

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05286

研究課題名(和文) 固相ライブラリー戦略に基づくペプチド系天然物の精密構造制御と新機能創製

研究課題名(英文) Structural Control and Generation of New Functional Molecules Using a Solid-Phase Library Strategy for Peptidic Natural Products

研究代表者

伊藤 寛晃 (Itoh, Hiroaki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：20758205

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)：本研究は、ミトコンドリアに存在するFoF1-ATP合成酵素を標的とする天然物の精密構造制御とこれに基づく新機能創製を目的とする。構造基盤分子として、ペプチド系複雑天然物であるエフラペプチンCを選択し、最小の脂肪族置換基であるメチル基を導入することで、3次元構造制御による活性向上を試みた。

まず、本天然物の効率的な固相全合成法を確立した。この方法を用いて6種類のメチル化類縁体を同様に構築し、生物活性および分子機能を評価した。その結果、天然物よりも優れたがん細胞増殖阻害活性とプロテアーゼ耐性を示す新規類縁体を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチル基導入は、医薬品候補化合物の特性を最適化するために広く用いられているが、柔軟かつ分子量の大きい鎖状分子においては、導入する位置や立体化学の生物活性に与える総合的影響を正確に予測することは困難であり、応用例に限られてきた。また、一般的に自然選択を経た生物活性天然物よりも優れた性質を示す類縁体を得ることは容易ではない。強力な活性と高い安定性を持つ新規エフラペプチンC類縁体の創出に成功した本成果は、鎖状分子を対象とした機能向上の方法論として、メチル基導入による構造制御が有効であることを実証する重要なものである。また、得られた類縁体は、新規抗がん活性分子創出のために有用な構造基盤である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the generation of new functional molecules through the structural modification of natural products targeting FoF1-ATP synthase. A complex peptidic natural product efrageptin C was adopted as the structural basis, and the introduction of a methyl group, the smallest aliphatic substituent, was conducted to enhance the biological activity by controlling its three-dimensional structure.

First, an efficient strategy for the solid-phase total synthesis of efrageptin C was established. Using this synthetic strategy, six methylated analogues were constructed, and their biological activities and molecular functions were evaluated. As a result, a promising new analogue was discovered. This new analogue exhibited more potent growth inhibitory activity against cancer cells and higher proteolytic stability compared to the parent efrageptin C.

研究分野：有機合成化学、天然物有機化学

キーワード：天然物有機化学 化合物ライブラリー 固相合成 構造活性相関 全合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATP合成を触媒するF₀F₁-ATP合成酵素の機能変調は、多様な疾患治療に応用できる可能性を有する。本研究では、F₀F₁-ATP合成酵素に結合し、機能を阻害するペプチド系複雑天然物に着目し、構造改変と生物活性、分子機能の評価によって、有用な生物活性分子を見出す。

2. 研究の目的

構造基盤とするペプチド系複雑天然物として、F₀F₁-ATP合成酵素のF₁ドメインに結合してATP合成を阻害することが知られるエフラペプチンC(図1、1a)を選択した。本天然物の3次元構造を制御したエフラペプチン類縁体ライブラリーを構築し、統一的な機能評価を行うことで、有用な性質を示す新規化合物を得ることを目指す。

3. 研究の方法

1aは、15残基のアミノ酸とN末端アセチル基(Ac-cap)、C末端カチオン性官能基(C-cap)によって構成される。構成アミノ酸のうち11残基が非タンパク質構成アミノ酸であり、ピペコリン酸(Pip)と2-アミノイソ酪酸(Aib)を豊富に含む。この特徴的なアミノ酸配列のうち、N末端に位置する第1-6残基およびC末端に位置する第9-15残基は剛直な3₁₀-ヘリックス構造を形成し、標的タンパク質と相互作用する。また、中央に位置する第7,8残基は、柔軟な配座特性を有し、リンカーとしてふるまうことが想定される。

本研究は、1aの有する第7,8残基リンカー領域の構造改変により、両末端の3₁₀-ヘリックスドメインへの影響を最小化しながら生物活性の向上およびプロテアーゼ耐性を向上することを狙った。リンカー領域の構造改変として、最小の脂肪族置換基であるメチル基を導入した6種類の類縁体1b-1gを設計した(図1)。これにより、1aの持つ配座特性を変化させ、分子全体の疎水性、生物活性、プロテアーゼ耐性を変調できると予想した。メチル化による構造修飾は合成低分子において広く利用されているが、柔軟な鎖状ペプチドに関しては、好ましい生物活性特性を発揮するために適切な置換位置や立体化学を正確に予測することは容易ではなく、応用例が限られていた。

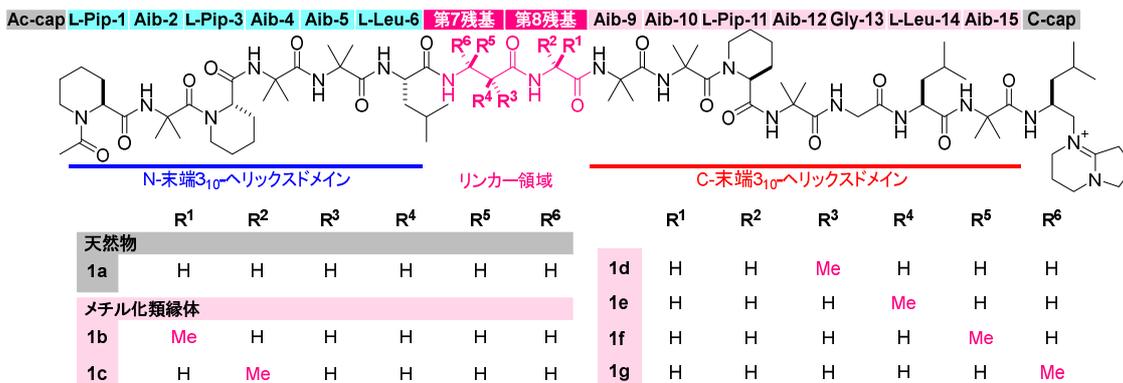


図1 エフラペプチンC(1a)およびメチル化類縁体1b-1gの構造式

4. 研究成果

まず、効率的に類縁体を合成するために必須となる1aの固相全合成法を確立した。極めて立体障害の大きいアミノ酸を多数含有する1aの全体構造を、固相のみで構築した例はない。酸に不安定な1aの配列を構築するためにトリチルリンカーを介して第15残基アミノ酸を結合したFmoc-Aib-trityl-ChemMatrix樹脂(2)から固相合成を開始した(図2)。縮合剤としてはHATUおよびHOAtを使用した。Aib-2-L-Pip-3、Aib-4-Aib-5、Aib-9-Aib-10、Aib-10-L-Pip-11のアミド化については、HOAtに比して立体障害が小さい活性エステルを形成するCOMUを採用することで効率的に構築した。全てのアミノ酸を導入した後、N末端のFmoc基を脱保護し、無水酢酸によってアセチル化して樹脂結合ペプチド3aを得た。この樹脂結合ペプチドを、(CF₃)₂CHOHによって切り出し、カルボン酸4aを合成した。さらに、4aをCOMUおよびアミン5と混合することで、アズラクトン6aを経由して1aを総収率26%で得ることに成功した。また、確立した方法によって、メチル化類縁体1b-1gについても、4.1-16%の総収率で統一的に全合成した。

目的の化合物群が得られたため、1aおよび6種類の類縁体1b-1gの配座および疎水性に関する調査を行った。まず、3₁₀-ヘリックスドメインの配座を評価するため、CF₃CH₂OH中において各化合物のCDスペクトルを測定した(図3)。結果として、類縁体1b-1gは1aと同様に3₁₀-ヘリックスに特徴的なパターンを示し、メチル基の導入が3₁₀-ヘリックスには顕著な影響を与えないことが明らかになった。また、スペクトル強度から、6種類の類縁体の3₁₀-ヘリックス含量は1b、

1d、1e、1f で比較的高く、1c および 1g では比較的低いこと、かつ 1f で最も高く、1g が最も低いことが示唆された。

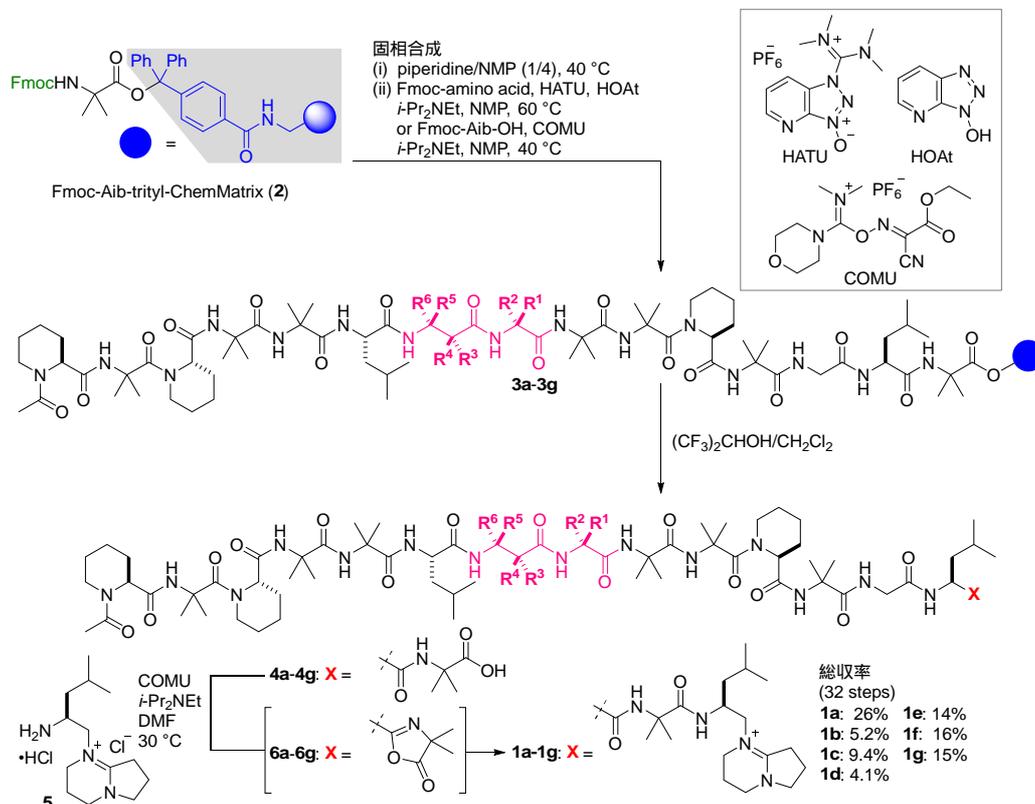


図2 1a-1gの固相全合成

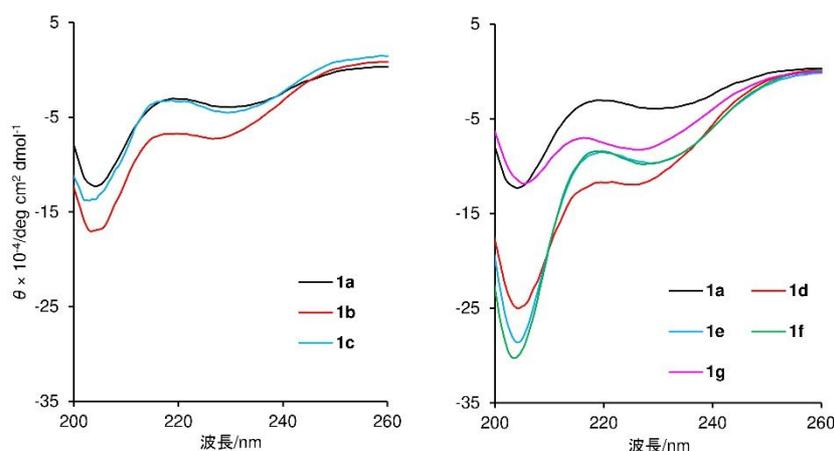


図3 1a-1gのCDスペクトル

続いて、各化合物の疎水性指標である $\log D$ 値を HPLC 法によって見積もった。その結果、メチル基の置換位置と立体化学により疎水性が変化することが分かった(表 1)。この際、4 種類の類縁体 1b、1d、1e、1f は、比較的高い疎水性を示した。これらは 3₁₀-ヘリックス含量の高い化合物群に該当する。一方で、比較的低い疎水性を示した 2 種類の類縁体 1c および 1g は、ヘリックス含量が低い群に該当する。一般に、ヘリックス形成にともなうアミド基の分子内水素結合は、分子全体の疎水性を向上するため、1a-1g の示す疎水性が、CD スペクトルの強度と相関したと想定した。

次いで、1a-1g の生物活性を統一的に評価した。まず、細胞膜透過処理を施した MCF-7 細胞を用い、1a-1g の ATP 合成阻害活性を 50% 効果濃度 (EC₅₀) によって比較した(表 1)。結果として 1b-1g は、1a の示す ATP 産生阻害活性を保持することが分かった。その中で、1a および 5 つの類縁体 1b-1f の EC₅₀ 値は約 1 nM であり、1b-1f のメチル化様式が F₀F₁-ATP 合成酵素阻害活性に及ぼす影響は小さいことが分かった。一方、1g では他の化合物に比して活性が 2 倍程度減弱した (EC₅₀ = 2.6 nM)。

なリンカー領域にメチル基を導入することで、より優れた性質を有する新規類縁体 **1f** を発見した。本戦略は、鎖状ペプチド系天然物の特性を改善するために応用可能であり、同様の性質を持つ化合物群の価値を高めることにも繋がる重要な成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yosuke Nakata, Junhao Fu, Hiroaki Itoh, Suresh Panthee, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Masayuki Inoue	4. 巻 29
2. 論文標題 Construction of Five Tryptophan Isomers and Application of the Isomers to Solid Phase Total Syntheses of Lysocin E Derivatives	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202301225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202301225	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 Junhao Fu, Yosuke Nakata, Hiroaki Itoh, Suresh Panthee, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Masayuki Inoue	4. 巻 29
2. 論文標題 Molecular Editing Enhances Oxidation Resistance of Menaquinone Targeting Antibiotics Lysocin E and WAP 8294A2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202301224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202301224	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 Yun-Wei Xue, Hiroaki Itoh, Shingo Dan, Masayuki Inoue	4. 巻 13
2. 論文標題 Gramicidin A accumulates in mitochondria, reduces ATP levels, induces mitophagy, and inhibits cancer cell growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 7482 ~ 7491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2SC02024F	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 Yun-Wei Xue, Kensuke Miura, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue	4. 巻 59
2. 論文標題 C-Terminal modification of polytheonamide B uncouples its dual functions in MCF-7 cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3914 ~ 3917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CC05915K	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 Hiroaki Itoh	4. 巻 142
2. 論文標題 Total Synthesis and Functional Analysis of Complex Peptidic Natural Products and Their Artificial Analogues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 561 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.22-00042	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 Hiroshi Hamamoto, Suresh Panthee, Atmika Paudel, Kenichi Ishii, Jyunichiro Yasukawa, Jie Su, Atsushi Miyashita, Hiroaki Itoh, Kotaro Tokumoto, Masayuki Inoue, Kazuhisa Sekimizu	4. 巻 12
2. 論文標題 Serum apolipoprotein A-I potentiates the therapeutic efficacy of lysocin E against Staphylococcus aureus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26702-0	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 Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue	4. 巻 79
2. 論文標題 Development of a High-Throughput Strategy for Functional Enhancement and Alteration of Antibacterial Natural Products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 996 ~ 1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.79.996	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 Aoi Takeuchi, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue	4. 巻 16
2. 論文標題 180/160 Encoding Strategy for Microscale Stereochemical Determination of Peptidic Natural Products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry - An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 2447 ~ 2452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.202100674	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 Koichi Kamiya, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue	4. 巻 84
2. 論文標題 Generation and Biological Evaluation of Degraded Derivatives of the Three E/Z-Isomers of Yaku' amide B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1854 ~ 1859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00339	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 Submitted by Alexandra K. Bodnar, Aneta Turlik, David Huang, Will Butcher, Joanna K. Lew, and Timothy R. Newhouse, Checked by Aoi Takeuchi, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue	4. 巻 98
2. 論文標題 Preparation of Hindered Aniline CyanH and Application in the Allyl-Ni-Catalyzed , - Dehydrogenation of Carbonyls	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Syntheses	6. 最初と最後の頁 263 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15227/orgsyn.098.0263	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27件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 伊藤 寛晃
2. 発表標題 複雑ペプチド系天然物を基盤とした新規生物活性分子の創出戦略
3. 学会等名 第10回慶應有機化学若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 元棋、伊藤 寛晃、井上 将行
2. 発表標題 Bioactivity Enhancement by Structural Modification of an Anticancer Natural Product Efrapeptin C
3. 学会等名 第21回次世代を担う有機化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 寛晃、三浦 健介、井上 将行
2. 発表標題 複雑ペプチド系天然物ヤクアミドBのOne-Bead-One-Compound戦略による構造単純化
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 寛晃
2. 発表標題 天然物の構造多様化を基盤とした新規生物活性分子の創出戦略
3. 学会等名 第56回天然物化学談話会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 右田貴大、薛贊唯、伊藤寛晃、井上将行
2. 発表標題 グラミシジンAトリプトファン改変体の合成と機能向上
3. 学会等名 第56回天然物化学談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 右田貴大、薛贊唯、伊藤寛晃、井上将行
2. 発表標題 グラミシジンAトリプトファン改変体の合成と機能向上
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 寛晃
2. 発表標題 天然物の構造多様化を基盤とした新規生物活性分子の創出戦略
3. 学会等名 化生談話会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 寛晃
2. 発表標題 固相全合成を基盤としたペプチド系複雑天然物の構造多様化と機能向上
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 澤田 瑞希、柿澤 大夢、竹内 碧、伊藤 寛晃、井上 将行
2. 発表標題 海洋産シデロフォア ロイヒケリンCおよび人工類縁体の固相全合成と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 右田貴大、伊藤寛晃、井上将行
2. 発表標題 グラミシジンAトリプトファン残基の位置異性体への置換による機能改変
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 柿澤大夢、竹内碧、伊藤寛亮、井上将行
2. 発表標題 ロイヒケリンCの固相全合成研究
3. 学会等名 第82回有機合成化学協会関東支部シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦健介、伊藤寛晃、井上将行
2. 発表標題 ヤクアミドB類縁体OBOCライブラリーの構築・評価法の開発
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue
2. 発表標題 Solid-Phase Total Synthesis and Functional Analysis of Yaku'amide B and Its Analogues
3. 学会等名 ICCEOCA-15 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 元棋、伊藤 寛晃、井上 将行
2. 発表標題 エフラベプチンCおよび類縁体の固相全合成と機能解析
3. 学会等名 第66回薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoi Takeuchi, Hiromu Kakizawa, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue
2. 発表標題 Synthetic Study of Delftibactin A
3. 学会等名 第13回大津会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Itoh, Yun-Wei Xue, Masayuki Inoue
2. 発表標題 Functional Analysis of an Ion-Channel-Forming Peptidic Natural Product Gramicidin A
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田遥友、付俊豪、伊藤寛晃、井上将行
2. 発表標題 キノン認識ペプチド系天然物のトリプトファン残基改変体の全合成と機能解析
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿澤 大夢、澤田 瑞希、竹内 碧、伊藤 寛晃、井上 将行
2. 発表標題 ロイヒケリンCの固相全合成
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 元棋、伊藤 寛晃、井上 将行
2. 発表標題 エフラペプチンCおよび類縁体の固相全合成と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦 健介、伊藤 寛晃、井上 将行
2. 発表標題 One-bead-one-compound戦略によるヤクアミドBの構造単純化
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤寛晃，井上将行
2. 発表標題 OBOCライブラリー戦略に基づくペプチド系天然物の機能制御
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 付 俊豪，中田 遥友，伊藤 寛晃，井上 将行
2. 発表標題 ライソシンEトリプトファン残基変体の設計，合成および機能解析
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内碧, 伊藤寛晃, 井上将行
2. 発表標題 18O/16O-encoding strategy for microscale stereochemical determination of peptidic natural products
3. 学会等名 AIMECS2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue
2. 発表標題 Solid-Phase Total Synthesis and Target Identification of Yaku'amide B
3. 学会等名 Pacifichem2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 薛贊唯, 伊藤寛晃, 井上将行
2. 発表標題 イオンチャネル形成天然物グラミシジンAの機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷光一, 喜多村佳委, 伊藤寛晃, 櫻井香里, 井上将行
2. 発表標題 合成プローブを利用したヤクアミドBの生物活性発現機構解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中田遥友, 伊藤寛晃, 井上将行
2. 発表標題 WAP-8294A2トリプトファン類縁体の合成と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroaki Itoh	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 22
3. 書名 Discovery of Natural Product Analogues with Altered Activities by a High-Throughput Strategy, In New Tide of Natural Product Chemistry (H. Ishikawa and H. Takayama, eds.)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチド系抗がん活性化化合物	発明者 井上将行, 伊藤寛晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/42956	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>東京大学大学院薬学系研究科天然物合成化学教室ホームページ https://inoue.f.u-tokyo.ac.jp/index.html 薬学部トピックス(2022/6/6) https://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=1&key=1654503399 薬学部トピックス(2021/11/8) https://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=1&key=1636371110 薬学部トピックス(2021/7/29) https://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=2&key=1627555517</p>

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			
オーストリア	IST Austria			
米国	Massachusetts Institute of Technology			
イスラエル	Technion			