

生体分子の副互変異性体存在仮説を実証するための研究 Study for the tautomerization of biologically active substrates

研究代表者 富山医科薬科大学薬学部・講師 柴田哲男

Lecturer, Dr. Norio Shibata

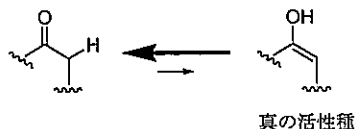
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical & Pharmaceutical University

Abstract: Design and synthesis of minor tautomer analogues (pseudo-logues, we named) of tryptophan and tyrosine are described. Tryptophan is known to exist in three tautomeric forms, i.e., indole-type, indolenine-type and cyclic-type structures. However tryptophan is generally isolated solely as indole-form, it is impossible to estimate the biological activity of other minor tautomers. The similar phenomenon can also be estimated the tyrosine. You can imagine the rapid equilibrium between the phenol form and the corresponding keto form of tyrosine. However there is no evidence for the existence of such keto form of tyrosine even *in vitro*, probably due to the aromaticity. In order to clarify the biological properties of these minor tautomers of tryptophan and tyrosine, we designed the pseudo-logue of tryptophan, 3a-fluoro-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-pyrrolo[2,3-b]indole-2-carboxylic acid (15), and the pseudo-logue of tyrosine, 2-amino-3-(1-fluoro-4-oxo-cyclohexa-2,5-dienyl)-propionic acid (3). The synthesis of pseudo-logue of tryptophan was accomplished by the treatment of tryptophan with Selectfluor in acetonitrile in good yield. The pseudo-logue of tyrosine was also synthesized in good yield by the reaction of tyrosine under the same conditions.

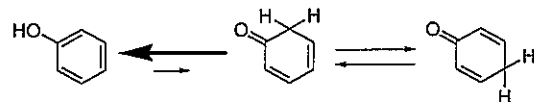
1. 研究目的

有機化学の常識において、ケトンは溶液状態にて、そのエノール型のものとの平衡混合物として存在する。これはケト-エノール互変異性としてよく知られている。しかし、そのエノール型のみを単離することは困難であり、通常はケト型として確認される。同様のことはフェノールについてもいえる。フェノールの場合、そのキノン型のものとの平衡状態にあると考えられるが、やはり確認することは困難である。

ケト/エノール互変異性

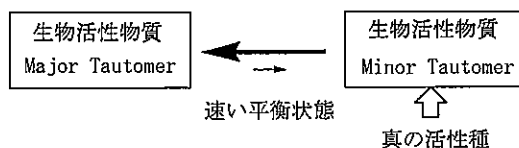


フェノール/ジオノン互変異性



しかしながら、有機化学の反応場において、遷移状態として考えられるのは、常にそのマイナーな異性体、副互変異性体の方である。では、このことを生体反応について当てはめるとどのようなことになるのであ

副互変異性体存在仮説



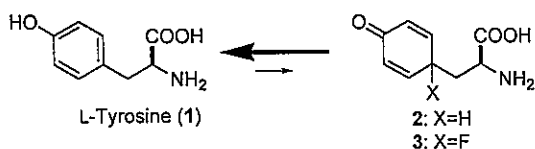
ろうか。仮説はつぎのようになる。代謝過程における重要分子の多くは平衡状態にある一対の互変異性体として存在し、多量に存在する主異性体は副異性体と比べてエネルギー的には圧倒的に有利である。そのため平衡は極端に片寄っており、通常、極微量の副異性体を検出することはできない。しかし、化学反応の現場ではこの副異性体がしばしば真の反応種となることが反応機構等の研究からわかっており、同様の現象が生体内でも起こり得ると考えられる。すなわち、ある種の酵素や受容体に作用する真の反

応種は、副異性体の構造である可能性がある。しかしながら、このような概念を提唱した例はない。もしこの仮説が実証されれば、基質活性の機構にも新たな経路を提供することになる。更に阻害剤や拮抗剤の開発に際しては、主異性体構造のミミック体を探索する従来法ではなく、副異性体の構造に基づいてデザインする必要性が生じる。基質またはリガンドの結合部位における詳細な状況を知ることは現時点では困難であるので、先ず副異性体に対応する安定型相似体の設計と合成を行い、その生物学的試験で得られる間接的証拠から、この「副異性体存在仮説」を実証することとする。標的化合物としてアミノ酸であるチロシンおよびトリプトファンを選定し、本研究を開始した。

2. 研究経過

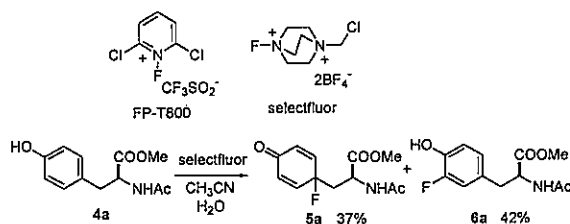
2-1. チロシン副互変異性等価体の分子設計と合成

チロシン (1) は、フェノール構造を持つため、そのジェノン型互変異性体 2 が考えられる。しかしながら、2 は、フェノール構造のもと速い平衡状態にあり検出できない。そこでキノン部分の水素をフッ素で置き換えた含フッ素ジェノン体 3 を設計した。3 はフッ素原子の疑似効果から、ジェノン型互変異性体 2 の安定型相似体となり、副異性体の絶好のモデルとなり得る。



合成は以下のように行った。まず、フッ素化試薬 $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{OF}$ を用いてアセチルチロシンメチルエステル 4a のフッ素化を行ったところ、ごくわずかではあるが目的のフルオロジェノン体 5a が得られた。次に FP-T800 と反応させたが、今度は、フェノール部のオルト位がフッ素化された 6a が得られたのみであった。そこで反応溶媒、フッ素化試薬などを種々検討した結果、アセトニトリル/水溶媒中、Selectfluor によるフッ素化を施したところ、目的のフルオロジ

エノン体 5a が 6a との約 1 : 1 の混合物で得られることがわかった。なお、両者は、カラムクロマトグラフィーにて分離精製することができた。

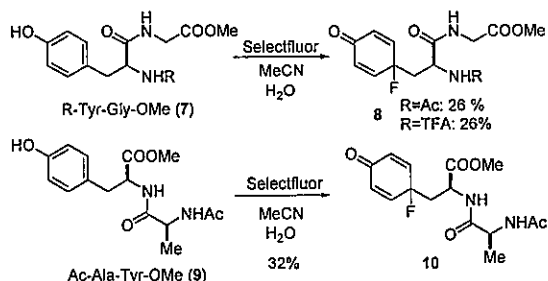


次にチロシンの保護基を変えて同様の反応を検討した。その結果、保護基の種類に関わらず、40% 弱の収率で対応するフルオロジェノン体を与えた。

Table 1. Reaction of Tyrosines 4 with Selectfluor

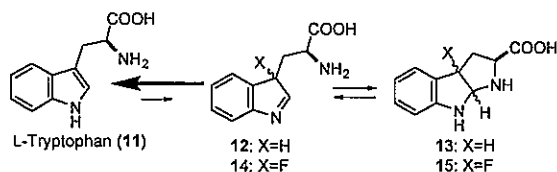
R'	R''	yield (%)	yield (%)
Me	TFA	39	31
Me	Fmoc	26	22
Bn	CBZ	34	26
Et	Ac	25	34

チロシンのフルオロジェノン体が安定であることが明らかとなったので、次に含チロシンペプチドに本反応を応用することとした。すなわち、Tyr-Gly 7 および Ala-Tyr 9 を用いて Selectfluor によるフッ素化を行ったところ、期待通り、目的のジェノン型チロシンを含むジペプチド 8 および 10 が得られた。



2-2. トリプトファン副互変異性等価体の分子設計と合成

トリプトファン (11) の場合, 生体内では右に示したような, 互変異性体 12 および環状互変異性体 13 との平衡混合物として存在すると仮定できる. 12 および 13 は 2 種類のジアステレオマーが存在することになるため, ジアステレオマー間で生物活性に差が認められる可能性が高い. すなわち, 特定部位の絶対配置が逆の, 互いにジアステレオマーの関係にある二つの異性体に特異的な, 全く別の生理活性の発現を追求することが可能となるため, より興味深い標的といえる. そこでこの仮説を具体化する方策として, この場合もフッ素原子で, 反応に関与する水素原子を置き換えることとした.



また, 上記互変異性体 12 の相似体として, フルオロオキシインドール 16 もあわせて設計した. 16 は, 2 位の炭素原子が sp^2 構造を持ち, 立体化学的に活性中間体 12 に極めて近い. 実際, 12 と 16 の 3 次元構造を計算ソフト MM2 を用いて比較したところ, 両者は立体化学的に近似していることが判明した.

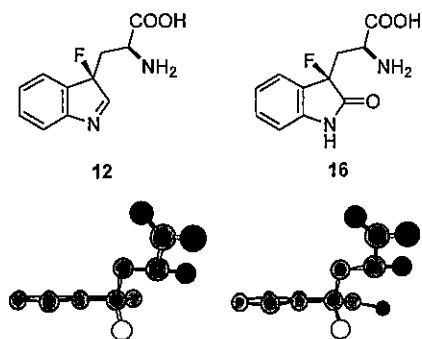
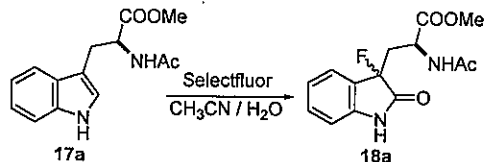


Figure 1. 12, 16の MM2 計算による解析図

ところで, インドール骨格の 3 位にフッ素原子を導入する方法はあまり報告されていない. 我々は,

種々条件を検討したところ, 先のチロシンの場合と同条件において, 17a がフルオロオキシインドール 18a に一挙に変換できることを見出した.

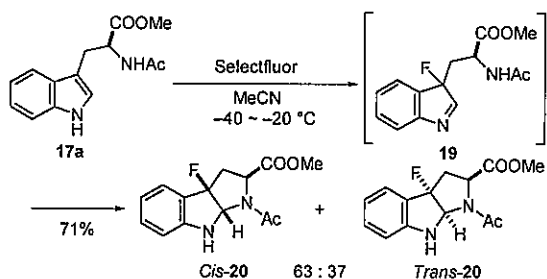


本法は, トリプトファンのみならず, インドール骨格を持つ化合物に適応可能な, 興味深い新規な反応になる可能性が高い. そこで種々の置換基を 3 位にもつインドール類を用いて, 本反応の一般性を検討した. 結果を Table 2 に示す. いずれも置換基の種類に関わらず収率良く対応するフルオロオキシインドールが得られた.

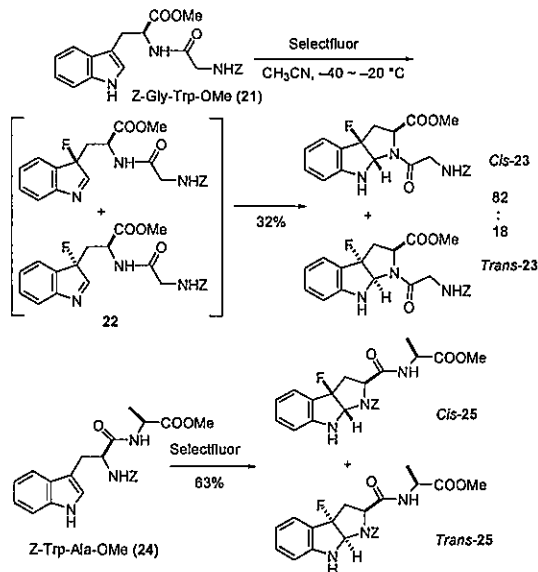
Table 2. Preparation of 3-Fluorooxindoles 18 from Indoles 17

entry	R	R'	yield (%)
1	Me	H	71
2	CH ₂ CH ₂ COOMe	H	82
3	CH ₂ COOMe	H	75
4	CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOMe	H	77
5	CH ₂ CH ₂ OAc	H	71
6	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OAc	H	69
7	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OAc	H	64
8	CH ₂ CH ₂ NPhth	H	71
9	CH ₂ CH ₂ CH(NHAc)COOMe	H	70
10	CH ₂ CH ₂ CH(NH ρ NB)COOMe	H	92
11	CH ₂ CH ₂ NPhth	OAc	82

さて, 最後にトリプトファン環状互変異性相似体である 15 の合成を検討した. 先のフルオロオキシインドール合成の際, アミド酸素の供給源となる水が補助溶媒として必須である. 従って, 無水条件下で本反応を行えば, 目的の互変異性等価体が得られる可能性が高い. そこで, 先の反応を無水条件下で行うこととした. まず, トリプトファンメチルエステル 17a を無水アセトニトリル中, セレクトフロアールと -20°C にて反応させた. その結果, 期待通り, 環状互変異性相似体 20 を 71% の収率でジアステレオマーの混合物として得ることに成功した.



次に、この環状互変異性体をペプチド構造に組み込むため、本反応をジペプチドを用いて行うこととした。すなわち、Gly-Trp 21 を同様の条件にてセレクトフロアールと反応させたところ、ジペプチド内にトリプトファン環状互変異性等価体構造を有する化合物 23 が 32% の収率で得られた。さらにトリプトファンのC末端から伸びた Trp-Ala 24 を用いても反応は首尾よく進行し、標的化合物 25 を 63% で得ることができた。



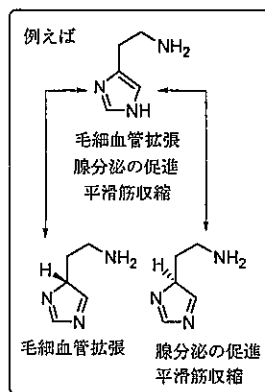
3. 研究成果

チロシンおよびトリプトファン副互変異性等価体の合成に成功した。

4. 今後の課題と発展

生命現象を分子の視点で把握することを究極目標

に、生体内最重要物質であるアミノ酸を中心にその生物学的等価体として、含フッ素体の分子設計および合成を行ってきた。本概念の適応はアミノ酸やペプチド化合物だけにとどまらない。生体分子や生理活性分子には、インドール骨格を持つものや、フェノール性水酸基を有する分子が数多く知られている。これらすべての生理活性発現に関して、本仮説が当てはまる可能性は極めて高い。となれば、これまでの創薬において行われているドラッグデザインの考え方を根本的に覆すものとなる。すなわち、創薬関係に携わる研究者にとって、生物活性分子と受容体との構造活性相関を考える際、必ず、その副互変異性体について考察しなければならないといえる。



例えばヒスタミンがH1やH2ブロッカーとして作用する際に活性に選択性が発現出来ない（言い換えれば、副作用を抑えることが出来ないこと）のは、副互変異性体に変化した際に、不斉中心が生じるため2種類の分子として作用している可能性が否定できないということである。本仮説を実証するため、数多くの生体重要分子の副互変異性等価体を合成し、生物活性の試験を行い、さらには、得られた成果を基に、新型医薬品の設計の新概念確立を目指したい。

5. 発表論文リスト

Y. Takeuchi, T. Tarui & N. Shibata; A novel and efficient synthesis of 3-fluorooxindoles from indoles mediated by selectfluor. *Org. Lett.* 2000, 2, 639—642.