

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18845

研究課題名(和文) インドリルグリシン不斉構築を基盤とした新規非天然アミノ酸含有ペプチド合成法の開発

研究課題名(英文) Novel methodology for the synthesis of unnatural amino acid-containing peptide based on asymmetric construction of indolyl glycine

研究代表者

猪熊 翼 (INOKUMA, Tsubasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・助教

研究者番号：40541272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドはそのアミノ酸配列に応じて多様な機能を付与できることから近年新たな医薬品候補化合物として注目されているが、その生体内不安定性を回避するため非天然アミノ酸構造の導入が不可欠となっている。これらのペプチドは、非天然アミノ酸ユニットの不斉構築とペプチド伸長プロセスへの導入によって合成可能であるが、より工程数の少ない実用的な合成法の開発が求められている。代表者は本研究でペプチドへの直接的な不斉反応による非天然アミノ酸の新規な合成法を考案し、当該手法を用いることで非天然アミノ酸の一つであるインドリルグリシン含有ペプチドの合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Peptides have recently gained much interest for the development of novel pharmaceuticals because they possess varieties of biological activities depending on their amino acid sequences. However, there is a problem arising from poor proteolytic stability in living systems. One of the solutions to overcome this difficulty is installation of unnatural amino acid units into peptides. The present methodology to prepare such peptides relies on asymmetric construction of unnatural amino acid units and installation into peptide elongation process. But this methodology requires multi-step reactions before its application to peptide synthesis. In this research, a novel concept for preparation of such peptides, an asymmetric construction of unnatural amino acid units directly in a growing peptide chain, was developed. By applying this new methodology, I succeeded in synthesis of indolyl glycine-containing peptide.

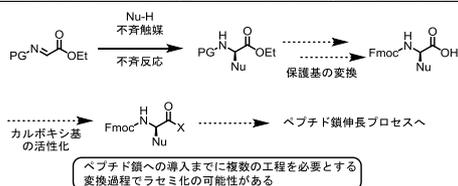
研究分野：有機合成化学

キーワード：非天然アミノ酸 インドリルグリシン 有機触媒 不斉反応 ペプチド合成

1. 研究開始当初の背景

近年、新たな創薬標的として中分子医薬品が注目されており、その中でもペプチドはそのアミノ酸配列に応じて多様な機能を付与できることから、有力な医薬品候補物質の一つとして認識されているが、生体内で不安定であるという問題点があり、非天然アミノ酸の導入が不可欠となっている。理論上非天然アミノ酸含有ペプチドの合成は不斉合成により得られるアミノ酸誘導体を **Fmoc** または **Boc** アミノ酸に変換後、カルボキシ基を活性化しペプチド伸長反応に付すことで達成できる (式1)。しかし本プロセスは1種類のアミノ酸残基の導入に複数の工程を必要とするだけでなくその分子変換過程の際にアミノ酸 α 位のラセミ化が懸念されることから、本ユニットを含有するペプチドの実用的合成法確立が求められている。

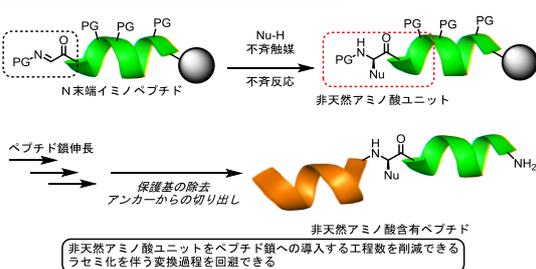
式1. 非天然アミノ酸含有ペプチドの既存法による調製



2. 研究の目的

本研究は非天然アミノ酸含有ペプチドの新規合成法確立を目的とする。代表者は、当該ペプチドを合成するに当たり、従来法とは異なるペプチドへの直接的な不斉反応を基盤とした方法論を考案した (式2)。すなわち、ペプチド伸長の際にイミン調製と不斉反応を適用すれば、合成工程の大幅な短縮とラセミ化の可能性を伴う変換過程の回避を同時に達成することができ、上記の問題点を解決できると考えた。本研究では導入する非天然構造として α -イミノアミドへのインドールの不斉 Friedel-Crafts 反応により得られるインドリルグリシン (IG) を選択した。IG は活性発現への寄与が大きいトリプトファンやフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸の非天然型アナログとして機能すると期待される。本研究で代表者はペプチドへの直接的な不斉反応による IG 含有ペプチドの合成法開発を目指した。

式2. ペプチドへの直接的な不斉反応



3. 研究の方法

(1) これまでに IG 骨格を有するアミノ酸ユニットを構築する不斉反応はいくつか知られている。代表者はイミン窒素が2-ニトロフェニルスルフェニル (Nps) 基で保護された α -イミノエステルとインドールとの不斉反応に着目し、当該反応で用いられる基質のエステル基をメチルアミド基に置換した化合物をモデル基質として設定し、対応するグリシンアミド化合物に対する二酸化マンガンによる酸化反応によって調製した。得られたモデル基質とインドールとの不斉 Friedel-Crafts 反応における条件最適化 (触媒、反応溶媒) について検討した。

(2) (1) で得られた付加体を基質として、アミノ酸伸長と脱保護を行い、当該過程が立体選択性を損なうことなく且つ高い収率で進行するか検証した。

(3) ペプチドへの不斉反応の基質となるイミン部位をペプチドへと導入しイミノペプチドを調製し、インドールとの不斉 Friedel-Crafts 反応、更なるペプチド鎖伸長と主鎖脱保護により、ペプチドへの直接的な不斉反応による IG 含有ペプチドの合成を試みた。

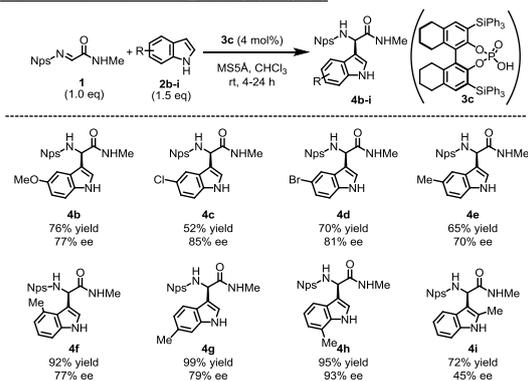
4. 研究成果

(1) まず N-Nps 基イミノアミド **1** とインドール **2a** との不斉 Friedel-Crafts 反応の条件最適化を試みた (表1)。トルエン溶媒中、種々のキラルブレンステッド酸触媒を検討したところ、キラルリン酸触媒 **3b**, **3c** を用いた際に良好な立体選択性で目的の付加体 **4a** を得ることができた。さらに溶媒を検討した結果、クロロホルム中で **3c** を触媒とした際に最も高いエナンチオ選択性が確認された。次に、見出した最適条件を、種々異なる置換基を有するインドール **2b-i** との反応に適用し、いずれも中程度から高い立体選択性で対応する付加体 **4b-i** を得ることに成功した (式3)。

表1. 不斉 Friedel-Crafts 反応の条件検討

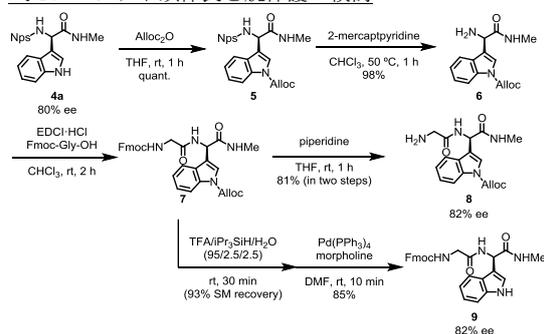
entry	3	solvent	yield (%)	ee (%)
1	3a	toluene	64	67
2	3b	toluene	92	76
3	3c	toluene	71	78
4	3d	toluene	88	69
5	3b	CHCl ₃	78	71
6	3c	CHCl ₃	82	80
7	3c	CH ₂ Cl ₂	70	65
8	3c	ClCH ₂ CH ₂ Cl	49	62
9	3c	THF	8	9

式3. インドール適用範囲の検討



(2) (1) で得られた付加体 **4a** を用いて、更なるアミノ酸伸長と脱保護が可能か検証した (式4)。**4a** のインドール窒素を Alloc 基で保護し **5** を得た。**5** の Nps 基を 2-メルカプトピリジンで除去後、得られた **6** に Fmoc-Gly-OH を縮合し **7** を合成した。**7** のピペリジン処理による N 末端の脱保護及び TFA 処理に続く脱 Alloc 化によりそれぞれ **8** あるいは **9** へと誘導した。これらの生成物のエナンチオマー過剰率は不斉反応で構築した水準を維持していることが確認され、モデルの反応系においてペプチドへの直接的な不斉反応による IG 含有ペプチドの合成に成功した。

式4. ペプチド鎖伸長と脱保護の検討



(3) ペプチド合成への展開を指向し、長鎖アルキル鎖からなる疎水性アンカー構造を有する第1級アミン **10** を出発物質とし検討を行った (式5)。まず **10** にグリシンを3残基導入した後 N 末端を Nps 保護し **11** とした。**11** の N 末端を二酸化マンガンを用いてイミノペプチド **12** へと酸化した。**12** とインドールとの不斉 Friedel-Crafts 反応を触媒 **3** 共存下で行い IG ユニットを導入した。(2) の過程で確立したルートを基に **13** のインドール部位の Alloc 化、Nps 基の除去、アミノ酸 (Tyr) 縮合とピペリジン処理を施し前駆ペプチド **14** とした。TFA 処理による疎水性アンカーからの切り出し及び Tyr 側鎖脱保護の後 Alloc 基の除去を行ったところ、高い純度で所望の IG 含有ペプチド **15** が生成したことが確認された (図1)。当該ペプチドを HPLC で精製し、ペプチドへの直接的な不斉反応による非天然アミノ酸含有ペプチドの合成に成功した。

式5. IG 含有ペプチド合成の検討

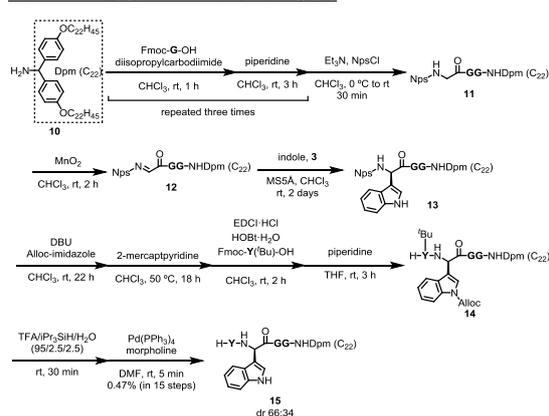
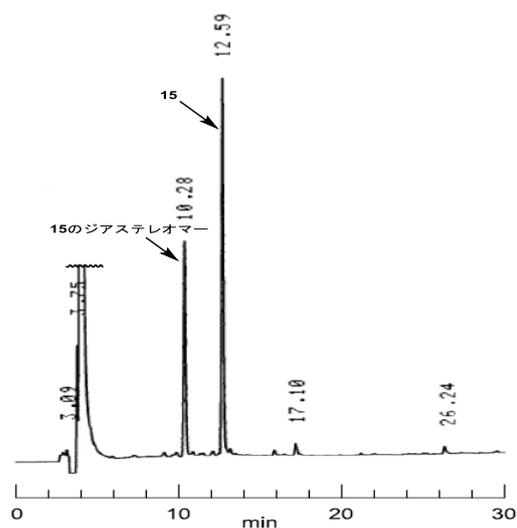


図1. 最終脱保護反応粗製生物の HPLC チャート



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2件)

1. Direct Enantioselective Indolylation of Peptidyl Imine for the Synthesis of Indolyl Glycine-Containing Peptides. Tsubasa Inokuma, Kodai Nishida, Akira Shigenaga, Ken-ichi Yamada, Akira Otaka. Heterocycles 2018, in press. (DOI: 10.3987/COM-18-S(T)86) (査読あり)
2. A Convenient Method for Preparation of α -Imino Carboxylic Acid Derivatives and Application to the Asymmetric Synthesis of Unnatural α -Amino Acid Derivative. Tsubasa Inokuma, Takahisa Jichu, Kodai Nishida, Akira Shigenaga, Akira Otaka. Chem. Pharm. Bull. 2017, 65, 573-581. (DOI: 10.1248/cpb.c17-00158) (査読あり)

[学会発表] (計3件)

1. 猪熊 翼：ペプチドへの直接的不斉反応を基盤とした非天然アミノ酸含有ペプチドの新規効率的な不斉合成法開発
第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島) 2017年10月22日
2. 猪熊 翼、西田 航大、重永 章、大高章：ペプチドへの直接的な不斉反応を基盤とする新規非天然アミノ酸含有ペプチド合成テクノロジーの開発
日本薬学会第137年会 (仙台) 2017年3月27日
3. 西田 航大、猪熊 翼、重永 章、大高章：非天然アミノ酸含有ペプチドの新規効率的な合成法の開発
第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (岡山) 2016年11月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪熊 翼 (INOKUMA, Tsubasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (薬学域)・助教

研究者番号：40541272