

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 早田 敦

早田 敦は、「ポリセオナミド B の固相全合成と作用解析」のタイトルで、研究を展開した。以下に、その詳細を述べる。

ポリセオナミド B (**1**, Figure 1a)は、海綿共生微生物 *Entotheonella* が産生する 48 残基のリボソーム由来ペプチドである。**1** は複雑かつ多様な翻訳後修飾を受けることで、D-, L-アミノ酸が交互に配列し、側鎖が多数メチル化および酸素官能基化された特異な構造となる。本配列は、 $\beta^{6,3}$ -ヘリックスと呼ばれるらせん構造を形成し(Figure 1b)、脂質平面二重膜中で一価カチオン(H^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+)選択的なイオンチャネルとして機能する。また、**1** は P388 マウス白血病細胞株に対し、非常に強力な毒性($IC_{50} = 0.098$ nM)を示す。この細胞毒性は、**1** の形成するイオンチャネルにより、細胞膜電位が乱れることに起因すると想定されているが、**1** の詳細な作用機構は解析されていない。早田はまず詳細な作用解析のために、**1** の効率的な固相全合成法の確立を目的とした。続いて、合成供給した**1**の細胞内動的挙動および作用解析を目指した。

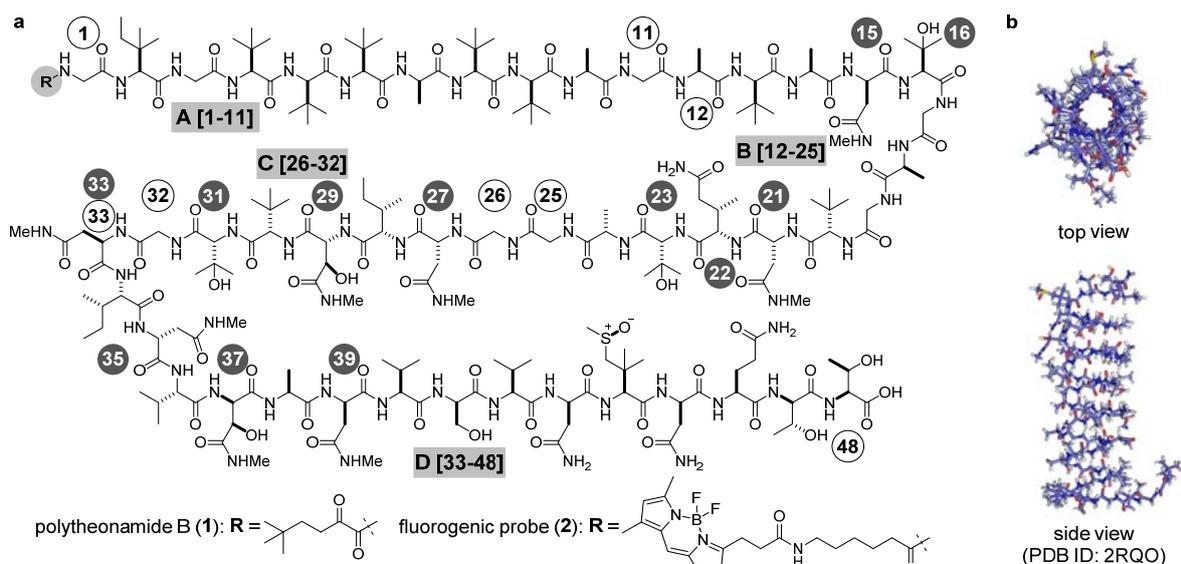


Figure 1. (a) Structures of polytheonamide B (**1**) and fluorogenic probe (**2**). (b) Three-dimensional structure of **1**.

従来の **1** の全合成では、17 残基以上のペプチド鎖の固相合成が困難であった。そのため、16 残基以下の 4 つのフラグメント(A: 1-11 残基、B: 12-25 残基、C: 26-32 残基、D: 33-48 残基)の固相合成と、これらの液相カップリングにより **1** の全体構造を構築した。早田は、側鎖官能基への保護基導入(Figure 2)に基づく 37 残基のフラグメント(BCD: 12-48 残基)の固相合成と固相上でのフラグメント縮合(A + BCD)により全体構造を構築する新規合成法を立案した。本合成法の実現により、多段階の液相反応(9 回)と HPLC 精製(9 回)を要した従来法に比して、液相反応(1 回)と HPLC 精製(2 回)を最小化した効率的な **1** の供給を可能にする計画である。

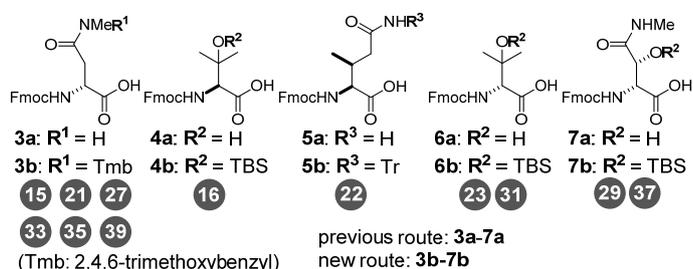
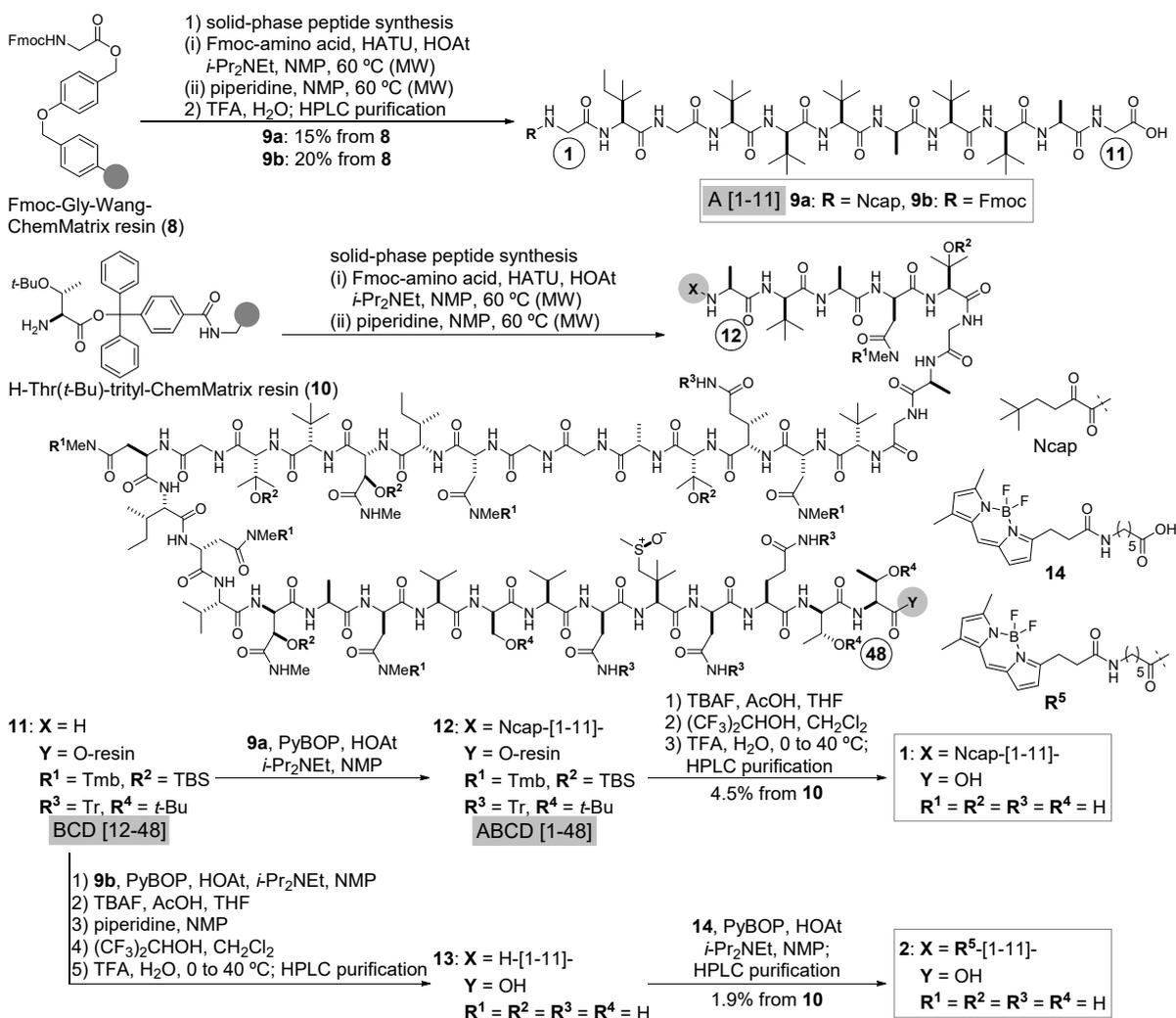


Figure 2. Component amino acids for the synthesis of **1**.

1. **1** の固相全合成

Scheme 1. Solid-phase total synthesis of polytheonamide B (**1**) and fluorogenic probe (**2**).



早田は、固相合成における側鎖間の相互作用や副反応を抑制する目的で、**3a-7a** の極性官能基に保護基を導入した **3b-7b** を合成した (Figure 2)。すなわち、**3a** の 2 級アミドおよび **5a** の 1 級アミドをそれぞれ Tmb 基、および Tr 基で保護し、**4a, 6a** および **7a** の 2, 3 級アルコールを TBS 基で保護した。アミノ酸ユニットとして **3b-7b** を、担体として ChemMatrix 樹脂を用いて、マイクロ波による加熱条件下固相合成を行った結果、予想通り BCD フラグメント (**11**) の構築に成功した (Scheme 1)。続いて、**8** から別途固相合成で調製した A フラグメント (**9a**) と固相担持された **11** を縮合し、**1** の全配列を有する **12** を得た。最後に、TBAF、(CF₃)₂CHOH および TFA を順次作用させて、18 個の保護基の除去と樹脂からのペプチド鎖の切断を行い、**1** の固相全合成を達成した。本合成法は、従来と同等の 4.5% の総収率で **1** を与えた。続いて、**1** の細胞内挙動を追跡するため、**1** の固相全合成法にしたがい、蛍光標識体 **2** を合成した。すなわち、N 末端が Fmoc 基の A フラグメント (**9b**) と **11** を縮合し、同様の化学変換により N 末端がアミンの **13** を得た。最後に BODIPY 蛍光団 (**14**) を N 末端に導入し、**2** を合成した。**1** および **2** のヒト乳がん細胞株 MCF-7 に対する増殖抑制活性を評価した結果、**1** と **2** は同等の GI₅₀ 値 (**1**: 0.69 nM, **2**: 2.31 nM) を示し、**2** は **1** の生物活性特性を保持していることが示唆された。

2. 1 の作用解析

続いて早田は、**1** のイオンチャネル活性が細胞膜電位に及ぼす影響を、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) により評価した。**1** の MCF-7 細胞への添加により、濃度依存的に速やかに蛍光強度が増大し、

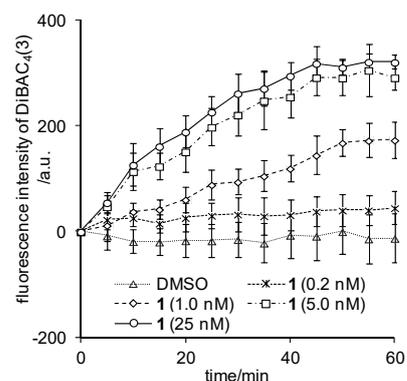


Figure 3. Time course of the change of the membrane potential caused by **1**.

1 のイオンチャネル形成と Na^+ 輸送に起因する脱分極が起きることが示唆された(Figure 3)。

次に、蛍光標識体 **2** の MCF-7 細胞内分布を共焦点蛍光顕微鏡により解析した。その結果、**2** は細胞内へ移行し (Figure 4a)、リソソーム蛍光標識色素 LysoTracker と共局在することがわかった。また、**2** の細胞内移行は、 4°C の培養条件下完全に阻害された(Figure 4b)。すなわち、**2** はエネルギー依存的な経路により細胞内へ取り込まれ、酸性オルガネラに集積することが示唆された。

この結果を踏まえ、**1** の経時的なリソソームへの作用を解析した。MCF-7 細胞への **1** の添加後 4 時間において、酸性度依存的に集積する LysoTracker の細胞内蛍光が著しく減少した(Figure 4c, d)。この結果から、**1** のイオンチャネル活性による酸性オルガネラのプロトン濃度勾配の消失が示唆された。そこで、リソソーム内に存在し、酸性条件下機能するプロテアーゼであるカテプシン B の活性を、カテプシン B により分解され蛍光を示す (Cbz-Arg-Arg)-2-cresyl violet [MR-(RR)₂] を用いて評価した。その結果、MCF-7 細胞への **1** の添加後、4 時間で基質分解物由来の蛍光が著しく減少した(Figure 4e, f)。以上より、**1** によるリソソーム-細胞質間プロトン濃度勾配消失が示唆されたため、デキストランを用いてリソソームの pH を測定した。測定の結果、**1** の添加後リソソームの pH が経時的に上昇し、4 時間後には pH は 4.1 から 6.7 まで上昇した(Figure 5)。以上より、**1** のイオンチャネル形成と H^+ 輸送に起因するリソソーム pH の上昇が示唆された。

細胞膜電位の脱分極を起こす化合物、およびリソソーム-細胞質間プロトン濃度勾配を消失させる化合物はアポトーシスを誘導することが知られている。そこで、これら 2 つの生物作用を併せ持つ **1** によるアポトーシスの誘導を評価した。まず、FITC-アネキシンと propidium iodide (PI) を用いて蛍光標識した MCF-7 細胞をフローサイトメトリーに付した。その結果、PI のみで染色されたネクロシスを起こした細胞はほとんど存在しない一方、アネキシンのみで染色された初期アポトーシスを起こした細胞の割合が有意に上昇した(Figure 6)。また、アポトーシスの 1 つの特徴であるミトコンドリア膜電位の消失が、ミトコンドリア膜電位感受性色素 tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) を用いた共焦点蛍光顕微鏡の解析により確認された(Figure 7)。以上より、**1** によるアポトーシスの誘導が示唆された。

以上のように早田敦は、新たな保護基戦略に基づき、37 残基の BCD フラグメントの固相合成を実現し、続く固相上でのフラグメント縮合により **1** の固相全合成を達成した。さらに本法により得た **1** および蛍光標識体 **2** を用いた解析により、**1** が細胞膜電位の脱分極およびリソソーム-細胞質間プロトン濃度勾配の解消という 2 つの生物作用を有することを初めて明らかにした。すなわち、**1** は細胞膜でイオンチャネルを形成し、 Na^+ の輸送により脱分極を引き起こすことに加え、細胞内移行によりリソソームに集積してイオンチャネルを形成し、 H^+ の輸送によりプロトン濃度勾配を消失させることが示唆された。さらに、これら 2 つの生物作用を併せ持つ **1** が、最終的にアポトーシスを誘導することが示唆された。これらの成果は、薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬科学)の学位を授与するに値するものと認めた。

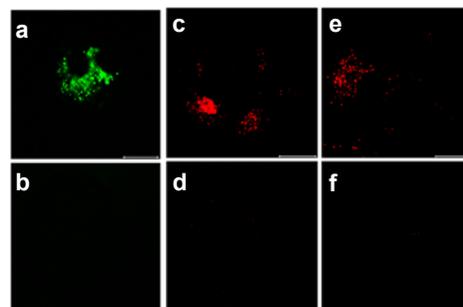


Figure 4. (a) MCF-7 cellular uptake of fluorescent probe **2** at 37°C and (b) 4°C . (c) Fluorescence of LysoTracker in MCF-7 cells incubated with **1** for 2 h and (d) 4 h. (e) Fluorescence of cresyl violet generated from the cathepsin B-associated hydrolysis of MR-(RR)₂ in MCF-7 cells. The cells were incubated with **1** for 2 h and (f) 4 h. Scale bar represents 20 μm .

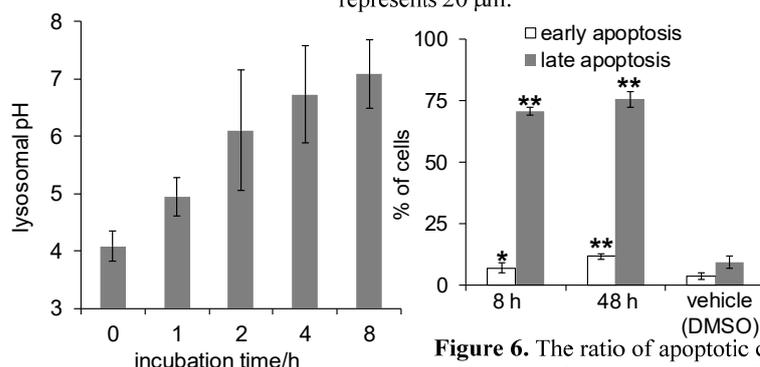


Figure 5. Time course of the change of lysosomal pH caused by **1**.

Figure 6. The ratio of apoptotic cells caused by **1**. Asterisks indicate significant differences compared with the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

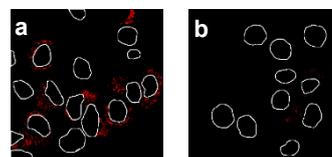


Figure 7. (a) Fluorescence of TMRM in MCF-7 cells incubated with **1** for 4 h and (b) 8 h.