

審査の結果の要旨

氏名 伊藤寛晃

伊藤寛晃は、「ポリセオナミドミミックの合成・構造改変・機能解析」のタイトルで、以下の研究を展開した。

ポリセオナミド B (1)は、48 残基からなる巨大ペプチド天然物であり (Figure 1)、P388 マウス白血病細胞に対して非常に強力な毒性を有する ($IC_{50} = 0.098 \text{ nM}$)。1 の一次構造は、多数の非タンパク質構成アミノ酸を有し、D 体、L 体のアミノ酸が交互に配列する特異なものである。また、特定の有機溶媒中で $\beta^{6.3}$ ヘルックス構造を形成し (Figure 2a)、脂質二重膜中、一価カチオン選択的なチャンネルを形成することが知られている。当研究室ではこれまでに、この特徴的な構造と機能を有する 1 の全合成と、その誘導体の機能解析を達成している。伊藤は、容易に合成可能であり、加えて機能解析に有用な官能基を簡便に導入可能な人工イオンチャンネル形成分子の創出を目的として研究に着手した。本研究で伊藤は、ダンスルポリセオナミドミミック (2) の合成と機能解析を行い、2 が 1 と同様のイオンチャンネルを形成し、強い細胞毒性を有することを明らかにした。さらに、2 の構造機能相関研究を行うことで、非イオンチャンネル型の強力な新規細胞毒性分子である 24 を見出した。

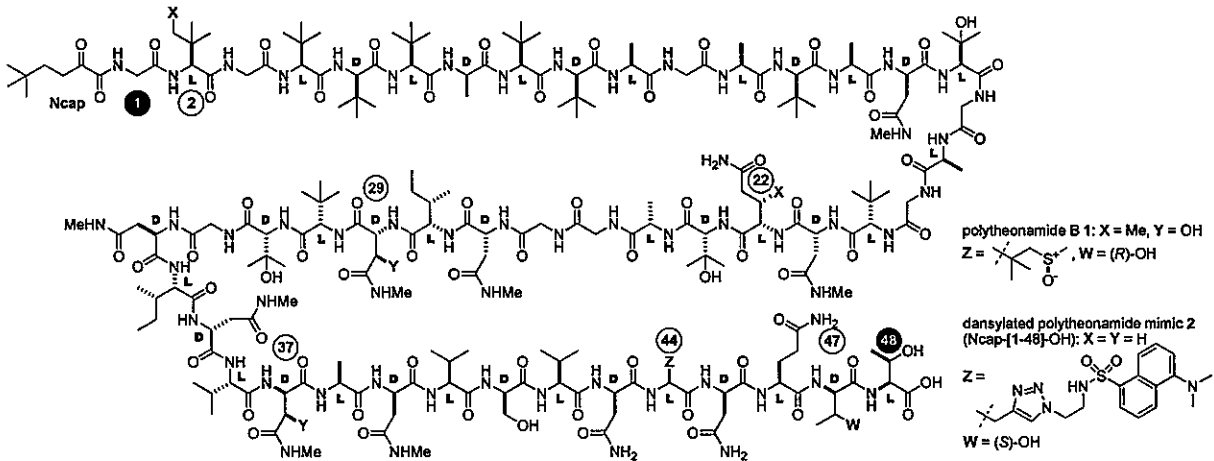


Figure 1. Structures of polytheonamide B (1) and dansylated polytheonamide mimic (2).

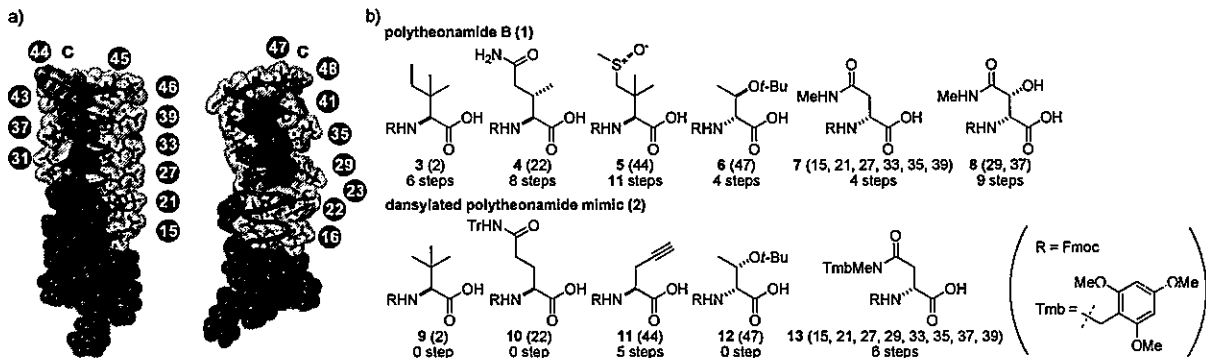
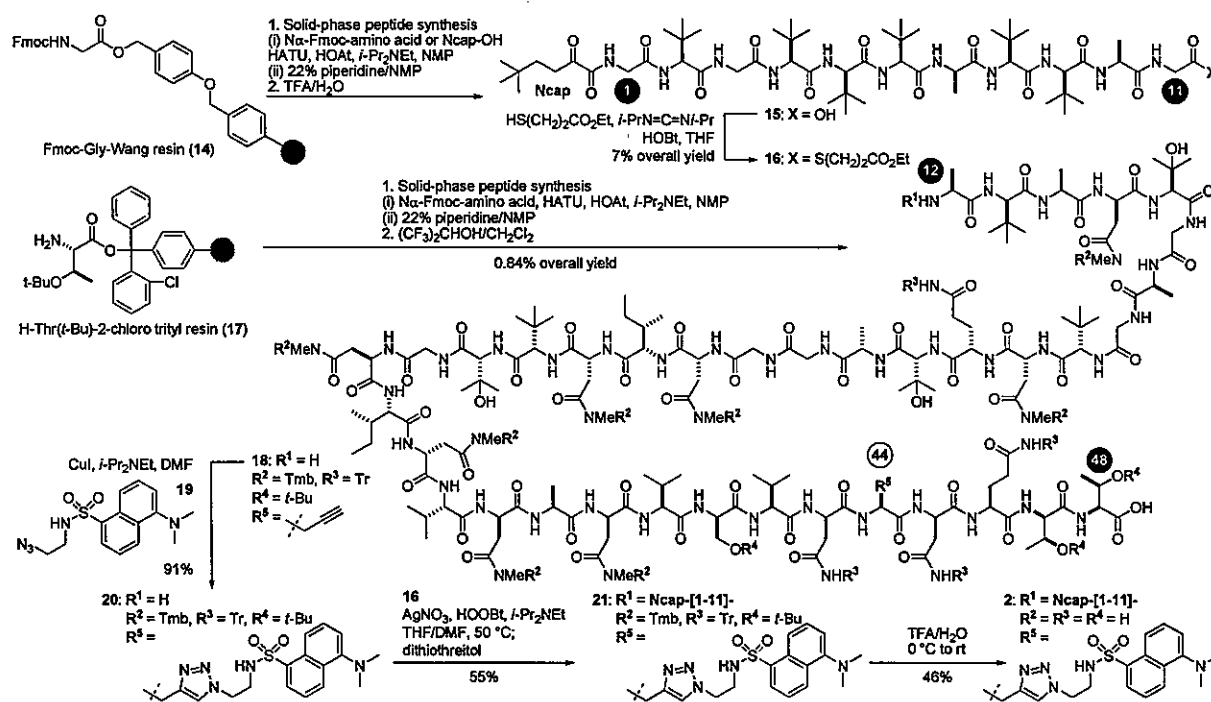


Figure 2. (a) The $\beta^{6.3}$ -helix structure of 1 (PDB1D code 2RQO). The structures are rotated by 90-degree around the y-axis. The side chains that potentially participate in a hydrogen bonding network along the helix axis and the side chain of residue 44 are shown with residue numbers. (b) Substituted component monomers in the synthesis of 2. The numbers indicated in parentheses are residue numbers. The numbers of synthetic steps are shown under the corresponding structures.

Scheme 1. Synthesis of dansylated polytheonamide mimic (2).



ペプチド **1** の全合成は、アミノ酸合成、自動固相合成、カップリング反応、脱保護の4段階を経て達成された。しかし、総工程数は161であり、詳細な分子機能解析に十分な量の**1**を得ることは困難であった。そこで伊藤は、合成工程数を削減するため、多数の合成工程を要するアミノ酸を、市販もしくはより短工程で合成可能なアミノ酸に置換した(Figure 2b)。ポリセオナミドのイオンチャネル機能発現に必須と考えられる $\beta^{6,3}$ ヘリックス構造は、主鎖・側鎖の水素結合形成により安定化されると予想されている。そこで、置換に際しては、水素結合ドナー・アクセプターとなりうる側鎖官能基の多くを保存した。一方、側鎖の水素結合可能な官能基は、固相合成中に水素結合を形成し、低収率の原因になりうる。したがって、**13**の側鎖メチルアミド基には、新たにTmb基を導入し、固相合成収率の改善を図った。加えて、側鎖にアルキンを有する**11**を第44残基モノマーとして採用した。これにより、クリックケミストリーを用いて種々のアジド化合物を容易に側鎖に導入可能である。本研究で伊藤は、**2**と脂質二重膜の相互作用に関する情報を得るため、環境応答性の蛍光官能基であるダンシル基を導入した。

Tmb基を用いた戦略によって、固相合成収率は劇的に改善した(Scheme 1)。これにより、37残基からなるフラグメント**18**が、自動固相合成のみで調製可能になった。さらに、**18**に対して化合物**19**とヨウ化銅を作用させ、アミン**20**を合成した。続いて、最適化された条件を用いて、硝酸銀によりチオエステル**16**を活性化し、アミン**20**と縮合することで保護体**21**を得た。最後に、3種類、計15個の保護基を、TFAを用いて一挙に除去することで、**2**の合成を達成した。総工程数は127であり、**1**の161工程と比較して大幅な合成工程数の削減を実現した。また、1回のカップリング反応のみで48残基からなる全体構造を構築可能であり、技術的に困難な3回のカップリング反応を要する**1**と比較して、合成が高度に自動化されている点も重要である。

続いて伊藤は、合成した**2**の機能解析を行った。まず、**2**と脂質二重膜の相互作用に関する情報を得るため、リポソーム中における**2**のダンシル基由来のストークスシフト値を測定した。リポソーム中の**2**のストークスシフト値は10564 cm⁻¹であり、メタノール中とバッファー中における値の中間に相当した。この結果は、リポソーム中の**2**のダンシル基が脂質と水の境界領域に存在することを示唆した。

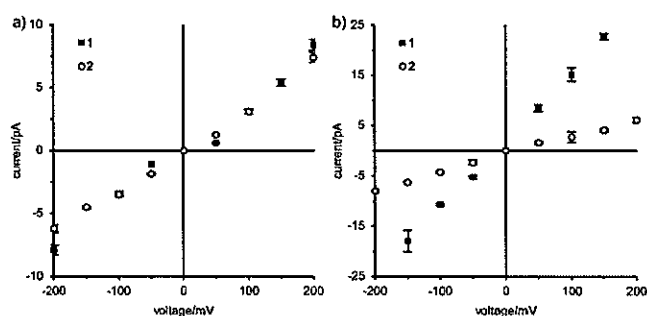


Figure 3. Current-voltage curves of **1** and **2**. Currents show cation flows through DPhPC planer bilayers in (a) 1 M NaCl (pH 7.4) or (b) 0.1 M HCl (pH 1) containing channels formed by **1** and **2**. DPhPC = diphytanoylphosphatidyl choline.

さらに彼は、2 がイオンチャンネルを形成するか調べるため、単一チャンネル電流測定を行った。pH 7.4 の中性条件下、2 の形成するチャンネル電流値は、1 のそれとほぼ同等であった(Figure 3a)。これより、2 は脂質二重膜中、1 と同様にイオンチャンネルを形成することが明らかになった。一方、pH 1 の酸性条件下においては、2 の形成するチャンネル由来の電流値は、1 と比較して優位に低下していた(Figure 3b)。この結果は、ダンシル基が、脂質膜と水の境界領域に存在することを踏まえ、pH 1 ではダンシル基がプロトン化されており、静電反発あるいは、ダンシル基のチャンネル入口への接近によるイオン流動の阻害によって引き起こされると考察できる。これらの結果は、2 の分子構造を有する pH 感受性新規チャンネル分子が創出可能であることを示唆した。

ミミック 2 の機能解析において、P388 マウス白血病細胞に対する 2 の成長阻害活性は $IC_{50} = 12$ nM であった (Table 1)。この値は、強力な毒性に該当するものの、天然物 1 と比較すると、2 の毒性がおよそ 1/100 に減弱していた。そこで伊藤は、2 の毒性発現のための最小構造要因を特定することを当初の目的として、網羅的な構造機能相関研究を計画した。13 種類の N 末端欠損体である化合物 22-34 を合成し、それらの細胞毒性を評価した。すると、37 残基からなる化合物 24 が、特異的に強力な細胞毒性を有することが明らかになった($IC_{50} = 3.7$ nM)。さらなる機能解析の結果、24 はリポソーム中においても(Figure 4)、P388 の細胞膜中においてもイオン輸送能を持たないことが分かった。これらの結果は、化合物 24 の細胞毒性が、イオンチャンネルを形成する 1 や 2 と異なった作用機序によって引き起こされる可能性を示唆した。

以上の研究において伊藤は、合理的に設計・合成された 2 の分子構造が、1 の機能を模倣することを明らかにした。加えて、2 の部分構造である化合物 24 が、親化合物である 1 や 2 と異なり、非イオンチャンネル型の強力な細胞毒性分子として作用することを見出した。本研究によって、2 の構造が、新規イオンチャンネル分子や細胞毒性分子創出のための新たな分子基盤として有用であることが初めて示された。

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。

Table 1. Cytotoxic activities of synthesized peptides against P388 mouse leukemia cells

compound	IC_{50} (nM)
1: polytheonamide B	0.098
2: Ncap-[1-48]-OH	12
22: H-[10-48]-OH	>420
23: H-[11-48]-OH	>420
24: H-[12-48]-OH	3.7
25: H-[13-48]-OH	81
26: H-[14-48]-OH	100
27: H-[15-48]-OH	>420
28: H-[16-48]-OH	140
29: H-[17-48]-OH	>450
30: H-[18-48]-OH	190
31: H-[19-48]-OH	>410
32: H-[20-48]-OH	390
33: H-[21-48]-OH	>250
34: H-[22-48]-OH	>420

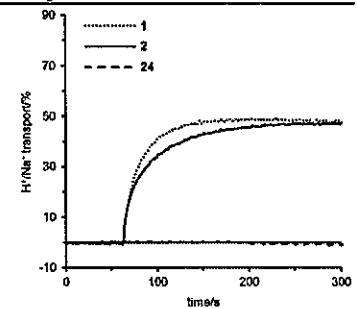


Figure 4. Time-course of H^+/Na^+ exchange across lipid bilayers of liposomes caused by 1, 2 and 24. Peptides were added at 60 s.