

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450145

研究課題名(和文) 抗HIV活性を有する環状デプシペプチドcallipeltin類の構造活性相関研究

研究課題名(英文) Structure activity relationship study of cyclic depsipeptide callipeltins with anti-HIV activity

研究代表者

今野 博行 (Konno, Hiroyuki)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50325247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：異常アミノ酸含有ペプチドは新規抗HIV剤創製のリード化合物として期待されている。我々は異常アミノ酸含有デプシペプチドカリペルチンならびにホモフィミンに焦点をあてその化学合成を検討した。その結果、カリペルチンBには細胞毒性が見られないことを見出し、真の活性本体を明らかにした。一方で、簡便評価系構築を目指しTAK779蛍光分子の作製も検討した。基本骨格の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The peptides contained with unusual amino acids show several biological activities, especially anti-HIV activity. We have attempted to synthesize cyclic depsipeptides callipeltins and homopymines with several unusual amino acids. Preparation of unusual amino acids were achieved by stereoselective synthesis in solution phase. Peptide constructions were used by standard Fmoc-solid phase peptide synthesis and cyclization and final deprotection were proceeded smoothly by optimized conditions to give callipeltin B and cyclic fragment of homophymines. We found that purified callipeltin B included the contamination of callipeltins C and H at a ratio of approximately 15%. These results suggested that the cytotoxicity of natural callipeltin B was derived from callipeltins C and H. On the other hand, TAK779 bound with coumarin was attempted for the preparation of new method of evaluation of anti-HIV activities.

研究分野：生物有機化学

キーワード：環状デプシペプチド CCR5阻害剤 異常アミノ酸 TAK779 ペプチド固相合成法 蛍光標識化 細胞毒性 HEK/CCR5

1. 研究開始当初の背景

我々は HIV 阻害剤創成を目指して Callipeltin 類の全合成ならびにその類縁体合成を展開してきた。我々はすでに異常アミノ酸部分の合成に成功し、さらに最近 callipeltin E ならびに M の全合成を達成することができた。Callipeltin 類は海綿ペプチドとしてはじめて HIV 阻害能を有することで注目を浴び、callipeltin 類をはじめとする環状デプシペプチド類の合成研究が国内外のグループによって精力的に行われている。私たちはこれらの類縁体に対して、その阻害部位の特定を行い、最適な阻害剤へ導いて行くことを大きな命題にしているが、アッセイ系に関してはラジオアイソトープを用いた方法のみが知られており決して簡便であるとは言いがたい。そこで、蛍光基質やフォトアフィニティー基質を作成することで簡便な評価法の確立が望まれている。

AIDS 治療薬は主に逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を組み合わせるカクテル療法が用いられるが、感染後の治療薬であること、薬剤耐性問題もあり新しいタイプの抗 HIV 剤が望まれる。その中で、膜融合阻害を標的とした maraviroc (Pfizer) が認可され、注目を浴びている。これは HIV が膜融合時に重要な相互作用をするケモカインレセプター CCR5 を創薬ターゲットにしたもので、製薬会社が保有する化合物ライブラリーのスクリーニングに端を発する。しかしながらこれ以降有望な薬剤が見つからない現実がある。私たちはその出発点をペプチド系天然物に求めた。Callipeltin 類には正常 L-アミノ酸が 1 つのみ、強力な CCR5 阻害作用と低い細胞毒性という利点をもつ。現段階では callipeltin 類の CCR5 に対する阻害メカニズムは不明であることから、その理解を深めることが重要であると考えている (Fig. 1, 2)。

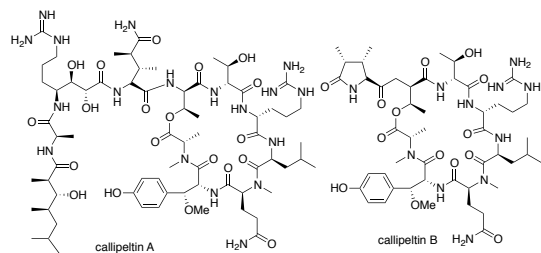


Fig. 1. Callipeltin A ならびに B

2. 研究の目的

Callipeltin 類をリード化合物とした抗 HIV 剤創製を目標に、callipeltin 類の全合成を通じてアナログ体の合成にも柔軟に対応できる合成法を開発し、細胞毒性発現モチーフの解明に向けた構造活性相関研究への展開を考えた。まず callipeltin アナログの固相合成による化合物ライブラリーの作成を行い、評価系に耐えうる様々な環状ペプチドの入手を容易にする。和たちは天然物

全合成を研究のゴールとしておらずアナログ体のアッセイを意識し固相法での合成を展開している。このようなコンセプトをもった本阻害剤創製研究は国内外においてほとんどいなかった。さらに homophymine B の全合成にも着手することにした。Homophymine B には callipeltin 類と同様の活性が期待できること、比較的細胞毒性が低いことがあげられる。一方で、CCR5 に対する簡便な評価法は今だ開発されていない。CCR5 の基質がケモカイン RANTES と呼ばれる巨大な蛋白質であることがあげられる。そこで我々は強力な阻害能を有する TAK779 (武田薬品) を基質として利用することを考案した。既に ^{13}C -導入 TAK779 の合成に成功し、固体 NMR によって CCR5 との結合部位の特定、立体構造の詳細な解析が可能になり、基質としての使用ならびに活性を低下させずに蛍光などの導入を行える部位を特定している (Fig. 2)。

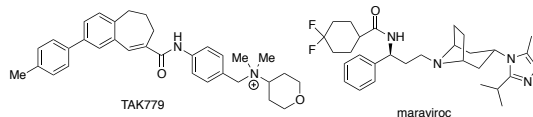
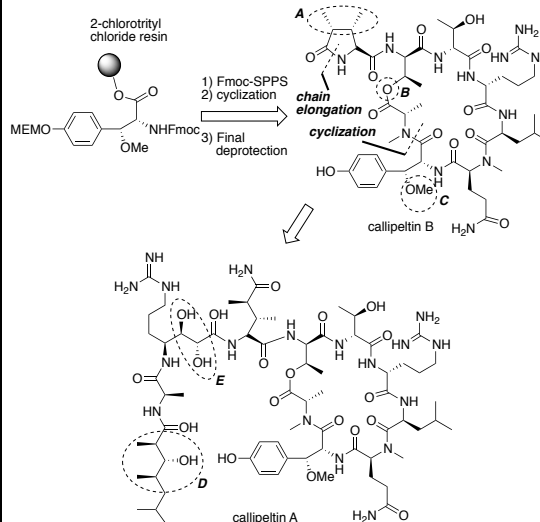


Fig. 2. TAK779 ならびに maraviroc

3. 研究の方法

固相合成による環状ペプチド化合物ライブラリーの作成と細胞毒性試験

Callipeltin M の全合成で確立された方法論をもとに環状ペプチド誘導体を合成する。デプシ結合での環化は低収率のため N-MeAla- β MeOTyr 間でのアミド結合形成により環化を行う。現在まで合成したペプチド誘導体の Hela 細胞を用いた細胞毒性試験から、毒性活性発現には (1) ジメチル部位は必要、(2) デプシ結合は分子を不安定化する、(3) β -メトキシ部位は不要であった。一方で callipeltin A 誘導体から (4) 側鎖脂肪酸ならびに (5) ジオール部分の立体化学、有無について検討する。



Scheme 1. Callipeltin 類の合成計画

さらに評価系とフィードバックしながら合成することで、環を縮小、拡大、あるいはN-メチル体、L体あるいはD体への変換も柔軟に対応することが可能となる。抗HIV剤として異常アミノ酸を豊富に含んだ低毒性、高CCR5阻害化合物の創製を目指す。Hela細胞に対する細胞毒性試験は既に確立したホルマザン試薬(WST-8)を用いた細胞増殖測定法で評価する(Scheme 1)。

同様のコンセプトをhomophymine Bの合成にも活用する。Homophymine Bを構成する異常アミノ酸について立体制御下に合成を行い、Fmoc-固相合成法に用いる状態に調製する。環化についてはデプシ結合部位、アミド結合部位の2通りについて条件検討を行う計画を立てた(Fig.3, 4)。

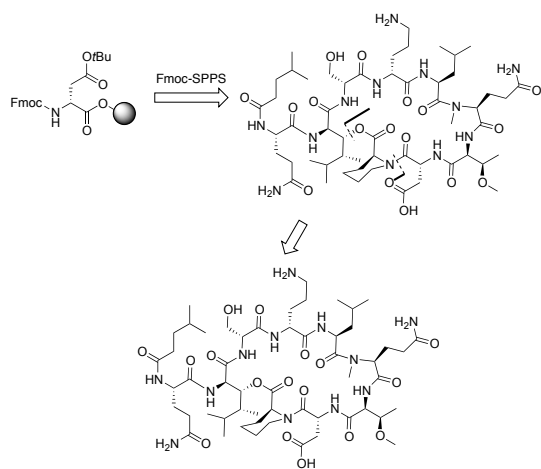


Fig. 3. Homophymine B 環状部の構築戦略

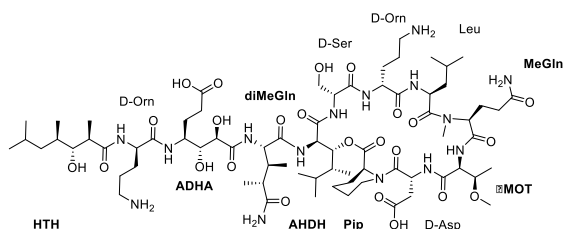


Fig. 4. Homophymine B の構造式

B. HEK/CCR5細胞の作成 CCR5 cDNAを単離し、ほ乳類細胞発現系ベクターに組み込んだものをHEK細胞に形質転換、HEK/CCR5の細胞培養系を確立した。我々は既に¹³C₃-labeled TAK779(TAK779; IC₅₀=1.2 nM for CCR5; 武田薬品)の開発に成功していることから、蛍光修飾基質green/red-TAK779を作成し、基質とCCR5との特異性、結合能を評価する。それによって蛍光標識部位と認識能の変化を調査し、適切な基質を開発する(Fig. 5)。

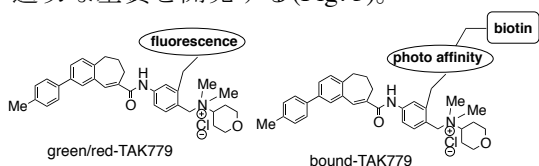


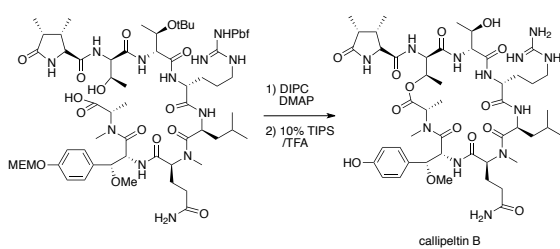
Fig. 5. 蛍光標識化 TAK779 誘導体の分子設計

4. 研究成果

Callipeltin B の全合成

予備実験として様々なアナログ体を用いた環化反応を検討したところ、いずれの条件もデプシ結合での環化は低収率であった。そのためN-MeAla-βMeOTyr間でのアミド結合形成により環化を行う方法論にし、詳細な条件検討を行った。その結果、βMeO基の脱離を伴う反応が優先的に進行し不飽和結合が形成されることがわかった。さらに他のアミド結合の環化反応においてもジケトピペラジンが優先することが明らかとなり、望む化合物を満足のいく収率で得ることが困難であることが予測された。そこで先に全合成を達成したcallipeltin Mを基質に用いるため、保護基の導入したcallipeltin Mの合成を行った。各カップリング条件を再検討したところ、安価に入手可能なPyBOP/HOBtも有効な反応剤であった。本条件でC末端から順次アミノ酸をカップリングし、樹脂を切断することで得た保護callipeltin Mに対し、50% TFA/CH₂Cl₂で処理し最終脱保護することでcallipeltin Mの効率的全合成を達成した。この際、副産物の生成を確認したため¹H NMR, MS, アミノ酸分析により解析したところ、βMOY部がβAlaに置換したペプチドであった。さらに、副産物が得られた原因としてFmoc-βMOY(MEM)-OHの合成時にFmoc-βAla-OHが副成するためであることを明らかにした。

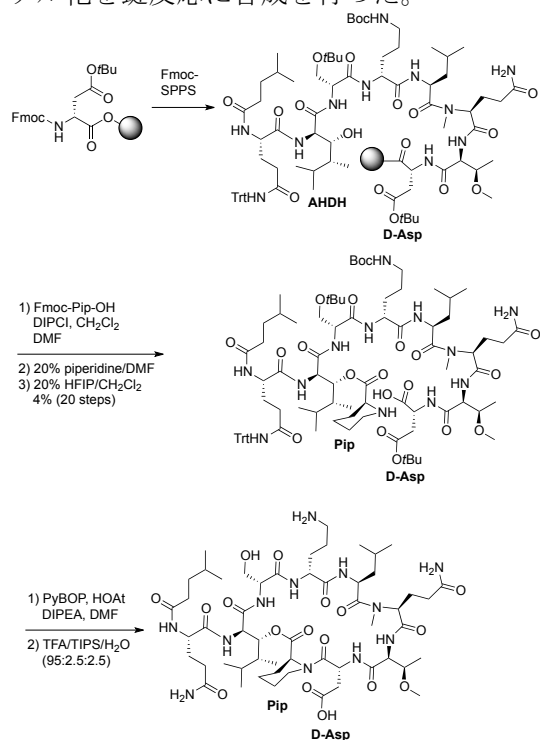
続いて、保護callipeltin Mを用いて鍵反応を検討した。その結果、DIPCI/DMAP/DMF, 45°Cの条件で効率的に環化反応が進行することを確認した。10% TIPS/TFAで保護基を除去して得たcallipeltin Bと天然物及び前述の合成物とのスペクトルデータを比較し、一致することを確認した。ここに、保護callipeltin Mのマクロラクトン化を経たcallipeltin Bの全合成を達成した。すでに様々な検討を行うことで、保護callipeltin Mを直接環化する方法、すなわちデプシ結合での環化反応は良い結果を与えないと考えていたが、様々な条件を検討する中で反応を進行させることに成功した。この環化反応は立体構造と立体配座が強く影響するため、環化部位の最適化が必要であった。これより、異常アミノ酸部をL-またはD-アミノ酸に置換したcallipeltinアナログ体を14種合成した。また、水の共存が化合物の分解を促進し、無水条件であれば比較的強い酸でも化合物は安定に存在できることがわかった。以上より、一般的なFmoc固相合成法と液相法を組み合わせたcallipeltin類及びその誘導体合成のための手法を確立することができた。現在の所、天然物の立体構造のみがデプシ結合での環化を可能にし、立体異性体についてはデプシ結合での成功例はない(Scheme 2)。



Scheme 2. Callipeltin B の全合成

Homophymine B の環状部の合成

まず Homophymine B を構成するフラグメントである ADHA、AHDH、 β MOT、MeGln、HTH の合成を検討した。それぞれのアミノ酸は Fmoc 固相合成法に適用するため保護誘導体を設計し合成した。ADHA の合成ではいくつかの出発原料を用いて検討したところ、Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH を用いる合成ルートが効率であると結論づけた。AHDH ならびに β MOT は我々が過去に開拓した合成ルートを参考に改良合成を行った。MeGln は Fmoc-Gln(Trt)-OH の窒素原子をメチル化することにより、HTH はリパーゼによる出発原料のキラル化と Roush クロチル化を鍵反応に合成を行った。



Scheme 3. Homophymine 類の環状部合成

また、合成した保護誘導体を用い Fmoc 固相合成法によって、Homophymine B の環状部の構築を検討した。まず、Fmoc-Pip-OH を樹脂に担持し、直鎖ペプチドを合成した。樹脂から切断し、得られたペプチドを用いてデプシ結合での環化を詳細に検討したが、望む環状ペプチドを得ることができなかった。Pip と AHDH さらに Fmoc 保護基の立体障害が主な原因と思われたため、保護基を除去後に環化を行ったが望む反応は進行

しなかった。そこで環化部位を Pip と D-Asp 間とした。Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH を樹脂に担持させ、ペプチド鎖を伸長した。その後、ペプチド鎖の AHDH 残基に Pip を縮合しエステルを形成した。次に、Pip の Fmoc 基を脱保護し、樹脂からペプチドを切り出した。最後に D-Asp と Pip とで環化させ、脱保護することで Homophymine B の環状部の合成を達成した。このように callipeltin B の環化とは明らかに異なる結果を与えた。生合成類似型であっても反応が全く進行しないことは想定外であったが、今後の全合成に大きな知見を得ることができた。

副産物の同定とメカニズム解明

本合成時の Fmoc- β Ala-OH 生成について考察したところ、Fmoc-OSu が塩基存在下で Lossen 転位を引き起こしていた。 β MOY には β 位に置換基が存在し Fmoc 化の進行が遅いためと思われた。その後、Fmoc-OSu のみを塩基で処理することでその反応を確認し、その他の副産物についても詳細な解析に成功した。そこで様々なアミノ酸に対する Fmoc 化を行い Fmoc- β Ala-OH の生成量を調査したところ、反応速度が大きな影響を与えていることが判明した。市販の Fmoc-アミノ酸にも微量ではあるが、Fmoc- β Ala-OH が混入していることを明らかにし、合成するペプチドの純度に影響を与えるため Fmoc- β Ala-OH が生成しない新規保護剤の開発が望まれる。

Callipeltin 類およびそのアナログ体の細胞毒性評価

これまでに、callipeltin B は子宮頸癌細胞 (HeLa 細胞) に対して $IC_{50} = 98 \mu M$ の細胞毒性を示すことが報告されている。我々は合成した callipeltin B, E および M に加え、アナログ体 14 種と天然 callipeltin B について HeLa 細胞に対する毒性を評価した。その結果、合成した callipeltin B を含む全ての合成ペプチドにおいては $200\sim 400 \mu M$ の高濃度でも $0\sim 20\%$ 程度の毒性であるのに対し、天然 callipeltin B のみ $CC_{50} = 130 \mu M$ の毒性が見られた。スペクトルデータの解析により、天然物中に callipeltin C ($CC_{50} = 17 \mu M$) 及び H が約 17% 混入していることが示され、これらが活性の本体であることを明らかにした。さらに、天然 callipeltin ($CC_{50} = 4 nM$) および D ($CC_{50} > 400 \mu M$) の細胞毒性試験の結果を加味することで、callipeltin 類の細胞毒性発現には環状部と鎖状部の両方のモチーフが必要であることを見出した (Fig. 6, 7)。この結果から、callipeltin B には細胞毒性がなく、抗 HIV 剤リード化合物としての可能性を持つことが示唆された。本知見は未だ報告されていない新規性の高いものであり、今後の CCR5 阻害剤創製に役立つ重要な結果であると考えている。

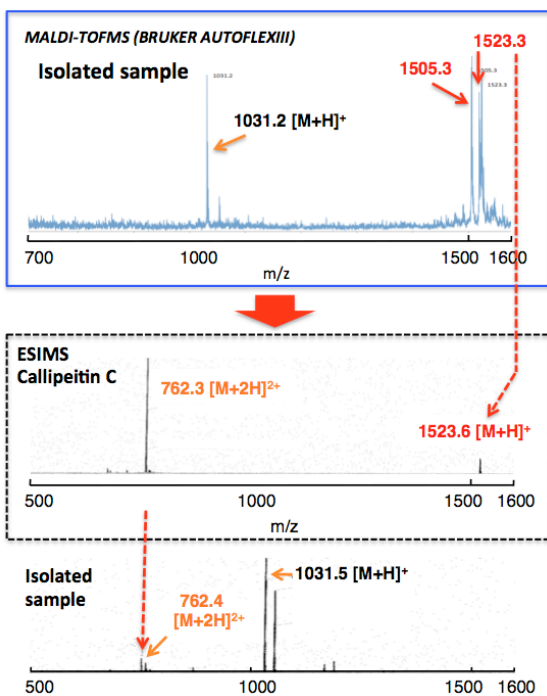


Fig. 6. 質量分析による解析結果

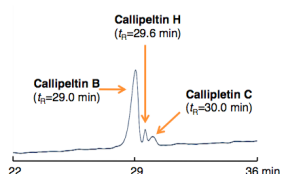


Fig. 7. HPLC による分析結果

HEK/CCR5 細胞の作製

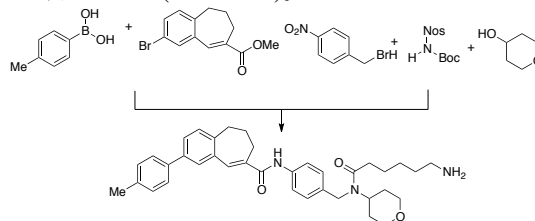
すでに培養に成功している HEK/CCR5 細胞に対して、継代培養を行い安定的に供給できる方法論を確立した。今度の評価系構築に向けた準備を完了した。

蛍光 TAK779 の合成研究

蛍光標識を用いた簡易な CCR5 阻害能評価系の構築を行う目的で、強力な CCR5 阻害能を有する TAK779 (武田薬品) を蛍光リガンドとして活用することにした。分子設計として 2 級アミン部位にスペーサーを導入し、蛍光分子を連結することにした。スペーサー野導入部位は標的となる CCR5 の細胞表面部分に位置することがすでにわかっているので、TAK779 と CCR5 の相互作用に影響を与えないと判断した。

TAK779 についてはトルイル部分と 2 環性カルボン酸部分を鈴木カップリングで連結した。またアニリン部位は福山法を 2 回用いることで調製した。それらを脱水縮合することで TAK779 骨格を得ることができた。さらにスペーサーを導入後、別途合成したクマリン誘導体とカップリングを試みたが低収率であった。現在条件検討中である。合成した化合物について HEK/CCR5 細胞に対する毒性試験を行ったところ、いずれも $CC_{50} = >200 \mu\text{M}$ であり、評価系構築には影響を与えない

と判断した (Scheme 5)。



Scheme 5. 蛍光 TAK779 誘導体の合成研究

まとめ

以上 callipeitin B の細胞毒性に関して文献とは異なった結果を与え、混入物が活性本体であることを発見した。この結果は CCR5 阻害剤研究を遂行するには大きな知見であり、今後の分子設計におおきな影響を与えと思われる。また、Fmoc- β Ala-OH の生成も見出すことができた。これらの知見、発見は天然物の全合成を成し遂げたからこそわかったことである。

謝辞

本研究は科学研究費補助金 (基盤研究 C) の交付を受け遂行されました。心から感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kikuchi, M.; Konno, H. Cytotoxic evaluation of natural and synthetic callipeitins: a revision of cytotoxicity of callipeitin B. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80* (6), 1066-1069. DOI10.1080/09168451.2016.1148581 (査読有)
2. Tokairin, Y.; Maita, K.; Takeda, S.; Konno, H. Synthesis of orthogonally protected(2R,3R,4S)-4-amino-2,3-dihydroheptan-1,7-dioic acid. *Synthesis* **2015**, *47*, 351-358. DOI 10.1055/s-0034-1378902 (査読有)
3. Tokairin, Y.; Takeda, S.; Kikuchi, M.; Konno, H. Synthetic studies on homophymine B: solid phase synthesis of a cyclic fragment. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2809-2812. DOI10.1016/j.tetlet. 2015. 04.044 (査読有)
4. Tokairin, Y.; Yoshino, R; Takeda, S; Konno, H. Solid phase synthesis of the cyclic fragment of homophymine B. *Peptide Science 2014*, **2015**, 15-16. (査読有)
5. Kikuchi, M.; Konno, H. Total synthesis of callipeitin B and M, peptidyl marine natural products. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4324-4327. DOI 10.1021/o15020619 (査読有)
6. Kikuchi, M.; Konno, H. Stereochemical assignment of four diastereomers of dimethylpyroglutamic acid, a component of callipeitin B. *Heterocycles* **2014**, *89* (7), 1620-1631. DOI 10.3987/COM-14-13003

(査読有)

7. Kikuchi, M.; Konno, H. Synthetic Study of Callipeltin B: Solid Phase Synthesis and Stereochemical Assignment. *Peptide Science* 2013, **2014**, 131-132. (査読有)
8. Takeda, S.; Tokairin, Y.; Kikuchi, M.; Konno, H. Synthetic Study on Homophymine A: Stereoselective Synthesis of Unusual Amino Acids and Solid Phase Synthesis of the Cyclic Fragment. *Peptide Science* 2013, **2014**, 123-126. (査読有)
9. Kikuchi, M.; Konno, H. Improved synthesis of D-allothreonine derivatives from L-threonine. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7098-7101. DOI10.1016/j.tet.2013.06.027 (査読有)
10. Kikuchi, M.; Konno, H. Structure Activity Relationship Study of Callipeltin B for the Cytotoxic Activity. *Peptide Science* 2012, **2013**, 145-148. (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

1. ○東海林由憲, 吉野諒, 今野博行, Homophymine B の全合成を目指した非タンパク性アミノ酸の合成, 日本農芸化学会年度大会, 2016年3月29日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
2. ○山口椋平, 東海林由憲, 二階堂由莉, 今野博行, ケモカインレセプターCCR5阻害剤 TAK779 類縁体の蛍光標識化, 日本農芸化学会年度大会, 2016年3月29日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
3. ○今野博行, 吉野諒, 東海林由憲, Callipeltin A の全合成研究, 日本化学会年会, 2016年3月25日, 同志社大学 (京都府・京田辺市)
4. Konno, H.; Kikuchi, M. Total synthesis of callipeltin B, 7th International Peptide Symposium, December 10, 2015, Singapore (Singapore)
5. Tokairin, Y.; Yoshino, R.; Konno, H. Synthetic study on Homophymines, A Potential Anti-HIV Agent. 7th International Peptide Symposium December 10, 2015, Singapore (Singapore)
6. ○今野博行, 菊池真理, 環状デプシペプチド callipeltin B の全合成と細胞毒性評価, 日本農芸化学会東北支部会, 2015年10月3日, 東北大学 (宮城県・仙台市)
7. ○今野博行, Callipeltin B の全合成, 第47回若手ペプチド夏の勉強会, 2015年8月10日, アスティかたおか (長野県塩尻市) (依頼講演)
8. ○吉野諒, 東海林由, 菊池真理, 武田祥, 今野博行, 抗 HIV 活性を有する環状ペプチド homophymine B の合成研究: 異常アミノ酸の合成と環状部の構築, 若手ペプチド夏の勉強会, 2015年8月10日, アスティかたおか (長野県塩尻市) ポスタ

一賞受賞

9. ○菊池真理, 今野博行, Callipeltin B, E および M の全合成と細胞毒性評価, 第26回万有仙台シンポジウム, 2015年6月6日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
10. ○東海林由憲, 今野博行, 海洋ペプチド homophymine B の全合成研究: 直鎖部に含まれる異常アミノ酸の合成, 日本農芸化学会 2015年度大会, 2015年3月26日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)
11. ○今野博行, 異常アミノ酸含有環状ペプチド誘導体の合成と構造活性相関, 日本農芸化学会中部支部創立 60 周年記念若手シンポジウム, 2014年11月22日, 信州大学 (長野県・南箕輪村) (依頼講演)
12. ○東海林由憲, 吉野諒, 武田祥, 今野博行, Solid phase synthesis of the cyclic fragment of homophymine B. 第51回ペプチド討論会, 2014年10月22日, 徳島大学 (徳島県・徳島市)
13. ○菊池真理, 今野博行, 異常アミノ酸含有ペプチド callipeltin 類の合成研究: 副産物の解析, 日本農芸化学会北海道東北合同支部会, 2014年9月22-23日, 北海道大学 (北海道・札幌市)
14. ○吉野諒, 東海林由憲, 武田祥, 今野博行, 海綿由来環状デプシペプチド Homophymine の全合成を目指した異常アミノ酸の立体制御合成, 化学系学協会東北大会, 2014年9月20日, 山形大学 (山形県・米沢市)
15. ○菊池真理, 今野博行, Callipeltin B の合成研究: 環化部位の探索, 日本農芸化学会 2014年度大会, 2014年3月28日, 明治大学 (神奈川県・川崎市)

[図書] (計 1 件)

1. 今野博行, 異常アミノ酸含有環状ペプチドの合成と生物活性, **2014**, pp. 49-56, 遺伝子医学 MOOK 別冊—次世代ペプチド医薬創製—, メディカルドゥ (編集) 赤路健一.

[その他]

ホームページ等
山形大学大学院理工学研究科今野研究室ウェブサイト
<http://bioorg.yz.yamagata-u.ac.jp>
山形大学研究者情報 (今野博行)
http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/html/100000237_ja.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

今野 博行 (KONNO, Hiroyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 50325247