

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860005

研究課題名(和文) アミノ酸・ペプチドの新規修飾法の開発と新規アミドイソスターの開発

研究課題名(英文) Development of new modification methods of peptide terminal using carbophilic Lewis acid and a new peptide isostere

研究代表者

相川 春夫(AIKAWA, Haruo)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：70547322

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)：ペプチドC末端アミドの修飾法開発において、安息香酸アミドをモデル基質として、カチオン性金触媒存在下、ベンジル化に成功した。  
オキサザボロリジン(CXCR4結合性リガンドFC131)を導入した環状ペプチドイソスターを合成し、ESI-MSにより確かめた。生理活性を調べたところ、10 microMで毒性は示さなかったものの、抗HIV-1活性は見られなかった。  
Fmocアミノ酸を用いた非極性有機溶媒のゲル化に成功した。

研究成果の概要(英文)：In the studies of development of new peptide-modification reactions, benzylation of benzoic amide was successfully proceeded in the presence of cationic gold catalyst.  
Oxazaborolidine was successfully introduced to FC131, cyclic pentapeptide which can bind to CXCR4, and ESI-MS showed cyclic product, mono-hydrated product, and dihydrated product peaks. This isostere did not show anti-HIV-1 activity and cytotoxicity at 10 microM.  
Fmoc-amino acid revealed to be very effective gelator of non-polar organic solvent such as chloroform and hexane.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ペプチド アルキル化 オキサザボロリジン イソスター カチオン性触媒 ゲル

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドやその単量体であるアミノ酸は生理活性物質から機能性材料まで幅広く研究対象として注目されている。原料であるアミノ酸は入手容易であるが、一方でより高機能のアミノ酸やペプチドを合成しようとする場合、問題点も多い。例えば酵素分解性や凝集性、アミノ酸カルボニル基の炭素上でのラセミ化を誘発する強塩基条件下の反応が困難であることという問題がある。また、生理活性を有するペプチドも酵素による分解が起こるため経口投与できず、医薬品へ直結しないという問題もある。新しいアミノ酸合成法、ペプチドミメティックの開発が求められる。

### 2. 研究の目的

本研究では、高機能性ペプチドミメティック・アミノ酸の開発を目的に、触媒の新規ペプチド末端・アミノ酸側鎖修飾法の開発、新規ペプチドミメティックの開発を行い、その知見を基に CXCR4 アンタゴニストへのペプチドミメティック導入とゲル創製研究に展開を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) アミノ酸側鎖の誘導化研究

研究代表者はこれまでにオルトアルキニル安息香酸アルキルエステルがカチオン性金触媒存在下、アルキン部位の活性化によって脱離能を向上させ、アルコール等の弱い求核剤もアルキル化できることを報告している。この方法をアミノ酸側鎖のアルキル化に応用することとした。すなわち、セリンの側鎖水酸基をオルトアルキニル安息香酸エステルとし、金触媒による活性化と続く求核置換反応により側鎖の官能基化が温和な条件で達成できるか検討を行った。求核剤として、アリル金属種の検討を行った。アリル基が導入できると、オレフィン部位を起点に種々官能基化が容易に行うことができ、また、ゲル化研究の基質の検討も容易になると考えた。

#### (2) ペプチド主鎖 N,C 末端の官能基化

合成ペプチドにおいて、しばしば主鎖の N 末端をアセチル化、C 末端をアミド化することで反応点を無くす(キャッピング)処理が施される。種々の実験系での安定性が確保できるが、一方でキャッピング後のペプチド末端の修飾は困難である。そこで、上述の金触媒による求核置換反応や付加反応を用いることで官能基化が可能ではないかと考えた。アセチル化されたペプチド N 末端はアレンを求電子剤として用いて、O-アルキル化-クライゼン転移反応により N 末端の官能基化を行った。アミド化されたペプチド C 末端は金触媒存在下で活性化されるアルキル化剤を利用して官能基化を試みた。

#### (3) 新規ペプチドイソスターの開発

医薬品プロファイル向上のためにペプチド結合の非ペプチド化が必要である。そこで、オキサザボロリジンに注目し、ペプチドイソスターとして利用することを考えた。本骨格はホウ素上の空軌道と隣接ヘテロ原子上の非共有電子対との共鳴により適度な平面性および柔軟性を有していると考えた。また、標的分子に合わせてホウ素上の水和状態を変化させることができる分子が創製可能であると考えた。本イソスターの評価は重要な創薬標的の一つである 7 回膜貫通型タンパク質 CXCR4 への結合活性が既知の環状ペプチド FC131 にオキサザボロリジンを組み込んだイソスターを合成して行うこととした。導入するナフチルアラニンのボロン酸イソスターは文献の方法を参考に合成を試みた。ペプチドの合成は Fmoc 固相合成法により行った。合成したイソスターは ESI-MS 測定により確認し、平衡状態の観測を行うこととした。このイソスターを用いて細胞毒性を調べ、CXCR4 結合活性を抗 HIV-1 活性試験にて評価した。

#### (4) アミノ酸誘導体を用いたゲル形成研究

側鎖に二重結合を有する Fmoc アミノ酸を合成する際、この分子がヘキサ中、超音波照射することでゲル化することが分かった。Fmoc アミノ酸のゲル化剤は知られているものの、側鎖の効果等系統的に調べられた例はない。そこで、この予備の実験結果を基に、Fmoc アミノ酸誘導体による低分子ゲル化剤の研究を行うこととした。上述(1)の方法を用いて種々の側鎖を有する Fmoc アミノ酸を合成し、ゲル化の検討を行うこととした。ゲル化可能な溶媒の選定、条件検討、ゲル化に必要なゲル化剤の量の検討等を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) アミノ酸側鎖の誘導化研究

Fmoc セリンに対して、オルトアルキニル安息香酸クロライドを反応させて、収率 38%で目的の側鎖に安息香酸エステル有する Fmoc アミノ酸とした。ここに 10mol%のカチオン性金触媒存在下、酢酸エチル溶媒中でアリルシランやアリルスタナン等を求核剤として反応させたが、基質の加水分解が見られるのみで目的のセリン側鎖アルキル化体は得られなかった。

#### (2) ペプチド主鎖 N,C 末端の官能基化

アセチル化されたペプチド N 末端修飾反応を行うにあたり、モデル基質としてアセチルアミドを用いた反応を行った。この基質に対して 1-トリルアレンを求電子剤として反応させると、目的の反応が進行した場合、アセチル基のメチルがアルキル化されたものが生成物として考えられる。パラジウムクロライド触媒存在下、DDQ を添加物として加えてテトラヒドロフラン溶媒中、60 度で 15 時間反応させたが、目的のアルキル体は得られず、

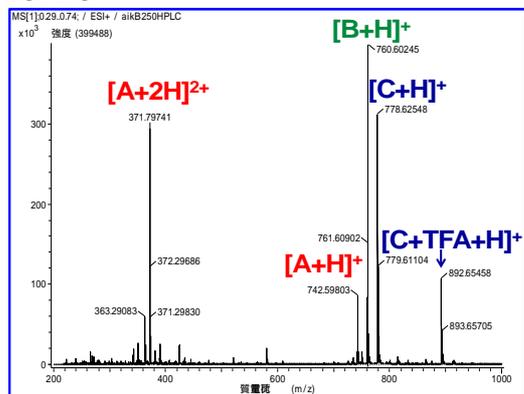
62%の原料回収となった。触媒検討として銀、銅触媒存在下、1,4-ジオキサン中、100 度で 5 時間反応させたが、74%の原料が回収されるのみであった。より求核的なチオアセチルアミドを基質としてカチオン性金触媒を用いて1,4-ジオキサン中80度16時間反応を行ったが反応は進行しなかった。

C 末端アミドのアルキル化に関して、安息香酸アミドをモデル基質としてオルトアルキルニル安息香酸ベンジルエステルをアルキル化剤としてカチオン性金触媒存在下反応させた。薄層クロマトグラフィで反応を追跡したところ、アルキル化剤の安息香酸エステルは30度3時間、80度12時間反応させても消失しなかった。反応温度を100度まで上昇させ、4時間攪拌したところ安息香酸エステルは消失し、目的の基質アミドのNベンジル化体が収率41%で得られた。また、アルキル化剤の脱離部位であるクマリン誘導体が定量的に得られた。本反応によるペプチド修飾の可能性を示すことができた。

### (3) 新規ペプチドイソスターの開発

FC131 のオキサザボロリジンイソスター合成を考え、ナフチルアラニンのボロン酸イソスター合成を行った。ボロン酸トリエチルエステルとナフチルメチル Grignard 反応剤との反応、続くピナンジオールとの反応によりナフチルメチルボロン酸ピナンエステルとした。クロロメチルアニオンとの反応と1,2転移、LHMDS との反応、TFA による脱保護によりナフチルアラニンのボロン酸イソスターを得た。FC131 のオキサザボロリジンイソスターを合成するため、FC131 の構成アミノ酸の内、ナフチルアラニン以外のアミノ酸を固相合成により連結し、脱樹脂後に上記ナフチルアラニンのボロン酸イソスターと縮合した。合成したペプチドの脱保護を行いHPLC精製後にESI-MSを測定したところ目的の環状ペプチドの分子量が観測できた(下図のA)。また同時に1水和体(下図B)、2水和体(開環体)(下図C)の分子量も観測された。本結果は、すくなくともESI-MS測定条件下で環状ペプチドが設計通り様々な水和状態や環状/非環状状態を平衡で取れることを示している。

#### ESI-MS

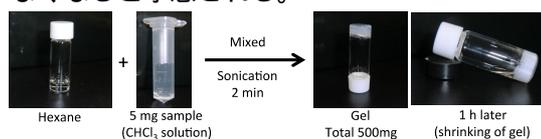


本ペプチドイソスターの効果を見積もるた

めに抗 HIV-1 活性試験および細胞毒性試験を行った。コントロールとして FC131 の試験を行ったところ、10 μM の濃度では細胞毒性を示さず、さらに、EC50 で数十 nM の抗 HIV-1 活性を示した。一方、オキサザボロリジン導入型 FC131 イソスターは 10 μM の濃度では細胞毒性を示さないものの、抗 HIV-1 活性を示さなかった。これはペプチドイソスターの環化状態の安定性が問題だと考えている。

### (4) アミノ酸誘導体を用いたゲル形成研究

4-ペンテンを側鎖に有する Fmoc アミノ酸をクロロホルムに溶解させ、ヘキサンに滴下、2 分間の超音波照射することでゲル化が進行した。500mg の溶媒をゲル化させるために 5mg の Fmoc アミノ酸で十分であったことから、本化合物はスーパーゲル化剤の分類である。ゲルは白濁しており、約 1 時間程度で収縮し、保持していた溶媒を一部遊離させた。同様のゲル化検討を種々の溶媒を用いて検討した。非極性溶媒として芳香族溶媒を検討した。ベンゼンでは一部ゲル化は進行するもののゲル化したのは 30%程度であった。トルエンでは 50%程度ゲル化が起こり、透明なゲルを形成した。ゲルの見た目が溶媒により変化することが分かった。クロロベンゼン、アセトフェノン、アニリンではゲル化が起こらなかった。また、極性溶媒として、水、ジメチルスルホキシド、メタノールやそれらの混合溶媒系を検討したが、ゲルは得られなかった。これらの結果から、本化合物を用いたゲル化は Fmoc 間のスタッキング相互作用や化合物間の水素結合が重要であり、芳香族溶媒や極性溶媒がそれらを阻害するとゲル化が進行しなくなると予想される。



#### < 引用文献 >

Aikawa, H.; Tago, S., Umetsu, K.; Haginiwa, N.; Asao, N. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 1774.

Watanabe, T.; Momose, I.; Abe, M.; Abe, H.; Sawa, R.; Umezawa, Y.; Ikeda, D.; Takahashi, Y.; Akamatsu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2009**, *19*, 2343.

Ryan, D. M.; Doran, T. M.; Anderson, S. B.; Nilsson, B. L. *Langmuir*, **2011**, *27*, 4029.

### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相川 春夫 (AIKAWA, Haruo)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教

研究者番号：70547322