



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/>

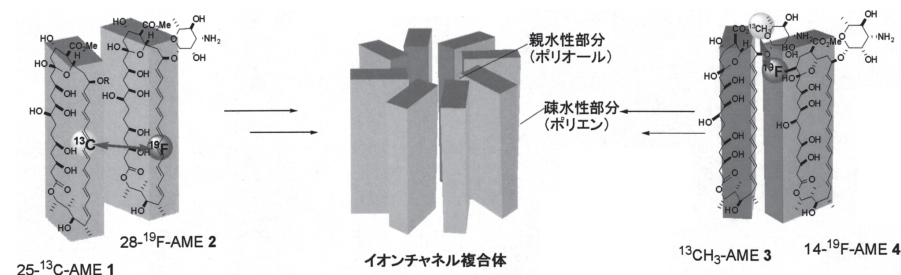
The University of Osaka

氏 名	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 2 2 6 8 0 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。 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ 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 $^{25-^{13}\text{C}}$ -AME および $^{28-^{19}\text{F}}$ -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 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR 測定を行ったところ、 $^{25-^{13}\text{C}}$ -AME と $^{28-^{19}\text{F}}$ -AME の標識原子間距離が約 7.2 Å 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 $^{13}\text{CH}_3$ -AME および $^{14-^{19}\text{F}}$ -AME を用いて、同様に $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR 測定が行われたところ、標識原子間距離が 8.0 Å 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 8.2 Å 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。