

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06156

研究課題名(和文)ポリセオナミドを基盤としたイオンチャネル形成分子の設計・合成・機能制御

研究課題名(英文) Design, Synthesis and Functional Analysis of Ion-Channel-Forming Molecules Based on Polytheonamide Structure

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)・助教

研究者番号：20758205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イオンチャネル形成ペプチド天然物であるポリセオナミドBの構造改変により、その極めて強い細胞毒性を制御するための方法論確立を目的とし、機能制御および詳細な細胞毒性発現評価のために必要となるポリセオナミドおよびその類縁体の効率的な固相合成法の確立を目指した。適切な保護基戦略を用いることにより、ポリセオナミドBの固相全合成を達成した。これにより、これまで多段階の液相反応やHPLC精製を要した合成が、飛躍的に簡便な操作で実施可能となった。また、量的供給の観点からも優れた合成法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Polytheonamide B is an ion-channel-forming 48-mer natural peptide that displays extraordinarily potent cytotoxicity. This study focuses on establishment of highly efficient solid-phase synthetic strategy for detailed functional and biological investigations of polytheonamide B and its analogues. Novel strategy of protective groups for component amino acids enabled full solid-phase total synthesis of polytheonamide B and its analogues. The newly established synthetic strategy significantly reduced the number of solution-phase synthetic steps and HPLC purification steps, leading to the efficient and facile synthesis of the total structure of polytheonamide B.

研究分野：有機化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：固相合成 有機化学 合成化学 ペプチド イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

ポリセオナミド B (1、図 1) は 48 個の D 体および L 体のアミノ酸残基が交互に配列する巨大ペプチド天然物であり、側鎖が高度にメチル化・酸化された特異な構造を有する。また、P388 マウス白血病細胞に対して $IC_{50} = 0.098$ nM という極めて強い細胞毒性を示すことが特徴である。この細胞毒性は、主鎖が形成する水素結合に加え、6 残基離れた側鎖間の水素結合からなる 4 つの側鎖水素結合ネットワーク (図 1、系列 A: 15-45、系列 B: 23-47、系列 C: 31-43、系列 D: 16-22) により、生体膜中で長さ 4.5 nm、内径 0.4 nm の $\beta^{6.3}$ ヘリックスを形成し (図 2)、ヘリックス内部を 1 価カチオンが通過するイオンチャンネルとして機能することに起因すると考えられているが、詳細な細胞毒性発現機構については未だ不明な点も多い。

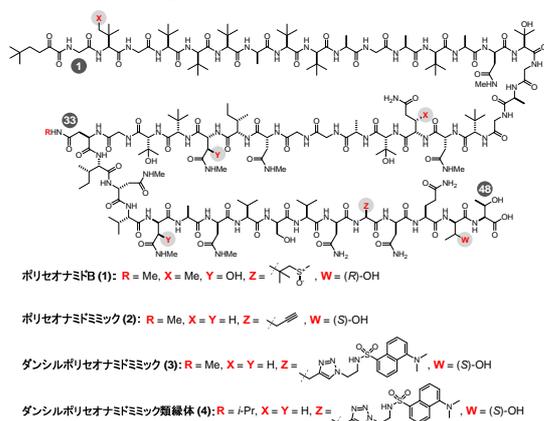


図 1 ポリセオナミド B (1)、ポリセオナミドミミック (2)、ダンシルポリセオナミドミミック (3) およびダンシルポリセオナミドミミック類縁体 (4) の構造式

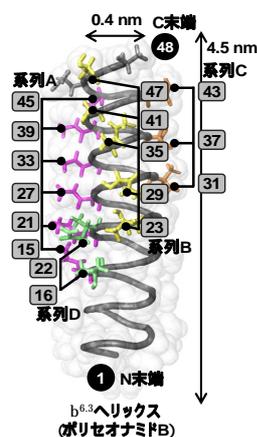


図 2 1 が形成するイオンチャンネルの想定活性コンフォメーション ($\beta^{6.3}$ ヘリックス) と側鎖水素結合ネットワーク (系列 A-D)

研究代表者が所属する研究グループ (主宰: 井上 将行教授) では、これまでに固相合成と液相反応を組み合わせることで 1 の全合成を達成した。また、これまでに研究代表者は側鎖

の単純化・修飾を目的として設計したダンシルポリセオナミドミミック (3、図 1) を合成し、天然物 1 と同様に脂質二重膜中においてイオンチャンネル機能を有することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究は、イオンチャンネル形成ペプチド天然物である 1 を基盤構造とし、強力な細胞毒性を活かした抗がん薬シーズの創出を目指し、構造改変により 1 の特異な機能を制御するための方法論確立を目的とした。

3. 研究の方法

上記の機能制御を実現するためには、詳細な細胞毒性発現機構の解明とそのために必要となる効率的な 1 および類縁体の合成的供給が不可欠である。従来 1 の合成法は、側鎖極性官能基によるペプチド鎖の会合・凝集や副反応により、直線的な経路を採用することが困難であった。そのため、従来法は合成終盤に多段階の液相反応や HPLC 精製を要し、原理的に多種類の誘導体合成には適さない。そこで、機能制御および詳細な細胞毒性発現評価のために必要な 1 および類縁体の効率的な固相合成法の確立を目指した。固相に担持されたペプチドはろ過で精製するため、固相合成を主体とした経路を実現することで、合成を飛躍的に効率化できる。

4. 研究成果

効率的な固相合成によるポリセオナミド類の合成を実現するため、固相担体として種々の溶媒中で高い膨潤率を示し、縮合反応が高効率で進行することが期待される ChemMatrix を採用し、マイクロ波を利用した Fmoc 固相合成法により主鎖を伸長することとした。また、48 個のアミノ酸残基からなるポリセオナミドの全体構造を N 末端フラグメント (1-11 残基) および C 末端フラグメント (12-48 残基) の 2 つに分割し、これらを固相担体上で連結することによって構築する計画を立てた。

まず、主鎖アミノ酸を置換した各種誘導体の合成・評価の効率を向上することを目指し、ポリセオナミド B の側鎖改変体であるポリセオナミドミミック (2、図 1) の固相合成による構築検討を行った (図 3)。まず、Fmoc-Gly-Wang-ChemMatrix (5) をピペリジン処理した後、マイクロ波照射下 HATU/HOAt を用いて Fmoc アミノ酸を縮合し、これを繰り返すことで N 末端フラグメント 8 を総収率 13% で合成した。また、H-L-Thr(Ot-Bu)-trityl ChemMatrix (9) に対し、HATU/HOAt を用いて Fmoc アミノ酸をマイクロ波照射下縮合し、続くピペリジンによる処理で Fmoc 基を除去した。この縮合・脱保護を繰り返すことで、樹脂に結合した C 末端フラグメント 10 を得た。10 に対し、N 末端フラグメント 8 を固相担体上で縮合する検討を行ったところ、

PyBOP/HOAt を用いることで 48 残基からなる全体構造が得られた。この保護ペプチドを樹脂から切断し、TFA により脱保護することで、2 を総収率 3.0% で合成することに成功した。2 は第 44 残基側鎖にアルキンを有し、従来法であるチオエステルおよび硝酸銀を用いた液相カップリングでは得ることが困難であった。本化合物は、アルキンの変換による誘導体化により、様々な機能解析への展開の可能性を有する化合物である。

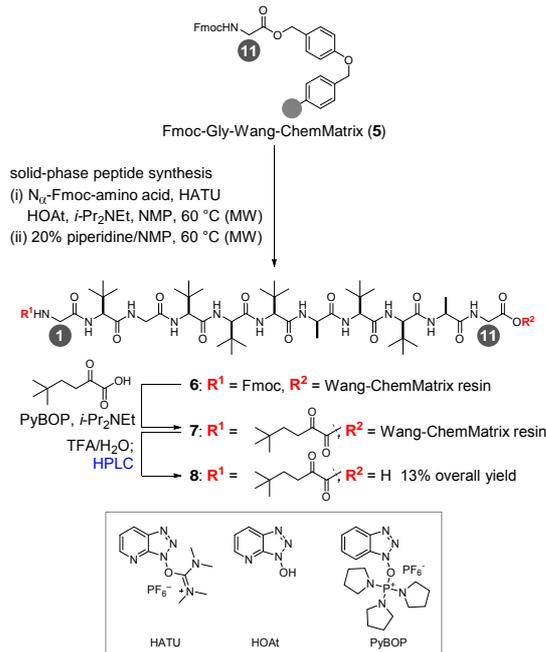


図 3 2 の固相全合成

また、新規ポリセオナミド類縁体として、第 33 残基に N-イソプロピルアスパラギンを導入したダンシルポリセオナミドミミック類縁体(4, 図 1)を合成し、P388 マウス白血病細胞に対する細胞毒性を評価したところ、3 ($IC_{50} = 12 \text{ nM}$)と同等($IC_{50} = 8.8 \text{ nM}$)の細胞毒性を示した。

続いて、2 の合成法をより複雑な側鎖構造を有する天然物 1 の固相全合成へ適用することを試みた。この際、従来法では無保護であった第 15、21、27、33、35、39 残基メ

チルアスパラギン 11 側鎖のメチルアミド基は 2,4,6-トリメトキシベンジル(Tmb)基で、また第 22 残基β-メチルグルタミン 12 側鎖の 1 級アミド基はトリチル(Tr)基で保護してそれぞれ 16、17 として固相合成を実施した。しかし、本合成においては 2 の合成と異なり副生成物が得られるのみで、全体構造の構築は困難であった。この結果は、主にアミノ酸 13、14、15 側鎖に存在するβ位ヒドロキシ基に起因すると予想し、これらを新たに TBS 基により保護して 18、19、20 として固相合成に用いることで、副反応を抑制することを計画した(図 4)。

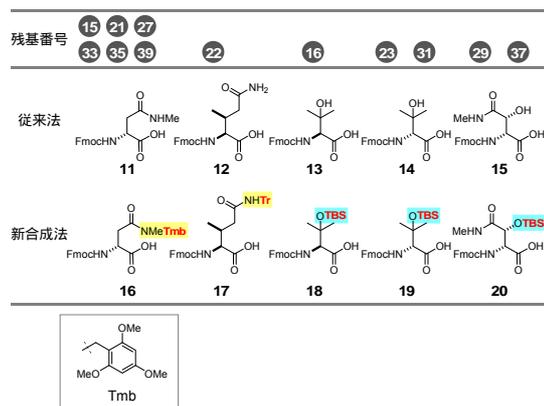


図 4 1 の固相合成で新たに保護した Fmoc アミノ酸

実際の合成においては、N 末端フラグメント 23 を 2 の合成と同様に樹脂 5 から総収率 15% で調製した。続いて C 末端フラグメント 24 の合成を行った。図 4 に示したとおり、新たに保護基を導入した Fmoc アミノ酸を用いて固相合成を行うことにより、これまで困難であった樹脂に結合した 24 の合成に成功した。さらに、23 を 24 と PyBOP/HOAt を用いて縮合することにより、固相担体上で全体構造の構築が実現できた。課題となった脱保護に関しては、TBAF/AcOH による処理により TBS 基を 2 個除去した後、ペプチドを樹脂から切断し、液相において TFA 処理に付すことで、導入した 18 個全ての保護基の除去を実現した。HPLC 精製を経て、総収率 4.5% で 1 の固相全合成を達成した。本法は、液相反応 1 回、HPLC による精製 2 回で 1 の合成が可能であることから、液相反応 9 回、HPLC による精製 9 回を要する従来法と比較して飛躍的に効率化できたと言える。また、本法は従来法(総収率 4.5%)と同等の総収率であり、量的供給の観点からも優れた合成法であると言える(表 1)。

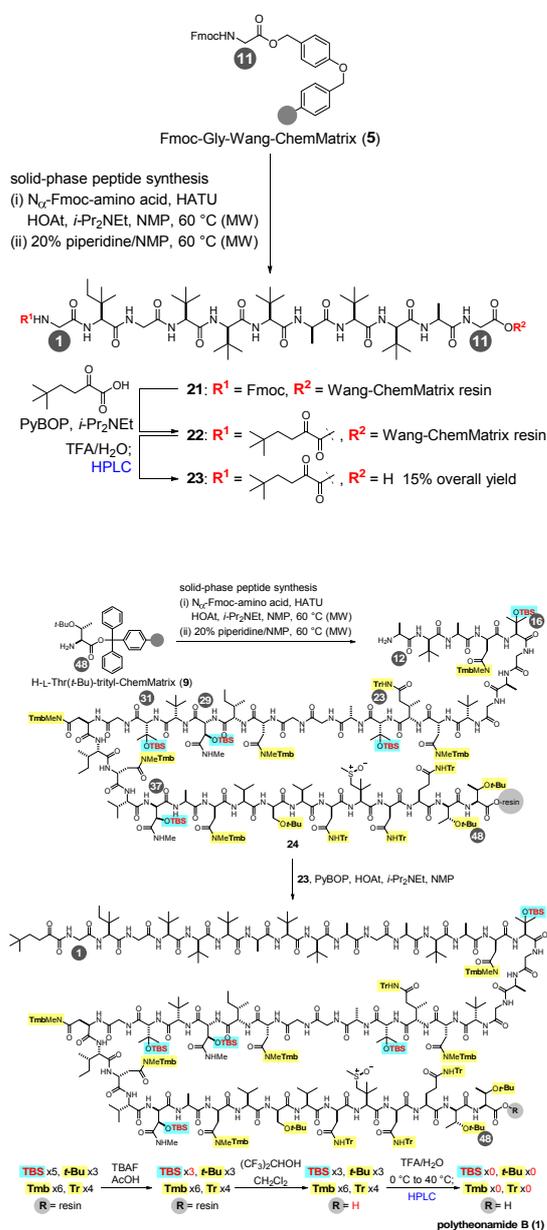


図5 1の固相全合成

表1 1の従来法と新合成法の比較

	液相反応	HPLC 精製	総収率
従来法	9回	9回	4.5%
新合成法	1回	2回	4.5%

本成果により、ポリセオナミド類縁体を効率的に供給可能な基盤が確立できたと言える。また、巨大複雑構造ペプチドを合成する際の保護基戦略の重要性について、新たな知見を与えた。今後は、効率化された類縁体合成と機能評価により、詳細な細胞毒性発現機構を解析し、機能制御へと展開することで、医薬品シーズとして有用なポリセオナミド類縁体配列を得ることを目指す。

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3件)

1. Takuya Kaji, Motoki Murai, Hiroaki Itoh, Junichiro Yasukawa, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Masayuki Inoue, “Total Synthesis and Functional Evaluation of Fourteen Derivatives of Lysocin E: Importance of Cationic, Hydrophobic, and Aromatic Moieties for Antibacterial Activity,” *Chemistry – A European Journal* **2016**, 22, 16912–16919. DOI: 10.1002/chem.201604022
2. Hiroyuki Mutoh, Yusuke Sesoko, Takefumi Kuranaga, Hiroaki Itoh, Masayuki Inoue, “The Total Synthesis and Functional Evaluation of Fourteen Stereoisomers of Yaku’amide B. The Importance of Stereochemistry for Hydrophobicity and Cytotoxicity,” *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, 14, 4199–4204. DOI: 10.1039/C6OB00640J
3. Atsushi Hayata, Hiroaki Itoh, Shoko Matsutaka, Masayuki Inoue, “Dual Chemical Modification of a Polytheonamide Mimic: Rational Design and Synthesis of Ion-Channel-Forming 48-mer Peptides with Potent Cytotoxicity,” *Chemistry – A European Journal* **2016**, 22, 3370–3377. DOI: 10.1002/chem.201504632

〔学会発表〕(計11件)

1. 早田敦、伊藤寛晃、井上将行、ポリセオナミド B の固相全合成、日本薬学会 第 137 年会、2017.3.24-27 東北大学(宮城県・仙台市)
2. 徳本皓太郎、伊藤寛晃、井上将行、WAP-8294A2 の全合成および機能解析、日本薬学会 第 137 年会、2017.3.24-27 東北大学(宮城県・仙台市)
3. 神谷光一、山下智也、伊藤寛晃、井上将行、ヤクアミド B の固相全合成、日本薬学会 第 137 年会、2017.3.24-27 東北大学(宮城県・仙台市)
4. 伊藤寛晃、加治拓也、井上将行、抗菌ペプチド中分子ライソシン E の構造機能相関研究、第 3 回新学術領域「中分子戦略」若手シンポジウム、2017.3.7-8 聖護院御殿荘(京都府・京都市)
5. Hiroaki Itoh, Takuya Kaji, Masayuki Inoue, Total Synthesis and Functional Evaluation of Fourteen Derivatives of Lysocin E, The 16th Tateshina Conference on Organic Chemistry, 2016.11.11-13 蓼科フォーラム(長野県・茅野市)
6. 早田敦、伊藤寛晃、井上将行、ポリセオナミド模倣ペプチドの疎水性制御による生物活性の増強、第 14 回次世代を担

有機化学シンポジウム、2016.5.28-5.29
日本薬学会長井記念ホール(東京都・渋谷区)

7. 徳本皓太郎、加治拓哉、伊藤寛晃、井上将行、WAP-8294A2 の全合成、第 71 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2016.5.14 東京農工大学(東京都・小金井市)
8. 山下智也、伊藤寛晃、井上将行、Staudinger ライゲーションを用いたヤクアミド B の合成研究、日本薬学会 第 136 年会、2016.3.26-29 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
9. Takuya Kaji, Motoki Murai, Hiroaki Itoh, Hiroshi Hamamoto, Masayuki Inoue, Syntheses and Structure-Function Relationship Study of Lysocins, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 2016.1.21-22 武田薬品工業研修所(大阪府・吹田市)
10. Atsushi Hayata, Hiroaki Itoh, Shoko Matsutaka, Masayuki Inoue, Enhancement of Bioactivity by Dual Chemical Modification of Polytheonamide Mimic, LMU-UTOKYO SYMPOSIUM 2015, 2015.10.27-31 Munich (Germany)
11. 早田敦、伊藤寛晃、井上将行、ポリセオナミドを基盤とした機能性分子の合成と機能制御、第 50 回天然物化学談話会、2015.7.1-7.3 グリーンピア岩沼 モンタナリゾート(宮城県・岩沼市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~inoue/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 寛晃 (ITOH, Hiroaki)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：20758205