

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659004

研究課題名(和文)ペプチド性医薬品創製のための新概念の構築と検証

研究課題名(英文)A new concept for drug discovery from peptide natural products

研究代表者

大石 真也(Oishi, Shinya)

京都大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80381739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多数のN-メチルアミド結合を有するペプチド性天然物の効率的な合成法の確立を目指して検討を行った。まず、細胞増殖抑制活性を有するcoibamide Aの固相合成を試み、主鎖骨格を構築するための条件を最適化した。環化反応を経て得られた生成物は天然物の提唱構造のエピ体であったが、天然物よりもやや弱い細胞増殖抑制活性を維持していた。また、IB-01212の全メチル化反応を経た合成プロセスを確立し、複数の誘導体による構造活性相関からペプチド主鎖のコンフォメーションが生物活性に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Facile synthetic approaches to peptide natural products with multiple N-methyl amide bonds were investigated. For the synthesis of antiproliferative coibamide A, the solid-phase protocols were optimized. The macrolactonization of the linear precursor provided a coibamide A epimer with slightly less potent antiproliferative activity. Additionally, a facile synthetic process of IB-01212 via multiple N-methylation was established. The structure-activity relationship of a series of the derivatives revealed that the peptide conformation would mainly contribute to the bioactivity.

研究分野：創薬化学

キーワード：ペプチド 二次代謝産物 天然物 全合成 薬らしさ

1. 研究開始当初の背景

ペプチド性化合物は、消化管内での分解や低い膜透過性ゆえに経口投与できないと考えられており、創薬研究の対象として敬遠されることが多かった。しかしながら、シクロスポリンは、Lipinski の Rule of Five によると経口吸収性が乏しいと判断されるペプチド性薬剤であるにも関わらず、多くが経口投与製剤として利用されている。また、シクロスポリンは細胞内のシクロフィリンに結合して薬理作用を示し、ペプチド性化合物であるにも関わらず、小分子化合物と同様の生物物理化学的特性を有している。こうした微生物由来のペプチド性二次代謝産物は、*N*-メチル基や分子内水素結合形成によりペプチド結合のアミド水素の溶媒接触能が失われ、エステル結合に類似した物性に変化していると考えられる。これらのペプチドの化学合成では、*N*-メチルアミド結合形成反応(縮合反応)の効率が著しく低く、多数の連続する *N*-メチルアミド結合を含むペプチド性二次代謝産物の化学合成は容易でない。このため、魅力的な生物活性を示すペプチドについて、構造活性相関研究を効率よく進めるための優れた化学合成法が必要とされていた。

2. 研究の目的

多数の *N*-メチルアミド結合を含むペプチドの効率的な構造活性相関研究の実現を目指して、新規 *N*-メチル化プロセスを利用した *N*-メチルアミド結合含有ペプチドの簡便な化学合成法を開発する。また、抗腫瘍活性デプシペプチドを検証例として、魅力的な生物活性を示す微生物の二次代謝産物由来のペプチド類に見られる *N*-メチルアミド結合について、そのペプチドの構造・生物活性・細胞膜透過性への寄与を精査する。

3. 研究の方法

Coibamide A の合成におけるトリホスゲン (BTC) を用いた縮合反応: BTC を THF に溶解し、Fmoc アミノ酸、2,4,6-コリジン、DIEA を加えた。この溶液を THF に懸濁したペプチド樹脂に加えて、2.5 時間または 4 時間振とうした。

Coibamide A の合成における固相樹脂上での *N*-メチル化反応: 2,4,6-コリジンと NsCl を NMP に溶解し、この溶液をペプチド樹脂に加えて 15 分間振とうした。続いて、Ns 保護ペプチド樹脂に THF 中 PPh<sub>3</sub> と MeOH を加えた後、DIAD を加えて 30 分間振とうした。最後に、Ns 保護ペプチド樹脂に NMP 中 2-メルカプトエタノールと DBU を加えて 5 分間振とうした。

IB-01212 の合成における全メチル化反応: 基質ペプチドと酸化銀を含む DMF 懸濁液に MeI を滴下後、遮光下室温で一昼夜攪拌した。MeOH を添加後、酢酸エチルで抽出し、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーによ

り精製し、目的のメチル化産物を得た。

4. 研究成果

[ Coibamide A の合成研究 ]

Coibamide A (1)の合成は、直鎖ペプチド 2 を Fmoc 固相合成法によって得た後、マクロラクトン化を経て合成することとし、縮合条件及び環化条件を精査した(図1)。

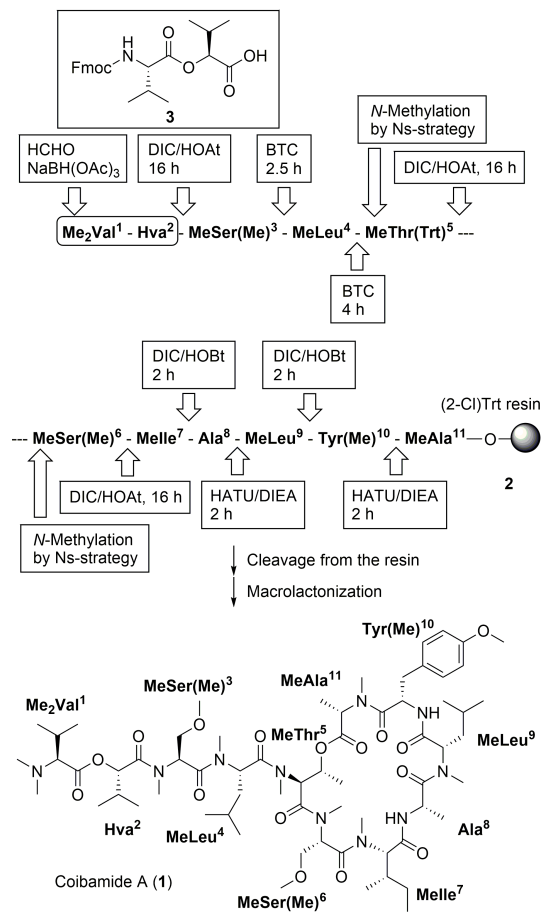


図1: Coibamide A の合成

直鎖ペプチド 2 の合成において、Tyr(Me)<sup>10</sup> と Ala<sup>8</sup> の *N*-メチルアミノ酸への縮合反応では HATU/DIEA を、MeLeu<sup>9</sup> と Melle<sup>7</sup> の縮合反応では DIC/HOBt をそれぞれ用いることにより、アシル化反応が収率よく進行した。MeSer(Me)<sup>6</sup> 及び MeThr(Trt)<sup>5</sup> の導入では、DIC/HOAt を用いて Ser(Me)もしくは Thr(Trt) を縮合後、固相樹脂上における *N*-メチル化反応を行った。MeLeu<sup>4</sup> 及び MeSer(Me)<sup>3</sup> の縮合反応は、BTC を用いた場合に縮合反応が完結した。N 末端の 2 残基相当部分 (Me<sub>2</sub>Val-Hva) は、あらかじめ合成したエステル 3 を DIC/HOAt により縮合後、得られたペプチドに対して固相樹脂上での還元的アミノ化反応を行うことにより構築した。

次に、得られた環化前駆体を用いてマクロラクトン化反応の検討を行った。種々縮合剤を検討したところ、MSNT を用いたときに低収率ながら環化体を得られた。一方、この環化体のスペクトルデータの一部が天然物のもものと異なっていたため、その化学構造を共

同研究により精査したところ、得られた環化体が D-MeAla<sup>11</sup> エピ体であることが判明した。

#### [ Coibamide A エピマーの生物活性 ]

得られた[D-MeAla<sup>11</sup>]-coibamide A の各種腫瘍細胞株への生物活性を評価した。[D-MeAla<sup>11</sup>]-coibamide A は、3種類の細胞株 (A549、HCT116、MCF-7、B16) に対して nM レベルの細胞毒性を示した(表1)。また、共同研究により、化学合成により得られた[D-MeAla<sup>11</sup>]-coibamide A の生物活性を天然物と比較した。4種類の細胞株 (H292、MDA-MB-231、PC-3、SF-295) に対する細胞毒性を評価したところ、[D-MeAla<sup>11</sup>]-coibamide A は天然物の 1/4 ~ 1/8 程度の細胞毒性を示した(表2)。

表1 : [D-MeAla<sup>11</sup>]-coibamide A の各種腫瘍細胞株に対する細胞毒性

Cell line	IC <sub>50</sub> (nM)
A549	19.0
HCT116	44.6
MCF-7	48.6
B16	54.4

表2 : Coibamide A と[D-MeAla<sup>11</sup>]-coibamide A の各種腫瘍細胞株に対する細胞毒性の比較

Cell line	IC <sub>50</sub> (nM)	
	coibamide A (natural product)	[D-MeAla <sup>11</sup> ]-coibamide A (synthetic product)
H292	124	610
MDA-MB-231	66	545
PC-3	80	424
SF-295	219	816

#### [ 全メチル化反応を利用した IB-01212 の合成 ]

N-メチルアミノ酸や特殊な縮合剤を使用しない新たな IB-01212 (4)の合成を計画した(図2)。非修飾のペプチド結合としてペプチド鎖を伸長してテトラペプチド5を得た後、ペプチド結合の N-メチル化反応を同時に行うことにより IB-01212 の2つの N-メチルアミド結合を構築した。この際、N-メチル基を有しない Me<sub>2</sub>Leu-Ser 間のペプチド結合には、Ser の側鎖水酸基を介してオキサゾリジン型保護基を付しておき、メチル化反応後に脱保護することで非修飾のペプチド結合とした。以上のプロセスにより、一般的なペプチドの化学合成法と保護基を付した条件下でのアミド結合の N-メチル化反応を経て、IB-01212 の前駆体ペプチド7が収率よく得られた。

続いて、先例に従って基質7からの二量化環化反応による IB-01212 の合成を検討した。この際、目的の環化反応が進行し低収率ながら IB-01212 が得られたものの、無視できない量のエピ体の生成が認められた。このエピ化の過程を精査したところ、二量化のプロセスではなく環化反応においてエピ化が生じていることが判明した。

#### [ IB-01212 誘導体の構造活性相関 ]

IB-01212 およびそのエピ体8とフェニルア

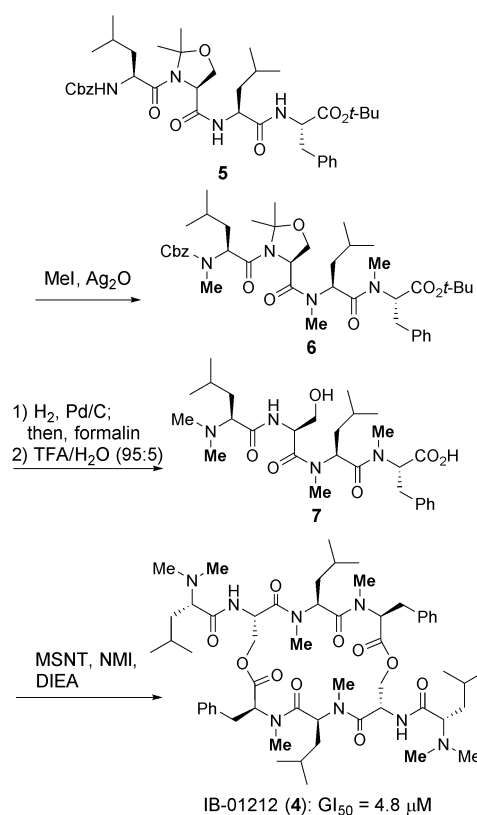


図2 : 全メチル化反応を用いた IB-01212 の合成

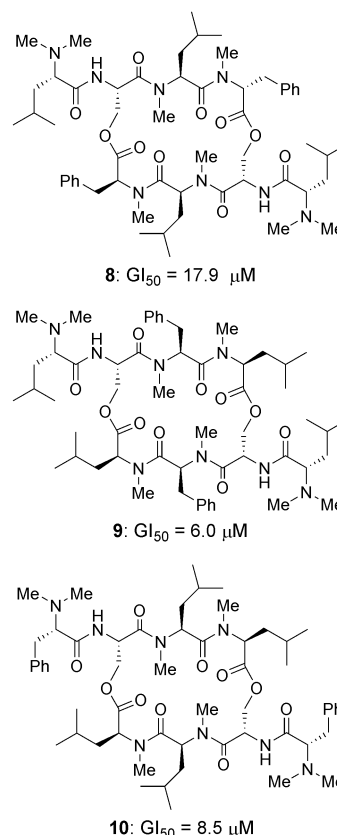


図3 : IB-01212 誘導体の細胞毒性

ランンの位置を変えた2種類の誘導体について、細胞増殖抑制活性を評価した(図3)。MePhe部位のエピ体8は、IB-01212 よりいくぶん低い細胞増殖抑制活性を示したのに対

し、フェニルアラニンの位置を変えた9および10はIB-01212とほぼ同等の細胞増殖抑制活性を示した。これにより、IB-01212誘導体の生物活性の発現には、アミノ酸側鎖官能基よりもペプチド主鎖のコンフォメーションの寄与が大きいことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kobayashi Y, Oishi S, Kobayashi K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Fujii N. Synthesis and functional analysis of deferriferrichrysin derivatives: application to colorimetric pH indicators. *Bioorg. Med. Chem.* 21(14) 4296-4300 (2013)

doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.078

Nabika R, Oishi S, Misu R, Ohno H, Fujii N. Synthesis of IB-01212 by multiple N-methylations of peptide bonds. *Bioorg. Med. Chem.* 22(21) 6156-6162 (2014)

doi: 10.1016/j.bmc.2014.08.036

Nabika R, Suyama TL, Hau AM, Misu R, Ohno H, Ishmael JE, McPhail KL, Oishi S, Fujii N. Synthesis and biological evaluation of the [D-MeAla<sup>11</sup>]-epimer of coibamide A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(2) 302-306 (2015)

doi: 10.1016/j.bmcl.2014.11.044

他1件

[学会発表](計13件)

小林由佳、小林数也、大石真也、堤浩子、秦洋二、大野浩章、藤井信孝「デフェリフェリクリシンの合成と新規キレート錯体の探索」第7回日本ケミカルバイオロジー学会年会 [2012年6月 京都大学(京都市)]

小林由佳、小林数也、大石真也、堤浩子、秦洋二、大野浩章、藤井信孝「デフェリフェリクリシンの合成と新規金属キレート錯体の探索」第44回若手ペプチド夏の勉強会 [2012年8月 ロッジ舞洲(大阪市)]

小林由佳、小林数也、大石真也、堤浩子、秦洋二、大野浩章、藤井信孝「Synthesis and investigation of novel metal complexes of deferriferrichrysin」第49回ペプチド討論会 [2012年11月 かごしま県民交流センター(鹿児島市)]

小林由佳、小林数也、大石真也、堤浩子、秦洋二、大野浩章、藤井信孝「デフェリフェリクリシン誘導体の合成と構造機能相関研究への応用」日本薬学会第133年会 [2013年3月 パシフィコ横浜(横浜市)]

Nabika R, Oishi S, Ohno H, Fujii N. 「Synthetic studies on coibamide A」The first Asian conference for “Monodukuri” strategy for synthetic organic chemistry [2013年7月 Southern Beach Hotel & Resort Okinawa(沖縄

県糸満市)]

Oishi S. 「Development of novel kinesin spindle protein (KSP) inhibitors」The First Asian Conference for “Monodukuri” Strategy for Synthetic Organic Chemistry [2013年7月 Southern Beach Hotel & Resort Okinawa(沖縄県糸満市)]

Kobayashi Y, Oishi S, Kobayashi K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Fujii N. 「Synthesis and functional analysis of deferriferrichrysin derivatives」2nd Annual Conference ICBS2013 [2013年10月 京都大学芝蘭会館(京都市)]

松田剛、並河亮太、大石真也、大野浩章、藤井信孝「Coibamide Aの合成研究」第63回日本薬学会近畿支部大会 [2013年10月 同志社女子大学(京都府京田辺市)]

Oishi S, Takeuchi T, Ohno H, Sawada J, Asai A, Fujii N. 「Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors with diaryl amine scaffold」9th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium [2013年10月 The Grand Hotel Taipei(台湾 台北市)]

Kobayashi Y, Oishi S, Kobayashi K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Fujii N. 「Synthesis and investigation of ferrichrysin derivatives」4th Asia-Pacific International Peptide Symposium [2013年11月 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)]

Nabika R, Oishi S, Misu R, Ohno H, Fujii N. 「Synthesis of IB-01212 by site-selective N-methylation of peptide bonds」4th Asia-Pacific International Peptide Symposium [2013年11月 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)]

並河亮太、大石真也、三須良介、大野浩章、藤井信孝「ペプチド結合のN-メチル化反応を利用したIB-01212の合成研究」第40回反応と合成の進歩シンポジウム [2014年11月 東北大学(仙台市)]

小林由佳、大石真也、大野浩章、藤井信孝「鉄(II)イオン配位性ペプチドの設計と機能評価」日本薬学会第135年会 [2015年3月 デザイン・クリエイティブセンター神戸(神戸市)]

[その他]

所属研究室ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizo/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 真也 (OISHI, Shinya)

京都大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：80381739