

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18855

研究課題名(和文) ペプチドの立体的相互作用を解析するための生化学ツールとなるフッ素化ペプチドの合成

研究課題名(英文) A synthesis of fluorinated peptide as a biochemical tool toward the analysis of sterically interaction for the peptide

研究代表者

樽井 敦 (Tarui, Atsushi)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：40434873

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)：タンパク質非構成アミノ酸であるフッ素化 β -アミノ酸を導入した人工ペプチドを合成し、フッ素置換基の特徴を利用したフッ素化ペプチドの機能性ペプチドとしての有用性に着目し研究を行った。トリフルオロエタノール中、求電子性の高いジフルオロ- β -ラクタムのアミノ酸との開環反応により縮合剤を用いることなくペプチド構造の構築に成功した。残念ながら立体的相互作用を解析するための二次構造構築能は評価できなかったが、得られたフッ素化ペプチドは酵素加水分解に対して抵抗性を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：I studied a synthesis of artificial peptide including fluorinated β -amino acid as a non-proteinogenic amino acid and focused on the utility of fluorinated peptides as a functionalized peptide using the property of fluorine substituents. The construction of the desired peptide was realized by the ring-opening reaction of a highly electrophilic difluoro- β -lactam with an amino acid without a condensation reagent in trifluoroethanol. Unfortunately, the evaluation of functionality for sterically interaction of the fluorinated peptide could not be achieved. However, the obtaining peptides showed the tolerance for enzymatic hydrolysis.

研究分野：有機フッ素化学

キーワード：フッ素 ジフルオロ- β -ラクタム 人工ペプチド β -アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

生体内における α -アミノ酸は β -アミノ酸に比べ希少なアミノ酸であり、これを利用した研究は多くの例がない。また、 β -アミノ酸はタンパク質を構成するためのアミノ酸として利用されないため、これを含むタンパク質は人工的に合成して得られるのが普通である。このような人工ペプチドは二次構造の誘起やペプチド結合の安定化などの機能をもった機能性ペプチドとして研究されてきた。含フッ素アミノ酸を導入したフッ素化ペプチドもまた機能性人工ペプチドとして着目される対象であるが (*Chemistry & Biodiversity*, **2012**, 9, 2410) 含フッ素 β -アミノ酸を導入した人工ペプチドの効率的合成とその物性は未だ開拓が遅れている。

一般にペプチド合成はジシクロヘキシルカルボジイミドなどの縮合剤や 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどの添加剤を利用した手法が主流であるが、当量以上の縮合剤・添加剤の使用はアトムエコノミーの観点から望ましくない。

2. 研究の目的

上述の研究背景のもと、本研究では人工ペプチドとして含フッ素 β -アミノ酸を導入したフッ素化ペプチドを設定し、これの縮合剤に頼らない合成を簡便に行い、この人工ペプチドの機能評価を行うことを目的とする。本研究により、新規人工ペプチドの合成と環境負荷の少ないペプチド合成法の確立が期待できるとともに、フッ素置換基のペプチド構造への影響と化学的・生化学的安定性への影響に対する新規知見が期待される。以下、本研究では二つのユニットに分けて研究を実施した。

(1) フッ素化ペプチドの合成

(2) フッ素化ペプチドの機能評価

3. 研究の方法

(1) フッ素化ペプチドの合成

β -アミノ酸は α -アミノ酸の増炭反応によって合成可能であるが、ペプチドに β -アミノ酸を組み込む場合、増炭とフッ素原子の導入およびペプチドの縮合を必要とする。一方、 β -ラクタムのアミノ酸による求核的開環反応は β -アミノ酸部位とペプチド鎖の構築が一挙に可能となる。研究代表者の所属する研究室では、 β -ジフルオロ- β -ラクタムと β -プロモ- β -フルオロ- β -ラクタムの合成を報告しており、これらフッ素化 β -ラクタムはフッ素原子の高い電気陰性度により求電子性の高まった基質であると言える。これら求電子性の高いフッ素化 β -ラクタムを用いたフッ素化ペプチドの合成を計画した。また、尾島らによる β -ラクタムの求核的開環反応 (*J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 1249) の手法を基に、縮合剤を用いないペプチドの合成を目指した。

(2) フッ素化ペプチドの機能評価

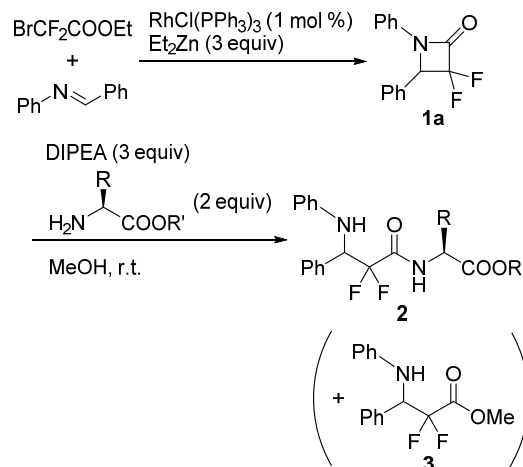
合成したフッ素化ペプチドを用いて、そのペプチドフォールドマーとしての機能と酵素によるペプチド分解実験で人工ペプチドとしての機能評価を実施することとした。フッ素原子の分子内水素結合によるコンフォメーション変化を CD スペクトルと IR スペクトルにより評価・考察する。

また、得られたペプチドの生理的安定性を評価するため、酵素加水分解による分解実験を実施する。最も単純に合成可能なジペプチドを対象と設定した。本ペプチドはタンパク質非構成アミノ酸を含むペプチドであることから基質認識されにくいと考えられる。よって、基質特異性の低い酵素である酸性カルボキシペプチダーゼを加水分解酵素として選定し、評価実験を行うこととした。

4. 研究成果

(1) フッ素化ペプチドの合成

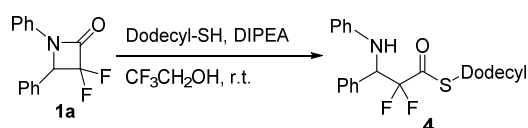
研究代表者によって報告した Rh 触媒とジエチル亜鉛を用いる手法でジフルオロ- β -ラクタム **1a** を得、これをモデル基質として β -アミノ酸エステルの塩酸塩との開環反応を検討した。ヒューニツヒ塩基存在下、溶媒にメタノールを用いることで開環反応は進行し、目的のフッ素化ジペプチド **2** が得られることを見出した。



室温下、種々のアミノ酸との反応でジペプチド **2** が得られることを見出したものの、多くのアミノ酸において 24 時間を超える長時間の反応時間をもってしても低収率にとどまり、溶媒であるメタノールで開環したアミノエステル体 **3** の副生がみられた。そこで、基質の溶解性改善を期待して、反応溶媒にトリフルオロエタノール (CF₃CH₂OH) を用いて合成を検討したところ、短時間かつ高収率にて種々のフッ素化ジペプチド **2** を得ることに成功した。本手法により、従来のペプチド合成に必要な縮合剤を用いることなく目的物を合成することが可能となり、またトリフルオロエタノール中での反応により短時間での合成と基質一般性の拡大を達成できた。

更に、ジフルオロ- β -ラクタム **1a** は硫黄求核種との開環反応にも適用可能であり、通常のアシル置換反応では合成困難なアミド

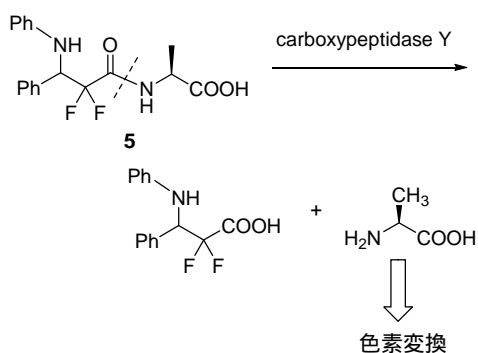
からチオエステル **4** への変換を可能にした。本知見はペプチドライゲーションへの展開が期待できるものと言える。



(2) フッ素化ペプチドの機能評価

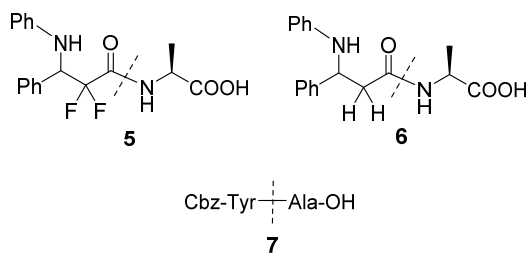
フッ素化 β -ラクタムからフッ素化ジペプチドの合成を達成したため、ペプチドの立体配座制御能を解析するためのオリゴペプチドの合成へと展開した。 α -ヘリックス構造を構築しやすいロイシン残基を有するテトラペプチドの合成を計画した。C 末、N 末ともに 1 残基程度のアミノ酸であれば既知の縮合反応によりペプチド鎖の伸長は可能でありトリペプチドは得られたものの、テトラペプチド特にロイシンが導入されたものの合成は難しく、難溶解性のため目的のテトラペプチドは得られなかった。

オリゴペプチドの合成は困難であることが分かったため、フッ素化ジペプチドを利用した機能評価を検討することとした。第二の機能評価対象であった酵素加水分解によるタンパク質分解に対する抵抗性の評価を実施した。フッ素化 β -ラクタム **1a** とアラニンとの縮合で得られたジペプチド **5** を基質とし、酵素で処理した。加水分解によって生成するアラニンと、引き続き酸化還元反応で生成する色素の吸光度測定で加水分解の程度を測定した。



コントロールペプチドとして、天然の β -アミノ酸のみからなるジペプチド Cbz-Tyr-Ala **7** を比較対象にアッセイしたところ、**7** の加水分解は速やかに進行したのに対しフッ素化ジペプチド **5** は加水分解が全く見られなかった。フッ素化ジペプチド **5** に加え、 β 位にフッ素置換基の無い非フッ素類縁体ジペプチド **6** を合成し、これの加水分解アッセイについても行った。残念ながら **6** についても加水分解が見られなかったことから、**5** の加水分解抵抗性はフッ素置換基特異的な抵抗性ではないことが分かった。

しかしながら、人工ペプチドにあたる **5** は酵素を介した加水分解に対して難分解性を示すことから、フッ素化 β -アミノ酸をペプチド鎖内に導入することで酵素に分解されにくいペプチドとして、実験室レベルで利用で



きるペプチドが提供可能となった。タンパク質の機能解析等で問題となるペプチドの安定性をクリアできる生化学的な素材となりうる発見であると考えている。

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 1 件)

1. 檀井敦、多置換フルオロ- β -ラクタム類の立体選択的合成と含フッ素 β -アミノ酸骨格への変換、*Yakugaku Zasshi*, **135**, 1245-1253, (2015)、査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 檀井敦、森川真梨乃、佐藤和之、表雅章、フッ素化 β -アミノ酸を含む人工ペプチドの合成とその機能評価、日本薬学会第 138 年会 (金沢) 2018 年 3 月 25-28 日

2. 檀井敦、森下格子、森川真梨乃、佐藤和之、表雅章、Simple synthetic method of fluorinated peptides and its application、第 10 回フッ素 155 委員会日仏セミナー (金沢) 2017 年 9 月 27-29 日

3. 森川真梨、森下格子、檀井敦、佐藤和之、表雅章、 β -ラクタムを用いた簡便なフッ素化ペプチドの合成と生理学的特性の評価、第 7 回フッ素化学若手の会 (京都) 2017 年 8 月 21-22 日

4. 上尾正和、檀井敦、佐藤和之、表雅章、安藤章、トリフルオロエタノールを用いた効率的なフッ素化ペプチドの合成、第 6 回フッ素化学若手の会 (神奈川) 2016 年 8 月 29-30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
摂南大学薬学部薬化学研究室
<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakka/yakka-lab/top-j>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樽井 敦 (TARUI, Atsushi)
摂南大学・薬学部 講師
研究者番号： 40434873

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

合田 光寛 (GODA, Mitsuhiro)
小林 直木 (KOBAYASHI, Naoki)