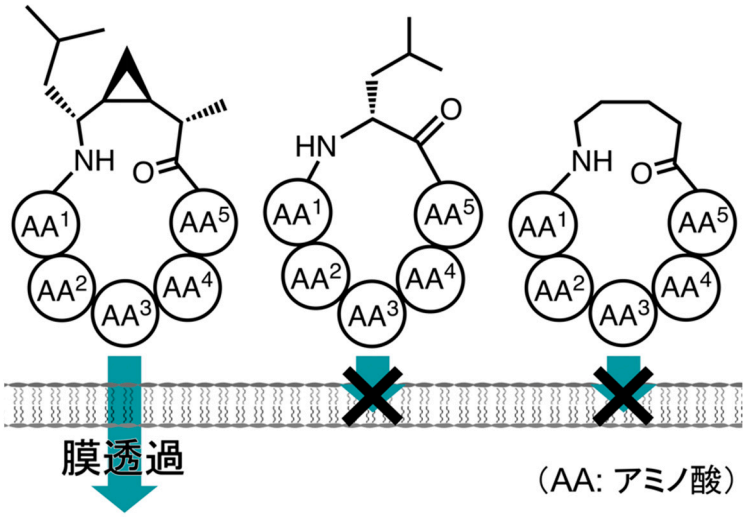
128　配座制御を基盤とした機能性オリゴペプチドの創出	渡邉　瑞貴

【目的】タンパク質間相互作用は、生体の恒常性維持において重要かつ様々な役割を担う。この相互作用を制御できる分子は、生物医学研究のツールや新たな医薬シーズとなりうる。実際に、特定のタンパク質間相互作用を阻害するバイオ医薬（例：抗体）が臨床応用され、その治療効果は高い。しかし、高い生産コスト、高分子量（>10,000）による免疫毒性、また、標的が細胞膜表面に限定的といった課題もある。これらバイオ医薬を補完しうる、より低コストで細胞内のタンパク質間相互作用も標的可能な合成小〜中分子が求められている。タンパク質間相互作用の制御分子として、相互作用面の hot-spot を形成するアミノ酸残基や配列を模倣し、多点間分子認識を可能とする機能性オリゴペプチド（およびその等価体）は有効であると考えられる。そこで本研究では、細胞内タンパク質間相互作用を標的可能な機能性オリゴペプチドの創出を目指した。

【方法】シクロプロパンの構造特性によって立体化学依存的にその配座が厳密に制御される光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸が、ペプチド分子全体の配座制御素子として利用できると考えた。特定の立体化学を有したこのアミノ酸誘導体を導入した環状ペプチドやオリゴペプチドを設計・合成し、その三次元構造を NMR や X 線回折を用いて解析した。また、合成した各種環状ペプチドの膜透過性を評価した。

【結果】まず、光学活性なシクロプロパンδ-アミノ酸モノマーを立体選択的に合成する経路を確立した。合成したδ-アミノ酸モノマーを導入した各種環状ペプチドや、オリゴ化した分子の合成に成功した。合成した環状ペプチドの膜透過性を評価した結果、アミノ酸配列ではなく、導入したδ-アミノ酸の立体化学に依存して膜透過性が大きく変化することが分かった。特に、*cis*-folded 構造に配座が制御されたδ-アミノ酸を含む環状ペプチドの膜透過性が、親ペプチドと比較して飛躍的に向上した。また、オリゴマー化した分子の三次元構造を NMR などで解析した結果、分子設計で期待した通り、ヘリックス構造をとっていることが分かった。

シクロプロパン導入による環状ペプチドの膜透過性の向上



128. 配座制御を基盤とした機能性オリゴペプチドの創出

渡邉　瑞貴

北海道大学 大学院薬学研究院 創薬科学部門 創薬有機化学研究室

Key words : 配座制御，ペプチド，シクロプロパン，膜透過性

緒　言

タンパク質間相互作用は、生体の恒常性維持において重要かつ様々な役割を担う。この相互作用を制御できる分子は、生物医学研究のツールや新たな医薬シーズとなりうる。実際に、特定のタンパク質間相互作用を阻害するバイオ医薬（例 : 抗体）が臨床応用され、その治療効果は高い。しかし、高い生産コスト、高分子量（＞10,000）による免疫毒性、また、標的が細胞膜表面に限定的といった課題もある。これらバイオ医薬を補完しうる、より低コストで細胞内のタンパク質間相互作用も標的可能な合成小〜中分子が求められている。

タンパク質間相互作用面は、比較的扁平かつ広範（800〜2,000 Å^2）なため、小分子（M.W.＜400）でその相互作用を制御するのは容易ではない。一方で、この相互作用は接着面全体での一様な結合ではなく、一定の間隔に配置された一部のアミノ酸残基群（hot-spot）が形成する結合に大きく依存する。すなわち、タンパク質間相互作用の制御には、相互作用面の hot-spot を形成するアミノ酸残基や配列を模倣し、多点間分子認識を可能とする機能性ペプチド（およびその等価体）が有効であると考えられる。そこで本研究では、アミノ酸配列に依存せずに適切な膜透過性と三次元構造を有し、細胞内タンパク質を制御する機能性ペプチド分子の開発を目指した。着目したのは、シクロプロパンの構造特性によって立体化学依存的にその配座が厳密に制御される光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸である。光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸を配座制御素子として用いた環状ペプチドやオリゴマーを設計・合成し、その三次元構造や膜透過性を解析した。その結果、アミノ酸配列に依存せず、分子全体の配座制御に基づいた飛躍的に膜透過性が向上した環状ペプチドや、一定のヘリカル構造をとるオリゴペプチドを得ることができた。

方　法

1.　配座制御を鍵とした分子設計

私たちは以前より、シクロプロパンの構造特性を利用し、小分子リガンドの配座を三次元的に多様に制御する分子設計法を開発してきた［1］。シクロプロパンは化合物の配座をシス形またはトランス形に制限でき、かつ、最小の環構造のため、標的タンパク質と結合する際の立体障害になりにくい。さらに、四員環以上の環構造とは異なり、配座の自由度が全く無い。そのため、シクロプロパン上のシス位置換基はエクリプス配座に固定され、置換基間で強力な立体反発（シクロプロパン歪み）が生じる。この立体的効果により、シクロプロパンに隣接する sp^{3}炭素上の最も小さい置換基が内側に配向する配座が安定になる。すなわち、シクロプロパンと隣接する 2 つの不斉炭素を有する光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸（5-アミノ-2,5-置換-3,4-メタノペンタン酸）の各立体異性体の配座は、シクロプロパンの立体的特性に基づき、その立体化学に依存して厳密に制御される。この高度に配座が制御されたシクロプロパンδ-アミノ酸を環状ペプチドに組み込めば、配列に依存せずにペプチド全体の三次元構造を変えることができ、環状ペプチドの膜透過性を向上させられると考えた。また、このアミノ酸誘導体をオリゴ化すれば、これまでに報告例の無い、δ-アミノ酸を基本ユニットに用いたフォルダマーになりうると考えた。

2. 光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸の合成

設計した光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸のうちの一つ、*cis*-NfCf 型の合成経路を図 1 に示す。一般的なペプチド固相合成法に適用するため、*N*-Fmoc 保護体として合成した。合成の鍵は、4 つの連続する不斉点の構築である。私たちがこれまでに報告した方法［2, 3］に従って光学活性エピクロロヒドリン（**1**）から誘導した光学活性なシス型シクロプロパンアルデヒド **2** を、*tert*-ブタンスルフィニルイミン **3** へと変換した。このイミン **3** に対するジアステレオ選択的 Grignard 反応によって、イソブチル基を導入して **4** とした。スルフィニル基および TBDPS 基の除去、および、続くアミノ基のベンジル化後、ヒドロキシメチル基を一炭素増炭したカルボン酸 **5** へと誘導した。不斉補助基であるオキサゾリジノンを縮合し、立体選択的アルキル化反応によりメチル基を導入した。不斉補助基およびベンジル基を除去した後、アミノ基を Fmoc 基で保護し、*cis*-NfCf 型の *N*-Fmoc アミノ酸 **6** を合成した［4］。他の立体異性体についても、同様にして合成できた。

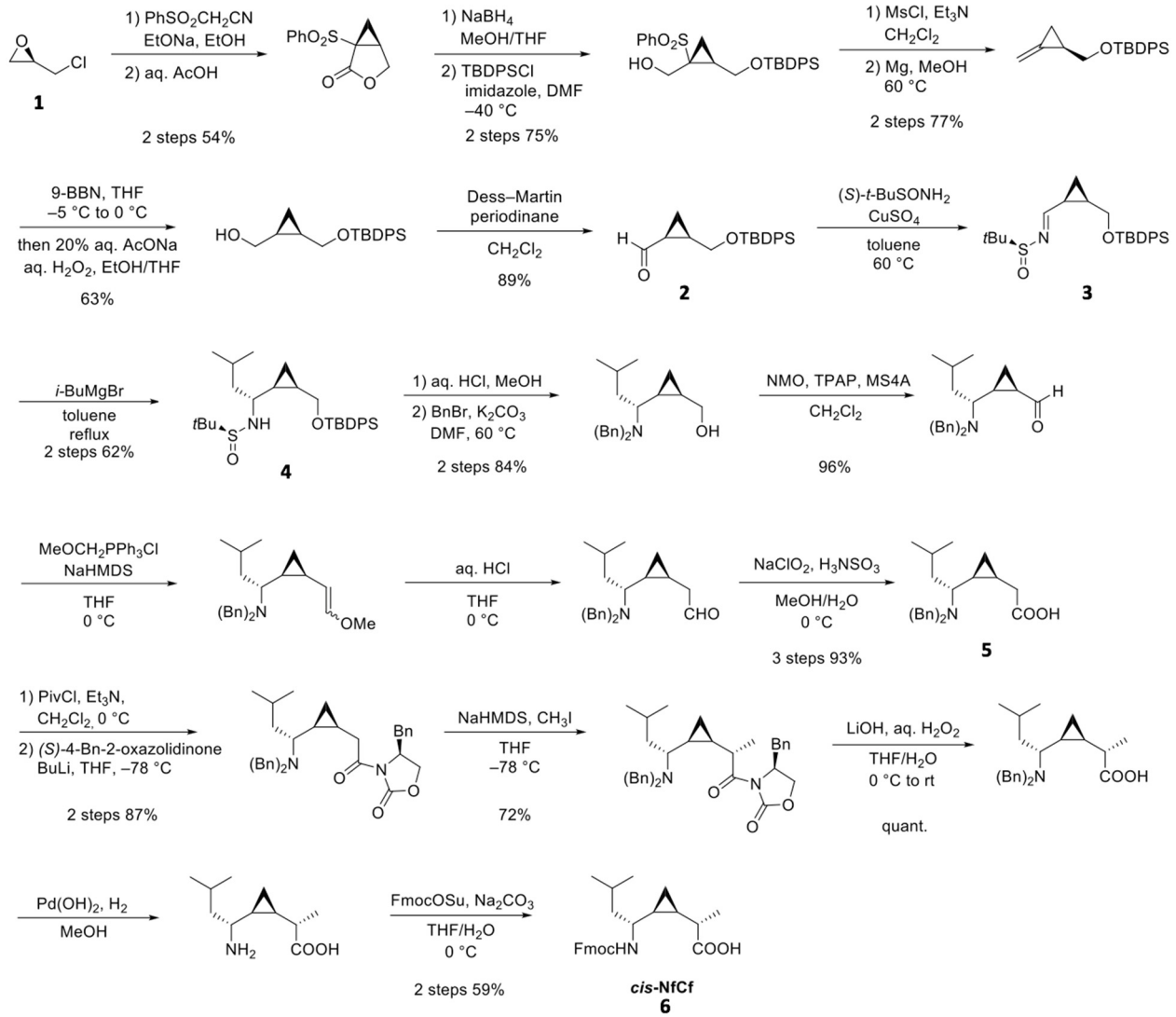


図 1. 光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸の合成経路

cis-NfCf 型の光学活性シクロプロパンδ-アミノ酸の合成経路を示す。

結果および考察

1. 配座を制御した環状ペプチドおよびオリゴマーの合成

合成した *cis*-NfCf 型シクロプロパン δ-アミノ酸を導入した鎖状ペプチドを、Fmoc 法を用いて固相合成した。切り出した後に環状化し、脱保護、および、HPLC 精製を経て、シクロプロパン δ-アミノ酸を含んだ環状ヘキサペプチドの合成を達成した。対照ペプチドとして、シクロプロパン δ-アミノ酸の代わりに L-Leu や鎖状 δ-アミノ酸を含有した環状ペプチドも合成した。また、*trans*-NfCf 型シクロプロパン δ-アミノ酸をオリゴ化した。

2. 環状ペプチドの膜透過性評価

合成した各種環状ペプチドについて、人工膜を用いた膜透過性評価（PAMPA）を行った（図 2）。人工膜の前後の化合物溶液の濃度を LC-MS を用いて測定することで、膜透過性を評価した。縦軸が膜透過係数で、バーが高いほど膜透過性が高いことを意味する。高い膜透過性を示した環状ペプチドとして報告されているペプチド（Lokey's peptide）[5] についても、比較対象として評価した。L-Leu や鎖状 δ-アミノ酸を含有した環状ヘキサペプチド（NP1 および δP1）や環化前駆体の鎖状ペプチド（LP1）は、全く膜を透過しなかった（検出限界以下）。その一方、*cis*-NfCf 型シクロプロパン δ-アミノ酸を導入した環状ヘキサペプチド（CP1）は、Lokey's peptide と比較しても非常に高い膜透過性を示した。ロイシンとアラニンの配列を変更しても、高い膜透過性は維持された（CP4）。これらの結果から、環状ペプチドにシクロプロパン δ-アミノ酸を導入することで、環状ペプチドの膜透過性を飛躍的に改善できることがわかった。NMR 解析の結果から、導入されたシクロプロパン δ-アミノ酸の配座制御効果によって環状ペプチドの三次元構造が折り畳んだ形に制御されていることも判明した。この三次元構造が、環状ペプチドの膜透過性に大きく影響していることが示唆された。

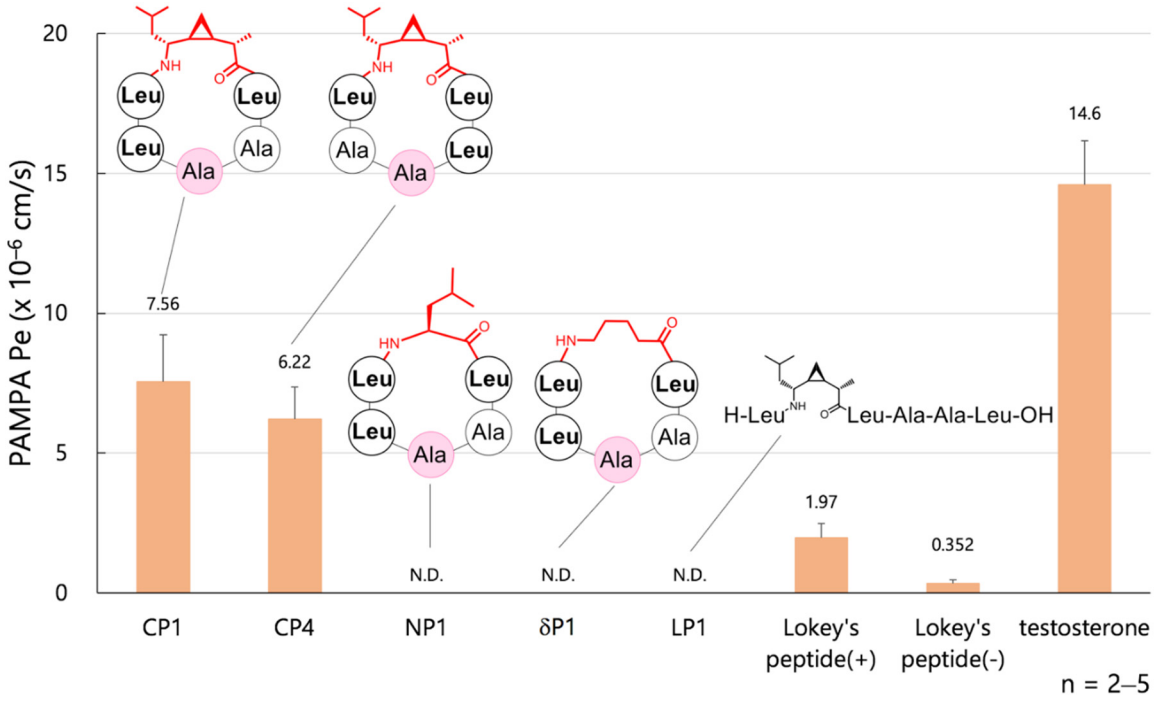


図 2. 膜透過性評価の結果

合成した環状ペプチドの人工膜を用いた膜透過性アッセイ（PAMPA）の結果。縦軸が透過係数を示す。testosterone はポジティブコントロール。

3. オリゴマーの立体構造解析

合成した *trans*-NfCf 型シクロプロパンδ-アミノ酸のオリゴマーの NMR や円二色性 (CD) を測定した。その結果、4 量体以上の長さをもつオリゴマーが、一定の二次構造をとっていることが示唆された。また、4 量体の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、分子設計で期待した通り、規則的なヘリカル構造をとっていることが明らかとなった。シクロプロパン歪みを利用した配座制御が、オリゴマーでも有効であることが示された。

共同研究者・謝辞

研究の共同研究者は、北海道大学大学院薬学研究院・創薬有機化学研究室の周東智教授である。また、ご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1) Mizuno A, Matsui K, Shuto S. From peptides to peptidomimetics: A strategy based on the structural features of cyclopropane. Chem Eur J. 2017 2017 Oct 17;23(58):14394-14409. DOI: 10.1002/chem.201702119

2) Watanabe M, Kazuta Y, Hayashi H, Yamada S, Matsuda A, Shuto S. Stereochemical diversity-oriented conformational restriction strategy. Development of potent histamine H_3 and/or H_4 receptor antagonists with an imidazolylcyclopropane structure. J Med Chem. 2006 Sep 7;49(18):5587-5596. PMID: 16942032 DOI: 10.1021/jm0603318

3) Kanada R, Tanabe M, Muromoto R, Sato Y, Kuwahara T, Fukuda H, Arisawa M, Matsuda T, Watanabe M, Shuto S. Synthesis of chiral cis-cyclopropane bearing indole and chromone as potential TNFα inhibitors. J Org Chem. 2018 Aug 3;83(15):7672-7682. DOI: 10.1021/acs.joc.8b00466.

4) Matsui K, Kido Y, Watari R, Kashima Y, Yoshida Y, Shuto S. Highly conformationally restricted cyclopropane tethers with three-dimensional structural diversity drastically enhance the cell permeability of cyclic peptides. Chem Eur J. 2017 Mar 2;23(13):3034-3041. DOI: 10.1002/chem.201604946.

5) Rezai T, Yu B, Millhauser GL, Jacobson MP, Lokey RS. Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers. J Am Chem Soc. 2006 Mar 1;128(8):2510-2511. PMID: 16492015 DOI: 10.1021/ja0563455