

側鎖上にのみ不斉中心を有する 環状ジ置換アミノ酸含有ペプチドの二次構造解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 江藤 諒

[背景・目的]

タンパク質は多様な機能性を有し、生物にとって重要な構成成分である。タンパク質の持つ機能としては、化学反応を触媒することや、シグナル分子を認識して細胞内情報伝達に関与することなどが挙げられる。近年、安定な二次構造を形成するフォルダマーを用い、タンパク質の持つ機能の一部を模倣する研究が注目を集めている。当研究室では、人工アミノ酸の一種である α,α -ジ置換アミノ酸を含有するペプチドが安定なヘリックス構造を形成することに着目し、 α,α -ジ置換アミノ酸の側鎖構造と含有ペプチドの二次構造との相関を調べる二次構造解析や、応用研究として不斉有機分子触媒や細胞膜透過性ペプチドへの展開が行われてきた。通常、タンパク質中に普遍的にみられる α -ヘリックス構造は、構成単位である L- α -アミノ酸の α 位の不斉中心により、右巻きに制御される。それに対して我々は側鎖上のみ不斉中心を有する 5 員環状ジ置換アミノ酸(3*S*,4*S*)-Ac₅c^{dOM} よりなるホモペプチドは結晶および溶液状態にて左巻きの α -ヘリックス構造を形成することを報告している。このことから、側鎖不斉中心のみによりヘリックス構造の巻き方を制御できることが示唆されたが、これは必ずしも容易とは言えない。例えば、側鎖にキラルなアセタールを有する 6 員環状ジ置換アミノ酸 (*R,R*)-Ac₆c^{4BD} よりなるホモペプチドは溶液中にてわずかに右巻きが優先したヘリックス二次構造が示唆されたが、詳細な二次構造は不明である。これらを踏まえ、今回、ジ置換アミノ酸側鎖の不斉環境の変化がヘリカルペプチドの巻き方制御性に与える影響について調査することを目的とした。

[方法]

側鎖不斉中心によってヘリックス構造の巻き方を制御するために重要な要素を特定すべく、側鎖にキラルなアセタール構造を有する環状ジ置換アミノ酸の修飾を行った。アミノ酸の側鎖アセタール部位にメトキシメチル基あるいはブチル基などのかさ高い置換基を導入すること、また、側鎖をシクロヘキサン環からシクロブタン環へと変化させ、側鎖不斉中心とペプチド主鎖との距離を変化させることがヘリックス構造の巻き方制御性に影響をおよぼすと考えた。そして、4 種類のジ置換アミノ酸を設計・合成した (**Figure 1**)。これらの環状ジ置換アミノ酸よりなるホモペプチドを合成し、溶液および結晶状態における二次構造解析を行った。

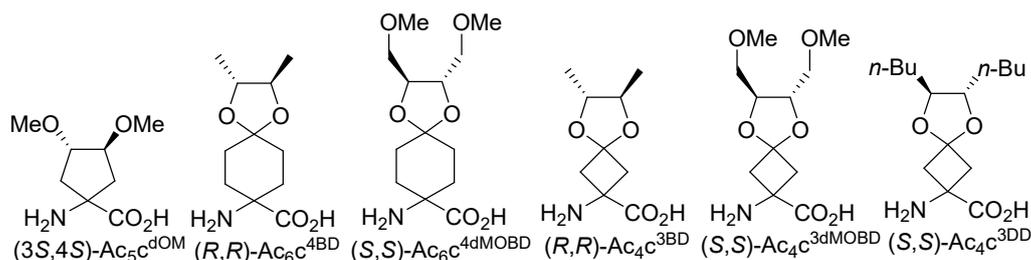
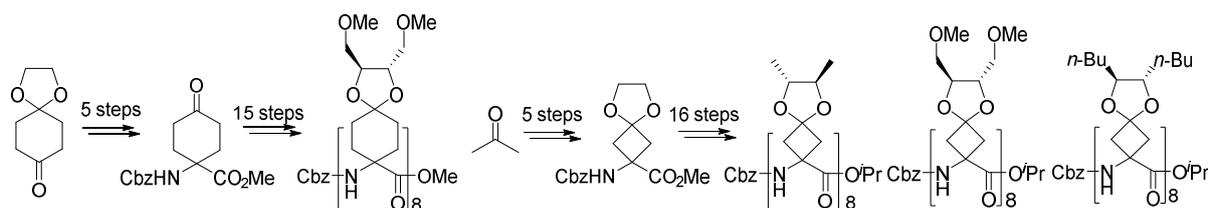


Figure 1. Structures of α,α -disubstituted α -amino acids with side-chain chiral centers.

[結果]

6員環状ジ置換アミノ酸(*S,S*)-Ac₆c^{4dMOBD}は、1,4-シクロヘキサジオンモノエチレンケタールを出発原料とし、5工程を経てカルボニル基を持つアキラルなジ置換アミノ酸を合成した後、(*S,S*)-1,4-ジメトキシ-2,3-ブタンジオールとのアセタール化により合成した。また、(*R,R*)-Ac₄c^{3BD}、(*S,S*)-Ac₄c^{3dMOBD}、および(*S,S*)-Ac₄c^{3DD}は、アセトンを出発原料とし、5工程を経て側鎖にエチレングリコール由来のアセタールを有するアキラルなジ置換アミノ酸を合成した後、酸性条件下側鎖エチレンアセタールを脱保護し、続いて(*R,R*)-2,3-ブタンジオール、(*S,S*)-1,4-ジメトキシ-2,3-ブタンジオール、(*S,S*)-5,6-デカンジオールとのアセタール化を行うことによりそれぞれ合成した。合成したアミノ酸を用い、液相法にてホモペプチドをN末端方向に1残基ずつ伸長し、それぞれホモオクタペプチドまで合成した (Scheme 1)。



Scheme 1. Synthesis of chiral amino acids and their homopeptides.

ホモペプチドの溶液状態での二次構造は、¹H NMR/FT-IR/CD を用いて調べた。ホモペプチドの CDCl₃ 溶液中での FT-IR スペクトルを測定し、1600-1700 cm⁻¹ の amide I 領域および 3250-3500 cm⁻¹ の amide A 領域におけるアミド基由来の吸収の解析を行った結果、いずれのホモペプチドもペプチド鎖の伸長に伴い、ヘリックス構造を形成していることが示唆された。次に、ホモペプチドの CF₃CH₂OH 中での CD スペクトルを測定した。その結果、(*R,R*)-Ac₄c^{3BD} よりなるホモペプチドは、わずかに右巻き方が優先していたが、極大値が非常に小さいことから、右巻きと左巻きのヘリックス構造が混在していることが示唆された。また、(*S,S*)-Ac₆c^{4dMOBD}、(*S,S*)-Ac₄c^{3dMOBD}、および(*S,S*)-Ac₄c^{3DD} は典型的なヘリックス構造を形成するペプチドの CD スペクトルに見られる特徴とは異なった形を示し、CD スペクトルからはヘリックス構造の巻き方制御性に関する知見を得ることが出来なかった (Figure 2)。

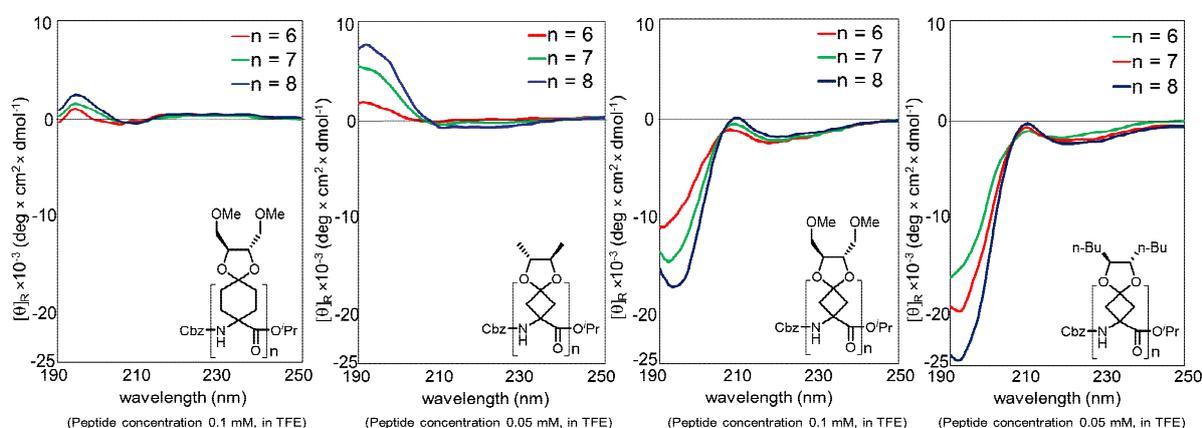


Figure 2. CD spectra of homopeptides.

(*R,R*)-Ac₄c^{3BD} ヘプタペプチドの X 線結晶解析では、右巻きと左巻きの 3₁₀-ヘリックス構造が 1:1 にて存在しており、側鎖に 14 個もの不斉中心を有するにも関わらず、巻き方が制御されていなかった (**Figure 3**) 。

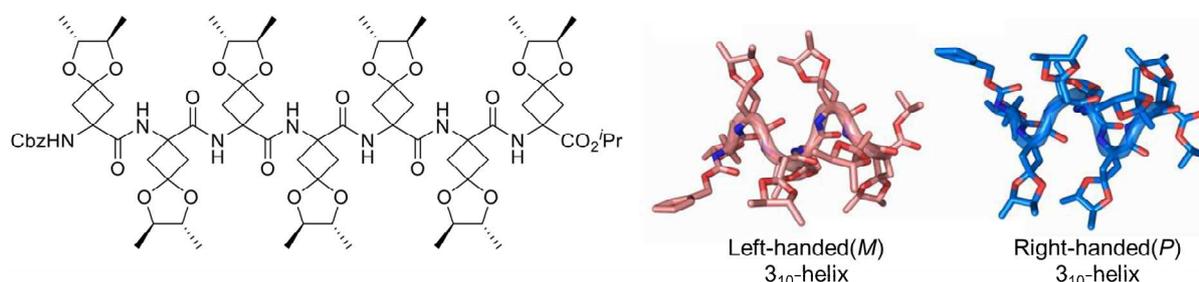


Figure 3. X-ray crystallographic analysis of (*R,R*)-Ac₄c^{3BD} heptapeptide.

(*R,R*)-Ac₄c^{3BD} オクタペプチドおよび(*S,S*)-Ac₆c^{4dMOBD} ヘプタペプチドの ¹H NMR を室温にて測定すると各アミドプロトンはシングレットとして観測されたが、低温ではヘリックス構造の右巻き・左巻き両方に由来すると考えられる 2 つのピークに分裂することから、ヘリックス構造の右巻き・左巻きは室温では速い平衡にあり、混在していることが示唆された。一方、(*S,S*)-Ac₄c^{3dMOBD} オクタペプチド、および(*S,S*)-Ac₄c^{3DD} ヘプタペプチドにおいては、低温状態でもアミドプロトンの分裂は観測されなかった。このことから、(*S,S*)-Ac₄c^{3dMOBD} および(*S,S*)-Ac₄c^{3DD} よりなるホモペプチドは溶液状態においてヘリックス構造の右巻き・左巻き間の相互変換が速くなった可能性、または片方の巻き方に制御された可能性が示唆された。

[考察]

環状ジ置換アミノ酸(*S,S*)-Ac₆c^{4dMOBD} および (*R,R*)-Ac₄c^{3BD} よりなるホモペプチドはヘリックス構造の巻き方が十分に制御されておらず、右巻きと左巻きが混在していた。一方で、(*S,S*)-Ac₄c^{3dMOBD} および(*S,S*)-Ac₄c^{3DD} よりなるホモペプチドでは、ペプチドの二次構造に関して更なる研究が必要であるものの、ヘリックス構造の巻き方が一方に制御された可能性も示唆された。これらのことから、ヘリックス構造の巻き方制御には側鎖不斉中心とペプチド主鎖との距離だけでなく、側鎖置換基のかさ高さや側鎖の環構造に影響を受けることが示唆された。本研究により得られた成果は、新規構造を有するキラルなα,α-ジ置換アミノ酸の設計を行う上で有用な知見を与えるものと考えられる。

[基礎となった学術論文]

Eto, R., Oba, M., Ueda, A., Uku, T., Doi, M., Matsuo, Y., Tanaka, T., Demizu, Y., Kurihara, M., Tanaka, M.: Diastereomeric Right- and Left-Handed Helical Structures with Fourteen (*R*)-Chiral Centers. *Chem. Eur. J.* **23**, 18120-18124 (2017).