

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310145

研究課題名(和文) 生物活性天然環状デブシペプチドを基軸とするペプチドミメティクスの創製

研究課題名(英文) Synthesis of biologically active natural product cyclodepsipeptides and their analogues

研究代表者

土井 隆行 (DOI, TAKAYUKI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90212076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：特異な生物活性をもつ天然物環状デブシペプチドを主軸として全合成手法の開発、類縁体合成、ミメティクスの設計と合成、および分子プローブ合成研究を行った。具体的には アプラトキシンAのペプチドミメティクスを創製した。また、アプラトキシンCの全合成に成功した。水溶性をもつテロメスタチン類縁体の合成に成功し、天然物と同等のテロメラーゼ阻害活性をもつ化合物を創製した。デストラキシンE類縁体のコンビナトリアル合成を行い、構造活性相関を明らかにした。ボーベリオライドIIIのペプチドミメティクスを合成し、さらに光親和性プローブの合成を行なった。

研究成果の概要(英文)：Cyclodepsipeptide natural products include optically active hydroxy acids as well as various unnatural amino acids and exhibit a variety of biological activity depending on the peptide sequence, chirality, and selection of the hydroxy acids. We have demonstrated (1) design and synthesis of peptide mimetics of apratoxin A and total synthesis of apratoxin C, (2) synthesis of water soluble telomestatin analogues that is as potent as telomestatin in telomerase inhibitory activity, (3) combinatorial synthesis of destruxin E analogues and their SAR study, (4) design and synthesis of peptide mimetics of beauveriolide III and synthesis of photoaffinity probes of beauveriolide III.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物活性分子の合成 環状デブシペプチド ペプチドミメティクス 生物活性天然物 固相合成 非天然型アミノ酸 マクロラクタム化

### 1. 研究開始当初の背景

天然から数多くの環状デプシペプチドがこれまでに単離・構造決定されている。これらはペプチド残基および不斉中心を複数有する脂肪酸等からなるため多様な構造を有しており、多彩な生物活性を示すばかりか、特異的に高い生物活性を示すものがある。これまで長年にわたり天然物をヒントにした創薬研究が展開されたきたが、近年では複雑な構造のため開発研究が敬遠されてきている。米国の大手製薬会社を中心に、より単純な複素環を基にしたコンビナトリアルライブラリー構築に力が注がれたものの臨床開発に進む化合物の数は年々減少しており、このような単純な化合物群では十分な化合物スペースを確保できないと考えられている[J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003, 43, 218], そこで、再び多様性をもつ天然物の骨格が重要視されている[J. Med. Chem. 2008, 51, 2589; Nat. Prod. Rep. 2008, 25, 475]。ごく最近では、海洋性天然物ハリコンドリンをもとに最適化された E7389 が複雑な構造をもつ化合物ながら創薬開発に結びついたことについて、世界中に大きなインパクトを与えている。しかし、天然物そのものを創薬に結びつけるために、活性面、物性面の性質、および供給方法のすべてを最適化することはとても難しい[Science, 2009, 325, 161]。そこで天然物をモチーフに活性に必用な部位を抽出してミメティクスを創製する技術をシステム化することができれば、創薬開発基盤技術として非常に有用であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では特異な生物活性をもつ天然物環状デプシペプチドを主として類縁体を効率よく合成できる全合成手法の開発、類縁体合成を基にした構造活性相関研究、活性発現情報を活用したミメティクスの設計と合成、および活性に関与しない部位を用いた分子プローブ合成を行い、それらを統合して創薬化学の基盤技術とすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

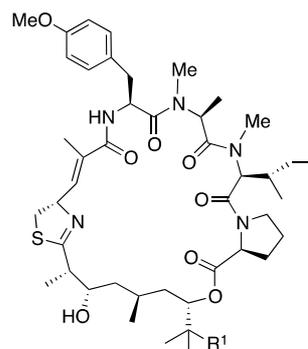
(1)アプラトキシンAのペプチドミメティクス創製：これまでの研究で得られた構造活性相関の情報をもとにアプラトキシンAのペプチドミメティクスを設計・合成する。(2)水溶性をもつテロメスタチン類縁体の合成とテロメア G-quadruplex 構造との結合様式の解明：テロメスタチンについて水溶性が高く、テロメアとより強固に結合する化合物を設計・合成する。(3)デストラキシニンE類縁体の合成、構造活性相関、分子プローブ合成による標的化合物の探索：デストラキシニンEについて固相合成法を用いて誘導体を合成し、構造活性相関を明らかにすると共に、分子プローブを迅速に合成し、標的化合物探索に展開する。(4)ボーベリオライド III のペプチドミメティクスの高機能化：ボーベリオライ

ドIIIについて環状デプシペプチド構造から6員環、およびピシクロ環化合物にミメティクス展開し、サブタイプ選択的 ACAT 阻害剤の開発を行う。

### 4. 研究成果

(1)アプラトキシンAのペプチドミメティクス創製：アプラトキシンAは25員環デプシペプチドで、ガン細胞に対する極めて高い細胞毒性をもつ。我々はすでに収束的な合成ルートによる全合成を達成している。アプラトキシンAの脂肪鎖に含まれる4つの不斉中心炭素を立体選択的に構築してヒドロキシカルボン酸部位を合成した。N-末端とプロリンと縮合し、共通の合成中間体とした。C-末端にはチアゾリン導入のための修飾システインを縮合し、続いてメタ位、およびパラ位で連結したヘテロ環含有アミノ酸を導入した。また、チアゾリンの代替としてフェニルエーテル含有アミノ酸と縮合した。すべての環化前駆体についてプロリンのN-末端でのマクロラクタム化を行い、計9種類のアプラトキシンA ミメティクスの合成に成功した。

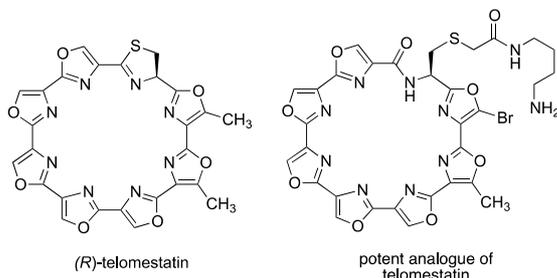
また、アプラトキシンAと構造が類似しているアプラトキシンCの全合成に成功した。この際、チアゾールの位のエピ化が縮合条件で起こることを明らかにし、その反応条件を精査した。また、本手法を用いてチロシン残基を別のアミノ酸で置き換えた類縁体3種類の合成を達成した。これらの癌細胞に対する細胞毒性を評価し、O-メチルチロシン残基が活性発現に関与していることを明らかにした。



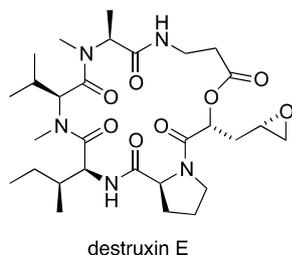
apratoxin A (R<sup>1</sup> = Me)  
apratoxin C (R<sup>1</sup> = H)

(2)水溶性をもつテロメスタチン類縁体の合成：天然物が難溶性である問題を解決するためメチルオキサゾールの代わりにプロモオキサゾールを、チアゾリン環の前駆体であるシステイン残基の硫黄原子を利用してS-アルキル化を経てアミノアルキル基を導入したテロメスタチンアナログを合成する手法を確立した。またプロモオキサゾールを利用して鈴木カップリングを行い、6種の芳香族置換体の合成に成功した。これらのテロメラゼ阻害活性は芳香族置換基によりほとんど影響を受けなかったが、アミノアルキル基置換体は、アルキル鎖の長さに依存して活

性が向上し、天然物と同等の活性をもつものを見出した。アミノアルキル基を導入することで水溶性は向上し、取り扱いが容易になったことから、有用な化合物と考えている。



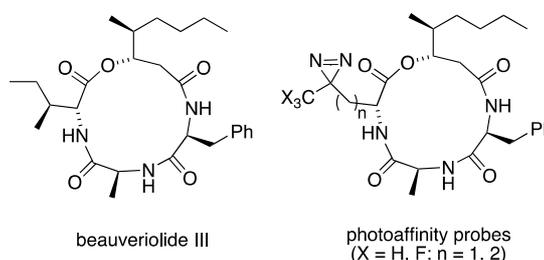
(3) デストラキシン E 類縁体の合成、構造活性相関、分子プローブ合成：デストラキシン E の類縁体について、Ile, MeVal, MeAla の三つの残基について  $3 \times 3 \times 2$  の計 18 種類からなる類縁体のコンビナトリアル合成を達成した。破骨細胞の収縮作用について評価を行った結果、MeAla 構造が活性発現に必要であることを見出した。また合成中間体の X 線結晶構造解析に成功し、結晶中の構造を明らかにしている。これにより MeVal-MeAla 間のアミド結合が *s-cis* をとった  $\beta$ -ターン構造をもつことがわかった。また、上記の三残基をアジド基に置換したリシン、および N-メチルリシンに置き換えたデストラキシン E 類縁体を合成した。それらの活性評価を行なったところ破骨細胞抑制効果を示したものの、その効果は天然物の 1/100 であり、標的化合物探索のためには、さらなるアナログ合成が必要であることがわかった。



(4) ポーベリオライド III のペプチドミメティクスの高機能化：ポーベリオライド III は 13 員環デプシペプチドであり、ACAT を阻害することでマクロファージの泡沫化を抑制する。我々はすでに類縁体のライブラリー合成を行い、生物活性の発現にはペプチド側鎖の空間配置が重要であることを明らかにしている。しかし、標的である ACAT は膜タンパク質で三次元構造は不明であるため、タンパク質の構造からの阻害剤設計は難しい。そこで、天然物の構造をモチーフに 6 員環およびピシクロ環上にポーベリオライド III のペプチド側鎖と類似の空間配置をとりうるように置換基を配置した化合物を設計し、固相合成によりそれらミメティクス類を迅速に合成できる手法の開発研究を行った。固相上にアセタールリンカーを介し、アミン、 $\alpha$ -アルキル- $\beta$ -アミノ酸、D-アミノ酸を順次縮

合した。固相から切り出し、分子内環化を行い、ミメティクスを合成する手法を確立した。本手法を用いて 10 種類のミメティクスを合成し、細胞レベルで天然物の 1/10 の生物活性を示すことを明らかにした。その結果、環状デプシペプチド天然物をヘテロ環含有化合物を用いてミミックできることを示した。

また、フォトアフィニティラベル基として働くジアジリンを含むアミノ酸を効率よく合成する方法を開発し、バリンおよびロイシンに相当する中性アミノ酸 4 種を合成した。これらをポーベリオライドの D-allo-イソロイシンの代替として組み込んだアナログを合成することに成功した。さらにこれらのアナログは天然物と同等の ACAT 阻害活性をもつことを明らかにした。今後、光親和標識剤として使い、ACAT との結合部位の解明に利用できると考えている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

M. Yoshida, H. Sato, Y. Ishida, H. Nakagawa, T. Doi, Scalable Solution-Phase Synthesis of the Biologically Active Cyclodepsipeptide Destruxin E, a Potent Negative Regulator of Osteoclast Morphology, *J. Org. Chem.* **2014**, 79(1), 296-306. 査読有, DOI:10.1021/jo402437z

T. Doi, M. Yoshida, K. Ohsawa, K. Shin-ya, M. Takagi, Y. Uekusa, T. Yamaguchi, K. Kato, T. Hirokawa, T. Natsume, Total Synthesis and Characterization of Thielocin B1 as a Protein-Protein Interaction Inhibitor of PAC3 Homodimer, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1860-1868. 査読有, DOI: 10.1039/c3sc53237b

K. Shibata, M. Yoshida, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Doi, Synthesis of Hepta-oxazole Macrocyclic Analogues of Telomestatin and Evaluation of Their Telomerase Inhibitory Activities, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2013**, 86(12), 1453-1465. 査読有, DOI: 10.1246/bcsj.20130198

S. Fuse, K. Inaba, M. Takagi, M. Tanaka, T. Hirokawa, K. Johmoto, H. Uekusa, K. Shin-ya, T. Takahashi, T. Doi, Design and synthesis of 2-phenyl-1,4-dioxaspiro [4.5]deca-6,9-dien-8-ones as potential anticancer agents starting from cytotoxic spiromamakone A, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**,

66, 180-184. 査読有, DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.05.030

K. Ohsawa, M. Yoshida, T. Doi, A Direct and Mild Formylation Method for Substituted Benzenes Utilizing Dichloromethyl Methyl Ether - Silver Trifluoromethanesulfonate, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*(7), 3438-3444. 査読有, DOI: 10.1021/jo400056k

H. Kobayashi, H. Harada, M. Nakamura, Y. Futamura, A. Ito, M. Yoshida, S. Iemura, K. Shin-ya, T. Doi, T. Takahashi, T. Natsume, M. Imoto, Y. Sakakibara, Comprehensive Predictions of Target Proteins Based on Protein-Chemical Interaction Using Virtual Screening and Experimental Verifications, *BMC Chem. Biol.* **2012**, *12*(2), DOI: 10.1186/1472-6769-12-2. 査読有

T. Doi, K. Oikawa, J. Suzuki, M. Yoshida, N. Iki, Development of a Near Infrared Fluorescence Labeling Reagent: Synthesis of Indole-Functionalized Indocyanine Green Derivatives, *Synlett* **2012**, (2), 306-310. 査読有, DOI: 10.1055/s-0031-1290139

T. Doi, T. Muraoka, D. Ohshiro, D. Matsuda, M. Yoshida, T. Takahashi, S. Omura, H. Tomoda, Conformationally Restricted Analog and Biotin-Labeled Probe Based on Beauveriolide III, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*(1), 696-699. 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.10.045

I. Kozone, M. Izumikawa, K. Motohashi, A. Nagai, M. Yoshida, T. Doi, M. Takagi, K. Shin-ya, Isolation of New Hexapeptides -JBIR-39 and JBIR-40- from a Marine Sponge-Derived *Streptomyces* sp. Sp080513SC-24, *J. Marine Sci. Res. Development* **2011**, *1*(1), 1000101. 査読有, <http://www.omicsonline.org/2155-9910/2155-9910-1-101.php>

S. Fuse, K. Okada, Y. Iijima, A. Munakata, K. Machida, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Doi, Total synthesis of spiruchostatin B aided by an automated synthesizer, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*(10), 3825-3833. 査読有, DOI: 10.1039/c0ob01169j

〔学会発表〕(計6件)

Takayuki Doi, Solid-phase Total Synthesis of Spiruchostatin A, International Symposium on Integrated Synthesis 8, November 29 - December 1, 2013, Nara.

吉田将人, 石田恵崇, 佐藤寛, 竹内久征, 村瀬隼人, 中川大, 土井隆行, 骨吸収抑制作用を有するデストラキシンEの全合成と構造活性相関研究, 第39回反応と合成の進歩シ

ンポジウム, 平成25年11月5日~6日, 福岡

土井隆行, 天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ, 日本薬学会第133年会, 平成25年3月27日~30日, 神奈川

吉田将人, 石田恵崇, 竹内久征, 中川大, 八代田陽子, 吉田稔, 高木基樹, 新家一男, 土井隆行, デストラキシンEおよびその誘導体の全合成と生物活性評価, 第49回ペプチド討論会プログラム, 平成24年11月7日~9日, 鹿児島

Masahito Yoshida, Yoshitaka Ishida, Hisayuki Takeuchi, Yoko Yashiroda, Minoru Yoshida, Hiroshi Nakagawa, Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya, Takayuki Doi, Total Synthesis of Cyclodepsipeptide Destruxin E and its Derivatives as a Potent V-ATPase Inhibitor, AIMECS11, November 29 ~ December 2, 2011, Tokyo

吉田将人, 大澤宏祐, 高木基樹, 広川貴次, 植草義徳, 加藤晃一, 新家一男, 夏目徹, 土井隆行, タンパク質間相互作用阻害活性を示す Thielocin B1 の全合成と相互作用解析, 第53回天然有機化合物討論会, 平成23年9月27日~29日, 大阪

〔図書〕(1件)

土井隆行, 「生物活性天然有機化合物環状デプシペプチド(-)アプラトキシンAの全合成, 固相合成, 類縁体合成」, 遺伝子医学MOOK21 最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用, 木曾良明・向井秀仁編, メディカルドゥ, 2012, 118-124頁.

〔産業財産権〕

出願状況(0件)

取得状況(0件)

〔その他〕

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~hannou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 隆行 (DOI, TAKAYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 90212076