The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	多剤耐性克服活性を有する海綿由来の新規ペプチドkendarimide Aの化学構造
Author(s)	曹, 立偉
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44796
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【18】

氏　　名	曹（ソウ）　立（リウ）　偉（エ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　１８６４４　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**多剤耐性克服活性を有する海綿由来の新規ペプチド kendarimide A の化学構造**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小林　資正 （副査） 教　授　田中　徹明　　教　授　北　　泰行　　教　授　今西　　武

論　文　内　容　の　要　旨

がん細胞が作用機序も化学構造も異なる複数の抗がん剤に同時に耐性を獲得する現象はがん多剤耐性（multidrug resistance, MDR）と呼ばれ、抗がん剤によるがん治療の大きな障害になっている。がん細胞が耐性を獲得するメカニズムはいくつか知られているが、薬剤排出膜蛋白質が関わる耐性獲得機構が注目されている。すなわち、多剤耐性がん細胞に過剰発現する P-glycoprotein（P-gp）に代表される膜蛋白質は、がんの治療に用いられる数多くの抗がん剤をポンプのように細胞外へ排出してしまう。従って、P-gp のような膜蛋白質の機能を抑制し、抗がん剤と併用することによりその効果を回復させることができる耐性克服物質が臨床で求められている。これまでに開発された種々の P-gp に対する多剤耐性克服物質は、耐性克服作用以外の生理活性が副作用となるため臨床での応用は困難である。そのため、既存の薬剤に頼らない新しいタイプのがん多剤耐性克服物質を探索する必要があると考えられる。

このような背景から、著者の研究室では新しい医薬リード化合物の開拓を目的とした海洋生物由来の生物活性物質探索研究の一環としてがん多剤耐性克服物質の探索を行っている。著者は、自身の研究室において確立したアッセイ法を用いて種々の海洋生物の抽出エキスをスクリーニングし、インドネシアで採取された *Haliclona* 属海綿のエキスに P-gp を過剰発現するヒト咽頭上皮がん細胞（KB C2）に対する顕著な耐性克服活性を見出したことから活性物質の単離を試みた。この海綿のエキスを活性試験の結果を指標に各種クロマトグラフィーにより精製した結果、活性成分として新規鎖状ペプチド kendarimide A を単離することができた。Kendarimide A は 6 μM の濃度で KB C2 細胞のコルヒチンに対する耐性を完全に克服した。

Kendarimide A は、高分解能 FAB-MS の解析から、分子組成 $C_{83}H_{134}O_{15}N_{14}S_2$ を有すること、各種 2D-NMR スペクトルの詳細な解析から、各１分子の *N*-メチルイソロイシンとフェニルアラニン、各２分子の *N*-メチルアラニンと *N*-メチルシステイン、６分子の *N*-メチルバリンを有することが明らかになった。また、*C*-末端残基はフェニルアラニノール、*N*-末端残基は *N*-メチルピログルタミン酸であることが推定され、kendarimide A は 14 個のアミノ酸から構成される新規鎖状ペプチドであることが明らかとなった。

Kendarimide A を構成するアミノ酸配列の決定は、アミノ酸残基の NH プロトンあるいは *N*-メチルプロトンと隣接するアミノ酸残基のアミドカルボニル炭素との HMBC 相関や NH プロトンあるいは *N*-メチルプロトンと隣接するアミノ酸残基の α-プロトンとの NOESY 相関から推定した。さらに、kendarimide A 及びそのフタル酸エステル誘

導体のFAB MSスペクトルのフラグメンテーションパターンを詳細に解析した結果、2D-NMRデータから推定した配列を確認することができ、kendarimide Aの平面構造を決定することができた。

次に、kendarimide Aに含有されるアミノ酸の絶対立体配置を決定するために、加水分解して得られる各アミノ酸をMarfey法により標準アミノ酸誘導体と比較分析した。その結果、二つの*N*-メチルシステインを除く全てのアミノ酸はL-体であることが判明した。また、kendarimide Aに含有されるフェニルアラニノールはアミノ酸ではないが、Marfey法がフェニルアラニノールの分析に適用できることを今回初めて確認した。

各種2D-NMRデータより、*N*-末端残基は*N*-メチルピログルタミン酸と決定したが、他のアミノ酸残基のプロトンシグナルとのオーバーラップがあるためにシグナルの帰属が不完全であり、かつ*N*-メチルピログルタミン酸を含有する天然物がこれまでに報告されていなかった。そこで、この残基を含む末端ジペプチド（EtO-L-Phe-L-pyroMeGlu）の合成を行い、天然物とのNMRデータを比較し、*N*-末端残基がL-*N*-メチルピログルタミン酸であることを確認した。

Kendarimide Aの*C*-末端側に含まれている二個の*N*-メチルシステインは、天然物を加水分解した段階で分解してしまうため、Marfey法が適用できなかった。また、隣接した*N*-メチルシステインがS-S架橋を形成した八員環構造（*ox*-[MeCys-MeCys]）は天然では非常に珍しい構造であり、その立体構造決定の方法も確立されていない。そこで、この二つのアミノ酸残基の立体化学を決める目的で、二個の*N*-メチルシステイン残基を含む末端テトラペプチドの4種のジアステレオマーの合成を計画した。すなわち、*ox*-[MeCys-MeCys]構造の両側にL-*N*-メチルバリンとL-フェニルアラニノールを結合させたテトラペプチドを合成し、天然物とのNMRデータを比較することにより、二個の*N*-メチルシステインの絶対立体配置を決定できると考えた。

著者は、まずBoc-L-MeCys(Acm)-OHとH-L-Pha-OAcをDEPCを用いて縮合し、ジペプチド(Boc-L-MeCys(Acm)-L-Pha-OAc）とし、Boc基を脱保護した後、再びBoc-L-MeCys(Acm)-OHと縮合させてトリペプチド（Boc-L-MeCys(Acm)-L-MeCys(Acm)-L-Pha-OAc）を得た。最後に、かさ高いFmoc-L-MeVal-OHとの縮合は、Bropを縮合剤に用いることでテトラペプチド（Fmoc-L-MeVal-L-MeCys(Acm)-L-MeCys(Acm)-L-Pha-OAc）が収率良く得られ、脱保護、S-S架橋、脱アセチルを経て、目的のテトラペプチド（H-L-MeVal-*ox*-[L-MeCys-L-MeCys]-L-Pha-OH）の合成を達成した。さらに、同様の合成ルートで他の3種のジアステレオマー（*ox*-[D-MeCys-D-MeCys]、*ox*-[D-MeCys-L-MeCys]、*ox*-[L-MeCys-D-MeCys]）も合成し、天然物との^{1}H-NMRデータの比較から、二つの*N*-メチルシステインも共にL-型であることが判明し、kendarimide Aの全化学構造を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

がん細胞が複数の抗がん剤に対して耐性を獲得する現象はがん多剤耐性（multidrug resistance, MDR）と呼ばれ、抗がん剤によるがん化学療法の大きな障害になっている。がん細胞が多剤耐性を獲得する主な原因は、P-glycoprotein（P-gp）に代表される薬剤排出膜蛋白質がん細胞に過剰発現し、抗がん剤をポンプのように細胞外へ排出してしまうことによる。従って、抗がん剤と併用することによってP-gpのような膜蛋白質の機能を抑制して、抗がん剤の効果を回復させることができる耐性克服物質が臨床で求められている。

このような背景から、著者は海洋生物由来の新しいがん多剤耐性克服物質の探索を行った。耐性克服物質を探索するアッセイ法を用いて種々の海洋生物の抽出エキスをスクリーニングし、インドネシアで採取した*Haliclona*属海綿のエキスにP-gpを過剰発現するヒト咽頭上皮がん細胞（KB C2）に対する顕著な耐性克服活性を見出したことから活性物質の単離を試みた。活性試験の結果を指標に各種クロマトグラフィーにより精製した結果、活性成分として新規鎖状ペプチドkendarimide Aを単離することができた。

Kendarimide Aの各種2D-NMRスペクトルの詳細な解析から、*C*-末端残基はフェニルアラニノール、*N*-末端残基は*N*-メチルピログルタミン酸であり、kendarimide Aは14個のアミノ酸から構成される高度に*N*-メチル化された新規鎖状ペプチドであることが明らかとなった。*N*-末端残基の*N*-メチルピログルタミン酸はシグナルの帰属が不完全であり、天然物にはこれまでに報告例がなかった。そこで、この残基を含む末端ジペプチド（EtO-L-Phe-L-

pyroMeGlu）の合成を行い、構造を確認した。

Kendarimide A を構成するアミノ酸配列の決定は、2D-NMR における HMBC 相関や NOESY 相関から推定し、さらに FAB MS の解析により、平面構造を決定した。

次に、kendarimide A に含有される各アミノ酸の絶対立体配置は、Marfey 法により標準アミノ酸誘導体と比較分析し、加水分解した段階で分解してしまう二つの *N*-メチルシステインを除く全てのアミノ酸は L-体であることが判明した。また、隣接した *N*-メチルシステインが S-S 架橋を形成した八員環構造（*ox*-[MeCys-MeCys]）は天然では非常に珍しい構造であり、その立体構造決定の方法も確立されていなかった。そこで、二個の *N*-メチルシステイン残基を含む末端テトラペプチドの４種のジアステレオマーを合成し、天然物との比較から、二つの *N*-メチルシステインもともに L-型であることを明らかにし、kendarimide A の全化学構造を明らかにした。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。