

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850068

研究課題名(和文)環状ペプチドPF1171類の三次元構造に着目した活性発現機構研究

研究課題名(英文)Action mechanism study of PF1171 hexapeptides focused on their 3D structures

研究代表者

増田 裕一(MASUDA, Yuichi)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：90617755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの麻痺活性やアポリポタンパク質Bの産生抑制活性を示す環状ペプチドPF1171類を有機合成した。X線結晶構造解析法や核磁気共鳴法により、分子内水素結合がPF1171類の三次元構造の維持において重要であることを明らかにした。類縁体を合成して三次元構造と活性の関係を綿密に調べることにより、結晶で見られた三次元構造が活性発現に深く関わっていることを示唆した。構造活性相関の知見を基に、PF1171類の標的分子探索が可能な分子プローブを設計・合成した。

研究成果の概要(英文)：We achieved organic synthesis of PF1171 hexapeptides, cyclic peptides with paralytic activity against silkworms and inhibitory activity against production of apolipoprotein B. X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance revealed significance of intramolecular hydrogen bonds in maintaining 3D structure of PF1171 hexapeptides. 3D structure-activity relationship study suggested that the 3D structure observed in the crystal is closely related to bioactivity. Based on the structure-activity relationship, we designed and synthesized molecular probes of PF1171 hexapeptides which can search for their target biomolecules.

研究分野：農芸化学、生物有機化学、ペプチド化学、核磁気共鳴

キーワード：環状ペプチド、カイコ、アポリポタンパク質B、X線結晶構造解析、核磁気共鳴、三次元構造、構造活性
相関、分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

天然由来の生物活性環状ペプチドには、様々な相互作用の絶妙なバランスによって特異な三次元構造を取るものがある。それらの三次元構造形成ならびに活性発現機構を解明することにより、有用な生物活性環状ペプチドの合理的な設計が可能になる。

PF1171 類 (図 1) は、複数種の子囊菌から生産される 19 員環の環状ペプチドで、*N*-メチルロイシン、ピペコリン酸、アントラニル酸などの特殊なアミノ酸残基に、D 体を含む 3 つのアミノ酸残基が連結した特異な構造を有している。PF1171 類は様々な生物活性を示し、アポリポタンパク質 B の産生抑制活性、モルモット心臓に対する強心作用、カイコに対する経口投与での麻痺活性が報告されている。PF1171 類はユニークな構造と活性を有することから、その三次元構造形成ならびに活性発現機構に興味を持たれた。

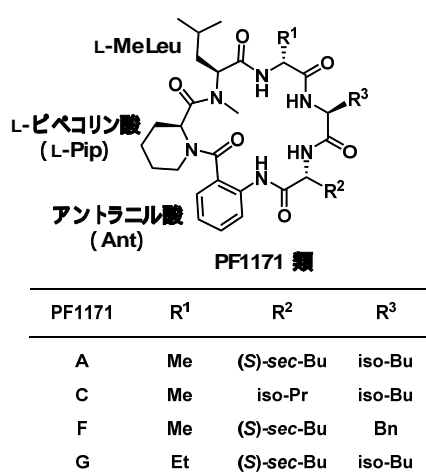


図 1 PF1171 類の化学構造

2. 研究の目的

PF1171 類の三次元構造に着目し、有機化学的手法と機器分析法を駆使して、活性発現機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 類縁体合成を指向して、PF1171 類の固相法を用いた全合成を行った。

(2) PF1171 類の三次元構造を、X 線結晶構造解析ならびに核磁気共鳴 (NMR) により解析した。

(3) 構築した三次元構造モデルを基に、類縁体を設計・合成した。類縁体の生物活性を評価するだけでなく、三次元構造を解析して比較することにより、三次元構造と活性の関係を考察した。

(4) 構造活性相関研究の結果を基に PF1171 類の分子プローブを設計・合成した。

4. 研究成果

(1) PF1171 類の固相法による合成では、スプリット&ミックス合成が容易なブロック状固相担体 (Lantern) を用い、ペプチド鎖の伸長は Fmoc 法により行った。求核性が弱いアントラニル酸の芳香族アミンに対する縮合は、トリホスゲンとコリジンをを用いて系中で酸クロライドを発生させる方法を用いることにより、高収率で進行させることができた。固相から切り出した後、鎖状ペプチドを液相で環化することで、PF1171A、C、F、G の初の全合成を達成した (図 2)。

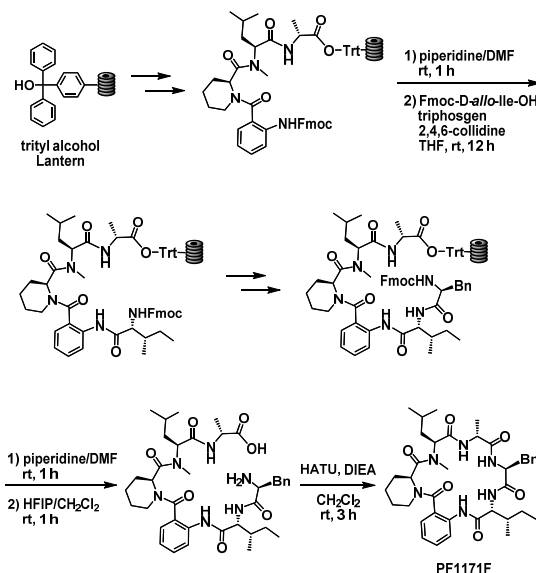


図 2 PF1171F の全合成

(2) PF1171F の単結晶の X 線結晶構造解析を行った結果、4 つの分子内水素結合の存在が確認され、これらが三次元構造の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された (図 3)。同時に、NMR による構造解析を行い、得られた核間距離情報と二面角情報を満たす立体配座を分子力学計算プログラムの MacroModel を用いて探索した結果、PF1171F は重クロロホルム中において上述の単結晶構造 (図 3) とほぼ同じ立体配座を形成していることが明らかとなった。

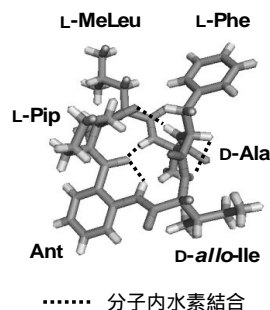


図 3 PF1171F の X 線結晶構造

(3) X線結晶構造情報がある PF1171F を元に 23 種類の類縁体を設計・合成し、これらの類縁体をカイコに血液注射して麻痺活性を評価するとともに、NMR による三次元構造解析を行った。その結果、¹H NMR スペクトルが PF1171F と類似している類縁体 (D-allo-Ile→D-Ala など) では活性が維持されているのに対し、分子内水素結合の様式が変わって NMR スペクトルが異なる類縁体 (D-Ala→L-Ala など) では活性が失われる傾向が見られた。本結果は、結晶で見られた三次元構造 (図 3) が麻痺活性の発現に深く関わっていることを示唆している。このように、三次元構造と活性の関係を緻密に研究した例は過去にほとんどなく、骨格が柔軟であることが課題となっていた環状ペプチドの新たな研究戦略を提示することができた。

一方で、PF1171 類縁体のヒト肝癌細胞株 HepG2 に対するアポリポタンパク質 B 産生抑制活性を、ELISA を用いた比色定量により評価したところ、天然物の PF1171 類は 50 μM の濃度でアポリポタンパク質 B の産生を 40% 抑制した。しかし、開環体やエナンチオマーも同等の抑制活性を示したことから、本活性に係る相互作用に立体化学は関与しておらず、特異性が低いものと考えられた。

(4) 側鎖に光反応基やアジドを有するアミノ酸数種を合成した。これらのアミノ酸を導入した PF1171F 類縁体 11 種を合成し、活性評価した結果、L-MeLeu の側鎖にアジド基を、L-Phe の芳香環のパラ位に光反応基であるトフルオロジアジリンを導入した類縁体が活性を維持していた。さらに、アジド部位に対してアルキンとのクリック反応を行うことで、ピオチンを導入した類縁体を合成することができた。本分子プローブを用いることにより、標的分子の効率的な探索を行うことができると考えられる。

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 8 件)

- 1) Masuda, Y., Maruyama, C., Kawabata, K., Hamano, Y., Doi, T.*: Synthesis of (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyarginine and its inhibitory activity against nitric oxide synthase. *Tetrahedron* **2016**, 72, 5602–5611. [査読有]
DOI: 10.1016/j.tet.2016.07.050
- 2) Masuda, Y., Aoyama, K., Yoshida, M., Kobayashi, K., Ohshiro, T., Tomoda, H., Doi T.*: Design, synthesis, and biological evaluation of beauveriolide analogues bearing photoreactive amino acids. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 754–765. [査読有]
DOI: 10.1248/cpb.c16-00095

- 3) Yoshida, M., Onda, Y., Masuda, Y., Doi, T.*: Potent oxazoline analogue of apratoxin C: synthesis, biological evaluation, and conformational analysis. *Biopolymers (Peptide Science)* **2016**, 106, 404–414. [査読有]
DOI: 10.1002/bip.22781
- 4) 増田裕一, 土井隆行: 生物活性環状ペプチド PF1171 類と apratoxin C の全合成と三次元構造解析. *化学工業* **2016**, 67, 18–25. [解説記事, 査読有]
DOI: なし
- 5) Kawahara, T., Kagaya, N., Masuda, Y., Doi, T., Izumikawa, M., Ohta, K., Hirao, A., Shin-Ya, K.*: Foxo3a inhibitors of microbial origin, JBIR-141 and JBIR-142. *Org. Lett.* **2015**, 17, 5476–5479. [査読有]
DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02842
- 6) Masuda, Y., Tanaka, R., Ganesan, A.,* Doi, T.*: Structure revision of similanamide to PF1171C by total synthesis. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 2286–2291. [査読有]
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00643
- 7) Masuda, Y., Suzuki, J., Onda, Y., Fujino, Y., Yoshida, M., Doi, T.*: Total synthesis and conformational analysis of apratoxin C. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8000–8009. [査読有]
DOI: 10.1021/jo500861k
- 8) Masuda, Y., Tanaka, R., Kai, K., Ganesan, A.,* Doi, T.*: Total synthesis and biological evaluation of PF1171A, C, F, and G, cyclic hexapeptides with insecticidal activity. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 7844–7853. [査読有]
DOI: 10.1021/jo501130b

[学会発表] (計 26 件)

- 1) 増田裕一, 丸山千登勢, 川畑球一, 濱野吉十, 土井隆行: (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy arginine の合成と一酸化窒素合成酵素の阻害活性. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学, 京都府京都市). 2017 年 3 月 18 日 [口頭発表: 講演番号 2C15a10, 査読無]
- 2) 増田裕一: 環状ペプチドの三次元構造に着目した構造 - 活性相関研究. 第 51 回 天然物化学談話会 (湯沢東映ホテル, 新潟県南魚沼郡). 2016 年 7 月 7 日 [口頭発表 (ショートトーク), 査読有]
- 3) 増田裕一, 田中錬, 土井隆行: カイコ麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の三次元構造 - 活性相関. 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市). 2016 年 3 月 27 日. [ポスター発表: 講演番号 3B064, 査読無]

- 4) Yuichi Masuda, Jun Suzuki, Masahito Yoshida, Takayuki Doi: Total synthesis and 3D structural analysis of apratoxin C. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM 2015) (Honolulu, Hawaii). December, 16, 2015 [口頭発表: 講演番号 ORGN861, 査読有]
- 5) 増田裕一, 田中錬, 土井隆行: カイコ麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の全合成と三次元構造 - 活性相関. 第 57 回天然有機化合物討論会 (神奈川県民ホール, 神奈川県横浜市). 2015 年 9 月 9 日 [口頭発表: 講演番号 07, 査読有]
- 6) 増田裕一, 田中錬, 土井隆行: 生物活性環状ペプチド PF1171 類の構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年会 (東北大学萩ホール, 宮城県仙台市). 2015 年 6 月 10 日 [口頭発表: 講演番号 O-06, 査読有]
- 7) 増田裕一, 田中錬, 甲斐建次, A. Ganesan, 土井隆行: 昆虫麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の全合成と三次元構造解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山大学, 岡山県岡山市). 2015 年 3 月 27 日 [口頭発表: 講演番号 2E21p19, 査読無, 2015 年度大会トピックス賞受賞]
- 8) Yuichi Masuda, Ren Tanaka, Kenji Kai, A. Ganesan, and Takayuki Doi.: Total synthesis and 3D structural analysis of PF1171A, C, F, and G: 第 51 回ペプチド討論会 (徳島大学蔵本キャンパス 大塚講堂, 徳島県徳島市). 2014 年 10 月 23 日 [口頭発表: 講演番号 O-1, 査読有]
- 9) Yuichi Masuda, Ren Tanaka, Kenji Kai, A. Ganesan, and Takayuki Doi.: Synthesis and biological evaluation of PF1171F analogues: 第 51 回ペプチド討論会 (徳島大学蔵本キャンパス 大塚講堂, 徳島県徳島市). 2014 年 10 月 23 日 [ポスター発表: ポスター番号 P-036, 査読無]
- 10) 増田裕一. 生物活性環状ペプチドの合成と三次元構造解析: 第 13 回化学系若手研究者セミナー (東北薬科大学 70 周年記念講堂, 宮城県仙台市). 2014 年 9 月 6 日. [招待講演]
- 11) 増田裕一. 固体 NMR を用いた生体分子の分子間相互作用の解析. 第 49 回天然物化学談話会 (せとうち児島ホテル, 岡山県倉敷市). 2014 年 7 月 3 日 [口頭発表 (ショートトーク), 査読有]

他 15 件 (省略)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 環状デプシペプチド化合物
 発明者: 土井隆行, 吉田将人, 増田裕一, 恩田勇一
 権利者: 土井隆行, 吉田将人, 増田裕一, 恩田勇一
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-027262
 出願年月日: 2016-02-16
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.mie-u.ac.jp/~masuda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 裕一 (MASUDA, Yuichi)
 三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授
 研究者番号: 90617755

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

甲斐 建次 (KAI, Kenji)
 大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師
 研究者番号: 40508404

(4) 研究協力者

田中 錬 (TANAKA, Ren)
 東北大学・大学院薬学研究所・大学院生