

篠原直樹は、「ポリセオナミド B の全合成と構造機能解析」のタイトルで、以下の研究を展開した。

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)。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 CDCl₃/CD₃OD 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。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。篠原は、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體群の構造機能相関の解明を達成した。さらに、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。

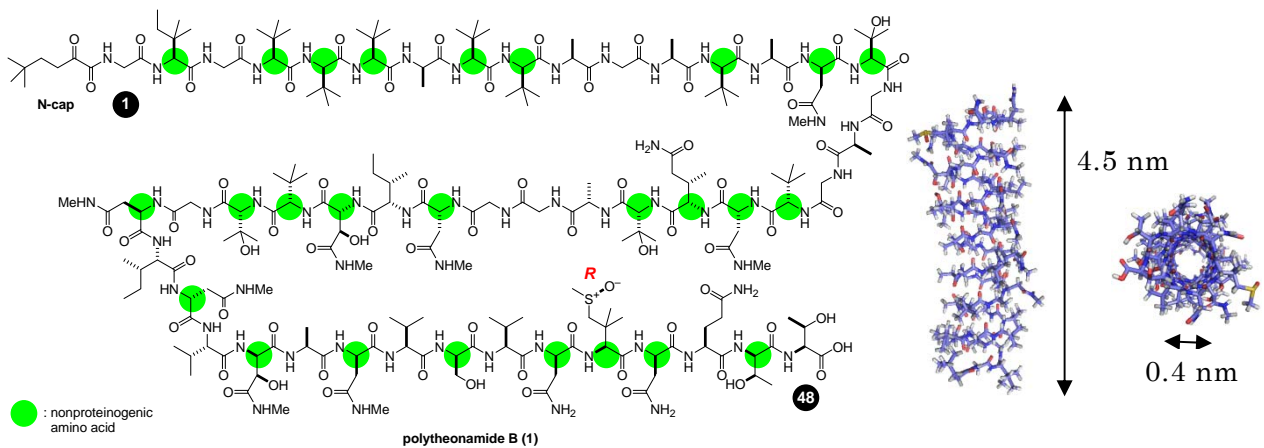
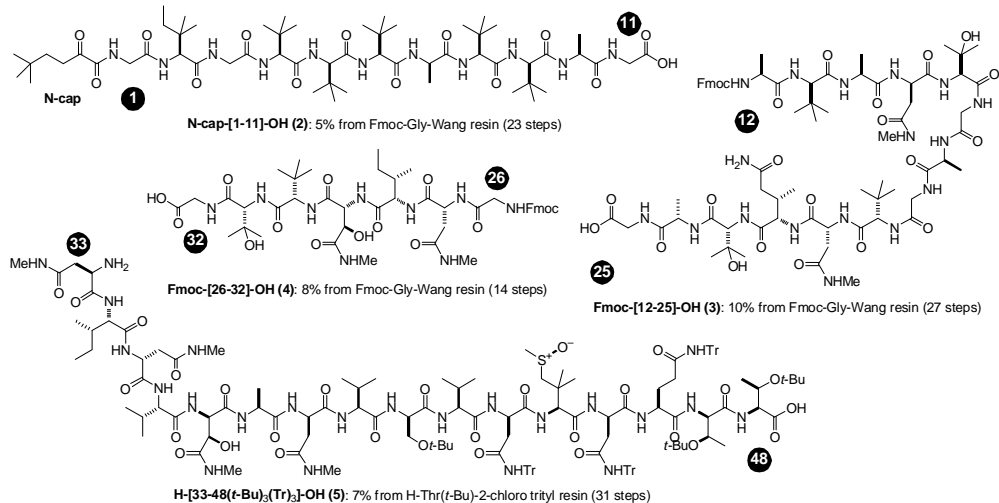


Figure 1. ポリセオナミド B (1)の一次構造とβ-ヘリックス構造

1. ポリセオナミドBの全合成

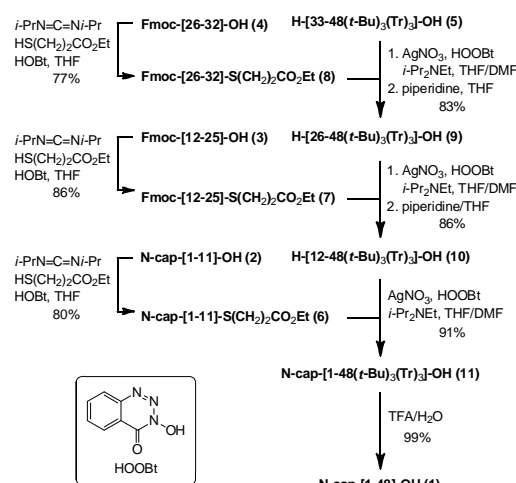


Scheme 1. ペプチドフラグメントの設計と合成

篠原は、様々な類縁体の調製を可能にする柔軟かつ収束的な **1** の全合成戦略を立案した。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** を構築する計画である。

まず、篠原は、当研究室において不斉合成された有機合成化学的に供給が必要な 9 種類のアミノ酸とそれ以外の市販の 11 種類のアミノ酸を用いて自動固相合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。また彼は、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し、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**)へと誘導し、チオエステル法(活性化剤 AgNO₃, 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。最後に篠原は、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。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。



Scheme 2. ポリセオナミド B (**1**) の全合成

2. ポリセオナミドフラグメントの機能解析

続いて篠原は、**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。この結果から彼は、**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を明らかにした。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。そこで彼は、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ン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** のみにチャン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** はチャンネル形成能を示さなかった。彼は、**19** は約 3 nm の細胞膜を貫通できるチャン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、チャンネル形成能を示さなかったと考察した。以上のように篠原は、3/4 フラグメント **19** がチャン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。

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

さらに篠原は、**1** の N 末端構造の生物活性への影響を調べるため、N-cap を除去した誘導体(**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体(**21**)および炭素鎖の異なるアシル基に置換した誘導体(**22, 23, 24**)をそれぞれ合成した。合成した誘導体の細胞毒性(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)。篠原は、**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

compound	IC ₅₀ (nM)	compound	IC ₅₀ (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)	1,600
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

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末端誘導体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。彼は、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した。

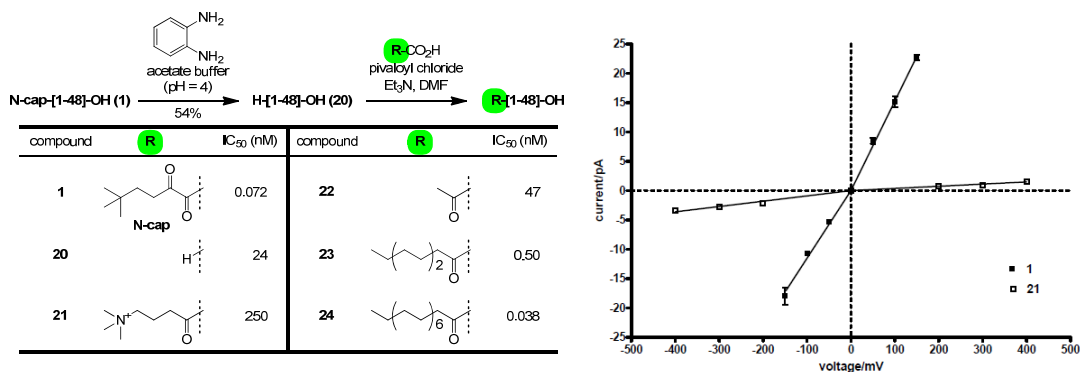


Figure 3. ポリセオナミド誘導体の合成と細胞毒性(左)、**1** および **21** の電流-電圧曲線(右)

4. 光応答性ポリセオナミドBの合成

最後に篠原は、前項の結果に基づき、**1** の N末端側に外部刺激に応答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)。**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。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)。

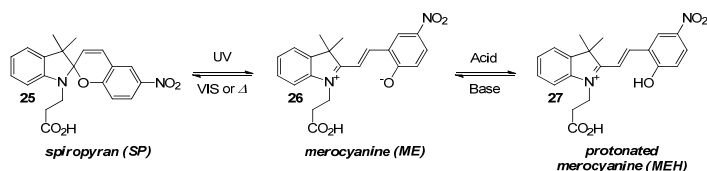
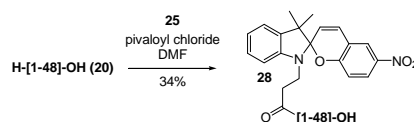


Figure 4. スピロピラン **25** の光異性化



Scheme 3. 光応答性ポリセオナミド **28** の合成

以上のように篠原は、ポリセオナミド **B** (**1**)の効率的合成法の確立および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。さらに、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。この成果は、薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。