

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790107

研究課題名(和文)ペプチドリード創薬のための新規アミド結合等価体の創出と応用

研究課題名(英文) Design and Synthesis of Chloroalkene Dipeptide Isosteres as Ground State Peptidomimetics for drug discovery

研究代表者

鳴海 哲夫(Narumi, Tetsuo)

静岡大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50547867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：創薬標的分子として重要なペプチドをリードとするペプチドリード創薬研究を加速することを目的として、ペプチド結合をクロロアルケン類に置換した生物学的等価体の合成法の開発と構造解析について検討した。その結果、trans-アミド配座を模倣したクロロアルケン型ジペプチドイソスター(以下、CADI)のラージスケール合成法およびジアステレオ選択的アリル位アルキル化反応を利用したXaa-Xaa型CADIの高立体選択的合成法の開発に成功した。これらの成果は、今後のアルケン型ジペプチドイソスターを用いた創薬研究の進展に資するものである。

研究成果の概要(英文)：As part of a program aimed at acceleration of the peptide-lead drug discovery, synthetic studies and a structural analysis of a newly designed dipeptide bioisosteres possessing an E/Z-chloroalkene unit as the surrogate functionality of a peptide bond were investigated. In this study, practical and divergent methodologies for the synthesis of chloroalkenes dipeptide isosteres (CADIs) have been developed including large-scale synthesis of Xaa-Gly-type CADIs and highly diastereoselective synthesis of Xaa-Xaa-type CADIs. These studies should contribute to the development of alkene dipeptide isosteres-based medicinal chemistry.

研究分野：創薬化学

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：アミド結合等価体

1. 研究開始当初の背景

近年ヒトとウィルスの戦いは複雑になり、疾病構造が大きく変化しつつある。この変化に対応するために、微量で強力な生理活性を有するペプチドをリードとするペプチドリード創薬が注目を集めている。古くからペプチド性医薬品の開発研究が行われており、近年では 40 種類を超えるペプチド性医薬品が市販され、臨床応用中のものは 300 種類近くに及んでいる。また Kent らによって報告された Native Chemical Ligation に代表される化学選択的ライゲーション法を用いて、非天然アミノ酸を含むペプチド誘導体やタンパク質誘導体の化学合成が精力的に行われ、それらを用いた創薬研究も進められている。このように世界的に需要が高いペプチドを基盤としたペプチドリード創薬であるが、ペプチドの主鎖骨格を形成するペプチド結合の加水分解性や、構成分子であるアミノ酸の側鎖に起因する凝集性などが問題となり、医薬品への直接展開は容易ではない。そこで、ペプチドが有する生物活性や機能を保持したまま、ペプチドの弱点を克服するペプチドミメティックなどの有機化学的手法がペプチドリード創薬研究において多数用いられている。

報告者はペプチドミメティックの中でも加水分解酵素により切断されやすいペプチド結合を、酵素に対し安定な不飽和結合に置換したアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究およびそれらを基盤とした創薬研究を展開してきた。報告者らはアルケン型、フルオロアルケン型、トリフルオロメチルアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法を確立し、CXCR4 アンタゴニストや GPR54 アゴニスト、HIV 膜融合阻害剤など種々の生理活性ペプチドを導入することで、それらイソスターの機能評価を行ってきた。特に、これまで皆無であった異なるアルケン型イソスターを導入したペプチドミメティックの比較研究 (例えば、アルケン型 vs フルオロアルケン型ミメティック) を精力的に行い、個々のアルケン型イソスターの特性を明らかにしている。

2. 研究の目的

このような背景を基に本研究課題では報告者が新たに設計したクロロアルケン型ジペプチドイソスター (以下、CADI) の短工程かつ立体選択的な合成法を確立し、X 線結晶構造解析によるペプチド主鎖の二面角(,)の等価性についての評価を行い、アルケン型ジペプチドイソスターの特性を生かした創薬研究を加速するための基礎的知見を得ることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) *trans*-アミド配座および *cis*-アミド配座を模倣したクロロアルケン型ジペプチドイソ

スターの立体選択的合成法の開発

アルケン型ジペプチドイソスターの合成では、ペプチド結合を模倣したオレフィンの幾何異性と、アミノ酸の側鎖に相当する α 位および δ 位のアルキル基の立体配置を同時に制御することが求められる。申請者はすでに γ 位に二つの塩素原子を有する α,β -不飽和カルボニル化合物に対し、有機銅試薬を作用させることでクロロアルケン骨格が得られることを見出している。また、有機銅試薬の調製に用いる銅塩や添加剤によってクロロオレフィンの幾何異性が制御できることも見出している。そこで、これら予備的研究を踏まえ、*trans*-アミド配座および *cis*-アミド配座それぞれを模倣したクロロアルケン型ジペプチドイソスターの効率的かつ立体選択的合成法を確立する。

(2) X 線結晶構造解析によるペプチド主鎖の二面角(,)の等価性についての評価

ペプチドの立体構造はペプチド結合面同士の間角(,)で決まり、基底状態ミメティックはこの二面角を忠実に再現することが求められる。そこで、本研究によって得られる CADI を X 線結晶構造解析し、理論計算手法による解析と併せて、その模倣能を評価する。

4. 研究成果

(1) *trans*-アミド模倣型 CADI のラージスケール合成法の開発

アルケン型ジペプチドイソスターを生理活性ペプチドに応用するには、マルチグラムスケールでの合成が求められる。そこで、CADI をマルチグラムで合成可能なラージスケール合成法の開発を目指し、工程数や精製回数の低減に焦点をあてた L-Val-Gly 型 CADI の合成研究に着手した。

Ellman らによって報告された光学活性な *tert*-ブチルスルフィンアミドを出発原料として、アルデヒドとの縮合、リチウムエノラトを用いた Mannich 型反応により、 α,α -ジクロロ- β -アミノエステルをジアステレオ選択的に合成した。続いて、*tert*-ブチルスルホニル (Bus) 基への酸化、エステル基の還元、Horner-Emmons 反応により鍵中間体 γ,γ -ジクロロ- α,β -不飽和エステルを合成した。これに対し、ヨウ化銅とメチルリチウムより調整した有機銅試薬を作用させることで、(*Z*)-クロロアルケン骨格を構築した。さらに、保護基の変換、加水分解を経て、目的とする L-Val-Gly 型 CADI を合成した。本合成法は、全 9 工程、カラム精製 2 回、総収率 65% であり、目的としたマルチグラムスケールでの CADI の合成が可能である。

(2) ジアステレオ選択的アリル位アルキル化

反応を利用した Xaa-Xaa 型 CADI の高立体選択的合成法の開発

近年 Feringa らは末端 *gem*-アリルジクロリドを基質とした触媒的不斉アリル位アルキル化反応による (*Z*)-ビニルクロリドの立体選択的合成法を報告している。これに対し、報告者らは不斉中心に隣接する内部 *gem*-アリルジクロリドに対し、量論量の有機銅試薬を作用させることでアリル位アルキル化反応が進行し、1,4-遠隔不斉誘起によってわずかながらジアステレオ選択性が発現することを報告している。そこで、 γ 位に配位性官能基としてスルホンアミド基を導入した γ,γ -ジクロロ- α,β -不飽和エステルを用いることで、銅錯体への配位によって高ジアステレオ選択性が発現するものと考え、Xaa-Xaa 型 CADI の合成研究に着手した。

γ,γ -ジクロロ- α,β -不飽和エステルに対し、シアン化銅および種々の有機金属試薬より調整した有機銅試薬を作用させることで、アリル位アルキル化反応が高収率かつ 1,4-遠隔不斉誘起により高ジアステレオ選択的に進行することを見出した。また、本反応では有機亜鉛試薬を用いることで、反応は円滑に進行し、一般的に困難とされるアリル基や嵩高いアリール基も立体選択的かつ高収率で導入可能であることを明らかにした。本反応を利用して、 α 位に様々な置換基を有する(L,D)型 CADIs を合成するとともに、オレフィンの幾何異性体を用いることで、(L,L)型 CADIs の合成にも成功した。

(3) *cis*-アミド配座を模倣する(*E*)-クロロアルケン骨格の高立体選択的構築と反応機構の詳細に関する研究

報告者らは以前の検討により γ 位に二つの塩素原子を有する α,β -不飽和カルボニル化合物に対し、嵩高いアルキル基を有する有機銅試薬を作用させると、(*E*)-クロロアルケンが高収率および高立体選択的に得られることを見出している。しかしながら、本反応の詳細については未解明であった。そこで、基質一般性や反応機構について精査した。その結果、エチルエステルや *tert*-ブチルエステルエステルに加え、ニトリルでも反応は進行し、さらにトリフルオロエチルエステルやヘキサフルオロイソプロピルエステルを基質とすることで、*E* 選択性が向上することを明らかにした。また、反応機構について精査した結果、 γ -アリル銅中間体において γ - β 平衡を経由するアルケンの異性化が示唆され、反応温度の上昇に伴い *Z* 体の生成比が向上したことから、(*E*)-クロロアルケンは速度論的生成物であることを明らかにした。

(4) X 線結晶構造解析によるペプチド主鎖の二面角(ϕ , ψ)の等価性についての評価

本研究に寄って得られた L-Val-D-Ala 型

CADI の X 線結晶構造解析の結果、天然のジペプチドとの高い構造的相同性が確認され、特に二重結合性を有するペプチド結合の距離とクロロアルケンの距離は等しく、クロロアルケン骨格がアミド結合等価体として有用であることが示唆された。

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 13 件)

1. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level *ab* Initio Calculations. Narumi, T.; Tsuzuki, S.; *Tamamura, H. *Asian J. Org. Chem.* (査読有) **3** (4), pp.497-503 (2014).
2. Development of the 8-aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl group as a new entry of photolabile protecting groups. Takano, H.; *Narumi, T.; Takano, H.; Ohashi, N.; Suzuki, A.; Furuta, T.; *Tamamura, H. *Tetrahedron* (査読有) **70** (29), pp. 4400-4404 (2014).
3. Isostere-Based Design of 8-Azocoumarin-Type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity-Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. Narumi, T.; Takano, H.; Ohashi, N.; Suzuki, A.; Furuta, T.; *Tamamura, H. *Org. Lett.* (査読有) **16** (4), pp.1184-1187 (2014).
4. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitors: Pharmacokinetic. Hashimoto, C.; Narumi, T.; Otsuki, H.; Hirota, Y.; Arai, H.; Yoshimura, K.; Harada, S.; Ohashi, N.; Nomura, W.; Miura, T.; Igarashi, T.; Matsushita S.; *Tamamura, H., *Bioorg. Med. Chem.* (査読有) **21** (24), pp.7884-7889 (2013).
5. Generation of a Replication-competent Simian-human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. Otsuki, H.; Hishiki, T.; Miura, T.; Hashimoto, C.; Narumi, T.; Tamamura, H.; Yoshimura, K.; Matsushita, S.; *Igarashi, T. *J. Gen. Virol.* (査読有) **94** (12), pp.2710-2716 (2013).
6. Peptide-based Ligand Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C. Ohashi, N.; Nomura, W.; Narumi, T.; *Tamamura, H., *Biopolymers: Peptide Science* (査読有) **100** (6), pp.613-620 (2013).
7. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. Narumi, T.; Aikawa, H.; Tanaka, T.; Hashimoto, C.; Ohashi, N.,

- Nomura, W.; Kobayakawa, T.; Takano, H.; Hirota, Y.; Murakami, T.; Yamamoto, N.; *Tamamura, H. *ChemMedChem* (査読有) 8 (1), pp.118-124 (2013).
8. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. **Narumi, T.**; Arai, H.; Yoshimura, K.; Harada, S.; Hirota, Y.; Ohashi, N.; Hashimoto, C.; Nomura, W.; Matsushita, S.; *Tamamura, H., *Bioorg. Med. Chem.* (査読有) 21 (9), pp.2518-2526 (2013).
 9. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. **Narumi, T.**; Komoriya, M.; Hashimoto, C.; Wu, H.; Nomura, W.; Suzuki, S.; Tanaka, T.; Chiba, J.; Yamamoto, N.; Murakami, T.; *Tamamura, H., *Bioorg. Med. Chem.* (査読有) 20 (4), pp.1468-1474 (2013).
 10. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. Nomura, W.; Hashimoto, C.; Ohya, A.; Miyauchi, K.; Urano, E.; Tanaka, T.; **Narumi, T.**, Nakahara, T.; Komano, J. A.; Yamamoto, N.; *Tamamura, H., *ChemMedChem* (査読有) 7 (2), pp.205-208 (2012).
 11. Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines. Hashimoto, C.; Nomura, W.; Ohya, A.; Urano, E.; Miyauchi, K.; **Narumi, T.**; Aikawa, H.; Komano J. A.; Yamamoto, N.; *Tamamura, H., *Bioorg. Med. Chem.* (査読有) 20 (15), pp.3287-3291 (2012).
 12. Pharmacophore-Based Small Molecule CXCR4 Ligands. **Narumi, T.**; Tanaka, T.; Hashimoto, C.; Nomura, W.; Aikawa, H.; Sohma, A.; Itotani, K.; Kawamata, M.; Murakami, T.; Yamamoto, N.; *Tamamura, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (査読有) 22 (12), pp.4169-4172 (2012).
 13. Stereoselective Formation of Trisubstituted (Z)-Chloroalkenes Adjacent to a Tertiary Carbon Stereogenic Center by Organocuprate-Mediated Reduction/Alkylation. **Narumi, T.**; Kobayakawa, T.; Aikawa, H.; Seike, S.; *Tamamura, H. *Org. Lett.* (査読有) 14 (17), pp.4490-4493 (2012).
- [学会発表](計28件)
1. **鳴海哲夫**, 小早川拓也, 玉村啓和, 1,4-遠隔不斉誘起によるジアステレオ選択的アリル位アルキル化反応の開発, 日本薬学会 第134回年会, 2014年3月28日, 熊本
 2. Takano, H., **Narumi, T.**, 他3名, Development of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups that Efficiently React under Aqueous Milieu Based on Amide-Alkene Isosterism, The 17th Korean Peptide Protein Society Symposium, 2013年11月29日, Seoul (Korea)
 3. 廣田雄樹, **鳴海哲夫**, 他 HIV 活性を有する CD4 ミミック誘導体の構造活性相関研究: インドール型誘導体の設計, 合成とその生物活性評価, 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月26日, 東京
 4. 大橋南美, **鳴海哲夫**, 他3名, FRET を基盤とする PKC リガンドスクリーニング法の開発, 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月26日, 東京
 5. 小早川拓也, **鳴海哲夫**, 玉村啓和, クロロアルケン型ジペプチドイソスターのラージスケール合成法の開発, 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月26日, 東京
 6. 高野皓, **鳴海哲夫**, 他3名, 水性環境下で効率的に反応する 8-アザクマリニルメチル型光分解性保護基の開発, 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月26日, 東京
 7. **Narumi, T.**, Kobayakawa, T., Tamamura, H., Design and Synthesis of Chloroalkene Dipeptide Isosteres as Ground State Peptidomimetics, The 10th Australian Peptide Conference, 2013年9月11日, Penang (Malaysia)
 8. 廣田雄樹, **鳴海哲夫**, 他7名, HIV 外被タンパク質 gp120 を分指標的とするインドール型低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究, 日本ケミカルバイオロジー研究会第8回年会, 2013年6月21日, 東京
 9. 小早川拓也, **鳴海哲夫**, 他2名, 有機銅試薬によるクロロアルケン類の立体選択的合成法の開発, 日本ケミカルバイオロジー研究会第8回年会, 2013年6月21日, 東京
 10. 高野皓, **鳴海哲夫**, 他3名, 水性環境下で効率的に反応する 8-アザクマリニルメチル型光分解性保護基の開発, 日本ケミカルバイオロジー研究会第8回年会, 2013年6月21日, 東京
 11. 野村渉, **鳴海哲夫**, 他3名, 2価結合型リガンドのケモカインレセプター CXCR4 の発現認識と細胞移動阻害活性に関する研究, 日本ケミカルバイオロジー研究会第8回年会, 2013年6月20日, 東京
 12. 大橋南美, **鳴海哲夫**, 他4名, FRET を用いた PKC リガンド結合性評価法の開発研究, 日本ケミカルバイオロジー研究会第8回年会, 2013年6月20日, 東京
 13. **鳴海哲夫**, 相川春夫, 玉村啓和, カチオン-相互作用を利用したインドール類の Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発,

- 日本ケミカルバイオジー研究会第 8 回
年会、2013 年 6 月 20 日、東京
14. **鳴海哲夫**、相川春夫、玉村啓和、機能性
アゾリウム塩によるインドール類の
Friedel-Crafts 型共役付加反応、日本薬学
会第 133 回年会、2013 年 3 月 30 日、横
浜
15. 小早川拓也、**鳴海哲夫**、他 2 名、E 型ク
ロロアルケン骨格の立体選択的合成法
の開発、日本薬学会第 133 回年会、2013
年 3 月 30 日、横浜
16. 廣田雄樹、**鳴海哲夫**、他 3 名、HIV 外被
タンパク質 gp120 を標的としたイン
ドール型低分子 CD4 ミミックの創製、日
本薬学会第 133 回年会、2013 年 3 月 29
日、横浜
17. 高野皓、**鳴海哲夫**、他 3 名、水性環境下
で効率的に反応する 8-アザクマリニル
メチル型光分解性保護基の開発、日本薬
学会第 133 回年会、2013 年 3 月 28 日、
横浜
18. **鳴海哲夫**、廣田雄樹、他 5 名、低分子型
CD4 ミミック：HIV 外被タンパク質の
構造変化を促す HIV 侵入阻害剤、第 30
回メディシナルケミストリーシンポジ
ウム、2012 年 11 月 28 日、東京
19. 廣田雄樹、**鳴海哲夫**、他 10 名、HIV 外
被タンパク質 gp120 を標的とするイン
ドール型低分子 CD4 ミミックの創製研
究、第 26 回日本エイズ学会学術集会・
総会、2012 年 11 月 26 日、東京
20. 高野皓、**鳴海哲夫**、他 7 名、HIV-1 MA,
CA タンパク質を基にした新規抗 HIV-1
剤の創製研究、第 26 回日本エイズ学会
学術集会・総会、2012 年 11 月 25 日、
東京
21. 相川春夫、**鳴海哲夫**、他 11 名、ペプチ
ドミメティック型インテグラーゼ阻害
剤の構造活性相関研究、第 26 回日本エ
イズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月
24 日、東京
22. 野村渉、**鳴海哲夫**、他 2 名、Development
of Cell-Penetrating ZIP Tag-Probe Systems
for Fluorescent Imaging of Protein
Dynamics in Cells, 第 49 回ペプチド討論
会、2012 年 11 月 8 日、鹿児島
23. 小早川拓也、**鳴海哲夫**、他 2 名、有機
銅試薬によるアリル位アルキル化反応
を基軸とする Z 型クロロアルケン骨格
の立体選択的合成法の開発、第 38 回反
応と合成の進歩シンポジウム、2012 年
11 月 6 日、東京
24. **鳴海哲夫**、他 2 名、アゾリウム塩を酸
触媒とするインドール類の
Friedel-Crafts 型共役付加反応の開発、
第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム、
2012 年 11 月 6 日、東京
25. 紺野誠、**鳴海哲夫**、他 2 名、二核亜鉛錯
体型 CXCR4 アンタゴニストの創製、第
56 回日本薬学会関東支部大会、2012 年

- 10 月 13 日、東京
26. **鳴海哲夫**、他 2 名、高活性イミダゾール
カルベンの創製を目指した構造活性相
関研究、第 56 回日本薬学会関東支部大
会、2012 年 10 月 13 日、東京
27. **Narumi, T.**; Seike, S., 他 2 名 ,
Stereoselective Formation of Trisubstituted
(Z)-Chloroalkenes Flanking Two
Stereogenic Centers by
Organocopper-Mediated Reduction/
Alkylation. 244th American Chemical
Society National Meeting & Exposition,
2012 年 8 月 21 日, Philadelphia (USA)
28. **鳴海哲夫**、Isostere Chemistry: ペプチド
結合等価体の合成と応用、東京理科大
学. 2012 年 5 月 30 日

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~ttnarum/>

6. 研究組織

(1) 研究代表

鳴海 哲夫 (NARUMI TETSUO)

静岡大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50547867

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし