

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月18日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550050

研究課題名（和文）安定同位体標識アミノ酸、オリゴペプチドの合成および配座解析

研究課題名（英文）Synthesis and Conformational Analysis of Amino Acids and Oligopeptides Labeled with Stable Isotopes

研究代表者

大場 真（OBA MAKOTO）

東海大学・開発工学部・教授

研究者番号：10246077

研究成果の概要（和文）：核磁気共鳴法を用いる蛋白質やペプチドの構造解析を効率化する立体選択的安定同位体標識アミノ酸の簡便・大量合成を検討した。8種類のアミノ酸の共通合成中間体となる不飽和ピログルタミノール誘導体の新規合成法を開発し、重水素標識プロリンおよびグルタミン酸のグラムスケール合成を達成した。得られた標識プロリンは環パッキングをモニターする上で好都合な標識パターンを持つため、各種ジペプチドに導入して系統的な配座解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Facile and large-scale synthesis of stereoselectively stable isotope-labeled amino acids, which can promote the efficiency of NMR protein structure determination, was investigated. In this work, a novel synthetic method for unsaturated pyroglutaminol derivatives, key intermediates for eight kinds of labeled amino acids, has been developed and gram-scale syntheses of deuterated prolines and glutamic acids were achieved. Using the obtained proline, some dipeptides were prepared and a systematic conformational analysis was carried out. With the help of selective deuterium-labeling, it becomes feasible to monitor the proline ring puckering by means of simple 1D NMR spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：安定同位体標識、アミノ酸、ペプチド、立体選択的合成、配座解析

## 1. 研究開始当初の背景

2001年、ヒトゲノムの全貌がほぼ明らかと

なり大きな注目を集めた。しかし、実際に我々の生命活動を担っているのはゲノムの

情報に従って合成された蛋白質である。従って、その構造をより速く、より多く解明することがポストゲノム時代に課せられた最も重要な課題の1つであることは言うまでもない。

蛋白質の構造を解析する手段として核磁気共鳴法 (NMR) がある。NMR の利点は、X線結晶構造解析法と異なりサンプルの結晶化を必要とせず、溶液中の立体構造や動的挙動を解析することができる点である。しかし、蛋白質のような生体高分子の NMR スペクトルは非常に複雑であるため、解析の基本となるシグナルの帰属さえ大きな困難を伴う。この問題を解決する手段として NMR の高磁場化やパルステクニックの駆使が挙げられる。2002 年、NMR を用いる溶液中での蛋白質の構造解析で Wüthrich がノーベル化学賞を受賞した。

一方、NMR を用いる蛋白質の構造解析を飛躍的に効率化する手段の一つに安定同位体標識法がある。それは蛋白質中の軽水素を重水素に置換してスペクトルを単純化させたり、逆に天然存在比の低い<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>Nを積極的に導入して解析の効率を向上させたりする手法である。しかし、その多くはランダムラベル、均一ラベル、ブロックラベルなどマクロな構造情報を得ることを目的としたものが殆どであり、NMR の利点を十分に生かしきれているとは言い難いのが現状である。その要因として蛋白質の構成成分であるアミノ酸の位置・立体選択的安定同位体標識法の欠如が挙げられる。例えばアミノ酸側鎖のジアステレオトピックなメチレン水素やメチル基の一方のみを立体選択的に重水素標識することができれば、NMR のスペクトル解析で最も問題となるシグナルの立体特異的帰属が確定するため、核オーバーハウザー効果 (NOE) を用いて高精度な距離情報 (蛋白質の二次、三次構造情報) を得ることができる。また、<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>N標識と組み合わせれば特定の残基、例えば活性中心近傍の残基のシグナルのみを抽出することができるため、結合定数 ( $J$ ) を用いて側鎖の配座 ( $\chi$ -アングル) を決定したり、その動的挙動を解析することが可能となる。

## 2. 研究の目的

アミノ酸を<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>Nで標識する場合、標識原料に制約があるため若干の工夫を必要とするものの、殆どの場合は既知の合成法により目的を達成することができる。しかし、アミノ酸側鎖を位置・立体選択的に重水素標識するためには新規なアミノ酸合成法を開発する必要がある。これまで本申請者は様々なアミノ酸の安定同位体標識法を開発してきた。そして、幾つかの安定同位体標識アミノ酸は共同研究者らによって蛋白質の構造解析に

利用され、その有効性が実証された (M. Kainosho et al., Nature 2006, 440, 52-57)。しかし、これまでの手法は合成経路が多段階に及ぶことから総収率が低く、その利用が大きく制限されてきたのが現状である。そこで本研究では、8種類の標識アミノ酸の共通合成中間体である不飽和ピログルタミノール誘導体の簡便かつ大量合成法の開拓を行い、多くの研究者が利用可能な汎用性の高い標識アミノ酸合成法を提供することを第一の目的とした。特にプロリンに関しては、次に述べるオリゴペプチドへの導入を考慮してグラムスケールの合成を実現する。

上記のとおり、本研究で得られる安定同位体標識アミノ酸は NMR を用いる蛋白質の構造解析を飛躍的に効率化することが実証されつつあるが、その基本となっているのはシグナルの立体特異的帰属に基づく高速かつ高精度な距離情報の取得であり、NMR の特徴である微視的かつ動的構造解析を行った例は非常に少ない。そこで本研究では蛋白質の三次元構造構築や機能発現を担う部分構造 (モデルオリゴペプチド) に標識アミノ酸を導入し、興味ある残基の精密な構造解析および動的配座解析を行う。オリゴペプチドは蛋白質の部分構造であるのみならず、ペプチドホルモンなどそれ自身が生理活性を持つものも多く、有機合成によって比較的容易に得られることから蛋白質のモデル化合物として興味深い。

本計画では特異な配座特性を持つことから蛋白質の主鎖の構造に大きな影響を与えることが知られているプロリン含有オリゴペプチドライブラリーを構築し Xaa-Pro 結合のシス-トランス異性化やプロリン環パッカリングの動的構造解析を行う。プロリン残基近傍の構造変化は、蛋白質のフォールディング、分子認識、安定性、反応性などと密接な関係があるため、モデルペプチドを用いて基本的な構造情報を得ることは蛋白質の機能を理解する上で非常に有意義である。

## 3. 研究の方法

### (1) 不飽和ピログルタミノール誘導体の新規合成法の開発

不飽和ピログルタミノール誘導体は8種類の立体選択的重水素標識アミノ酸の合成中間体となりうる極めて重要な化合物である。しかし、これまでの手法は多段階を要する上、2重結合構築の際に毒性の高いセレン試薬を用いるため大量合成には不相当であった。また、<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>Nを導入する場合、原料となる標識グルタミン酸を発酵法によって合成していたため標識パターンに制約があった。そこで本研究では、D-セリン誘導体 **1** とメルドラム酸 **2** から得られるテトラミン酸 **3** を経由する不飽和ピログルタミノール誘導

体 4 の新規合成法の開発を計画した (図 1)。D-セリンはグリシンとギ酸を縮合して得られるエノールエーテルを不斉水素化することによって合成可能であり、メルドラム酸もマロン酸から容易に得られるため、 $^{13}\text{C}$  標識原料と重水素化された還元剤を適当に組み合わせることによって任意の同位体標識パターンを構築することが可能である。またテトラミン酸 **3** は活性メチレンを持つためメチル基の導入も可能である。

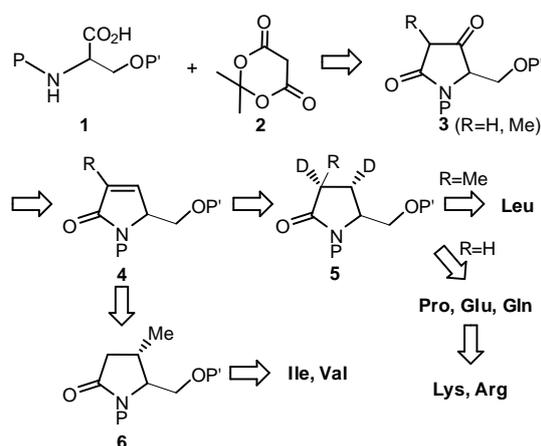


図 1. 不飽和ピログルタミノール誘導体の新規合成法の開発と各種アミノ酸への誘導

ピログルタミノール誘導体 **5** および **6** から各種アミノ酸への変換は本申請者がこれまでに確立した手法を改良することによって達成できる。本手法は  $^{13}\text{C}$  を任意の位置に導入できる上、従来法に比べて各反応のスケールアップも容易である。今回、標識プロリンについてはグラムオーダーの合成を実現する。

## (2) 重水素標識プロリンを含むオリゴペプチドの合成と配座解析

プロリンは唯一の環状アミノ酸であり、特異な配座特性を持つことが知られている。例えば、Xaa-Pro 結合のシストランス異性化や、環パッカリングは前後のペプチド鎖の相対配置に大きな影響を与えるため、それらの溶液中での挙動をモニターすることができれば蛋白質の構造変化に関する基礎的な情報を得ることができる。

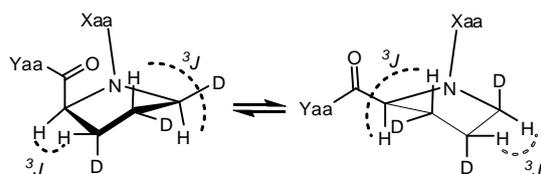


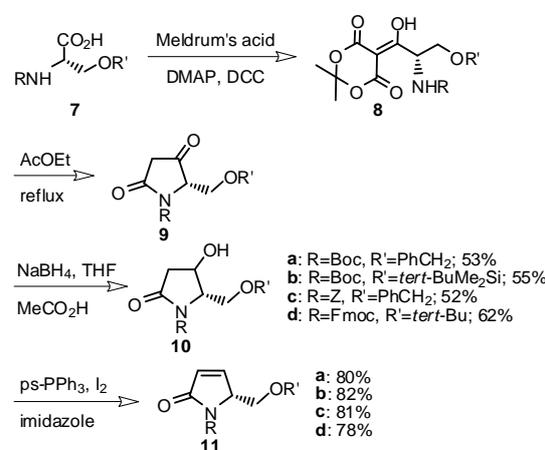
図 2. 重水素標識プロリンの環パッカリング

本研究で得られる重水素標識プロリンは  $\alpha$  および  $\delta$  位のプロトンのビシナル結合定

数を用いてプロリン環の配座を容易に決定することができるため環パッカリングをモニターする上で極めて好都合な標識パターンを持っている (図 2)。本計画では標識プロリンを導入したオリゴペプチドをモデル化合物として用い、Xaa-Pro 結合のシストランス異性化に伴うプロリン残基近傍の構造変化を NMR を用いて解析する。検討項目は以下のとおりである。① peptidyl prolyl cis-trans isomerase (PPIase) の基質として知られている Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA、Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA などを中心に標識プロリン含有オリゴペプチドライブラリーを構築する。② Xaa-Pro 結合のシストランス異性化に伴うプロリン環の配座変化について系統的な情報収集を行う。③ キモトリプシンや PPIase 存在下で Xaa-Pro 結合のシストランス異性化に伴うプロリン残基近傍の動的な構造変化、特にプロリン環パッカリングを NMR を用いて解析する。本手法を確立することにより、シストランス異性化の速度論的パラメータを取得することも可能となるため、PPIase 活性の新規評価法の開発にも発展する可能性がある。

## 4. 研究成果

### (1) 不飽和ピログルタミノール誘導体の新規合成法の開発



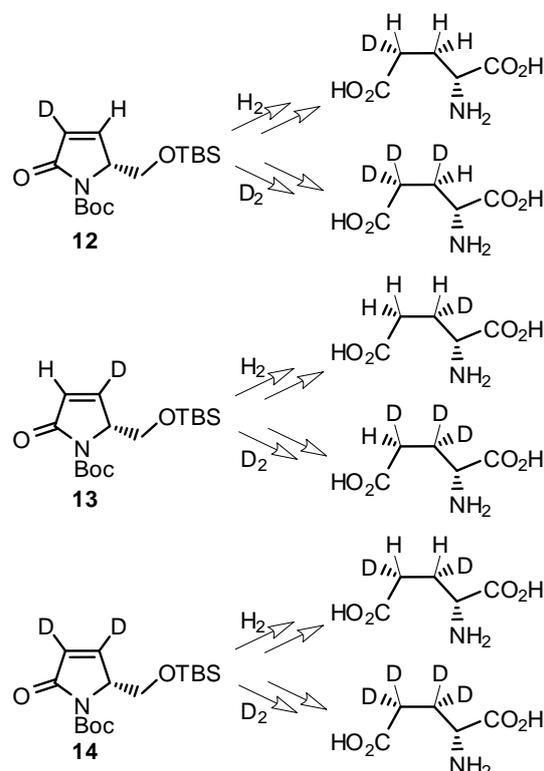
式 1. 不飽和ピログルタミノール誘導体の新規合成法

様々な立体選択的重水素標識アミノ酸の合成中間体として有用な不飽和ピログルタミノール誘導体の新規合成法を開発した。最初に保護 D-セリン誘導体 **7** とメルドラム酸を DCC の存在下で縮合してテトラミン酸誘導体 **9** を合成した。得られたテトラミン酸のカルボニル基を還元してヒドロキシピログルタミノール **10** としたのち、水酸基をヨウ素化したところ、自発的に脱離反応が進行して不飽和ピログルタミノール誘導体 **11** が高収率で得られた。基質一般性を確認するべく様々

な保護基を持つ D-セリンを出発物質として同様の検討を行ったところ、新規化合物を含む何種類かの不飽和ピログルタミン誘導体を効率良く得ることに成功した。本手法はテトラミン酸を経由することからカルボニル基を還元する際、適当な重水素化試薬を用いることにより任意の位置に重水素を導入することが可能である。また、特殊な試薬や反応条件を用いないことから各反応のスケールアップが容易であり、各種重水素標識アミノ酸の大量合成も可能である。

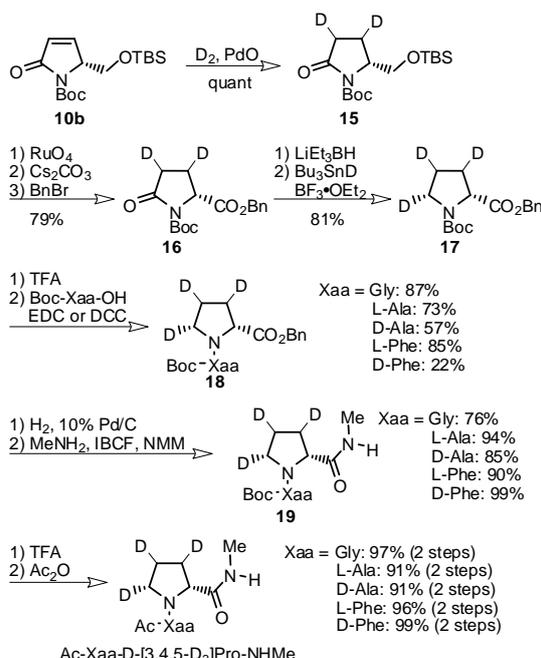
## (2) 各種重水素標識グルタミン酸の合成

テトラミン酸 **9** をヒドロキシピログルタミン誘導体 **10** に変換する際、水素化ホウ素ナトリウムおよび酢酸のどちらか、或いは両方を対応する重水素化試薬に置き換えることにより、3種類の重水素標識不飽和ピログルタミン誘導体 **12-14** を合成した (式 2)。更に、**12-14** のオレフィン部位を接触還元する際、水素と重水素を使い分けることにより、任意の標識パターンを持つ重水素化グルタミン酸を合成することに成功した。本研究によって得られた重水素標識グルタミン酸の殆どは、従来法では得ることが非常に困難な重水素標識パターンを有しており、様々な分野への応用が期待される。



式 2. 各種重水素標識グルタミン酸の合成

## (3) 重水素標識プロリン含有ジペプチドの合成と配座解析



式 3. 重水素標識プロリン含有ジペプチドの合成

不飽和ピログルタミン誘導体 **10b** を重水素添加した後、側鎖をベンジルエステルに変換して重水素標識ピログルタミン誘導体 **16** を得た。**16** のラクタムカルボニル基を立体選択的に還元して重水素を導入し、立体選択的重水素標識プロリン **17** を合成した。得られた重水素標識プロリン **17** と各種Boc-アミノ酸を縮合してジペプチド **18** とした後、C末端をN-メチルアミド、N末端をアセチル基で保護して目的とするジペプチド Ac-Xaa-D-[3, 4, 5-D<sub>3</sub>]Pro-NHMeを合成した。

表 1. プロリン残基のビシナル結合定数 ( $J$ )

Xaa	$\omega_{trans}$		$\omega_{cis}$	
	$J_{2-3}$	$J_{4-5}$	$J_{2-3}$	$J_{4-5}$
Gly	4.3	7.3	2.4	9.2
L-Ala	3.2	7.0	2.9	9.2
D-Ala	5.8	6.1	1.5	9.9
L-Phe	3.9	8.0	9.0	9.7
D-Phe	5.3	6.3	2.1	9.0

得られた各種ジペプチドの<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定し、プロリン残基のビシナル結合定

数 ( $J_{2-3}$ および $J_{4-5}$ )を表1に纏めた。いずれの場合も $J_{2-3}$ より $J_{4-5}$ の値が大きいDOWN型の配座が優先的であり、シス体ではその傾向がより顕著であった。また、XaaがL体とD体の場合を比較すると、トランス体ではL体の方がよりDOWN型が優先的であったが、シス体ではその傾向が逆転していた。なお、XaaがL-Pheのシス体では異常なJ値が観測されており、その原因については現在検討中である。現段階では定性的な考察しかできないが、2つのJ値を比較することにより環パッカリングに関する情報を容易に入手可能であることが明らかとなった。今後はパッカリング情報を定量化するべく、分子シミュレーション等を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① M. Oba, S. Koguchi, K. Nishiyama, “Stereoselective Synthesis of 3,4-Dihydroxylated Prolines and Prolinols Starting from L-Tartaric Acid”, *J. Heterocyclic Chem.* **2012**, in press, 査読有
- ② M. Oba, K. Tanaka, K. Nishiyama, W. Ando, “Aerobic Oxidation of Thiols to Disulfides Catalyzed by Diaryl Tellurides under Photosensitized Conditions”, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4173-4177, 査読有
- ③ M. Oba, T. Kondo, K. Tanaka, S. Koguchi, K. Nishiyama, “Synthesis and Structure of 9,10-Bis(2,4,6-triisopropylphenyl)-9,10-dihydro-9,10-disilaanthracene”, *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 982-985, 査読有
- ④ 大場 真, 「不飽和オルトピログルタミン酸エステルを用いる非タンパク性アミノ酸の立体選択的合成」、東海大学紀要開発工学部 2010、20、31-40、査読有
- ⑤ M. Oba, Y. Okada, M. Endo, K. Tanaka, K. Nishiyama, S. Shimada, W. Ando, “Formation of Diaryl Telluroxides and Tellurones by Photosensitized Oxygenation of Diaryl Tellurides”, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10680-10686, 査読有
- ⑥ Y. Okada, M. Oba, A. Arai, K. Tanaka, K. Nishiyama, W. Ando, “Diorganotelluride-catalyzed Oxidation of Triorganosilanes to Silanols under Atmospheric Oxygen”, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 383-385, 査読有
- ⑦ M. Oba, C. Ito, T. Hayashi, K. Nishiyama, “Facile Synthesis of Unsaturated Pyroglutaminol Derivatives”, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5053-5055, 査読有
- ⑧ M. Oba, Y. Okada, K. Nishiyama, W. Ando, “Aerobic Photooxidation of Phosphite Esters Using Diorganotelluride Catalysts”, *Organic Letters* **2009**, *11*, 1879-1881, 査読有
- ⑨ K. Okuma, A. M. Ono, S. Tsuchiya, M. Oba, K. Nishiyama, M. Kainosho, T. Terauchi, “Asymmetric Synthesis of (2*S*,3*R*)- and (2*S*,3*S*)-[2-<sup>13</sup>C;3-<sup>3</sup>H]Glutamic Acid”, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1482-1484, 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 鈴木英亮、大場 真、西山幸三郎、「重水素標識プロリン含有ジペプチドの合成および配座解析」、日本化学会第92春季年会、2012.3.25-28 (慶応大学、横浜)
- ② 大場 真、西山幸三郎、島田 茂、安藤 亘、「テルリン酸無水物-テルロン付加物の合成と性質、第38回有機典型元素化学討論会、2011.12.7-9 (石川県立音楽堂、金沢)
- ③ 大場 真、鈴木俊裕、岡田祐子、久島広信、佐野貴紀、西山幸三郎、「酒石酸およびリボースを出発物質とするポリヒドロキシピロリジン誘導体の立体選択的合成」、第41回複素環化学討論会、2011.10.20-22、(崇城大学市民ホール、熊本)
- ④ 田中和仁、大場 真、西山幸三郎、安藤 亘、「ジアリールテルリドを触媒として用いるチオールの空気酸化」、日本化学会第91春季年会、2011.3.26-29 (神奈川大学、横浜)
- ⑤ K. Kojima, M. Oba, K. Nishiyama, “Reduction of Organic Substrates in Aqueous Media Using Hypophosphorous acid-palladium System”, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Honolulu (USA).
- ⑥ M. Oba, K. Tanaka, Y. Okada, K. Nishiyama, W. Ando, “Formation of Diaryl Telluroxides and Tellurones by Photosensitized Oxygenation of Diaryl Tellurides”, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.15-20, Honolulu (USA).
- ⑦ 田中和仁、大場 真、西山幸三郎、安藤 亘、「テルロキシドを酸化剤として用いるジシランの酸化」、第37回有機典型元素化学討論会、2010.11.25-27、(室蘭市民会館、

室蘭)

- ⑧ 小嶋華織、大場 真、西山幸三郎、「次亜リン酸-パラジウム系を用いる水系での接触還元反応」、日本化学会第90春季年会、2010.3.26-29 (近畿大学、東大阪)
- ⑨ 田中和仁、大場 真、西山幸三郎、安藤 亘、「テルリドを触媒として用いるチオールの酸化第36回有機典型元素化学討論会」、2009.12.10-12 (とりぎん文化会館、鳥取)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大場 真 (OBA MAKOTO)  
東海大学・開発工学部・教授  
研究者番号：10246077

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：