

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009年～2012年

課題番号：21310145

研究課題名（和文） スクアリン酸含有アミノ酸のペプチドへの自在導入法の開発と新規ペプチドの機能

研究課題名（英文） Synthesis of α -Amino Squaric Acid Incorporated Peptides and Their Biological Activities

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・教授

研究者番号：30271513

研究成果の概要（和文）：ペプチドの機能を探る研究は生命科学研究の中核的課題である。ペプチド中のアミノ酸(AA)をアミノ酸アナログに置換し、ペプチドの機能を解析する、あるいは、従来にない機能を付与したペプチドを創製する研究が盛んである。本研究では、独自に開発したスクアリン酸含有アミノ酸(ASQ)を利用し、その固相上でのペプチド導入法を開発した。これにより、新規ペプチドライブラリー構築と、ASQ導入が生物活性に及ぼす影響の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Peptides are one of the pivotal biological materials that plays an important role in biological function. Due to their crucial roles, development of peptide analogs as a tool for investigation of peptide function has attracted much attention from the researchers in the area of biology, medicinal chemistry, and synthetic chemistry. In this research, the synthesis of α -amino squaric acid incorporated peptides on solid phase was investigated. The solid phase synthesis was achieved by using a new ASQ containing dipeptide unit. These biological activities were also investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	13,600,000	408,000	17,680,000

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：ペプチド、スクアリン酸、固相合成、ペプチドアナログ

1. 研究開始当初の背景

ペプチドは生命の維持機能を司る重要な生体分子の一つである。ペプチドの機能を探る研究が盛んに行われている中で、ペプチドを構成する天然アミノ酸(AA)をアミノ酸アナログに置換することによって、ペプチドの機能改変から天然由来の生物活性ペプチドの機能を明らかにする、あるいは、天然にはない新たな機能を付与したペプチドを創

製する研究が盛んに行われている。我々は、基盤研究(C)[No. 18510191 (2006-2008)]の支援を受けて、世界初となるスクアリン酸 **3** を組み込んだアミノ酸アナログ **2** (ASQ)の合成と、**2** を含むオビオイドペプチドアナログ **4** の液相合成に成功した(Fig. 1)。本研究成果の特色は、従来のアミノ酸アナログでは困難であった、ペプチド内部への組み込みが、ASQにおいて可能になった点にある。

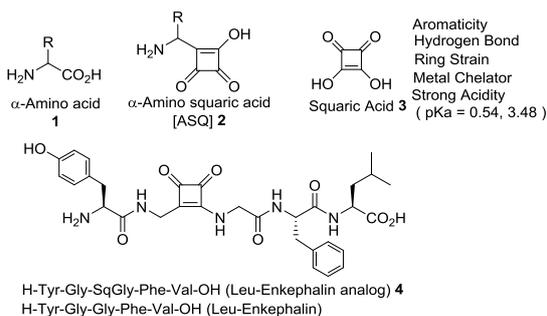


Figure 1. スクアリン酸含有アミノ酸(ASQ)、スクアリン酸、スクアリン酸含有エンケファリンアナログの構造

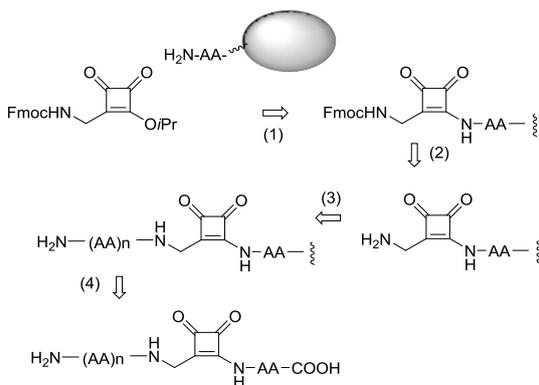
2. 研究の目的

AA は固相合成により自在にペプチドに導入でき、合成は自動化されている。今回、ASQ がペプチド内部に導入できることを受けて、固相合成により ASQ をペプチドに自在導入する方法を開発することを計画した。これにより、新規ペプチドライブラリーの構築と、その生物活性を評価することで、ASQ 導入の効果を検証することにした。

3. 研究の方法

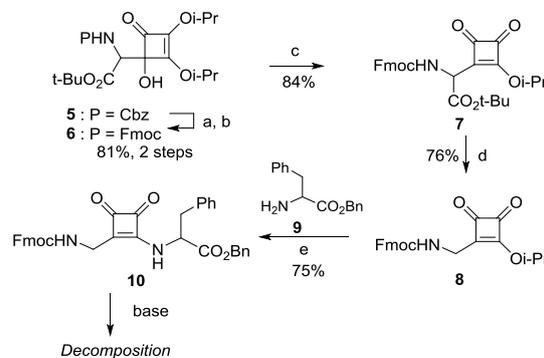
(1) Fmoc 法適用のためのモデル実験。

ペプチド固相合成法はいくつか知られている。その中で、実用的な方法として広く用いられている Fmoc 法を適用することにした。Fmoc 法によるペプチド化は、(1) Fmoc-HN-AA-COOH の固相担持、(2) 塩基性の条件下での脱 Fmoc 化反応、(3) Fmoc-HN-AA-COOH の縮合と (2)と(3)の繰り返しによるペプチド鎖伸長、(4) 固相からの切り出しから構成されている。固相合成に用いる ASQ ユニットとして、まず Fmoc-HN-ASQ-OiPr を想定し、ペプチド合成への適用について調査を開始した(Scheme 1)。



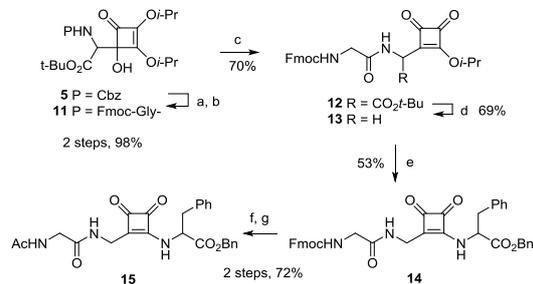
Scheme 1. Fmoc 法による ASQ 連結

Fmoc-SqGly-Phe-OBn **10** をモデル基質として、脱 Fmoc 化反応について検討した。**10** は既に報告しているのオピオイドペプチドアナログ合成法を参考に、**5** から 4 段階で合成した (Scheme 2)。**10** の脱 Fmoc 化をさまざまな塩基を用いて試みた。しかしながら、いずれも複雑な混合物を与えるのみであった。



Scheme 2. モデル基質 **10** の合成と脱 Fmoc 化。反応条件：(a) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ (20 wt%), MeOH, rt, 3 h; (b) FmocOSuc, CH_3CN , rt, 4 h; (c) $12/\text{HCl}$ (1 eq.), CH_2Cl_2 , rt, 3 h; (d) TFA (30 eq.), CH_2Cl_2 , 0 °C to rt, 12 h; (e) pH 8.2 phosphate buffer, 3 h.

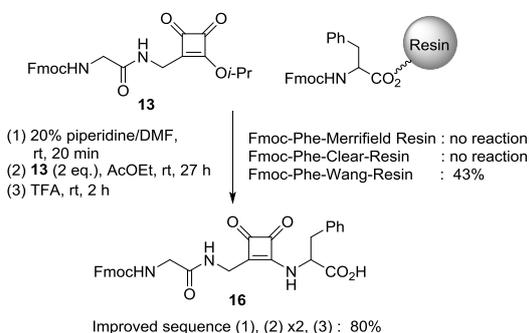
上記、脱 Fmoc 化反応の生成物について調べたところ methylenefluorene が得られた。このことは、塩基の作用によって脱 Fmoc 化反応が進行していることを示している。あわせて、脱 Fmoc 化後に生成するアミン体が不安定であり、分解していることを示唆している。そこで、SqGly の N 末にあらかじめ Fmoc-HN-Gly を導入した、保護体 **14** をモデル基質とし、脱 Fmoc 化を検討した。その結果、Fmoc 基はスムーズに除去され、かつ、これにより派生するアミン体が安定に存在することが確認できた。なお、アミン体の生成は、アセチル化後の生成物 **15** の単離によって確認している。



Scheme 3. モデル基質の合成と脱 Fmoc 化：反応条件 (a) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ (20 wt%), MeOH, rt, 3 h; (b) Fmoc-Gly-OH, EDCl, THF, rt, 2 h; (c) $12/\text{HCl}$ (1 eq.), CH_2Cl_2 , rt, 3 h; (d) TFA (30 eq.), CH_2Cl_2 , 0 °C to rt, 12 h; (e) K_2HPO_4 , THF, rt, 3h; (f) $20\%\text{Et}_2\text{NH}/\text{THF}$, rt, 30 min; (g) excess Ac_2O , THF, rt, 1 h.

(2) 固相合成 (Fmoc 法)の試み。固相への担持

先の結果を踏まえて、固相合成の反応ユニットとして、Fmoc-Gly-SqGly- OiPr **13** を選択し、まず、その固相担持について検討した (Scheme 4)。ペプチド合成において汎用されている 3 種類のレジン (Phe をあらかじめ担持) に対して、**13** の縮合を試みたところ、Wang レジンにおいてのみ反応が進行することがわかった。溶媒には酢酸エチルが最適であった。担持効率はレジンから切り出したトリペプチドアナログ **16** の収率から算出している。検討の結果、Wang レジンに対して、**13** を 2 回繰り返して縮合させることで、収率を 80% まで高めることができた。また、レジンからの切り出しが可能なのも、**16** の単離により確認できた。

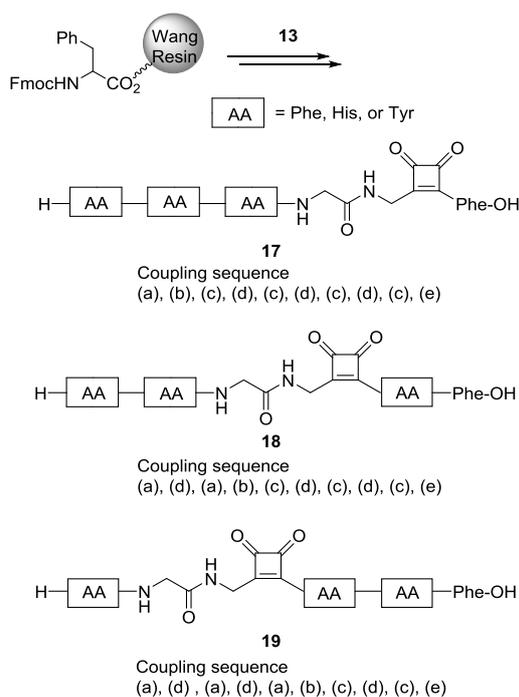


Scheme 4. ジペプチドユニットの縮合効率

(3) SqGly 含有ペプチドライブラリーの構築

上記の結果をもとに、**13** を用いた新規ペプチドライブラリーの構築を試みた。Fmoc-Phe-Wang レジンを出発原料とし、縮合する AA として 3 種の芳香族アミノ酸 (Phe, His, Tyr = 1:1:1) の混合物を用いた。Gly-SqGly の導入位置の違いにより、ライブラリー構築を 3 系統に分類し、それらの構築を平行に進めた。縮合の回数は、AA を 3 回、**13** を 1 回とした。

AA の縮合には、HOBT, HBTU, *i*Pr₂NEt を用いた。**13** の縮合は、スクアリン酸エステルがアミンと容易に反応する性質から、縮合剤を用いることなく、反応の際に弱塩基性を維持できる程度のアミンを共存させることで行った。1 系統のライブラリーには理論的に 27 種の ASQ 含有ヘキサペプチドアナログが含まれる。3 系統あわせて、計 81 種の SqGly 含有新規ペプチド **17-19** が構築できた (Scheme 5)。同様に、フェニルアラニン等価体である SqPhe を用いて、81 種の新規ライブラリー **20-22** を構築した (Fig. 2)。今回開発した方法により、合計、162 種の新規ペプチドを含む、6 系統のライブラリーが固相合成により構築できた。



Scheme 5. SqGly 含有新規ヘキサペプチドライブラリーの構築: 反応条件: (a) 20% piperidine/DMF, rt, 20 min. (b) **13** (2 eq.), AcOEt, rt, 24 h (x2). (c) 20% Et₂NH/DMF, rt, 20 min. (d) Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (1.3 eq.), Fmoc-Phe-OH (1.3 eq.), Fmoc-His(Trt)-OH (1.3 eq.), HOBT (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (4 eq.), AcOEt, rt, 1 h. (e) TFA, rt, 4 h.

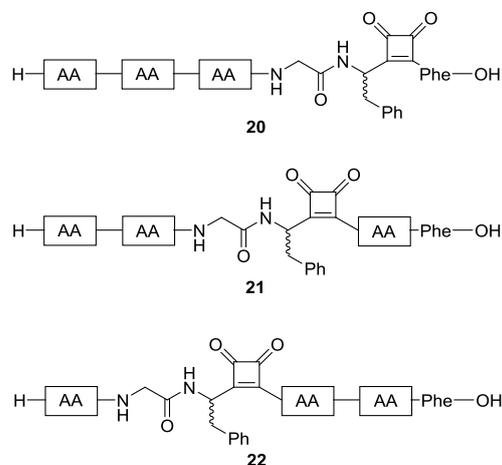
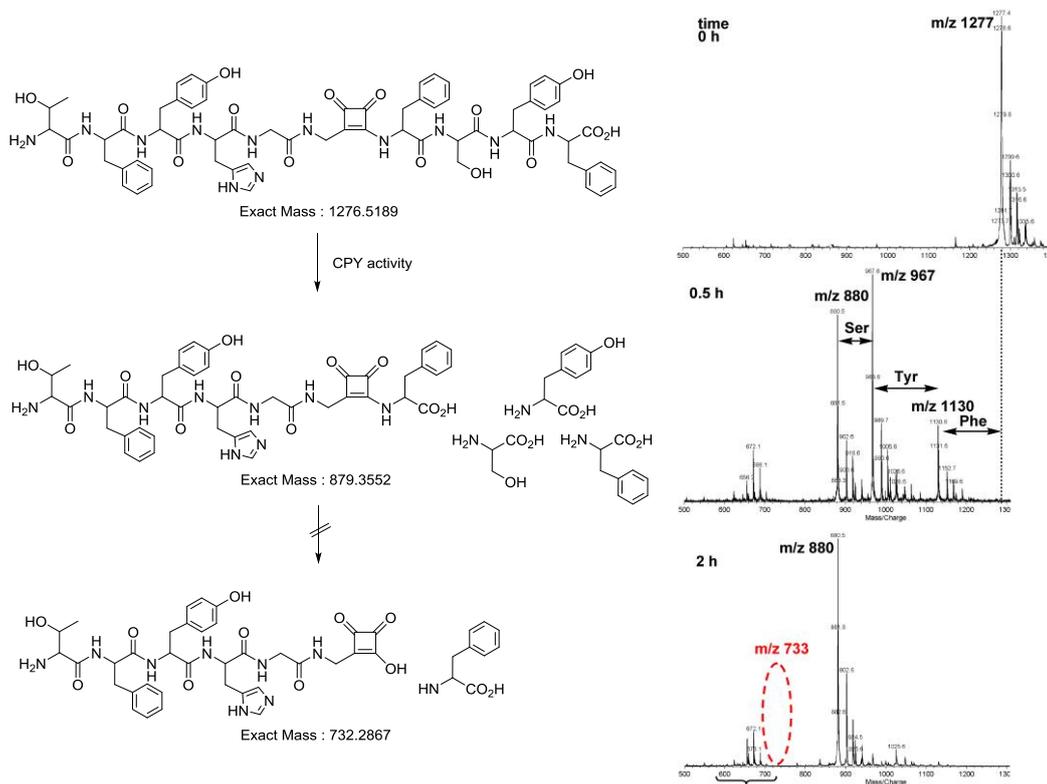


Figure 2. SqPhe 含有新規ヘキサペプチドライブラリーの分子構造

(4) 生物活性評価

ASQ は非天然型 AA であるため、加水分解酵素に対して耐性を示すことが期待された。この点を確かめるために、SqGly 含有ペプチドを合成し (Scheme 6)、ペプチドの C 末の AA を特異的に加水分解する酵素、カルボキシペプチターゼ Y との反応を試みた。ASQ 含有ペプチドを固相合成し、HPLC にして精製して単離精製したものを反応に用いた (Scheme



Scheme 6

6). 酵素反応は MALDI-TOF-MS にて追跡した。その結果、C 末から 3 つのアミノ酸残基が切り出されたペプチドに由来する m/z が観測された。これにより、 $-SqGly-Phe-COOH$ 結合部位にあたる、Sq アミド部位は、酵素によって切断を受けていないことが示された。

新規ペプチドの生物活性に及ぼす影響をさらに探るために、グルタミン酸受容体との結合活性、ガン細胞増殖抑制活性、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性、 β セクレターゼ阻害活性試験について調べた。その結果、弱いながらも ($100 \mu M$) ガン細胞増殖抑制活性が認められることを見出した。ライブラリーには、わずかながら Gly-SqGly を含まないテトラペプチドが混在する。それらが活性に関与していないことを明らかにするために、別途テトラペプチドライブラリーを合成し、ガン細胞増殖抑制活性を調査した。その結果、 $100 \mu M$ において活性が認められないことを確認した。これにより、生物活性の発現に SqGly が必要なことが示された。

4. 研究成果

本研究で得られた成果は次のようにまとめられる。

- 固相合成に利用可能なペプチドユニットを開発した
- 固相合成に適したレジンを見出した。
- 固相合成により、SqGly, SqPhe を含む 162 種の新規ペプチドライブラリーが構築で

- きた
- ASQ がカルボキシペプチターゼに対する加水分解耐性を示すことを明らかにした。
 - 新規ライブラリーの生物活性をランダムスクリーニングした結果、弱いながらも HepG2 ガン細胞増殖抑制活性があることを明らかにした。
 - ガン細胞増殖抑制活性において、ASQ が活性発現に必須であることを確かめた。

このように、研究計画に提案した ASQ 含有ペプチドの固相上での自在合成法を確立できた。また、新規ペプチドライブラリーを作成し、ASQ に特徴的な生物活性を見出すことにも成功している。本研究により、今回新たに開発した手法の有用性の一端が示されたものと考えている。

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 10 件)

- ① Stereoselective Synthesis of $E-\alpha,\beta$ -Dehydroamino Acid Esters, Y. Yasuno, M. Hamada, T. Yamada, T. Shinada, Y. Ohfuné, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 1884-1888 [査読有]
- ② Mild and Catalytic Transesterification Reaction using K_2HPO_4 for the Synthesis of Methyl Esters, T. Shinada, M. Hamada, K. Miyoshi, M. Higashino, T. Umezawa, Y.

- Ohfuné, *Synlett* **2010**, 2141-2145 [査読有]
- ③ Thiol addition to *t*-butyl methyl squarate. efficient synthesis of novel sulfur-linked squaryl group-containing glutamate analogs. T. Shinada, A. Yamasaki, Y. Kiniwa, K. Shimamoto, Y. Ohfuné, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4354-4357 [査読有]
- ④ Asymmetric Synthesis of α,α -disubstituted α -amino acids: Strecker and Claisen Approaches. Y. Ohfuné, K. Sakaguchi, T. Shinada, ACS Symposium Series (2009), 1009 (Asymmetric Synthesis and Application of α -Amino Acids), 57-71 [査読有]

[学会発表] (計 16 件)

- ① 前田健太郎、品田哲郎、大船泰史、固相合成による α -アミノスクアリン酸含有ペプチドの合成、日本化学会第 93 春季年会 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス)、2013、3/22-25、講演予稿集 3D1-28
- ② K. Maeda, T. Shinada, Y. Ohfuné, Synthesis of Novel Peptide Analog by Iterative Linkage of Squaric Acid-Containing Amino Acid, The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12), 2012、12/12-16, Kyoto, Japan, PA-024
- ③ 前田健太郎、木庭雄一、石田捻和、品田哲郎、大船泰史、スクアリン酸含有アミノ酸を組み込んだ新規ペプチドアナログ合成、第 54 回天然有機化合物討論会、2012 9/18-20、P-41、P387
- ④ 品田哲郎、非天然型アミノ酸構造を有する天然有機化合物の全合成研究、第 39 回有機反応懇談会、関西大学千里山キャンパス、2012、8/3、P27 (招待講演)
- ⑤ T. Shinada, Y. Kiniwa, Y. Ohfuné, Synthesis of Squaric Acid-containing Amino Acid and Its Incorporation into Peptide, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. "Frontier of Medicinal Science", 2011、11/29-12/2, Keio Plaza Hotel, Japan.
- ⑥ 木庭雄一、品田哲郎、大船泰史、 α -アミノスクアリン酸含有ペプチドライブラリーの合成研究、日本化学会第 91 春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、2011、3/26-29
- ⑦ T. Shinada, Y. Kiniwa, T. Ishida, and Y. Ohfuné, Incorporation of Squaric Acid-containing Amino Acid into Peptide, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), 2010, 12/10-15, Hawaii, USA
- ⑧ T. Shinada, T. Ishida, A. Yamasaki, Y.

Kiniwa, Y. Ohfuné, Synthesis of α -Amino Squaric Acid and Its Incorporation into Peptide, Tenth Tetrahedron Symposium in Paris, France, 2009、6/24-26, B-45

- ⑨ 品田哲郎、精密有機合成を駆使した微量生理活性分子の構造決定、第 36 回有機反応懇談会、関西学院大学、2009、8/3 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/henk-an/index.html>

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・教授
研究者番号：30271513

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし