

Title	アンフォテリシンBが脂質二重膜に形成するチャネル 様会合体の固体NMRによる構造解析
Author(s)	中川, 泰男
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52272
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

アンフォテリシン B が脂質二重膜に形成する チャネル様会合体の固体 NMR による構造解析

平成 26 年度

学位論文

中川 泰男

化学専攻

大阪大学大学院理学研究科

第一	草 序論	
1-1	細胞膜上で複合体を形成する有機低分子化合物	1
1-2	アンフォテリシンB	2
1-3	脂質膜中に形成される AmB とステロールの複合体モデル	3
1-4	AmB とステロールの分子間相互作用	5
1-5	AmB のチャネル様会合体の構造解析	8
1-6	固体 NMR	10
1-7	固体 NMR による AmB 複合体の構造解析	17
1-8	本研究の目的	24
第二	章 AmB とステロール誘導体の親和性評価	
2-1	ステロール誘導体とその合成	32
2-2	AmB とステロール誘導体の親和性評価法	37
2-3	側鎖誘導化ステロールと AmB の親和性評価	40
2-4	炭素環誘導化ステロールと AmB の親和性評価	49
2-5	AmB とエルゴステロールの分子間相互作用	62
実験	項	63
参考	文献	68
第三	章 分子間距離情報に基づく AmB-エルゴステロールの分子間相互作用解	沂
3-1	標識体の調製	71
3-2	32-F-AmB の活性試験	85
3-3	AmB とエルゴステロールの平行型相互用の解析	90
3-4	AmB とエルゴステロールの反平行型相互作用解析	92
3-5	AmB-エルゴステロール分子間距離計算	93
3-6	分子間距離情報に基づく AmB-エルゴステロールのジオメトリー探索	99
実験	項	103
会老	· · · · · · · · · · · · · · · · · · · 	108

第四章 AmB-AmB の分子間相互作用解析	
4-1 26,40- ¹³ C ₂ -AmB と 14-F-AmB を用いた ¹³ C{ ¹⁹ F}REDOR 測定	112
4-2 14-F-AmB を用いた ¹⁹ F CODEX 測定	114
4-3 26,40- ¹³ C-AmB と 32-F-AmB を用いた ¹³ C{ ¹⁹ F}REDOR 測定	116
4-4 AmB-AmB 分子間距離計算	118
4-5 チャネルモデリングによる AmB 二分子間の相対位置の推定	122
4-6 AmB-エルゴステロール複合体の全体構造	141
実験項	149
参考文献	152
第五章 結論	154
合成の部	156
謝辞	187

付録

略語表

AmB amphotericin B

AFM atomic force microscope

BCECF 2', 7'-Bis-(carboxyethyl)-4or5-carboxyfluorescein

CD circular dichroism

Cho cholesterol

CODEX centerband-only detection of exchange

CP cross polarization
DD Dipolar Decoupling

7-DHC 7-dehydrocholesterol

DEAD dethyllazodicarcoxylate

DIAD diisopropylazodicarcoxylate DIBAL diisobutylaluminiumhydride

DMAP 4-dimethylaminopyridine

DMF N, N-dimethylformamide

DMPC dimyristoyl phosphatidylcholine

DMSO dimethyl sulfoxide

DMP Dess-Martin periodinane

DSPC distearoyl phosphatidylcholine

EC₅₀ half maximal effective concentration

EDTA N, N, N', N' ethylenediaminetetraaceticacid

EE ethoxyethyl

EggPC egg yolk phosphatidylcholine

Erg ergosterol

ESI electrospray ionization

FCCP carbonyl cyanid-p-trifluoro-methoxyphenyl hydrazone

Fmoc- 9-fluorenylmethylsuccinimidylcarbonate

FmocOSu 9-fluorenylmethylsuccinimidylcarbonate

HEPES 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonic acid

HPLC high performance liquid chromatography

KHMDS potassium hexamethyldisilazide

LAH lithium aluminium hydride

LHMDS lithium hexamethyldisilazide

LVU large unilamellar vesicles

MAS magic angle spinning

MCMM multi-corner multi-mode

mCPBA m-chloroperoxybenzoic acid

MNBA 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride

MD molecular dynamics

MLV multi lamellar vesicles

MS mass spectrometry

NMR nuclear magnetic resonance

ODS octadecylsilica

OPLS Optimized Potentials for Liquid Simulations

POPC 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

ppm part par million

PT 1-phenyl-1H-tetrazole

Py pyridine

REDOR otational echo double resonance SEM 2-trimethylsilyl-ethoxymethyl

SIMPSON a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy

SPR surface plasmon resonance

TBAF tetrabuthylammoniumfluoride

TBDPS tert-butyldiphenylsilyl
TBS tert-butyldimethylsilyl

TMS trimethylsilyl

TNCG Truncated Newton Conjugate Gradient

THF tetrahydrofuran

TLC thin-layer chromatography
TPPM two pulse phase modulation

UV ultraviolet

VDW van der Waals

第一章 序論

1-1 細胞膜上で複合体を形成する有機低分子化合物

天然に存在する有機低分子化合物の中には、細胞膜上で自己会合により複合体を形 成することで生理活性を発現するものが数多い 1-3。それらの多くは、細胞膜にイオン 透過性の孔を形成したり、界面活性剤のように脂質分子を抜き出したりすることで、 細胞膜が担うバリア機能を破壊する 4。このような膜活性を有する有機低分子化合物 の代表例として、ポリエンマクロライド系抗生物質や膜結合ペプチドが挙げられる (図 1-1)。これらの化合物は細胞膜に直接作用することによって生理活性を発現する ため、その他の薬剤とは異なり耐性菌ができにくい性質を有すると同時に幅広い抗菌 スペクトルを示す。このような特徴から、これら化合物は実際に臨床で使用されてい る例も多く存在し、感染症治療薬として重要な地位を築いている。そのため長年に渡 り、その膜中での複合体構造を含めた作用メカニズムに関する研究が進められてきた。 しかし、これら低分子化合物の活性発現の場である脂質二重膜は、基本的に非結晶性 であり、また、膜法線に沿った分子運動が制限されているので、X線結晶構造解析や 溶液 NMR 法といった従来の構造生物学的手法の適用が困難である。そのため、膜中 での複合体構造や作用メカニズムに関する研究は、その重要度に比べて大幅に遅れて おり、脂質膜中での分子間相互作用を解析するための方法論の確立が求められている。 以降に述べるアンフォテリシン B(AmB, 図 1-1)も細胞膜中で複合体を形成するポ リエンマクロライド化合物であり、本研究では AmB が細胞膜上で形成する複合体の 構造解析を通じて、脂質膜環境下での構造解析法の確立を目指した。

図 1-1 細胞膜上で複合体を形成すると考えられているポリエンマクロライドと膜結合性ペプチドの一例。

1-2 アンフォテリシンB

AmB は、1955 年に放線菌 Streptomyces nodosus から単離され 1959 年に初めて感染症治療への適用が報告された。それ以降、耐性菌のできにくさや極めて広い抗菌スペクトルから現在に至るまで最も広く使用されているポリエン系抗真菌剤である 5-7。

AmB の化学構造は、親水性のポリオール部分と疎水性の共役へプタエン部分からなる両親媒性を示す 37 員環マクロラクトンとマイコサミンで特徴づけられる。その全立体構造は 1971 年にN-ヨードアセチル誘導体のX線結晶構造解析によって決定された 8 。また、AmB のマクロラクトン環は、共役ポリエン構造を持つため比較的強直であり、骨格の配座自由度はヒドロキシ基を持たないC6-C7 がトランスーゴーシュ変換を起こす程度であると計算科学などにより示唆されている(図 1-2) 9 。その作用メカニズムとしては、細胞膜中でAmB が円状に並んだチャネル型会合体を形成するという樽板型モデルがDe kruijff らにより提唱され、広く受け入れられている 10 。

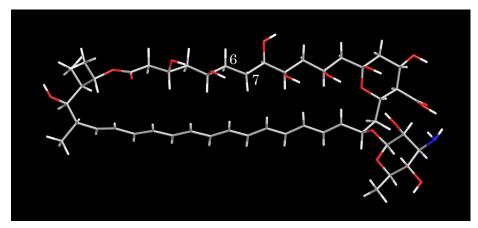


図 1-2 N-ヨードアセチル誘導体の X 線結晶構造解析から得られた AmB の立体構造 (1) (ヨードアセチル基は示していない)。ポリオール部分は 8 位を除いてすべてマクロラクトン環に対し同一方向(紙面手前)に出ている。また。ヘプタエン構造から、全体の構造は比較的硬い。灰色:炭素、白:水素、赤:酸素、青:窒素。

AmB はその構造の複雑さから、多くの合成研究者の注目を集め 1988 年には Nicolau らによりその全合成が達成された $^{12-17}$ 。また、現在でも医薬品としての重要性や特異な生物活性から、誘導体や化学プローブ等などの合成も精力的に行われており、近年には Carreira $^{18-20}$ や Burke $^{21-25}$ らのグループにより 35-deoxyAmB やマイコサミン構造類縁体の合成およびそれらを用いた構造活性相関研究が報告されている。

AmB の選択毒性は、細胞膜の主要構成脂質であるステロールの構造の違いに起因すると考えられている。すなわち AmB はヒト細胞膜に存在するコレステロールに比べ真菌細胞膜に存在するエルゴステロールと高い親和性を有するため、真菌選択性を発現するとされている(図 1-3) $^{26-28}$ 。Bittman らは、25%ステロール含有する卵黄フォスファチジルコリン(EggPC)リポソームに対する結合定数は、コレステロールでは K_a =6.9 ± 1.1×10 $^{-5}$ 、エルゴステロールでは K_a =5.2 ± 1.4×10 $^{-4}$ と報告しており、10 倍程度エルゴステロールとの親和性が高い 29 。また、他のグループも、親和性の差は 15~17 倍程度と報告しており、選択性が十分高いとは言えない 30,31 。AmB がコレステロールに対しても少し親和性を示すことが、腎毒性などの重篤な副作用の原因であると考えられている。

図 1-3 ヒト細胞膜主要脂質であるコレステロールと真菌細胞膜主要脂質であるエルゴステロールの化学構造。AmB は両ステロールの化学構造の違いを認識し選択毒性を発現するものの、親和性の差は10倍程度しかなく副作用が問題となっている。

1-3 脂質膜中に形成される AmB とステロールの複合体モデル

1960 年代後半以降、AmB の活性測定や分光学的手法に黒膜法やリポソーム等の人工モデル脂質二重膜が用いられるようになり、AmB のステロール選択性を含む作用メカニズムをより正確に解析できるようになった³。それ以降、多くのグループからAmB はステロール含有膜中でより強いイオン透過活性を示すこと、またその活性はステロールの構造に大きく依存することが報告されてきた^{3,32,33}。

1969年にAndreoli らはAmBの添加量に依存してリン脂質膜の電気抵抗が低下すること、またその低下はステロール含有膜に対してのみ観測されることを示し、AmBはステロール分子と共に自己会合することでポア状の会合体を形成していると考察した³⁴。それ以降、膜の電気抵抗以外にもイオン透過活性試験やCDスペクトル測定など多くの実験から、AmBはステロール依存的に脂質膜と相互作用し、膜透過活性を

示すことが報告されている 35-38。

1974年にDe Kruijuff らは、AmB 複合体構造をスペースフィリングモデルによる概略図を用いて説明している ¹⁰。彼らは、AmB の透過活性はグルコース程度の大きさの分子しか通さないことやステロールの分子長と AmB のヘプタエン長が同程度であることから、AmB 分子が親水性部分を内側に、疎水性部分を外側にして円状に並ぶことでポアを形成、そして、AmB 分子間にステロールが挿入されているという樽板型モデルを提唱した(図 1-4)。このモデルは多くの科学者に支持され、その後の AmB 作用メカニズム解析の研究基盤となった。

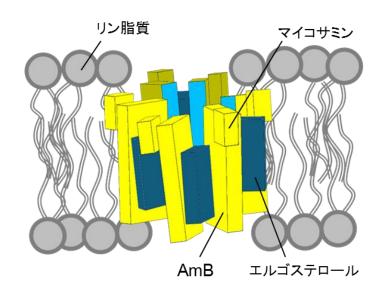


図 1-4 樽板型モデルの概念図。De kruijuff らにより提唱されたこのモデルでは、AmB 分子が親水性部分(図中水色)を内側に円状に配列し、その間にステロールや脂質分子が挿入されることでチャネル複合体を安定化している。チャネル内部をカリウムイオンが通過し、細胞内外のイオン濃度勾配が失われることで真菌細胞は死に至ると考えられている 10 。

長年に渡り、樽板型モデルによるイオン透過活性が AmB の生理活性発現メカニズムであると考えられてきたが、近年では、Burke らのグループにより異なる作用メカニズムが提唱されている。彼らは、35-deoxy-AmB を化学合成し、その生物活性を評価したところ、35-deoxy-AmB は人工モデル膜および酵母細胞に対しイオン透過活性示さないにも関わらず、AmB と同程度の酵母およびカンジダ菌に対する殺菌効果を有することを見出した。またステロール含有リポソームを用いた ITC 測定から C35-deoxy-AmB は脂質膜中のエルゴステロールに選択的に結合していることが明らかに

した 23 。 さらに、アシル鎖にドキシル基を導入したリン脂質を用いた NMR による常磁性緩和促進法からは、高濃度の AmB を加えた場合 AmB の大部分は脂質二重膜には挿入されず脂質膜表面に堆積し、膜中からエルゴステロールを抜き出しているということを示唆する結果が得られた。エルゴステロールは、膜物性の調節、膜タンパクの機能制御、エンドサイトーシス、液胞分離、細胞分裂など様々な生命現象において重要な役割を果たしている。そのため、彼らは実験結果から、エルゴステロールを細胞膜から抜き出すことが AmB の抗真菌作用の主要メカニズムであると提唱している(図 $^{1-5}$)39。しかし、このようなスポンジ型複合体は AmB の濃度が非常に高い時しか観測されておらず、また、同様の測定条件下において AmB は顕著なイオン透過活性を示すことからスポンジ型複合体とイオンチャネル型複合体は平衡状態にあると考えられる。そのため、AmB の詳細な作用メカニズムは議論の対象となっている 40 。

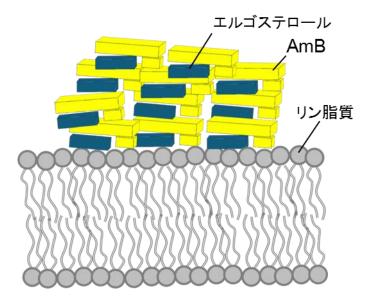


図 1-5 ステロールスポンジモデルの概念図。Burke らにより提唱されたモデルでは、AmB が脂質膜中のエルゴステロール分子に結合した後、膜外へ引き抜き、細胞膜中のエルゴステロールを枯渇させる。その結果、エルゴステロールが関与している様々な生命現象に支障をきたし、真菌細胞は死に至るとされている ³⁹。

1-4 AmB とステロールの分子間相互作用

上述したように、AmB はコレステロールよりもエルゴステロールと高い親和性を有することで、真菌に対する選択毒性を発現すると考えられている。両者のわずかな構造の違いをどのように AmB が認識しているのかに興味が持たれ、これまでにUV/CD スペクトル 35,41-43 や膜透過活性試験 35,44,45、計算科学 46-49 など様々なアプロー

チで AmB のステロール認識機構に関する研究が行われてきた。

Gary-bobo らも、ステロール類縁体を用いた ³¹P NMR 測定によるイオン透過活性試験を行い、AmB の透過活性に対するステロール構造の寄与を考察している。その結果、ステロイド骨格 B 環に二重結合ないもの、もしくは 1 個あるものよりも共役ジエンを持つステロール含有リポソームにおいて AmB は強いイオン透過活性を示すことが明らかとなった ⁴⁴。これらの結果から彼らは、骨格内に二重結合を多く持つステロールほどその骨格が強直になり、AmB のマクロライド環とのファンデルワールス力が大きくなることで親和性が高くなると考察している。このような AmB とステロールの間のファンデルワールス相互作用の重要性は、近年に至るまで様々な実験結果により支持されている ^{50,51}。

ステロールの3位のヒドロキシ基は AmB との水素結合を形成すると想定されており 3,52,53、選択毒性との関連性も示唆されてきた。そのため、ステロールと水素結合を形成する AmB の官能基に関しても多くの議論がされており、マイコサミンにある 2'位のヒドロキシル基が有力視されてきた 19,47,49,53,54。Neumann らは、分子動力学計算を行うことで、AmB とステロールの水素結合に関する考察を行っている 48。彼らは、AmB のマイコサミンの配向を決定する二面角 C18-C19-O41-C42 の分布について、エルゴステロール含有膜ではマイコサミンはクローズ型(図 1-6 右)の配座をとる傾向にあるが、コレステロール含有膜ではオープン型の配座をとりやすい(図 1-6 左)ことを示した。また、クローズ型の配座のみ、すなわちエルゴステロール含有膜のみでマイコサミンの 2'位ヒドロキシ基とステロール 3 位のヒドロキシ基の間に水素結合が形成され、AmB とコレステロールの間には水素結合は観測されないと報告している。

しかし一方で、近年 Burke らにより 2'-OH を化学合成的に除去した C2'-deOAmB は AmB と同等のエルゴステロールに対する親和性を有していることが示されており 21 、ステロール 3 位のヒドロキシ基との相互作用部位は未だ明らかとはなっていない。

また、Baran らのグループも分子動力学計算により、エルゴステロールとコレステロールの親和性の差を考察している 55 。彼らによれば、AmB-ステロール相互作用には上述したステロール 3-OH の水素結合および骨格同士のファンデルワールス相互作用に加え、エルゴステロール側鎖にある二重結合と AmB のヘプタエン間の π - π 相互作用の計 3 か所での相互作用が重要あり、そのため側鎖に二重結合を持たないコレステロールでは AmB との親和性が低くなると考察している(図 1-7)。

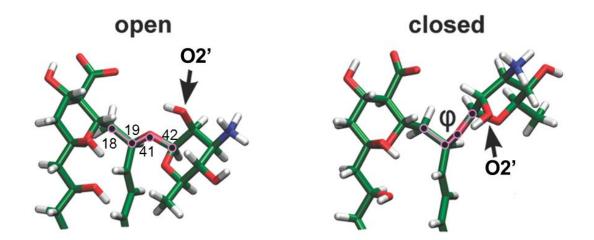


図 1-6 マイコサミンのオープン型(左)とクローズ型(右)の配向。コレステロール含有膜ではオープン型の配向が大部分を占め、ステロールとの水素結合も観測されない。一方、エルゴステロール含有膜ではクローズ型の配座をとり、C2'位のヒドロキシ基とエルゴステロール 3 位との水素結合が観測される。

Adapted with permission from *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 18266-18272. ⁴⁸ Copyright (2010) American Chemical Society.

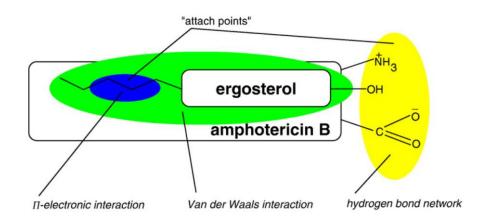


図 1-7 Baran らにより提唱された AmBーエルゴステロールの相互作用モデル。強直な骨格同士のファンデルワールス力に加えて、ヘッドグループ付近に形成される水素結合およびステロール側鎖とヘプタエン間の π - π 相互作用という計 3 点での相互作用が複合体を安定化している。

Reprinted from *Biophys. Chem., 141*, Baran, M., Browski, E., Mazerski, J., Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water II, 162-168. ⁵⁵ Copyright (2009), with permission from Elsevier.

1-5 AmB のチャネル様会合体の構造解析

1974年にDe kruijuff らにより樽板型モデルが提唱されて以来、AmB の複合体は、 医薬品としての重要性やステロールと共に自己会合しポア形成するといった特異な 性質から多くの研究者の注目を集め、様々な手法により構造解析が進められてきた⁴⁰。

Katsu らは、様々な分子サイズの非電解質を用いたモデルリン脂質膜および赤血球膜透過実験を行い、ポアの内径を 7.1 ± 0.1 Å と推察した 56 。また近年では、Yang らにより、AmB のポアサイズは AmB の濃度依存的に大きくなることが報告されており、複合体構造の濃度依存性が示されている 57 。また、AmB 複合体を形成する分子数の推定も行われており、Gruszecki 58 や Ide ら 59 による AFM 測定や単一チャネル電流測定の結果から、6-8 分子から形成されていると推測されている。

また、Gruszecki らは、UV スペクトル測定から AmB のヘプタエン間の距離を見積 もり、より定量的な複合体構造の解析を試みた ⁶⁰。その結果彼らは、ヘプタエン同士 の励起子カップリングの大きさからその距離を 4.7 Å と推定した。しかし、この場合 チャネル内径はおよそ1~2Åとなり、過去の実験値と一致する結果は得られていない。 このように複合体構造に関する断片的な情報は得られているものの、複合体中にお ける分子間相互作用を直接的かつ定量的に解析した例は極めて少ない。また AmB の 複合体構造は二重膜を構成するリン脂質やステロールの種類に大きく依存するため、 実験条件が異なる測定値を比較することが困難である。現在のところ、脂質膜環境下 で複合体における分子間相互作用を原子レベルかつ視覚的に解析可能な手法は計算 科学的なアプローチのみである。そのため、多くのグループにより分子動力学計算が 進められてきた。特に Baginski らのグループは長年にわたり AmB 複合体の構造解析 を行っている $^{9,46-49,61,62}$ 。彼らは、DMPC 膜中に AmB8 分子とステロール 8 分子を埋 め込み、分子動力学計算を行うことで、AmB とステロールが形成する複合体の全体 構造を解析した(図 1-8)。その結果、計算にエルゴステロールを用いた場合とコレステ ロールを用いた場合でチャネル構造に顕著な違いが見られた。エルゴステロール含有 膜ではコレステロール含有膜に比べ AmB 同士で形成される水素結合が減少し、一方 で AmB とステロール間に形成される水素結合は増加した。また、エルゴステロール 含有膜で形成されるチャネルはコレステロール含有膜に形成されたものよりもポア サイズが大きくなった。以上の事から彼らは、エルゴステロールが AmB に結合する ことで AmB 同士の相互作用を阻害し、チャネル様の会合体を安定化していると考察 している。

このように、分子動力学計算からは膜中での複合体の構造を予測する上で重要な知見を得ることができる。しかし、計算は初期構造に依存する部分も多く、また現段階では長くともナノ秒程度の解析が限界であり、実際系で平衡状態に達するまでの時間に比べはるかに短いのも問題視されている。

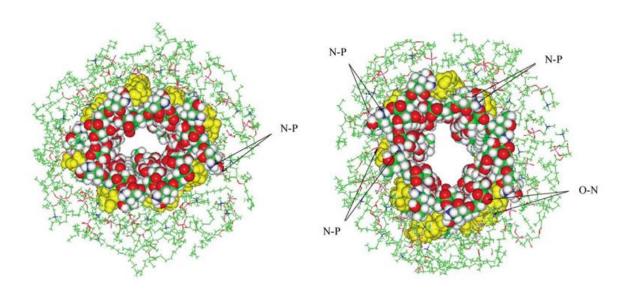


図 1-8 分子動力学計算により推定された AmB-コレステロール(左)および AmB-エルゴステロール(右)会合体構造。ステロールは黄色で表されている。

Reprinted from *Biochim. Biophys. Acta*, *1567*, Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E., Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B – cholesterol / ergosterol membrane channels, 63–78. ⁴⁶ Copyright (2002), with permission from Elsevier.

このように AmB 複合体の構造解明に向けた研究は、長年に渡って様々な方法で行われてきたが、未だにその結果は断片的であり、信頼性などの問題も多い。また、計算科学以外に脂質膜中における分子間相互作用を定量的に解析する方法がほとんどない。そのため、未だにチャネル構造の詳細は不明であり、さらなる研究が求められている。

1-6 固体 NMR

1-6-a 固体 NMR における相互作用

固体 NMR では対象とする分子の運動性が低いため、溶液 NMR とは異なり様々な相互作用が平均化されずに残っている。それらはシグナルの広幅化を引き起こしスペクトルの解析を困難にする。そのため、通常固体 NMR では、試料をマジック角で回転させるか(MAS 法)、もしくは配向サンプルを用い、これに加えて、高出力のデカップリングパルスを照射する。これらの操作によって相互作用を取り除きシグナルの先鋭化を行う。一方で、固体特有の平均化されずに残っている相互作用は、分子の配向情報、運動性、距離情報など構造解析に有用な様々な情報を含んでいる。そのため、高感度でそれらの情報を取得する手法が様々開発されており、それらの多くは生体膜系への適用が試みられている。生体膜系での固体 NMR 測定により得られる情報と測定方法の一例を示した(表 1-1)。

表 1-1 脂質膜に関して固体 NMR から得られる情報

得られる情報	観測する相互作用
原子間距離	双極子相互作用(REDOR, TEDOR, RR等)
運動性 • 配向	四極子分裂幅(² H-NMR 等)
配向	化学シフト異方性 (¹³ C-NMR, ¹⁵ N-NMR, ¹⁹ F-NMR, ³¹ P-NMR 等)

1-6-b REDOR 法

原子間距離は、生体膜サンプルを解析する上で、有用な構造情報となる。例えば、同一分子内において複数の原子間距離を取得することができれば、膜中での分子の配座解析が可能となる。また、分子間の距離情報を取得することができれば、二分子間の相互作用様式の解析、ひいては複合体の構造解析も可能になる。そのため、固体NMRを用いた原子間距離測定手法が数多く開発されてきた。特に、異種核間の距離を高精度で測定可能なRotational Echo Double Resonance(REDOR)法 63-65 は最もよく使われる測定の一つである(図 1-9)。以下にその原理を記す。

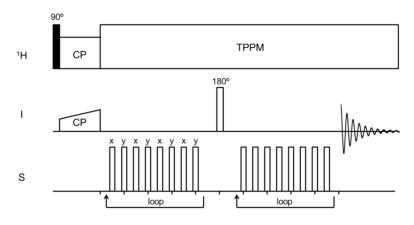


図 1-9 REDOR のパルスシークエンス

二つの核スピンI、S間に生じる双極子-双極子相互作用の大きさ ω_D はスピン間の距離をr、静磁場に対する二つのスピンの角度を θ とすると双極子カップリングDを用いて式 1-1 で表される。

$$\omega_D(\theta) = \pm \pi D(3\cos^2\theta - 1)$$
 (\ddagger 1-1)

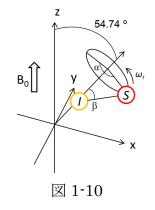
$$D = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar \mu_0}{8\pi^2 r^3} \quad (\text{ } \ \text{ } \ \text$$

 $\gamma_I: I$ 核の核磁気回転比、 $\gamma_S: S$ 核の核磁気回転比、 μ_0 : 真空の透磁率

この双極子作用はシグナルのブロードニングを引き起こし、解析を困難にするため 固体 NMR では通常、MAS 法で消去する。MAS 法ではサンプルを 54.74°(マジック角)

傾けて高速回転させる。この場合、試料を θ =54.74° として配置した場合と同じ効果があり、($3\cos^2\theta$ -1)の項は 0 となるため双極子相互作用は消失する。REDOR 法はこの MAS 条件下で消去された双極子相互作用を選択的に復活させ、特定のスピン間の双極子相互作用の大きさを測定する手法である。

MAS 条件下、時間 t における双極子相互作用の大きさは、MAS の回転速度を $\omega_{\rm r}$ 、I-S ベクトルの方位角を α 、極角を β (図 1-10)とすると式 1-3 で表される。



$$\omega_D(\alpha, \beta, t) = \pm \pi D[\sin^2 \beta \cos 2(\alpha + \omega_r t) - \sqrt{2} \sin 2\beta \cos(\alpha + \omega_r t)] \qquad (\ddagger 1-3)$$

この双極子相互はマジック角での回転により平均化され、t=0 から一回転後(τ_r 後)までを合計すると 0 になる。一方 REDOR 法では、S 核に $t=\tau_r/2$ で 180 ° パルスを照射し、双極子相互作用は平均化を防ぐ。そのため、S 核は双極子相互作用で展開し続ける。この時、一回転後の位相のずれ Φ は式 1-4 で表される。

$$\Phi = \int_0^{\pi/2} \omega_D(\alpha, \beta, t) dt - \int_{\pi/2}^{\pi} \omega_D(\alpha, \beta, t) dt
= \mp 4\sqrt{2}D\tau_r \sin\beta\cos\beta\sin\alpha$$
(\(\frac{\pi}{\pi}\)1-4)

また、 $t=\tau_r$ で 180° パルスを再び照射した後、このサイクルを n 回繰り返すと展開時間 $n\tau_r$ 後の位相のずれは式 1-5 となる。180° パルスを照射した場合、照射していない時にくらべ、この位相のずれの分だけシグナルの強度が減少する。

$$\Phi_n = \mp 4\sqrt{2}Dn\tau_r \sin\beta\cos\beta\sin\alpha$$
 ($\pm 1-5$)

この時、S 核に 180° パルスを照射した時(S)としていない時(S_0)のシグナルの強度比は式 1-6 で表される。

$$S/S_0 = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^{\pi} \sin\beta d\beta \cos(\Delta\Phi_n) \quad (\text{1-6})$$

また、REDOR 減衰率は上式をベッセル関数 $J_k(x)$ により変換することで次のように表される。

$$\Delta S/S_0 = 1 - \left[J_0 \left(\sqrt{2} D n \tau_r \right) \right]^2 + 2 \sum_{k=1}^{\infty} \frac{1}{16k^2 - 1} \left[J_k \left(\sqrt{2} D n \tau_r \right) \right]^2 \quad (\text{\mathbb{Z}} 1-7)$$

このように、REDOR 減衰率($\Delta S/S_0$)は双極子カップリング D と展開時間 $n\tau_r$ で表されるため、展開時間に対して、REDOR 減衰率 $\Delta S/S_0$ の実測値をプロットし、式 1-7 でフィッティングすることにより双極子カップリング D を求めることができる。そして、その大きさから、式 1-2 により原子間の距離を算出できる。

1-6-c CODEX 法

膜タンパクや膜ペプチドなどの多くは生体膜中で複数分子が集まった多量体として存在し、その機能を発現する 66。そのため、膜中での構造解析において会合体を形成する分子数の決定は非常に重要であり、その解析にも固体 NMR が有用なアプローチとなる。近年、Buffy らにより、膜中での会合数の決定が可能な CODEX 法が報告されている 67。CODEX 法は従来、タンパク質などの低速ダイナミクス解析に用いられていたが 68、低温条件下等で分子の運動を完全に抑制するれば、会合数の決定が可能となる。CODEX 法のパルスシークエンスを図 1-11 に示した。

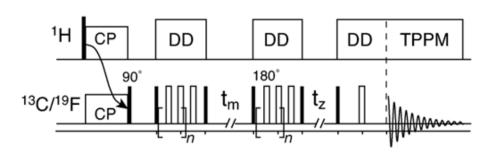


図 1-11 CODEX のパルスシークエンス

n 量体を形成している分子のある一つの原子に 着目すると、それら n 個の原子は化学的には等価 であるが、異なる配向を有する(図 1-12)。固体 NMR ではシグナルの先鋭化のため、通常この異方性は MAS 条件下で消去されているが、CODEX 測定で はローター周期に合わせて 180°パルスを照射する ことで復活させる。その結果、混合時間 (tm)の間に それら原子間でスピン拡散が起こり、観測される エコーの強度が減衰する。混合時間が十分に長い

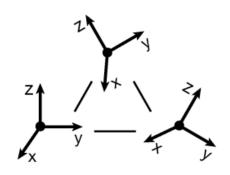


図 1-12 複合体の異方性

とき、シグナル強度は 1/n まで減少するため、その値から複合体の会合数を決定することができる。本測定法を生体膜サンプルへ適用した例としては、観測核としては炭素 13 やフッ素を用いた測定が報告されている。特にフッ素はバックグラウンドからのシグナルがなく、かつ高感度で測定可能であるため、本測定に適した核種であるといえる。

1-6-d 固体 NMR の生体膜への応用

高分解能の装置および測定法の普及に伴い、固体 NMR は生体膜系へ適用されるようになった。また、脂質二重環境下において直接的な構造解析が可能であることから、膜貫通ペプチドや膜タンパクの三次元構造の解析に広く用いられている ⁶⁹⁻⁷²。特に REDOR 法は分子間の距離情報を基に相互作用を解析できるため、重要なツールとなっている。

Mani らは抗菌ペプチドである Protegrin-1 (PG-1)に関して、複数の標識体を用いて分子間 REDOR 測定を行うことで脂質膜中における構造を解析した 73 。PG-1 はアルギニンに富む 18 残基からなる抗菌ペプチドであり、分子内ジスルフィド結合による β -ヘアピン構造を有する。また、脂質膜中で複数の分子間水素結合により安定化されたダイマー構造を形成すると考えられていた。そこで、彼らはダイマーの分子間距離をREDOR 測定により求めることでそのジオメトリーを推定している。

彼らはまず、[13 C'-Cys $_{15}$]PG-1 と[15 N-Cys $_{15}$]PG-1 を用いて 15 N{ 13 C}REDOR および 1 H{ 13 C'}REDOR 測定、さらに[$^{4-19}$ F-Phe $_{12}$, 13 C'-val $_{16}$]PG-1 を用いて 13 C{ 19 F}REDOR 測定を行うことで、複数の分子間距離測定を求めた。PG-1 は分子間水素結合の組み合わせから 6 種類の相互作用様式が想定される(図 1-13A)。そこで、それぞれの相互作用様式での標識原子間の距離を予想し、実測値と比較したところ、ただ、1 つの構造に決定された(図 1-13B)。

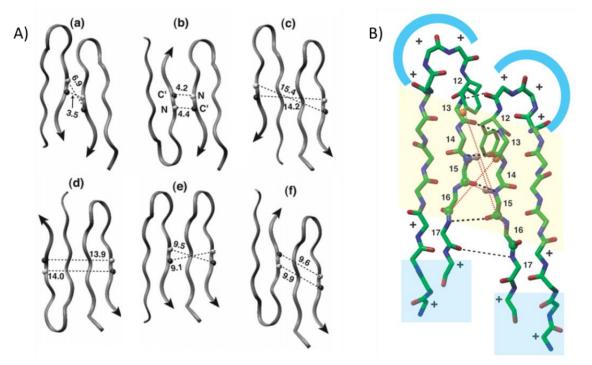


図 1-13 A) 想定された六つの相互作用様式、B) REDOR 測定により決定されたダイマー構造。黒点線:水素結合、赤線: REDOR 測定 Reprinted with permission from *Biochemistry* **2006**, *45*, 8341–8349. ⁷³ Copyright (2006) American Chemical Society.

また、同グループは REDOR 測定等の分子間距離測定以外にも、CODEX 法により 抗菌ペプチドや膜タンパクの膜貫通部位の会合数を決定することにも成功しており、 固体 NMR の使用範囲の幅が広がりつつある。彼らは上述した PG-1 に 4-F-フェニル アラニンを導入した標識体を用いた 19 F-CODEX 測定により、PG-1 が脂質膜中でダイマーとして存在していることを確認した 67 。また、インフルエンザウイルスの M2 タンパク質の膜貫通部位に $^{4-}$ F-フェニルアラニンを導入した化合物を用いた CODEX 測定も行っている 74 。 M2 タンパク質は X 線結晶構造等から 4 量体として存在していることが示されていたが、CODEX 測定から脂質膜中でも同様に 4 量体として存在していることが初めて証明された。またスピン拡散によるシグナルの減衰速度からフッ素間の距離を算出することでその四量体構造を予測することにも成功している(図 1-14)。

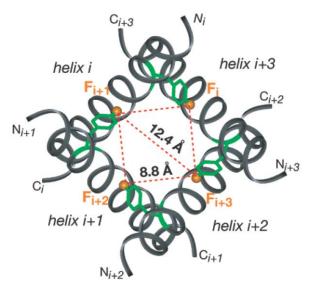


図 1- 14 CODEX 測定により推定された M2 タンパクの膜槓子部位の構造。4-フェニルアラニンをペプチドに導入し会合数の決定、フッ素の分子間距離測定を行った。 Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7242–7251. ⁷⁴ Copyright (2006) American Chemical Society.

このように固体 NMR は、脂質二重膜を再現した環境下において原子間の相互作用を観測することで、より直接的な構造情報を得ることができる。また、固体 NMR は原子そのものが観測対象であるため、蛍光標識化やスピンラベル化などに比べ、標識化による観測分子の化学的性質への影響を最小限に抑えることができる。

1-7 固体 NMR による AmB 複合体の構造解析

上述したように、固体 NMR の生体膜試料への適用例は、タンパク質やペプチド、または膜を構成する脂質分子に限られており、非ペプチド系の化合物、特に天然物に適用された例は極めて稀である。これは、非ペプチド系天然物の分子構造の複雑さに起因する。固体 NMR により精密な解析を行うためには、最適な位置に標識原子を導入する必要があり、天然物の場合は単純なアミノ酸の繰り返し構造を持つタンパク質などに比べその標識体の調製が容易ではない。そのため、AmB の研究においても固体 NMR を用いた解析が報告されているものの、それらは重水素化リン脂質を用いてAmB が引き起こす脂質膜の運動性変化を観察するなどに留まっていた 75-78。

当研究室ではこの課題を克服すべく、これまでに炭素 13 強化培地での放線菌、酵母の培養や、化学合成による誘導化などを駆使し、様々な AmB やエルゴステロールの標識体調製を行ってきた 50,79-86。その結果、それらの標識体を用いた固体 NMR 測定により複合体を構成する分子間の相互作用を直接観測できるようになった。

AmB の複合体形成には AmB、リン脂質、ステロールの 3 成分の分子間相互作用が関与していると考えられるが、これらを同時に解析することは非常に困難である。そこで当研究室では、 $AmB-AmB^{87,88}$ 、AmB-ステロール 50,83,85,86、AmB-リン脂質 79,82,86間の相互作用をそれぞれ個別に固体 NMR で観測することで複合体の解析を進めてきた。

1-7-a AmB-AmB 間の相互作用解析

当研究室の梅川らは、¹³C{¹⁹F}REDOR により AmB-AmB 間の相互作用解析を試みている ^{87,89}。彼らは炭素 13 強化培地で培養した放線菌から抽出した[tri-¹³C] AmB と化学合成により AmB から 5 段階で誘導した 14-F-AmB(図 1-15)を POPC 膜中で混合し ¹³C{¹⁹F}REDOR 測定を行った。その結果、AmB の 14 位のフッ素と 41 位の炭素の原子間距離を見積もることに成功し、コレステロール含有膜では原子間距離が 10.3 Åであるのに対して、エルゴステロール含有膜では 12.1 Å と原子間距離が増加することを明らかとした。また、エルゴステロール含有膜においてのみ、AmB のフッ素と POPC の炭素の間に双極子相互作用が観測され、POPC が AmB の複合体に構造化していることを示した。UV 測定の結果と合わせて考察することで彼らは、エルゴステロールおよびコレステロール含有膜で形成される AmB の複合体モデルを提唱した(図 1-16)。

すなわちコレステロール含有膜では、AmB のみが密に集まった凝集体として存在し、 周囲のリン脂質とは相分離した状態にある。一方、エルゴステロール含有膜では、AmB の分子間にエルゴステロールおよび POPC が挿入され、チャネル様の三者会合体状態 にあると考察している。

$$[\text{tri-}^{13}\text{C}] \text{ AmB} \qquad \text{ho} \qquad$$

図 1-15 [tri-¹³C] AmB、14-F-AmB と POPC の化学構造。

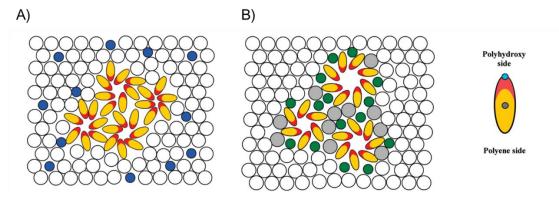


図 1-16 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR と UV スペクトルから推定された POPC 膜中で形成される AmBーステロール会合体の概念図。A) コレステロール含有膜では AmB 同士がランダムに集合した大きな凝集体を形成しており、周囲の脂質分子とは相分離している。(赤と黄色楕円:AmB、青丸:これステロール、白丸:POPC)B) エルゴステロール含有膜では凝集体の形成は抑制され、AmBーエルゴステロールーPOPC の三者会合状態にあり、イオンチャネル型の会合体が形成されている。(赤と黄色楕円:AmB、緑丸:エルゴステロール、灰丸:AmB 複合体に構造化している POPC、白丸:その他の POPC)。Reprinted with permission from *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469. 87 Copyright (2008) American Chemical Society.

1-7-b AmB-ステロール間の相互作用解析

また、当研究室では AmB-エルゴステロールの分子間相互作用に関しても REDOR 測定による解析を進めてきた 50,86 。まず、 13 C 標識体として、酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* を[2- 13 C]酢酸ナトリウムを含む 13 C 強化培地で培養することで、1 つおきに炭素 13 が導入された[skipped- 13 C]-ergosterol (図 1-17 左)を調製した。梅川らはこの 13 C-ergosterol と 14-F-AmB (図 1-15)を POPC 膜中に 1/1 の割合で混合し REDOR 測定を行った (図 1-18)。

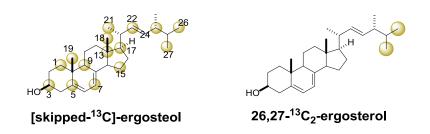


図 1-17 [skipped-¹³C]-ergosterol および 26,27-¹³C₂-ergosterol の化学構造

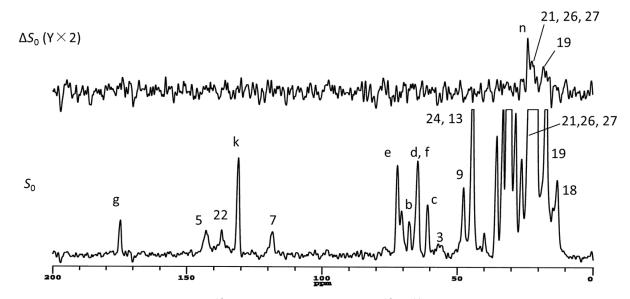


図 1-18 14-F-AmB/[skipped- 13 C]-ergosterol /POPC の 13 C{ 19 F}REDOR スペクトル(下: 非照射スペクトル、上: 差スペクトル)。各間メチルの 19 位および側鎖の 21、26、27 位のメチル基由来であると思われるシグナルに減衰が観測された。

測定の結果、エルゴステロールの19位の角間メチル基および側鎖末端の21,26,27位メチル基に由来すると思われるシグナルにREDOR減衰が観測された。従来の樽板モデルではエルゴステロールのヒドロキシ基がAmBのマイコサミン部と同様の方向を向いて複合体を形成した平行型モデルが想定されていた(図1-19A)^{25,54,55,61}。AmBの14位のフッ素はヘッドグループ付近に位置するため、19位の炭素のREDOR減衰は従来から示唆されてきた相互作用様式を反映しているものと考えられる。一方で、21,26,27位の炭素は全て、エルゴステロールの側鎖に位置している。この側鎖部位にREDOR減衰が観測されたことはAmBのヘッドグループとエルゴステロールの末端側鎖が近接した従来とは逆の"反平行型"モデルの存在を示唆している(図1-19B)。

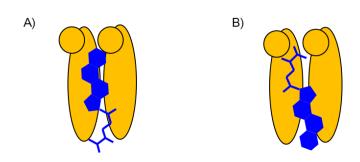


図 1-19 エルゴステロールと AmB の配向(黄楕円: AmB、黄丸: AmB のマイコサミン、青: エルゴステロール)。A) 従来の AmB 複合体モデルで考えられていた平行型相互作用、B) 固体 NMR 測定から新たに予想された反平行型相互作用

反平行型は従来想定されていない相互作用であったが、減衰が観測された付近には、リン脂質やエルゴステロールのその他の位置のシグナルが数多く重複しており、減衰が観測されたシグナルの帰属が明確ではなかった。そのため、筆者らは修士課程においてエルゴステロール 26,27 位のメチル基を位置特異的に標識した 26,27- 13 C₂-ergosterol(図 1-17)を合成し 14-F-AmB との REDOR 測定を行った 86,90 。

その結果、エルゴステロールの標識部位に明確なREDOR減衰が観測され(図1-20)、 エルゴステロールの一部は AmB と 反平行型で相互作用していることが明らかとなった。さらに、標識炭素の減衰の割合から反平行型における AmB の 14 位のフッ素と 26、27 位の炭素の原子間距離を各々5.5、7.0 Å と見積もることに成功している。

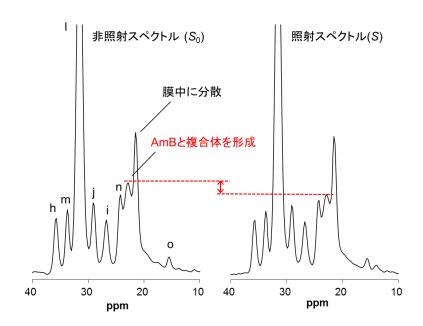


図 1-20 14-F-AmB (1)/ 26, 27- 13 C₂-ergosterol (2)/POPC の 13 C{ 19 F}REDOR スペクトル (左: 非照射スペクトル、右: 照射スペクトル)。エルゴステロール側鎖末端のメチル 基と AmB の 14 位にあるフッ素との間に明確な相互作用が観測された。

1-7-c AmB-リン脂質間の相互作用解析

また、松岡らは[tri-¹³C] AmB(図 1-15)を DMPC および DSPC(図 1-21)で形成したリポソームに導入し、 13 C $\{^{31}$ P $\}$ REDOR を測定することで、リン脂質が AmB 会合体に与える影響を考察した 79 。まず、DMPC 膜中に[tri-¹³C] AmB を導入し 13 C $\{^{31}$ P $\}$ REDOR 測定を行ったところ、AmB の 41 位カルボニル炭素および、39, 40 位メチル基由来のシグナルに顕著な減衰が観測された(図 1-22)。また、ヘプタエンのシグナルには減衰が観測されなかったことから、AmB は DMPC 膜では一分子で膜を貫通した"single-length-channel"を形成しているものと考察した(図 1-23 左)。一方、炭素鎖長の長い DSPC 膜中では 41 位のカルボニル炭素由来のシグナルには明確な減衰が観測されたものの、39,40 位のメチル基由来のシグナルには観測されなかったことから、AmB 一分子では膜を貫通できていない、もしくは、上下にチャネルが並んだ"double-length-channel"を形成していると推察した(図 1-23 右)。

また、梅川らも 14-F-AmB と $[tri-^{13}C]$ -AmB を用いた $^{13}C\{^{19}F\}$ REDOR 測定の結果を DMPC 膜と POPC 膜で比較することにより、両脂質膜中における AmB 会合体の構造 の違いを考察している。POPC 膜では、上述したように AmB、エルゴステロール、 POPC が三者会合状態にありチャネル様の複合体を形成しているのに対し、DMPC 膜

中では、AmB とエルゴステロール間の相互作用は観測されなかったことから、AmB と DMPC のみからなる会合体を形成していると考察している。このように、AmB の 会合状態は二重膜を構成するリン脂質の構造に大きく依存し、AmB-リン脂質間の相 互作用が AmB 複合体構造を左右する重要な要素であることが明らかになってきている。

図 1-21 DMPC および DSPC の化学構造。

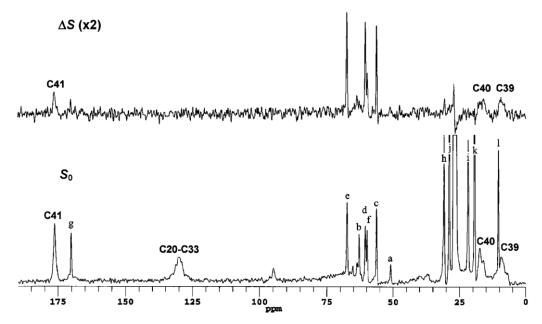


図 1-22 [tri-¹³C] AmB/DMPC=1/10 の ¹³C{³¹P}REDOR スペクトル(下: 非照射スペクトル、上: 差スペクトル)。AmB の両末端の炭素(C39, 40, 41)の 3 箇所で REDOR 減衰が確認され、ヘプタエン炭素(C20-33)では減衰が観測されなかった。

Reprinted with permission from *Biochemistry* **2005**, *44*, 704–710. ⁷⁹ Copyright (2005) American Chemical Society.

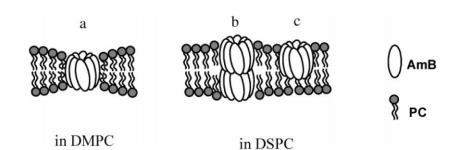


図 1-23 DMPC および DSPC 膜中で形成される AmB 会合体のモデル図。(a)DMPC 膜中では AmB は単分子で膜を貫通した"single-length-channel"を形成している。DSPC 膜中では、(b)二分子長で膜を貫通、もしくは(c)単分子で貫通できていない。

Reprinted with permission from *Biochemistry* **2005**, *44*, 704–710. ⁷⁹ Copyright (2005) American Chemical Society.

1-8 本研究の目的

AmB は医薬品としての重要性や脂質膜中でステロールと共に自己会合しイオン透過性チャネルを形成するという特異な性質から、多くの研究者の注目を集め、これまでに数多くの研究が行われてきた。しかし、未だにその詳細なチャネル複合体の構造は明らかとなっていない。そこで、本研究では脂質二重膜環境下での相互作用観測が可能な固体 NMR を駆使することで、AmB のチャネル複合体の構造を原子レベルで決定することを目的とする。

上述してきたように脂質膜中における AmB の複合体の構造は、AmB の濃度、膜の組成(エルゴステロール、リン脂質)などに大きく依存する。従って、どのような条件で AmB の複合体を解析するかは重要である。過去に行われた固体 NMR や SPR などの結果から、脂質膜の構成脂質として POPC を用いた場合、AmB は脂質膜に含有されたステロールの構造依存的に会合体を形成することが明らかになっている。また、エルゴステロール含有 POPC 膜では、高濃度の AmB が存在する場合にも AmBーエルゴステロールーリン脂質が構造化したチャネル様の複合体が形成される。また、POPCは真菌細胞膜に豊富に存在するリン脂質であることからも、エルゴステロール含有 POPC 膜で形成される複合体構造は、AmB が薬効を発現する際に形成するイオンチャネル複合体内の分子間相互作用を反映しているものと思われる。そこで、本研究では、POPC/エルゴステロール膜系で再現される AmBーエルゴステロールのチャネル様会合体の構造解析を行うこととした。

樽板型モデルを仮定すると、AmB の会合体は AmB とエルゴステロールが円状に並んだ繰り返し構造であると考えることができる。従って AmBーAmB および AmBーエルゴステロールの二種類の二分子間の位置関係を決定することができれば、複合体の全体構造を算出することができる。当研究室はこれまでに、フッ素や炭素 13 等を導入した標識体を用いた REDOR 法により、いくつかの分子間距離情報を取得することに成功している。そこで、本研究では REDOR 測定からさらなる分子間距離情報を取得することで、二分子間の位置関係ひいては複合体の全体構造を明らかにする。

また、分子に標識を導入できる位置には限界があり、また複雑な構造を持つ AmB の標識体を数多く合成するのは現実的ではない。そのため、分子間距離情報のみから 複合体の全体構造を算出するというのは困難が予想される。そこで、距離情報に加えて、フッ素標識化 AmB を用いた CODEX 測定を行うことで、複合体を構成する AmB の分子数の決定も行う。さらに AmB-エルゴステロール相互作用に関しては、様々

なステロール誘導体を用いた AmB との親和性評価も行い、AmB とステロールの相互 作用様式を大まかに予想することにした。以上の実験から得られる情報を総合的に解 釈することで AmB とエルゴステロールが脂質膜中で形成するチャネル様会合体の構造を決定する(図 1-24)。

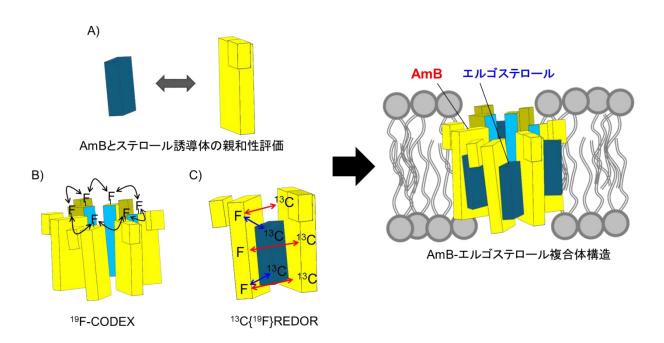


図 1-24 分子間距離情報に基づく AmB 複合体構造解析の戦略。A) ステロール誘導体を用いた AmB との親和性評価。B) フッ素標識化 AmB を用いた CODEX 測定による AmB の会合数の決定。C) フッ素、炭素 13 標識化 AmB およびエルゴステロールを用いた 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定による分子間距離測定。以上の実験から AmBーAmB および AmBーエルゴステロールのチャネル内における位置関係を決定する。

参考文献

- (1) Schreier, S.; Malheiros, S. V. P.; de Paula, E. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1508*, 210–234.
- (2) Sitaram, N.; Nagaraj, R. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1999**, *1462*, 29–54.
- (3) Bolard, J. Biochim. Biophys. Acta 1986, 864, 257–304.
- (4) Shai, Y. Pept. Sci. 2002, 236–248.
- (5) Monk, B. C.; Goffeau, A. Science 2008, 321, 367–369.
- (6) Cannon, R. D.; Lamping, E.; Holmes, A. R.; Niimi, K.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Monk, B. C. *Microbiology* 2007, 153, 3211–3217.
- (7) Duarte, j M.; Betts, R.; Rotstein, C.; Colombo, arnaldo lopes; Moya, luis thompson; Smietana, J.; Lupinacci, R.; Sable, C.; Kartsonis, N.; Perfect, J. N. Engl. J. Med. 2002, 347, 2020–2029.
- (8) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560–4564.
- (9) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. a. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 560–570.
- (10) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.
- (11) Jarzembska, K. N.; Kamin, D.; Hoser, A. A.; Malin, M.; Senczyna, B.; Wozniak, K.; Gagos, M. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 2336–2345.
- (12) Nicolaou, K.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2208–2210.
- (13) Nicolaou, K.; Daines, R.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 2821–2822.
- (14) Nicolaou, K.; Chakraborty, T.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Fuurst, G. T. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 4660–4672.
- (15) Nicolaou, K.; Daines, R.; Uenishi, J.; Li, W. S.; Papahatjis, D. P.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672–4685.
- (16) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. J. Am. Chem. Soc. 1987, 110, 4685–4696.
- (17) Nicolaou, K.; Daines, R.; Ogawa, Y.; Chalraborty, K. J. Am. Chem. Soc. 1988,

- 110, 4696-4705.
- (18) Szpilman, A. M.; Manthorpe, J. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4339–4342.
- (19) Croatt, M.; Carreira, E. Org. Lett. 2011, 13, 1390–1393.
- (20) Volmer, A. a; Szpilman, A. M.; Carreira, E. M. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1329–1349.
- Wilcock, B. C.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Burke, M. D. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 8488–8491.
- (22) Wilcock, B. C.; Uno, B. E.; Bromann, G. L.; Clark, M. J.; Anderson, T. M.; Burke, M. D. *Nat. Chem.* 2012, 4, 996–1003.
- Gray, K. C.; Palacios, D. S.; Dailey, I.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Wilcock, B.
 C.; Burke, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, *109*, 2234–2239.
- (24) Palacios, D. S.; Anderson, T. M.; Burke, M. D. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 13804–13805.
- (25) Palacios, D. S.; Dailey, I.; Siebert, D. M.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011, 108, 6733–6738.
- (26) Teerlink, T.; de Kruijff, B.; Demel, R. a. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *599*, 484–492.
- (27) Kerridge, D. Adv. Microb. Physiol. **1986**, 27, 1–72.
- (28) Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancrède, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1373*, 76–86.
- (29) Readio, J.; Bittman, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219–224.
- (30) Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807–7815.
- (31) Onishi, M.; Kamimori, H. Biol. Pharm. Bull. 2013, 36, 658–663.
- (32) Hartsel, S.; Hatch, C.; Ayenew, W. J. Liposome Res. 1993, 3, 377–408.
- (33) Cohen, B. E. J. Membr. Biol. 2010, 238, 1–20.
- (34) Andreoli, T. E.; Dennis, V. W.; Weigl, a M. *J. Gen. Physiol.* **1969**, *53*, 133–156.
- (35) Vertut-Croquin, A.; Bolard, J.; Chabbert, M.; Gary-Bobo, C. *Biochemistry* **1983**, *22*, 2939–2944.
- (36) Cohen, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *857*, 117–122.

- (37) Capuozzo, E.; Bolard, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *820*, 63–73.
- (38) Vertut-Croquin, A.; Bolard, J.; Gary-Bobo, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *125*, 360–366.
- (39) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; Uno, B. E.; Wildeman, E. L.; Gonen, T.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. Nat. Chem. Biol. 2014, 10, 400–406.
- (40) Kamiński, D. M. Eur. Biophys. J. 2014, 43, 453–467.
- (41) Charbonneau, C.; Fournier, I.; Dufresne, S.; Barwicz, J.; Tancrède, P. *Biophys. Chem.* **2001**, *91*, 125–133.
- (42) Clejan, S.; Bittmans, R. J. Biol. Chem. 1985, 260, 2884–2889.
- (43) Chen, W. C.; Bittman, R. *Biochemistry* **1977**, *16*, 4145–4149.
- (44) Gary-Bobo, C. *Biochimie* **1989**, *71*, 37–47.
- (45) Hsuchen, C. C.; Feingold, D. S. Antimicrob. Agents Chemother. 1973, 4, 309–315.
- (46) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63–78.
- (47) Czub, J.; Neumann, A.; Borowski, E.; Baginski, M. *Biophys. Chem.* **2009**, 141, 105–116.
- (48) Neumann, A.; Baginski, M.; Czub, J. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 18266– 18272.
- (49) Neumann, A.; Czub, J.; Baginski, M. J. Phys. Chem. B 2009, 113, 15875–1 5885.
- (50) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi,
 H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 1178–1185.
- (51) Langlet, J.; Bergès, J.; Caillet, J.; Demaret, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1191*, 79–93.
- (52) Andreoli, T. *Kidney Int* **1973**, *4*, 337–345.
- (53) Silberstein, A. J. Membr. Biol. 1998, 126, 117–126.
- (54) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10667–10675.
- (55) Baran, M.; Borowski, E.; Mazerski, J. *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 162–168.

- (56) Katsu, T.; Okada, S.; Imamura, T.; Komagoe, K.; Masuda, K.; Inoue, T.; Nakao, S. Anal. Sci. 2008, 24, 1551–1556.
- (57) Yang, T.-S.; Ou, K.-L.; Peng, P.-W.; Liou, B.-C.; Wang, W.-T.; Huang, Y.-C.; Tsai, C.-M.; Su, C.-H. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 1794–1801.
- (58) Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Kernen, P. FEBS Lett. 2002, 524, 92–96.
- (59) Hirano, M.; Takeuchi, Y.; Matsumori, N.; Murata, M.; Ide, T. *J. Membr. Biol.*2011, 240, 159–164.
- (60) Gruszecki, W.; Gagos, M.; Herec, M.; Kernen, P. Cell. Mol. Biol. Lett. 2003, 8, 161–170.
- (61) Czub, J.; Baginski, M. J. Phys. Chem. B 2006, 110, 16743–16753.
- (62) Neumann, A.; Baginski, M.; Winczewski, S.; Czub, J. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1485–1494.
- (63) Gullion, T.; Schaefer, J. Adv. Magn. Reson. 1989, 13, 57–83.
- (64) Gullion, T.; Schaefer, J. J. Magn. Reson. 1989, 81, 196–200.
- (65) Gullion, T. Concepts Magn. Reson. 1998, 10, 277–289.
- (66) Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principles of Biochemistry, 2nd ed.*; Worth, 1993.
- (67) Buffy, J. J.; Waring, A. J.; Hong, M. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 4477–4483.
- (68) DeAzevedo, E.; Hu, W. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 8411–8412.
- (69) Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong,
 M. Nature 2010, 463, 689–692.
- (70) Tsutsumi, A.; Javkhlantugs, N.; Kira, A.; Umeyama, M.; Kawamura, I.; Nishimura, K.; Ueda, K.; Naito, A. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1735–1743.
- (71) Paik, Y.; Yang, C.; Metaferia, B.; Tang, S.; Bane, S.; Ravindra, R.; Shanker, N.; Alcaraz, A. a; Johnson, S. a; Schaefer, J.; O'Connor, R. D.; Cegelski, L.; Snyder, J. P.; Kingston, D. G. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 361–370.
- (72) Cegelski, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5767–5775.
- Mani, R.; Tang, M.; Wu, X.; Buffy, J. J.; Waring, a J.; Sherman, M. a; Hong,
 M. *Biochemistry* 2006, 45, 8341–8349.
- (74) Luo, W.; Hong, M. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 7242–7251.
- (75) Dufourc, E. J.; Smith, I. C.; Jarrell, H. C. Biochim. Biophys. Acta 1984, 776,

- 317-329.
- (76) Dufourc, E.; Smith, I.; Jarrell, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *778*, 435–442.
- (77) Paquet, M.; Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancr, P.; Auger, M. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *119*, 1–11.
- (78) Hing, a W.; Schaefer, J.; Kobayashi, G. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 323–332.
- (79) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, 44, 704–710.
- (80) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 3565–3567.
- (81) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6187–6191.
- (82) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608–6614.
- (83) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11977–11984.
- (84) Matsushita, N.; Matsuo, Y.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 114–115.
- (85) Matsumori, N.; Tahara, K.; Yamamoto, H.; Morooka, A.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11855–11860.
- (86) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 83–89.
- (87) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.
- (88) Umegawa, Y.; Adachi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. Bioorg. Med. Chem. 2012, 20, 5699–5704.
- (89) 梅川 雄一 平成 20 年度 大阪大学大学院理学研究科博士論文
- (90) 中川 泰男 平成 23 年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文

第二章 AmB とステロール誘導体の親和性評価

諸言

AmB は、ヒト細胞膜に含まれるコレステロール(Cho)と真菌細胞のエルゴステロール(Erg)の構造の違いを認識し、選択毒性を発現するとされている ¹⁻³。Cho と Erg の構造の違いは、ステロイド環に含まれる二重結合の数、および側鎖に存在する 24 位のメチル基と 22 位の二重結合の有無のみである。これらの構造の違いを AmB がどのように認識しているのかを調べることは、AmB の選択毒性を理解することに加え、AmB と Erg がどのように相互作用しているかを知る上で、有用な情報を与えると期待される。

Bittman のグループは UV 測定の結果から、Cho よりもステロイド環 7 位に二重結合をもつ7-デヒドロコレステロール (7-DHC)の方が AmB との親和性が高いことを報告しており、特に7位の二重結合が AmB との親和性に重要であると考察している 4。一般にこのようなステロールの構造依存的な AmB との親和性の変化は、強固な AmB のマクロライドとのファンデルワールス相互作用 5-7、もしくは静電相互作用により説明される。すなわち、ステロイド環に二重結合が存在することで、分子の揺らぎが抑えられ AmB とのファンデルワールス相互作用を高める、もしくは B 環に共役二重結合が存在することで、局所的な電荷の偏りが生じ、AmB との静電相互作用が強めると考えられている。8.9 一方で、当研究室の野々村らは、炭素環の二重結合を 1~3本持つステロール誘導体と AmB との親和性評価を行ったところ、AmB との親和性には二重結合の数には依存しないことを明らかにした。また、ステロイド環の平面性が高い誘導体ほど AmB との親和性が高くなることから、二重結合依存的なステロイド環の配座変化が AmB との親和性に影響を与えたと考察している 10。

ステロール側鎖構造に関しても同様に、その AmB との親和性への寄与はファンデルワールス相互作用と静電相互作用により説明される。Baginski らは 22 位の二重結合が存在することにより、Erg の側鎖は Cho のそれに比べて揺らぎが少なくなることを分子動力学計算により示している 9,11 。また、Baran らは、側鎖 22 位の二重結合はAmB のヘプタエン部位と $\pi-\pi$ 相互作用することにより AmBーErg 複合体を安定化していると考察している 12 。 一方で Erg 特有の側鎖メチル基の寄与についての報告例はなく、その親和性への影響は明らかとなっていない。

このように、AmB がどのようにステロールと相互作用し、Erg を認識しているのかは未だに多くの研究の対象なっているが、その詳細は明らかとなっていない。その大きな理由としては、大部分の AmBーステロール間の相互作用解析は計算科学や天然から得られるステロール誘導体のみを用いた断片的な実験結果に基づくものと考えられる。そこで本項では、側鎖と炭素環の部分構造を独立に少しずつ変化させた誘導体を合成し、体系的かつ定量的に AmB との親和性を評価することにした。

また、親和性の評価法としては、当研究室で方法論がすでに確立されているステロール含有脂質膜に対する AmB のイオン透過活性試験 2 および表面プラズモン共鳴法 $(SPR 法)^{13}$ による速度論的解析を行うことにした。

2-1 ステロール誘導体とその合成

本項で用いたステロール誘導体の構造を図 2-1 に示した。ステロール側鎖誘導体に関しては、炭素環の構造はすべて Erg と同様のものとし、天然物である Erg 1 と 7-DHC 5) に加えて、22 位の二重結合もしくは 24 位のメチル基を除去した類縁体 2、3 を合成することにした。また、AmB ヘプタエンとの π - π 相互作用について調べるため、側鎖に共役ジエンを導入した誘導体 4 を更に側鎖全体の寄与を調べるために側鎖を短くした誘導体 5 を合成することにした。炭素環誘導体に関してはすでに当研究室の野々村らによりイオン透過活性測定が行われているものの 10 、同測定条件下で側鎖誘導体と比較することを目的とし、再び測定を行うこととした。用いる誘導体としては、 $\Delta 5$,7-共役ジエン体 (Erg 1、7-DHC 5)、 $\Delta 5$ (Bras 7、Cho 10)もしくは7位に二重結合を1 個もつ誘導体 8、11、 $\Delta 5$,7,9-共役トリエン体 12、更に炭素環が完全に飽和な 3- β -コレスタノール 13 を用いることにした。なお、 δ ¹⁴、 δ ¹⁵、 δ ¹¹⁴、 δ ¹⁶は過去の報告例に従い合成した。

図 2-1 親和性評価に用いたステロール誘導体の構造。(A) 側鎖誘導体: すべての誘導体の炭素環構造は共通しており $\Delta 5$,7-共役ジエンを持つ。 (B) 炭素環構造誘導体: 上段と下段の化合物はそれぞれ Erg 側鎖および Cho 側鎖を共通構造として有する。

まず、22- ジヒドロエルゴステロール 2の合成を行った(スキーム 2-1)。Erg 保護体 14^{17} に対し酢酸エチル中 Pd-C を用いて水素添加を行うことで、6 位 22 位のいずれか (15, 15")、および両方(15')が還元された化合物を原料回収とともに得た。また、その 生成比はおよそ、14+15:15'+15"=6:1 であった。続いてジエン部とヒドロキシル基 の脱保護を行い、シリカゲルカラム精製により 2 を Erg 1 との混合物として 3 段階 46%の収率で得た。これらはオープンカラムでの分離が困難であったため、HPLC に より精製することで 2 を単一の化合物として得た。

スキーム 2-1 22- ジヒドロエルゴステロール 2の合成

続いて 24-デメチルエルゴステロール 3 の合成を行った(スキーム 2-2)。アルデヒド 14 に対し 5-イソペンチルスルホニル-1-フェニル-1H-テトラゾール 18 との Julia-Kocienski 反応を行ったところ目的とするカップリング体 16 を E:Z=6:1 の混合物として得た。続いて、共役ジエン部とヒドロキシ基の保護基を除去して 3 を立体異性体との混合物として得た。最後に HPLC 精製を行うことで単一の 3 を得ることに成功した。

スキーム 2-2 24-デメチルエルゴステロール 3の合成

次に側鎖に共役ジェン構造を有する 4 の合成を行った(スキー2-3)。まず、14 に対し水素化アルミニウムリチウムを用いてアルデヒドの還元およびジェン部の脱保護を行いアルコール 17 を得た。このアルコール体に対し Parikh-dering 酸化を行いアルデヒド 18 とした後、ジメチル-3-メチル-2-オキソブチルホスホネート 19 と Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行うことでエノン 19 を高収率で得た。続いて Wittig 反応によりケトン部を末端オレフィン体 20 へと変換した後、TBS 基を除去し、24-デヒドロエルゴステロール 4 を合成することに成功した。

スキーム 2-3 24-デヒドロエルゴステロール4の合成

最後に側鎖部を短くした誘導体であるデス C5-エルゴステロール 6 の合成を行った (スキーム 2-4)。アルデヒド 14 に対してメチルトリフェニルホスホニウムブロミドを 用いた Wittig 反応を行うことで 97%の収率で末端オレフィンへ体 21 と変換した後、 ジエン部の保護と TBS 基を除去することで 6 を 2 段階 71%の収率で合成することに 成功した。

スキーム 2-4 デス C5-エルゴステロール 6 の合成

2-2 AmB とステロール誘導体の親和性評価法

2-2-a K+/H+交換速度測定

AmB のイオン透過活性は脂質膜に含有されたステロールの構造に大きく依存することが知られている。そのため長年に渡り、ステロール含有膜に対する AmB の透過活性がステロールとの親和性の指標として用いられてきた²⁰⁻²³。当研究室の高野らは、

pH 感受性色素である 2', 7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein²⁴ (BCECF、図 2-2)をリポソームに内包することで、AmB の脂質膜に対する透過活性を定量的に解析することに成功している²。本研究においてもこの方法を応用することで、AmB のステロール含有膜に対するイオン透過活性を評価することにした。

図 2-2 pH 感受性色素 BCECF の化学構

本測定法では、BCECFを内包したステロール誘導体含有リポソームの内外にpH およびカリウムイオン濃度の勾配を設ける。脂質膜中にAmB がイオン透過性チャネルを形成すると、濃度勾配に従いカリウムイオンの流入が起きる。また、このカリウムイオンの流入に伴い、リポソーム内のプロトンがイオノフォアであるFCCPによって

外に排出されることでリポソーム内 pH が上昇する。この pH 変化に伴う BCEFC の蛍 光強度上昇を観測することで AmB が引き起こすイオンの流出入をリアルタイムで観 測できるという方法である。

また、AmB のイオン透過活性は i) AmB の膜への吸着および、ii) チャネルの形成という二段階の過程を経て現れる ¹³(図 2-3)。そこで、本測定では AmB をリポソーム溶液に加えるタイミングを変化させることで、脂質膜に含有されたステロールの構造が AmB の活性発現の各段階にどのように影響を与えるかを調べた。すなわち、リポソーム内外に pH およびカリウムイオン濃度の勾配を設けた後、AmB を添加した場合 (添加実験、図 2-4A)、添加後の蛍光強度変化には i)、ii)の両方の過程が反映される。一方、先に AmB を十分時間インキュベートしておき、脂質膜上にチャネルを形成した後、リポソームの内外にイオン濃度勾配を設けると、AmB のチャネル形成は平衡 状態に達しているためチャネルの安定性がより大きく反映される。(インキュベート実験、図 2-4B)。

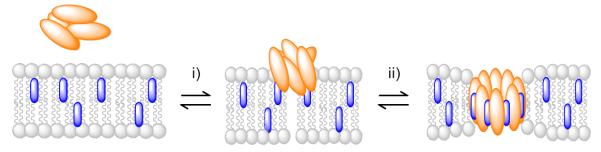


図 2-3 AmB のイオンチャネル形成過程。i) AmB の膜への吸着、ii) チャネルの形成

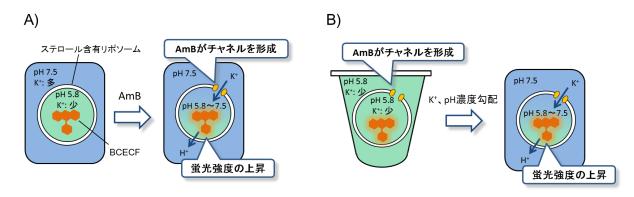


図 2-4 添加実験(A)およびインキュベート実験(B)による AmB のステロール誘導体含有膜に対するイオン誘過活性試験の概略図。

2-2-b ステロール誘導体含有膜を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)

当研究室の毛利らは、Erg もしくは Cho を含有するリポソームをセンサーチップ表面に固定化し、そこに AmB 溶液をインジェクトすることで、各ステロール含有膜における AmB のチャネル形成の速度論的な解析を行った。¹³ 上述したように AmB のチャネル形成の速度論的な解析を行った。¹³ 上述したように AmB のチャネル形成は脂質膜への吸着およびチャネル形成の二段階から成る。そこで、毛利らは、得られたセンサーグラムを式 2-1 で表される二状態反応モデル ^{25,26}でのフィッティングを行うことで各段階の速度論的な解析が可能であることを示した(図 2-5)。式 2-1 の A は AmB、B は脂質膜を表している。 AmB が脂質膜に吸着した状態が AB であり、そこから内部化およびチャネルを形成することで AB*になると仮定している。そこで本研究でも、ステロール誘導体を含有する POPC リポソームに対する AmB の速度定数を算出することで、AmB の活性発現におけるステロール構造の寄与を調べることとした。

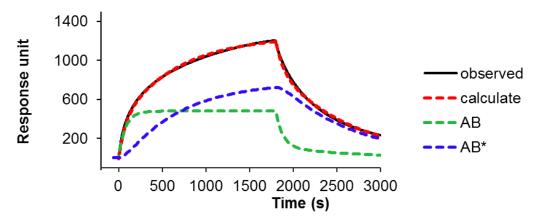


図 2-5 ステロール含有リポソームと AmB の相互作用を示すセンサーグラム(黒実線) および、二状態反応モデルに基づく理論曲線(点線)。AB: AmB の脂質膜への吸着、AB*: AmB のチャネル形成。

2-3 側鎖誘導化ステロールと AmB の親和性評価

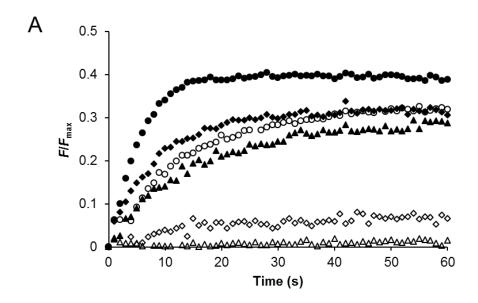
2-3-a イオン透過活性試験

まず、ステロール側鎖誘導体を含有したリポソームに対する AmB のイオン透過活性試験を行った(図 2-3)。図 A には添加実験における AmB 添加後の蛍光強度変化を示した(バリノマイシンを加え完全にリポソーム内外のイオン勾配をなくした際の蛍光強度 F_{max} で規格化したグラフを示した)。このグラフを見るとリポソームに含有されたステロール誘導体の側鎖構造依存的に蛍光強度上昇が起きており、AmB のイオン透過活性はステロールの側鎖構造に大きく依存することが分かる。続いて各ステロール含有膜における K^+/H^+ 交換の初速度を算出することでグラフの定量化を試みた。

AmB の水中から膜への分配はチャネル形成に比べはるかに速い 27 。また、AmB が脂質膜に形成するチャネル型会合体はコンダクタンスが大きく、形成されると即座にリポソーム内外のイオン交換が終了する "all-or-none"型であることが知られている 28 。従って、AmB が引き起こす K^+/H^+ 交換の速度は内外のイオンが未交換のリポソームの残存量のみに依存すると考えれば、時間 t における蛍光強度は F/F_{max} = $1-\exp(-t/T)$ で表すことができる。しかし、図 A を見るとリポソーム内外のイオン交換は途中で頭打ちし、完全には起きないことが分かる。これは、すべてのリポソームにチャネル様会合体が形成されていないことに起因すると考えられる。すなわち、いったん AmB がリポソームに吸着すると水中へ再分配がほとんどされない。その結果、AmB の有効濃度が低くなりすべてのリポソームに AmB が行きわたらずに内外のイオンが未交換のリポソームが残るものと考えられる。そこで、得られた蛍光強度変化のグラフを F/F_{max} = $A(1-\exp(-t/T))$ としてフィッティングし、その結果からイオン交換の初速度 $(r_{mi}$ =A/T (t=0))を算出した(図 2-3B)。

イオン交換の初速度を各ステロール誘導体含有膜で比較すると、Erg 1 に比べ、二重結合およびメチル基のどちらか一方を除去した誘導体 2,3 を含有するリポソームでは AmB の透過活性が大きく低下していることがわかった。さらにその両方が除去された 7-DHC 5 含有膜では AmB の活性は更に低下しており、ステロール側鎖にあるメチル基と二重結合の両方がイオン透過活性に重要であることがわかった。また、AmB へプタエンとの π - π 相互作用が強められると期待された 24 位に二重結合を持つ誘導体 4 含有膜においても、予想に反して AmB のイオン透過活性は低下した。さらに、22 位の二重結合は保持しているが側鎖の大部分を失った誘導体 6 含有膜では、AmB

はほとんど活性を示さず、側鎖の全体構造が AmB のイオン透過活性には必要であることが分かった。



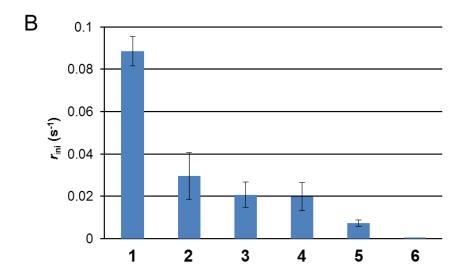
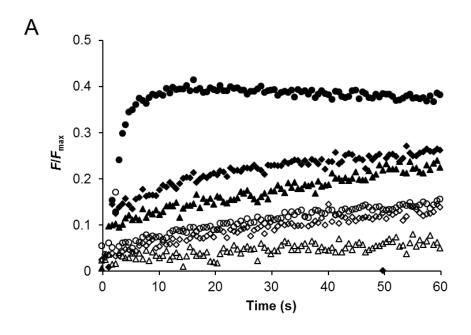


図 2-6 ステロール側鎖誘導体含有膜に対する AmB のイオン透過活性試験(添加実験)。 (A)AmB 添加後の蛍光強度変化(F/F_{max})。(B)AmB 添加直後の K^+/H^+ 交換速度(r_{ini})。 Erg (1, \bullet)、 22-ジヒドロエルゴステロール (2, \bullet)、 24-デメチルエルゴステロール(3, \circ)、 24-デヒドロエルゴステロール (4, \blacktriangle)、7-DHC (5, \diamond)、デス C5-エルゴステロール (6, \vartriangle)。 測定には 5%ステロール含有 POPC リポソームを用い、AmB の濃度は $R_{(AmB/lipid)}$ = 3.16×10⁻³ とした。また、 K^+/H^+ 交換の初速度は実験値を F/F_{max} =A(1-exp(-t/T))で表される曲線でフィッティングすることで算出した(初速度: r_{ini} =A/T (t=0))。

図 2-7A には、AmB を 3 時間リポソームにインキュベートした後、pH およびカリ ウムイオンの濃度勾配を設けることで測定したイオン透過活性試験の結果を示した (インキュベート実験)。ここでも同様に、側鎖構造依存的なイオン交換が見られた。 Erg 含有膜の蛍光強度変化をみると、濃度勾配を設けた後、すぐに蛍光強度が頭打ち していることが分かる。一方、他のステロール誘導体含有膜では数秒間で急激に上昇 した後、緩やかに上昇し続けていることが分かる。これは、Erg 以外のステロール誘 導体含有膜では異なる二つのイオン透過性複合体が形成されていることを示唆して いる。過去の報告例から Erg 含有膜では、AmB と Erg から成る非常にコンダクタンス の高いチャネル様の複合体が形成されるのに対し、Cho含有膜ではコンダクタンスの 低い AmB のみが集まった凝集体が形成されることが明らかになっている 29,30。その ため、Erg 含有膜以外で見られた二種類のイオン透過性複合体はこれら二種類の会合 状態に対応すると考えられる。つまりイオン濃度勾配を設けた後、即座に上昇する成 分が AmB-ステロール会合体由来であると考えられ、初速度はこの成分すなわち AmBーステロール会合体の存在量を大きく反映していると考えられる。従って、初速 度を比較することにより AmB-ステロール複合体の安定性を評価できる。なお初速 度は、濃度勾配を設けた後から 20 秒間の蛍光強度変化を添加実験と同様の式でフィ ッティングすることにより算出した(図 2-7B)。

各ステロール誘導体含有膜におけるイオン交換の初速度は、添加実験と非常に似た傾向が得られていることがわかる。すなわち、Erg 含有膜で最も AmB の透過活性は大きく、二重結合やメチル基を除去したものや二重結合を増やしたものでは低下した。また、メチル基と二重結合の両方を失ったものや側鎖が短くなったものではでは、更に活性が低下した。このように傾向は一致しているものの、添加実験に比べ Erg 含有膜とその他のステロール含有膜における AmB が引き起こすイオン交換の初速度の差は大きくなった。これは、ステロールの側鎖構造がチャネル複合体の安定性に大きく寄与していることを示唆している。



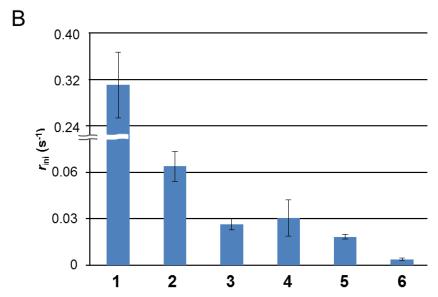


図 2-7 ステロール側鎖誘導体含有膜に対する AmB のイオン透過活性試験(インキュベート実験)。(A)pH および K+の濃度勾配を設けた直後からの蛍光強度変化(F/F_{max})。(B)pH および K+の濃度勾配を設けた直後(0s)の K+/H+交換速度(r_{ini})。 Erg ($\mathbf{1}, \bullet$)、 22-ジヒドロエルゴステロール ($\mathbf{2}, \bullet$)、 24-デメチルエルゴステロール($\mathbf{3}, \circ$)、24-デヒドロエルゴステロール ($\mathbf{4}, \blacktriangle$)、7-DHC($\mathbf{5}, \diamond$)、デス C5-エルゴステロール ($\mathbf{6}, \Delta$)。測定には 5% ステロール含有 POPC リポソームを用い、AmB の濃度は $R_{\text{(AmB/lipid)}}=3.16\times10^{-3}$ とした。また、K+/H+交換の初速度は 0~20 秒までの蛍光強度変化を $F=A(1-\exp(-t/T))$ で表される曲線でフィッティングすることで算出した(初速度は $\Delta F=A/T$ (t=0)で表される)。

2-3-b SPR 測定

続いて、Erg 1 および 7-DHC 5 とその中間の構造を持つ側鎖のメチル基もしくは二重結合を除去した誘導体 2、3 について、脂質二重膜を用いた SPR 実験を行った。各ステロール誘導体含有 POPC リポソームを、ドデシルアミンで修飾した CM5 センサーチップ上に固定することによってステロール-POPC 膜を調製した。その後、AmB の水分散液をセンサーチップにインジェクトすることで AmB とステロール誘導体含有膜の相互作用を解析した。図 2-8 に各ステロール誘導体含有膜を用いて得られたセンサーグラム(黒線)と二状態反応モデルによるフィッティング(赤点線)の結果を示した。

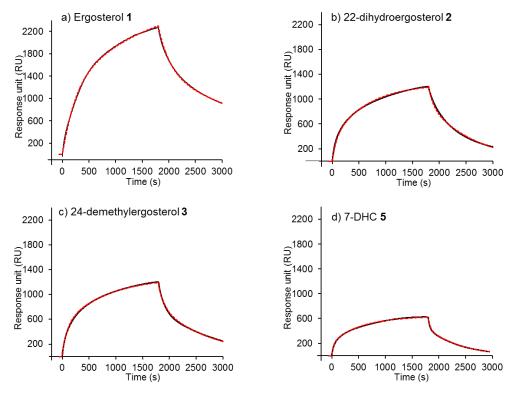


図 2-8 ステロール側鎖誘導体を 20%含む膜に対して AmB (30 μM) を添加して得られたセンサーグラム(黒実線)と二状態反応モデルに基づく理論曲線(赤点線)。ランニングバッファー: 5% DMSO 含有 PBS バッファー、流速: $10 \mu l/min$ 、温度: $25 \, ^{\circ}$ C。

リポソームに含有されたステロールの構造依存的な応答の変化が見られた。また、その傾向はイオン透過活性の結果とよく一致しており、AmB の透過活性が高くなるステロール含有膜ほど、AmB の膜への吸着量が多いことが分かる。さらに、いずれの測定においても、二状態反応モデルによって作成した理論曲線は実験値と非常によい

一致を示した。フィッティングにより得られた各ステロール誘導体含有膜における AmB のチャネル形成の速度定数を表 2-1 に示した。一般に AmB 活性発現の一段階目 の膜への吸着の速度定数は、AmB 溶液の濃度やセンサーチップ表面に固定化された リポソームの量などに大きく左右され、良好な再現性が得られない 13,31 。一方で AmB の複合体の解離の速度定数 k_{d2} はこれらの条件に大きくは依存せず、AmBーステロールの複合体の安定性を再現性良く評価できる 13 。そこで、 k_{d2} の逆数で表される AmB-ステロール複合体寿命(T_{d2})を比較することで AmB-ステロール複合体の安定性を評価することにした。図 2-9 には、各ステロール誘導体含有膜を用いて測定した結果から算出した T_{d2} を示した。 T_{d2} に関しても、イオン透過活性試験とおおよそ一致する結果が得られ、ステロール側鎖の構造が AmB の複合体の安定性に影響を与えることが明らかとなった。

表 2-1 二状態反応モデルによるフィッティングから算出した各ステロール炭素環 誘導体含有 POPC 膜に対する AmB (30 μ M)の吸着およびチャネル形成の速度定数 a

sterol	$k_{a1} (\mathrm{M}^{\text{-}1}\mathrm{s}^{\text{-}1})$	$k_{\rm d1}~(\times 10^{-3}{\rm s}^{-1})$	$k_{a2} (\times 10^{-3} \text{s}^{-1})$	$k_{d2} (\times 10^{-3} \text{s}^{-1})$	$K_{\rm A}(\times 10^3 {\rm M}^{-1})$
Erg 1	29.1	3.10	1.07	0.580	17.2
22-dihydroergosterol 2	15.0	8.30	1.77	1.36	2.35
24-demethylergosterol 3	20.2	10.3	1.47	1.13	2.55
7-DHC 5	46.1	25.4	3.11	1.86	3.03

a 結合定数(k_{a1} 、 k_{a2})、解離定数(k_{d1} 、 k_{d2})および平衡定数 $K_A(k_{a1}/k_{d1} \times k_{a1}/k_{d2})$

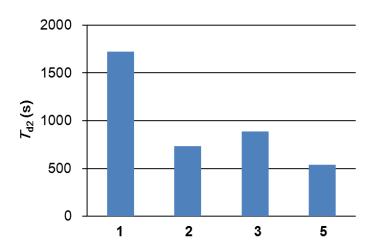


図 2-9 SPR のセンサーグラムのフィッティング結果から得られた会合寿命 T_{d2} は各ステロール含有膜における AmB 複合体の解離速度定数 k_{d2} (表 2-1) の逆数とした。

2-3-c ステロール側鎖の配座計算

本項の測定により、ステロールの側鎖構造は AmB チャネルの安定性に大きく影響 することが明らかになった。一般にステロール分子は脂質膜のアシル鎖のオーダーを 高める効果があることが知られており、また AmB のイオン透過活性も脂質膜のオー ダーに依存することが報告されている ³²⁻³⁴。従って、ステロールによる AmB チャネ ル安定化が、ステロールが引き起こす膜物性変化による間接的効果によるのか、もし くは、チャネル会合体に結合する直接的な相互作用によるるのか、2 つの可能性があ る。この点で、Hsueh らは Erg、Cho および 7-DHC の POPC 膜へのオーダー効果はそ れほど変わらないことを報告している³⁵。また、当研究室の固体 NMR からも AmB と Erg の直接的な相互作用が観測されている 3,17。従って、本測定におけるステロール誘 導体のチャネル安定効果は AmB との直接的な相互作用によるものであると考えるの が妥当である。すなわち、AmB とステロール側鎖誘導体の親和性の差がチャネル安 定化効果の差として現れていると考えられる。このように側鎖構造を明確に認識する 点で、AmB は他のステロールを認識する天然物とは大きく異なり非常に興味深い。 例えば、アンフィジノール3やセオネラミドも同様にステロールの構造を認識する天 然物であるが、その親和性に影響を及ぼすのはステロールの3位にあるヒドロキシ基 の立体など膜中の浅い部分のみであり、ステロール側鎖構造は親和性にあまり影響し ない 3,36-38。従って、この膜の奥深くにあるステロール側鎖との相互作用は AmB もし くはポリエンマクロライド化合物独自のステロール認識のメカニズムであると推測 される。

続いて、ステロール誘導体と AmB の親和性の差の構造的要因を考察することで AmB がどのようにステロールの側鎖構造を認識しているか検討した。最近の報告例を含め、多くの研究により AmB とステロールの相互作用にはファンデルワールス相互作用が重要であることが示唆されている 5-7.22.39。従って、側鎖のメチル基が失われた誘導体は、AmB のマクロライドとのファンデルワールス接触できる面積が低下したことにより AmB との親和性が低下したと考えられる。一方で、二重結合のみを除去した誘導体や二重結合を増やした誘導体は、側鎖のかさ高さが Erg とそれほど違わないにもかかわらず AmB との親和性が低下しており、疎水性部分の面積の大きさのみでは説明できない。Baginski らのグループは、計算科学により Cho の側鎖は Erg の側鎖に比べ、脂質膜中での配座自由度が高いことを報告しており 40、このフレキシビリティが Cho と AmB の弱い親和性の原因となっていると推測できる。そこで、各ス

テロール誘導体の安定配座を計算することにした。図 2-10 には、真空条件下、分子力学計算により得た各誘導体の安定配座から 5 kJ mol⁻¹ 以内の構造を重ね書きした。

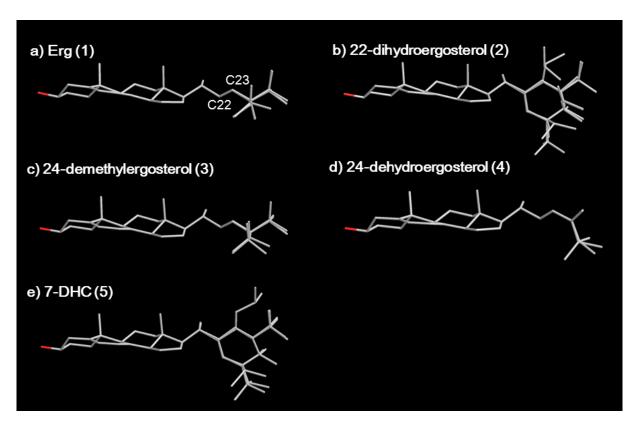


図 2-10 分子力学計算による配座探索から得た各ステロール誘導体の最安定配座から 5 kJmol^{-1} の構造の重ね書き。Erg 1、2、3、4、7-DHC 5 に対し、それぞれ計 15、27、18、7、30 のコンフォマーをステロイド炭素環の RMDS が最少になるように重ねた。

計算の結果、22 位の二重結合の有無により C21-C22-C23-C24 の二面角に大きな違いが見られた。二重結合を持つ Erg 1 やデメチル体 3 ではその二面角はおよそ-120。で固定され、側鎖全体が伸びきった配座をとっているのに対し、22 位が飽和になった誘導体 2,5 ではその二面角およそ 60°になった配座も多く見られた。このステロイド炭素環平面に対し垂直に折れ曲がった配座が、AmB のマクロライド環とのファンデルワールス相互作用を阻害することが予想され、そのため、誘導体 2,5 では AmB との親和性が低下したと考えられる。また、側鎖に二重結合を二本持つ誘導体 4 は共役二重結合部分が s-trans 構造をとるため、側鎖末端のイソプロピル基が炭素環平面に対し垂直方向に向いた状態で固定されている。この構造が、AmB のマクロライドとのファンデルワールス接触面積を低下させると考えられる。

以上の結果からステロール側鎖のメチル基は AmB との主要相互作用であるファンデルワールス相互作用できる面積を増加させる役割、および 22 位の二重結合は側鎖全体が強固な AmB のマクロライドと相互作用できるような配座で固定する役割を果たしていると考えられる。

2-4 炭素環誘導化ステロールと AmB の親和性評価

2-4-a イオン透過活性試験

続いてステロイド環の二重結合の数および位置を変化させた誘導体を含有したリポソームに対するイオン透過活性試験を行った。図 2-11 には添加実験における蛍光強度変化(図 A, B)と K^+/H^+ 交換の初速度を示した(図 C, D)。

Erg および Cho と同様の側鎖を持つ誘導体のいずれにおいても、炭素環部構造に依存的な AmB のイオン透過活性が観測された。また、蛍光強度変化の大きさは Erg 側鎖を持つ誘導体の方が大きいものの、その炭素環構造の依存性の傾向は、側鎖構造が変化しても一致していることがわかる($\Delta 5$,7 $\geq \Delta 7$ > $\Delta 5$ > $\Delta 5$,7,9)。このことから、ステロイド環の構造と側鎖構造はそれぞれ独立に AmB のイオン透過活性に寄与していることがわかる。また、同じ側鎖を持つ誘導体の中では、炭素環 B 環に共役ジェンを持つ誘導体含有膜において AmB のイオン透過活性が最も大きくなった。5 位に二重結合を一つだけ持つ誘導体や完全に飽和な誘導体含有膜では AmB の透過活性は大きく低下した。さらに、AmB のヘプタエンとの π - π 相互作用が強められると期待された共役トリエン体含有膜でも、共役ジエン体に比べ、AmB の透過活性は低下した。一方、興味深いことに、7 位の二重結合を一本のみ持つ誘導体含有膜において、AmB の透過活性は $\Delta 5$,7 に共役二重結合を持つ誘導体含有膜での活性と同程度であることが明らかになった。

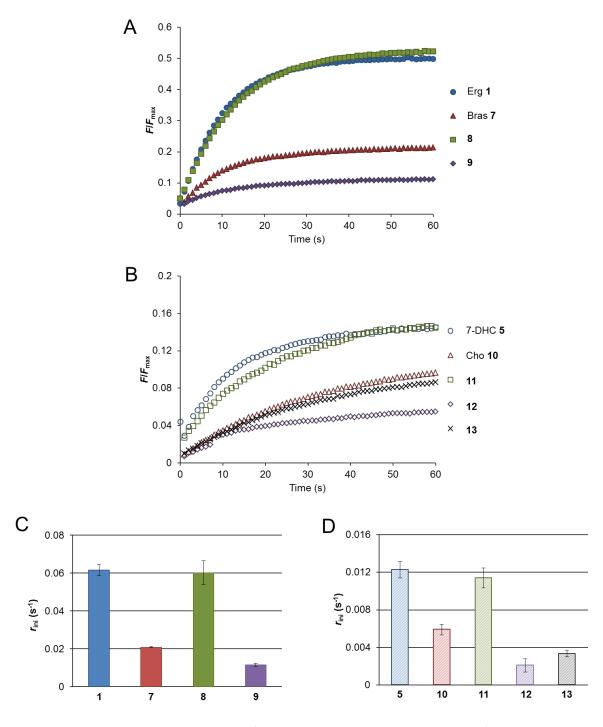


図 2-11 ステロール炭素環誘導体を含有膜に対する AmB のイオン透過活性試験(添加実験)。A、B:AmB 添加後の蛍光強度(F/F_{max})の変化。C、D:AmB 添加直後の K^+/H^+ 交換速度(r_{ini})。 測定には 5%ステロール含有 POPC リポソームを用い、AmB の濃度は $R_{(AmB/lipid)}=3.16\times10^{-3}$ とした。また、 K^+/H^+ 交換の初速度は実験値を $F=A(1-\exp(-t/T))$ で表される曲線でフィッティングすることで算出した(初速度: $\Delta F=A/T$ (t=0))。

続いて、AmB をリポソーム溶液に 3 時間インキュベートした後、pH およびカリウムイオンの濃度勾配を設けることで AmB のイオン透過活性を測定した(インキュベート実験、図 2-12)。インキュベート実験においても、炭素環に共役ジエンを持つ誘導体および 7 位に二重結合を持つ含有膜で AmB の透過活性は最も大きくなり、他のステロール誘導体含有膜では低下するという添加実験と同様の傾向が得られた。一方で、側鎖誘導体を用いた測定でも見られたように、インキュベーション実験においては Erg と 5 位にのみー本二重結を持つ誘導体 8 の活性が強調され、他のステロールとの活性の差が大きくなった。このことから、炭素環構造も側鎖同様に AmB のチャネル複合体の安定性に大きく寄与していることが予想される。

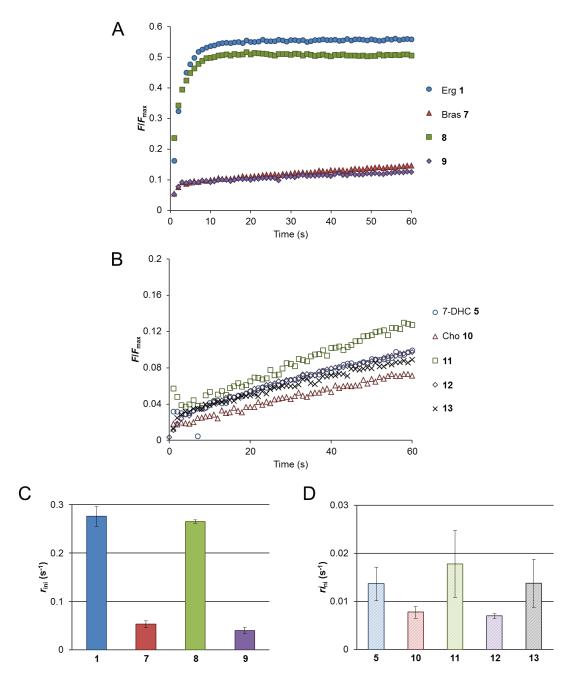


図 2-12 ステロール炭素環誘導体を含有膜に対する AmB のイオン透過活性試験(インキュベート実験)。A、B:pH および K^+ の濃度勾配を設けた直後からの蛍光強度変化(F/F_{max})。C、D:pH および K^+ の濃度勾配を設けた直後(Os)の K^+/H^+ 交換速度(r_{ini})。測定には 5%ステロール含有 POPC リポソームを用い、AmB の濃度は $R_{(AmB/lipid)}$ = 3.16×10^{-3} とした。また、 K^+/H^+ 交換の初速度は $0\sim20$ 秒までの蛍光強度変化を $F=A(1-\exp(-t/T))$ で表される曲線でフィッティングすることで算出した(初速度は $\Delta F=A/T$ (t=0)で表される)。

2-4-b SPR による AmB のチャネル形成の速度論的解析

続いて炭素環誘導体に関しても、SPR 法による親和性評価を行った(図 2-13)。側鎖誘導体を用いた測定結果と同様に、レスポンスユニットの大きさはイオン透過活性試験の傾向とおよそ一致し、イオン透過活性が大きいほど膜への吸着量が多いことが確認された。また、二状態反応モデルによるフィッティングも実験値と良好な一致を示し、その値から AmB-ステロール会合体寿命 T_{d2} を算出した(図 2-13)。5-ジヒドロエルゴステロール 8 の T_{d2} が想定されるよりも小さくなったものの全体の傾向は、イオン透過活性試験の結果と一致しており、炭素環の構造が AmB のチャネル構造の安定性に大きく影響を与えることが明らかになった。

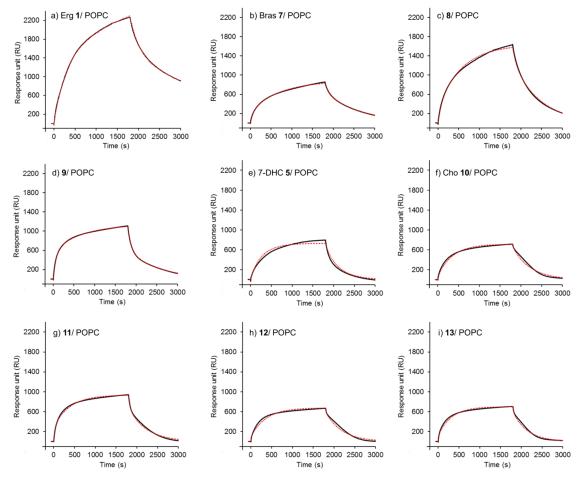


図 2-13 20%ステロール炭素環誘導体含有膜をリポソームに固定化し、30 μ M AmB をインジェクションして得られたセンサーグラム(黒実線)と二状態反応モデルに基づく理論曲線(赤点線)。ランニングバッファー: 5% DMSO 含有 PBS バッファー、流速: 10 μ l/min、温度: 25 °C。

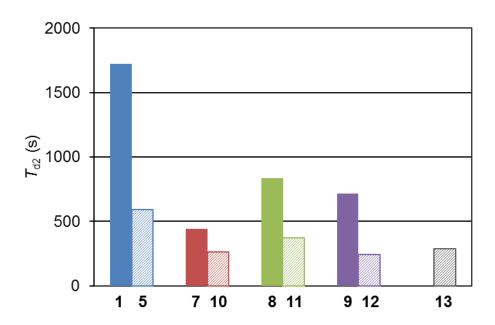


図 2-14 SPR のセンサーグラムのフィッティング結果から得られた k_{d2} より算出した、各ステロール炭素環誘導体含有膜における AmB 複合体の会合寿命 T_{d2} 。 T_{d2} = $1/k_{d2}$ として計算した。

表 2-2 二状態反応モデルによるフィッティングから算出した各ステロール炭素環誘導体含有 POPC 膜に対する AmB (30 μ M)の吸着およびチャネル形成の速度定数 $^{\rm a}$

sterol	$k_{a1} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{\rm d1}~(\times 10^{-3}{\rm s}^{-1})$	$k_{\rm a2} \ (\times 10^{-3} {\rm s}^{-1})$	$k_{\rm d2} \ (\times 10^{-3} \rm s^{-1})$	$K_{\rm A} (\times 10^3 {\rm M}^{-1})$
Ergo 1	29.1	3.12	1.07	0.580	17.2
Bras 7	17.6	7.72	3.07	2.25	3.10
8	34.1	8.51	2.12	1.20	7.09
9	42.0	12.0	1.11	1.39	2.78
7-DHC 5	47.3	23.4	3.15	1.69	3.78
Cho 10	28.2	24.3	19.0	3.82	5.80
11	41.3	22.4	3.82	2.70	2.61
12	24.8	14.3	7.31	4.14	3.07
13	64.4	51.0	11.3	3.46	4.11

a 結合定数 (k_{a1}, k_{a2}) 、解離定数 (k_{d1}, k_{d2}) および平衡定数 $K_A(k_{a1}/k_{d1} \times k_{a1}/k_{d2})$

2-4-c ステロール誘導体含有膜における AmB の UV 測定

更に、炭素環中の二重結合が AmB のチャネル形成にどのように影響するかを詳細に調べるため、ステロール誘導体含有 POPC 膜中での AmB の UV スペクトルを測定した(図 2-15)。

水溶液中において AmB のヘプタエンは 408、385、365 nm にモノマー由来、328 nm 付近に凝集体由来の特徴的な吸収ピークを示すことが知られている(図 2-15a)⁴¹。一方 Erg 含有 POPC 膜においては、最も長波長側にあるピークが 415 nm にシフトする。この長波長シフトは、AmB が膜中に挿入された結果、ヘプタエン発色団周囲の疎水性が上がったためだと考えられている ⁴¹。一方で他のステロール誘導体含有膜中では、408nm と 415 nm の両方のピークが観測された(図 h)。これは、他のステロール含有膜では AmB が水溶液中と脂質二重膜内部の両方に分配されることを示している。興味深いことにこの分配率はイオン透過活性試験結果の傾向とよく一致している。つまり、Erg 1 および 5 位にのみ二重結合を持つ 8 では AmB の大部分は膜中に分配されているが、活性が低かった Bras 7、7-DHC 5、Cho 10、ステロール非含有膜では水中への分配率が大きくなっている。このことから、AmB と高い親和性を有するステロール誘導体含有膜ほど AmB の膜中へ取り込まれる AmB の量が多くなることが示された。

また、320-350 nm 付近の AmB の会合状態を反映していると考えられている浅色シフト (短波長シフト) によるピーク変化が認められた。浅色シフトの大きさは、平行に並んだ 2 つの AmB のヘプタエン発色団の距離に依存すると考えられており、ヘプタエン同士の距離が近い場合、浅色シフトは大きくなり短波長にピークが現れる ^{29,42}。当研究室の梅川らは、Cho 含有膜やステロール非含有膜において、AmB はランダムに集まり、イオン透過活性をほとんど持たない凝集体を形成し、それらは脂質膜から相分離もしくは膜外に出ると考察している ²⁹。そのため、Cho 含有膜やステロール非違含有膜で見られた非常にブロードかつ短波長に観測される浅色シフトはそのような凝集体を反映しているものと考えられる。また、あらかじめインキュベートして行ったイオン透過活性実験で見られた、緩やかにイオン交換を引き起こす成分がこの凝集体に対応すると考えられる。一方、AmB が高いイオン透過活性を示すステロール誘導体含有膜ほど浅色シフトは長波長側にシャープなピークとして観測された。

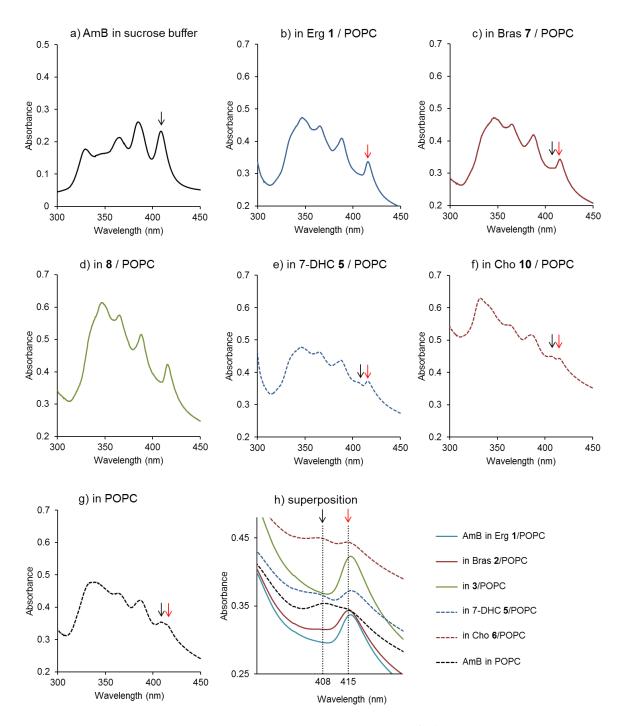


図 2-15 スクロース溶液(a)および 20%ステロール誘導体含有 POPC 膜(b-g)における AmB の UV スペクトル。(h)各ステロール誘導体含有 POPC 膜における AmB の UV スペクトルを重ね書きし、390 nm -420 nm 部分を拡大した図。黒矢印と赤矢印はそれぞれ膜中(415 nm)および水溶液中(408 nm)の AmB 由来の吸収ピークに対応する。スクロース溶液中の AmB の濃度は $5.27~\mu M(R_{(AmB/lipid)}=3.16\times10^{-2})$ 。

これは AmB のヘプタエン同士の距離が一定以上に保たれ、かつ比較的均一になっていることを表しており、AmB とステロールが形成する樽板型のチャネル構造を反映していると考えられる。

以上の結果から脂質二重膜に含有されたステロール炭素環の二重結合の位置、数に依存して AmB の膜への取り込みとチャネル形成が促進されることが確認された。

2-4-d 14-F-AmB と 4-¹³C-Erg および 4-¹³C-Cho の固体 NMR 測定

続いて、固体 NMR 測定により AmB とステロール間の相互作用をより直接的に解析することにした。第一章で述べたように固体 NMR の一種である ¹³C{¹⁹F}REDOR 測定では炭素 13 とフッ素の原子間距離を見積もることができる。そこで、14-F-AmB と 4-¹³C-Erg および 4-¹³C-Cho を用いて AmB のマクロライドから A 環部までの距離を調べることで、ステロイド炭素環構造が AmB との親和性に与える影響を調べることとした。まず、AmB と 4-¹³C-Erg もしくは 4-¹³C-Cho を水和 POPC 膜に混合し、CP-MAS ¹³C NMR 測定を行うことで、ステロール 4 位の炭素の化学シフトを確認した(図 2-16)。 AmB を加えず、ステロールのみを脂質二重膜に加えた時、4-¹³C-Erg および 4-¹³C-chol の 4 位の炭素のシグナルはそれぞれ 42.3 ppm および 43.4 ppm にシャープなピークとして観測された。一方、AmB を添加すると、図中に矢印で示したように Frg 全有

AmB を加えず、ステロールのみを脂質二重膜に加えた時、4-**C-Erg および 4-**C-chol の 4 位の炭素のシグナルはそれぞれ 42.3 ppm および 43.4 ppm にシャープなピークとして観測された。一方、AmB を添加すると、図中に矢印で示したように Erg 含有膜では 39.7 ppm 付近に新たにブロードなピークが観測された。また、そのピークはAmB の添加量を増やすと AmB を加えていない時にも存在していたシャープなピークに対する相対的な強度が大きくなっていった。この事から、このピークは AmB と相互作用している Erg 由来のシグナルであると考えられる。筆者らは 26,27-¹³C₂-Erg を用いた同様の測定でも、このように AmB と相互作用している場合としていない場合で Erg の標識炭素の化学シフトが異なることを報告しており ¹⁷、本測定においても同様の現象が観測されたものと思われる。一般に ¹³C NMR の化学シフトは周囲の化学的環境に大きく依存することが知られており、AmB 複合体に結合することで Erg の化学的環境が変化し、化学シフトが変化したものと考えられる。

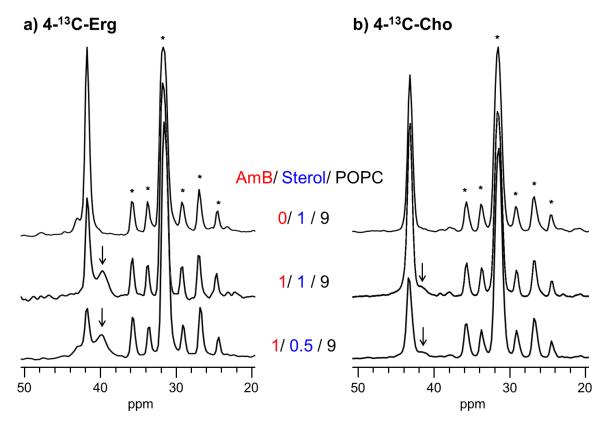


図 2-16 AmB/4-¹³C-Erg/POPC(a)および AmB/4-¹³C-Cho/POPC(b)の CP-MAS ¹³C NMR スペクトル(上段:AmB/ ¹³C-sterol/POPC=0/1/9、中段:1/1/9、下段:2/1/18)。黒矢印:AmB と相互作用している Erg および Cho。図中の*は POPC 由来のシグナル。測定温度:30 °C、MAS 速度: 5k Hz。

一方で、Cho 含有膜においては、40.7 ppm 付近に新たなピークが観測されたものの、その強度は非常に小さかった。これは、Cho と AmB の親和性が非常に弱いため、AmB と相互作用している Cho の総量が少ないことを示している。このように固体 NMR による直接的な相互作用の観測においても Erg と Cho の親和性の差が示された。

続いて 14-F-AmB と 4^{-13} C-Erg もしくは 4^{-13} C-Cho を POPC 膜に 1:1 で混合し、REDOR 測定を行った(図 2-17)。生理的温度(38° C)では、AmB と相互作用している Cho のピーク強度が小さかったため、測定は -30° C で行った。Erg 含有膜、Cho 含有膜共に低温条件下では、AmB と相互作用していないステロール由来のシャープなシグナルの強度が減少し、相互作用しているピークをより明確に観測できるようになった。一般にリン脂質はゲル層中では運動性が低下することによりシグナル強度が大きく減少することが知られている 43,44 。おそらく、AmB と相互作用していない Erg も同様の理由でシグナル強度が低下したものと思われる。

REDOR 測定の結果、AmB と相互作用している Erg および Cho の 4 位のシグナルに 明確な REDOR 減衰が観測され、その減衰の大きさはそれぞれおよそ 40% と 30% であった。この結果は、Erg のステロイド A 環部分と AmB のマクロライドの距離が、Cho に比べて 0.3 Å 程度長くなっていることを示しており、Erg の方が Cho に比べ AmB のマクロライドと密に相互作用していることが示唆された。

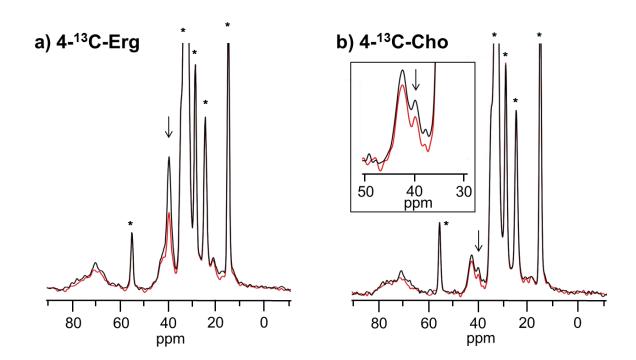


図 2-17 (a)14-F-AmB/4-¹³C-Erg/POPC=1/1/9 および(b)14-F-AmB/4-¹³C-Cho/POPC=1/1/9 の ¹³C{¹⁹F}REDOR スペクトル(赤線: 非照射スペクトル、黒線: ¹⁹F-照射スペクトル)。 図中の矢印は AmB と相互作用しているステロールの標識部位由来のシグナルを表している。*は POPC 由来のシグナル。 測定温度: −30 °C、MAS 速度: 5 kHz、展開時間: 6.4 ms、積算回数: (a) 25208、(b) 100865。

2-2-e 炭素環誘導体の配座計算

炭素環誘導体に関しても AmB との親和性に影響を与える構造を調べるため、各ステロール誘導体の配座計算を行った。図 2-18 には分子軌道計算により得た炭素環構造の最安定配座を示した。

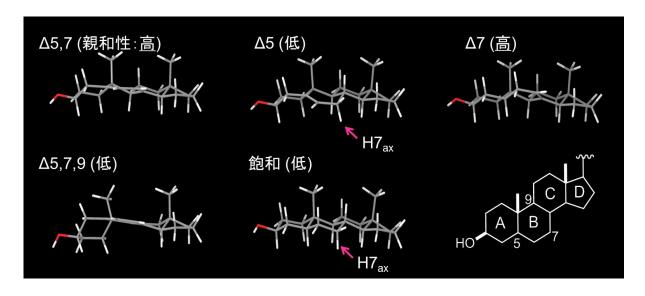


図 2-18 DFT 計算により得たステロール誘導体のステロイド炭素環の最安定配座。 側鎖の構造は省略したが、Erg と同様の構造を持つ側鎖は、まっすぐに伸びた配座を とっているのに対し、Cho 側鎖は C21-C22-C23-C24 の二面角が 60°となり途中で折れ 曲がった配座となった。

AmB との親和性が低かった共役トリエン構造を有する誘導体の配座を見ると、他のステロールに比べ A 環部分が大きく歪んだ構造をとっていることがわかる。おそらく、このような凸構造が AmB のマクロライドとの密な接触を妨げ、ファンデルワールス相互作用が阻害されたため、親和性が低下したと考えられる。

一方でその他のステロール誘導体の配座にはそれほど違いが見られず、いずれのステロールも AmB と密に相互作用できるような平面性の高い環構造を有するように見える。そこで、AmB との親和性が小さくなった 5 位に二重結合を持つ誘導体と完全に飽和な誘導体のみに共通する構造を考えると、ステロイド炭素環の最も外側に位置する B 環 7 位のアキシアル水素が挙げられる。おそらく、このアキシアル水素が AmB と相互作用する際、マクロライドのいずれかの部分と立体障害を引き起こすため、両者の密なパッキングが阻害されると考えられる。REDOR 測定から明らかになった AmB のマクロライドとステロイドの A 環の距離は Erg に比べ Cho の方がわずかに遠いという結果も、アキシアル水素による立体障害を反映しているものと考えられる。 Charbonneau らは、過去に UV 測定の結果から 7 位のアキシアル水素を持たない 7-ケトコレステロールが Erg に匹敵する AmB との親和性を有することを報告しており 5、本考察とよく一致する。また、このようなステロール認識は AmB 以外のポリエンマクロライドにも見られる。 De kruijff らは AmB より小さいポリエンマクロライドであ

るナタマイシンとステロールの親和性はステロイド環 7 位の二重結合の有無に大きく依存することを報告している ⁴⁵。従って、この 7 位のアキシアル水素とマクロライドの立体障害は、ステロールと相互作用するポリエンマクロライド化合物に共通する分子認識機構であると推測される。

興味深いことに、この立体障害を引き起こす A 環の歪んだ構造と 7 位のアキシアル水素は両者ともステロイド炭素環にある角間メチルとは逆の方向(α 平面方向)に向いている。このことから、ステロールの α 平面が AmB のマクロライドと密に接するような形で相互作用していることが分かる。つまり、 α 面が平らなステロイド炭素環を持つ $\Delta 5$,7-ステロールや $\Delta 5$ -ステロールは AmB のマクロライド平面と密に接触し、面と面での強固なファンデルワールスを獲得できる一方で(図 2-19 左)、 α 平面方向に凸構造を持つ誘導体は立体障害によりファンデルワールス相互作用が弱められたものと考えられる(図 2-19 中、右)。

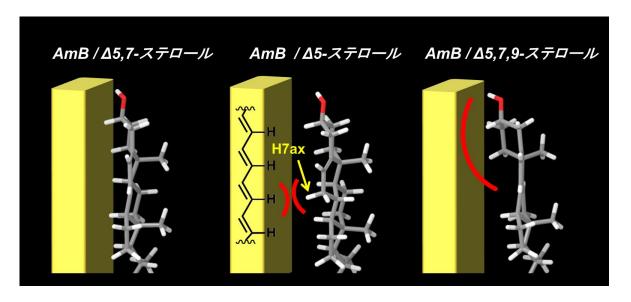


図 2-19 推定される AmB(黄色直方体)とステロール誘導体の相互作用様式。(A) $\Delta 5$,7-ステロールは炭素環の α 平面が平らであるため、AmB のマクロライドと密に接することができる。(B) α 平面方向に飛び出した A 環が AmB との密な接触を阻害している。(C) 7 位のアキシアル水素が立体障害を引き起こし AmB との相互作用を阻害している。

2-5 AmB とエルゴステロールの分子間相互作用

本項では、ステロールの構造の変化が AmB との親和性に与える影響を側鎖と炭素環に分けそれぞれ個別に調べた。その結果、ステロールの側鎖と炭素環はそれぞれ独立に AmB との親和性に寄与していることが明らかとなった。

従来、Erg の側鎖は比較的フレキシブルであり、複合体中においても明確に構造化していないと考えられていた。しかし、側鎖構造依存的に AmB との親和性が大きく変化することから、側鎖は AmB との主要相互作用であるファンデルワールス力を獲得する上で重要な役割を果たしていることが明らかにされた。さらに、7-DHC 5 と Bras 7 の AmB との親和性を比較してもわかるように、側鎖の親和性への寄与は、炭素環と同程度もしくはそれ以上である。また、側鎖のメチル基および二重結合はそれぞれ独立に AmB との親和性に寄与していることが明らかになった。Erg の側鎖にある 22位の二重結合は側鎖全体が AmB のマクロライドと密に接することができるように、まっすぐ伸びきった側鎖構造を安定化する役割を果たしていると考えられる。また、24位のメチル基は、AmB とのファンデルワールス相互作用を強化できるように側鎖の疎水面積を増やしていると思われる。

ステロイド炭素環に関しては、 $\Delta 5$,7-ステロールや $\Delta 7$ -ステロールに比べて、 $\Delta 5$ -ステロールや $\Delta 5$,7,9-ステロールの AmB に対する親和性が大きく低下したことから、二重結合の位置が AmB と相互作用する上で重要であることが分かった。また、AmB と親和性が低かった誘導体は、炭素環の α 面方向に飛び出した A 環や 7 位のアキシアル水素を持つことから、炭素環の α 面と AmB のマクロライドの密な接触が両者の相互作用に重要であることが推察された。

以上の結果を踏まえると、Erg はその平らな炭素環の α 面とまっすぐに伸びたかさ高い側鎖の両方で、すなわち分子全体で AmB のマクロライドと密に接するような形で相互作用していることが推察される。このように獲得した強固なファンデルワールス相互作用が、AmB-Erg 複合体を安定化していると考えられる。

実験項

試薬

AmB、Cho、BCECF、バリノマイシン、FCCP はナカライテスクから、Erg、3- β -コレスタノールは東京化成から、7-DHC は MP Bio medical inc. ブラジカステロールはタマ生化学から、4- 13 C-Chol は Cambridge isotope 社から、POPC は日本油脂から購入したものを用いた。22-dihydroergosterol 2、24-demethylergosterol 2、24-dehydroergosterol 2、DesC5-ergosterol 2、8、9 は Erg から、11、12 は 7-DHC より合成した。14-F-AmB は AmB より過去の報告例に従い合成した 46 。4- 13 C-Erg は当研究室の松下直広博士が合成したものを用いた 47 。サンプル調製における溶媒はナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を用いた。また、水には MilliQ 水(Millipore 社)を用いた。また、SPR に用いたセンサーチップ CM5、PBS バッファー、1 M エタノールアミン塩酸塩、酢酸塩バッファー(pH 5.5)は GE ヘルスケア・ジャパン社から購入した。その他の試薬は特に記載のない限り、市販のものをそのまま用いた。また、HPLC および SPR に用いたバッファーは測定前にソニケーションを行うことで脱気して使用した。また、サンプル調製の際 AmB は DMSO のストックソリューションとし UV スペクトルにより濃度決定を行い使用した(ϵ_{415} =1.28× ϵ 10 ϵ 10 ϵ 10.

使用機器

可視紫外分光光度計は島津製作所製の V-630BIO を使用した。ボルテクスミキサーは laboratory & Medical supplies 社の MIXER UZUSIO VTX-3000L を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。固体 NMR は CMX-300 (Chemagnetics/ Varian, 300 MHz for ¹H NMR)を用いた。蛍光強度測定には日本分光社の分光蛍光度計 FP-6600 およびスターラー付き恒温セルホルダーSTR-313 を使用した。SPR 測定には GE ヘルスケア社の BIAcore T200 を使用した。

K+/H+交換速度測定

POPC (14.8 μmol)とステロール誘導体 **1-13** (0.78 μmol)をナスフラスコもしくは試験 管中でクロロホルムに溶かした。溶媒をエバポレーターで除去し、脂質膜フィルムを 形成した後、真空下で一晩乾燥させた。その後 BCECF を含む 1 mL のリン酸バッファー(0.15 M リン酸カリウム(KH₂PO₄: K₂HPO₄=92:8)、76 μ M BCECF, pH 5.8)を加え、超音波およびボルテックスを行うことで水和した。その後、凍結融解を 5 回繰り返し行い MLV 懸濁液とした。続いて、リポソファスト®シリンジを用いてポリカーボネートフィルター(200 nm ポアサイズ)を 19 回通し粒子径を均一にした後、Sepharose4Bを用いたゲル濾過を行い BCECF 内包 LUV を得た。この LUV の懸濁液のリン脂質濃度をリン脂質-C キット(和光純薬工業)により決定した後、0.15 M リン酸カリウムバッファー(pH 5.8)で希釈し 0.5 mM のリポソーム懸濁液とした。この懸濁液 1mL あたり 10 μ L の 1 mM FCCP のエタノール溶液を加え、6 $^{\circ}$ C で保存した。

添加実験では、まず BCECF を内包した $0.5 \, \text{mM}$ リポソーム懸濁液($200 \, \mu\text{L}$)をスターラーおよび $0.15 \, \text{M}$ リン酸水素二カリウム水溶液($1.8 \, \text{mL}$ 、pH 9.2)が入った蛍光用セルに加えた。その後、マグネティックスターラーを備えた蛍光測定機 FP-6600 にその蛍光用セルをセットし、蛍光強度測定を開始した。測定開始 $30 \,$ 秒後に AmB の DMSO 溶液($32 \, \mu\text{M}$ 、 $10 \, \mu\text{L}$)を加え、カリウムイオンの流入に伴うリポソーム内の pH 変化をBCECF の蛍光強度変化(励起波長: $500 \, \text{nm}$ 、蛍光波長: $535 \, \text{nm}$)としてリアルタイムで観測した。AmB を添加してから $70 \,$ 秒後にバリノマイシンのメタノール溶液($5 \, \text{mM}$ 、 $10 \, \mu\text{L}$)を加えて $100 \,$ 秒間撹拌し、完全にリポソーム内外の pH 勾配がなくなったときの蛍光強度(F_{max})を確認した。この F_{max} の値で得られた蛍光強度の時間変化を規格化した。以上の実験は $6 \, ^{\circ}$ で行った。

インキュベート実験では、BCECF を内包した 0.5 mM リポソーム溶液($200 \text{ }\mu\text{L}$)に AmB の DMSO 溶液($32 \text{ }\mu\text{M}$ 、 $10 \text{ }\mu\text{L}$)を加え 3時間 $6 ^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。続いて、スターラーバーおよび 0.15 M リン酸水素二カリウム水溶液(1.8 mL)が入ったキュベットをマグネティックスターラーを備えた蛍光測定機に入れて測定を開始した。測定を開始し、30 秒後に AmB をインキュベートしたリポソーム懸濁液($200 \text{ }\mu\text{L}$)を加え蛍光強度変化を観測した。 リポソーム溶液を加えた 70 秒後、バリノマイシンのメタノール溶液(5 mM, $10 \text{ }\mu\text{L}$)を加えて F_{max} を得た。 得られた F_{max} で蛍光強度を規格化した後、解析を行った。 また、ネガティブコントロールは AmB の代わりに $DMSO(10 \text{ }\mu\text{L})$ をインキュベートしたサンプルとした。

AmB もしくは AmB をインキュベートしたリポソームを加えた時間を 0 秒とし、それ以降の蛍光強度変化をカーブフィッティングすることで、 K^+/H^+ 交換の初速度 r_{ini} を算出した。カーブフィッティングは Origin®を用いて行い、添加実験は AmB 添加後の 60 秒間、インキュベート実験は AmB をインキュベートしたリポソームを添加した後

の 20 秒間の蛍光強度変化を式 $F/F_{max} = A(1-\exp(-t/T))$ によりフィッティングした。また、初速度は $r_{ini}=A/T$ (t=0)として計算した。以上の実験はすべて 3 連で行い、エラーバーは得られたそれら実験から得られた初速度の標準誤差として計算した。

SPR

POPC (4.0 μmol)とステロール誘導体 **1-13** (1.0 μmol)をナスフラスコ中でクロロホル ムに溶かした。溶媒をエバポレーターで除去し、脂質膜フィルムを形成した後、真空 下で一晩乾燥させた。1mLの PBS バッファーを加えた後、ボルテックスとソニケー ションにより水和した。その後凍結融解を 5 回行うことで MLV を形成し、その懸濁 液をリポソファスト®シリンジを用いてポリカーボネートフィルター(100 nm ポアサ イズ)を 19 回通し LUV とした。さらにその懸濁液を PBS バッファーで希釈すること によりリン脂質濃度が 0.25 mM の LUV 溶液を得た。以降の操作はすべてランニング バッファーを 5% DMSO 含有 PBS バッファー(pH 7.4)、測定温度を 25 °C として行っ た。続いて、BIAcore T200 を用いて CM5 チップ上にアミノ化カップリング法を用い てドデシルアミンの固定化を行った。一つのフローセルのレーンのみにドデシルアミ ンを固定化し、残るレーンはコントロールレーンとして用いた。まず、390 mM EDC と 100 mM NHS の混合溶液(1:1 v/v)を流速 5 μL/min で 7 分間インジェクトし CM5 セ ンサーチップ上のカルボキシ基を活性化した。その後、センサーチップをとりだし、 基盤表面にドデシルアミン(1.0 mg/mL)の 10% DMSO 含有酢酸塩バッファー(pH 5.5)溶 液を載せて 30 分間反応させた。その後基盤表面を EtOH で洗浄し空気中で乾燥させ た。ドデシルアミンを固定化したセンサーチップを装置に戻し、1Mエタノールアミ ン塩酸塩(pH 8.5)を流速 5 μL/min で 7 分間インジェクトし、未反応の N-ヒドロキシス クシンイミドエステルをブロッキングした。最後に10%DMSO含有酢酸塩バッファー (pH 5.5)を 5 μL/min で 7 分間インジェクトしセンサーチップ表面を洗浄した。また、 コントロールレーンにはエタノールアミンのみを固定化した。続いて、上述した0.25 mM のリポソーム懸濁液を流速 2 μL/min で 30 分間インジェクトし固定化した後、50 mM NaOH 水溶液を流速 20μL/min で 2 分間インジェクトした。50 mM NaOH のイン ジェクションは計3回行い、ベースラインが安定化ていること、リポソームがドデシ ルアミンに結合していることを確認し以降の測定を行った。続いて AmB(30 μM)の 5%DMSO 含有 PBS バッファー溶液を流速 10μL/min でインジェクトし、AmB のリポ ソームへの吸着および解離を観測した。なお結合時間、解離時間はそれぞれ 1800 秒、

1200 秒とした。その後、得られたセンサーグラムを式 2-1 で表される二状態反応モデルでフィッティングすることで AmB のリポソームへの吸着およびチャネル形成の速度定数を算出した。なおフィッティングは BIAevaluation software(GE ヘルスケアバイオサイエンス社)を用いて行った。

UV 測定

AmB (95 nmol)と POPC (3 μ mol)をクロロホルム/メタノール=2/1 に完全に溶解した後、アルゴンガスを吹き付け溶媒を除去することで脂質フィルムを形成した(ステロール含有膜形成の際には POPC の 20%をステロール誘導体 1、5、7、8、10 に置換した)。真空下で終夜乾燥させた後、8%スクロース水溶液 (2 mL)を加え、ボルテックスとソニケーションで水和した。その後、凍結融解を 5 回繰り返し MLV を得た。その後、得られたリポソーム懸濁液(300 μ L)を 8%スクロース水溶液(2400 μ L)で希釈し、UV スペクトルを測定した。測定には公路長 1.0 cm の石英セルを用い、バックグラウンドは 8%スクロース溶液として測定した。

固体 NMR

POPC (39.6 µmol)、 4^{-13} C-sterol(4.4 µmol)および AmB(4.4 µmol)をクロロホルムとメタノールの混合溶媒に完全に溶解した後、エバポレーターで溶媒を除去した。(AmB/ 13 C-sterol/POPC=2/1/18 のサンプル調製の際は、 4^{-13} C-sterol の量を半分にした。また、 13 C{ 19 F}REDOR 測定用のサンプル調製には、AmB の代わりに 14-F-AmB を用いた。)真空下で脂質フィルムを終夜乾燥させた後、10 mM HEPES バッファー(35 µL)および MilliQ (1 mL)を加え、ボルテックスとソニケーションにより水和させた。得られた懸濁液に対し凍結融解を 5 回繰り返すことで MLV とした後、凍結乾燥した。得られた粉末を 50 wt%となるように重水を加え、ボルテックスと凍結融解を繰り返すことで均一に水和された MLV サンプルを得た。そのサンプルをガラスチューブに封入し、エポキシ樹脂で密閉した。そのガラスインサートを $\varphi 5$ mm の MAS ローターに挿入し測定を行った。

測定には 5 mm の 3 チャンネル MAS プローブ(Varian)を使用した。測定時には温度 コントローラーと MAS 速度コントローラーを用いて、温度と MAS 速度を一定に保った。MAS 速度は $5000\pm2\,\text{kHz}$ で測定した。サンプルに吹き付けるエアーの温度は 30

℃ もしくは-30 ℃ で保った。低温測定には Poly cold System 社の PGC-150 を用いた。 またプロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンス 48 を用いた。フッ素の位相回しには $xy-8^{49}$ を用いた。また、CP 条件とパルス幅はサンプルごとに最適化を行った。

配座計算

配座探索およびその最適化は Windows 7 オペレーティングシステムのパーソナルコンピュータにインストールした Macromodel 9.9 を用いて行った。まず、すべてのステロール誘導体において配座探索と得られたコンフォマーの構造最適化を行った。配座探索のサンプリングには mixed tortional/low-mode sampling (MCMM/LMCS)法 50 を用い、配座発生の試行回数は 5000 回とした。また、力場は OPLS2005 51 を用いて真空中で計算した。また、エネルギーの最安定化は Polak-Ribiele conjugate gradient (PRCG)法 52 を用い、繰り返し回数を 7000 回として行った。その後、得られたコンフォマーに対し、繰り返し回数を 7000 回とし、真空中で Truncated Newton Conjugate Gradient(TNCG)法 53 による最安定化を行うと共に重複配座の除去を行った。ステロール側鎖誘導体に関しては、これらの計算から得られたコンフォマーのうち最安定配座から 5 kJ 53 によりさらなる構造最適化を行った。DFT 計算は 55 により

本章は ACS Publications の Biochemistry 誌に投稿した論文を基に作成した。

Adapted with permission from Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Takano, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3088–3094.

Copyright (2014) American Chemical Society.

Adapted with permission from Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Nonomura, K.; Matsushita, N.; Takano, T.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2015**, *54*, 303-312.

Copyright (2015) American Chemical Society.

参考文献

- (1) Bolard, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 864, 257–304.
- (2) Takano, T.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6301–6304.
- (3) Matsumori, N.; Tahara, K.; Yamamoto, H.; Morooka, A.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata,M. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11855–11860.
- (4) Clejan, S.; Bittmans, R. J. Biol. Chem. 1985, 260, 2884–2889.
- (5) Charbonneau, C.; Fournier, I.; Dufresne, S.; Barwicz, J.; Tancrède, P. *Biophys. Chem.* **2001**, *91*, 125–133.
- (6) Langlet, J.; Bergès, J.; Caillet, J.; Demaret, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1191*, 79–93.
- (7) Neumann, A.; Baginski, M.; Czub, J. J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132, 18266–18272.
- (8) Baginski, M.; Borowski, E. J. Mol. Struct.: THEOCHEM 1997, 389, 139–146.
- (9) Baginski, M.; Bruni, P.; Borowski, E. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1994**, *311*, 285–296.
- (10) 野々村 健一 平成22年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文
- (11) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63–78.
- (12) Baran, M.; Borowski, E.; Mazerski, J. *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 162–168.
- (13) Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807–7815.
- (14) Giroux, S.; Corey, E. J. Org. Lett. **2008**, 10, 801–802.
- (15) Delseth, C.; Kashman, Y.; Djerassi, C. Helv. Chim. Acta 1979, 62, 2037–2045.
- (16) Ohvo-Rekilä, H.; Akerlund, B.; Slotte, J. P. Chem. Phys. Lipids **2000**, 105, 167–178.
- (17) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 83–89.
- (18) Fettes, A.; Carreira, E. M. J. Org. Chem. **2003**, 68, 9274–9283.
- (19) Lundy, B.; Jansone-Popova, S.; May, J. Org. Lett. **2011**, 13, 4958–4961.
- (20) Vertut-Croquin, A.; Bolard, J.; Chabbert, M.; Gary-Bobo, C. *Biochemistry* **1983**, 22, 2939–2944.
- (21) Herve, M.; Debouzy, J.; Borowski, E.; Cybulska, B.; Gary-bobo, C. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 980, 261–272.

- (22) Hsuchen, C. C.; Feingold, D. S. Antimicrob. Agents Chemother. 1973, 4, 309–315.
- (23) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 429–434.
- (24) Rink, T. J.; Tsien, R. Y.; Pozzan, T. J. Cell Biol. 1982, 95, 189–196.
- (25) Papo, N.; Shai, Y. *Biochemistry* **2003**, *42*, 458–466.
- (26) Morton, T.; Myszka, D.; Chaiken, I. Anal. Biochem. 1995, 227, 176–185.
- (27) Bolard, J.; Vertut-Croquin, A.; Cybulska, B. E.; Gary-bobo, C. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *647*, 241–248.
- (28) Gary-Bobo, C. *Biochimie* **1989**, *71*, 37–47.
- (29) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.
- (30) 梅川 雄一 平成 20 年度 大阪大学大学院理学研究科博士論文
- (31) Onishi, M.; Kamimori, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 658–663.
- (32) Zumbuehl, A.; Stano, P.; Heer, D.; Walde, P.; Carreira, E. M. **2004**, 5–8.
- (33) Al, N. **1995**, *69*.
- (34) Bolard, J.; Vertut-Croquin, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 647, 241–248.
- Hsueh, Y.-W.; Chen, M.-T.; Patty, P. J.; Code, C.; Cheng, J.; Frisken, B. J.; Zuckermann,
 M.; Thewalt, J. *Biophys. J.* 2007, 92, 1606–1615.
- (36) Espiritu, R. A.; Matsumori, N.; Tsuda, M.; Murata, M. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3287–3293.
- (37) Espiritu, R. A.; Matsumori, N.; Murata, M.; Nishimura, S.; Kakeya, H.; Matsunaga, S.; Yoshida, M. *Biochemistry* **2013**, *52*, 2410–2418.
- (38) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Ueno, H.; Nonomura, K.; Yano, S.; Michio, M.; Oishi, T. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1437–1442.
- (39) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178–1185.
- (40) Czub, J.; Baginski, M. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2368–2382.
- (41) Fujii, G.; Chang, J. E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959–4968.
- (42) Gagoś, M.; Koper, R.; Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90–98.
- (43) Bruzik, K. S.; Salamonczyk, G. M.; Sobon, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 143–146.
- (44) Bruzik, K. S.; Harwood, J. S. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 6629–6637.

- (45) Te Welscher, Y. M.; ten Napel, H. H.; Balagué, M. M.; Souza, C. M.; Riezman, H.; de Kruijff, B.; Breukink, E. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6393–6401.
- (46) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3565–3567.
- (47) 松下 直広 平成 17 年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文
- (48) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958.
- (49) Gullion, T.; Baker, D.; Conradi, M. J. Magn. Reson. 1990, 89, 479–484.
- (50) Kolossváry, I.; Guida, W. J. Comput. Chem. 1999, 20, 1671–1684.
- (51) Kaminski, G.; Friesner, R. J. Phys. Chem. B **2001**, 2, 6474–6487.
- (52) Polak, E. Computational methods in optimization; Academic Press: New York, 1971.
- (53) Ponder, J. W.; Richards, F. M. J. Comput. Chem. 1987, 8, 1016–1024.
- (54) Becke, A. D. *Phys. Rev.* [Sect.] A **1988**, 38, 3098–3100.
- (55) Parr, R.; Yang, W. *Density-functional theory of atoms and molecules*; Oxford University Press: New York, 1994.

第三章 分子間距離情報に基づく AmB-エルゴステロールの分子間相互作用解析

諸言

第二章では、AmB とステロール誘導体の親和性評価により大まかに AmB と Erg 相互作用様式を決定した。しかし、複合体の全体構造を決定するためにはより詳細に二分子間の相互作用様式を決定することが不可欠である。第一章でも述べたように筆者らは過去に、位置特異的な F-AmB および $^{13}C-Ergosterol$ ($^{13}C-Erg$)を用いた $^{13}C(^{19}F)$ REDOR 測定により、脂質二重膜環境下で相互作用している両者の分子間距離測定が可能であることを示した 1 。

そこで、本章では新たな位置選択的な標識体を用いて 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定を行うことで、さらなる分子間距離情報を求めることにした。それらの距離情報に基づき、複合体中における AmB と Erg の二分子間の位置関係を精査することにした。

3-1 標識体の調製

第一章でも述べたように AmB と Erg は平行型と反平行型の両方の向きで相互作用していることが明らかにされており、本章ではその両配向における AmBーErg 二分子間の位置関係の決定を行う。そのためには、少なくとも各配向において、2 点ずつの分子間距離、できれば離れた2点の距離情報を得ることが望ましい。前述したように、筆者は修士論文研究において 26,27- 13 C-Erg と 14-F-AmB を用いた測定により、反平行型相互作用における AmB のヘッドグループと Erg 末端部の標識部位間の距離測定に成功した 1 。また、第二章で行った 4- 13 C-Erg と 14-F-AmB を用いた測定でも標識部位である Erg4 位の炭素 NMR シグナルに明確な REDOR 減衰を観測することに成功しており、4- 13 C-Erg を用いた測定からも分子間距離の取得が見込まれる。そこで、残るAmB の末端部からの距離情報を所得するために、ヘプタエンの末端部にフッ素を導入した 32-F-AmB(図 3-1 左)の合成を行うことにした。

当研究室では過去に、天然の AmB の分解と化学合成を組み合わせた半合成法によりへプタエン中央部に標識を導入した AmB メチルエステル体(AME)の合成に成功しており $^{2.3}$ 、その合成法を応用することで 32-F-AmB の合成できると考えた。また、第四章で後述するが、AmB-AmB 二分子間の相互作用解析に向け、同様の合成方法論を応用することで 26,40- 13 C $_2$ -AmB(図 3-1 右)の合成も行うことにした。

図 3-1 32-F-AmB および 26,40-13C2-AmB の化学構造。

3-1-a 32-F-AmB および 26,40-¹³C₂-AmB の逆合成解析

当研究室の土川と松下らは天然の AmB を分解することで得られるポリオールフラグメントと化学合成により調製したポリエンフラグメントを連結後、マクロラクトン環を再構築することで 28-F-AME および 25- 13 C-AME の合成に成功している 2,3 。本合成でもその手法を応用し、32-F-AmB および 26,40- 13 C₂-AmB の合成を行うことにした。すなわち、天然の AmB を保護した後、オゾン分解および高井オレフィン化により得たヨードオレフィン体 24 とポリエンセグメント 25,31 を Stille カップリングで連結後、マクロラクトン化を行うことで目的とする標識体を合成する(スキーム 3-1)。

土川らの合成では、AmB の 41 位のカルボン酸をメチルエステル体で保護していたが、メチルエステルの選択的加水分解はマクロラクトン環の開裂が競合してしまうため、非常に困難かつ再現性が得られなかった 4。そのため、カルボン酸が脱保護された標識化 AmB を固体 NMR 測定に必要な量を供給する方法は確立されていない。また、当研究室の松田らが行った ²H NMR 測定によると、AME は Erg と相互作用することなく膜中で高い運動性を有している等、AmB とは大きく化学的性質が異なることが示唆されており ⁵、AmB 標識体の合成方法の確立が望まれる。そこで、当研究室の松尾らはマクロラクトンの開裂を伴わずに除去可能な AmB カルボン酸の保護基を検討した結果、2-トリメチルシリルエトキシエチル (SEM) ⁶エステルとして保護することで HF・Py で選択的に脱保護可能であることを見出した ⁷。本研究でもカルボン酸の保護基に SEM を採用し、ポリオールフラグメントの合成を行うこととした。

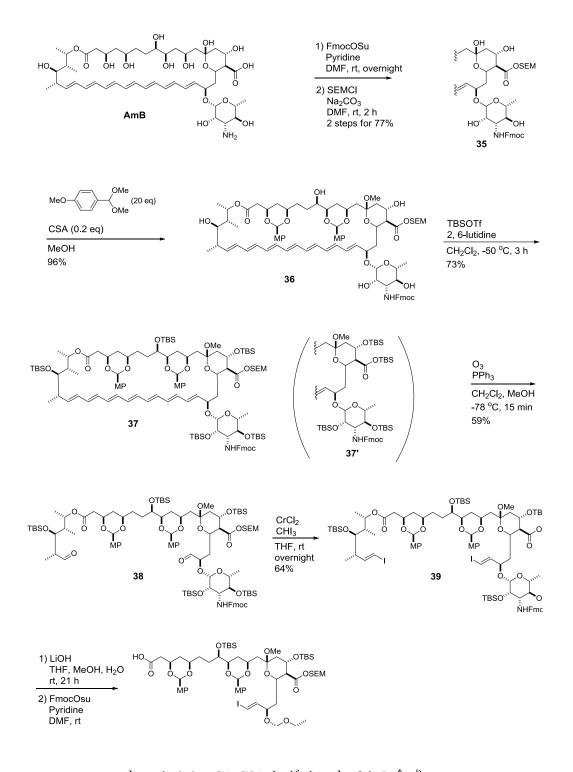
また、標識を導入したポリエンフラグメントに関しては、Carreira らの報告に従い合成したキラルなラクトン体 **30**⁸ を開環した後、Honor-Wadsworth-Emmons (HWE)反応によりポリエンを順次伸長していくことで得られると考えた。すなわちフッ素標識フ

ラグメントはラクトン **30** の開環後、フッ化ホスホン酸ジエステル **29** を用いた **HWE** 反応によりフルオロオレフィン **26** とした後、更なる **HWE** 反応によりポリエン部を伸張していくことで得られると考えた。また、炭素 **13** を導入したフラグメントは、ラクトン体 **30** の 13 C-ヨウ化メチルを用いたメチル化および、 13 C-ホスホン酸ジエステル **33** 9 との **HWE** 反応により調製できると考えた。

スキーム 3-1 32-F-AmB 22 および 26,40-13C2-AmB 23 の逆合成解析。

3-1-b C1-C21 セグメントの合成

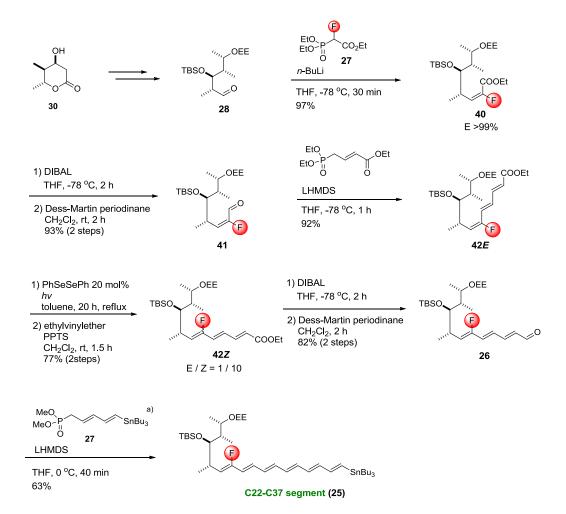
まず、両標識体の共通中間体となる C1-C21 セグメント 24 の合成を行った(スキーム 3-2)。出発物質を AmB として松尾らの報告に従いアミノ基を Fmoc、カルボン酸を SEM 基で保護し SEM エステル 35 を良好な収率で得た 7 。 その後ポリオールのうち 2 つの 1, 3-ジオール部を p-メトキシベンジリデンアセタール、13 位をメチルケタール として保護することで p-メトキシベンジリデンアセタール(MP アセタール)保護体 36 とした 2 。 続いて残りのヒドロキシ基の TBS 化を検討した。まず、2, 6-ルチジン存在下 TBSOTf を用いて 0° C で反応を行ったところ、目的とする TBS エーテル体 37 に加えて、SEM 基が脱離し TBS エステルとなった 37 が分離困難な副生成物として得られた。そこで、試薬を加える際 -50° C まで冷却して 30 分撹拌後、 0° C まで昇温することで、TBS エステル体 37 の生成を抑えることに成功し 37 を良好な収率で得た。次にオゾン分解を行い、ジアルデヒド 38 を 59%の収率で得た後、高井オレフィン化によりビス-ヨードオレフィン 39 へ 64%の収率で変換した。続いて水酸化リチウムで処理することで 1 位のエステルを選択的に加水分解し、最後に除去された Fmoc 基を再び導入した。その後、ゲル濾過による精製を行い、2 段階 35%の収率で C1-C21 セグメント 24 を合成することに成功した。



スキーム 3-2 C1-C21 セグメント **24** の合成。

3-1-c C22-C37 セグメント **25** の合成 (32-F-AmB)

まず、32-F-AmB 22 の合成を行うこととし、続いて 32 位にフッ素を導入した C22-C37 セグメント 25 の合成を行った(スキーム 3-3)。 土川らの報告に従いラクトン 30 から誘導したアルデヒド 28^3 に対し HWE 反応を行い E-フルオロオレフィン 40 を高 収率で得た。その後、DIBAL によるエステルの還元、続く Dess-Martin 酸化を行うこ とでアルデヒド 41 へと誘導した。次に 4-ブロモクロトン酸エチルから誘導したホス ホン酸ジエチル 10 を用いて、再び HWE 反応を行うことでトリエンへ 42E と伸長し た。続いて得られた E-フルオロオレフィン体 42E に対し、目的とする Z 体 42Z への 異性化を試みた。まず、過去の報告に従い³、室温下ジクロロメタン中、ジフェニル ジセレニドを加えタングステンランプを照射した。しかし、反応はほとんど進行せず、 目的とする Z 体が 1 割程度しか得られなかった。そこで溶媒をトルエンに変更し、還 流条件下で反応を行ったところ、20時間ほどでE/Z=1/10まで反応が進行した。こ の際、さらに長く撹拌させると、目的物の他に分解物も徐々に生成するため、反応は 20 時間が最適であると考えられる。また、この際、エトキシエチル基が脱離したもの との混合物として得られたため、再び保護を行い2段階77%の収率で目的とする42Z を得た。続いて、DIBAL 還元および Dess-Martin 酸化を行いアルデヒド 26 へと変換 後、ホスホン酸ジメチル **27**⁹と HWE 反応を行うことで目的とする C22-C37 セグメン ト 25 を 63%の収率で合成することに成功した。



スキーム 3-3 C22-C37 セグメントの合成。

3-1-d 連結、マクロラクトン化 (32-F-AmB)

C1-C21 セグメント 24 と C22-C37 セグメント 25 の合成が完了したので、次に両セグメントのカップリングおよびマクロラクトン化を行った。(スキーム 3-4)。両セグメントに対し Pd2(dba)3·CHCl3 触媒存在下、トリフェニルヒ素、ジイソプロピルエチルアミンを加えて THF、室温で 7 時間撹拌したところ反応は問題なく進行し、対応するカップリング体 43 が得られた。この際、TLC で確認したところ原料が残っていたが、分離困難であったため混合物のまま次の反応に用いた。この混合物に対し、パラメトキシベンジリデンジメチルアセタール存在下、PPTS で処理することでエトキシエチル基を除去し、最後にマクロラクトン化を行った。土川らの報告 4 に従い、DMAP 存在下、縮合剤として MNBA を用いて反応させたところ目的とする環化体 44 の生成をTLC で確認することができた。原料付近にスポットは残っていたが、環化体は極性が低く、この段階で単一の化合物として精製することができ、最終的に 3 段階 28%の収率で 44 を得ることに成功した。

スキーム 3-4 連結およびマクロラクトン化。

3-1-e 脱保護 (32-F-AmB)

マクロラクトン環の再構築に成功したので、次に脱保護を検討した。まず、TBS 基および SEM エステルの脱保護を行った(スキーム 3-5)。以降の反応は TLC での追跡が困難であったため HPLC を用いて反応を追跡した。50°C で 18% HF-Py を 39 時間作用させ、HPLC により分析したところ、複数のピークが得られた(図 3-2)。各ピークを分取し質量分析により構造を推定したところ、目的とする 45 以外に、MP 基が外れた 46、47 やグリカールになった 45′、46′、SEM 基が残っている 48、分解物と思われるものが生成していた。MP アセタールは最終的には除去するため外れていてもよい。また、グリカール体も MP アセタール除去の酸加水分解条件でヘミアセタール構造に変換できるため問題ない。一方 SEM 基は MP アセタール、メチルケタールの酸加水分解条件で除去可能か検討したところほとんど除去できなかったため、この段階でできるだけ脱保護を完結しておく必要がある。しかし、反応時間を伸ばすとヘプタエン構造が分解したためかピーク強度が全体的に小さくなった。そこで、SEM 基がある程度除去できた 39 時間で反応を停止することとし、得られた混合物を ODS カラムで粗精製後、ピペリジンを作用させ Fmoc 基の脱保護を行った。

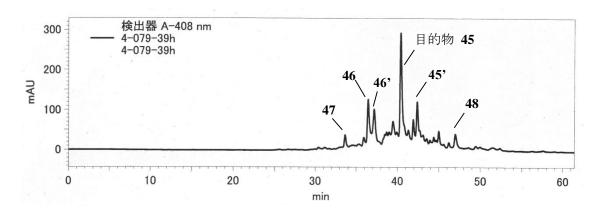


図 3-2 TBS, SEM 基除去 39 時間後の HPLC クロマトグラム。カラム: MS-II $5C_{18}$ 10×250 mm, 溶媒: 70% MeOH- 30% AcONH4buffer (pH=5.0) \rightarrow 100% MeOH(30 min)流速: 1.0 ml/min, 検出: λ =408 nm

スキーム 3-5 SEM、TBS 基および Fmoc 基の除去。

続いて、MP 基およびメチルケタールの除去を検討した。まず、AmB から誘導した 非標識の 50 を用いて MP 基の除去を検討した(スキーム 3-6)。過去の報告に従い 4、87 mM の塩酸をメタノール中で 1 時間作用させたところ、HPLC チャートにおいて目 的とする 51 のピークが確認されるもののベースラインが大きく上昇し分解物が多く できた。また、塩酸の濃度を 10 mM とし、長時間撹拌したところ反応が完了する前 にベースラインはさらに上昇した。そこで濃度を 1.0 M として短時間で反応を終了したところ、分解物の生成ある程度抑制され目的物がメインピークとして得られたため、この条件を採用することにした。また、MP 基が外れていないものも残っていたが、 少量であればメチルケタールと同時に除去できると予想されたため、混合物のまま次の反応に用いた。

次にメチルケタールの除去を検討した。まず、過去の条件に従い t-BuOH と水の混合溶媒中、0 $^{\circ}$ $^{$

スキーム 3-6 非標識体を用いた MP アセタール、メチルケタールの脱保護。

非標識体を用いた脱保護の条件検討が完了したので、32-F-マクロラクトン体 49 を用い、同様の条件で MP アセタールおよびメチルケタールを除去した(スキーム 3-7、図3-3)。分解物の生成は見られたものの目的物をメインピークとして得ることができ、最後に HPLC を用いて精製することで 32-F-AmB (22)を TBS 保護体 44 から 4 段階 17%の収率で得ることに成功した(図 3-4)。

スキーム 3-7 MP アセタールおよびメチルケタールの除去

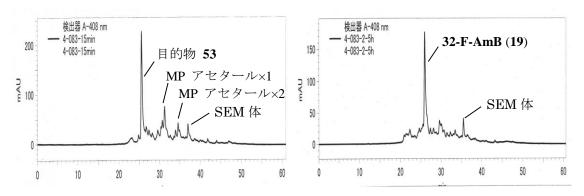


図 3-3 左: MP 基除去後、右: メチルケタール除去後の HPLC クロマトグラム。測定条件 カラム MS- II 5C₁₈ 10×250 mm、溶媒: 70% MeOH- 30% AcONH₄buffer (pH=5.0) to 100% MeOH、流速: 1.0 ml/min、検出: λ =408 nm。

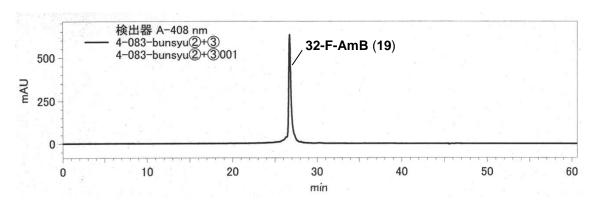


図 3-4 HPLC 精製後の 32-F-AmB の HPLC クロマトグラフ。 3-1-f 26,40-¹³C₂-AmB **23** の合成

続いて、同様の方法論を用いて 26,40-¹³C₂-AmB 23 の合成に取り組んだ(スキーム 3-7)。ポリエンフラグメントの合成はラクトン 30 を出発物質とし、まず ¹³C-ョウ化メチルを用いたメチル化を行うことで 34 を得た ⁸。 その後、32-F-AmB のポリエンフラグメント合成と同様の方法でアルデヒド 53 まで誘導した。得られたアルデヒドに対して、木下らの報告に従い合成したホスホン酸ジエステル 54³ を用いた HWE 反応を行うことでトリエン 55 へと伸長し、さらに DIBAL 還元、続く Dess-Martin 酸化によりトリエナール 32 を得た。この際、32-F-AmB の合成の際と同様に還元、酸化を経てトリエナールを調製したが、アルデヒドへと酸化する際、多くの副生成物が生成し複雑な混合物となった。これは、おそらく 32 位にフッ素が導入されている場合に比べ、フッ素が導入されていないトリエナールは不安定であることが考えられる。最後に別途調製した α 位に炭素 13 を導入したホスホン酸ジエステル 33^{2,3}と HWE 反応を行うことで、26 位および 40 位に炭素 13 を導入したポリエンフラグメント 31 の合成に成功した。

以降は 32-F-AmB の合成と同様に Stille カップリング、さらにマクロラクトン化を行った後、すべての保護基を脱保護することで目的とする 26,40-¹³C₂-AmB 23 の合成に成功した。32-F-AmB の合成と同様に脱保護は、HPLC で反応を追跡しながら行ったが、フッ化体の脱保護に比べ副生成物が多く見られ、収率が低くなった。おそらくこれは、トリエナール合成の際にも言及したように、フッ素が導入されていないポリエン体の方が、32 位にフッ素が導入されたポリエンに比べ不安定であることに起因すると思われる。

スキーム 3-7 26,40-¹³C₂-AmB **23** の合成。

以上のように本項では、AmB のカルボン酸を SEM エステルとして保護することですべての保護基を脱保護した AmB 標識体の効率的な合成法の確立し、32-F-AmB 22 および 26,40- 13 C₂-AmB 23 の合成に成功した。近年、Burke らのグループは同様に天然の AmB の分解と化学合成を組み合わせることで 35-deoxy-AmB の合成に成功しており、その合成では、AmB のカルボキシ基を 2-トリメチルシリル基で保護している 11 。このようにシリルアルキルエステルとして保護することで、これまで困難だった AmB のカルボキシ基の脱保護を再現性良く行えるものと期待される。

3-2 32-F-AmB の生物活性試験

3-2-a 溶血活性試験

合成した 32-F-AmB が天然の AmB と同様の性質を有するかを確認するため生物活性試験を行った。まず、ヒトの赤血球に対する溶血活性を調べた。AmB が赤血球にチャネルを形成するとそこからカチオンが流入およびそれに伴う水の流入が起こるため赤血球は溶血する。1%赤血球懸濁液に AmB および 32-F-AmB の DMSO 溶液を加

え、38℃で18時間インキュベートした後、遠心分離すると溶血していない赤血球は 沈殿しほぼ透明な上澄み液を得られるのに対し、溶血を起こすとヘモグロビンが漏れ 出し450 nm に吸収を示すようになる。そこで、上澄み液の吸光度を測定し、どの程 度溶血が起こっているかを(式3-1)用いて評価した。

A=膜外に流出したヘモグロビンの吸光度(450 nm)、 A_{100} =ポジティブコントロールのヘモグロビンの吸光度、 A_0 =ネガティブコントロールのヘモグロビンの吸光度

ポジティブコントロールとして純水で希釈し完全溶血させたもの、ネガティブコントロールとしてサンプル溶液の代わりに DMSO を加えたものを用いた。その用量作用曲線を図 3-5 に示した。また、用量作用曲線から EC_{50} を求めた(表 3-1)。その結果、32-F-AmB と AmB の EC_{50} はほぼ同等であり、32-F-AmB が AmB と同程度の溶血活性を保持していることが確認された。

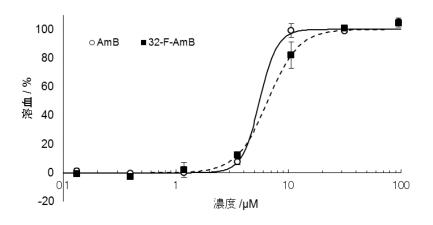


図 3-5 AmB および 32-F-AmB の用量作用曲線。

表 3-1 用量作用曲線から求めた 32-F-AmB および AmB の EC₅₀。

	EC ₅₀	
AmB	5.55 μM	
32-F-AmB	6.54 μM	

3-2-b 抗カビ活性試験

続いて、抗カビ活性試験を行った。カビ(Aspergillus niger)を含む寒天培地上に抗カビ活性のある試薬を染み込ませたペーパーディスクを置くと、その周辺はカビの繁殖が抑制され阻止円が形成されるため、試験に用いるサンプルの抗カビ活性を評価できる。

ペーパーディスクにサンプルの DMSO 溶液を染み込ませ(30, $10 \mu g/disk$)、A. niger 菌 糸体を含む寒天プレート上に置き、カビの繁殖を観察した。ネガティブコントロール としては DMSO のみを染み込ませたディスクを用いた。室温で 83 時間培養した段階 で、DMSO をしみこませたディスク周辺にはカビが繁殖したが、AmB と 32-F-AmB を $10 \mu g$ しみこませたディスクの周りには阻止円が形成されていた(図 3-6)。以上の結果から、32-F-AmB は AmB と同程度の抗カビ活性を保持していることが確認された。

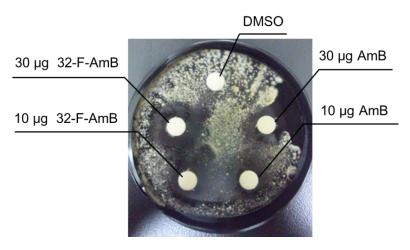


図 3-6 培養開始から83時間後の様子

3-2-c 32-F-AmB のステロール選択性の評価

次に 32-F-AmB が AmB と同じように Erg 選択性を有するかを 31 P NMR を用いた K+流入試験 $^{12-14}$ を行うことで調べた。リン酸の 31 P NMR シグナルは pH = 4.5 のとき 1.2 ppm に現れ、pH が 7.5 に近づくにつれてそのシグナルが低磁場にシフトしていき、pH = 7.5 になると 3.1 ppm に移動することが知られている。そのため、本手法ではリポソームに内包されたリン酸の 31 P NMR の化学シフトの値を観測することで脂質膜を透過するカチオンの流れを観察することができる(図 2-16)。リポソームを pH = 4.5 (12 PO4-)のリン酸緩衝溶液中で調製し、その後、水酸化カリウム水溶液を加えてリポ

ソームの外液を pH=7.5 (HPO_4^2) として pH 勾配つくる。そこに、AmB を加えてインキュベートすると、AmB がリポソームにチャネルを形成するため、カリウムイオンの流入およびそれに伴うプロトンの放出が起きる。その結果、リポソーム内外の pH 勾配が解消され最終的にリポソーム内の pH も 7.5 となる。 ^{31}P NMR 測定時には Mn^{2+} イオンを加えることにより、リポソーム外のシグナルを除去することができ、リポソーム内のリン酸のシグナルのみを観察することができる。

Gary-bobo らは、Erg 含有膜では 1.2 ppm と 3.1 ppm に二本シグナルが現れる"all-ornone"タイプと呼ばれるチャネルが形成され、一方、ステロール非含有および Cho 含有膜ではブロードなピークが観測される"graded"タイプのチャネルが形成されると報告している 12,13 。"all-or-none"タイプのチャネルはコンダクタンスが高くチャネルが形成されると、素早く K^+/H^+ 交換が平衡に到達し、"graded"タイプのチャネルは徐々にリポソーム内の pH が変化する(図 3-7) 12,13 。

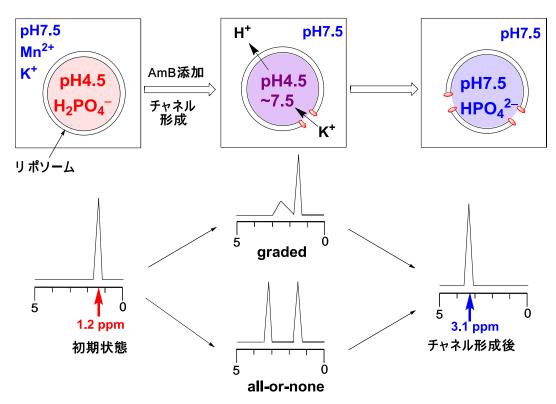


図 3-7 31 PNMR によるイオンチャネル活性試験の概略図。AmB チャネルの形成に伴い、リポソーム内部の pH が変化し、リン酸の 31 P NMR の化学シフトが変化する 13 。

10% Erg および 10% Cho 含有 POPC リポソームを用いた測定の結果を図 3-8 に示した。その結果、32-F-AmB は Erg 膜において R_(AmB/lipid)=10⁻⁵ でも all or none 型のチャネ

ルが形成しているのに対し、Cho 膜ではイオンの透過が起きていないことが分かる。また、 $R=10^4$ では Cho は graded 型に近いピークを示している。以上の活性試験の結果から、ヘプタエンの 32 位にフッ素原子が導入された 32-F-AmB は AmB と同等の生物活性を保持しており、Erg 選択性を有していることが確認された。したがって、32-F-AmB は脂質膜中で AmB と同様のチャネル複合体を形成していると考えられ、固体 NMR 測定における有用なプローブになることが期待される。

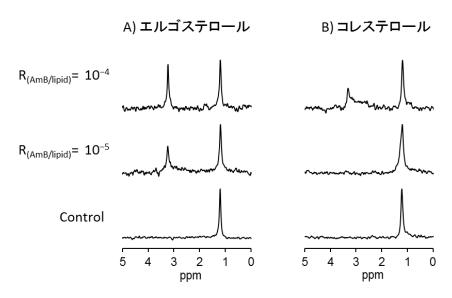


図 3-8 32-F-AmB の 31 P NMR による K+透過活性試験。32-F-AmB の濃度は R_(AmB/lipid)= 10^{-4} (上段)、 10^{-5} (中段)、0(下段)とした。エルゴステロール(A)およびコレステロール含有 POPC 膜(B)に 32-F-AmB を 3 時間インキュベートした後の 31 P NMR を示した。

3-3 AmB とエルゴステロールの平行型相互用の解析

続いて、AmB—Erg 間の距離情報を取得するべく、新たに合成した 32-F-AmB と過去の報告例に従い調製した 14-F-AmB 、26,27- 13 C $_2$ -Erg および当研究室の松下により合成された 4- 13 C-Erg を含む水和 POPC 膜を調製し 13 C $_3$ P $_4$ REDOR 測定を行った。

まず、14-F-AmB /4- 13 C-Erg および 32-F-AmB/26,27- 13 C₂-Erg の組み合わせで測定を行い、平行型の AmB — Erg 相互作用を解析した。この組み合わせでは、平行型で相互作用している場合のみ AmB と Erg の標識部位同士が近づき、標識炭素シグナルに減衰が観測されるはずである。図 3-9 には 13 C-Erg と F-AmB を 1:1 で脂質膜に混合し 38 °で測定した 13 C{ 19 F}REDOR 測定の非照射スペクトル(50)と差スペクトル(50)と差スペクトル(50)と表スペクトルを示した。第二章でも述べたように、Erg の標識炭素由来のシグナルは、Erg がAmBに結合している場合(図 3-9中の赤矢印)としていない場合(図 3-9中の黒矢印)で、異なる化学シフトを持つ。また、結合していない Erg は高い運動性を有するため、シャープなピークを与えるのに対し、結合している Erg は AmB との相互作用し運動性が低下することで非常にブロードなピークを与える。当初の予想通り、両方の標識体の組み合わせで測定した REDOR スペクトルにおいて、AmB と相互作用している Erg 由来のピークのみに明確な REDOR 減衰が観測された。これは、AmB と相互作用している Erg 由来のピークのみに明確な REDOR 減衰が観測された。これは、AmB と相互作用している Erg の 4位の炭素は AmB の 14位のフッ素に近く、26,27位の炭素は 32位のフッ素に近い、すなわち 500円 50

また、表 3-2 には、 S_0 と S スペクトルの面積値からを算出した各展開時間における標識炭素シグナルの減衰率($\Delta S/S_0$)をまとめた。これを見ると、4- 13 C-Erg/14-F-AmB と 26,27- 13 C₂-Erg/32-F-AmB の両方の組み合わせにおいて、減衰率はおよそ 70%で頭打ちしていることがわかる。REDOR 測定では、炭素 13 とフッ素の原子間距離が十分に近いとき、展開時間を延ばしていくとシグナルの減衰は最大で 100%まで達する。しかし得られた減衰率は 70%程度で頭打ちしている。これは、標識炭素由来のシグナルを構成する 30%程度が減衰を引き起こさない成分であることを示している。過去に行った Erg の末端部と AmB のヘッドグループを標識した 26,27- 13 C₂-Erg と 14-F-AmB を用いた REDOR 測定ではシグナルの減衰は 30%で頭打ちしていた 1 。

これらの結果を踏まえると、標識部位のピークは 70%が AmB と平行型、残る 30% が反平行型で AmB と相互作用しているエルゴステロール由来であるがわかる。

以上のように、平行型の相互作用を初めて明確に観測することに成功し、AmB とエルゴステロールが両方の向きで相互作用しているということを確認できた。

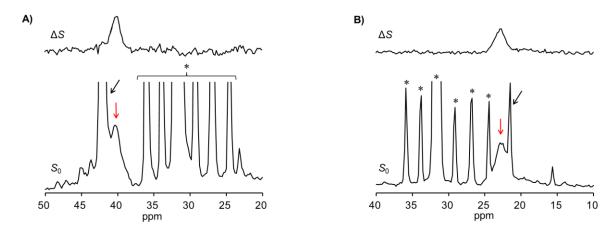


図 3-9 4-¹³C-Erg/14-F-AmB/POPC =1:1:9 (**A**)および 26,27-¹³C₂-Erg/32-F-AmB /POPC =1:1:9 (**B**)の ¹³C{¹⁹F}REDOR スペクトル(上段: 差スペクトル、下段: 非照射スペクトル)。図中の赤矢印と黒矢印は、それぞれ AmB と相互作用している ¹³C-Erg と相互作用していない ¹³C-Erg の標識炭素由来のシグナルを示している。また*は POPC 由来のピークを示している。測定温度: 38 °C、MAS 速度: 5 kHz、展開時間: 12.8 ms、積算回数: A 60432、B 11672。

表 3-2 4-¹³C-Erg/14-F-AmB/POPC =1:1:9 (**A**)および 26,27-¹³C₂-Erg/32-F-AmB /POPC =1:1:9 (**B**)の標識炭素の REDOR 減衰の割合。(非照射、照射スペクトルのシグナルの積分値から計算)。

A) 14-F-AmB/4- ¹³ C-Erg		
$\Delta S/S_0$		
0.10		
0.31		
0.55		
0.66		
0.69		
0.66		

B) 32-F-AmB/26,27- ¹³ C ₂ -Erg	
展開時間 (ms)	$\Delta S/S_0$
3.2	0.17
4.8	0.30
6.4	0.42
12.8	0.56
19.2	0.70
25.6	0.70
38.4	0.69

3-4 AmB とエルゴステロールの反平行型相互作用解析

筆者らは、過去に 26,27- 13 C-Erg と 14-F-AmB を用いた 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定により AmB と Erg の反平行型の観測および分子間距離の取得に成功している 1 。そこで、本研究では異なる位置での分子間距離情報を取得するため、4- 13 C-Erg および 32-F-AmB を用いて REDOR 測定を行った(図 3-10)。

この組み合わせにおいても、AmB と相互作用している Erg の標識炭素のシグナル に明確な REDOR 減衰が観測された。また、その減衰率は展開時間を延ばして測定したところ、最大で 30%まで減衰した(表 3-3)。これは前述したように、複合体中の Erg のうち 70%が平行型、30%が反平行型で AmB と相互作用しているという結果によく一致する。以上の結果から、改めて AmB と Erg が平行型と反平行型の両方で相互作用しており、その存在比はそれぞれ 70%と 30%であるということを確認できた。

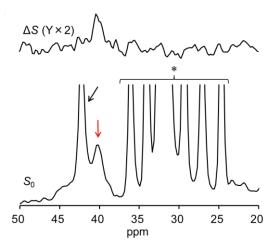


図 3-10 4-¹³C-Erg/32-F-AmB/POPC= 1/1/9 の ¹³C{¹⁹F}REDOR スペクトル(上段: 差スペクトル、下段: 非照射スペクトル)。図中の赤矢印と黒矢印は、それぞれ AmB と相互作用している ¹³C-Erg と相互作用していない ¹³C-Erg の標識炭素由来のシグナルを示している。また*は POPC 由来のピークを示している。測定温度: 38 ℃、MAS 速度: 5 kHz、展開時間: 12.8 ms、積算回数: 58224。

表 3-3 4-¹³C-Erg/32-F-AmB/POPC =1:1:9 の標識炭素の REDOR 減衰の割合。(非照射、 照射スペクトルのシグナルの席分子から計算)。

32-F-AmB/4- ¹³ C-Erg		
展開時間 (ms)	$\Delta S/S_0$	
3.2	0.06	
6.4	0.14	
9.6	0.29	
12.8	0.30	
16.0	0.30	

3-5 AmB-エルゴステロール分子間距離計算

3-5-a 分子間距離の計算にあたって

続いて得られた展開時間に対する減衰の大きさから標識部位間の距離計算を行うことにした。一般に 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定における炭素 NMR のシグナルの減衰率は、分子運動の大きさや標識炭素の近くにあるフッ素の数に影響を受けることが知られている 15 。そこで、分子間距離計算を行う前に、これらが距離計算に与える影響を調べることにした。

まず、AmB チャネル複合体の分子運動を調べるために、低温条件下での ¹³C{ ¹⁹F}REDOR 測定を行うことにした。チャネル複合体内の分子が運動している場合 や複合体間で分子交換等が起きている場合、それらは観測されるシグナルの減衰率を 小さくする。仮に分子運動および分子交換が REDOR 減衰に影響を与えるほど起きて いるとした場合、測定温度を下げて測定を行えば運動性が抑制され、減衰率が増加するはずである。

図 3-11 には低温条件下で測定した 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR のスペクトル(図 A、B)および低温条件下と 38 °における標識炭素の減衰率をプロットした(図 C、D)。 $^{-30}$ °で測定した $^{4-13}$ C-Erg のシグナル減衰はわずかながら 38 °での測定に比べて大きくなったものの、全体的にみると低温条件下でもそれほど減衰率は変化していない。これは、REDOR 測定の間に分子運動はそれほど起きておらず、Erg は AmB と強固に相互作用しているということを示している。従って、分子間距離計算の際には、分子の運動性を考慮せずとも妥当な計算ができることが分かった。

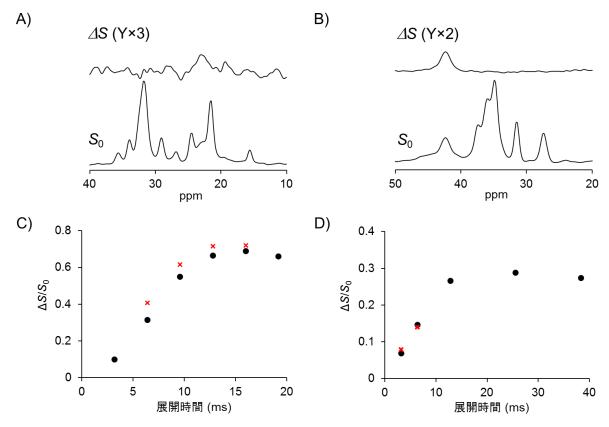


図 3-11 A, B) 低温条件下で測定した ¹³C{¹⁹F}REDOR 測定の *S*₀ および Δ*S* スペクトル。展開時間: 12.8 ms。C, D) 展開時間に対する Erg 標識炭素の REDOR 減衰の割合。 (A, C)4-¹³C-Erg/ 14-F-AmB/POPC= 1/1/9、×: −30 °C、●: 38 °C。(B, D)26,27-¹³C₂-Erg/ 14-F-AmB/POPC= 1/1/9、×: −10 °C、●: 38 °C。

続いて、REDOR 測定における Erg の標識炭素の減衰に影響を与えるフッ素の数を調べることにした。REDOR 測定では、観測核(13 C)の周りに複数の照射核(19 F)がある場合、観測核のシグナル減衰の大きさはそれぞれの核間距離と 19 F- 13 C- 19 F がなす角度等に依存する 16 。従って、実際に Erg の炭素 13 シグナルの減衰に関与するフッ素の数を知ることは距離計算において重要である。

Erg の標識炭素の近傍にある F-AmB としては、同一チャネル内にある F-AmB に加え、別のチャネルにある F-AmB が考えられる。後者はチャネル同士の距離が近い場合、Erg の標識炭素の減衰に影響を与える可能性がある。この場合、チャネル間のヘプタエン同士は非常に近くなり、その近接は UV スペクトルにおける励起子カップリングに影響を与えられるはずである。しかし、第二章で測定した UV スペクトルからわかるように、Erg 含有膜においては、AmB ヘプタエン由来の 330 nm 付近の浅色シ

フトによる吸収は Cho 含有膜やステロール非含有などに比べ、長波長側にシャープなピークとして観測されている。これは、ヘプタエン間の距離が比較的均一かつある程度離れていることを示している。従って、チャネル間の距離もある程度離れていると考えることができるため、別のチャネルにある F-AmB は Erg の標識炭素の減衰に関与しないと考えられる。

複合体における Erg は AmB 二分子に挟まれたようなサンドウィッチ型の相互作用をしていると想定されており 17,18 、この場合 Erg の標識炭素の近傍には、隣り合う二つの AmB のフッ素が存在し得る。一方で、第二章で明らかになったように Erg は分子全体が 1 分子の AmB のマクロライドに密に接するような形で相互作用しているとすれば、逆側にある AmB のフッ素は標識炭素から十分に遠くなる可能性もある。そこで、これらのどちらが正しいのかを確かめるために、F-AmB の一部を非標識 AmB で希釈したサンプルを用いて $^{13}C\{^{19}F\}REDOR$ 測定を行った。

サンプルに用いるすべての AmB が F-AmB の場合、Erg の隣り合う二つの AmB は 必ず F-AmB である(図 3-12 上段)。一方、半分の AmB を非標識体とした場合、Erg の 隣り合う AmB の組み合わせは、図 3-12 下段に示した 4 通りとなり、それぞれの組み 合わせが 25%を占める。これらのうち Erg 標識炭素の減衰を引き起こし得るのは A-C であり、Erg の両側のフッ化 AmB が Erg の炭素 13 と近い場合、減衰の大きさは距離 r_1 と r_2 を反映した 75%まで減衰する理論曲線でフィッティングできる。一方、片側のフッ化 AmB が Erg と十分に離れている場合、減衰を引き起こす組み合わせは図の A、C のみであり、距離 r_1 を反映した 50%まで減衰する理論曲線でフィッティングできる。また、この場合は距離 r_2 の寄与を受けないため、各展開時間における減衰の大きさは、すべての AmB を F-AmB として測定した場合の半分になるはずである。

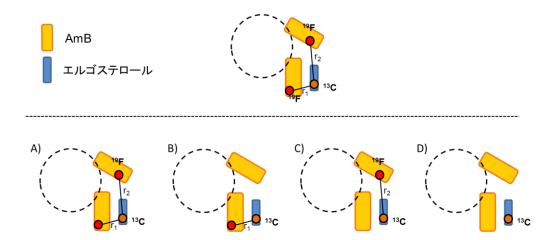


図3-12 F-AmB/¹³C-Erg= 1/1 サンプルにおけるスピン系(上段)と AmB/F-AmB/¹³C-Erg= 0.5/0.5/1 の時のスピン系。

図 3-13 には 14-F-AmB/4- 13 C-Erg および 14-F-AmB/26,27- 13 C₂-Erg の組み合わせで行った希釈実験の結果を示した。いずれの 13 C-Erg のシグナルも、非希釈サンプルに対し減衰の大きさがほぼ半分になった。これは前述したように、Erg に隣り合う二つのAmB のうち片方だけが、Erg の炭素 13 シグナルに影響を与えるということを示している。従って、AmB のフッ素と Erg の炭素 13 の原子間距離を計算する際は、減衰の大きさを 2 スピンのみを考慮したカーブでフィッティングすればよいことが分かった。

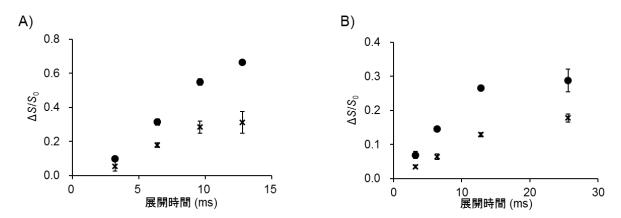


図 3-13 展開時間に対する Erg 標識炭素の REDOR 減衰の割合。(●: F-AmB/¹³C-Erg= 1/1、×: AmB/F-AmB/¹³C-Erg= 0.5/0.5/1)。(A) 4-¹³C-Erg/ 14-F-AmB/POPC= 1/1/9。(B)26,27-¹³C₂-Erg/ 14-F-AmB/POPC= 1/1/9。

3-5-b AmB-Erg 間の分子間距離測定

続いて、前項から明らかになった情報に従い、分子運動を考慮しないフッ素と炭素 13 の 2 スピン系に基づく理論曲線によりフィッティングすることで分子間距離を算 出することにした。

REDOR 測定のタイムスケールでは分子運動はほとんどなかったため、26,27- 13 C₂-Erg の標識部位であるジメチル部分も AmB と相互作用することで固定されていると仮定し、C26 と C27 位から AmB のフッ素までの距離はそれぞれ独立に計算することとした。しかし、この二つのメチル基は同一の化学シフトを有するため、それぞれのメチル基由来の減衰率を独立に算出することは困難であった。そこで 26,27- 13 C₂-Erg の標識部位のシグナルの減衰の大きさは、異なる距離に基づく 2 つの理論曲線を 1:1 で足し合わせた曲線でフィッティングを行った。

また、各サンプルで測定した REDOR 減衰の割合から明らかになったように、平行型と反平行型の存在比は 7:3 であるため、 4^{-13} C-Erg/14-F-AmB と 26,27- 13 C₂-erg/32-F-AmB を用いた測定では最大で 70%まで減衰する理論曲線、 4^{-13} C-Erg/32-F-AmB、 26,27- 13 C₂-erg/14-F-AmB を用いた測定では 30%まで減衰する理論曲線でフィッティングを行った。

図 3-14 には、理論曲線によるフィッティングの結果および得られた分子間距離を示した。(修士論文研究において行った $26,27^{-13}C_2$ -Erg /14-F-AmB の組み合わせでの測定結果も併せて示した 1 。) いずれの標識体の組み合わせで行った測定においても、実測値と理論曲線は非常によい一致を示し、平行型と反平行型相互作用においてそれぞれ 3 点の分子間距離情報を取得することに成功した。

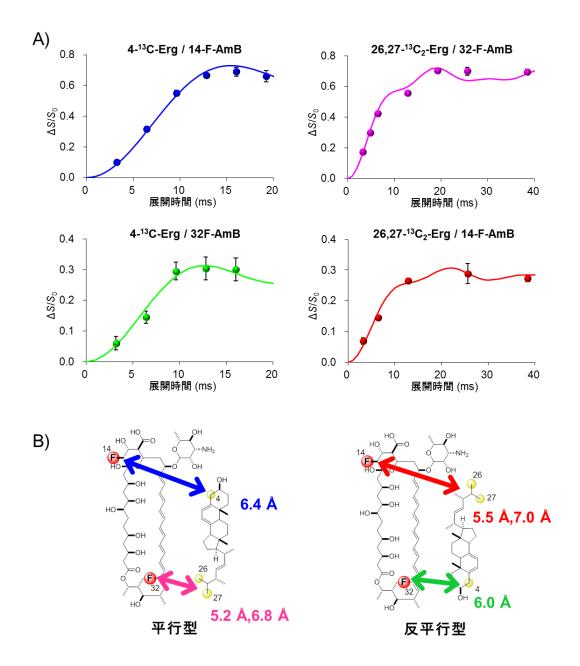


図 3-14 (A) 2 スピン系で計算した実測値に最も合う 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 減衰の理論曲線。プロットと実線はそれぞれ実測値と理論曲線を示している。また、プロットのエラーバーは S_0 および ΔS スペクトルの S/N 比から算出した。(B) 理論曲線によるフィッティングから得られた分子間距離情報。図 A の理論曲線と図 B 中の標識部位を示した矢印の色は対応させた。

3-6 分子間距離情報に基づく AmB-エルゴステロールのジオメトリー探索

続いて、AmB と Erg の二分子間相互作用を詳細に調べるため、得られた分子間距離情報を制限情報として、マクロモデルを用いたコンフォメーション探索および最安定化を行うことで AmB-Erg の複合体構造を推定した。

AmB の配座は N-ヨードアセチル-AmB の X 線結晶構造 19 からヨードアセチル基を除いたものを初期配座として用いた。また、計算の間 AmB のヒドロキシ基、アンモニウム基、カルボキシ基は水素結合の寄与を調べるために自由回転させ、その他の原子は完全に固定した。また、分子間距離の制限を加えるため AmB の 14 位および 32 位の水素をフッ素に置換して計算を行った。

Erg は分子力学計算により計算した最安定配座の一つである側鎖がまっすぐに伸びた構造を用いた。Erg の側鎖は通常、比較的フレキシブルであると考えられているが、第二章で明らかになったようにまっすぐに伸びた側鎖が AmB との VDW 相互作用に大きく寄与している。また、低温条件下での REDOR 測定の結果は、固体 NMR 測定のタイムスケールにおいてほとんど分子運動していない、すなわち側鎖は AmB と相互作用することで固定されていることを示している。そのため、Erg 側鎖を構成する炭素の二面角はすべて±30°の幅を持たせて初期配座で固定し、残る原子は自由に動かし計算を行った。

また、AmB-Erg の平行型と反平行型の相互作用は、REDOR 測定から得られた異なる距離制限を用いてそれぞれ独立に計算を行った。

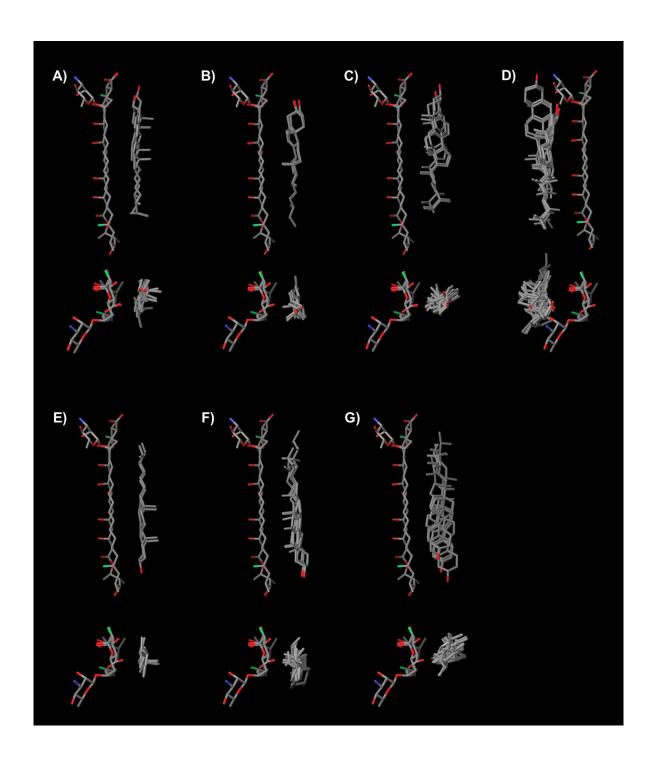


図 3-15 REODR 測定から得た分子間距離を制限情報としたコンフォメーション探索 およびエネルギー安定化から得られた AmB-Erg 複合体の推定構造。A-D は平行型、E-G は反平行型の計算結果を示した。平行型、反平行型共に、最安定配座から 10~kJ mol^{-1} 以内に得られた結果を相互作用様式で分類して、重ね書きした。灰色:炭素、赤:酸素、緑:フッ素、水素は省略した。

コンフォメーション検索およびエネルギー安定化の結果、平行型と反平行型のそれぞれの相互作用において、最安定構造から $10~kJ~mol^{-1}$ 以内に 19、34 つの複合体構造が得られた(図 3-15)。また、得られた構造は AmB と Erg の位置関係から主に 4 つグループに分類でき、それらは平行型と反平行型で共通していた。すなわち、Erg の α 面(図 A,E)もしくは角間メチル(図 B,F)が AmB のマクロライド側面と接しているもの、または Erg のステロイド炭素環と AmB のマクロライド平面が垂直になったもの(図 C,G)であった。また、これらの相互作用ではすべて Erg が AmB の疎水性面(マイコサミンとは反対側のマクロライド側面)に結合していた。さらに、平行型においては、Erg が AmB のマクロライドの親水面側(マイコサミンが出ている方向)に位置しているもの(図 D)も見られた。

平行型と反平行型の両方において大部分の複合体の構造は、Erg が AmB の疎水面と相互作用しているグループに含まれた。これはおそらく 14 位と 32 位のフッ素は両方とも AmB のマイコサミンと同じ方向に向いているためだと考えられる。つまり、得られた分子間距離情報を満たすように Erg をマクロライド親水面に配置すると、Erg とマクロライドの距離が遠くなり VDW 相互作用を獲得できなくなるためだと考えられる。

REDOR 測定の結果からは平行型と反平行型の存在比は 7:3 であることが明らかになっており、両相互作用の安定性にそれほど差がないことが分かる。これは、平行型と反平行型で主な安定化効果が共通している、つまり、AmB と Erg は両方の向きで同じように相互作用していることが推測できる。また、第二章で明らかになったように、Erg はフラットなステロイド炭素環 α 面とまっすぐに伸びた側鎖が AmB のマクロライドと密に接するような形で相互作用し強固な VDW 相互作用を獲得していると考えられる。以上のことを踏まえると、Erg は図 A,E のように、AmB の疎水面にフラットな α 面と側鎖を密着させるような形で相互作用していると考えられる。

しかし、図 A,E の相互作用では平行型と反平行型の両相互作用において、Erg はマイコサミンと離れた位置に存在しており、両者の間に分子間水素結合は観測されなかった。従来、Erg の 3 位と AmB の間に形成される水素結合が AmB-Erg 複合体の安定化に大きく寄与していると考えられている $^{20-24}$ 。本測定で分子間水素結合が観測されなかった理由としては、以下の二つが考えられる。一つは、Erg 隣り合う AmB 二つのうち片方が図 A、E で示されたように Erg と密に接しており、その逆側にある AmBが Erg の 3-OH と水素結合している場合である。Erg は Erg AmB の疎水面と Erg の Erg の Erg なかっために、逆側の Erg の Erg なかった出図 Erg の Erg に示したように近づくはず

である。この場合 AmB のマイコサミン部分のヒドロキシ基が Erg と水素結合を形成でき得る(図 3-16A)。もう一つの可能性としては、Erg は AmB と直接水素結合を形成しておらず、水分子やリン脂質などと水素結合のネットワークを形成している場合である ²⁵。筆者らは修士論文研究において、リン脂質は単なる膜の構成成分として存在するのではなく、AmB 複合体の一部として構造化していることを明らかにしている。従って、構造化したリン脂質と水素結合を形成し、AmB-Erg-POPC の三者会合状態を安定化している可能性もある。この場合、Erg が反平行型で AmB と相互作用している際にも、リン脂質のヘッドグループと水素結合を形成することができるため、平行型と反平行型の安定性がほとんど同じであるという実験結果にも一致する。

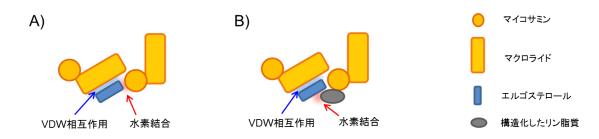


図 3-16 想定される Erg の 3 位の水素結合。(A) 隣り合う AmB のうち、片方とは VDW 相互作用し、もう片方のマイコサミン部のヒドロキシル基と水素結合を形成している。(B) AmB 複合体に構造化しているリン脂質のヘッドグループと水素結合を形成している。

実験項

試薬

AmB はナカライテスクから、POPC は Avanti Polar Lipid 社もしくは日本油脂から購入したものを用いた。14-F-AmB は AmB より過去の報告例に従い合成した 26 。 26 3 27 C-Erg は当研究室の松下直広博士が合成したものを用いた 27 。26,27- 13 C₂-Erg は過去の合成法に従い Erg から合成した 1 。サンプル調製における溶媒はナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を用いた。また、水には MilliQ 水(Millipore 社)を用いた。また、HPLC に用いたバッファーは測定前にソニケーションを行うことで脱気して使用した。また、サンプル調製の際 AmB および 32-F-AmB は DMSO のストックソリューションとし UV スペクトルにより濃度決定を行い使用した(AmB: ϵ_{415} =1.28× 10^{5} M 1 cm $^{-1}$ 、32-F-AmB: ϵ_{415} =0.98× 10^{5} M $^{-1}$ cm $^{-1}$ 、32-F-AmB: ϵ_{415} =0.98× ϵ_{415}

使用機器

可視紫外分光光度計は島津製作所製の V-630BIO を使用した。ボルテクスミキサーは laboratory & Medical supplies 社の MIXER UZUSIO VTX-3000L を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。固体 NMR は CMX-300 (Chemagnetics/Varian, 300 MHz for ¹H NMR)を用いた。

溶血活性試験

ヒト血液(2mL)を PBS バッファーで 10mL に希釈した後、5 分間 2000 rpm で遠心分離した。上澄み液を取り除き再び PBS バッファーで 10 mL に希釈した。この操作を計三回繰り返して得た赤血球の懸濁液を更に PBS バッファーで 20 倍希釈した(1%赤血球懸濁液)。AmB と 32-F-AmB を DMSO に溶かして各濃度の溶液を調整し、この溶液 4 μ l を 1%のヒト赤血球溶液 196 μ l に加えて 38℃で 18 時間インキュベートした。その後、インキュベートした溶液をそれぞれ 5 分間 2000 rpm で遠心分離した。上澄み液(180 μ L)を 96 ウェルマイクロプレートに取り、波長 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を用いて測定した。ポジティブコントロールとしては 20%赤血球懸濁液(10 μ L)に蒸留水(190 μ L)で希釈し完全溶血させたもの、

ネガティブコントロールとしては AmB 溶液の代わりに DMSO を $4 \mu l$ 加えたものとした。得られた各サンプルの吸光度を以下の式に代入し、溶血した赤血球の割合を算出した。その値から用量作用曲線を作成し、50%溶血が起きる濃度(EC_{50})を求めた。

% hemolysis = $(A-A_0)/(A_{100}-A_0)\times 100$

A= サンプルの吸光度

A₁₀₀ = ポジティブコントロールの吸光度

A₀ = ネガティブコントロールの吸光度

抗カビ活性試験

抗カビ試験用の培地には GP 寒天培地を用いた。培地成分は以下に示す通りである。

GP 寒天培地(精製水 1L 当り)	
ブドウ糖	20 g
粉末酵母エキス(酵母エキス)	2 g
硫酸マグネシウム	0.5 g
ポリペプトン(カゼイン製ペプトン)	5 g
リン酸二水素カリウム	1 g
カンテン	15 g

クリーンベンチ内で GP 寒天培地の粉末 4.35 g を精製水 100 ml に溶かし、オートクレイブで 120℃、20 分間滅菌した。温かいうちに、培地 2 ml をシャーレに取り薄く広げ蓋をしてビニールテープで密閉し、冷蔵庫で保存した。

この培地に別途培養しておいた黒コウジカビ(Aspergillus niger)を含む培地を薄く広げた。その後、望む濃度に調製した AmB および 32-F-AmB の DMSO 溶液(50 μ L)をペーパーディスクにしみこませ寒天培地上に載せた後再び密閉した。その後、25℃、暗所で保存し黒コウジカビの繁殖の様子を観測した。また、ネガティブコントロールとして DMSO(50 μ L)のみをしみこませたペーパーディスクとし、活性の有無については、DMSO のみのペーパーディスクの阻止円が消滅した時点でサンプルの阻止円が保持されているかどうかで判断した。

³¹P NMR による K+流入活性試験

POPC (204 μmol)と Erg もしくは Cho (22.7 μmol)をナスフラスコ中でクロロホルムに溶かした。その後、エバポレーターで溶媒を除去した後、真空下で終夜乾燥した。得られた脂質フィルムに 3ml のリン酸緩衝溶液(0.4 M KH2PO4/1 mM EDTA/40%D2O, pH4.5)を加えボルテックス、ソニケーションを行うことで水和した。その脂質懸濁液に対し凍結融解を四回繰り返すことで MLV 懸濁液とした後、リポソファスト®シリンジを用いてポリカーボネートフィルター(200 nm ポアサイズ)を 19 回通しサイズを均一にした。得られた LUV 懸濁液に水酸化カリウム水溶液を加えることで pH 7.5 に調製した後、その懸濁液 750 μL に対し FCCP のエタノール溶液(10 mM, 2 μL)を加えた。そこに、望む濃度に調製した AmB および 32-F-AmB の DMSO 溶液(6.39 μL)を加えて 3 時間インキュベートしたのち、550 μL をとり 5 mm NMR チューブに加えて 31 P NMR スペクトルを測定した。測定は ECS-400 spectrometer (JEOL)を用いて 25 °C で行った。測定条件は以下に示す通りである。

31 P NMR 測定条件

Experiment	single_pulse_dec
Solvent	$\mathrm{D}_2\mathrm{O}$
X_domain	$^{31}\mathbf{P}$
X_freq	161.835
X_sweep / kHz	30.340
X_points	16384
Irr_domain	$^{1}\mathrm{H}$
Scans	256
X_90 _width / μs	12.75
Temp_get / °C	30
Relaxation_delay / s	2
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

固体 NMR 測定

32-F-AmB (1.7 mg, 1.8 μ mol)、26, 27-¹³C₂-Erg (720 μ g, 1.8 μ mol)および POPC (12.3 mg, 16.1 μ mol)をクロロホルムとメタノールの混合溶媒に完全に溶解した後、エバポレーターで溶媒を除去した。その他の標識体の組み合わせで測定した際のサンプルは、同様の方法で異なる標識体を用いて行った。また、希釈サンプルも同様の方法で、F-AmB

の半分を AmB に置換して調製した。真空下で脂質フィルムを終夜乾燥させた後、 $10 \, \mathrm{mM}$ HEPES バッファー($14.7 \, \mu \mathrm{L}$)および MilliQ ($500 \, \mu \mathrm{L}$)を加え、ボルテックスとソニケーションにより水和させた。得られた懸濁液に対し凍結融解を $5 \, \mathrm{D}$ 回繰り返すことで MLV とした後、凍結乾燥した。得られた粉末を $50 \, \mathrm{wt}$ % となるように重水を加え、ボルテックスと凍結融解を繰り返すことで均一に水和された MLV サンプルを得た。そのサンプルをガラスチューブに封入し、エポキシ樹脂で密閉した。そのガラスインサートを $\varphi 5 \, \mathrm{mm}$ の MAS D ローターに挿入し測定を行った。

測定には 5 mm の 3 チャンネル MAS プローブ(Varian)を使用した。測定時には温度 コントローラーと MAS 速度コントローラーを用いて、温度と MAS 速度を一定に保った。MAS 速度は 5000 ± 2 kHz で測定した。サンプルに吹き付けるエアーの温度は 30 °C もしくは-10 °C、-30 °C で保った。ただし、エアーの温度を 30 °C に設定した場合、デカップリング等の影響で発熱するため実際のサンプル温度は 38 °C となる 1 。低温 測定には Poly cold System 社の PGC-150 を用いた。またプロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンス 28 を用いた。フッ素の位相回しには $xy-8^{29}$ を用いた。また、CP 条件とパルス幅はサンプルごとに最適化を行った。

REDOR 減衰理論曲線の作成

2 スピン系での理論曲線は Bessel 級数による近似式(式 1-7)を用いて Microsoft Excell により k=6 まで計算することで作成した。

分子力学計算による AmB-Erg のジオメトリー探索

ジオメトリー探索およびその最適化は Windows 7 オペレーティングシステムのパーソナルコンピュータにインストールした Macromodel 9.9 を用いて行った。AmB および Erg を十分に離した状態で同一空間に配置したものを初期構造とし、Macromodelの conformational search を行うことで解析を行った。

AmB の配座は N-ヨードアセチル-AmB の X 線結晶構造 19 からヨードアセチル基を除いたものを初期配座として用いた。また、計算の間 AmB のヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシ基の C-O、C-N、C-CO、CO-O の結合は水素結合の寄与を調べるために自由回転させ、その他の原子は完全に固定した。また、14 位および 32 位の水素をフッ素に置換して計算を行った。Erg は第二章で行った分子力学に基づく配座探索

及び最安定化から得られた、最安定配座の一つである側鎖がまっすぐに伸びた配座を初期構造とした。また、側鎖を構成する炭素原子すべての二面角は初期配座で $\pm 30^\circ$ の幅を持たせ固定し、その他の二面角はすべて自由に動かして計算した。また、平行型と反平行型は以下の表に示した異なる距離制限を用いて独立に計算した。また距離制限における force constant は $100 \, \text{kJ/mol} \, \text{Å}^2$ とした。

	標識原子の位置	標識原子間距離(Å)
	F14 (AmB)-C4 (Erg)	6.4
平行型	F32 (AmB)-C26 or C27(Erg)	5.2
	F32 (AmB)-C27 or C26(Erg)	6.8
	F32 (AmB)-C4 (Erg)	6.0
反平行型	F14 (AmB)-C26 or C27(Erg)	5.5^{1}
	F14 (AmB)-C27 or C26(Erg)	7.0^{1}

配座探索のサンプリングには torsional sampling (MCMM)法 ³⁰ を用い、配座発生の試行回数は 20000 回とした。また、力場は OPLS2005³¹ を用いて真空中で計算した。また、エネルギーの最安定化は Polak-Ribiele conjugate gradient (PRCG)法 ³² を用い、繰り返し回数を 28000 回として行った。その後、得られたコンフォマーに対し、繰り返し回数を 28000 回とし、真空中で Truncated Newton Conjugate Gradient(TNCG)法 ³³ による最安定化を行うと共に重複配座の除去を行った。また、最適化にも配座探索と同様の距離制限を用いて行った。

参考文献

- (1) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 83–89.
- (2) Matsushita, N.; Matsuo, Y.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 114–115.
- (3) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6187–6191.
- (4) 土川 博史 平成 18 年度 大阪大学大学院理学研究科博士論文
- (5) 松田 康彦 平成22年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文
- (6) Wuts, P.; Greene, T. *Greene's protective groups in organic synthesis*; 4 th.; WILEY-INTERSCIENCE: New Jersey, 2007; pp. 565–566.
- (7) 松尾 由紀子 平成 21 年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文.
- (8) Tholander, J.; Carreira, E. Helv. Chim. Acta **2001**, 84, 613–622.
- (9) Paquette, L. J. Org. Chem. **1998**, 63, 7389–7398.
- (10) Bennacer, B.; Trubuil, D.; Rivalle, C.; Grierson, D. S. *European J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 4561–4568.
- Gray, K. C.; Palacios, D. S.; Dailey, I.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Wilcock, B. C.; Burke,
 M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, 109, 2234–2239.
- (12) Gary-bobo, C. M. *Biochimie* **1989**, *71*, 37–47.
- (13) 梅川 雄一 平成 20 年度 大阪大学大学院理学研究科博士論文
- (14) Herve, M.; Debouzy, J.; Borowski, E.; Cybulska, B.; Gary-bobo, C. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *980*, 261–272.
- (15) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.
- (16) Tsutsumi, A.; Javkhlantugs, N.; Kira, A.; Umeyama, M.; Kawamura, I.; Nishimura, K.; Ueda, K.; Naito, A. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1735–1743.
- (17) Baran, M.; Borowski, E.; Mazerski, J. *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 162–168.
- (18) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63–78.
- (19) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560–4564.
- (20) Neumann, A.; Baginski, M.; Czub, J. J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132, 18266–18272.

- (21) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10667–10675.
- (22) Croatt, M.; Carreira, E. Org. Lett. 2011, 13, 1390–1393.
- (23) Silberstein, A. J. Membr. Biol. 1998, 126, 117–126.
- (24) Czub, J.; Neumann, A.; Borowski, E.; Baginski, M. *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 105–116.
- (25) Langlet, J.; Bergès, J.; Caillet, J.; Demaret, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1191*, 79–93.
- (26) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565–3567.
- (27) 松下 直広 平成 17 年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文
- (28) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958.
- (29) Gullion, T.; Baker, D.; Conradi, M. J. Magn. Reson. 1990, 89, 479–484.
- (30) Chang, G.; Guida, W.; Still, W. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 4379–4386.
- (31) Kaminski, G.; Friesner, R. J. Phys. Chem. B **2001**, 2, 6474–6487.
- (32) Polak, E. Computational methods in optimization; Academic Press: New York, 1971.
- (33) Ponder, J. W.; Richards, F. M. J. Comput. Chem. 1987, 8, 1016–1024.

第四章 AmB-AmB の分子間相互作用解析

諸言

本章では AmB 会合体構造解析で最も重要となる AmB-AmB 二分子間の位置関係の決定を行った。第一章でも述べたように、これまでに AmB の複合体構造に関する研究は数多く行われてきたが、それらの大部分はステロールやリン脂質の違いによる会合状態の変化を、種々の分光学的手法やイオン透過活性評価等で観測するなど間接的な構造解析に留まっていた。そのため、AmB 二分子間の相互作用を直接的かつ原子レベルで解析した例は計算科学を除きほとんど存在しない。その数少ない成功例のひとつが、当研究室で行われた $^{13}C\{^{19}F\}REDOR$ 測定である。第一章でも述べたように、梅川らは 14-F-AmB および[tri- ^{13}C] AmB を用いた REDOR 測定により、14 位のフッ素と 41 位の炭素の原子間距離を見積もることに成功した 1,2 。しかし、現在得られているのはこのヘッドグループ付近の推定距離のみであり、複合体中の AmB 二分子の位置関係を決定するには至っていない。

そこで、本章では第二章で新たに合成した 32-F-AmB および 26,40- 13 C₂-AmB を用いて 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定を行うことによって AmB の末端部分と中央部分からの距離情報の取得を目指した。

また、複合体中の AmB - AmB 二分子間の位置関係を決定する上で、何分子の AmB が複合体を構成しているかを決定することは非常に重要である。従来、その分子数は 6-8 分子程度と推定されているが ^{3,4}、いずれの結果もチャネルのイオン伝導度(コンダクタンス)の値や分原子間力顕微鏡により類推した孔サイズを基に決めるなど、間接的な方法で得られた結果であった。そこで、本章では ¹⁹F-CODEX 測定をおこなうことで、より直接的に分子数を決定し、その結果を合わせて考察することで AmB の二分子間の位置関係を推定することを試みた。この位置関係と第三章で推定した AmB-Erg の二分子複合体の推定構造を用いて、過去の報告から得たチャネルの特徴に合致するチャネル会合体の構造候補を選別した。これら候補のなかで、高い精度で実験値と一致するものをチャネル構造の最終候補とした。

4-1 26,40-¹³C₂-AmB と 14-F-AmB を用いた ¹³C{¹⁹F}REDOR 測定

第二章において AmB と Erg は平行型と反平行型の二種類の向きで相互作用することが明らかとなった。この両配向の存在は、二種類の AmB ーAmB 相互作用様式を示唆している。一つ目は会合体中における AmB がすべて同じ方向を向いている、すなわち AmB 二分子が平行型で相互作用している場合である。この場合、AmB は一定の向きで膜に挿入された後、二重膜の両面にある Erg と相互作用することで平行型と反平行型の相互作用を形成すると考えられる(図 4-1A)。この際、AmB は二重膜の両面の Erg と相互作用するため単分子長で膜を貫通した 'single-length-channel"を形成していると考えられ、過去の固体 NMR の結果ともよく一致する 5 。もう一つの可能性は、最近の蛍光測定や単一チャネル電流測定の結果から示唆されているように $^{4.6.7}$ 、複合体中で AmB 二分子が反平行型で相互作用している場合である。この場合、反平行型で相互作用している AmB 同士の間にある Erg は、どちらか一方の AmB とは反平行型で相互作用していることになる(図 4-2B)。

AmB 二分子がどちらの向きで相互作用しているかは、位置関係を調べる上での前提条件にもなるため極めて重要である。そこで、14-F-AmB と 40 位の 13 C 標識 AmB 用いて 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定を行った(合成の都合上 26,40- 13 C $_2$ -AmB を用いたが、26- 13 C は測定結果に影響しないと考えらえる)。フッ素は AmB のヘッドグループの 14 位に位置するが、40 位は末端部に位置する。そのため、AmB 二分子が反平行型で相互作用している場合、それらの標識部位は近接し、AmB の 40 位の炭素のシグナルにREDOR 減衰が観測されるはずである。一方 AmB 二分子が平行型で相互作用している場合、14 位フッ素と 40 位炭素は単純なモデリングから 18 Å 程度以上は離れていると推測され、減衰は観測されないはずである。

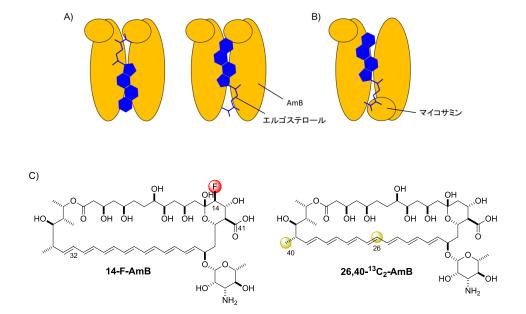


図 4-1 想定される二つの AmB-AmB 間の相互作用様式。(A) AmB 二分子は平行型の相互作用をしており、その間に Erg が上下両方の向きで挿入される。 (B) AmB 二分子が反平行型で相互作用している。この際間に挿入された Erg は平行型と反平行型の両方で相互作用することになる。(C) 14-F-AmB と 26,40-¹³C₂-AmB の化学構造。

図 4-2 には 14-F-AmB と 26,40- 13 C₂-AmB を 1:1 で POPC 膜に混合し測定した 13 C{ 19 F}REDOR の結果を示した。長い展開時間においても、40 位の炭素のシグナル はほとんど減衰せず、チャネル会合体内において AmB のヘッドグループと末端部分 は非常に遠いことが示された。わずかに見られた減衰は(<7%、距離に概算した場合およそ 16 Å)、ごく一部の AmB 二分子が反平行型で相互作用している、もしくは異なるチャネルにある 14-F-AmB により引き起こされたものであると推測される。しかし、いずれの場合においても、この結果は大部分の AmB はチャネル複合体中において平行型並んでいるということを表している。従って AmB 二分子間の位置関係を解析する際には平行型を前提としてよいことが明らかとなった。

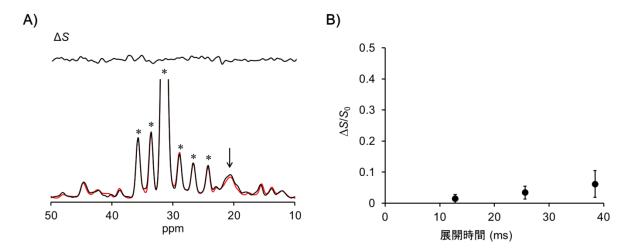


図 4-2 (A) $26,40^{-13}$ C-AmB/14-F-AmB/Erg/POPC=0.5/0.5/1/9 の 13 C{ 19 F}REDOR スペクトル(上段: 差スペクトル、下段黒: 非照射スペクトル、下段赤: 19 F 照射スペクトル)。図中の矢印は $26,40^{-13}$ C₂-AmB の 40 位炭素、*は POPC 由来のピークを示している。測定温度: 38 °C、MAS 速度: 5 kHz、展開時間: 38.4 ms、積算回数: 141184。(B) 展開時間に対する 40 位標識炭素の減衰率。

4-2 14-F-AmB を用いた ¹⁹F CODEX 測定

次に 14-F-AmB を用いた 19 F-CODEX 測定により AmB 複合体を形成する分子数の決定を試みた。 19 F-CODEX 測定により会合数を見積もる場合、観測対象の運動性を完全に抑制する必要がある 8 。過去に行われた重水素固体 NMR の測定結果から、AmB 複合体の運動性は非常に低いことが分かっているが 9 、完全に運動性を抑えるため $^{-15}$ で測定を行った。図 4-3 に 19 F-CODEX 測定のスペクトルおよび、混合時間に対するシグナルの残余量を示した。

AmB の 14 位のフッ素由来のシグナルが-201 ppm に観測され、スピン拡散のための混合時間を設けた場合(S スペクトル)、明確なシグナルの減衰が見られた。また、混合時間を延ばしていくとシグナルの強度は最大で 13%まで低下した。この結果は、エラーバーを考慮すると AmB 複合体は 8±2 分子により形成されているということを示している。この値は過去に行われた単一チャネル電流測定や分子間力顕微鏡により推測された値 ^{3,4} とほぼ同じではあるものの、初めて非ペプチド性低分子が脂質膜中で形成する会合体の分子数を直接的に観測できた重要な知見であると考えられる。

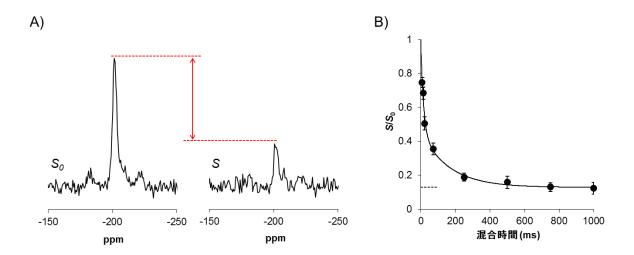
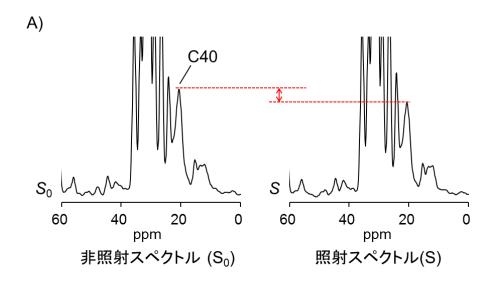


図 4-3 (A) 14-F-AmB/Erg/POPC=1/1/19 の 19 F-CODEX スペクトル(左:混合時間なし、右:混合時間あり)。測定温度:-15 °C、MAS 速度:7 kHz、混合時間:71.4 ms、積算回数:512。(B) 混合時間に対する 14 位のフッ素シグナルの残余量(S/S_0)と $S/S_0=0.50$ ×exp(-t/16)+0.33×exp(-t/162)+12.9 で表される曲線。エラーバーはスペクトルの S/N 比から算出した。

4-3 26,40-¹³C₂-AmB と 32-F-AmB を用いた ¹³C{¹⁹F}REDOR 測定

続いて AmB の末端部および中央部からの分子間距離情報を得るために 32-F-AmB と 26,40- 13 C₂-AmB を用いて 13 C{ 19 F}REDOR 測定を行った。図 4-4 に両標識体を 1:1 で POPC 膜に混合して測定したスペクトルを示した。ポリエン炭素である 26 位はメチル基炭素の 40 位に比ベシグナルの緩和が早く、展開時間を延ばしていくと十分なシグナル強度を得ることができなかった。そのため、26 位の炭素を観測する際にはプロトンデカップリングの強度を上げて測定を行った(C26 位のデカップリング強度: 69.4kHz、C40 位のデカップリング強度: 54.3 kHz)。

26位および40位の炭素由来の両方のシグナルに明確なREDOR減衰が観測された。14-F-AmBを用いた測定では減衰がほとんど観測されなかった40位の炭素のシグナルにも顕著な減衰が観測され、AmBがチャネル複合体内において同じ向きでて並んだ平行型の配向を取ることを改めて確認することができた。また、興味深いことに、まっすぐにAmBが脂質膜に挿入されている場合、32位のフッ素との距離が比較的遠くなると予想されたヘプタエン26位の炭素のシグナルにも短い展開時間において顕著な減衰が観測された。しかし、長い展開時間においては26位由来の炭素のシグナルは緩和したため十分なシグナル強度を得ることができず、測定精度は低下した。



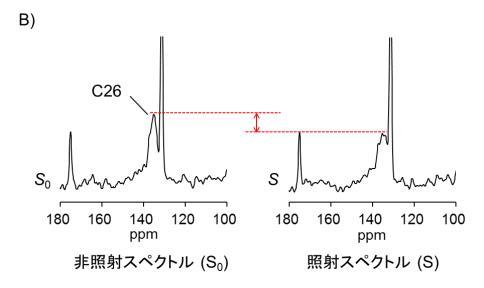


図 4-4 (A) 26,40-¹³C₂-AmB/32-F-AmB/Erg/POPC=0.5/0.5/1/9 の ¹³C{¹⁹F}REDOR スペクトル(左:非照射スペクトル、右: ¹⁹F 照射スペクトル)。(A) 40 位の標識炭素の減衰。測定温度:38 ℃、MAS 速度:5 kHz、展開時間:12.8 ms、積算回数:53424。(B) 26 位の標識炭素の減衰。測定温度:38 ℃、MAS 速度:5 kHz、展開時間:12.8 ms、積算回数:60000。

4-4 分子間距離の計算

4-4-a 展開時間に対する 26 位および 40 位のシグナルの減衰の大きさ

続いて 26 位と 40 位の標識炭素由来のシグナルの減衰から原子間距離を見積もることにした。26 位は展開時間を 3.2、6.4、12.8 ms、40 位は 6.4、12.8、25.6、38.4 ms で測定し、 S_0 と S スペクトルの面積値から $\Delta S/S_0$ を算出した(表 4-1)。この値を基にチャネル複合体中で 32-F-AmB と隣り合う 26,40- 13 C₂-AmB の F32-C26 および F32-C40 間の距離を見積もることにした。

表 4-1 各展開時間における 40 位、26 位の REDOR 減衰の割合。

a) C40 位の》			b) C26 位の》	·····································
展開時間 (ms)	$\Delta S/S_0$		展開時間 (ms)	$\Delta S/S_0$
6.4	6.40.0412.80.1125.60.3138.40.50		3.2	0.06
12.8			6.4	0.10
25.6			12.8	0.18
38.4				

4-4-b 分子間距離計算にあたって

第二章の AmB-Erg の分子間距離計算の際にも述べたように、REDOR 測定における観測核のシグナルの減衰は i) 分子運動や ii) 磁気双極子相互作用におけるスピンシステムに影響を受ける。さらに、本測定では 32-F-AmB および 26,40- $^{13}C_2$ -AmB を脂質膜に混合したサンプルを用いて測定を行っているため、複合体中で必ずしも 32-F-AmB と 26,40- $^{13}C_2$ -AmB が隣り合うわけではない。従って、iii) F-AmB と ^{13}C -AmB が会合体においてどのように並んでいるかも考慮しなければならない。

i) 分子運動に関しては、当研究室の梅川らが行った低温条件下での固体 NMR 測定により 1 、会合体における AmB の運動性は減衰に影響を与えないことが示されている。また、重水素固体 NMR からも、脂質二重膜における一定濃度以上の AmB の運動性は極めて低いことが報告されており 9 、分子運動が REDOR 減衰に与える影響は無視できると考えてよい。

ii) スピンシステムに関しては、標識炭素のシグナルの減衰に影響を与えるのは同一会合体中で隣り合う F-AmB のみであると仮定した(図 4-5 赤線)。他に影響を与える可能性のある F-AmB 分子としては、異なるチャネルにある F-AmB と会合体内で隣り合っていない二分子以上離れた F-AmB が考えられる(図 4-5 黒点線)。しかし、異なるチャネルにある F-AmB は、第三章で述べたように UV スペクトル測定の結果から、Erg 含有膜においてチャネル会合体間は十分に離れていると考えられるため、減衰を引き起こさないと考えるのは妥当である。また、同一チャネル内で二分子以上離れている F-AmB に関しても、AmB の厚みが 6 Å 程度あることを考慮

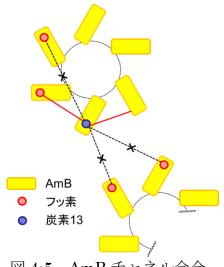


図 4-5 AmB チャネル会合 体を上から見た図。

すれば単純なモデリングから二分子以上離れた F-AmB のフッ素は ¹³C-AmB の標識炭素から 17Å 程度以上は離れていると考えられる。そのため、二分子以上離れた AmB はほとんど減衰に影響を及ぼさないと考えられる。

iii) 続いて会合体内における F-AmB と 13 C-AmB の並び方を考える。32-F-AmB は前述したように AmB と同程度の生物活性、イオン透過活性、ステロール選択性を有する。そのため、32-F-AmB と 26 40- 13 C2-AmB の物理的性質は同様、すなわち両者は会合体においてランダムに混ざり合っていると仮定した。この場合、会合体内の 13 C-AmB と隣り合う AmB の組み合わせは図 26 4-6 の 26 4 通りとなり、それぞれ 25 8の確率で起こる。これらのうち減衰を引き起こすのは 26 7-AmB と 13 C-AmB が隣り合う確率は 26 7-AmB が 26 7-AmB が 26 7-AmB が 26 9-AmB か 26 9-AmB 26 9-AmB か 26

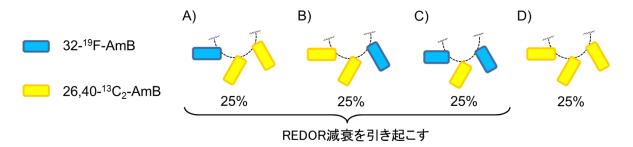


図 4-6 想定されるチャネル会合体中における F-AmB と 13 C-AmB の並び方。 13 C-AmB と隣り合う AmB の組み合わせは A-D の 4 パターン考えられそれぞれ 25%で起こりうる。このうち減衰を引き起こすのは A-C のみであるため、減衰の最大は 75% となる。

従って、40位の炭素のシグナルの減衰($\Delta S/S_0$)は式 4-1 で表すことができる。

ΔS/S₀= (¹³C-AmB の C26/F32 分子間由来) ×75% ...(式 4-1)

一方、26 位の炭素は他のヘプタエン炭素と同様の化学シフトを持つため、ヘプタエン炭素由来のシグナルすべてが 26 位の炭素由来ではない。実際には、26,40- 13 C₂-AmB の 20-25,27-33 位と 32-F-AmB の 20-33 位の天然存在比炭素 13 由来のシグナルも含まれている。 従って観測されるヘプタエン由来のシグナルのうち 100/(100+1.1×27)=77.1%が 26 位の標識炭素由来、 $1.1\times13/(100+1.1\times27)=11.0\%$ が 26,40- 13 C₂-AmB の C26 以外のヘプタエン炭素、 $1.1\times14/(100+1.1\times27)=11.9\%$ が 32-F-AmB のヘプタエン炭素となる。従って、観測される REDOR 減衰は式 4-2 で表すことができる。

ΔS/S₀= {(¹³C-AmB の C26/F32 分子間由来)×75%}×77.1%+{(¹³C-AmB の C20-25,27-33/F32 の分子間由来)×75%}×11.0%+(32-F-AmB の分子内由来)×11.9%(式 4-2)

32-F-AmB のヘプタエン炭素由来のシグナルの減衰は、AmB の X 線結晶構造 10 を 基に 32 位の水素をフッ素に置換することで求めた各ヘプタエン炭素と F32 の原子間 距離を用いて計算した(表 4-2)。一方、 13 C-AmB の標識炭素以外のヘプタエン炭素と 32F-AmB のフッ素との原子間距離を一義的に決めるのは、複合体の全体構造が明らかではないため困難である。そこで、今回の計算では 13 C-AmB のヘプタエン炭素と 32-F-AmB のフッ素との距離はすべての同じ距離として扱った。

表 4-2 32 位のフッ素から原子内のヘプタエン炭素までの距離。

炭素番号	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33
F32 からの距離 (Å)	14.3	13.2	12.0	10.9	9.6	8.6	7.3	6.3	5.0	4.1	2.8	2.3	1.3	2.3

4-4-c 原子間距離計算

4-4-b で述べた条件に基づいて、標識炭素(C26, C40)とフッ素(F32)の距離 r で 75%まで減衰する最も単純な 2 スピン系での理論曲線によるフィッティングを行った。(図 4-7)。

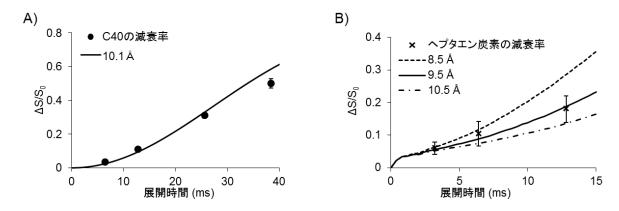


図 4-7 最大で 75%まで減衰する 2 スピン系カーブでのフィッティング結果と原子間 距離。(A) 40 位標識炭素の REDOR 減衰の実測値と 10.1 Å の理論曲線。(B) 26 位炭素 の RDOR 減衰の実測値と 8.5、9.5、10.5 Å の理論曲線。

C40 位の減衰に関しては 10.1 Å の理論曲線と良い一致を示し、分子間距離を推定することができた。また、C26-F32 の距離に関しては、測定感度が低かったためエラーバーが大きいことや計算が煩雑であるため精度は高くないが、およそ 9.5 Å と見積もることができた。興味深いことに C26-F32 の分子間距離が比較的短くなった。AmB が垂直に膜に挿入されている場合、ヘプタエン中央部にある C26 と末端部にある F32 の距離は単純なモデリングから 12 Å 程度は離れていることが予想される(図 4-8A)。しかし、実際に得られた距離は約 9.5 Å と予想されるよりかなり短い。また、梅川らの報告によると 41 位の炭素と 14 位のフッ素の距離は 12.1 Å と逆に想定されより長くなっている 1。おそらくこの結果は、図 12.1 Å と逆に想定されより長くなっている 13 おそらくこの結果は、図 12.1 Å と逆に想定されより長くなっている 13 おそらくこの結果は、図 12.1 Å と逆に想定されより長くなっている 13 おそらくこの結果は、図 12.1 Å と逆に想定されより長く

NMR の結果からも、AmB が脂質膜に対して傾いて挿入されていることが示唆されて おり¹¹、本測定結果もそのような AmB の配向を反映しているものと考えられる。

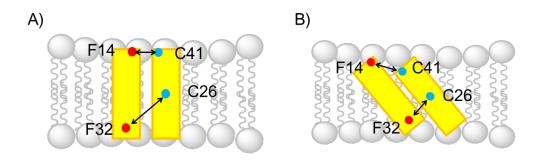


図 4-8 (A) AmB 分子が垂直に膜に挿入された従来想定されている会合体モデル。このモデルでは 32 位のフッ素と 26 位の炭素は離れており、ポリオールに位置する 14 位のフッ素と 41 位の炭素は近づいている。(B) REDOR 測定から示唆された AmB が膜中で傾いているモデル。このモデルでは、AmB のヘプタエン中央部と末端部が近づく。

4-5 チャネルモデリングによる AmB 二分子間の相対位置の推定

上述の 4-4-c では単純な 2 スピン系での計算を行ったが、実際の AmB 複合体においてはより複雑なスピンシステムになることが予想される。AmB 分子を樽板型モデルに従い配置した場合、F-AmB と 13 C-AmB では標識位置が異なるため、 13 C-AmB の標識炭素から隣り合う二つの F-AmB のフッ素までの距離は左右で異なる(図 4-9)。また、 13 C-AmB が二つの F-AmB に挟まれる場合(25%の確率で起きる)、3 スピン系での計算が必要となる。つまり、より実際に近い系では、REDOR 減衰は二つの距離 r_1 、 r_2 および 19 F- 13 C- 19 F の角度 θ に依存すると考えられる(図 4-9)。従って、より正確に解析を行うためにはこれら 3 つのパラメータを変化させて理論曲線を作成し、フィッティングを行う必要がある。

しかし、3つのパラメータを変化させフィッティングした場合、複数のパラメータ値の組み合わせで実測値を取る可能性が高くなったり、フィッティングが煩雑になり精度が落ちたりするなど、困難が予想された。また、AmB 二分子間の位置関係を推定する場合、標識部位が異なる複数点で算出した3つのパラメータ値を満たす分子配置を得るのも容易ではなかった。そこで本項の解析では、先にAmB 二分子間の位置関

係を定義した後、その情報に従い理論曲線を作成し、実測値とフィッティングすることにした。

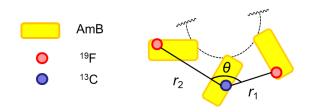


図 4-9 F-AmB と 13 C-AmB を用いた 13 C 19 F 19 FREDOR 測定における実際のスピン系。 13 C-AmB が F-AmB 二分子はさまれた時、 13 C-AmB の標識炭素の REDOR 減衰は距離 r_1 、 r_2 と角度 θ に依存する。

固体 NMR で解析できる複合体の構造は、少なくともミリ秒間に変化する構造を平均した像であることを鑑みれば、膜中で制限のもとに運動している AmB 分子の位置は平均化されて観測されるはずである。これまでの実験で得られた AmB 会合体のNMR シグナルは比較的単一性が高いので、チャネル会合体の種類は少なく(すなわち AmB 分子数 N の分布は狭く)、また、ミリ秒間の平均構造では N 分子の AmB が円状に並んだ回転対称体であると見なすことができる。この場合、複合体中の AmB の配置は、i)分子数 N、ii)チャネルの空孔内径、iii-v)AmB の配向(角度 α 、 β 、 γ)の5つのパラメータで定義できる(図 4-10)。また、これらのパラメータを定義すると、AmB 会合体を三次元座標で表すことができ、そこから分子間距離 r_1 、 r_2 と角度 θ を算出できる。そこで、これら5つのパラメータを少しずつ変化させ、その際の距離および角度情報を基に REDOR 減衰の理論曲線を作成し、実測値と比較することにした。実験値と理論値を比較し、最もずれの少ないチャネル構造を探索することですべての実験値を満たすチャネル構造を推定した。

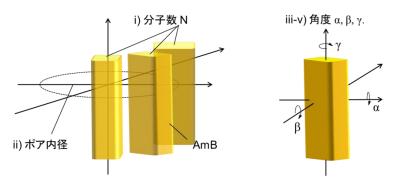


図 4-10 AmB のチャネルを回転対称体とみなした時、チャネルを定義する 5 つのパラメータ。

作成したチャネルモデルにおける AmB の配座は N- ヨードアセチル-AmB の X 線結晶構造の座標を用いることとした 10 。また、実験値は C26/F32 および C40/F32 間の 測定結果に加えて、過去に梅川らが行った C41/F14 間の $^{13}C\{^{19}F\}$ REDOR 測定の結果 を用いた 1,2 。なお、3 スピン系を考慮した理論曲線の作成は以下の方法で行った。前述したように会合体における F-AmB と ^{13}C -AmB の並びは図 4-6 の 4 通りあるため、 C40/F32 間の REDOR 減衰の理論曲線は式 4-3 で表される混合曲線となる。

$$\Delta S/S_0$$
(C40/F32)= $(r_1 \mathcal{O} 2 \exists \text{t}^\circ \vee \mathcal{A}) \times 25\% + (r_2 \mathcal{O} 2 \exists \text{t}^\circ \vee \mathcal{A}) \times 25\% + (r_1, r_2, \theta \mathcal{O} 3 \exists \text{t}^\circ \vee \mathcal{A})$ ×25% $\times 25\%$...(式 4-3)

また、26 位のシグナルに関しては 4-3-b で述べたように、他のヘプタエン炭素由来のシグナルが含まれている。そのため、式 4-4 で表される各炭素の減衰率を足し合わせた混合曲線を作成した。すべての分子間由来の減衰率は式 4-3 に示したように、 r_1 、 r_2 に対応する二つの 2 スピン系に基づく理論曲線と 3 スピン系に基づく理論曲線をそれぞれ 25%ずつ足し合わせた曲線とした。また、32-F-AmB の分子内の減衰率に関しては表 4-2 に示した距離に対応する 2 スピン系に基づく理論曲線を足し合わせた曲線とした。

 $\Delta S/S_0$ (C26/F32)=(13 C-AmB の C20/F32 分子間由来)×1.1%+ … +(13 C-AmB の C26/F32 の分子間由来)×77.1%+ … +(13 C-AmB の C33/F32 の分子間由来)×1.1%+(32 F-AmB の 分子内由来)×11.9% …(式 4-4)

41 位の炭素は標識率が 15%であり 1 、14-F-AmB の天然存在比の C41 も考慮する必要がある。観測される C41 のシグナルのうち 13 C-AmB 由来は 15/(1.1+15)=93.2%、14-F-AmB 由来は 1.1/(1.1+15)=6.8%であるため、理論曲線は式 4-5 で表される混合曲線として得られる。なお、14-F-AmB における C41/F14 の分子内距離は X 線結晶構造の 14 位水素をフッ素に置き換えることで計算し、4.9 \mathring{A} とした。

 $\Delta S/S_0$ (C41/F14)= $\{(r_1 \, \mathcal{O} \, 2 \, \text{スピン系}) \times 25\% + (r_2 \, \mathcal{O} \, 2 \, \text{スピン系}) \times 25\% + (r_1, \, r_2, \, \theta \, \mathcal{O} \, 3 \, \text{スピン系}) \times 25\% \} \times 93.2\% + (14-F-AmB \, \mathcal{O}$ 分子内の減衰、 $4.9 \, \mathring{A} \, \mathcal{O} \, 2 \, \text{スピン系}) \times 6.8\%$...(式 4-5)

また、3 スピン系の理論曲線はSIMPSON¹²を用いて作成した。

4-5-a 探索条件

各パラメータの探索範囲は表 4-3 のように設定し、計 112385 通りのチャネルを検 討した。

表 4-3 AmB のチャネル構造を定義する 5 つのパラメータの探索範囲 (角度 α 、 β 、 γ は表中の範囲を 5 °おきに探索した。)

1) → M.	ii) チャネル内径(Å)		0 (0)	. (0)
i) 分子数	空孔中心から O8までの距離の 2 倍	111) α (°)	iv) β (°)	v) γ (°)
6, 7, 8, 9, 10	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	-45 ~ 45	−30 ~ 30	-90 ~ -30

- i) 分子数に関しては ¹⁹F-CODEX 測定の結果に従い、探索範囲は 6-10 分子とした。
- ii) 本項のモデリングでは、チャネル内径を空孔中心から AmB の 8 位の酸素までの距離の二倍と定義した。Katsu らは様々なサイズの溶質を用いた浸透圧保護実験により AmB のチャネルを通過できる水和分子・イオンの大きさを調べている。その結果から、AmB のチャネルは水和半径が 3.5 Å のテトラメチルアンモニウムイオンを通過させることが明らかとなっている。水和イオンの最外殻にある水分子がチャネル内部の 8 位の酸素と水素結合距離で最近接すると仮定すると、チャネル内径は少なくとも12.4 Å 以上のはずである(O-H…O 水素結合中の酸素原子間の距離を 2.7 Å とした 13)。そのため内径の探索範囲は 12 Å~18 Å とした。

iii-v) AmB 分子の配向に関しては図 4-11 に示したように、O8=(R, 0, 0)、F14=(R, 0, 7.8)、C41 (R+4.4, 0, 10.0)となるように配置した時を(α , β , γ)=(0, 0, 0)とした。R はチャネルの空孔中心(0, 0, 0) から O8 までの距離を表している。また、 α は図中の緑で示した x 軸、 β は y 軸、 γ は z 軸(R, 0, z)周りの回転角度に対応する。脂質膜に対してAmB 分子が大きく傾いている場合、膜法線方向の AmB の疎水性領域の高さが小さくなるため脂質二重膜を貫通できなくなる。そのため、 α は-45°~45°、 β は-30°~30°の範囲で探索を行った。また、AmB の空孔内部は、親水性であることを考えると、AmB のポリオール部分は空孔の内側を向いている必要がある。従って γ は-90°~-30°の範囲で探索した。

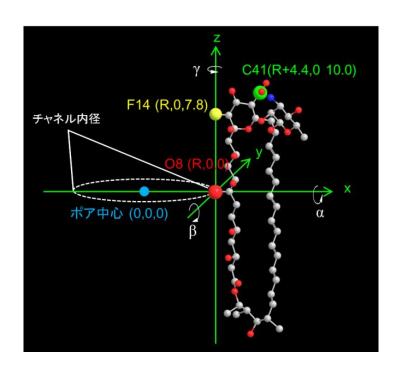


図 4-11 $(\alpha, \beta, \gamma)=(0, 0, 0)$ の時の AmB の配向

4-5-b 候補の選出

前項で設定した 80275 通りの AmB 複合体の中には、実測値と大きくずれるものも存在すると考えられる。そこで、理論曲線を作成する前に実測値を満たし得るチャネル複合体の候補を限定することにした。

まず、作成したチャネルに Erg を配置することで候補を限定した。第三章で述べたように、AmB と Erg 二分子間の位置関係は、AmB とステロール誘導体の親和性評価

および REDOR 測定の結果から推定されている(図 3-15**A**,**E**)。また、希釈サンプルを用いた 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定の結果から二つの F-AmB に挟まれた 13 C-Erg は隣り合う一方の F-AmB とは REDOR 減衰に影響がない程度離れていることが分かっている。従って、図 4-12 に示した距離 $r_{1(AmB-Erg)}$ と $r_{2(AmB-Erg)}$ のうち、AmB のフッ素と近いほうを $r_{1(AmB-Erg)}$ とすると、少なくとも $r_{1(AmB-Erg)}$ となるはずである。そこで、作成したチャネルモデルに 2 章で求めた位置関係で Erg を配置することで $r_{1(AmB-Erg)}$ 、 $r_{2(AmB-Erg)}$ を算出し、 $r_{1(AmB-Erg)}$ $\leq r_{2(AmB-Erg)}$ となるチャネル複合体のみを候補とした。

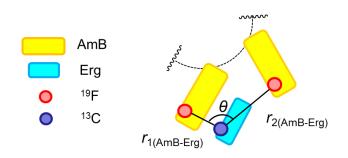


図 4-12 F-AmB と ¹³C-Erg 複合体における ¹³C{ ¹⁹F}REDOR のスピンシステム

続いて、AmB-AmB 間の REDOR 減衰値を大まかにフィッティングすることで、候補を限定した。まず、各チャネル複合体の C40-F32 間の距離を根拠に候補構造を絞った。図 4-9 に示した r_1 と r_2 のうちどちらか一方が 8.6 Å と等しく、かつ、残る一方は減衰を引き起こさない程離れていると仮定して作成した理論曲線を求めた(図 4-13A の青実線)。 r_1 と r_2 のどちらか一方でも 8.6 Å より小さい場合、その理論曲線は実線より必ず上に表れ、実測値と大きくずれる。従って、 r_1 ,と r_2 がいずれも 8.6 Å より大きいことをチャネル候補の条件とした。さらに、図中の点線は $r_1=r_2=11.1$ Å のときの 3 spin 系に基づいて作成した理論曲線を表している。 r_1 と r_2 の両方が 11.1 Å より大きくなる場合、理論曲線は点線より必ず下側にずれる。そこで、 r_1 ≤ 11.1 Å もしくは r_2 ≤ 11.1 Å となるチャネルを候補とした。C41-F14 間に関しても同様の議論により距離の下限を設定することで候補を限定した(図 4-13B)。すなわち、 r_1 ,と r_2 がいずれも 10.1 Å より大きいことをチャネル候補の条件とした。C41-F14 に関しては、距離の上限は設定しなかった。

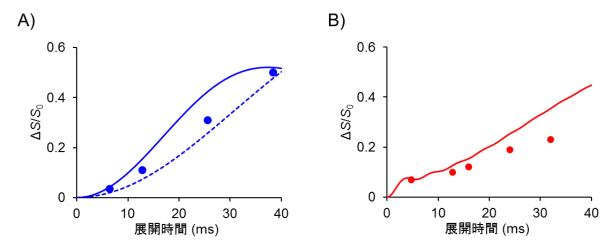


図 4-13 (A) プロット: C40/F32 間の REDOR 測定の減衰率。実線: r_1 と r_2 のどちらか一方が 8.6 Å と等しく、残る一方ははるかに大きいと仮定して作成した理論曲線 (50%まで減衰する 8.6 Å の 2spin 系曲線)。点線: r_1 = r_2 =11.1 Å として作成した理論曲線(3 spin 系での理論曲線の作成は、 19 F- 13 C- 19 F のなす角を 55° として計算した)。 (B) プロット: C41/F14 間の REDOR 測定の減衰率。実線: r_1 と r_2 のどちらか一方が 10.1 Å と等しく、残る一方ははるかに大きいと仮定して作成した理論曲線(50%まで減衰する 10.1 Å の 2spin 系曲線)。

4-5-c RMSD の計算

前項で設定した条件を満たすチャネル構造は計 798 通りであり、そのうち RMSD が小さくなった構造の大部分の分子数 6 であった。これは、AmB の分子数が 7 以上の場合、設定したチャネル内径の範囲では AmB 同士が近づきすぎるため、前項で設定した条件を満たせなくなるためである。続いて、それぞれのチャネル構造から算出した r_1 、 r_2 、 θ を用いて式 4-3, 4-4, 4-5 に従い理論曲線を作成した。そして、得られた理論値と実測値の差 $\Delta\Delta S/S_0 = \Delta S/S_{0obs.} - \Delta S/S_{0calc.}$ から式 4-6 を用いて RMDS を算出した(表 4-4)。また、図 4-14 には α と γ に対して、最少の RMSD をプロットした。

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{12} \sum \left(\frac{\Delta \Delta S/S_0}{\Delta S/S_0}\right)^2} \qquad \dots (\overrightarrow{\mathbb{R}} 4-6)$$

表 4-4 REDOR 減衰の実測値を満たすチャネルの候補の 5 つのパラメータとそれらを基に作成した理論値と実験値の RMSD。表 A~K に会合数および内径で分類した表を載せた。(青: $RMSD \le 0.10$ 、緑: $RDSD \le 0.15$ 、黄: $RMSD \le 0.20$)

表 A (会合数、内径)= (6、12 Å)

											_
α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°	°) β(°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
30	0	-30	0.517	40	0	-50	0.742	45	-5	-40	0.489
35	-5	-35	0.554	40	0	-45	0.573	45	-5	-35	0.453
35	-5	-30	0.571	40	0	-40	0.445	45	0	-55	1.051
35	0	-40	0.493	40	0	-35	0.366	45	0	-50	0.868
35	0	-35	0.422	40	0	-30	0.339	45	0	-45	0.705
35	0	-30	0.397	40	5	-35	0.487	45	0	-40	0.563
35	5	-30	0.417	40	5	-30	0.355	45	0	-35	0.455
40	-10	-45	0.595	45	-10	-55	0.725	45	0	-30	0.390
40	-10	-40	0.596	45	-10	-50	0.621	45	5	-45	0.949
40	-5	-50	0.595	45	-10	-45	0.558	45	5	-40	0.768
40	-5	-45	0.506	45	-5	-60	1.007	45	5	-35	0.607
40	-5	-40	0.463	45	-5	-55	0.841	45	5	-30	0.471
40	-5	-35	0.459	45	-5	-50	0.693	45	10	-30	0.704
40	-5	-30	0.482	45	-5	-45	0.572				

表 B (会合数、内径)= (6、13 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
30	-5	-30	0.598	40	-5	-40	0.387	45	-5	-45	0.465
30	0	-35	0.418	40	-5	-35	0.403	45	-5	-40	0.412
30	0	-30	0.400	40	0	-55	0.739	45	0	-60	1.079
30	5	-30	0.364	40	0	-50	0.556	45	0	-55	0.886
35	-5	-40	0.466	40	0	-45	0.411	45	0	-50	0.715
35	-5	-35	0.472	40	0	-40	0.313	45	0	-45	0.562
35	-5	-30	0.495	40	0	-35	0.271	45	0	-40	0.439
35	0	-45	0.434	40	0	-30	0.277	45	0	-35	0.359
35	0	-40	0.346	40	5	-40	0.465	45	0	-30	0.334
35	0	-35	0.308	40	5	-35	0.318	45	5	-50	0.969
35	0	-30	0.311	40	5	-30	0.216	45	5	-45	0.781
35	5	-35	0.355	45	-10	-60	0.725	45	5	-40	0.612
35	5	-30	0.249	45	-10	-55	0.604	45	5	-35	0.466
40	-10	-50	0.535	45	-5	-60	0.857	45	5	-30	0.355
40	-5	-50	0.466	45	-5	-55	0.699	45	10	-35	0.714
40	-5	-45	0.405	45	-5	-50	0.563	45	10	-30	0.548

表 C (会合数、内径)= (6、14 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	-	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
20	5	-35	0.463	35	5	-35	0.195	-	45	-5	-60	0.717
20	5	-30	0.382	35	5	-30	0.133		45	-5	-55	0.571
25	0	-30	0.421	40	-5	-55	0.450		45	-5	-50	0.461
25	5	-35	0.392	40	-5	-50	0.375		45	-5	-45	0.396
25	5	-30	0.309	40	-5	-45	0.351		45	0	-65	1.113
30	-5	-35	0.519	40	-5	-40	0.360		45	0	-60	0.913
30	-5	-30	0.527	40	0	-60	0.748		45	0	-55	0.735
30	0	-40	0.354	40	0	-55	0.555		45	0	-50	0.575
30	0	-35	0.331	40	0	-50	0.398		45	0	-45	0.442
30	0	-30	0.336	40	0	-45	0.287		45	0	-40	0.352
30	5	-35	0.298	40	0	-40	0.235		45	0	-35	0.321
30	5	-30	0.221	40	0	-35	0.239		45	5	-55	0.995
35	-5	-45	0.412	40	0	-30	0.281		45	5	-50	0.802
35	-5	-40	0.414	40	5	-45	0.457		45	5	-45	0.627
35	-5	-35	0.430	40	5	-40	0.301		45	5	-40	0.474
35	0	-50	0.397	40	5	-35	0.189		45	5	-35	0.355
35	0	-45	0.297	40	5	-30	0.143		45	5	-30	0.285
35	0	-40	0.251	40	10	-35	0.437		45	10	-40	0.729
35	0	-35	0.253	40	10	-30	0.280		45	10	-35	0.558
35	0	-30	0.282	45	-10	-60	0.607		45	10	-30	0.412
35	5	-40	0.313	45	-5	-65	0.884	_	45	15	-30	0.689

表 D (会合数、内径)= (6、15 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	$\frac{1-(0\sqrt{15})}{RMSD}$	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	•	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
15	5	-30	0.339	35	0	-40	0.222	-	40	10	-30	0.161
15	10	-30	0.360	35	0	-35	0.256		45	-10	-65	0.623
20	0	-30	0.451	35	0	-30	0.306		45	-5	-65	0.744
20	5	-40	0.399	35	5	-45	0.284		45	-5	-60	0.590
20	5	-35	0.319	35	5	-40	0.159		45	-5	-55	0.470
20	5	-30	0.274	35	5	-35	0.097		45	-5	-50	0.395
25	0	-40	0.393	35	5	-30	0.126		45	0	-70	1.153
25	0	-35	0.373	35	10	-30	0.199		45	0	-65	0.945
25	0	-30	0.373	40	-5	-60	0.453		45	0	-60	0.762
25	5	-40	0.333	40	-5	-55	0.364		45	0	-55	0.596
25	5	-35	0.252	40	-5	-50	0.333		45	0	-50	0.456
25	5	-30	0.214	40	-5	-45	0.339		45	0	-45	0.358
30	-5	-40	0.473	40	0	-60	0.567		45	0	-40	0.322
30	0	-45	0.314	40	0	-55	0.400		45	5	-60	1.026
30	0	-40	0.290	40	0	-50	0.279		45	5	-55	0.827
30	0	-35	0.297	40	0	-45	0.220		45	5	-50	0.648
30	0	-30	0.321	40	0	-40	0.224		45	5	-45	0.490
30	5	-45	0.374	40	0	-35	0.271		45	5	-40	0.366
30	5	-40	0.250	40	0	-30	0.315		45	5	-35	0.292
30	5	-35	0.174	40	5	-50	0.459		45	5	-30	0.283
30	5	-30	0.157	40	5	-45	0.297		45	10	-45	0.749
35	-5	-50	0.382	40	5	-40	0.181		45	10	-40	0.573
35	-5	-45	0.381	40	5	-35	0.137		45	10	-35	0.424
35	0	-55	0.379	40	5	-30	0.167		45	10	-30	0.314
35	0	-50	0.268	40	10	-40	0.435		45	15	-35	0.703
35	0	-45	0.217	40	10	-35	0.277	_				

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
10	5	-35	0.384	30	5	-45	0.214	40	5	-45	0.184
10	5	-30	0.356	30	5	-40	0.145	40	5	-40	0.143
15	5	-40	0.351	30	5	-35	0.146	40	5	-35	0.179
15	5	-35	0.309	30	5	-30	0.188	40	5	-30	0.235
15	5	-30	0.293	30	10	-35	0.274	40	10	-45	0.437
15	10	-40	0.380	30	10	-30	0.184	40	10	-40	0.279
15	10	-35	0.289	35	-5	-55	0.369	40	10	-35	0.168
15	10	-30	0.228	35	-5	-50	0.365	40	10	-30	0.131
20	0	-35	0.423	35	0	-55	0.254	45	-10	-70	0.646
20	0	-30	0.420	35	0	-50	0.199	45	-5	-70	0.776
20	5	-45	0.355	35	0	-45	0.208	45	-5	-65	0.615
20	5	-40	0.280	35	0	-40	0.249	45	-5	-60	0.487
20	5	-35	0.244	35	0	-35	0.305	45	0	-70	0.980
20	5	-30	0.242	35	5	-55	0.433	45	0	-65	0.793
20	10	-35	0.326	35	5	-50	0.264	45	0	-60	0.623
20	10	-30	0.245	35	5	-45	0.135	45	0	-55	0.476
25	0	-45	0.367	35	5	-40	0.082	45	0	-50	0.371
25	0	-40	0.348	35	5	-35	0.131	45	0	-45	0.331
25	0	-35	0.356	35	5	-30	0.197	45	5	-65	1.060
25	0	-30	0.373	35	10	-40	0.311	45	5	-60	0.856
25	5	-50	0.412	35	10	-35	0.185	45	5	-55	0.673
25	5	-45	0.290	35	10	-30	0.114	45	5	-50	0.511
25	5	-40	0.215	40	-5	-60	0.367	45	5	-45	0.382
25	5	-35	0.190	40	-5	-55	0.328	45	5	-40	0.304
25	5	-30	0.205	40	0	-65	0.586	45	5	-35	0.295
25	10	-35	0.327	40	0	-60	0.412	45	5	-30	0.314
25	10	-30	0.234	40	0	-55	0.283	45	10	-50	0.772
30	0	-50	0.291	40	0	-50	0.218	45	10	-45	0.592
30	0	-45	0.269	40	0	-45	0.221	45	10	-40	0.439
30	0	-40	0.281	40	0	-40	0.272	45	10	-35	0.327
30	0	-35	0.316	40	5	-60	0.667	45	15	-40	0.720
30	0	-30	0.349	40	5	-55	0.467				
30	5	-50	0.338	40	5	-50	0.301				

表 F (会合数、内径)= (6、17 Å)

24 - (2	$\Delta \cup M$, 1 1 IT	_)_ (0, 1	, , ,								
α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	-	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
10	5	-40	0.374	25	10	-35	0.201	-	40	-5	-60	0.331
10	5	-35	0.356	25	10	-30	0.177		40	0	-70	0.607
10	5	-30	0.356	30	0	-55	0.280		40	0	-65	0.429
10	10	-35	0.207	30	0	-50	0.263		40	0	-60	0.297
10	10	-30	0.216	30	0	-45	0.283		40	0	-55	0.232
15	5	-45	0.330	30	0	-40	0.317		40	0	-50	0.237
15	5	-40	0.299	30	5	-55	0.301		40	0	-45	0.278
15	5	-35	0.297	30	5	-50	0.180		40	5	-65	0.677
15	5	-30	0.311	30	5	-45	0.129		40	5	-60	0.475
15	10	-50	0.430	30	5	-40	0.157		40	5	-55	0.309
15	10	-45	0.313	30	5	-35	0.213		40	5	-50	0.197
15	10	-40	0.234	30	5	-30	0.267		40	5	-45	0.166
15	10	-35	0.195	30	10	-40	0.239		40	5	-40	0.206
15	10	-30	0.191	30	10	-35	0.169		40	5	-35	0.264
20	0	-40	0.410	30	10	-30	0.163		40	5	-30	0.318
20	5	-50	0.321	35	-5	-55	0.359		40	10	-50	0.436
20	5	-45	0.255	35	0	-60	0.248		40	10	-45	0.281
20	5	-40	0.236	35	0	-55	0.196		40	10	-40	0.181
20	5	-35	0.250	35	0	-50	0.213		40	10	-35	0.162
20	5	-30	0.279	35	0	-45	0.260		40	10	-30	0.204
20	10	-45	0.369	35	0	-40	0.310		40	15	-35	0.307
20	10	-40	0.266	35	5	-60	0.413		40	15	-30	0.210
20	10	-35	0.204	35	5	-55	0.242		45	-5	-75	0.809
20	10	-30	0.185	35	5	-50	0.117		45	-5	-70	0.646
25	0	-50	0.356	35	5	-45	0.091		45	-5	-65	0.509
25	0	-45	0.342	35	5	-40	0.157		45	0	-75	1.014
25	0	-40	0.351	35	5	-35	0.226		45	0	-70	0.824
25	5	-55	0.371	35	5	-30	0.286		45	0	-65	0.653
25	5	-50	0.253	35	10	-45	0.286		45	0	-60	0.504
25	5	-45	0.191	35	10	-40	0.172		45	0	-55	0.395
25	5	-40	0.188	35	10	-35	0.129		45	0	-50	0.342
25	5	-35	0.221	35	10	-30	0.161		45	5	-70	1.091
25	5	-30	0.264	35	15	-30	0.271		45	5	-65	0.884
25	10	-40	0.275	40	-5	-65	0.381	_	45	5	-60	0.701

表 F (会合数、内径)= (6、17 Å) 続き

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α	(°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
45	5	-55	0.537	4	.5	10	-50	0.613	45	15	-40	0.558
45	5	-50	0.406	4	.5	10	-45	0.459	45	15	-35	0.414
45	5	-45	0.327	4	.5	10	-40	0.347	45	15	-30	0.319
45	5	-40	0.307	4	.5	10	-35	0.294	45	20	-30	0.531
45	5	-35	0.327	4	.5	10	-30	0.294				
45	10	-55	0.794	4	.5	15	-45	0.736				

表 G (会合数、内径)= (6、18 Å)

<u> 1X U (</u>	云口	·/ L113	E)- (0, 1	10 A)								
α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD		α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
10	5	-45	0.372	25	0	- 50	0.340		35	0	-60	0.198
10	5	- 40	0.362	25	0	-45	0.352		35	0	- 55	0.216
10	10	-55	0.338	25	5	-60	0.349		35	0	-5 0	0.265
10	10	-5 0	0.254	25	5	- 55	0.234		35	5	-65	0.408
10	10	-45	0.216	25	5	- 50	0.182		35	5	-60	0.234
10	10	- 40	0.217	25	5	-45	0.194		35	5	- 55	0.110
10	10	- 35	0.240	25	5	- 40	0.237		35	5	-5 0	0.098
10	10	-30	0.270	25	5	- 35	0.284		35	5	-45	0.171
15	5	-5 0	0.323	25	5	-30	0.327		35	5	-4 0	0.243
15	5	-45	0.300	25	10	-5 0	0.351		35	5	- 35	0.304
15	5	- 40	0.306	25	10	-45	0.242		35	10	- 50	0.272
15	5	- 35	0.327	25	10	-4 0	0.186		35	10	-45	0.166
15	5	-30	0.353	25	10	- 35	0.185		35	10	-4 0	0.140
15	10	-55	0.384	25	10	-30	0.217		35	10	- 35	0.182
15	10	-5 0	0.273	25	15	-30	0.304		35	10	-30	0.240
15	10	-45	0.206	30	0	-6 0	0.278		35	15	- 35	0.264
15	10	-4 0	0.188	30	0	- 55	0.262		35	15	-30	0.207
15	10	- 35	0.206	30	0	-5 0	0.285		40	- 5	-7 0	0.400
15	10	-30	0.238	30	0	-45	0.323		40	- 5	-65	0.339
15	15	-4 0	0.369	30	5	-65	0.452		40	0	-7 0	0.455
15	15	- 35	0.301	30	5	-6 0	0.281		40	0	-65	0.316
15	15	-30	0.260	30	5	- 55	0.162		40	0	-60	0.243
20	5	-55	0.304	30	5	-5 0	0.124		40	0	- 55	0.244
20	5	-5 0	0.246	30	5	-45	0.168		40	0	-5 0	0.285
20	5	- 45	0.239	30	5	- 40	0.230		40	5	- 70	0.696
20	5	-4 0	0.263	30	5	- 35	0.287		40	5	-65	0.492
20	5	- 35	0.298	30	5	-30	0.335		40	5	-60	0.324
20	5	-30	0.333	30	10	-5 0	0.330		40	5	- 55	0.210
20	10	-5 0	0.322	30	10	- 45	0.217		40	5	-5 0	0.179
20	10	- 45	0.229	30	10	- 40	0.165		40	5	-45	0.219
20	10	- 40	0.187	30	10	- 35	0.178		40	5	- 40	0.277
20	10	- 35	0.192	30	10	-30	0.222		40	5	- 35	0.332
20	10	-30	0.222	30	15	-30	0.266		40	10	- 55	0.443
20	15	-30	0.299	35	0	-65	0.254	_	40	10	-5 0	0.288
								-				

表 G (会合数、内径)= (6、18 Å) 続き

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°) β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
40	10	-45	0.191	45	0	-65	0.532	45	10	-45	0.364
40	10	- 40	0.177	45	0	- 60	0.416	45	10	- 40	0.307
40	10	- 35	0.221	45	0	-55	0.356	45	10	- 35	0.306
40	10	-30	0.278	45	5	— 75	1.128	45	10	-30	0.336
40	15	- 40	0.310	45	5	- 70	0.917	45	15	- 50	0.757
40	15	- 35	0.219	45	5	-65	0.732	45	15	- 45	0.576
40	15	-30	0.197	45	5	-60	0.565	45	15	- 40	0.428
40	20	-30	0.357	45	5	- 55	0.428	45	15	- 35	0.330
45	- 5	— 75	0.678	45	5	-50	0.344	45	15	-30	0.291
45	- 5	-7 0	0.535	45	5	- 45	0.319	45	20	- 35	0.541
45	0	-80	1.051	45	10	-60	0.822	45	20	-30	0.403
45	0	— 75	0.858	45	10	-55	0.638				
45	0	-7 0	0.685	45	10	-5 0	0.480				

表 H(会合数、内径)= (7、12 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
45	0	-35	0.963

表 I (会合数、内径)= (7、13 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	_	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD		α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
40	0	-30	0.674	_	45	0	-40	0.921	•	45	0	-30	0.693
45	-5	-35	0.739		45	0	-35	0.793					

表 J (会合数、内径)= (7、14 Å)

$\alpha(^\circ)$	β (°)	γ (°)	RMSD		α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
40	-5	-30	0.608	_	45	-5	-35	0.604	45	0	-30	0.547
40	0	-35	0.588		45	-5	-30	0.567	45	5	-35	0.802
40	0	-30	0.519		45	0	-45	0.906	45	5	-30	0.661
45	-10	-35	0.669		45	0	-40	0.761				
45	-5	-40	0.676	_	45	0	-35	0.639				

表 K (会合数、内径)= (7、15 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
35	0	-30	0.464	40	5	-30	0.432	45	0	-45	0.753
40	-10	-30	0.663	45	-10	-40	0.595	45	0	-40	0.615
40	-5	-35	0.518	45	-10	-35	0.577	45	0	-35	0.504
40	-5	-30	0.510	45	-5	-45	0.647	45	0	-30	0.427
40	0	-40	0.536	45	-5	-40	0.554	45	5	-40	0.797
40	0	-35	0.447	45	-5	-35	0.497	45	5	-35	0.644
40	0	-30	0.396	45	-5	-30	0.473	45	5	-30	0.512

表 L (会合数、内径)= (7、16 Å)

7 - (2	· ii /// `	1 4 1 1 1 2	, (,, =		,				_				
α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD		α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD		α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
30	5	-30	0.433		40	0	-30	0.311		45	0	-40	0.487
35	-5	-30	0.521		40	5	-35	0.392		45	0	-35	0.396
35	0	-35	0.396		40	5	-30	0.289		45	0	-30	0.342
35	0	-30	0.365		45	-10	-45	0.553		45	5	-45	0.804
35	5	-30	0.336		45	-5	-45	0.532		45	5	-40	0.643
40	-5	-40	0.463		45	-5	-40	0.459		45	5	-35	0.501
40	-5	-35	0.442		45	-5	-35	0.424		45	5	-30	0.385
40	-5	-30	0.446		45	-5	-30	0.416		45	10	-30	0.579
40	0	-40	0.404		45	0	-50	0.762					
40	0	-35	0.338	_	45	0	-45	0.612	_				
				_					_				

表 M (会合数	、内征	圣)= (7、	17	Å)							
α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD		α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
25	5	-30	0.364		40	- 5	-30	0.412	45	- 5	-35	0.384
30	0	- 30	0.378		40	0	-45	0.380	45	0	-55	0.778
30	5	- 35	0.364		40	0	- 40	0.305	45	0	-5 0	0.621
30	5	-30	0.287		40	0	- 35	0.272	45	0	-45	0.488
35	- 5	- 35	0.469		40	0	-30	0.274	45	0	- 40	0.387
35	- 5	-30	0.468		40	5	-45	0.507	45	0	- 35	0.326
35	0	-4 0	0.351		40	5	-4 0	0.363	45	0	-30	0.305
35	0	- 35	0.315		40	5	- 35	0.251	45	5	-5 0	0.816
35	0	-30	0.308		40	5	-30	0.180	45	5	-45	0.649
35	5	-4 0	0.384		40	10	-30	0.336	45	5	-4 0	0.501
35	5	- 35	0.277		45	-10	-5 0	0.535	45	5	- 35	0.379
35	5	-30	0.206		45	- 5	-5 0	0.531	45	5	-30	0.292
40	- 5	- 40	0.405		45	- 5	-45	0.446	45	10	- 35	0.578
40	- 5	-35	0.401		45	- 5	- 40	0.399	45	10	-30	0.436

表 N (会合数、内径)= (7、18 Å)

(- , -, ,, ,	• • • •									
α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
15	5	-30	0.385	35	5	-35	0.168	45	- 5	-45	0.390
20	5	-30	0.325	35	5	-30	0.144	45	0	- 55	0.643
25	0	-30	0.406	35	10	-30	0.246	45	0	-5 0	0.501
25	5	- 35	0.319	40	- 5	-45	0.387	45	0	-45	0.391
25	5	-30	0.266	40	- 5	- 40	0.378	45	0	- 40	0.323
30	- 5	-30	0.502	40	0	-50	0.377	45	0	- 35	0.298
30	0	- 35	0.347	40	0	-4 5	0.292	45	0	-30	0.304
30	0	-30	0.340	40	0	- 40	0.254	45	5	- 55	0.839
30	5	-4 0	0.323	40	0	- 35	0.255	45	5	-5 0	0.667
30	5	- 35	0.244	40	0	-30	0.279	45	5	-45	0.514
30	5	- 30	0.202	40	5	- 50	0.505	45	5	- 40	0.386
35	- 5	-4 0	0.441	40	5	- 45	0.353	45	5	- 35	0.294
35	- 5	- 35	0.435	40	5	- 40	0.235	45	5	-30	0.247
35	0	-45	0.330	40	5	- 35	0.160	45	10	- 40	0.588
35	0	- 40	0.289	40	5	-30	0.143	45	10	- 35	0.442
35	0	- 35	0.281	40	10	- 35	0.319	45	10	-30	0.324
35	0	- 30	0.295	40	10	-30	0.201	45	15	- 30	0.557
35	5	-45	0.355	45	- 5	- 55	0.543				
35	5	- 40	0.242	45	- 5	- 50	0.446				

表 O (会合数、内径)= (8、16 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
45	0	-30	0.744

表 P (会合数、内径)= (8、17 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
45	- 5	-30	0.608	45	0	-30	0.598

表 Q (会合数、内径)= (8、18 Å)

α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α	(°)	β (°)	γ (°)	RMSD	α (°)	β (°)	γ (°)	RMSD
40	0	-30	0.460	4	15	0	- 35	0.564	45	5	-30	0.562
45	-10	- 30	0.607	4	15	0	-30	0.478				
45	- 5	- 30	0.512	4	15	5	- 35	0.689				

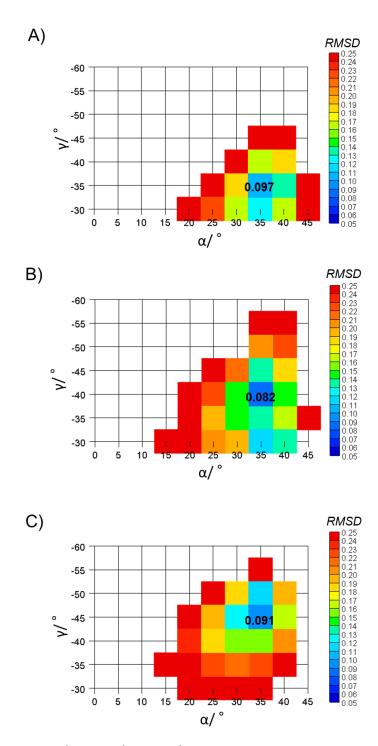


図 4-14 内径が A) 15 Å, B) 16 Å, C) 17 Å の時の α と γ に対する *RMSD* のプロット。 各交点に対応する (α, γ) をもつ(分子数, $\alpha, \beta, \gamma)$ の組み合わせのうち、最も *RMSD* が小さくなる組み合わせの値を示した。最小の *RMSD* を与える組み合わせについてはその値を交点に示した。プロットがない (α, γ) の交点は、4-4-b で候補から除かれたため計算を行っていない。

AmB のチャネル複合体構造は(分子数,内径, α , β , γ)=(6,16,35,5,-40)の時に *RMSD* が最少になり、すべての標識炭素のシグナル減衰率は理論値と非常に良い一致を示した(図 4-15)。この時の標識原子間の距離と 19 F- 13 C- 19 F のなす角度は表 4-5 にまとめた。

表 4-5 推定したチャネル構造における標識原子間距離。

C40/1	F32	C26/I	F32	C41/F14			
<i>r</i> ₁ (Å)	12.3	r_1 (Å)	8.9	<i>r</i> ₁ (Å)	11.7		
r_2 (Å)	9.6	r_2 (Å)	14.8	r_2 (Å)	13.8		
heta (°)	93.2	heta (°)	80.7	heta (°)	81.8		

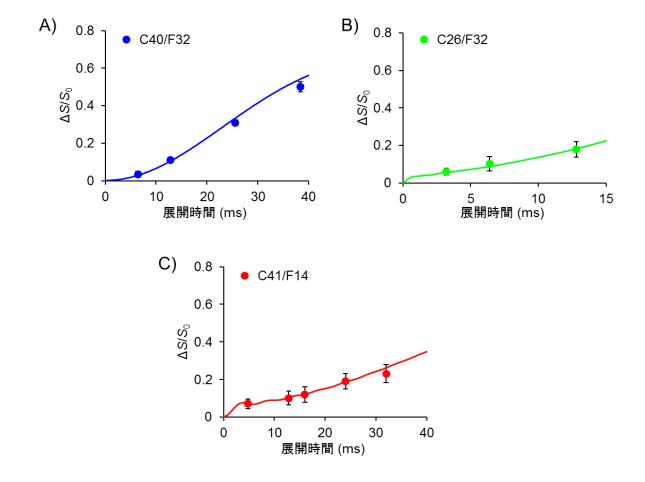


図 4-15 最も RMSD が小さくなったチャネル複合体のフィッティング結果。図中のプロットは C40/F32(青)、C26/F32(緑)、C41/F14(赤)の組み合わせで測定した REDOR 減衰の実測値を表している。それぞれの実線は(分子数,内径, α , β , γ)=(6,16,35,5,-40) とした時の r_1 、 r_2 、 θ を基に作成した理論曲線を表している。プロットの誤差範囲は S_0 および ΔS スペクトルの S/N 比から算出した。

また、チャネル構造を推定する際には、図 4-12 で示した AmB-Erg の分子間距離が $r_{1(AmB-Erg)} \le r_{2(AmB-Erg)}$ となるチャネル複合体を探索した。しかし、 $r_{1(AmB-Erg)} \ge r_{2(AmB-Erg)}$ が 近い場合、大きい方の距離も Erg の標識炭素のシグナル減衰に影響を与える可能性が ある。そこで、最も小さい RMSD を与えるチャネル構造中の距離 $r_{2(AmB-Erg)}$ 、 $r_{2(AmB-Erg)}$ および角度に基づき 3 スピン系での理論曲線を作成し、REDOR 測定の実測値と比較 した(図 4-16)。その結果、いずれの標識体の組み合わせで行った測定においても実測 値は理論曲線とよく一致し、推定した AmB のチャネル構造が AmB-Erg 間の REDOR 測定の結果と矛盾しないことが示された。

以上の結果から AmB のチャネル構造を推定した。図 4-17 には、推定したチャネルモデルの 3 次元構造を示した。

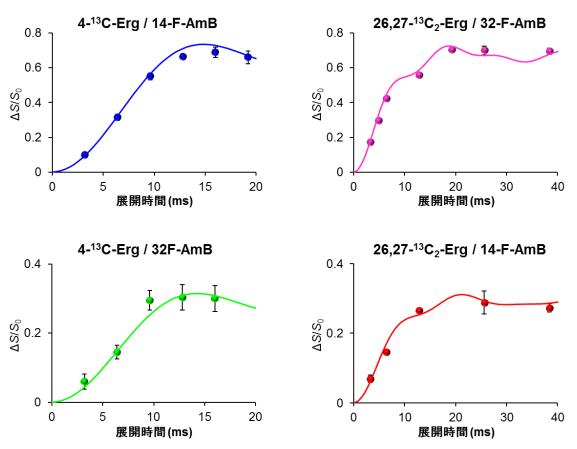


図 4-16 F-AmB と 13 C-Erg を用いた 13 C{ 19 F}REDOR 測定の実測値および推定した AmB-Erg 複合体構造中の標識原子間距離および角度に基づく 3 スピン系理論曲線。 平行型および反平行型の相互作用を観測した測定にはそれぞれ 70%、30%で頭打ちする理論曲線を示した。また、26,27- 13 C-Erg を用いた測定の理論曲線は、F/C26 および F/C27 に対応する理論曲線を 1:1 で混合した曲線とした。

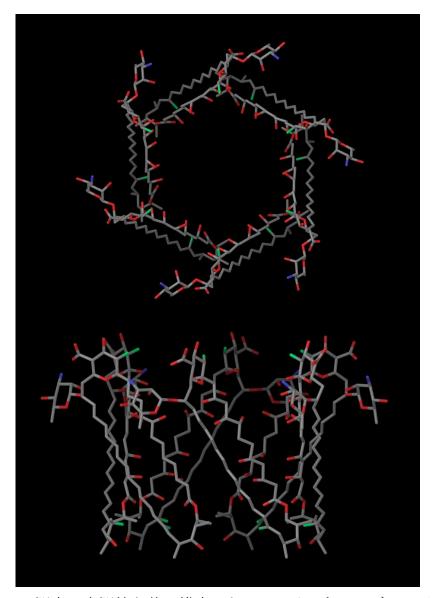


図 4-17 REDOR 測定の実測値を基に推定した AmB チャネルモデルの三次元構造の上面図と側面図。灰色:炭素、赤:酸素、青:窒素、緑:フッ素。水素は見やすさを考慮し省略した。

4-5-d 推定チャネル構造の考察

推定されたチャネル構造中では AmB 分子が膜法線に対して大きく傾いていることが分かる。この結果は、当研究室で過去に行われた重水素固体 NMR の結果とよく一致する 11 。モデリングにより推定された AmB が膜法線に対して 35 °程度傾いているという場合、AmB の疎水性部の長さが 22 Å 程度であることを考慮すると、膜法線方

向の疎水部の厚さは 18 Å 程度になる。一方で POPC 膜の疎水性部の長さは 30 Å 程度であるため 14 、AmB の疎水性部分の高さは二重膜疎水性部分の厚みに対してかなり短くなる。従って、AmB 複合体周辺の POPC がインターディジット構造をとることで、膜の厚みを調節し AmB 複合体が単分子長で膜を貫通できるようなっていると考えられる。また、過去にも AmB を加えると脂質二重膜の厚みが低下すると報告されており本結果と矛盾しない 15 。

また、推定したチャネル構造の内径は 16 Å であった。本項のチャネル構造の探索 では、チャネル内径を空孔中心から AmB の 8 位酸素原子中心までの距離の二倍と定 義した。しかし、実際のチャネル内径は空孔内部の最も狭い部分であると考えるべき であるが 16、推定した構造において 8 位の酸素が空孔中心から最も近いとは限らない。 そこで、空孔中心から最も近い原子を調べたところ3位の酸素原子が最も近く、実際 のチャネル内径は 14.8 Å であることが分かった。4-5-a でも述べたように、過去に行 われた浸透圧保護下のイオン透過活性試験の結果から、AmB のチャネルは直径が 7.0 Å の水和イオンを透過させる一方で、7.4 Å の水和直径を持つイオンは通過させない ことが明らかになっている ¹⁷。水和イオンの最外殻にある水分子がチャネル空孔内部 のヒドロキシ基と水素結合距離で最近接すると考えれば、チャネルの内径は12.4-12.8 Å であると予想される(O-H…O 水素結合中の酸素原子間の距離を 2.7 Å とした 13)。 しかし、イオン透過活性試験で観測される AmB のチャネル構造は刻々と変化してい る動的なものであり、チャネル内部は完全な円状ではないと推測される。その場合、 チャネル空孔の最小径が 12.4-12.8 Å となり、直径の平均が更に大きくなることが想 定される。従って、本研究の NMR 測定により推定した平均構造の内径がイオン透過 活性試験から推定されるチャネル内径より若干大きくなることは妥当である。

また、最小の RMSD を与えるチャネル構造からチャネル内径が ± 1.0 Å 変化した際の RMSD は全体の最小値とそれほど大きな差がない (図 4-14)。また、内径の変化に合わせて角度 γ が 5 °変化することで、チャネル内径の変化に伴う実測値とのずれを補正していることが分かる。そのため、本モデリングで推定されたチャネル内径および角度 γ に関しては、他のパラメータに比べやや大きな誤差を含んでいることが想定される。

またモデリングの結果、実験値を満たし得るチャネル(*RMSD* が小さくなるチャネル構造)の大部分は 6 分子であった。これは上述したように、分子数が 7 以上になると、AmB 同士の分子間距離が小さくなるため実測値を満たせなくなるためである。また、この会合数は過去に行われた単一チャネル電流測定の結果から推測された値と

も一致しており ⁴、妥当な数であると言える。また、上述したように浸透圧保護下の イオン透過活性試験の結果からは、明確なチャネル内径が示されているため、異なる 会合数から成るチャネル構造が複数種類存在するとは考えづらい。そのため、脂質二 重膜で形成される複合体の大部分は AmB を 6 分子含むと考えられる。

4-6 AmB-エルゴステロール複合体の全体構造

以上の実験から求めた AmB-Erg および AmB-AmB の二分子間の相対位置関係を基に複合体の全体像を考察した。図 4-18 には推定した AmB のチャネル構造に第 3 章で求めた位置関係で Erg を埋め込んだ三次元構造を示した。チャネル複合体中に含まれる 6 分子の Erg のうち、2 分子は反平行型の位置関係で挿入した構造を例として挙げた。

推定構造を見ると Erg が AmB 二分子の間の隙間を埋めるように位置していることが分かる。これは、AmB 間に Erg が挿入され AmB 同士の相互作用が弱められることで、安定なチャネル様会合体が形成されるという過去の報告とよく一致する ^{1,18}。また、Erg を挿入しても AmB のヘプタエン平面周辺には隙間が残る。修士論文研究において明らかになった POPC が AmB 複合体に構造化しているということを考慮すると ¹⁹、POPC のアシル鎖がその隙間を埋めるように充填され、複合体が安定化されていると推測される。また、反平行型で AmB と相互作用している Erg のヘッドグループ付近には水素結合を形成し得る AmB の官能基が存在しないため、Erg はその構造化した POPC のヘッドグループと水素結合を形成していると推測される。このようにPOPC はアシル鎖とヘッドグループの両方で複合体との相互作用を獲得し、AmBーErgーPOPC の三者会合状態が安定化されていると思われる。

一方、平行型で AmB のマクロライドと相互作用している Erg のヘッドグループは 隣接するもう一方の AmB のマイコサミンと近づいていることが分かる。そのため、 Erg の 3 位ヒドロキシ基は構造化した POPC 以外に、AmB のマイコサミン部分と水素 結合を形成していている可能性がある。しかし、マイコサミンと最も近づいているのは Erg の 19 位の角間メチル基であり、従来 AmBーErg 相互作用に重要視されている Erg3 位とマイコサミン 2'位ヒドロキシ基間の水素結合は観測されなかった。ただし、本項で行ったチャネル構造の探索には AmB の X 線結晶構造を用いたため、マイコサミン部のマクロライドに対する配向は、実際にチャネルを形成している際のものとは 異なる可能性がある。その配向によっては、マイコサミンのヒドロキシ基が Erg のヒ

ドロキシ基と近づき、水結合を形成し得る。従って、AmB と Erg 間に形成される水素 結合をより詳細に調べるためには、マクロライドに対するマイコサミンの配向の取得 が望まれる。

さらに、本研究により推定された、AmB が大きく傾いた状態で複合体構造を形成 しているという点は興味深い。POPC が形成する脂質二重膜と AmB の疎水性領域の 厚さはそれぞれ30Å、22Å程度であるため、疎水性マッチングの観点から考えると AmB は膜に垂直に挿入されている方が安定であると予想される。このような一見不 利に思われる傾斜構造を可能とするのも、上述した AmB-Erg-POPC の密な三者会合 状態であると考えることができる。チャネルに構造化している POPC はアシル鎖が複 合体の隙間に入り込むように相互作用しているため、それらの POPC には二重膜性が 失われている。また、その周囲にも何層かに渡りチャネル複合体と相互作用する POPC が存在しており、それらは AmB 会合体から離れるにつれバルクのリン脂質に近づき、 やがては二重膜性を取り戻す。このように AmB 複合体の周囲のリン脂質は膜の厚み を調整していると考えることができる。一方、ステロール非含有膜や AmB との親和 性が小さいステロール含有膜では、安定な三者会合体が形成されず、脂質分子だけが AmB と弱いながら相互作用することになる。そのため、疎水性マッチングの不利を 克服できるほどの安定化効果がなく、AmB 分子はその不利を解消するため膜法線に 対して平行に近づいていく。その結果、AmB 同士のポリオール部分の高さが一致す るようになり、複数の水素結合により安定化された、コンダクタンスの乏しい凝集体 が形成されると考えられる。これらのステロール有無もしくは種類により形成される 複合体構造の違いは第二章のイオン透過活性試験や UV 測定でも観測されており、本 考察を支持する。このように、ステロールと AmB の親和性の差がチャネル構造およ びイオン透過活性に寄与しているのではないかと考えられる。

以上述べてきた AmB 会合体(図 4-17)および AmB-Erg 複合体(図 4-18 に一例として)の構造は、いくつかの前提のもとに実験結果を客観的に解釈して推定してものである。したがって、前提条件が変更されれば構造も変化しうることを付記しておく。特に、推定構造にある程度の影響を与えうる条件としては、チャネルの孔径、F標識AmB と AmB の混和の均一性、会合状態の均一性が挙げられる。また、NMR 条件において形成される AmB-Erg 会合体と薬理活性を担うチャネル会合体の類似性も議論する必要がある。今後、これらの前提条件の妥当性を検証して行くことによって、本研究で得られた実験結果をもとにチャネル構造の精度をさらに上げることが望まれる。

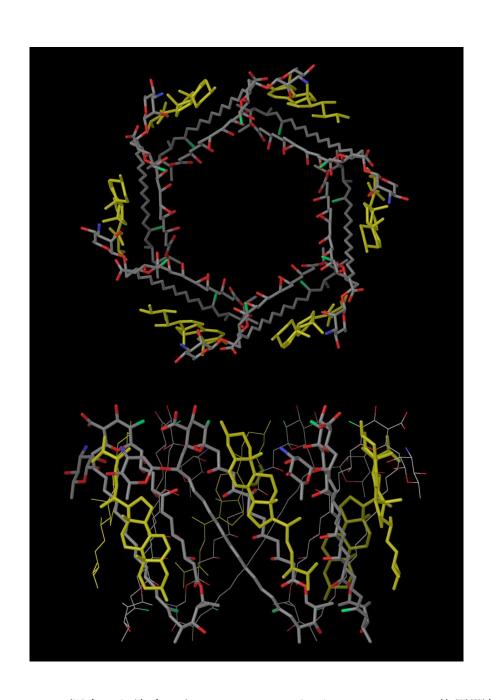


図 4-18 REDOR 測定から決定した AmB-Erg および AmB-AmB の位置関係に基づき作成した AmB-Erg 複合体構造の上面図と側面図。灰色:炭素、赤:酸素、青:窒素、緑:フッ素。水素は見やすさを考慮し省略した。Erg 分子は黄色で表した。

実験項

試薬

Erg は東京化成から、POPC は日本油脂から購入したものを用いた。14-F-AmB は AmB より過去の報告例に従い合成した 20 。サンプル調製における溶媒はナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を用いた。また、水には MilliQ 水(Millipore 社) を用いた。また、サンプル調製の際 AmB は DMSO のストックソリューションとし UV スペクトルにより濃度決定を行い使用した($\epsilon_{415}=1.28\times10^5 \mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}$)。

使用機器

ボルテクスミキサーは laboratory & Medical supplies 社の MIXER UZUSIO VTX-3000L を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。固体 NMR は CMX-300 (Chemagnetics/ Varian, 300 MHz for ¹H NMR)もしくは AVANCE400 (Bruker, 400 MHz for ¹H NMR)を用いた。

¹³C{¹⁹F}REDOR 測定

32-F-AmB (1.44 μ mol)、26,40-¹³C₂-AmB (1.44 μ mol)、Erg (2.88 μ mol) および POPC (25.9 μ mol)をクロロホルムとメタノールの混合溶媒に完全に溶解した後、エバポレーターで溶媒を除去した。(その他の標識体の組み合わせで測定した際のサンプルは、同様の方法で異なる標識体を用いて行った。)真空下で脂質フィルムを終夜乾燥させた後、10 mM HEPES バッファー(19.9 μ L)および MilliQ (500 μ L)を加え、ボルテックスとソニケーションにより水和させた。得られた懸濁液に対し凍結融解を5回繰り返すことで MLV とした後、凍結乾燥した。得られた粉末を50 wt%となるように重水を加え、ボルテックスと凍結融解を繰り返すことで均一に水和された MLV サンプルを得た。そのサンプルをガラスチューブに封入し、エポキシ樹脂で密閉した。そのガラスインサートを ρ 5 mm の MAS ローターに挿入し測定を行った。

測定には CMX-300 (Chemagnetics/ Varian, 300 MHz for ¹H NMR)を用い、5 mm の 3 チャンネル MAS プローブ(Varian)を使用した。測定時には温度コントローラーと MAS 速度コントローラーを用いて、温度と MAS 速度を一定に保った。MAS 速度は 5000±2

kH で測定した。サンプルに吹き付けるエアーの温度は 30 $^{\circ}$ で保った。ただし、エアーの温度を 30 $^{\circ}$ に設定した場合、デカップリング等による発熱のため実際のサンプル温度は 38 $^{\circ}$ となる 19 。またプロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンス 21 を用いた。

REDOR 減衰理論曲線の作成

2 スピン系での理論曲線は Bessel 級数による近似式を用いて Microsoft Excell により k=6 まで計算することで作成した。

3 スピン系の理論曲線の作成には INPUT ファイルに分子間距離から計算した双極 子相互作用の大きさおよび ^{19}F - ^{13}C - ^{19}F のなす角を記述して SINPSON により計算する ことで作成した。

¹⁹F-CODEX

 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR 測定と同様の方法で 14-F-AmB/Erg/POPC=1/1/9 から成る水和膜サンプルを調製し、テフロンインサートに密封した。そのインサートを φ 4 mm の MAS ローターに挿入し測定を行った。測定には AVANCE400 (Bruker, 400 MHz for 1 H NMR) を用い、3 チャンネル MAS プローブ(4 mm Bruker H/X/Y CPMAS solid Probe)を使用した。測定時には温度コントローラーと MAS 速度コントローラーを用いて、温度と MAS 速度を一定に保った。 MAS 速度は 7000±1 kH で測定した。またプロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンス 21 を用いた。

チャネル構造の探索

チャネル構造の作成および各チャネル構造における分子間距離と 19 F- 13 C- 19 Fのなす角度の計算は、Microsoft Excel 上で行った。

まず、第二章で計算した図 3-15A, D のうち、最もエネルギーの低かった AmBーErg の平行型、反平行型相互作用を三次元座標で表した(平行型と反平行型で AmB の座標は完全に一致させた)。その後、AmB の 8 位の酸素が原点、14 位のフッ素が (0,0,7.8)、 C41 (4.4,0,10.0)となるように平行移動および回転移動させた。この状態の AmB の配向を (α,β,γ) =(0,0,0)とし、任意の角度で x 軸 $\to y$ 軸 $\to z$ 軸の順に軸対象回転させた。

なお、x 軸周りの回転を α 、y 軸周りを β 、z 軸周りの回転を γ とした。その後、8 位の酸素が(R,0,0)となるように x 軸方向に平行移動した(R×2 はチャネル内径に対応する)。その後、z 軸周りに(360/N)°、(360/N)×2°、(360/N)×3°…(360/N)×N° 軸対象回転させた位置に AmB を複製し、内径 R、分子数 N のチャネルモデルを作成した。作成したチャネルの座標から分子間距離および角度を算出した。

参考文献

- (1) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.
- (2) 梅川 雄一 平成 20 年度 大阪大学大学院理学研究科博士論文
- (3) Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Kernen, P. *FEBS Lett.* **2002**, *524*, 92–96.
- (4) Hirano, M.; Takeuchi, Y.; Matsumori, N.; Murata, M.; Ide, T. *J. Membr. Biol.* **2011**, *240*, 159–164.
- (5) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, 44, 704–710.
- (6) Volmer, A. a; Carreira, E. M. *Chembiochem* **2010**, *11*, 778–781.
- (7) Wasko, P.; Luchowski, R. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 1511–1520.
- (8) Buffy, J. J.; Waring, A. J.; Hong, M. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 4477–4483.
- (9) Matsumori, N.; Tahara, K.; Yamamoto, H.; Morooka, A.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11855–11860.
- (10) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner, C. P. J. Am. Chem. Soc. 1971, 93, 4560–4564.
- (11) 山上 正輝 平成 24 年度 大阪大学大学院理学研究科修士論文
- (12) Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296–330.
- (13) Wallwork, S. C. Acta Crystallographica **1962**, 15, 758–759.
- (14) Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 2761–2771.
- (15) Nguyen, T.-S.; Weers, P. M. M.; Raussens, V.; Wang, Z.; Ren, G.; Sulchek, T.; Hoeprich, P. D.; Ryan, R. O. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 303–312.
- (16) Wang, Y.; Liu, Y.; Deberg, H. a; Nomura, T.; Hoffman, M. T.; Rohde, P. R.; Schulten, K.; Martinac, B.; Selvin, P. R. *eLife* **2014**, *3*, e01834.
- (17) Katsu, T.; Okada, S.; Imamura, T.; Komagoe, K.; Masuda, K.; Inoue, T.; Nakao, S. *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 1551–1556.
- (18) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. Biochim. Biophys. Acta 2002, 1567,

- 63 78.
- (19) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 83–89.
- (20) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565–3567.
- (21) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958.

第五章 結論

本研究では固体 NMR を中心とした種々の手法で脂質膜に形成される AmB-Erg 会合体の構造解析を行った。

まず、AmBのステロール認識機構および AmBーErg の相互作用様式を明らかにすべく、ステロール誘導体含有膜を用いたイオン透過活性試験、SPR、UV 測定、固体 NMR 測定を行った。その結果、ステロールの側鎖構造および炭素環構造の両方が AmB との親和性に重要であり、それらはそれぞれ独立に AmB との親和性に寄与していることが分かった。

Erg の側鎖に存在する 24 位のメチル基は側鎖の疎水性面積を増加させ、22 位の二重結合は側鎖をまっすぐな配座で固定することで、ステロール側鎖と AmB のマクロライド間の VDW 相互作用を最大化していることが明らかとなった。また、炭素環構造に関しては、ステロイド炭素環の α 面に突出した A 環や 7 位のアキシアル水素が AmB との親和性を大きく低下させることが分かった。このことから Erg の平らな炭素環の α 面が同様に平らな AmB のマクロライドと密に接するような形で相互作用しているということが示された。

以上の結果を踏まえた考察の結果、Erg はフラットなα面とまっすぐな側鎖全体で AmB のマクロライドと密にパッキングすることで高い親和性を獲得していることが 推察された。

次に、固体 NMR 測定による分子間距離測定に向けた位置特異的な AmB 標識体の合成を行った。その結果、天然の AmB の分解と化学合成を組み合わせた効率的な半合成より 32-F-AmB および 26,40- 13 C₂-AmB の合成に成功した。なお、本合成では AmB のカルボン酸の保護基として SEM エステルを用いることで選択的な脱保護を可能とし、疎水性領域に標識を導入した AmB を初めてミリグラムスケールで合成することに成功した。

次に、位置選択的フッ素標識 AmB および炭素 13 標識 Erg を用いた 13 C $\{^{19}$ F $\}$ REDOR を行うことで、AmB と Erg が平行型と反平行型の両方の向きで相互作用しているということを確認した。また、その存在比が 7:3 であるということを明らかにした。さらに、両相互作用において、3 か所の AmB-Erg 分子間距離を見積もることに成功した。

更に、得られた距離情報を制限情報とし、AmB-Erg 二分子間のジオメトリーを分子力学計算により解析した。その結果、Erg は AmB のマイコサミンがある面とは逆

のマクロライド疎水性側面と相互作用していることが示唆された。また、AmB とステロール誘導体の親和性評価の結果と合わせて考察することで、AmB とステロールの二分子間相互作用を推定した。

次に、F-AmB および 13 C-AmB を用いた 13 C $\{^{19}F\}$ REDOR を行うことで AmB 二分子間の位置関係を考察した。その結果、チャネル会合体中において AmB は大部分が同じ方向を向いた平行型で並んでいることが明らかになった。さらに、REODR 測定の実測値を最も満たすチャネル構造を探索することで AmB 二分子の相対位置を推定することができた。

そして、決定した AmB-Erg および AmB-AmB 二分子間の位置関係に基づきチャネル複合体の全体構造を推定することに成功した。その結果から、AmB は膜法に対して 35 °程度傾いた状態でチャネルを形成しており、Erg は AmB 二分子間の隙間を埋めるように挿入されていることが推測された。

以上のように本研究では、固体 NMR から得られた分子間距離情報に基づき、初めて AmB 複合体の全体構造を実験的に推定することに成功した。現在は AmB 複合体という限られた系での構造解析に過ぎないが、本研究で行った有機合成化学と種々の分光学的手法を組み合わせた一連の方法論は生体膜環境下での精密な分子間相互作用解析における端緒となることが期待される。

合成の部

一般事項

試薬

試薬は特に記載のない限り市販のものをそのまま用いた。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)は Merck 社の Kieselgel 60 F254 を用いた。また、カラムクロマトグラフィーには Merck 社の silica gel 60 (particle size 0.063-0.200 μ m, 60-230 mesh)、関東化学の Silica gel 60N (球状、中性、100-210 μ m)もしくは、和光純薬工業の Florisil® (75~150 μ m) を用いた。

反応は記載のない限りアルゴン雰囲気化で行い、エルゴステロール誘導体および、標識化 AmB 合成の際のポリエン化合物に関しては遮光条件下で取り扱った。

使用機器

NMR スペクトルは、JEOL 社製 ECA-500 (1 H NMR: 500 MHz, 13 C{ 1 H} NMR: 125.7 Hz)、ECS400 (1 H NMR: 400 MHz, 13 C{ 1 H} NMR: 100.5 Hz)もしくは Agilent 社の VNMR System(1 H NMR: 600 MHz, 13 C{ 1 H} NMR: 150 Hz)を用いて測定した。NMR 測定溶媒としては CDCl₃、 d_4 -MeOH、 d_6 -DMSO を用いた。質量分析には、サーモクェスト社製LTQ-Orbitrap XL を用いた。HPLC は、島津製作所製の SCL-10Avp, SPD-M10Avp, LC-20Avp, DGU-14A からなる装置を使用し、カラムは、ナカライテスク製の COSMOSIL 5 C₁₈-MS-II 10×250 mm もしくは COSMOSIL 5 C₁₈-AR-II 20×250 mm を使用した。

¹H NMR の化学シフトは、溶媒のシグナルを内部基準 (CDCl₃: δ 7.26、 d_4 -MeOH: 3.30、 d_6 -DMSO: 2.49)としたときの値 (δ ppm)で示した。 ¹³C NMR の化学シフトは、溶媒のシグナルを内部基準 (CDCl₃: δ 77.0、 d_4 -MeOH: 49.0、 d_6 -DMSO: 39.5 ppm)としたときの値(ppm)で示した。

ステロール誘導体の合成

Conversion of 14 to 15. エルゴステロール保護体 **14** (285 mg, 0.42 mmol)を酢酸エチル(8 ml)に溶かし Pd-C (220 mg)を加えて、水素雰囲気下、室温で 5 時間撹拌した。反応溶液をセライトで濾過した後、ろ液の溶媒を留去し **15** を副生生物との混合物として得た。この段階では精製せずに次の反応に用いた。

Conversion of 15 to 2. 15 と副生成物の混合物を THF(6 ml)に溶かし、水素化リチウムアルミニウム(164 mg, 4.3 mmol)を加えた。還流条件下 2 時間撹拌した後、酒石酸カリウムナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣を THF(10 ml)に溶かし、テトラブチルアンモニウムフロライド(1.0 M, 4.3 ml) を加えて終夜室温で撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0:1-1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、エルゴステロールとの混合物として 22-ジヒドロエルゴステロール(70.6 mg)を得た。最後にHPLC 精製(AR-II $5C_{18}$ 20×250 mm, isocratic MeOH)を行い白色結晶として 22-ジヒドロエルゴステロール 2 (17 mg, 10% for 3 steps)を得た。

 $R_f = 0.45$ (2/1-hexane/AcOEt); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.57 (1H, dd, J=5.7, 2.4 Hz, H6), 5.38 (1H, dt, J=5.6, 2.7 Hz, H7), 3.64 (1H, m, H3) 2.47 (ddd, 1H, J= 2.2, 4.6, 14.3 Hz, H4e), 2.28 (d,1H, J= 14.3 Hz, H4a), 2.09 (1H, m), 2.00-1.86 (5H, m), 1.76-1.64 (2H, m), 1.62-1.17 (15H, m), 0.94 (3H, d, J=6.4 Hz, H21), 0.94 (3H, s, H19), 0.96 (3H, d, J=6.7 Hz, H28), 0.79 (3H, d, J=6.9 Hz, 26or27), 0.78 (3H, d, J=6.9 Hz, H26or27), 0.62 (3H, s, H18); ¹³C NMR

(100 MHz, CDCl₃) δ 141.46, 139.74, 119.59, 116.24, 70.46, 55.72, 54.47, 46.22, 42.90, 40.76, 39.16, 19.04, 38.36, 36.99, 36.53, 33.64, 31.96, 31.44, 30.62, 28.04, 23.02, 21.10, 20.51, 19.00, 17.57, 16.27, 15.42, 11.80

Conversion of 14 to 16. 5-イソペンチルスルホニル-1-フェニル-1H-テトラゾール(135 mg, 478 μ mol)を THF(1.5 ml)に溶かし、-78 °C に冷却した。KHMDS (0.5 M, 1.05 ml)を 滴下し、1 時間撹拌した。そこに THF (2 ml)に溶かしたアルデヒド 14 を滴下して、-78 °C で 1 時間撹拌後、室温で終夜撹拌した。塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン、 $0/1 \rightarrow 1/30$)で精製し、16E と 16Z (136 mg, E/Z=6/1, 44%)を黄色固体として得た。

Conversion of 16 to 3. TBS エーテル 16E と 16Z を THF (2.0 ml) に溶かし、LiAlH4 (78 mg, 2.1 mmol) を室温でゆっくりと加えた。リフラックス条件下 2 時間撹拌した後、酒石酸カリウムナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣を THF (10 ml)に溶かし、テトラブチルアンモニウムフロライド(1.0 M, 2.1 ml)を加えて室温で終夜撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン、 $1/0 \rightarrow 5/1$)で精製し、白色結晶(67.8 mg, E/Z=6/1)を得た。さらに、HPLC で精製することで 24-デメ

チルエルゴステロール **3** (69% for 2 steps)を得た(AR-II $5C_{18}$ 20×250 mm, isocratic MeOH)。

 $R_f = 0.45$ (2/1-hexane/AcOEt); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.57 (1H, dd, J=5.6, 2.4 Hz, H6), 5.38 (1H, dt, J=5.6, 2.7 Hz, H7), 5.30 (1H, dt, J=15.2, 6.9 Hz, H22), 5.22 (1H, J=15.2, 8.3 Hz, H23), 3.64 (1H, m, H3) 2.43 (1H, ddd, J = 2.2, 4.7, 14.4 Hz, H4e), 2.25 (1H, t, J= 14.3 Hz, H4a), 2.01-2.09 (2H, m), 1.94-2.00 (2H, m), 1.45-1.93 (14H, m), 1.21-1.44 (5H, m), 1.03 (3H, d, J=6.6 Hz, H21), 0.95 (3H, s, H19), 0.87 (3H, d, J=6.6 Hz, 26or27), 0.86 (3H, d, J=6.6 Hz, H26or, 27), 0.63 (3H, s, H18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 141.30, 139.76, 137.81, 126.46, 119.56, 116.26, 70.42, 55.60, 54.53, 46.20, 42.79, 41.93, 40.69, 40.38, 39.05, 38.34, 36.99, 31.88, 28.52, 28.38, 22.98, 22.30, 22.24, 21.07, 20.96, 16.25, 11.98,

Conversion of 14 to 17. アルデヒド 14 (1.1 g, 1.78 mmol)を THF (18 ml)に溶かし、水素化リチウムアルミニウム(676 mg, 17.8 mmol)を加えて還流条件下 2 時間撹拌した。 1 N 水酸化ナトリウム(3 ml)とイオン交換水(1 ml)を加えて反応を停止し、セライトで濾過した。ろ液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:30-1:15 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、白色結晶としてアルコール 17 (445 mg, 56%)を得た。

 $R_f = 0.42(5/1-\text{hexane/AcOEt}); ^1\text{H NMR } (500 \text{ MHz, CDCl}_3) \delta 5.55 (1\text{H, dd, } J=5.6, 2.4, \text{H6}),$ 5.39 (1H, dt, J=5.6, 2.7, H7), 3.66 (1H, m, H22), 3.59 (1H, m, H3), 3.40 (1H, m, H22), 2.30-2.35 (2H, m), 2.08 (1H, ddd, J=12.7, 4.3, 2.7 Hz), 1.97 (1H, m), 1.83-1.94 (3H, m), 1.66-1.80 (3H, m), 1.51-1.63 (m), 1.18-1.46 (6H, m), 1.08 (3H, d, J=6.6, H21), 0.94 (3H, s, H19), 0.89 (9H, s, -TBS), 0.64 (3H, s, H18), 0.06 (6H, s, -TBS)

Conversion of 17 to 18. アルコール **17** (445 mg, 1.0 mmol)をジクロロメタン (10 ml) に溶かし、トリエチルアミン (0.56 ml, 4.0 mmol)とジメチルスルホキシド (0.58 ml, 8.0 mmol) を加えて氷冷した。そこに、三酸化硫黄ピリジン錯体 (478 mg, 3.0 mmol)を加

えて、室温で 2 時間撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0:1-1:20 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、白色結晶としてアルデヒド **18**(410 mg, 93%)を得た。 R_f = 0.85 (5/1-hexane/AcOEt); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.60 (1H, d, J= 3.2 Hz, H21), 5.55 (1H, brd, J=5.2, H6), 5.40 (1H, dt, J=5.6, 2.7 Hz, H7), 3.59 (1H, m, H3), 2.29-2.41 (3H, m), 1.89-2.08 (5H, m), 1.58-1.80 (5H, m), 1.39-1.56 (3H, m), 1.22-1.36 (2H, m), 1.15 (3H, d, J=6.9 Hz, H21), 0.94 (3H, s, H19), 0.89 (9H, s, -TBS), 0.66 (3H, s, H18), 0.07 (6H, s, -TBS)

Conversion of 18 to 19. t-BuOK (115 mg, 1.0 mmol)を THF(3.0 ml)に懸濁させ、そこに ジメチル-3-メチル-2-オキソブチルホスホネート(214 mg, 1.1 mmol)の THF(3 ml)溶液を 滴下し、30 分撹拌した。その後、アルデヒド 18 の THF 溶液(4 ml)を滴下し、還流条件下終夜撹拌した。イオン交換水を加えて反応を停止し、エーテルで抽出し、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0:1-1:30 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、エノン 19(171 mg, 96%)を白色結晶として得た。

 $R_f = 0.53 \, (10/1-\text{hexane/AcOEt}); \, ^1\text{H NMR} \, (500 \, \text{MHz}, \, \text{CDCI}_3) \, \delta \, 6.73 \, (1\text{H}, \, \text{dd}, \, \textit{J} = 15.7, \, 8.9 \, \text{Hz}, \, \text{H22}), \, 6.08 \, (1\text{H}, \, \text{d}, \, \textit{J} = 15.7 \, \text{Hz}, \, \text{H23}), \, 5.54 \, (1\text{H}, \, \text{brd}, \, \textit{J} = 5.3 \, \text{Hz}, \, \text{H6}), \, 5.38 \, (1\text{H}, \, \text{dt}, \, \textit{J} = 5.6, \, 2.7 \, \text{Hz}, \, \text{H7}), \, 3.59 \, (1\text{H}, \, \text{m}, \, \text{H3}), \, 2.82 \, (1\text{H}, \, \text{hep.}, \, \textit{J} = 6.9 \, \text{Hz}), \, 2.23-2.37 \, (3\text{H}, \, \text{m}), \, 1.82-2.09 \, (4\text{H}, \, \text{m}), \, 1.47-1.80 \, (6\text{H}, \, \text{m}), \, 1.20-1.45 \, (7\text{H}, \, \text{m}), \, 1.12 \, (3\text{H}, \, \text{d}, \, \textit{J} = 6.7 \, \text{Hz}, \, \text{H21}), \, 1.10 \, (6\text{H}, \, \text{d}, \, \textit{J} = 6.9 \, \text{Hz}, \, \text{H26}, \, 27), \, 0.93 \, (3\text{H}, \, \text{s}, \, \text{H19}), \, 0.89 \, (9\text{H}, \, \text{s}, \, \text{-OTBS}), \, 0.65 \, (3\text{H}, \, \text{s}, \, \text{H18}), \, 0.06 \, (6\text{H}, \, \text{s}, \, \text{H18})$

Conversion of 19 to 20. メチルトリフェニルホスホニウム=ブロミド (600 mg, 1.7 mmol)と t-BuOK (188 mg, 1.7 mmol)をフラスコに入れ 0 $^{\circ}$ C に冷却後 THF (4 ml)を加えて 20 分撹拌した。そこにエノン 19 (170 mg, 0.34 mmol) の THF 溶液(6 ml)を加えて室温で終夜撹拌した。イオン交換水を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液と飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0:1-1:60 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、TBS エーテル 20 (156 mg, 91%)を白色結晶として得た。

 R_f = 0.82 (30/1-hexane/AcOEt); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.96 (1H, d, J= 15.8 Hz, H23), 5.60 (1H, dd, J= 15.8, 8.7 Hz, H22), 5.55 (1H, brd, J= 5.3 Hz, H6), 5.39 (1H, dt, J=5.6, 2.7, H7), 4.85 (2H, d, J= 16.0 Hz, H28), 3.59 (1H, m, H3), 2.56 (1H, m), 2.29-2.36 (2H, m), 2.05-2.19 (2H, m), 1.83-2.0 (3H, m), 1.48-1.80 (5H, m), 1.23-1.45 (10H, m), 1.09 (6H, d, J= 6.4 Hz, H26, 27), 1.08 (3H, J= 6.4 Hz, H21), 0.95 (3H, s, H19), 0.90 (9H, s, -TBS), 0.65 (3H, s, H18), 0.07 (6H, s, -OTBS)

Conversion of 20 to 4. TBS エーテル 20 (190 mg, 0.37 mmol) を THF (7 ml)に溶かしてテトラブチルアンモニウムフロライドを加えて終夜室温で撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶内を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:10-1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、24-デヒドロエルゴステロール4(125 mg, 85%)を白色結晶として得た。

 R_f = (2/1-hexane/AcOEt); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.95 (1H, d, J= 15.8 Hz, H23), 5.60 (1H, dd, J= 15.8, 8.7 Hz, H22), 5.55 (1H, dd, J= 5.3, 2.4 Hz, H6), 5.39 (1H, dt, J=5.6, 2.7 Hz, H7), 4.84 (2H, d, J= 15.9 Hz, H28), 3.64 (1H, m, H3), 2.55 (1H, hept., J= 6.7 Hz), 2.47 (1H, ddd, J= 14.3, 4.7, 2.6 Hz, H4), 2.28 (1H, t, J= 14.3 Hz, H4), 2.15 (1H, dq, J= 15.3, 6.7 Hz),

2.08 (1H, ddd, J= 12.7, 4.7, 2.6 Hz), 1.98 (1H, td, J= 7.3, 3.0 Hz), 1.86-1.92 (3H, m), 1.45-1.80 (7H, m), 1.23-1.44 (5H, m), 1.08 (6H, d, J= 6.4 Hz, H26, 27), 1.07 (3H, d, J= 6.7 Hz, H21), 0.95 (3H, s, H19), 0.65 (3H, s, H18); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 152.95, 141.12, 139.81, 135.71, 129.34, 119.52, 116.35, 109.67, 70.39, 55.70, 54.45, 46.18, 42.92, 40.68, 40.56, 39.03, 38.32, 36.98, 31.87, 29.33, 28.18, 22.95, 22.38, 22.01, 21.06, 20.60, 16.25, 12.06,

Conversion of 14 to 21. メチルトリフェニルホスホニウム=ブロミド (444 mg, 1.2 mmol)と t-BuOK (140 mg, 1.2 mmol)をフラスコに入れ 0 $^{\circ}$ C に冷却後 THF (3 ml)を加えて 20 分撹拌した。そこにアルデヒド 14 (150 mg, 0.25 mmol) の THF 溶液(4 ml)を加えて室温で終夜撹拌した。イオン交換水を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液と飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0:1-1:25 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、保護体 21 (146 mg, 97%)を白色結晶として得た。

Rf 0.85 (5/1-hexane/AcOEt); 1 H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.08-8.18 (2H, m, -Ph), 7.68 (2H, m, -Ph), 6.65 (1H, d, J= 8.2 Hz, H6), 6.25 (1H, d, J= 8.2 Hz, H7), 5.65 (1H, ddd, J= 17.0, 10.2, 8.5 Hz, H22), 4.91 (1H, dd, J= 17.0, 1.2 Hz, H23), 4.83 (1H, d, J= 10.2, 1.9 Hz, H23), 3.95 (1H, dd, J= 12.0, 7.6 Hz, H4), 3.88 (1H, dd, J= 12.0, 4.5 Hz, H4), 3.59 (1H, m, H3), 2.01-2.12 (3H, m), 1.96-2.01 (1H, m), 1.86 (1H, m), 1.46-1.70 (6H, m), 1.22-1.46 (7H, m), 1.04 (3H, d, J= 6.6 Hz, H21), 1.02 (3H, s, H19), 0.86 (9H, s, -TBS), 0.85 (3H, s, H18), 0.09 (3H, s, -TBS), 0.00 (3H, s, -TBS)

Conversion of 21 to 6. 保護体 21 (145 mg, 0.24 mmol)を THF (3 ml)に溶かし、水素化リチウムアルミニウム(92 mg, 2.4 mmol)を加えて還流条件下、1 時間 30 分撹拌した。1 N 水酸化ナトリウム(3 ml)とイオン交換水 (1 ml)を加えて反応を停止し、セライトで濾過し、ろ液を濃縮した。残渣を THF (5 ml)に溶かし、テトラブチルアンモニウムフロライド(1.0 M, 1.5 ml)を加えて室温で終夜撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:10-1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、DesC5-エルゴステロール 6 (56 mg, 2 steps for 71%)を白色結晶として得た。

Rf 0.85 (5/1-hexane/AcOEt); 1 H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.68 (1H, ddd, J= 17.0, 10.2, 8.5 Hz, H22), 5.57 (1H, dd, J= 5.7, 2.6 Hz, H6), 5.39 (1H, dt, J= 5.7, 2.4 Hz, H7), 4.92 (1H, ddd, J= 17.0, 1.2, 0.9 Hz, H23), 4.83 (1H, d, J= 10.2, 1.9 Hz, H23), 3.63 (1H, m, H3), 2.46 (ddd, 1H, J = 2.2, 4.7, 14.4 Hz, H4e), 2.28 (1H, t, J= 14.3 Hz, H4a), 2.04-2.14 (2H, m), 1.98 (1H, t, J= 7.4 Hz), 1.85-1.93 (3H, m), 1.44-1.83 (6H, m), 1.24-1.44 (5H, m), 1.06 (3H, d, J= 6.6 Hz, H21), 0.95 (3H, s, H19), 0.64 (3H, s, H18); 13 C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144.96, 141.13, 139.80, 119.54, 116.35, 111.76, 70.38, 55.13, 54.44, 46.18, 42.87, 41.42, 40.74, 39.04, 38.33, 36.98, 31.93, 28.13, 22.97, 21.06, 20.22, 16.25, 11.98

32-F-AmB および 26,40-¹³C₂-AmB の合成

Conversion of AmB to 35. AmB (3.0 g, 3.25 mmol)を DMF(33 mL) に懸濁させ、ピリジン (1.57 ml, 19.5 mmol) およびを To a stirred solution of AmB (1) (3.0 g, 3.25 mmol) in DMF (33 mL) was added 炭酸 9-フルオレニルメチル *N*-スクシンイミジル (1.64 g, 4.88 mmol) 加え終夜撹拌した。その後、ジエテルエーテル(400 ml)に沈殿させ、セライト濾過した。エーテル(100 ml)で洗浄した後、得られた黄色個体を真空下で乾燥させ次の反応に用いた。得られた Fmoc 体を DMF (33 mL) に溶かし、0℃に冷却した。そのこに炭酸ナトリウム(396 mg, 3.43 mmol)を加えて一時間撹拌した。その後、SEMCI (0.64 ml, 3.57 mmol) を加えて更に一時間撹拌した後、反応液をエーテルに注ぎ目的物を沈殿させた。セライト濾過により沈殿物を回収後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール、6/1)で精製し、SEM エステル 35 (3.19 g, 77% for 2 steps)を黄色個体として得た。

 $R_{\rm f} = 0.49$ (CHCl₃/MeOH = 6/1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.87 (2H, d, J = 7.8 Hz, Fmoc), 7.73 (2H, dd, J = 7.1, 4.6 Hz, Fmoc), 7.41 (2H, t, J = 7.1 Hz, Fmoc), 7.32 (2H, m, Fmoc), 6.04-5.87 (13H, m, heptaene), 5.44 (1H, dd, J = 14.7, 10.1 Hz, H33), 5.19 (2H, m), 4.73 (2H, m), 4.54 (1H, dd, J = 22.7, 5.5 Hz), 4.35-4.42 (2H, m), 4.16-4.28 (5H, m), 4.04 (2H, m), 3.36-3.71 (7H, m), 3.04-3.19 (4H, m), 2.27 (1H, m), 2.17 (1H, J = 6.4 Hz), 2.01 (1H, t, J = 10.5 Hz), 1.91 (2H, m), 1.72 (1H, m), 1.49-1.62 (5H, m), 1.22-1.44 (1H, 5H, m), 1.16 (3H, d, J = 4.6 Hz, H6'), 1.10 (3H, d, J = 6.4, H38), 1.03 (3H, d, J = 6.0 Hz, H40), 0.91 (3H, d, J = 7.3, H39), -0.04 (9H, s, SEM); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.46, 170.76, 144.13, 144.09, 140.87, 137.00, 136.38, 134.03, 133.86, 133.48, 133.39, 132.72, 132.69, 132.51, 132.43, 132.26, 132.07, 131.38, 129.09, 129.07, 127.82, 127.27, 125.65, 125.55, 120.24, 97.56, 97.46, 96.92, 88.30, 77.21, 74.81, 73.90, 73.77, 73.66, 73.58, 69.60, 69.50, 69.44, 69.33, 69.15, 67.87, 67.75, 66.85, 66.45, 66.33, 65.87, 65.41, 65.23, 57.28, 57.21, 57.16, 46.88, 44.85, 42.25, 42.20, 37.03, 35.25, 35.21, 29.19, 29.15, 18.68, 18.30, 17.66, 17.17, 12.24, -1.13; MS (ESI) m/z calcd for $C_{68}H_{97}NO_{20}Si[M+Na^+]$ 1298.6271, found: 1298.6281

Conversion of 35 to 36. SEM エステル **35**(5.93 g, 4.65 mmol) をメタノール(126 ml) に溶かし、そこにp-アニスアルデヒドジメチルアセタール(13.1 ml, 78.1 mmol) を加え、その後 10-カンファースルホン酸 (126.9 mg, 0.504 mmol) を加えて室温で 1 時間 30 分 攪拌した。続いて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を止め、酢酸エチルで抽出した。飽和の食塩水で有機層を洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー(5:1 酢酸エチル/ヘキサン, 1:10 メタノール/クロロホルム)で精製し、**36** (6.82 g, 96%)を得た。

 $R_{\rm f} = 0.75$ (CHCl₃/MeOH, 6/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.61 (2H, m), 7.31-7.44 (6H, m, MP, Fmoc), 6.87 (4H, dd, *J* = 8.81, 6.01 Hz, MP), 6.05-6.35 (12H, m, H21-32), 5.82 (1H, dd, J = 5.8, 14.4 Hz, H20), 5.46 (1H, s, 3,5-MP), 5.43 (1H, dd, J = 14.5, 9.0 Hz, H33), 5.43 (1H, s, 9,11-MP), 5.39 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.28 (1H, d, J = 6.3 Hz, SEM), 4.60 (2H, m), 4.42 (2H, m), 4.20 (3H, m), 3.81-3.95 (2H, m), 3.80 (3H, s, MP), 3.78 (3H, s, MP), 3.61-3.76 (5H, m), 3.26-3.48 (3H, m), 3.08 (1H, m), 3.02 (3H, s, 13-OMe), 2.67 (1H, dd, J = 16.7, 5.4), 2.42 (1H, m), 2.33 (1H, m), 2.28 (1H, d, J = 7.6 Hz), 1.64-2.08 (11H, d, J = 7.6 Hz)m), 1.35-1.61 (4H, m), 1.33 (3H, d, J = 6.0 Hz, H6'), 1.20 (3H, d, J = 6.4 Hz, H38), 1.12 (3H, d, J = 6.6 Hz, H40), 1.02 (3H, d, J = 7.2 Hz, H39), 0.01 (9H, s, SEM); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.35, 169.31, 159.87, 159.79, 158.06, 143.68, 141.28, 135.81, 134.05, 133.31, 133.10, 133.07, 133.04, 132.97, 132.83, 132.61, 132.34, 132.11, 131.91, 130.95, 130.90, 127.73, 127.42, 127.21, 127.10, 127.08, 125.06, 125.02, 119.99, 113.57, 113.53, 100.53, 100.02, 99.98, 97.15, 89.09, 79.99, 78.22, 77.20, 76.02, 73.41, 73.16, 72.54, 72.12, 70.02, 69.75, 68.19, 67.34, 66.85, 66.31, 56.40, 55.77, 55.25, 48.21, 47.10, 42.27, 40.92, 36.99, 32.66, 32.54, 28.03, 18.31, 18.07, 17.56, 17.12, 11.38, -1.47; MS (ESI) m/z calcd for $C_{85}H_{111}NO_{22}Si[M+Na^+]$ 1548.7265, found: 1548.7266.

Conversion of 36 to 37. p-メトキシベンジリデンアセタール体 36 (9.0 g, 5.9 mmol) と 2, 6-ルチジン (34 ml, 295 mmol)をジクロロメタン(23 ml)に溶かし-50 $^{\circ}$ C に冷却した。TBSOTf (13.9 ml, 76.7 mmol)を加えたのち 1 時間撹拌し、0 $^{\circ}$ C に昇温し 1 時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を 0.5 M 塩酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン、 $10/1 \rightarrow 5/1$)により精製し、5-TBS エーテル 37 (9.02 g, 73%)を黄色無定形固体として得た。

 $R_f = 0.55$ (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (2H, d, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.59 (2H, m, Fmoc), 7.37-7.32 (6H, m, Fmoc, MP), 7.27 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 6.81 (4H, dd, J = 20.5, 8.5 Hz, MP), 6.22-6.01 (12H, m, H21-32), 5.73 (1H, dd, J = 14.5, 6.6 Hz, H20), 5.54 (1H, dd, J = 14.8, 9.2 Hz, 33H), 5.44 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.39 (1H, s, 9, 11-MP acetal),5.32 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.24 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 4.90 (2H, d, J = 9.9 Hz), 4.40-4.46 (2H, m), 4.32-4.37 (1H, dd, J = 10.5, 6.6 Hz), 4.15-4.25 (3H, m), 3.85 (1H, m), 3.78 (6H, s, -OMe), 3.59-3.74 (3H, m,), 3.35 (1H, t, J = 9.5 Hz), 3.29 (1H, m), 3.02 (3H, s, -OMe), 2.61(1H, dd, J = 17.4, 7.0 Hz, H16), 2.34 (2H, t, J = 10.5 Hz, H2), 2.20-2.52 (2H, m), 1.96 (1H, m),1.75-1.84 (3H, m), 1.55-1.70 (5H, m), 1.23 (3H, d, J = 6.5 Hz, H6'), 1.20 (3H, d, J = 6.5 Hz, 38Me), 1.00 (3H, d, J = 6.5 Hz, 40Me), 0.95 (3H, d, J = 8.7 Hz, H39), 0.91, 0.90, 0.87, 0.83, 0.75(45H, s, TBS, SEM), 0.11--0.14(41H, TBS, SEM); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.26, 169.71, 159.71, 159.61, 155.51, 144.02, 143.96, 141.36, 135.86, 133.63, 133.51, 133.32, 133.14, 132.74, 132.46, 132.20, 131.94, 131.73, 131.29, 131.21, 130.26, 127.62, 127.34, 126.96, 124.93, 119.89, 113.46, 113.25, 100.57, 100.17, 99.98, 97.89, 89.73, 80.21, 77.20, 75.29, 73.83, 73.44, 72.50, 72.34, 72.27, 72.20, 68.21, 68.78, 66.95, 66.66, 57.06, 56.06, 55.24, 47.99, 47.19, 43.03, 42.42, 40.66, 37.08, 36.01, 32.22, 31.84, 30.34, 28.91, 26.97, 26.08, 25.98, 25.75, 25.61, 18.84, 18.38, 18.31, 18.24, 18.11, 17.98, 17.82, 17.70, 14.02, 10.94, -1.44, -3.96, -4.03, -4.17, -4.26, -4.39, -4.43, -4.56, -5.14, -5.33; MS (ESI) m/z calcd for $C_{115}H_{181}N_1O_{22}Si_6[M+Na^+]$ 2119.1589, found: 2119.1575

Conversion of 37 to 38. 5-TBS エーテル 37(3.0 g, 1.4 mmol)をジクロロメタン(375 ml), メタノール(25 ml)に溶かし-78 °C に冷却した後、20 分間オゾンをバブリングした。 その後、10 分間アルゴンをバブリングし系中のオゾンを取り除き、トリフェニルホスフィンを (7.9 g, 30 mmol)を加えて 3 時間撹拌した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:20-1:3 酢酸エチル/ヘキサン)により精製し、ジアルデヒド 38 (1.7 g, 59%)を白色固体として得た。

 $R_{\rm f} = 0.50$ (hexane/AcOEt, 2/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.65 (1H, s, CHO), 9.49 (1H, d, J = 2.8 Hz, CHO), 7.75 (2H, d, J = 7.6 Hz, Fmoc), 7.59 (2H, d, J = 7.3 Hz, Fmoc), 7.41-7.27 (6H, m, Fmoc, MP), 7.27 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 6.82 (4H, dd, J = 20.5, 8.5 Hz, MP), 5.49 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.44 (1H, s, 9,11-MP acetal), 5.33 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.16 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.01 (1H, m), 4.49-3.60 (7H, m), 3.78, 3.77 (6H, s, -OMe), 3.33 (1H, m), 3.15 (3H, s, OMe), 2.67 (1H, dd, J = 15.3, 7.6 Hz), 2.51-2.39 (2H, m), 2.20 (1H, m), 1.96 (1H, m), 1.75-1.84 (3H, m), 1.55-1.70 (5H, m), 1.23 (3H, d, J = 6.5 Hz, H6'), 1.20 (3H, d, J = 6.5 Hz, 38Me), 1.00 (3H, d, J = 6.5 Hz, 40Me), 0.95 (3H, d, J = 8.7 Hz), 0.91, 0.90, 0.87, 0.86, 0.82, 0.75(45H, s, TBS, SEM), 0.10--0.12 (41H, TBS, SEM); MS (ESI) m/z calcd for C₁₀₃H₁₆₉N₁NaO₂₄Si₆[M+Na⁺] 1995.0548, found: 1995.0515.

Conversion of 38 to 39. スターラーバー入りの 300 ml ナス型フラスコに、グローブボックス内で秤量した塩化クロム(II)(2.5 g, 20 mmol)を移し、減圧下 30 分間ヒートガンで乾燥させた。アルゴン雰囲気下室温に戻し、直前にベンゾフェノンケチルで蒸留した THF(40 ml)を加えて 0° C に冷却した。この溶液に対し、ヨードホルム(2.0 g, 5.1 mmol)とジアルデヒド 38(1.7 g, 0.85 mmol)の THF(45 ml)溶液を加え、 0° C で 10 分、そ

の後室温で 11 時間攪拌した。0 $^{\circ}$ に冷却して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0:1-1:5 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、ビス-(ヨードオレフィン) $\mathbf{39}(1.2~\mathrm{g},64\%)$ を無色無定形固体として得た。

 $R_{\rm f} = 0.62$ (hexane/AcOEt, 5/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (2H, d, J = 7.6 Hz, Fmoc), 7.59 (2H, dd, J = 7.3, 3.4 Hz, Fmoc), 7.41-7.27 (6H, m, Fmoc, MP), 7.27 (2H, t, J =7.5 Hz, Fmoc), 6.83 (4H, dd, J = 20.5, 8.5 Hz, MP), 5.49 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.44 (1H, s, 9,11-MP acetal), 5.33 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.16 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 6.45-6.53 (2H, m, H20, H33), 6.35 (1H, d, J = 14.7 Hz, H21), 6.02 (1H, d, J = 14.4 Hz, H32), 5.50 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.46 (1H, s, 9,11-MP acetal), 5.29 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.22 (1H, d, J = 6.2Hz, SEM), 5.11 (1H, t, J = 6.4 Hz, H37), 4.83 (1H, d, J = 9.9 Hz, NH), 4.15-4.47 (8H, m), 3.79, 3.78 (6H, s, -OMe), 3.71 (2H, m), 3.63 (2H, m), 3.5 (1H, m), 3.19-3.35 (2H, m), 3.07 (3H, s, -OMe), 2.68 (1H, dd, J = 7.3, 15.6 Hz), 2.47 (1H, dd, J = 15.5, 5.9 Hz), 2.40 (1H, m), 2.29-2.28 (2H, m), 1.34-2.00 (20H, m), 1.23 (3H, d, J = 6.0 Hz, H6'), 1.15 (3H, d, J = 6.2 Hz, 38Me), 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, 40Me), 0.93 (3H, 39H), 0.91, 0.88, 0.87, 0.83, 0.76 (45H, s, TBS, SEM), 0.08, 0.06, 0.05, 0.03, 0.02, 0.04, 0.06, 0.07, -0.11 (41H, TBS, SEM); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.21, 169.91, 159.70, 155.55, 150.14, 146.12, 143.95, 143.87, 141.36, 131.06, 127.62, 127.49, 127.26, 126.96, 124.89, 119.90, 113.41, 113.37, 100.62, 100.41, 100.30, 99.26, 89.53, 79.76, 79.57, 78.61, 77.20, 76.44, 75.99, 75.23, 73.85, 73.60, 73.25, 72.71, 72.35, 72.25, 71.58, 68.16, 67.36, 66.68, 66.61, 57.09, 55.26, 55.21, 47.97, 47.14, 43.69, 42.17, 41.36, 36.64, 31.68, 27.46, 26.01, 25.90, 25.72, 25.57, 18.74, 18.30, 18.17, 17.96, 17.69, 16.34, 14.12, 11.12, -1.35, -3.58, -3.94, -4.02, -4.05, -4.22, -4.28, -4.41, -4.60, -5.17, -5.31; MS (ESI) m/zcalcd for $C_{103}H_{169}N_1NaO_{24}Si6[M+Na^+]$ 2242.8895, found: 2242.8877.

Conversion of 39 to C1-C21 segment (24). ジョードオレフィン体 39 (1.2 g, 0.54 mmol) を THF(90 ml)、水(45 ml)、メタノール(30 ml)の混合溶媒に溶かし、水酸化リチウム 1 水和物(2.5 g, 59.4 mmol)を加えて室温で 21.5 時間攪拌した。0℃に冷却して飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗精製し、そのまま次の反応に用いた。残渣をトルエン共沸により脱水した後、DMF(36 ml)に溶かし、ピリジン(1.5 ml, 19 mmol)および 9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネート(1.8 g, 5.4 mmol)を加えて室温で 5 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-1:1 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、C1-C21 セグメント 20 を副生成物との混合物として得た。これを HPLC 用クロロホルム (1.5 ml)に溶かし、LC918 を用いたゲルろ過(JAIGEL-2H, CHCl3, 4 ml /min, 268 nm, 0.3 ml ずつインジェクト)により精製し、C1-C21 セグメント 20(352 mg, 35% for 2 steps)を白色固体として得た。

 $R_{\rm f}=0.65$ (silica gel, ethyl acetate/hexane = 1/1); $[\alpha]_{\rm D}^{25}$ +4.6 (c 0.57, CHCl₃); 1 H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (2H, d, J = 7.6 Hz, Fmoc), 7.55 (2H, dd, J = 6.7, 5.0 Hz, Fmoc), 7.39-7.33 (6H, m, Fmoc, MP), 7.29 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 6.84 (4H, dd, J = 24.9, 8.5 Hz, MP), 6.50 (1H, dd, J = 14.5, 7.7 Hz, H20), 6.34 (1H, d, J = 14.5 Hz, H33), 5.51 (1H, s, -OMe), 5.46 (1H, s, -OMe), 5.29 (1H, d, J = 6.2 Hz, SEM), 5.22 (1H, d, J = 6.2 Hz, SEM), 4.84 (1H, d, J = 9.9 Hz, NH), 4.45 (0.5H, dd, J = 10.5, 6.6 Hz), 4.38 (1H, br), 4.35 (1H, dd, J = 10.5, 6.4 Hz), 4.16-4.30 (4H, m), 3.90 (1H, m), 3.82 (3H, m), 3.79, 3.38 (6H, s, -OMe), 3.71 (2H, q, J = 8.5 Hz), 3.62 (2H, tt, J = 9.9, 2.9 Hz), 3.31 (1H, t, J = 8.73 Hz), 3.24 (1H, m), 3.07 (3H, s, -OMe), 2.75 (1H, dd, J = 16.2, 7.0 Hz), 2.58 (1H, dd, J = 16.0.0, 5.9 Hz), 2.23-2.16 (2H, m), 1.95 (1H, br), 1.81-1.70 (4H, m), 1.57 (2H, m), 1.49 (2H, m), 1.21 (3H, d, J = 6.0 Hz, H6°), 1.00 (2H, t, J = 8.2 Hz, SEM), 0.88, 0.87, 0.82, 0.76 (36H, s, TBS), 0.05, 0.04, 0.02, 0.01, -0.05, -0.06, -0.08, -0.11 (33H, s, TBS, SEM): 13 C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.20, 169.91, 159.86, 159.70,

155.60, 146.12, 143.93, 143.84, 141.36, 131.07, 130.82, 127.63, 127.48, 127.32, 126.97, 124.88, 119.91, 113.51, 113.37, 100.60, 100.55, 99.35, 89.53, 79.77, 79.52, 78.74, 77.21, 76.47, 73.86, 73.63, 72.80, 72.69, 72.36, 72.24, 68.16, 67.36, 66.72, 66.63, 57.34, 57.10, 55.27, 55.21, 47.98, 47.13, 42.99, 41.99, 40.52, 38.89, 36.37, 31.75, 31.67, 27.44, 26.00, 25.90, 25.72, 25.56, 18.73, 18.33, 18.16, 17.96, 17.69, -1.35, -3.58, -4.02, -4.24, -4.28, -4.41, -4.62, -5.18, -5.32; MS (ESI) m/z calcd for $C_{90}H_{142}INNaO_{21}Si_{5}[M+Na^{+}]$ 1862.7863, found:1862.7847.

Conversion of 28 to 40. トリエチル-2-フルオロ-2-ホスホノアセテート (2.6 g, 10.8 mmol)を THF (30 ml)に溶かし -78° C に冷却後、n-BuLi (1.6 M, 6.4 ml, 10.2 mmol)を滴下し、30 分撹拌した。その後トルエン共沸したアルデヒド 28(2.2 g, 6.37 mmol)を 5 分間かけて滴下し、30 分撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(1:20-1:10 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、フルオロエステル 40 (2.7 g, 97%)を無色オイルとして得た。

 $R_{\rm f}$ = 0.65 (silica, hexane/AcOEt= 4/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.00 (0.5H, dd, J = 22.1, 10.76 Hz, H33), 5.91 (0.5H, dd, J = 22.1, 10.53 Hz, H33), 4.67 (1H, m, EE), 4.30 (2H, q, J = 7.10 Hz, OEt), 3.89 (1H, m, 37H), 3.67-3.41 (3H, m, EE, 35H, 34H), 1.86 (0.5H, ddd, J = 14.4, 7.1, 2.1 Hz, 35H), 1.92 (0.5H, ddd, J = 14.4, 7.1, 2.1 Hz, 35H), 1.35 (3H, t, J = 7.1 Hz, OEt), 1.28 (3H, d, 5.0 Hz, EE), 1.19 (3H, t, J = 6.9 Hz, EE), 1.08 (1.5H, d, J = 6.4 Hz, 38H), 1.04 (1.5H, dd, J = 6.53, 3.21, 0.92 Hz, 40H), 1.02 (1.5H, d, J = 6.4 Hz, 38H) 0.93, 0.92 (9H, s, TBS), 0.88, 0.86 (3H, d, J = 2.8 Hz, 39H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160.99, 160.94, 160.70, 160.66, 146.67, 146.66, 144.67, 144.63, 128.27, 128.24, 128.15, 128.10, 98.85, 98.23, 76.69, 76.67, 76.45, 76.44, 72.53, 71.18, 61.35, 61.31, 61.08, 60.01, 43.22, 42.22, 33.10, 33.06, 32.92, 32.89, 26.20, 26.13, 26.08, 20.99, 20.83, 18.43, 18.38, 16.04, 15.36, 15.31, 15.24, 14.44, 14.11, 13.87, 9.93, 9.77, -78 °C 3.72, -78 °C 3.98, -78 °C 4.07; MS (ESI) m/z calcd for C₂₂H₄₃FNaO₅Si[M+Na⁺] 457.2761, found: 457.2762.

Conversion of 40 to 41. フルオロエステル **40** (857 mg, 1.8 mmol) を THF (19 ml) に 溶かし、-78°C に冷却した後 DIBAL (1.0M, 9.6 ml, 9.6 mmol)を 10 分かけて滴下した。 2 時間撹拌後飽和酒石酸ナトリウムカリウムを加え反応を停止し、3 時間撹拌した。 酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を留去しアルコールを得た。

得られたアルコールをジクロロメタン(20 ml)に溶かし、そこに Dess-Martin 試薬 (1.67 g, 3.94 mmol)を加えて、1.5 時間撹拌した。飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を留去した。得られた残差をカラムクロマトグラフィー (0:1-1:20 酢酸エチル/へキサン)により精製し、エナール **41** (718 mg, 93% for 2steps) を無色オイルとして得た。

 $R_{\rm f}$ = 0.62, 0.65 (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.78 (0.5H, d, J = 17.2 Hz, 31H), 9.67 (0.5H, d, J = 15.3 Hz, 31H), 6.24 (0.5H, dd, J=18.9, 11.6 Hz, 33H), 6.06 (0.5H, dd, J = 18.9, 11.5 Hz, 33H), 4.61 (2H, quin, J = 5.2 Hz, EE), 3.74 (1H, m, 37H), 3.57-3.37 (3H, m, EE, 35H), 3.36 (1H, m, 34H), 1.81 (1H, m, 34H), 1.23-1.80 (6H, m, EE, -OEt), 1.14 (3H, q, J = 6.6 Hz, EE), 1.07-1.04 (4.5H, m, 38,H 40H), 1.00 (1.5H, d, J = 6.2 Hz, 38H), 0.88, 0.87 (9H, s, TBS), 0.86, 0.85 (1H, d, J = 5.0 Hz, H39), 0.03, 0.02, 0.01, 0.00 (6H, s, TBS); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.72, 182.54, 49, 182.29, 153.71, 153.63, 151.70, 151.62, 132.23, 131.11, 131.22, 131.10, 98.93, 98.74, 97.61, 77.39, 77.37, 75.87, 75.85, 72.90, 71.51, 61.75, 60.17, 59.77, 44.45, 42.62, 32.77, 32.73, 32.24, 32.20, 26.00, 25.90, 20.93, 20.47, 18.30, 18.18, 17.06, 16. 48, 16.46, 16.44, 15.72, 15.70, 15.15, 14.05, 11.45, 11.15, -3.80, -4.08, -4.18, -4.46; MS (ESI) m/z calcd for $C_{22}H_{43}FNaO_{5}Si[M+Na^+]$ 413.2499, found: 413.2491.

Conversion of 41 to 42*E*. 4-ブロモクロトン酸エチルから誘導したホスホン酸ジエチル(181 mg, 0.72 mmol)を THF(5 ml)に溶かして -78° C に冷却後、LHMDS(1.0M, 0.69 ml, 0.69 mmol)を 5 分かけて滴下し、30 分間撹拌した。その後、エナール 36 を THF(5 ml)に溶かしカニュラで滴下し、40 分撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、乾燥させた後、溶媒を留去した。得られた残渣をクロマトグラフィー(0:1-1:20 酢酸エチル/ヘキサン)により精製し、黄色オイルとして *E*-エステル 42*E* (162 mg, 92%)を得た。

 $R_{\rm f} = 0.64$ (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.36 , 7.33 (1H, ddd, J = 11.5, 11.4, 1.3 Hz, 29H), 6.72-6.49 (2H, m, 30H, 31H), 6.00, 5.97 (1H, d, J = 8.45 Hz, 29H), 5.44, 5.32 (1H, dd, J = 20.8, 11.0 Hz, 33H), 4.67 (1H, m, EE), 4.22, 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz, -OEt), 3.83 (1H, m, 37H), 3.65-3.43 (3H, m, EE, H35), 2.67 (1H, m, 34), 1.92-1.82 (1H, m, H36), 1.32-1.17 (9H, m, EE, EE, -OEt), 1.10 (1.5H, t, J = 7.6 Hz, H38), 1.04-1.01 (4.5H, m, H38, H40), 0.93, 0.92 (9H, s, TBS), 0.88 (3H, t, J = 7.02 Hz), 0.06, 0.05 (6H, s, TBS); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.51, 166.43, 155.40, 155.16, 153.00, 153.76, 143.09, 142.81, 127.33, 127.29, 127.00, 126.89, 126.85, 126.76, 126.43, 126.18, 123.24, 123.80, 119.01, 118.80, 118.45, 118.24, 99.08, 97.76, 77.52, 76.29, 73.222, 71.41, 61.60, 60.26, 60.20, 59.68, 53.26, 44.03, 42.50, 34.04, 33.97, 33.64, 33.56, 26.05, 25.96, 20.97, 20.58, 18.39, 18.21, 17.04, 16.17, 16.13, 15.00, 15.88, 15.21, 14.14, 14.01, 11.09, 10.90, -3.87, -4.05, -4.14, -4.38; MS (ESI) m/z calcd for $C_{26}H_{47}FNaO_{5}Si[M+Na^+]$ 509.3074, found: 509.3087.

Conversion of 42*E* to 42*Z*. *E*-エステル 42*E* (247 mg, 0.43 mmol) をトルエン(8.6 ml)に溶かし、ジフェニルジセレニド (27 mg, 0.09 mmol)を加えてタングステンライト照射下で 21 時間還流した。室温まで冷却し溶媒を留去した後、残渣をジクロロメタン(5.0 ml)に溶かしてエチルビニルエーテル (0.85 ml) および PPTS (56 mg, 0.26 mmol)を加えて 2 時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を停止し、酢酸エチル

で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(0:1-1:15 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、黄色無定形固体として Z-エステル 42Z (191 mg, 2steps for 77%) を得た。

 R_f = 0.64 (silica, hexane/AcOEt= 4/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (1H, m, H29), 6.52, 6.51 (1H, dd, J = 15.2, 11.46 Hz, H30), 6.22 (1H, dd, J = 25.9, 15.2 Hz, H31), 5.97, 5.96 (1H. d, J = 15.2 Hz, H28), 5.08, 5.01 (1H, dd, J = 35.8, 9.7Hz, H33), 4.66 (1H, m, EE), 4.21 (2H, t, J = 6.6 Hz, -OEt), 3.89 (1H, m, H37), 3.65-3.42 (3H, m, EE, H35), 2.93 (1H, m, H34), 1.92, 1.85 (1H, m, H36), 1.30 (3H, t, J = 6.6 Hz, -OEt), 1.28 (3H, t, J = 1.3 Hz, EE), 1.09 (1.5H, d, J = 6.3 Hz, H38), 1.02 (3H, d, J = 6.2 Hz, H40), 1.01 (1.5H, d, J = 6.2 Hz, H40), 0.92, 0.91 (9H, s, TBS), 0.87 (3H, d, J = 7.2 Hz, H39), 0.49, 0.02 (6H, s, TBS); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.45, 155.57, 153.08, 142.82, 142.76, 130.94, 130.77, 130.69, 130.52, 125.85, 125.82, 125.65, 122.63, 122.50, 120.12, 119.96, 98.85, 97.88, 76.63, 76.40, 72.79, 71.22, 60.55, 60.13, 59.70, 43.14, 42.32, 32.75, 32.66, 25.99, 25.96, 20.80, 20.59, 18.27, 18.24, 16.30, 15.40, 15.22, 15.18, 14.70, 14.23, 14.10, 10.16, 10.08, -4.02, -4.09; MS (ESI) m/z calcd for $C_{26}H_{47}FNaO_{5}Si[M+Na^+]$ 509.3074, found: 509.3087.

Conversion of 42Z to 26. E-エステル体 42Z (86 mg, 0.18 mmol) を THF (1.8 ml) に溶かし、-78°C に冷却した後 DIBAL (0.7 ml)を滴下した。1 時間撹拌後飽和酒石酸ナトリウムカリウムを加え反応を停止し、2 時間撹拌した。酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を留去しアリルアルコールを得た。

得られたアルコールをジクロロメタン(1.7 ml)に溶かし、そこに Dess-Martin 試薬(104 mg, 0.24 mmol)を加えて、30 分撹拌した。飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を留去した。得られた残差をカラムクロマトグラフィー(0:1-20:1 酢酸エチル/ヘキサン)により生成し黄色無定形固体としてアルデヒド 26 (60.9 mg, 82% for 2steps)を得た。

 $R_{\rm f} = 0.62, 0.65$ (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.49 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.06, 7.05 (1H, dd, J = 14.9, 11.2 Hz, H29), 6.56, 6.55 (1H, dd, J = 15.2, 11.2 Hz, H30), 6.28

(1H, dd, J = 25.7, 15.2 Hz, H31), 6.13 (1H, dd, J = 14.9, 8.0 Hz, H28), 5.12, 5.04(1H, dd, J = 35.7, 9.9 Hz, H33), 4.59 (1H, m, EE), 3.79 (1H, m, H37), 3.52 (1H, m, H35), 3.49-3.32 (2H, m, EE), 2.87 (1H, m, H34), 1.83, 1.78 (1H, m, H36), 1.21-1.08 (6H, m, EE), 1.01 (1.5H, d, J = 6.41 Hz, H38), 0.95 (4.5H, m, H38, H40), 0.84, 0.83 (9H, s, TBS), 0.80, 0.78 (3H, d, J = 4.6 Hz), -0.03, -0.05 (6H, s, TBS); 13 C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 192.86, 155.39, 152.90, 149.96, 149.89, 132.65, 132.50, 132.47, 132.42, 132.22, 125.73, 125.70, 125.52, 125.48, 121.81, 121.64, 98.79, 97.78, 76.46, 76.19, 72.73, 71.93, 60.47, 60.04, 59.73, 59.62, 43.19, 42.31, 32.87, 32.80, 25.93, 25.90, 20.75, 20.53, 18.21, 18.17, 16.29, 15.39, 15.19, 15.13, 14.67, 14.14, 13.96, 10.14, 10.08, -4.08, -4.15; MS (ESI) m/z calcd for C₂₆H₄₇FNaO₅Si[M+Na⁺] 465.2812, found: 465.2810.

Conversion of 26 to 25. トルエン共沸したホスホン酸ジメチル 27 (1.6 g, 3.4 mmol) を THF(17 ml)に溶かし、0℃に冷却し LHMDS (1.0M, 3.2 ml, 3.2 ml)を 5 分かけて滴下して 10 分撹拌した。その後、トルエン共沸したアルデヒド 26 (743 mg, 1.68 mmol) を 5 分かけて滴下して 30 分撹拌した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をフロリジルカラム(Hexane/AcOEt =1/0-30/1, 1%トリエチルアミン)で精製し、黄色無定形固体として C22-C37 セグメント 25 (820 mg, 63%) を得た。

 $R_{\rm f}=0.62,~0.65$ (hexane/AcOEt, 4/1); $[\alpha]_{\rm D}^{25}+59.3$ (c 1.14, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.65-5.82 (10H, m, H22-31), 4.86, 4.80 (1H, dd, J=36.7, 9.6 Hz, H33), 4.66 (1H, m, EE), 3.90 (1H, m, H37), 3.66-3.41 (3H, m, EE, H35), 2.90 (1H, m, H34), 1.93, 1.85 (1H, m, H36), 1.17-1.54 (18H, m, EE, SnCH₂ CH₂), 1.08 (1.5H, d, J=6.3 Hz, H38), 1.02-0.94 (4.5H, m, H38, H40), 0.91-0.85 (24H, TBS, Sn(CH₂)CH₂CH₃), 0.84, 0.82 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.04, 0.03 (6H, s, TBS); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 156.51, 154.05, 146.76, 146.33, 136.43, 136.35, 136.32, 136.17, 136.13, 135.96, 135.72, 135.45, 134.84, 134.74, 134.65, 134.11, 134.05, 133.08, 132.01, 131.76, 131.72, 131.64, 128.83, 128.66, 123.48, 123.33, 123.24, 123.09, 116.178, 116.02, 98.99, 98.09, 76.91, 73.02, 71.38, 60.68, 60.21, 59.87, 42.98, 42.38, 32.63, 32.51, 29.14, 29.07, 29.03, 28.97, 28.93, 27.47, 27.20, 26.93, 26.12, 26.10, 20.95, 20.77, 18.37,

16.36, 15.40, 15.28, 14.83, 14.56, 14.11, 13.62, 10.43, 10.24, 10.11, 9.50, -3.87, -3.90, -3.95; MS (ESI) *m/z* calcd for C₄₁H₇₅FNaO₃SiSn[M+Na⁺] 805.4389, found: 805.4410.

Conversion of 8 to S5. トルエン共沸により脱水した C1-C21 セグメント 24(174 mg, 0.095 mmol) と、ジイソプロピルエチルアミン(0.17 ml, 0.95 mmol)を THF(5 ml)に溶かし、そこへ、トルエン共沸により脱水した C22-C37 セグメント(25) (147 mg, 0.19 mmol)の THF(5 ml)溶液を加えた。これに対し、グローブボックス内で秤量したトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム(29 mg, 0.029 mmol)とトリフェニルヒ素(97 mg, 0.28 mmol)の THF(2 ml)を加え、遮光下室温で 4 時間攪拌した。THF を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:5 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 クロロホルム/メタノール、1%トリエチルアミン)で粗精製し、カップリング生成物 43 (234 mg, impure)を得た。

Conversion of S5 to S6. 得られたカップリング生成物 43 (234 mg)をメタノール(9.5 ml)と p-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタール(1.85 ml)に溶かし、PPTS(407 mg, 1.89 mmol)を加えて遮光下室温で 3 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 クロロホルム/メタノール、1%トリエチルアミン) で粗精製し、セコ酸(207 mg, impure)を黄色無定形固体として得た。セコ酸(207 mg)をジクロロメタン(80 ml)に溶かし、そこにグローブボックス内で秤量した 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物(202 mg, 0.59 mmol)と DMAP(110 mg, 1.17 mmol)のジクロロメタン(20 ml)溶液を 40

分かけて滴下した。室温で4時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0:1-1:5 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 メタノール/クロロホルム) で精製し、マクロラクトン 44(55 mg, 28% for 3 steps)を黄色無定形固体として得た。

 $R_{\rm f} = 0.45$ (silica gel, hexane/AcOEt=4/1); $[\alpha]_{\rm D}^{26} + 55.4613$ (c 1.18 CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (2H, d, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.58 (2H, m, Fmoc), 7.40-7.36 (4H, m, Fmoc, MP), 7.33 (2H, d, J = 8.7 Hz, MP), 7.29 (2H, td, J = 7.5, 0.9 Hz, Fmoc), 6.80 (4H, dd, J = 21.7, 8.8 Hz, MP), 6.49 (1H, dd, J = 10.9, 15.1 Hz), 6.11-6.35 (9H, m, H21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29), 5.83 (1H, dd, J = 24.9, 15.2 Hz, H31), 15.79 (1H, dd, J = 14.7, 6.7 Hz, H20), 5.45 (1H, s, MP), 5.40 (1H, s, MP), 5.31 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 5.24 (1H, d, J = 6.0 Hz, SEM), 4.88 J = 6.7 Hz, H19), 4.43 (1H, dd, J = 10.5, 6.6 Hz, Fmoc), 4.42 (1H, br, H1'), 4.35 (1H, dd, J = 10.5), 4.42 (1H, br, H1'), 4.35 (1 10.5, 6.6 Hz), 4.16-4.24 (3H, m, Fmoc, H3, H15), 3.84 (2H, m, H3, 11), 3.78 (3H, s, -OMe), 3.77 (3H, s, -OMe), 3.63-3.75 (7H, m, H5, 8, 9, 17, 35, 3', 2'), 3.25-3.26 (2H, m, H4', H5'), 3.02 (3H, s, -OMe), 2.79 (1H, m, H34), 2.67 (1H, dd, J = 17.3, 6.0 Hz, H2a), 2.29-2.36 (2H, m, H34)H2b, H16), 2.21 (1H, dd, J = 13.3, 4.6 Hz), 19.3-2.0 (2H, m), 1.74-1.89 (3H, m), 1.64-1.74 (2H, m), 1.50 (2H, br), 1.32 (1H, m), 1.17-1.29 (m), 1.00 (3H, d, J = 6.9 Hz, H38), 1.95 (3H, H40), 0.72-0.93 (53H, m, TBS, SEM, H39, H6'), 0.10--0.147 (39H, m, TBS, SEM); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.18, 169.53, 159.64, 159.57, 155.44, 143.97, 143.90, 141.31, 136.24, 136.07, 135.13, 134.46, 134.02, 133.56, 132.16, 132.08, 131.72, 131.40, 131.20, 131.14, 130.36, 130.19, 129.14, 127.56, 127.52, 127.21, 126.92, 124.88, 123.21, 122.97, 121.84, 119.85, 113.39, 113.24, 100.49, 100.09, 99.93, 97.85, 89.69, 80.04, 77.20, 75.36, 75.11, 73.78, 72.99, 72.44, 72.40, 72.32, 69.57, 68.17, 68.03, 67.72, 66.92, 66.60, 60.31, 57.02, 56.01, 55.19, 55.13, 53.37, 47.96, 47.14, 42.98, 42.41, 40.29, 37.23, 37.23, 36.32, 31.96, 31.79, 31.53, 29.63, 26.79, 26.04, 26.93, 25.71, 25.58, 22.60, 20.98, 18.87, 18.81, 18.44, 18.33, 18.24, 18.17, 18.06, 17.93, 17.68, 14.15, 14.08, 10.85, -1.38, -1.47, -3.53, -3.99, -4.07, -4.24, -4.31, -4.44, -4.57, -5.17,-5.37; MS (ESI) m/z calcd for $C_{115}H_{180}FNaO_3Si_6[M+Na^+]$ 2137.1494, found: 2137.1497.

Conversion of 44 to 45. テフロンチューブにマクロラクトン 44 (112 mg, 53 μ mol)を移し、メタノール (2.7 mL)を加えた。室温で 18% HF-ピリジン(1.1 ml)を滴下し、その後 50 度に昇温して 40 時間攪拌した。反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中に滴下して反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣を ODS カラム (0:1-1:0 メタノール/ H_2O) で粗精製し、黄色固体を得た。

得られた粗成生物(83 mg)をジクロロメタン(6.0 ml)に溶かし、ピペリジン(160 μ l, 1.6 mmol)を加えて室温で 4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:20-1:0 メタノール/クロロホルム) で粗精製し、Fmoc 脱保護体 45 (78 mg, impure)を黄色固体として得た。

Conversion of 45 to 22. Fmoc 脱保護体 45(78 mg)をメタノール(5.2 ml)に溶かし0°C に冷却後、濃塩酸(434 μ l)を滴下し、0°C で 18 分攪拌した。炭酸水素ナトリウム(542 mg)を加えて反応を停止し、pH が 7 付近になったことを確認し溶媒を減圧留去した。得られた残渣を t-ブタノール(4.2 ml)と H_2O (1.1 ml)に溶かし、そこへ濃塩酸 (217 μ l)を加え、0°C で 5 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウムと水を加えて反応を停止し、反応水溶液をそのまま ODS のオープンカラム(H_2O -MeOH)にチャージして粗精製することで黄色固体を得た。それを HPLC により再精製し、最終的に純粋な 32-F AmB 22(8.5 mg, 17% for 4 steps)を黄色固体として得た。

 $R_{\rm f} = 0.10$ (CHCl₃/MeOH, 5/1); ¹H NMR (500 MHz, MeOH- d_4 /DMSO- d_6 , 5/1) δ 6.27-6.55 (8H, m, H22-30), 6.08 (1H, dd, J = 15.3, 8.5 Hz, H20), 6.17 (1H, dd, J = 15.3, 10.5 Hz, H21), 6.021 (1H, dd, J = 25.9, 15.3 Hz, H31), 5.16 (1H, m, J = 6.2, 3.01 Hz, H37), 4.73 (1H, dd, J = 15.3)

10.7, 35.3 Hz, H33), 4.62 (1H, s, H1'), 4.35 (1H, m, H19), 4.38 (1H, m, H11), 4.37 (1H, m, H17), 4.24 (1H, brddd, J = 10.9, 4.5, 4.5 Hz, H15), 4.14 (1H, brdddd, J = 8.4, 8.4, 4.4, 4.4 Hz, H3), 3.98 (1H, brs, H2'), 3.71 (1H, m, H5), 3.62 (1H, brd, J = 10.8 Hz, H9), 3.34 (1H, m, H5'), 3.32 (1H, m, H4'), 3.27 (1H, m, H35), 3.24 (1H, m, H8), 3.07 (1H, br, H3'), 2.82 (1H, m, H34), 2.24 (1H, dd, J = 16.5, 4.4 Hz, H2a), 2.28 (1H, m, 18a), 2.22 (1H, dd, J = 16.5, 8.02, H2b), 2.04 (1H, m, H14a), 1.99 (1H, m, h16), 1.88 (1H, m, H36), 1.69 (2H, m, 12ab), 1.68 (1H, m, 18b), 1.66 (1H, m, 10a), 1.61 (1H, m, 7a), 1.51-1.36 (6H, m, H4ab, H6ab, 7b, 10b), 1.27 (3H, d, J = 5.5 Hz, H6'), 1.21 (3H, d, J = 6.3 Hz, H38), 1.12 (3H, d, J = 6.4 Hz, H40), 1.02 (3H, d, J = 7.02 Hz, H39); ¹³C NMR (100 MHz, MeOH- d_4 /DMSO- d_6 , 4/1) δ 176.54, 170.57, 156.04 (d, J = 243.6 Hz), 137.29, 135.81, 135.35, 134.96, 134.35, 134.20, 132.26, 131.62, 131.39, 129.62, 129.06, 127.85, 122.97, 97.38, 97.20, 77.55, 76.19, 74.42, 74.34, 74.03, 73.21, 70.66, 70.10, 69.68, 68.22, 66.64, 66.23, 65.97, 58.46, 55.90, 45.91, 44.73, 44.34, 42.44, 42.26, 39.7, 39.6, 35.09, 34.10, 29.44, 18.68, 17.85, 17.18, 12.04; MS (ESI) m/z calcd for C₄₇H₇₂NNaO₁₇[M+Na⁺] 964.4682, found: 964.4671.

Conversion of 30 to 34. -78 °C に冷却した THF (50 ml) に n-BuLi (1.6 M, 33 ml) およびジイソプルピルミン(7.4 ml, 52 mmol)を加え 30 分撹拌した。そこに、THF (20 ml) と HMPA (20 ml) に溶かしたラクトン 30 をカニュラでゆっくりと加えた。30 分撹拌後、n-BuLi (1.6 M, 26 ml) を加え更に 45 分撹拌した後、 13 CH $_3$ I (4.0 ml, 62.4 mmol)をゆっくりと加え、一時間かけて-30 °C まで昇温した。そこから更に 2 時間撹拌した後、THF (15 ml) に溶かした酢酸(15 ml)を加えて反応を停止した。ジクロロメタンで抽出後、水および飽和食塩水で有機層を洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去したの後、得られた残差をシリカゲルクロマトグラフィー (hexane/AcOEt 4/1) により精製することで、 13 C-ラクトン 34 (2.1 g, 72%) を白色固体として得た。

 $R_{\rm f}$ = 0.15 (hexane/AcOEt, 2/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.44 (1H, dq, J = 10.5, 7.0 Hz, H37), 3.71 (1H, dd, J = 3.5, 2.5 Hz, H35), 2.68-2.62 (1H, m, H34), 1.82 (1H, dqd, J = 10.0, 4.0, 3.5 Hz, H36), 1.43 (1.5H, d, J = 6.5 Hz, H40), 1.34 (3H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.18 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H40), 1.04 (3H, d, J = 6.5 Hz, H39); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 175.04, 72.73, 43.51, 43.16, 36.87, 26.43, 22.39, 19.42, 15.78, 12.56; MS (ESI) m/z calcd for C₇¹³CH₁₄NaO₃ [M+Na⁺] 182.0874, found: 182.0872.

Conversion of 34 to S1. 13 C-ラクトン 34 (2.0 g, 12.6 mmol) を THF (50 ml) に溶解させ-40 °C に冷却した後、2,6-lutidine (2.9ml, 25.2 mmol) と TBSOTf (4.4 ml, 18.9 mmol) をゆっくりと加えた。30 分撹拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応をクエンチした。ジクロロメタンで抽出後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留居した。得られた残差をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt, $1/0 \rightarrow 10/1$)により精製することで、TBS エーテル S1 (2.0 g, 57%) を白色結晶として得た。

 $R_f = 0.87$ (silica gel, 1:1-ethyl acetate/hexane); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 4.43 (1H, dq, J = 9.5, 6.0 Hz, H37), 3.62 (1H, dd, J = 3.0, 2.0 Hz, H35), 2.62 (1H, qd, J = 8, 3.0 Hz, H34), 1.79 (1H, dqd, J = 12.0, 7.0, 2.5 Hz, H36), 1.37 (1.5H, d, J = 7.5 Hz, H40), 1.32 (3H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.11 (1.5H, d, J = 7.5 Hz, H40), 0.96 (3H, d, J = 7.0 Hz, H39), 0.85 (9H, s, t-Bu-Si), 0.04 (6H, s, Me-Si); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 174.30, 74.53, 44.34, 44.04, 36.15, 27.07, 25.78, 24.20, 19.93, 16.62, 13.98, -4.42, -4.75; MS (ESI) m/z calcd for C₁₃¹³CH₂₈NaO₃Si [M+Na⁺] 296.1739, found: 296.1736.

Conversion of S1 to S2. CH₃NH(OMe)·HCl (3.4 g, 34.8 mmol)をジクロロメタン(40 ml) に溶解して 0 °C に冷却後、トリメチルアルミニウムのヘキサン溶液(1.0M, 45.2 mmol) を滴下ロートでゆっくりと加えた。30 分撹拌後、ジクロロメタン(30 ml)に溶かした TBS エーテル S1(1.9 g, 6.95 mmol)を滴下ロートでゆっくりと加えた。室温で 5 時間撹拌後、再び 0 °C に冷却し、飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて更に 5 時間撹拌した。その後、酢酸エチルで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留居し得られた残差を真空下で乾燥した後、ジクロロメタン (70 ml) に溶かした。そこにエチルビニルエーテル(13.4 ml, 140 mmol) および PPTS (874 mg, 3.48 mmol)を室温で加えて 2 時間半撹拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でクエンチした。ジクロロメタンで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶

媒を留居して得られた残差をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt, 5/1)により精製し、ワインレブアミド **S2** (2.3 g, 86% for 2 steps)を無色オイルとして得た。

 $R_f = 0.63$ (silica gel, 1:2-ethyl acetate/hexane); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 4.67 (0.5H, q, J = 5.0, H37), 4.63 (0.5H, q, J = 5.0 Hz, H34), 3.95-3.90 (1.5H, m, H35, H37), 3.78-3.74 (0.5H, m, H37), 3.68 (1.5H, s, N-OMe), 3.67 (1.5H, s, N-OMe), 3.58-3.52 (0.5H, m, EE), 3.47-3.36 (1.5H, m, EE), 3.18-3.12 (3.5H, m, N-Me, H34), 3.05 (0.5H, dq, J = 12.5, 5.5 Hz, H34), 1.92-1.89 (0.5H, m, H36), 1.77-1.71 (0.5H, m, H36), 1.26 (3H, d, J = 5.5 Hz, EE), 1.22 (1.5H, t, J = 7 Hz, H40), 1.16 (3H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.11 (1.5H, d, J = 6.0 Hz, H38), 1.03 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H38), 0.96 (1.5H, d, J = 7.5 Hz, H40), 0.89-0.87 (10.5H, m, H39, t-Bu-Si), 0.86 (1.5H, d, J = 1.5 Hz, H39), 0.04 (6H, m, Me-Si); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 177.83, 99.89, 98.79, 59.67, 43.13 26.26, 26.24, 20.71, 18.42, 16.53, 15.38, 15.34, 15.26, 13.88, 13.55, 12.63, 12.06, -3.67,-4.01, -4.05; MS (ESI) m/z calcd for C_{19}^{13} CH₄₃NNaO₅Si [M+Na⁺] 429.2842, found: 429.2832

Conversion of S2 to 53. ワインレブアミド S2 (2.3 g, 5.8 mmol) をジクロロメタン(60 ml)にとかし-78 °C に冷却した。そこに DIBAL (1.0 M, 17.4 ml)をゆっくりと加え一時間撹拌後、飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて 5 時間撹拌した。酢酸エチルで抽出後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し溶媒を留居した。得られた残差をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt, $1/0 \rightarrow 5/1$)により精製し、アルデヒド 53(1.4 g, 71%)を無色オイルとして得た。

 $R_f = 0.59$ (silica gel, 1:5-ethyl acetate/hexane); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.69 (1H, dd, J = 1.5, 1.5 Hz, CHO), 4.64 (1H, qd, J = 5.0, 5.5 Hz, EE), 4.26-4.23 (0.5H, m, H35), 4.16-4.13 (0.5H, m, H35), 3.88-3.81 (1H, m, H37), 3.61-3.52 (1H, m, EE), 3.47-3.39 (1H, m, EE), 2.55-2.52 (0.5H, m, H34), 2.48-2.44 (0.5H, m, H34), 1.98-1.93 (0.5H, m, H36), 1.91-1.87 (0.5H, m, H36), 1.26-1.23 (4.5H, m, H40, EE), 1.18-1.15 (3H, m, EE), 1.12 (1.5H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.06 (1.5H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.00 (1.5H, dd, J = 9.0, 6.5 Hz, H40), 0.87-0.83 (12H, m, H39, t-Bu-Si), 0.04 (3H, s, Me-Si), -0.04 (3H, s, Me-Si); MS (ESI) m/z calcd for C₁₇¹³CH₃₈NaO₄Si [M+Na⁺] 370.2471, found: 370.2496.

Conversion of 54 to 55. ホスホン酸ジメチル 54 (1.6 g, 4.0 mmol)を THF (20 ml)にとかし 0 °C に冷却した後、LHMDS (1.0 M, 6.4 ml)を加えて 10 分間撹拌した。その後、THF(20 ml)に溶かしたアルデヒド 53 (1.4 g, 4.0 mmol)をゆっくりと滴下し、一時間撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で反応をクエンチした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得られた残差をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt $1/0 \rightarrow 30/1$)で精製し、トリエン 55(1.7 g, 91%)を無色オイルとして得た。

 $R_{\rm f} = 0.70$ (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.69 (1H, dd, J= 11.2, 15.2, H29), 6.52 (1H, dd, J= 10.5, 14.9, H31), 6.23 (1H, ddd, J= 14.8, 11.2, 3.4 Hz, H30), 6.11 (1H, dd, J= 15.3, 10.5 Hz, H32), 6.0 (1H, m, H33), 5.84 (1H, d, J= 15.2 Hz, H28), 4.65 (1H, q, J= 5.0 Hz, EE), 4.20 (2H, q, J= 7.1 Hz, -OEt), 3.92 (1H, m, H37), 3.38-3.65 (3H, m, H35, EE), 2.50 (1H, m, H34), 1.93 (1H, m, H36), 1.86 (1H, m, H36), 1.32-1.24 (6H, m, -OEt, EE), 1.18 (4.5H, m, H40, EE), 1.08 (1.5H, d, J= 6.4 Hz, H38), 1.00 (1.5H, d, J= 6.4 Hz, H38), 0.85 (1.5H, m, H40), 0.83 (3H, m, H39), 0.87-0.83 (12H, s, t-Bu-Si), 0.04 (3H, s, Me-Si), -0.04 (3H, s, Me-Si); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 167.16, 144.70, 144.64, 144.33, 128.86, 128.77, 128.32, 128.16, 98.88, 98.26, 77.47, 77.21, 72.72, 71.39, 60.93, 60.21, 60.02, 53.40, 42.69, 41.90, 40.52 40.42, 40.17, 40.06, 26.23, 26.13, 21.05, 20.88, 18.55, 18.34, 16.76, 16.66, 16.23, 16.09, 15.92, 15.80, 15.69, 15.35, 14.31, 13.89, 13.84, 13.72, 11.60, 11.49, -3.64, -3.70, -3.93; MS (ESI) m/z calcd for C_{25}^{13} CH₄₈NaO₅Si [M+Na⁺] 492.3202, found: 492.3199.

Conversion of 55 to 32. トリエン 55 (1.0 g, 2.1 mmol)をジクロロメタンに溶かし-78 $^{\circ}$ C に冷却後、DIBAL (1.0 M, 8.5 mmol)をゆっくりと加えた。1 時間半撹拌した後、飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液で反応を停止し、更に4時間撹拌した。酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去した後、得られた残差を真空下で乾燥し、次の反応に用いた。クルードのアルコールをジクロロメタン(21 mL)に溶かし、デスマーチン試薬(1.4 g, 3.2 mmol)を0 $^{\circ}$ C で加えた。

室温で 1 時間撹拌した後、飽和チオ硫酸ナトリウムで反応を停止した。酢酸エチルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留居した後、シリカゲルクロマトグラフィー(hexane/AcOEt, $1/0 \rightarrow 15/1$)により精製することでトリエナール **32**(345 mg, 38% for 2 steps)を無色オイルとして得た。

 $R_{\rm f} = 0.55$ (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.53 (1H, d, J= 8.9, CHO), 7.11 (1H, dd, J= 13,3, 13,2), 6.23 (1H, dd, J= 10.0 Hz, 15.2), 6.35 (1H, m), 6.18-6.02 (2H, m), 6.40 (2H, m, EE), 3.90 (1H, m, H37), 3.62-3.39 (3H, m, H35, EE), 2.51 (1H, m, H34), 1.91 (0.5H, m, H36), 1.84 (1H, m, H36), 1.25 (3H, m, EE), 1.16 (4.5H, m, EE, H40), 1.06 (1.5H, dd, J= 6.2, 2.3 Hz, H38), 1.00 (1.5H, dd, J= 6.2, 2.3 Hz, H38), 0.92-0.81 (13.5H, m, tBu-Si, H40, H39), 20.12 (3H, s, Me-Si), -15.38 (3H, s, Me-Si); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 193.45, 152.28, 152.19, 151.96, 146.60, 146.25, 143.25, 143.12, 142.94, 130.76, 130.67, 128.72, 128.62, 128.27, 128.11, 99.17, 98.73, 98.13, 73.45, 72.54, 71.31, 60.81, 59.84, 59.72, 42.73, 41.81, 40.57, 40.44, 40.30, 40.15, 31.50, 26.12, 26.06, 26.02, 22.57, 20.96, 20.76, 20.70, 20.18, 20.06, 18.68, 18.43, 18.31, 17.19, 16.47, 16.16, 16.08, 15.89, 15.75, 15.65, 15.51, 15.28, 14.93, 13.74, 13.63, 13.57, 11.31, 10.58, 10.39, 8.86, -3.70, -3.79, -4.00; MS (ESI) m/z calcd for C_{23}^{13} CH₄₄NaO₄Si [M+Na⁺] 448.2940, found: 448.2939.

Conversion of 32 to 31. 13 C-ホスホン酸ジメチル 33(1.1 g, 2.36 mmol) を THF (24 ml) にとかし 0 $^{\circ}$ C に冷却した。そこに、LHMDS (1.0 m, 1.2 mmol)を加えて 10 分間撹拌した。その後、THF (5 ml)に溶かしたトリエナール 32 (500 mg, 1.2 mmol)を加え 45 分撹拌した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去 し得られた残差をフロリジルカラムクロマトグラフィー (hexane/AcOEt $^{1/0}$ →30/1)で精製し、C22-C37 セグメント 31 (505 mg, 54%)を黄色オイルとして得た。 $R_{\rm f}=0.65$ (hexane/AcOEt, $^{10/1}$); 1 H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 6.20-6.30 (10H, m, H21-H31), 6.06 (1H, m, H32), 5.77 (1H, m, H33), 4.66 (1H, m, EE), 3.95 (1H, m, 37), 3.68-3.57 (1H, m, EE), 3.50-3.39 (2H, H35, EE), 2.46 (1H, m, H34), 1.95 (0.5H, m, H36), 1.86 (0.5H, m, H36), 1.58-1.43 (6H, m, $^{\circ}$ -Bu-Sn), 1.37-1.25 (15H, m, $^{\circ}$ -Bu-Sn, EE), 1.22-1.16 (4.5H, m, EE, H40), 1.08 (1.5H, d, $^{\circ}$ -6.4 Hz, H39), 1.02 (1.5H, d, $^{\circ}$ -6.4 Hz, H39), 0.94-0.81 (22.5H, m, tBu-Si, $^{\circ}$ -Bu-Sn, H38, H40), 0.04 (3H, s, Me-Si), 0.01 (3H, s, Me-Si); 13 C NMR (100 MHz,

CDCl₃) δ 146.93, 135.91, 135.65, 133.65, 133.51, 133.41, 133.30, 133.30, 133.14, 132.87, 132.82, 132.72, 132.66, 132.45, 132.40, 132.16, 129.35 129.30, 128.05, 127.99, 98.89, 98.31, 77.71, 77.60, 72.83, 71.42, 60.93, 60.05, 42.42, 41.81, 40.01, 31.57, 29.08, 27.82, 27.27, 26.99, 26.15, 21.08, 20.93, 18.45, 18.40, 16.19, 15.85, 16.62, 15.34, 13.99, 13.69, 12.70, 11.70, 11.44, 11.23, 10.57, 10.47, 10.35, 9.53, -3.62, -3.75, -3.89, -3.95; MS (ESI) m/z calcd for $C_{39}^{13}C_2H_{76}NaO_3SiSn$ [M+Na+] 789.4550, found: 789.4559.

Conversion of 24 to S3. トルエン共沸により脱水した C1-C21 セグメント 24 (552 mg, 0.32 mmol)と C22-C37 セグメント(31) (505 mg, 0.66 mmol)およびジイソプロピルエチルアミン(0.58 ml, 3.2 mmol)を THF (25 ml)に溶かした。そこに、グローブボックス内で秤量したトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム(99 mg, 96 μ mol)とトリフェニルヒ素(97 mg, 0.28 mmol)の THF (32mL)溶液を 0 °C で加え、室温に昇温し終夜撹拌した。その後 THF を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5 酢酸エチル/ヘキサン、1:10-1:20 クロロホルム/メタノール、1%トリエチルアミン)で粗精製し、カップリング生成物 S3 (453 mg, impure)を得た。

Conversion of S3 to S4. 得られたカップリング生成物 S3 (450 mg)をメタノール(21 ml)と p-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタール(3.6 ml)に溶かし、PPTS(1.4 g, 6.3 mmol)を加えて遮光下室温で 4.5 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減

圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5 酢酸エチル/ヘキサン、1:10-1:20 クロロホルム/メタノール、1%トリエチルアミン) で粗精製し、セコ酸(499 mg, impure)を黄色無定形固体として得た。

Conversion of S4 to S5. セコ酸 S4(499 mg)をジクロロメタン(50 ml)に溶かし、そこにグローブボックス内で秤量した 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物(475 mg, 1.4 mmol)と DMAP (337 mg, 2.8 mmol)のジクロロメタン(190 ml)溶液を一時間半かけて滴下した。室温で更に 2 時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0:1-1:10 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 メタノール/クロロホルム) で精製し、マクロラクトン S5 (171 mg, 35% for 3 steps)を黄色無定形固体として得た。

 $R_{\rm f}$ = 0.52 (hexane/AcOEt, 4/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (2H, d, J= 7.5 Hz, Fmoc), 7.59 (2H, m, Fmoc), 7.37-7.32 (6H, m, Fmoc, MP), 7.27 (2H, t, J= 7.5 Hz, Fmoc), 6.81 (4H, dd, J= 20.5, 8.5 Hz, MP), 6.43 (0.5H, m, H26), 6.22-6.01 (11.5H, m, H21-32), 5.73 (1H, dd, J= 14.5, 6.6 Hz, H20), 5.54 (1H, dd, J= 14.8, 9.2 Hz, 33H), 5.44 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.39 (1H, s, 9, 11-MP acetal), 5.32 (1H, d, J= 6.0 Hz, SEM), 5.24 (1H, d, J= 6.0 Hz, SEM), 4.90 (2H, d, J= 9.9 Hz), 4.40-4.46 (2H, m), 4.32-4.37 (1H, dd, J= 10.5, 6.6 Hz), 4,15-4.25 (3H, m), 3.85 (1H, m), 3.78 (6H, s, -OMe), 3.59-3.74 (3H, m,), 3.35 (1H, t, J= 9.5 Hz), 3.29 (1H, m), 3.02 (3H, s, -OMe), 2.61 (1H, dd, J= 17.4, 7.0 Hz, H16), 2.34 (2H, t, J= 10.5 Hz, H2), 2.20-2.52 (2H, m), 1.96 (1H, m), 1.75-1.84 (3H, m), 1.55-1.70 (5H, m), 1.23 (3H, d, J= 6.5 Hz, H6'), 1.20 (3H, d, J= 6.5 Hz, 38Me), 1.14 (1.5H, d, J= 6.9 Hz, H40), 0.95 (3H, d, J= 8.7, H39), 0.91, 0.90, 0.87, 0.83, 0.75 (46.5H, s, TBS, SEM, H40), 0.11--0.14 (41H, TBS, SEM); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.26, 169.71, 159.71, 159.61, 155.51, 144.02, 143.96, 141.36, 135.86, 133.63, 133.51, 133.32, 133.14, 132.74, 132.46, 132.20, 131.94, 131.73, 131.29, 131.21, 130.26, 127.62, 127.34, 126.96, 124.93, 119.89, 113.46, 113.25, 100.57, 100.17, 99.98, 97.89, 89.73, 80.21, 77.20, 75.29, 73.83, 73.44, 72.50, 72.34, 72.27, 72.20, 68.21, 68.78, 66.95, 66.66, 57.06,

 $56.06, 55.24, 47.99, 47.19, 43.03, 42.42, 40.66, 37.08, 36.01, 32.22, 31.84, 30.34, 28.91, 26.97, 26.08, 25.98, 25.75, 25.61, 18.84, 18.38, 18.31, 18.24, 18.11, 17.98, 17.82, 17.70, 14.02, 10.94, -1.44, -3.96, -4.03, -4.17, -4.26, -4.39, -4.43, -4.56, -5.14, -5.33; MS (ESI) m/z calcd for <math>C_{113}^{13}C_2H_{181}NNaO_{22}Si_6$ [M+Na⁺] 2121.1656, found: 2121.1663

Conversion of S5 to S6. テフロンチューブにマクロラクトン S5 (85 mg, 40 μ mol)を移し、メタノール(2.0 mL)を加えた。室温で 18% HF-ピリジン(1.6 ml)を滴下し、その後 50 度に昇温して 39 時間攪拌した。反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中に滴下して反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣を ODS カラム (0:1-1:0 メタノール/ H_2O) で粗精製し、黄色固体を得た。

得られた粗成生物(83 mg)をジクロロメタン(4.0 ml)に溶かし、ピペリジン(122 μ l, 1.24 mmol)を加えて室温で 4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0:1-1:0 メタノール/クロロホルム) で粗精製し、Fmoc 脱保護体 **S6** (72 mg, impure)を黄色固体として得た。

Conversion of S15 to 26,40-¹³C₂-AmB 6. Fmoc 脱保護体 S6 (72 mg)をメタノール(2.6 ml)に溶かし 0° C に冷却後、濃塩酸(327 μ l)を滴下し、 0° C で 20 分攪拌した。炭酸水素ナトリウム(409 mg)を加えて反応を停止し、pH が 7 付近になったことを確認し、濾過した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を t-ブタノール(3.2 ml)と H_2 O (0.8 ml)に溶かし、そこへ濃塩酸(163 μ l)を加え、 0° C で 5 時間攪拌した。反応液を ODS のオープンカラム(0:1-1:0 メタノール/ H_2 O)にチャージして粗精製することで黄色固体を得

た。それを HPLC により再精製し、単一の $26,40^{-13}$ C₂-AmB **23** (2.5 mg, 7% for 4 steps)を 黄色固体として得た。

 $R_{\rm f}=0.10$ (CHCl₃/MeOH, 5/1); ¹H NMR (600 MHz, $d_{\rm 6}$ -DMSO/ $d_{\rm 4}$ -MeOH,=1/2) δ 6.60-6.17 (13H, m, H21-H33), 6.13 (1H, dd, J= 8.9, 14.6 Hz, H20), 5.49 (1H, dd, J= 11.06, 10.6 Hz, H33), 5.40 81H, m, H37), 4.65 (1H, m, H1'), 4.49 (1H, m, H19), 4.43-4.38 (2H, m, 11H, 17H), 4.02 (1H, br, 3H), 3.92 (1H, m, 15H), 3.78 (1H, m, H2'), 3.71 (1H, m, H5), 3.64 (1H, m, H9), 3.34-3.17 (4H, m, H5', H35, H8, H4'), 2.43 (1H, m, H34), 2.27 (1H, H18), 1.99 (1H, m, H14), 1.84 (1H, m, H39), 1.80-1.35 (12H, m), 1.31 (3H, d, J= 5.5 Hz), 1.26 (1.5H, J= 6.2 Hz, H40), 1.25 (3H, d, J= 7.1 Hz, H38), 1.07 (1.5H, d, J= 6.2, H40), 1.05(3H, d, J= 7.1 Hz, H39); ¹³C NMR (150 MHz, $d_{\rm 6}$ -DMSO/ $d_{\rm 4}$ -MeOH,=1/2) δ 134.61, 18.98 (labeled carbon); MS (ESI) m/z calcd for C_{45} ¹³ C_{2} H₇₃NNaO₁₇ [M+Na⁺] 948.4843, found: 948.4846

謝辞

本研究を行うにあたり、大変多くの方々の御指導、御協力を賜りましたことに対し、 ここに感謝の意を表明させていただきます。

本研究は大阪大学大学院理学研究科化学専攻生体分子化学研究室で行われたものであり、大変興味あるテーマを与えてくださると共に、終始御指導、御啓発くださいました村田道雄教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたって直接ご指導および数々のご助言を賜りました、九州大学大学院理学研究院理学府化学専攻、松森信明教授および大阪大学大学院理学研究科 JST-ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト、梅川雄一助教に深く感謝いたします。

また、研究における多大なるご助言のみならず、日常生活においても様々なご助言 をくださいました花島慎也講師、土川博史助教に深く感謝いたします。

研究の進め方から、直接のご指導および様々なご助言を下さいました、山口敏幸博士に深く感謝いたします。また、数多くの有意義なご助言を頂きました九州大学大学院理学研究院理学府化学専攻、大石徹教授、大阪大学大学院理学研究科 JST-ERATO村田脂質活性構造プロジェクト 松岡茂准教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、貴重な標識体を提供してくださいました松下直広博士に深く感謝いたします。

その他研究のみならず、日常生活においても多くのご助言とご協力をくださいました本研究室の皆様にも深く感謝いたします。

最後に経済的、精神的に支えてくださいました両親、姉に深く感謝いたします。

本研究が多くの方々のご協力によって成し遂げられたものであることをここに銘 記し、お世話になったすべての方に厚く御礼申し上げます。