

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006-2008

課題番号：18510191

研究課題名（和文） スクアリン酸含有アミノ酸の導入によるペプチドの機能制御

研究課題名（英文） Chemistry of Sq group containing amino acid (ASQ): Incorporation of ASQ into peptides and their function

研究代表者 品田 哲郎 (SHINADA TETSURO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30271513

研究成果の概要：

アミノ酸、ペプチドは生命の維持機能をつかさどる重要な分子である。その機能を探る研究は生命科学研究における重要な課題である。本研究では、近年注目を集めている機能性酸性分子、スクアリン酸を組み込んだアミノ酸誘導体を世界で初めてペプチドへ導入することに成功した。これによって、従来にはない機能をそなえたペプチド類の合成が可能になるとともに、その基本的諸性質を初めて明らかにできた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 2007 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2008 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 480,000 | 3,680,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：スクアリン酸、アミノ酸、ペプチド、立体配座、生物活性

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸 **1** は生命の維持機能を司る重要な分子の 1 つである。アミノ酸の機能を探る研究ツールとして、そのカルボン酸部位をホウ酸、硫酸、リン酸、テトラゾールなどの酸性官能基で置換したアナログ **3-6** が開発され、広く利用されてきた(図 1)。H15~16 年度基盤研究 (C) の課題として、従来にはない新規なアミノ酸アナログ、 α アミノスクアリン酸(ASQ)の合成を提案し、研究を開始した。

スクアリン酸は、カルボン酸と等価な性質に加えて、金属錯体形成能、水素結合形成能、求核試薬との高い反応性、紫外吸収特性などの興味ある特性を併せ持つ機能性分子として、近年、医薬開発、機能性分子の開発などの幅広い領域で利用されている。その特性を付帯した ASQ は、さまざまな活用法が期待できると考え、実際に、天然型および非天然型に相当する ASQ 類をオリジナルな方法で合成した。こうした背景のもと、ASQ 類をペプチドへ組み込むことを次の大きな目標に

掲げた。

アミノ酸のカルボン酸部位を他の酸性官能基で置換した、たとえば、アミノスルホン酸やアミノホスホン酸をペプチドに導入した研究は幾つか知られている。しかし、これらアミノ酸誘導体は生理的条件下で、対応するアミド結合が加水分解されやすいという性質から、広く普及するには至っていない。これに対して、スクアリン酸は対応するアミド結合形成が容易でありかつ、生理的条件下における安定性が、これまでの合成研究事例から期待できた。このように、スクアリン酸を備えた ASQ は、従来型の誘導体の不得手な部分をカバーする生命科学研究ツールとして、ペプチド科学研究に利用できると期待した。

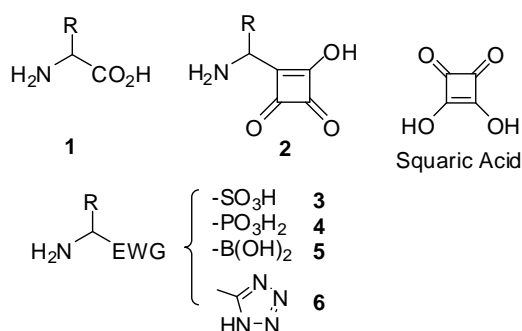


図1 アミノ酸およびそのカルボン酸部位を他の酸性基で置換した誘導体

2. 研究の目的

これまでに、ASQ をペプチドに組み込んだ例はない。そのため ASQ のペプチドへの導入法の確立を第一の目的とした。具体的には、オピオイド受容体と結合する鎮痛活性を有するペプチド、ロイシンエンケファリン (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu 7) のグリシン部位 (2つあるうちのいずれか) およびチロシン部位を ASQ 8 あるいは 9 と置換したアナログ 10-12 を合成する。ついで、安定性、生物活性、立体配座に及ぼす影響など、新規ペプチドの特性を明らかにする計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) 合成研究

ASQ 類の合成研究背景をもとに、N-保護アミノ酸エステルから発生させたジアニオン型エノラートをスクアリン酸ジエステルに付加させる反応を鍵として、これより得られるヒドロキシシクロブテン体の脱 Cbz 化、生じたアミンへのペプチド鎖伸長、脱炭酸反応、アミノ酸とのカップリング反応による、標的ペプチドの合成を計画した。

(2) 立体配座解析

ASQ 含有ジペプチドをモデル化合物に設定し、その合成と基本的な ASQ 含有ペプチドの立体配座を NMR 分析手法にて解析した。あわせて、ロイシンエンケフェリンアナログの立体配座と分子間水素結合の有無を解析した。

(3) 生物活性評価

ASQ 含有ロイシンエンケフェリンの薬理的詳細をオピオイドの3種の受容体サブタイプに対する結合活性試験にて評価した。

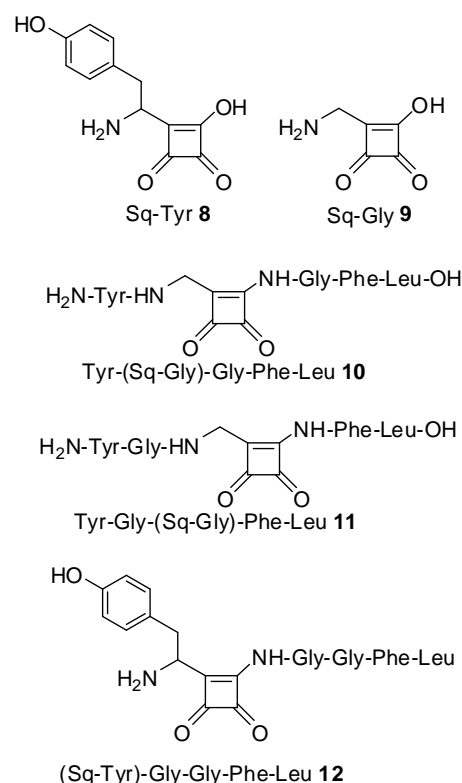


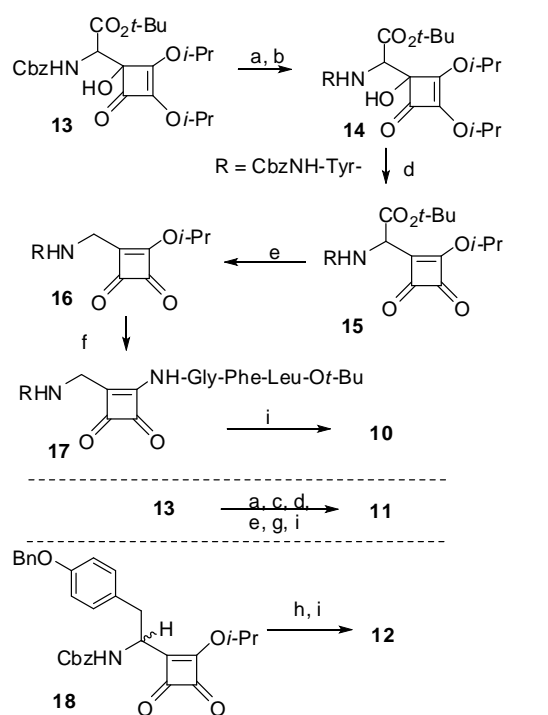
図2 標的ペプチドアナログ 10-12

4. 研究成果

(1) 合成研究

研究方法に沿って、まず、アナログ 10 の合成を試みた。スクアリン酸ジイソプロピルエステルに対して Cbz グリシンエスエルのジアニオン型エノラートを付加させて得られる 13 から出発して、その Cbz 基を水素添加条件下に除去、チロシンをカップリングして 14 を得た。立体的に混み合った位置でのカップリング反応であるために、EDCI による縮合は低収率であった。この点は、DEPBT を用いることで解決できた。14 は微量の塩酸の存在下、シクロブテンジオン体 15 へと変換し、ついで、TFA を作用させると t-Bu 基の脱離とともに、スクアリン酸部位の強い電子吸引作用によって自発的な脱炭酸反応が進

行して **16** を与えた。スクアリン酸イソプロピル部位はアミンと容易に反応することが既に知られている。実際に、残る Gly-Phe-Leu ユニットはトリエチルアミンの存在下容易に **16** と縮合し、目的とするペプチドアナログの保護体 **17** が合成できた。最後に酸性条件下、脱保護することで新規ペプチドアナログ **10** を合成できた。同様にして **13** から **11** を、チロシンアナログ **18** から **12** を、図 3 に示す経路で合成できた。新規ペプチドアナログは酸性脱保護条件でも分解せず、NMR 測定条件（重水中、重DMSO 中）や HPLC 分離条件（0.1%TFA, H₂O/MeCN）において分解等は確認されず、生物活性試験等の生理学的な条件下における十分な安定性を持つことが示された。



Conditions a) Pd-C (20% w/w), H₂, MeOH, rt, 2h. b) CbzNH-Tyr-OH (1.1 equiv), DEPBT, (1.2 equiv), THF, rt, 48 h, 2 steps, 78%. c) CbzNH-Tyr-Gly-OH (1.1 equiv), DEPBT, (1.2 equiv), THF, rt, 48 h, 2 steps, 76%. d) concd HCl, (0.9 equiv), CH₂Cl₂, rt, 3h, 74%. e) TFA (30 equiv), CH₂Cl₂, rt, 12 h, 74%. f) H₂N-Gly-Phe-Leu-O^{tert}-Bu (1.5 equiv), Et₃N, (1 equiv), THF, rt, 1.5 h, 91%. g) H₂N-Phe-Leu-O^{tert}-Bu (1.5 equiv), Et₃N, (1 equiv), THF, rt, 1.5 h, 91%. h) H₂N-Gly-Gly-Phe-Leu-O^{tert}-Bu (1.5 equiv), Et₃N, (1 equiv), THF, rt, 1.5 h, 85%. i) 30% HBr/AcOH, rt, 1.5 h, 95-98%.

図 3 ASQ 含有ペプチド **10-12** の合成

(2) 立体配座解析

ASQ 含有ペプチドの立体配座については解析例がないため、まず、モデルジペプチドを合成し、その立体配座を NMR にて解析した (図 4)。その結果、SQ 基のアミド結合部位には、アンチとシンの 2 つの回転異性体の平

衡混合物であることが示された。SQ 基は 2 つの電子不足なカルボニル基を有しているため、水素結合による立体配座の固定などに期待が持たれる。また、エンケフェリンは、分子内水素結合形成によって、その立体配座が固定されることが、鎮痛活性発現に重要であることが知られている。そこで、ペプチドアナログ **10** および **11** について、温度可変 NMR 条件下におけるアミドプロトンの交換速度を指標として、それらのアミドプロトンの水素結合形成の有無を解析した。その結果、**10** および **11** のいずれにおいても顕著な水素結合形成は確認されなかった。なお、ASQ 含有ペプチド類はいずれも、モデル化合物と同様に SQ アミド結合における回転異性体の平衡混合物として観測された。

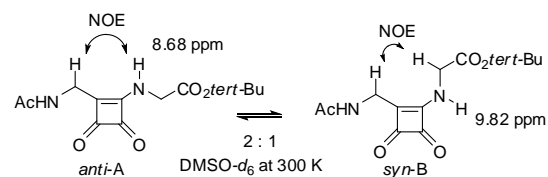


図 4 モデルペプチドの立体配座

(3) オピオイド受容体における結合特

ASQ ペプチドアナログ **10-12** の受容体結合活性試験を、茂里博士 (産総研) の協力を得て解析した。ハムスター由来のオピオイド受容体 (3 種のサブタイプ) に対して、新規ペプチドアナログを作用させたところ、3 つのサブタイプ選択的リガンドに比べて数十分の 1 程度の弱い結合活性が認められた。

(4) まとめと展望

新規 ASQ 含有ペプチド類の初めての合成に成功し、その安定性、立体配座、オピオイド受容体に対する結合活性を初めて明らかにした。オピオイド受容体に対する結合活性は弱いものであったが、この一例が ASQ の特性を全て表しているわけではないため、今後、様々な ASQ 含有生理活性ペプチドを合成し、その生物活性に及ぼす影響を調べる予定である。

このように ASQ 含有ペプチドの合成法や安定性に関する基本的な性質を明らかにできたことは、ASQ を利用する生命科学研究の展開に向けての大きな糧となった。中でも生理的条件下や、種々の合成反応条件に耐えうるだけの安定性を確認できたことは大きな収穫である。この結果を受けて、現在、ASQ 含有ペプチドを固相上で合成することを考えている。その実現は、天然アミノ酸を用いたペプチド研究と同じ速度で、ASQ 含有ペプチドを利用した生命科学研究を大きく拡大することに繋がると期待している。

(5) 謝辞

研究の進展を暖かく見守って下さいました大船泰史教授ならびに坂口和彦准教授，活性試験を実施下さいました茂里康博士に心から感謝申し上げます。惜しみない努力と情熱をもって研究に取り組んで下さいました共同研究者の皆様にも心より感謝申し上げます。末尾ながら，研究を行うにあたり，大きな励みになった科学研究費補助金の支援に感謝申し上げます。

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 8 件)

- ① A short and efficient synthesis of manzacidins A and C, Oe, K.; Shinada, T.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 7426-7429 (feature cover article). 査読有
- ② Total Synthesis of (-)-Amathaspiramide F, Sakaguchi, K.; Ayabe, M.; Watanabe, Y.; Okada, T.; Kawamura, H.; Shinada, T.; Ohfuné, Y.* *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5449-5452. 査読有
- ③ Efficient asymmetric synthesis of functionalized pyroglutamate core unit common to oxazolomycin and neooxazolomycin using Michael reaction of nucleophilic glycine Schiff base with α,β -disubstituted acrylate. Yamada, T.; Sakaguchi, K.; Shinada, T.; Ohfuné, Y.; Soloshonok, V. A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 2789-2795. 査読有
- ④ Synthesis of Novel Enkephalin Analogs Containing α -Amino Squaric Acids. Shinada, T.; Ishida, T.; Hayashi, K.; Yoshida, Y.; Shigeri, Y.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7614-7617. 査読有
- ⑤ 生命科学研究におけるスクアリン酸の利用とその進歩，品田哲郎，石田稔和，大船泰史，有機合成化学協会誌，**2007**，*65*，30-43. 査読有
- ⑥ A New Entry to the Synthesis of N-Acylguanidine by Condensation of Thiocarbamates with HMDS. Shinada, T.; Umezawa, Y.; Ando, T.; Kozuma, H.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1945-1947. 査読有
- ⑦ Total Synthesis of 5,6,11-Trideoxytetradotoxin. Umezawa, T.; Hayashi, T.; Sakai, H.; Yoshikawa, T.; Izumida, M.; Teramoto, H.; Tamatani, Y.; Hirose, T.; Ohfuné, Y.; Shinada, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4971-4974. 査読有
- ⑧ Novel Biologically Active Peptides from the Venom of *Polistes rothneyi iwatai*. Murata, K.; Shinada, T.; Ohfuné, Y.; Hisada, M.; Yasuda, A.; Naoki, H.; Nakajima, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2493-2497. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 山寄敦子，品田哲郎，大船泰史，スクアリン酸を用いた硫黄含有グルタミン酸アナログの合成と活性，日本化学会第 88 春季年会 (立教大学)，2008 年 3 月 26 日～3 月 30 日，講演予稿集 2 G3-12.
- ② Yamazaki, T. Shinada, Y. Ohfuné, Synthesis of Thio-squarate Group Containing Glutamate Analog, 第 2 4 回有機合成化学セミナー 2007 年 9 月 12 日～14 日，淡路夢舞台国際会議場，(poster), P-10, 講演要旨集 P-96.
- ③ Yamasaki, T. Shinada, Y. Ohfuné, Synthesis of Thio-squarate Group-containing Glutamate, The 11th Osaka City University International Conference, August 3, 2007, Osaka, Japan (Poster).
- ④ 山寄敦子，品田哲郎，大船泰史，スクアリン酸を用いた硫黄含有グルタミン酸アナログの合成，第 34 回有機反応懇談会 (大阪府立大学学術交流会館)，2007 年 7 月 27 日 (ポスター)
- ⑤ 品田哲郎，石田稔和，大船泰史，新規スクアリン酸含有アミノ酸およびペプチド誘導体の合成 第 91 回有機合成化学シンポジウム，1-13 平成 19 年 6 月 12 日 (火)～13 日 (水) 東京工業大学・大岡山西地区 (西 9 号館) デジタル多目的ホール，講演要旨集 P49-52.
- ⑥ 山寄敦子，品田哲郎，大船泰史，スクアリン酸を用いた硫黄含有グルタミン酸アナログの合成，日本化学会第 87 春季年会 (関西大学千里山キャンパス)，2007 年 3 月 25 日～3 月 28 日，講演予稿集 3 H2-07.
- ⑦ 山寄敦子，石田稔和，林謙一，吉田慈孝，大山勇生，品田哲郎，大船泰史，Squaric Acid as a Useful Tool for Amino Acid and Peptide Chemistry, 「化学プラットホーム

@関西」シンポジウム 2006 (大阪市立大学学術情報総合センター), 2006 年 12 月 12 日 (ポスター)

- ⑧ 山崎敦子, 品田哲郎, 大船泰史, スクアリン酸ジエステルを用いたペプチドの選択的官能基化, 第 33 回有機反応懇談会 (同志社大学京田辺キャンパス), 2006 年 8 月 3 日 (ポスター)
- ⑨ Yamasaki, T. Ishida, K. Hayashi, Y. Yoshida, Y. Ooyama, T. Shinada, Y. Ohfuné, Squaric Acid as a Useful Tool for Amino Acid and Peptide Chemistry, IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (ICOB-5 & ISCNP-25), July 23-28, 2006, Kyoto, Japan, P-212 (Poster).
- ⑩ 山崎敦子, 品田哲郎, 大船泰史, スクアリン酸ジエステルを用いたペプチドの選択的官能基化, 日本化学会第 86 春季年会 (日本大学理工学部船橋キャンパス), 2006 年 3 月 27 日~3 月 30 日, 講演予稿集 4 L3-01.

[図書] (計 1 件)

- ① ACS book symposia series, ed by Soloshonof. Asymmetric synthesis of α -substituted amino acids. Y. Ohfuné, Sakaguchi, K.; Shinada, T. **2009**, in press.

[その他]

ホームページ等

<http://www.materials.sci.osaka-cu.ac.jp/HENKAN/index.html>

受賞: 品田哲郎, 2008 年, 第 6 回有機合成化学協会関西支部賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者 品田 哲郎 (SHINADA TETSURO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 30271513

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし