

論文内容の要旨

論文題目 単純化ポリ環状エーテルの設計と合成および
そのタンパク質、ペプチドとの相互作用の評価

(Design and Synthesis of Simplified Polycyclic Ethers and
Evaluation of their Interaction with Proteins and a Peptide)

氏名 佐々木 真聡

Brevetoxin B (Figure 1)の構造決定に端を発した縮環型ポリ環状エーテル天然物は、近年になり培養渦鞭毛藻やこれらを食餌とすると思われる魚介類より数多く報告されている。この中でbrevetoxin類、ciguatoxin類は電位感受性ナトリウムチャンネル(VSSC)に作用して毒性を示すことが知られているが、それ以外の化合物はその構造の類似性にもかかわらず異なる生物活性を示すものもある。それらの標的分子はVSSCへの作用からの類推により膜タンパク質であると考えられるが、いまだ決定されていない。その原因としてこれらの化合物は天然からの供給がわずかであり、加えてその構造の複雑さから大量合成が困難であることがあげられる。

筆者はこれまでの研究から膜タンパク質に対するポリ環状エーテルに共通する認識機構を想定し、このことを示すためにbrevetoxin Bを用いてVSSC以外の膜タンパク質との特異的結合を確認すべく競争阻害実験を行った。またこれら相互の一般的分子認識を検証すべく、量的調達が可能な単純化ポリ環状エーテルを合成し、その評価を行った。

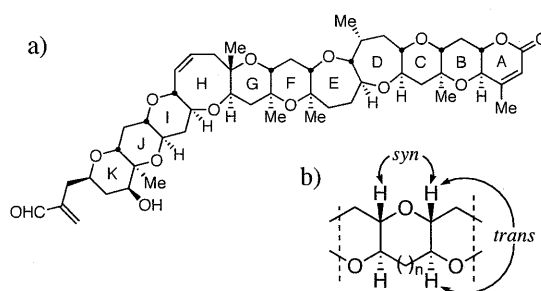


Figure 1. (a) Structure of brevetoxin B and (b) common structural feature of polycyclic ethers.

1. ポリ環状エーテルによる一般的分子認識の検証

本研究で想定したポリ環状エーテルに共通する分子認識が存在するならば、VSSCに結合するbrevetxoin Bがそれ以外の膜タンパク質に対しても結合すると考えられる。そこでVSSCの発現はないとされる赤血球に対し、トリチウム標識および非標識brevetoxin Bを用いた競争阻害実験を行ったところ、特異的結合を検出した(Figure 2)。この結合は細胞質成分を除いた赤血球ゴーストでも見いだされたことから膜タンパク質に対するものである。また、マウス白血病細胞P388においても同様の結果を得た。この細胞もVSSCの発現はないとされるため、この結果からbrevetoxin BのVSSC以外の膜タンパク質への結合が示唆され、想定した分子認識機構を支持する結果を得た。

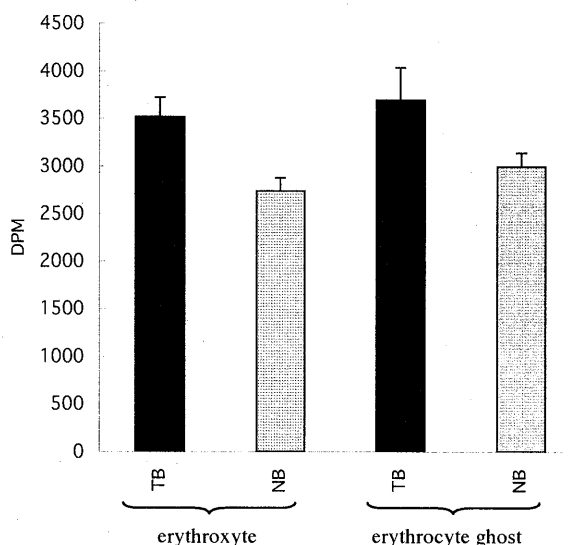
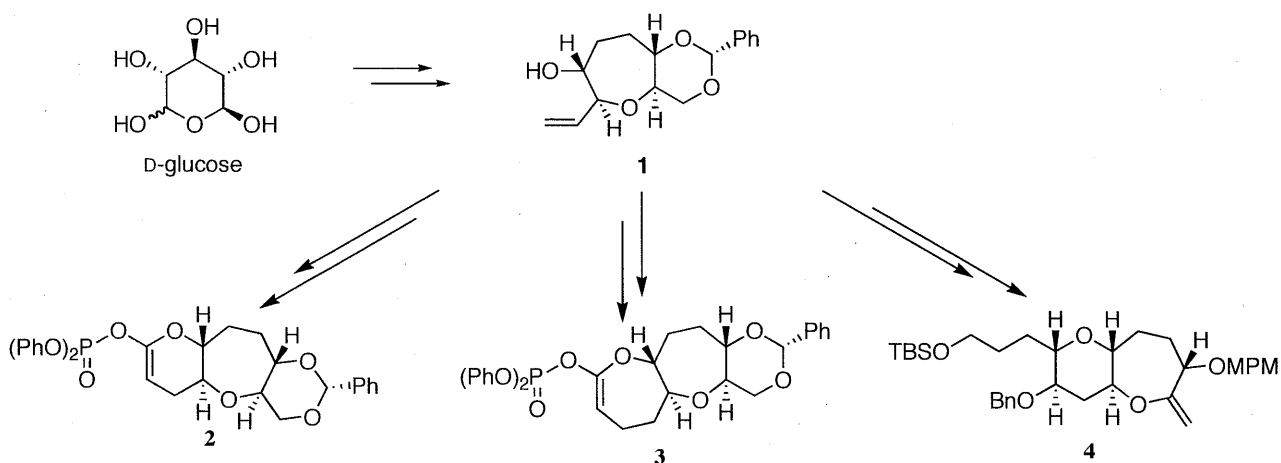


Figure 2. Specific binding of brevetoxin B to erythrocytes and their membranes.

(TB: total binding, NB: nonspecific binding)

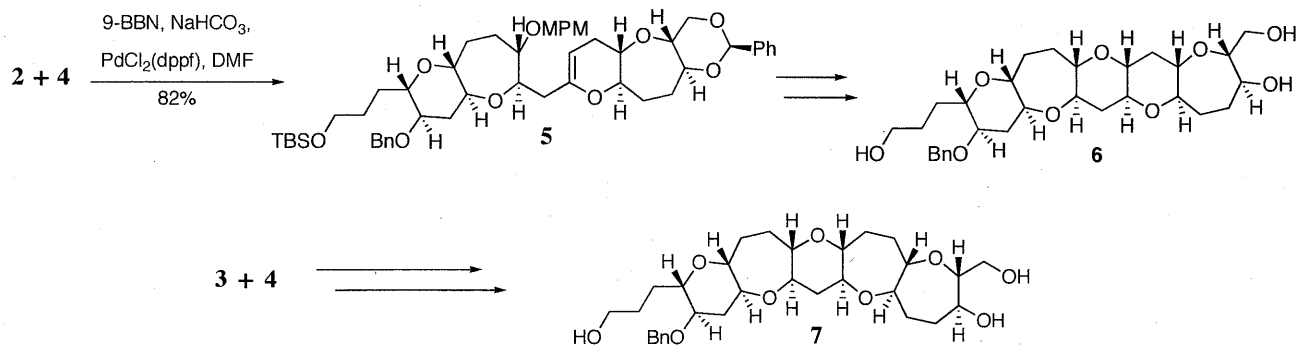
2. 単純化ポリ環状エーテルの合成

次に膜タンパク質との分子複合体構造研究に必要な量的供給が可能であり骨格構造を変えることができる単純化ポリ環状エーテルの合成について検討した。合成は本研究室で開発した鈴木宮浦クロスカップリング反応による収束的合成法を用いることとした。まずD-glucoseから合成可能な七員環エーテル**1**を共通の中間体としてカップリングのフラグメントとなるエノールリン酸エステル**2**(6/7)、**3**(7/7)、およびエキソエノールエーテル**4**(6/7)をそれぞれ合成した(Scheme 1)。



Scheme 1

次いでこれらのフラグメントからの多環性化合物の合成を行った。エノールリン酸エステル **2** とオレフィン **4** を鈴木宮浦クロスカップリング反応によって連結し **5** を高収率で得た。さらに数段階を経ることで六員環エーテルを閉環し、五環性の単純化ポリ環状エーテル **6**(6/7/6/6/7) を合成した。同様の方法によって **3** と **4** をカップリングさせることで骨格の異なる五環性化合物 **7**(6/7/6/7/7) も合成した。(Scheme 2)



Scheme 2

3. 合成単純化ポリ環状エーテルの評価

まず前述したトリチウム標識 brevetoxin **B** による特異的結合に対する合成単純化ポリ環状エーテルの結合活性の評価を行った。二つの五環性化合物 **6**(6/7/6/6/7) と **7**(6/7/6/7/7) について競争阻害実験を行ったがいずれにおいても阻害は見られなかった(Figure 3)。これは brevetoxin **B** に比べて分子長が短いこと、または官能基や骨格の違いから brevetoxin **B** が結合している膜タンパク質に対して十分な親和性が得られなかったためであると考えられる。

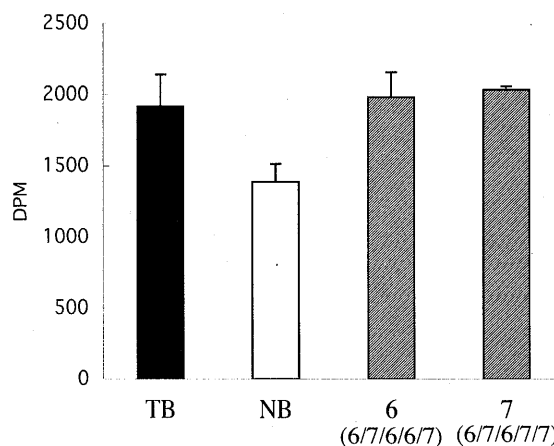


Figure 3. Competitive displacement assay of brevetoxin **B** and synthetic polycyclic ethers to P388.

ところでポリ環状エーテルの酸素原子間距離はタンパク質の α -ヘリックスのピッチに近似しており、また膜タンパク質の膜貫通部位は一般的に α -ヘリックス構造をとっていることからこれがポリ環状エーテルの分子認識に重要であると考えられる。そこで著者はメタノール中で α -ヘリックス構造を取ることが知られている 26 残基のペプチド melittin と合成単純化ポリ環状エーテルの相互作用について検証した。ペプチドの二次構造の情報を得るために CD 測定を行ったところ、二種類の合成ポリ環状エーテルで異なる結果を得た(Figure 3)。すなわち **7**(6/7/6/7/7) では α -ヘリックス含有量の増加を示すのに対し **6**(6/7/6/6/7)

ではこの働きは見られなかった。これは α -ヘリックスとポリ環状エーテルとの相互作用を非天然型ポリ環状エーテルによって示した初めての例であり、またその相互作用はポリ環状エーテルの骨格構造によって異なることを示唆している。この相互作用の濃度依存性について検討を行った (Figure 5)。7(6/7/6/7/7)では濃度依存的に α -ヘリックス含有量が増加したのに対し、6(6/7/6/6/7)ではいずれの濃度においても α -ヘリックス含有量が増加は見られなかった。6と7は全く同じ官能基を有し、構造上の違いは連続する七員環構造部分のみであることからこの部分が相互作用において重要であると考えられる。連続する七員環の配座変換は分子にフレキシビリティを与えるという報告があることからフレキシビリティが分子認識において重要な要素であることが示唆された。

以上、著者は brevetoxin B を用いた競争阻害実験によって brevetoxin B が VSSC 以外の膜タンパク質に対して特異的に結合していることを示す結果を得た。またポリ環状エーテルの一般的分子認識機構の存在を示すべく単純化ポリ環状エーテルの合成を行い効率的な合成ルートを確認した。さらにこれらの化合物を用いて α -ヘリックスに対するポリ環状エーテルの相互作用についての検証を行い、相互作用を確認するとともに、その分子認識に対して骨格構造が影響を及ぼすことを示す結果を得た。

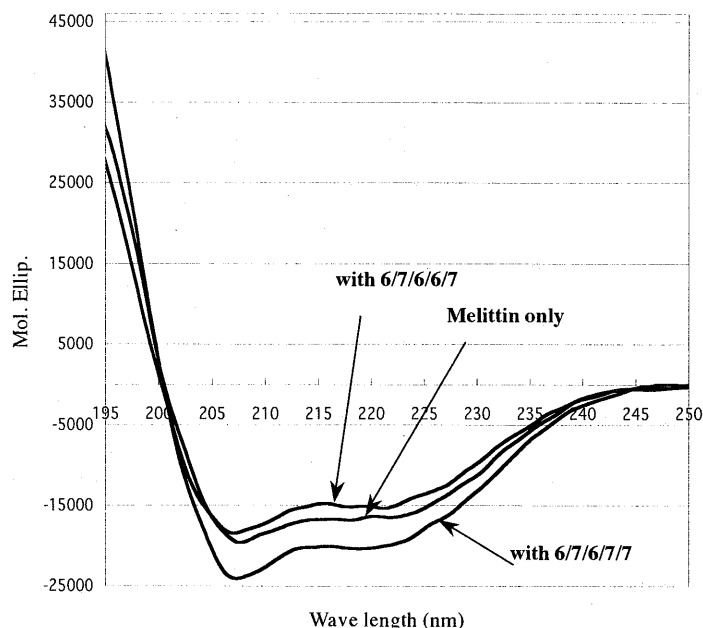


Figure 4. CD spectra of melittin in MeOH and effect of synthetic polycyclic ethers.

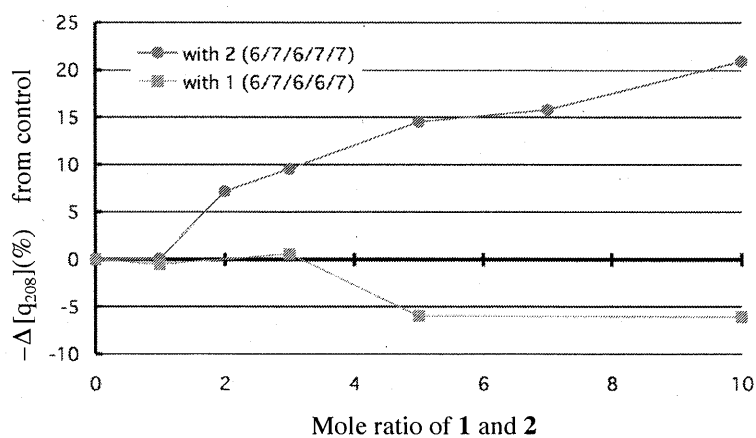


Figure 5. ellipticity change at 208 nm for melittin in the presence of various amount of 6 and 7.