OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	液胞型ATPアーゼの阻害機構の解明を目指した標識化サリシリハラミドの合成研究
Author(s)	杉本, 賀規
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23464
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【50】

氏名	杉本賀規（すぎもとよしのり）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 22684 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	液胞型ATPアーゼの阻害機構の解明を目指した標識化サリシリハラミドの合成研究
論文審査委員	（主査） 教授 村田 道雄 （副査） 教授 深瀬 浩一　教授 加藤 修雄　教授 金澤 浩

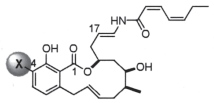
論文内容の要旨

液胞型(H^+-)ATPアーゼ(V-ATPase)は、ATP加水分解共役型のプロトンポンプであり、種々の生理現象に密接に関連している。一方、V-ATPaseの過剰発現に起因する疾患が数多く知られており、創薬研究の標的となっている。正常なV-ATPaseの阻害は潜在的毒性につながるため、標的組織特異的な阻害剤の開発が重要である。

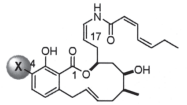
海綿から抗腫瘍性マクロリドとして単離されたサリシリハラミドA(**1**)は、哺乳類性V-ATPaseを1 nM以下のIC_{50}値で特異的に阻害することで抗腫瘍性を発揮する。従来の阻害剤であるバフィロマイシンやコンカナマイシンとは異なり、哺乳類と真菌のV-ATPaseを識別している点が特徴的である。そのため、**1**によるV-ATPaseの阻害機構の解明は、副作用の少ない医薬品の開発につながると期待される。**1**は膜貫通部位に共有結合することが示唆されているものの、その詳細な阻害機構および分子複合体の構造は不明である。

近年、NMR測定技術の発達により、脂質膜中の分子の構造解析を行うことが可能になってきている。特に固体NMR測定の場合には、位置特異的にNMR核を導入することが重要であるが、なかでも^{19}Fは共鳴周波数の高さと生物試料におけるバックグラウンドの低さから注目されている。天然から得られないフッ素標識体を得るためには、化学合成が唯一の手段があるが、フッ素の標識位置によっては天然物の全合成そのものにも匹敵するため、挑戦的な課題となる。さらに、フッ素標識体が天然物と同等の活性を保持していることを生物活性試験等によって確認する必要がある。本研究では、**1**によるV-ATPaseの阻害機構を分子レベルで解明することを最終目的とし、**1**の分子プローブの合成を行った。すなわち、溶液あるいは固体^{19}F-NMR測定に有用な4-^{19}F-サリシリハラミドA(**2**)および4-^{19}F-サリシリハラミドB(**4**)を合成し、それらの生物活性評価を行った。さらに、結合部位を特定するためのビオチン化標識体(**5**)の合成を行った。

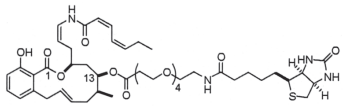
天然型サリシリハラミドA(**1**)およびB(**3**)の実践的合成法を確立した上で、**2**および**4**の合成に成功した。合成したサリシリハラミド類のV-ATPase阻害活性を、培養細胞内の酸性オルガネラおよびブタ由来クロマフィン顆粒膜小胞に対するプロトン流入の阻害を指標にし、pH感受性試薬の蛍光強度を測定することによって評価した。4位にフッ素を導入された**2**および**4**は、天然物(**1**)と同等の阻害活性を保持しており、NMR測定に有用な分子プローブであることが示された。また、13-*O*-ビオチン化標識体(**5**)も、合成した天然物から調製することができた。



(-)-salicylihalamide A (SA, **1**): X = H
4-^{19}F-salicylihalamide A (F-SA, **2**): X = F



(-)-salicylihalamide B (SB, **3**): X = H
4-^{19}F-salicylihalamide B (F-SB, **4**): X = F



13-*O*-biotinated salicylihalamide B (**5**)

Table. Inhibition of H^+ Transport Activity of V-ATPase (from Porcine Adrenal Glands) by Synthetic Salicylihalamides

IC_{50} / nM	SA (1)	F-SA (2)	SB (3)	F-SB (4)
	0.7	2	30	10

Vacuolar typed (H^+-)ATPase (V-ATPase) is a proton pump conjugated with ATP hydrolysis, and involved in various physiological processes. The ATPase is widely regarded as a pharmacological target for some diseases due to its excessively functional expression. Development of the target tissue-specific inhibitors against the ATPase is important, since non-specific inhibition of ATPases leads to serious side effects.

Salicylihalamide A (SA, **1**), an antitumor macrolide isolated from a marine sponge, is a specific inhibitor against mammalian V-ATPase, whereas lacking the activity to microbial ATPases. This feature distinguishes SA from conventional inhibitors such as bafiomycins and concanamycins. So, the elucidation of the inhibition mechanism of SA will lead to development of the less toxic drugs for V-ATPase-related diseases related to.

Recent advance in NMR spectroscopy enables us to conduct the structural analysis of molecules embedded in lipid membrane. For example, $^{13}C\{^{19}F\}$REDOR is a useful solid state NMR technique for distance measurement between ^{13}C atom and ^{19}F one. Yet, for this experiment, the regioselectively labeled molecules with ^{13}C and ^{19}F atoms are required. Particularly, ^{19}F-labeled compounds, which are not obtainable from natural sources, is needed to prepare chemically; synthesis of the natural product with its skeletal structure labeled with ^{19}F atom will often be comparable to its total synthesis, thus posing a scientific challenge. Moreover, the bioactivity of fluorinated compound must be equal to that of an original natural product. In this research, molecular probes of **1** were synthesized for the ultimate purpose of

elucidation of its inhibition mechanism at the molecular level. Namely, 4-^{19}F-salicylialamide A (F-SA, **2**) and B (F-SB, **4**) were synthesized for the use of solution and solid-state ^{19}F-NMR measurements, and subjected to evaluation of their bioactivities. In addition, the biotinated probe (**5**) was synthesized to elucidate the binding site of salicylihalamides.

Prior to synthesis of fluorinated probes, the practical synthetic methodology of natural for SA (**1**) and SB (**3**) was established. Then, synthesis of F-SA (**2**) and F-SB (**4**) was accomplished by application of the same methodology. The V-ATPase inhibitory activities of synthesized SAs were evaluated by the inhibition of proton uptake into both acidic organelles in the cultured cell and porcine chromaffin granule membrane vesicles upon monitoring fluorescence intensity of pH indicators. As a result, fluorinated SAs **2** and **4** were shown to possess potent inhibitory activity of V-ATPase, which were comparable to that of natural SA **1**. This result reveals that their fluorinated probes will serve as a useful probe for investigating the inhibition mechanism by ^{19}F-NMR. In addition, 13-*O*-biotinated derivative (**5**) was successfully prepared from the chemically synthesized SA (**1**) and SB (**3**).

論文審査の結果の要旨

液胞型プロトンATPアーゼ(V-ATPase)は膜貫通性タンパク質であり、ATP加水分解共役型のプロトン輸送機能を有し、種々の生理現象に関連している。V-ATPaseの過剰発現に起因する疾患が数多く知られており、創薬研究の標的となっている。一方、海綿から抗腫瘍性マクロリドとして単離されたサリシリハラミドA（SA）は、哺乳類性V-ATPaseの酵素機能を特異的かつ強力に阻害することで抗腫瘍性を発揮する。従来の阻害剤とは異なり、哺乳類と真菌の酵素を識別している点が特徴である。そのため、SAによる阻害機構の解明は、毒性の少ない医薬品の開発につながると期待される。

最近のNMR測定技術の発達により、脂質膜中の分子の構造解析を行うことが可能になり、SAのような膜タンパク質に結合する薬物の研究に利用されるようになった。しかし、固体NMR測定には^{13}Cや^{19}FなどのNMR測定核種標識体を調製する必要がある。特に、天然からは得られないフッ素標識体の調製には化学合成が必要となるが、一般にフッ素の導入反応は選択性と効率性において問題が多い。さらに、炭素同位体による標識とは異なり、フッ素標識体については生物化学的性状が天然物と異なっているため生物活性の再評価が必要である。

本研究は、SAによるV-ATPaseの阻害機構を分子レベルで解明するための分子プローブの合成を目的として行われた。すなわち、^{19}F-NMR測定に有用な4-^{19}F-サリシリハラミドAおよび4-^{19}F-サリシリハラミドBの合成、およびそれらの生物活性評価が実施された。さらに、結合部位を特定するためのビオチン化標識体が調製された。合成したサリシリハラミド類のV-ATPase阻害活性の測定は、培養細胞内の酸性オルガネラおよびブタ由来クロマフィン顆粒膜小胞を用いて行われた。すなわち、V-ATPaseを介するプロトン流入の阻害作用に基づく定量的な活性評価に成功している。フッ素標識体は、天然物と同等の阻害活性を保持しており、固体NMR測定に有用な分子プローブであることが示された。また、13-*O*-ビオチン化標識体も、合成した天然物から調製することができた。以上のように、本論文は新規な天然物の作用機構解明に道を開く成果を含んでおり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。