

## 論文の内容の要旨

論文題目       ポリセオナミド B の全合成と構造機能解析

氏 名           篠原 直樹

【序論】1994年に八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* から単離・構造決定されたポリセオナミド B (**1**) は、非リボソーム起源ペプチドでは最大の分子量(5032)を持ち、pM レベルの低濃度で細胞毒性を示す(Figure 1)<sup>1)</sup>。**1** は、非タンパク質構成アミノ酸を含む全 48 アミノ酸残基が D 体・L 体交互に配列する特異な一次構造を有し、タンパク質では見られない特徴的なフォールディング構造を形成する。これまでに CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD を溶媒とした NMR 解析により、**1** が分子全体に渡るβ-ヘリックスを形成し、長さ 4.5 nm・内径 0.4 nm のナノチューブ構造となることが明らかになった<sup>2)</sup>。このナノチューブが細胞膜を貫通し、イオンチャンネルとして機能することが、**1** の細胞毒性発現機構と予想されている<sup>3)</sup>。我々は、一般的なイオンチャンネルタンパク質に比べて 10 分の 1 以下の分子量である **1** が、チャンネル形成能を有することに着目し、**1** を分子基盤とした有機合成化学によるチャンネル機能の構築と制御を目標とした。本研究で私は、基盤分子となる **1** の効率的全合成法の確立および **1** のペプチドフラグメント群と誘導体群の構造機能相関の解明を達成した。また、**1** のチャンネル制御システムの構築を視野に入れた光応答性ポリセオナミドの合成に成功した。

【方法】**1** の全合成では、様々な類縁体の調製を可能にする柔軟かつ収束的な戦略を立案した。すなわち、非タンパク質構成アミノ酸の合成・ペプチドフラグメントの固相合成・フラグメント連結による全体構造の構築という三段階の階層構造別合成法により **1** を構築する。さらに本全合成法を応用して、**1** のペプチドフラグメント群および誘導体群を合成し、これらの生物活性・チャンネル機能評価により **1** の構造機能相関を明らかにする。また、構造機能相関から得られた情報を基に、光応答性分子を **1** に導入して高機能イオンチャンネル分子の創製を目指す。

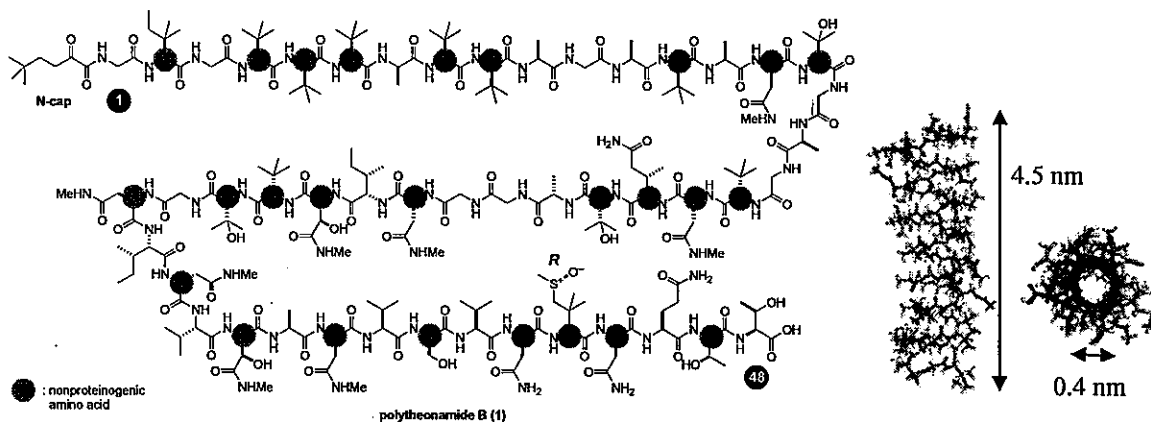
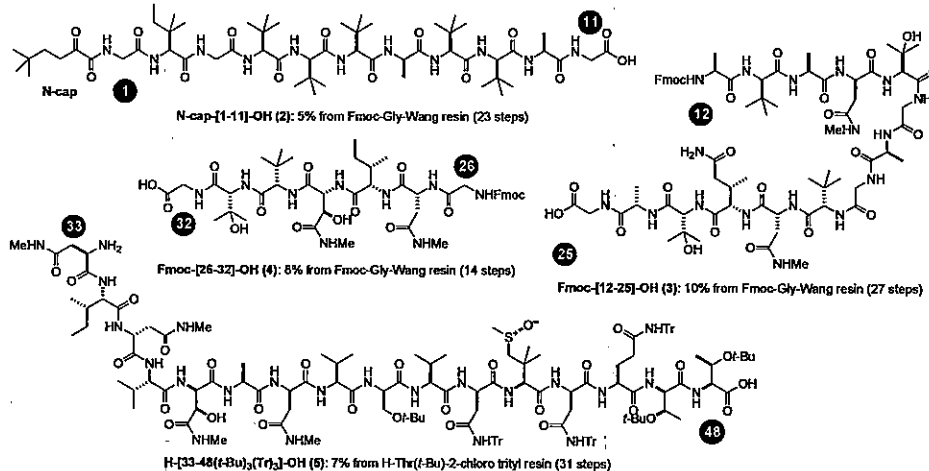


Figure 1. ポリセオナミド B (1)の一次構造とβ-ヘリックス構造

【結果】

1. ポリセオナミド B の全合成

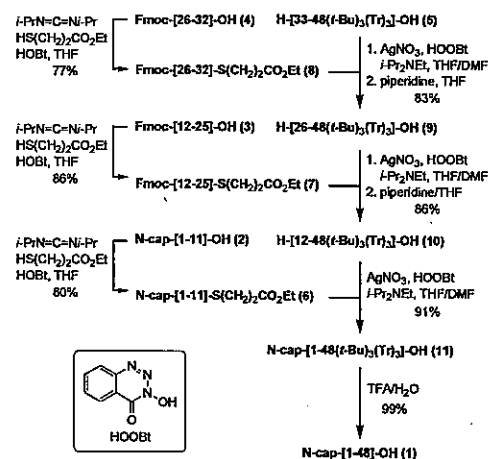
1 を構成する全 20 種類のアミノ酸のうち、有機合成化学的に供給が必要な 9 種類のアミノ酸は、当研究室において不斉合成された。これらのアミノ酸を用いて自動固相合



Scheme 1. ペプチドフラグメントの設計と合成

成によりペプチドフラグメントを合成した。15 残基以上のペプチドでは、合成収率が極端に低下したため、1 を 4 つのペプチドフラグメント 2, 3, 4, 5 に分割した (Scheme 1)。その際、フラグメント縮合時における C 末端アミノ酸のラセミ化を防ぐため、各フラグメントの C 末端側には Gly を配置した。また、アミノ酸側鎖に多くの極性官能基を有する 5 は、固相合成が困難であると予想されたため、アルコールを *t*-ブチル(*t*-Bu)基で、第 1 級アミド基をトリフェニルメチル(Tr)基で保護した。

以上の設計したフラグメント 2, 3, 4, 5 を Fmoc 固相合成法により合成した。2, 3, 4 の C 末端カルボン酸をチオエステル化してカップリング前駆体(6, 7, 8)へと誘



Scheme 2. ポリセオナミド B (1)の全合成

導し、チオエステル法<sup>4)</sup>(活性化剤 AgNO<sub>3</sub>, HOOBt)を用いて順次連結した(Scheme 2)。まず、チオエステル 8 と 5 を連結した後、Fmoc 基を除去して全体構造の半分に対応する 9 を合成した。続いて、9 をチオエステル 7 と連結し、Fmoc 基の除去を経て 10 を合成した。さらに、チオエステル 6 を 10 と連結し、全体構造を有するポリセオナミド B 保護体 11 の合成に成功した。最後に、3 つの *t*-Bu と 3 つの Tr を TFA により同時除去し、1 の全合成を達成した<sup>5)</sup>。天然から得られた 1 と合成した 1 の各種 NMR スペクトル、HPLC の保持時間は完全に一致した。また、分光学的データの比較により、1 の第 44 番残基スルホキシドの立体化学を *R* と完全に結論付けた。

## 2. ポリセオナミドフラグメントの機能解析

1 のフラグメントの生物活性評価および機能解析に着手した。まず、4 つのフラグメント 2, 3, 4, 5 を用いて、全合成の手法を応用し 1 の 1/4, 1/2, 3/4 に相当するフラグメント 12 ~19 をそれぞれ合成した。次に、1 と合成した化合物の細胞

毒性[マウス白血病細胞(P388)]を評価した(Figure 2)。その結果、1 は pM レベルの非常に低濃度で細胞毒性を示したのに対し、フラグメントは 1 に比べて非常に弱い毒性を示した。この結果から、1 の強力な細胞毒性発現には全体構造が必要であることがわかった。また、細胞毒性試験の結果から、33~48 残基アミノ酸を共通に含む 14, 17, 19 は他のフラグメントに比べて nM レベルの強い毒性を示した。そこで、これらフラグメントの毒性発現機構を調べるため、リポソームを用いたイオン透過活性試験、膜崩壊活性試験および単一チャネル電流測定による機能解析実験をおこなった。その結果、1 と 3/4 フラグメント 19 のみにチャネル形成能が確認され、1/4 フラグメント 14 と 1/2 フラグメント 17 はチャネル形成能を示さなかった。19 は約 3 nm の細胞膜を貫通できるチャネルを形成できるのに対し、14 と 17 は膜を貫通するのに必要な長さを持たないため、チャネル形成能を示さなかったと考察した。以上の結果から、3/4 フラグメント 19 がチャネル機能を持つことを初めて明らかにし、フラグメントの長さとの機能を相関を解明した。

compound	IC <sub>50</sub> (nM)	compound	IC <sub>50</sub> (nM)
N-cap-[1-48]-OH (1)	0.072	N-cap-[1-25]-OH (15)	2,000,000
N-cap-[1-11]-OH (2)	14,000	H-[12-32]-OH (16)	4,100
H-[12-25]-OH (12)	1,500	H-[26-48]-OH (17)	1,040
H-[26-32]-OH (13)	8,000,000	N-cap-[1-32]-OH (18)	1,500
H-[33-48]-OH (14)	2,050	H-[12-48]-OH (19)	864

Figure 2. 1 とフラグメントの細胞毒性

## 3. ポリセオナミド B の官能基選択的化学誘導と構造機能相関

1 の N 末端構造の生物活性への影響を調べるため、N-cap を除去した誘導體(20)、N-cap をカチオン性の(3-カルボキシプロピル)トリメチルアンモニウム基に置換した誘導體(21)および炭素鎖の異なるアシル基(アセチル、オクタノイル、パルミトイル)に置換した誘導體(22, 23, 24)をそれぞれ合成した。合成した誘導體の細胞毒性(p388)を比較したところ、N-cap 除去体 20 とカチオン性の 21、N-アセチル体 22 に顕著な活性の低下が見られた(Figure 3)。この結果は、1 は脂溶性の高い N 末端側から膜に挿入すると推測されていることから、N 末端側の脂溶性の減少により 1 の細胞膜への挿入が困難になり、チャネル機能の発現が抑制されたことに起因すると考察した。さらに、1 と N 末端誘導體の一価カチオン透過性チャネルの単一チャネル電流を測定した(Figure 3)。その結果、20, 22~24 は 1 と同程度のコンダクタンスを持つチャネルを形成したのに対し、21 は非常に小さいコンダクタンスを持つチャネルを形成した。この結果は、チャネル開口部近傍に存在するカチオン性のトリメチルアンモニウム基が、チャネルに出入りするカチオンと静電反発を起こす

ため、カチオンの透過を阻害したと考察できる。

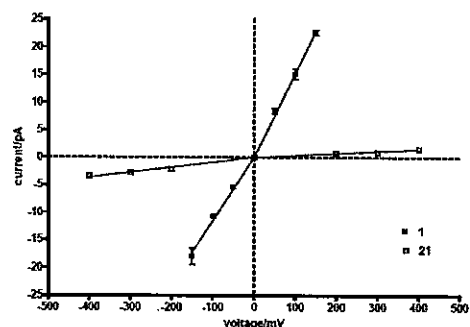
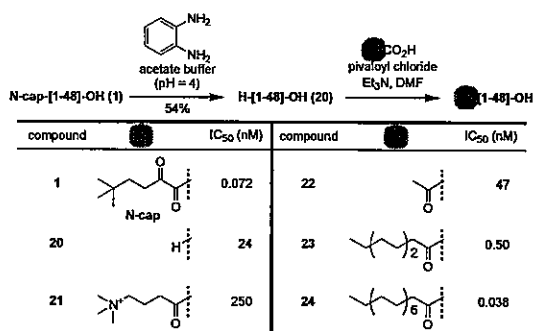


Figure 3. ポリセオナミド誘導体の合成と細胞毒性(左)、1 および 21 の電流-電圧曲線(右)

#### 4. 光応答性ポリセオナミド B の合成

前項の結果に基づき、1 の N 末端側に外部刺激にตอบสนองして電荷が変化する機能性分子を連結し、1 のチャネル機能の制御を計画した。機能性分子には、光照射で容易に構造変化でき、汎用性の高い、スピロピラン 25 を選択した(Figure 4)<sup>6)</sup>。25 は、UV 照射によって中性の SP 型から双性イオンの ME 型 26 に異性化し、酸性条件ではカチオン性の MEH 型 27 へ可逆的に異性化する分子スイッチである。25 を 1 の N 末端側に導入し、光照射により N 末端側の電荷を変化させ、チャネル機能を光制御する。前項と同様の手法で N-cap 除去体 20 に対し、N 末端のアミン選択的に 25 を付加させ、光応答性ポリセオナミド 28 の合成に成功した(Scheme 3)。28 は可逆的に光異性化が可能であり、現在、チャネル機能制御を検討している。

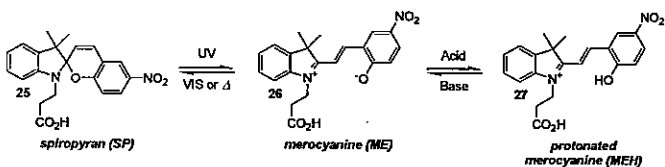
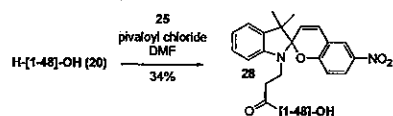


Figure 4. スピロピラン 25 の光異性化



Scheme 3. 光応答性ポリセオナミド 28 の合成

【結論】私は、ポリセオナミド B (1) の効率的合成法を確立した。さらに、ペプチドフラグメント群と誘導体群の構造機能相関の解明を達成した。すなわち、1 の強力な毒性発現には全体構造が必須であること、そして 3/4 フラグメント 19 が 1 と類似のチャネル機能を有することを明らかにした。また、1 の N 末端構造の脂溶性を減少させると細胞毒性が大きく低下し、カチオン性官能基を付与するとチャネル機能も低下することを見いだした。この知見に基づき、光応答性ポリセオナミド 28 を設計・合成し、1 の高機能化に成功した。

- 【参考文献】 1) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Yano, G.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110-118. 2) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Fujiwara, M.; Fujita, K.; Hirota, H.; Schmucki, R.; Guntert, P.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12941-12945. 3) Iwamoto, M.; Shimizu, H.; Muramatsu, I.; Oiki, S. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3995-3999. 4) Aimoto, S. *Biopolymers* **1999**, *51*, 247. 5) Inoue, M.; Shinohara, N.; Tanabe, S.; Takahashi, T.; Okura, K.; Itoh, H.; Mizoguchi, Y.; Iida, M.; Lee, N.; Matsuoka, S. *Nature Chem.* **2010**, *2*, 280-285. 6) Raymo, F. M.; Giordani, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4651-4652.