

Title	Structure-based Study on Mode of Action of Dinoflagellate Metabolites, Amphidinols
Author(s)	蓬台, 俊宏
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45597">https://hdl.handle.net/11094/45597</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	ほ　　だ　　と　　ひ 蓬　　台　　俊　　宏
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　19202　号
学位授与年月日	平成17年3月25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	Structure-based Study on Mode of Action of Dinoflagellate Metabolites, Amphidinols (渦鞭毛藻由来アンフィジノール類の脂質膜透過化作用に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 道雄  (副査) 教授 関口 清俊　　教授 深瀬 浩一

#### 論 文 内 容 の 要 旨

本研究者が研究対象としたアンフィジノール類は渦鞭毛藻が生産する二次代謝産物のひとつで非常に強力な生物活性を有している。1991年に初めて Amphidinol 1 (AM1) が報告されてから今までに、8種類の同族体が報告されている。近年、これら同族体の中でも最も活性の強い AM3 について、その絶対構造が決定された。また、その活性は脂質二重膜に結合し、そのイオン透過性を増大させることで発現することが分かった<sup>3,5</sup>。同様にして活性を発現する化合物として、膜中で会合体を形成する Alamethicin、Magainin、および Amphotericin B (AmB) などが、二重膜構造を破壊する界面活性剤などが知られている。アンフィジノールも含め、これら化合物の共通点は親水基と疎水基が局在化した両親媒性の構造を有している点であった。そこで本研究者は、より詳細な活性発現機構の解明を目指し、AmB との活性発現機構の比較、アンフィジノール同族体を用いた構造活性相関、および生体膜環境下における配座解析を行った。

まず初めに、AM3 の脂質二重膜に対するイオン透過活性発現を AmB と比較した。AmB はこれまで数多くの研究が報告されており、脂質二重膜中で膜ステロールの一種である、エルゴステロールと選択的に相互作用することで会合体を安定化させ、直径が 0.8 nm の内孔をイオンが流れていることが知られている。<sup>23</sup>Na NMR 測定によるステロール選択性試験、散乱を利用した界面活性試験、コロイド浸透圧保護実験、脂質二重膜中における UV 測定など行った結果、AM3 は膜ステロールによってその活性が阻害されるが、会合体を形成し直径が約 2.4 nm の内孔を通ることでイオンが流れることが分かった。

脂質二重膜中で会合体を形成し、イオン透過性を増大させるメカニズムとしては“toroidal”および“barrel-stave”モデルが知られている。“toroidal”はまわりの脂質分子を抱き込み、親水面を内側にした会合体を形成する。一方、“barrel-stave”は脂質二重膜の構造を保ったまま親水面を内側にして会合し、樽状の会合体を形成する。これらモデルの違いは、その内孔の直径で“toroidal”の方が大きい。また、“toroidal”は正電荷を帯びた分子(例: Magainin)が、“barrel-stave”は中性の分子 (AmB, Alamethicin) が形成することも知られている。アンフィジノール分子は中性であるにもかかわらず、その会合体が形成する内孔の直径は大きいことから、どちらのモデルの特徴も見られず、また、このような例もアンフィジノールが初めてであった。

次に、どのようなメカニズムで活性を発現するのか調べるため、同族体を用いた構造活性相関を行った。用いた同族体として AM3 に加えて AM4 (末端のブタジエンがビニル) と AM2 (先端に THP 環) を用いた。これら同族体のイオン透過活性は、強い方から AM3、AM4、AM2 の順になる。膜への分配係数、および形成する会合体の内孔の直径を調べた結果、末端がビニルになることでその分配係数が 1/10 に、先端に THP 環があることで内孔の直径が小さくなることが分かった。

さらに、詳細なメカニズムの解明を目指して Sodium dodecyl sulfate (SDS) ミセル中における配座解析を行った。ミセルは膜環境を再現するだけでなく、溶液 NMR 測定において高分解能のスペクトルが得られることから数多くの膜透過化ペプチドの配座解析に用いられてきた。重水中で AM3 と重水素化 SDS (SDS- $d_{25}$ ) (1:10) と混ぜた試料を調製し、2D NMR スペクトル (DQF-COSY、TOCSY、および NOESY) を測定した。得られた二面角および距離情報を基に配座計算を行った結果、分子中央付近で曲がった配座を取り、また、それはヒドロキシル基間の水素結合で安定化していると考えられる。得られた配座は親水基と疎水基が隣接した AmB のような構造になり “barrel-stave” モデルに似たメカニズムでその活性を発現すると考えている。

### 論文審査の結果の要旨

生体膜の主要成分は脂質および膜タンパク質であるが、近年、マイクロドメインやラフトの生理機能の重要性が指摘されるようになり、脂質二重膜自身が研究対象として重視されるようになった。なかでも、脂質膜と相互作用する低分子化合物は、自然免疫との関連で注目を集めており、生体膜の機能解明のためのプローブ分子としても重要である。蓬台君は、博士論文研究において海洋単細胞藻類である渦鞭毛藻 *Amphidinium klebsii* が産生するポリエンポリオール化合物・アンフィジノールの膜透過化作用の解明を行った。すなわち、アンフィジノールは、今まで知られている膜透過化活性化化合物とは化学構造が大きく異なることから、新たな作用機構が想定されていた。本博士論文では、アンフィジノールがリン脂質二重膜中に形成するイオン透過性チャネルを様々な角度から精査した。具体的には、アンフィジノール 3 について、イオン透過化活性の膜含有ステロール依存性を調べ、さらに赤血球を用いた浸透圧保護実験によるチャネルの大きさを見積もっている。その他、独自の試験法を創出して脂質二重膜との相互作用の解明を進めた。特に、核磁気共鳴法 (NMR) を用いて、アンフィジノール 3 のミセル中での配座を明らかにし、従来ランダム構造を取ると考えていたテトラヒドロピラン環周辺部分が脂質環境中では屈曲した形が比較的安定していることを示し、特異な膜作用の解明に向けた重要な知見を加えた点が評価できる。

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。