

論文の内容の要旨

論文題目 チロシンを起点としたペプチドの構造多様化法

氏 名 藤後 貴也

【研究背景】

ペプチドは、タンパク質間相互作用阻害剤などの難関医薬標的へとアプローチしうる中分子モダリティの一つとして近年注目を集めている。しかしながら天然アミノ酸から構成されるペプチドは、体内安定性や膜透過性の低さなど薬物動態面での課題があり、広汎な医薬品への応用が難しいとされてきた。この解決を目指し、非天然型構造（図 1.）大環状骨格や非天然アミノ酸などを化学合成によって導入する施策が検討されてきた。特に合成後期において高化学選択的反応を用いる構造多様化を行うことができれば、活性が担保された薬物構造を起点とした構造展開が可能になるため、医薬開発面での魅力が大きい。当研究室では、オキシム試薬を用いたチロシン（Tyr）選択的タンパク質化学修飾反応の開発を行っており¹、私はこの Tyr-オキシム付加体を足掛かりとしたペプチド構造多様化法の開発に着手した。

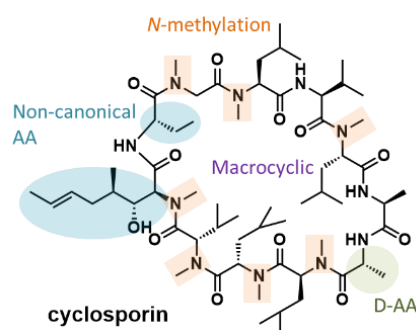
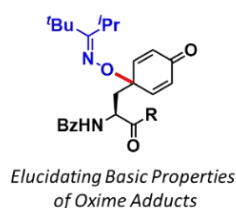


図1. ペプチド医薬品に含まれる非天然構造の例

【方法】

Tyr-オキシム付加体は右図に示す通り、フェノールが脱芳香族化されたシクロヘキサジエノン部位を有する。これは Tyr 側鎖がオキシム修飾によって活性化された構造と捉えることができる。

▶ (a): Single Amino Acid



▶ (b): Unprotected Bioactive Peptide

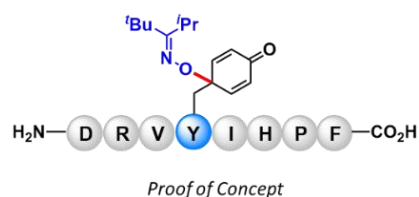


図2. 研究方針

そこでまずは、モデル化合物（Tyr1 残基のオキシム付加体）を用いて、本脱芳香族化構造に対する様々な反応形式の適用可否を評価した（図 2a）。次に適用できた反応形式を生理活性ペプチドへと適用し、側鎖無保護・水溶性ペプチドでも構造多様化を行えるかどうかを確かめた（図 2b）。

【結果】

これまでに当研究室では、Kool 触媒(図 3 中の構造)およびフェニルヒドラジンで Tyr-オキシム付加体を処理することで、中性 pH 水中条件下にてアゾベンゼン側鎖への変換を実現している¹。しかしながら他反応形式の適用可能性については全くの未知数であった。そこ

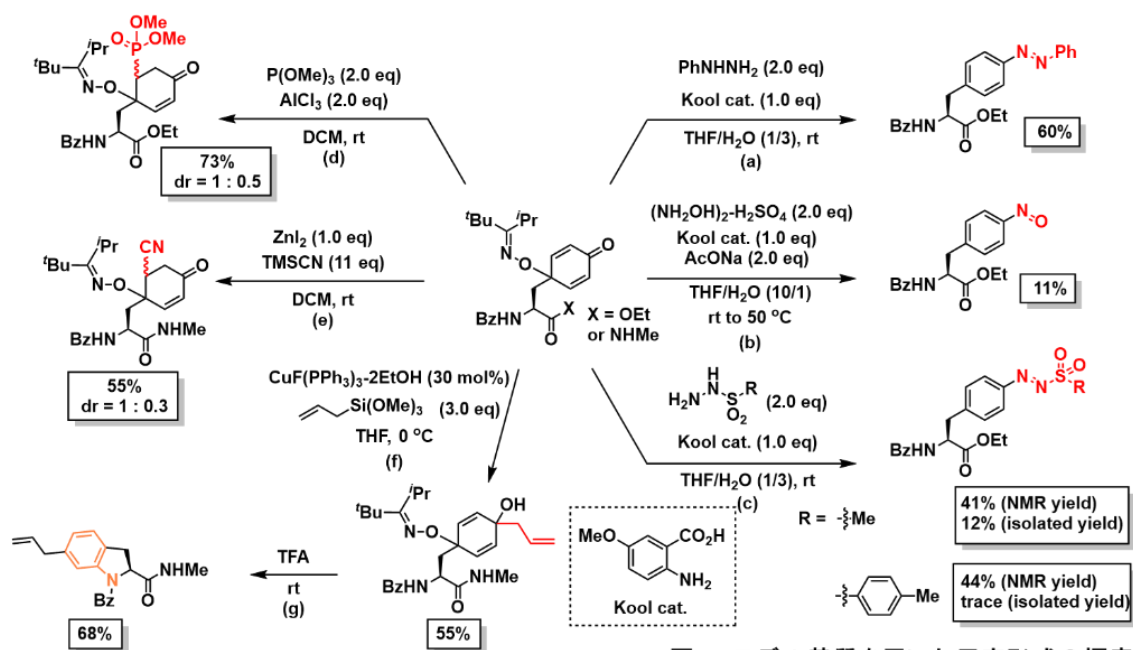


図3. モデル基質を用いた反応形式の探索

で将来的にペプチドへの適用も視野に入れ、反応条件を注意深く選択しつつ適用可否を評価した。

まずフェニルヒドラジンの代わりにヒドロキシアミンを同様の条件で作用させたところ、50 °Cに昇温するとニトロソ化合物が11%で得られることが分かった (図 3b)。メシルヒドラジド及びトシルヒドラジドを作用させたところ、NMR 収率 40%程度での反応の進行が確認できたが、生成物が光に対して不安定であり、単離すると収率は大幅に低下した (図 3c)。

$\text{P}(\text{OMe})_3$ や TMSCN をルイス酸と共存させたところ、1,4 付加がそれぞれ中程度の収率で進行することが分かった (図 3d, e)。また官能基許容性の高いフッ化銅触媒を用いるアリル化²を検討したところ、55%収率でカルボニルへの1,2-付加反応が進行することが分かった。この生成物に関してはTFAで処理することにより、主鎖アミド窒素が $\text{S}_{\text{N}}2$ 置換した後、オキシムの β 脱離を経て再芳香族化された生成物が得られた (図 3f, g)。

シクロヘキサジエノン構造へのペプチド主鎖窒素の付加を行うことが出来れば、プロリン模倣構造へ変換され、ペプチドの高次構造に配座規制をもたらしうる新たな考え方の誘導体化法になることが期待される。これを意図した様々な塩基条件を検討したところ、エタノール中 $\text{Ca}(\text{OMe})_2$ を用いると5員環が迅速に形成される一方 (図 4a)、 KO^tBu を用いると6員環形成が優先されることを見いだした (図 4b)。TLCで反応を追跡すると5員環形成が初めに進行したのち、6員環環化体が時間とともに得られることが分かった。この現象は、5員環形成の方が速度論的に起こりやすいが、レトロマイケル反応も同時に進行し、熱力学的に安定な6員環が最終的に得られると考察している。次に、得られた5/6縮環構造体

の脱オキシム化反応に関して検討した。TEMPO 及び TFA を作用させるとオキシムの脱離と環の酸化を経てカテコール様構造物が 34%で得られることが分かった (図 4c)。また、TFA のみで処理すると 89%収率

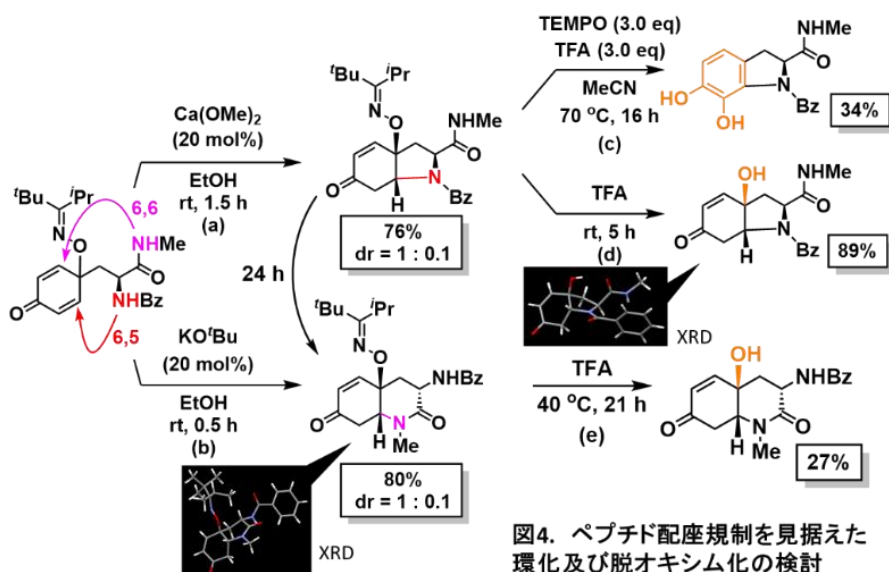


図4. ペプチド配座規制を見据えた環化及び脱オキシム化の検討

で脱オキシム化が進行した (図 4d)。その一方、6/6 縮環構造体に関しては同様の反応は遅く、40 °Cで反応させたところ 27%収率で脱オキシム生成物が得られることが分かった (図 4e)。

ここまで見出した条件を基に生理活性ペプチド (アンジオテンシン II) への適用を検討した (図 5)。初めに、有機溶媒中でのオキシム付加について再検討を行ったところ、オキシム及び CAN を 10 当量ずつ作用させると、望みの生成物が 96%収率で得られることを見出した (図 5(2))。続いて、ここに $\text{Ca}(\text{OMe})_2$ を 20 当量加え、室温で反応させたところ、NMR、MS のデータに一致する速度論的に安定な上向きシス 5/6 縮環環化体が 23%収率で得られ

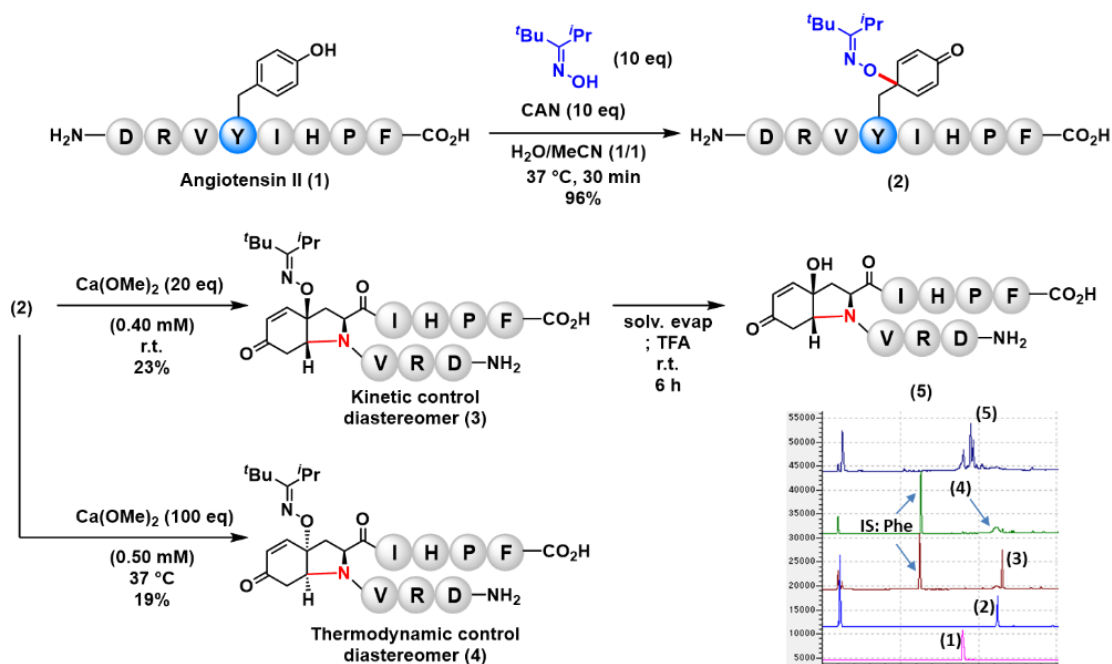


図5. 生理活性ペプチド(アンジオテンシン II)への適用

HPLCチャート

ることを見出した(図 5(3))。一方で、 $\text{Ca}(\text{OMe})_2$ を 100 当量加え、37 °C で反応させたところ、NMR、MS のデータに一致する熱力学的に安定な下向きシス 5/6 縮環環化体が 19% 収率で得られることを見出した(図 5(4))。最後に、環化体(3)の溶媒を除去し、TFA を加えて攪拌すると、副生成物の生成も確認されるものの、脱オキシム化体に相当する生成物ピークへと変換された(図 5(5))。以上の結果より、条件選択的な環化反応と引き続く脱オキシム化反応についてはペプチドレベルでの適用可能性を見いだすことが出来た。

【総括】

ペプチドのチロシン選択的構造多様化を実現すべく、①モデル基質を用いて適用可能な反応形式を種々見出し、②環化反応及び TFA を用いた脱オキシム反応が生理活性ペプチドにおいても進行しうることを見出した。

【参考】

- 1) Maruyama, K.; Ishiyama, T.; Seki, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *ChemRxiv*, doi: 10.26434/chemrxiv.12278717.v1
- 2) Yamasaki, S.; Fujii, K.; Wada, R.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6536