

令和元年5月15日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07707

研究課題名(和文) 生物活性環状ペプチドPF1171類の生体内における立体配座解明と標的分子同定

研究課題名(英文) Conformation analysis and target molecule identification of PF1171 hexapeptides in vivo

研究代表者

増田 裕一 (MASUDA, Yuichi)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：90617755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カイコ麻痺活性を示す環状ペプチドPF1171Fの疑似生体内環境中(水系溶媒やカイコ血液)の立体配座を解析する目的で、PF1171Fの窒素原子を<sup>15</sup>Nで標識し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>Nの二次元核磁気共鳴(NMR)実験を行った。その結果、PF1171Fの水系溶媒中での立体配座が有機溶媒中と全く異なることが示唆された。一方、カイコ血液中ではNMRシグナルが観測されず、PF1171Fが血球などの巨大分子と結合しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環状ペプチドの立体配座は、標的分子結合や体内動態と密接に関係しているが、実際に活性が発現する生体環境中における立体配座研究は、これまでほとんど行われていなかった。

本研究では、<sup>15</sup>N標識したPF1171Fを有機合成し、二次元NMRを駆使することにより、疑似生体環境中の立体配座解析を実現した。本解析法は、薬の候補分子として注目されている環状ペプチドの活性発現機構研究に有効である。また、本研究で得られた疑似生体環境中における立体配座の知見は、環状ペプチドの合理的設計につながる。

研究成果の概要(英文)：PF1171F is a cyclic hexapeptide with paralytic activity against silkworm larvae via oral administration. To elucidate its conformation in pseudo body's internal environment (aqueous solution and silkworm's hemolymph), PF1171F whose nitrogen atoms were labeled with <sup>15</sup>N was analyzed by <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 2-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR) experiments. The conformation in aqueous solution was found to be quite different from those in organic solvents. On the other hand, no NMR signals were observed in the 2D spectrum of PF1171F in silkworm's hemolymph. This might be because PF1171F sticks to large biomolecules such as hemocytes.

研究分野：農芸化学、生物有機化学、ペプチド化学、核磁気共鳴

キーワード：環状ペプチド カイコ 立体配座 三次元構造 核磁気共鳴 安定同位体標識 分子プローブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

天然由来の生物活性環状ペプチドには、様々な相互作用の絶妙なバランスによって特異な三次元構造を取るものがある。それらの三次元構造形成ならびに活性発現機構を解明することは、有用な生物活性環状ペプチドの合理的設計につながる。

PF1171 類 (図 1A) は、複数種の子囊菌が生産する 19 員環の環状ペプチドで、*N*-メチルロイシン (MeLeu)、ピペコリン酸 (Pip)、アントラニル酸 (Ant) などの特殊なアミノ酸残基に、D 体を含む 3 つのアミノ酸残基が連結した特異な構造を有している。PF1171 類は、カイコに対して経口投与で麻痺を引き起こすことから、本ペプチドの立体配座と活性発現との関係に興味を持たれる。

これまでに、PF1171 類の中で経口吸収性が最も高い PF1171F の X 線結晶構造解析および NMR 解析を行っている。その結果、PF1171F は有機溶媒中で 4 本の分子内水素結合 (図 1B) を形成しており、これらが活性立体配座の形成において重要であることが示唆された [Masuda, Y. *et al. J. Org. Chem.* **2017**, 82, 11447]。しかしながら、PF1171 類が実際に活性を発現する環境、つまり水系溶媒やカイコ血液における立体配座は、溶解度が非常に低いために解明されていなかった。

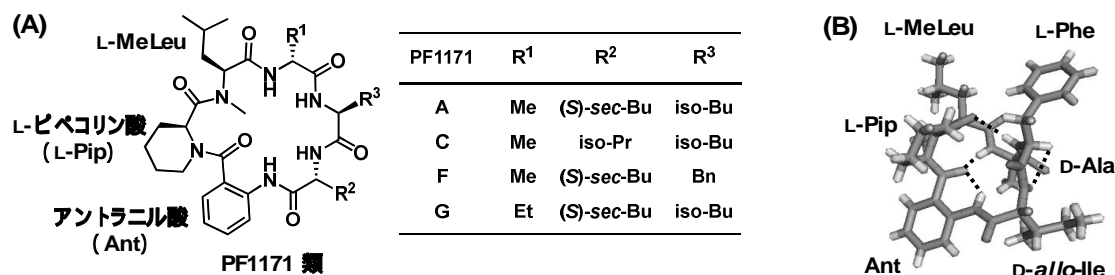


図 1 (A) PF1171 類の化学構造。(B) PF1171F の X 線結晶構造。点線は分子内水素結合を示す。

### 2. 研究の目的

本研究では、PF1171 類を安定同位体標識して生体環境中での立体配座を NMR により解析するとともに、アフィニティー精製や光親和性標識法を用いて PF1171 類の標的分子を同定することにより、PF1171 類がどのような立体配座をとることによりカイコ体内を巡り、標的分子と結合するかを解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

- (1) <sup>15</sup>N で標識した PF1171 類を化学合成し、カイコ血液中の立体配座を NMR により解析する。
- (2) アフィニティー精製法や光親和性標識法により、PF1171 類の標的分子を同定する。

### 4. 研究成果

(1) 分子内水素結合の形成に関わっている D-Ala、D-allo-Ile、L-Phe、Ant のアミド窒素を <sup>15</sup>N 標識した PF1171F (1, 図 2A) を合成し、リン酸緩衝液やカイコ血液におけるアミドプロトンの様子を NMR により解析した。<sup>15</sup>N 標識された L-Phe および Ant は購入し、購入が困難な <sup>15</sup>N 標識 D-Ala および D-allo-Ile は有機合成した (図 2B)。具体的には、脱離基であるトシル基を導入した α ヒドロキシ酸 2 に対して、<sup>15</sup>N 標識したベンジルアミンを求核置換反応させることにより 3 とした後、保護基の変換を経て目的とする保護アミノ酸 4 へと導いた。4 種類の <sup>15</sup>N 標識アミノ酸を、既に確立している PF1171 類の合成法 [Masuda, Y., *et al. J. Org. Chem.* **2014**, 79, 7844] に適用することにより、1 の合成を達成した。

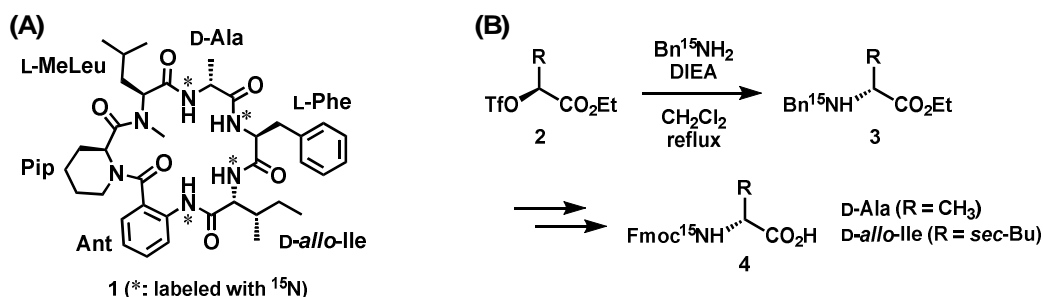


図 2 (A) <sup>15</sup>N 標識した PF1171F (1)。(B) <sup>15</sup>N 標識した Fmoc アミノ酸の合成。

(2) 合成した **1** をリン酸緩衝液( カイコ血液と同じ pH6.8 )に溶解し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N の二次元相関 NMR を測定した。本測定には 800 MHz の NMR 装置を使用し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N の二次元相関スペクトルを高感度で測定できる SO-FAST 法を用いた。その結果、主に 3 組の化学シフトが観測され、PF1171F のリン酸緩衝液中の主要な立体配座が 3 種類あることが判明した。これらの化学シフトは重クロロホルム中のものと大きく異なっていたことから、PF1171F が有機溶媒と水系溶媒で全く異なる立体配座を形成していることが明らかとなった。しかしながら、観測された立体配座がどのようなものかを解析することは困難であった。

一方、**1** をカイコ血液に溶解して同様の NMR 測定を行ったが、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 相関ピークは観測されなかった。その原因の一つとして、PF1171F が血液中の何らかの巨大分子に結合しているため、NMR シグナルの緩和が非常に速くなっていることが考えられた。

(3) リン酸緩衝液中における立体配座を解析するため、水溶性を向上させた PF1171F 類縁体を設計・合成することにより、水中における PF1171F の立体配座の NMR 解析を目指した。側鎖に水酸基を導入した水溶性類縁体 2 種を設計・合成した。合成した類縁体 2 種は PF1171F よりも水溶性が 7 倍程度向上した。重クロロホルム中の構造を NMR で解析したところ、PF1171F と同様の立体配座を形成していることが明らかになった。

(4) 側鎖に光反応基、アジド、ピオチンなどを導入した PF1171F 類縁体数種の合成が完了している。現在、PF1171F-ピオチン化合物をアビジンアガロース樹脂に固定化して、カイコ細胞破砕液のアフィニティー精製を行っている。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

- 1) D'Amato, A., Della Sala, G., Izzo, I., Costabile, C., Masuda, Y.\*, De Riccardis, F.\*: Cyclic octamer peptoids: simplified isomers of bioactive fungal cyclodepsipeptides. *Molecules* **2018**, 23, 1779. [ 査読有 ]  
DOI: 10.3390/molecules23071779
- 2) Doi, T.\*, Masuda, Y. Yoshida, M.: Natural products apratoxins A and C and their analogs. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* **2018**, 76, 1170–1175 [ 解説記事, 査読有 ].  
DOI: 10.5059/yukigoseikyokaishi.76.1170
- 3) Masuda, Y.\*, Tanaka, R., Ganesan, A., Doi, T.\*: Systematic analysis of relationship among 3D structure, bioactivity, and membrane permeability of PF1171F, a cyclic hexapeptide with paralyzing effects on silkworms. *J. Org. Chem.* **2017**, 82, 11447–11463. [ 査読有 ]  
DOI: 10.1021/acs.joc.7b01975
- 4) Onda, Y., Masuda, Y., Yoshida, M., Doi, T.\*: Conformation-based design and synthesis of apratoxin A mimetics modified at the  $\alpha,\beta$ -unsaturated thiazoline moiety. *J. Med. Chem.*, **2017**, 60, 6751–6765. [ 査読有 ]  
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00833
- 5) Masuda, Y., Maruyama, C., Kawabata, K., Hamano, Y., Doi, T.\*: Synthesis of (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyarginine and its inhibitory activity against nitric oxide synthase. *Tetrahedron* **2016**, 72, 5602–5611. [ 査読有 ]  
DOI: 10.1016/j.tet.2016.07.050
- 6) Masuda, Y., Aoyama, K., Yoshida, M., Kobayashi, K., Ohshiro, T., Tomoda, H., Doi T.\*: Design, synthesis, and biological evaluation of beauveriolide analogues bearing photoreactive amino acids. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 754–765. [ 査読有 ]  
DOI: 10.1248/cpb.c16-00095
- 7) Yoshida, M., Onda, Y., Masuda, Y., Doi, T.\*: Potent oxazoline analogue of apratoxin C: synthesis, biological evaluation, and conformational analysis. *Biopolymers (Peptide Science)* **2016**, 106, 404–414. [ 査読有 ]  
DOI: 10.1002/bip.22781
- 8) 増田裕一, 土井隆行: 生物活性環状ペプチド PF1171 類と apratoxin C の全合成と三次元構造解析. *化学工業* **2016**, 67, 18–25. [ 解説記事, 査読有 ]  
DOI: なし

[ 学会発表 ] ( 計 23 件 )

- 1) 田中 郁也, 柴田 果奈, 増田 裕一: アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成: ベンゼン環と配座固定の位置の検討. 日本農芸化学会 2019 年度大会, ( 東京農業大学, 東京 ) 2019 年 3 月 24 日 ~ 27 日. [ 口頭発表 3D3p11, 査読無 ]
- 2) 吉田 優香, 増田 裕一: Cherimolacyclopeptide E の全合成と生物活性評価. 日本農芸化学会 2019 年度大会 ( 東京農業大学, 東京 ) 2019 年 3 月 24 日 ~ 27 日. [ 口頭発表 3D3p07, 査読無 ]
- 3) Yuichi Masuda: 3D Structure-activity relationship study of naturally occurring peptides and its application to drug design. 第 10 回国際ペプチドシンポジウム / 第 55 回ペプチド討論会 ( ロームシアター京都, 京都 ), 2018 年 12 月 3 日 ~ 7 日. [ 日本ペプチド学会奨励賞受賞講演, AW-02 ]

- 4) 田中郁也, 柴田果奈, 増田 裕一: アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成. 日本農芸化学会 中部支部 第183回 例会(名古屋大学豊田講堂, 名古屋), 2018年9月15日. [ポスター発表 P38, 査読無, 中部支部企業奨励賞受賞]
- 5) 増田裕一, 佐野萌佳, 本田将也, 赤木謙一: 環状ペプチド PF1171F の生体内環境における立体配座の NMR による解析. 日本農芸化学会 2018 年度大会(名城大学, 名古屋) 2018 年 3 月 15 日~18 日. [口頭発表 3A14p06, 査読無]
- 6) 本田将也, 増田裕一: 環状ペプチド PF1171 ペンタペプチドと avellanin 類の全合成と生物活性評価. 日本農芸化学会 2018 年度大会(名城大学, 名古屋), 2018 年 3 月 15 日~18 日. 口頭発表 2A15a13, 査読無]
- 7) 田中郁也, 柴田果奈, 増田 裕一: アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成. 日本農芸化学会 2018 年度大会(名城大学, 名古屋), 2018 年 3 月 15 日~18 日. [口頭発表 2A15a12, 査読無]
- 8) Masaya Honda, Yuichi Masuda: Total synthesis and biological evaluation of PF1171B, D, E, and avellanins A, B, C. 第 54 回ペプチド討論会(大阪府立大学, 大阪府堺市), 2017 年 11 月 20 日~22 日. [ポスター発表 P-020, 査読無]
- 9) 増田裕一, 丸山千登勢, 川畑球一, 濱野吉十, 土井隆行: (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy arginine の合成と一酸化窒素合成酵素の阻害活性. 日本農芸化学会 2017 年度大会(京都女子大学, 京都府京都市). 2017 年 3 月 18 日 [口頭発表: 講演番号 2C15a10, 査読無]
- 10) 増田裕一: 環状ペプチドの三次元構造に着目した構造-活性相関研究. 第 51 回 天然物化学談話会(湯沢東映ホテル, 新潟県南魚沼郡). 2016 年 7 月 7 日 [口頭発表(ショートトーク), 査読有]

他 13 件(省略)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 環状デブシペプチド化合物

発明者: 土井隆行, 吉田将人, 増田裕一, 恩田勇一

権利者: 土井隆行, 吉田将人, 増田裕一, 恩田勇一

種類: 特許

番号: 特願 2016-027262

出願年: 2016 年

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.cc.mie-u.ac.jp/~masuda/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 赤木 謙一

ローマ字氏名:( AKAGI, Ken-ichi )

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。