

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03363

研究課題名（和文）アルケン型ペプチド結合等価体の分子特性の解明と創薬応用

研究課題名（英文）Chemical Basis and Medicinal Application of Alkene Dipeptide Isosteres

研究代表者

鳴海 哲夫（Narumi, Tetsuo）

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：50547867

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：アルケン型ペプチド結合等価体の分子特性を解明するために、ペプチドの構造形成や機能発現に重要な非共有結合性相互作用のミミック効果について検討し、アルケン上の置換基を起点とする立体効果や立体電子効果が、活性発現や分子認識に重要なペプチドのコンフォメーションの安定化に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの知見をもとに、グアニン四重鎖構造に選択的に結合する中分子ペプチドの創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、中分子ペプチド創薬において有用なバイオイソスターであるアルケン型ペプチド結合等価体について、それぞれの等価体には化学的特徴や固有の機能があり、アルケン上の置換基が特性を決めることを明らかにした点にある。これは様々なパラドックスや活性低下が問題となっていたアルケン型ペプチド結合等価体の創薬応用において、その解決策と明確な設計指針を提供するものである。これらの知見は、中分子ペプチド創薬の加速化につながることから、社会的意義も高い。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the chemical basis and molecular properties of alkene-type dipeptide isosteres, we investigated the peptide bond mimicry of non-covalent interactions, including n- π^* interactions and hyperconjugative interactions, which are crucial for the structure formation and molecular recognitions of peptides. Our studies revealed that the steric and stereoelectronic effects derived from the substituents on the alkene moieties play an extremely important role in stabilizing the conformation of peptides, which is essential for the structure formation and molecular recognitions of peptides. Based on these findings, we successfully identified med-sized beta-turn peptides and peptidomimetics that can selectively bind to the guanine quadruplex structure.

研究分野：創薬化学

キーワード：中分子ペプチド 生物学的等価体 アルケン 非共有結合性相互作用 β -ターン構造 グアニン四重鎖構造

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中分子ペプチドは魅力的な医薬モダリティであるものの、酵素によって容易に加水分解されるため、生体内安定性を向上させる分子技術の開発は、中分子ペプチド創薬に不可欠な技術である。アルケン型ペプチド結合等価体は、加水分解酵素によって切断されるペプチド結合を、結合の長さや角度がよく似た炭素-炭素二重結合で置換した生物学的等価体であり、ペプチドの易水分解性を克服し得る分子技術である (Fig. 1)。これまでに研究代表者は、高い電気陰性度を有するフッ素原子や塩素原子をカルボニル酸素等価体として導入したハロアルケン型ペプチド結合等価体に関する創薬研究を推進

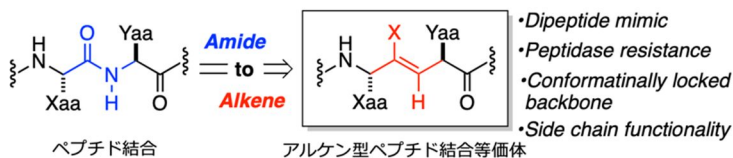


Fig 1.

してきてきた。これまでにアルケン型ペプチド結合等価体を利用した創薬研究が多数報告されているものの、それぞれの等価体の特性が十分に理解されないまま応用されており、様々なパラドックスや活性低下が生じている。また、複数のアルケン型ペプチド結合等価体を同時に機能評価した研究例はごく僅かであり、それぞれの等価体の優位性や実用性については未だ体系化されていない状況である。そこで、これまでのアルケン型ペプチド結合等価体の創薬研究における多くの課題を解決するには、それぞれのアルケン型ペプチド結合等価体の化学的特徴や固有の機能を解明し、それらに基づいて生理活性ペプチドに適切に応用することが必要不可欠であると着想し、本研究課題の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、アルケン型ペプチド結合等価体の機能解析や構造解析を行うことにより、これら等価体の分子特性の解明を目的とした。また、これら等価体の特性を活かして、がん創薬の重要な創薬標的であるグアニン四重鎖構造に選択的に結合する中分子ペプチド性化合物の創出を目的とした。

3. 研究の方法

以下に示す 3 項目を重点的に研究した。

- (1) アルケン型ペプチド結合等価体による非共有結合性相互作用のミミック効果
- (2) 二次構造制御を指向した特殊アミノ酸含有アルケン型ペプチド結合等価体の創製
- (3) グアニン四重鎖構造を標的とするアルケン型ペプチドミメティックの創製

4. 研究成果

- (1) アルケン型ペプチド結合等価体による非共有結合性相互作用のミミック効果

$n \rightarrow \pi^*$ 相互作用の受容体としての機能解析

ペプチドやタンパク質の構造形成に重要な $n \rightarrow \pi^*$ 相互作用に着目し、種々のアルケン型ペプチド結合等価体の $n \rightarrow \pi^*$ 相互作用のミミック効果を実験科学ならびに計算化学の両方向から精査した。アセチルプロリンメチルエステルに対応する (*Z*)-クロロアルケン型や(*E*)-メチルアルケン型化合物を立体選択的に合成した。合成した化合物群を用いて検討を行ったところ、天然型ペプチドは *trans*-アミド配座が優勢に対し、クロロアルケン型やメチルアルケン型ペプチド結合等価体は *cis*-アミド配座が優勢であることを明らかにした (Fig. 2A)。さらに、合成したアルケン型化合物群の $n \rightarrow \pi^*$ 相互作用について NBO 解析したところ、その相互作用エネルギーは 0.05 kcal/mol 未満であり、プロリルアミドにおいて、アルケン型ペプチド結合等価体は $n \rightarrow \pi^*$ 相互作用の受容体としては機能していないことを見出した (Fig. 2B)。

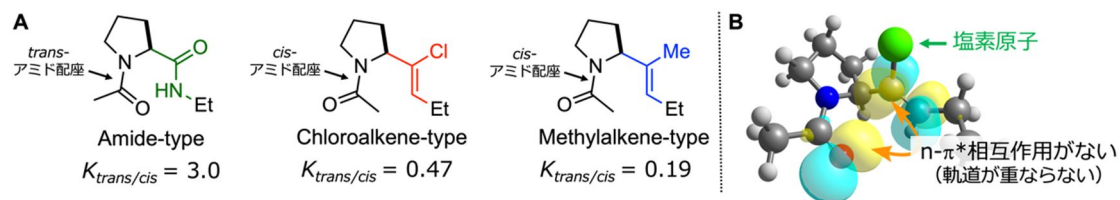


Fig 2.

アルケン骨格周りの立体電子効果の解析

タンパク質のフォールディングの起点となる β -ターン構造に着目し、L-Xaa-D-Yaa 配列にクロロアルケン骨格を導入したクロロアルケン型ペプチドミメティックを合成し、 β ターン構造のミミック効果を精査した。様々な配列 (L-アラニン-D-アラニン、L-バリン-グリシン、L-バリン-アラニン、L-フェニルアラニン-D-バリン) に対応するクロロアルケン型ペプチドミメティックを

立体選択的に合成し、分光学的解析を行ったところ、これらペプチドミメティックは溶液中において、 β -ターン構造を形成することを見出した (Fig. 3A)。また、結晶構造 (Fig. 3B) に基づく計算化学的解析から、クロロアルケン骨格の立体効果に加え、塩素原子を起点とする立体電子効果 ($\sigma^*(C-Cl) \rightarrow \sigma^*(C-H)$ 相互作用 (Fig. 3C) および $n_{p(Cl)} \rightarrow \sigma^*(C-H)$ 相互作用) が、 β -ターン構造の安定化に寄与しており、これらの安定化効果は、フルオロアルケン型やメチルアルケン型などよりも、クロロアルケン型が高いことを見出した。

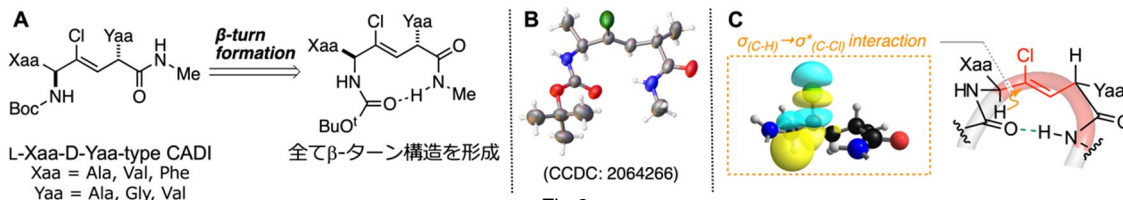


Fig 3.

(2) 二次構造制御を指向した特殊アミノ酸含有アルケン型ペプチド結合等価体の創製

創薬科学に有用な未知化学空間を開拓するために、特定の二次構造を誘起する α, α -ジ置換アミノ酸を導入したクロロアルケン型ペプチド結合等価体の新規合成法を開発した (Fig. 4)。本合成法では、ケチミンと α, α -ジクロロエノラートをを用いる aza-Darzens 縮合により、高度に官能基化された四級アジリジン環を立体選択的に合成した後、アジリジン環の選択的開環を伴う、1,3-不斉転写によって、高ジアステレオ選択的に α, α -二置換アミノ酸含有クロロアルケン型ペプチド結合等価体の合成が可能である。本法によって、創薬的に有用なオキサタン骨格やトリフルオロメチル基を有するクロロアルケン型ペプチド結合等価体の合成に成功した。また、合成したクロロアルケン型ペプチド結合等価体の N 末端および C 末端の修飾についても検討し、C 末端エステルは加水分解によってカルボン酸へ、N 末端スルホンアミドは塩化アルミニウムを作用させることで無保護アミノ基へ誘導可能であり、それぞれアミノ酸誘導体と縮合することで、対応するトリペプチドミミックが合成できることを確認した。これらの結果から、一般的なアミノ酸と同様にペプチド鎖への導入が可能であることが示唆された。さらに本合成法を用いて、五員環状二置換アミノ酸 Ac5c を含むクロロアルケン型ペプチド結合等価体を合成し、7 残基の短鎖ヘリカルペプチドに CADI を応用したヘリカルペプチドミメティックの合成にも成功した。ヘリカルペプチドミメティックの CD スペクトルを測定した結果、右巻きの α -ヘリックス構造を形成していることが示唆された。

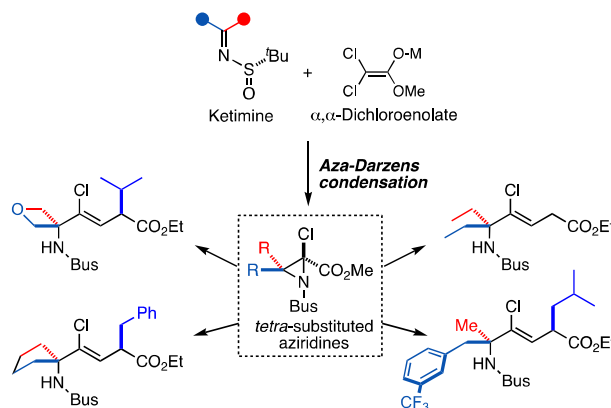


Fig 4.

(3) グアニン四重鎖構造を標的とするアルケン型ペプチドミメティックの創製

テロメア領域においてグアニン四重鎖構造 (G4 構造) が形成されると、テロメラーゼ活性が阻害されることから、G4 構造はがん研究の重要な創薬標的である。DNA 修復酵素: TLS/FUS は、G4 構造に特異的に結合することが知られており、なかでも Arg-Gly-Gly-Xaa 配列 (Xaa: 芳香族アミノ酸) が繰り返し現れる RGG3 領域が結合に重要である。Arg-Gly-Gly-Xaa 配列は、ペプチド主鎖に自由度を与える Gly が連続するため、特定の二次構造を形成しないと考えられていたが、TLS/FUS 中では β -ターンを形成することが示唆されている。一方で、RGG3 領域の部分ペプチドは、特定の二次構造を形成せず、G4 構造にも結合しない。つまり、G4 構造に結合するには β -ターン構造を形成する必要がある。そこで、上記のアルケン型ペプチド結合等価体の β -ターン誘起能を活かして、G4 構造に結合する中分子ペプチドの創製を検討した (Fig. 5)。

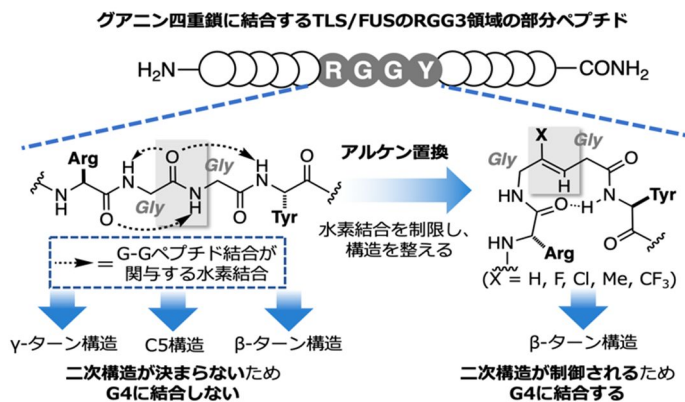
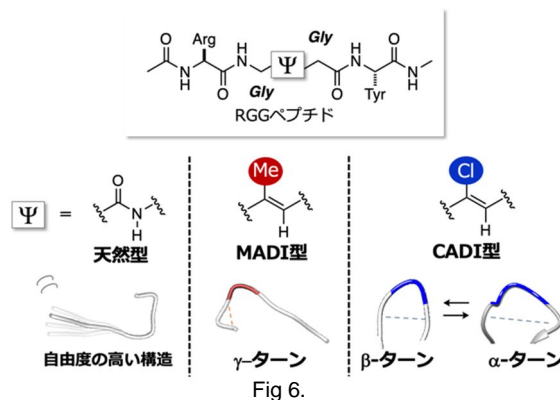


Fig 5.

TLS/FUS の RGG 配列を多く含む RGG3 ドメインをもとに、天然型 RGG ペプチド 10 種類およびこれらに特定の二次構造制御能を有するメチルアルケン型ペプチド結合等価体を導入した

アルケン型 RGG ペプチドミメティック 32 種類からなる RGG ペプチドライブラリーを構築した。合成した RGG ペプチドライブラリーの G4 結合親和性を評価した結果、RNA 由来のグアニン四重鎖 TERRA に対し、50 μM 以下の結合親和性を示したペプチドを 12 種見出し、なかには 1.47 μM と高い結合親和性を示す新規 RGG ペプチドを見出した。

RGG 配列は、 β -ターンを形成することが示唆されているものの、その詳細な構造解析は皆無である。また研究代表者らは、グリシン-グリシンペプチド結合を炭素-炭素二重結合に置換したアルケン型ミミックが G4 構造に結合することを見出している。そこで、RGG ペプチドの最小単位である 4 残基 RGGY ペプチドに加え、それに対応する (E)-メチアルケン型および (Z)-クロロアルケン型誘導体を合成し、溶液中におけるそれぞれの構造を 1H-NMR により解析した (Fig. 6)。その結果、RGGY ペプチドは特定の二次構造を形成しないのに対し、アルケン型はターン構造を形成



することが明らかになった。興味深いことに、(E)-メチアルケン型は γ -ターン構造を形成し、(Z)-クロロアルケン型は β -ターン構造と α -ターン構造の平衡状態にあり、アルケン上の置換基は、RGG ペプチドのコンフォメーションを決める構造因子であることが明らかになった。これまでの検討から 14 残基の(Z)-クロロアルケン型 RGG ペプチドミミックが、天然型や (E)-メチアルケン型と比較して、高い G4 結合親和性を示すことを見出しており、これらの結果は β -ターン構造が G4 結合親和性に重要であることを支持する結果が得られた。

以上、これらの研究成果は、アルケン型ペプチド結合等価体を基盤とする創薬研究において、有用な基礎的知見を与えるものである。特に、アルケン上の置換基を起点とする立体効果や立体電子効果が、活性発現や分子認識に重要なペプチドのコンフォメーションの安定化に極めて重要な役割を果たしていることは、本等価体の創薬応用において極めて重要な知見である。これは、アルケン上の置換基効果に着目し、それぞれのアルケン型ペプチド結合等価体を持つ特性をもとに応用することで、ペプチドを望みの形にデザインできることを示している。本研究によって、 β -ターン構造においては、塩素原子が置換したクロロアルケン型が最も優れた β -ターンミミックとなることが明らかになったものの、ペプチドの規則構造の多くを占める α -ヘリックスや β -シート構造については未開拓である。今後はこれら二次構造におけるアルケン型ペプチド結合等価体の誘起効果や安定化効果の解明が強く望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kodama Yuki, Takeo Sayuri, Fujimoto Junko, Sato Kohei, Mase Nobuyuki, Narumi Tetsuo	4. 巻 87
2. 論文標題 Synthesis and Structural Characterization of α -Turn Mimics Containing (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2167 ~ 2177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c03115	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Okita Hikari, Kato Yuna, Masuzawa Tatsuki, Arai Kosuke, Takeo Sayuri, Sato Kohei, Mase Nobuyuki, Oyoshi Takanori, Narumi Tetsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Stereoselective synthesis of Gly-Gly-type (E)-methylalkene and (Z)-chloroalkene dipeptide isosteres and their application to 14-mer RGG peptidomimetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 29373 ~ 29377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0RA06554D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Yuki, Imai Saki, Fujimoto Junko, Sato Kohei, Mase Nobuyuki, Narumi Tetsuo	4. 巻 57
2. 論文標題 Stereoselective synthesis of highly functionalized (Z)-chloroalkene dipeptide isosteres containing an α , β -disubstituted amino acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6915 ~ 6918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC02952E	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹尾沙優里, 田畑舞子, 加藤由奈, 児玉有輝, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 大吉崇文, 鳴海哲夫
2. 発表標題 グアニン四重鎖構造を標的としたRGGペプチドライブラリの構築および結合性評価
3. 学会等名 創薬懇話会2021 in 京都
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海哲夫
2. 発表標題 ペプチド創薬：理論・設計・合成
3. 学会等名 近畿大学薬学部 医薬品化学研究室 公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayuri Takeo, Maiko Tabata, Yuki Kodama, Kohei Sato, Nobuyuki Mase, Takanori Oyoshi, Tetsuo Narumi
2. 発表標題 IDENTIFICATION OF G4-BINDING PEPTIDE MOLECULES FROM THE RGG3 DOMAIN OF TRANSLOCATED IN LIPOSARCOMA/FUSED IN SARCOMA
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kodama, Junko Fujimoto, Kohei Sato, Nobuyuki Mase, Kentaro Takayama, and Tetsuo Narumi
2. 発表標題 SYNTHESIS AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF α -TURN MIMICS CONTAINING (Z)-CHLOROALKENE DIPEPTIDE ISOSTERES
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹尾沙優里, 田畑舞子, 児玉有輝, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 大吉崇文, 鳴海哲夫
2. 発表標題 RGGペプチドライブラリの構築とグアニン四重鎖結合性ペプチドの探索
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海哲夫
2. 発表標題 ペプチド・タンパク質のバックボーンケミストリー
3. 学会等名 第15回超領域研究会 / 第3回静岡県三大学連携シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海哲夫
2. 発表標題 ペプチド・タンパク質の主鎖改変を基盤とするケミカルバイオロジー
3. 学会等名 東京医科歯科大学生体材料工学研究所第243回 IBBセミナー / 第28回創薬学領域セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河原 和寿、竹尾 沙優里、藤本 准子、佐藤 浩平、間瀬 暢之、鳴海 哲夫
2. 発表標題 アミド-アルケンの等価置換における隣接基効果：C末端エステル加水分解反応の速度論的解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹尾 沙優里、児玉 有輝、佐藤 浩平、間瀬 暢之、鳴海 哲夫
2. 発表標題 クロロアルケンジペプチドイソスター含有 β -ターンミミックの立体選択的合成と構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴海哲夫
2. 発表標題 アルケン型ペプチド結合等価体によるペプチドの二次構造制御
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴海哲夫
2. 発表標題 ペプチドと分子科学で何ができるか-創薬や医療におけるモダリティ分子としての可能性-
3. 学会等名 浜松医科大学大学院特別講義（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuo Narumi, Yuki Kodama, Yuna Kato, Kosuke Arai, Sayuri Takeo, Tatsuki Masuzawa, Kohei Sato, Nobuyuki Mase, Takanori Oyoshi
2. 発表標題 Noncovalent interactions in the chloroalkene-type RGG peptidomimetics stabilize the beta-turn structure
3. 学会等名 The 57th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外山 大地、新井 康介、佐藤 浩平、間瀬 暢之、高山 健太郎、鳴海 哲夫
2. 発表標題 2型ニューロメジニン受容体選択的ペプチドアゴニストの分子内アシル転位反応の速度論的評価
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉有輝, 今井咲, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 鳴海哲夫
2. 発表標題 , -二置換アミノ酸含有クロロアルケン型ペプチド結合等価体の高ジアステレオ選択的合成法の開発
3. 学会等名 創薬懇話会2021 in 京都
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Toyama, Yuki Kodama, Junko Fujimoto, Kohei Sato, Nobuyuki Mase, Kentaro Takayama, and Tetsuo Narumi
2. 発表標題 DIASTERESELECTIVE SYNTHESIS OF A HIGHLY FUNCTIONALIZED (Z)-CHLOROALKENE DIPEPTIDE ISOSTERE OF LEU-DAP DIPEPTIDE
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kodama, Saki Imai, Junko Fujimoto, Kohei Sato, Nobuyuki Mase, and Tetsuo Narumi
2. 発表標題 Stereoselective Synthesis of , -Disubstituted Amino Acid-Containing (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres
3. 学会等名 AIMECS 2021. 13th AFMC INTERNATIONAL MEDICINAL CHEMISTRY SYMPOSIUM.
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------