

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15216

研究課題名(和文) 穏和なアミノビニルシステイン構築を鍵とするチオアミド含有環状ペプチド中分子の合成

研究課題名(英文) Synthetic studies for thioamide-bearing cyclopeptide Neothioviridamide

研究代表者

大澤 宏祐 (Ohsawa, Kosuke)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20774417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：リボソーム上で合成された前駆体ペプチドが翻訳後修飾を受けて産生される中分子ペプチド性天然物ネオチオビリダミドの全合成について検討した。天然物中の水酸基を1つ除いたデオキシ体をモデル基質に設定し、光反応による低温条件下での酸化的脱炭酸および生じたラジカル種のセレノエーテルによる捕捉を見出すことで、環状ペプチド骨格内に含まれる(2-アミノビニル)-3-メチルシステイン構造の合成終盤での構築に初めて成功した。別途合成した鎖状チオペプチドフラグメントを活性チオノエステルとすることで、中性条件下で環状ペプチド部と収束的に連結し、デオキシ体の初の全合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光反応を用いた低温条件下での(2-アミノビニル)-3-メチルシステイン構造の構築法を開発し、アミノビニルシステイン構造を有する環状ペプチド天然物の初の全合成を達成した。従来法のような高温条件や酸化剤を必要としないため官能基共存性が高く、合成終盤の複雑な基質に対しても適用可能なことから、他の生物活性ペプチド天然物への展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Synthetic studies for ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide, neothioviridamide, were investigated. Deoxy analogue of natural product was designed as a model substrate to establish the synthetic route. Formation of (2-aminovinyl)-3-methylcysteine substructure was efficiently performed via oxidative decarboxylation, followed by capture of the resulting radical species by a selenoether. Our developed methodology was applicable to the ionic amino acid-bearing cyclopeptide in the late-stage of the synthesis. Coupling of the cyclopeptide moiety and with the thiopeptide-rich fragment was conducted via an activated thionoester under neutral conditions, and first total synthesis of deoxy-neothioviridamide was achieved.

研究分野：薬系化学

キーワード：全合成 天然物 環状ペプチド チオペプチド (2-アミノビニル)-3-メチルシステイン 光反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボソームで合成された前駆体ペプチドが翻訳後修飾を受けて産生されるペプチド性天然物 (RiPP) は、特異な生物活性や遺伝子工学による構造多様性の点で、天然由来の創薬シードとして近年注目されている。一方、ゲノム解析技術が進歩した現代でも、多数の酵素が関連する翻訳後修飾は不明な点が多く、生合成機構の解明には「天然物の化学合成経路の確立と推定される生合成中間体の供給」が不可欠である。

ネオチオリダミド (Fig. 1) は、放線菌中の遺伝子を利用した異種発現で産生された RiPP の一つであり、種々のがん細胞に細胞毒性を示す (Kawahara T. et al. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 264)。翻訳後修飾により構築される「ピルピル基」「連続するチオアミド基」「 β -ヒドロキシ-*N,N*-ジメチルヒスチジニウム (hdmHis)」「[(*Z*)-2-アミノビニル]-3-メチルシステイン (aviMeCys)」といった特有の構造は、構造決定のための酸加水分解条件でエピメリ化や分解を生じることから、平面構造しか決定されていない。天然からの単離量も僅かであり、絶対配置の決定や生合成機構の解明には有機合成化学による立体選択的な供給が必須である。

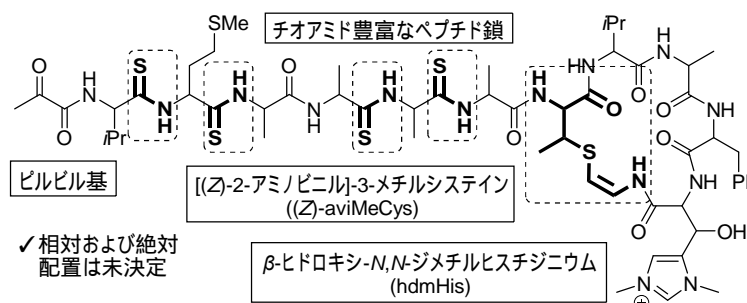


Fig. 1 Chemical structure of neothioviridamide.

一方、イオン性アミノ酸やルイス塩基性の高いチオアミド基を複数もつチオリダミド系天然物は、反応溶媒への低溶解性が懸念されることから合成難易度が高く、部分構造ですら合成例が報告されていない。さらに、環状ペプチド骨格への (*Z*)-aviMeCys の導入法についても、従来法では反応条件が過酷なため、合成序盤の基質でさえ低収率に留まっている (Carrillo, A. K. et al. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1034)。したがって、複数の不安定な構造を共存させつつ高極性な中分子ペプチド天然物を組み上げる合成方法論の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

以下に示すネオチオリダミドの合成的課題を解決しつつ世界初の全合成を達成し、構造決定や生合成機構の解明への展開に向けた合成経路の確立を目的とする。

- (1) 合成終盤でも適用可能な、官能基共存性の高い aviMeCys の構築法を開発する。
- (2) 極性官能基を多数有するネオチオリダミドの合成経路を確立し、天然物の相対および絶対配置を決定する。

3. 研究の方法

酸化的脱炭酸反応によるカルボン酸から脱離基への変換を鍵として、続く穏和な条件下での β -水素脱離により、aviMeCys に含まれる二重結合の構築を行う。高温条件や強力な酸化剤を用いず酸化的脱炭酸反応を進行させるため、光照射によるカルボン酸あるいはその誘導体の活性化と生じたラジカル種の捕捉を検討する。

また、高極性化合物の取り扱いに向けて、環状ペプチド部と鎖状チオペプチド部を連結する収束的な合成を行う。酸性度の高いチオアミド α 位のエピメリ化を回避したフラグメント同士の縮合条件を検討する。

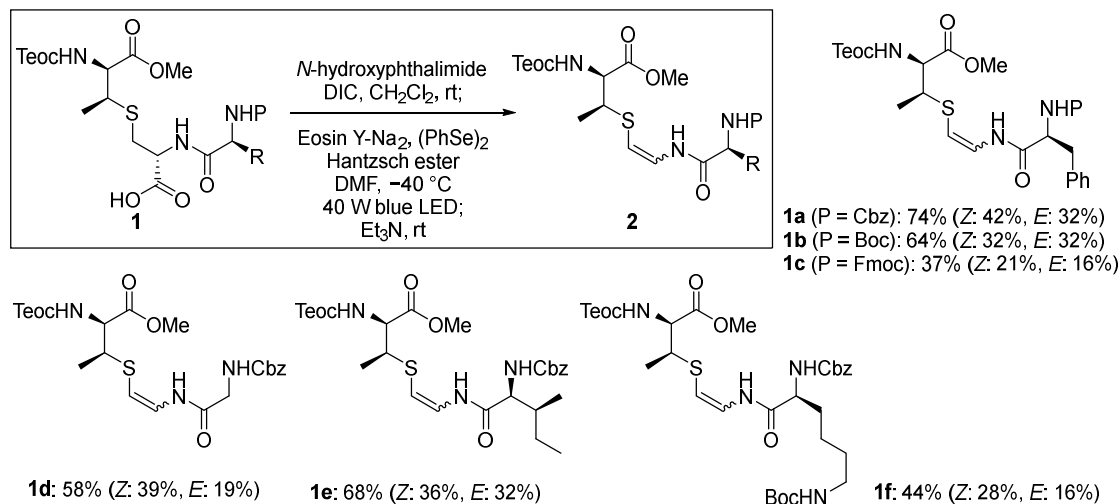
4. 研究成果

- (1) 酸化的脱炭酸を起点とする aviMeCys 構築法の開発

ランチオン構造を有するトリペプチド **1a** をモデル基質とし、aviMeCys 構造の構築を検討した。反応条件を精査した結果、カルボン酸を *N*-ヒドロキシフタルイミドエステルとして活性化させた後、40 W blue LED 照射下 1 mol% の Eosin Y- Na_2 および Hantzsch ester を作用させることで、 -40°C の低温条件下で酸化的脱炭酸反応が進行することが見出した。この際、系中で発生したラジカル種の補足には $(\text{PhSe})_2$ が有用であり、生じたセレノエーテル中間体を NEt_3 で処理することで β -水素脱離が容易に進行し、所望の **2a** を得ることに成功した (Scheme 1)。一連の反応は one-pot で行うことができ、不安定な活性中間体を取り出すことなく、生成物を中程度から良好な収率で与えた。一方、非環状ペプチドを基質とした場合、生成物の *E/Z* 選択性はほとんど発現

しないことがわかった。本反応の官能基共存性は高く、ペプチド合成で汎用されるカルバマート系保護基も共存可能であった。興味深いことに、光触媒である Eosin Y- Na_2 非存在下でも酸化的脱炭酸反応が進行したことから、*N*-ヒドロキシフタルイミドエステルと Hantzsch ester との間で EDA 複合体を形成することが示唆された。

Scheme 1. Formation of aviMeCys peptides **2** via photocatalyzed oxidative decarboxylation of **1**.



(2) デオキシネオチオピリダミドの収束的全合成

確立した aviMeCys 構築法の天然物合成への有用性を調べるため、hdmHis を *N,N*-ジメチルヒスチジニウムに簡素化したデオキシネオチオピリダミド (Fig. 2) をモデル基質に設定し、合成経路の確立を行った。報告されている aviMeCys 含有ペプチド天然物を参考に、aviMeCys 部位の立体化学は *D* 体、その他のアミノ酸は *L* 体であると推定した。はじめに、収束的合成に向けたフラグメント同士の連結位置を検討した。研究開始当初、アミドと比較して α 位の酸性度が高く、活性化エステルとした際にエピメリ化が懸念されるチオアミド部位での連結を避けるため、アラニンとランチオニンとの間での連結を計画していた (Fig. 2, (a) の位置)。

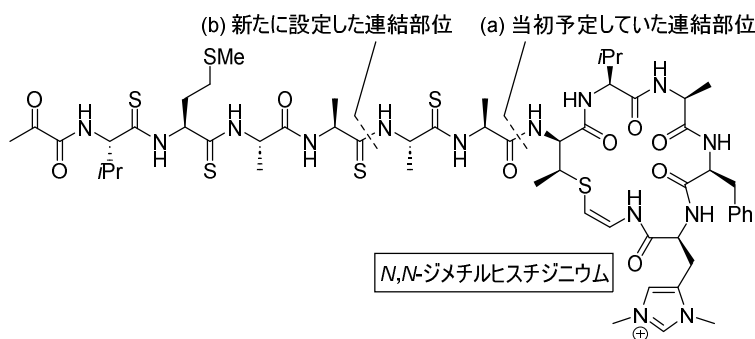
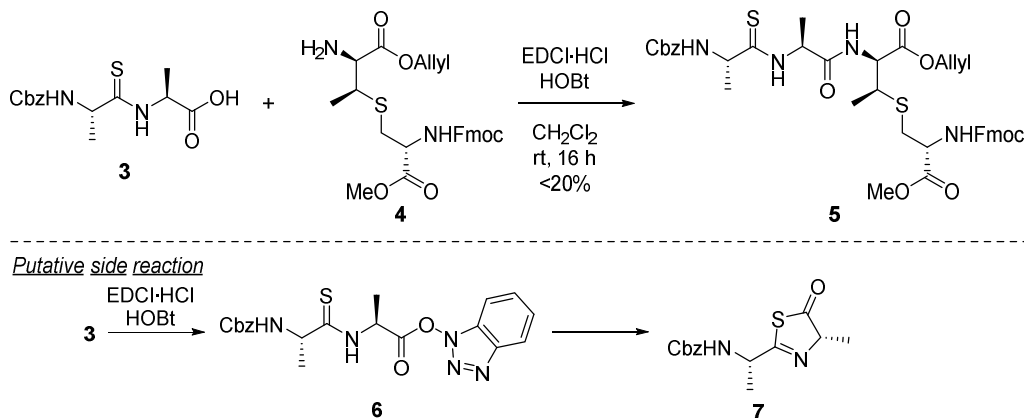


Fig. 2 Chemical structure of deoxyneothioviridamide.

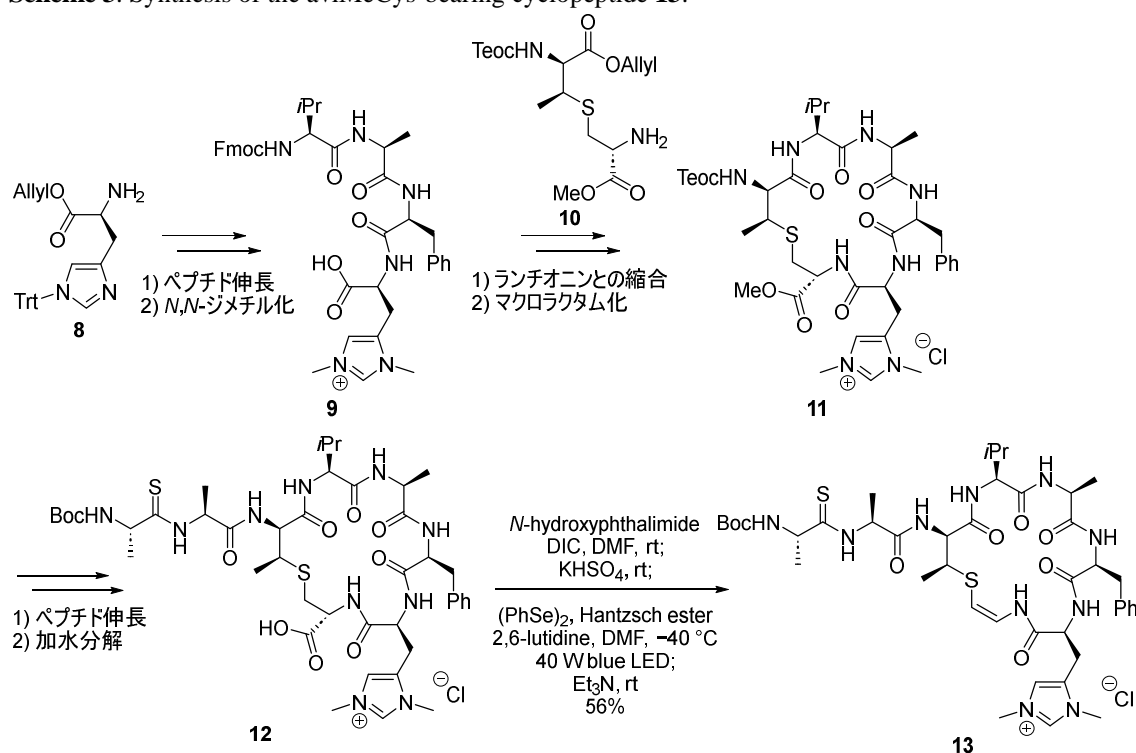
しかし、チオアミドを含むジペプチド **3** とランチオニン **4** を用いて縮合条件の最適化を試みたが、所望の **5** は低収率に留まることがわかった (Scheme 2)。チオアミド硫黄の求核性のため、系中で生じた活性化エステル **6** から 5 員環のチアズラクトン **7** の形成が優先したためだと考察している。

Scheme 2. Initial attempts for the convergent synthesis using the thioamide-bearing dipeptide **3** and the lanthionine **4**.



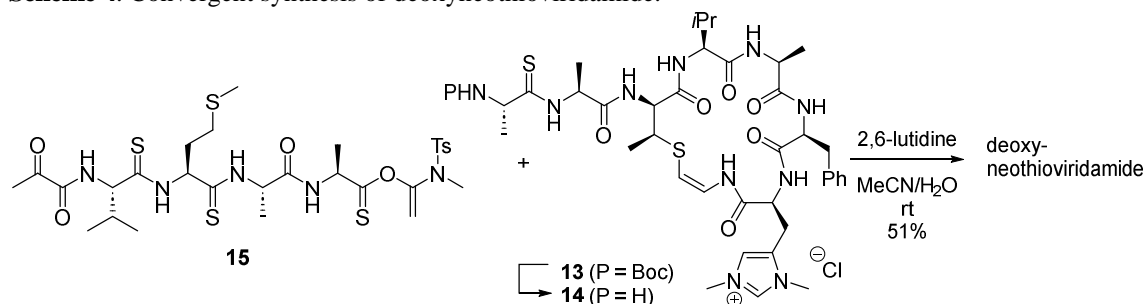
そこで、チアズラクトン形成を回避するため、鎖状ペプチド部の C 末端から 2 残基目がチオアラニンではなくアラニンとなる位置を新たな連結位置に設定した(Fig. 2, (b)の位置)。H-His(Trt)-OAllyl (8) に対して、構成アミノ酸の縮合およびヒスチジン残基の側鎖イミダゾールの *N,N*-ジメチル化を行い、テトラペプチド 9 を得た。次に、ランチオン 10 との縮合およびマクロラクタム化による 19 員環構築を経て、環状ペプチド 11 へ導いた。アラニンおよびチオアラニンを順次縮合した後、メチルエステルの加水分解を行い、鍵反応前駆体であるカルボン酸 12 とした。検討の過程で、環化反応および以降のペプチド伸長においてイオン性アミノ酸残基の対アニオンにより化合物の物性が変化し、反応の再現性に乏しいことがわかった。そこで、反応終了後の生成物を陰イオン交換樹脂で処理することで対アニオンを Cl に統一し、再現良く 11 および 12 が得られることを見出した。続いて、酸化脱炭酸反応を経由した aviMeCys の構築を行ったところ、確立した反応条件を最適化することで、収率 56% で望む 13 を得ることに成功した(Scheme 3)。鎖状ペプチド 1 を用いた検討で得られた aviMeCys 体 2 はいずれも *E/Z* 混合物であったが、環状ペプチド 12 を用いた場合には環状構造に由来する立体配座の制約により *Z* 体選択的に 13 を与えることがわかった。イオン性アミノ酸、チオアミドおよびランチオン構造が密集した複雑な構造を有する環状ペプチドにも適用でき、本手法の有用性を示せたといえる。

Scheme 3. Synthesis of the aviMeCys-bearing cyclopeptide 13.



得られた 13 の Boc 基を除去し 14 とした後、別途合成した活性チオノエステル 15 との縮合を行い、デオキシネオチオピリダミドの収束的全合成を達成した(Scheme 4)。デオキシネオチオピリダミドも RiPP の一つとして近年報告されており(Hu, L. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 4431)、アミノビニルシステイン構造を有する環状ペプチド天然物の化学合成経路を初めて確立することに成功した。現在、天然物の構造決定に向けて、合成したデオキシネオチオピリダミドの NMR 解析を行っている。

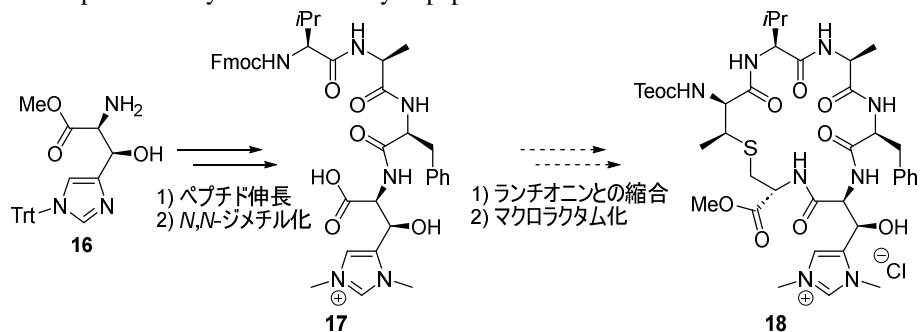
Scheme 4. Convergent synthesis of deoxyneothioviridamide.



(3) ネオチオビリダミドの合成研究

確立したデオキシネオチオビリダミドの合成経路を基に、ネオチオビリダミドの全合成を検討した。Evans アルドール反応を経て立体選択的に合成した **16** に対して、同様にペプチド伸長および *N,N*-ジメチル化を行い、テトラペプチド **17** とした。続いて、ランチオニンとの縮合およびマクロラクタム化を試みたが、無保護のアリール位水酸基の β -脱離に伴う副反応が進行し、所望の **18** を再現良く得ることはできなかった(Scheme 5)。現在、水酸基の適切な保護について検討している。

Scheme 5. Attempts for the synthesis of the cyclopeptide **18**.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kumashiro Masaya, Ohsawa Kosuke, Doi Takayuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Photocatalyzed Oxidative Decarboxylation Forming Aminovinylcysteine Containing Peptides | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Catalysts | 6. 最初と最後の頁 1615 ~ 1615 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/catal12121615 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 神代格也、大澤宏祐、土井隆行 |
| 2. 発表標題 フォトレドックス反応を用いた新規AviMeCys構築法の開発 |
| 3. 学会等名 第121回有機合成シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神代 格也、大澤 宏祐、新家 一男、土井 隆行 |
| 2. 発表標題 Neothioviridamide の合成研究 (5) |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神代格也、大澤宏祐、越阪部佑太、新家一男、土井隆行 |
| 2. 発表標題 Neothioviridamide の合成研究 (4) |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神代格也、大澤宏祐、越阪部佑太、矢本啓輔、新家一男、吉田将人、土井隆行 |
| 2. 発表標題 Neothioviridamideの合成研究 |
| 3. 学会等名 第118回有機合成シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 神代格也、大澤宏祐、土井隆行 |
| 2. 発表標題 光反応を用いたAviMeCys構築法の開発 |
| 3. 学会等名 第52回複素環化学討論会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神代格也、大澤宏祐、新家一男、土井隆行 |
| 2. 発表標題 チオアミド含有ペプチド Deoxyneothioviridamide の合成研究 |
| 3. 学会等名 第66回天然有機化合物討論会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masaya Kumashiro, Kosuke Ohsawa, Takayuki Doi |
| 2. 発表標題 Development of S-[2-Aminovinyl]-3-methylcystein Construction Using Photoreaction |
| 3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Digitalization-driven Transformative Organic Synthesis (ISDigiTOS-2) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masaya Kumashiro, Kosuke Ohsawa, Takayuki Doi |
| 2. 発表標題 Development of S-[2-aminovinyl]-3-methylcysteine construction using photoreaction |
| 3. 学会等名 The 60th Japanese Peptide Symposium |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大澤宏祐 |
| 2. 発表標題 特殊アミノ酸の拡散的合成ならびに生物活性環状ペプチド天然物の合成研究 |
| 3. 学会等名 第44回東北薬学セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大澤宏祐 |
| 2. 発表標題 中分子天然物の全合成を基盤とする構造決定や作用機序解明 |
| 3. 学会等名 第20回化学系若手研究者セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 大澤宏祐 |
| 2. 発表標題 奇抜な構造をもつ 生物活性ペプチド天然物の合成研究 |
| 3. 学会等名 第54回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|