

集合して生体に作用する有機分子の設計と合成および機能評価

東京大学大学院 薬学系研究科分子薬学専攻 薬化学教室

大和田 智彦

A synthetic method was developed for synthesizing α,α -disubstituted glycines bearing a large hydrophobic ring (more than 15-membered ring) based on ring-closing metathesis. Ring-closing metathesis reactions of the dialkenylated malonate precursors turned out to proceed efficiently, particularly when long methylene chains adequately tether both terminal olefin groups. Surprisingly, the amino groups of the α,α -disubstituted glycines bearing a large hydrophobic ring are inert to conventional protective reactions (e.g., N-Boc-protection: Boc²O/DMAP/CH₂Cl₂; N-Z-protection: Z-Cl (benzyloxycarbonyl chloride)/DMAP/CH₂Cl₂). The Curtius rearrangement of the carboxylic acid functionality of the malonate derivatives, obtained after the ring-closing metathesis, to an amine functionality can be catalyzed by diphenylphosphoryl azide (DPPA), but unexpectedly, only the intermediate isocyanates can be isolated, even in the presence of alcohols such as benzyl alcohol. Thus, the corresponding isocyanates were isolated in high yields when this Curtius rearrangement was carried out in an aprotic solvent (benzene). The resultant isocyanate was treated with 9-fluorenylmethanol in a high boiling point solvent such as toluene under reflux to give the N-Fmoc-protected aminomalonic derivatives in high yield. These hydrophobic amino acids can be incorporated into a peptide by Fmoc-solid phase peptide synthesis using the acid fluoride activation method. In a 17-amino-acid peptide sequence known to take a monomeric α -helix structure, the replacement of two alanines with two new hydrophobic amino acids bearing a cyclic 18-membered ring enhanced the stability of the helical structure. Assembly to hexamers was also suggested by the results of sedimentation equilibrium studies in the presence of 100 mM NaCl.

1. 緒言

Aib (α -aminoisobutyric acid) などの $C_{\alpha,\alpha}$ -二置換グリシン誘導体は β -bend、 3_{10} もしくは α ヘリックス構造をとりやすく、またこれらの構造を安定化させることが知られている。なかでも、 C_{α} のジ置換基をシクロアルカンとしたものは 1-aminocycloalkane-1-carboxylic acid 残基 (Acnc) として知られ、Tonio らを中心に現在までに Ac3c (3員環) -Ac12c (12員環) の合成および数残基のホモオリゴマーもしくはオリゴマー中への挿入ペプチドの構造特性が調査されている¹⁾。

一方、天然に存在する疎水性アミノ酸、特にアルキル側鎖をもつアミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどで、アルキル炭素数も 1~4 とその疎水性の違いが比較的小さい。疎水性領域を大きく変化させたアミノ酸の機能は不明である。さらに、長いペプチド鎖に $C_{\alpha,\alpha}$ -二置換グリシン誘導体を導入した際の単独ペプチド構造および自己組織化構造への効果は未知である。このような考えのもとに、本研究者は新規疎水性 α,α -二置換グリシン誘導体 **1**, **2**, **3** を設計し、その自己組織化構造への効果を調査した (Figure 1)。

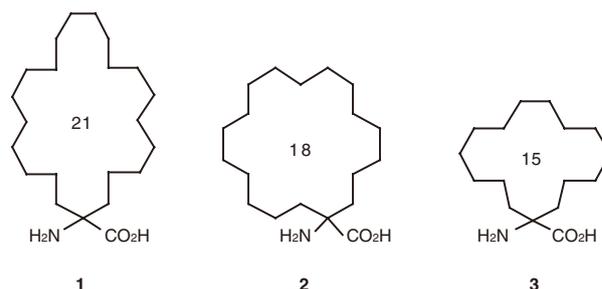


Figure 1

2. 実験

2.1 大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の合成法

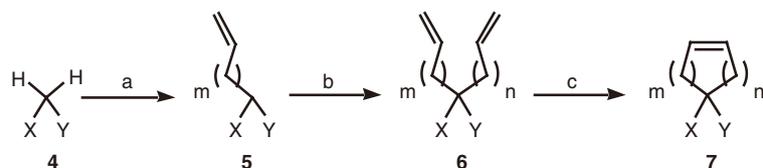
今まで Tonio らによって報告され構造解析がされた Acnc の合成法は Strecker 反応を用いたものがほとんどである¹⁾。しかし、この合成法では無保護のアミノ酸を合成してから NH₂ および CO₂H に保護基を導入する必要がある。環が小さい場合はあまり問題にならないが、環が大きくなった場合、無保護のアミノ酸の溶解性の低さ、立体障害が問題となり保護基を導入することが困難になってくる事が予想される。そこで本研究者はマロン酸誘導体を出発物質とし、Grubbs 触媒を用いた Ring Closing Metathesis (ROM) による環形成の後 Curtius 転位反応を行うことで大環状アミノ酸誘導体の合成を計画した (Scheme 1)。すなわち、マロン酸誘導体 **4** をジアルケニル化後 (**6**)、閉環オレフィンメタセシス反応を用いて環化を行い (**7**)、それに続く Curtius 転位反応を経て (**9**) アミノ酸誘導体 **12**



Design, synthesis and functions of self-assembled biomolecules.

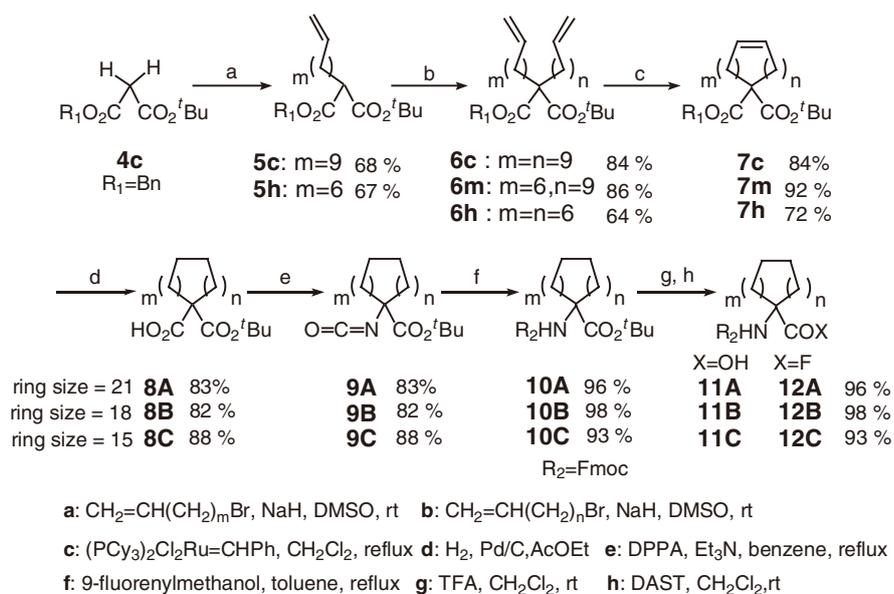
Tomohiko Ohwada

Graduate School of Pharmaceutical Sciences The University of Tokyo



Reagents a,b and c are shown in Scheme 2

Scheme 1



Scheme 2

を得る合成法を計画した (Scheme 2)。

2. 1. 1 ジエン 6 の合成

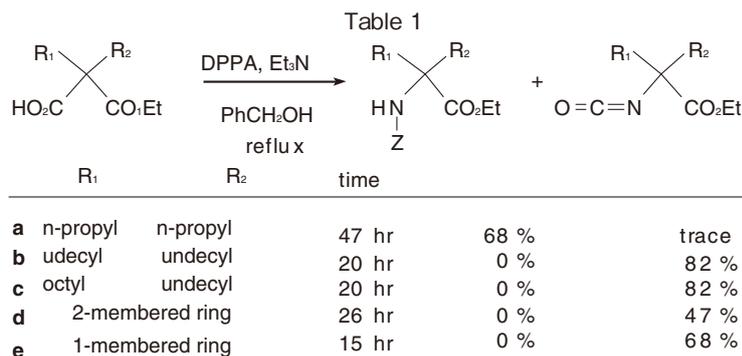
マロン酸エステルからは Curtius 転位反応により α アミノ酸を、ニトリル化合物からは還元により β アミノ酸を合成できると考え、基質としてマロン酸ジエステル、シアノ酢酸エチル、マロニトリルを用いた。これらの基質 **4** に塩基存在下、alkenyl bromide を付加させることでジエン **6** を得た。反応の副生成物を避けるため、一気にジアルケニル化する方法ではなく、モノアルケニル体 **5** を経てからジアルケニル化する方法を用い、比較的高収率で **6** を得た。

2. 1. 2 閉環メタセシス反応 (ROM)

市販の第一世代の Grubbs 触媒を用いて、様々な置換基、アルキル鎖をもつジエン **6** の閉環メタセシス反応を行った (Scheme 2)²⁾。その結果、置換基とアルキル鎖の長さにより反応の効率が異なることがわかった。特に、ニトリル置換基を持つ化合物や一方の炭素鎖が短い場合 (n=2) の収率は低かったが、それ以外では比較的高い収率で環化体 **7** が得られた。反応によっては分子間で反応が進行したダイマーも得られた。環化した **7** のオレフィンの E/Z 比を ¹³CNMR の積分値から見積もったところ、E 体が優先的に得られていることがわかった。

2. 1. 3 Z-Acnc-F18 の合成 (合成経路の探索研究)

21,18,15 員環をもったアミノ酸誘導体の N-Z (benzyloxy carbonyl) - 酸フッ化物の合成を t-butylbenzyl malonate (**4c**) を用いての合成を行った (Scheme 2)。Pd/C を用いて **7** のオレフィンを接触還元すると同時にベンジルエステルをカルボン酸としてモノエステル **8** を得た。得られた **8** に対し DPPA (diphenylphosphoryl azide) を用いた Curtius 転位反応を検討した。アルコール存在下でカルボン酸を DPPA と反応させると通常はイソシアネートを経由してアルコールが反応して一気にウレタン誘導体を与えるが (Table 1)³⁾、 α の二置換基のアルキル鎖が大きくなるとアルコール共存下でもイソシアネートが単離されることが判明した (Table 1)。そこでモノエステル **8** を非プロトン性溶媒 (ベンゼン) 中 DPPA と加熱環流下反応させると、イソシアネート **9** が収率良く得ることが出来た。イソシアネート **9** をベンジルアルコール中 neat で加熱することで Z-保護アミノ酸エステルを得た (Table 1)。この反応スキームは N-Fmoc 保護体の合成にも適用した。一方、別法で得たアミノ基を塩化メチレン溶液中触媒量の DMAP (N,N-dimethylaminopyridine) 存在下 N-benzyloxycarbonyl chloride (Z-Cl) で N-Z 化や DMAP 存在下塩化メチレン溶液中 Boc₂O で処理し、N-Boc 化を試みても反応せず、先の合成法の有効性が判明した。



2. 1. 4 Fmoc-Ac20c-F の合成

Fmoc 固相合成法を用いてペプチドを伸長するため、N-Fmoc 保護のアミノ酸を合成した (Scheme 2)。21,18,15 員環をもった benzylt-butyl malonate (**4c**) を Pd/C を用いて接触還元してモノエステル体 **8** とし、得られた **8** に対し、DPPA を用いた Curtius 転位反応を行い、イソシアネート **9** とした。**9** をトルエン中、高濃度の 9-fluorenylmethanol と加熱還流することで N-Fmoc アミノ酸 t-butyl エステル **10** とし、**10** を TFA で処理することによりカルボン酸 **11** とした。**11** を DAST (diethylamino) sulfur trifluoride) を用いて酸フッ化物とし目的物 **12** が得られた。ここで得られた酸フッ化物はカラムクロマトグラフィーで分離精製可能である。

2. 2 大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の置換による α ヘリックス構造への効果

2. 2. 1 疎水性アミノ酸の評価

通常ペプチドは水溶液中では、水との水素結合が優先し、ペプチドは規則構造は取らない。TFE (tetrafluoro ethanol) などの疎水性有機溶媒の共存化で分子内水素結合を形成し α ヘリックスなどの自己組織化構造を形成することが知られている。そのため α ヘリックス構造は分子間や分子内で会合しその疎水性ゆえに安定化される。一方、Baldwin らは Ac- (N) Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala (CO) NH₂ (peptide I) の配列をもつペプチドが水溶液中で会合することなく単独で α ヘリックスをとることを報告している⁴⁾。このペプチドはらせんに沿って酸性アミノ酸の Glu (-) と塩基性アミノ酸の Lys (+) の塩橋 (salt bridge) が存在し α ヘリックスを安定化すると考えられている。本研究者はこのペプチドの疎水性アミノ酸である Ala を 1 つまたは 2 つ新規疎水性アミノ酸 **2** (**12B**) に置換したものを合成し、CD スペクトルを用いて大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の α ヘリックス構造への効果を調査した。大きい疎水場を持つアミノ酸を導入することで塩橋による固定化が壊れ α ヘリックス性が減少する可能性と、疎水場を中心に集合体をつくることで α ヘリ

ックス性が增大する可能性が考えられ、また、 α ヘリックス性が変化しないとしても、安定性に大きな違いがみられる可能性があり、疎水性アミノ酸の評価方法として適当であると考えたからである。

なお、ペプチド合成は N-Fmoc と酸フルオリドを用いた Rink amide resin を用いた固相合成法によって行った。Ac-AE3AAAKEAA10AKEAAAKA-NH₂ peptide I (native)
Ac-AE (2,C18) AAKEAA (2,C18) KEAAAKA-NH₂ peptide II
Ac-AEAAAKEAA (2,C18) KEAAAKA-NH₂ peptide II
Ac-AE (2,C18) AAKEAAAKEAAAKA-NH₂ peptide IV
(A=Ala, E=Glutamic acid, K=Lysine)

水溶液中の CD 測定から大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の一つまたは二つアラニンの代わりに置換したアミド鎖は Baldwin の原形と同じく α -ヘリックスを取ることが分かった (Figure 2 (A))。すなわち、**2** を二つ置換基した peptide II の α ヘリシティーは原形 (peptide I) より増強されていた。peptide II では大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体がヘリックス鎖に沿って重なるように位置を選定している。一方 1 つ置換した peptide III もしくは Peptide IV では α ヘリシティーは原形 (peptide I) より減弱している。さらに温度上昇によるヘリックス構造の減少速度から **2** を二つ置換基した peptide II はヘリックス構造の安定化の亢進が観測された (Figure 2 (B))。

また、peptide II は塩濃度増加 (10mM->100mM) により CD 曲線から α ヘリシティーの増加が観測された(データ省略)。

2. 3 大きな疎水性領域コアを持つ α ヘリックスペプチドの自己集合構造

peptide II の 40000 回転 (一分間当たり) における遠心沈降実験を行ったところ⁵⁾、100mM の塩濃度でテトラマーを形成することが分かった。特にモノマー \leftrightarrow テトラマー間の直接的な会合現象であり、途中にダイマーやトリマーは存在しない。ペプチド鎖は大きな疎水性コアによって会合し、ヘリックスバンドル間水素結合の関与も考えられる。ペプチド鎖同士は双分子モーメントをうち消すアンチパラレル構造を取ると推測している。

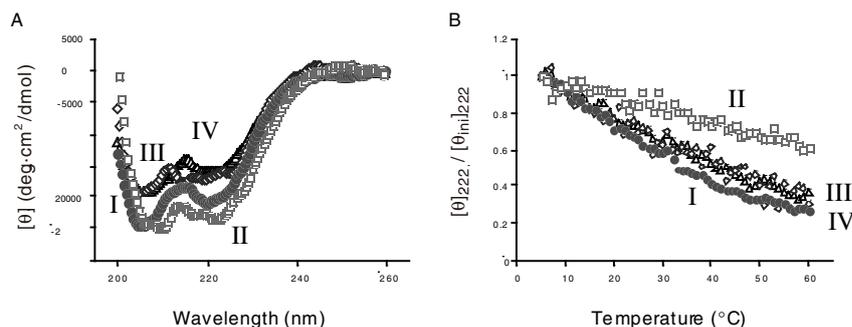


Figure 2

3. 結果と考察

本研究において本研究者は新規疎水性アミノ酸 **1**, **2**, **3** を得るため、マロン酸誘導体 **4** をジアルケニル化後 (**6**)、閉環オレフィンメタセシス反応を用いて環化を行い (**7**)、それに続く Curtius 転位反応を経てアミノ酸誘導体 **11** を得る、という合成法を計画し、N-Fmoc 化されたアミノ酸 **11** を得ることに成功した。大環状疎水基を持つアミノ酸において無保護のアミンを Z 化することができず、カルボン酸も無保護の場合には有機溶媒に不溶であることから推測すると、Strecker 合成を用いてアミンを保護した **1**, **2**, **3** を合成するのは非常に困難であると考えられる。本合成法は Strecker 合成と異なり、無保護のアミノ酸を保護する過程がなく、合成の各段階において比較的高収率で目的物を得られる。また、最初のジアルケニル化に用いるアルキル基の長さを変えることにより、様々な大きさの環をもつアミノ酸誘導体を得ることができる。さらに、安定に単離できるイソシアネート **9** と反応させるアルコールを変えることにより、アミンの保護基も選択できるなど、様々な利点を有する。今後、この合成法を用いて様々な大きさの環や原子種を持つ新規疎水性アミノ酸を合成する予定である。

本合成法の key step である閉環オレフィンメタセシス反応を様々な基質 **6** を用いて調査した結果、置換基とアルキル鎖の長さにより反応の効率が異なることがわかった。ニトリル置換基を持つ化合物や、一方の炭素鎖が短い場合の収率が低かったが、それ以外では比較的高収率で環化体 **7** が得られ、反応によっては分子間で反応が進行したダイマーも得られた。この結果から、反応には置換基のかさ高さによる立体的な影響、触媒と置換基のキレーションによる収率の変化など様々な要因が関与していると考えられる。

まとめ

本研究により、高次構造をとり得るような長さのペプチドに **1**, **2**, **3** などの大環状疎水性アミノ酸を導入できるこ

とが明らかとなった。導入効率などの改善点は残るものの、今後、これらのアミノ酸を導入したペプチドの性質を詳細に検討し、本研究で示した疎水性コアによる水溶液中でのヘリックスペプチドの自己集合組織化の一般性の調査を行うことは今後の重要な課題である⁶⁾。従来にない新しい構造とそれに由来する生体機能を持ったペプチドの創製を目指したいと考えている。

本研究は、小嶋大輔修士、京都大学化学研究所 黄檗達人博士、二木史朗博士、杉浦幸雄教授、大阪大学大学院薬学研究所 西 義則博士、小林祐次教授、千葉大学分析センター山口健太郎博士との共同研究である。

- 1) a) A. Moretto, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, M. Saviano, R. Iacovino, R. M. Vitale and E. Benedetti, *J. Pept. Res.*, 57, 307 (2001). b) M. Saviano, R. Iacovino, V. Manchise, E. Benedetti, G. M. Bonora, M. Gatos, L. Graci, F. Formaggio, M. Crisma and C. Toniolo, *Biopolymers*, 53, 200 (2000).
- 2) a) R. H. Grubbs and S. Chang, *Tetrahedron*, 54, 4413 (1998) b) T. A. Kirkland and R. H. Grubbs, *J. Org. Chem.*, 62, 7310 (1997).
- 3) T. Shioiri; K. Ninomiya; S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 6203-6205 (1972). b) K. Ninomiya; T. Shioiri; S. Yamada, *Tetrahedron*, 30, 2151-2157 (1974).
- 4) S. Marqusee and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 8898 (1987).
- 5) M. Doi; Y. Nishi; S. Uchiyama; Y. Nishiuchi; T. Nakazawa; T. Ohkubo; Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 9922-9923 (2003).
- 6) T. Ohwada.; D. Kojima; T. Kiwada; S. Futaki; Y. Sugiura; K. Yamaguchi; Y. Nishi, Y. Kobayashi, *Chemistry-A European Journal*, 10, 617-626 (2004).