C-P ペプチド†

山 内 清

(大阪市大工学部生物応用化学科)

1. はじめに*

下等な生物, 特に進化から取り残されたような微生物や動植物から思いがけない成分が発見されることがある. 1959 年に報告された (2-aminoethyl)phosphonic acid (シリアチン) (1, AEPn) もその 1 つであろう⁽¹⁾. 当時, 生体リン化合物はすべてリン酸型として存在すると考えられていたが, この分子内塩は C-P 共有結合を有していたのである. その後, 種々の生物 (主に微生物) より多様な構造の C-P 態リン化合物が単離され, それらは分子量は小さいものの, ペプチドの体裁を成しさまざまな生物活性を示すことがわかった. また, これらの発見に前後して, 筆者を含む多くの研究者は一般に $\text{NH}_2\text{-R-PO}_3\text{H}_2$ 構造を持つアミノホスホン酸をペプチドの修飾物質として扱ってきたが, 通常のペプチドには発現しない生物活性と強い効果を認めることができた. 本稿では天然と人工 C-P ペプチドの最近の研究について, 合成と生物活性に焦点を当てつつ, 紹介する.

2. 合 成

ホスホペプチドの化学合成法については文献 2 に詳しいので参考にされたい. 成分のアミノホスホン酸は鏡像体であることが望ましいが, ラセミ体を出発物質として酵素を利用した光学活性ホスホペプチドの合成法が最近報告された^(3,4) (式 1). DL-アミノホスホン酸のうち L 型のみが基質として利用される. 例えば, Cbz-L-Ala (615 g) と 4 倍モルの AlaP diethyl ester のラセミ

体 (2000 g) を四塩化炭素 (19 l)/水 (5 l) に分散したところにパパイン (600 g; 50 nkat/mg) を添加し, システイン (緩衝液成分ならびに酵素の安定化剤) の存在下, pH 4.5 にて 15 時間, 50°C の加温を続けると, 生成物は有機溶媒層に分配されて, 酸処理の後, LL 体の (1-aminoethyl)phosphonylalanine (Alaphosphin) が 65% の収率で得られる. Cbz 化ジペプチドも原料に使うことができる.

また, 化学合成法ではホスホン酸基の保護基 [例えば前駆体 Cbz-AlaP (OMe) Ala (OEt) の Me, Et 基な

- 3a: r=H, R=H
 3b: r=H, R=CH₃
 3c: r=H, R=CH₂C₆H₅
 3d: r=CH₃, R=CH₂C₆H₅

† Peptides Bearing C-P Bond.

Kiyoshi YAMAUCHI (Department of Bioapplied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558, Japan)

* 略号. ap: アミノホスホン酸; AEPn: (2-アミノエチル)ホスホン酸 (1); GlyP, AlaP, TyrP, Ala-AlaP など; グリシン, アラニン, チロシン, Ala-Ala などに対応するアミノホスホン酸やホスホペプチド類似体; AEPn (OMe) など括弧内はホスホン酸基部の置換基を示す; K₁: 阻害定数.

ど」の除去には厳しい加水分解条件を使わねばならず、改良すべき問題を含んでいるが^(6,9), phosphodiesterase, alkaline phosphatase, alkaline peptidase を用いた脱保護化が報告された⁽⁷⁾。アミド結合も α -chymotrypsin により切断することができる。ホスホノペプチドの酵素合成法は今後の発展が期待されるだろう。

3. 生物活性

ホスホノペプチドの生物活性として抗菌、除草、酵素阻害に関する報告が多い。活性の源泉は、おおむね、特定アミノ酸残基に類似した構造のアミノホスホン酸が酵素やタンパク受容体などの活性中心に対して、真性基質よりも可逆的に強く結合し拮抗することによる。

3-1. 天然ホスホノペプチド

天然ホスホノペプチド等の C-P ペプチドと生物活性例を表 1 に示す。日本人の寄与が大きい、Antibiotic K シリーズは右端に tyrosine のアミノホスホン酸型 (2, Tyr P) を持っている⁽⁶⁾。他のアミノ酸のアミノホスホン酸アナログにも興味が集まるゆえんである。Bialaphos (phosphinothricylalanylalanine) は放線菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) の生産する除草活性等を有する抗生物質であるが、グラム陽性細菌のみならずグラム陰性細菌にも効果がある。合成経路も調べられた^(9,10)。Bialaphos の phosphinothricin 部のみの活性は低い。Fosfazino-

mycin はホスホノアミド結合を持っている抗生物質である。

3-2. 人工ホスホノペプチド

天然ホスホノペプチドで示されたように生物活性を示すアミノホスホン酸 (ap) が疎水性のアミノ酸やオリゴペプチドに連結すると、その活性が助長される傾向が見られる。合成品には ap-peptide, peptide-ap-peptide, peptide-ap の結合様式が考えられるので構造と活性に設計の工夫を要するところである。代表的なものは 1978 年にイギリスのロシュ会社がグラム陰性細菌に対する強力な抗生物質 [グラム陽性細菌にも有効] として発表した Ala-AlaP (Alaphosphin) である (最小阻止濃度: *E. coli* E 73, 0.03 $\mu\text{g/ml}$; *K. aerogenes* K 5, 0.5 $\mu\text{g/ml}$; *Salmonella typhimurium* S 394, 1.7 $\mu\text{g/ml}$)⁽¹¹⁾。アラニンと結合することにより容易にバクテリア細胞膜を透過した有効成分の Alaphosphin はペプチダーゼにより AlaP を放出し、これが細胞壁成分のペプチドグリカンの生合成を阻害するとされている。ホスホノペプチドでの付属アミノ酸残基、ペプチド残基は Ala, Ala-Ala のように親油性に富み、ペプチドグリカンのペプチド鎖に似せているようだ。

酵素阻害効果も多数報告された。著者らは AEPn (1) を持つホスホノジペプチド [Cbz-AEPn(OH)-aa

表 1 代表的な天然 C-P ペプチド

C-P ペプチド	由 来	生 物 活 性	文 献
CH ₃ C(O)-Ile-Tyr-TyrP (antibiotic K-4)	<i>Actinomadura spiculosphora</i>	hypotensive effect	8
(L) CH ₃ P(O)CH ₂ CH ₂ CHC(O)-Ala-Ala OH NH ₂ (Bialaphos)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	herbicide fungicide bactericide mitocide	9 20~22
(D) Ala-(aa)-NHCHCH=CHCH ₂ P(O)(OH) ₂ COOH Plumbemycin A (aa=Asp) and B (aa=Asn)	<i>Streptomyces plumbeus</i>	L-threonine antagonist	23
X-NH(CH ₂) ₃ CHC(O)-NHN-P(O)CHCO ₂ CH ₃ NHR CH ₃ OH OH Fosfazinomycin A (R=valyl) and B (R=H) X=NHC(=NH)NH ₂	<i>Streptomyces lavendofoliae</i>	fungicide	24

表 3 アミノホスホン酸の酵素阻害

アミノホスホン酸	酵 素	$K_i(\mu\text{M})$	文献
(D) L-ValP(OH)-OH	Leucine aminopeptidase	1.2(pH8)	6, 25
(L) LeuP(OH)-OH*		0.23	
(D) LeuP(OH)-OH		220	
(L) LeuP(OMe)-OH		320	
(D, L) $n\text{-C}_7\text{H}_{15}\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{PO}_3\text{H}_2$	D-Alanine : D-alanine ligase	0.5	26
(D) $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$		510(pH7.9)	
(D-Cycloserine)		(250)	

* Bestatin アナログ (K_i , 0.6 nM).

表 4 ホスホノペプチドの酵素阻害

ホスホノペプチド	酵 素	阻害活性 (μM)	文献
Pro-His-Pro-Phe-His-LeuP($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$)-Val-Ile-His-Lys	Renin (Aspartyl protease)	$\text{IC}_{50}(\text{pH7.2})$ 0.075	27
Ac-GlyP(OH)-Phe-Met	Enkephalinase Angiotensin converting enzyme	$K_i(\text{pH7.6})$ 0.14 3.4	28
Bz-GlyP(OH)-Ala-Pro	Angiotensin converting enzyme	$K_i(\text{pH7.5})$ 10	29
Cbz-GlyP(OH)-Phe	Carboxypeptidase A	$K_i(\text{pH7.5})$ 0.09	19
Cbz-AEP _n (OH)-Phe	Carboxypeptidase A	$K_i(\text{pH7.5})$ 0.01~0.007	12
Cbz-GlyP(OH)-Leu-Ala-Gly	Collagenase	$K_i(\text{pH7.5})$ 14	30
Cbz-GlyP(OH)-Leu	Thermolysin	$K_i(\text{pH7.5?})$ 0.009 (Cbz-Gly-Leu, K_m , 2600)	31

が(ホスホノアミド切断の中間体である) 5 配位のリン原子を許容しえないからと思われる。その他のアミノホスホン酸やホスホノペプチドの種々の酵素に対する阻害効果を表 3 と表 4 に掲げる。遷移中間体型阻害剤として説明されているものが多い。

4. おわりに

原生動物テトラヒメナのタンパク分画が AEP_n (1) を含み、それがプロナーゼおよびトリプシン耐性であるという⁽¹³⁾。類似の高分子成分が海洋プランクトンや海産

生物等に発見されている^(14,15)。上記したようなメカニズムで AEP_n を持つ天然タンパクが分解酵素に対して耐性を示すなら、AEP_n は水棲生物の表面膜を外部環境から守る自己防衛機能の役目を果たすとの説は現実味を帯びる。原始地球は還元的富水素大気に包まれ、かつ苛酷な環境を呈していたが、その頃の微生物の細胞膜成分の脂質は炭化水素鎖部が飽和型であり、耐熱性、耐酸性、耐塩性と見なされるものが多い^(16,17)。AEP_n など C-P 化合物も酸素数の少ないリン原子から成り、かつ化学的に安定であるので、環境に適応すべく、C-O-P 化合物の始原的化合物として前駆した可能性が考えられよう。

† AEP_n (1) はホスホン酸エステル結合やアミド結合などで(糖)タンパクに連結している可能性が指摘されている。P(O)-NH 結合様式を示すデータは得られていないが、否定もできない。P(O)-N 結合は不安定なため(加水分解による室温での半減期: pH8.5, 数日; pH5.5~6 時間; pH3~6, 2~6 時間; pH2, 数分)^(5,18)、アミノホスホン酸を含むペプチドは、存在したとしてもそれを欠いた形か、右末端に持つのみ分離されると考えられるからである。単離されたホスホノペプチドはアミノホスホン酸を右末端に有するものが多い。ホスホノアミド結合の不安定性を逆利用して、原料が分解して効果が発揮する酵素阻害剤が考案されている⁽¹⁹⁾。

- (1) M. Horiguchi and M. Kandatsu : *Nature*, **184**, 901 (1959).
- (2) 山内 清 : 有機合成化学協会誌, **46**, 654(1988).
- (3) J. L. Moriniere, B. Danree and A. Guy : *Eur. J. Med. Chem.*, **22**, 347 (1987).
- (4) M. Le Breton, J. L. Moriniere, B. Danree, O. Chasseray, C. Rousseau and J. Y. Lacolle : *Eur. Pat. Appl. EP 209,430*; *Chem. Abstr.*, **108**, 4678 b (1988).
- (5) K. Yamauchi, S. Ohtsuki and M. Kinoshi-

- ta : *J. Org. Chem.*, **49**, 1158 (1984).
- (6) P. P. Giannousis and P. A. Bartlett : *J. Med. Chem.*, **30**, 1603 (1987).
- (7) I. A. Natchev : *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1989**, 125.
- (8) H. Kase, M. Yamato, T. Koguchi, R. Okachi, M. Kasai, K. Shirahata, I. Kawamoto, K. Shuto, A. Karasawa, T. Deguchi and N. Nakayama : *Eur. Pat. Appl. EP 61,172* (1982) ; *Chem. Abstr.*, **98**, 17793 m (1983).
- (9) H. Seto, S. Imai, A. Satoh, M. Kojima, S. Inoue, T. Suzuki and N. Otake : *J. Antibiot.*, **36**, 96 (1983).
- (10) T. Hidaka, S. Imai, O. Hara, H. Anzai, T. Murakami, K. Nagaoka and H. Seto : *J. Bacteriol.*, **172**, 3066 (1990).
- (11) J. G. Allen, F. R. Atherton, M. J. Hall, C. H. Hassall, S. W. Holmes, R. W. Lambert, L. J. Nisbet and P. S. Ringose : *Nature*, **272**, 56 (1978).
- (12) K. Yamauchi, S. Ohtsuki and M. Kinoshita : *Biochim. Biophys. Acta*, **827**, 275 (1985).
- (13) H. Rosenberg : *Nature*, **203**, 299 (1964).
- (14) 堀 太郎, 堀口雅昭編 : C-P 化合物の生化学, 学会出版センター, 1978.
- (15) T. Hori, M. Horiguchi and A. Hayashi, ed. : "Biochemistry of Natural C-P Compounds," Maruzen, 1984.
- (16) M. Rosa, A. Gambacorta and A. Gliozzi : *Microbiol. Rev.*, **50**, 70 (1986).
- (17) K. Yamauchi, Y. Sakamoto, A. Moriya, K. Yamada, T. Hosokawa, T. Higuchi and M. Kinoshita : *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3188 (1990).
- (18) N. E. Jacobsen and P. A. Bartlett : *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 654 (1981).
- (19) R. E. Galardy and D. Grobelny : *J. Med. Chem.*, **28**, 1423 (1985).
- (20) E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hagele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. König and Z. Zaher : *Helv. Chim. Acta*, **55**, 224 (1972).
- (21) Y. Ogawa, S. Inoue and T. Niida : *Jpn. Kokai*, **7**, 391, 019 (1973) : *Chem. Abstr.*, **81**, 4070 t (1974).
- (22) 文献 14, p. 40.
- (23) B. K. Park, A. Hirota and H. Sakai : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 161, 573 (1977).
- (24) T. Ogita, H. Gunji, Y. Fukusawa, A. Tera-shita, T. Kinoshita, M. Nagaki and T. Bep-pu : *Tetrahedron Lett.*, **24**, 2283 (1983).
- (25) B. Lejczak, K. Kafarski and J. Zygmunt : *Biochemistry*, **28**, 3549 (1989).
- (26) P. K. Chakravarty, W. J. Greenlee, W. H. Parsons, A. A. Patchett, P. Combs, A. Roth, R. D. Busch and T. N. Mellin : *J. Med. Chem.*, **32**, 1886 (1989).
- (27) M. C. Allen, W. Fuhrer, B. Tuck, R. Wade and J. M. Wood : *J. Med. Chem.*, **32**, 1652 (1989).
- (28) R. L. Elliot, N. Marks, M. J. Berg and P. S. Portoghese : *J. Med. Chem.*, **28**, 1208 (1985).
- (29) R. E. Galardy, V. Kontoyiannidou-Ostrem and Z. P. Kortylewicz : *Biochemistry*, **22**, 1990 (1983).
- (30) K. A. Mookhtiar, C. K. Marlowe, P. A. Bartlett and H. E. Van Wart : *Biochemistry*, **26**, 1962 (1987).
- (31) P. A. Bartlett and C. K. Marlowe : *Biochemistry*, **22**, 4618 (1983).