

学位論文題名

シクロプロパン形 Grb2 SH2ドメイン
結合ペプチドミメティックの創製研究

学位論文内容の要旨

Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) は主要な細胞増殖シグナル伝達経路の一つである Ras/MAPK経路に関わる細胞内情報伝達系蛋白質であり、通常はGDP/GTP交換因子であるSosとの複合体として細胞質中に存在している。近年、特に乳がん細胞中で過剰発現が観察されている、EGFRおよびその変異体に端を発する細胞増殖経路において、Shc/Grb2/Sosを介した細胞増殖シグナル伝達が注目されている。このためGrb2に作用する阻害剤は細胞増殖シグナル伝達を遮断し、乳がん細胞の増殖を抑制する制がん剤としての応用が期待されている。

Grb2 SH2ドメインの基質となるShc由来Grb2 SH2ドメイン結合ペプチドのコア配列、pTyr-Val-Asn-Val部はGrb2と相互作用する際に β ターン構造と呼ばれる折れ曲がったコンフォメーションをとることが知られている。 β ターン構造は、多くの場合ターン内で水素結合を形成し、蛋白質のペプチド主鎖の進行方向を反転させるはたらきを持っている。この構造は蛋白質表面に多く存在することから、蛋白質—蛋白質間相互作用における分子認識に重要な役割を担っていると考えられており、新たな医薬品開発の鍵構造として注目されている。しかし、ペプチド化合物は生体内でのペプチダーゼによる分解や、高極性ゆえの膜透過性の低さ、体内分布などの問題からそのままでは医薬品としての利用は、多くの場合困難である。

これまでに Grb2 シグナル伝達阻害活性を有する化合物として報告されているものは、そのほとんどが環状ペプチドを母骨格としたミメティックであり、強い Grb2 結合親和性を有しているものの、分子量の大きさに起因する体内動態上の問題、ペプチダーゼによる分解や膜透過性の低さで行ったペプチド化合物特有の問題点は解決されていない。本論文では堅固で最小の環構造であるシクロプロパン環の特殊な立体構造に着目して、シクロプロパンを母骨格とした β ターンミメティックを創製することを着想した。即ち、Shc 由来 Grb2 SH2 ドメイン結合ペプチドのコア配列、pTyr-Val-Asn-Val の Val-Asn 間のペプチド結合をシクロプロパンにより置換し、ペプチド主鎖がシクロプロパンに対しシスの関係に制限することで、ペプチドミメティックは β ターン構造を模倣できる。また同時に、シクロプロパンによりペプチド結合を置換することで、極性の軽減による膜透過性の向上やペプチダーゼに対する耐性の獲得が期待できると考えた。さらに、たんぱく質とリガンドとの相互作用する際に起きる、誘導適合と呼ばれる構造変化に対応するため、小分子ペプチドミメティックには側鎖官能基の三次元配置に多様性を持

たせる必要であると考え、分子全体の構造を β ターン様に制限することを目的としたシス形ミメティックに加え、官能基の三次元配置に多様性をシクロプロパン形ペプチドミメティックに与えることを目的に、トランス形ミメティックも合わせて合成し Grb2 シグナル伝達阻害活性を評価することを計画した。

以上の考えを基に、pTyr-Val-Asn-Valのペプチド主鎖に対応する炭素鎖をシス及びトランスシクロプロパン骨格上に配置、同時にシクロプロパン隣接位に不斉点を持たせたシス形のみメティック4種およびトランス形のみメティック4種、計8種の立体異性体で構成されるシクロプロパン誘導体を、三次元的に多様性を備えたGrb2 SH2ドメイン結合低分子ペプチドミメティックとして合成することを計画した。即ち、この8種の何れかが、SH2ドメインとの結合に適する三次元構造を有するリード化合物となることを期待した。

(*R*)-エピクロロヒドリンから立体選択的にシクロプロパン環を構築後、Ellmanらにより開発された (*R*)-および (*S*)-*t*-ブタンスルフィニルイミンを用いたジアステレオ選択的な炭素鎖導入を鍵反応としてシス形4種およびトランス形4種、計8種の化合物をGrb2 SH2ドメイン結合ペプチドミメティックとして合成した。また(*S*)-エピクロロヒドリンより、同様にして対掌体の合成を行った。

合成したミメティックに対して水素結合形成能、および Grb2 に対する親和性活性を評価した。その結果、水素結合を形成しやすいのは1*R*,2*R*,1'*S*-シス形ミメティックであり、一方、Grb2 の機能阻害活性が高いのは1*R*,2*S*,1'*S*-トランス形ミメティック(IC₅₀ = 10.5 μ M)であると判明した。本ミメティックのGrb2 シグナル伝達阻害活性は決して高くはないが、 β ターンミメティックのリード化合物創出を目的としたシクロプロパンの特性と三次元的多様性に基づくアプローチの有効性を示した知見である。今後は、構造活性相関研究による Grb2 シグナル伝達阻害活性の向上が課題となる。

標的化合物合成の途上で、化合物中のアミド基に対する保護基の導入、除去において問題が生じた。アリル基は近傍の立体障害が大きいアミド基に対しても導入が容易であり、また酸性、塩基性など多くの反応条件下で安定な、有機合成上有用な保護基であるが、アミド基の保護基としては脱保護に問題があった。もし、アミド窒素上のアリル基を容易に除去できる一般的方法を開発できれば、目的のみメティックの合成にとどまらず、生物活性を有するペプチドをはじめとする様々な第二級アミド化合物の合成に有効に利用できると考え、第二級アミド窒素上のアリル基の穏和な条件下での脱保護法の開発を計画した。

著者は RuH 触媒の強力なオレフィンの異性化能に着目し、アミド窒素上アリル基の異性化とそれに続く酸化的解裂を経る効率的なアリル基の除去が可能であると考えた。

実際に RuH 触媒を用いたアミド窒素上アリル基の異性化とそれに続くオゾン酸化、塩基処理をワンポットで行える条件を考案し、高極性かつ多官能基なペプチド化合物 Cbz-Ala-Ala-OBn をアリル基で保護した基質を用いて反応を行った。その結果、Pd や Ir、Ni などさまざまな既存の脱アリル化法がいずれも未反応か、基質の分解という結果になったのに対し、新規に開発した脱保護法を適用したところ脱アリル体をワンポットで3工程70%という良好な収率で得た。さらに、側鎖がかさ高く、分子量が大きいジペプチド Cbz-Thr(OTBS)-Ala-OBn、Cbz-Pro-Ala-OBn、Cbz-Ala-Leu-OBn に対しても本法を適用する

ことで、脱アリル化体をそれぞれ 68%、75%、62%の収率で得られた。

以上、著者は第二級アミド窒素原子上アリル基の効率的な除去法を開発した。本法はワンポットで反応を行うことが可能であり、ジペプチドのような高極性、含多官能基化合物にも適用可能な汎用性の高い脱アリル化法である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	周 東	智
副 査	教 授	佐 藤	美 洋
副 査	准教授	有 澤	光 弘
副 査	准教授	齋 藤	望

学 位 論 文 題 名

シクロプロパン形 Grb2 SH2ドメイン 結合ペプチドミメティックの創製研究

Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) は主要な細胞増殖シグナル伝達経路の一つである Ras/MAPK 経路に関わる細胞内情報伝達系蛋白質である。Grb2 に作用する阻害剤は細胞増殖シグナル伝達を遮断し、乳がん細胞の増殖を抑制する制がん剤としての応用が期待されている。

Grb2 SH2 ドメインの基質となる Shc 由来 Grb2 SH2 ドメイン結合ペプチドのコア配列、pTyr-Val-Asn-Val 部は Grb2 と相互作用する際に β ターン構造と呼ばれる折れ曲がったコンフォメーションをとることが知られている。この構造は蛋白質表面に多く存在することから、蛋白質—蛋白質間相互作用における分子認識に重要な役割を担っていると考えられており、新たな医薬品開発の鍵構造として注目されている。しかし、ペプチドは生体内でのペプチダーゼによる分解や、膜透過性の低さ、体内分布などの問題からそのままでは医薬品としての利用は、多くの場合困難である。

梶原浩気は堅固で最小の環構造であるシクロプロパン環の特殊な構造に着目して、シクロプロパンを母骨格とした β ターンミメティックを創製することを着想した。即ち、Shc 由来 Grb2 SH2 ドメイン結合ペプチドのコア配列、pTyr-Val-Asn-Val の Val-Asn 間のペプチド結合をシクロプロパンにより置換し、ペプチド主鎖がシクロプロパンに対しシスの関係に制限することで、ペプチドミメティックは β ターン構造を模倣できる。また同時に、シクロプロパンによりペプチド結合を置換することで、極性の軽減による膜透過性の向上やペプチダーゼに対する耐性の獲得が期待できる。さらに、たんぱく質とリガンドとの相互作用する際に起きる、誘導適合と呼ばれる構造変化に対応するため、小分子ペプチドミメティックには側鎖官能基の三次元配置に多様性を持たせる必要であると考え、分子全体の構造を β ターン様に制限すること

を目的としたシス形ミメティックに加え、官能基の三次元配置に多様性をシクロプロパン形ペプチドミメティックに与えることを目的に、トランス形ミメティックも合わせて計8種の立体異性体合成し、Grb2 シグナル伝達阻害活性を評価することを計画した。何れかが、SH2 ドメインとの結合に適する三次元構造を有するリード化合物となることを期待した。

(*R*)-エピクロロヒドリンから立体選択的にシクロプロパン環を構築後、Ellman らにより開発された (*R*)-および (*S*)-*t*-ブタンスルフィニルイミンを用いたジアステレオ選択的な炭素鎖導入を鍵反応としてシス形4種およびトランス形4種、計8種の化合物をGrb2 SH2 ドメイン結合ペプチドミメティックとして合成した。また(*S*)-エピクロロヒドリンより、同様にして対掌体の合成を行った。

合成したミメティックに対して水素結合形成能、および Grb2 に対する親和性活性を評価した。その結果、水素結合を形成しやすいのは 1*R*,2*R*,1'*S* シス形ミメティックであり、一方、Grb2 の機能阻害活性が高いのは 1*R*,2*S*,1'*S* トランス形ミメティック(IC₅₀ = 10.5 μM)であると判明した。本ミメティックの Grb2 シグナル伝達阻害活性は決して高くはないが、βターンミメティックのリード化合物創出を目的としたシクロプロパンの特性と三次元的多様性に基づくアプローチの有効性を示した重要な知見である。

さらに、標的化合物合成の途上で、化合物中のアミド基の保護基において問題が生じたことを契機に新規なアリル基の脱保護法を開発した。アリル基は近傍の立体障害が大きいアミド基に対しても導入が容易であり、また酸性、塩基性など多くの反応条件下で安定な、有機合成上有用な保護基であるが、アミド基の保護基としては脱保護に問題があった。もし、アミド窒素上のアリル基を容易に除去できる一般的方法を開発できれば、目的のミメティックの合成にとどまらず、生物活性を有するペプチドをはじめとする様々な第二級アミド化合物の合成に有効に利用できると考え、第二級アミド窒素上のアリル基の穏和な条件下での脱保護法の開発を計画した。種々検討の結果、RuH 触媒を用いたアミド窒素上アリル基の異性化とそれに続くオゾン酸化、塩基処理をワンポットで行える方法を開発した。本法は目的物合成に有効であり、さらに、ジペプチドのような高極性、含多官能基化合物にも適用可能な汎用性の高い脱アリル化法であることを明らかにした。

これらの成果は創薬化学上の意義は高く、またその発展に大いに寄与するものであり、博士(生命科学)の学位を授与するに値するものと判断した。