

# 環状アミノ酸を利用した立体選択的 ペプチド側鎖架橋

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 真倉 唯

## 【背景・目的】

タンパク質は20種類のL- $\alpha$ -アミノ酸の織りなす多様な配列により構成されており、生理機能の発現では $\alpha$ -ヘリックス構造が重要である。タンパク質に比べ合成が容易なペプチドは、中分子医薬品として次世代創薬への応用が期待されているが、二次構造が不安定なままでは機能化はできない。二次構造を適切に制御する手法の一つとしてペプチドの側鎖架橋が知られており、様々な架橋法のなかでも、閉環メタセシス反応による炭化水素鎖架橋は、その簡便性と化学的安定性から近年盛んに利用されている。しかし、閉環メタセシス反応で生じる二重結合部分はE体とZ体の混合物を与え、それらの分離は困難である。このような背景のもと、EまたはZ選択的なペプチド側鎖架橋法の開発および二次構造解析を行った。

## (1) ペプチドの $i, i+1$ 位側鎖架橋の開発

ペプチド側鎖に架橋構造を導入することで二次構造を安定化することができる。例えば、 $3_{10}$ -ヘリックス構造をとるペプチドを安定化する手法として  $i, i+3$  位架橋、 $\alpha$ -ヘリックス構造の安定化では  $i, i+4$  位架橋や  $i, i+7$  位架橋が汎用されている。一方で、隣接したアミノ酸同士など短いアミノ酸残基間で架橋した例は少なく、その二次構造は明らかとなっていない。そこで、アミノ酸1残基間 ( $i, i+1$  位) 架橋の検討および架橋後の二次構造を明らかにすることを目的に研究を行った。

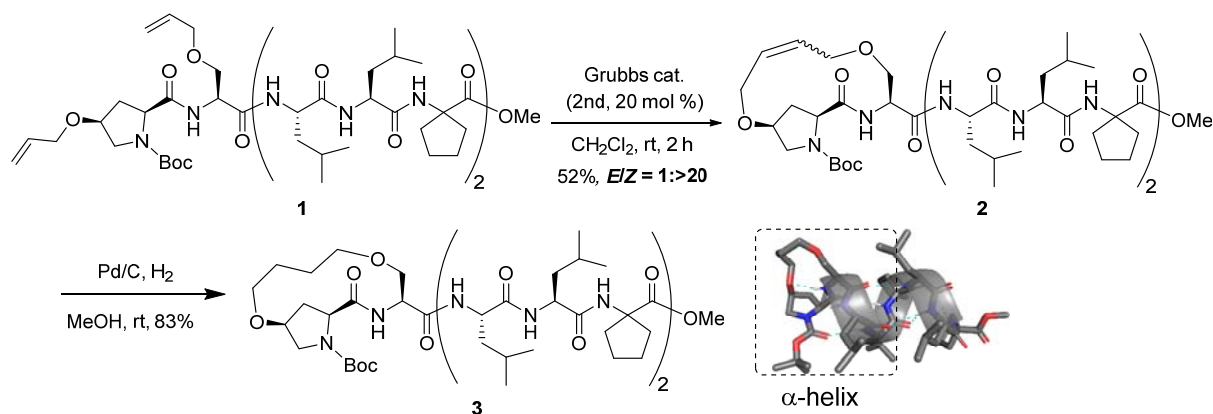
## (2) 五員環状ジ置換アミノ酸による E 選択的ペプチド側鎖架橋

側鎖架橋に *O*-アシル-L-セリン等の  $\alpha$ -アミノ酸や鎖状ジ置換アミノ酸を用いる手法では、E/Z 混合物を与える。この原因が、自由度の高い鎖状ジ置換アミノ酸を利用しているためと考えた。そこで、側鎖自由度を制限したキラルな五環状ジ置換アミノ酸に着目し、これらを用いてアミノ酸4残基間での立体選択的な側鎖架橋を目指した。

## 【結果】

### (1) ペプチドの $i, i+1$ 位側鎖架橋の開発

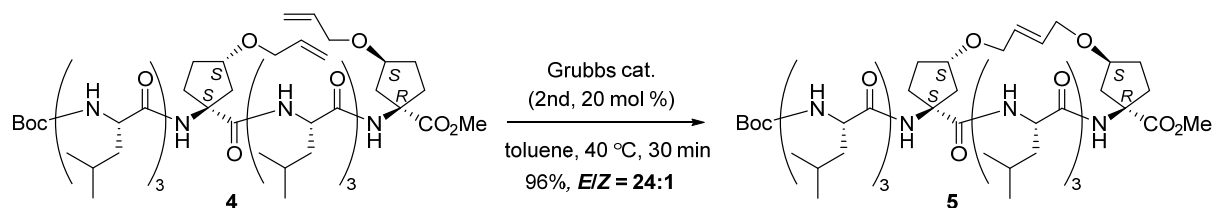
*cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリンとオレフィン側鎖を有するアミノ酸からなる種々のペプチドに対し、閉環メタセシス反応による  $i, i+1$  位架橋反応を行った。その結果、架橋の土台となるアミノ酸の構造の違いにより、*E* 選択的架橋 ( $E/Z = 8.5:1$ ) や *Z* 選択的架橋 ( $E/Z = 1:>20$ ) が起こった。また、ヘリックス誘起配列を含むペプチド **1** の N 末架橋では、高い *Z* 選択性 ( $E/Z = 1:>20$ ) で側鎖架橋反応が進行した (Figure 1)。架橋後のオクタペプチド **3** の X 線結晶解析からは、架橋部位がある N 末側では C 末側よりも  $\alpha$ -ヘリックス性が高いことが分かり、隣接する 2 つのアミノ酸による架橋においても、 $\alpha$ -ヘリックス二次構造を安定化する効果が見られた。



**Figure 1.** Ring-closing metathesis reaction of octapeptide at  $i, i+1$  positions.

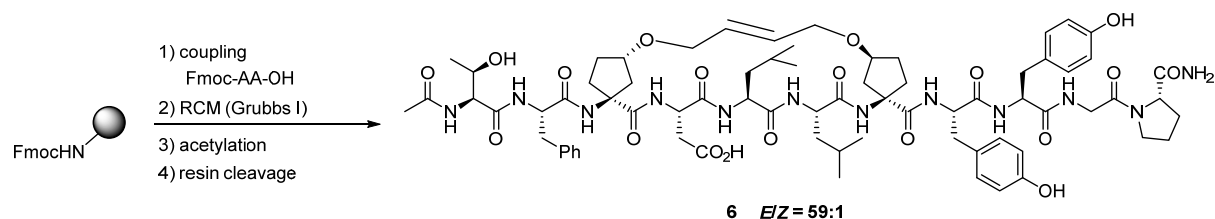
### (2) 五員環状ジ置換アミノ酸による *E* 選択的ペプチド側鎖架橋

架橋形成部位を有するキラルな五員環状ジ置換アミノ酸をロイシンペプチド配列の  $i$  および  $i+4$  位に導入し、側鎖を閉環メタセシス反応により架橋したところ、高い *E* 選択性 ( $E/Z = 24:1$ ) で側鎖架橋が進行した (Figure 2)。X 線結晶解析の結果、架橋ペプチド **5** は右巻きの  $\alpha$ -ヘリックスを形成していることが分かった。一方で、鎖状ジ置換アミノ酸や立体化学の異なる五員環状ジ置換アミノ酸では、閉環メタセシス反応の *E* 選択性は低下した。



**Figure 2.** *E*-Selective ring-closing metathesis reaction for  $i, i+4$  stapled peptide.

これらの結果をもとに、(1*S*,3*S*) 体および (1*R*,3*S*) 体の五員環ジ置換アミノ酸を用いた側鎖架橋反応の基質適用範囲を調査した。ペプタペプチドやヘキサペプチドのような短鎖ペプチド、L-ロイシン以外のアミノ酸残基を含む配列で検討したところ、いずれも高い *E* 選択性を示した。また、固相法で合成したペプチドの樹脂上での閉環メタセシス反応においても、高い *E* 選択性で側鎖を架橋することが可能であった (Figure 3)。このことから、本法は液相法だけではなく、固相法で合成したペプチドの樹脂上での閉環メタセシス反応においても、高い *E* 選択性で側鎖を架橋することが可能であることが分かった。



**Figure 3.** RCM reaction on the solid-support peptide.

#### 【まとめ・考察】

閉環メタセシス反応によりペプチド側鎖の *i*, *i*+1 位、*i*, *i*+4 位架橋を行った結果、アミノ酸の立体化学やヘリカル構造が側鎖架橋反応の *E/Z* 選択性に影響を与えた。従来の報告では、側鎖を架橋すると *E* 体と *Z* 体の混合物を与える点が課題であったが<sup>1)</sup>、 $\alpha$  位に環構造を有する五員環状ジ置換アミノ酸を用いて側鎖の自由度を制限することで、高い *E* 選択性で側鎖架橋反応が進行した。

#### [参考文献]

1. Schafmeister, C. E., Po, J., Verdine, G. L. :An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5891–5892 (2000).

#### [基礎となった学術論文]

2. Makura, Y., Ueda, A., Kato, T., Iyoshi, A., Higuchi, M., Doi, M., Tanaka, M. :X-ray Crystallographic Structure of  $\alpha$ -Helical Peptide Stabilized by Hydrocarbon Stapling at *i*, *i* + 1 Positions. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5364 (2021).
3. Ueda, A., Makura, Y., Kakazu, S., Kato, T., Umeno, T., Hirayama, K., Doi, M., Oba, M., Tanaka, M. :*E*-Selective Ring-Closing Metathesis in  $\alpha$ -Helical Stapled Peptides Using Carbocyclic  $\alpha$ , $\alpha$ -Disubstituted  $\alpha$ -Amino Acids. *Org. Lett.* **24**, 1049–1054 (2022).