、大庭 誠、田中 正一               |
| 2. 発表標題<br>キラル相間移動触媒を用いる -トリフルオロメチル化アミノ酸の不斉合成研究 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第140年会                          |
| 4. 発表年<br>2020年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田 美鈴, 笠江 卓矢, 上田 篤志, 大庭 誠, 土井 光暢, 田中 正一 |
| 2. 発表標題<br>光学活性 -トリフルオロメチル化置換アミノ酸の合成とそのペプチドの2次構造解析 |
| 3. 学会等名<br>第55回化学関連支部合同九州大会                        |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>池田 美鈴、笠江 卓矢、上田 篤志、大庭 誠、土井 光暢、田中 正一         |
| 2. 発表標題<br>光学活性 $\alpha$ -トリフルオロメチル化ジ置換アミノ酸とそのペプチドの合成 |
| 3. 学会等名<br>第50回若手ペプチド夏の勉強会                            |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Atsushi Ueda, Misuzu Ikeda, Takuya Kasae, Makoto Oba, Mitsunobu Doi, Masakazu Tanaka             |
| 2. 発表標題<br>Synthesis and analysis of $\alpha$ -trifluoromethylated $\alpha$ -amino acids and their peptides |
| 3. 学会等名<br>The Fourteenth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (国際学会)         |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田 美鈴、笠江 卓矢、上田 篤志、大庭 誠、土井 光暢、田中 正一                  |
| 2. 発表標題<br>光学活性 $\alpha$ -トリフルオロメチル化ジ置換アミノ酸を含有するペプチドの合成と二次構造解析 |
| 3. 学会等名<br>第35回日本薬学会九州支部大会                                     |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ueda, Atsushi; Kasae, Takuya; Oba, Makoto; Doi, Mitsunobu; Tanaka, Masakazu   |
| 2. 発表標題<br>Synthesis of enantiomerically pure $\alpha$ -trifluoromethyl $\alpha$ -amino acids and conformational studies of their L-leucine-based peptides |
| 3. 学会等名<br>254th ACS National Meeting & Exposition (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>池田 美鈴, 笠江 卓也, 上田 篤志, 大庭 誠, 土井 光暢, 田中 正一   |
| 2. 発表標題<br>キラルな -トリフルオロメチルジ置換アミノ酸を導入したペプチドの合成と二次構造解析 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第138年会                               |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 研究紹介/薬化学<br><a href="http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/research/rsh_pc.html">http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/research/rsh_pc.html</a> |
|---|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|