



Title	Membrane-active Compounds from Dinoflagellate- Structure-based Mechanism of Action of Amphidinol 3
Author(s)	Respati, Tri Swasono
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/23474">https://hdl.handle.net/11094/23474</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

[8]

氏 名	レスパティ・トリ・スワソノ Respati Tri Swasono
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 1 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 9 月 22 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	Membrane-active Compounds from Dinoflagellate-Structure-based Mechanism of Action of Amphidinol 3. (渦鞭毛藻由来の膜透過化物質・アンフィジノール3の構造を基盤とした作用機構に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村田 道雄  (副査) 教 授 深瀬 浩一 教 授 中谷 和彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

The dinoflagellates of the genus Amphidinium attract much attention because of their production of bioactive compounds, namely amphidinols, karatungliols, lingshuiols, and luteophanols. Seventeen members of the amphidinol family (AMs) have been isolated from the genus. AMs largely exhibit potent antifungal, cytotoxic, and hemolytic activity, and possess common structural features comprising a linear polyhydroxyl moiety, two or three tetrahydropyrans and an olefinic chain. Unlike other natural or synthetic antifungal compounds, AMs lack nitrogenous polycycles or macrocyclic structures in their structures. These unique features make AMs an interesting model to gain a better understanding of the molecular mechanism of antifungal action. Among AM

homologues, amphidinol 3 (AM3) significantly exceeds other homologues in the antifungal activity. The absolute configuration of AM3 was previously determined by extensive NMR experiments on the basis of *J*-based configuration analysis (JBCA) method, modified Mosher method, and HPLC analysis of the degradation products.

AM3 undergoes conformational changes in organic solvents while it takes relatively fix configuration in membrane model. By using NMR data of peracetyl AM3, the configuration of C50-C51 of AM3 which remained uncertain in the previous study can be confirmed as *threo*. The assignment supports that AM3 takes a turn structure around the two tetrahydropyran rings to form a hairpin-like shape. This conformational preference of AM3 is considered to play a crucial role for toroidal formation.

Like other polyene antibiotics, sterols commonly play an essential role in the selective toxicity of AM3. To examine more closely the effects of sterol on the affinity of AM3 to liposomal membranes, a dodecylamine-modified sensor chip was used to carry out kinetic analysis for AM3 binding to sterol-containing and sterol-free palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) liposomes by surface plasmon resonance (SPR).

Among other kinetic models, the two-state reaction scheme best reproduced the SPR sensorgrams, which indicated that the interaction is composed of two steps, which correspond to partition to the membrane and internalization to form stable complexes. The association constant for the first step ( $k_{a1}$ ) and affinity constant ( $K_A$ ) value of AM3 in 5% cholesterol-containing membrane exceeds that in the cholesterol-free one by 180- and 1000-fold, respectively. Although effect of ergosterol on the initial binding process is not as dramatic as in the case of cholesterol, ergosterol stabilizes formation of complex in the second step. As a result,  $K_A$  value of AM3 in 5% ergosterol-containing membrane exceeds that in the sterol-free one by about 5000-fold. These effects of cholesterol and ergosterol may account for the respective potent cytotoxicity and antifungal activities. Interestingly, AMs lack anti-bacterial activity, which is probably due to the absence of sterols in bacterial membranes. Moreover, AM3 showed higher affinity to ergosterol membrane than cholesterol one, particularly, in dissociation process;  $K_{A2}$  of the former was significantly larger than those of the latter. These observations indicate that AM3 forms more stable complex in the presence of ergosterol and may provide a clue for developing a new antifungal drug.

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Swasono 氏は、海洋性単細胞藻類の一種である渦鞭毛藻の生産する抗菌物質・アンフィジノールの化学構造と作用機構に関する研究を博士論文として行なった。かなでも、アンフィジノール3（以下AM3と略称）は、強い抗カビ活性を有し、その作用は細胞膜の透過性を増大させること起因すると推定されている。医薬品として使用されているアンフォテリシンB等と類似性を示す部分もあるが、透過するイオンの大きさが異なることから、新しい作用機構が存在すると考えられており、注目を集めている。AM3の活性発現には、膜中のステロールが必須であることが明らかとなり、ステロールとAM3の相互作用に興味を持たれた。Swasono氏は、まずAM3の作用機構解明に必要な立体配置の確定を行なった。AM3に存在する1,2-ジオール部分はしばしば二種類の回転異性体が混合した配座を示すことが知られていた。特に、50, 51位1,2-ジオール部分については、立体配置が確定していなかった。そこで、分子内水素結合の影響を排除するために、全ヒドロキシ基を酢酸エステル化したAM3誘導体を調製し、各種NMR測定に供した。特に、問題の50, 51位については典型的なゴーシュ形配座に収束していることが確認できたので、この系に有用な、炭素-水素のスピン結合定数を用いた立体配置解析法（JBCA法）を適用してトレオ形配置であることを決定した。

次に、Swasono氏は、AM3の膜透過化活性のステロール依存性を、定量的に解析する目的で、表面

プラズモン共鳴法（SPR）の適用を試みた。本 SPR 実験では、脂質膜への結合と解離の過程の時間経過を観測するのが目的であるが、AM3 のような両親媒性物質は膜への吸着が強く、再現性よい結果を得るのが困難とされていた。Swasono 氏は試行錯誤の結果、検出器表面にその都度脂質膜を形成することによって信頼性の高い数値を得ることに成功した。その結果、AM3 がコレステロールおよびエルゴステロール依存的にリン脂質二重膜に結合すること、その結合速度は、ステロールのない膜にくらべて数十倍大きく、AM3 の抗真菌性を含む生物活性がステロール膜への速い結合によって説明できることを示した。また、これら SPR データに対して、速度論的解析モデルへの適合を調べた結果、二段階反応反応モデルがよい一致を示した。すなわち、AM3 は膜に結合した後、膜中において別の安定構造を取ることが示唆された。これは、以前に提出された AM のトロイダル型チャネル仮説を支持するものである。この二段階目の過程では、コレステロールに比べエルゴステロールの方が約 7 倍安定化作用が高いことが分かった。これらの結果は、AM 類の膜結合過程をリアルタイムで測定した最初の例であり、高く評価されている。また、AM 類がエルゴステロール膜に対する選択性を有することが示されて、抗カビ剤の開発につながる可能性を示した点でも誠に意義深い。

よって、本論文を博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。