

博士論文（要約）

論文題目 ポリセオナミドBの固相全合成と作用解析

氏 名 早田 敦

【序】ポリセオナミド **1** (Figure 1a)¹⁾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²⁾。**1** は現在までに報告されている中で最も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³⁾。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⁴⁾。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¹⁾。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^{4a)}、**1** の哺乳動物細胞に対する詳細な作用機構は解析されていない。私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。

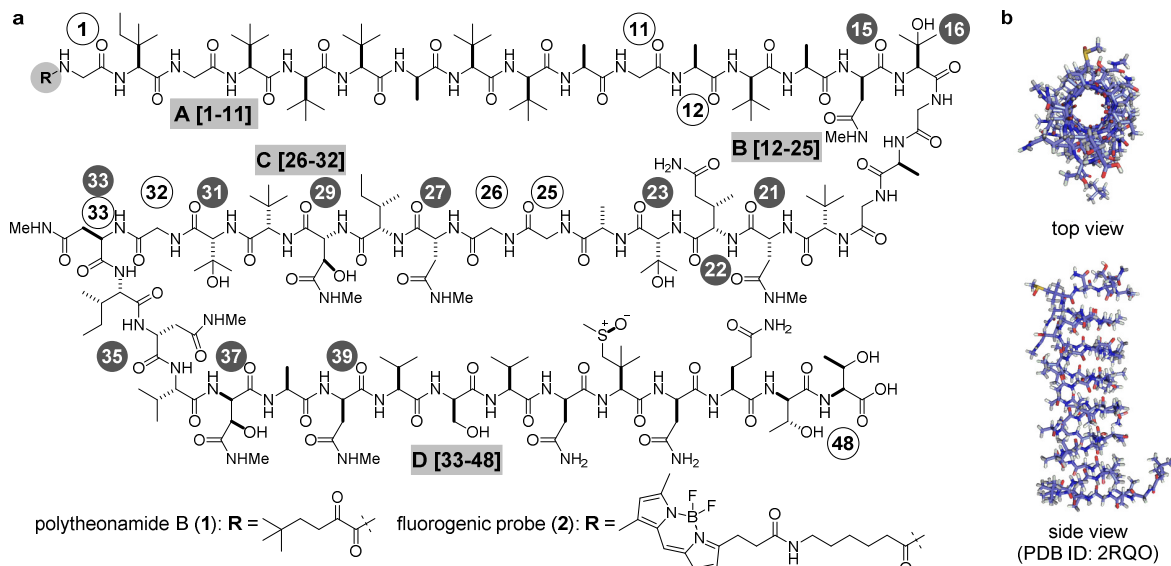


Figure 1. (a) Structures of polytheonamide **1** and fluorogenic probe **2**. (b) Three-dimensional structure of **1**.

【計画】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⁵⁾。私は、側鎖官能基への保護基導入(Figure 2)に基づ

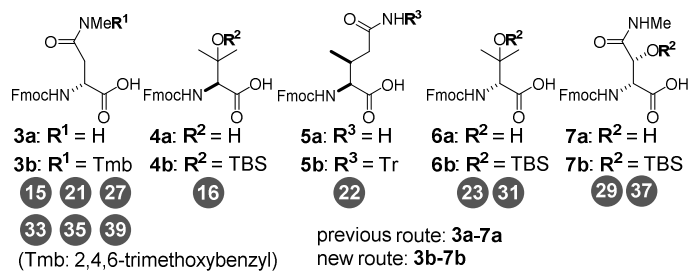


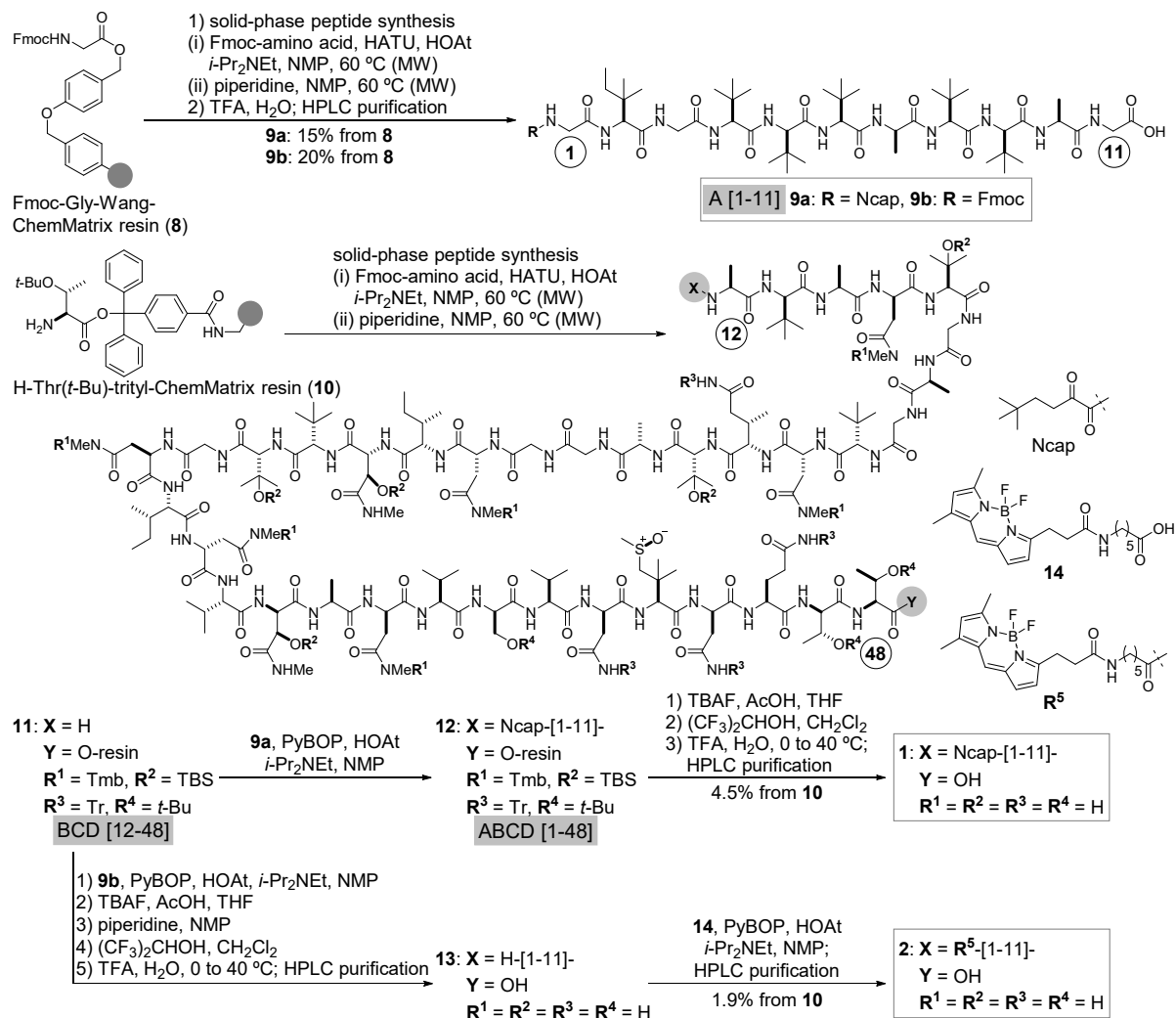
Figure 2. Component amino acids for the synthesis of **1**.

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。

【方法・結果】

1. 1 の固相全合成

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



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⁶⁾、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。

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

Table 1. Growth inhibitory activity against MCF-7 cells.

compound	GI ₅₀ /nM ^a
1	0.69
2	2.31

^aGI₅₀ = 50% cell growth inhibition determined by SRB assay.

性を sulforhodamine B (SRB)アッセイ⁷⁾により評価した(Table 1)。その結果、**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

まず、**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。DiBAC₄(3)は膜電位の脱分極にともない細胞内へ移行し、細胞内由来の蛍光強度が増大するため、膜電位変化を測定できる。**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、**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)。

続いて、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、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(Figure 4)。また、**2**の細胞内移行は、4℃培養条件、ATP 枯渇条件(NaN₃ + 2-DG)、およびマクロピノサイトーシスの阻害剤 EIPA 添加条件において阻害された(Figure 5a)。すなわち、**2**はエンドサイトーシス経路、特にマクロピノサイトーシス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 5b, c)。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 5d, e)。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。評価に用いたデキストランは、pHの上昇にともない蛍光強度が増大するフルオレセインと、pHにより蛍光強度が変化しないテトラメチルローダミンを有し、この2つの蛍光強度の比からpHを評価できる。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、

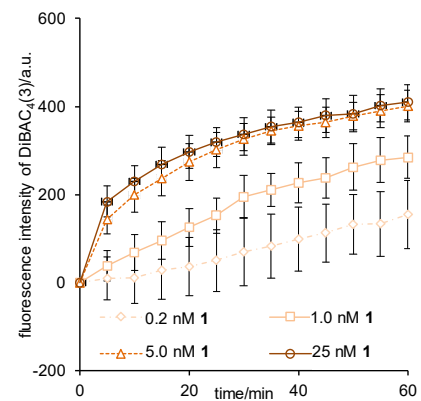


Figure 3. Time course of the change of the membrane potential caused by **1**.

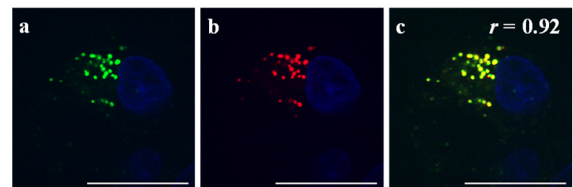


Figure 4. (a) Fluorescence of probe **2** and (b) LysoTracker in MCF-7 cells incubated with **2** for 1 h. (c) Superposition of the image (a) and (b). Nucleus was shown in blue. Scale bar represents 20 μm.

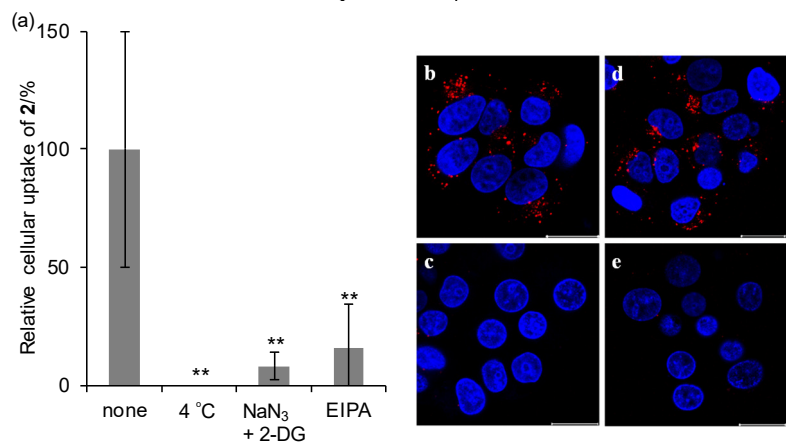


Figure 5. (a) Cellular uptake of **2** with each condition. Asterisks indicate significant differences compared with the control (none) by t-test (** p < 0.01). (b) Fluorescence of LysoTracker in MCF-7 cells incubated with **1** for 2 h and (c) 4 h. (d) Fluorescence of cresyl violet generated from the cathepsin B-associated hydrolysis of MR-(RR)₂ in MCF-7 cells. The cells were incubated with **1** for 2 h and (e) 4 h. Nucleus was shown in blue. Scale bar represents 20 μm.

4 時間後には pH は 4.1 から 6.7 まで上昇した(Figure 6)。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、アネキシンで染色された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 7a)。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 7b, c)。以上より、**1** によるアポトーシスの誘導が示唆された。

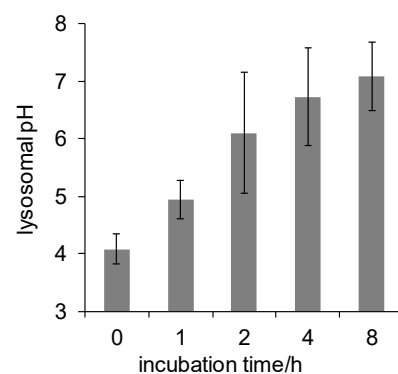


Figure 6. Time course of the change of lysosomal pH caused by **1**.

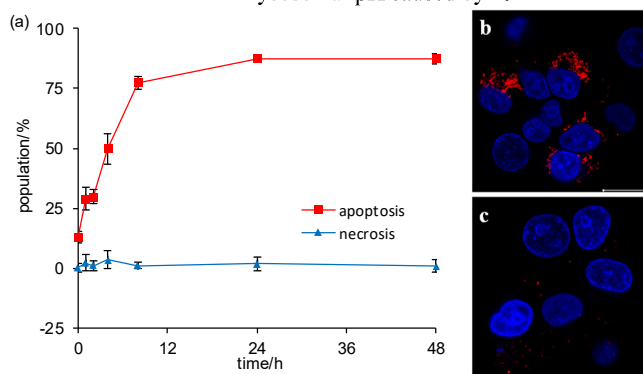


Figure 7. (a) Time course of apoptotic and necrotic cells caused by **1**. (b) Fluorescence of TMRM in MCF-7 cells incubated with **1** for 4 h and (c) 8 h. Nucleus was shown in blue. Scale bar represents 20 μ m.

【結語】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、エンドサイトーシス経路を介した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。

【参考文献】1) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Yano, G.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110. 2) Wilson, M. C.; Mori, T.; Rückert, C.; Uria, A. R.; Helf, M. J.; Takada, K.; Gernert, C.; Steffens, U. A.; Heycke, N.; Schmitt, S.; Rinke, C.; Helfrich, E. J.; Brachmann, A. O.; Gurgui, C.; Wakimoto, T.; Kracht, M.; Crüsemann, M.; Hentschel, U.; Abe, I.; Matsunaga, S.; Kalinowski, J.; Takeyama, H.; Piel, J. *Nature* **2014**, *506*, 58. 3) Freeman, M.; Gurgui, C.; Helf, M.; Morinaka, B.; Uria, A.; Oldham, N.; Sahl, H.-G.; Matsunaga, S.; Piel, J. *Science* **2012**, *338*, 387. 4) (a) Iwamoto, M.; Shimizu, H.; Muramatsu, I.; Oiki, S. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3995. (b) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Fujiwara, M.; Fujita, K.; Hirota, H.; Schmucki, R.; Güntert, N.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12941. 5) Inoue, M.; Shinohara, N.; Tanabe, S.; Takahashi, T.; Okura, K.; Itoh, H.; Mizoguchi, Y.; Iida, M.; Lee, N.; Matsuoka, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 280. 6) Itoh, H.; Matsuoka, S.; Kreir, M.; Inoue, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14011. 7) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112.