

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 毛吉

毛吉は、「グラミシジン A を基盤としたイオンチャネル型ヘリックスペプチドの設計・合成・機能解析」のタイトルで、以下の研究を展開した。

グラミシジン A (GA) は、土壌細菌バシラス属より単離された抗菌ペプチドであり、脂質二重膜中で可逆的に N 末端同士が二量体化することで一価カチオン選択的なイオンチャネルを形成する。その構造的特徴として、D および L アミノ酸の交互配列を有する点、および周囲の環境に応じて様々なコンフォメーションをとる点が挙げられる。GA は、有機溶媒中では逆並行型の二重螺旋構造を形成する一方、脂質環境では、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックスの二量体構造を形成することが知られている(図 1a)。特に、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックス二量体は脂質二重膜中での主要なコンフォメーションであることが示され、この構造がイオンチャネル機能を担い、抗菌活性の発現に重要であると考えられている。 β 型ヘリックス構造を形成する天然物由来のペプチドは、今日に至るまでわずか二例とその数は極めて少ない。毛は、GA がイオンチャネル型の新規抗菌ペプチド創出を目指す上で非常に有用な構造基盤になると考え、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造の安定化がイオンチャネル機能や抗菌活性の増強につながるのではないかと仮説に基づき研究に着手した。

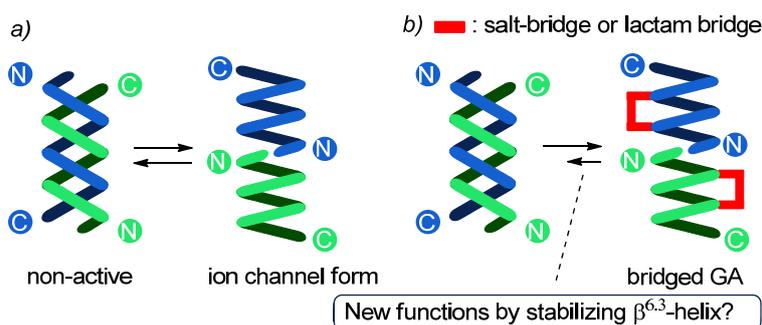
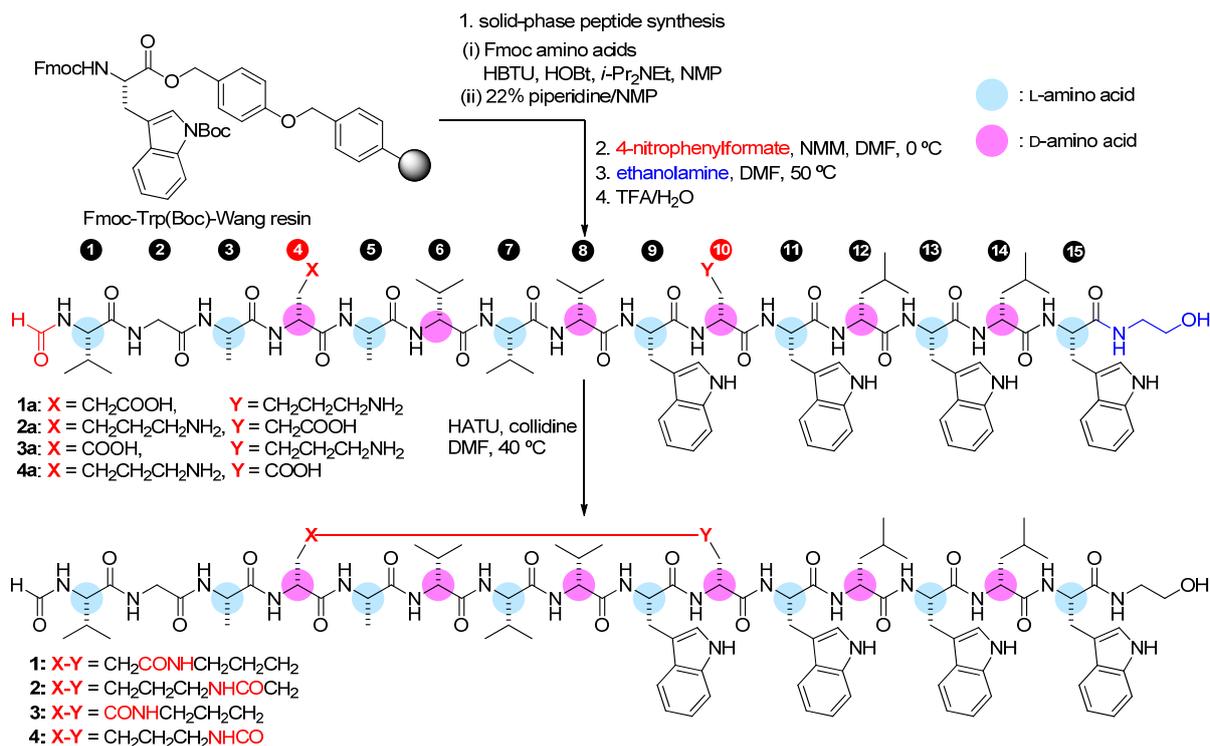


図 1. (a) グラミシジンのとる代表的なコンフォメーションの例。有機溶媒中における二重螺旋構造(図左)と脂質二重膜中におけるヘリックス二量体(図右) (b) $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造安定化戦略

1. グラミシジン誘導体の合成

毛は、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造の安定化は、側鎖同士の架橋に基づく化学的な構造修飾により達成可能と考えた。即ち、側鎖同士の静電相互作用を利用する塩橋や側鎖同士を共有結合により架橋させたラクタム架橋を利用する手法である(図 1b)。架橋長や架橋部分の置換パターンの重要性を評価するため、4 種類の塩橋誘導体および 4 種類のラクタム架橋誘導体を合成することとした(スキーム 1)。全ての誘導体は Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて合成した。自動固相合成機を用いて順次アミノ酸を縮合・伸長した後、N 末端ホルミル基を、4-ニトロフェニルホルメートおよび NMM を用いて導入し、続いてエタノールアミンで処理することで樹脂からペプチドの切り出しおよび C 末端のアミド化を一挙に行った。ペプチド上に存在する保護基は、TFA により脱保護し、逆相 HPLC による精製を経て、塩橋ペプチド誘導体 **1a-4a** をそれぞれ 4.3%、13%、1.9% および 3.2% の収率で得た。ラクタム架橋誘導体(**1-4**)は、**1a-4a** を前駆体として用い HATU による縮合反応に付すことで調製した。逆相 HPLC による精製を経て、ラクタム架橋ペプチド **1-4** を、それぞれ 33%、46%、41% および 39% の収率で得た。



Scheme 1. GA 誘導体の合成。HBTU = O-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HOBT = 1-hydroxybenzotriazole; NMM = N-methyl morpholine; HATU = O-(7-azabenzotriazole-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate.

2.構造解析

合成したペプチド誘導体を用いてモデル脂質膜中での構造を、円偏光二色性(CD)実験により調べた。CD スペクトルは、pH7.5 緩衝液条件中で測定した。EYPC/POPG 条件では、ペプチド **1**、**2** および **3** において、220 nm と 238 nm に $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造に特徴的な2つのピークが観測された(図 2A, B)。ペプチド **4** は異なる CD スペクトルを与え、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造の変形が示唆された。対照的に、全ての塩橋誘導体は、顕著に CD スペクトルが異なり、 $\beta^{6.3}$ -ヘリックスとは異なるコンフォメーションを示す結果となった。また GA (図 2A, 黒線)と比較すると、ペプチド **2** と **3** は CD スペクトル強度が増大していたことから、側鎖同士の架橋による $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造の安定化が示唆された。また SDS ミセルを用いた NMR による更なる構造解析実験から、GA および **2** は、両者とも $\beta^{6.3}$ -ヘリックスの二量体構造を形成していることが確認された。

3.機能解析

毛は、合成したペプチド誘導体のイオンチャネル機能を調べるために、pH 勾配リポソームを用いた蛍光測定実験を行った。この実験では、イオンチャネル機能に基づく膜内外でのカチオン透過活性をリポソーム(EYPC / POPG)内に封入された pH 感受性蛍光プローブからの蛍光の増加として観測する(図 2C)。全てのラクタム架橋誘導体 **1-4** は、対応する塩橋ペプチド誘導体や GA よりも効率的なイオン透過を示した。CD 実験の結果を考慮すると、観測された速いイオン透過活性は、ラクタム架橋による $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造の安定化によって脂質膜中での $\beta^{6.3}$ -ヘリックス二量体構造の増加に起因すると考えた。一分子でのイオンチャネル機能をさらに調べるために、単一チャネル測定実験を行った。ラクタム架橋ペプチド **2** は、コンダクタンスやチャネル開時間の点で GA とは顕著に異なるイオンチャネルの性質を示した。

4.生物活性試験

続いて毛は、合成したペプチドの生物活性を調べるために、抗菌活性試験および溶血活性試験を実施した。抗菌活性は、標準的な手法に従い、測定細菌の最小阻害濃度(MIC)として評価することとし、種々のグラム陽性細菌(図 2D)に対して抗菌活性試験を行った。塩橋ペプチド誘導体は **1a** を

除いて、いずれも抗菌活性を示さなかった。一方、ラクタム架橋ペプチド **2** は、種々の細菌株に対して GA と同程度の抗菌活性を示した。次に、ウサギの赤血球を用いて溶血活性を測定したところ、いずれのペプチド誘導体も、測定した濃度の範囲内では検出可能な溶血活性を示さなかった。GA と同程度の抗菌活性を示したラクタム架橋ペプチド **2** は、倍時間のインキュベーション後でも、わずかな溶血活性(<10%)しか見られなかった。これは 0.2 μM (図 2E, F)の低濃度で明らかに溶血活性を示した GA とは対照的な結果である(HC_{50} 0.5 μM)。さらに、ペプチド **2** は、GA と比較して P388 マウス白血病白血球細胞に対して 1000 倍近い細胞毒性の減少を示した。

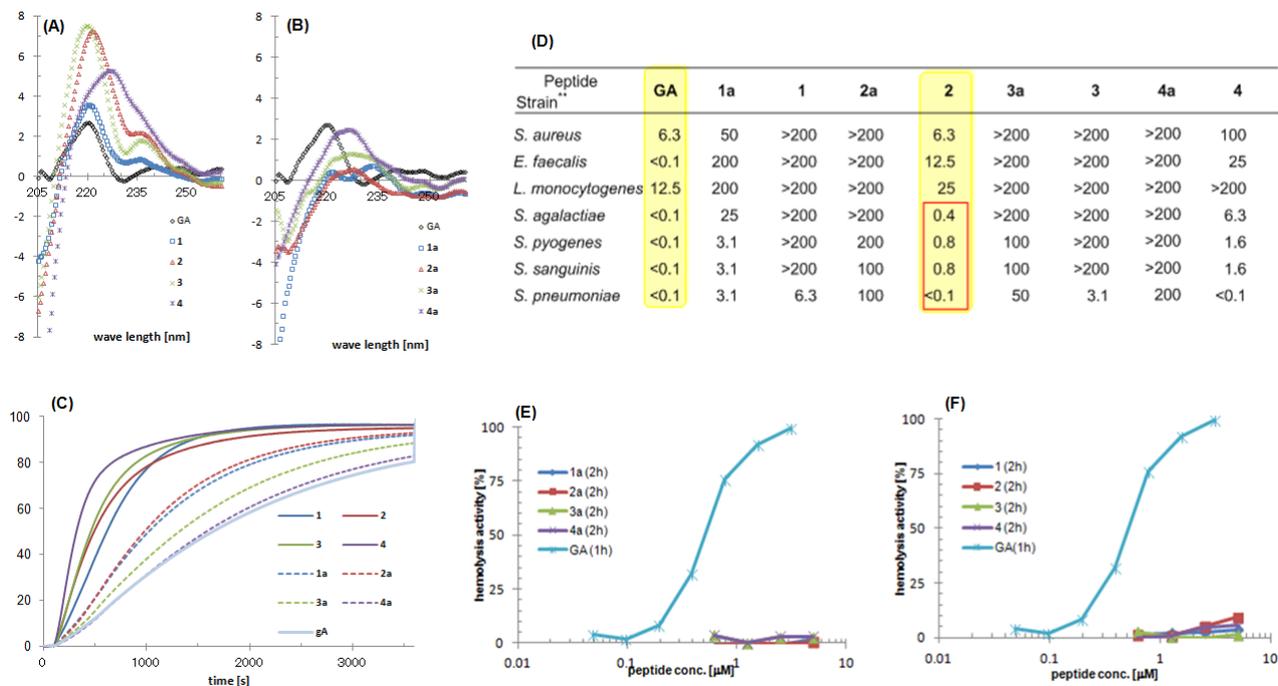


図 2. EYPC/POPG リポソーム中におけるペプチド誘導体の CD スペクトル(A, B)。pH 勾配リポソームを用いた蛍光測定実験(C)。抗菌活性試験(MIC in $\mu\text{g}/\text{mL}$) (D)。溶血活性試験(E, F)。

以上のように毛は、側鎖の化学的構造修飾による構造安定化の戦略に基づき、4 種類の塩橋誘導体および 4 種類のラクタム架橋誘導体の合成を達成した。それら合成したペプチド誘導体のモデル脂質二重膜中における構造や機能および抗菌活性、溶血活性や細胞毒性などの生物活性を調べた。CD、蛍光、単一チャネル測定実験から、ラクタム架橋ペプチド **2** は、モデル脂質膜中で安定な $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造を形成し、GA とは顕著に開時間やコンダクタンスが異なるチャネルの性質やより速いイオン透過活性を有することが明らかとなった。またペプチド **2** は、種々のグラム陽性菌に対して GA と同程度の抗菌活性を示した一方、GA と比較して極めて弱い溶血活性を示した。この溶血活性や細胞毒性の顕著な低下の詳細はまだ明らかではないが、ラクタム架橋が構造の安定化の作用だけでなくイオンチャネルなどの機能モジュレーターとしても有用であることが示され、イオンチャネル型抗菌ペプチドの創出へ向けた有望なリード化合物の創製に成功した。

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。