

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 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21689004

研究課題名（和文）ケモカインレセプターCCR5 を標的とした阻害剤の開発と機能解析

研究課題名（英文）Design and synthesis of the inhibitors for chemokine receptor CCR5

研究代表者 今野 博行 (KONNO HIROYUKI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：50325247

研究成果の概要（和文）：抗 HIV 剤開発を目指し、海綿産環状デプシペプチド類の合成と評価を行った。環状デプシペプチド・カリペルチンはケモカインレセプターCCR5 を阻害することで抗 HIV 活性を発現すると考えられているが詳細は今だわかっていない。カリペルチン類は異常アミノ酸を豊富に含み、立体化学の未決定部分が存在し、効率的な合成法も確立されていなかった。そこで、入手が困難な異常アミノ酸について立体制御合成を行い、ペプチド形成は Fmoc-固相法で合成を行う計画を立てた。また CCR5 に対する評価系確立のため、細胞毒性試験を行いながら研究を進めた。

研究成果の概要（英文）：Callipeltins are linear- and cyclic depsipeptides isolated from marine sponge by Zampella's group. These molecules were reported to exhibit anti-HIV activity and cytotoxicity against various tumor cell lines. In the course of our recent research regarding the synthetic study of cyclic depsipeptides, we conducted studies on the synthesis of callipeltins supposed to be efficient structures for CCR5 inhibitors as anti-HIV drugs or anti-cancer agents. In the present study, we performed the stereoselective synthesis of several unusual amino acids and solid phase synthesis of callipeltin E, M and B on Fmoc-strategy. In addition, we evaluated the cytotoxicity against the Hela cell line.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
総計	21,200,000	6,360,000	27,560,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：医薬品化学

キーワード：環状ペプチド、抗 HIV 活性、ケモカインレセプター、固相合成、異常アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

異常アミノ酸を含有する有機化合物は医薬品のリードや生命現象の解明の鍵を握るような顕著な生物活性を有するものが多く、その構造の複雑さや新奇性から多くの注目を

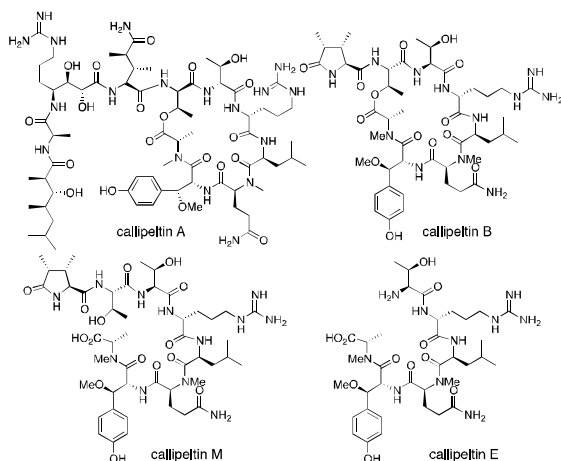
浴びている。一般的に正常蛋白性アミノ酸がアミド結合で連結されたペプチドや蛋白質は生体内で分解されやすく、医薬品として利用されにくいといった欠点をもっている。それに比べて、異常アミノ酸類はその構造の多

様性などから生物活性を有しながら、分解されにくく、しかも高次構造の形成に関与しやすいといった利点を有している。筆者は現在まで、 α , α -2 置換- α -アミノ酸、 α , β -置換- β -アミノ酸、不飽和- γ -アミノ酸といった様々な異常アミノ酸合成法を確立し、 α -ヘリックスや β -シート構造といった高次構造を誘発するような機能性分子の創出や医薬品創製を目指してきた。その結果、システインプロテアーゼ阻害剤として Miraziridine A の全合成を達成し、カテプシン B、K さらには SARS プロテアーゼを用いた阻害能を評価する目的で構造活性相関研究を展開している。

これらを基盤として、筆者は 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。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、国内外のグループが精力的に研究を展開している。現在も副作用が確認されている maraviroc が承認されているのみであり、HIV 感染に関する CCR5 についての研究は大学、製薬企業を始め過酷な競争の中にある。

2. 研究の目的

筆者は callipeltin 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主な目的とした。HIV が膜融合時に重要な役割として相互作用するケモカインレセプター CCR5 に対する阻害能を評価する。現在の段階では callipeltin A がどのようなメカニズムで CCR5 を阻害しているかは不明であり、生化学、細胞生物学の助けを借りながら追求する。そのためには安定な物質供給が必要であり、異常アミノ酸類の効率的な合成法の開発、これらを組み込んだ固相上でのカップリング、環化反応など合成化学的な研究を中心に検討を行う。



3. 研究の方法

構成異常アミノ酸は立体制御下に行い、それらを固相上で組み立てる戦略である。阻害剤創成を目指すためアナログ体合成に柔軟に対応できるものでなければならない。それを最も優先したルートを計画した。

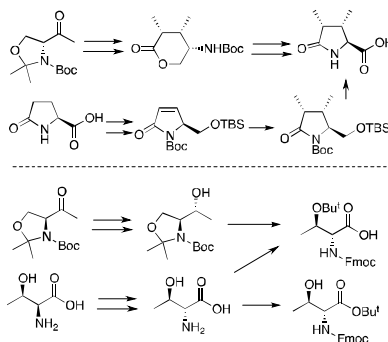
細胞培養は培養、継代、MTT アッセイまでを確立し、HEK 細胞、HKE/CCR5 細胞へと展開する。また同時に蛍光プローブの作成を行う。

4. 研究成果

(1) 異常アミノ酸 dimethylglutamine ならびに D-allothreonine の立体制御合成

出発原料にセリンを用い、各種保護基を導入後 Hanessian 法による完全立体制御による 2 つにメチル基の導入に成功した。その後、ラクトン体へ変換し、天然物の立体構造にするために立体反転を行い、ラクトンからラクタムへの one pot 変換に成功した。最後に TEMPO 酸化によって選択的に 1 級アルコールのみをカルボン酸に変換し、その合成を達成した。また同様の原料から Fmoc-D-allothreonine へ導くことにも成功したが、メチル基のジアステレオ制御に課題が残った。

そこで L-threonine α 位の異性化反応を検討した。文献記載の方法では再現性が悪く、望む化合物を得ることは難しかった。そこで種々検討した結果、反応温度、pH を厳密に制御することで D-allothreonine を得ることに成功した。さらに、Fmoc-D-alloThr (tBu)-OtBu に対して水酸基、カルボン酸保護基を位置選択的に除去する方法も見出すことができた。

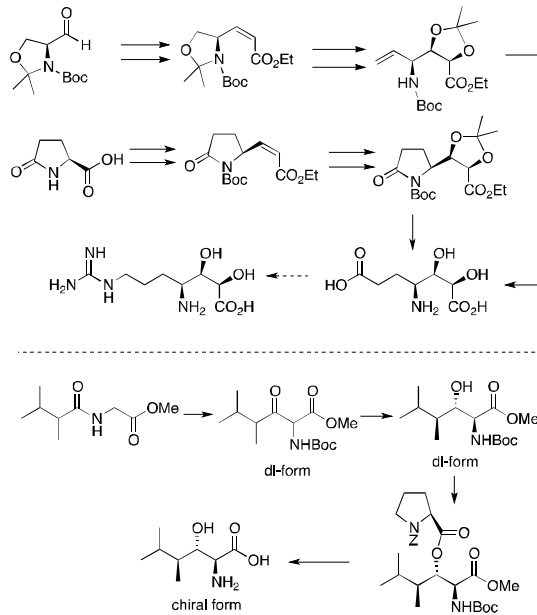


(2) アルギニン由来異常アミノ酸類の合成

ガーナーアルデヒドを原料に用いてジアステレオ選択的にジヒドロキシル化、さらに cross-metathesis 反応によって Guanidino 基、カルボン酸類の導入を行った。立体化学の決定のため天然物との比較、さらには JBCA 法を適用したが、決定することは困難を極めた。

(3) ロイシン由来異常アミノ酸類の合成

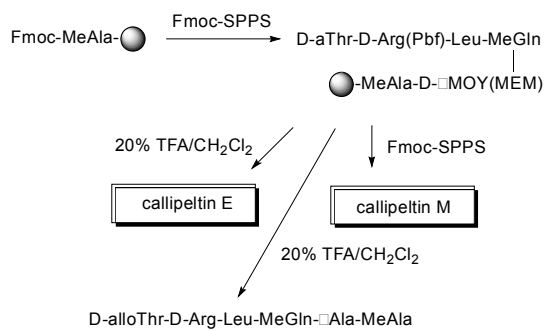
イソバレロクロリドとグリシンを原料にアミノ基転位反応を鍵反応に合成した。最終βケトエステルの還元では、ジアステレオマー化合物を基質に用いても天然物の立体化学のみが優先的に得られることを見出し、高効



率的な合成法を確立した。

(4) カリペルチン E ならびに M の全合成

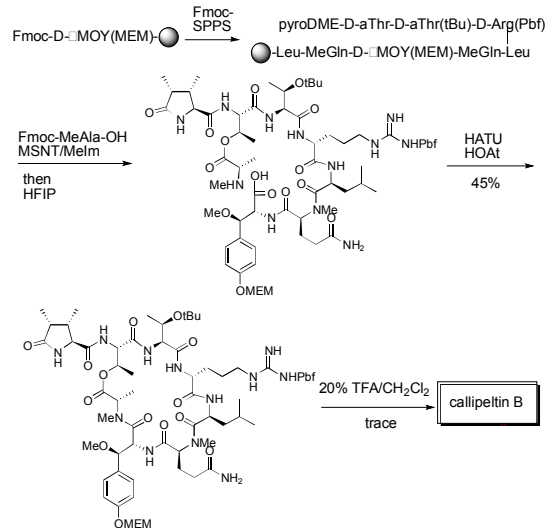
合成した異常アミノ酸を Fmoc-固相合成法によりカップリングし、カリペルチン E ならびに M の合成を達成した。また同時に得られる副産物を同定し、βメトキシチロシンがβアラニンに変換される反応機構も解明することに成功した。



(5) 環状デプシペプチドの合成

ケモカインレセプターCCR5阻害剤創成を目指して環状デプシペプチドcallipeltin ならびに類縁体の合成を行った。環状デプシペプチドの合成ではC末端からN末端に向かう直鎖状のペプチドを合成し、N末端とC末端、すなわちデプシ部分での環状化反応を詳細に検討した。その結果、N末端アミノ酸の構造に起因する環状化の効率性について大きな知見を得ることができた。結果としてcallipeltin Bの合

成には不向きであるという結論に達したが、今後のcallipeltin A 類の合成には適用可能である。これらの知見をもとに様々なアミノ酸を組み込んだ環状ペプチドライブラリーの合成を行ったところ、C末端アミノ酸がN-メチルアミノ酸の時に重大な問題点が生じることがわかった。C末端 MeAla のカルボン酸と Thr 側鎖アルコール部分での環状化では Thr のN側アミノ酸によって環化効率が異なることがわかった。すなわちGlnの時には70%、pyroGln の時には全く進行しないという結果であった。そこで直鎖内にデプシ部分を組み込み、Arg と Thr とでアミド化による環化を行った所、大変良好な結果を与えた。しかしながら、MeAla が分子内に存在する場合にはジケトピペラジン形成が優先的に起こり望む環状ペプチドを与えるには困難であった。これより、MeAlaとTyrでの環化が最も効率的であることを見出した。このルートで15種類の callipeltin アナログの合成に成功した。様々な誘導体合成に適用可能であることを証明することができた。



(6) HeLa細胞に対する細胞毒性試験

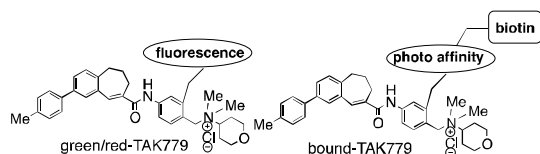
得られたペプチドを用いて HeLa 細胞に対する細胞毒性試験をおこなった所、そのほとんどで毒性を示さなかった。

Dimethylglutamine のジメチル基が毒性発現に必須であることを突き止めた。この結果は抗ウイルス剤の創製には有利な情報である。またHEK/CCR5細胞培養にも成功した。

(7) 今後の課題

Callipeltin 類の合成法の確立、細胞毒性試験等、多くの結果を得ることができた。しかしながら、CCR5 とのアッセイに用いる蛍光

プローブの作成が期間内に間に合わず一部計画を達成することができなかったことは反省材料である。新年度に入り継続して蛍光プローブの作成を検討中であり、当初の目的を必ずしや達成したいと考えている。研究室を主宰する時期と重なり、機器類、試薬類などの購入資金の助成は何物にも代え難い支援であった。関係各位に心から感謝申し上げます。



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 11 件)

1. Kikuchi, M.; Konno, H. Structure Activity Relationship Study of Callipeltin B for the Cytotoxic Activity. *Peptide Science* **2012**, **2013**, 145-148. (査読有)
2. Kikuchi, M.; Konno, H. Improved synthesis of Fmoc-D-allothreonine derivatives from L-threonine. **2013**, in press. (査読有)
3. Kikuchi, M.; Konno, H. Solid phase total synthesis and cytotoxicity of callipeltin E and M, the linear peptides isolated from marine sponge *Latrunculia* sp. **2013**, Manuscript in preparation. (査読有)
4. Kikuchi, M.; Watanabe, Y.; Tanaka, M.; Akaji, K.; Konno, H. Synthetic Study of Depsipeptides Analogues of callipeltin B and Its Cytotoxicity. *Peptide Science* **2011**, **2012**, 111-114. (査読有)
5. Konno, H. Synthetic study of bioactive natural product as protein inhibitors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, **76**(6), 1-5. (査読有)
6. Kikuchi, M.; Watanabe, Y.; Tanaka, M.; Akaji, K.; Konno, H. Synthetic study of callipeltin B analogues and its cytotoxicity. Proceedings of 32nd European Peptide Symposium **2012**, 636-637. (査読有)
7. Konno, H.; Kikuchi, M.; Maita, K.; Takatsuka, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthetic Study of Cyclodepsipeptide for Anti-HIV agent. *Peptide Science* **2010**, **2011**, 200. (査読有)
8. Kikuchi, M.; Nosaka, K.; Akaji, K.; Konno, H. Solid Phase Total Synthesis of Callipeltin E isolated from marine sponge *Latrunculia* sp. *Tetrahedron Lett.* **2011**, **52**(30),

3872-3875. (査読有)

9. Kikuchi, M.; Watanabe, Y.; Tanaka, M.; Akaji, K.; Konno, H. Synthesis and cytotoxicity of callipeltin B analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, **21**, 4865-4868. (査読有)
10. Konno, H.; Takebayashi, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthetic Studies on Callipeltins: stereoselective syntheses of (3S, 4R)-3,4-dimethyl-L-pyroglutamic acid and Fmoc-D-allothreonine. *Heterocycles* **2010**, **81**(1), 79-89. (査読有)
11. Konno, H.; Aimoto, S.; Smith, S. O.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthesis of [19.35.36-¹³C₃]-Labeled TAK779 as a molecular probe. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, **17**, 5769-5774. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

1. ○Takeda, S.; Maita, K.; Tokairin, Y.; Konno, H. Synthetic study on homophymine A: stereoselective synthesis of unusual amino acids. UK/Japan Conference in Catalytic Asymmetric Synthesis. April 19, 2013, 仙台国際センター (宮城県)
2. ○今野博行, 異常アミノ酸含有ペプチドのデザインと疾患関連蛋白質阻害剤の創製, 日本農芸化学会フロンティアシンポジウム, 2013年3月28日 (秋湯クレセントホテル (宮城県))
3. ○菊池真理, 今野博行, 異常アミノ酸含有直鎖ペプチド callipeltin M の固相全合成, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 25 日, 東北大学川内キャンパス (宮城県)
4. ○武田祥, 菊池真理, 米田翔, 今野博行, 抗 HIV 活性を有する phomophymine A の合成研究: 異常アミノ酸部の合成, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 25 日, 東北大学川内キャンパス (宮城県)
5. ○菊池真理, 野坂和人, 赤路健一, 今野博行, Callipeltin E の固相全合成, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都女子大学 (京都府)
6. ○米田翔, 菊池真理, 武田祥, 今野博行, 抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチド類の全合成研究, 日本農芸化学会東北支部会, 2012 年 10 月 6 日, 弘前大学農学生命科学部 (青森県)
7. ○菊池真理, 今野博行, Structure activity relationship study of callipeltin B for the cytotoxic activity, 第 49 回ペプチド討論, 2012 年 11 月 7 日, 鹿児島県民会館 (鹿児島県)
8. ○菊池真理, 今野博行, callipeltin B の全合成研究, 第 28 回若手研究者の仙台セミナー, 2012 年 12 月 1 日, 東北大学薬学部

- (宮城県)
9. ○Kikuchi, M.; Watanabe, Y.; Tanaka, M.; Akaji, K.; Konno, H. Synthetic study of callipeltin B analogues and its cytotoxicity. 32nd European Peptide Symposium. September 4, 2012, Megaron Athens International Conference Centre (Athens, Greece) *J. Pep. Sci.* **2012**, *18*, S368.
 10. ○菊池真理, 米田翔, 赤路健一, 今野博行, Callipeltin B の全合成研究: モデルペプチドの環化反応, 日本農芸化学会, 2011年3月26日, 京都女子大学(京都府)
 11. ○菊池真理, 渡辺善久, 田中雅樹, 赤路健一, 今野博行, Synthetic study of the depsipeptides analogues of callipeltin B and its cytotoxicity, 第48回ペプチド討論会, 2011年9月28日, 札幌コンベンションセンター(北海道)
 12. ○今野博行, 天然物を範とする疾患関連蛋白質阻害剤の創成研究, 日本農芸化学会東北支部, 2011年10月8日, 山形大学農学部(山形県) **奨励賞**
 13. ○Konno, H.; Kikuchi, M.; Maita, K.; Nosaka, K.; Akaji, K.; Synthetic Study of Callipeltin A, An Anti-HIV cyclodepsipeptide isolated from Marine Sponge. Int. Peptide Symposium (IPS5), December 6, 2010, 京都国際会館(京都府)
 14. 今野博行, ○菊池真理, 野坂和人, 赤路健一, Callipeltin B の全合成研究: pyrodiMeGln-D-alloThr(N-MeAla)-OH の合成, 日本農芸化学会, 2010年3月28日, 東京大学駒場キャンパス(東京都)
 15. 今野博行, ○菊池真理, 米田翔, 高塚由美子, 野坂和人, 赤路健一, 抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチドの全合成研究, 第43回若手ペプチド夏の勉強会., 2010年8月5日, ウェルネスパーク五色(兵庫県) **ポスター賞**
 16. 今野博行, ○高沼大樹, 千葉裕己, 相本三郎, Steven O. Smith, 赤路健一, CCR5 阻害剤 TAK779 の ¹³C ラベル体合成, 日本農芸化学会東北北海道合同支部, 2010年9月28日, 東北大学農学部(宮城県)
 17. ○今野博行, 疾患関連蛋白質を標的とした阻害剤の創成研究, 第14回山形大学大学院理工学研究科セミナー, 2010年8月31日, 山形大学工学部(山形県)
 18. 今野博行, ○米田翔, 菊池真理, 野坂和人, 赤路健一, 抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチド類の全合成研究: β-MeOTyr, β-MeOThr およびアミノヘプタノール誘導体の合成研究, 日本農芸化学会東北北海道合同支部会, 2010年9月27日, 東北大学農学部(宮城県)
 19. ○今野博行, 野坂和人, 赤路健一, 環状デプシペプチド callipeltin B の固相全合

- 成研究, 日本薬学会年会, 2009年3月27日, 京都国際会館(京都府)
20. ○今野博行, 異常アミノ酸含有天然物の合成と機能性分子創成への展開, 第46回ペプチド討論会, 2009年11月6日, 北九州市国際会議場(福岡県) **奨励賞**

[図書] (計2件)

1. 今野博行, 海綿から単離された異常アミノ酸含有ペプチドの合成, **2012**, pp. 106-110, 遺伝子医学 MOOK21 号—最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用—, メディカルドゥ(編集)木曾良明.
2. 今野博行, 第9章アレイ系, **2010**, pp273-279. コンビナトリアル・バイオエンジニアリング(普及版), CMC 出版(監修)植田充美.

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioorg.yz.yamagata-u.ac.jp>

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・准教授

研究者番号: 50325247