



Title	Synthesis and Structure-Activity Relationships of Peptidic Ion Channel Inhibitors, Calciclude and Dendrotoxin I
Author(s)	西尾, 秀喜
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46515
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

氏 名	にし お ひで き 西 尾 秀 喜
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 19683 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 4 月 15 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Synthesis and Structure-Activity Relationships of Peptidic Ion Channel Inhibitors, Calcicludine and Dendrotoxin I (ペプチド性イオンチャンネル阻害剤、カルシクルジンとデンドロトキシン I の合成と構造活性相関)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小林 祐次 (副査) 教 授 前田 正知 教 授 今西 武 教 授 小林 資正

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内外の Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 等の無機イオンは、イオンチャンネルによる選択的な膜透過で制御され、生命維持・情報伝達等に関わっている。近年、多くのイオンチャンネルがクローニングされ、それらの構造、機能ならびに多様性が明らかにされている。イオンチャンネルは、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、非選択カチオンチャンネルに分類され、それぞれに多種のサブタイプが存在する。それらの機能解析には、各々に高親和な阻害剤が不可欠となる。この目的で、ヘビ、イモ貝、サソリやクモ毒液から単離されたペプチド毒が強力なツールとして利用されている。しかし、天然からの供給量は限定され、研究の進展に支障をきたしているため、化学合成によるペプチド毒の安定供給が待たれる。

筆者は、*Dendroaspis* genus に属するマンバ蛇毒液より単離された2種のペプチド性イオンチャンネル阻害剤、カルシクルジン (Calcicludine, CaC) とデンドロトキシン I (Dendrotoxin I, DTX-I) の合成と構造活性相関について研究を行った。CaC は 1994 年に Schweitz らにより *Dendroaspis angusticeps* 毒液より単離され、高閾値活性化型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルのほとんど全てのサブタイプ (L、N、P 型) に作用する。特に、神経系の L 型 Ca^{2+} チャンネルを特異的に阻害する。60 アミノ酸から構成され、3 残基のトリプトファン (Trp)、3 組の分子内ジスルフィド結合を有している。しかし、C 末端構造 (カルボン酸かアミド体の何れであるか)、またジスルフィド架橋様式も未決定であった。一方、DTX-I は 1973 年に Strydom により *Dendroaspis polylepis polylepis* 毒液より単離され、電位依存性 K^+ チャンネルのサブタイプ Kv1.1、Kv1.2 と Kv1.6 に作用する。60 アミノ酸から構成され、1 残基の Trp、3 組の分子内ジスルフィド結合を有している。DTX-I のジスルフィド架橋様式ならびに NMR による高次構造解析は既に報告されているものの、その全合成はなされていない。さらに CaC および DTX-I の一次構造には高い相同性 (分子全体で 40%、C 端 30 残基においては 67%) が認められる。しかし、この相同性に関わらず、CaC は Ca^{2+} チャンネルを、DTX-I は K^+ チャンネルを識別して結合する。

本研究の目的は、1) CaC と DTX-I の化学合成により、各々の一次構造を確定する、2) イオンチャンネル識別能を分子レベルで理解するために、三次構造解析を行う、3) 構造-活性相関を解明し、高親和性・選択性を備えたアナログを開発することにある。先ず CaC と DTX-I の化学合成に際し、Trp 含有長鎖シスチンペプチドの効率的な合成法を開発した。合成は、液相でのセグメント縮合法を適用し、個々のセグメントは Boc 法による最大保護法で

調製した。最終保護ペプチドは、HF 処理により Cys の側鎖保護基であるアセトアミドメチル (Acm) 基以外の全ての保護基を除去し、[Cys(Acm)]₆-ペプチドに変換した。これを精製後、酢酸第二水銀 [Hg(OAc)₂]/2-メルカプトエタノール (2-ME) 処理で Acm 基を除去し、得られた遊離 (Cys)₆-ペプチドを環化、精製し目的物ペプチドを得た。上記経路で合成する途上、次に挙げる点が問題となる。①Trp のインドール保護基として汎用されるホルミル基は、HF での除去に 1,4-ブタンジチオール等のチオール添加が必須となる。しかし、チオール類は、その悪臭のみならず HF 反応時にポリマーを形成し、続く精製操作を煩雑にする。②Cys(Acm)₆-ペプチドから Acm 基を除去する Hg(OAc)₂/2-ME 処理は、Trp 残基の修飾を伴うことを明らかにした。これらの問題点を解決するために、新規 Trp 保護基の開発と同時に、Hg(OAc)₂/2-ME 処理による Trp 残基の修飾反応の抑制法を検討した。その結果、その除去にチオール類の添加が必要でない新規インドール保護基、シクロヘキシルオキシカルボニル基を開発するとともに、Trp 残基の修飾反応機構とその抑制法を提示した。以上の開発、検討により、Trp 含有シスチンペプチドの高効率合成法が構築できた。

次に、この高効率合成法を用いて、選択性の異なる 2 種類のイオンチャンネル阻害剤 CaC (Ca²⁺ チャンネル阻害剤) および DTX-I (K⁺ チャンネル阻害剤) の液相法による化学合成に成功した。CaC の合成では、天然物との比較により、一次構造の確認とともに、C 末端構造 (カルボン酸) とジスルフィド架橋様式を初めて決定した。また、DTX-I の合成では、提出一次構造に基づいた合成品と天然物を詳細に比較分析し、提出一次構造の誤りを訂正した。すなわち、12 位アミノ酸残基はアスパラギンではなく、アスパラギン酸である。

最後に、一次構造上で相同性の高い CaC と DTX-I が、イオンチャンネルを識別する要因を解明するために、合成 CaC および合成 DTX-I の NMR での三次構造解析を行った。両ペプチドの主鎖構造は酷似しているが、唯一 N 端部の構造およびカチオン性アミノ酸の分布に差異が認められた。従って、N 端部にイオンチャンネルを識別する部位があると予測される。そこで、N 端部分を互いに入れ替えたキメラペプチド、CaC(1-30)/DTX(31-60) と DTX-I(1-30)/CaC(31-60) を合成し、CD での構造解析ならびにレセプター活性測定を行い、元の CaC と DTX-I のそれらと比較検討した。その結果、CaC と DTX-I の N 端部位が、分子全体の立体構造を規定するのみならず、Ca²⁺ チャンネルと K⁺ チャンネルの選択的認識に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上の研究成果より、CaC や DTX-I の主鎖の構造を基本とし、イオンチャンネルの選択性が異なった人工ペプチド性イオンチャンネル阻害剤開発の可能性を提示することができた。

論文審査の結果の要旨

西尾秀喜君はペプチドの化学合成の手法を用いてペプチド性イオンチャンネル阻害剤の構造活性相関を解析することを試みた。取り上げた系は、マンバ蛇の毒液に含まれるカルシクルジン (Calcicludine, CaC) とデンドロトキシン I (Dendrotoxin I, DTX-I) の 2 種の毒ペプチドで、前者は Ca²⁺ チャンネルを、後者は K⁺ を阻害する。ともに 60 アミノ酸残基よりなり、Kunitz 型のプロテアーゼインヒビターに属し、3 組のジスルフィド結合の結合様式も同じである。アミノ酸配列においても相同性が高く、分子全体で 40%、C-末端側 30 残基で 67% の相同性を示す。西尾君はこの高い相同性にも拘らず、どの様にしてそれらの標的とするチャンネルに相違を生じさせるのかを、化学合成の手法を用いて明らかにしようとした。その際、これらのペプチドで前者では 3 残基の、後者では 1 残基の Trp が含まれている。西尾君はまず、Trp の保護基および修飾反応の抑制方法を種々検討し、N^m-cyclohexyloxycarbonyl (Hoc) が保護基として有用であることを示し、改良した合成法を用いて、CaC と DTX-I を合成した。合成した両ペプチドを二次元 NMR とディスタンスジオメトリー法により解析し三次元構造を解析し、それらが N-末端側を除いてよく類似していることを示した。次に、CaC(1-30)/DTX-I(31-60) と DTX-I(1-30)/CaC(31-60) の 2 種のキメラペプチドを合成し、イオンチャンネルの選択性を決定しているのが構造を異にする N-末端側 30 残基であることを明らかにした。このように、CaC や DTX-I の構造を scaffold として用いて、イオンチャンネル選択性を付与したイオンチャンネル阻害剤の開発への道を開いた。従って、西尾君の本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認められる。