OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	標識アンフォテリシンＢの合成およびその脂質二重膜中複合体の構造解析
Author(s)	松下, 直広
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23465
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

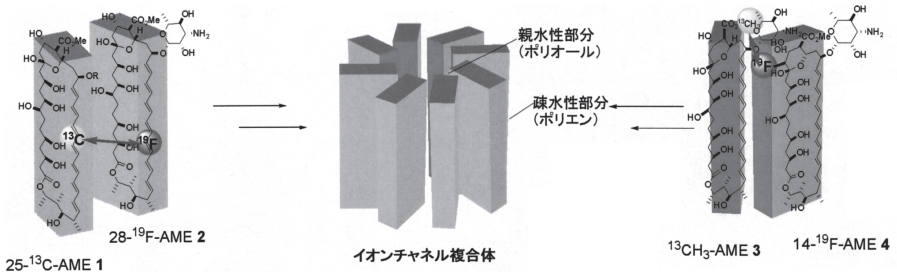
【46】

氏名	松下直広（まつした なおひろ）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 ２２６８０ 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	**標識アンフォテリシンＢの合成およびその脂質二重膜中複合体の構造解析**
論文審査委員	（主査） 教授 村田 道雄 （副査） 教授 久保 孝史　教授 高尾 敏文

論文内容の要旨

アンフォテリシンB(AmB)は放線菌 *Streptomyces nodosus* によって生産されるポリエンマクロリド化合物であり、発見以来五十年経った現在でも重要な抗真菌薬として重用されている。AmBは、生体膜中で親水性のポリオール部分を内側に、疎水性の共役ヘプタエン部分を外側にして膜含有ステロールと共に自己会合することでイオンチャネルを形成し抗菌活性を発現すると考えられている。AmB の選択毒性は、哺乳類の細胞膜に含まれるコレステロールに比べ、真菌類の細胞膜に含まれるエルゴステロールに対して、より高い親和性を持つことに起因すると推定されている。しかし、生体膜系では X 線結晶構造解析や溶液 NMR による構造解析が困難であるため、AmB が形成するイオンチャネル複合体の構造や、コレステロールとエルゴステロールの微妙な違いを認識するメカニズムについては未だに解明されていない。

本研究では、AmB によって形成されるイオンチャネル複合体の構造を解明するために、脂質膜系の構造解析に有用である固体 NMR を適用することとし、固体状態において観測される磁気双極子相互作用によって異種核間距離を正確に測定することを目指した。$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR と呼ばれるこの測定法を適用するためには、^{13}C および ^{19}F で位置特異的に標識した AmB 誘導体を化学合成することが最も重要である。これらを用いて、生体膜中で ^{13}C と ^{19}F の原子間距離を測定することにより脂質膜中でのチャネル複合体の構造を明らかにすることを最終目的とした。このためには、シグナル感度の向上を図ることによって、正確な距離を測定することが必要となる。従来は生産微生物の ^{13}C 源強化培養によって標識体を調製していたが、標識率の低下と標識位置の選択性の低さが問題となっていた。本研究では、化学合成によって特定の位置だけを 100%^{13}C 標識し、さらに培養では導入の困難な ^{19}F 標識体を調製することによって正確な原子間距離測定を目指した。まず、ステロールとの分子認識に重要である疎水性部分を位置選択的に ^{13}C 及び ^{19}F で標識した AmB 誘導体(**1**,**2**)を合成した。次に、親水性部分を位置選択的に ^{13}C 及び ^{19}F で標識した AmB 誘導体(**3**,**4**)を調製し、あわせて固体 NMR 測定を行った。得られた２点間の距離情報を基に、AmB の２分子相互作用を明らかにし、さらにチャネル複合体全体の構造についても検討を行った。



論文審査の結果の要旨

アンフォテリシンB（AmB）は、発見後５０数年を経過した今なお、真菌薬として広く感染症治療に用いられている。その薬理活性は細胞膜中でAmBとステロールが形成するイオン透過性チャネル複合体に由来する。AmBは生体膜中で親水性のポリオール部分を内側に、疎水性の共役ヘプタエン部分を外側にして膜含有ステロールと共に自己会合することでイオンチャネルを形成し抗菌活性を発現すると考えられている。AmBが哺乳類の細胞膜に含まれるコレステロールに比べ、真菌類の細胞膜に含まれるエルゴステロールに対してより高い親和性を持つことで選択毒性を発現していると推定されている。

本研究では、AmBのメチルエステルであるAMEに着目している。AMEはAmBと同様な薬理活性を有しており、AmBの機能を調べるためにも有用な分子である。また、その合成においては、AmBにおけるカルボキシル基の保護基を除去する低収率段階を省けるのでその点でも有利である。すでに、AMEの実践的な合成法は提案されているので、それを改良することから本研究は始まっている。AmBのポリオール部分に相当するC1-C21セグメントは、入手容易な天然AmBからオゾン分解と高井オレフィン化を経て誘導されており、ほぼ全合成したポリエン部分とのStilleカップリングにより連結後、マクロラクトン化を行うことで25-^{13}C-AME および28-^{19}F-AME をそれぞれ合成することに成功している。合成した標識体を用いて$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR測定を行ったところ、25-^{13}C-AMEと28-^{19}F-AME の標識原子間距離が約7.2Åと見積もられ、AMEの疎水性部位における距離の推定に初めて成功している。次に、親水性側に標識を入れた$^{13}CH_3$-AME および14-^{19}F-AME を用いて、同様に$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR測定が行われたところ、標識原子間距離が8.0Åと見積もられた。チャネルを形成している隣同士のAMEが平行かつ同じ高さに配置していると仮定すると、推定された二点間の距離を用いてチャネル構造のモデリングが可能となる。このモデリングの結果、隣り合うAMEラクトン平面の作る角度がおよそ45°と求まったので、AMEが８分子集合することによって、内径8.2Åのチャネル内孔をもつ会合体を形成しうることがはじめて示された。すなわち、AmBについて従来提唱されていた八量体構造チャネルの仮説が、今回AMEによって実験的に裏付けられたと言える。このモデルはAmBイオンチャネル複合体の構造解明へ向けての重要な知見であろう。以上のように、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。