



Title	分子内構造情報に着目したアンフォテリシンBチャンネル複合体の構造解析
Author(s)	山本, 智也
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61512">https://doi.org/10.18910/61512</a>
rights	Reproduced in part with permission from Yamamoto T., Umegawa Y., Yamagami M., et al. The Perpendicular Orientation of Amphotericin B Methyl Ester in Hydrated Lipid Bilayers Supports the Barrel-Stave Model. <i>Biochemistry</i> 58, 2282 (2019); <a href="https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00180">https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00180</a> . Copyright 2019 American Chemical Society.
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

分子内構造情報に着目した  
アンフォテリシン B チャネル複合体の構造解析

平成 28 年度

学位論文

山本 智也

化学専攻

大阪大学大学院理学研究科





## 目次

### 第一章 序論

1-1	細胞膜に作用する天然物	-1-
1-2	抗真菌剤	-1-
1-3	アンフォテリシン B	-3-
1-4	AmB-ステロール複合体の全体像	-7-
1-5	相互作用の推定	-9-
1-6	固体 NMR による構造解析	-16-
1-7	AmB チャネル複合体への固体 NMR の適用	-21-
1-8	研究目的	-27-
	参考文献	-29-

### 第二章 ポリオール部分の構造活性相関研究

	緒言	-35-
2-1	ポリオール部分 7 位の構造改変	-35-
2-2	抗菌、溶血活性試験	-38-
2-3	K <sup>+</sup> イオン透過活性試験	-42-
2-4	各類縁体の立体配座の探索	-40-
2-5	考察	-44-
2-6	本章のまとめ	-48-
	実験項	-50-
	参考文献	-56-

### 第三章 <sup>2</sup>H、<sup>19</sup>F NMR による脂質膜中における AmB の配向解析

	緒言	-58-
3-1	固体 NMR による配向解析	-60-
3-2	新規誘導体の調製と活性評価	-64-
3-3	新規標識体の活性評価	-65-
3-4	化学シフト異方性 (CSA) テンソル情報の取得	-68-
3-5	リポソーム中における 14β-F-d <sub>3</sub> -AME の NMR スペクトル	-71-
3-6	配向解析	-73-
3-7	考察	-78-
	実験項	-82-
	参考文献	-91-

第四章	$\beta$ グリコシド結合の配座解析	
	緒言	-94-
4-1	マイコサミン部分の配向解析に向けた戦略と新規標識体の合成経路	-95-
4-2	19-d <sub>1</sub> -1'- <sup>13</sup> C-AmB の合成経路検討	-97-
4-3	<sup>13</sup> C{ <sup>2</sup> H} REDOR	-103-
4-4	19-d <sub>1</sub> -1'- <sup>13</sup> C-AmB のリボソーム中における <sup>13</sup> C NMR 測定	-108-
4-5	距離測定と二面角の推定	-110-
4-6	REDOR 測定より推定される配座	-113-
4-7	本章のまとめ	-117-
	実験項	-119-
	参考文献	-144-
第五章	結論	-146-
	スペクトルの部	-148-
	謝辞	-214-

## 略語表

AmB	Amphotericin B
AME	Amphotericin B methylester
BCECF	2',7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein
CMP	2-chloro-6-methylpyridine
CMPT	2-chloro-6-methylpyridinium trifluoromethanesulfonate
COARSE	Centerband-only analysis of rotor unsynchronized spin echo
CODEX	Centerband-only detection of exchange
CSA	Chemical Shift Anisotropy
DCPC	1,2-dicapryloyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> benzoquinone
DFT	Density functional theory
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMSO	Dimethylsulfoxide
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Erg	Ergosterol
FCCP	Carbonyl cyanide- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazone
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
GB/SA	Generalized Born/surface area
GIAO	Gauge including atomic orbital
HETCOR	Heteronuclear correlation experiment
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Hetero-nuclear single quantum coherence
LUV	Large unilamellar vesicle
MCMM	Monte Carlo multiple minimum
MAS	Magic Angle Spinning
MD	Molecular Dynamics
MLV	Multilamellar vesicle
MP2	second-order Møller-Plesset
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	NOE correlated spectroscopy
PBS	Phosphate buffered saline

PC	Phosphatidylcholine
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
REDOR	Rotational echo double resonance
RMSD	Root mean square deviation
SEM	2-(trimethylsilyl)-ethoxymethyl
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TES	triethylsilyl
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin-layer chromatography
TMS	trimethylsilyl
UV	Ultraviolet
VDW	van der Waals

## 第一章 序論

### 1-1 細胞膜に作用する天然物

天然には細胞膜に直接作用して活性を示す有機小分子化合物が多く存在し、それらの活性は分子の自己会合および膜構成低分子との相互作用によって規定される。ポリエンマクロライド系抗生物質や膜結合ペプチドに代表されるこれらの化合物は抗菌および抗真菌活性を有するものが多い。これらの化合物は細胞膜に直接作用することで活性を示すため、耐性菌が出現し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、これらの化合物は臨床に多く使われている。一方で、細胞膜中で形成される低分子複合体は、その形成に寄与する相互作用が弱く、複合体構造自体が剛直でないために非結晶性である。よってこれらの複合体構造に対し、X線結晶構造解析を適用することができない。また、細胞膜のような異方的環境を持つため、従来分子の複合体構造を解析するために用いられてきた溶液 NMR の適用も難しい。これらの構造解析手法が適用できないために、脂質膜中で形成される低分子複合体の活性発現機構や複合体形成に必須である相互作用を推定することは困難であり、研究が遅れている。よって、脂質膜中における低分子複合体に関する研究は構造活性相関研究や MD 計算のほか、UV, IR, CD スペクトルなどの簡略な分光学的手法が主に用いられている。

### 1-2 抗真菌剤

カンジダ症や侵襲性アスペルギルス症に代表される深在性真菌症は、真菌類が血液、肺、肝臓、腎臓等に感染することで引き起こされる。これら感染症は、HIV 感染、ステロイド投与、好中球減少症、臓器移植等の免疫力が低下する要因により、日和見感染として発症することが多い。真菌類は真核生物であり、ヒトの細胞膜と真菌細胞膜との違いは、細菌と比較してはるかに少なく、細胞壁の有無と細胞膜に含まれるステロールの違いなどに限られている。よって、体内に感染した真菌に対して選択的に働く化合物は少なく、真菌症の治療薬は限られている。

深在性真菌症の治療は抗真菌薬の静脈投与によって行われる。抗真菌薬は前述したヒト細胞と真菌細胞との違いを認識する分子が用いられ、アゾール系、キャンディン系、ピリミジン系、ポリエン系の4つに分類される。これらのうち、アゾール系抗真菌薬はエルゴステロールの生合成阻害、キャンディン系抗真菌薬は真菌細胞壁の合成阻害、ピリミジン系抗真菌薬は RNA, DNA 合成の阻害を

引き起こすことで活性を発現する (図 1-1)。一方でこの 3 者は抗菌スペクトラムの狭さや耐性菌の出現に問題がある<sup>1,2</sup>。アンフォテリシン B やナイスタチン等のポリエン系抗真菌剤は、真菌の細胞膜に含まれるエルゴステロールとの会合により活性を示すことが知られている (図 1-2)。標的タンパク質を持たないことから、耐性菌が出現しにくいこと、幅広い抗菌スペクトラムを示すことなどの特徴があり、真菌感染症の最終防衛線として重用されている。

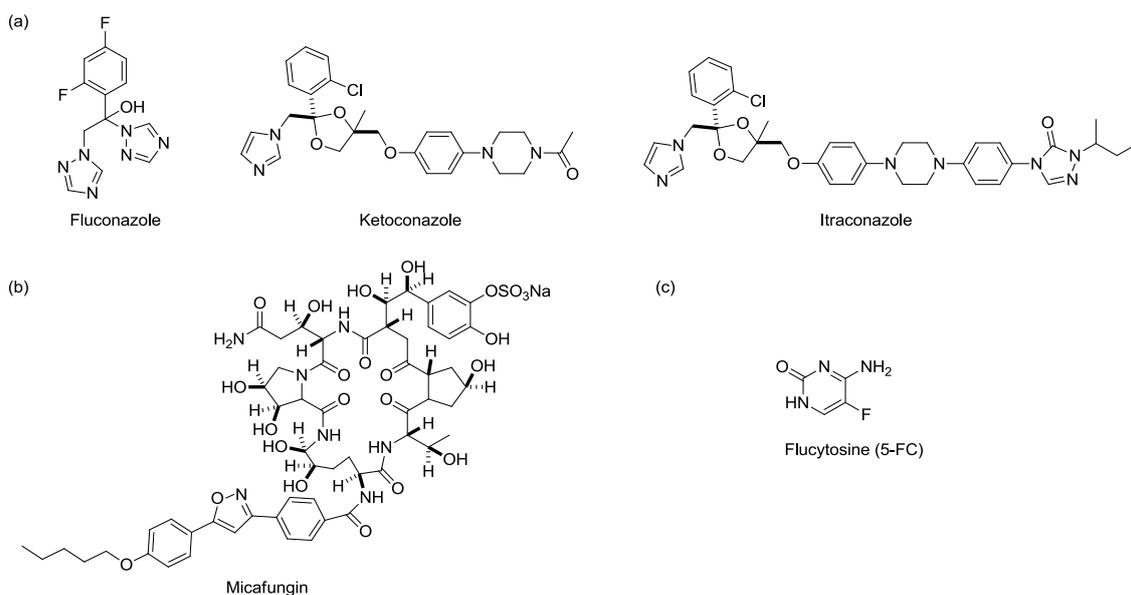


図 1-1 (a) アゾール系、(b) キャンデイン系、(c)ピリミジン系抗真菌薬

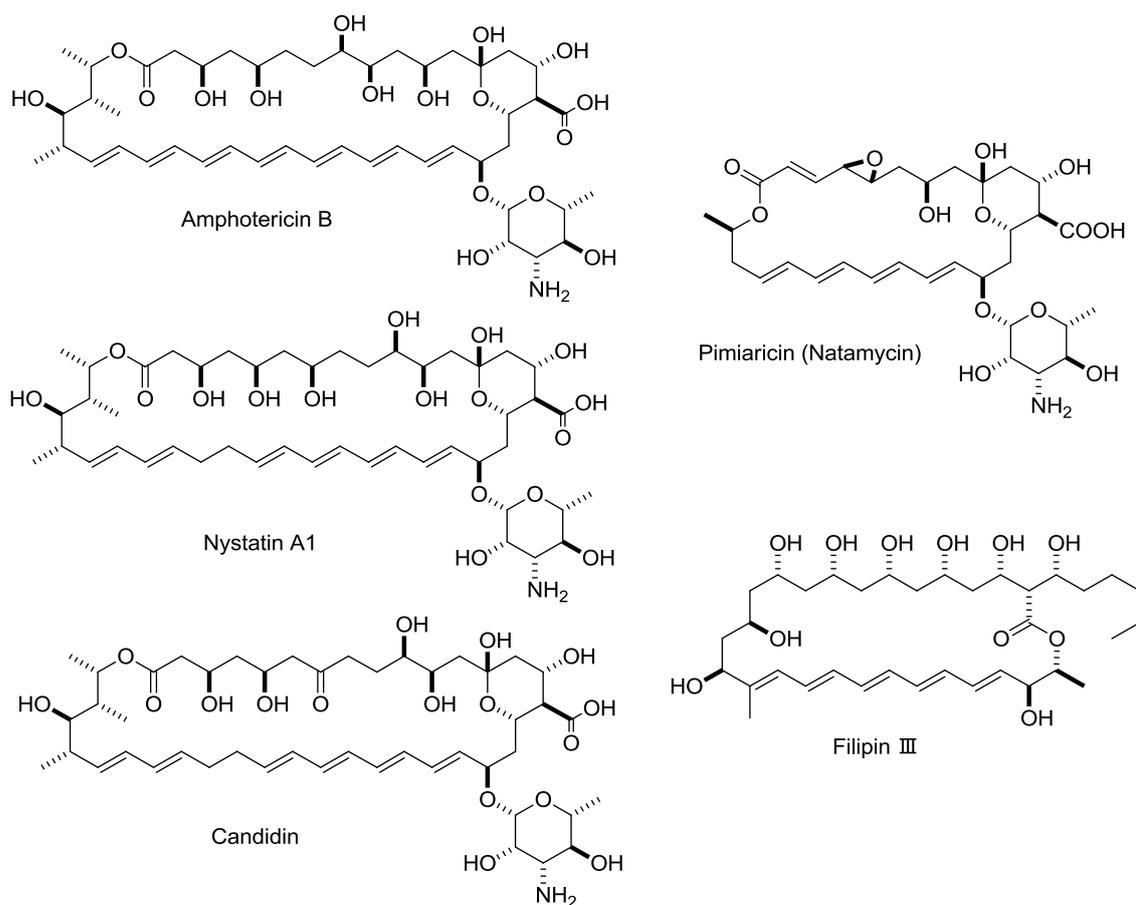


図 1-2 ポリエン系抗真菌剤

一方で、このポリエン系抗真菌剤のステロール選択性は十分ではなく、ヒトの腎臓毒性などに代表される重篤な副作用を示すことも知られている。また、近年は *Candida auris* に代表される新型多剤耐性真菌の出現が報告されており、真菌症治療法の改善は重要である<sup>3</sup>。一方でこのポリエン系抗真菌剤は、低分子同士の場合により活性を示すために、分子レベルでの作用機構を解明することは難しく、副作用の軽減等、薬剤としての機能の改善が遅れている。これらのことより、ポリエン系抗真菌剤の作用機構をより基礎化学的な見地から研究し、その活性構造を明らかにすることは重要であるといえる。

### 1-3 アンフォテリシン B

アンフォテリシン B (AmB、図 1-3a)<sup>4,5</sup> はベニズエラのオリノコ川流域で分離された放線菌 *Streptomyces nodosus* より生産されるポリエンマクロライド系抗真菌剤で、1955 年に初めて文献に記載された<sup>6</sup>。更に 1959 年には感染症治療への適用例が報告されている<sup>7</sup>。当初より、前述したステロール選択性の低さによる

副作用や、水への溶解度が低いことが臨床への適用の問題となっていたが、AmBを脂質分子または界面活性剤と共に可溶化する手法によってこれらの問題は改善され、臨床に広く用いられている<sup>4,5</sup>。

AmBの化学構造は、*N*-iodoacetyl-AmBへの誘導化の後、結晶X線回折法より決定された<sup>8</sup>。AmBは、38員環マクロライドにマイコサミンが結合した構造を有する。そのマクロライドの片側には疎水性のヘプタエン部分を持ち、もう片側には親水性のポリオール部分を持つ。また、マイコサミンはアミノ基を持つ親水性部分である。AmBは、この両親媒性の構造から膜に作用することで活性を示すことが考えられてきた。

また、AmBがステロール含有膜特異的に活性を示すことが古くから示されている。AndreoliらはAmBの添加量依存的に脂質膜の電気抵抗が低下することを明らかにした<sup>9</sup>。また、この電気抵抗の低下がステロール含有膜で顕著であることから、AmB-ステロール間の相互作用によって、AmBがイオン透過性を示すことが示唆された。このイオン透過性は後の詳細な研究により、イオンのサイズや価数に依存的であることが示されている<sup>10</sup>。さらに、AmB 1分子が0.7分子という比較的少ないステロールと会合していることやAmB-ステロール間の相互作用が疎水性相互作用によるものであること<sup>11</sup>、AmBのイオン透過性がAmB濃度依存的であることも他の研究によって示されている<sup>12</sup>。

これらの情報を基にDe Kruijffらは、アンフォテリシンBの活性発現機構として、樽板型モデルを提唱した<sup>13</sup>。この樽板型モデルはアンフォテリシンBとステロールが膜中で環状に並び、チャンネル複合体を形成するというモデルである。アンフォテリシンBのヘプタエン部分がVDW相互作用によりステロールと会合し、親水性であるポリオール部分がチャンネルの内側を向くことにより、チャンネル複合体構造が安定化される。また、脂質膜の疎水性部分の厚さはAmBの疎水性部分の長さに比べて大きいため、De Kruijffらの樽板型モデルでは、AmBは二分子長で膜を貫通するチャンネルを形成すると考えられていた。現在でもAmBの膜貫通様式について明確な情報は得られておらず、図1-3bには一分子貫通型の樽板型チャンネルモデルを示した。また、1976年にAmBの単一チャンネルの開閉がvoltage clamp法により観測され、樽板型チャンネルモデルが支持される一因となった<sup>14</sup>。

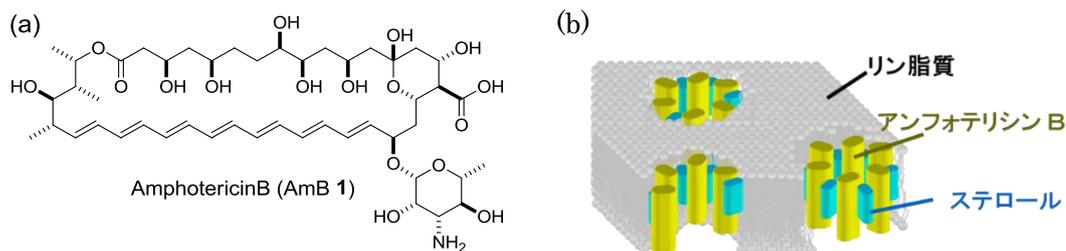


図 1-3 (a)アンフォテリシン B の化学構造。親水性のポリオール部分とマイコサミン部分、疎水性のヘプタエン部分を持つ両親媒性分子である。(b) 樽板型モデル。親水性部分が膜表面やチャンネル内部に存在することで、水やイオンが通過できるチャンネルを形成できると考えられている。また膜中におけるステロール親和性から、ステロールと相互作用してチャンネルを形成するモデルが提唱された。

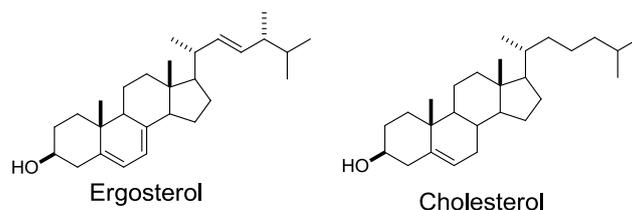


図 1-4 エルゴステロールとコレステロール。このステロール構造の違いを認識して、真菌に対する選択毒性を示す。

AmB の真菌に対する選択毒性は、真菌とヒトの細胞膜に含まれるステロールの種類に起因すると考えられている。真菌の細胞膜はエルゴステロールを有するのに対し、ヒトの細胞膜はコレステロールを有する (図 1-4)。AmB はエルゴステロールと選択的に会合することから、選択毒性を示すと考えられている。このように選択毒性が説明できることから樽板型モデルは広く支持されている。一方で、この選択毒性は不完全であり、AmB は腎毒性などの重篤な副作用を引き起こす。Bittman らによって報告されたステロール含有卵黄ホスファチジルコリン (EggPC) リポソームに対する親和性評価では、25%コレステロール含有膜における結合定数が  $K_a=6.9 \pm 1.1 \times 10^{-5}$  であるのに対し、25%エルゴステロール含有膜では  $K_a=5.2 \pm 1.4 \times 10^{-4}$  であり、結合親和性の差は 10 倍程度である<sup>15</sup>。また他のグループによる報告でも親和性の差は 15~17 倍程度であり、ステロール選択性は十分に高いとは言えない<sup>16,17</sup>。

AmB の副作用との関連で、コレステロール膜中において異なる構造のチャネ

ルが形成されることが示唆されている。Cohen らの電気化学的測定による研究<sup>18-21</sup>ではイオン選択性の異なる2種類のチャネルの存在を見出しており、1価カチオン等の小さなイオンのみを通す **non-aqueous pore** とグルコース程度の大きさの物質を透過させる **aqueous pore** が存在すると考えている。エルゴステロール膜では **aqueous pore** が形成されやすいことから、**aqueous pore** はエルゴステロールと共に形成される内径の大きなチャネルであり、**non-aqueous pore** は AmB のみによって形成される内径の小さなチャネルであるとしている。よって、AmB のステロール選択性の低下はステロールを含まない **non-aqueous pore** の形成に由来すると考えられる。このモデルは、梅川らによる固体 NMR の研究からも支持されている<sup>22</sup>。

さらに近年は、この樽板型モデルとは異なるステロール認識機構や活性発現機構が提唱されている。Burke らのグループは AmB の新たな活性発現機構として「ステロールスポンジモデル」を提唱している<sup>23,24</sup> (図 1-5)。このモデルでは AmB が膜表面に結合し、膜中のエルゴステロールを引き抜くことで膜の物理的性質を変化させることによって薬理活性を示すとされている。AmB が低濃度の条件ではイオンチャネルとして働く一方<sup>25</sup>、AmB が高濃度の条件においてステロールスポンジの存在を観測しており、このステロールスポンジの形成が活性に重要であると報告している。この仮説は中性子散乱による研究にも支持されている一方で<sup>26</sup>、チャネル複合体形成を前提とした抗真菌活性のメカニズムは多く研究が成されている他、Burke がチャネル複合体を形成するとした低濃度において抗真菌活性が認められることからステロールスポンジモデルを疑問視する向きもある<sup>18,27</sup>。抗真菌活性にどちらのモデルが寄与しているのかについて明白な実験的根拠はまだ得られていないが、チャネル複合体は真菌の生存に一定の影響を与えるものと考えられる。

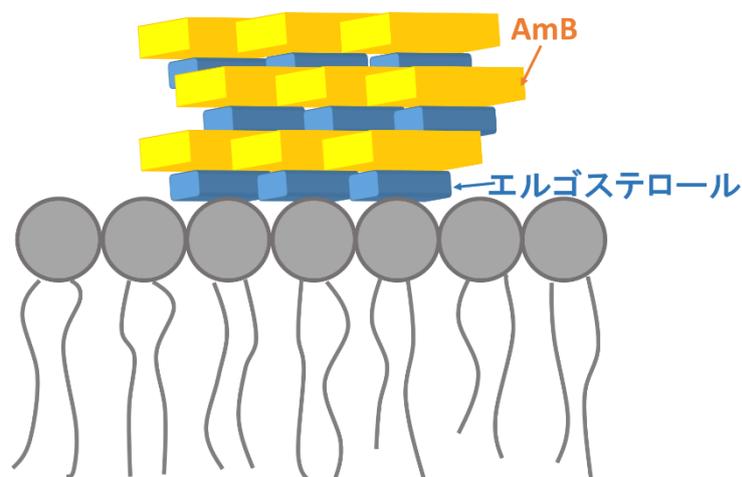


図 1-5 Burke らによって提唱されたステロールスポンジモデル。膜中のエルゴステロールを膜外に引きぬくことで、膜の物性を変化させ、細胞の生存に影響を与える。

#### 1-4 AmB-ステロール複合体の全体像

脂質膜中における分子複合体の構造解析は、非結晶性や異方的環境を持つといった特徴が障害となって非常に困難である。よって AmB チャンネル複合体についてはこれまで、活性試験や MD 計算、分光学的測定手法によってチャンネル複合体の大まかな構造を推定されていたに過ぎない。

AmB のチャンネル内径は、チャンネルを透過する分子の大きさから推定されてきた。Andreoli や De Kruijff らの実験ではチャンネルを介した分子の拡散速度を測定し、チャンネルを透過する分子の大きさは最大でもグルコース程度であると報告した<sup>9,10</sup>。また、Katsu らは電気化学的な測定手法を用いて、大きさの異なる電解質についてチャンネル透過活性を測定し、チャンネル内径を  $7.1 \pm 0.1 \text{ \AA}$  と見積もっている<sup>28</sup>。また、Hirano らは、チャンネル複合体を形成する AmB の会合分子数は AmB-dimer の単一チャンネル電流から、6 分子であると推定している<sup>29</sup>。

AmB-脂質膜間の hydrophobic mismatch の存在から、AmB の 1 つのチャンネル、もしくは、2 つのチャンネルが重なって膜を貫通しているかについても議論が行われてきたが、未だ明確な答えは得られていない。当研究室の松岡らは組成の異なる脂質膜における AmB のチャンネル活性を測定し、脂質のアシル鎖長と活性の関係について考察した。その結果、アシル鎖の短い 1,2-dicapryloyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DCPC) 等のリン脂質を含む脂質膜ほどチャンネル活性が大きくなることが明らかとなった<sup>30</sup>。このことから、AmB は single-length channel を形成すると予想された。この後に、松岡らは [tri-<sup>13</sup>C]-AmB-リン脂質間の <sup>13</sup>C{<sup>31</sup>P}

REDOR を測定した<sup>31</sup>。この測定では DMPC 膜中において AmB の 39, 40, 41 位の <sup>13</sup>C NMR ピークの減衰が見られたのに対し、アシル鎖の長い DSPC 膜中では 41 位においてのみピークの減衰が見られた。このことより AmB チャンネル複合体は pure-DMPC 膜より薄い脂質膜では 1 分子長チャンネルを形成するのにに対し、ゲル状態の DSPC のような厚い脂質膜中では膜の片側の leaflet にのみ存在するか、2 分子長チャンネルを形成すると考えられる。また、DMPC 膜の系では hydrophobic mismatch を防ぐために、DMPC が指組み構造を取っていると考えられる。一方でこの測定はエルゴステロールを含まない脂質膜において行っており、ステロールが膜貫通様式にどのように影響を与えるかについては明らかとなっていない。

チャンネル複合体中における AmB 同士の距離情報は可視光吸収および蛍光測定により求められている。Gruszecki らのグループは様々な条件におけるヘプタエン部分の可視光吸収および蛍光を解析し、AmB-AmB 間の分子間距離や会合体数を予測した<sup>32-34</sup>。可視光吸収や蛍光発光を示す分子のクロモフォア(発色団)の励起状態のエネルギー準位分裂はクロモフォア間距離に依存することから、Gruszecki らは膜中における分子複合体について分子間距離を 4.8 Å と見積もっている<sup>32</sup>。また、可視光吸収や蛍光スペクトルから得られるモノマー/会合体比の温度依存性を van't Hoff プロットに代入し、会合分子数を 4 分子と見積もっている<sup>34</sup>。しかし、この場合のチャンネル内径は 1~2 Å となり、上に示した結果と矛盾する。また、脂質膜中環境を反映していない条件で測定を行っている点も問題である。

また、計算化学によるチャンネル構造の推定も多く行われている。Baginski らは長年にわたり、AmB のチャンネル構造を計算化学によって研究している。チャンネル複合体の全体像については、2002 年、DMPC 膜中に AmB 8 分子とステロール 8 分子で形成される複合体構造を分子動力学計算により推定している (図 1-6)<sup>35</sup>。この研究では、コレステロール膜中に比べて、エルゴステロール膜中でのチャンネル複合体のほうが分子間水素結合により安定化されていることがわかっている。一方で、このような計算化学的手法によって得られる複合体構造は初期配座や計算条件に依存するため、実験的に得られる情報との比較が必要である。

以上述べたようにチャンネル複合体の全体像を求める研究は様々な手法を用いて行われているが、実験条件の限界や得られる情報の不明瞭さから、確信的な情報を得るには至っていない。

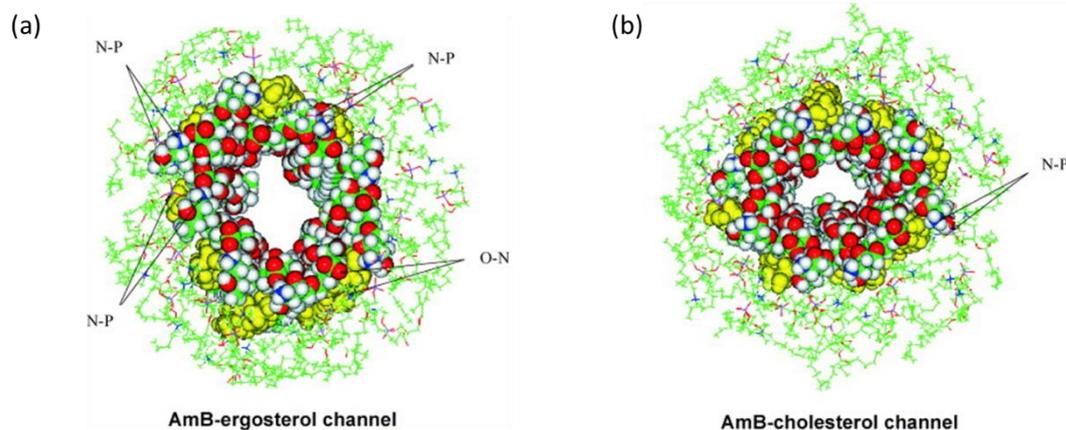


図 1-6 Baginski らの分子動力学計算<sup>35</sup>により計算された(a)エルゴステロール膜中でのチャンネル構造と(b)コレステロール膜中でのチャンネル構造。Reprinted from *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1567*, 63–78. Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. Comparative molecular dynamics simulation of amphotericin B-cholesterol / ergosterol membrane channels. Copyright (2002), with permission from Elsevier.

### 1-5 AmB の脂質二重膜における相互作用の推定

AmB チャンネル複合体の形成機構を理解する上で、AmB の特定の官能基がどのように相互作用し、活性やステロール選択性にどのように寄与しているかという相互作用の情報は重要である。これらの情報を直接的に測定することは困難であるが、計算化学や構造活性相関研究を用いて、相互作用を間接的に推定することは可能である。これらの手法を用いて、これまでに AmB の特徴的な官能基について、その活性やステロール選択性への寄与が調べられてきた。

#### 1-5-a ヘプタエン部分

AmB のヘプタエン部分は過去の MD 計算等の研究より、疎水性部分としてエルゴステロールやリン脂質と VDW 相互作用をすると考えられてきた<sup>36</sup>。

これまでにヘプタエン部分の構造を変化させた AmB 類縁体について活性試験が行われ、相互作用が推定されてきた。ヘプタエン部分の C28-C29 結合が単結合となっている Amphotericin A<sup>37</sup> やヘプタエン部分をビフェニルリンカーに置換した類縁体の活性は AmB に比べて大きく低下している<sup>38</sup>。このことから、AmB のヘプタエン部分の剛直性や平面性が活性に重要であることが示唆されて

いる。

近年、当研究室の中川らは炭素環および側鎖部分の構造を変化させたステロール誘導体と AmB の親和性測定を行い、ヘプタエン部分—ステロール相互作用について考察している (図 1-7) <sup>39,40</sup>。種々のステロールを含有した脂質膜におけるイオンチャネル活性試験および表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定の結果では、炭素環の平面構造と側鎖部分の配座自由度の低下が活性に重要であることが明らかとなった。特に、ステロール炭素環部分の構造については、ステロール 7 位の構造が活性に大きく寄与しており、7 位が  $sp^3$  炭素である場合に、7 位水素原子とヘプタエン部分の相互作用が AmB ステロール複合体の安定性を低下させるということが明らかとなった。これにより AmB ヘプタエン部分—エルゴステロール間の VDW 相互作用が活性に重要であることが示唆された。

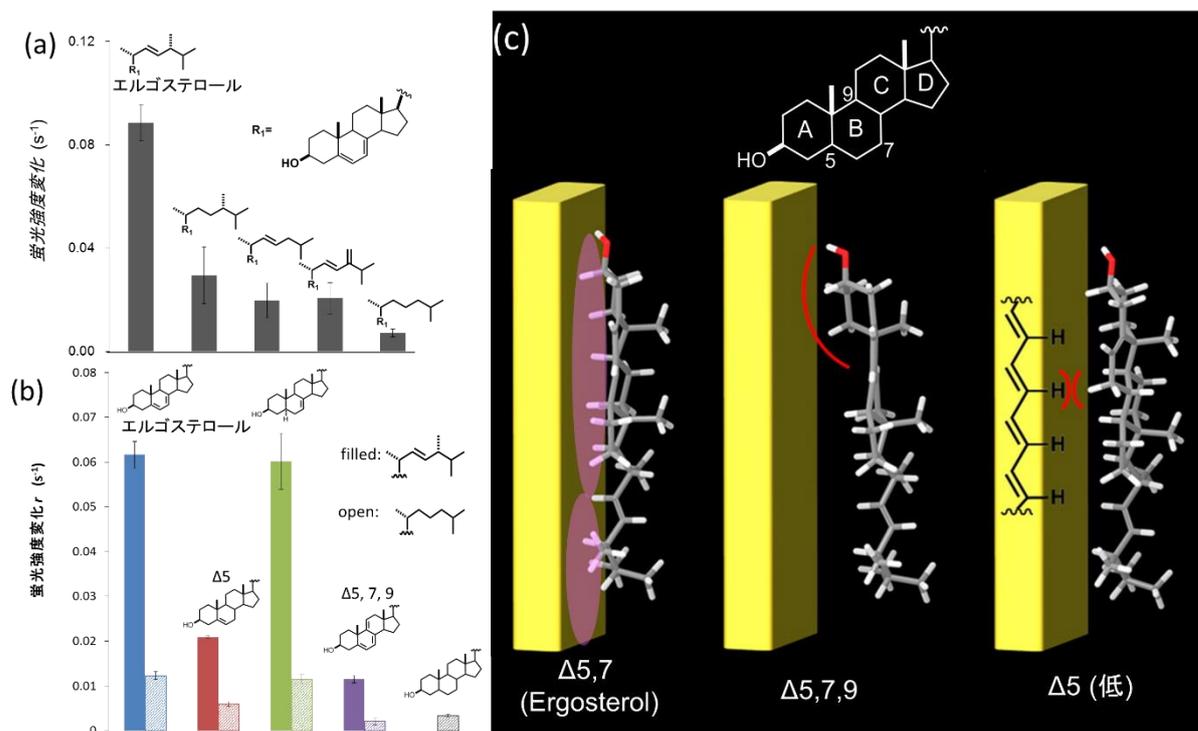


図 1-7 (a)側鎖部分および(b)骨格部分を変化させたステロール誘導体と AmB の親和性測定。 (c)親和性測定より推定されるヘプタエン-ステロール間相互作用。側鎖部分の固定と骨格部分の平面性による VDW 相互作用の増加が活性に重要であることが示唆された。

### 1-5-b ポリオール部分

ポリオール部分は親水性部分としてチャンネル内孔に存在し、水分子やイオンがチャンネルを透過しやすくすると考えられてきた<sup>41</sup>。一方で近年ではポリオール部分に関する構造活性相関研究やMD計算等の結果から、ポリオール部分は透過物と作用する親水性部分としての役割だけでなく、分子間水素結合などによってチャンネル構造を安定化させていると考えられている<sup>34</sup>。

ポリオール部分の配座は分子動力学計算により推定されている。Baginski らによる分子動力学計算では、ポリオール部分の配座は剛直であるが、C6-C7結合において *anti-gauche* の配座交換が起こることを示唆している (図 1-8)<sup>42</sup>。環のひずみや立体障害の観点からはポリオール部分は全ての C-C 結合が *anti* 配座を取ったほうが安定であると考えられるが、C6-C7結合に関しては8位と9位のOH基間の分子内水素結合によって *gauche* 配座が安定化されると考えられる。また、ヘプタエン部分の蛍光スペクトル解析と分子動力学計算を組み合わせた研究により、ポリオール部分8位のOH基が分子間水素結合を形成することでチャンネル複合体が安定化されることも提唱されている<sup>32</sup>。

構造活性相関研究については、ポリケチド生合成経路に対し変異導入を行うことで、ポリオール部分の構造類縁体が調製されている (表 1-1)。ポリオール部分7位にケトン基を導入した 7-oxo-AmB<sup>43</sup> やポリオール部分のOH基の配列を変化させた構造類縁体 BSG003<sup>44</sup> は AmB に比べて大きく活性が低下する一方、Nystatin 様のポリオール構造を持つ S44HP やアルコールの数を減らした BSG022 は活性を保持している。しかし、詳細な相互作用については考察されていない。

また、Davis らはポリオール3位のOH基を除去した 3-deoxyAmB を合成した<sup>45</sup>。3-deoxyAmB が形成するチャンネルは、コンダクタンスが大きく低下している他、イオン選択性も変化していることから、3位のOH基がイオンの透過やチャンネル内径に重要であることが示唆されている。

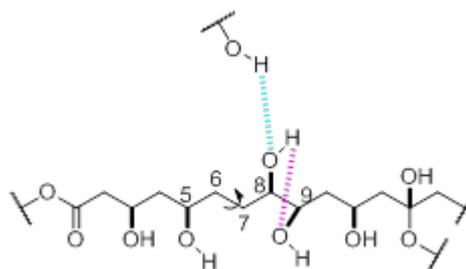
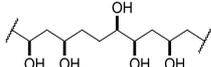
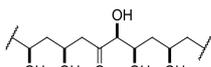
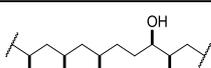
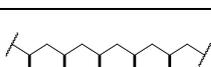
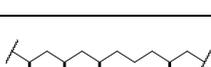


図 1-8 ポリオール部分の配座と水素結合。C6-C7結合が *anti* 配座を取る場合、8位OH基は他のOH基と分子間水素結合を形成する (水色)。一方、*gauche* 配座を取る場合、分子内水素結合を形成する (マゼンタ)。

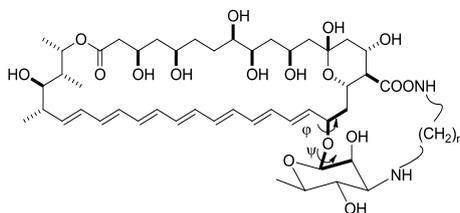
表 1-1 ポリオール部分の構造活性相関研究<sup>44</sup>

Compound	R	Relative activity against <i>C. albicans</i> (MIC <sub>compound</sub> /MIC <sub>AmB</sub> )
AmB 1		1
7-oxo-AmB		3.6
S44HP		1.1
BSG003		67
BSG022		1.1

### 1-5-c マイコサミン部分

マイコサミン部分はマクロラクトン環に結合するアミノ糖であり、活性に大きく寄与していることが知られている。当研究室の澤田らは **AmB** のマイコサミン部分とカルボン酸を分子内架橋した **AmB** 類縁体を合成し、構造活性相関研究を行った (表 1-2)<sup>46,47</sup>。この活性試験の結果では、エルゴステロール選択性が顕著に大きくなる  $n=6$  架橋体が存在し、マイコサミンの配向がステロール選択性に大きく寄与することが示唆された。また、膜中に存在するステロールの種類によってマイコサミン部分の配向が変化することが示唆され、マイコサミン-ステロール間の相互作用の存在が推定された。これは **Neumann** らによる分子動力学計算の結果からも支持されている。この計算では、マイコサミンの 2' -OH 基とステロールの 3 $\beta$  -OH 基が水素結合を形成し得ることや、ステロールの種類によってマイコサミン部分の配向が変化することを示唆している<sup>48</sup>。

表 1-2 分子内架橋体による構造活性相関研究と、 $\beta$  グリコシド結合の二面角計算結果



	K <sup>+</sup> flux activity: EC <sub>50</sub> (Sample/ lipid)×10 <sup>-6</sup>			φ (°)	ψ (°)
	sterol-free liposomes	cholesterol-containing liposomes	ergosterol-containing liposomes		
AmB 1	47	43	11	-	-
n=4 架橋体	61	86	50	-86.1	122.1
n=6 架橋体	60	58	5.8	-89.4	153.8
n=8 架橋体	180	110	27	-85.5	160.5

マイコサミン部分の構造活性相関研究は、その他にも多く行われている (表 1-3)。これらの研究において、アミノ基がトリメチル化された **DMS-AmB** では活性が低下していないのに対し、アミノ基の塩基性を低下させた **Ac-AmB** では活性が 1/10 程度になっていることから、アミノ基の正電荷の重要性が説明できる<sup>49</sup>。また、Croatt らによる構造活性相関研究では<sup>50</sup>、類縁体 2'-*epi-ent*-mycosamine-AmE では活性が大きく低下している。この類縁体はマイコサミン部分が **AmB** と同じ配向を取ることができないため、マイコサミン部分の配向が活性に重要であることを改めて示唆する結果となった。一方、ステロールと水素結合を形成するとされる 2'-OH 基立体反転を行った 2'-*epi*-AME では、顕著な活性の減少は見られなかった。

また、Wilcock らは C2' の OH 基を除去した 2'-deoxyl-AmB を合成した<sup>51</sup>。この類縁体はエルゴステロールを含有する真菌に対する活性は 1/4 程度しか低下しなかったのに対し、コレステロールを含むヒト細胞中では活性が 1/59 低下し、2'-OH 基の除去が選択毒性を上昇させる結果となった。このことから、2'-OH 基はコレステロール膜中での活性に寄与する相互作用をしているということが示唆された。後の文献で、2'-OH 基がマクロラクトン環 13 位の OH 基と水を介した水素結合ネットワークを形成し、マイコサミンの配向を固定していると推定している<sup>52</sup>。



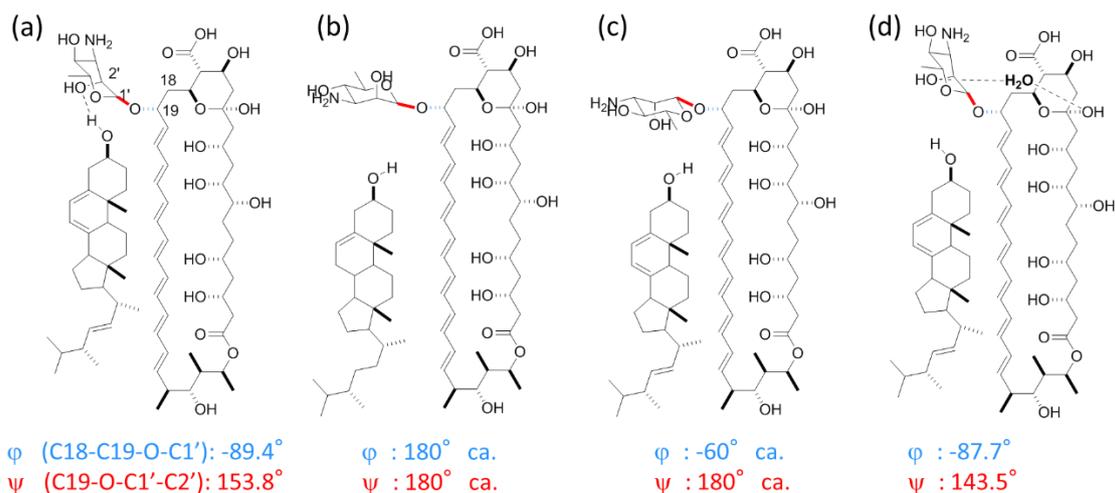


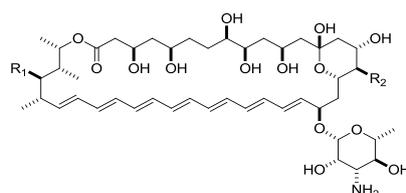
図 1-9 構造活性相関研究より得られたマイコサミン部分の配座と相互作用モデル。(a) 澤田らの分子内架橋体の配座探索より得られたモデル。MD 計算の結果からも支持されている。(b) Neumann らの分子動力学計算より提唱されたコレステロール膜中でのモデル。ステロールの種類によってマイコサミン部分の配向が変化することが示唆された。(c) Croatt らの構造活性相関研究より得られたモデル。活性が著しく低下する *ent*-mycosamine-AmE はこの配座を取れないことから推定した。マイコサミン-ステロール間の水素結合は必然的でない。(d) Burke らのグループが提唱したモデル。結晶構造と同じ配座。アミン-カルボン酸間の相互作用と、水分子を介したマイコサミン-マクロラクトン環間の水素結合でマイコサミン部分の配座が固定されていると推定した。

#### 1-5-d その他の極性部分など

マクロラクトン環 16 位に結合するカルボン酸や 35 位のアルコールについても構造活性相関研究は行われている (表 1-4)。カルボン酸をメチルエステル化したアンフォテリシン B メチルエステル(AME)は AmB と同程度の活性を持つ<sup>49</sup>。AME は脂質分子を含まない不活性な会合体を形成しにくいことが知られており<sup>53</sup>、これまでに固体 NMR 測定等に用いられてきた。一方で、ステロール選択性が低いという報告がある<sup>15</sup>。また、Me-AmB 等のカルボン酸部分の構造を変化させた AmB 類縁体も活性を保持していることから、カルボン酸部分の負電荷は活性に影響しないと考えられる<sup>54</sup>。また、近年はこのカルボン酸部分を単段階で他の官能基へ変換し、AmBAU や AmBCU などの副作用の小さい類縁体を合成する試みも行われている (表 1-4)<sup>52</sup>。マクロラクトン環 35 位の OH 基を除去した 35-deoxy-AmB methylester や C35deOAmB も活性に顕著な低下が見られない

ことが報告されている<sup>55-58</sup>。このように AmB の構造活性相関研究は多く行われており、それぞれの結果から相互作用メカニズムが推定されている。しかし、提唱されたメカニズムには矛盾点も多く、詳細な相互作用の解明には至っていない。

表 1-4 カルボン酸, 35-OH などを変化させた類縁体の活性



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Relative antifungal activity (MIC <sub>50, compound</sub> /MIC <sub>50, AmB</sub> )	Relative hemolytic activity (MHC <sub>50, compound</sub> /MHC <sub>50, AmB</sub> )
AmB	OH	COOH	1	1
AME	OH	COOMe	1.7	2.8
Me-AmB	OH	Me	1	n.d.
AmBAU	OH	NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	1	>58.5
AmBCU	OH	NHCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	0.5	>58.5
35-deoxy-AmB methylester	H	COOMe	26	n.d.
35-deO-AmB	H	COOH	16	n.d.

## 1-6 固体 NMR による構造解析

### 1-6-a 固体 NMR によって得られる情報

生体膜や高分子材料、無機結晶のように低運動性で不均一な試料を研究する際、固体 NMR は有用である。固体 NMR 測定では測定対象の低運動性から、溶液 NMR では平均化されていた化学シフト異方性や四極子相互作用、双極子相互作用といった情報を得ることができる。この固体 NMR 特有の情報をを用いることで、不均一な試料中での分子の配座や運動性、配向等を求めることが可能になる。生体膜系の固体 NMR では特に表 1-5 で示した核種が用いられる。

表 1-5 生体膜系の測定で用いられる核種

核種	スピン量子数 ( $I$ )	天然存在比	核磁気回転比	周波数比
		x/%	$\gamma / 10^7 \text{rads}^{-1} \text{T}^{-1}$	%
$^1\text{H}$	1/2	99.9885	26.752	100
$^2\text{H}$	1	0.0115	4.107	15.350
$^{13}\text{C}$	1/2	1.07	6.728	25.145
$^{15}\text{N}$	1/2	0.368	-2.713	10.137
$^{19}\text{F}$	1/2	100	25.181	94.094
$^{31}\text{P}$	1/2	100	10.839	40.481

#### 1-6-b 固体 NMR によって得られる相互作用情報の抽出

固体 NMR 特有の相互作用情報について表 1-6 に示した。前項でも説明したように、これらは分子の配座や配向、運動性といった情報を得る上で有用である。しかし、これらの相互作用はシグナルのブロードニング等を引き起こすため、解析を困難にするという問題点もある。そこで、パルスシーケンス等を工夫し、必要な情報のみを抽出する必要がある。

固体 NMR 測定においては、上述のように相互作用がピークのブロードニングを引き起こすため、感度の低下などが問題となる。これを抑える手法の一つとして、マジック角回転 (MAS) がある。マジック角回転 (MAS) では試料を  $54.7^\circ$  傾けて回転させて NMR を測定する。MAS 条件下では、相互作用に関する角度がマジック角において平均化されるため、これらの相互作用が 0 となる。

一方で、MAS は固体 NMR 測定において重要である双極子相互作用に関する情報を消去してしまうという欠点があった。そこで、マジック角回転 (MAS) 条件下で双極子相互作用を復活させ、感度の良い測定条件において双極子相互作用を測定する手法が多く開発されている<sup>59-64</sup>。この中でも、異種核間の双極子相互作用を測定できる Rotational Echo Double Resonance (REDOR) 法は、脂質膜サンプルでの複合体構造解析に多く用いられている<sup>65,66</sup>。REDOR 法では MAS に同期した  $\pi$  パルスを片方の核 (S 核) に連続的に照射することで、打ち消された双極子相互作用を復活させる。これによって、S 核と双極子相互作用しているもう片方の核 (I 核) はエコーパルスによるリフォーカスが妨げられ、シグナル強度が減衰する。この減衰率は展開時間に依存するため、様々な展開時間における減衰率を測定し、適合曲線を求めることにより双極子相互作用の大きさを決定できる (図 1-10, 11)。

この他にも、CODEX 法<sup>68,69</sup>や COARSE 法<sup>70-72</sup>など、パルスシーケンスによってスピン拡散の速度や化学シフト異方性を測定する手法が近年は多く開発されている。

表 1-6 固体 NMR から得られる情報

	得られる情報	測定手法
化学シフト異方性	配向、運動性	$^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{31}\text{P}$ NMR 等
四極子相互作用	配向、運動性	$^2\text{H}$ NMR 等
双極子相互作用	配向、原子間距離、運動性	REDOR, TEDOR, RR 等

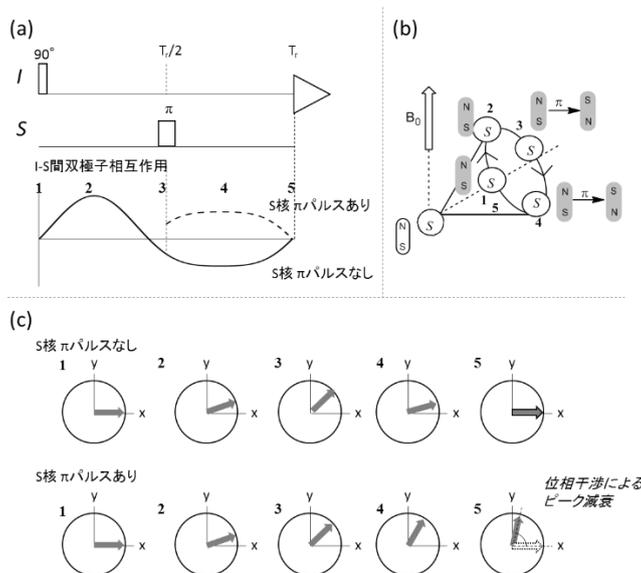


図 1-10 (a)  $\pi$  パルスによる双極子相互作用への影響。MAS 条件下で双極子相互作用を積分 (平均化) するとゼロとなるが、MAS の周期  $T_r$  の半分の間隔で  $\pi$  パルスを S 核に照射することで双極子相互作用が復活する。(b) MAS と  $\pi$  パルスの模式図。MAS 周期の半分で  $\pi$  パルスを S 核に照射すると S 核の磁化成分が反転する。(c) ベクトルモデルによる模式図。 $\pi$  パルスを加えることで、双極子相互作用によって展開された磁化がリフォーカスしなくなり、I 核シグナルが減衰する。

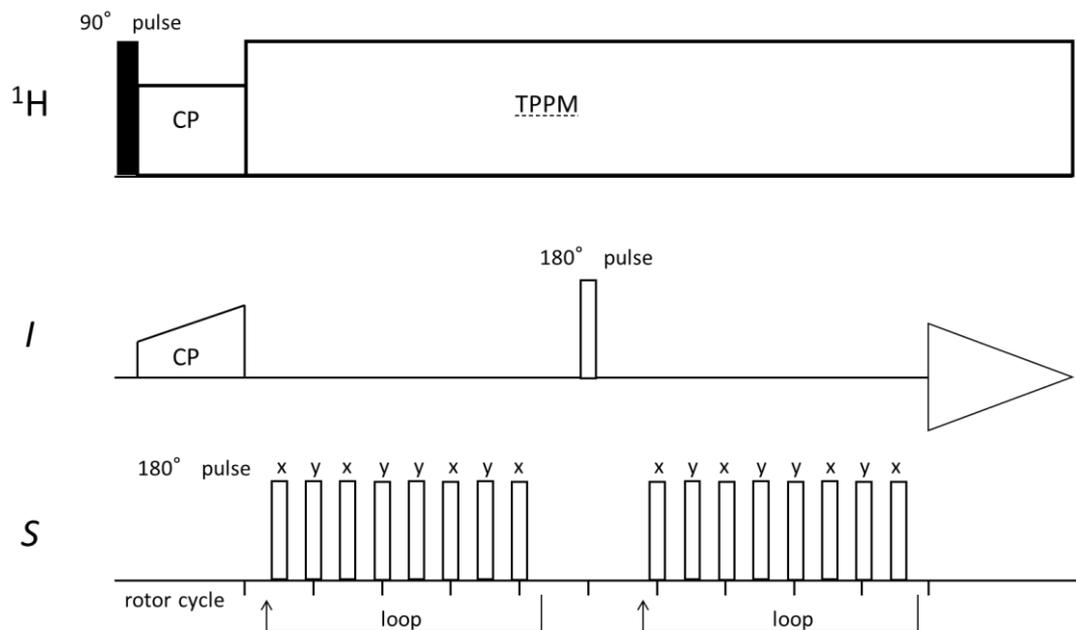


図 1-11 I{S} REDOR xy8 パルスシーケンス <sup>65,67</sup>

### 1-6-c 脂質膜における固体 NMR 測定

脂質膜における分子複合体の構造解析や機能解析に、固体 NMR は多く用いられてきた。なかでもアミロイド  $\beta$  やインフルエンザ M2 タンパク質、抗菌ペプチド等、膜に作用するペプチドについて固体 NMR を用いた研究が進んでいる。

アミロイド  $\beta$  の研究については、ペプチドを  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識し、REDOR 測定により標識核間の距離情報が測定されている。これによって、分子内における距離情報からペプチドのコンフォメーションが明らかとなったほか、分子間距離情報の解析により、アミロイド  $\beta$  が形成する複合体の構造も明らかとなっている <sup>73,74</sup>。

インフルエンザ M2 タンパク質については Hong らのグループが長年にわたり固体 NMR を用いた解析を行っている。このグループの研究では標識核を導入したペプチドを用いて、分子間距離情報や会合体数を求めることに成功している <sup>75</sup>。また、その阻害剤であるアマンタジンに  $^2\text{H}$  標識を導入し、 $^2\text{H}$  NMR 測定より得られる四極子相互作用から M2 タンパク質中でのアマンタジンの配向を求めている他、ペプチド中  $^{13}\text{C}$  との  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR によって、M2 タンパク質-アマンタジン複合体構造の算出に成功している <sup>76</sup> (図 1-12a)。また、ペプチド内に存在する  $^{15}\text{N}$  標識化ヒスチジンの化学シフトが pH 依存的に変化することを明らかとし、プロトンポンプの役割に大きく寄与するとしている <sup>77</sup>。

また、 $\alpha$ ヘリックス構造を持つ抗菌ペプチドは、その配座の剛直さから、膜中での配向解析が多く行われてきた。Ulrich らのグループでは抗菌ペプチド PGLa の膜中での配向を固体 NMR によって測定している。このうち  $^2\text{H}$  NMR を用いた実験では、アラニンを  $^2\text{H}$  標識したペプチドを多種合成し、それぞれについて配向膜を用いて  $^2\text{H}$  NMR 測定を行っている。配向解析ではペプチドが何度傾いて挿入されるかという tilt angle とどの方向に傾くかという rotation angle の二種類の角度情報が必要である (図 1-12 b,c)。Ulrich らは  $^2\text{H}$  NMR より得られた 8 つの四極子分裂幅の値から、理論値が実験値に最も近づく角度情報のペアを算出した (図 1-12 d)。また、膜構造によって配向が変化することを提唱している<sup>78</sup>。このような配向解析はリポソームサンプルでも可能であり、得られる化学シフト異方性の解析などによる研究が行われている。

このようなペプチドを用いた固体 NMR 解析は、同位体標識をペプチド固相合成法により容易に導入できるため、多く行われてきた。一方、膜に作用するペプチド以外の化合物については標識核の導入が困難であるために、あまり固体 NMR が適用されていない。一方で、近年は固体 NMR 測定を指向した低分子化合物の合成が多く行われており<sup>79,80</sup>、固体 NMR 測定の適用範囲は低分子化合物へ広がっていくものと考えられる。

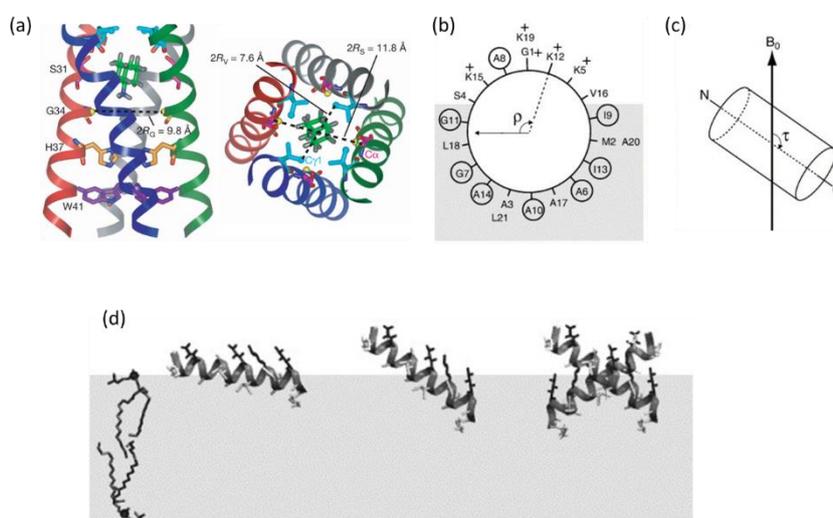


図 1-12 (a) Hong らによるインフルエンザ M2 タンパク質-アマンタジン複合体構造。固体 NMR の REDOR 測定等から構造が決定された<sup>76</sup>。(b), (c)ペプチドの配向解析で求められる rotation angle ( $\rho$ )と tilt angle ( $\tau$ )。(d) Ulrich らに提唱された PGLa の膜中における配向。ペプチドの濃度や膜の構成成分により、配向が異なることを示唆している<sup>78</sup>。Reprinted from *Nature*, 2010, 463, 689-692.

Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Klaus, W. J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong, M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. Copyright (2010) with permission from Nature publishing group. Reprinted from *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 1330-1342. Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state  $^2\text{H}$ -NMR. Tremouilhac, P.; Strandberg, E.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. Copyright (2006) with Elsevier.

### 1-7 固体 NMR による AmB チャンネル複合体の構造解析

固体 NMR による研究は AmB チャンネル複合体にも適用されている。初期の研究では重水素化リン脂質を用いた脂質分子の運動性解析が行われ、膜の相状態に対する AmB の影響が調べられている<sup>81</sup>。この結果では、AmB が高濃度で脂質膜中に存在するとき、脂質の運動性が低下することが明らかとなっている。また、コレステロール含有膜とエルゴステロール含有膜で、AmB から受ける影響は異なり、コレステロール含有膜においては AmB が脂質の運動性を低下させるのに対し、エルゴステロール含有膜においては AmB が脂質の運動性を上昇させることが明らかとなっている<sup>82</sup>。また、AmB から短段階で調製できる重水素化 AmB 誘導体を用いて、配向膜中での  $^2\text{H}$  NMR が測定されている。この研究では、測定温度によって四極子相互作用の大きさが異なり、AmB の配向や運動性が温度依存的に変化することが示唆された<sup>83</sup>。また、当研究室の松森らは重水素化エルゴステロールを用いて、エルゴステロールの運動性を評価し、AmB とエルゴステロールの直接的な相互作用により、エルゴステロールの運動性が低下することを示している<sup>84</sup>。

しかし、固体 NMR による分子複合体の構造解析では、測定対象に  $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  などの標識核を位置選択的に導入する必要がある。AmB に短段階で標識核を導入できる箇所は限られており、合成化学的手法等を用いた標識体の合成が必要であった。これを解決するべく、これまでに半合成的手法や培養によって AmB に標識核を導入する手法が多く開発されてきた<sup>85-88</sup> (図 1-13 a-c)。また、エルゴステロールについても  $^{13}\text{C}$  や  $^{19}\text{F}$  を導入した標識体が多く合成されている<sup>89</sup> (図 1-13 d)。これらの標識体を用いて、分子複合体の構造解析が行われている。

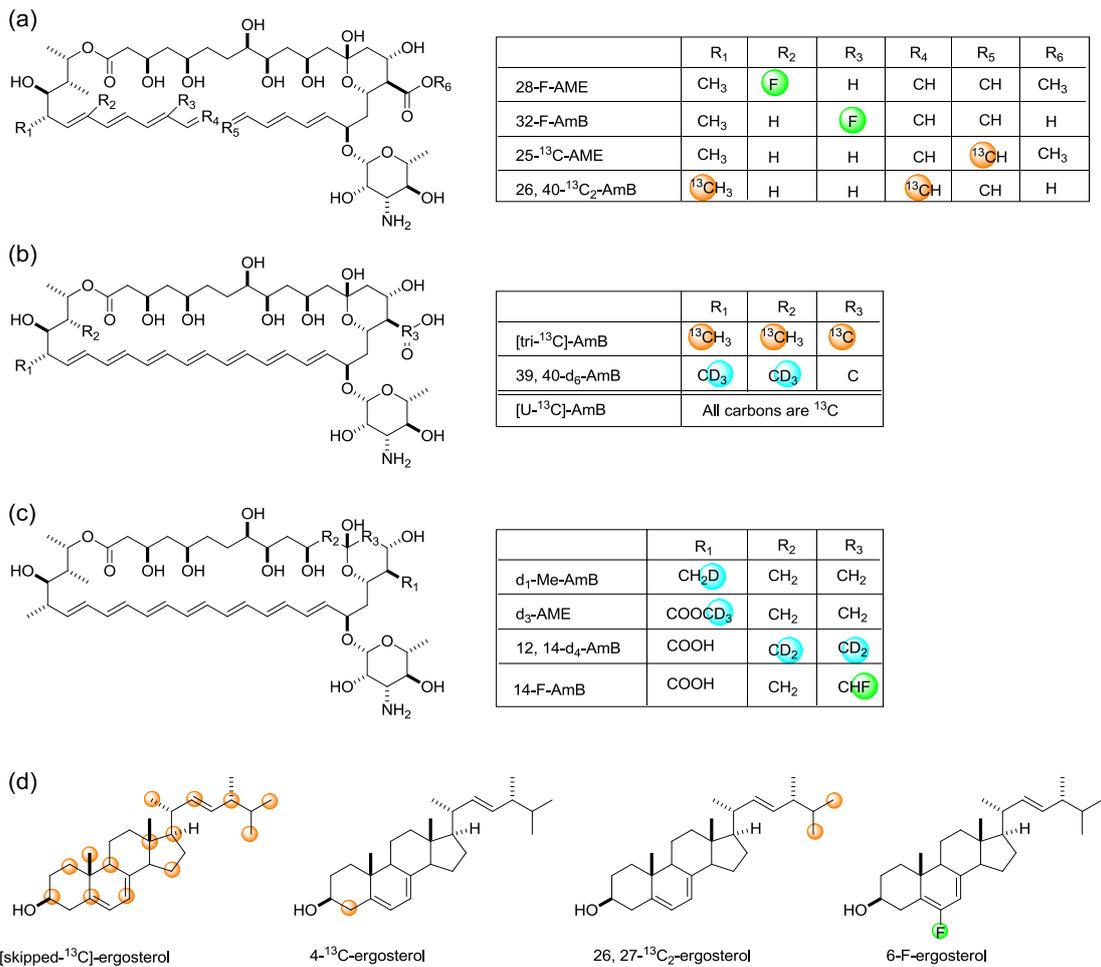


図 1-13 これまでに合成された標識体。(a)土川らによってヘプタエン部分に標識核を導入する手法が確立され<sup>85</sup>、<sup>19</sup>Fや<sup>13</sup>Cなどを導入した標識体が合成された。(b)標識化プロピオン酸ナトリウムを取り込ませることにより、培養で部位特異的に標識核を導入できる<sup>88</sup>。また、U-<sup>13</sup>C-グルコースを用いればU-<sup>13</sup>C-AmBを調製することも可能である。(c)その他の比較的短段階で調製可能な標識体<sup>87</sup>。(d)標識化エルゴステロール

AmB チャネル複合体の構造は、AmB とエルゴステロールが環状に並んで形成されるので回転対称であると考えられる。このことに従い、チャネル複合体中における AmB-エルゴステロール間、AmB-AmB 間の距離情報を測定することで、分子同士の位置関係を決定し、チャネル複合体の構造を解明できると考えられてきた(図 1-14)。

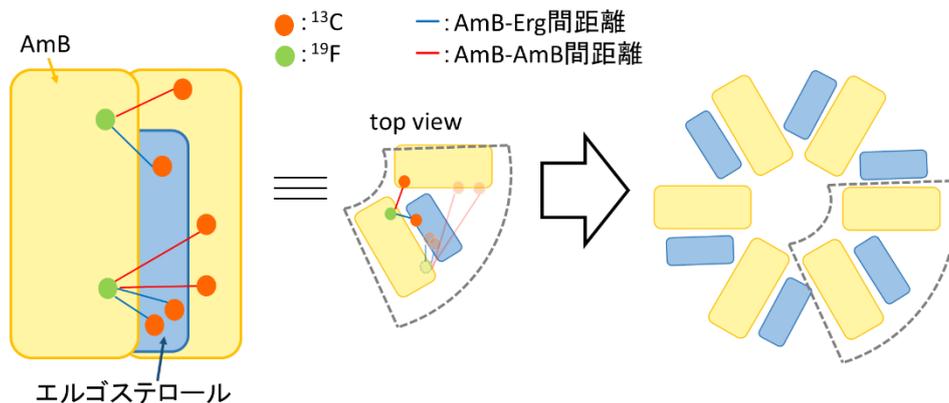


図 1-14 AmB チャンネル複合体の構造解析へ向けたこれまでの戦略。標識体を用いて、AmB-エルゴステロール間、AmB-AmB 間の REDOR 測定を行い、得られる距離情報からそれぞれの分子の位置関係を明らかにする。チャンネル複合体は回転対称な繰り返し構造であるため、REDOR 測定より得られた AmB-Erg-AmB の単位構造を環状に並べることで、チャンネル複合体構造が得られると考えられた。

梅川、中川らは AmB に  $^{19}\text{F}$  標識、エルゴステロールに  $^{13}\text{C}$  標識を導入し、AmB-エルゴステロール間の距離を REDOR 測定によって求めた (図 1-15)。14-F-AmB と [skipped- $^{13}\text{C}$ ]-エルゴステロールを用いた POPC 膜中での REDOR 測定では、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。このことは、AmB の 14 位に導入されたフッ素とエルゴステロールの両端が近接していることを示しており、従来のチャンネルモデルで推定されていた平行型の AmB-エルゴステロール複合体の他に反平行型の複合体構造が存在することが示唆された<sup>89</sup>。

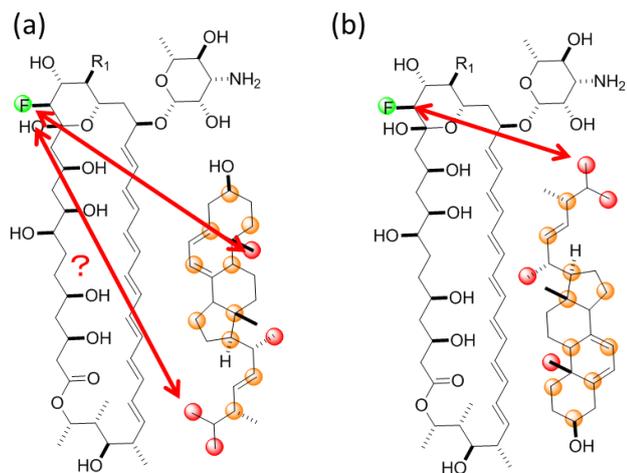


図 1-15 [skipped- $^{13}\text{C}$ ]-Ergosterol と 14  $\beta$ -F-AmB を用いた REDOR 測定の結果。(a)従来の平行型では説明できない遠隔標識核間に REDOR 減衰が見られた。(b)それにより、反平行型相互作用モデルが提唱された。

この構造のより詳細な解析を目指し、中川はエルゴステロールに対して位置

特異的に  $^{13}\text{C}$  を導入した 4- $^{13}\text{C}$ -エルゴステロールと 26,27- $^{13}\text{C}_2$ -エルゴステロール、また AmB に  $^{19}\text{F}$  を導入した 32-F-AmB と 14-F-AmB を用いてより詳細な距離情報の取得を行った。その結果、平行型、反平行型それぞれの複合体において、分子間距離情報を得ることができた (図 1-16 ab)。さらに、この距離情報を元に分子動力学計算を用いた構造探索やエルゴステロールの  $\alpha$  面が AmB と相互作用しているという情報から、AmB-エルゴステロール二分子複合体の構造を決定するに至った<sup>90,91</sup>(図 1-16 cd)。

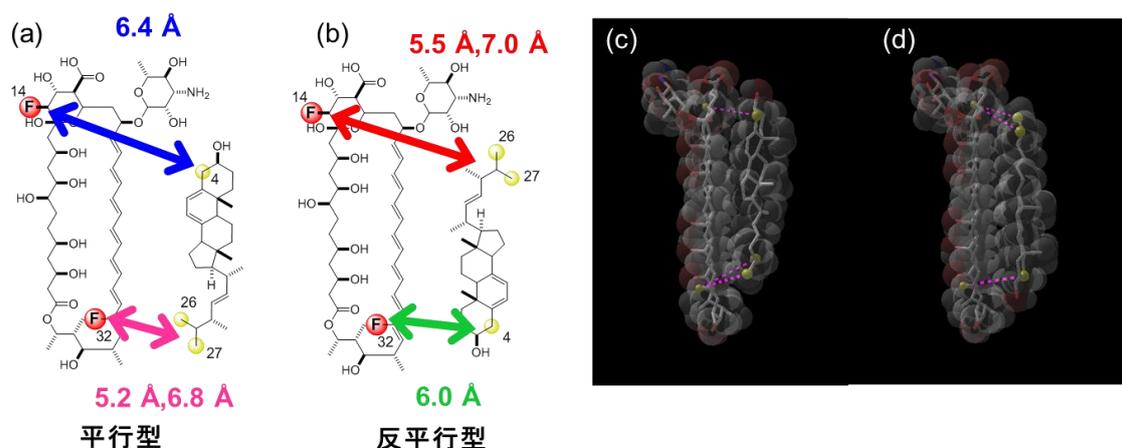


図 1-16 (a, b)REDOR 測定より得られた平行型と反平行型の距離情報<sup>90,91</sup>。(c, d) 得られた距離情報を元に行った配座探索の結果。

AmB-AmB 間の距離情報についても、 $^{13}\text{C}$  や  $^{19}\text{F}$  を標識した AmB 誘導体を用いて REDOR 測定による解析が行われてきた。梅川らは培養により  $^{13}\text{C}$  を導入した [tri- $^{13}\text{C}$ ]-AmB と、合成化学的に  $^{19}\text{F}$  を導入した 14-F-AmB を用いて  $^{13}\text{C}$ [ $^{19}\text{F}$ ] REDOR 測定を行い AmB-AmB 間の距離情報の測定に成功した。この測定によって、隣り合う AmB の標識核間距離が 12.1 Å であると推定されたが、解析手法には未だ多くの議論がなされており、正確な距離は明らかになっていない。また、POPC 膜中においてはエルゴステロールの存在によって AmB-AmB 間の距離が増加することが明らかとなった。このことから、エルゴステロールはチャネル形成時、AmB と AmB の間に存在してチャネル構造を安定化することが示唆された(図 1-17)<sup>22</sup>。さらに足立、谷脇らにより、異なる  $^{13}\text{C}$  標識化 AmB を用いた距離情報の解析が行われた<sup>92,93</sup>。しかし、標識位置が限定されることや、 $^{13}\text{C}$  のシグナル強度が 2 つの  $^{19}\text{F}$  核から影響を受ける 3 スピン系の解析が必要であることから (図 1-18a)、複合体構造を回転対称に並べてチャネル構造を決定するという従来の計画は困難であった。

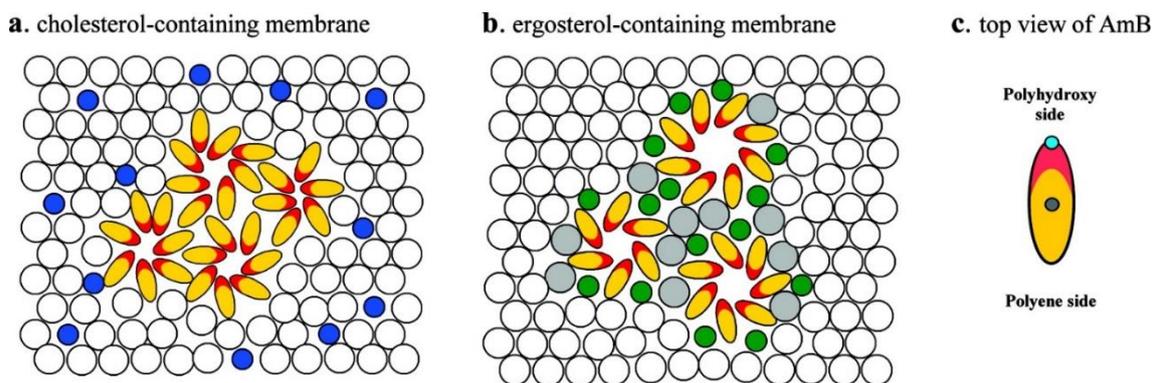


図 1-17 梅川らの REDOR 測定により提唱されたチャンネルモデル。エルゴステロール膜中では AmB-AmB 間距離が増加することから、エルゴステロールに AmB が挟まれるチャンネルモデルが提唱された<sup>22</sup>。Reprinted from *Biochemistry* 2008, 47, 13463–13469. Ergosterol Increases the Intermolecular Distance of Amphotericin B in the Membrane-Bound Assembly As Evidenced by Solid-State NMR. Copyright (2008), with permission from Elsevier.

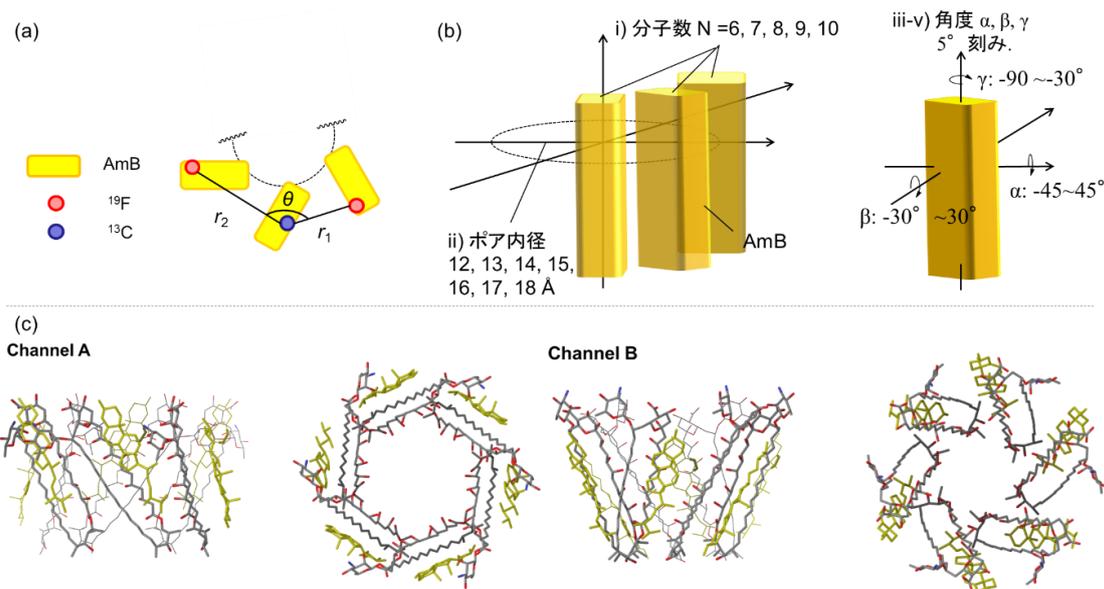


図 1-18 (a) 3-スピン系の REDOR 減衰に影響するパラメーター。(b)チャンネルモデリングによる構造解析で用いる 5 つの変数。これらの変数を変化させてできる計 112385 通りのチャンネル構造から、実験で得られた REDOR 減衰を示すものを探索した。(c)チャンネルモデリングより得られた、2 つのチャンネル構造。

中川らは、ヘプタエン部分に  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  標識を導入した  $26,40\text{-}^{13}\text{C}_2\text{-AmB}$  と  $32\text{-F-AmB}$  を合成し、REDOR 測定を行った。この測定によって得られた結果と、 $14\text{-F-AmB}$  と  $[\text{tri-}^{13}\text{C}]\text{-AmB}$  によって行われた REDOR 測定の結果を組み合わせ、

チャンネルモデリングによる複合体の構造解析を試みた<sup>90</sup>。この解析手法では、AmB チャンネル複合体が回転対称体であると仮定し、会合体を形成する分子数、チャンネル内径、AmB の膜中での配向を表す 3 つの角度  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の計 5 つの変数を用いて、系 112385 通りのモデルを作成した (図 1-18b)。それぞれのチャンネルモデルにおける REDOR 測定の減衰曲線を作成し、REDOR 測定によって得られる実験値に最も合うチャンネルモデルを探索した。この探索手法により、3 スピン系の解析をチャンネル形成が可能である系に限定することが可能となり、より効率的にチャンネル複合体の構造を決定できる。この手法による結果では、測定結果に合うチャンネル複合体構造が 2 種類得られた (図 1-18c)。どちらの構造も 6 分子の AmB が複合体を構成しているが、AmB の配向が大幅に異なる。先に示した AmB-エルゴステロール複合体構造を重ねあわせることで、AmB 6 分子、エルゴステロール 6 分子の計 12 分子で形成されるチャンネル構造を得ることができた。得られた 2 種類の構造のうち、どちらの構造が真のチャンネル構造を反映しているのかについては、今後さらに固体 NMR による構造情報を得ることで決定できると考えられる。

一方、これまでの構造解析の結果にはいくつか問題点が存在する。まず、AmB-エルゴステロールの複合体構造については、マイコサミン部分の配座を結晶構造と同じであると仮定して構造探索を行っている。マイコサミン部分はエルゴステロールと相互作用すると考えられており、実験的に配座を求める必要がある。また、チャンネルモデルによる構造解析では配向に関する変数が  $5^\circ$  刻みで計算されている。これについては配向のみに影響される異なる測定手法を用いて、精度良く配向を決定する必要がある。また、化学量論的な問題として、AmB とエルゴステロールが 1 対 1 で相互作用しておらず、チャンネルを形成している AmB の約 50% がエルゴステロールと結合していない可能性がある。また、測定に用いた AmB の 100% がチャンネルを形成しているとの仮定のもとでチャンネルモデリングを行っているが、実際は 90% 程度であると考えられ、その条件で構造探索を行うと AmB とエルゴステロールが近接しすぎるという問題もある。

AmB の配向については、 $^2\text{H}$  NMR 等の配向情報のみの影響を受ける測定手法によっても解析が行われてきた。松田ら、および山上らは、 $^2\text{H}$  標識した AmB 誘導体を種々調製し、脂質膜中において  $^2\text{H}$  固体 NMR 測定を行っている<sup>94,95</sup>。これらの結果では、DMPC 膜中において AmB 誘導体が配向解析に十分な運動性を持つことが明らかとなったものの、培養によって調製される 39,40- $d_6$ -AME は標識率が低く解析に十分なピーク強度が得られなかった。また、骨格に  $^2\text{H}$  標識を行った 12,14- $d_4$ -AME は運動性が低く配向解析に適用できなかった。 $^2\text{H}$  NMR によって得られた分子の配向情報は  $d_3$ -AME による NMR スペクトルのみが有用であり、他の手法による配向情報の取得が望まれている。

## 1-8 研究目的

AmB チャンネル複合体は、膜中で自己会合してチャンネルを形成するという特異な性質や副作用軽減の必要性から、多くの研究者の注目を集め、様々な物理化学的手法や合成化学的手法による研究が行われてきた。一方で、構造活性相関研究や分光学的手法、分子動力学計算などによる研究は、得られる情報が断片的であり、チャンネル複合体構造の決定やステロール認識機構の解明につながっていないのが現状である。

上述のとおり、近年は AmB チャンネル複合体にも固体 NMR が適用されており、AmB-AmB 間、AmB-エルゴステロール間の距離情報が測定された。これらの結果により、AmB-エルゴステロール二分子複合体の詳細な構造が決定されたほか、チャンネルモデリングを用いた解析により、AmB が形成するチャンネル構造が推定された。一方、これまでの測定では、2 種類のチャンネル構造が推定されており、どちらが正しいかは明らかとなっていない。両者の決定的な違いは AmB の配向であり、AmB の配向を距離情報以外の情報源から決定できれば、正しいチャンネル構造を決定できる。また、これまでの測定で得られた構造は分子の配置に過ぎず、柔軟であると推定されている  $\beta$  グリコシド結合やポリオール部分の配座を結晶構造と同じであると仮定して構造解析を行っている。特に、 $\beta$  グリコシド結合は過去の構造活性相関<sup>46,47,50,51</sup> や MD 計算<sup>48</sup> により、ステロール選択性に寄与すると考えられている。よってこの部分の配座決定が、チャンネル形成機構やステロール認識機構の解明に必要であると考えられる。このように AmB チャンネル複合体の構造解析では、これまで決定されていなかった AmB の配向や、ポリオール部分やマイコサミン部分の配座といった分子内構造情報が、チャンネル複合体の構造解析に必要不可欠である。

そこで本研究では、AmB チャンネル複合体における分子内構造情報に着目し、AmB マクロラクトン環の膜中における配向、AmB ポリオール部分の配座、および、 $\beta$  グリコシド結合の配座を固体 NMR や構造活性相関研究を駆使して決定する。マクロラクトン環の配向については、新規  $^{19}\text{F}$  化 AmB 誘導体を調製し、化学シフト異方性の解析を AmB に適用することによって、AmB マクロラクトン環の配向を決定する。また、ポリオール部分の配座についてはポリオール部分の構造を変化させた生合成類縁体に対して反応を行うことで、ポリオール部分の構造を変化させた新規構造類縁体を調製する。これらの活性試験の結果を配座探索により得られる結果と組み合わせ、AmB がチャンネル中で形成するポリオール部分の配座を考察する。また、 $\beta$  グリコシド結合の配座については、19 位に  $^2\text{H}$  を導入し、マイコサミン部分に  $^{13}\text{C}$  を導入した二重標識化 AmB の合成を行い、標識核間の距離を測定することで、 $\beta$  グリコシド結合の配座を決定する。こ

れにより、マイコサミン部分における相互作用について、これまでの構造活性相関研究と合わせた考察を行う予定である。これらの研究より得られる分子内構造情報と、これまでに得られた分子間の距離情報を組み合わせ、さらに分子の配座を考慮することによって、より正確な AmB-Erg チャンネル複合体構造を決定することを最終目的とした。

参考文献

- (1) Lupetti, A.; Danesi, R.; Campa, M.; Tacca, M.; Kelly, S. *Trends in molecular medicine*, **2002**, *8*, 76–81.
- (2) Butts, A.; Krysan, D. J. *PLoS Pathog.*, **2012**, *8*, 76-81.
- (3) Chowdhary, A.; Kumar, V. A.; Sharma, C.; Prakash, A.; Agarwal, K.; Babu, R.; Dinesh, K. R.; Karim, S.; Singh, S. K.; Hagen, F.; Meis, J. F. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* **2014**, *33*, 919-926.
- (4) Hartsel, S.; Bolard, J. *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 445-449.
- (5) Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2005**, *68*, 151-162.
- (6) (a) Oura, M.; Sternberg, T. H.; Wright, E. T. *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 566-573. (b) Gold, W.; Stout, H. A.; Pagano, J. F.; Donovan, R. *Antibiot. Annu.*, **1955**, *3*, 579-586. (c) Sternberg, T. H.; Wright, E. T.; Oura, M. *Antibiot. Annu.*, **1956**, 566-573.
- (7) Utz, J. P.; Treger, A. *Ann. Int. Med.* **1959**, *51*, 1220-1229.
- (8) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560–4564.
- (9) Andreoli, T.; Dennis, V.; Weigl, A. *J. Gen. Physiol.*, **1969**, *53*, 133–156.
- (10) De Kruijff, B.; Gerritsen, W. J.; Oerlemans; Demel, R. A.; van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **1974**, *339*, 30–43.
- (11) De Kruijff, B.; Gerritsen, W. J.; Oerlemans, A.; van Dijck, P. W.; Demel, R. A.; van Deenen, L. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 44–56.
- (12) Cass, A.; Finkelstein, A.; Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 100–124.
- (13) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.
- (14) Ermishkin, L. N.; Kasumov, K. M.; Potzeluyev, V. M. *Nature*, **1976**, *262*, 698-699.
- (15) Readio, J. D.; Bittman, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219–224.
- (16) Onishi, M.; Kamimori, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 658–663.
- (17) Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807–7815.
- (18) Cohen, E. *J. Membr. Biol.* **2010**, *238*, 1–20.
- (19) Cohen, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1108*, 49–58.
- (20) Cohen, B. E. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 95–106.

- (21) Romero, E.; Valdivieso, E.; Cohen, E. *J. Membr. Biol.* **2009**, *230*, 69–81.
- (22) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) Cioffi, A. G.; Hou, J.; Grillo, A. S.; Diaz, K. A.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10096–10099.
- (26) De Ghellinck, A.; Fragneto, G.; Laux, V.; Haertlein, M.; Jouhet, J.; Sferrazza, M.; Wacklin, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2317–2325.
- (27) Chudzik, B.; Koselski, M.; Czuryło, A.; Trębacz, K. *Eur. Biophys. J.*, **2015**, *44*, 77–90.
- (28) Katsu, T.; Okada, S.; Imamura, T.; Komagoe, K.; Masuda, K.; Inoue, T.; Nakao, S. *Anal. Sci.*, **2008**, *24*, 1551–1556.
- (29) Hirano, M.; Takeuchi, Y.; Matsumori, N.; Murata, M.; Ide, T. *J. Membr. Biol.* **2011**, *240*, 159–164.
- (30) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109–115.
- (31) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704–710.
- (32) Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szluzak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czub, J.; Gruszecki, W. I. *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 13821–13832.
- (33) Gruszecki, W. I.; Luchowski, R.; Wasko, P.; Gryczynski, Z.; Gryczynski, I. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *875*, 57–65.
- (34) Wasko, P.; Luchowski, R.; Tutaj, K.; Grudzinski, W.; Adamkiewicz, P.; Gruszecki, W. I. *Mol. Pharm.*, **2012**, *9*, 1511–1520.
- (35) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**,

1567, 63–78.

- (36) Czub, J.; Baginski, M. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 16743–16753.
- (37) Aszalos, A.; Bax, A.; Burlinson, N.; Roller, P.; McNeal, C. *J. Antibiot.*, **1985**, *38*, 1699–1713.
- (38) Rogers, B. N.; Selsted, M. E.; Rychnovsky, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *24*, 3177–3181.
- (39) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Takano, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2014**, *53*, 3088–3094.
- (40) 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.
- (41) Resat, H.; Baginski, M. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 294–305.
- (42) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. A. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 560–570.
- (43) Power, P.; Dunne, T.; Murphy, B.; Nic Lochlainn, L.; Rai, D.; Borissow, C.; Rawlings, B.; Caffrey, P. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 78–86.
- (44) Brautaset, T.; Sletta, H.; Degnes, K. F.; Sekurova, O. N.; Bakke, I.; Andreassen, T.; Ellingsen, T. E.; Zotchev, S. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6636–6643.
- (45) Davis, S. A.; Della Ripa, L. A.; Hu, L.; Cioffi, A. G.; Pogorelov, T. V.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15102–15104.
- (46) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 11977–11984.
- (47) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667–10675.
- (48) Neumann, A.; Baginski, M.; Czub, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18266–18272.
- (49) Chéron, M.; Cybulska, B.; Mazerski, J.; Grzybowska, J.; Czerwiński, A.; Borowski, E. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 827–836.
- (50) Croatt, M. P.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1390–1393.
- (51) Wilcock, B. C.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8488–8491.

- (52) Davis, S. A.; Vincent, B. M.; Endo, M. M.; Whitesell, L.; Marchillo, K.; Andes, D. R.; Lindquist, S.; Burke, M. D. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 481–487.
- (53) Mazerski, J.; Bolard, J.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1236*, 170–176.
- (54) Palacios, D.; Anderson, T.; Burke, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13804-13805.
- (55) Szpilman, A. M.; Manthorpe, J. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4339–4342.
- (56) Szpilman, A. M.; Cereghetti, D. M.; Wurtz, N. R.; Manthorpe, J. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4335–4338.
- (57) Szpilman, A. M.; Cereghetti, D. M.; Manthorpe, J. M.; Wurtz, N. R.; Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7117–7128.
- (58) 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.
- (59) Ok, J.; Spencer, R. G. S.; Bennett, A. E.; Griffin, R. G. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *197*, 389-395.
- (60) Tycko, R.; Dabbagh, G. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *173*, 461-465.
- (61) Gregory, D. M.; Wolfe, G.; Jarvie, T.; Shiels, J.; Drobny, G. *P. Mol. Phys.* **1996**, *89*, 1835-1849.
- (62) Bennett, A. E.; Ok, J. H.; Griffin, R. G.; Vega, S. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 8624-8627.
- (63) Hing, A. W.; Vegas, S.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.*, **1992**, *96*, 205-209.
- (64) Takegoshi, T.; Nakamura, S.; Terao, T. *Chem. Phys. Lett.*, **2001**, *344*, 631-637.
- (65) (a) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.*, **1989**, *13*, 57-83. (b) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.*, **1989**, *81*, 196-200.
- (66) Gullion, T. *Concepts Magn. Reson.*, **1998**, *10*, 277-289.
- (67) Gullion, T.; Baker, B.; Conradi, M. S. *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 479-484.
- (68) Buffy, J. J.; Waring, A. J.; Hong, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4477-4483.

- (69) DeAzevedo, E.; Hu, W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8411-8412.
- (70) Umegawa, Y.; Yamaguchi, Y.; Murata, M.; Matsuoka, S. *Magn. Reson. Chem.*, **2015**, *53*, 514-519.
- (71) Raleigh, D.P.; Olejniczak, E. T.; Griffin, R. G., *J. Chem. Phys.*, **1988**, *89*, 1333-1350.
- (72) Kolbert, A. C.; Raleigh, D. P.; Levitt, M. H.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.*, **1989**, *90*, 679-689.
- (73) Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16742-16747.
- (74) Mani, R.; Tang, M.; Wu, X.; Buffy, J. J.; Waring, A. J.; Sherman, M. A.; Hong, M. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 8341-8349.
- (75) Luo, W.; Hong, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7242-7251.
- (76) Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Klaus, W. J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong, M. *Nature*, **2010**, *463*, 689-692.
- (77) Hu, F.; Luo, W.; Hong, M. *Science*, **2010**, *330*, 505-508
- (78) Tremouilhac, P.; Strandberg, E.; Wadhwani, P.; Ulrich, A. S. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 1330-1342.
- (79) Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; Hayashi, T.; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 915-924.
- (80) Loy, B. A.; Lesser, A. B.; Staveness, D.; Billingsley, K. L.; Cegelski, L.; Wender, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3678-3685.
- (81) Dufourc, E. J. ; Smith, I. C.; Jarrell, H. C. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1984**, *778*, 435-442.
- (82) Paquet, M.; Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancrede, P.; Auger, M. *Chem. Phys. Lipids.* **2002**, *119*, 1-11.
- (83) Hing, A. W.; Schaefer, J.; Kobayashi, G. S. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1643*, 323-332.
- (84) Matsumori, N.; Tahara, K.; Yamamoto, H.; Morooka, A.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11855-60.
- (85) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6187-6191.
- (86) Matsushita, N.; Matsuo, Y.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata,

- M.; Oishi, T. *Chem. Lett.*, **2009**, *38*, 114-115.
- (87) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.
- (88) McNamara, C. M.; Box, S.; Crawforth, J. M.; Hickman, B. S.; Norwood, T. J.; Rawlings, B. J. *J. Am. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, *1*, 83-87.
- (89) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry*, **2012**, *51*, 83-89.
- (90) 中川 泰男 大阪大学大学院理学研究科 平成 26 年度 学位論文
- (91) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Matsushita, N.; Yamamoto, T.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2016**, *55*, 3392-3402.
- (92) 足立 剛士 大阪大学大学院理学研究科 平成 21 年度 修士論文
- (93) 谷脇 龍 大阪大学大学院理学研究科 平成 24 年度 修士論文
- (94) 松田 康彦 大阪大学大学院理学研究科 平成 22 年度 修士論文
- (95) 山上 正輝 大阪大学大学院理学研究科 平成 24 年度 修士論文

## 第二章 ポリオール部分の構造活性相関研究

### 緒言

AmB のイオン透過活性は、その両親媒性な分子構造が一因である。疎水性であるヘプタエン部分が脂質膜内部のアシル鎖やエルゴステロールに強い親和性を持つ一方で、親水性部分が膜表面や水分子やイオンの透過を容易にすることでチャンネル活性が発現すると考えられている。その親水性部分の一つであるポリオール部分は、ポア内部に位置し、水分子やイオン等の透過物と相互作用する重要な役割を担っていると考えられている。

ポリオール部分の活性への寄与は MD 計算<sup>1,2</sup> や蛍光分光法<sup>3-5</sup> による実験結果から議論が成されてきた。これらの研究では、ポリオール部分はイオン透過を促進するだけでなく<sup>6</sup>、分子間水素結合によりイオンチャンネルの形成を補助する役割を果たすことも示唆されている<sup>2</sup>。その一方で、ポリオール部分同士の間水素結合が、水中における不活性な会合体の形成を促進することも示唆されている<sup>3</sup>。このポリオール部分の配座については、MD 計算による研究が行われている。MD 計算による研究では、ポリオール部分の配座は C6-C7 結合が柔軟であり、*anti-gauche* の配座交換を起こすと考えられている<sup>7</sup>。一方 SDS ミセル中に取り込まれた AmB の配座を溶液 NMR 測定により解析した結果では、この C6-C7 結合は *anti* 配座のみを取ることが報告されている<sup>8</sup>。

ポリオール部分の配座や相互作用、活性に対する寄与を調べる上で、構造活性相関研究は有用な手法であるといえる。しかし、5 つの不斉炭素を持つ構造から、ポリオール部分の構造誘導化を合成化学的に行うことは困難である。よってポリオール部分の構造誘導化手法は限られており、構造の活性に対する寄与は体系的に理解されていないのが現状である。近年では AmB の生合成経路<sup>9,10</sup> を基に、生合成工学的にポリオール部分の構造を変化させた構造類縁体が多く調製されている<sup>11-15</sup>。そこで本章では、生合成工学的手法と合成化学的手法を組み合わせ、ポリオール部分の構造を変化させた新規 AmB 類縁体を調製した。さらにその活性試験と立体配座の解析結果から、AmB のチャンネル活性やステロール選択性に対するポリオール部分の寄与について考察した。

### 2-1 ポリオール部分 7 位の構造改変

過去の研究で、AmB のポリケチド生合成経路において、7 位を還元する

ketoreductase を遺伝子組み換えにより不活性化し、7 位にケトン基を導入した 7-oxo-AmB **2** を調製する手法が確立されている (図 2-1)<sup>13</sup>。共同研究先である Dublin 大学の Patrick Caffrey 教授および Leicester 大学の Bernard Rawlings 博士らのグループにこの 7-oxo-AmB **2** のサンプルを提供して頂いた。この 7-oxo-AmB **2** をヒドリド還元が付すことで、新たな AmB 構造類縁体 7 $\alpha$ -OH-AmB **3**, 7 $\beta$ -OH-AmB **4** を調製した (スキーム 2-1)。

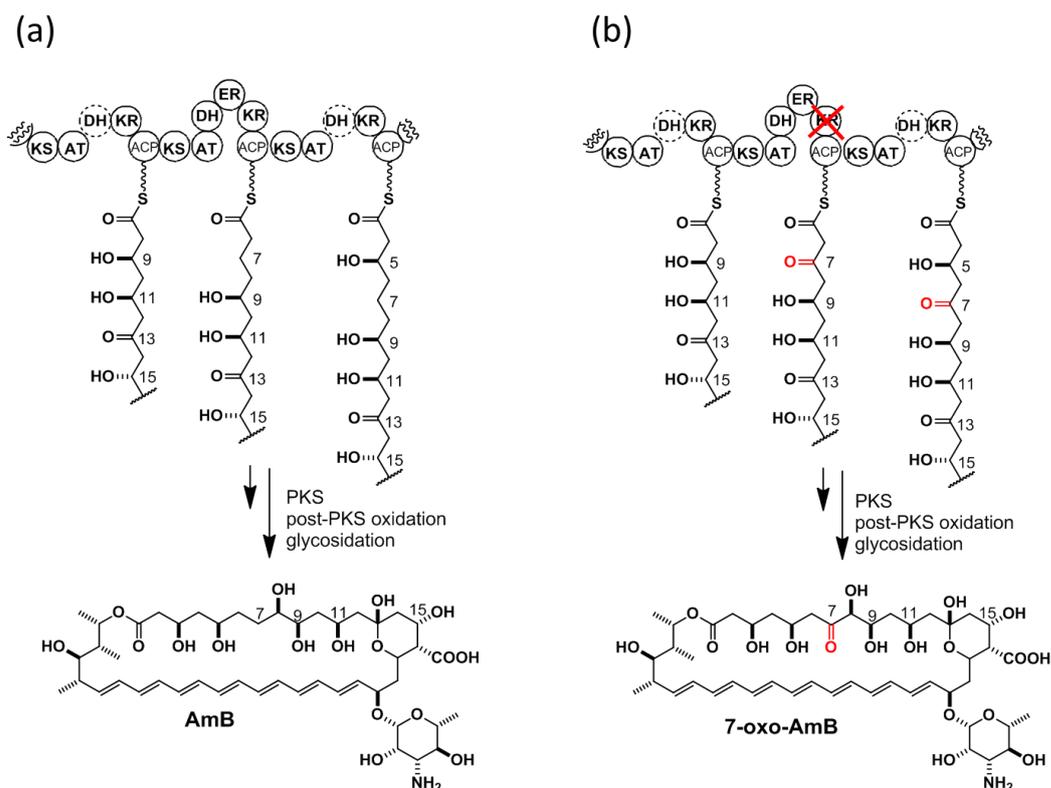
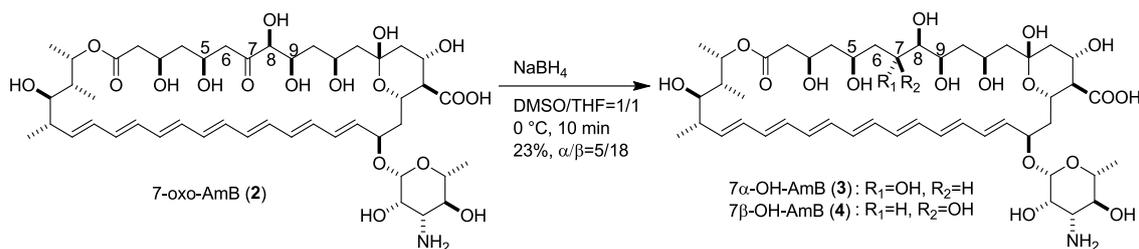


図 2-1 (a) AmB と (b)7-oxo-AmB **2** のポリオール部分のポリケチド生合成モジュール。7-oxo-AmB のモジュールでは7位に作用するケトリダクターゼ(KR) を不活性化することにより、7位にアルコールが形成されず、7位アルコールに作用するデハイドラターゼ (DH) やエノイルリダクターゼ (ER) が反応しない。



スキーム 2-1  $7\alpha$ -OH-AmB **3**,  $7\beta$ -OH-AmB **4** の調製

THF、メタノール混合溶媒中において、7-oxo-AmB **2** に水素化ホウ素ナトリウムを作用させ、7位のケトン基を還元した。この反応により  $7\alpha$ -OH-AmB **3**、 $7\beta$ -OH-AmB **4** が 1 : 1 で生成し、これらのジアステレオマーを HPLC により分離、精製した。調製した  $7\alpha$ -OH-AmB **3** および  $7\beta$ -OH-AmB **4** の構造決定は  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC 等の溶液 NMR 測定により行った。特に7位の立体化学の決定については、ユニバーサル NMR データベース法により  $^{13}\text{C}$  NMR の化学シフトを分析することで決定した (図 2-2 a-c) <sup>16</sup>。ユニバーサル NMR データベース法は、3 結合以上離れた炭素に結合した官能基は化学シフトに影響を与えないことを仮定し、様々な立体化学を含むポリオール構造について化学シフトをデータベース化し、それと構造決定を行いたい化合物を比較することで立体化学の決定を行う手法である。過去に報告されている 1,3,5-トリオール構造が調製した AmB 誘導体の 3 位から 7 位に一致していることから、この部分の  $^{13}\text{C}$  化学シフトをデータベースと比較した。1,3,5-トリオール構造におけるユニバーサル NMR データベース法では、中心のアルコールにおける  $^{13}\text{C}$  の化学シフトについて *syn/syn* トリオールに比べて *syn/anti* トリオールが 2 ppm 程度小さくなることが知られている (図 2-2a)。ヒドリド還元によって得られた二種類の化合物について、 $^{13}\text{C}$  化学シフトを  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC によって求め、データベースとの比較を行った。その結果、片方の化合物は 5 位の  $^{13}\text{C}$  化学シフトが 66.1 ppm であったのに対し (図 2-2b)、もう片方は 67.8 ppm であった (図 2-2c)。これを 1, 3, 5-トリオール構造におけるユニバーサル NMR データベースと比較し、前者が *syn/anti* トリオール、後者が *syn/syn* トリオールであることから、前者が  $7\alpha$ -OH-AmB **3**、後者が  $7\beta$ -OH-AmB **4** であると決定できた。

これに加えて、NOESY より得られた NOE 相関でも立体化学の確認を行った (図 2-2d, e)。ポリオール部分の C7-C8、C8-C9 結合が *anti* 配座を取っていると仮定すると、 $7\beta$ -OH-AmB **4** では 7 位-CH と 9 位-CH の水素間に NOE 相関が観測できる。これにより帰属した立体化学はユニバーサル NMR データベース法で得られたものと一致し、この手法でも立体化学を確認することができた。

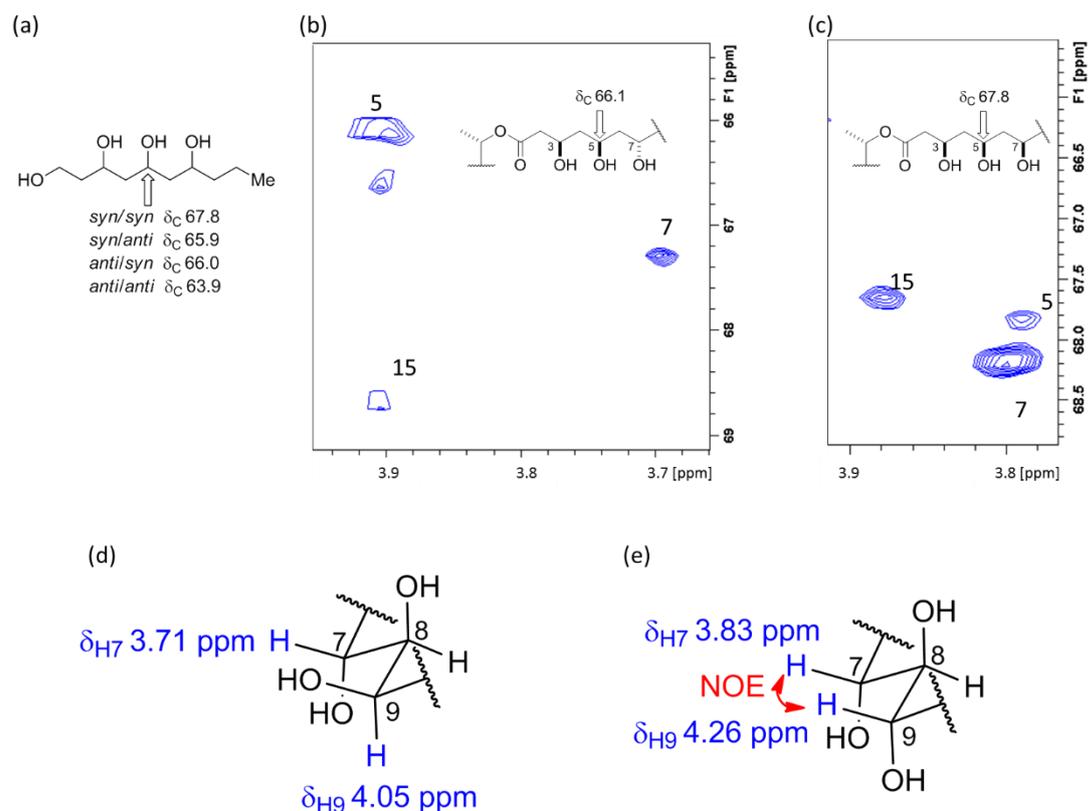


図 2-2 (a) ユニバーサル NMR データベースにおける 1,3,5,7-tetraol の  $^{13}\text{C}$  化学シフト <sup>16</sup>。(b) 7 $\alpha$ -OH-AmB **3**, (c) 7 $\beta$ -OH-AmB **4** の 5 位における  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルと  $^{13}\text{C}$  化学シフト。(d, e) 2 つの類縁体の H7-H9 間における NOE 相関の違い (d) 7 $\alpha$ -OH-AmB **3** では H7-H9 間に NOE 相関が観測されなかった一方で、(e) 7 $\beta$ -OH-AmB **4** においては H7-H9 間の NOE 相関が観測された。

## 2-2 抗菌、溶血活性試験

AmB、および調製した 7-oxo-AmB **2**, 7 $\alpha$ -OH-AmB **3** および 7 $\beta$ -OH-AmB **4** について、抗真菌活性試験を塩野義製薬株式会社 (巻氏、堀田氏) に行って頂いた (表 2-1)。抗真菌活性試験では、7 $\alpha$ -OH-AmB **3**、7 $\beta$ -OH-AmB **4** のサンプル量が少ないことから、*Candida albicans* に対する抗真菌活性のみを測定している。この結果では 7-oxo-AmB **2**, 7 $\alpha$ -OH-AmB **3**, 7 $\beta$ -OH-AmB **4** は、AmB に比べて低い抗真菌活性を示した。一方で 7 $\beta$ -OH-AmB **4** はこれら類縁体の中で、はわずかながら抗真菌活性が高かった。また、これら AmB 類縁体に対し溶血活性試験を

行った結果、同様に、AmB に比べて類縁体の活性は低いという結果を得た。一方で、興味深いことに、7 $\alpha$ -OH-AmB 3 と 7 $\beta$ -OH-AmB 4 の溶血活性の大きさはほぼ同等であり、抗真菌活性と異なる結果が得られた。

表 2-1 AmB および調製した類縁体の *Candida albican* に対する抗真菌活性とヒト赤血球に対する 50%溶血活性。\*7-oxo-AmB 2 は 15  $\mu$ M において 10%溶血活性を誘導した。

	抗真菌活性(MIC, $\mu$ M)	50% 溶血活性 ( $\mu$ M)
AmB	0.25	3.2
7-oxo-AmB 2	2	>15*
7 $\alpha$ -OH-AmB 3	4	5.4
7 $\beta$ -OH-AmB 4	1	6.9

### 2-3 K<sup>+</sup>イオン透過活性試験

上述の抗真菌活性や溶血活性試験では AmB 類縁体の生物活性を評価できる一方で、AmB のステロールに対する親和性評価には適していない。そこで、当研究室の高野らにより開発された、人工脂質膜を用いた K<sup>+</sup>イオン透過活性試験により、イオンチャネル形成時のポリオール部分の役割やステロール選択性への寄与を調べるこ

ととした<sup>17</sup>。この活性試験では pH 感受性蛍光色素である 2',7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein (BCECF, 図 2-3) を内包させたリポソームを用いて、AmB の脂質膜に対する透過活性を定量的に解析できる。

AmB のチャネル形成によって引き起こされる K<sup>+</sup>イオンの流入に伴うリポソーム内の pH 変化を蛍光色素 BCECF の蛍光強度変化によって評価する(図 2-4)。BCECF を内包させたリポソームの内外に pH 勾配および K<sup>+</sup>イオンの濃度勾配を形成させた後、AmB を添加すると、AmB のイオンチャネルを介して、K<sup>+</sup>イオンが濃度勾配に従ってリポソーム内へ流入する。これに伴い、リポソーム内の水素イオンはプロトンキャリアである Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP) によってリポソーム外へ流出し、リポソーム内の pH は上昇する。この pH 変化を BCECF の蛍光強度によって観測する。蛍光強度が飽

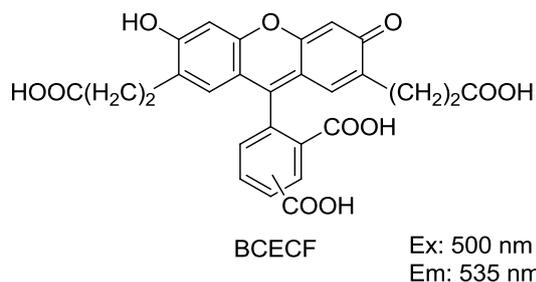


図 2-3 pH 感受性色素 BCECF の化学構造

和した後に、 $K^+$ イオンイオノフォアであるバリノマイシンを添加し、蛍光強度の最大値 ( $F_{max}$ ) を求め、この値で測定時間内の蛍光強度を規格化し、pH 変化の初速度をイオン透過活性の強度として評価する。

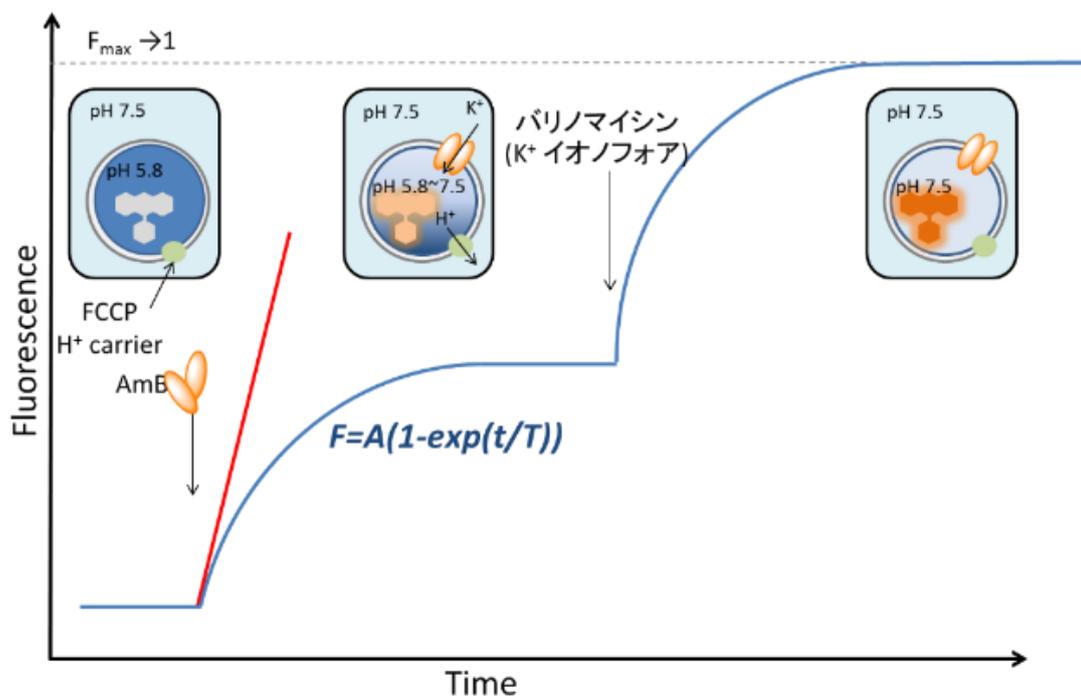


図 2-4 BCECF による  $K^+$ イオン透過活性試験の概略図。

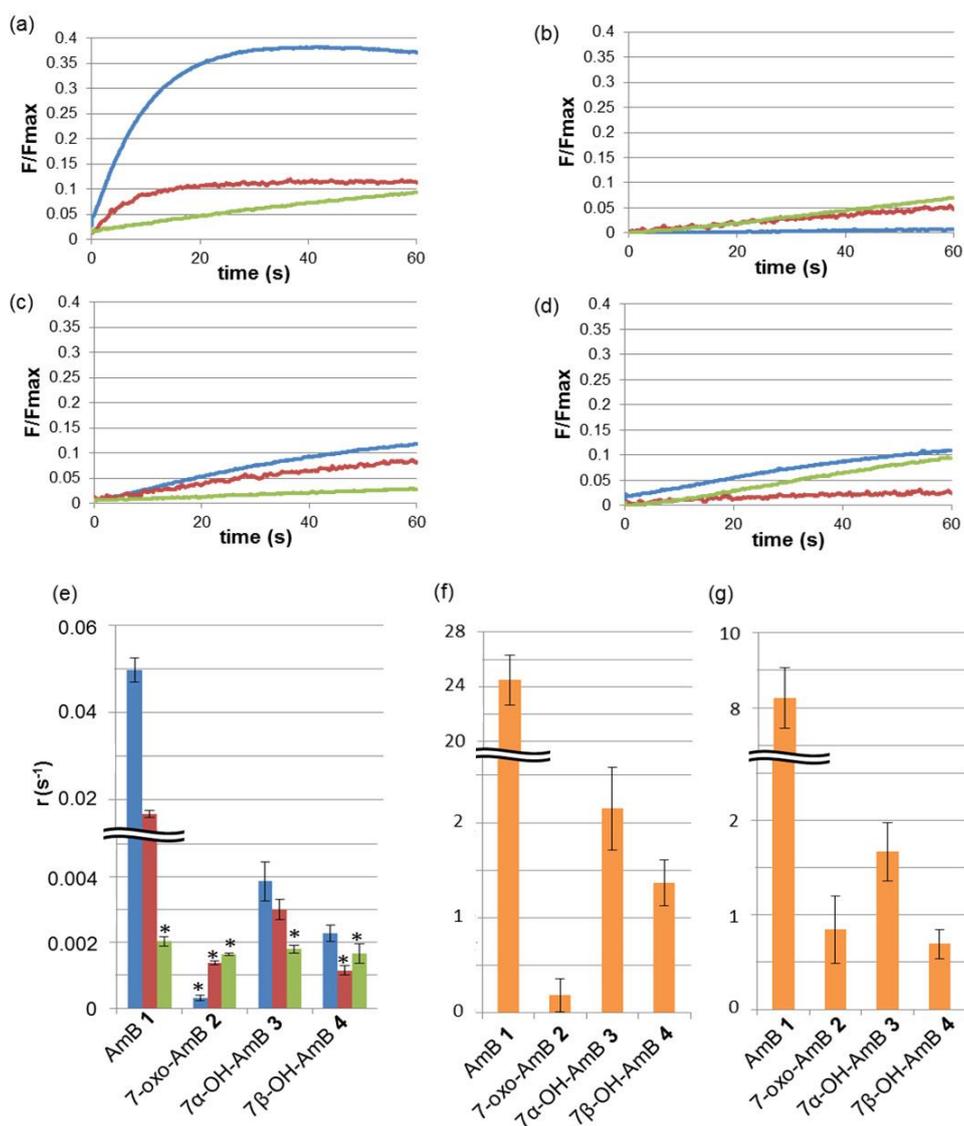


図 2-5 AmB およびその誘導体の人工脂質膜における  $K^+$ イオン透過活性試験。(a)-(d) リポソーム内 pH の時間変化。5 mol% エルゴステロール含有 POPC 膜(青線)、5 mol% コレステロール含有 POPC 膜 (赤線)、ステロール非含有 POPC 膜 (緑線)。(e) AmB 添加直後の  $K^+$ イオン交換速度 ( $r$ )。蛍光強度の時間変化を指数曲線( $F(t)=A(1-\exp(-t/T))$ )としてフィッティングし、 $r$  を蛍光強度変化の初速度  $F'(0)=A/T$  として評価した。フィッティングには AmB 添加から 60 秒間の蛍光強度変化を用いている。5 mol% エルゴステロール含有 POPC 膜(青)、5 mol% コレステロール含有 POPC 膜 (赤)、ステロール非含有 POPC 膜 (緑)。\* $r$  を線形近似により、蛍光強度の時間変化を  $F(t)=rt$  にフィッティングすることで求めた。(f, g) 異なる脂質膜組成における  $K^+/H^+$ イオン交換速度の比。5mol% エルゴステロール含有 POPC 膜/ステロール非含有 POPC 膜 (f)。5mol% コレステロール含有 POPC 膜/ステロール非含有 POPC 膜 (g)。

今回はリン脂質として POPC を用いたリポソームについて、ステロールを含まないもの、10%のコレステロールおよびエルゴステロールを含むものを用いて活性試験を行った。AmB によるリポソーム内の pH 変化を図 2-5 a-d に示した。また  $K^+$ イオン/ $H^+$ イオンの交換速度を図 2-5 e-g にまとめた。全ての類縁体は AmB に比べて活性が大きく低下していることが明らかとなった。しかし、 $7\alpha$ -OH-AmB 3 と  $7\beta$ -OH-AmB 4 はある程度ステロール選択性を維持しており、 $7\alpha$ -OH-AmB 3 が  $7\beta$ -OH-AmB 4 に比べて、わずかながら活性が高いことも明らかとなった。また、 $7\alpha$ -OH-AmB 3 がコレステロール含有膜中でもエルゴステロール膜の 3/4 程度の活性を示しており、 $7\alpha$ -OH-AmB はステロール選択性が弱くなっていると言える。一方、 $7\beta$ -OH-AmB 4 はコレステロール膜中とエルゴステロール膜中の活性の比が 1/2 程度であり、 $7\alpha$ -OH-AmB 3 に比べてステロール選択性が高いことも明らかとなった。また、 $7$ -oxo-AmB 2 はイオン透過活性とステロール選択性が大きく低下していた。

#### 2-4 各類縁体の立体配座の探索

ポリオールの変化した類縁体について立体配座や水素結合モードを比較するために、マクロモデルによる配座探索を行った。この配座探索では水中の環境を再現できるよう、GB/SA solvent model を用いた<sup>18</sup>。このモデルは溶媒和の自由エネルギーを静電的な項と非静電的な項に分けて計算を行うことが可能であり、静電的な項は Generalized Born 式で求め、非静電的な項は溶媒が接触可能な分子の表面積を元に計算している。図 2-6 に AmB および類縁体それぞれについて最安定配座から 5 kJ/mol 以内に得られた配座を示した。この配座探索ではまず、 $7$ -oxo-AmB 2 が AmB や  $7\alpha$ -OH-AmB 3、 $7\beta$ -OH-AmB 4 に比べて、大きく異なる配座を取っていることがわかる。これは 7 位の炭素が  $sp^2$  軌道を持つためであり、結果として、AmB 等が取るような水素結合ネットワークを取れなくなっていることがわかる。これにより、 $7$ -oxo-AmB 2 のポリオール部分は柔軟性が大きく上昇し、再安定配座から 5 kJ/mol 以内に多くの配座が得られている。

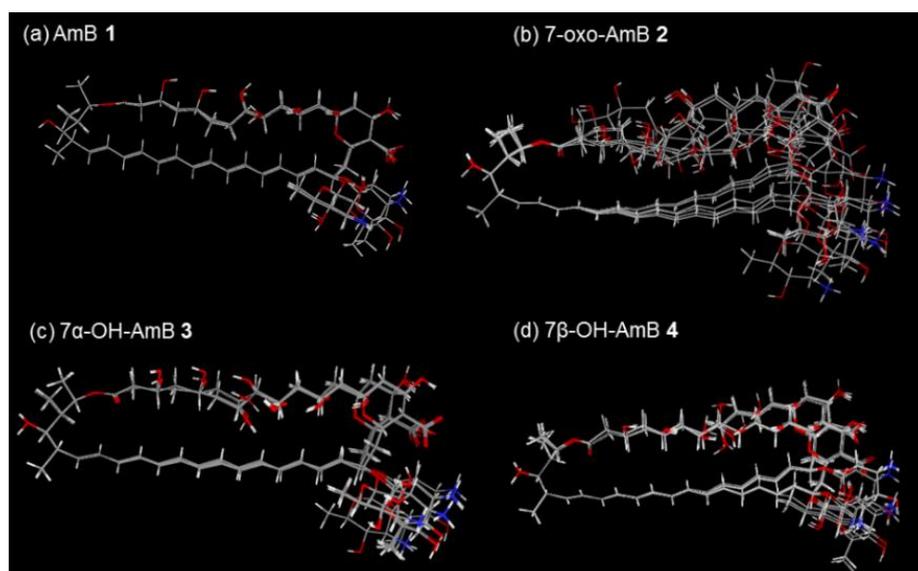


図 2-6 AmB (a), 7-oxo-AmB 2 (b), 7 $\alpha$ -OH-AmB 3 (c), 7 $\beta$ -OH-AmB 4 (d)の配座探索で得られた最安定配座より 5 kJ/mol 以内の安定配座の重ね合わせて示した。

AmB, 7 $\alpha$ -OH-AmB 3, 7 $\beta$ -OH-AmB 4 の配座に着目すると、これらの配座は二種類に分類できる (図 2-7)。一つは、ポリオール部分の炭素-炭素結合が全て *anti* 配座となっている伸長型配座、もう一つが C6-C7 結合のみが *gauche* 配座を取る C6/C7-*gauche* 配座である。AmB の配座探索の結果によると水中において最も安定な配座は C6/C7-*gauche* 配座であると推定された (図 2-7a)。一方で、伸長型配座が最安定配座より約 10 kJ/mol 不安定な配座として得られている (図 2-7e)。これまでに当研究室では、溶液 NMR による解析を元に、AmB のポリオール部分が SDS ミセル中で伸長型配座を取ることを示しており<sup>8</sup>、今回の配座探索の結果と合わせると、AmB は水中から脂質膜中に挿入される過程で配座を C6/C7-*gauche* 配座から伸長型 d 配座に変化させることが示唆された。

また、7 $\alpha$ -OH-AmB 3 については、最安定配座から 21 kJ/mol 以内に C6/C7-*gauche* 配座のみが得られた (図 2-7c)。伸長型配座を取るとき 7 位の  $\alpha$  面に導入された OH 基が疎水性のヘプタエン部分と接触するために、伸長型配座は大きく不安定化されていると考えられる (図 2-7f)。一方で 7 $\beta$ -OH-AmB 4 の伸長型配座は大きく安定化されており、再安定配座から 21 kJ/mol 以内に得られた配座のほとんどは伸長型配座であった。これは 7 位  $\beta$  面に導入された OH 基が 5 位の OH 基と水素結合を形成し (図 2-7d)、伸長型配座を安定化するためであると考えられる。

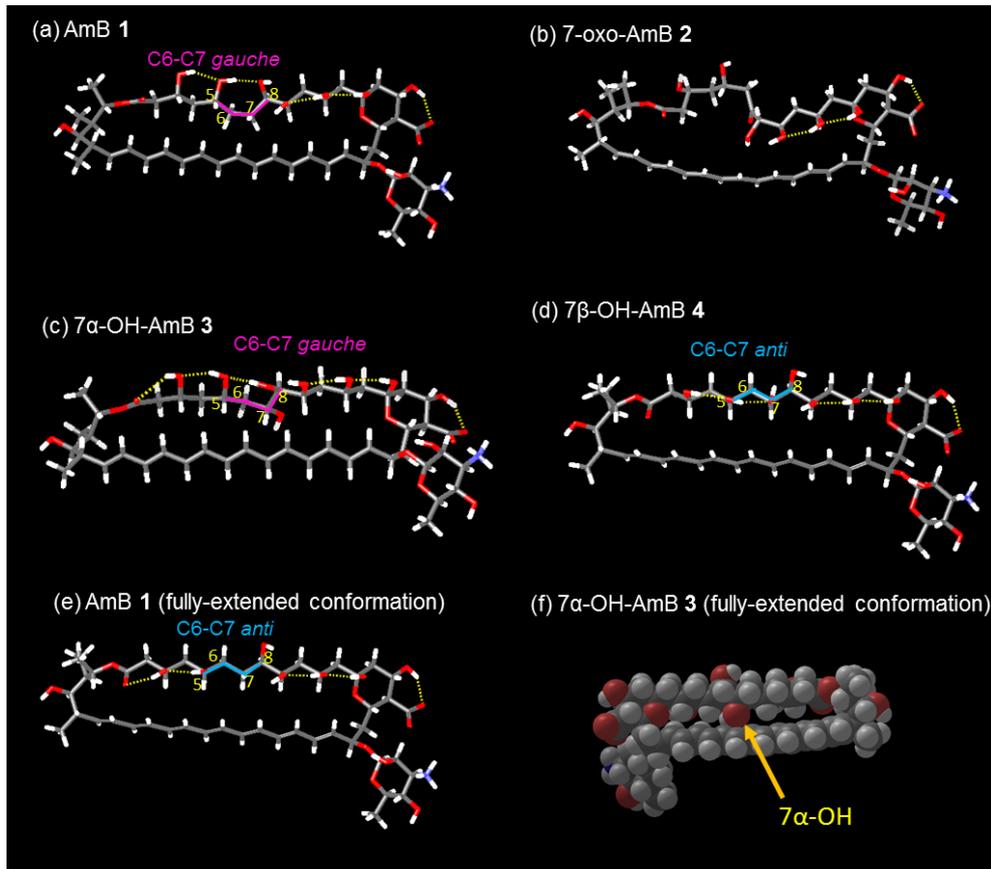


図 2-7 (a-d) AmB (a), 7-oxo-AmB 2 (b), 7 $\alpha$ -OH-AmB 3 (c), 7 $\beta$ -OH-AmB 4 (d)の配座探索で得られた最安定配座。(e) AmB の伸長型配座。最安定配座よりも 10 kJ/mol 程度不安定。(f) 7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の伸長型配座。7 $\alpha$ -OH 基が疎水性のヘプタエン部分に近接するため、配座探索でこの配座は得られなかった。

## 2-5 考 察

本研究で得られた K<sup>+</sup>イオン透過活性試験と配座探索の結果から、AmB 類縁体の活性がポリオール部分の水素結合ネットワークや立体配座に大きく影響されることがわかる。例えば、7-oxo-AmB 2 については、ポリオール部分における水素結合ネットワークが形成できず、その結果、抗真菌活性、イオン透過活性、ステロール選択性を失っていた。特にエルゴステロール含有膜におけるイオン透過活性は、ステロール非含有膜における AmB のイオン透過活性と同程度であるが、エルゴステロール含有膜の方に対して低いイオン透過活性を示している。このことから、7-oxo-AmB 2 のイオン透過活性はエルゴステロールによって阻害されていると考えられる。上で示したように、ポリオール部分の柔軟性はヘプタエン部分の配座に影響を与え、結果として、マクロラクトン環全体の剛直性も変化

すると推定できる。マクロラクトン環全体の剛直性が失われることでステロール選択性が失われることは、AmB の類縁体である *nystatin* でも示されている。*nystatin* は AmB と同様のポリオール部分とポリエン部分を持つが、ポリエン部分の二重結合が一つ少なく、結果として AmB よりもステロール選択性が遥かに小さい<sup>20</sup>。7-oxo-AmB 2 のステロール選択性の低下はこの *nystatin* の例と同様の傾向を示していると言える。また、7-oxo-AmB 2 のイオン透過活性はステロール非含有 POPC 膜よりも弱く、特にエルゴステロール膜において活性が低下している。これは、7-oxo-AmB のように分子全体が柔軟な構造を持つ化合物は、ステロール含有膜などの剛直な膜構造に挿入されにくいことに由来すると考えられる。特に 5 mol% ステロール含有膜についてはエルゴステロールのほうが、コレステロールよりも膜を安定化させる効果が大きいことから、7-oxo-AmB はエルゴステロール含有膜に対する活性が特に低下していると考えられる。

また、7 $\alpha$ -OH-AmB 3 は AmB が水中で取ると推定される C6/C7-*gauche* 配座を安定化する一方で AmB が膜中で形成する伸長型配座を大きく不安定化していた。この配座解析の結果は溶液 NMR による NOE 測定により、*gauche* 配座が観測されることから支持されている (図 2-8)。当研究室で行われた構造活性相関研究<sup>20,21</sup> および固体 NMR による REDOR 測定によると<sup>22</sup>、AmB/エルゴステロール間の相互作用は VDW 相互作用により安定化されている。7 $\alpha$ -OH-AmB 3 はイオン透過活性試験の結果ではステロール選択性が AmB に比べて低下しており、この配座探索の結果と組み合わせると、C6/C7-*gauche* 配座は AmB/エルゴステロール間の VDW 相互作用を阻害することが示唆された。

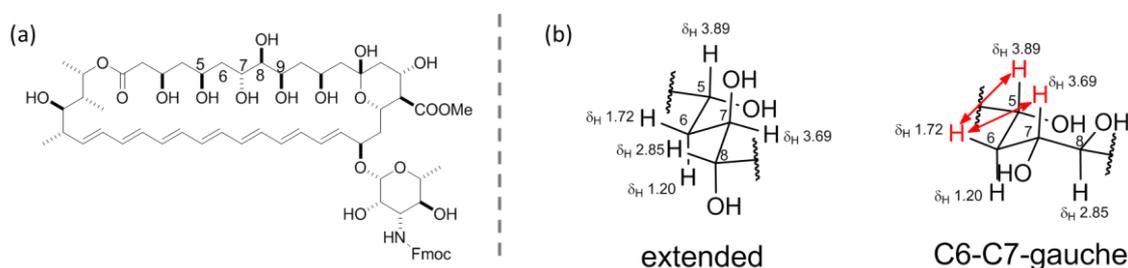


図 2-8 (a) NOE による配座解析に用いた N-Fmoc-7 $\alpha$ -OH-AmB methylester の化学構造。(b) N-Fmoc-7 $\alpha$ -OH-AmB methylester の NOESY 測定により得られた NOE 相関 (赤矢印)。DMSO-d<sub>6</sub> 中で C6-C7-*gauche* 配座に特有の NOE 相関が得られたため、C6-C7-*gauche* 配座が安定化されていると考えられる。

一方で、7 $\beta$ -OH-AmB 4 についてはエルゴステロールとの VDW 相互作用を形成しやすい伸長型配座が大きく安定化されていた。この結果は、イオン透過活性

試験や抗真菌活性試験の結果において、 $7\beta$ -OH-AmB **4** がステロール選択性を保持しているという結果と一致する。一方で、 $7\beta$ -OH-AmB **4** のイオン透過活性は AmB に比べて低下している。エルゴステロール含有膜に対する  $7\beta$ -OH-AmB **4** の親和性を AmB と比較するために、5%-エルゴステロール含有 POPC 膜における  $7\beta$ -OH-AmB **4** の UV/Vis スペクトルを AmB と比較した (図 2-9)。この測定では 415 nm における吸収極大が AmB の膜への挿入を表す<sup>23,24</sup>。 $7\beta$ -OH-AmB **4** のスペクトルに着目すると、この部分のピークは 415 nm ではなく 408 nm に極大値を持っていた。この結果は  $7\beta$ -OH-AmB **4** がエルゴステロール含有膜に対する親和性が低く、水中に分散していることを示唆している。 $7\beta$ -OH-AmB **4** では伸長型配座が VDW 相互作用を形成しやすいために、水中で大きな会合体を形成し、膜へ分配されにくいと考えられる。近年の MD 計算および分光学的手法により、AmB の水中における二分子会合体構造が推定されており、この構造でも AmB は伸長型配座を示している<sup>3</sup>。

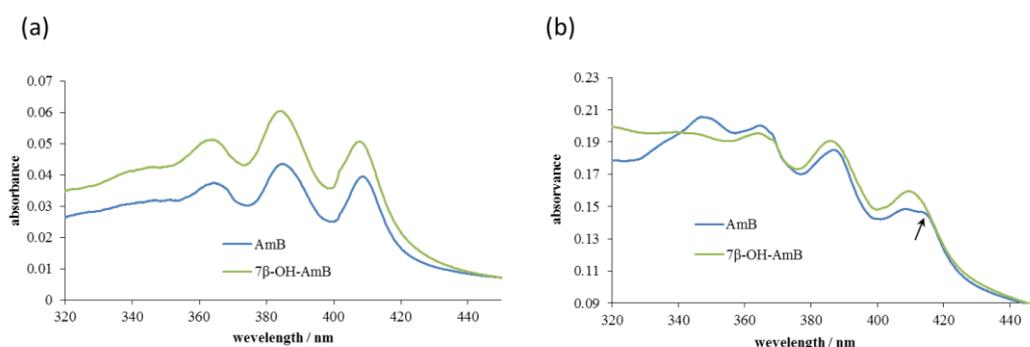


図 2-9 AmB と  $7\beta$ -OH-AmB **4** の UV スペクトルの比較 (1.67  $\mu$ M)。 (a) スクローブ緩衝液中。 (b) 5%エルゴステロール含有 POPC 膜中(drug/lipid =  $1.0 \times 10^{-2}$ )。

これらの結果を踏まえると、AmB のように水中と脂質膜中で異なる配座を取ることが活性に重要であることが考えられる (図 2-10)。AmB 様のポリオール構造は C6-C7 *gauche* 配座と伸長型配座のエネルギー差が少なく、周囲の環境によって安定な配座が異なると考えられる。AmB は水中では C6-C7 *gauche* 配座を取ることによって自己会合が妨げられる一方、脂質膜中では伸長型配座を取ることによって、エルゴステロールとの VDW 相互作用によりチャネル構造が安定化されている。このように水中と脂質膜中の両方で活性に有利な配座を形成できることが、AmB が他の類縁体に比べて強い活性を持っている理由であると考えられる。また、片方の配座しか形成できない  $7\alpha$ -OH-AmB **3** や  $7\beta$ -OH-AmB **4** は、それぞれエルゴステロールとの相互作用の低下や水中での自己会合が原因となり、活性が低下しているという推論も可能である。

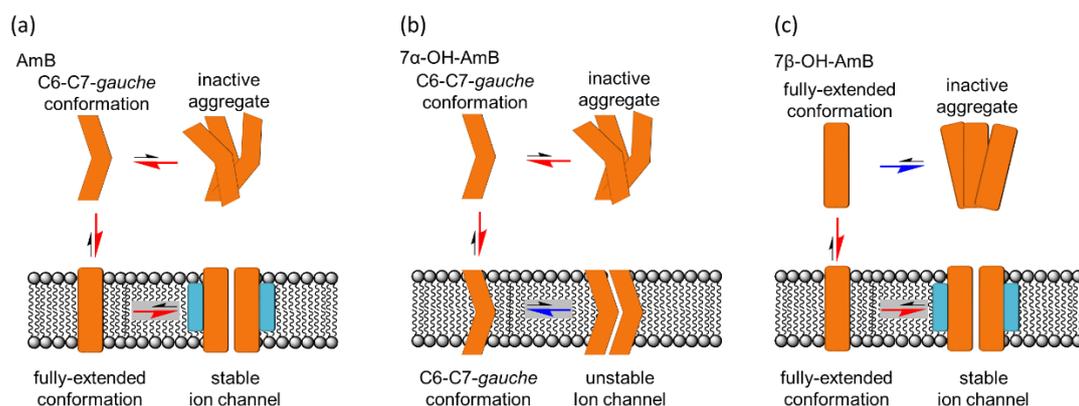


図 2-10 AmB(a)、7 $\alpha$ -OH-AmB 3(b)、7 $\beta$ -OH-AmB 4(c)の配座が活性に与える影響についての考察。脂質膜中での C6/C7-*gauche* 配座は安定なイオンチャンネルを形成できない他、水中での伸長型配座は自己会合を促進するためにチャンネル活性に不利であると考察した。AmB のように水中で C6/C7-*gauche* 配座、脂質膜中で伸長型配座を形成することが活性に有利であると考えられる。

このモデルを過去に報告されているポリオール部分の構造類縁体にも適用した (図 2-11a)。これまでの構造活性相関研究では、nystatin 様のポリオール構造を持つ S44HP は AmB とほぼ同程度の抗真菌活性を示すのに対し、アルコールの配置が AmB や nystatin と異なる BSG003 は抗真菌活性が AmB の 1/67 に低下することが知られている。また、nystatin 様のポリオール構造からアルコールの数を一つ減らした BSG022 については AmB と抗真菌活性がほぼ等しいことが報告されている。これらの構造類縁体について、本研究と同条件で配座探索を行った所、S44HP については最安定配座が C8/C9-*gauche* 配座であった一方で、最安定配座から 11.772 kJ/mol 不安定な配座として伸長型配座が得られた (図 2-11 b,e)。これは *gauche* 配座となる結合が異なるものの AmB の配座探索の結果と同じ傾向を示している。活性の弱い BSG003 については最安定配座が伸長型配座であり、C9-C10 結合が *gauche* 配座となる構造も得られる一方、基本的には伸長型配座が得られるという結果となった(図 2-11c)。このことは伸長型配座しか取ることのできない類縁体は活性が弱くなるという、本研究で提唱したモデルと一致する。一方で AmB と同程度の活性を示す BSG022 も伸長型配座しか形成できないという結果になったが(図 2-11d)、これはポリオールの個数が少ないために実際はポリオール部分の配座が計算結果より柔軟であるため、C8/C9-*gauche* 配座を取ることができると予想している。

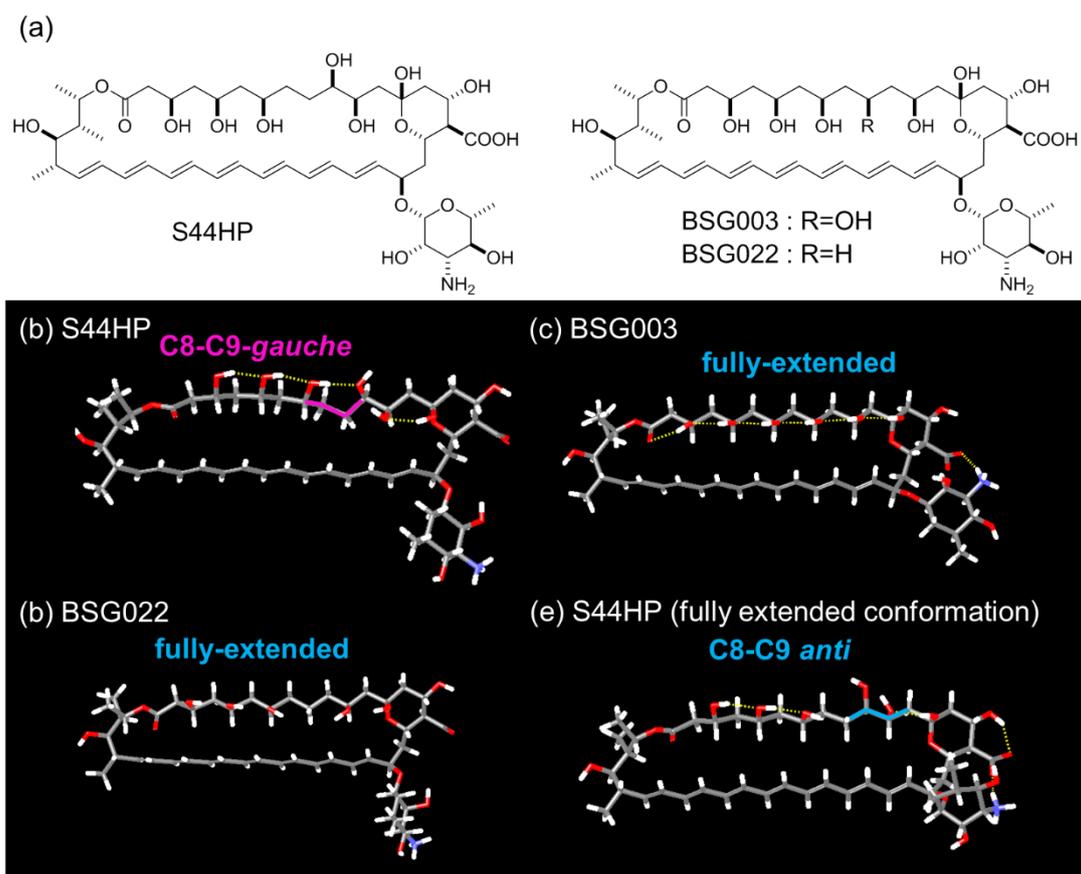


図 2-11 (a) 過去に報告されたポリオール部分の構造を変化させた類縁体。S44HP, BSG022 は AmB と同程度の活性を示すが、BSG003 は活性が 1/67 低下する。(b-d) S44HP (b)、BSG003 (c)、BSG022 (d) の最安定配座。(e) S44HP の伸長型配座。最安定配座から 11.772 kJ/mol 不安定な配座として得られた。

## 2-6 本章のまとめ

本研究では AmB のポリオール部分の構造を変化させた類縁体  $7\alpha$ -OH-AmB **3**、 $7\beta$ -OH-AmB **4** を遺伝子工学により得られる  $7$ -oxo-AmB **2** より調製し、構造活性相関研究に用いた。 $7$ -oxo-AmB **2** がステロール選択性を完全に失った一方で、 $7\alpha$ -OH-AmB **3**、 $7\beta$ -OH-AmB **4** はある程度活性を保持するという結果になった。配座探索の結果より、ポリオール部分の水素結合ネットワークはポリオールの配座に大きく関係し、これが活性に影響を与えていることが示唆された。これらの研究で、 $7\beta$ -OH-AmB **4** は伸長型配座を形成し、これが AmB の脂質膜中における配座と類似していることが示唆された。よって  $7\beta$ -OH-AmB **4** は AmB の形成するイオンチャネル構造を研究する上で有用な測定プローブになり得る。

また、本研究では、マクロラクトン環の配座の安定性が、エルゴステロールとの相互作用に重要であるということが示唆された。

## 実験項

### 試薬

7-oxo-AmB **2** は Dublin 大学の Patrick Caffrey 教授に提供して頂いた<sup>13</sup>。AmB、BCECF、バリノマイシン、FCCP、水素化ホウ素ナトリウム、DMSO はナカライテスクから、エルゴステロールは東京化成工業から、POPC は日本油脂から、THF は関東化学から購入したものを用いた。K<sup>+</sup>透過活性試験、UV スペクトル測定におけるリポソームサンプルにはナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用クロロホルムおよびメタノールを用いた。また水には MilliQ 水(Millipore 社)を用いた。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。HPLC に用いた緩衝液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 K<sup>+</sup>透過活性試験、UV スペクトル測定のサンプル調製の際、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( $\epsilon_{415}=1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )。逆相カラムクロマトグラフィーはコスモシール 75C<sub>18</sub>-OPN (ナカライテスク)を用い、HPLC 精製は COSMOSIL Packed Column, 5C<sub>18</sub>-MS-II (ナカライテスク、10φ×250 mm) を用いた。

### 使用機器

溶液 NMR は ECA 500 (日本電子, <sup>1</sup>H NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 125 MHz) および AVANCE 700 (Bruker, <sup>1</sup>H NMR: 700 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 175 MHz) を用いた。質量分析は LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。蛍光強度測定には分光蛍光光度計 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。

### 7 $\alpha$ -OH-AmB **3**, 7 $\beta$ -OH-AmB **4** の調製

7-oxo-AmB **2** (12.7 mg, 13.5  $\mu\text{mol}$ )を DMSO/THF (1:1) 混合溶媒 1.6 mL に溶解させ、0 ° C に冷却した。これに水素化ホウ素ナトリウム (2.05 mg, 4.0 Eq) を加え、10 分間攪拌し、ケトン基のヒドリド還元を行った。7  $\alpha$ -OH-AmB **3**, 7  $\beta$ -OH-AmB **4** の混合物が得られたため、反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (100  $\mu\text{L}$ ) を加えて pH を調製した後、生成物を逆相クロマトグラフィーにより粗精製することで塩を取り除いた。溶媒を減圧留去した後、高速液体クロマトグラフィー (COSMOSIL Packed Column, 5C<sub>18</sub>-MS-2, 10  $\phi$  × 250 mm, solvent gradient: 30% 0.5 mM ammonium acetate buffer in MeOH to 0% for 30 min) により 7  $\alpha$ -OH-AmB **3**

(retention time = 29 min)と 7  $\beta$ -OH-AmB **4** (retention time = 31 min)を精製した。7  $\alpha$ -OH-AmB **3**, 7  $\beta$ -OH-AmB **4** の収率はそれぞれ 5%、18%であった。

7 $\alpha$ -OH-AmB **3**: yellow solid; HRMS (ESI) calcd for C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>18</sub>Na 962.4725, found 962.4729.

7 $\beta$ -OH-AmB **4**: yellow solid; HRMS (ESI) calcd for C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>18</sub>Na 962.4725, found 962.4728.

NMR の帰属については表 2-3 を参照

### 抗真菌活性および溶血活性試験

抗真菌活性試験は塩野義製薬に依頼し、Clinical and Laboratory Standard Institute による Protocol 27-A に従い、液体培地における真菌の濃度を測定する手法により行って頂いた。

溶血活性試験では 1%ヒト赤血球溶液におけるヘモグロビンの溶出を 450 nm の可視光吸収より測定した。ヒトの血液を 2000 rpm で遠心分離し、上清をデカンテーションにより除去した。得られた赤血球の沈殿を PBS 緩衝液で三度洗浄し、もとの血液の 1/100 の濃度になるよう PBS 緩衝液に懸濁させた。この懸濁液 190  $\mu$ L に AmB およびその類縁体の DMSO 溶液 10  $\mu$ L を加え、38 ° C で 18 時間、穏和に攪拌しながらインキュベーションを行った。この懸濁液を 2000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清の 450 nm における可視光吸収をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices)によって測定し、溶血活性を求めた。ポジティブコントロールとして、1%赤血球溶液を蒸留水で調製したものを、ネガティブコントロールとして、1%赤血球懸濁液に 10  $\mu$ L の DMSO を加えたものを用いた。

### K<sup>+</sup>イオン透過活性試験

K<sup>+</sup>イオン透過活性試験は、高野らによって報告された手法に従って行った<sup>17</sup>。POPC とエルゴステロールまたはコレステロール (5 mol%) をクロロホルムに溶解させ、溶媒をゆっくり留去し、ナスフラスコ中で脂質膜フィルムを形成させた。フィルムは真空中で 6 時間以上乾燥させた。リン酸緩衝液 (0.15 M, pH 5.6) によって調製した BCECF 溶液 (1 mL, 76  $\mu$ M) によってフィルムを水和させ、ボルテックスおよびソニケーションにより脂質膜を懸濁させた。この懸濁液に凍結融解を 5 回繰り返してリポソームを形成させた後、Liposofast<sup>®</sup> シリンジを用いてポリカーボネートフィルター (200 nm pore size, Avestin Inc.) を通し、BCECF を内包した LUV を形成させた。リポソーム外の BCECF は Sepharose 4B (Sigma-

Aldrich) を用いたゲル濾過により除去した。得られた LUV 懸濁液のリン脂質濃度をリン脂質 C テスト (和光純薬工業) により決定した後、リン酸緩衝液 (0.15 M, pH5.6) を加え、リン脂質濃度が 0.5 mM の LUV 懸濁液を調製した。この LUV 懸濁液 5 mL に対し 50  $\mu$ L の FCCP-エタノール溶液 (1 mM) を加え、6 ° C に冷却した。この LUV 溶液 200  $\mu$ L を、1.8 mL の K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液 (0.15 M, pH9.2) を入れた蛍光用セルに加えた。マグネティックスターラーを備えた蛍光光度計 (FP-6600, 日本電子) に蛍光用セルをセットし、AmB またはその誘導体の DMSO 溶液 (10  $\mu$ L) を加えた。K<sup>+</sup>イオンの流入による pH 変化を蛍光強度変化によって観測した。AmB およびその誘導体の DMSO 溶液を加えてから 70 秒後にバリノマイシンのメタノール溶液 (5 mM, 10  $\mu$ L) を加えて、蛍光強度の最大値 (F<sub>max</sub>) を得た。得られた蛍光強度の時間変化を F<sub>max</sub> により規格化した後に解析を行った。また、ネガティブコントロールは AmB 溶液の代わりに DMSO (10  $\mu$ L) を加えて行った。

AmB もしくは AmB 誘導体の DMSO 溶液を加えた時間を 0 秒とし、それ以降 60 秒間の蛍光強度変化を  $F/F_{\max}=A(1-\exp(-t/T))$  によりカーブフィッティングすることで、K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換の初速度  $r$  を求めた。初速度は  $r_{\text{ini}}=A/T (t=0)$  として計算した。また、活性が弱く上記の式を適用できない場合は、 $F/F_{\max}=rt$  としてフィッティングを行った。以上の実験は全て 3 連で行い、これから得られた初速度の標準誤差をエラーバーとして計算した。

## 配座探索

配座探索は Macromodel version 9.9 (Schrödinger) を用いて行った。AmB の初期構造は N-ヨードアセチル AmB の結晶構造を基に作成した<sup>19</sup>。新たに調製した類縁体の初期構造も、この結晶構造の 7 位の水素を特定の官能基に置換して作成した。また、初期構造について 41 位のカルボキシル基、3' 位のアミノ基は電荷を持ち、それぞれ COO<sup>-</sup>、NH<sub>3</sub><sup>+</sup> という形で計算を行った。配座のサンプリングは Monte Carlo Multiple Minimum (MCMM) 法<sup>26</sup> を使って行い、力場は OPLS\_2005<sup>27</sup> を用いている。この配座探索では 5000 個の配座をランダムに生成し、それぞれの配座を共役勾配法により最適化した。極性官能基における部分電荷は表 2-2 に示した値を用いた。また、溶媒和のモデルとして generalized Born-surface area (GB/SA) 法を用いた。

表 2-2 計算で用いた極性官能基の部分電荷

NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	N	0.300
	H	0.330
COO <sup>-</sup>	O	-0.800
OH	O	-0.683
	H	0.418
acetal	O	-0.583

### UV/Vis スペクトル測定

AmB および 7β-OH-AmB **4** (1.07 nmol), POPC(112.5 nmol), エルゴステロール (12.5 nmol)を CHCl<sub>3</sub>/ MeOH =5/3 に溶解させた後、試験管中でアルゴン流により溶媒を留去しフィルムを形成させた。これを真空中で 6 時間乾燥させた後、8% スクロース水溶液 (200 μL) で水和させ、vortex と超音波破碎、凍結融解により MLV を形成させた。これに 8% スクロース水溶液 550 μl を加え、750 μL の MLV 懸濁液とした。この全量をセル長 1 cm 石英セミマイクロセルに移し、300~450 nm の範囲で UV/Vis スペクトルを測定した。

表 2-3 7 $\alpha$ -OH-AmB **3**, 7 $\beta$ -OH-AmB **4**, *N*-Fmoc-7 $\alpha$ -OH-AmB **3** methylester, 7 $\beta$ -OH-AmB **4** methylester の NMR 化学シフト比較。AVANCE 700 (Bruker, 700 MHz) により測定した COSY および HSQC スペクトルより帰属。

	7 $\alpha$ -OH-AmB <b>3</b>		7 $\beta$ -OH-AmB <b>4</b>		<i>N</i> -Fmoc-7 $\alpha$ -OH-AmB methylester		<i>N</i> -Fmoc-7 $\beta$ -OH-AmB methylester	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
2	2.2 (a) 2.2 (b)	42.8	2.21 (a) 2.21 (b)	42.8	2.22 (a) 2.17 (b)	42.8	2.20 (a) 2.20 (b)	42.8
3	4.13	67.3	4.05	66.5	4.13	67.2	4.03	66.1
4	1.45 (a) 1.35 (b)	45.6	1.5 (a) 1.43 (b)	45	1.48 (a) 1.36 (b)	45.8	1.48 (a) 1.38 (b)	45.6
5	3.91	66.1	3.8	67.8	3.89	66.5	3.84	68.8
6	1.7 (a) 1.17 (b)	43.5	1.7 (a) 1.54 (b)	-	1.72 (a) 1.19 (b)	43.4	1.67 (a) 1.36 (b)	40.7
7	3.71	67.3	3.83	68.1	3.68	67.4	3.78	68.1
8	2.81	77.5	3.05	74.2	2.85	77.4	3.05	74.5
9	4.05	66.6	4.26	68.2	4.03	66.0	4.25	68.1
10	1.56 (a) 1.56 (b)	-	1.55 (a) 1.55 (b)	-	1.56 (a) 1.56 (b)	-	1.54 (a) 1.54 (b)	46.5
11	4.14	67.2	4.19	66.1	4.29	68.3	4.21	66.1
12	1.56 (a) 1.56 (b)	47.5	1.55 (a) 1.55 (b)	47.1	1.57 (a) 1.57 (b)	46.9	1.54 (a) 1.56 (b)	41.1
14	1.89 (a) 1.07 (b)	45.1	1.84 (a) 1.05 (b)	44.9	1.89 (a) 1.13 (b)	44.8	1.89 (a) 1.12 (b)	44.8
15	3.91	68.8	3.89	67.8	4.01	70.5	4.02	66.0
16	1.69	-	1.69	39.4	2.07	30.7	2.06	58.0
17	4.32	75.7	4.26	-	4.23	65.7	4.22	66.3
18	2.23 (a) 1.51 (b)	-	2.25 (a) 1.51 (b)	-	1.86 (a) 1.53 (b)	37.4	1.87 (a) 1.53 (b)	37.4
19	4.34	75.5	4.36	75.6	4.35	75.0	4.36	75.1
20	6.1	132.6	6.03	131.4	5.98	137.2	5.95	136.9
32	6.06	132	6.1	138.0	6.06	131.9	6.08	131.8
33	5.43	137.5	5.48	137.9	5.44	137.5	5.47	137.5
34	2.31	42.7	2.29	42.6	2.30	42.7	2.27	42.9
35	3.07	74.2	3.1	75.2	3.07	77.8	3.09	77.9
36	1.74	-	1.72	38.8	1.75	21	1.78	-
37	5.18	69.5	5.14	70.1	5.22	69.0	5.20	65.7
38	1.1	17.8	1.11	17.7	1.11	17.9	1.10	17.7
39	0.88	19.2	0.92	19.2	0.89	18.1	0.91	18.1
40	1.03	19.0	1.03	19.8	1.03	19.2	1.03	19.2
1'	4.49	97.4	4.36	100.0	4.31	97.4	4.30	97.2
2'	-	-	-	-				

3'	2.89	53.8	-	-	3.34	59.7	3.39	57.8
4'	3.14	73.1	3.03	73.7	3.16	74.2	3.16	74.2
5'	3.12	73.7	3.14	73.7	3.16	70.0	3.16	70.1
6'	1.15	19.0	1.15	18.7	1.17	19.1	1.17	18.8

本章は Elsevier の *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 誌に投稿した論文を基に作成した。

Adapted with permission from Yamamoto, T.; Umegawa, Y.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Hanashima, S.; Murata, M.; Haser, R.; Rawlings, B.; Caffrey, P. *Bioorgan Med Chem* **2015**, *23*, 5782–5788.

Copyright (2015) Elsevier

## 参考文献

- (1) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63–78.
- (2) Neumann, A.; Baginski, M.; Winczewski, S.; Czub, J. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1485–1494.
- (3) Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szlajak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czub, J.; Gruszecki, W. I. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13821–13832.
- (4) Wasko, P.; Luchowski, R.; Tutaj, K.; Grudzinski, W.; Adamkiewicz, P.; Gruszecki, W. I. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1511–1520.
- (5) Gruszecki, W. I.; Luchowski, R.; Gagoś, M.; Arczewska, M.; Sarkar, P.; Hereć, M.; Myśliwa-Kurdziel, B.; Strzałka, K.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z. *Biophys. Chem.* **2009**, *143*, 95–101.
- (6) Resat, H.; Baginski, M. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 294–305.
- (7) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. A. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 560–570.
- (8) Matsumori, N.; Houdai, T.; Murata, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 700–706.
- (9) Caffrey, P.; Lynch, S.; Flood, E.; Finnan, S.; Oliynyk, M. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 713–723.
- (10) Carmody, M.; Murphy, B.; Byrne, B.; Power, P.; Rai, D.; Rawlings, B.; Caffrey, P. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34420–34426.
- (11) Caffrey, P.; Aparicio, J. F.; Malpartida, F.; Zotchev, S. B. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 639–653.
- (12) Murphy, B.; Anderson, K.; Borissow, C.; Caffrey, P.; Griffith, G.; Hearn, J.; Ibrahim, O.; Khan, N.; Lamburn, N.; Lee, M.; Pugh, K.; Rawlings, B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3758–3770.
- (13) Power, P.; Dunne, T.; Murphy, B.; Nic Lochlainn, L.; Rai, D.; Borissow, C.; Rawlings, B.; Caffrey, P. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 78–86.
- (14) Brautaset, T.; Sletta, H.; Degnes, K. F.; Sekurova, O. N.; Bakke, I.; Volokhan, O.; Andreassen, T.; Ellingsen, T. E.; Zotchev, S. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6636–6643.
- (15) Tevyashova, A. N.; Olsufyeva, E. N.; Solovieva, S. E.; Printsevskaya, S. S.; Reznikova, M. I.; Trenin, A. S.; Galatenko, O. A.; Treshalin, I. D.; Pereverzeva, E. R.; Mirchink, E. P.; Isakova, E. B.; Zotchev, S. B.; Preobrazhenskaya, M. N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3815–3822.
- (16) Kobayashi, Y.; Tan, C.; Kishi, Y. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2562–2571.
- (17) Takano, T.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6301–6304.

- (18) Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.
- (19) Kristanc, L.; Božič, B.; Gomišček, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 2635–2645.
- (20) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Takano, T.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3088-3094.
- (21) 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.
- (22) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Matsushita, N.; Yamamoto, T.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2016**, *55*, 3392–3402.
- (23) Fujii, G.; Chang, J. E.; Coley, T.; Steere B. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 4959-4968.
- (24) Gagoś, M.; Koper, R.; Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90–98.
- (25) Jarzemska, K. N.; Kamiński, D.; Hoser, A. A.; Malińska, M.; Senczyna, B.; Woźniak, K.; Gagoś, M. *Cryst. Growth & Des.* **2012**, *12*, 2336–2345.
- (26) Kolossváry, I; Guida, W. C. *Journal of Comput. Chem.* **1999**, *20*, 1671-1684.
- (27) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 6474-6487.

### 第三章 $^2\text{H}$ 、 $^{19}\text{F}$ NMR による脂質膜中における AmB の配向解析

#### 緒言

第二章ではポリオール部分の構造活性相関研究から脂質膜中における AmB のマクロラクトン環の配座を推定し、AmB は脂質膜中で、剛直な伸長型配座を取っていることが示唆された。これによって AmB のチャンネル複合体構造の決定に重要なマクロライド環の立体配座を決定することができた。

マクロラクトン環が結晶構造と同じ伸長型配座を取っているということから、チャンネル複合体構造は $\beta$ グリコシド結合の配座を除けば、マクロラクトン環の位置関係のみによって規定できると言える。マクロラクトン環の位置関係については、中川、梅川らによって分子間距離測定を用いた解析が行われている。この測定では固体 NMR の REDOR 測定を基に、AmB-AmB 間<sup>1,2</sup>、AmB-エルゴステロール間<sup>3,4</sup>の分子間距離情報を取得し、AmB-エルゴステロールの二分子複合体の構造が決定された他、チャンネル複合体の大まかな構造も推定された<sup>1</sup>。しかし、これらの情報を基にしたチャンネル構造の決定手法では、複数のチャンネル複合体構造が得られることが問題となっていた (図 3-1a)。これは、距離情報のみでチャンネル複合体の構造を出そうとしていることに起因する。これまでの分子間距離情報より得られた二種類のチャンネル複合体構造については、AmB 自身の配向が大きく異なる。よって、AmB 自身の配向を分子間距離情報から独立した情報として得ることができれば、チャンネル複合体の構造を一つに絞り込むことができると考えられる (図 3-1b)。

脂質膜中での分子の配向を測定する上で、固体 NMR は有用なツールである。固体 NMR で得られる四極子分裂幅、双極子相互作用、化学シフト異方性といった情報は、磁場に対する分子の配向に依存するため、固体 NMR を用いた分子の配向解析はこれまでに多く行われてきた。固相合成法により標識核を容易に導入できるペプチド類、特に分子の構造が剛直で分子内配座が明確な  $\alpha$ -ヘリックス構造を持つペプチドについては配向解析がこれまでに多く適用されている<sup>5-13</sup>。一方で、細胞膜自身に結合することで活性を示す天然物のような低分子化合物では、標識核の導入が困難なために配向解析の研究例が乏しい。

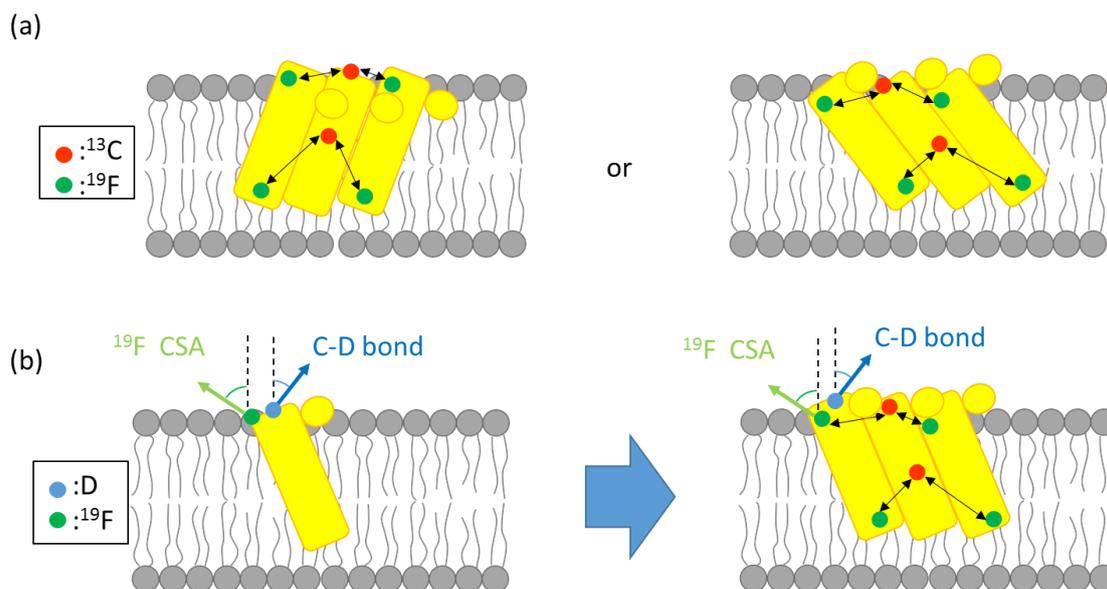


図 3-1 (a) これまでに行われた分子間距離測定によるチャンネル複合体の構造解析。REDOR 測定によって得られる原子間距離情報とチャンネル複合体が回転対称であるという仮定を基にチャンネル構造を推定した。その結果、2 種類のチャンネル構造が得られている。(b) この章での研究手法。重水素固体 NMR により得られる四極子分裂幅や  $^{19}\text{F}$  NMR 等より得られる CSA の値は、分子の配向に依存する。このような分子間距離に依存しない情報からマクロラクトン環の配向を得る。また、この配向と過去に得られた分子間距離情報を組み合わせて、チャンネル複合体の構造をより精度良く推定する。

AmB については、これまでに  $^2\text{H}$  NMR を用いた配向解析が試みられているが、ピーク強度、標識化率等の問題により、配向決定に十分な情報が不足しており、未だ配向を決定できていないというのが現状である<sup>14-16</sup>。一方、AmB の配向情報はチャンネル複合体の構造決定にとどまらず、AmB の活性メカニズムを決める上でも重要である。近年は AmB の活性メカニズムとして樽板型モデル<sup>17</sup> 以外に AmB が膜表面に結合したステロールスポンジモデルが提唱されている<sup>18</sup>。これらのモデルの決定的な違いは AmB の配向であり、AmB の配向を決定することによって、AmB がどちらの活性メカニズムに近い複合体構造を取っているかを決定することができる。

AmB の配向については、固体 NMR 以外の測定手法を用いた推定も行われている。中性子散乱<sup>19</sup>、UV/可視光吸収<sup>20</sup>、X 線散乱<sup>21</sup>、蛍光異方性測定<sup>22</sup> を用いた解析では、AmB は膜法線に対しほぼ平行に配向すると推定されている。また、AmB が膜法線に対し斜めに配向し、V-shape 型のイオンチャンネルを形成するというモデルも提唱されている<sup>23</sup>。一方、直線偏光二色性スペクトル<sup>24</sup> や

ESR<sup>25</sup> を用いた測定では AmB は膜表面に存在し、膜法線に対し垂直に配向しているというモデルを支持する結果が得られている。しかし、これらの測定の中には、脂質膜中での AmB が膜中に挿入される深度をもとに配向を予測するなど、間接的に配向を予測しているものもあり、固体 NMR のように配向が直接的に測定結果に影響するような手法で配向解析を行う必要が指摘されていた。

そこで本章では、固体 NMR によって AmB の配向を決定することを目指して、配向解析に有用な新規二重標識化 AmB 誘導体の調製を行った。これまで AmB の配向解析に用いられていた *d*<sub>3</sub>-AmB methylester (AME) に対し、新たに <sup>19</sup>F 標識を導入した。調製した標識体を用いて、四極子分裂幅と化学シフト異方性という 2 つの情報を基に、AmB 誘導体の配向を求める手法を確立した。これによって DMPC/Erg 膜中での、AmB の配向を推定した。

### 3-1 固体 NMR による配向解析

固体 NMR で観測される相互作用の多くは外部磁場に対する分子の配向に依存する。そこで、化学シフト異方性や四極子相互作用等の値を解析することで、分子の磁場に対する配向の分布を得ることが可能である。これを利用して、脂質膜中における分子配向が数多く測定されている。

化学シフト異方性は原子核周辺の電子遮蔽が異方的であるために、電子遮蔽テンソル-磁場ベクトル間の角度によって化学シフトが変化する、固体 NMR 特有の性質である。核周辺の電子遮蔽は、3 つの電子遮蔽ベクトル  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$  によって表される (図 3-2)。 $\sigma_{11}$  は電子遮蔽が最も小さい方向、 $\sigma_{33}$  は電子遮蔽が最も大きい方向を表し、これらのベクトルに直交するベクトルを

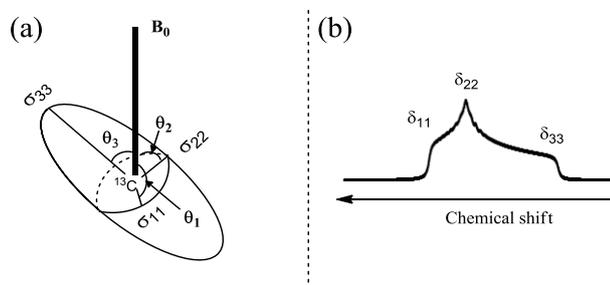


図 3-2 (a) 核周辺の電子遮蔽ベクトルと (b) 粉末状態におけるスペクトル。外部磁場と遮蔽テンソル  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$  が平行であ

$\sigma_{22}$  と表す。化学シフトテンソルの主値  $\delta_{\alpha\beta}$  は、基準値から遮蔽テンソルの主値を引いて規格化したもので、したがって符号が逆になる。すなわち、遮蔽が大きいと化学シフトは小さく (負の方向に) になる。

化学シフトは、式(3-1)により決定される。

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{11} \cos^2 \theta_1 + \delta_{22} \cos^2 \theta_2 + \delta_{33} \cos^2 \theta_3 \quad (\text{式 3-1})$$

ここで  $\theta_1, \theta_2, \theta_3$  はそれぞれ磁場ベクトルと  $\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$  ベクトルとのなす角である (図 3-2a)。一般に、粉末サンプルのような分子がランダムに配向したサンプルでは、核周辺の電子遮蔽の磁場に対する配向もランダムであり、配向の分布を推定できる。これを利用して  $\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$  の値より図 3-2b のような粉末サンプルのスペクトルを推定することが可能である。

脂質膜試料では、この化学シフト異方性の情報を分子の配向解析に用いることが可能である。脂質膜中で分子が膜法線を回転軸として回転運動をするとき、電子遮蔽テンソルは軸対称に平均化される (図 3-3a)。平均化されたテンソルは 2 つの電子遮蔽テンソルベクトル  $\delta_{//}$  と  $\delta_{\perp}$  で表すことができる。この平均化は分子の膜法線に対する配向に依存し、 $\delta_{//}$  と  $\delta_{\perp}$  は式(3-2), (3-3)のように表される<sup>26,27</sup>。

$$\delta_{//} = \delta_{11} \cos^2\beta + \delta_{22} \sin^2\alpha \sin^2\beta + \delta_{33} \sin^2\beta \cos^2\alpha \quad (\text{式 3-2})$$

$$\delta_{\perp} = [\delta_{11} \sin^2\beta + \delta_{22}(1 - \sin^2\alpha \sin^2\beta) + \delta_{33}(1 - \sin^2\beta \cos^2\alpha)]/2 \quad (\text{式 3-3})$$

ここで  $\alpha$  は膜法線と  $\delta_{33}$  のなす角度、 $\beta$  は膜法線と  $\delta_{11}$  のなす角度である (図 3-3b)。

特に、リポソームサンプルにおいてはリポソームの赤道面に存在する分子が示す配向が最も大きな成分であり、その化学シフトは  $\delta_{\perp}$  を示す (図 3-3c)。リポソームの極部分に存在する分子の示す配向が最も小さな成分であり、その化学シフトは  $\delta_{//}$  である。このことからリポソームサンプルにおける化学シフト異方性を示すピークは図 3-3d のようになる。これより得られる  $\delta_{//}, \delta_{\perp}$  の差  $\Delta\delta$  は式(3-4)によって表される。ここで  $S_{\text{mol}}$  はオーダーパラメーターを表す

$$\Delta\delta = S_{\text{mol}}[\delta_{11} \sin 2\beta + \delta_{22}(1 - \sin 2\alpha \sin 2\beta) + \delta_{33}(1 - \sin 2\beta \cos 2\alpha)]/2 \quad (\text{式 3-4})$$

このように、低運動性状態における CSA 主値  $\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$  と脂質膜中で軸回転運動をしている際の CSA 主値  $\delta_{\perp}, \delta_{//}$  を用いることで、分子の配向を解析できる。

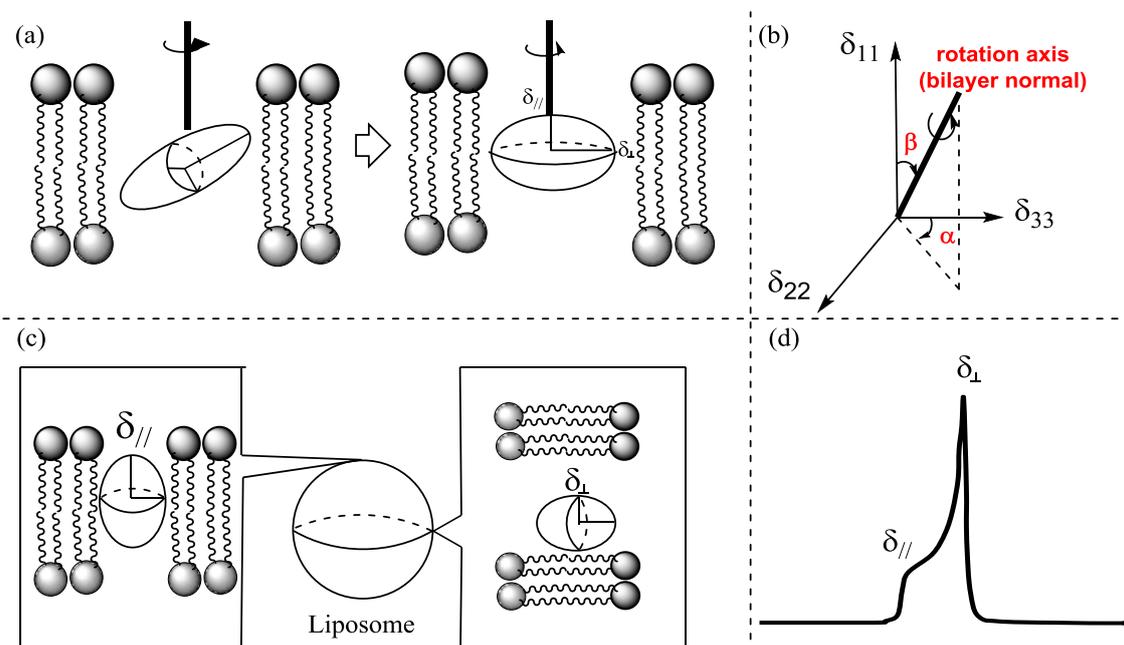


図 3-3 (a) 膜中での回転運動による電子遮蔽テンソルの平均化。(b) 平均化におけるパラメーター。(c) リポソームサンプルにおける電子遮蔽テンソル。(d) リポソームサンプルの NMR スペクトル

核四極子相互作用はスピン量子数  $I$  が 1 以上の核において観測される相互作用である。 $I$  が 1 以上の核では、原子核の電荷分布が球対称からずれる。この不均一な電荷分布と磁場との配向は、それぞれのエネルギー準位を安定化および不安定化させる。特に  $I=1$  の核では  $m=\pm 1$  の核と  $m=0$  の核で安定化の寄与が異なり、 $m=+1-0$  間と  $m=0-1$  間のエネルギー差に違いが生じる (図 3-4)。これによって、 $I=1$  の核は分裂したスペクトルを示す。この分裂幅は四極子分裂幅と呼ばれ、特に炭素に結合した  $^2\text{H}$  の四極子分裂幅は式(3-5)によって表される。

$$\Delta\nu = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{h} \frac{3\cos^2\theta_Q - 1}{2} \quad (\text{式 3-5})$$

ここで  $\theta_Q$  は  $\text{C}-^2\text{H}$  結合-磁場ベクトル間のなす角度である。また  $e^2qQ/h$  は四極子カップリング定数である。化学シフト異方性の解析と同様に、粉末サンプルなどの運動性が低いサンプルでは分子が全てランダムに配向しており、 $\text{C}-^2\text{H}$  結合の磁場に対する配向の分布を推定することが可能である。この時、 $\theta=90^\circ$  の存在確率が最も高くなるため、ピークトップは  $\theta=90^\circ$  における分裂幅を表す。これが粉末における四極子分裂幅  $\Delta\nu_0$  (式(3-6)) であり、配向解析では定数として用いられている。

$$\Delta\nu_0 = -\frac{3}{4} \frac{e^2qQ}{h} \quad (3-6)$$

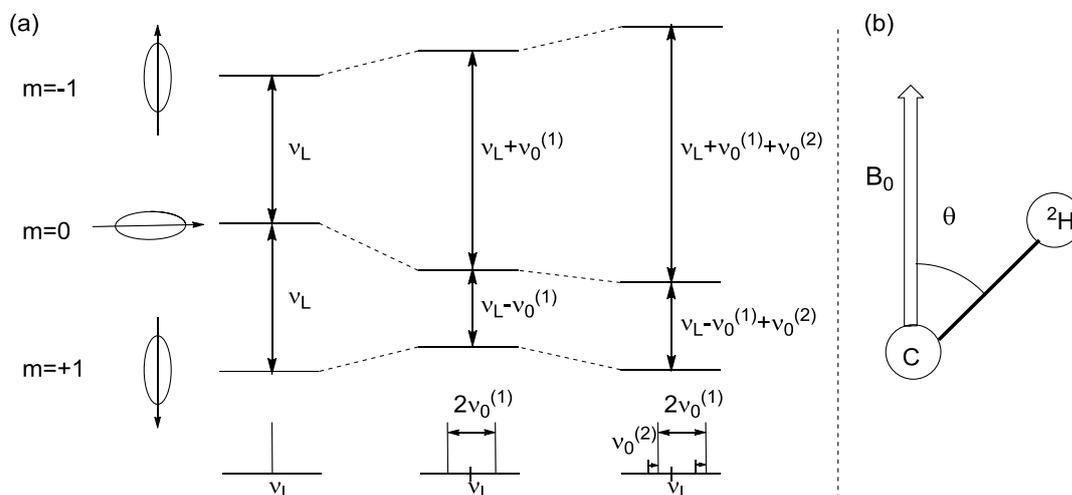


図 3-4 I=1 の核のエネルギー準位と共鳴線の位置。外部磁場と原子核の不均一電荷によるエネルギー準位の変化は一次の摂動項  $\nu_{0(1)}$  と二次の摂動項  $\nu_{0(2)}$  によって表される。四極子分裂幅として現れるのは  $2\nu_{0(1)}$  であり、式(3-5)によって表される。

脂質膜中において膜法線を軸に分子が回転運動を行っている際、四極子分裂幅  $\Delta\nu$  は式(3-7)によって表される<sup>28-30</sup>。

$$\Delta\nu = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{h} S_{mol} \frac{3\cos^2\Omega-1}{2} \frac{3\cos^2\Theta-1}{2} \quad (3-7)$$

ここで  $\Omega$  は膜法線と磁場ベクトルのなす角、 $\Theta$  は膜法線と C-<sup>2</sup>H 結合のなす角である(図 3-5)。また、 $S_{mol}$  はオーダーパラメーターである。リポソームサンプルにおいては赤道面における分子の存在確率すなわち  $\Omega=90^\circ$  における分子の存在確率が最も多くなるため、四極子分裂幅  $\Delta\nu$  は式(3-8)により表される。

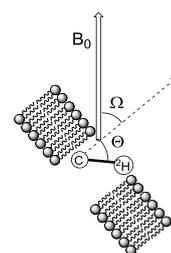


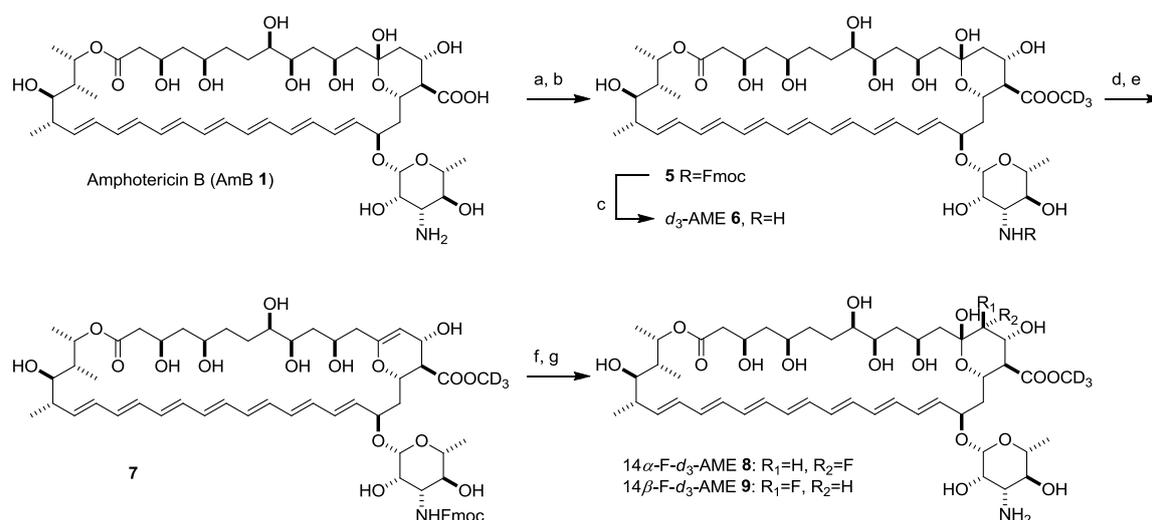
図 3-5 膜中における C-<sup>2</sup>H 結合

$$\Delta\nu = -\frac{3}{4} \frac{e^2qQ}{h} S_{mol} \frac{3\cos^2\Theta-1}{2} = \Delta\nu_0 S_{mol} \frac{3\cos^2\Theta-1}{2} \quad (3-8)$$

このように、四極子分裂幅は膜法線と C-<sup>2</sup>H 結合の成す角に依存するため、分子の配向情報を求めることができる。本研究ではこの化学シフト異方性と核四極子相互作用を用いて AmB の配向解析を行った。

### 3-2 新規誘導体の調製と活性評価

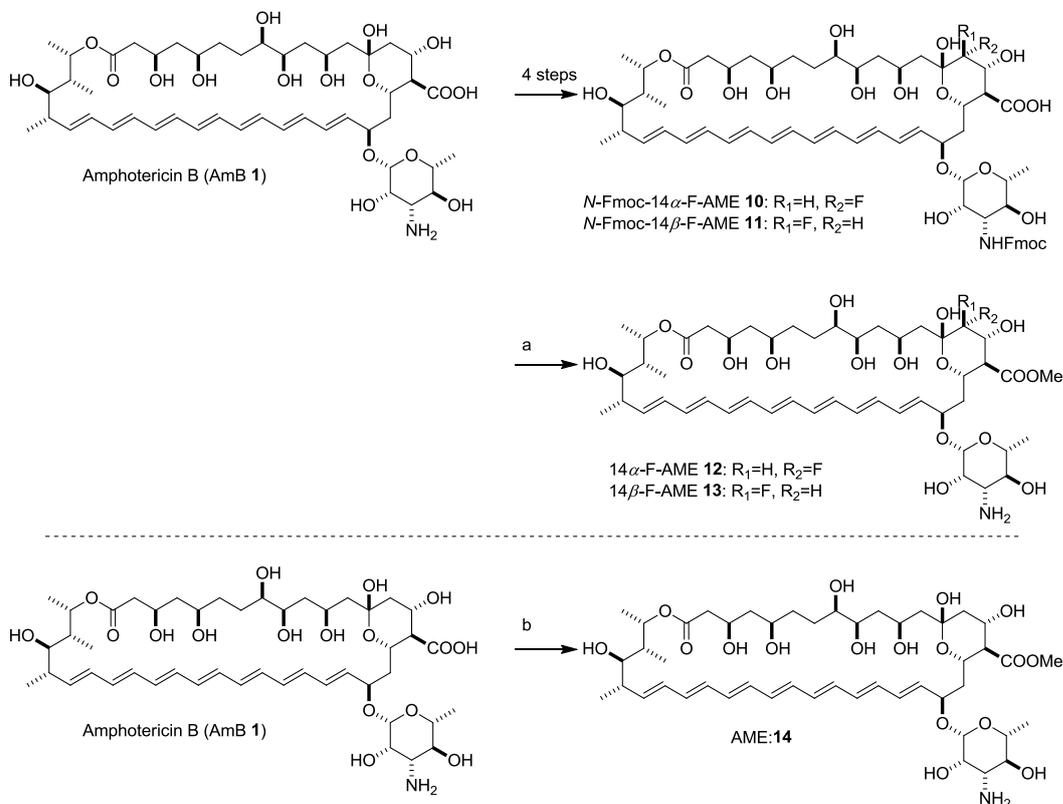
AmB の配向解析を行うために、AmB に <sup>2</sup>H と <sup>19</sup>F の両方標識を導入した、14-F-*d*<sub>3</sub>-AME の調製を行った (スキーム 3-1)。AmB のアミノ基に Fmoc 保護を行い、カルボン酸部分をヨードメタン-*d*<sub>3</sub> によってエステル化することで *N*-Fmoc-*d*<sub>3</sub>-AME 5 を得た。これに対し TMS 化、HF/pyridine による脱保護を行うことで 13, 14 位の脱水を行い、グリカール 6 を得た。さらに求電子的フッ素化反応と Fmoc 基の除去により、14-F-*d*<sub>3</sub>-AME を得た<sup>31</sup>。フッ素化の際の  $\alpha/\beta$  選択性は 1/4 であった。この  $\alpha/\beta$  混合物の Fmoc 基を除去した後、14 $\alpha$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 8 と 14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 9 を HPLC で分離した。



スキーム 3-1 新規誘導体の調製 (a) FmocOSu, pyridine, DMF, 室温, 4 h, (b) iodomethane-*d*<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 0 °C, 2 時間, 74% (2 段階); (c) piperidine, DMF/*i*PrOH =2/1, 室温, 1 時間, 68%; (d) TMSOTf, 2,6-lutidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 1 時間; (e) HF/pyridine THF, 室温, 6 時間, 43% (2 段階); (f) Selectfluor®, DMF, pH6.8 phosphate buffer, 室温, 1 時間, 19%; (g) piperidine, DMSO/H<sub>2</sub>O =2/1, 室温, 1 時間, and HPLC purification 31%

また粉末サンプルの <sup>19</sup>F NMR 測定には、重水素化していない 14  $\alpha$ -F-AME と 14  $\beta$ -F-AME を用いた。これらの標識体は過去に報告された手法により 14-F-AmB を合成した後、TMS ジアゾメタンによるメチルエステル化と Fmoc 基の除去をワンポット反応として行い調製した。これらの  $\alpha/\beta$  体は、HPLC 精製によ

り分離した。また、活性の比較に用いた **AME 14** は過去に確立されたワンポットメチルエステル化により合成している。



スキーム 3-2 新規誘導体の調製 (a)TMS-diazomethane, DMSO/MeOH =2/1, 0 °C, 2 時間; piperidine, 0 °C, 3 時間, HPLC 精製, 11% (b)FmocOSu, pyridine, 室温, 3 時間; TMS-diazomethane, DMSO/MeOH =2/1, 0 °C, 2 時間; piperidine, 0 °C, 3 時間, HPLC 精製, 23%

### 3-3 新規標識体の活性評価

調製した新規誘導体についてヒト赤血球に対する溶血活性を調べた所、14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AmB **9** は AmB の 67%程度の活性を保持していたのに対し、14 $\alpha$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME **8** は AmB の 40%程度の活性しか示さなかった(表 3-1)。また、<sup>31</sup>PNMR を用いた K<sup>+</sup>イオン透過活性試験<sup>32</sup>によりエルゴステロール選択性を測定した(図 3-6)。<sup>31</sup>PNMR による K<sup>+</sup>イオン透過活性試験では、リポソームに内包されたリン酸イオンの電荷を<sup>31</sup>PNMR の化学シフトにより判定することで、AmB が形成するチャネルによる、K<sup>+</sup>イオンのリポソーム内への流入を調べることができる。

AmB は R=10<sup>-5</sup> の条件において all-or-none 型の K<sup>+</sup>イオン透過活性を示す。14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME **9** を用いた測定では、エルゴステロール含有リポソーム、R=10<sup>-4</sup> の

条件においてリン酸イオンを示すピークが  $\delta$  1.2 と 3.1 の両方に得られており、all-or-none 型の  $K^+$ イオン透過活性を示した。一方、 $14\alpha$ -F- $d_3$ -AME は  $R=10^{-4}$  以下の濃度ではイオン透過活性を示さず、 $R=10^{-3}$  の条件において初めて活性を示した。これらの点から、今回調製した AmB 誘導体のうち、 $14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** が、より AmB と類似したチャネル形成能を有すると考え、こちらを配向解析に用いることとした。

表 3-1 AmB および調製した類縁体のヒト赤血球に対する 50% 溶血活性。

	50% 溶血活性 ( $\mu$ M)
AmB <b>1</b>	2.18
AME <b>14</b>	2.80
$14\alpha$ -F- $d_3$ -AME <b>8</b>	5.50
$14\beta$ -F- $d_3$ -AME <b>9</b>	3.25

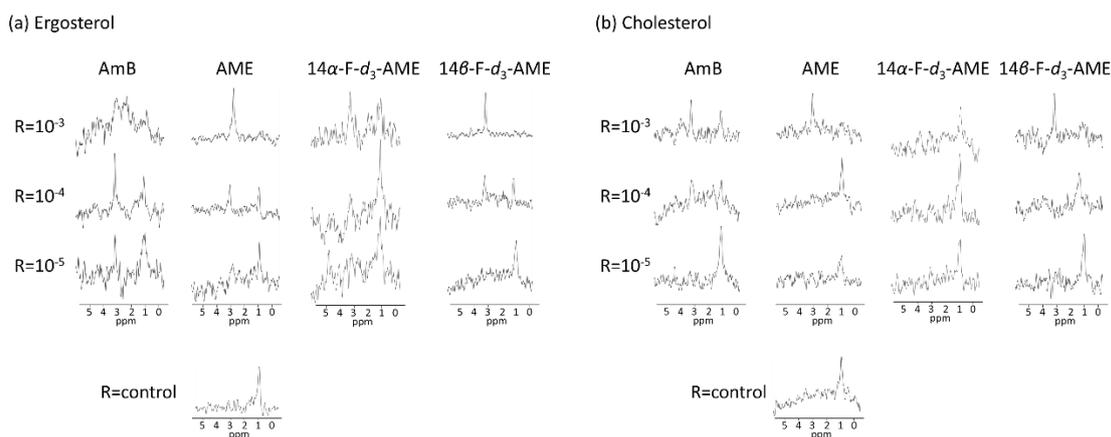


図 3-6  $^{31}\text{P}$ NMR を用いた AmB およびその類縁体のイオン透過活性。AmB およびその類縁体を 10 mol% エルゴステロール(a) およびコレステロール(b) 含有 POPC リポソームに滴下し、リポソームに内包されたリン酸の化学シフト変化を観測した。AmB/脂質濃度 ( $R$ ) は  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  となるよう調製した。

また、脂質膜中における UV/可視光吸収スペクトルより、 $14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** の膜に対する親和性および形成するチャネル構造を AmB のものと比較した (図 3-7a-c)。AmB やその類縁体のヘプタエン部分の UV/可視吸収スペクトルは、会合状態や周囲の環境に依存することが知られている。例えば、AmB 単量体由来のピークはヘプタエン周囲の環境に依存して波長が変化し、水中では 408 nm 付近に、脂質膜中では 415 nm 付近に現れる<sup>33</sup>。今回の測定では、エルゴステロール含有膜中において、AmB と  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME **8** は類似したスペクトルを与え、大部分が脂質膜中に分配されていることを示した。一方で、コレステロール含有膜中

では水中に分配されている成分が増えており、 $14\beta\text{-F-}d_3\text{-AME 9}$  は AmB のステロール選択性を反映しているという結果になった。また、エルゴステロール膜中ではチャンネル複合体に由来する 345 nm 付近のピークが得られるのに対し、コレステロール膜中では不活性な会合体に由来する 330 nm 付近のピークが得られていることから<sup>34-36</sup>、 $14\beta\text{-F-}d_3\text{-AME 9}$  が AmB のステロール選択性を反映していることが説明できる。一方、チャンネル複合体に由来する 345 nm 付近の極大波長からチャンネルを形成するヘプタエン間の距離を概算できることが過去に報告されている<sup>34, 35</sup>。AmB 単量体由来のピークとチャンネル複合体由来のピークの波数の差は式(3-8) によって表される。

$$\nu_m - \nu_{mon} = 2\beta \cos\left(\frac{m\pi}{N+1}\right) \quad (\text{式 3-8})$$

この式において  $N$  は遷移状態の数であり、AmB の 6 量体の場合、 $N=6.5$  である。また  $m$  はその吸収波数が何番目の遷移状態であるかを示す。345 nm 付近の会合体由来のピークを見る場合は  $m=1$  となる。

また  $\beta$  は式(3-9)で表される双極子-双極子カップリングの行列要素である。

$$\beta = \frac{|\mu_{mon}|^2}{4\pi\epsilon_0 n^2 R^3} (\cos\theta - 3\cos^2\phi) \quad (\text{式 3-9})$$

$\mu_{mon}$  はモノマーの遷移双極子モーメントであり、11.3 Debye、 $\epsilon_0$  は真空の誘電率、 $n$  は溶媒の屈折率、 $\theta$  はモノマーの双極子モーメント同士の角度でありチャンネル構造の場合は  $0^\circ$ 、 $\phi$  は隣り合う遷移双極子モーメントの中心を結んだときの角度であり、チャンネル構造の場合は  $90^\circ$  である。また、励起双極子 (ヘプタエン) 間距離を  $R$  で表している。これはすなわち、モノマーと会合体の吸収波数の差が  $1/R^3$  に比例することを示している。

AmB と  $14\beta\text{-F-}d_3\text{-AME 9}$  の単量体における極大波長はそれぞれ、415 nm, 413 nm である。また、会合体における極大波長はそれぞれ 347 nm, 349 nm である。よって、AmB と  $14\beta\text{-F-}d_3\text{-AME 9}$  の単量体-会合体の吸収波数差  $\nu_m - \nu_{mon}$  はそれぞれ  $4722 \text{ cm}^{-1}$ ,  $4440 \text{ cm}^{-1}$  である。また、過去の報告で pure-DPPC 膜中における AmB の  $\nu_m - \nu_{mon}$  が  $5611 \text{ cm}^{-1}$  であることを利用してヘプタエン間の距離  $R$  が 4.9 Å であると見積もられている。この計算結果を基に今回の測定条件におけるヘプタエン間距離  $R$  を見積もったところ、AmB では  $R=5.19 \text{ \AA}$ 、 $14\beta\text{-F-}d_3\text{-AME 9}$  では  $R=5.29 \text{ \AA}$  となった。このようにヘプタエン間の距離は AmB と  $14\beta\text{-F-}d_3\text{-AME 9}$  で 0.1 Å 程度しか変わらず、ほぼ同一のチャンネル構造を形成していると

考えても構わない。一方、エルゴステロール含有膜中におけるスペクトルにおいて、AmB のほうが不活性会合体に由来する 330 nm 付近の成分がわずかに大きい。14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 9 は AME と同様に<sup>37</sup>、不活性な会合体を形成しにくい性質を保持していることが考えられる (図 3-7 d)。

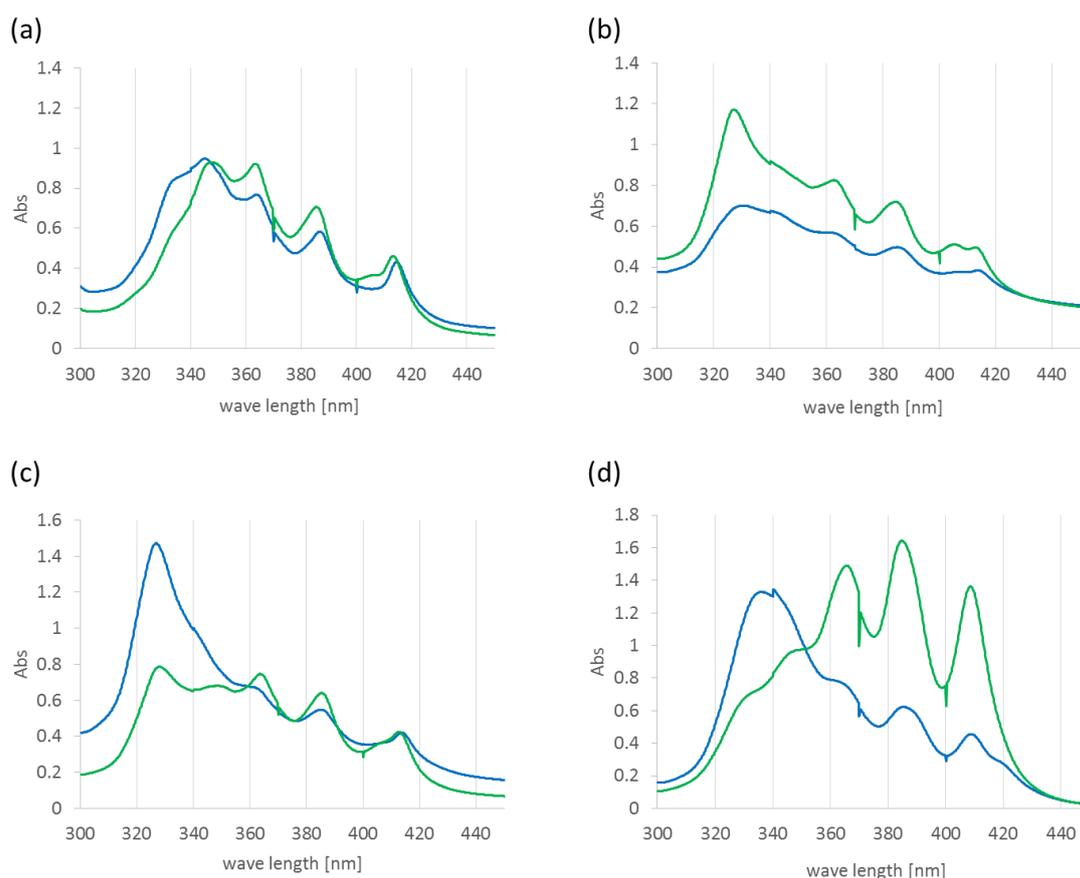


図 3-7 (a)10% エルゴステロール含有、(b)10% コレステロール含有、(c)ステロール非含有 DMPC 膜中における AmB (青線) および 14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 9 (緑線) の UV/可視光吸収スペクトル。AmB/脂質比は 1/50。(d)8% スクロース水溶液中における AmB (青線) および 14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 9 (黄線) の UV/可視光吸収スペクトル。

### 3-4 化学シフト異方性 (CSA) テンソル情報の取得

<sup>19</sup>F 核の CSA によって配向解析をする上で、<sup>19</sup>F 核の CSA テンソルおよび CSA 主値を決定する必要がある。フッ化ベンゼン等に見られるような sp<sup>2</sup> 炭素に結合した <sup>19</sup>F 核の CSA テンソルについてはこれまで多く研究がなされてきたが<sup>38,39</sup>、今回の誘導体に見られるような sp<sup>3</sup> 炭素に結合した <sup>19</sup>F 核については、CSA テンソルの研究は乏しい。そこでまず、量子化学的な計算手法である GIAO (gauge

including atomic orbital)法<sup>40</sup>によって、CSAの主軸系が分子座標系に対しどのような方向を向いているか計算した。

過去のユニバーサル NMR データベース法等の研究で、三結合以上離れた官能基は化学シフトに影響を与えないことが知られているため<sup>41</sup>、マクロラクトン環 11、18 位より THP 環から遠い部分は CSA テンソルの計算で無視しても影響は無い。そこで、本計算では 14 $\beta$ -F-AME の構造を簡略化し、THP 環部分のみを表した化合物(図 3-8a)を計算に用いた。この化合物に対し、基底関数として 6-311G (d)を用いた Møller-Pleset 法<sup>42</sup>によって構造最適化を行った後、6-311++G(2d, 2p)を基底関数として用いた DFT-GIAO 法 (B3LYP)<sup>43</sup>により CSA テンソルを計算し、分子座標系における CSA の主軸系を得た (図 3-8b)。なお、構造最適化において、13,15 位ヒドロキシ基の配座は、それぞれアノマー効果、41 位カルボニル基との水素結合により安定化されており、今回の立体配座のみが得られた。

CSA テンソルの計算と共に得られる CSA の主値を実験値と比較することで計算の精度を調べることができる。CSA の主値を実験的に得るために、14 $\beta$ -F-AME **13** の粉末サンプルについて <sup>19</sup>F NMR を 5 kHz MAS、1H decoupling 条件下で測定した。得られたスピニングサイドバンドのパターンを SIMPSON 3.0 によってシミュレーションし、実測スペクトルから CSA の主値を得た (図 3-8c)。表 3-2 に示すとおり、CSA の主値は実験で得られたものと GIAO 法による計算で得られたもので、各主値の差は CSA の大きさの 6%以内に収まっており、本計算で得られた CSA テンソルは実際の系を十分に再現していると判断した。

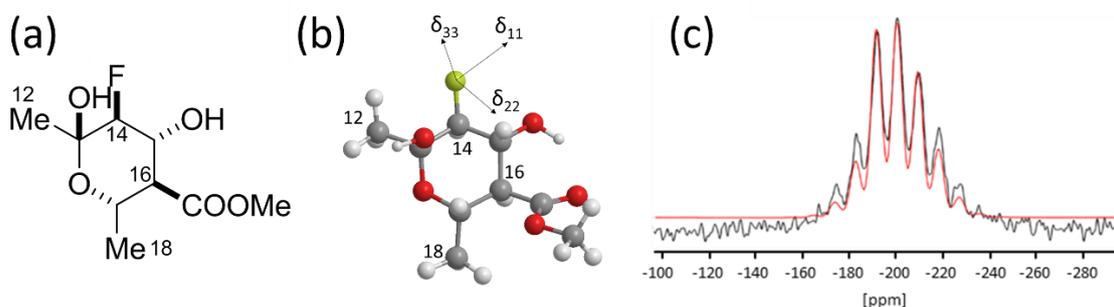


図 3-8 (a) <sup>19</sup>F CSA の量子化学計算に用いた、14 $\beta$ -F-AME の THP 環構造。(b) MP2 計算によって構造最適化された THP 環の配座と、<sup>19</sup>F CSA の主軸系。(c) 14 $\beta$ -F-AME 粉末サンプルの <sup>19</sup>F NMR スペクトル。スペクトルは 600 MHz NMR (<sup>19</sup>F の共鳴周波数は 564.41 MHz)を用いて、5 kHz MAS の条件下で測定した。

表 3-2 14 $\beta$ -F-AME **13** 粉末サンプルの <sup>19</sup>F CSA 主値 (ppm)。実測のスペクトルから得られた値と GIAO 法により量子化学計算値を比較した。

	$\delta_{11}$	$\delta_{22}$	$\delta_{33}$	$\delta_{iso}$
実験値	-178.2	-198.3	-224.1	-200.2
計算値	-177.5	-196.3	-226.8	-200.2

また、 $14\alpha$ -F- AME **12** についても CSA テンソルの計算を行った。簡略化した構造 (図 3-9a) を用いて、 $14\beta$ -F- AME **13** と同様の条件で構造最適化および CSA テンソルの計算を行った。この計算では実験値よりも CSA が小さくなるという結果になった (表 3-3, 図 3-9c)。また、 $14\alpha$ -F-AME は 15 位のヒドロキシ基が 41 位カルボニル基と 14 位のフッ素基の両方と水素結合を形成することが可能であることも、構造最適化より示された (図 3-9b)。このように  $14\alpha$ -F- $d_3$ -AME **8** は 15 位のヒドロキシ基の配座の予想が難しいという点からも、配座解析に適用するのは困難であると言える。

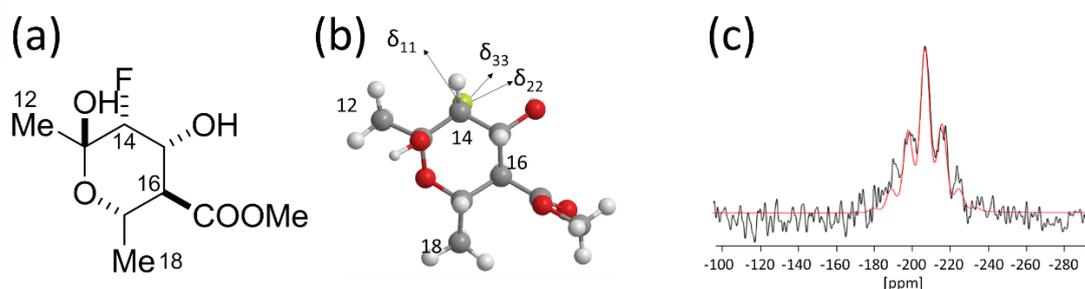


図 3-9 (a)  $^{19}\text{F}$  CSA の量子化学計算に用いた、 $14\alpha$ -F- $d_3$ -AME **8** の THP 環構造。(b) MP2 計算によって構造最適化された THP 環の配座と、 $^{19}\text{F}$  CSA の主軸系。(c)  $14\beta$ -F-AME 粉末サンプルの  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトル。スペクトルは 600 MHz NMR ( $^{19}\text{F}$  の共鳴周波数は 564.41 MHz)を用いて、5 kHz MAS の条件下で測定した。

表 3-3  $14\alpha$ -F-AME 粉末サンプルの  $^{19}\text{F}$  CSA 主値 (ppm)。実測のスペクトルから得られた値と GIAO 法により量子化学計算値を比較した。

	$\delta_{11}$	$\delta_{22}$	$\delta_{33}$	$\delta_{iso}$
実験値	-187.8	-207.3	-225.4	-206.8
計算値	-191.2	-211.1	-218.2	-206.8

### 3-5 リポソーム中における $14\beta$ -F- $d_3$ -AME の NMR スペクトル

調製した  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** を 10 mol% エルゴステロール含有 DMPC リポソームに取り込ませ、 $^{19}\text{F}$ 、 $^2\text{H}$  固体 NMR を測定した。当研究室の山上は、 $d_3$ -AME を用いて AmB 誘導体の濃度および温度依存的な運動性変化を観測している (図 3-10)<sup>14</sup>。この結果によると、 $d_3$ -AME は 20 °C ではいかなる濃度でも四極子相互作用の平均化が起こらなかったのに対し、40 °C の条件では四極子分裂幅の平均化された成分が得られた。 $d_3$ -AME が高濃度である  $d_3$ -AME:Erg:DMPC = 1:1:9 や  $d_3$ -AME:Erg:DMPC = 1:2:18 の条件では運動性の低い成分が観測されたのに対し、 $4\beta$ -F- $d_3$ -AME:Erg:DMPC = 1:5:45 の条件において、運動性の高い成分のみが存在することが明らかとなった。よって、今回の  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** を用いた配向解析は、40 °C、 $14\beta$ -F- $d_3$ -AME:Erg:DMPC = 1:5:45 の条件で行った。

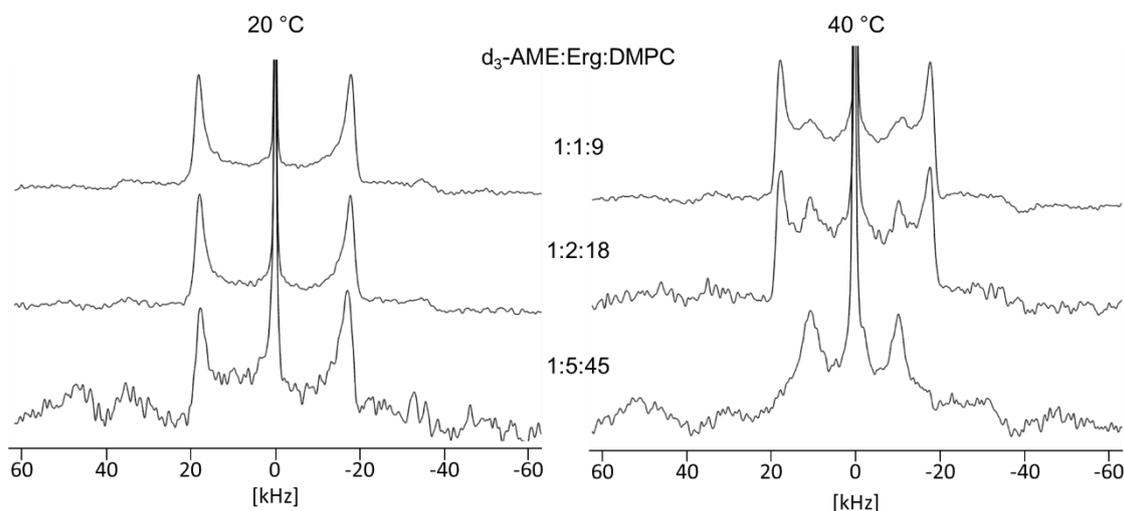


図 3-10 山上により測定された温度、濃度依存的な  $d_3$ -AME の四極子分裂幅の変化<sup>14</sup>。

また、本測定では、リポソーム調製の手法をこれまでの研究とは異なる、遠心分離を用いた手法によって行った。従来の AmB を用いた固体 NMR 測定のサンプル調製では、MLV を形成後に凍結乾燥し、水和率が 50wt% になるように水を加えて、凍結融解を繰り返すことでサンプル全体を均一にしていた。この手法で  $^{19}\text{F}$  NMR 測定を行った所、水中に分配された  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** が多く観測された (図 3-11a)。 $^{19}\text{F}$  NMR 測定では Hahn エコーパルスを用いているため、運動性の高い成分のピークは大きくなる。水中に分配された成分に由来するピークは  $^{19}\text{F}$  NMR の解析を困難にするため、これを除去する手法が必要であった。

そこで、遠心分離を用いたサンプル調製法を検討した。新たな手法では、MLV

を形成した後に遠心分離を行い、上清を取り除いた。さらに、得られたリポソームの沈殿を水で洗浄し、遠心分離で上清を取り除くという操作を繰り返すことで、膜外の AmB 誘導体を減少させることに成功した (図 3-11b)。この手法により、膜に挿入された AmB 誘導体由来の軸対称なピークが得られた。なお、 $14\alpha$ -F- $d_3$ -AME **8** でも同じ手法により測定を行ったが、幅広なピークは得られなかった (図 3-11c)。ここからも  $14\alpha$ -F- $d_3$ -AME **8** は膜に挿入されにくいと推定している。

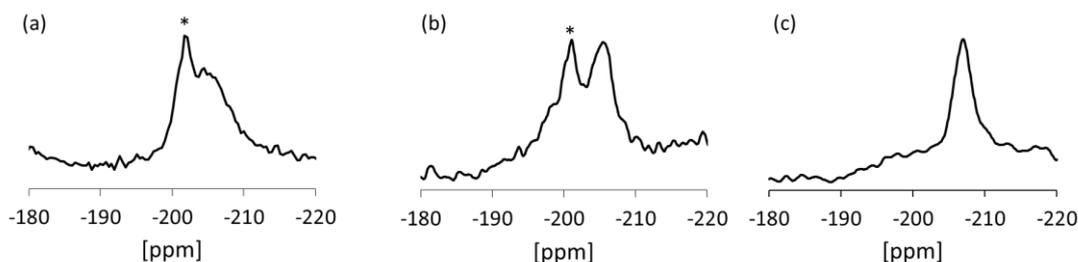


図 3-11 (a, b) サンプル調整法による  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルの比較。 $14\beta$ -F- $d_3$ -AME/Erg/DMPC =1/5/45 のサンプルで測定。\*で示したピークは水中に分配された  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME を示す。(a) AmB の固体 NMR 測定で従来用いられている手法に従い、サンプルを調製した。(b) 遠心分離を用いてサンプル調製した。MLV を形成後に遠心分離し、上清を取り除くことを繰り返してサンプルを得た。(c)  $14\alpha$ -F- $d_3$ -AME/Erg/DMPC =1/5/45 のサンプルで測定した  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトル。 $14\alpha$ -F-AmB の等方的化学シフトも 206 ppm になることから、CSA の値は 2 ppm 以下であると推測される。

$14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** の軸対称なスペクトルから、 $\delta_{\perp} = -206.2$  ppm と  $\delta_{\parallel} = -188.2$  ppm に相当する 2 つの CSA 主値を得ることができた。また、これより得られる平均化された CSA ( $\Delta\delta = \delta_{\perp} - \delta_{\parallel}$ ) は 18.0 ppm であると計算した (図 3-12 a)。

$14\beta$ -F- $d_3$ -AME **9** のリポソーム中における  $^2\text{H}$  NMR スペクトルは、過去に測定された  $d_3$ -AME のものに比べて<sup>14</sup>、ブロードなピークが得られた (図 3-12 b)。これは前述したサンプル調製法の違いによるものであり、リポソームが均一になっていないことから、一部 AmB 誘導体の濃度が高い、ゲル相のような成分が存在するためであると考えられる。しかし、四極子分裂幅は 19.5 kHz と過去の  $d_3$ -AME による測定結果と近い値が得られた。このことは、AME に対するフッ素化は、分子の配向にほとんど影響を与えないことを示しており、この四極子分裂幅を配向解析に用いた。

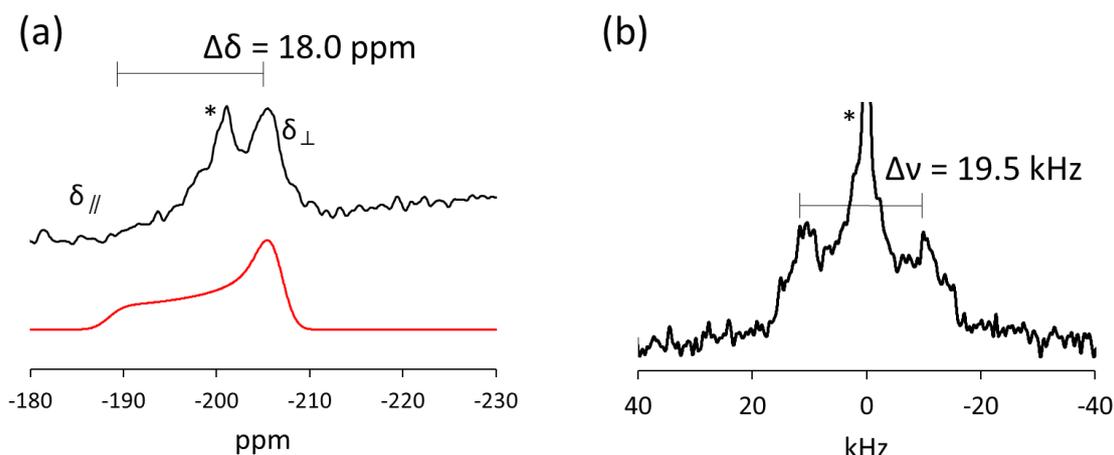


図 3-12 10 mol% エルゴステロール含有 DMPC リポソーム膜における  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME 9 の  $^{19}\text{F}$ NMR スペクトル(a)と  $^2\text{H}$ NMR スペクトル(b)。40 °C で測定。 $^{19}\text{F}$ NMR では実測のスペクトルを黒線で、SIMPSON によるシミュレーションを赤線で示した。\*等方的なピークは水中に分配された AmB 誘導体であると帰属した。

### 3-6 配向解析

前項で得られた  $^2\text{H}$ NMR の四極子分裂幅の値と、 $^{19}\text{F}$ CSA の値を用いて、脂質膜中における  $14\beta$ -F- $d_3$ -AME 9 の配向を解析した。計算は、上述の量子化学計算において構造最適化された THP 環を用いた。THP 環の膜法線に対する配向を変化させながら、膜法線に対する CSA 主軸の配向、および、それに対する C- $^2\text{H}$  結合の角度を求め、その値を基に四極子分裂幅と  $^{19}\text{F}$ CSA を計算し、実験値と合致する配向を探索した。

C- $^2\text{H}$  結合の配向に関する前提として、 $14\beta$ -F- $d_3$ -AME 9 の  $\text{CD}_3$  基は O- $\text{CD}_3$  結合を中心に回転し、完全に平均化されるものとした。このことから、C- $^2\text{H}$  結合の配向は O- $\text{CD}_3$  結合の配向と等しいと見なすことができる。さらに、C41-O 結合の二面角はエステル部分の非共有電子対の共役により C16/ $\text{CD}_3$  が *anti* 形を取る立体配座が安定化されており、したがって、O- $\text{CD}_3$  結合は C16-C41 結合と同じ配向を取ると見なせる。これらのことを踏まえて、O- $\text{CD}_3$  結合、C14- $14\beta\text{F}$  結合に影響を与える分子運動を考慮し、分子全体の運動性を表すオーダーパラメーター  $S_{\text{mol}}$  を導入した。また、分子の傾き  $\tau$  を膜法線と O17-C16 ベクトル間の角度であると定義した (図 3-13 a)。また、方位角  $\rho$  は三次元座標を用いて、分子が傾く方向と分子座標系の関係を定義することで表した (図 3-13b)。まず構造最適化された THP 環を 3 次元座標上に配置した。 $(\tau, \rho) = (0^\circ, 0^\circ)$  のとき、O17 が三次元座標の原点に、C16 が z 軸上に、C41 が yz 平面に存在するものとし (図 3-13 b)、

分子の傾く方向と y 軸との間の角度を  $\rho$  と表した。

$\Delta\delta$ ,  $\Delta\nu$  の理論値を計算するために、先程定義した  $(\tau, \rho) = (0^\circ, 0^\circ)$  のときの THP 環の 3 次元座標上における配置を用いた。なお、この座標上では z 軸方向が膜法線の向きであるとする。 $(\tau, \rho) = (0^\circ, 0^\circ)$  のときの座標を式(3-9)によって回転させ、 $\tau$ ,  $\rho$  をそれぞれ  $1^\circ$  ずつ変化させることで、合計  $180 \times 180$  個の THP 環の配向を得ることができる。

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\tau & \sin\tau \\ 0 & -\sin\tau & \cos\tau \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos\rho & \sin\rho & 0 \\ -\sin\rho & \cos\rho & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_{0,0} \\ y_{0,0} \\ z_{0,0} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{\tau,\rho} \\ y_{\tau,\rho} \\ z_{\tau,\rho} \end{pmatrix} \quad (3-9)$$

ここで、 $(x_{0,0}, y_{0,0}, z_{0,0})$  は  $(\tau, \rho) = (0^\circ, 0^\circ)$  のときの各原子の座標と CSA テンソルであり、 $(x_{\tau,\rho}, y_{\tau,\rho}, z_{\tau,\rho})$  は  $\tau$  と  $\rho$  により THP 環を回転させた後の各原子の座標とテンソルである。3-1 に示した手法により粉末サンプルより得られた  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$ ,  $\delta_{33}$  の値を用いてそれぞれの配向における  $^{19}\text{F}$  CSA ( $\Delta\delta$ ) を計算した。また、分子が運動していない状態における四極子分裂幅は山上によって測定された  $20^\circ\text{C}$  における脂質膜中での四極子分裂幅  $35.6\text{ kHz}$  を  $S_{\text{mol}}=1.0$  として用い、それぞれの配向における四極子分裂幅 ( $\Delta\nu$ ) を計算した。平均自乗偏差 (RMSD、式 3-10) により、今回の実験で得られた  $\Delta\delta$ ,  $\Delta\nu$  とそれぞれの配向における計算値を比較することで、実験値と計算値が最も合致する配向を求めている。なお、RMSD は CSA と四極子分裂幅の寄与を等しくするために、それぞれの値の取り得る範囲 ( $\Delta\delta^{\text{max}} - \Delta\delta^{\text{min}} = 91.8\text{ ppm}$ ,  $\Delta\nu^{\text{max}} - \Delta\nu^{\text{min}} = 53.4\text{ kHz}$ ) によって実験値と計算値の差を規格化している。

$$\text{RMSD}(\tau, \rho, S_{\text{mol}}) = \sqrt{\left(\frac{\Delta\delta^{\text{exp}} - \Delta\delta^{\text{calc}}}{\Delta\delta^{\text{max}} - \Delta\delta^{\text{min}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\nu^{\text{exp}} - \Delta\nu^{\text{calc}}}{\Delta\nu^{\text{max}} - \Delta\nu^{\text{min}}}\right)^2} \quad (3-10)$$

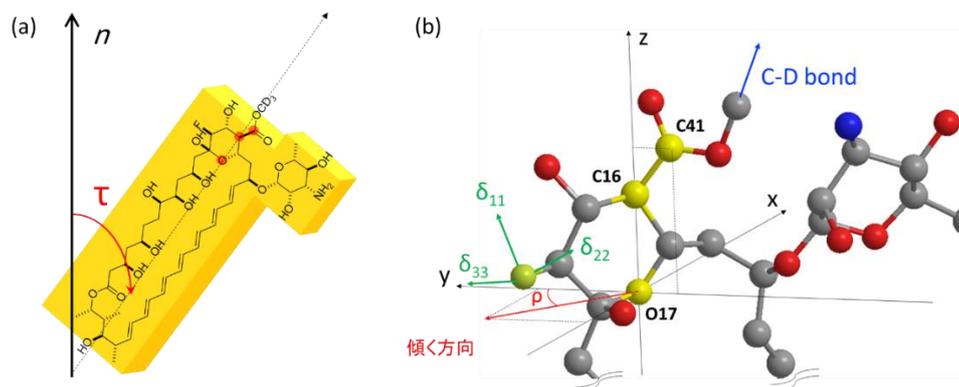


図 3-13 (a)AmB の配向の定義。AmB の傾き  $\tau$  を O17-C16 ベクトルと膜法線との間の角度であると定義した。また方位角  $\rho$  は傾く方向と定義した分子軸から C41 へ向けた方向との間の角度であると定義した。(b)  $(\tau, \rho) = (0^\circ, 0^\circ)$  における THP 環の 3 次元座標。測定に影響を与える  $^{19}\text{F}$  CSA の主軸と、O41-CD<sub>3</sub> ベクトルの向きはそれぞれ赤色、青色の矢印で示した。

異なるオーダーパラメーター  $S_{\text{mol}}$  における RMSD の等高線プロットを図 3-14,15 に示した。この図において、RMSD が 0.017 以上となる範囲の配向は、 $^2\text{H}$  NMR の四極子分裂幅の理論値が実験値と 1.0 kHz 以上離れる他、 $^{19}\text{F}$  CSA の理論値が実験値と 1.0 ppm 以上離れることから除外した。 $S_{\text{mol}}$  が 0.95 以上の範囲においては、 $\tau$  が  $0^\circ$  付近および  $27^\circ$  付近において RMSD が小さい領域が見られた。ここで、 $\tau$  が  $0^\circ$  付近では幅広い  $\rho$  の値の範囲で RMSD が小さくなっている。これは配向角の定義の都合上、 $\tau$  が  $0^\circ$  付近では、 $\rho$  が変化しても C- $^2\text{H}$  結合や CSA テンソルの配向自体が大きく変化しないためである。 $S_{\text{mol}}$  がより小さい範囲では  $\tau$  が  $20^\circ$  付近の範囲に RMSD の極小値が得られている。これらのことから、AmB の配向は  $0^\circ$  から  $30^\circ$  の範囲を取ることが示唆された。これらの範囲で RMSD が最小となったのは  $(S_{\text{mol}}, \tau, \rho) = (0.92, 2^\circ, -57^\circ)$  となる点であり、その値は  $6.30 \times 10^{-4}$  であった (図 3-16 a)。この点において、AmB 誘導体は膜法線にほぼ平行に配向する (図 3-16 b)。この点以外でも、RMSD が 0.017 を取る範囲では分子軸 (O35-C41 ベクトル) を基準とした分子の傾きは  $20^\circ$  以下であり、親水性のマイコサミンを親水性の脂質膜表面に向けた配向をとる。

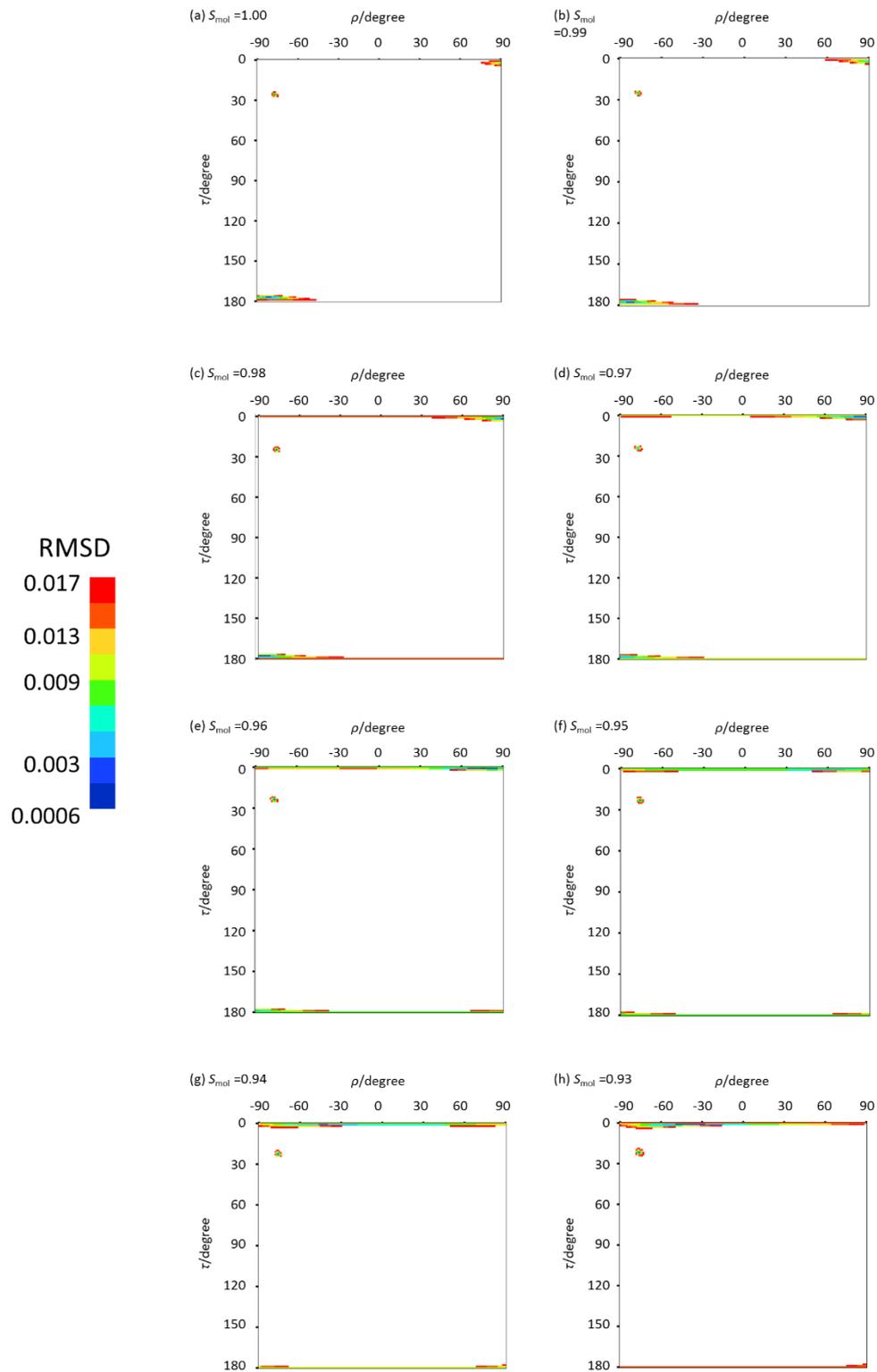


図 3-14.  $0.93 \leq S_{mol} \leq 1$  の範囲における  $\rho$ 、 $\tau$ 、 $S_{mol}$  に対する RMSD の等高線プロット。実測値と計算値の差を RMSD で評価した。

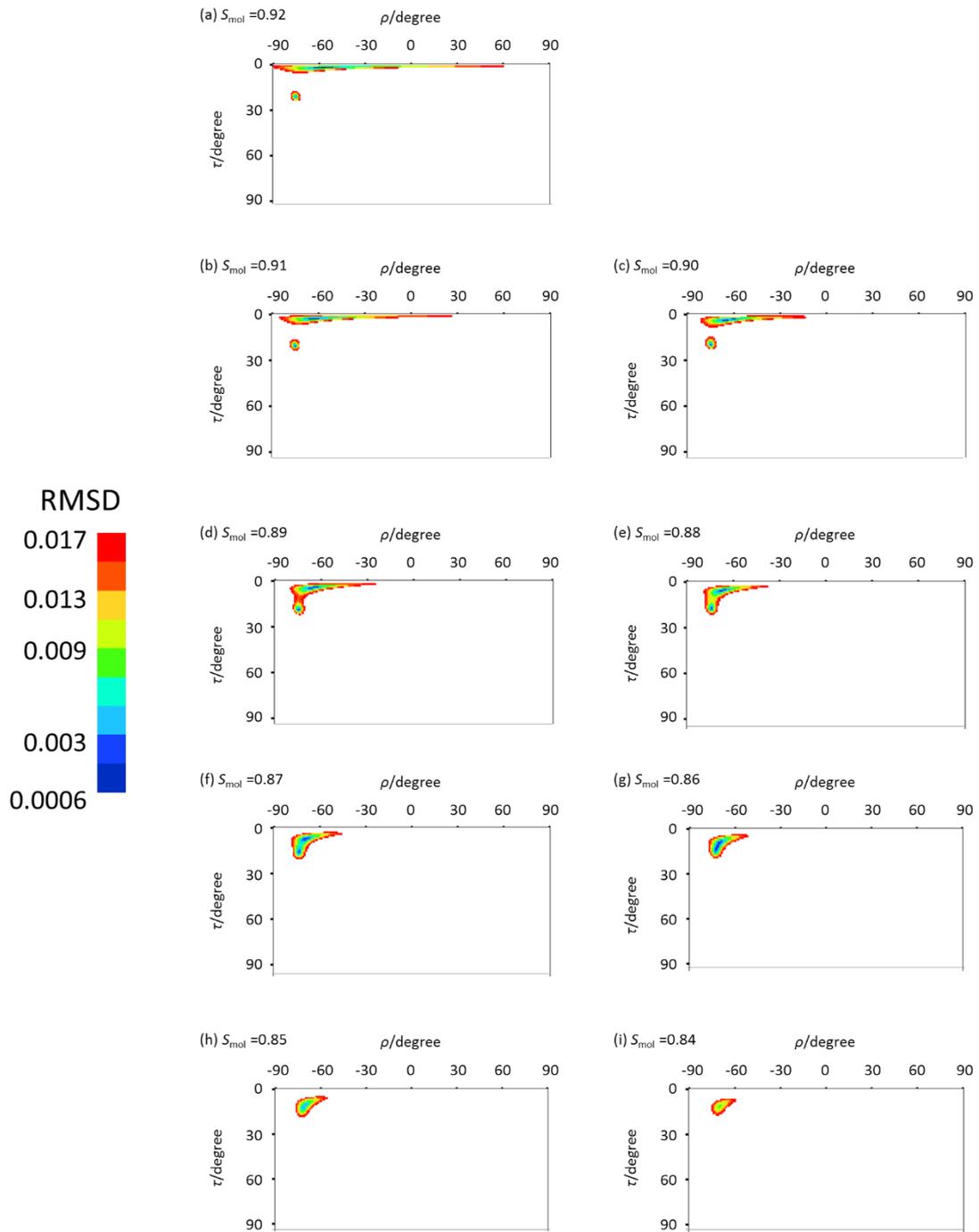


図 3-15.  $0.84 \leq S_{mol} \leq 0.92$  の範囲における  $\rho$ 、 $\tau$ 、 $S_{mol}$  に対する RMSD の等高線プロット。実測値と計算値の差を RMSD で評価した。また、 $\tau > 90^\circ$  の範囲では  $RMSD \leq 0.017$  となる配向が存在しなかったため省略した。

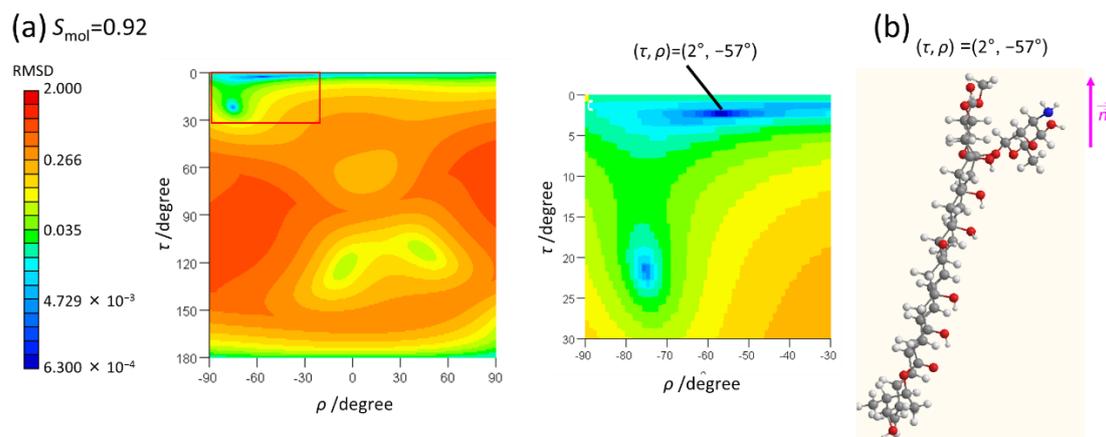


図 3-16. (a)  $S_{mol}=0.92$  における RMSD の等高線プロット。(b) RMSD が最小となる点、 $(\tau, \rho, S_{mol})=(2^\circ, -57^\circ, 0.92)$  における AME の配向。右上の矢印は膜法線を示す。

### 3-7 考 察

AmB の配向については、これまでに中性子散乱<sup>19</sup> や X 線回折<sup>21</sup>、蛍光異方性<sup>22</sup>、MD 計算<sup>44</sup> を用いた研究が行われてきた。これらの研究で示された AmB の傾きは今回の固体 NMR 測定で得られた配向と基本的には一致する。一方で、AmB の方位角については過去の研究と異なる。前述した MD 計算や中性子散乱による研究では、AmB は親水性のポリオール部分を膜表面に向けるような方位角を取っている (図 3-17b)。一方で、今回の固体 NMR によって得られた配向では、親水性のマイコサミン部分が膜表面に面するような方位角となっている (図 3-17a)。この違いは、今回の測定と MD 計算で仮定している会合体構造の違いに由来すると考えられる。MD 計算による研究では、単量体として存在する AmB の配向を計算しており、ポリオール部分が水和された方が安定であるために、ポリオール部分を膜表面方向に向ける。一方で、今回の測定で用いた条件では AmB 誘導体は単量体よりもチャンネル用の複合体を多く形成していることが、UV/Vis スペクトルからわかる。この構造においてポリオール部分は会合体中で他の AME のポリオール部分と相互作用するため、水和される必要はなく、電荷を持った親水性のマイコサミン部分が親水性の脂質膜表面と相互作用していると予想される。このような脂質膜表面-正電荷間の相互作用は *snorkeling effect* と呼ばれ、正電荷を持つ含む膜貫通ペプチドでも観察されている。<sup>13,45,46</sup>

また、今回得られた配向から、AmB の膜貫通様式について考察した。初期の樽板型チャンネルモデルでは、AmB の疎水的なポリエーテル部分 (18 Å ca.) が真菌の細胞膜の厚さよりも小さいことから、二分子膜貫通型のチャンネルモデルが提唱

されていた。一方で、当研究室で行われた  $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$  REDOR 測定により、AmB はステロール非含有 DMPC 膜において一分子貫通型のチャンネルを形成することが示された<sup>47</sup>。また、AmB のイオン透過活性は、炭素鎖の短い PC を含む脂質膜において増強されることが明らかとなっている<sup>48</sup>。これに加えて、エルゴステロールが DMPC 膜中において一分子貫通型の AmB イオンチャンネルの形成を促進することが知られている<sup>23,49</sup>。これらの点から、AmB はエルゴステロール含有 DMPC 膜に対し、深く挿入される方が安定であることと考えられる。今回の研究で得られた配向は AmB が膜に深く挿入されることを示す新たな証拠となりうる。また、膜法線に平行な配向は脂質膜-AmB 間の hydrophobic mismatch を軽減する上で有利であることが予想される。

AmB の活性機構について考察すると、Burke らによって提唱されたステロールスポンジモデルでは AmB は膜法線に垂直に配向していた(図 3-17c)。このような配向は、AmB のポリオール部分が水和する方が安定であるために提唱された配向である。一方で、樽板型チャンネルモデルでは AmB が脂質膜を貫通できるように、膜法線に平行に配向していた。これらのモデルと本研究結果を比較すると、樽板型チャンネルモデルが本研究結果に適合すると言える。AmB によって形成されるスポンジ構造は AmB/脂質比が 1/10 という比較的高濃度な条件で観測されており、膜表面で運動性を失った多くの AmB、エルゴステロール分子によって形成されていると考えられる<sup>18</sup>。山上によって得られた  $d_3$ -AME の濃度依存的な運動性変化では、AME が高濃度で存在すると運動性の低い成分が存在することが示されており、これがステロールスポンジモデルのような大きな会合体の形成に由来する可能性もある。しかし、少なくとも、本研究で配向解析に用いたような低濃度の条件 ( $14\beta$ -F- $d_3$ -AME/Erg/DMPC = 1/5/45) では、サンプル調整法の都合上、 $^2\text{H}$  NMR でゲル様のピークが確認されたものの、これまでのサンプル調製法のように均一なりポソームサンプルを形成すればステロールスポンジのような大きな会合体は形成されにくく、AME は膜に深く挿入された状態で高速の軸回転運動をしていると考えられる。

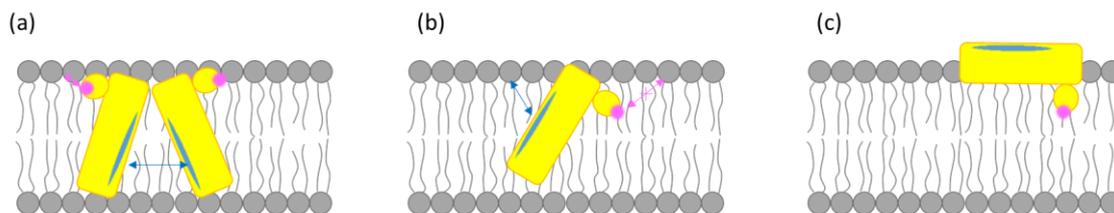


図 3-17 (a)今回の固体 NMR 測定から得られた配向。ポリオール部分 (青)はチャンネル内部を向くため、水分子や他分子のポリオール部分と相互作用する。マイコサミン部分を膜表面に向けるように傾き、マイコサミン部分のアミノ基 (マゼンダ) が膜表面と親水性相互作用をしていると考えられる。(b) 過去の MD 計算および中性子散乱によって得られたモデル。膜表面との相互作用はポリオール部分の方が優先される。しかし、このデータが得られた中性子散乱の測定条件はアミノ基がヨードアセチル化されており、マイコサミン部分の正電荷が存在しない他、MD 計算では 1 分子の配向を測定しており、他分子とのポリオール部分間相互作用の影響が無い。(c)ステロールスポンジモデルにおける配向。ポリオール部分の水和が最優先されるために、このような配向を形成すると考えられた。

本項では、 $^2\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  固体 NMR を用いて、脂質膜中におけるマクロラクトン環の配向を測定した。過去に山上によって得られた AME のほとんどが高速の軸回転運動をする条件を配向測定に適用し、新規に開発した AmB 誘導体  $14\beta\text{-F-d}_3\text{-AME 9}$  を用いてマクロラクトン環の配向解析を行った。そして、固体 NMR 測定より得られた分子の傾きと方位角を用いて、AmB の配向を推定した。本研究の結果は、AmB のマクロラクトン環が膜法線に対しほぼ平行に配向していることを示していることに加えて、親水性のマイコサミン部分が親水性の脂質膜表面と相互作用していることも示唆した。一方、今回は一つの条件でしか配向解析をしておらず、リン脂質等の違いによって配向が変化する可能性もある。今回の配向から予想されたマイコサミン-膜表面間の相互作用の存在や膜法線に平行な配向についてその真偽を確かめるために、異なる条件で配向を測定し、膜の厚さや脂質の電荷が配向にどのような影響を与えるかについて調べる必要がある。その際にも今回調製したプローブ分子が適用可能であり、今回開発した測定手法によって、マクロラクトン環の配向について更に詳細な情報を得られると期待される。

また、今回得られた配向を、分子間距離情報より推定されたチャンネル構造と比較した<sup>1</sup>。中川によって測定された AmB-AmB 間の分子間距離情報を満たすチャンネル複合体構造は Channel A および Channel B という二種類のチャンネル構造に

分類される。分子間距離情報を満たすチャンネル構造における AmB の配向と今回の配向測定の結果を比較すると、Channel B 構造の配向が今回の配向測定の結果に近いことがわかる(図 3-18)。よって、AmB は Channel B 構造に近い配向を取っていると考えられる。また、分子間距離情報より得られる Channel B 構造と今回の配向測定の結果両方を満たす配向として  $(\tau, \rho) = (27^\circ, -68^\circ)$  が得られた。この配向を満たす会合体数やチャンネル内径の絞込には至っていないが、このようにこれまでの分子間距離情報と今回の配向情報を組み合わせることで、より精密にチャンネル構造を推定することができた。

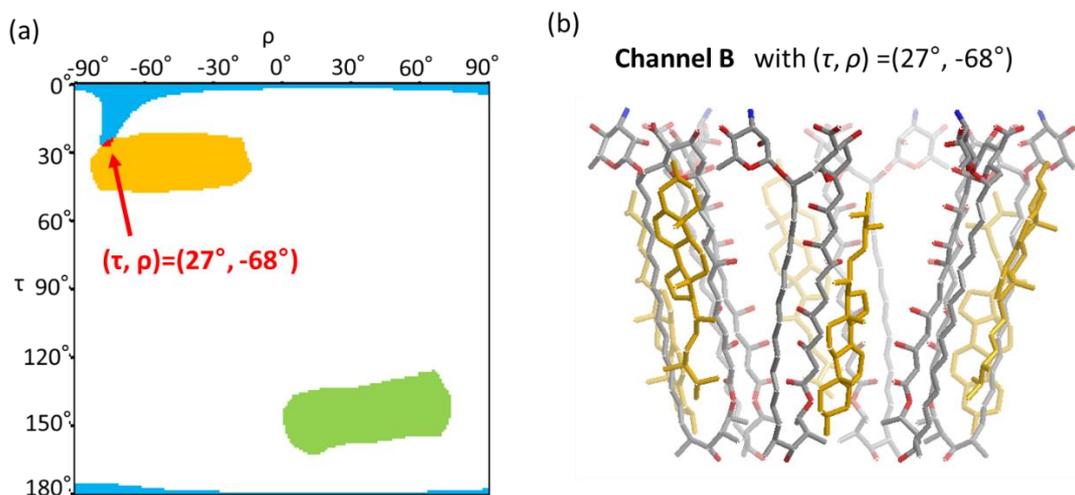


図 3-18 (a)過去の分子間距離測定によって得られた Channel A(緑色)、Channel B(黄色)に分類される配向の範囲と、今回の配向測定で RMSD が 0.017 以下となる配向の範囲(水色)。今回の配向測定の結果と Channel B の両方を満たす配向として  $(\tau, \rho) = (27^\circ, -68^\circ)$  が得られた (赤色)。 (b)  $(\tau, \rho) = (27^\circ, -68^\circ)$  を満たすチャンネル構造。

## 実験項

### 試薬

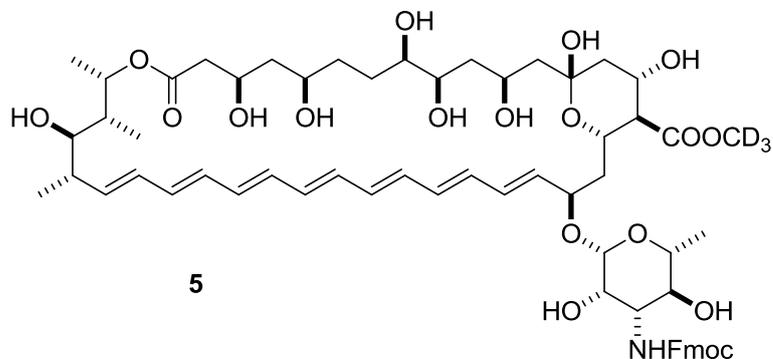
AmB はナカライテスクから、エルゴステロールは東京化成工業から、DMPC は日本油脂から購入した。固体 NMR 測定や UV スペクトル測定、イオン透過活性試験のサンプル調製における溶媒はナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を用いた。また水には MilliQ 水(Millipore 社)を用いた。その他の試薬は特に記載のない限り、市販のものをそのまま用いた。HPLC に用いた緩衝液は測定前にソニケーションを行うことで脱気して使用した。またサンプル調製の際 AmB は DMSO のストックソリューションとし、UV スペクトルにより濃度決定を行い使用した( $\epsilon_{415}=1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )。薄層クロマトグラフィー(TLC) は Merck 社の Kieselgel 60 F254 を用いた他、順相カラムクロマトグラフィーは関東化学の Silica gel 60N (球状、中性、40-50  $\mu\text{m}$ ) を用いた。逆相カラムクロマトグラフィーはコスモシール 75C<sub>18</sub>-OPN (ナカライテスク)を用い、HPLC 精製は COSMOSIL Packed Column, 5C<sub>18</sub>-MS-II (ナカライテスク、20ID×250 mm) を用いた。

### 使用機器

溶液 NMR は ECA 500 (日本電子, <sup>1</sup>H NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 125 MHz)を用いた。質量分析は LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

## 新規標識体の調製

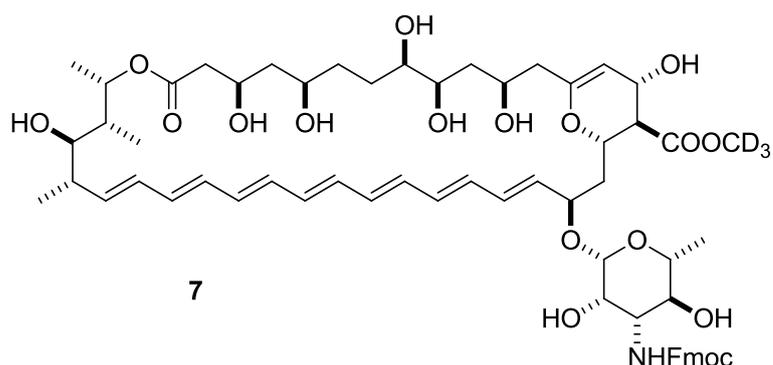
### *N*-Fmoc-*d*<sub>3</sub>-AME 5



DMF (10.0 ml)に溶解させた *N*-Fmoc-AmB (200.0 mg, 174.6  $\mu$ mol) に  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (28.0 mg, 264  $\mu$ mol)、ヨードメタン-*d*<sub>3</sub> (18.8  $\mu$ l, 296  $\mu$ mol) を加え、室温で23時間攪拌した。反応液をジエチルエーテル (200 ml) に加えて、目的物を沈殿させ、濾過後、ジエチルエーテル (50 ml) で洗浄した。沈殿をクロロホルム:メタノール =5:3 の混合溶媒で回収した後、溶媒を留去した。これをフラッシュカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , クロロホルム:メタノール =10:1) で生成し、*N*-Fmoc-*d*<sub>3</sub>-AME 5 を黄色粉末 (110.0 mg, 94.5  $\mu$ mol, 54%) として得た。

*N*-Fmoc-*d*<sub>3</sub>-AME 5:  $R_f = 0.57$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 5/1$ ); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{82}\text{D}_3\text{NO}_{19}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1185.5796, found: 1185.5791

### グリカール 7



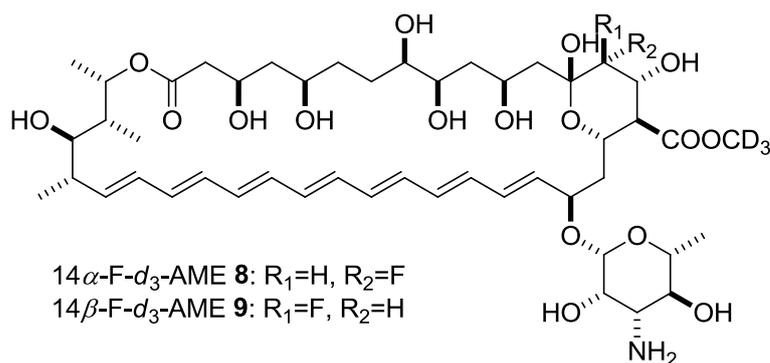
ジクロロメタン (12 mL) に溶解させた *N*-Fmoc-*d*<sub>3</sub>-AME 5 (660.3 mg, 567.6  $\mu$ mol) に対し、2,6-lutidine (3.55 ml, 30.7 mmol)、TMSOTf (2.88 ml, 15.9 mmol) をクウあえ、室温で2時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、モテ茎物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過の後に溶媒を留去した。得られた固体は、カラムクロマトグラフィー

ーによる精製を行わずに次の反応に用いた。

得られた固体を THF (5.0 ml) に溶解させ、プラスチック容器へ移し、0 °C に冷却した。この溶液に 7.1% HF/pyridine (3.62 ml) を加え、14 時間攪拌した。反応液をヘキサン/ジエチルエーテル=1/1 の混合溶媒 (300 ml) に加え、得られた黄色沈殿をセライトで濾過し、ジエチルエーテル、7% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液、水で洗浄した。沈殿をメタノールで回収し、溶媒を留去した後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム: メタノール 15:1 to 8:1) で精製を行い、グリカール **6** を黄色粉末 (281.0 mg, 245.3 μmol, 43% for 2 steps) として得た。

グリカール **6**: R<sub>f</sub> = 0.30 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.89 (3H, d, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.76 (3H, dd, *J* = 7.5, 3.0 Hz, Fmoc), 7.42 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.33 (3H, m, Fmoc), 7.00 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, Fmoc), 6.41-6.11 (10H, m, H<sub>21</sub>-31), 6.05 (1H, dd, *J* = 15.5, 11.0 Hz, H<sub>32</sub>), 5.83 (1H, dd, *J* = 15.5, 7.5 Hz, H<sub>20</sub>), 5.51 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.0 Hz, H<sub>33</sub>), 5.08 (1H, m, H<sub>37</sub>), 5.03 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H<sub>14</sub>), 4.83 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, OH), 4.74 (4H, m, OH), 4.63 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, OH), 4.52 (2H, m, OH), 4.38 (3H, m, H<sub>15</sub>, 19, 1'), 4.10 (1H, m, H<sub>17</sub>), 4.02 (1H, m, H<sub>3</sub>), 3.81 (1H, m, H<sub>5</sub>), 3.63 (1H, m), 3.20-3.08 (m, 3H), 2.36 (1H, m, H<sub>16</sub>), 2.27 (1H, m, H<sub>34</sub>), 2.17 (2H, m, H<sub>2</sub>), 1.93-1.78 (3H, m, H<sub>18ab</sub>), 1.72 (1H, m, H<sub>36</sub>), 1.60-1.21 (9H, m), 1.16 (3H, d, *J* = 5.5 Hz, H<sub>6'</sub>), 1.11 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H<sub>38</sub>), 1.03 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H<sub>40</sub>), 0.91 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H<sub>39</sub>); MS (ESI) calcd for C<sub>63</sub>H<sub>80</sub>D<sub>3</sub>NO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1167.5691, found: 1167.5694

#### 14 $\alpha$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME **8**, 14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME **9**



DMF/pH6.8 リン酸緩衝液=3/1 の混合溶媒 (10.1 ml) に溶解させたグリカール **6** (281.0 mg, 245.3 μmol) を 0 °C に冷却し、Selectfluor (91.3 mg, 258 μmol) を加え、10 分攪拌した。反応液をオープン逆相カラム (COSMOSIL, 75C<sub>18</sub>-OPN, メタノール/水 0/1 to 1/0) により脱塩を行った。得られた黄色粉末をフラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム: メタノール 20:1) により精製し、化合物 **S2** の黄色粉末を、14 $\alpha$ F/14 $\beta$ F の混合物として得た (54.7 mg, 46.3 μmol, 19%,  $\alpha/\beta$ )

=1/4)。得られた化合物 S2 (54.7 mg, 46.3  $\mu$ mol) を DMSO/*i*PrOH =3/1 の混合溶媒 (12 ml) に溶解させ、ピペリジン (42.0  $\mu$ l, 425  $\mu$ mol) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応溶液をジエチルエーテル (75 ml) に加え、得られた黄色沈殿をセライト濾過し、クロロホルム/メタノール =5/3 で回収した後、溶媒を留去して 14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 3 を黄色粉末として得た (48.1 mg, quant.,  $\alpha/\beta$  mixture)。これを HPLC (5C<sub>18</sub>-MS-II, 20ID $\times$ 250 mm, 5 mM AcONH<sub>4</sub> 緩衝液/メタノール 72/28, 8 ml/min) により精製し、14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 9 と 14 $\alpha$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 8 を分離した。

14 $\alpha$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 8; R<sub>f</sub> =0.32 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.45-6.00 (12H, m, H21-31), 5.88 (1H, dd, *J*= 16, 9.5 Hz, H-20), 5.44 (1H, dd, *J*= 14.0, 10.0 Hz, H-33), 5.20 (1H, m, H-37), 4.36 (1H, m, H-19), 4.26 (2H, m, H-17, H-19), .26 (1H, d, *J*=100 Hz, H-14), 4.22 (1H, s, H-1'), 4.13 (1H, dd, *J*<sub>H-F</sub>= 30.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub>= 9.5 Hz, H-15), 4.06 (1H, m, H-3), 3.53 (2H, m, H-5, H-2'), 3.45 (1H, m, H-8), 3.12 (1H, m, H-9), 3.09 (1H, m, H-35), 3.04 (1H, m, H-5'), 2.86 (1H, t, *J*= 9.0 Hz, H-4'), 2.46 (1H, m, H-16), 2.35 (1H, m, H-34), 2.29 (1H, m, H-3'), 2.17 (2H, m, H-2ab), 1.88 (1H, m, 18a), 1.73 (2H, m, H-12a, H-36), 1.58 (2H, m, H-18b, H-10a), 1.55 (2H, m, H-7a, H-12a), 1.40-1.23 (6H, m, H-4ab, H-6ab, H-10b, H-7b), 1.15 (3H, d, *J*= 6.0 Hz, H-6'), 1.10 (3H, d, *J*= 6.0 Hz, H-38), 1.04 (3H, d, *J*=7.0 Hz, H-40), 0.91 (1H, d, *J*= 7.0 Hz, H39); <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -206.8 (dd, *J*=50.0, 30.0 Hz); MS (ESI) calcd for C<sub>48</sub>H<sub>71</sub>D<sub>3</sub>FNO<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup> 959.5202, found: 959.5207

14 $\beta$ -F-*d*<sub>3</sub>-AME 9; R<sub>f</sub> =0.32 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.49-6.05 (11H, m, H21-31), 5.88 (1H, dd, *J*=11.2, 8.8 Hz, H20), 5.43 (1H, dd, *J*=14.8, 10.0 Hz, H33), 5.22 (1H, m, H37), 4.35 (2H, m, H19, 17), 4.23 (1H, m, H11), 4.22 (1H, s, H1'), 4.07 (2H, m, H3, 15), 3.84 (1H, dd, *J*=50.8, 8.8 Hz, H14), 3.48 (3H, m, H5, 9, 2'), 3.09 (3H, m, H5', 35, 8) 2.87 (1H, t, *J*= 9.2 Hz, H4'), 2.37 (1H, t, *J*=10.4 Hz, H16), 2.31 (2H, m, H3', 34), 2.16 (2H, m, H2ab), 1.90 (1H, m1, H18a), 1.71 (1H, m, H36) 1.61-1.21 (11H, m, H5ab, 6ab, 7ab 10ab, 12ab, 18b), 1.14 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H1'), 1.11 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H38), 1.04 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H40), 0.91 (3H, d, *J*=7.2 Hz); <sup>19</sup>F NMR (377 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -200.58 (dd, *J*=50.8, 8.6 Hz); MS (ESI) calcd for C<sub>48</sub>H<sub>71</sub>D<sub>3</sub>FNO<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup> 959.5202, found: 959.5207



14 $\beta$ -F-AME **13**  $R_f=0.32$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6.49-6.05 (11H, m, H21-31), 5.88 (1H, dd,  $J=11.2, 8.8$  Hz, H20), 5.43 (1H, dd,  $J=14.8, 10.0$  Hz, H33), 5.22 (1H, m, H37), 4.35 (2H, m, H19, 17), 4.23 (1H, m, H11), 4.22 (1H, s, H1'), 4.07 (2H, m, H3, 15), 3.84 (1H, dd,  $J=50.8, 8.8$  Hz, H14), 3.64 (3H, s, OMe), 3.48 (3H, m, H5, 9, 2'), 3.09 (3H, m, H5', 35, 8) 2.87 (1H, t,  $J=9.2$  Hz, H4'), 2.37 (1H, t,  $J=10.4$  Hz, H16), 2.31 (2H, m, H3', 34), 2.16 (2H, m, H2ab), 1.90 (1H, m, H18a), 1.71 (1H, m, H36) 1.61-1.21 (11H, m, H5ab, 6ab, 7ab 10ab, 12ab, 18b), 1.14 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H1'), 1.11 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H38), 1.04 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H40), 0.91 (3H, d,  $J=7.2$  Hz); <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -200.58 (dd,  $J=50.8, 8.6$  Hz); MS (ESI) calcd for C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>FNO<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup> 956.5014, found: 956.5015

### 溶血活性試験

溶血活性試験では 1% ヒト赤血球溶液におけるヘモグロビンの溶出を 450 nm の可視光吸収より測定した。ヒトの血液を 2000 rpm で遠心分離し、上清をデカンテーションにより除去した。得られた赤血球の沈殿を PBS 緩衝液で三度洗浄し、もとの血液の 1/100 の濃度になるよう PBS 緩衝液に懸濁させた。この懸濁液 190  $\mu$ L に AmB およびその類縁体の DMSO 溶液 10  $\mu$ L を加え、38 °C で 18 時間、穏和に攪拌しながらインキュベーションを行った。この懸濁液を 2000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清の 450 nm における可視光吸収をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) によって測定し、溶血活性を求めた。ポジティブコントロールとして、1% 赤血球溶液を蒸留水で調製したものを、ネガティブコントロールとして、1% 赤血球懸濁液に 10  $\mu$ L の DMSO を加えたものを用いた。

### <sup>31</sup>P NMR を用いたイオン透過活性試験

イオン透過活性試験は過去に報告された手法に従って行った<sup>32</sup>。この実験では、カリウムイオンのリポソーム内への流入に伴うリポソーム内の pH 変化を、リポソームに内包されたリン酸イオンの <sup>31</sup>P NMR における化学シフト変化から評価した。POPC とステロールをクロロホルム中に溶解させ、ナスフラスコ中で溶媒を留去させることでフィルムを形成させた。得られたフィルムを真空中で 6 時間以上乾燥させ、0.4 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/1 mM EDTA 溶液 (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O =3/2, pH 5.5) により水和した。凍結融解を 5 回繰り返してリポソームを形成させた後、Liposofast® シリンジを用いてポリカーボネートフィルター (200 nm pore size, Avestin Inc.) を通し、リン酸イオンを内包させた LUV を調製した。LUV 懸濁液を 400 mM

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液で希釈し、脂質濃度 12 mM のリポソーム懸濁液とした。これに 10 M KOH 水溶液を加え、pH が 7.5 になるように調製した。この LUV 懸濁液 750 μL に対し、2 μL の FCCP-エタノール溶液 (10 mM) と 6.39 μL の AmB およびその誘導体の DMSO 溶液 (濃度は AmB/脂質比が 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> になるように調製) を加え、室温で 3 時間インキュベーションした。この懸濁液のうち 550 μL を NMR チューブに移し、4.4 μL の MnCl<sub>2</sub> 水溶液 (100 mM) を加えて、リポソーム外のリン酸イオンの <sup>31</sup>P NMR シグナルをクエンチした。<sup>31</sup>P NMR 測定には ECS400 (日本電子,<sup>31</sup>P NMR: 162 MHz) を用い、<sup>1</sup>H デカップリング条件下で測定した。

#### UV スペクトル測定

AmB および 14β-F-*d*<sub>3</sub>-AME **9** (95 nmol)、DMPC (840 nmol)、コレステロール or エルゴステロール (105 nmol) をクロロホルム/メタノール =2/1 に溶解させ、溶媒を留去してフィルムを形成させた。これを真空中で 6 時間乾燥させた後、8% スクロース水溶液 (2 mL) で水和させ、vortex、超音波破碎、凍結融解により MLV を形成させた。この MLV 懸濁液を 8% スクロース水溶液で 2.11 倍希釈し、MLV 懸濁液 1 mL を光路長 1 cm の石英セルに加えた。UV スペクトルを測定には日本分光製の V-630BIO を用い、300~450 nm の波長域で測定を行った。また、バックグラウンド測定には 8% スクロース水溶液を用いた。

#### 固体 NMR 測定用リポソームサンプルの調製

14β-F-*d*<sub>3</sub>-AME **9** または 14α-F-*d*<sub>3</sub>-AME **8**, エルゴステロール、DMPC をクロロホルム/メタノール =5/3 の混合溶媒に溶解させ、溶媒を留去させることでフィルムを形成させた。これを真空中で 8 時間乾燥させた後、フィルムに超軽水 (Aldrich, <1 ppm D<sub>2</sub>O 含有) をサンプル濃度が 30.3 mg/mL になるように加え、50 °C に加温した後にボルテックスを行うことで懸濁液を作成した。この懸濁液を 5 回凍結融解することで MLV 懸濁液とし、遠心分離 (15000 rpm, 10 min) を行った。上清をデカンテーションにより除去した。得られた沈殿を再度超軽水 (30.3 mg/mL) により懸濁させ、遠心分離 (15000 rpm, 10 min) の後、上清を除去した。<sup>19</sup>F NMR 測定では、得られたリポソームペレット (約 15 mg) を HR-MAS インサート (Bruker) に移し、インサートをエポキシ樹脂により密封した後、MAS ローター (φ = 4 mm) に挿入した。<sup>2</sup>H NMR 測定では、リポソームペレット (約 100 mg) を 5 mm ガラスチューブに移し、エポキシ樹脂により密封した。

## 固体 NMR 測定用粉末サンプルの調製

粉末サンプルの調製には、重水素化していない  $14\beta$ -F-AME **13** または  $14\alpha$ -F-AME **12** を用いた。 $14\beta$ -F-AME **13** または  $14\alpha$ -F-AME **12** を 1 mL のクロロホルム/メタノール =5/3 の混合溶媒に溶解させ、これに 25 mg のセライトを加えた。溶媒を留去することで、セライトに担持させた  $14\beta$ -F-AME の粉末を得た。この粉末を MAS ローター ( $\phi = 4$  mm) に移した。 $14\beta$ -F-AME の粉末を MAS ローターの中心付近に位置させるために、MAS ローターの上部と下部に 15 mg ずつの洗浄したセライトをスペーサーとして充填した。

## 固体 NMR 測定

$^2\text{H}$  固体 NMR は AVANCE400 ( $^2\text{H}$  共鳴周波数: 61.441 MHz, Bruker) を用い、5 mm  $^2\text{H}$  static probe を用いた。測定は 40 °C で行い、magic quadrupolar-echo パルスシーケンス<sup>50</sup> を用いた。90°パルス幅は 4.6  $\mu\text{s}$ 、待ち時間は 0.5 s、観測幅は 250 kHz で行った。

$^{19}\text{F}$  NMR スペクトルは AVANCE 600 ( $^{19}\text{F}$  共鳴周波数: 564.61 MHz, Bruker) を用い、4 mm quadrupole resonance (1H/19F/X/Y) MAS probe を用いた。測定は 40 °C で行い、粉末サンプルのスペクトルは 5 kHz MAS 条件下で、リポソームサンプルのスペクトルは MAS を用いずに測定した。テフロンインサート由来のバックグラウンドシグナルを除去するために、spin-echo pulse sequence after  $^{19}\text{F}$  direct excitation を用いている。 $^1\text{H}$  デカップリングをスピネコーと FID 観測の間に用いている。 $^{19}\text{F}$  核の 90°パルス幅は 4.5  $\mu\text{s}$ 、エコー時間は 20  $\mu\text{s}$ 、観測幅は 113.6 kHz、 $^1\text{H}$  デカップリング強度は 60 kHz、待ち時間は 5 s を用いた。また、 $^{19}\text{F}$  化学シフトの外部標準として、0.5% TFA- $\text{D}_2\text{O}$  溶液 (76.0 ppm) を用いた。

## $^{19}\text{F}$ CSA テンソルの計算

$^{19}\text{F}$  CSA のテンソル計算は Gaussian 09W (Gaussian Inc.) を用いて行った。図に示した簡略化された THP 環構造をソフトウェアにインプットし、second-order Møller-Plesset (MP2) 法により構造最適化を行った<sup>22</sup>。この時の基底関数は 6-311G (d) を用いた。得られた構造の CSA テンソルは B3LYP 法<sup>43</sup> を用いた DFT-GIAO 法<sup>40</sup> により求めた。このときの基底関数は 6-311++G (2d, 2p) を用いた。インプットした初期構造は GaussViews 5.0.9 (Gaussian Inc.) によって作成し、アウトプットした構造は Chem3D (CambridgeSoft) により可視化した。



参考文献

- (1) 中川泰男 平成 26 年度 学位論文 大阪大学大学院理学研究科.
- (2) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 13463–13469.
- (3) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry*, **2012**, *51*, 83–89.
- (4) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Matsushita, N.; Yamamoto, T.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2016**, *55*, 3392–3402.
- (5) Sanderson, J. M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 201–212.
- (6) Sato, H.; Feix, J. B. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1758*, 1245–1256.
- (7) Cross, T. A.; Ekanayake, V.; Paulino, J.; Wright, A. *J. Magn. Reson.* **2014**, *239*, 100–109.
- (8) Strandberg, E.; Zerweck, J.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *Biophys. J.* **2013**, *104*, L9–11.
- (9) Wadhvani, P.; Strandberg, E.; van den Berg, J.; Mink, C.; Bürck, J.; Ciriello, R. A.; Ulrich, A. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1838*, 940–949.
- (10) Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1848*, 1944–1954.
- (11) Tsutsumi, A.; Javkhlantugs, N.; Kira, A.; Umeyama, M.; Kawamura, I.; Nishimura, K.; Ueda, K.; Naito, A. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1735–1743.
- (12) Patching, S. G. *Mol. Membr. Biol.* **2015**, *32*, 156–178.
- (13) Vostrikov, V. V.; Hall, B. A.; Sansom, M. S.; Koeppe, R. E. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 12980–12990.
- (14) 山上正輝 平成 24 年度 修士論文 大阪大学大学院理学研究科.
- (15) 松田康彦 平成 22 年度 修士論文 大阪大学大学院理学研究科.
- (16) Hing, A. W.; Schaefer, J.; Kobayashi, G. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 323–332.
- (17) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.
- (18) 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.
- (19) Foglia, F.; Lawrence, M. J.; Demeè, B.; Fragneto, G.; Barlow, D. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 778.
- (20) Lopes, S.; Castanho, M. A. R. B. *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 7278–7282.
- (21) Kamiński, D. M.; Czernel, G.; Murphy, B.; Runge, B.; Magnussen, O. M.; Gagoś, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 2947–2953.
- (22) Grudzinski, W.; Sagan, J.; Welc, R.; Luchowski, R.; Gruszecki, W. I. *Sci Rep*

2016, 6, 32780.

- (23) Cohen, B. E. *J. Membr. Biol.* **2010**, 238, 1–20.
- (24) Gagoś, M.; Gabrielska, J.; Dalla Serra, M.; Gruszecki, W. I. *Mol. Membr. Biol.* **2005**, 22, 433–442.
- (25) Man, D.; Olchawa, R. *J Liposome Res* **2013**, 23, 327–335.
- (26) Mehring, M.; Griffin, R. G.; Waugh, J. S. *J. Chem. Phys.* **1971**, 55, 746–755.
- (27) Kohler, S. J.; Klein, M. P. *Biochemistry*, **1976**, 15, 967–973.
- (28) Seelig, J. Q. *Rev. Biophys.* **1977**, 10, 353–418.
- (29) Bechinger, B.; Salnikov, E. S. *Chem. Phys. Lipids*, **2012**, 165, 282–301.
- (30) Resende, J. M.; Verly, R. M.; Aisenbrey, C.; Cesar, A.; Bertani, P.; Piló-Veloso, D.; Bechinger, B. *Biophys. J.* **2014**, 107, 901–911.
- (31) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3565–3567.
- (32) Herve, M.; Cybulska, B.; Gary-Bobo, C. M. *Eur. Biophys. J.* **1985**, 12, 121–128.
- (33) Fujii, G.; Chang, J.-E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* **1997**, 36, 4959–4968.
- (34) Gagoś, M.; Koper, R.; Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1511, 90–98.
- (35) Gruszecki, W. I. I.; Gagoś, M.; Hereć, M.; Kernen, P. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, 8, 161–70.
- (36) Gruszecki, W. I.; Gagoś, M.; Hereć, M. *J. Photochem. Photobiol. B* **2003**, 69, 49–57.
- (37) 松下 直広 平成 20 年度 学位論文 大阪大学大学院理学研究科
- (38) Sanders, L. K.; Oldfield, E. *J. Phys. Chem. A*, **2001**, 105, 8098–8104.
- (39) Sternberg, U.; Klipfel, M.; Grage, S. L.; Witter, R.; Ulrich, A. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 7048–7060.
- (40) Ditchfield, R. *Mol. Phys.* **1974**, 27, 789–807.
- (41) Higashibayashi, S.; Czechtizky, W.; Kobayashi, Y.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14379–14393.
- (42) Møller, C.; Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618–622.
- (43) (a) Becke, A. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648–5652. (b) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev., B*, **1988**, 37, 785–789.
- (44) Neumann, A.; Wieczor, M.; Zielinska, J.; Baginski, M.; Czub, J. *Langmuir* **2016**, 32, 3452–3461.
- (45) Mishra, V. K.; Palgunachari, M. N.; Segrest, J. P.; Anantharamaiah, G. M. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 7185–7191.
- (46) Strandberg, E.; Killian, J. A. *Febs Lett.* **2003**, 544, 69–73.

- (47) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704–710.
- (48) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109–115.
- (49) Cohen, B. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 95–106.
- (50) Mananga, E. S.; Roopchand, R.; Rumala, Y. S.; Boutis, G. S. *J. Magn. Reson.* **2007**, *185*, 28–37.

## 第四章 $\beta$ グリコシド結合の配座解析

### 緒言

チャンネル構造の全体像解明に向けて、第二章ではマクロライドの配座を構造活性相関により推定した他、第三章では AmB 分子の配向を固体 NMR 測定により決定した。これらの結果と、当研究室の梅川、中川らによって行われた分子間距離測定の結果<sup>1-3</sup>を組み合わせることで、チャンネル複合体中における AmB のアグリコン・マクロライド部分とエルゴステロールの位置関係をより精度良く推定することができた。一方でこれらの手法では、アグリコンとマイコサミン部分を結ぶ  $\beta$  グリコシド結合の配座を、結晶構造と同じであると仮定してチャンネル構造の推定を行っている。しかし、この  $\beta$  グリコシド結合の配座は、マイコサミン部分の配向に寄与する重要な情報であり、分子間距離情報等とは独立した情報として得る必要がある。

近年は、このマイコサミン部分が活性やステロール選択性に重要であることが示唆されている。マイコサミン部分の構造を変化させた類縁体の構造活性相関研究では、マイコサミン部分 2'位のヒドロキシ基を除去することでステロール選択性が向上し<sup>4</sup>、2'位のヒドロキシ基をメチル基によって保護することで活性が低下する<sup>5</sup>ことが明らかとなった。当研究室の松森、澤田らによる分子内架橋体の研究では、架橋部分の長さによってマイコサミン部分の配向を制御することでステロール選択性が変化したという結果が報告されており、 $\beta$  グリコシド結合の配座がステロール選択性に寄与していることが強く示唆されている<sup>6,7</sup>。また MD 計算による研究でも膜中に存在するステロールの種類によって  $\beta$  グリコシド結合の立体配座が変化する他、マイコサミン部分 2'位のヒドロキシ基がステロールのヒドロキシ基と水素結合するという計算結果が得られている<sup>8</sup>。

これらのことから、 $\beta$  グリコシド結合の配座は AmB チャンネル複合体の構造情報の中でも最も活性やステロール選択性に寄与するものであると考えられる。よって、チャンネル複合体の構造決定およびそれを用いた AmB ステロール間相互作用の考察において、マイコサミン部分の配向は必須であり、その測定手法の確立が求められている。

固体 NMR で  $\beta$  グリコシド結合の配座を決定するためには、マイコサミン部分へ標識核を合成化学的に導入する必要があるが、その手法は未だ確立されていない。マイコサミン部分に標識核を導入する合成経路では、AmB のアグリコンに対し、標識化マイコサミン供与体を  $\beta$  グリコシル化により導入する必要がある。しかし、 $\beta$  グリコシル化の段階は、AmB 脱糖体の不安定性や低反応性から、AmB の全合成研究において最も収率の低い反応となっている<sup>9</sup>。また、 $\beta$  グ

リコシル化以降も 2'位の立体反転等、低収率の反応が続き、マイコサミン部分への標識核の導入はこれまで困難であるとされてきた。

一方で近年は、AmB 脱糖体に対する  $\beta$  グリコシル化の収率も改善されていることから<sup>10</sup>、マイコサミン部分へ標識核を導入する反応も以前よりは容易になったといえる。そこで本章では、 $\beta$  グリコシル化を介した合成経路によって、マイコサミン部分周辺に標識核を導入した新規標識化 AmB を合成した。さらに合成した新規標識体に  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$ REDOR 測定を適用し、 $\beta$  グリコシド結合の配座を決定した。

#### 4-1 マイコサミン部分の配向解析に向けた戦略と新規標識体の合成経路

マイコサミン部分の配向解析を固体 NMR によって行う上で、本研究ではマクロラクトン環・マイコサミン間の距離を REDOR 測定により決定することで、 $\beta$  グリコシド結合の二面角を決定することを考えた。アグリコン側の任意の原子とマイコサミン側の任意の原子の間の距離は  $\beta$  グリコシド結合の二面角によって変化する。すなわち、これらの原子間距離を決定することができれば、 $\beta$  グリコシド結合の二面角を決定することが可能である (図 4-1)。そこで、 $\beta$  グリコシド結合の配座を測定できる新規 AmB 標識体として、19 位に重水素を導入し、マイコサミンの 1'位に  $^{13}\text{C}$  を導入した 19-*d*<sub>1</sub>-1'- $^{13}\text{C}$ -AmB をデザインした。19 位に導入した重水素と、マイコサミン部分 1'位に導入した  $^{13}\text{C}$  との間の距離は二面角 D19-C19-O-C1' (二面角  $\Phi$ ) に依存する。よって、この標識核間距離を測定することで、二面角  $\Phi$  を決定できると考えた。一方、この手法では  $\beta$  グリコシド結合を形成する 2 つの共有結合の内、糖に近い方の結合二面角 C19-O-C1'-C2' (二面角  $\Psi$ ) を決定できないという問題点がある。しかし、糖のアノマー炭素-酸素間結合の結合二面角はエキソアノマー効果により固定されることが過去に示されており<sup>14,15</sup>、今回は片方の結合二面角 D19-C19-O-C1' (二面角  $\Phi$ ) のみを決定することを目指した。

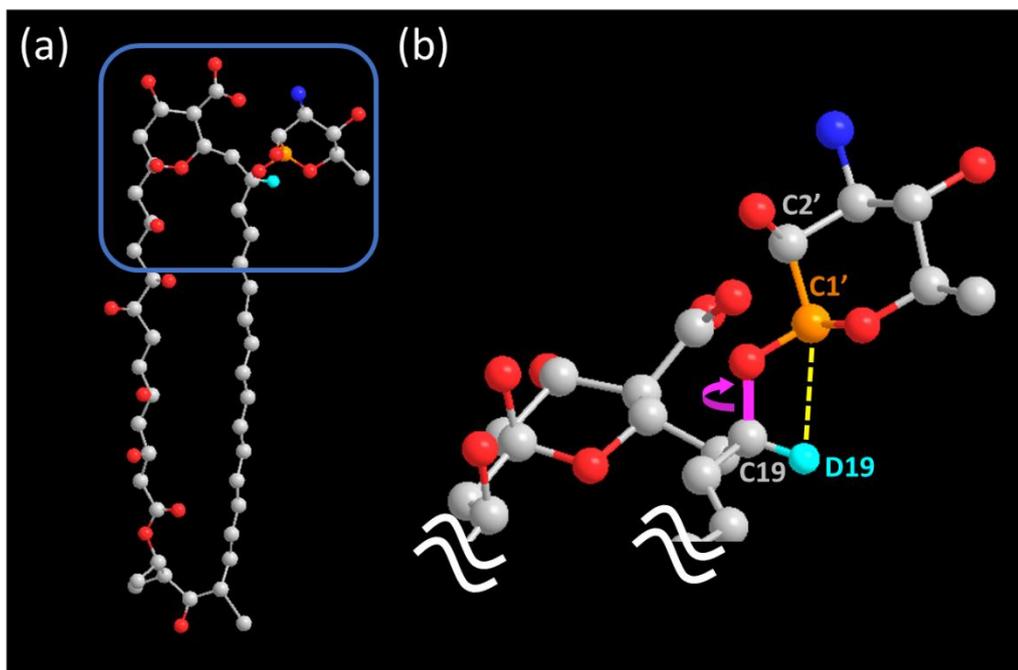


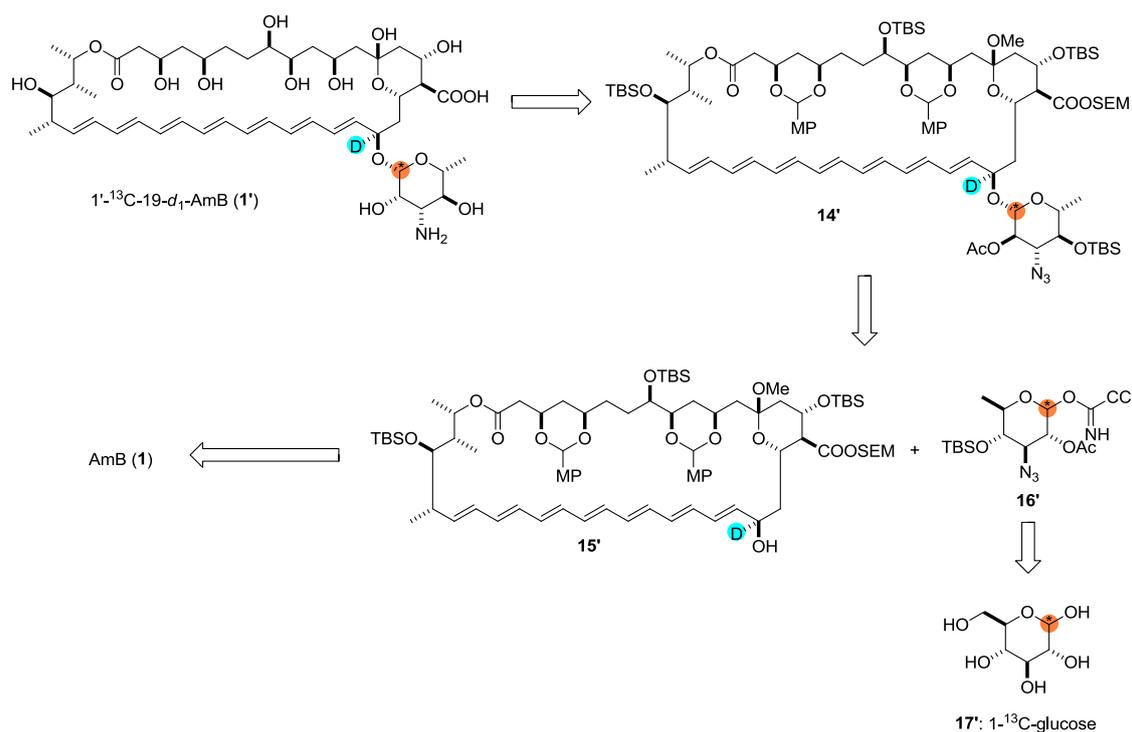
図 4-1. (a) AmB の結晶構造。今回  $^{13}\text{C}$  標識を導入する 1'位を橙色で、 $^2\text{H}$  標識を導入する 19 位を水色で示した。(b) マイコサミン部分周辺の拡大図。D19-C1' 間の距離は、二面角 D19-C19-O-C1' の大きさに依存する。

このような測定を行う上で、マイコサミン部分とマクロラクトン環両方に標識核を導入する必要がある。そこで、本研究では重水素標識した AmB 脱糖体と  $^{13}\text{C}$  標識化マイコサミン供与体を  $\beta$  グリコシル化により縮合することで、新規二重標識体を合成できると考えた (スキーム 4-1)。具体的には、天然の AmB 1 に対して保護基を導入した後、酸化的脱糖によりマイコサミン部分を脱離させ、得られたケトンに対し重水素化ホウ素ナトリウムを作用させることで重水素化 AmB 脱糖体 15' を得る。 $^{13}\text{C}$  マイコサミン供与体 16' は、過去に非標識体で確立された手法により<sup>11</sup>、 $^{13}\text{C}$  標識化グルコース 17' を原料として合成する。これらを 2' 位の隣接基関与を用いた  $\beta$  グリコシル化により縮合し、化合物 14' を得る。この時 2' 位の立体配置が天然物と逆になっているため、酸化還元により 2' 位の立体反転を行い、脱保護を行うことで目的の二重標識体を合成できると考えた。

筆者は修士論文研究で本合成経路と同様に  $\beta$  グリコシル化を経由した合成経路によりマクロラクトン環 19 位を標識した AmB 誘導体の合成に成功している<sup>12</sup>。しかし、アルコールの保護基に TES 基を用いたために、2' 位の立体反転の際に Swern 酸化を適用できず、反応の収率が大きく低下するという問題点があった。このことから、今回は過去の標識体合成例に従い、Swern 酸化に耐久する *p*-methoxyphenyl 基と TBS 基を用いている。また、カルボン酸の保護基にメチ

ル基を用いたために、脱保護の際にメチル基が除去できないという問題点があった。そこで本合成経路では、過去の研究例に従い、SEM 基を用いている<sup>2,13</sup>。

今回の合成では、合成経路の確立の際には非標識の AmB 脱糖体とマイコサミン供与体を用いた。また、実際の標識体合成では、19 位を重水素化した AmB 脱糖体と 1 位を <sup>13</sup>C 標識したマイコサミン供与体を用いて合成を行っている。1 位を <sup>13</sup>C 標識したマイコサミン供与体はより安価な標識体である 1-<sup>13</sup>C-グルコースより合成することが可能である。



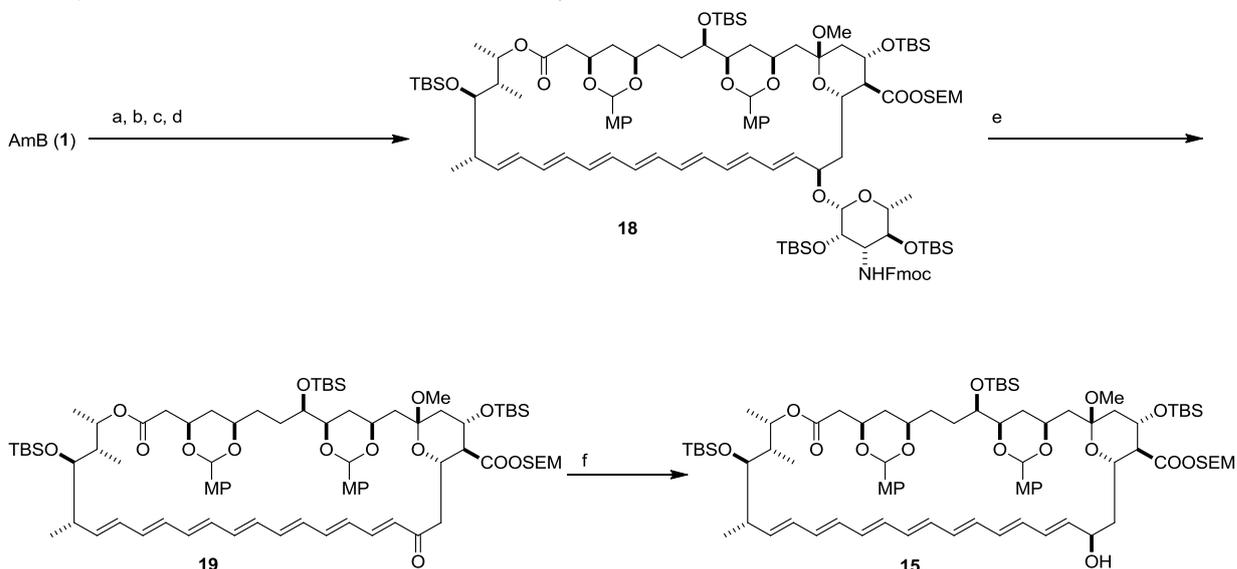
スキーム 4-1. 標識体の合成経路

#### 4-2 19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB の合成経路検討

新規標識体 19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB の合成経路確立に向けて、非標識体を用いた合成経路の検討を行った。

AmB 脱糖体の合成では天然の AmB に対し、4 段階で保護基を導入して化合物 **18** を得た後、酸化的なマイコサミン部分の脱離を試みた (スキーム 4-2)。しかし、アルコールの保護基として用いた *p*-メトキシフェニル基の副反応などにより、従来用いられている DDQ では、収率が低くなるという問題点があった。そこで、用いる酸化剤を検討した所 (表 4-1)、より温和なキノン系酸化剤である Chrolanil を用いたところ、反応は上手く進行し、64%でケトン **19** を得た。こ

れに対し水素化ホウ素ナトリウムによりヒドリド還元を行うことで、目的の AmB 脱糖体 **15** を得た。なお、標識体合成の際は、このヒドリド還元の際に重水素化ホウ素ナトリウムを用いている。

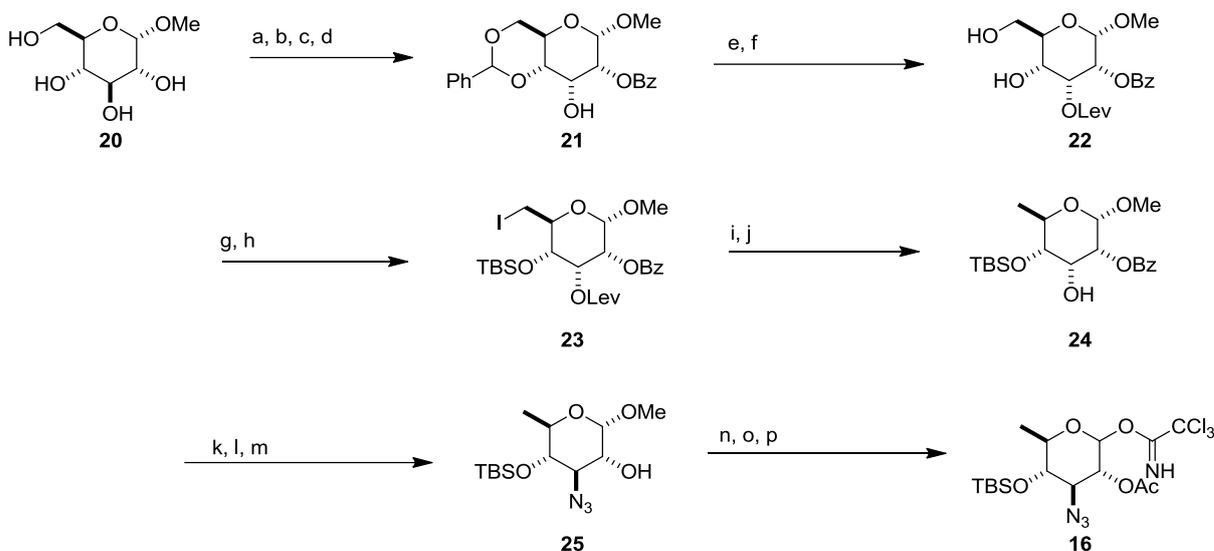


スキーム 4-2. AmB 脱糖体の合成経路 (a) FmocOSu, pyridine, DMF, 室温, 4 時間; (b) *p*-anisaldehyde dimethyl acetal, CSA, MeOH, THF, 室温, 30 分, 70% (2 段階); (c) SEMCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 0 °C, 1 時間, 62%; (d) TBSOTf, 2, 6-lutidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -40 °C, 1 時間, 61%; (e) Chloranil, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 21 時間, 64% (f) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, THF, 0 °C, 10 分, 74%

表 4-1 脱糖反応の条件検討

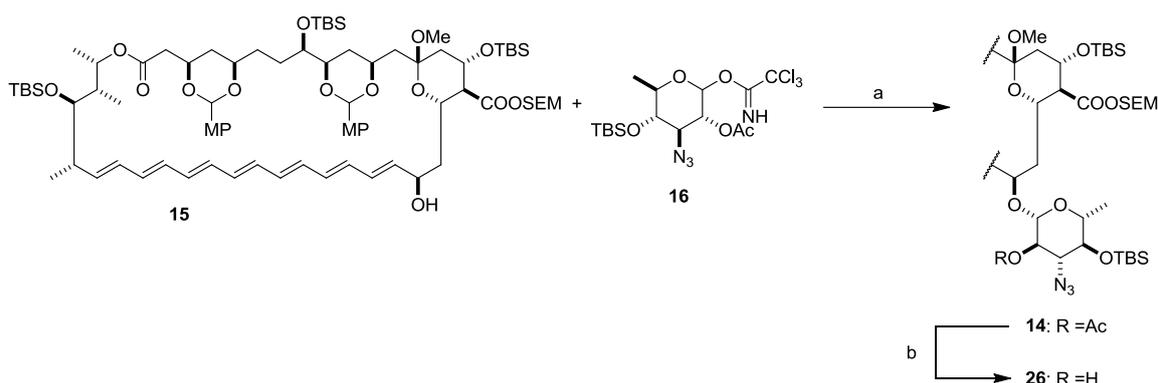
entry	oxidant	Eq	time	Yield (%)
1	DDQ	1.5	10 min	29
2	NBS	1.5	3 h	decomposed
3	TEMPO, PhI(OAc) <sub>2</sub>	1.5	3 h	no reaction
4	Chloranil	3	3 h	47
5	Chloranil	5	21 h	64

マイコサミン供与体 **16** の合成は過去に確立された手法により<sup>11</sup>、グルコース誘導体 **20** より 16 段階で合成した (スキーム 4-3)。なお、標識体合成の際は 1-<sup>13</sup>C グルコースを原料として用いている。



スキーム 4-3. マイコサミン供与体の合成 (a) benzaldehyde dimethyl acetal, CSA, CH<sub>3</sub>CN, 室温, 15 時間; (b) BzCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Me<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub>, THF, 室温, 76 時間, 71% (2 段階); (c) PDC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, 室温, 76 時間, 73%; (d) NaBH<sub>4</sub>, THF, MeOH, -15 °C, 3 分, 86%; (e) レブリン酸, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 24 時間, 78%; (f) H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOEt, 室温, 60 時間; (g) I<sub>2</sub>, Ph<sub>3</sub>P, 1H-imidazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 4 時間, 73% (2 段階); (h) TBSCl, 1H-imidazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 還流, 108 時間, 73%; (i) Bu<sub>3</sub>SnH, AIBN, toluene, 還流, 3 時間, 93%; (j) H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, pyridine, AcOH, 室温, 19 時間, 64%; (k) Tf<sub>2</sub>O, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 22 時間; (l) NaN<sub>3</sub>, 15-crown-5, DMF, 室温, 1 時間; (m) NaOMe, MeOH, 室温, 15 時間, 72% (3 段階); (n) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ac<sub>2</sub>O, 0 °C~室温, 30 分, 58%; (o) H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>·AcOH, DMF, 室温, 19 時間, 75%; (p) CCl<sub>3</sub>CN, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 1.5 時間, 98%.

合成した AmB 脱糖体 **15** とマイコサミン供与体 **16** を用いて β-グリコシル化を行った(スキーム 4-4)。この反応は過去の研究で、2-クロロ-6-メチルピリジン-トリフルオロメタンスルホン酸塩 (CMPT) を活性化剤として用い、pH を調整するために系中に 2-クロロ-6-メチルピリジン (CMP) を加えることで、収率が向上することが報告されている<sup>10</sup>。この報告に従い、同条件で反応を行った所、収率 16% で化合物 **14** が得られた。なお、さらなる収率の向上を目指し、ピリジン-*p*-トルエンスルホン酸塩 (PPTS) やピリジン-トリフルオロメタンスルホン酸塩 (PT) 等のピリジニウム塩を検討したが、最も収率が良いのは報告された条件であった(表 4-2)。得られた目的物に対し K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を作用させ、2'位のアセチル基を除去することでアルコール **26** を得た。

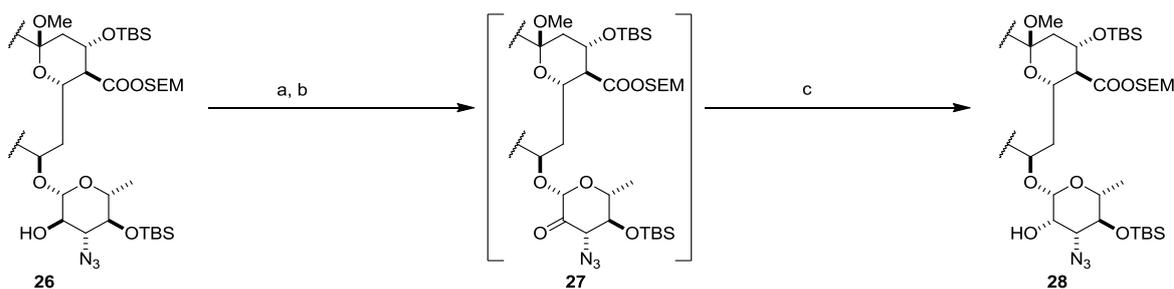


スキーム 4-4. β グリコシル化と 2'位の脱保護 (a) CMPT, CMP, Hexane, 室温, 1 時間, 16%; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, THF, 室温, 11 時間, 74%.

表 4-2 グリコシル化の条件検討

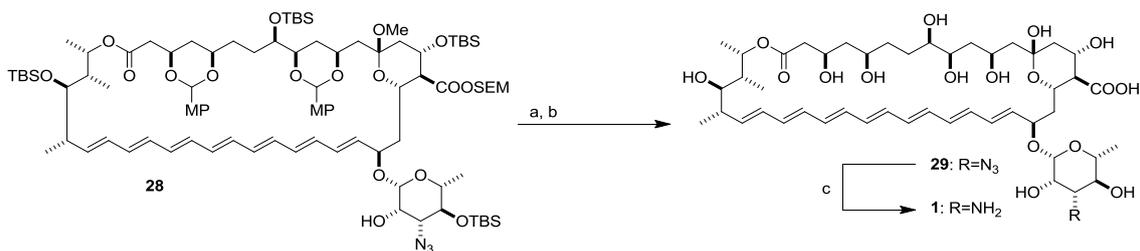
entry	acid (conc. μM)	base (conc. μM)	Yield (%)	recovered (%)
1	CMPT (19.6)	CMP (32)	16	51
2	CMPT (19.6)	-	trace	-
3	PPTS (19.6)	-	9	38
4	PT (19.6)	-	trace	56

アルコール **26** における 2'位の立体反転は、過去の全合成研究では Swern 酸化によってケトン **27** を生成し、分液等による粗精製を行った後に、ヒドリド還元によってアルコール **28** を得るという 2 段階反応として行われていた。しかし、この反応を試みたところ、Swern 酸化によって得られるケトン **27** が不安定であり、粗精製の段階で水和等の副反応が起こるといった問題が生じた。この副反応により、Swern 酸化とヒドリド還元の出率は 2 段階で約 30%であった他、収率に再現性がないという問題点があった。この問題を解消するために、Swern 酸化とヒドリド還元を one-pot 反応として行った(スキーム 4-5)<sup>16</sup>。この反応では Swern 酸化で得られた不安定なケトン **27** を -78 °C に保ったまま、次のヒドリド還元を用いるため、ケトン **27** に対する副反応を防ぐことができる。この反応条件で反応は進行し、収率 59%でアルコール **28** を得た。



スキーム 4-5. Swern 酸化とヒドリド還元による立体反転 (a) DMSO, TFAA,  $\text{Me}_2\text{NCONMe}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$ , 3 時間; (b) then,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ , 15 分; (c) then  $\text{NaBH}_4$   $i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O} = 4/1$  溶液,  $-78^\circ\text{C}$ , 10 分, 59%.

アルコール **28** の脱保護は、13.5% HF/pyridine を用いて TBS 基と SEM 基を除去した後、CSA による *p*-methoxyphenyl 基と 13 位 Me 基の除去を行い、化合物 **29** を得た(スキーム 4-6)。最後の 3' 位アジドの還元については Staudinger 反応を用いた還元を試みた。過去の報告で用いられている  $\text{Me}_3\text{P}$  を用いたところ、副生成物が多く得られたため、別の反応条件を試みた(表 4-3)。硫化水素を用いた反応を試みたが反応は進行せず、Staudinger 反応に用いるホスフィンの種類について検討した所、Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine 塩酸塩を用いることで副反応を抑えられることが明らかとなり、標識体合成ではこの反応を用いることとした。また、この反応の際、最終生成物が試薬由来の不純物と会合した状態で得られることから、HPLC 精製を行う前に酢酸を加え、AmB のイオン化状態を変えることにより不純物を AmB から遊離させ、ゲルろ過により不純物を除去するという精製手法を用いた。この反応条件により、標識体  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$  の合成経路を確立した。

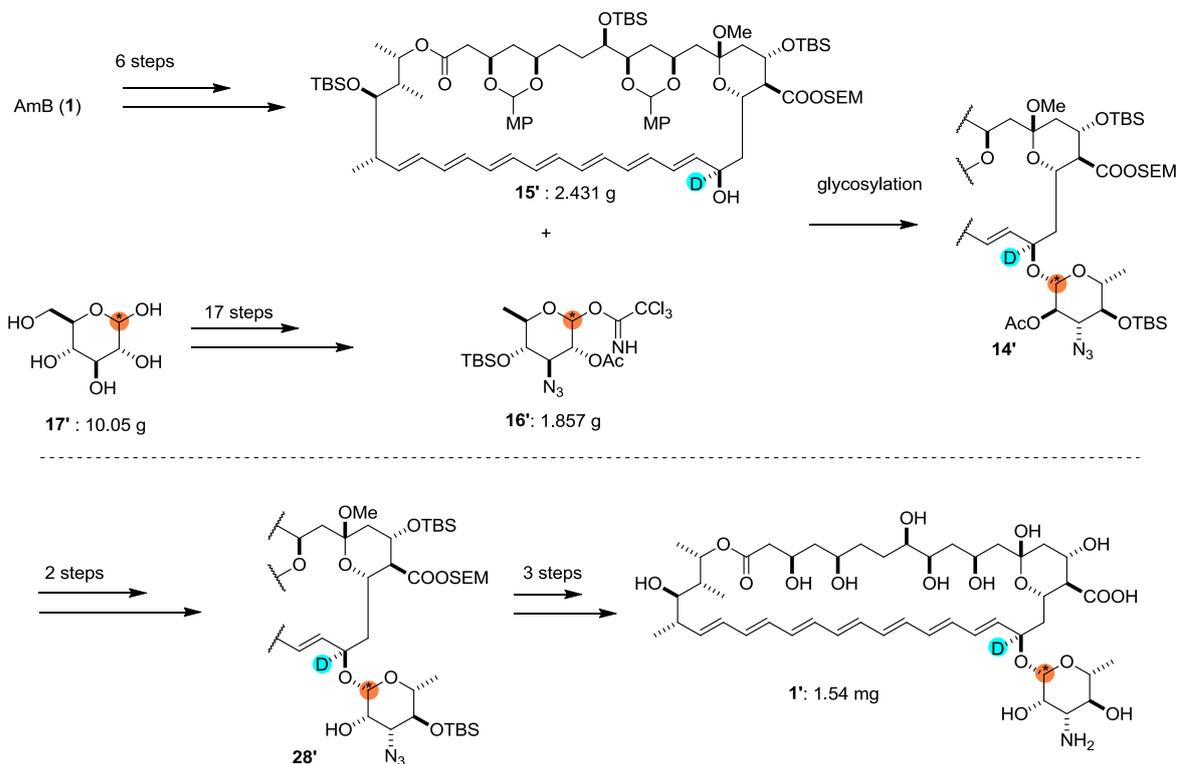


スキーム 4-6. 脱保護と Staudinger 還元 (a) 13.5%, HF/pyridine, MeOH,  $50^\circ\text{C}$ , 38 時間, (b) CSA, THF/ $\text{H}_2\text{O}$  = 2/1, 室温, 6 時間; (c)  $\text{P}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH})_3 \cdot \text{HCl}$ , THF/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  = 1/1/1, 室温, 12 時間, HPLC 精製, 4% (3 段階).

表 4-3 Staudinger 還元 の条件検討

entry	reagent	conc. ( $\mu$ M)	solvent	Yield (%)
1	Me <sub>3</sub> P	4	THF/MeOH/H <sub>2</sub> O =1/1/1	no reaction
2	Me <sub>3</sub> P	40	THF/MeOH/H <sub>2</sub> O =1/1/1	1
3	Bu <sub>3</sub> P	40	THF/MeOH/H <sub>2</sub> O =1/1/1	decomposed
4	Ph <sub>2</sub> MeP	40	THF/MeOH/H <sub>2</sub> O =1/1/1	no reaction
5	H <sub>2</sub> S	-	H <sub>2</sub> O/pyridine =2/1	no reaction
6	P(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> COOH)·HCl	40	THF/MeOH/H <sub>2</sub> O =1/1/1	4

確立した合成経路を用いて標識体 19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB の合成を行った(スキーム 4-7)。原料として 1'-<sup>13</sup>C-グルコース 10.05 g を用いて 1'-<sup>13</sup>C-マイコサミン供与体 1.857 g を得た。また AmB より合成した 19-*d*<sub>1</sub>-AmB 脱糖体 2.431 g と 1'-<sup>13</sup>C-マイコサミン供与体 1.857 g を  $\beta$ -グリコシル化により縮合し、2'位の脱保護、立体反転を行った後、全保護基の除去、アジドの還元を行うことで、目的の 19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB 1' を 1.54 mg 得た。なお、最終生成物である 19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB 1' の重水素化率は MS スペクトルのピーク比より 90% であると決定した。合成した標識体と市販の AmB の HSQC スペクトル等を比較することで、目的物の生成を確認した。



スキーム 4-7. 標識体の合成

### 4-3 $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$ REDOR

1章でも述べた通り、REDOR測定は異種核間の双極子相互作用の大きさを見積もる手法として広く用いられている。例えばペプチドにおける $^{13}\text{C}\{^{15}\text{N}\}$  REDORは二次構造の決定やペプチドグリカンの配座推定にも用いられている<sup>17-19</sup>。また、 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$  REDORは約13 Åという長い原子間距離を測定することが可能であるため、AmBチャンネル複合体における分子間距離測定に用いられてきた<sup>1-3</sup>。これらの手法は磁気量子数 $I=1/2$ の核種のみを用いているため、 $180^\circ$ パルスの照射効率が良く、REDOR減衰をシミュレーションする際は双極子相互作用の大きさのみを考慮すれば良い。

またREDORパルスでは半ローター周期ごとに $180^\circ$ パルスを照射する必要があるが、用途等に応じてこれを照射される核種が異なる。REDORのパルスシーケンスには観測核でない核に照射するもの(Y REDOR)や、観測核に照射するもの(X REDOR)、または両方の核に交互に照射するもの("XY" REDOR)が用いられる<sup>20, 21</sup>。半ローター周期ごとに照射される $180^\circ$ パルスは化学シフト異方性の小さい核種に照射されることが多い。また、2つの核に交互に照射するパルスシーケンスは、各チャンネルが照射するパルスの間隔を広くすることで、

rf 磁場の不完全性を補っている。しかし、前述した  $I=1/2$  の核種についてはどの手法を用いても測定結果にあまり影響を与えない。

一方、 $^2\text{H}$  等の磁気量子数  $I$  が 1 以上の核種では、パルスの照射効率が悪い場合が多く、パルスシーケンスに工夫が必要である。本研究で用いる  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR は、これまで様々な系に適用されており、前述した X REDOR<sup>22,23</sup>, Y REDOR<sup>24,25</sup>, XY REDOR<sup>21</sup> の適用がこれまでに試みられてきた。一方、 $^2\text{H}$  核は磁気量子数  $I$  が 1 であり、四極子相互作用によりシグナルの幅は 200 kHz 程度となっている。このような核種に対し効率良く  $180^\circ$  パルスを照射することは困難であるため、 $^2\text{H}$  核へのパルス照射回数が少ない X REDOR が近年は適用されている。また、 $^2\text{H}$  核へのパルス照射の効率を改善するために、より広い範囲のシグナルを励起できるコンポジットパルスを用いた測定が行われている。

X REDOR パルスシーケンスを用いた  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR の代表的な適用例として、Hong らによる Influenza M2 タンパク質-Amantadine 複合体の構造決定が挙げられる<sup>23</sup>。この文献では  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR によってペプチド-Amantadine 間の距離測定を行い、複合体構造の決定に用いている。今回の測定はこの文献の条件を基にして行った (図 4-2a)。

Hong らによって用いられている REDOR のパルスシーケンスにおいて、詳細なパルス条件や、REDOR 減衰のシミュレーション手法等を検討するため、予め標識核間距離が知られている、3- $^{13}\text{C}$ -2- $d_1$ -アラニン粉末を用いて REDOR 測定を行った。分子間双極子相互作用の影響を小さくするため、非標識アラニンによって 10 倍希釈した 3- $^{13}\text{C}$ -2- $d_1$ -アラニン粉末を用いて予備測定を行った。この測定においてアラニン 3 位の  $^{13}\text{C}$  NMR ピークの減衰が確認されたため、本研究ではこのパルスシーケンスを適用した (図 4-3a)。

Hong らは REDOR 減衰のシミュレーションを、 $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  間の双極子カップリング  $b_{^{13}\text{C}^2\text{H}}$  (式 3-1) の大きさのみを考慮した条件で行っていた。今回の 3- $^{13}\text{C}$ -2- $d_1$ -アラニンについても、双極子カップリング定数を算出し、展開時間に対する位相のずれを計算することで REDOR 減衰のシミュレーションを行った (図 4-3b)。この方法では、過去に得られているアラニンの結晶構造<sup>26</sup>において、2 位の水素と 3 位の炭素の間の距離が 2.17 Å であることから、式 (4-1) を用いて双極子カップリング定数  $b_{^{13}\text{C}^2\text{H}}$  を計算した。

$$b_{^{13}\text{C}^2\text{H}} = -\frac{\gamma_{^{13}\text{C}}\gamma_{^2\text{H}}\mu_0\hbar}{4\pi r_{^{13}\text{C}^2\text{H}}^3} \quad (\text{式 4-1})$$

ここで、 $\gamma_{^{13}\text{C}}$ ,  $\gamma_{^2\text{H}}$  はそれぞれ  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  の核磁気回転比、 $\mu_0$  は真空の透磁率、 $r_{^{13}\text{C}^2\text{H}}$  は  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  間の距離である。

しかし、このシミュレーション手法で得られる REDOR 減衰は 3- $^{13}\text{C}$ -2- $d_1$ -アラニン粉末による測定結果に合致しなかった。68% scaling factor を乗じた REDOR 曲線で展開時間が 1.429 ms 以内の範囲ではシミュレーションが実測値と合致したものの、展開時間が 1.429 ms より大きくなるとシミュレーションは実測値と合致せず、シミュレーション手法を改善する必要があった。

前述したとおり、 $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR では  $^2\text{H}$  核のピークが四極子相互作用によって広幅化しており、コンポジットパルスを用いても、 $^2\text{H}$  核の磁化を完全に反転させることは困難である。よって、四極子相互作用の大きさを考慮し、磁化が反転する  $^2\text{H}$  核がどのくらいの割合で存在するのかを推定する必要がある。また、この四極子相互作用の大きさは四極子相互作用テンソルと外部磁場との間の角度によって決定する。従って、分子の磁場に対する配向に依存して  $^2\text{H}$  核のシグナルの広がりが大きくなるため、 $^2\text{H}$  核の磁化の反転効率も分子の磁場に対する配向に依存する。さらに双極子相互作用の大きさも、双極子相互作用の向きと外部磁場との間の角度に依存する。すなわち、双極子相互作用の大きさと  $^2\text{H}$  核の磁化の反転効率の大きさは分子の配向に依存し、各配向におけるそれぞれの組み合わせは、双極子相互作用の向きが四極子相互作用テンソルに対してどのような配向を取っているのかに依存する。よって、今回の測定では、 $^{12}\text{C}$ - $^2\text{H}$  の共有結合の向きと  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  ベクトル間の角度、 $^2\text{H}$  核の四極子カップリング定数、パルスシーケンス (図 4-2b) を考慮したシミュレーションを、NMR のシミュレーションソフトウェアである SIMPSON<sup>27</sup> を用いて行った。結晶構造より得られる結合長や結合角に従って、3次元座標上にアラニンを配置した。アラニン 2位の炭素の座標を (0,0,0) とすると、C2-D2 間の結合距離が 1.091 Å であることから、アラニン 2位の重水素の座標を x 軸上に配置すると、その座標は (1.091, 0, 0) とおける。また、C2-C3 間の結合距離が 1.534 Å, D2-C2-C3 間の結合角が 108.4° であることを利用して、アラニン 3位の炭素を xz 平面に配置すると、その座標は (1.534cos(108.4°), 0, 1.534sin(108.4°))、すなわち (-0.535, 0, 1.438) となる。これらの座標から四極子相互作用ベクトル (C2-D2 ベクトル) や双極子相互作用ベクトル (C3-D2) ベクトルの x 軸, y 軸, z 軸間の角度算出し、SIMPSON のインプットファイルに入力した。用いた 3- $^{13}\text{C}$ -2- $d_1$ -アラニンの重水素化率が 96% であること、また希釈に用いた非標識化アラニンには天然存在比 (1.1%) 分の  $^{13}\text{C}$  が含まれていることを考慮して REDOR 減衰をシミュレーションした結果、得られたフィッティングカーブに 92% scaling factor を乗じたものが合致したため、このシミュレーション手法を用いることとした (図 4-3c)。なおこの scaling factor は MAS の回転速度と実際のパルス周期のずれや、パルス強度の不完全性を考慮した測定上の不完全性を表すものであり、装置固有の値であるとする。

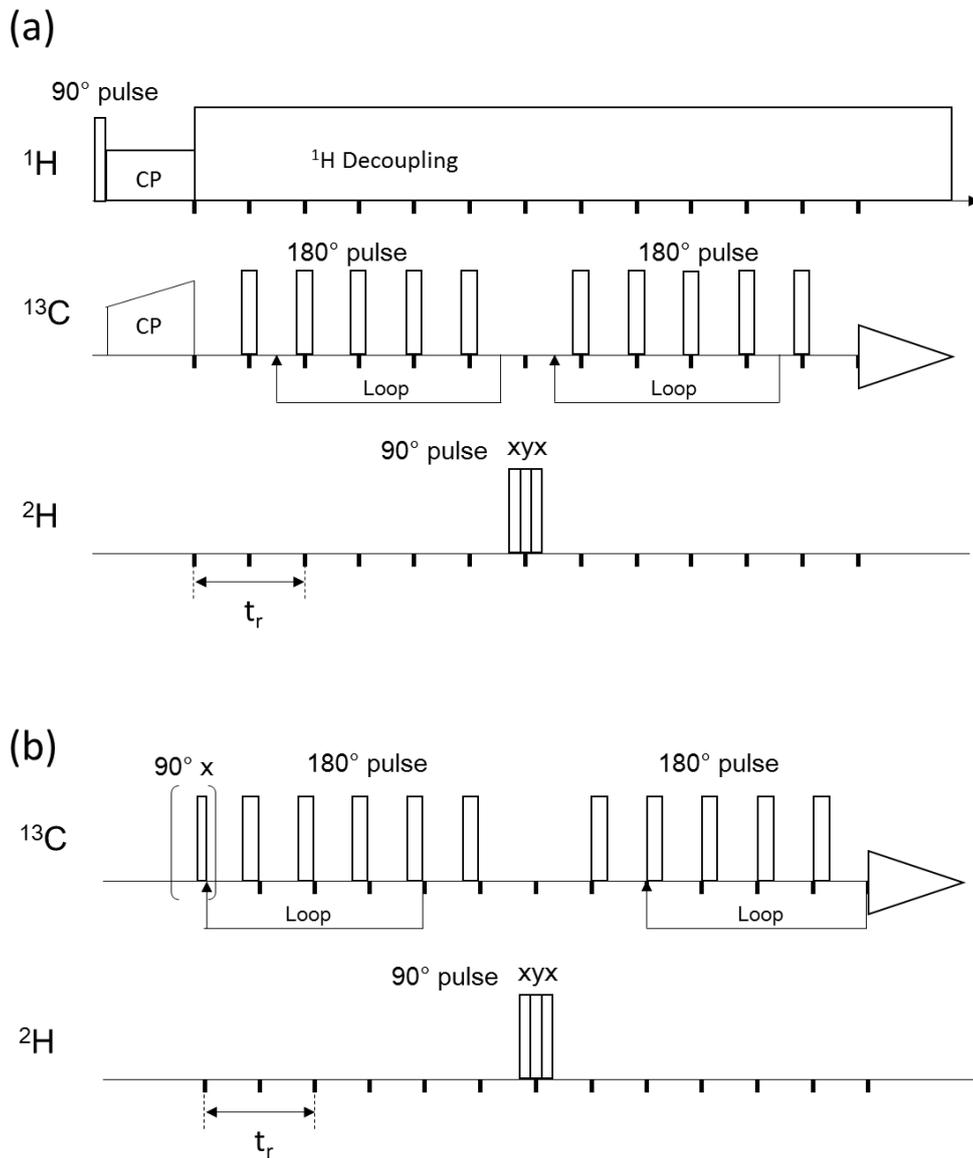


図 4-2. (a) 今回の REDOR 測定で用いたパルスシーケンス。観測核に MAS 周期と同期した  $180^\circ$  パルス照射する X-REDOR 型のパルスシーケンスを用いた。(b) シミュレーションソフトウェア SIMPSON に入力したパルスシーケンス。計算を簡略化するため、ループ位置を MAS の周期に合わせたものを用いた。

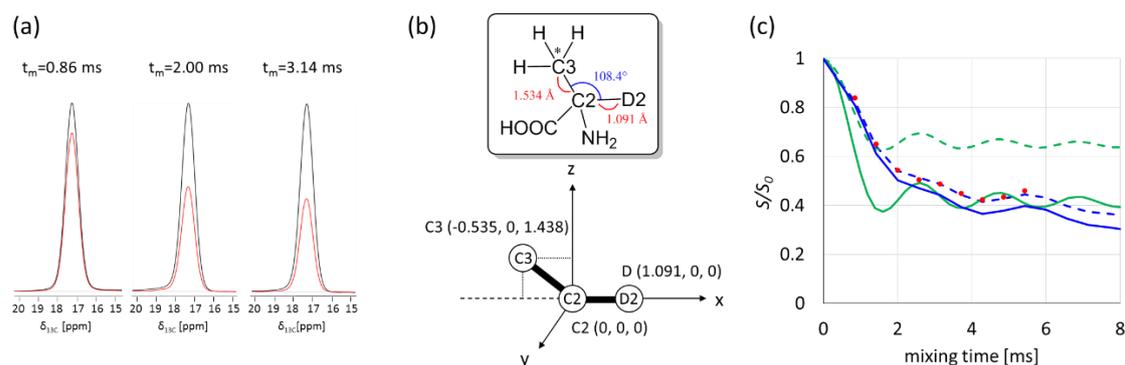


図 4-3. (a)  $3\text{-}^{13}\text{C}\text{-}2\text{-}d_1$ -アラニン粉末のパウダーを用いた REDOR 測定における REDOR 減衰。 $180^\circ$ パルス非照射時(黒色)と  $180^\circ$ パルス照射時(赤色)をあわせて示した。 $t_m$ は展開時間を表す。これは 7 kHz MAS 条件下で測定を行った。(b) アラニンの結晶構造<sup>26</sup>をより得られる結合角と結合距離より、アラニンの C-2, C-3, 2-D を座標上に配置した。C2-2D ベクトルを四極子相互作用ベクトルとし、C3-2D ベクトルを双極子相互作用ベクトルとした。(c)  $2\text{-}d_1\text{-}3\text{-}^{13}\text{C}\text{-alanine}$  の  $180^\circ$ パルス非照射時( $S_0$ )と  $180^\circ$ 照射時 ( $S$ )のピーク積分値の比 ( $S/S_0$ ) を展開時間ごとにプロットした (赤色)。またシミュレーションによって得られた減衰曲線については、核間距離のみを考慮したもの (緑色実線)とそれに 68% scaling factor を掛けたもの (緑色点線)、SIMPSON により核間距離、双極子相互作用の大きさ、双極子相互作用ベクトル、四極子相互作用ベクトルを考慮してシミュレーションを行ったもの (青色実線) とそれに 92% scaling factor を掛けたもの (青色点線) を示している。

実際の  $\beta$  グリコシド結合の配座については、 $N$ -ヨードアセチル AmB の結晶構造<sup>28</sup>を元にそれぞれの結合距離や結合角を定め、二面角  $\text{D19-C19-O-C1}'$  (二面角  $\Phi$ )を変化させたときの双極子相互作用の大きさや四極子相互作用ベクトル、双極子相互作用ベクトルの向きを定めた。実際の計算では C19 を三次元座標の原点 (0, 0, 0) に置き、C19-O19 間の結合距離が 1.418 Å であることから、O19 を z 軸上の点 (0, 0, 1.418) に置いた。C19-D19 間の結合距離が 1.093 Å、O-C19-D19 の結合角が  $108.5^\circ$  であることから、D19 原子を  $(1.093 \times \cos(108.5^\circ - 90^\circ), 0, -1.093 \times \sin(108.5^\circ - 90^\circ))$ 、すなわち (1.037, 0, -0.3468) に固定した。O-C1'間の結合距離を 1.381 Å、C19-O-C1'間の結合角を  $116^\circ$  ことを利用すると  $\Phi=0^\circ$ における C1'の座標は、 $(1.381 \times \cos(116^\circ - 90^\circ), 0, 1.418 + 1.381 \times \sin(116^\circ - 90^\circ))$ 、すなわち (1.241, 0, 2.023) となる。また、 $\Phi$ を変化させたとき、C1'の座標は  $(1.241 \times \cos\Phi, 1.241 \times \sin\Phi, 2.023)$  となる。このように各原子の座標を置き、C19-D ベクトルを四極子相互作用ベクトルの向き、C1'-D ベクトルを双極子相互作用ベクトルの向きとし、それぞれについて x,y,z 軸との間の角度を  $\alpha, \beta, \gamma$  を

置き、REDOR 減衰のシミュレーションに用いた(図 4-4a)。

二面角  $\Phi$  の値を変化させたときの双極子相互作用ベクトル、四極子相互作用ベクトル、双極子カップリング定数 (詳細は実験項、表 4-7 に記載)を用いて、それぞれの二面角  $\Phi$  の値について REDOR 減衰のシミュレーションを行った(図 4-4b)。

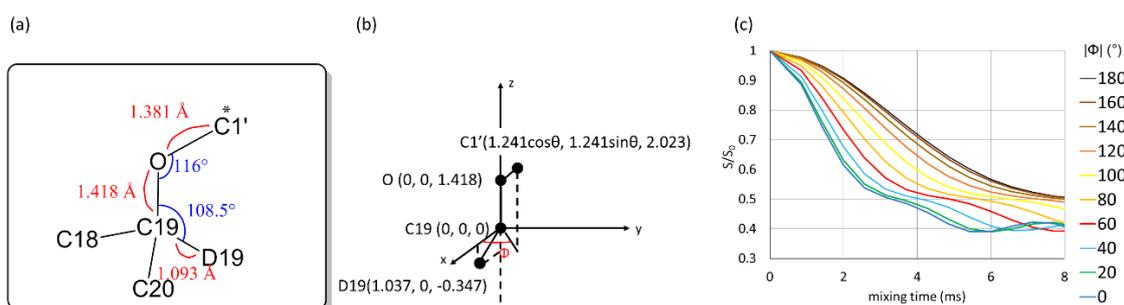


図 4-4. (a) REDOR 減衰をシミュレーションする際に用いた、1'位の  $^{13}\text{C}$  と 19 位の重水素の位置関係。19 位の炭素を原点、19 位の重水素を  $xz$  平面、19 位の酸素を  $z$  軸に固定し、異なる二面角における  $\text{C1}'$  の座標を計算し、 $\text{D19-C1}'$  間の距離、双極子相互作用ベクトル( $\text{D19-C1}'$  ベクトル)、四極子相互作用ベクトル( $\text{C19-D19}$  ベクトル) を算出した。(b)算出した値をもとに、SIMPSON によってシミュレーションされた REDOR の減衰曲線。

#### 4-4 19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB のリポソーム中における $^{13}\text{C}$ NMR 測定

調製した 19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB を混合したリポソームを調製し、固体 NMR 測定を行った。調製した標識体の量が少ないため、はじめにエルゴステロール濃度の薄いリポソームサンプルで固体 NMR 測定を行い、一連の測定を行った後にサンプルを回収し、エルゴステロールを加えてリポソームを再調製することで、エルゴステロール濃度を変化させた。最終的に 19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB/Erg/POPC の比率が、1/0/7, 1/1/7, 1/3/7 となる 3 つの条件で測定を行った。

これら 3 つの条件について、まず  $^{13}\text{C}$  固体 NMR 測定の比較を行った(図 4-5)。これら 3 つの条件全てにおいて、98 ppm 付近にピークが得られていた。他に得られたピークは、AmB を導入していない条件においても観測されるピークである他、19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB の溶液  $^{13}\text{C}$  NMR において、 $^{13}\text{C}$  標識を導入した 1' 位由来のピークは 96.46 ppm に得られていたことから、これが今回調製した標識体由来のピークであると考えられる。この標識体由来のピークに着目すると、19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB/Erg/POPC の比率が 1/0/7 のサンプルでは広幅なピークしか

得られないのに対し、1/1/7 のサンプルでは広幅な成分と先鋭な成分が重なったピークが得られており、さらに 1/3/7 のサンプルでは先鋭なピークのみが得られている。このようにエルゴステロールの濃度によって  $^{13}\text{C}$  NMR に見られる二成分の比率が変化した。この原因については先鋭な成分と広幅な成分がエルゴステロールとの会合の有無に対応している可能性がある。または、エルゴステロールの存在によって AmB が脂質膜中に挿入されやすくなり、脂質膜中に挿入された AmB と不活性な会合体を形成しているという可能性も考えられる。

この先鋭な成分と広幅な成分がそれぞれ何に対応するかについては明確ではないが、マイコサミン部分 1'位の  $^{13}\text{C}$  のピークの形状がエルゴステロールによって先鋭になることから、エルゴステロールが何らかの形でマイコサミン部分周辺の環境に影響を均一にする効果を持つと考えられる。

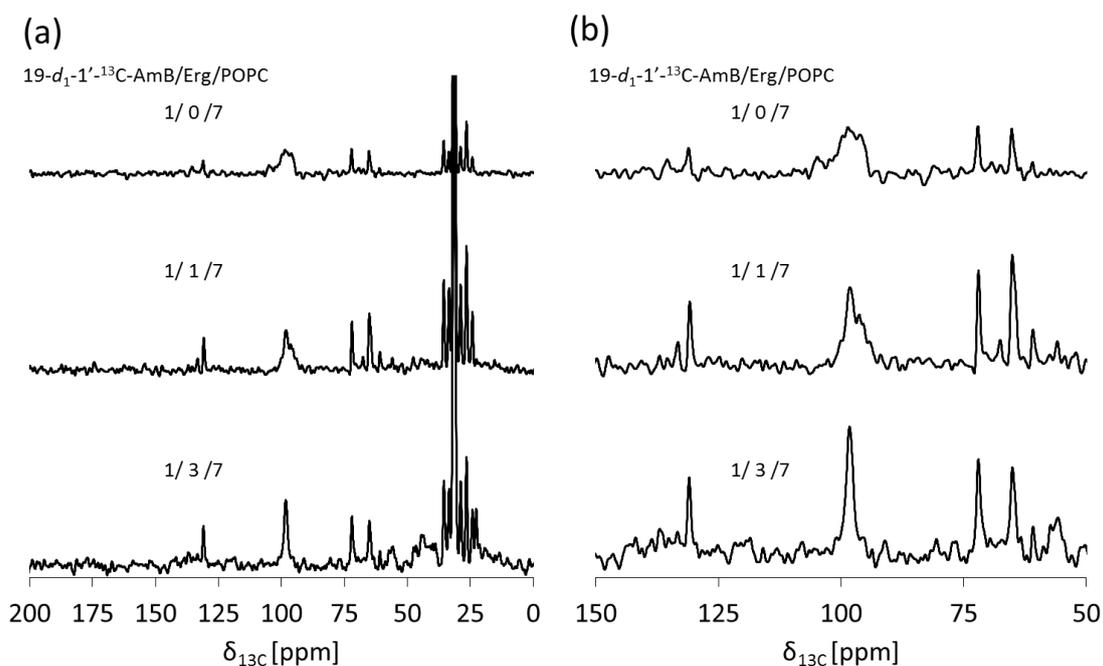


図 4-5.  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/Erg/POPC} = 1/0/7$  (上),  $1/1/7$  (中),  $1/3/7$  (下) の各条件における  $^{13}\text{C}$  固体 NMR 測定のスเปクトル。REDOR 測定において  $t_m = 2.000$  ms となる条件の  $S_0$  スペクトルを示した。7 kHz MAS, 30 °C で測定。積算回数は全て 16384 回。(a)が全体像で (b)が  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$  由来のピークがある 100 ppm 付近の拡大図。

#### 4-4 距離測定と二面角の推定

19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB を混合したリポソームで  $^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$ -REDOR 測定を行った。19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB/Erg/POPC =1/0/7 の比率で形成されたリポソームについては、100 ppm 付近の幅広なピークが減衰した (図 4-6a)。この広幅なピークの減衰率は化学シフトによって異なることから、このピークの中に、異なる配座がいくつか含まれていることが予想される。各展開時間における減衰率をフィッティングカーブと比較し、D19-C19-O-C1'の二面角  $\Phi$  を推定した(図 4-6b)。複数の化学シフトにおける減衰率を分けて解析することが困難であることから、ピーク全体の積分値より減衰率を計算した。この結果では、二面角  $\Phi$  の絶対値は 40 に近いことがわかる。しかし、シグナルのブロードニングにより S/N 比が小さく、誤差範囲も大きいことから、正確な二面角を見積もることは困難であった。

表 4-4. 19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB/ Erg/ POPC =1/0/7 における REDOR 測定の減衰率 ( $S/S_0$ )

mixing time	$S/S_0$
0.857	0.91
1.429	0.86
2.000	0.73
2.571	0.61
3.714	0.51
4.857	0.45

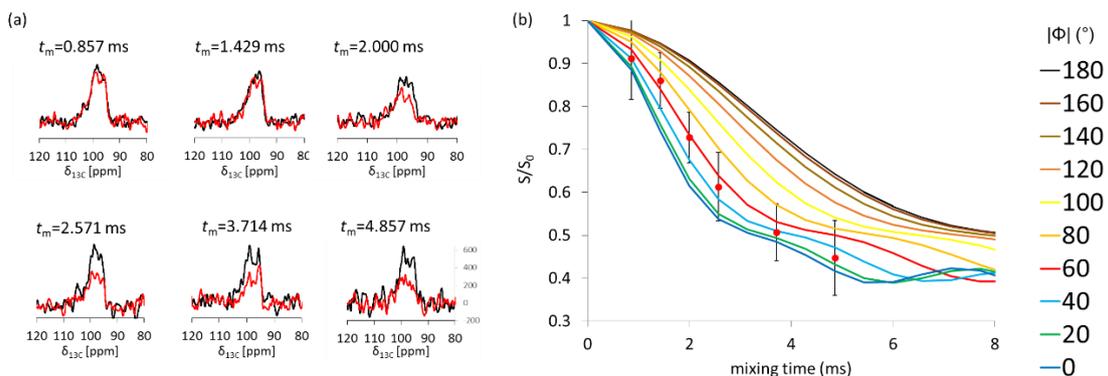


図 4-6. (a)  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/0/7$  の比率で調製したリポソームサンプルの REDOR 測定により得られる  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (展開時間: 2.000 ms)。 $180^\circ$ パルス非照射時 ( $S_0$ , 黒線)と  $180^\circ$ パルス照射時 ( $S$ , 赤線)を重ねて示した。100 ppm 付近にあるピークが 1'位の  $^{13}\text{C}$  に対応し、 $180^\circ$ パルスの照射によって減衰していることがわかる。(b) REDOR による減衰率  $S/S_0$  をプロットしたものとフィッティングカーブの比較。実験値を赤い円で示した。誤差範囲が大きいけど二面角  $\Phi$  は  $0\sim 80^\circ$  の範囲に含まれると考えられる。

続いて  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/1/7$  の比率となるリポソームの  $^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR 測定でも、ピークの減衰が観測された (図 4-7a)。 $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/1/7$  の REDOR 減衰をフィッティングカーブと比較すると、二面角  $\Phi$  の絶対値は  $0^\circ\sim 80^\circ$  の範囲を取り得ることがわかる (図 4-7b)。この条件も広幅な成分が含まれていることから S/N 比が悪く、正確な二面角の算出には至らなかった。

表 4-5.  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/1/7$  における REDOR 測定の減衰率 ( $S/S_0$ )

mixing time	$S/S_0$
0.857	0.98
1.429	0.87
2.000	0.73
2.571	0.67
3.143	0.56
3.714	0.52

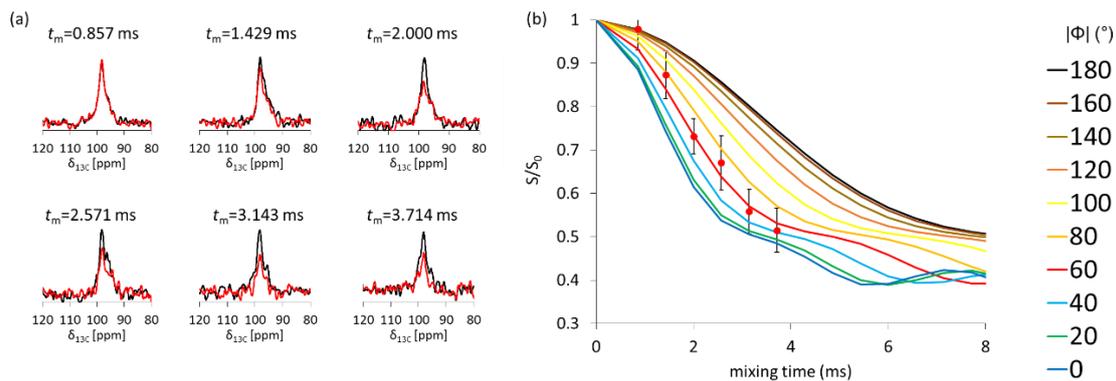


図 4-7. (a)  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/1/7$  の比率で調製したリポソームサンプルの REDOR 測定により得られる  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル。  $180^\circ$ パルス非照射時 ( $S_0$ , 黒線)と  $180^\circ$ パルス照射時 ( $S$ , 赤線)を重ねて示した。  $100\text{ ppm}$  付近にあるピークが  $1'$ 位の  $^{13}\text{C}$  に対応し、  $180^\circ$ パルスの照射によって減衰していることがわかる。(b) REDOR による減衰率  $S/S_0$  をプロットしたもの。二面角  $\Phi$  は  $0^\circ \sim 80^\circ$  であると考えられる。

先鋭なピークのみを選択的に観測できる  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/3/7$  の条件で、  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR 測定を行った結果では、エルゴステロール濃度が薄いサンプルよりも  $S/N$  比が大きく、精度良く配座を算出することができた。一点目以外の誤差範囲内にあるフィッティングカーブより、得られた二面角  $\Phi$  の絶対値は  $53^\circ \pm 12^\circ$  の範囲にあると考えられる。

表 4-6.  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/3/7$  における REDOR 測定の減衰率 ( $S/S_0$ )

mixing time	$S/S_0$
0.857	0.92
1.429	0.82
2.000	0.71
2.571	0.63
3.143	0.57
3.714	0.52

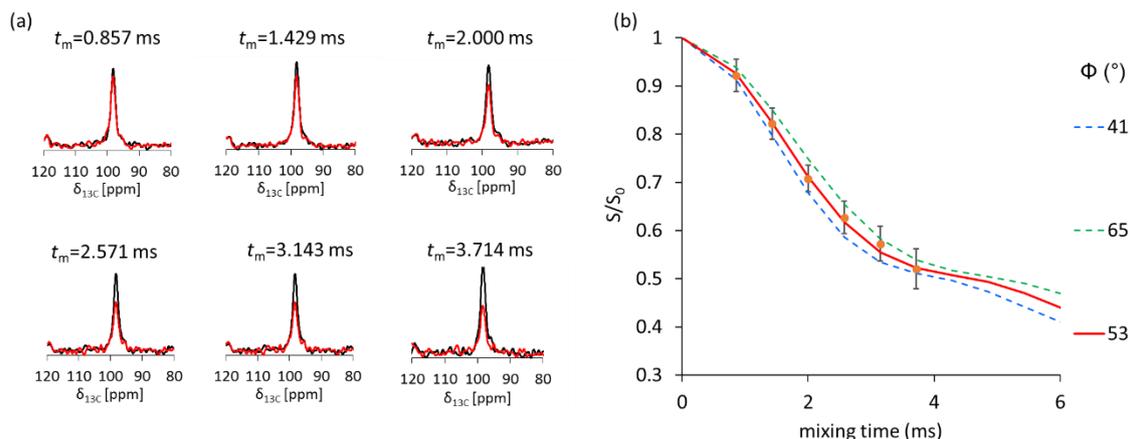


図 4-8. (a)  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC} = 1/3/7$  の比率で調製したリポソームサンプルの REDOR 測定により得られる  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル。180°パルス非照射時 ( $S_0$ , 黒線)と 180°パルス照射時 ( $S$ , 赤線)を重ねて示した。100 ppm 付近にあるピークが 1'位の  $^{13}\text{C}$  に対応し、180°パルスの照射によって減衰していることがわかる。(b) REDOR による減衰率  $S/S_0$  をプロットしたもの (オレンジ丸)とフィッティングカーブ。二面角  $\Phi$  の絶対値は  $53 \pm 12^\circ$  であると考えられる。

#### 4-5 REDOR 測定より推定される配座

今回の研究では  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC}$  の比率が  $1/0/7$ ,  $1/1/7$ ,  $1/3/7$  の3つの条件において固体 NMR 測定を行った。このうち、 $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB/ Erg/ POPC}$  の比率が  $1/3/7$  の条件において先鋭なピークが得られ、二面角  $\Phi$  の絶対値が  $53^\circ \pm 12^\circ$  であることを明らかにした。一方、本研究手法の問題点として、二面角  $\Phi$  の正負を判定できないということが挙げられる。本研究では REDOR 測定のみではこれらのどちらが正しいのかを判別できない。よって今回の測定結果によって得られる二面角  $\Phi$  は  $+53^\circ \pm 12^\circ$  と  $-53^\circ \pm 12^\circ$  となる。

これらの配座について二面角  $\text{C}19\text{-O-C}1'\text{-C}2'$  (二面角  $\Psi$ ) を考慮して、分子全体の配座を考察した。マクロラクトン環は第二章で示した通り結晶構造と同じ配座を取ると仮定する。また、二面角  $\Psi$  はエキソアノマー効果を考慮すると、180°が最安定な配座であると考えられる。そこで、 $\text{D}19\text{-C}19\text{-O-C}1'$  の二面角が  $+53^\circ$  または  $-53^\circ$ 、二面角  $\Psi$  が 180°となる2つの配座のどちらかが実際の  $\beta$  グリコシド結合の配座であると予想される。

第三章の配向解析と過去の分子間距離測定より求めたチャンネル構造において、それぞれの配座が存在し得るかどうかを考えると、 $\Phi = 53^\circ$  の場合はマイコサミンが他の原子と接しておらず、立体障害が小さいために、このような配座は存在できるといえる。一方、 $\Phi = -53^\circ$  の場合は、マイコサミン部分が隣接する AmB と

重なっており、このような配座を取ることはできないと予想される。このことから、 $\beta$  グリコシド結合は $(\Phi, \Psi)=(53^\circ, 180^\circ)$ という配座を取ることが予想される。

過去の MD 計算による  $\beta$  グリコシド結合の配座についての研究では<sup>8</sup>、グリコシド結合はエルゴステロール含有膜中では'closed'と呼ばれる配座を取るのに対し、コレステロール含有膜中では'open'と呼ばれる配座を取ることを示している。これらの配座を今回の結合二面角の定義で表すと、closed 配座は $(\Phi, \Psi)=(\text{約 } 50^\circ, \text{約 } 180^\circ)$ 、open 配座は $(\Phi, \Psi)=(\text{約 } -50^\circ, \text{約 } 180^\circ)$ となっており、それぞれが今回の REDOR 測定より推定される 2 つの立体配座に対応している。これらの MD 計算の結果と組み合わせると、本測定と同じ、エルゴステロール含有膜中の配座を反映した closed 配座を実際の系では取っていることが予想される。また、この配座は AmB の分子内架橋体のうち、エルゴステロール含有膜中で強い活性を示す架橋体の配座  $(\Phi, \Psi)=(30.6^\circ, 153.8^\circ)$ に近い<sup>7</sup>。このことから、 $\beta$  グリコシド結合はエルゴステロール存在下 $(\Phi, \Psi)=(53^\circ, 180^\circ)$ となる立体配座を取っていると推定することが可能である。

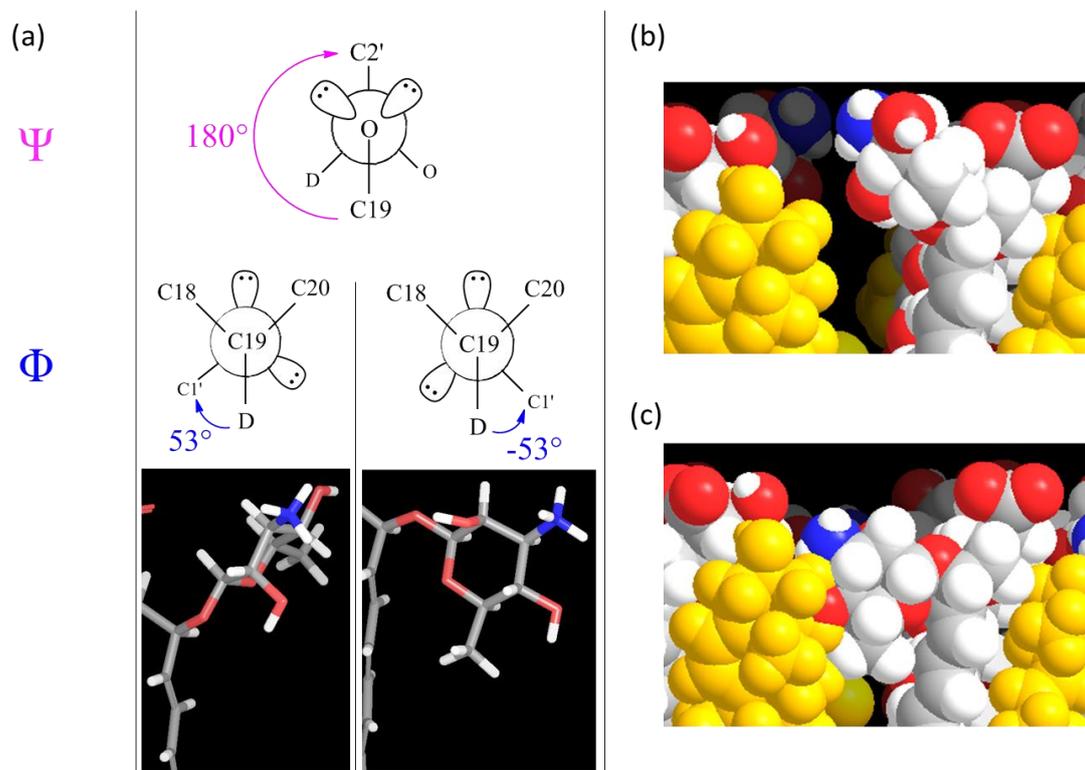


図 4-9. (a)  $19-d_1-1'-^{13}C$ -AmB/ Erg/ POPC = 1/1/7 の条件で推定された  $\Phi=53^\circ$  または  $-53^\circ$  における  $\beta$  グリコシド結合のコンフォメーション。エキソアノマー効果で二面角  $\Psi$  は  $180^\circ$  に固定される。(b)  $\Phi=53^\circ$  におけるチャンネルモデル複合体中でのマイコサミン。他の原子に接しておらず、立体障害は小さいと考えられる。(c)  $\Phi=53^\circ$  におけるチャンネル複合体モデル中でのマイコサミン。隣接する AmB と重なっており、このような配座は取ることができないと予想される。

また、今回の測定では、エルゴステロール濃度依存的に  $^{13}C$  NMR のピーク形状が変化した。 $19-d_1-1'-^{13}C$ -AmB/ Erg/ POPC の比率が 1/0/7 の条件においては広幅なピークのみが観測されたが、REDOR 測定ではその広幅のピークの中でも化学シフトの値によって減衰率が異なった。よって、このピークの広幅化は、二面角  $\Phi$  が一つの値を取らないためであり、様々な二面角  $\Phi$  を持つ標識体が存在することに由来すると考えられる。一方、エルゴステロールの濃度を上げていくと先鋭な成分が現れ、 $19-d_1-1'-^{13}C$ -AmB/ Erg/ POPC の比率が 1/3/7 の条件において、先鋭な成分のみを選択的に観測できるようになった。また、これらの結果より、エルゴステロールが脂質膜中に存在することで  $\beta$  グリコシド結合の配座が一様になっていると予想される。

マイコサミン部分・エルゴステロール間の相互作用によって  $\beta$  グリコシド結合の配座が変化するという仮説は、MD 計算や構造活性相関等の研究により以前

から提唱されていた。しかし、今回の配座やマイコサミンの周辺環境が一様になる現象は、エルゴステロールが **AmB** の膜への挿入を促進するという効果もあるため、エルゴステロールとの会合によるものであるかどうかは断定できない。しかし、エルゴステロールの存在により、**AmB** がチャンネルを形成しやすくなることで配座や周辺環境が一様になっているとすれば、チャンネル中のマイコサミン部分の自由度は不活性会合体に比べて小さく、何らかの相互作用がマイコサミン周辺に働いていると予想される。図 4-9b で示したように、チャンネルモデル中におけるマイコサミン部分周辺は立体的に混み合っていることから、チャンネルが形成されることによって  $\beta$  グリコシド結合の配座の自由度が低下するという説明も可能である。

一方で中川らは、過去の固体 NMR および構造活性相関による研究で、マイコサミンの存在しない面である **AmB** の  $\alpha$  面とエルゴステロールが VDW 相互作用するというモデルを提唱している<sup>1a,2a</sup>。実際に分子間距離情報より推定されたチャンネル構造においても、マイコサミン部分とステロールは近接しておらず、マイコサミン部分とステロールが何らかの相互作用をしているとは考えにくい。また、中川は、チャンネルを形成するエルゴステロールと **POPC** との間の双極子相互作用を  $^{13}\text{C} \{^{31}\text{P}\}$  REDOR によって観測している。REDOR 減衰によって双極子相互作用が観測されるためには、ミリ秒スケールで相互作用が継続していることが必要であり、チャンネル形成時に **POPC** がチャンネルに構造化されていることを示唆している<sup>1b</sup>。エルゴステロール含有膜においては、**AmB** 二分子の間にエルゴステロールが挟まれるため、**AmB** 同士の距離が長くなることが知られているが、それによって、**AmB** とエルゴステロールによって形成される複合体内の隙間が大きくなるとすれば、アシル鎖がその間に入り、リン脂質が構造化されることが考えられる。この時、リン脂質ヘッドグループとマイコサミン部分が相互作用し、構造化すると考えれば、ステロールの存在によって構造化されたリン脂質のヘッドグループとマイコサミン部分との相互作用により、 $\beta$  グリコシド結合の配座が固定されるという可能性も考えられる (図 4-10)。

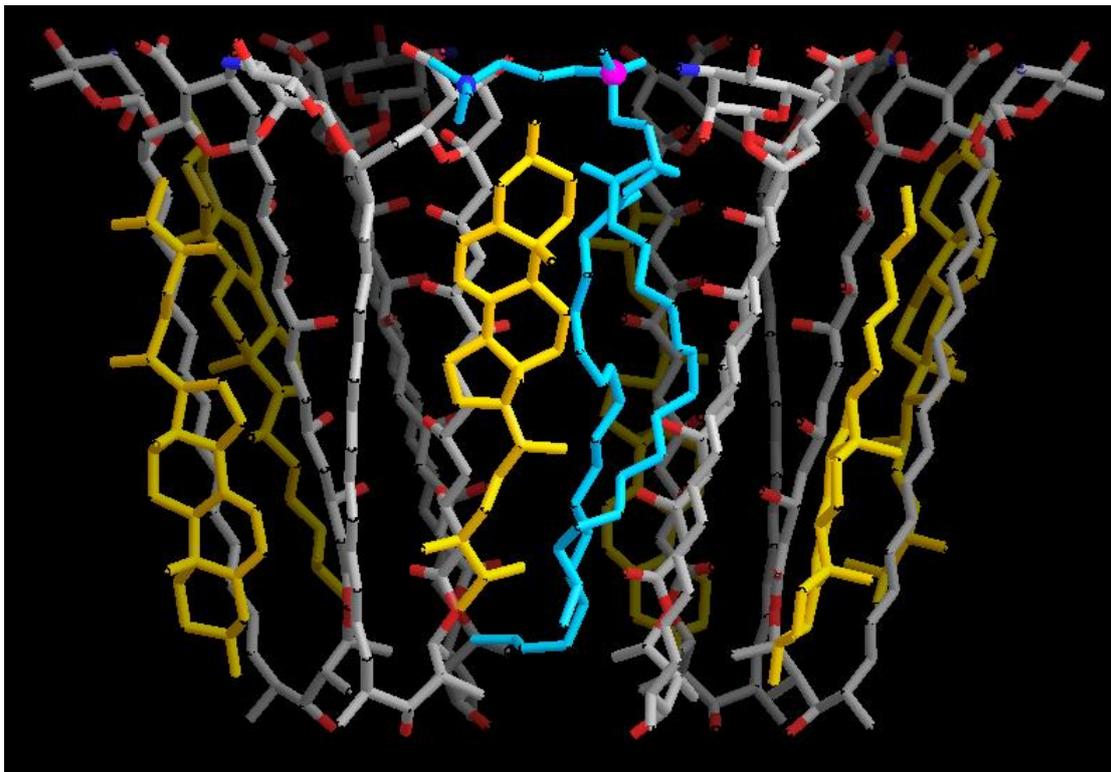


図 4-10. マイコサミン部分の配座を考慮したチャンネル構造と配座固定メカニズム。分子間距離情報を基にしたチャンネル構造に今回得られたβグリコシド結合の配座に関する情報を加えた。マイコサミン部分はステロールと近接していないことから、図の左側に示すように、構造化されたリン脂質(水色, ピンク色がリン原子で青色が窒素原子を示す) との相互作用によって、マイコサミン部分の配座が固定化され、 $^{13}\text{C}$  NMR のピークが先鋭になっている可能性が考えられる。

#### 4-6 章のまとめ

本研究では、新規二重標識化 AmB である  $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$  の合成経路を確立し、標識体合成を行った。さらに、合成した標識体を用いて  $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR 測定を行い、βグリコシド結合の配座を  $(\Phi, \Psi) = (53^\circ, 180^\circ)$  であると推定した。

今回の測定では REDOR 測定だけでは二面角  $\Phi$  の正負を判定できないという問題点があった。この問題は、REDOR 測定に用いたサンプルを用いて Medium- and long-distance HETCOR (MELODI-HETCOR)<sup>29</sup> 等の長距離  $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$  間の双極子相互作用を検出する測定を行うことで解決できると考えられる。例えば  $\Phi = -53^\circ$  の場合、1'位の  $^{13}\text{C}$  はヘプタエン部分 ( $\delta_{1\text{H}} = 6\sim 7$  ppm) に近接する一方、 $\Phi = +53^\circ$  の場合は 1'位の  $^{13}\text{C}$  は 17 位 ( $\delta_{1\text{H}} = 4.18$  ppm) および 18 位 ( $\delta_{1\text{H}} = 2.11$ ,

1.55 ppm) に近接する。このように 1'位の  $^{13}\text{C}$  とこれらの  $^1\text{H}$  との双極子相互作用による相関を観測することができれば、 $\Phi$  の正負を判定できる。また、似た測定手法として、Rotational Resonance in the Tilted Rotating frame (R2TR)法<sup>30</sup>や Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR)法<sup>31</sup>を U- $^{13}\text{C}$ -AmB に適用すれば、マイコサミン-ヘプタエン間およびマイコサミン-17, 18 位間の  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  双極子相互作用を定性的に観測することが可能であり、二面角  $\Phi$  の正負を決定できるだろう。

また本研究では二面角  $\Psi$  の角度をエキソアノマー効果により固定して解析を行ったが、静電相互作用等により、この仮定が成り立たない可能性もある。よって厳密には二面角  $\Psi$  を異なる測定により得る必要があるが、これはマイコサミンの異なる部分に  $^{13}\text{C}$  標識を導入した二重標識体を用いて REDOR 測定を行うことで決定できる。マイコサミンの異なる部分に  $^{13}\text{C}$  標識を導入した二重標識体はマイコサミン供与体の原料となるグルコースの標識位置を変えることにより、本研究と同じ経路で合成することが可能である。

今回の測定法には前述した問題点が残っているが、固体 NMR によって配糖体のグリコシド結合の配座を決定したのは本研究が初めての例である。細胞膜には糖脂質に代表される配糖体が多く存在し、生体内で様々な重要な役割を担うことが知られているため、近年注目を集めている。本研究で用いた手法は、このような配糖天然物の活性発現機構を決定する上で重要であり、今回の  $\beta$  グリコシド結合の配座決定は、その先駆けとなる研究成果であるといえる。

## 実験項

### 試 薬

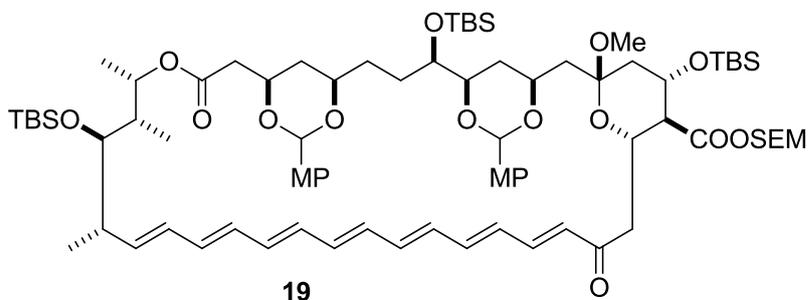
AmB はナカライテスクから、エルゴステロールは東京化成工業から、POPC は日本油脂から購入した。固体 NMR 測定や UV スペクトル測定、イオン透過活性試験のサンプル調製における溶媒はナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を用いた他、水には MilliQ 水(Millipore 社)を用いた。その他の試薬は特に記載のない限り、市販のものをそのまま用いた。HPLC に用いた緩衝液は測定前にソニケーションを行うことで脱気して使用した。またサンプル調製の際 AmB は DMSO のストックソリューションとし、UV スペクトルにより濃度決定を行い使用した( $\epsilon_{415}=1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。薄層クロマトグラフィー(TLC) は Merck 社の Kieselgel 60 F254 を用いた他、順相カラムクロマトグラフィーは関東化学の Silica gel 60N (球状、中性、40-50  $\mu\text{m}$ ) を用いた。逆相カラムクロマトグラフィーはコスモシール 75C<sub>18</sub>-OPN (ナカライテスク)を用い、HPLC 精製は COSMOSIL Packed Column, 5C<sub>18</sub>-MS-II (ナカライテスク、20ID×250 mm) を用いた。また、ゲルろ過はリサイクル分取 HPLC (日本分析工業)を用いる際はカラムとして JAIGEL-1H および JAIGEL-2H (日本分析工業) を用い、オープンカラムを用いる場合は Sephadex LH20 (GE Healthcare) を用いた。

### 使用機器

溶液 NMR は ECA 500 (日本電子, <sup>1</sup>H NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 125 MHz)、または ECS400 (日本電子, <sup>1</sup>H NMR: 400 MHz, <sup>13</sup>C NMR: 100 MHz)を用いた。質量分析は LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

## 19-*d*<sub>1</sub>-AmB 脱糖体 15'の合成

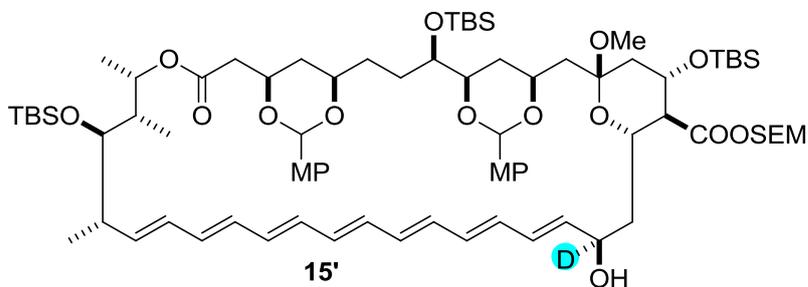
### ケトン 19



5OTBS-2MP-SEM-OMe-NFmoc-AmB **18** は過去の報告に従い合成した。5OTBS-2MP-SEM-OMe-NFmoc-AmB **18** (3.11 g, 1.48 mmol) をジクロロメタン (90 mL) に溶解させ、CaCO<sub>3</sub> (564.4 mg, 10 Eq) を加えた後、0 °C に冷却した。反応液に Chrolanil (564.3 mg, 1.5 Eq) を加え、室温で 15 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。ジエチルエーテルにより抽出した後、飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過、溶媒の留去を行った後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/ EtOAc = 9/1 to 5/1) により精製を行い、ケトン **19** (766.9 mg, 511.0 μmol, 35%) を得た。

ケトン: red powder;  $R_f$  = 0.48 (Hexane/EtOAc = 3/1); MS (ESI) calcd for C<sub>82</sub>H<sub>130</sub>O<sub>17</sub>Si<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1521.8277, found 1521.8274.

### 19-*d*<sub>1</sub>-AmB 脱糖体 15'



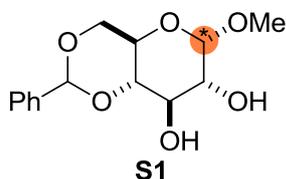
ケトン **19** (766.9 mg, 511.2 μmol) を MeOH/ THF = 2/1 (30 mL) に溶解させ、0 °C に冷却した後、重水素化ホウ素ナトリウム (213.9 mg, 10 Eq) を加え、

15 分間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、ジエチルエーテルで抽出を行った。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た後、濾過、溶媒留去を行いフラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/EtOAc = 8/1 to 5/1) により精製を行い、19-*d*<sub>1</sub>-AmB 脱糖体 (456.0 mg, 303.3 μmol, 59%) を得た。

19-*d*<sub>1</sub>-AmB 脱糖体 **15'**: yellow powder;  $R_f = 0.25$  (Hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.35 (4H, m, MP), 6.80 (4H, m, MP), 6.32-6.00 (12H, m, heptaene), 5.79 (1H, d,  $J = 14.5$  Hz, H-20), 5.70 (1H, dd,  $J = 15.0, 8.5$  Hz, H-33), 5.45 (1H, s, MP-acetal), 5.39 (1H, s, MP-acetal), 5.35 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, SEM), 5.20 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, SEM), 4.85 (1H, m, H-37), 4.24 (1H, td,  $J = 11.0, 5.0$  Hz, H-15), 4.14 (1H, m, H-3), 3.92 (1H, m, H-17), 3.79 (1H, m, H-5), 3.78 (6H, 2s, MP-OMe), 3.63 (2H, m), 3.60 (1H, m, H-35), 3.05 (3H, s, 13-OMe), 2.61 (1H, dd,  $J = 17.5, 6.5$  Hz, H-2a), 2.38 (1H, m, H-34), 2.31 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-16), 2.23 (1H, m, H-2b), 2.20 (1H, m, H-14a), 1.85 (2H, m, H-18ab), 1.81-1.22 (11H, m), 1.19 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-40), 1.00 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-38), 0.93 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-39), 0.91 (9H, s, TBS), 0.88 (9H, s, TBS), 0.76 (9H, s, TBS), 0.07 (3H, s, TBS), 0.06 (3H, s, TBS), 0.05 (3H, s, TBS), -0.02 (3H, s, TBS), -0.06 (3H, s, TBS), -0.12 (3H, s, TBS); MS (ESI) calcd for C<sub>82</sub>H<sub>131</sub>DO<sub>17</sub>Si<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1524.8497, found 1524.8491.

#### <sup>13</sup>C 標識化マイコサミン供与体の合成

##### 1-<sup>13</sup>C-ジオール **S1**

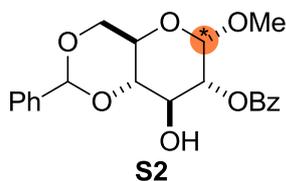


1-<sup>13</sup>C グルコース **17'** (5.01 g, 27.67 mmol, Cambridge Isotope Laboratories, 1-<sup>13</sup>C:99%) をメタノール (56 mL) に懸濁させ、TMSCl (17.56 mL, 5.0 Eq) を加え、60 °C で 20 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、トルエン共沸を行い 1-<sup>13</sup>C-メチル- $\alpha/\beta$ -D-グルコピラノシドを得た。精製を行わず反応を進めた。1-<sup>13</sup>C-メチル- $\alpha/\beta$ -D-グルコピラノシド (27.67 mmol) をアセトニトリル (65 mL)

に懸濁させ、ベンズアルデヒドジメチルアセタール (16.7 mL, 1.01 Eq)、10-カンファースルホン酸 (64 mg, 0.01 Eq) を加えて室温で 15 時間攪拌した。アセトニトリル (35 mL)、ベンズアルデヒドジメチルアセタール (16.7 mL, 1.01 Eq)、10-カンファースルホン酸 (64 mg, 0.01 Eq) を加えさらに 3 時間攪拌した後、ベンズアルデヒドジメチルアセタール (16.7 mL, 1.01 Eq) を加え、4 時間攪拌した。反応液をトリエチルアミン (10 mL) で中和し、溶媒を減圧留去した後、オープンカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane /EtOAc =7/3 to 0/1, then AcOEt/MeOH =9/1)により精製した。目的の 1-<sup>13</sup>C-ジオール **S1**(6.2911 g, 22.2 mmol, 80%) を白色結晶として得た。

1-<sup>13</sup>C-ジオール **S1**: white solid; *R<sub>f</sub>* =0.30 (Hexane /EtOAc =1/4); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.50 (2H, m, Ph), 7.37 (3H, m, Ph), 5.54 (1H, s, PhCH), 4.81 (1H, dd, *J*<sub>C-H</sub> =170, *J*<sub>H-H</sub> =4 Hz, H-1), 4.30 (1H, dd, *J* =10, 4.0 Hz, H-6a), 3.94 (1H, t, *J* =9.0 Hz, H-3), 3.80 (1H, tdd, *J*<sub>C-H</sub> =1.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub> =10.0, 4.5 Hz, H-5), 3.75 (1H, t, *J* =10.0 Hz, H-6b), 3.65 (1H, ddd, *J*<sub>C-H</sub> =1.5 Hz, *J*<sub>H-H</sub> =9.0, 4.0 Hz, H-2), 3.51 (1H, t, *J* =9.0 Hz, H-4), 3.47 (3H, d, *J* =4.0 Hz, OMe); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 99.73 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>13</sub><sup>13</sup>CH<sub>18</sub>O<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 306.1029, found 306.1029

1-<sup>13</sup>C-アルコール **S2**

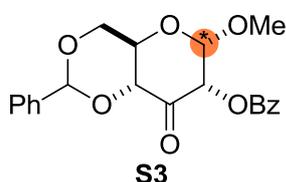


THF (46 ml)中に溶解させた 1-<sup>13</sup>C-ジオール **S1** (4.795 g, 16.99 mmol) に対し、ジメチルスズクロリド (185.9 mg, 0.05 Eq, 846.1 μmol)、炭酸カリウム (4.68 g, 2.0 Eq, 33.9 mmol) を加え、室温で 5 分間攪拌した後、塩化ベンゾイル (2.86 g, 1.2 Eq, 20.31 mmol) を加え室温で 15 時間攪拌した。水を加えてクエンチし、ジクロロメタンで抽出した後、有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥させた。ろ過後、溶媒を留去し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/Ethyl Acetate =10/ 1 → 0/ 1) により精製を行い、1-<sup>13</sup>C-アルコール **S2** (5.288 g, 13.65 mmol, 80%) を得た。

1-<sup>13</sup>C-アルコール **S2**: white solid; *R<sub>f</sub>* = 0.77 (Hexane /EtOAc =1/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.10 (2H, m, Ph), 7.59 (1H, tt, *J* =7.5, 1.0 Hz, Ph), 7.52

(2H, m, Ph), 7.47 (2H, m, Ph), 7.39 (3H, m, Ph), 5.59 (1H, s, Ph-CH), 5.09 (1H, dd,  $J_{C-H}=172.5$  Hz,  $J_{H-H}=3.5$  Hz, H-1), 5.05 (1H, dd,  $J_{C-H}=1.0$  Hz,  $J_{H-H}=9.5$ , 3.5 Hz, H-2), 4.37 (1H, dt,  $J_{H-H}=9.5$ , 3.0 Hz, H-3), 4.34 (1H, dd,  $J=9.5$ , 5.0 Hz, H-6b), 3.93 (1H, dtd,  $J_{C-H}=1.5$  Hz,  $J_{H-H}=10.0$ , 5.0 Hz, H-5), 3.81 (1H, t,  $J=10.0$  Hz, H-6a), 3.65 (1H, t,  $J=9.5$  Hz, H-4), 3.41 (3H, d,  $J_{C-H}=4.5$  Hz, OMe);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  97.78 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}^{13}\text{CH}_{22}\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  410.1291, found 410.1291.

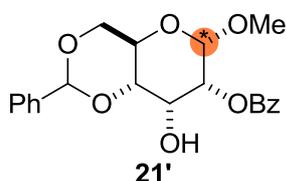
### 1- $^{13}\text{C}$ -ケトン **S3**



オキサリルクロリド (1.75 ml, 1.1 Eq, 20.5 mmol)をジクロロメタン (40 mL)に溶解させ、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ に冷却した。ジクロロメタン(7 mL)に溶かした DMSO (9.0 mL, 2.2 Eq, 40.8 mmol)を滴下漏斗によって加えた後、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ で10分撹拌した。続いてトルエン共沸を行った 1- $^{13}\text{C}$ -アルコール **S2** (7.197 g, 18.6 mmol) をジクロロメタン (40 mL)に溶解させ、10分間かけて反応液に滴下した。滴下終了後、反応液を $-78\text{ }^\circ\text{C}$ で20分撹拌し、トリエチルアミン (12.6 mL, 4.88 Eq, 90.8 mmol)を加えた。反応液を室温まで昇温した後、30分撹拌し水を加えた。生成物をジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、溶媒を留去することで、1- $^{13}\text{C}$ -ケトン **3** (7.3455 g, quant.)を得た。得られた 1- $^{13}\text{C}$ -ケトンは精製を行わず、次の反応に用いた。

1- $^{13}\text{C}$ -ケトン **S3**: white solid;  $R_f=0.79$  (Hexane /EtOAc =1/1);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.14 (2H, m, Ph), 7.61 (1H, tt,  $J=7.0$ , 1.0 Hz, Ph), 7.52 (2H, m, Ph), 7.47 (2H, m, Ph), 7.37 (3H, m, Ph), 5.64 (1H, dt,  $J_{C-H}=4.0$  Hz,  $J_{H-H}=4.0$ , 1.5 Hz, H-2), 5.61 (1H, s, Ph-CH), 5.35 (1H, dd,  $J_{C-H}=174.5$  Hz,  $J_{H-H}=4.0$  Hz, H-1), 4.46 (1H, dd,  $J=10.0$ , 5.0 Hz, H-6b), 4.43 (1H, dd,  $J=10.0$ , 1.5 Hz, H-4), 4.20 (1H, dtd,  $J_{C-H}=1.5$  Hz,  $J_{H-H}=10.0$ , 5.0 Hz, H-5), 3.99 (1H, t,  $J=10.0$  Hz, H-6a), 3.51 (3H, d,  $J_{C-H}=5.0$  Hz, OMe);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  101.47 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}^{13}\text{CH}_{20}\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  408.1135, found 408.1134.

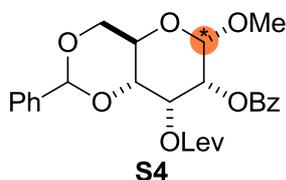
### 1-<sup>13</sup>C-アルコール **21'**



1-<sup>13</sup>C-ケトン **S3** (7.3455 g, 18.6 mmol) を THF/MeOH =10/1 の混合溶媒 (134.1 mL) に溶解させ、-15 °C に冷却した。反応液に水素化ホウ素ナトリウム (130 mg, 3.43 mmol) を加え、一分間攪拌した。氷を含んだ飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に反応液を滴下した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、溶媒を留去した。得られた 1-<sup>13</sup>C-アルコール **21'** (7.20 g, quant) は精製を行わず次の反応に用いた。

1-<sup>13</sup>C-アルコール **21'**: white solid;  $R_f = 0.81$  (Hexane /EtOAc =1/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.1 (2H, m, Ph), 7.61 (1H, tt,  $J = 8.0, 1.5$  Hz, Ph), 7.53 (2H, m, Ph), 7.47 (2H, m, Ph), 7.37 (3H, m, Ph), 5.63 (1H, s, Ph-CH), 5.10 (1H, dt,  $J_{C-H} = 1.5$  Hz,  $J_{H-H} = 3.5$  Hz, H-2), 5.05 (1H, dd,  $J_{C-H} = 172.0$  Hz,  $J_{H-H} = 3.5$  Hz, H-1), 4.51 (1H, m, H-3), 4.43 (1H, dd,  $J = 10.0, 5.0$  Hz, H-6b), 4.25 (1H, dtd,  $J_{C-H} = 1.5$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0, 5.0$  Hz, H-5), 3.84 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-6a), 3.69 (1H, dd,  $J = 10.0, 3.0$  Hz, H-4), 3.51 (3H, d,  $J_{C-H} = 4.5$  Hz, OMe), 3.22 (3H, d,  $J = 7.5$  Hz, OH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  98.77 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>20</sub><sup>13</sup>CH<sub>22</sub>O<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 410.1291, found 410.1291.

### 1-<sup>13</sup>C-レブリンル化体 **S4**

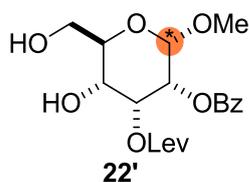


1-<sup>13</sup>C-アルコール **21'** (7.20 g, 18.6 mmol) をジクロロメタン (99 mL) に溶解させた後、DCC (7.67 g, 2.0 Eq, 37.2 mmol)、レブリン酸 (3.80 mL 2.0 Eq, 37.2 mmol) を加えた。DMAP (1.58 g, 0.7 Eq, 13.0 mmol) を 5 分おきに 7 回に分けて加え、室温で 16 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液でクエンチした後、セライトろ過を行い、酢酸エチルにより生成物を抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、ろ過、溶媒の留去を行った。フラッシュカラムクロマ

トグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/ Toluene =1/0 to 4/1)により精製を行い、1-<sup>13</sup>C-レブリニル化体 **S4** (8.18 g, 16.9 mmol, 91% in 3steps)を得た。

1-<sup>13</sup>C-レブリニル化体 **S4**: colorless oil;  $R_f = 0.57$  (Hexane /EtOAc =1/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.02 (2H, m, Ph), 7.58 (1H, tt,  $J = 7.2, 1.6$  Hz, Ph), 7.46 (2H, m, Ph), 7.37 (3H, m, Ph), 5.85 (1H, m, H-3), 5.59 (1H, s, Ph-CH), 5.15 (1H, dt,  $J_{C-H} = 1.6$  Hz,  $J_{H-H} = 3.6$  Hz, H-2), 5.03 (1H, dd,  $J_{C-H} = 171.2$  Hz,  $J_{H-H} = 3.6$  Hz, H-1), 4.39 (1H, dd,  $J = 10.4, 5.2$  Hz, H-6b), 4.25 (1H, dtd,  $J_{C-H} = 1.6$  Hz,  $J_{H-H} = 10.4, 4.8$  Hz, H-5), 3.79 (2H, m, H-6a, H-4), 3.51 (3H, d,  $J_{C-H} = 4.8$  Hz, OMe), 2.83-2.70 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  97.54 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>25</sub><sup>13</sup>CH<sub>28</sub>O<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 508.1659, found 508.1654.

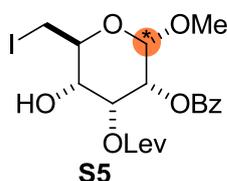
1-<sup>13</sup>C-ジオール **22'**



1-<sup>13</sup>C-レブリニル化体 **S4** (8.18 g, 16.9 mmol, 91% in 3 steps)を酢酸エチル(276 mL)に溶解させた。パラジウム炭素(10%wt/wt, 3.53 g)を加え、フラスコ内を水素に置換した。室温で44時間攪拌した後、反応液をセライトろ過した。濾液の溶媒を留去することで1-<sup>13</sup>C-ジオール **22'** (6.506 g, 16.37 mmol, 97%)を得た。

1-<sup>13</sup>C-ジオール **22'**: colorless oil;  $R_f = 0.33$  (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.99 (2H, m, Ph), 7.57 (1H, tt,  $J = 9.0, 1.5$  Hz, Ph), 7.44 (2H, m, Ph), 5.73 (1H, dt,  $J_{C-H} = 3.0$  Hz,  $J_{H-H} = 5.0$  Hz, H-3), 5.07 (1H, dt,  $J_{C-H} = 2.0$  Hz,  $J_{H-H} = 5.0$  Hz, H-2), 5.02 (1H, dd,  $J_{C-H} = 170.5$  Hz,  $J_{H-H} = 4.5$  Hz, H-1), 4.00-3.84 (4H, m, H-4, 5, 6ab), 3.42 (3H, d,  $J_{C-H} = 5.0$  Hz, OMe), 2.86 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.69 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.19 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  96.75 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>18</sub><sup>13</sup>CH<sub>24</sub>O<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 420.1346, found 420.1342.

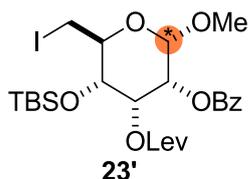
### 1-<sup>13</sup>C-ヨウ素化体 **S5**



トルエン共沸した 1-<sup>13</sup>C-ジオール **22'** (6.506 g, 16.37 mmol) を THF (164 mL) に溶解させた。反応液を水浴中で保温しながら、トリフェニルホスフィン (8.59 g, 32.7 mmol, 2.0 Eq) , ヨウ素 (8.31 g, 32.7 mmol, 2.0 Eq), 1H-imidazole (8.36 g, 122.8 mmol, 7.5 Eq) を加え、室温 (水浴中) で 1 時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加えた後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液でクエンチし、酢酸エチルで抽出した。有機層を pH 6.5 リン酸緩衝液、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過後溶媒を留去し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/ EtOAc = 1/0 to 2/1) により精製を行うことで 1-<sup>13</sup>C-ヨウ素化体 **S5** (5.255 g, 10.36 mmol, 63%) を得た。

1-<sup>13</sup>C-ヨウ素化体 **S5** : colorless oil;  $R_f = 0.72$  (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.98 (2H, m, Ph), 7.57 (1H, tt,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, Ph), 7.44 (2H, m, Ph), 5.73 (1H, dt,  $J_{C-H} = 3.0$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-3), 5.09 (1H, dt,  $J_{C-H} = 2.0$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-2), 5.00 (1H, dd,  $J_{C-H} = 170.5$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-1), 3.76 (1H, ddd,  $J_{C-H} = 2.0$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0, 8.0, 2.0$  Hz, H-5), 3.71 (1H, dd,  $J = 10.0, 2.0$  Hz, H-6a), 3.65 (1H, td,  $J = 10.0, 4.0$  Hz, H-4), 3.50 (3H, d,  $J_{C-H} = 5.0$  Hz, OMe), 3.34 (1H, dd,  $J = 10.0, 8.0$  Hz, H-6b), 2.86 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.79 (1H,  $J = 10.0$  Hz, OH), 2.67 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.19 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  97.01 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>20</sub><sup>13</sup>CH<sub>22</sub>IO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 530.0363, found 530.0359.

### 1-<sup>13</sup>C-TBS 化体 **23'**

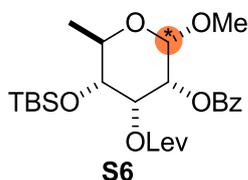


1-<sup>13</sup>C-ヨウ素化体 **S5** (3.919 g, 7.73 mmol) をジクロロメタン (63.9 mL) に溶

解させた。反応液を 0 °C に冷却し、1H-イミダゾール (3.16 g, 46.3 mmol, 6.0 Eq), TBS クロリド (4.00 g, 30.9 mmol, 4.0 Eq) を加えた。還流下で 66 時間攪拌した後、TBS クロリド (4.00 g, 30.9 mmol, 4.0 Eq) を加えた。還流下でさらに 19 時間攪拌した後、ジエチルエーテルに溶解させ、飽和塩化アンモニウム水溶液でクエンチした。ジエチルエーテルで抽出を行った後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、1M 硫酸銅 (II) 水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過後溶媒を留去し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/EtOAc = 10/1 to 5/1) により精製を行うことで、1-<sup>13</sup>C-TBS 化体 **23'** (4.158 g, 6.69 mmol, 87 %) を得た。

1-<sup>13</sup>C-TBS 化体 **23'**: colorless oil; *R*<sub>f</sub> = 0.64 (Hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (2H, m, Ph), 7.57 (1H, tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, Ph), 7.45 (2H, m, Ph), 5.59 (1H, dt, *J*<sub>C-H</sub> = 3.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 4.0 Hz, H-3), 5.05 (1H, dt, *J*<sub>C-H</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 4.0 Hz, H-2), 4.99 (1H, dd, *J*<sub>C-H</sub> = 170.5 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 4.0 Hz, H-1), 3.84 (1H, dddd, *J*<sub>C-H</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 10.0, 7.0, 2.0 Hz, H-5), 3.65 (1H, dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, H-6a), 3.56 (1H, dd, *J* = 10.0, 3.0 Hz, H-4), 3.47 (3H, d, *J*<sub>C-H</sub> = 5.0 Hz, OMe), 3.27 (1H, dd, *J* = 10.0, 7.0 Hz, H-6b), 2.86-2.63 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 0.86 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.16 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0.10 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 97.11 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>24</sub><sup>13</sup>CH<sub>37</sub>IO<sub>8</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 644.1228, found 644.1222.

#### 1-<sup>13</sup>C-6-デオキシ糖 **S6**

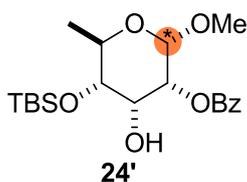


1-<sup>13</sup>C-TBS 化体 **23'** (4.158 g, 6.69 mmol) をトルエン (75 mL) に溶解させた。トリブチルすずヒドリド (3.60 mL, 13.4 mmol, 2.0 Eq) を加えた後、還流下で攪拌し、AIBN (109.8 mg, 66.9 μmol, 0.01 Eq) を加えて還流下で 7 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、減圧下で溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルに溶解させたのち、フッ化カリウム水溶液を加え、0 °C で 1 時間攪拌した。セライトろ過を行った後、酢酸エチル中に抽出し有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ

過後、溶媒を留去し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/EtOAc =1/0 to 5/1)による精製を行うことで、1-<sup>13</sup>C-6-デオキシ糖 **S6** (3.109 g, 6.27 mmol, 94%) を得た。

1-<sup>13</sup>C-デオキシ糖 **S6**: colorless oil;  $R_f = 0.42$  (Hexane/EtOAc= 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.98 (2H, m, Ph), 7.56 (1H, tt,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, Ph), 7.45 (2H, m, Ph), 5.57 (1H, dt,  $J_{C-H} = 3.0$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-3), 5.04 (1H, dt,  $J_{C-H} = 2.0$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-2), 4.92 (1H, dd,  $J_{C-H} = 169.5$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-1), 3.84 (1H, ddq,  $J_{C-H} = 2.0$  Hz,  $J_{H-H} = 9.0, 7.0$  Hz, H-5), 3.48 (1H, dd,  $J = 9.0, 4.0$  Hz, H-4), 3.39 (3H, d,  $J_{C-H} = 5.0$  Hz, OMe), 2.85-2.63 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.25 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-6), 0.86 (3H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0.08 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  96.70 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>24</sub><sup>13</sup>CH<sub>38</sub>O<sub>8</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 518.2262, found 518.2260.

#### 1-<sup>13</sup>C-アルコール **24'**

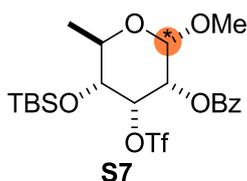


1-<sup>13</sup>C-6-デオキシ糖 **S6** (3.109 g, 6.27 mmol) をピリジン (30.3 mL)、酢酸 (19.9 mL) に溶解させ、水浴中で攪拌した後、ヒドラジン—水和物 (6.10 mL, 125.4 mmol, 20 Eq) を加えて室温で、36 時間攪拌した。反応液をアセトンでクエンチした後、10 分攪拌した。反応液を 0 °C に冷却した 15%炭酸ナトリウム/10%炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) に 1 時間かけて滴下した。生成物を酢酸エチルで抽出し、有機層を硫酸銅水溶液、食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムにより乾燥させた。ろ過後溶媒を留去し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/ EtOAc =1/0 to 12/1) により精製を行い、1-<sup>13</sup>C-アルコール **24'** (1.971 g, 4.96 mmol, 79%) を得た。

1-<sup>13</sup>C-アルコール **24'**: colorless oil;  $R_f = 0.64$  (Hexane/EtOAc= 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.13 (2H, m, Ph), 7.58 (1H, tt,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, Ph), 7.45 (2H, m, Ph), 5.10 (1H, dt,  $J_{C-H} = 2.0$  Hz,  $J_{H-H} = 3.5$  Hz, H-2), 4.94 (1H, dd,  $J_{C-H} = 170.5$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-1), 4.19 (1H, m, H-3), 3.99 (1H, ddq,  $J_{C-H} = 1.0$  Hz,  $J_{H-H} = 9.5, 6.0$  Hz, H-5), 3.43 (3H, d,  $J_{C-H} = 4$  Hz, OMe), 3.42 (1H, dd,  $J = 9.5, 3.0$  Hz, H-4), 1.30 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-6), 0.93 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (6H, s, Si-

CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 97.91 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>19</sub><sup>13</sup>CH<sub>32</sub>O<sub>6</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 420.1894, found 420.1891.

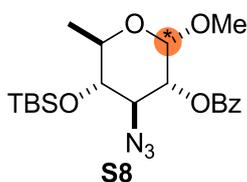
### 1-<sup>13</sup>C-トリフラート **S7**



1-<sup>13</sup>C-アルコール **24'** (1.971 g, 4.96 mmol) をジクロロメタン (53.4 mL) に溶解させ、-40 °C に冷却した。ピリジン (4.51 mL, 44.7 mmol, 9.0 Eq)、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (2.50 mL, 14.9 mmol, 3.0 Eq) を加え、室温で 11 時間攪拌した後、ジエチルエーテルに溶解させ、水、2 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで有機層を乾燥させた。濾過後、溶媒を留去することで 1-<sup>13</sup>C-トリフラート **S7** を得た。1-<sup>13</sup>C-トリフラート **S7** は、精製を行わず次の反応へ用いた。

1-<sup>13</sup>C-トリフラート **S7**: brown oil; R<sub>f</sub> = 0.54 (Hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.10 (2H, m, Ph), 7.60 (1H, tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, Ph), 7.47 (2H, m, Ph), 5.28 (1H, dt, *J*<sub>C-H</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 4.5 Hz, H-2), 5.18 (1H, ddd, *J*<sub>C-H</sub> = 2.5 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 5.0, 3.0 Hz, H-3), 4.88 (1H, dd, *J*<sub>C-H</sub> = 169.5 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.10 (1H, ddq, *J*<sub>C-H</sub> = 1.0 Hz, *J*<sub>H-H</sub> = 10.0, 6.0 Hz, H-5), 3.59 (1H, dd, *J* = 9.5, 3.0 Hz, H-4), 3.42 (3H, d, *J*<sub>C-H</sub> = 4.5 Hz, OMe), 1.30 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6), 0.94 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.16 (6H, 2s, Si-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 96.57 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>20</sub><sup>13</sup>CH<sub>31</sub>FO<sub>8</sub>SSi [M+Na]<sup>+</sup> 552.1387, found 552.1382.

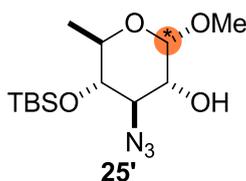
### 1-<sup>13</sup>C-アジド **S8**



1-<sup>13</sup>C-トリフラート **S7** (4.96 mmol) を DMF (20.2 mL) に溶解させ、アジ化ナトリウム (354.6 mg, 5.46 mmol, 1.1 Eq)、15-クラウン-5 (1.08 mL, 5.46 mmol, 1.1 Eq)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液に水を加えた後、ヘキサン/ジエチルエーテル =1/1 の混合溶媒で抽出し、有機層を炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過を行い、溶媒を留去することで 1-<sup>13</sup>C-アジド **S8** を得た。1-<sup>13</sup>C-アジド **S8** は精製を行わず次の反応に用いた。

1-<sup>13</sup>C-アジド **S8**: brown oil;  $R_f = 0.43$  (Hexane/EtOAc= 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.68 (1H, dd,  $J_{C-H} = 169$  Hz,  $J_{H-H} = 4.0$  Hz, H-1), , 3.62 (1H, ddq,  $J_{C-H} = 1.5$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0, 6.5$ , Hz, H-5), 3.53 (1H, dtd,  $J_{C-H} = 1.0$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0, 4.0$  Hz, H-2), 3.43 (3H, d,  $J_{C-H} = 4.5$  Hz, OMe), 3.41 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-4), 3.02 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-3), 2.12 (1H, dd,  $J_{C-H} = 2.5$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0$  Hz, OH), 1.22 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-6), 0.91 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.19 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0.10 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  98.38 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>19</sub><sup>13</sup>CH<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 445.1959, found 445.1958.

1-<sup>13</sup>C-アルコール **25'**

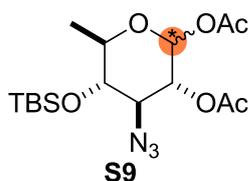


1-<sup>13</sup>C-アジド **S8** (4.96 mmol) をメタノール (44 mL) に溶解させ、フェノールフタレイン (0.5 mg) を加えた。ナトリウムメトキシド (401.9 mg, 7.44 mmol, 1.5 Eq) 加え、室温で15時間攪拌した後、アンバーライト H<sup>+</sup>を加えてクエンチし、濾過ご溶媒を留去した。生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、1-<sup>13</sup>C-アルコール **25'** (1.1028 g, 3.46 mmol, 70% in 3 steps) を得た。

1-<sup>13</sup>C-アルコール **25'**: colorless oil;  $R_f = 0.63$  (Hexane/EtOAc= 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.14 (1H, dd,  $J_{C-H} = 171.5$  Hz,  $J_{H-H} = 3.5$  Hz, H-1), 4.87 (1H, ddd,  $J_{C-H} = 1.0$  Hz,  $J_{H-H} = 10.5, 3.5$  Hz, H-2), 3.91 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-3), 3.73 (1H, ddq,  $J_{C-H} = 1.5$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0, 6.5$ , Hz, H-5), 3.37 (3H, d,  $J_{C-H} = 4.5$  Hz, OMe),

3.59 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-4), 1.27 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-6), 0.93 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.20 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>), 0.12 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 96.20 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for C<sub>12</sub><sup>13</sup>CH<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 341.1697, found 341.1694.

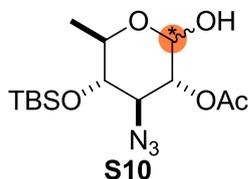
### 1-<sup>13</sup>C-アセチル化体 **S9**



1-<sup>13</sup>C-アルコール **25'** (1.1028 g, 3.46 mmol) を無水酢酸 (9 mL) に溶解させ、0 °C に冷却した。この溶液に、濃硫酸 9 滴を加えた無水酢酸 (0.9 mL) を加え、0 °C で 5 分攪拌した後に室温に昇温し、30 分攪拌した。反応液を 0 °C に冷却した飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に加え、1 時間攪拌した後、生成物をジエチルエーテルに抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過後溶媒を留去した後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/EtOAc = 1/0 to 12/1) による精製を行い、1-<sup>13</sup>C-アセチル化体 **S9** (763.3 mg, 1.96 mmol, 56%) を得た。

1-<sup>13</sup>C-アセチル化体 **S9**: colorless oil;  $R_f = 0.59$  (Hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 6.19 (1H, dd,  $J_{C-H} = 177.2$  Hz,  $J_{H-H} = 3.6$  Hz, H-1( $\alpha$ )), 5.63 (1H $\times$ 0.2, dd,  $J_{C-H} = 166.8$  Hz,  $J_{H-H} = 8.0$  Hz, H-1( $\beta$ )), 4.97 (1H $\times$ 0.2, ddd,  $J_{C-H} = 6.4$  Hz,  $J_{H-H} = 10.0, 8.0$  Hz, H-2( $\beta$ )), 4.87 (1H, dd,  $J_{H-H} = 10.4, 3.5$  Hz, H-2( $\alpha$ )), 3.73 (1H, ddq,  $J_{C-H} = 0.5$  Hz,  $J_{H-H} = 8.0, 6.4$  Hz, H-5( $\alpha$ )), 3.51 (1H, m,  $J = 10.0$  Hz, H-3( $\alpha$ )), 3.51 (1H $\times$ 0.2, m, H-5( $\beta$ )), 3.45 (1H, dt,  $J_{C-H} = 1.2$  Hz,  $J_{H-H} = 10.4$  Hz, H-3( $\alpha$ )), 3.17 (1H $\times$ 0.2, t,  $J_{H-H} = 10.4$  Hz, H-4( $\beta$ )), 3.15 (1H, t,  $J_{H-H} = 10.4$  Hz, H-4( $\alpha$ )), 2.17 (3H, s, Ac ( $\alpha$ )), 2.11 (3H $\times$ 0.2, s, Ac ( $\beta$ )), 2.09 (3H, s, Ac( $\alpha$ )), 2.04 (3H $\times$ 0.2, s, Ac( $\beta$ )), 1.28 (3H $\times$ 0.2, d,  $J = 6.4$  Hz, H-6), 1.24 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-6( $\alpha$ )), 0.93 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>( $\alpha$ )), 0.92 (9H $\times$ 0.2, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>( $\beta$ )), 0.20 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>( $\alpha$ )), 0.19 (3H $\times$ 0.2, s, Si-CH<sub>3</sub>( $\beta$ )), 0.12 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>( $\alpha$ )), 0.10 (3H $\times$ 0.2, s, Si-CH<sub>3</sub>( $\alpha$ )); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 91.94 (labelled carbon,  $\beta$ ), 88.89 (labelled carbon,  $\alpha$ ); MS (ESI) calcd for C<sub>15</sub><sup>13</sup>CH<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 411.1751, found 411.1751.

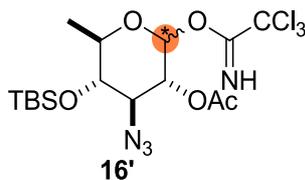
1-<sup>13</sup>C-ヘミケタール **S10**



1-<sup>13</sup>C-アセチル化体 **S9** (763.3 mg, 1.96 mmol) を DMF (23 mL) に溶解させ、ヒドラジン酢酸 (271.4 mg, 2.94 mmol, 1.5 Eq) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液に水を加えてクエンチし、ヘキサソジエチルエーテル =1/1 の混合溶媒で抽出を行った。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過後、溶媒を留去した。生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, Hexane/ EtOAc =1/0 to 7/1) で精製し、1-<sup>13</sup>C-ヘミケタール **S10** (555.9 mg, 1.60 mmol, 82%) を得た。

1-<sup>13</sup>C-ヘミケタール **S10**: white solid;  $R_f = 0.59$  (Hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.53 (1H, dt,  $J_{C-H} = 172.0$  Hz,  $J_{H-H} = 3.2$  Hz, H-1(α)), 4.62 (1H×0.2, t,  $J_{C-H} = 163.6$  Hz,  $J_{H-H} = 9.2$  Hz, H-1(β)), 4.70 (1H, dd,  $J_{H-H} = 10.4, 3.2$  Hz, H-2(α)), 4.65 (1H×0.2, m, H-2(β)), 3.94 (1H, ddq,  $J_{C-H} = 0.5$  Hz,  $J_{H-H} = 8.0, 6.4$ , Hz, H-5(α)), 3.78 (1H, m,  $J = 10.4$  Hz, H-3(α)), 3.51 (1H×0.2, m, H-5(β)), 3.10 (1H, t,  $J = 10.4$  Hz, H-4(α)), 2.57 (1H, m, OH(α)), 2.17 (3H, s, Ac (α)), 1.22 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-6(α)), 0.92 (9H, s, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(α)), 0.19 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>(α)), 0.11 (3H, s, Si-CH<sub>3</sub>(α)); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 91.94 (labelled carbon, β), 89.61 (labelled carbon, α); MS (ESI) calcd for C<sub>13</sub><sup>13</sup>CH<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 369.1646, found 369.1644.

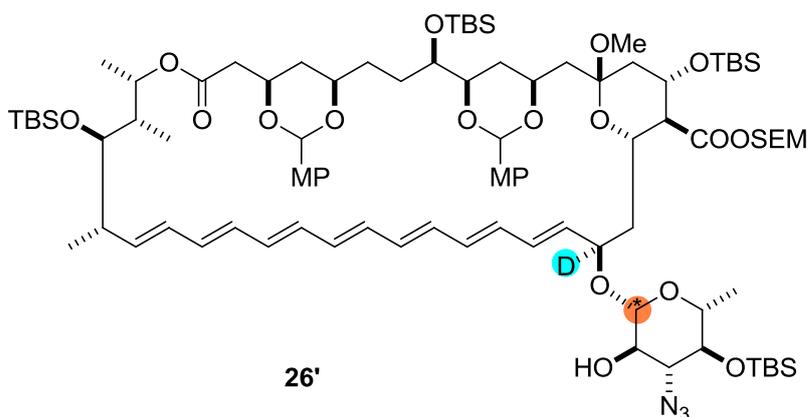
1-<sup>13</sup>C-イミデート **16'**





d,  $J = 6.0$  Hz, SEM), 5.37 (1H, s, MP-acetal), 5.25 (1H, m, 37-H), 5.15 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, SEM), 4.90 (1H, m, 2'-H), 4.87 (1H, m), 4.43 (1H, dd,  $J_{C-H} = 159.5$  Hz,  $J_{H-H} = 8.0$  Hz, 1'-H), 4.26-4.10 (5H, m, H-15, H-3 and polyol), 3.79 (m, 1H, H-17), 3.78 (6H, 2s, MP-OMe), 3.71 (1H, m), 3.63 (1H, m, H-5), 3.61 (1H, m, H-35), 3.38 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-3'), 3.29 (1H, m, H-5'), 3.16 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-4'), 2.95 (3H, s, 13-OMe), 2.61 (1H, dd,  $J = 18.0, 7.0$  Hz, H-2a), 2.38 (1H, m, 34-H), 2.27 (1H, m, H-16), 2.23 (3H, s, Ac), 2.22 (2H, m, 14a, 2a), 2.01 (1H, m, H-36), 1.89 (1H, m, 18a), 1.81-1.41 (9H, m, 4a, 6ab, 7ab, 10ab, 12ab), 1.35-1.14 (10H, m, H-6', H-39, H-40, H-4a), 1.01 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-38), 0.95-0.80 (27H, m, TBS), 0.75 (9H, s, TBS), 0.20-0.12 (33H, m, TBS, SEM);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  98.31, (peak of byproduct was observed at 91.30); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{95}^{13}\text{CH}_{156}\text{DN}_3\text{O}_{21}\text{Si}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1853.0144, found 1853.0136.

$1'-^{13}\text{C}$ -19- $d_1$ -アルコール **26'**

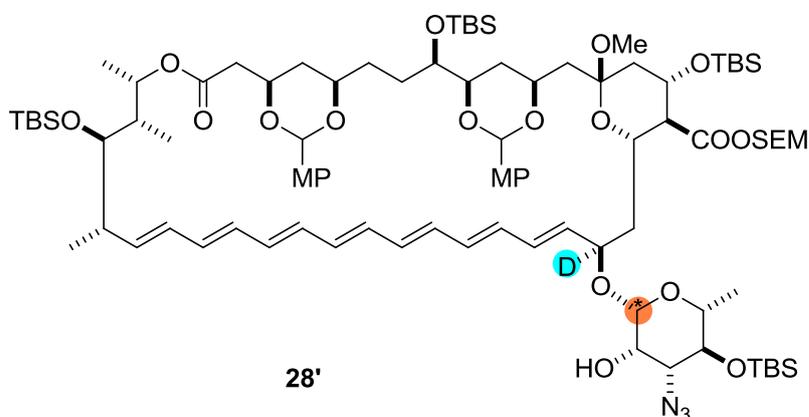


19- $d_1$ - $1'-^{13}\text{C}$ -グリコシル化体 **14'** (35.2 mg, 19.2  $\mu\text{mol}$ ) をメタノール/THF =1/1 の混合溶媒 (10.4 mL) に溶解させ、 $0^\circ\text{C}$  に冷却した。炭酸カリウム (53.1 mg, 384.4  $\mu\text{mol}$ , 20 Eq) を加え、室温で12時間攪拌した後、ジエチルエーテルに溶解させ、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過後、溶媒を留去した。生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (Hexane/ EtOAc=10/1 to 8/1) で精製し、 $1'-^{13}\text{C}$ -19- $d_1$ -アルコール **26'** (23.6 mg, 13.2  $\mu\text{mol}$ , 69%) を得た。

$1'-^{13}\text{C}$ -19- $d_1$ -アルコール **26'**: yellow solid;  $R_f = 0.44$  (Hexane/EtOAc= 4/1);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 (4H, dd,  $J = 22.0, 9.0$  Hz, MP), 6.82 (4H, dd,  $J = 22.0, 9.0$  Hz, MP), 6.30-6.00 (12H, m, heptaene), 5.75 (1H, m, H-20), 5.57

(1H, m, H-33), 5.43 (1H, s, MP-acetal), 5.42 (1H, d,  $J=6.0$  Hz, SEM), 5.38 (1H, s, MP-acetal), 5.17(1H, d,  $J=6.0$  Hz, SEM), 4.86 (1H, m, 37-H), 4.26 (1H, dd,  $J_{C-H}=157.5$  Hz,  $J_{H-H}=7.5$  Hz, 1'-H), 4.24-4.12 (5H, m, H-15, H-3 and polyol), 3.87 (m, 1H, H-17), 3.78 (6H, 2s, MP-OMe), 3.71 (1H, m), 3.63 (1H, m, H-5), 3.61 (1H, m, H-35), 3.38 (1H, m, H2'), 3.28 (1H, m, H-5'), 3.23 (1H, t,  $J=10.0$  Hz, H-3'), 3.05 (1H, t,  $J=10.0$  Hz, H-4'), 3.00 (3H, s, 13-OMe), 2.60 (1H, dd,  $J=18.0, 7.0$  Hz, H-2a), 2.41 (1H, m, H-16), 2.35 (1H, m, 34-H), 2.23 (2H, m, 14a, 2a), 2.17 (3H, s, Ac), 1.94 (1H, m, 18a), 1.82 (1H, m, 18b), 1.78 (1H, m, H-36) 1.74-1.41 (9H, m, 4a, 6ab, 7ab, 10ab, 12ab), 1.35 (1H, m, H14b), 1.23 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-40), 1.22 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-6'), 1.19 (1H, m, H-4a), 0.99 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-38), 0.92 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-39), 0.91 (9H, s, TBS), 0.89 (9H, s, TBS), 0.86 (9H, s, TBS), 0.75 (9H, s, TBS), 0.17 (3H, s, TBS), 0.08 (3H, s, TBS), 0.07 (3H, s, TBS), 0.06 (3H, s, TBS), 0.05 (3H, s, TBS), 0.04 (3H, s, TBS), 0.02 (9H, s, SEM), 0.02 (3H, s, TBS), -0.04 (3H, s, TBS), -0.07 (3H, S, TBS), -0.14 (3H, s, TBS);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  102.17 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{93}^{13}\text{CH}_{154}\text{DN}_3\text{O}_{20}\text{Si}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1811.0039, found 1811.0032.

19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ - AmB 脱保護前駆体 **28'**

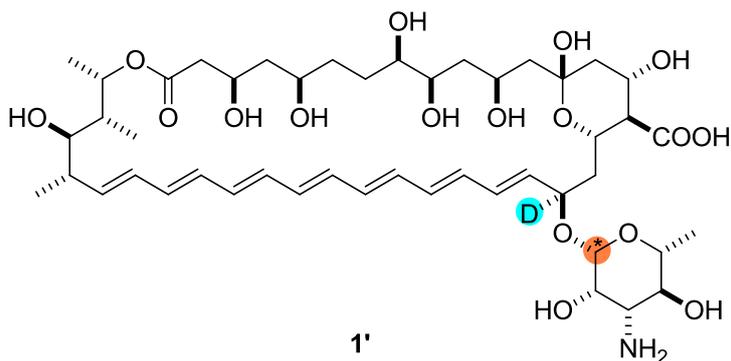


ジクロロメタン (4.0 mL) に蒸留した DMSO (181  $\mu\text{L}$ , 2.54 mmol, 200 Eq),  $N, N, N, N$ -テトラメチル尿素 (306  $\mu\text{l}$ , 2.54 mmol, 200 Eq) を加え、 $-78^\circ\text{C}$  に冷却した。トリフルオロ酢酸無水物(180  $\mu\text{L}$ , 1.27 mmol, 100 Eq) を滴下し、15分攪拌した。トルエン共沸した 19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -2'-*epi*-AmB 脱保護前駆体 (22.8 mg, 12.7  $\mu\text{mol}$ ) をジクロロメタン (1.0 mL) に溶解させ、反応液に滴下し、 $-78^\circ\text{C}$  で3時間攪拌した。蒸留したトリエチルアミン (356  $\mu\text{L}$ , 2.54 mmol, 200 Eq) を加え、 $-78^\circ\text{C}$  で15分攪拌した後、水素化ホウ素ナトリウム (19.2 mg, 508  $\mu\text{mol}$ , 40 Eq) を2-プロパノール/水=4/1の混合溶媒 (1.0 mL) に溶解させたものを加

え、 $-78^{\circ}\text{C}$  で 10 分攪拌した。反応液にジエチルエーテルを加えて抽出を行った後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過、溶媒を留去した。リサイクル分取 HPLC を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (JAIGEL-2H, JAIGEL-1H,  $\text{CHCl}_3$ , 3mL/min, 日本分析工業)による粗精製を行った後、フラッシュカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , Hexane/ EtOAc =10/1 to 8/1) で精製を行い、 $19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$  脱保護前駆体 **28'** (13.7 mg, 7.66  $\mu\text{mol}$ , 59%) を得た。

$19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$  脱保護前駆体 **28'**: yellow solid;  $R_f = 0.32$  (Hexane/EtOAc = 4/1);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 (4H, dd,  $J = 27.0, 8.5$  Hz, MP), 6.82 (4H, dd,  $J = 27.0, 8.5$  Hz, MP), 6.30-6.00 (12H, m, heptaene), 5.75 (1H, d,  $J = 14.5$  Hz, H-20), 5.64 (1H, dd,  $J = 14.5, 8.5$  Hz, H-33), 5.44 (1H, s, MP-acetal), 5.40 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, SEM), 5.39 (1H, s, MP-acetal), 5.13 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, SEM), 4.85 (1H, m, 37-H), 4.50 (1H, d,  $J_{\text{C-H}} = 157.0$  Hz, 1'-H), 4.21 (1H, td,  $J = 10.5, 5.0$  Hz, H-15), 4.13 (1H, m), 4.10 (1H, s, H-2'), 3.85 (m, 1H, H-17), 3.78 (6H, 2s, MP-OMe), 3.71-3.60 (3H, m, H-35, H-5, polyol), 3.59 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-4'), 3.25 (1H, ddq,  $J_{\text{C-H}} = 2.5$  Hz,  $J_{\text{H-H}} = 9.0, 6.0$  Hz, H-5'), 3.18 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.5$  Hz, H-3'), 3.02 (3H, s, 13-OMe), 2.61 (1H, dd,  $J = 18.0, 6.5$  Hz, H-2a), 2.38 (1H, m, 34-H), 2.32 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-16), 2.23 (2H, m, 14a, 2a), 1.94 (1H, m, 18a), 1.81 (1H, m, H-36), 1.79 (1H, m, 18b), 1.74-1.41 (9H, m, 4a, 6ab, 7ab, 10ab, 12ab), 1.31 (1H, m, H14b), 1.27 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-6'), 1.21 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-40), 1.19 (1H, m, H-4a), 1.00 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-38), 0.93 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-39), 0.91 (9H, s, TBS), 0.90 (9H, s, TBS), 0.87 (9H, s, TBS), 0.76 (9H, s, TBS), 0.21 (3H, s, TBS), 0.10 (3H, s, TBS), 0.07 (3H, s, TBS), 0.06 (3H, s, TBS), 0.05 (3H, s, TBS), 0.04 (3H, s, TBS), 0.02 (9H, s, SEM), 0.02 (3H, s, TBS), -0.03 (3H, s, TBS), -0.07 (3H, S, TBS), -0.12 (3H, s, TBS);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  96.73 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{93}\text{H}_{154}\text{DN}_3\text{O}_{20}\text{Si}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1811.0039, found 1811.0038.

$19\text{-}d_1\text{-}1'\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$  **1'**



19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C- AmB 脱保護前駆体 **28'** (18.2 mg, 10.1 μmol) をメタノール (1302 μL) に溶解させ、13.5% HF/pyridine (1026 μL) を加えて 50 °C で 30 時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、2% リン酸水素二カリウム水溶液、0.25 M 塩酸、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、溶媒を留去して 2MP-OMe-N<sub>3</sub>-AmB を得た。2MP-OMe-N<sub>3</sub>-AmB は精製することなく次の反応に用いた。

得られた 2MP-OMe-N<sub>3</sub>-AmB を THF/ 水 =2/1 の混合溶媒 (2.3 mL) に溶解させ、10-カンファースルホン酸 (123.3 mg, 530.8 μmol, 231 mM) を加え、室温で 6 時間攪拌した。反応液をトリエチルアミン (150 μL) で中和し、ODS カラム (COSMOSIL OPN-C18, MeOH/H<sub>2</sub>O =0/1 to 1/0) により脱塩を行い、溶媒を留去することで 19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-N<sub>3</sub>-AmB を得た。19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-N<sub>3</sub>-AmB は精製を行わずに次の反応に用いた。

19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-N<sub>3</sub>-AmB を THF/メタノール/水 =1/1/1 の混合溶媒 (900 μL) に溶解させ、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (6.0 mg, 20.9 μmol, 2.07 Eq) を加えて、室温で、12 時間攪拌した。反応液に酢酸 (18 μL) を加えた後、オープンカラムによるサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex LH20, CHCl<sub>3</sub>/ MeOH =5/3) に通し、脱塩を行った後、高速液体クロマトグラフィー (5C<sub>18</sub>-MS-2, 10ID × 250 mm, 3 mL/min, 5 mM AcONH<sub>4</sub> buffer/ MeOH = 3/7 to 0/1, 30 min gradient, *t*<sub>r</sub> = 12.5 min) により精製を行い、19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB **1'** (0.381 mg, 412.1 μmol, 4% in 3steps, DMSO 中の吸光度により定量)を得た。

19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB **1'**: yellow solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ6.50-6.02 (12H, m, heptaene), 5.97 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-20), 5.45 (1H, dd, *J* = 14.4, 9.6 Hz, H-33), 5.21 (1H, m, H-37), 4.46 (1H, d, *J*<sub>C-H</sub> = 171.5 Hz, H-1'), 4.26 (1H, m, H-11), 4.21 (1H, m, H-17), 4.19 (1H, m, H-17), 4.06 (1H, m, H-3), 3.99 (1H, m, H-15), 3.75 (1H, s, H-2'), 3.66 (1H, m, H-5), 3.51 (1H, m, H-9), 3.16 (1H, m, H-5'), 3.12 (2H, m, H-8, H-35), 3.04 (1H, m, H-4'), 2.59 (1H, m, H-3'), 2.27 (1H, m, H-34), 2.17 (3H, m, H-2ab, 18a), 1.87 (2H, m, H-14a, H-16), 1.73 (1H, m, H-36), 1.62-

1.23 (12H, m, H-4ab, H-6ab, H-7ab, H-10ab, H-12ab, H-18b, H36), 1.16 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-6'), 1.14 (1H, m, H-14b), 1.11 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-38), 1.04 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-40), 0.91 (3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-39);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  96.46 (labelled carbon); MS (ESI) calcd for  $\text{C}_{46}^{13}\text{CH}_{73}\text{DNO}_{17}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  926.5048, found 926.5043.

### $^{13}\text{C}$ $\{^2\text{H}\}$ REDOR 測定 of サンプル調製

2- $d_3$ - $^{13}\text{C}$ -alanine の粉末サンプルは以下のように調製した。2- $d_3$ - $^{13}\text{C}$ -L-alanine (Cambridge Isotope Laboratories. 3- $^{13}\text{C}$ : 99%, 2-D-96%) 6.0 mg と非標識の L-alanine 60.3 mg を水に溶解させ、凍結乾燥することで 1/11 希釈された 2- $d_3$ - $^{13}\text{C}$ -L-alanine 粉末を得た。このうち 11.7 mg を HR-MAS インサート (Bruker) に移し、MAS ローター( $\varphi = 4$  mm) に挿入した。

19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB/Erg/POPC = 1/0/7 のサンプルは以下のように調製した。19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB (0.75 mg, 0.810  $\mu\text{mol}$ ), POPC (4.3 mg, 5.67  $\mu\text{mol}$ ) を 20 mL バイアル中でクロロホルム/メタノール = 2/1 の混合溶媒に溶解させ、高速濃縮装置 V-10 (Biotage, Uppsala, Sweden) により溶媒を留去させることで脂質フィルムを形成させた。脂質フィルムを真空中で 10 時間乾燥させた後、水 (500  $\mu\text{L}$ ) と 10 mM HEPES buffer (5  $\mu\text{L}$ ) を加えた。ボルテックス、ソニケーションによりフィルムを水和、懸濁させた後、凍結融解を 5 回繰り返すことで MLV 懸濁液を調製した。MLV 懸濁液を凍結乾燥させた後、超軽水(50wt%)を加え、均一になるまで凍結融解を繰り返した。得られたリポソームペレットを HR-MAS インサート (Bruker) に移し、インサートをエポキシ樹脂により密封した後、MAS ローター( $\varphi = 4$  mm) に挿入した。

エルゴステロール含有膜による測定は上の手法で調製したサンプルを REDOR 測定に用いた後、insert 内のサンプルをバイアル中に回収し、エルゴステロール (0.32 mg, 0.81  $\mu\text{mol}$ ) を加えて 19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB/Erg/POPC = 1/1/7 とした後、凍結融解を行った。これをクロロホルム/メタノール=2/1 の混合溶媒に溶解させ、上と同様の手法によりサンプル調製を行った。

### $^{13}\text{C}$ $\{^2\text{H}\}$ REDOR 測定

$^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$  REDOR 測定は AVANCE400 ( $^2\text{H}$  共鳴周波数 : 61.441 MHz,  $^{13}\text{C}$  共鳴周波数 : 100.653 MHz,  $^1\text{H}$  共鳴周波数 : 400.249 MHz, Bruker) により、4 mm quadrupole resonance (1H/X/Y) MAS probe を用いた。測定は 30 °C、7 kHz

MAS 条件下で行い、Hong らに用いられたパルスシーケンス<sup>23</sup>を用いて測定した。<sup>13</sup>C 核の 180°パルス幅は 9.0  $\mu$ s、<sup>2</sup>H 核の 90°パルス幅は 6.5  $\mu$ s、<sup>1</sup>H デカップリングには spinal64 を用い、デカップリング強度は 61 kHz を用いた。<sup>13</sup>C 核の観測中心は 100.0 ppm、観測幅は 34.7 kHz を用いた。

#### REDOR 減衰曲線のシミュレーション

REDOR 減衰曲線は NMR のシミュレーションソフトウェア SIMPSON<sup>27</sup> を用いて計算した。4-3 に示した手法により、19-D, 19-C, O, 1'-C の 4 つの原子を三次元座標に配置し、 $\Phi=0\sim 180^\circ$ における(19-D)-(19-C)ベクトル、(19-D)-(1'-C)ベクトルを求めた他、(19-D)-(1'-C)間距離を計算した。SIMPSON のインプットファイルにこれらの情報より得られる四極子相互作用ベクトル、双極子相互作用ベクトルを x 軸、y 軸、z 軸に対する角度  $\alpha, \beta, \gamma$  の形に変換して入力し、双極子相互作用の大きさを(19-D)-(1'-C)間距離を基に計算して入力した。また、図 4-2b に示したパルスシーケンスを入力し、MAS 周期、パルス幅等の情報を実際の測定条件に合わせて入力した。実際のインプットファイルを次ページに、角度ごとに変化させたパラメーターの値を表 4-7 に示す。

SIMPSON インプットファイル（下線太字が二面角によって変わるパラメータ）

```
spinsys {      channels 13C 2H

nuclei  13C 2H
dipole  1 2 b αD βD γD
shift   1 10p 0p 0.5 0 0 0
quadrupole 2 1 166666 0 αQ βQ γQ }
par {variable index  1
    np                32
    spin_rate         7000

    proton_frequency 400e6

    start_operator    I1x
    detect_operator   I1p
    method            direct
    crystal_file      zcw4180
    gamma_angles      8
    sw                spin_rate/2
    variable tsw      1e6/sw
    verbose           1101

    variable tr       1e6/spin_rate
    variable tr2      0.5e6/spin_rate

    variable rf13C    55556
    variable t180C    0.5e6/rf13C

    variable rfD      38461

    variable t90D     0.25e6/rfD
    variable t180D    0.5e6/rfD}

proc pulseseq {} {
    global par
```

```
set d1 [expr $par(tr2)-$par(t180C)]
set d2 [expr $par(tr2)-$par(t90D)*3/2]
```

```
reset
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) x 0 0
```

```
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) y 0 0
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) x 0 0
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) y 0 0
store 1
```

```
reset
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) x 0 0
delay $d2
pulse $par(t90D) 0 0 $par(rfD) x
pulse $par(t90D) 0 0 $par(rfD) y
pulse $par(t90D) 0 0 $par(rfD) x
delay $d2
pulse $par(t180C) $par(rf13C) x 0 0
```

```
delay $d1
store 2
reset
pulse $par(t180C) $par(rf13C) x 0 0
```

```
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) y 0 0
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) x 0 0
delay $d1
pulse $par(t180C) $par(rf13C) y 0 0
```

```

delay $d1
  store 3
reset

acq
  for {set i 1} {$i < $par(np)-1} {incr i} {
    reset
  }
prop 1
  prop 2
  prop 3
  store 2
  acq
}
}

proc main {} {
global par

  set f [fsimpson]
fsave $f $par(name).fid
}

```

表 4-7 SIMPSON のインプットファイルに代入したパラメーター

$\Phi$ (°)	双極子カップ リング	双極子相互作用ベクトル-座標軸 間の角度 (°)			四極子相互作用ベクトル-座標軸 間の角度(°)		
	b (Hz)	$\alpha_D$	$\beta_D$	$\gamma_D$	$\alpha_Q$	$\beta_Q$	$\gamma_Q$
0	-344.441	85.06356	90	4.93644	18.5	90	108.5
20	-330.746	86.91298	100.1397	10.60872	18.5	90	108.5
40	-295.984	91.96211	108.5928	18.70363	18.5	90	108.5
60	-253.326	99.07932	114.0702	25.93292	18.5	90	108.5
80	-213.469	107.1108	115.981	31.85055	18.5	90	108.5
100	-181.366	115.1495	114.5136	36.43677	18.5	90	108.5
120	-157.905	122.4861	110.3895	39.80664	18.5	90	108.5
140	-142.284	128.4728	104.4637	42.09851	18.5	90	108.5
160	-133.425	132.4539	97.47427	43.42601	18.5	90	108.5
180	-130.562	133.8605	90	43.86048	18.5	90	108.5
(alanine)	-453.690	138.5102	90	48.5102	0	90	90

参考文献

- 1) (a) 中川泰男 平成 26 年度 学位論文 大阪大学大学院理学研究科 (b) 中川泰男 平成 23 年度 修士論文 大阪大学大学院理学研究科
- 2) (a) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Matsushita, N.; Yamamoto, T.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2016**, *55*, 3392–3402. (b) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry*, **2012**, *51*, 83–89.
- 3) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.
- 4) Wilcock, B. C.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8488–8491.
- 5) Croatt, M. P.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1390–1393.
- 6) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 11977–11984.
- 7) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667–10675.
- 8) (a) Neumann, A.; Baginski, M.; Czub, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18266–18272. (b) Czub, J.; Neumann, A.; Borowski, E.; Baginski, M. *Biophys. Chem.*, **2009**, *141*, 105–116.
- 9) Nicolaou, K. C.; Danies, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *110*, 4696.
- 10) Szpilman, A. M.; Cereghetti, D. M.; Manthorpe, J. M.; Wurtz, N. R.; Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7117–7128.
- 11) Manthorpe, J. M.; Szpilman, A. M.; Carreira, E. M. *Synthesis*, **2005**, *19*, 3380–3388.
- 12) 山本 智也 平成 25 年度 修士論文 大阪大学大学院理学研究科
- 13) 松下 直広 平成 20 年度 学位論文 大阪大学大学院理学研究科
- 14) Lemieux, R. U.; Koto, S. *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 1933–1944.
- 15) Woodcock, H. L.; Moran, D.; Pastor, R. W.; MacKerell Jr., A. D.; Brooks, B. R. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1–10.
- 16) Cruz-Gregorio, S.; Hernandez, L.; Vargas, M.; Quintero, L.; Sartillo-Piscil, F. *J. Mex. Chem. Soc.*, **2005**, *49*, 20–23.
- 17) Balbach, J. J.; Ishii, Y.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Rizzo, N. W.; Dyda, F.; Reed, J.; Tycko, R. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13748–13759.
- 18) Yao, X. L.; Hong, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4199–4210.

- 19) Kim, S. J.; Singh, M.; Preobrazhenskaya, M.; Schaefer, J. *Biochemistry*, **2013**, *52*, 3651-3659.
- 20) Gullion, T *Modern Magnetic Resonance 'Rotational-Echo, Double Resonance NMR'* **2008**, 713-718.
- 21) Xie, L.; Ghosh, U.; Schmick, S. D.; Weliky, D. P. *J. Biomol. NMR* **2013**, *55*, 11-17.
- 22) Gullion, T.; Kishore, R.; Asakura, T. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 7510-7511.
- 23) Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong, M. *Nature* **2010**, *463*, 689-692.
- 24) Sack, I; Balazs, Y. S.; Rahimipour, S.; Vega, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12263-12269.
- 25) Sack, I; Goldbourt, A.; Vega, S.; Buntkowsky, G. *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 54-65.
- 26) Lehmann, M. S.; Koetzle, T. F.; Hamilton, W. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 2657-2660.
- 27) Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.
- 28) Jarzemska, K. N.; Kamiński, D.; Hoser, A. A.; Malińska, M.; Senczyna, B.; Woźniak, K.; Gagoś, M. *Cryst. Growth & Des.* **2012**, *12*, 2336-2345.
- 29) Yao, X. L.; Schmidt-Roh, K.; Hong, M. *J. Magn. Reson.* **2001**, *149*, 139-143.
- 30) Takegoshi, K.; Nomura, K.; Terao, T. *Chem. Phys. Lett.*, **1995**, *232*, 424-428.
- 31) Takegoshi, K.; Nakamura, S.; Terao, T. *Chem. Phys. Lett.*, **2001**, *344*, 631-637.

## 第五章 結 論

本学位論文では、AmB が形成するチャネル複合体について、その分子内構造情報に着目した構造解析を行った。

まず、ポリオール部分の構造活性相関研究では、Dublin 大学の Caffrey 教授および Leicester 大学の Rawlings 博士より提供して頂いた 7-oxo-AmB を原料とし、ポリオール部分の構造を変化させた新規標識体である 7 $\alpha$ -OH-AmB および 7 $\beta$ -OH-AmB を調製し、溶血活性およびイオン透過活性試験を行った。これらの結果とマクロモデルによる配座探索より、C6-C7 結合の *anti gauche* の配座交換が活性に重要であることを提唱した。またチャネル複合体中では C6-C7 結合が *anti* 配座を取るという新たなモデルを提唱するに至った。

マクロラクトン環の配向解析では、マクロラクトン環の配向解析に有用な新規二重標識体 14 $\beta$ F-*d*<sub>3</sub>-AME を調製した。この標識体は活性試験および UV スペクトル測定の結果より、AmB と似た挙動を示すことが明らかとなり、固体 NMR による脂質膜中の配向解析に適用した。<sup>2</sup>H NMR による四極子分裂幅および、<sup>19</sup>F NMR による CSA の解析より、マクロラクトン環は膜法線に対しほぼ平行に配向しているという結果が得られた。この結果から、今回の測定条件では、Burke らによって提唱されたステロールスポンジモデルではなく、従来提唱されてきた樽板型モデルに近い複合体構造を取ることが強く示唆された。また、マイコサミン部分を脂質膜表面に向けて配向することから、マイコサミン部分と脂質頭部との間の相互作用がチャネル形成に重要であることが示唆された。過去の中川らによる AmB-AmB 間の REDOR 測定では二種類のチャネル構造が提唱されていたが、今回の配向情報を元に、マイコサミン部分を膜表面に向けたチャネル構造が実際のチャネル構造に近いことが示唆された。

また、 $\beta$  グリコシド結合の配座解析では、<sup>13</sup>C {<sup>2</sup>H} REDOR を用いて  $\beta$  グリコシド結合の配座解析を行うべく、新規二重標識体である 1'-<sup>13</sup>C-19-*d*<sub>1</sub>-AmB を合成した。これを用いて REDOR 測定を行い、二面角 D19-C19-O-C1' が 53° $\pm$ 12° であると推定することができた。これまで配座が測定できず相互作用の推定が困難であったマイコサミン周辺の配座決定に向けて端緒となる測定を行うことができた。今後更なる測定を行うことで、より精度の高い配座決定に至ると考えられる。

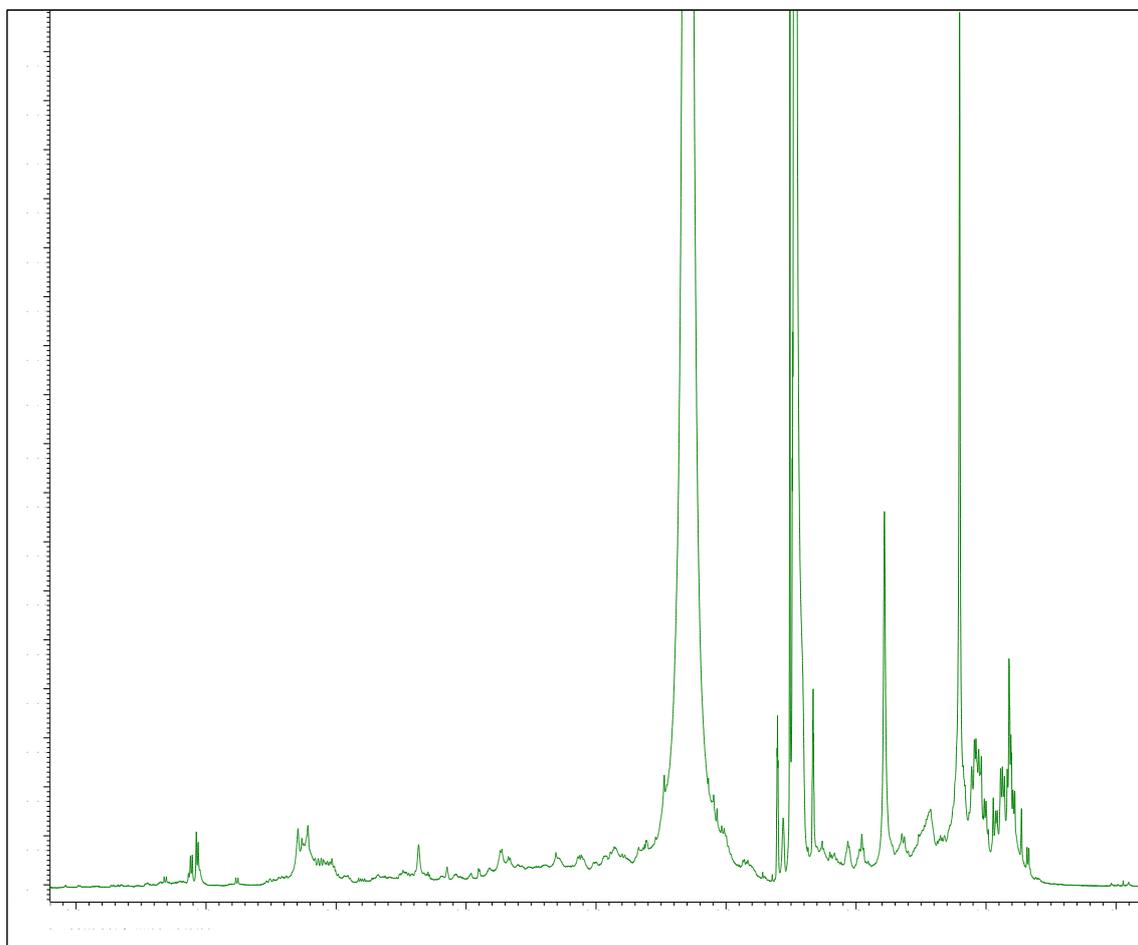
これらの研究によって、これまで AmB のチャネル複合体の構造解析では言及されなかった分子内構造情報を得るに至り、より精度の高いチャネル複合体構造を算出することができると予想される。一方で、固体 NMR で得られるチャネル構造は、測定のタイムスケール内で高速で変化しているチャネル複合体構造の平均的な構造であり、実際に膜中で形成されているチャネル構造と区別して

議論する必要がある。例えば、固体 NMR によって得られる平均化されたチャンネル構造は対称構造と仮定できる一方で、実際のチャンネルの構造は非対称になっていると考えられる。よって、固体 NMR によって得られる構造に比べて、実際のチャンネル構造はチャンネル内径等に違いがあり、この解釈について更なる議論が必要である。固体 NMR で得られた平均的なチャンネル構造と MD 計算によって得られるチャンネル構造のスナップショットを比較することで、実際に形成されるチャンネル複合体構造の実態やチャンネル複合体中での相互作用についての更なる理解が期待される。

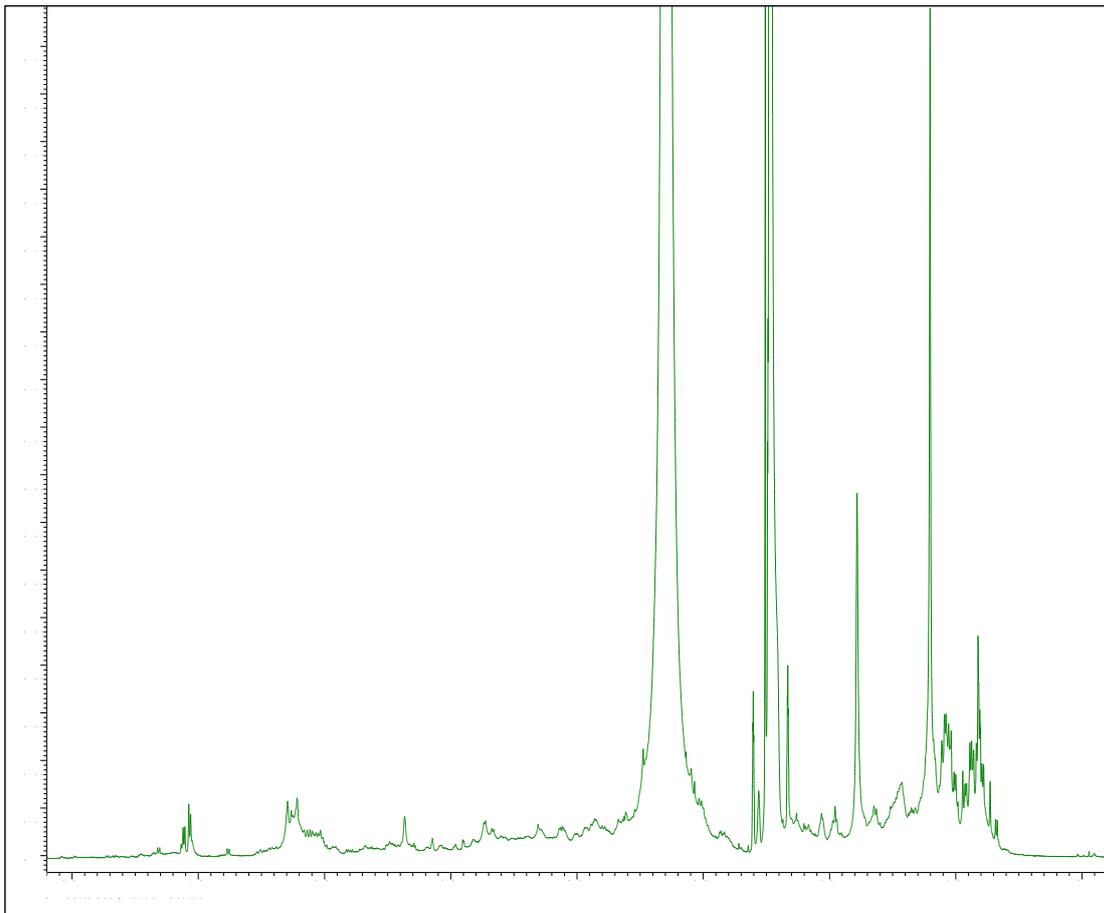
また、マクロラクトン環の配向解析や、マイコサミン部分の配座解析は、AmB が持つ官能基の役割を理解する上で重要であり、今後様々な条件での測定を行うことで、チャンネル複合体中での相互作用の予測が可能になるだろう。マクロラクトン環の配向解析で提唱したマイコサミン-脂質頭部間の相互作用については、異なる脂質を用いたりポソームで測定を行うことでより詳細な相互作用様式が明らかになると予想される。また、マイコサミン部分はステロール選択性に寄与していることが予想されるため、コレステロール膜中など、膜に含まれるステロールの種類を変化させて配座解析を行うことで、ステロール-マイコサミン間の相互作用について新たな情報が得られると考えられる。このような相互作用の解明に発展できる重要な測定手法を、今回の研究で開発することができたと言える。

スペクトルの部

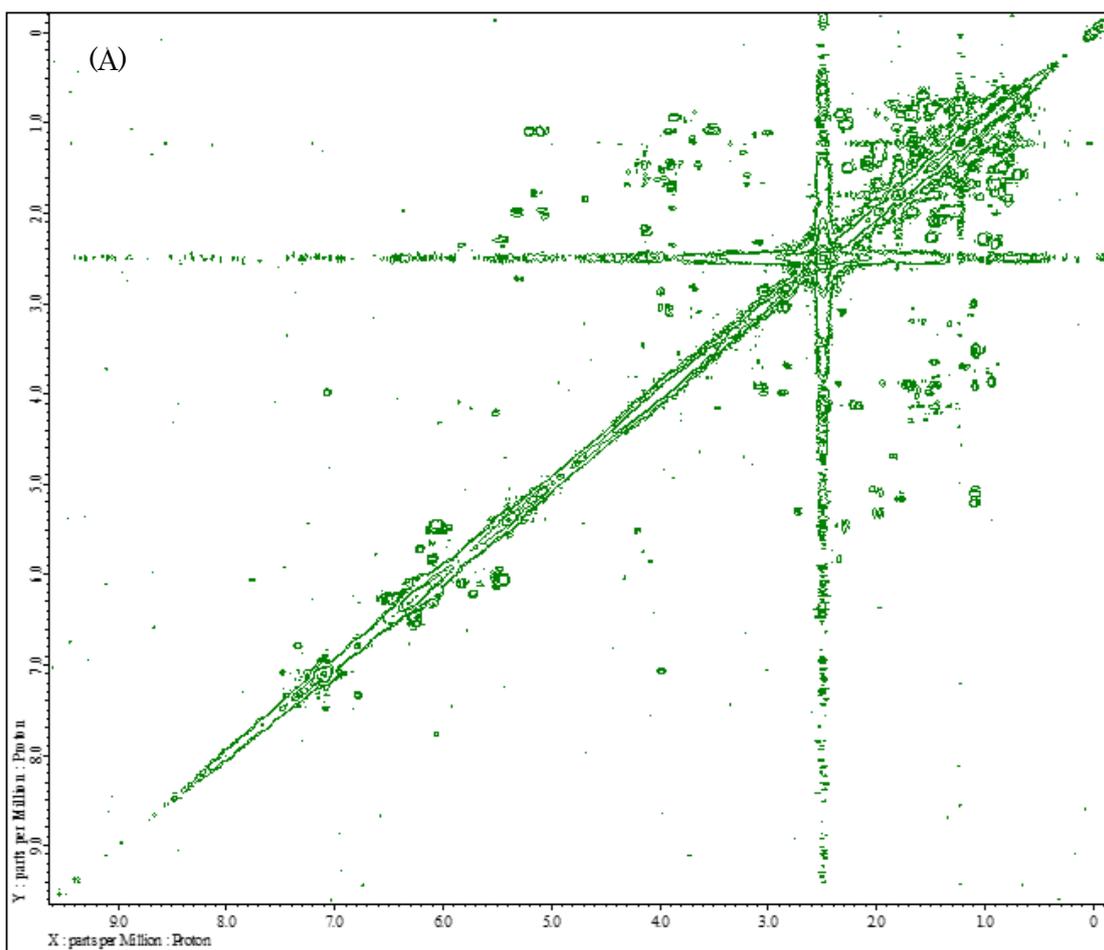
第二章



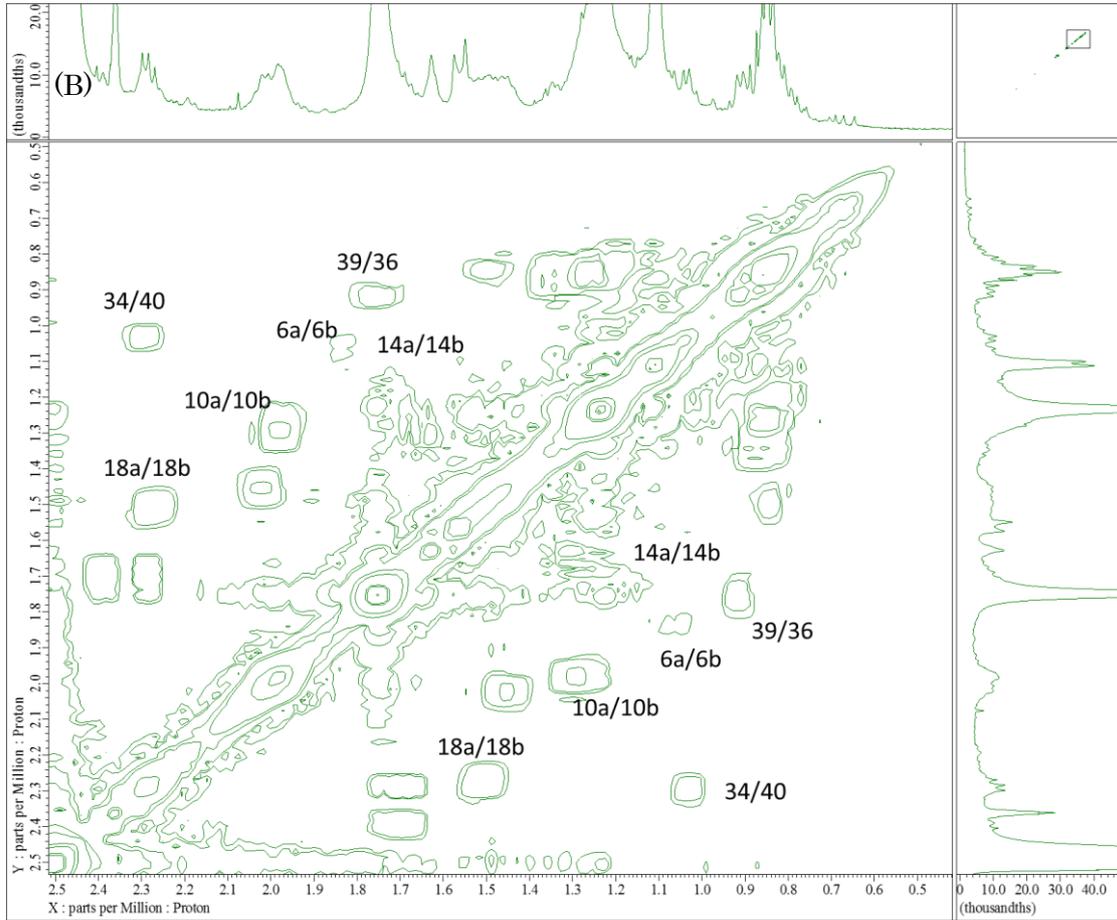
7α-OH-AmB 3 の <sup>1</sup>H NMR スペクトル。DMSO-d<sub>6</sub> 中で測定。



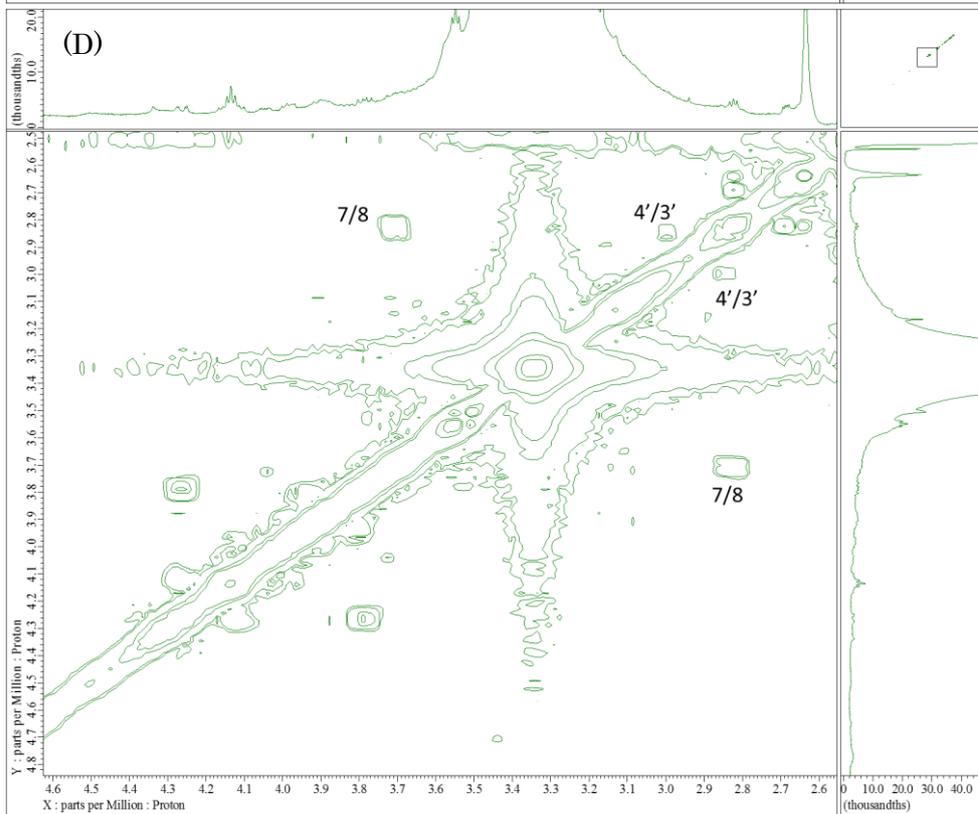
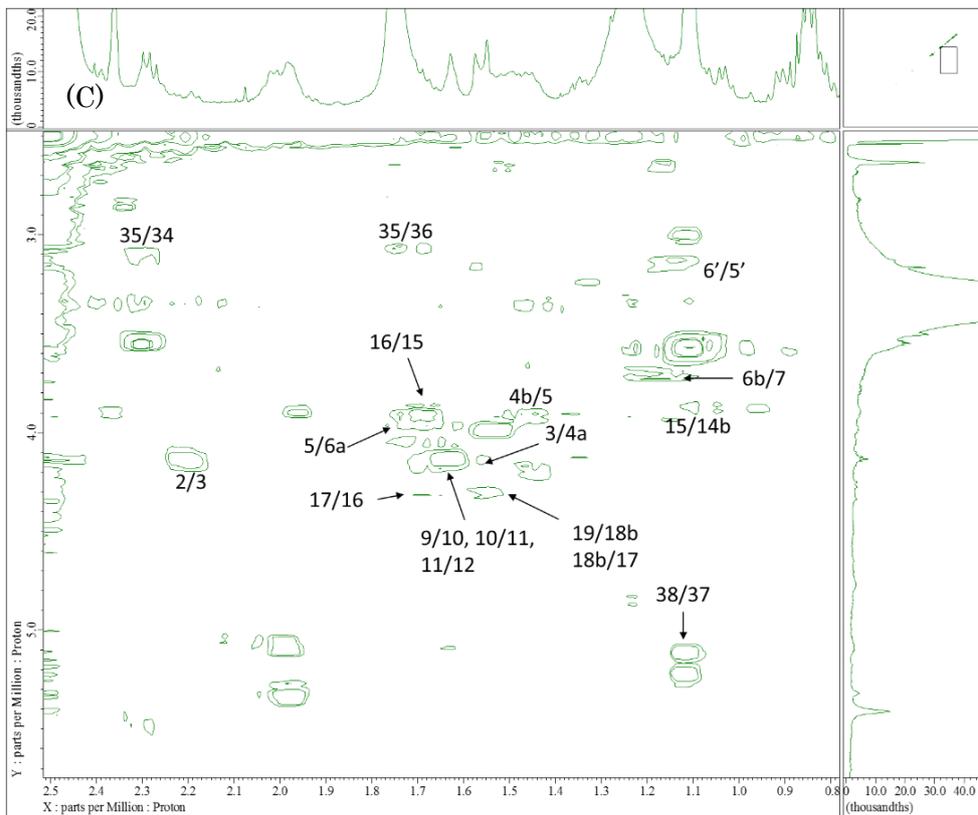
7β-OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル。 DMSO- $\text{d}_6$  中で測定



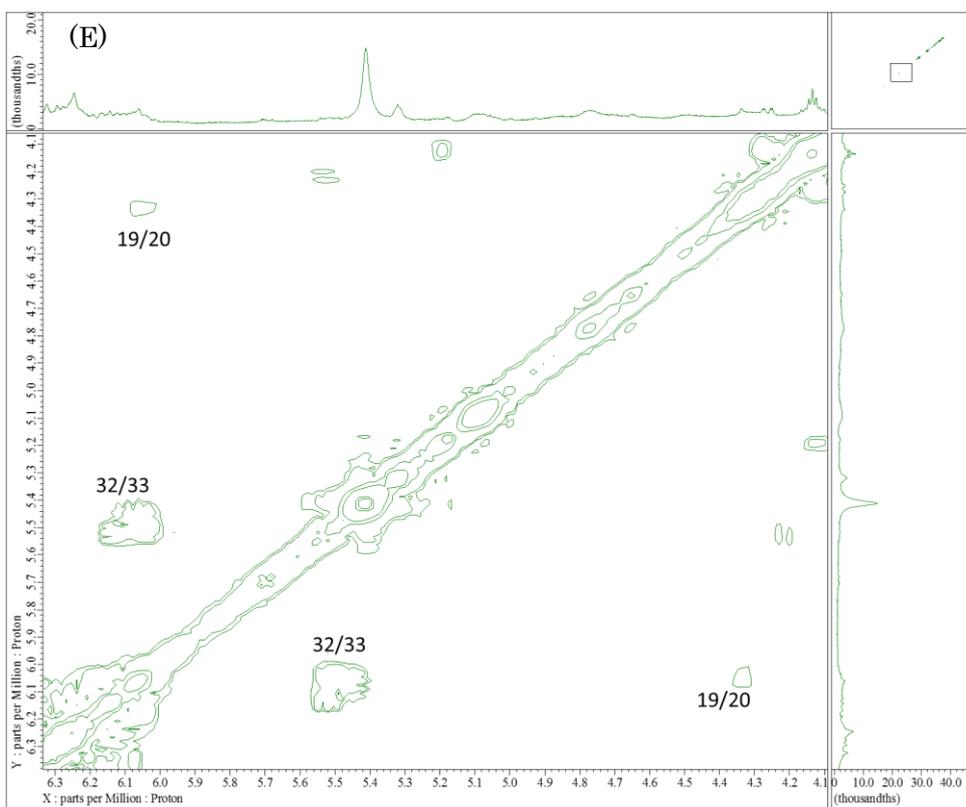
7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



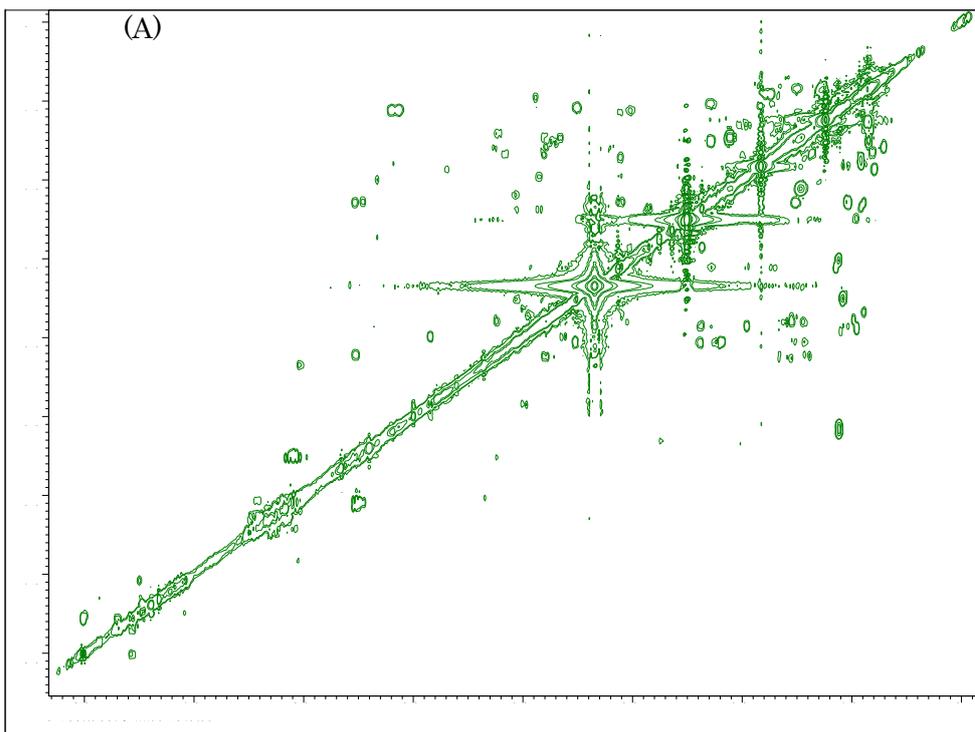
7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



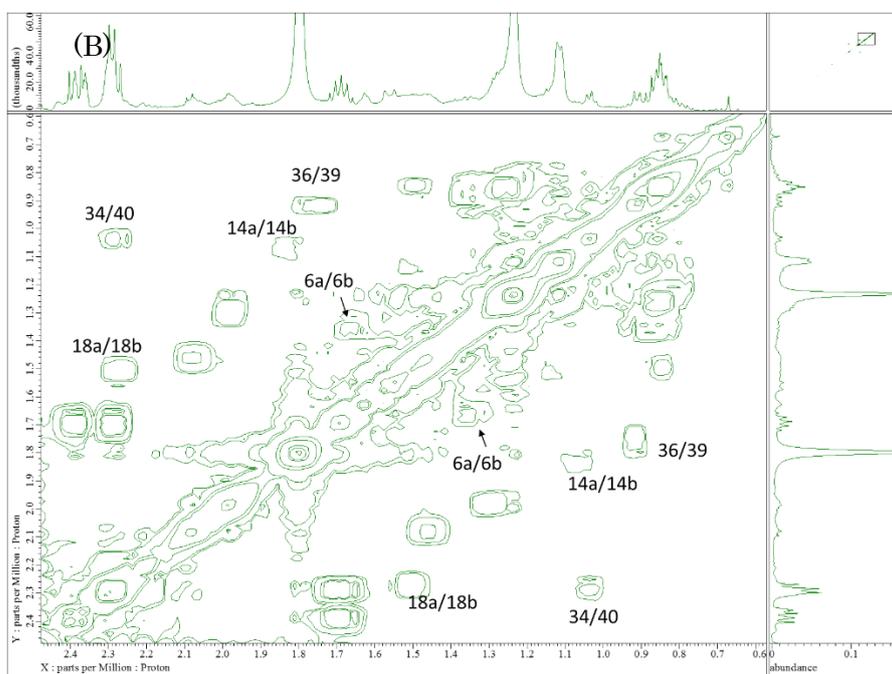
7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



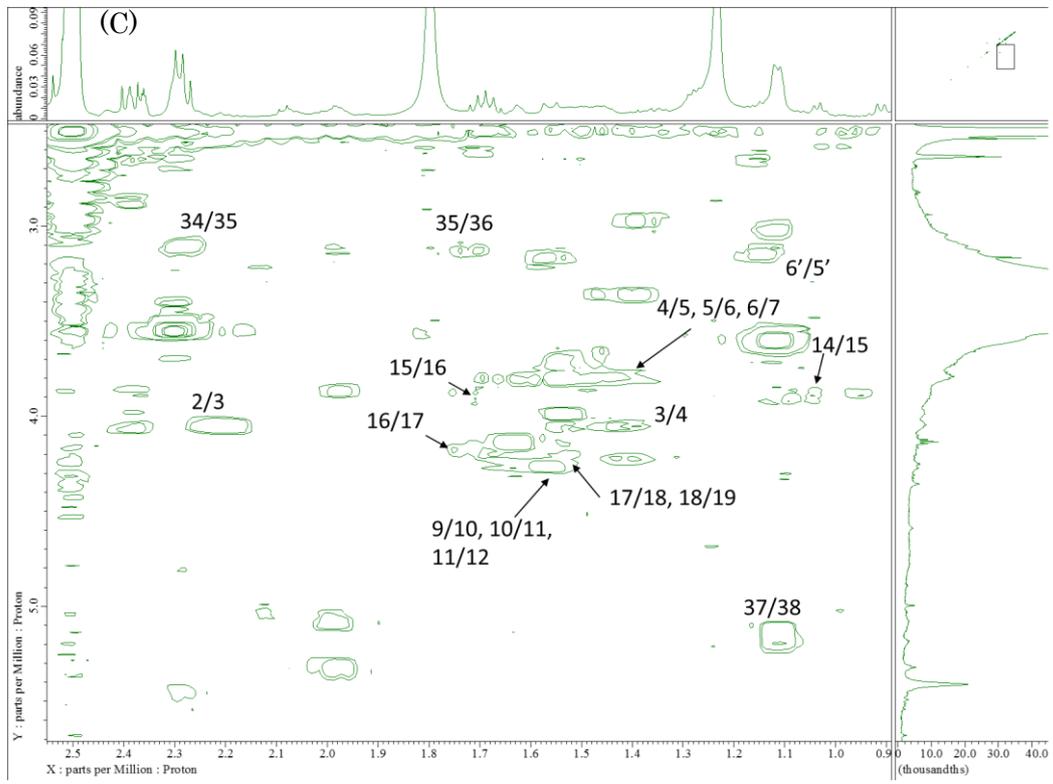
7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



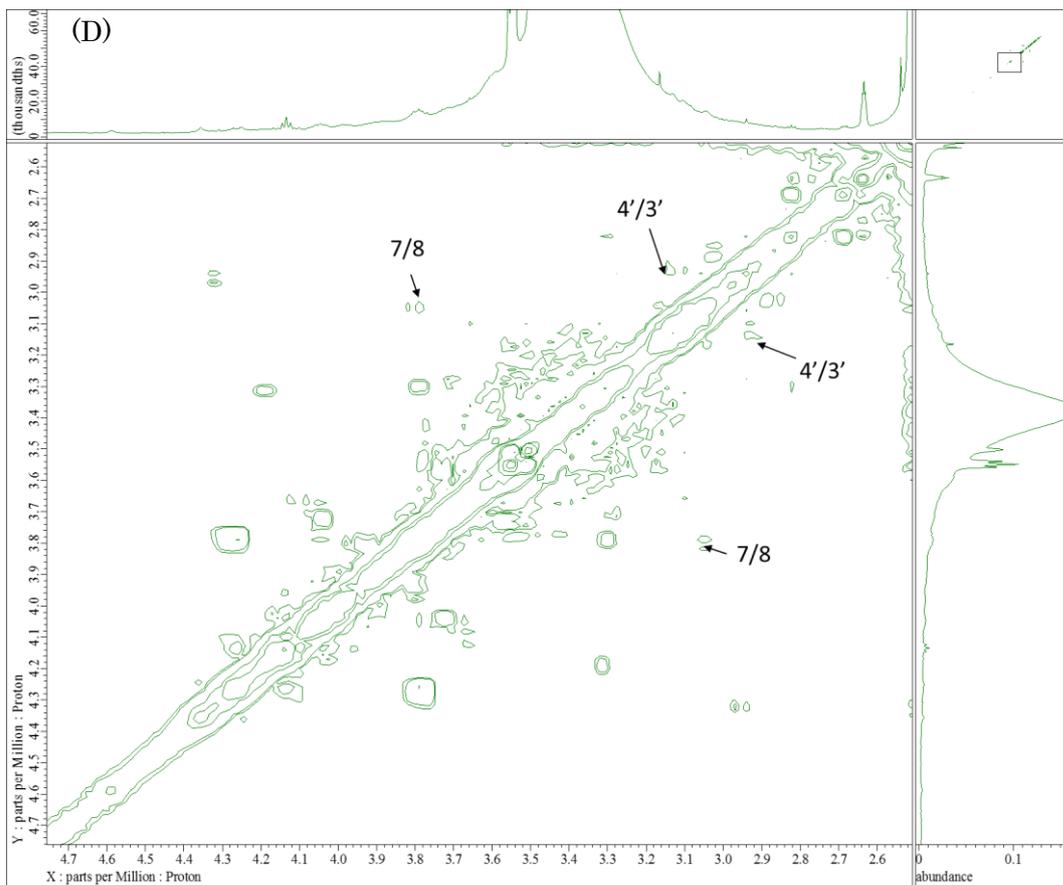
7β-OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



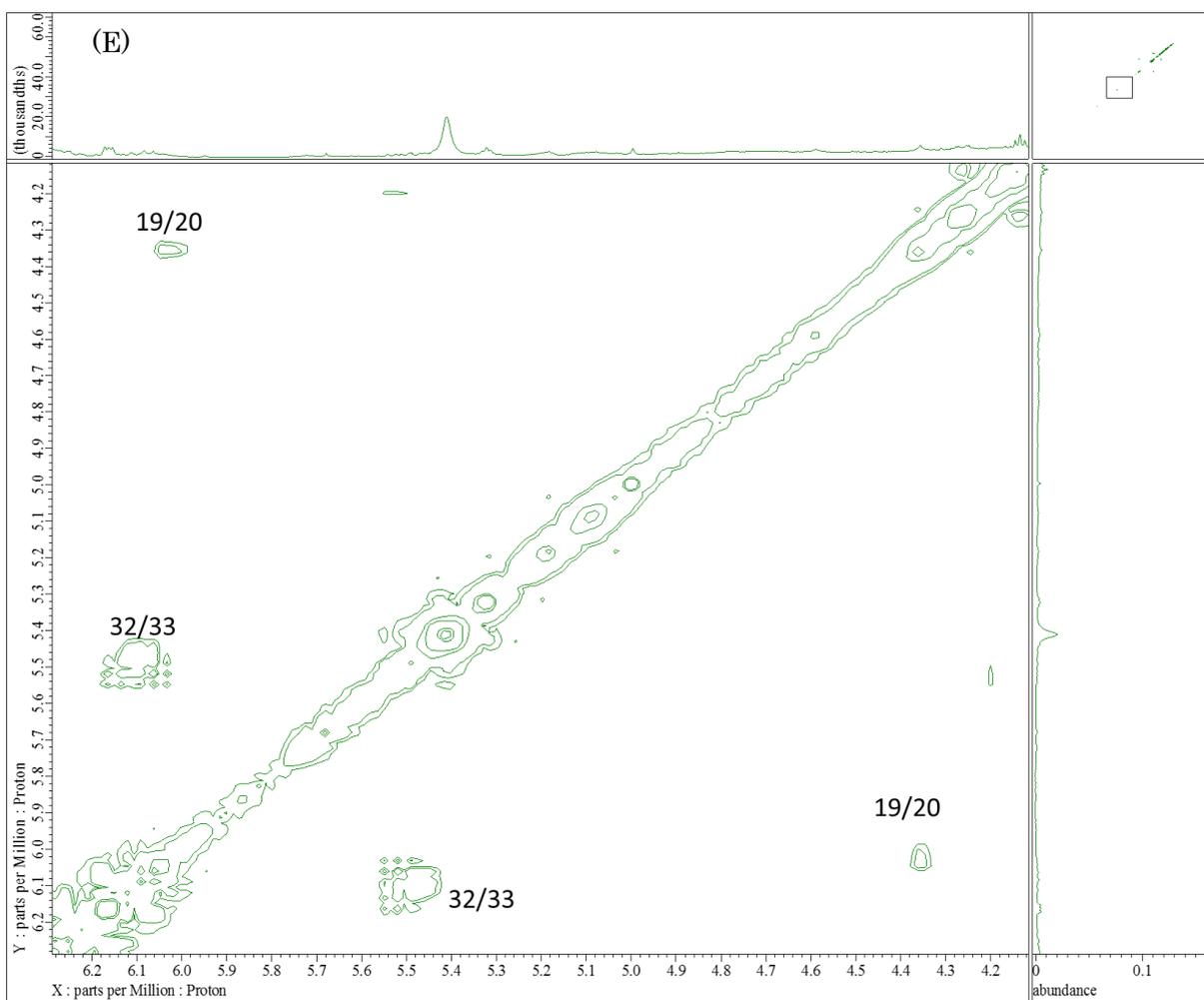
7β-OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



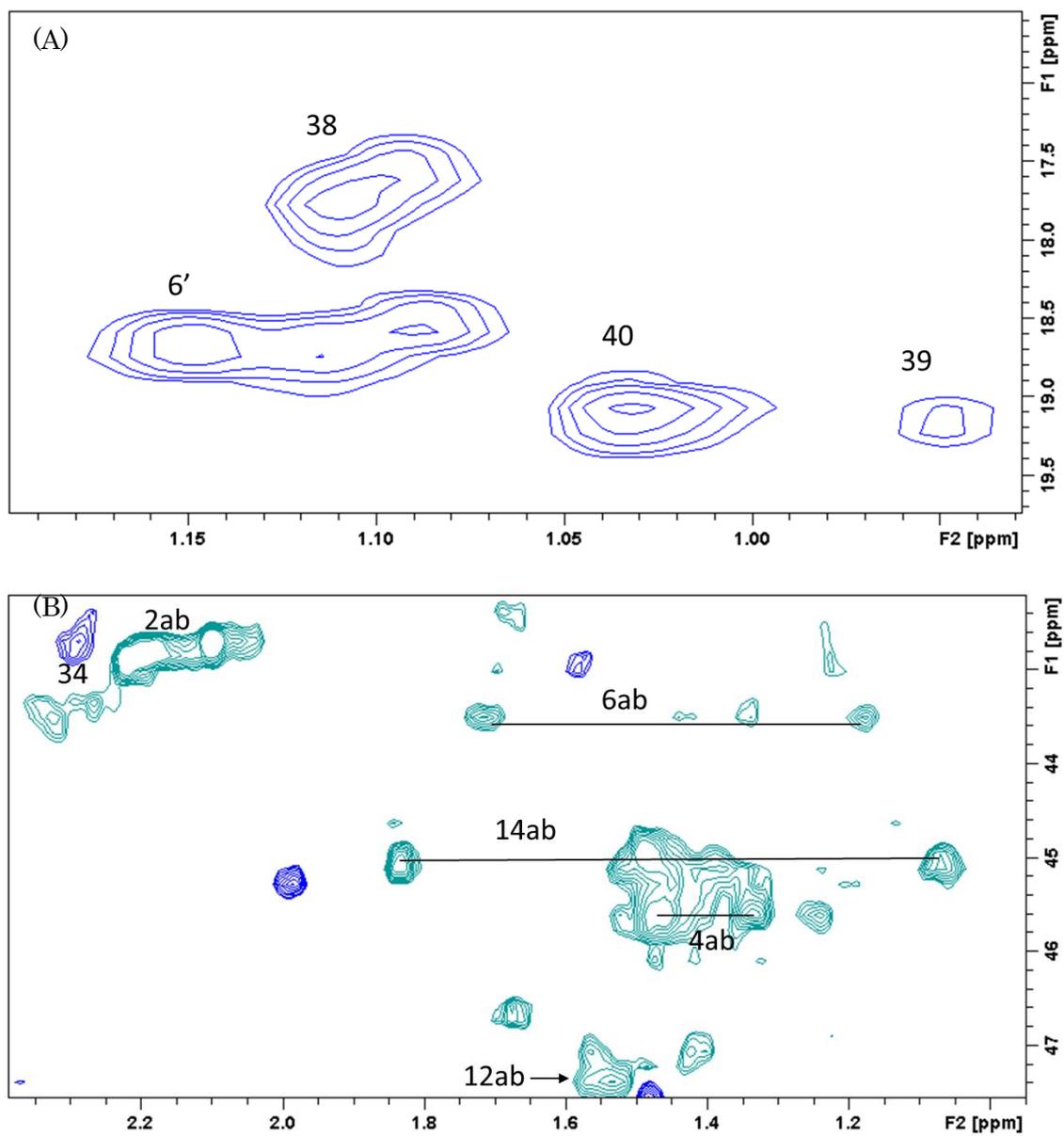
7  $\beta$ -OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



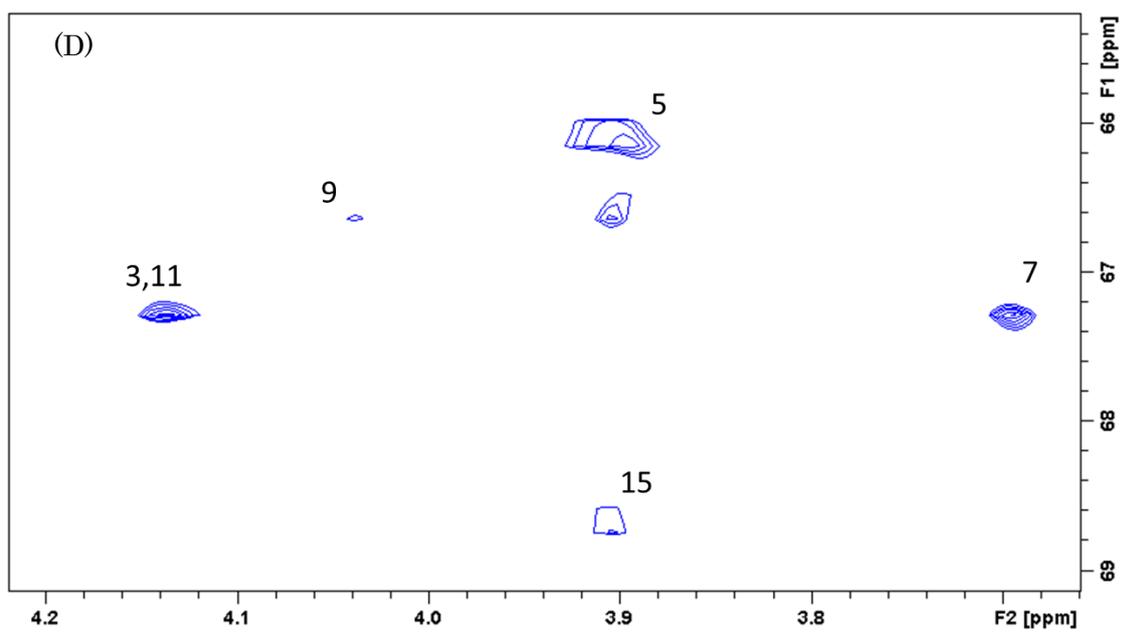
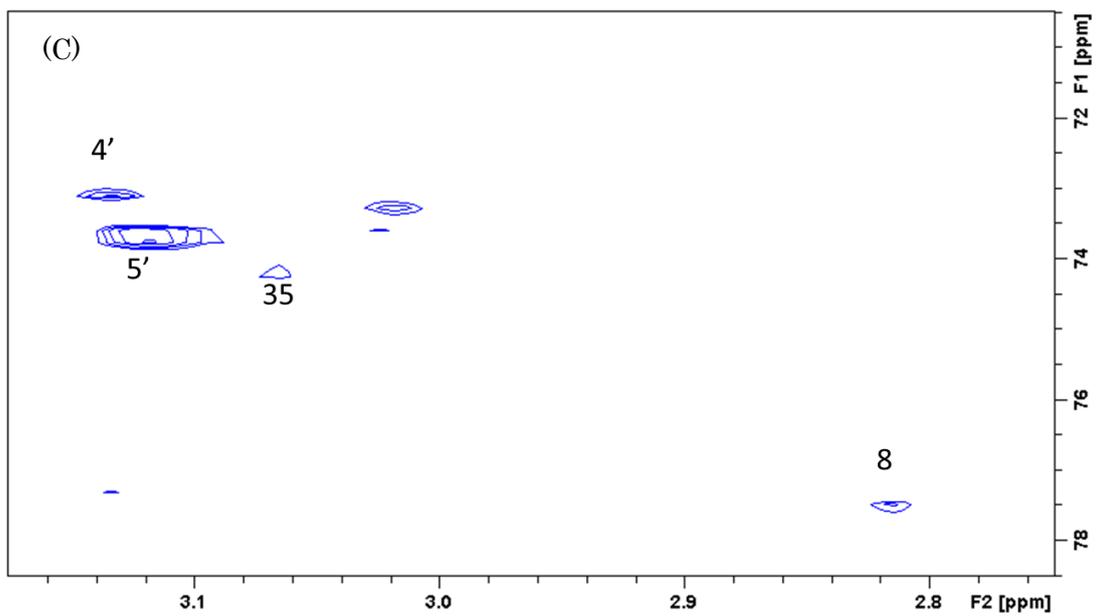
7β-OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



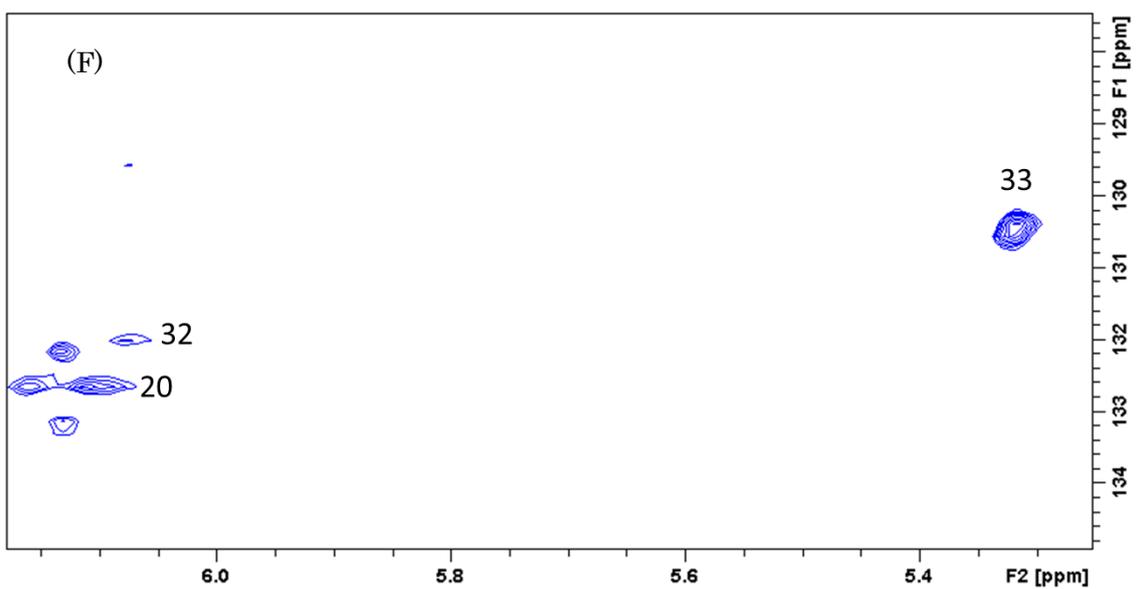
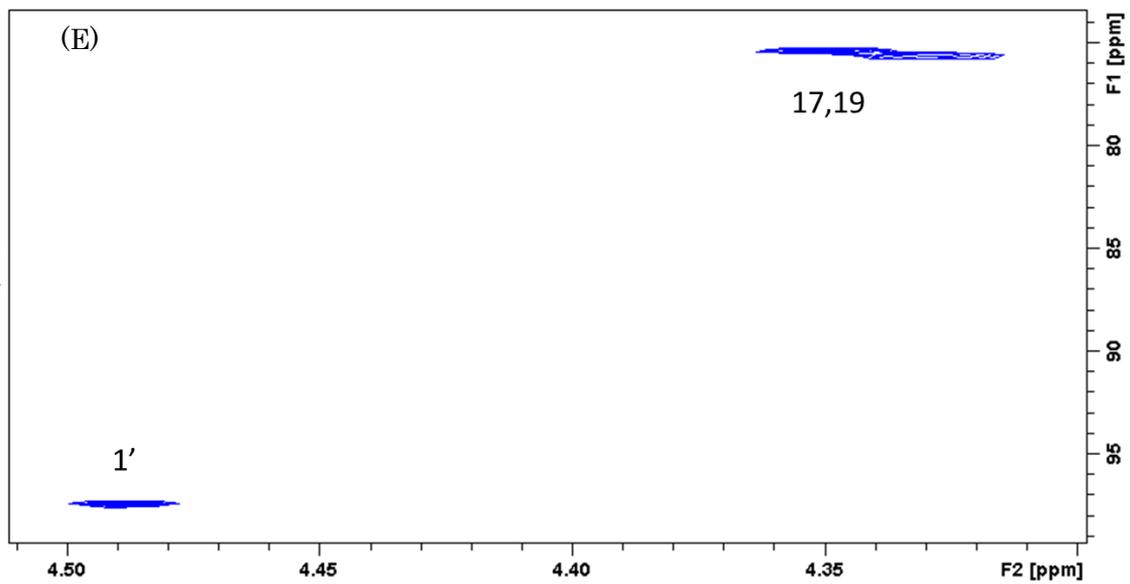
7β-OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



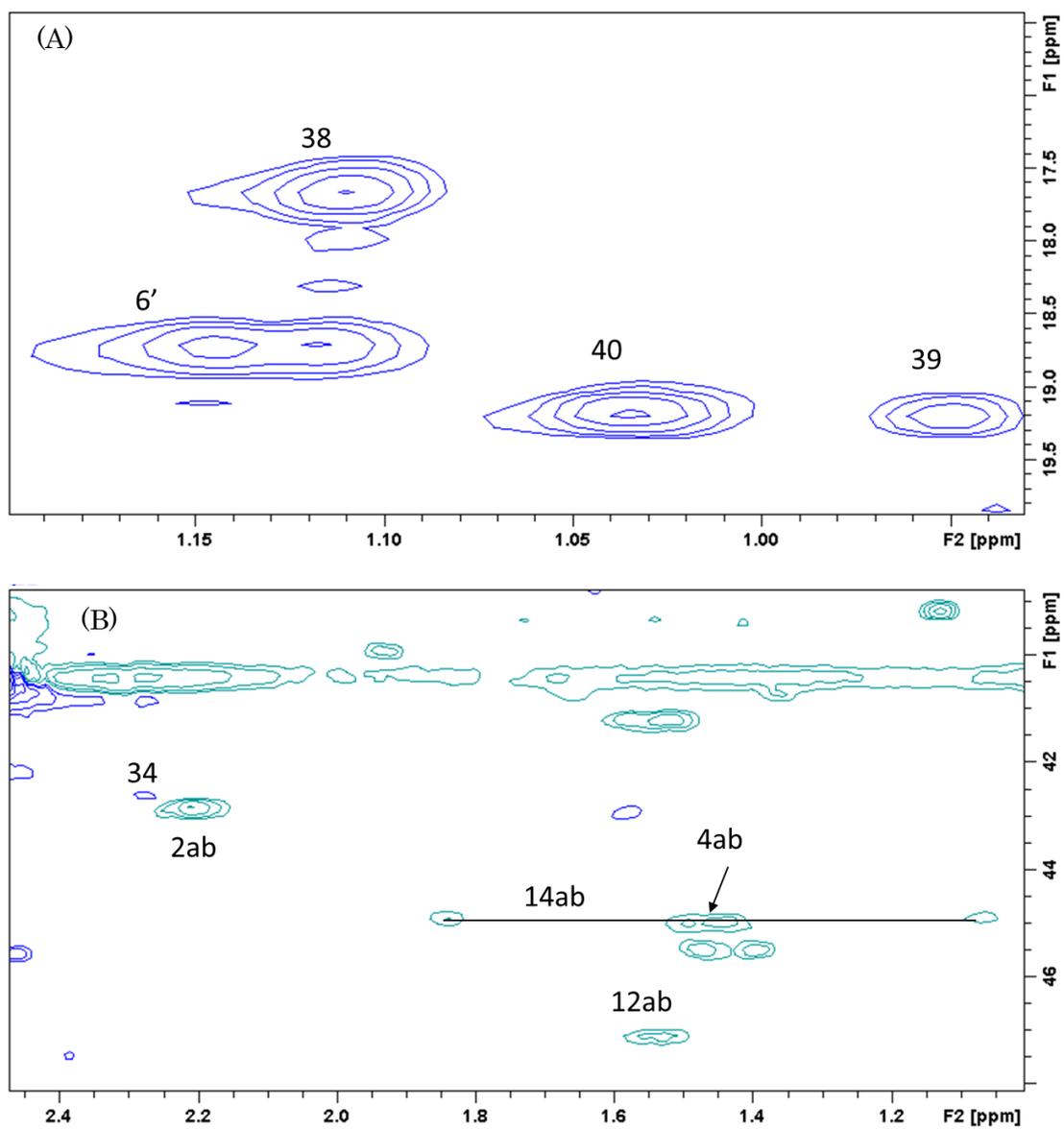
7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



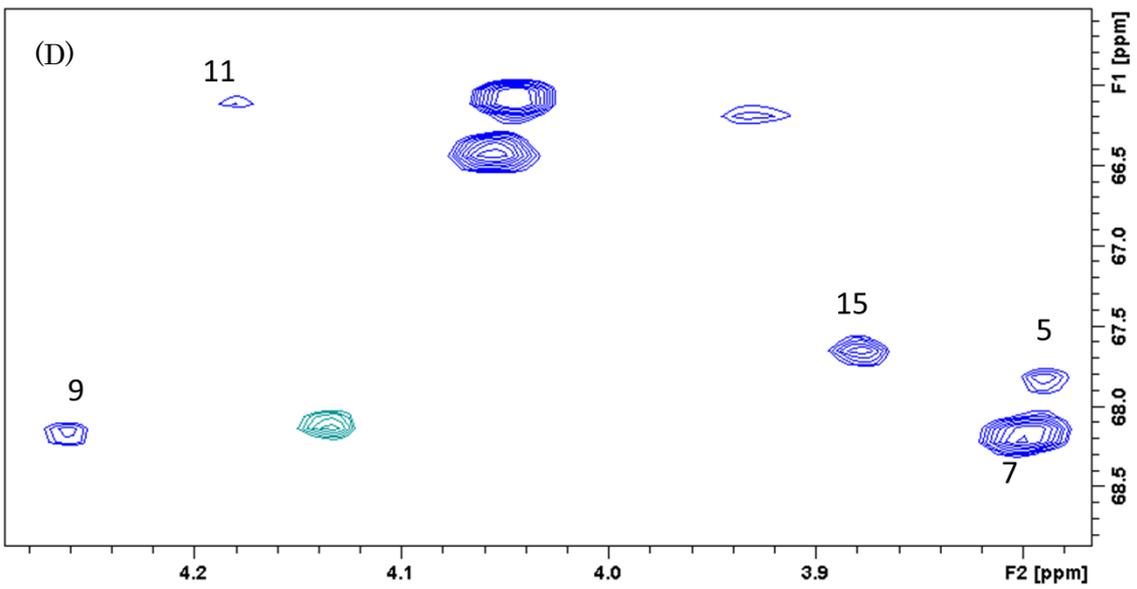
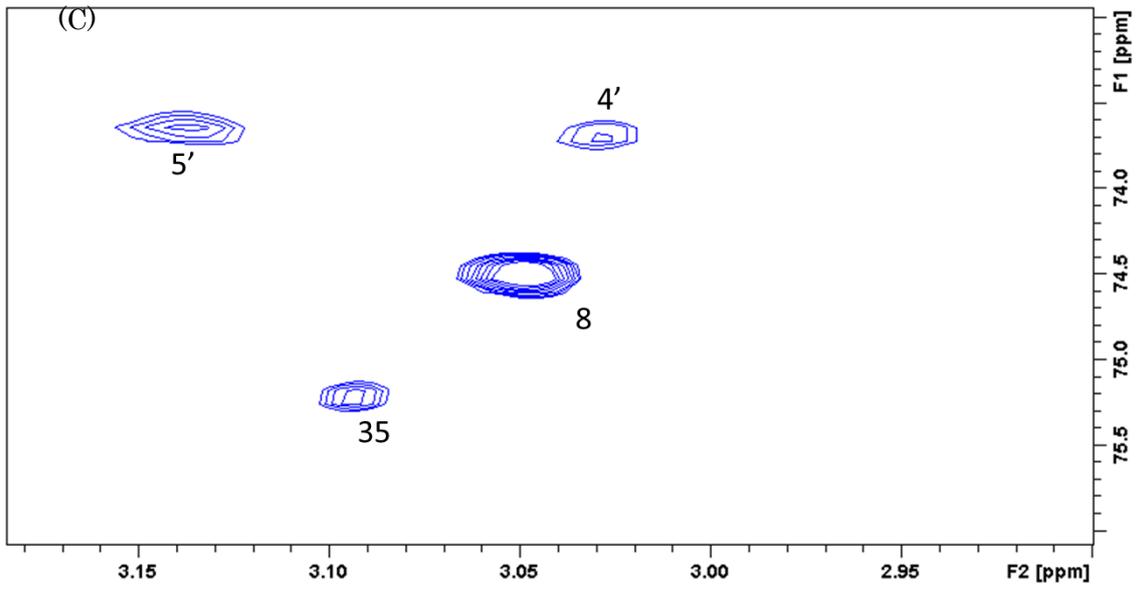
7  $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



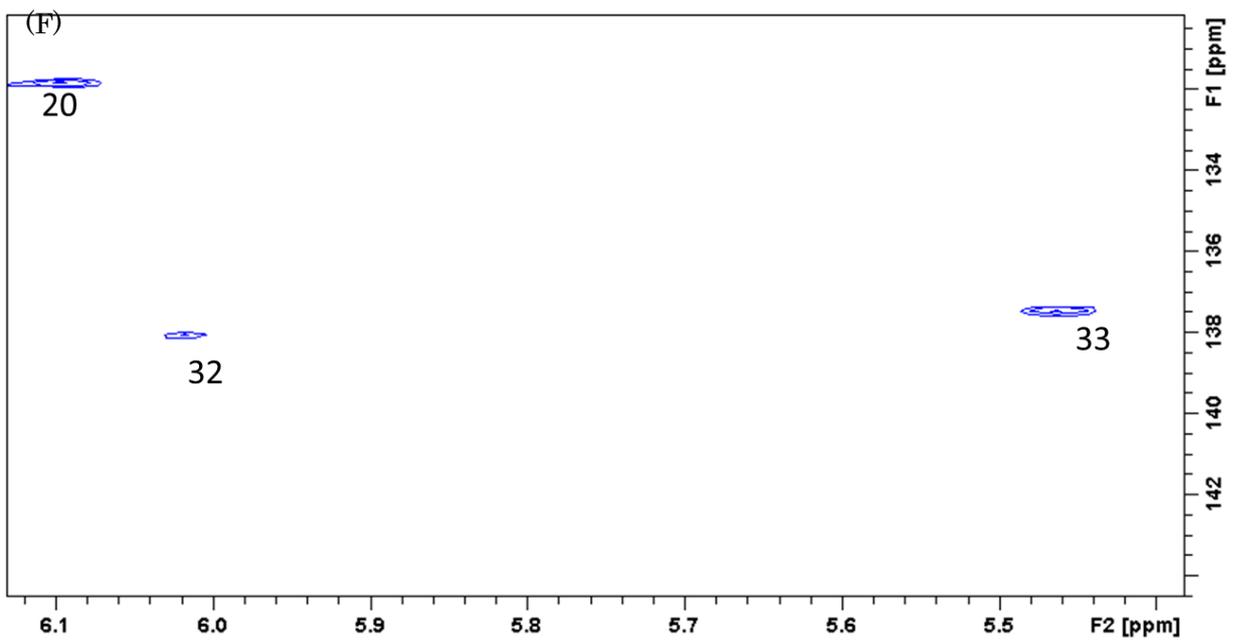
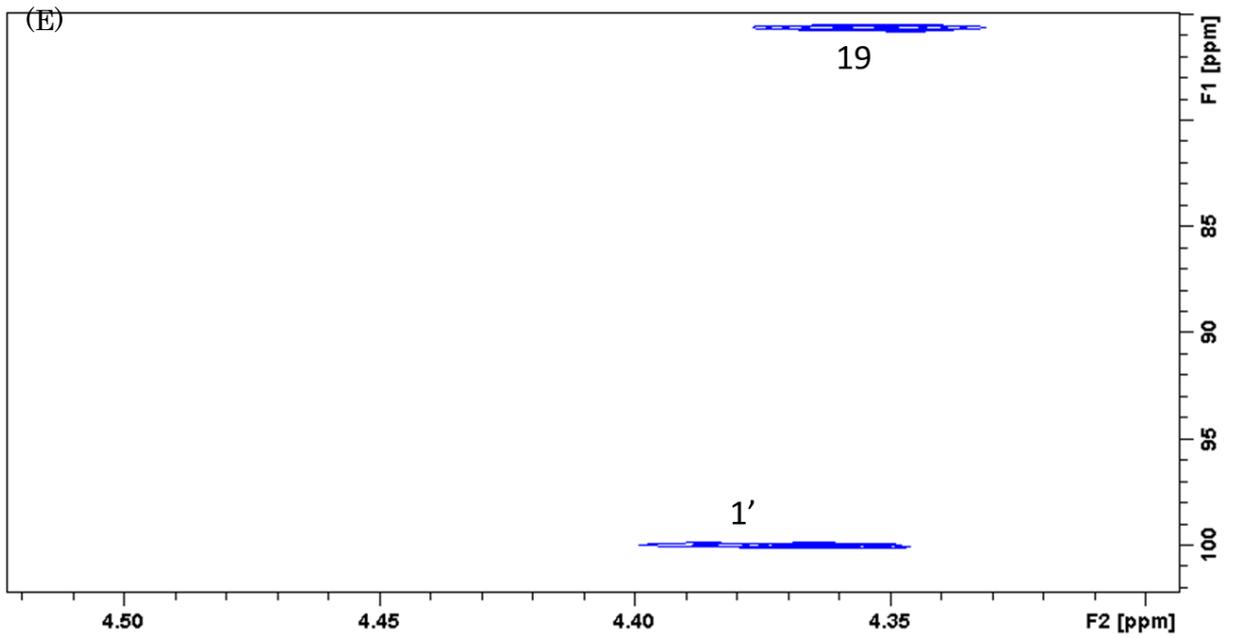
7 $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



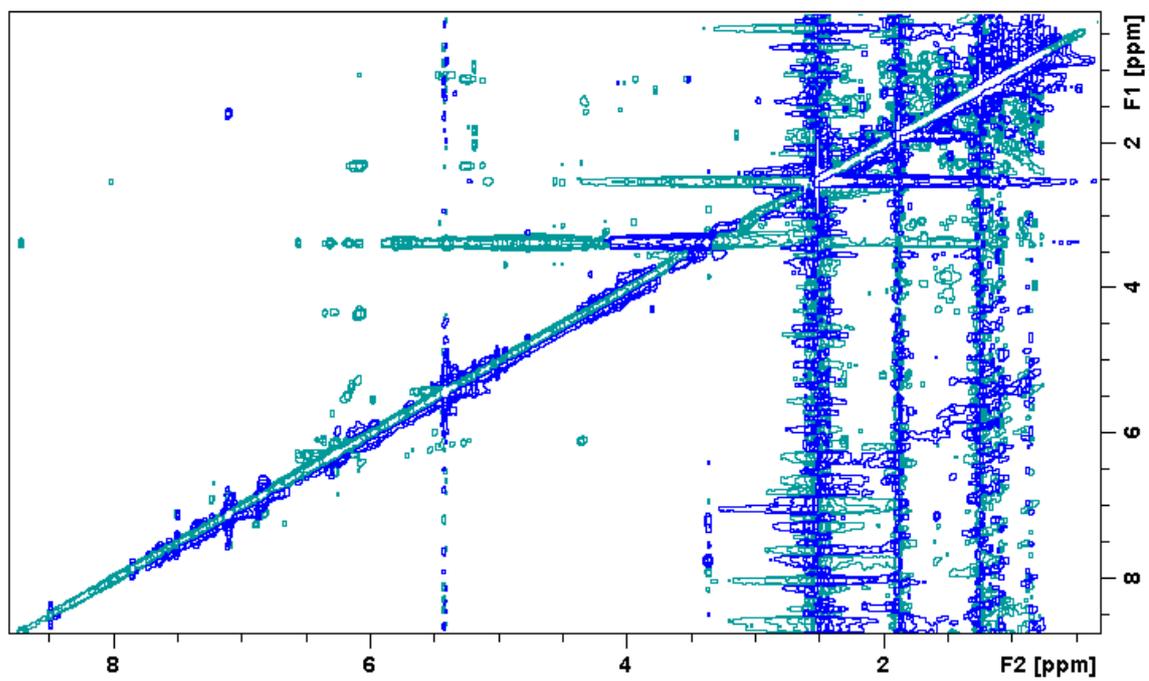
7  $\beta$ -OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



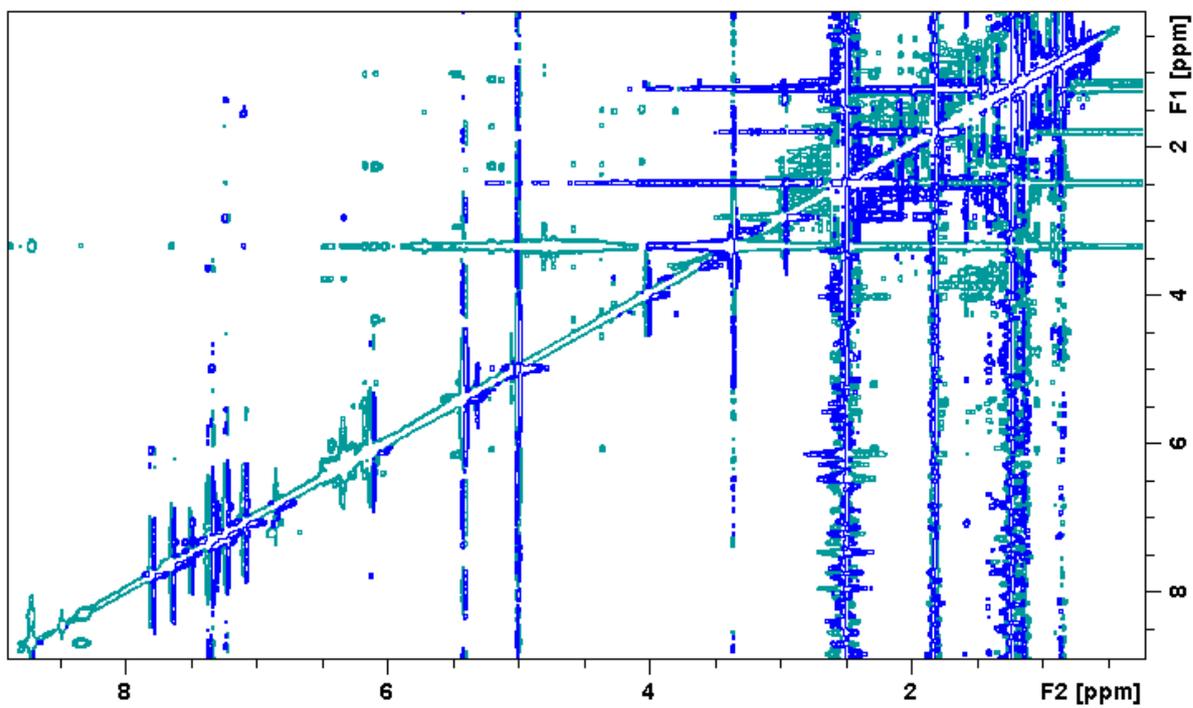
7  $\beta$ -OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



7β-OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。

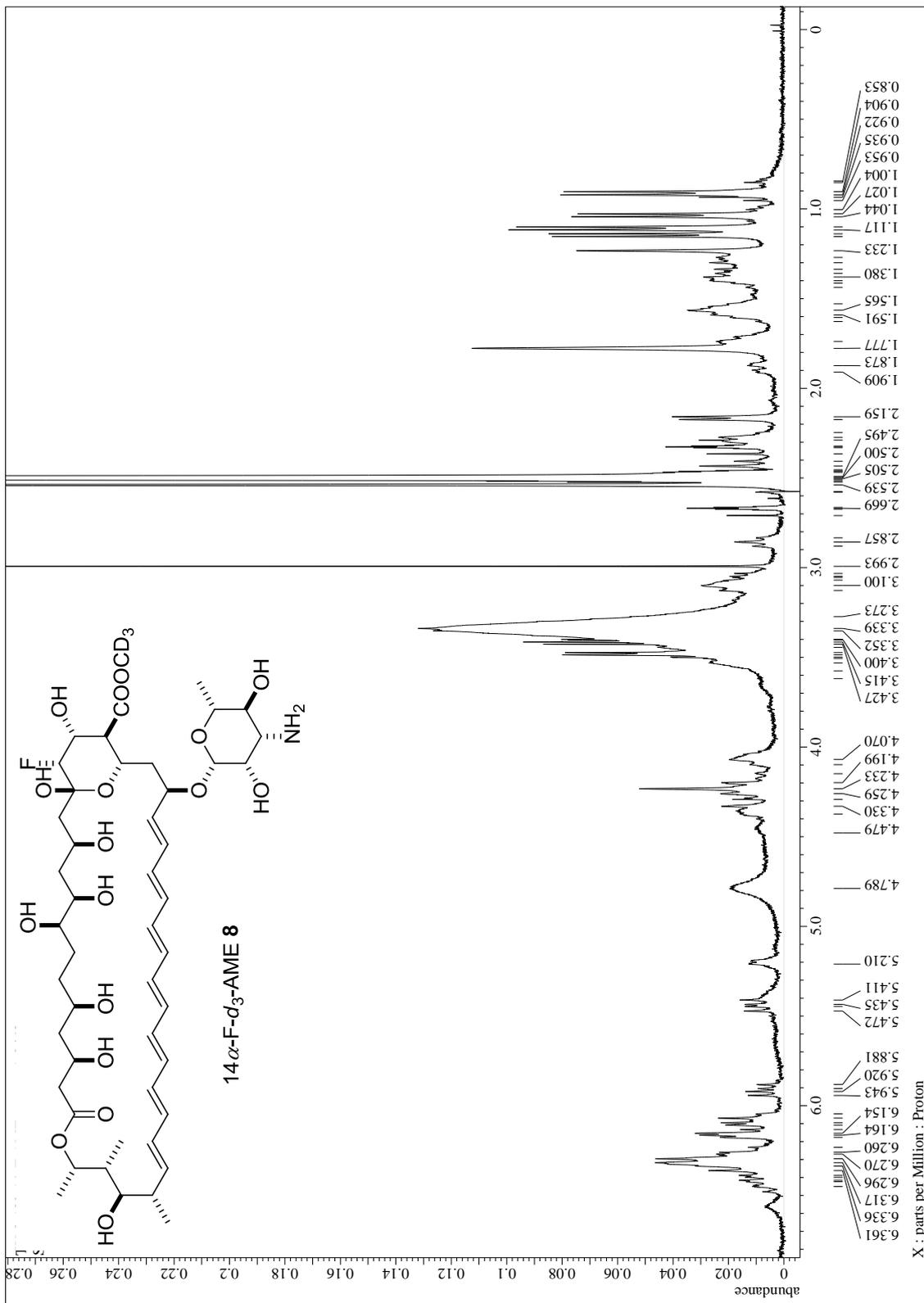


7  $\alpha$ -OH-AmB 3 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。

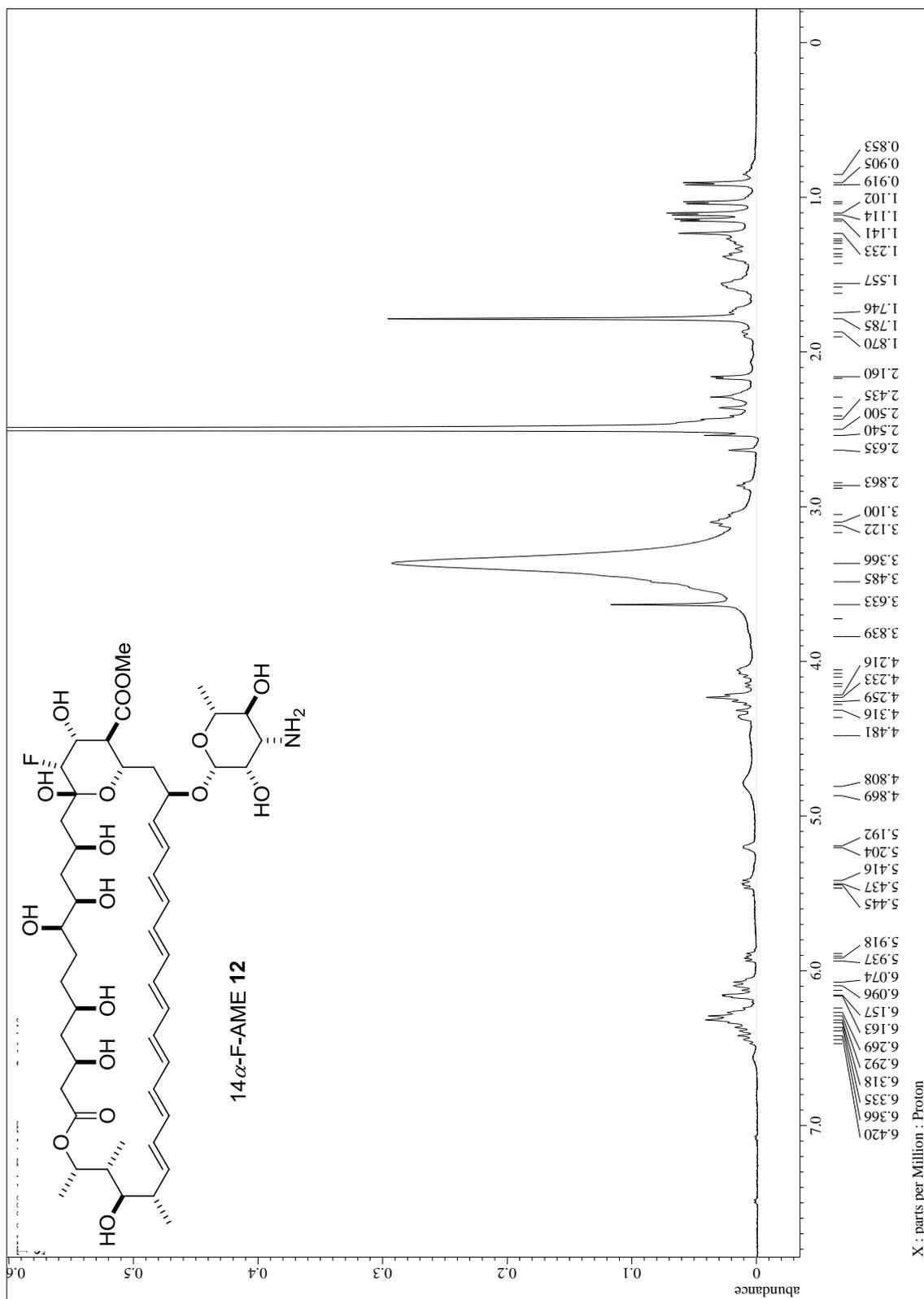


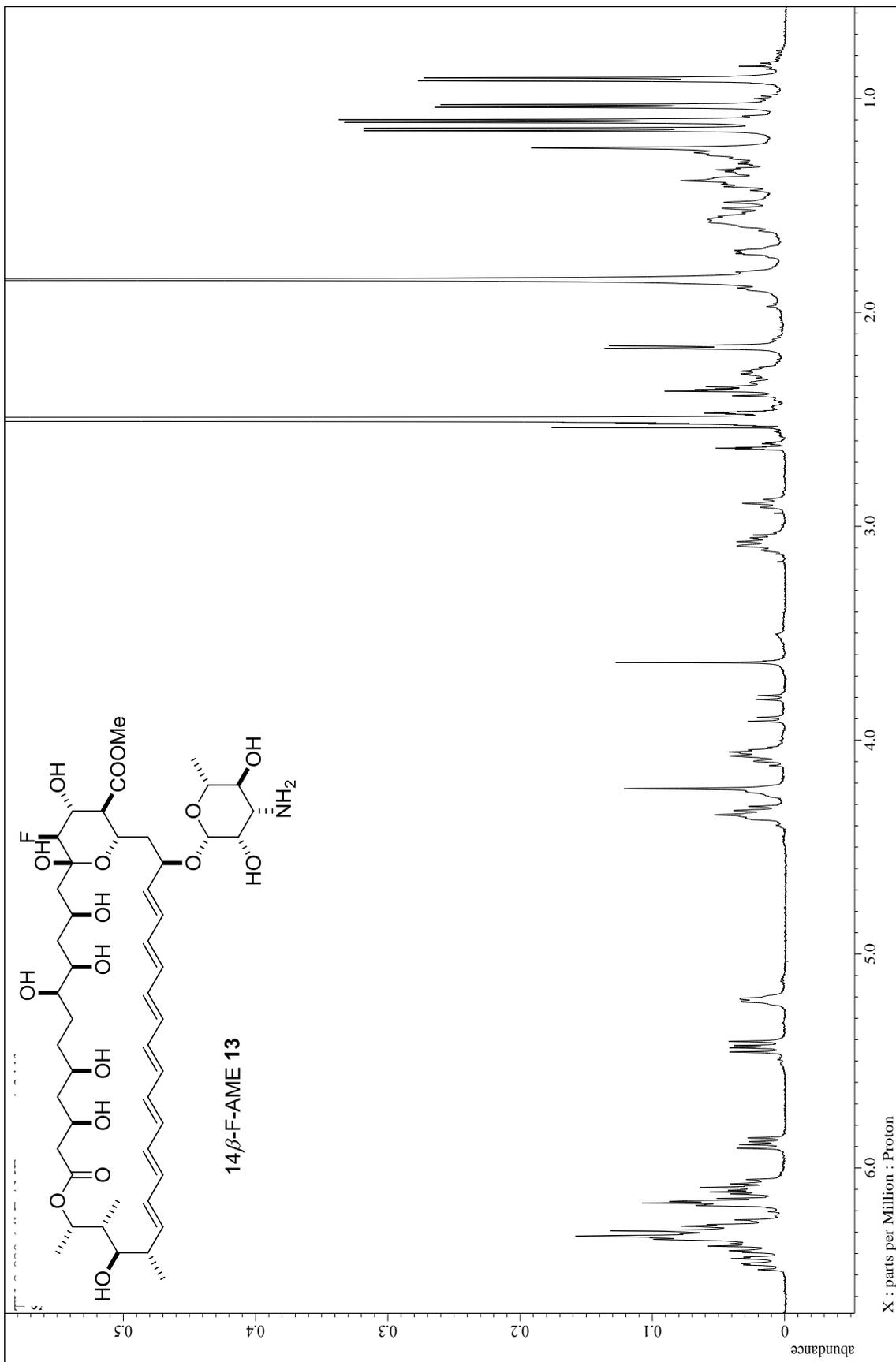
7  $\beta$ -OH-AmB 4 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY スペクトル。DMSO- $d_6$  中で測定。



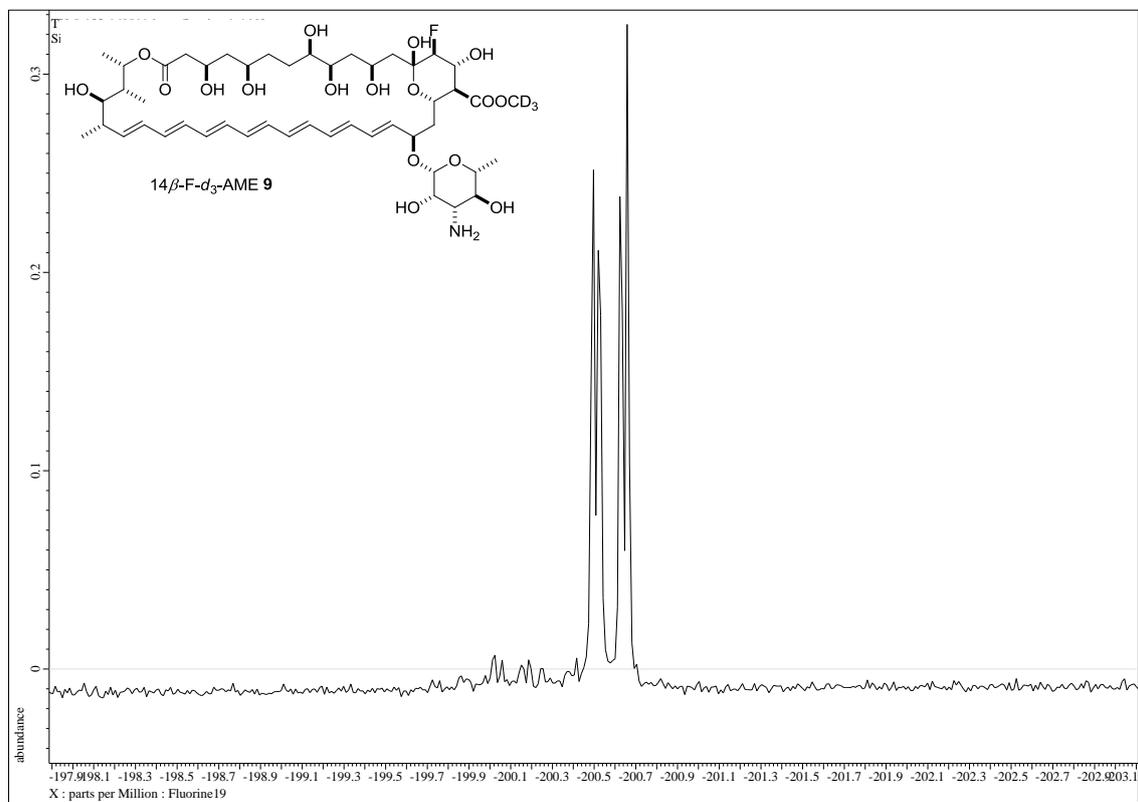
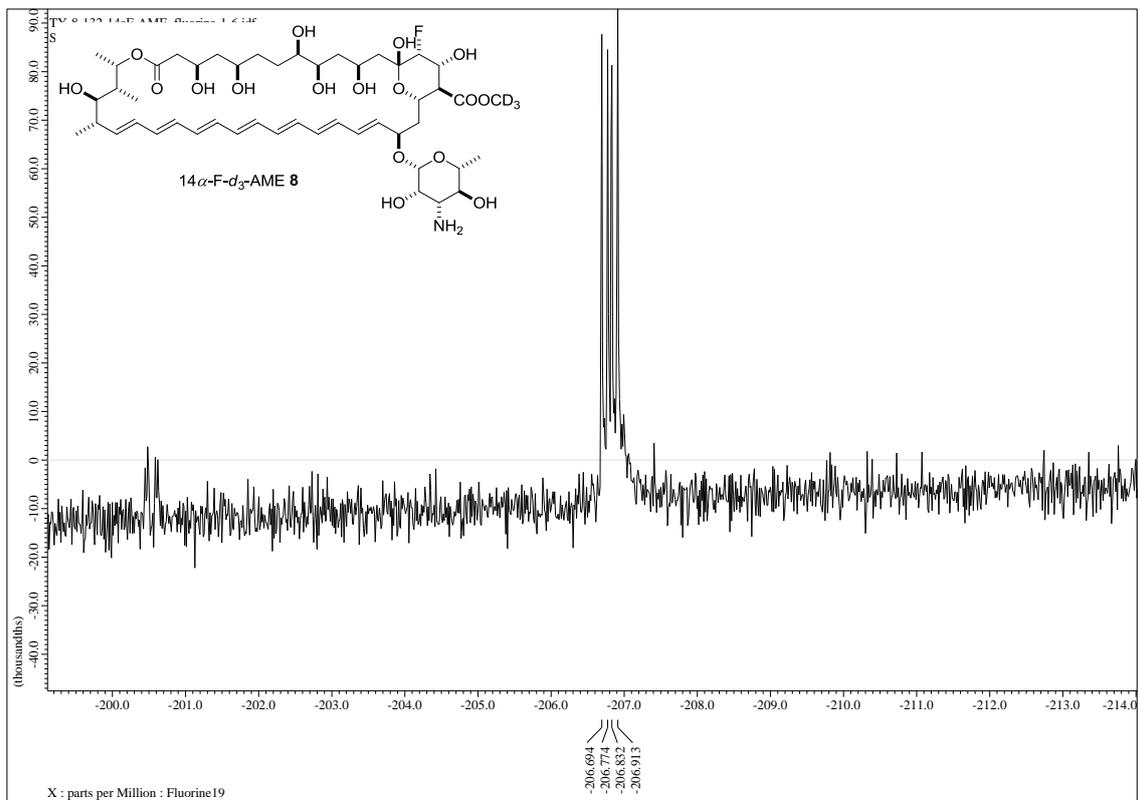


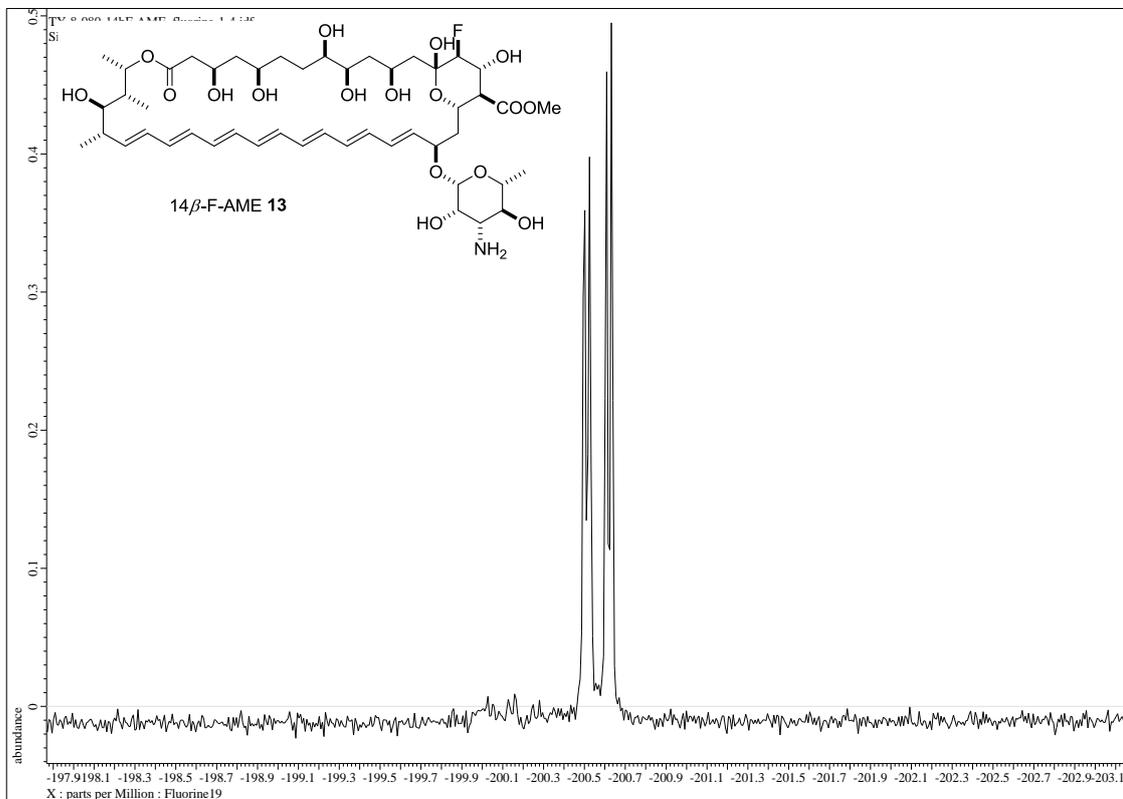
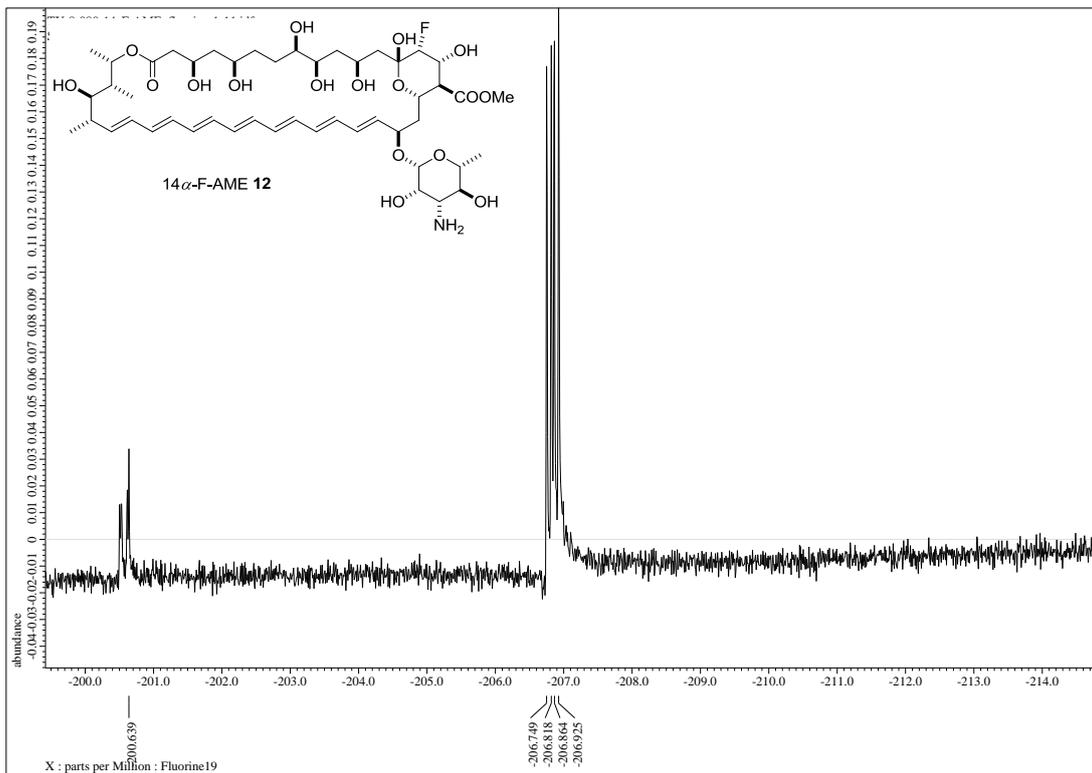






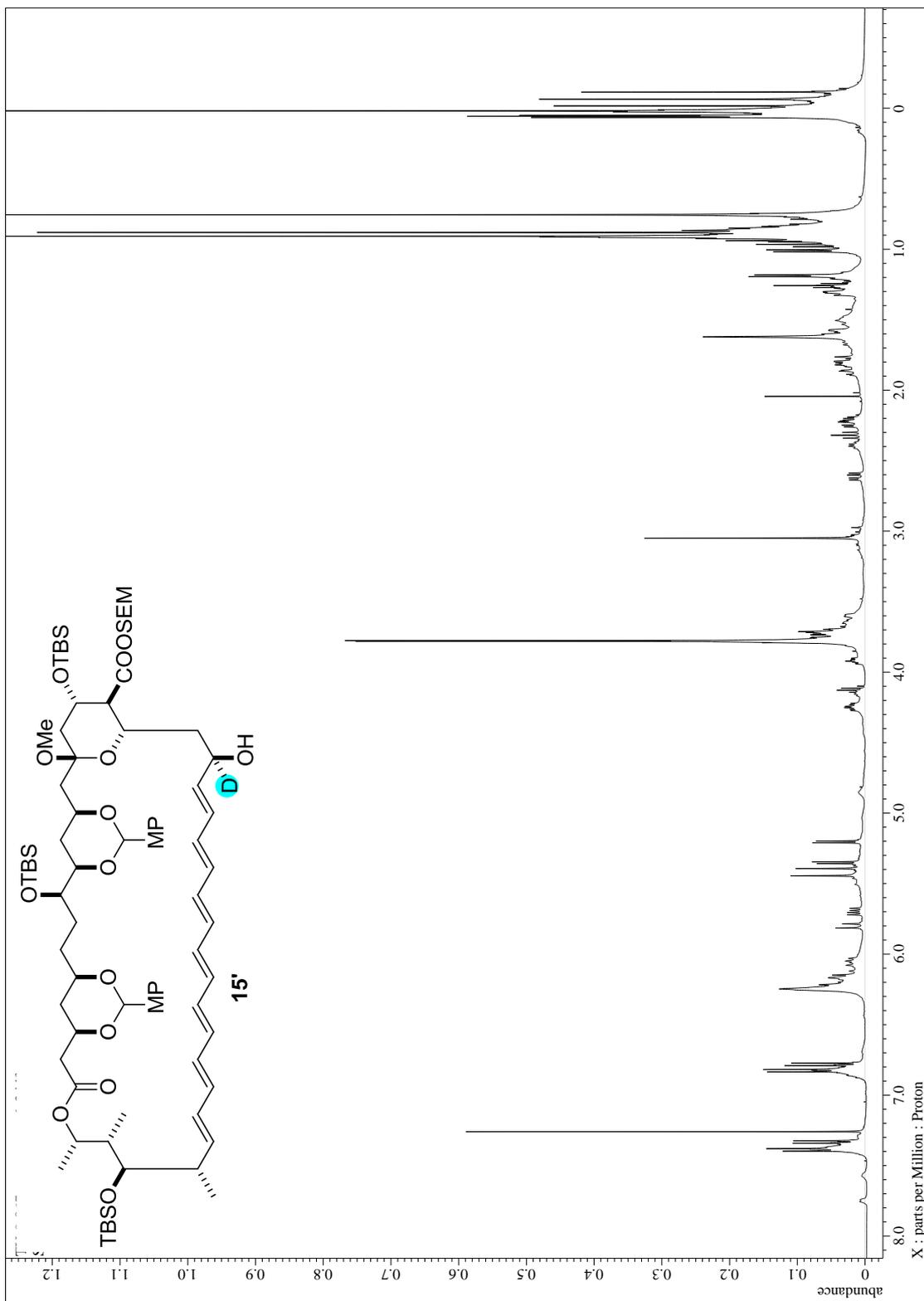
$^{19}\text{F}$  NMR スペクトル

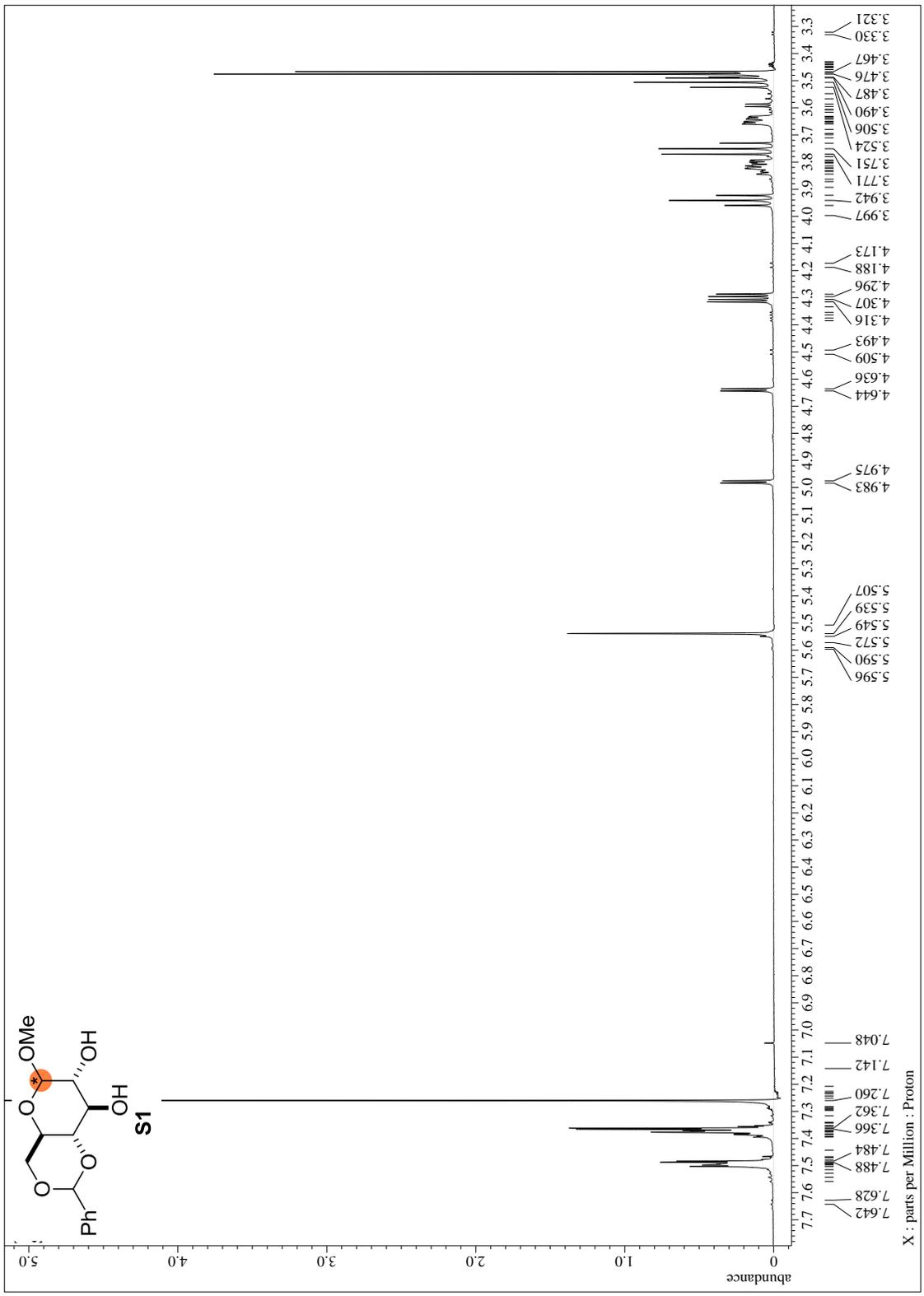


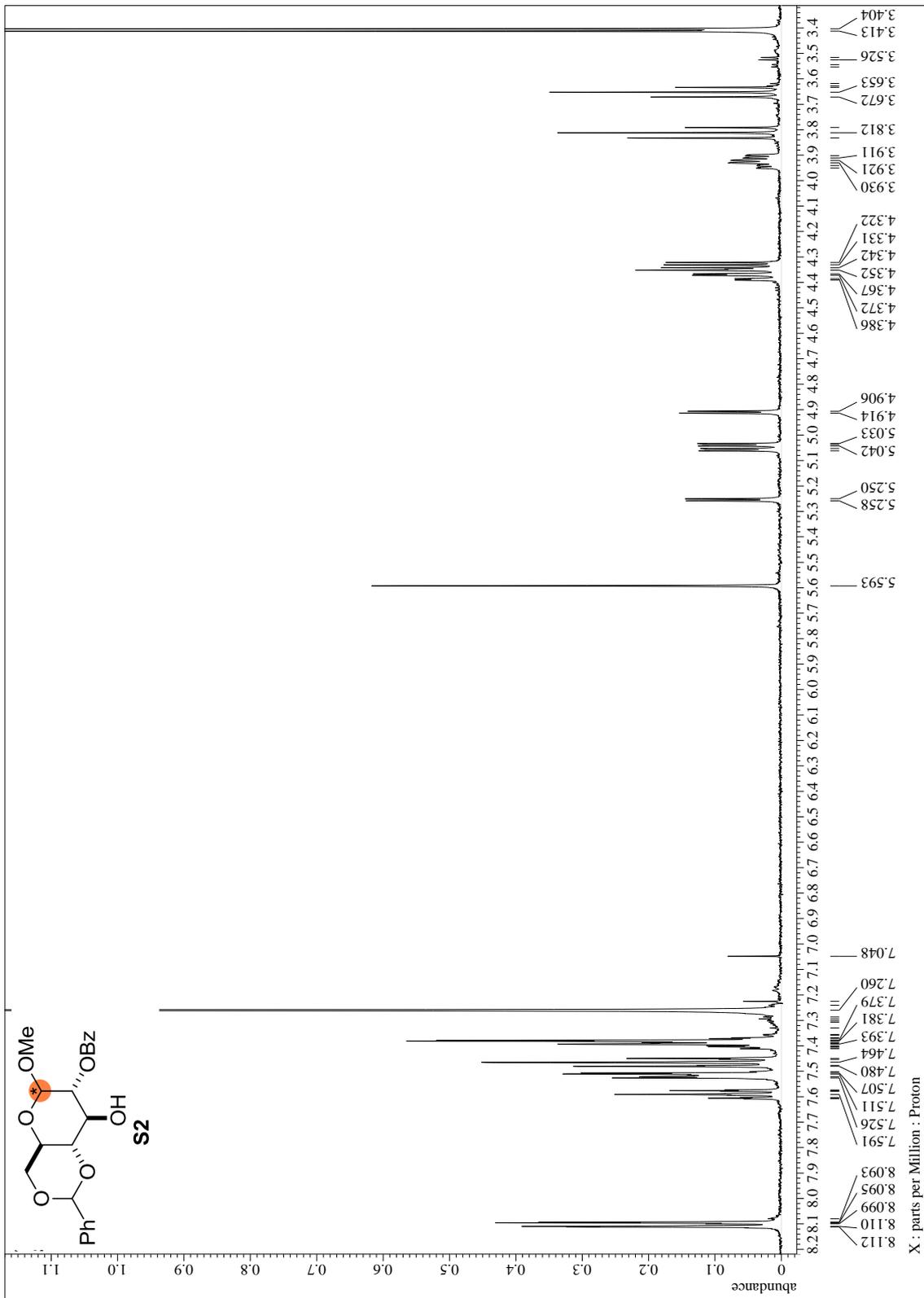


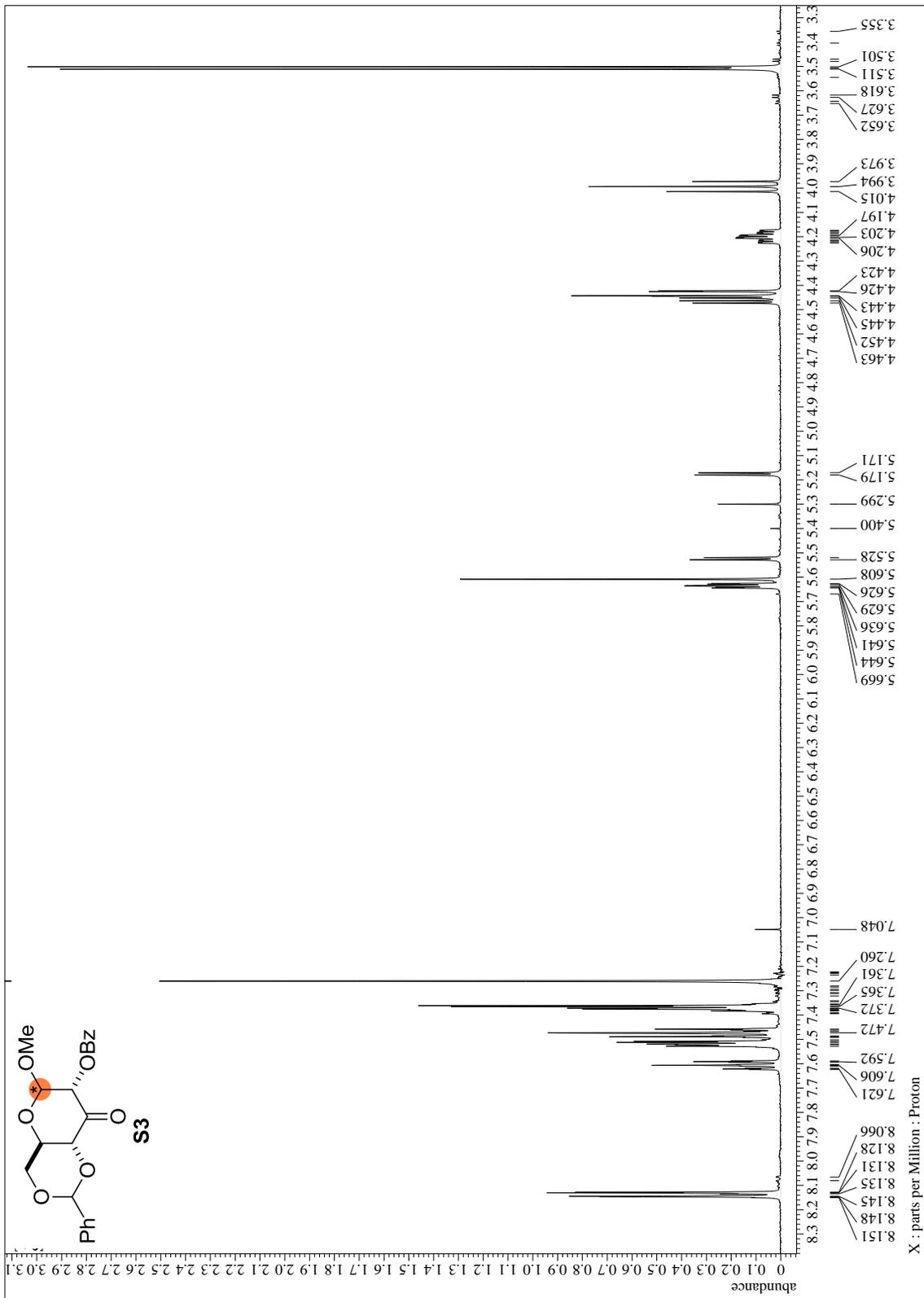
第4章

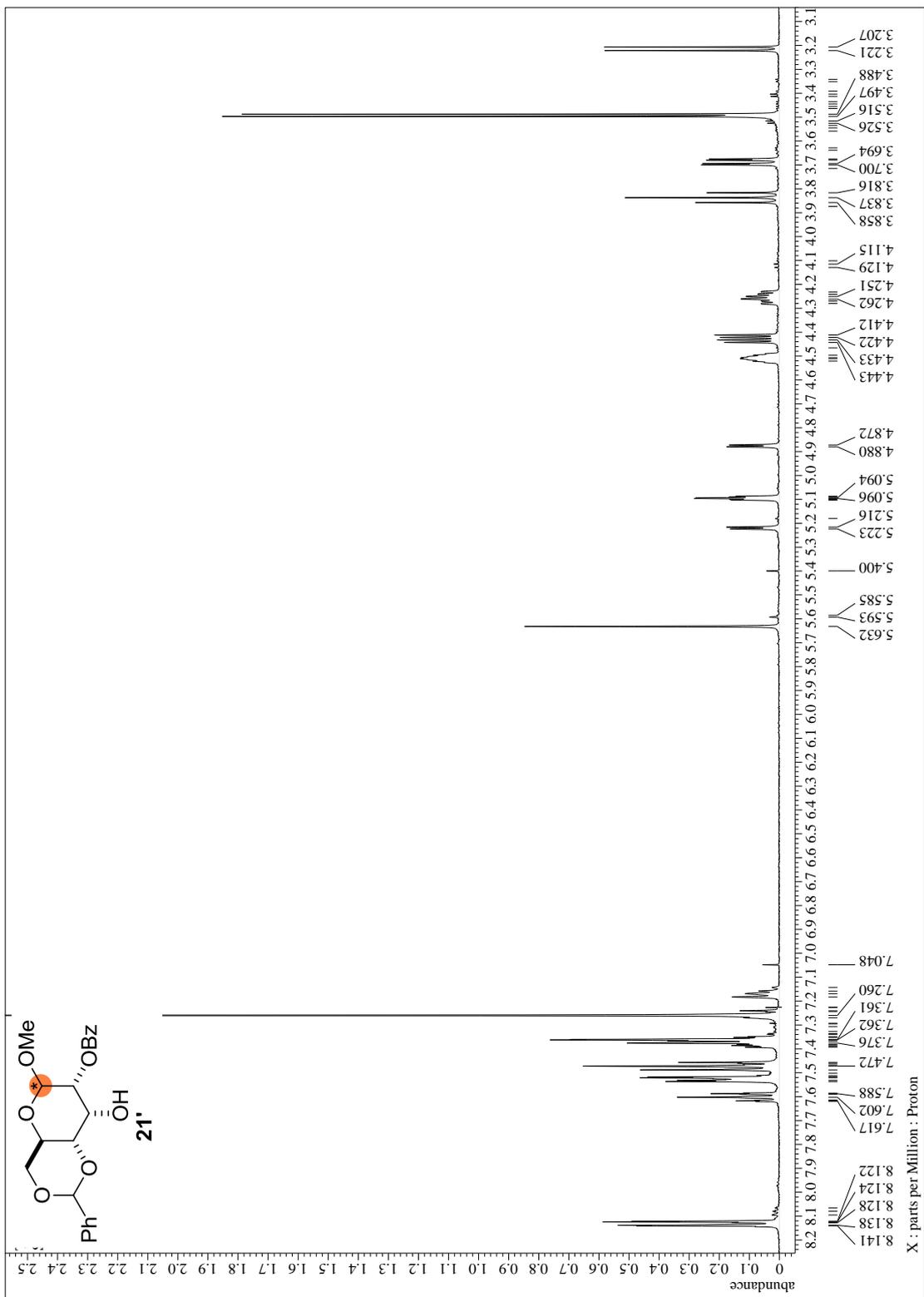
合成化合物の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

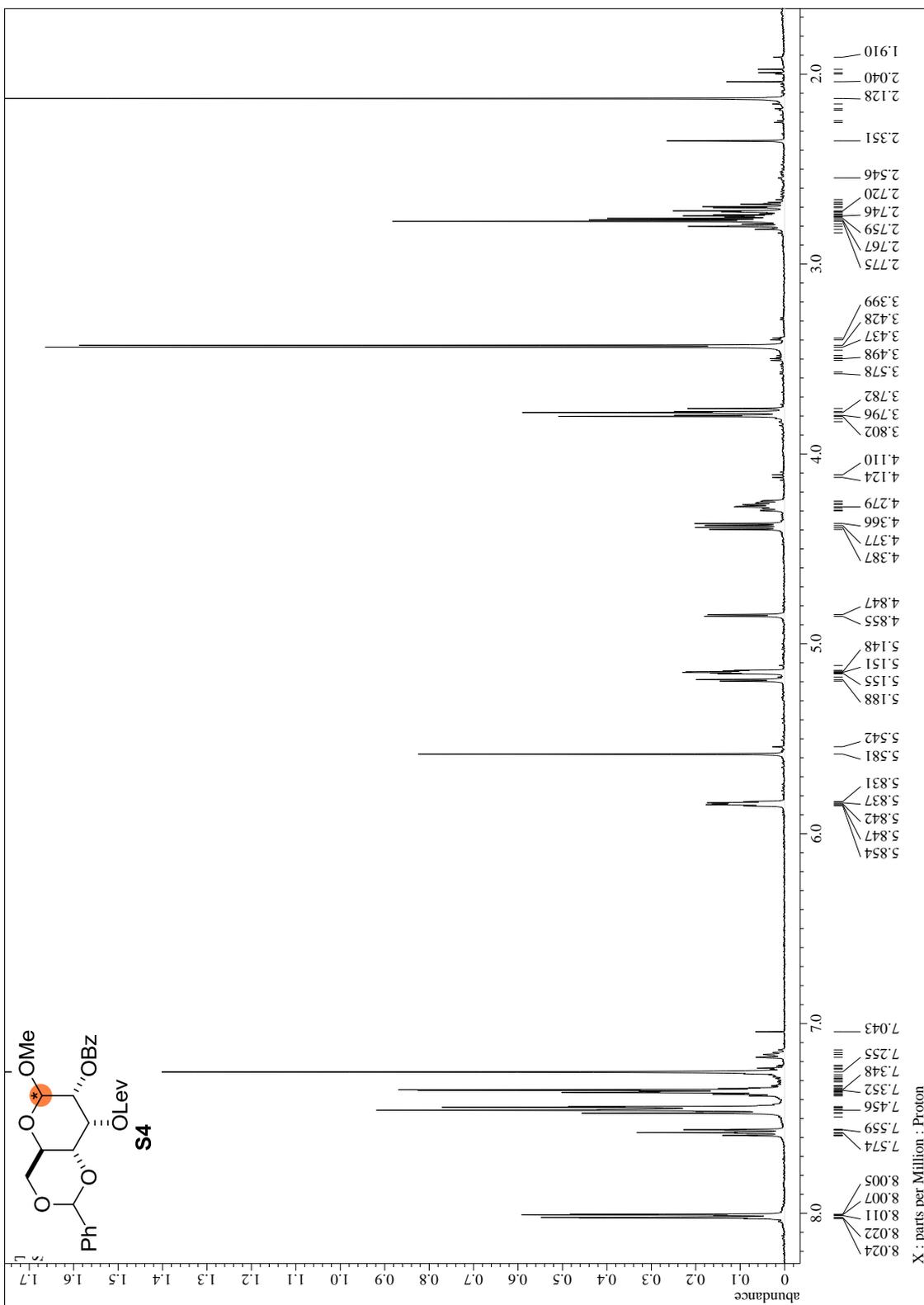


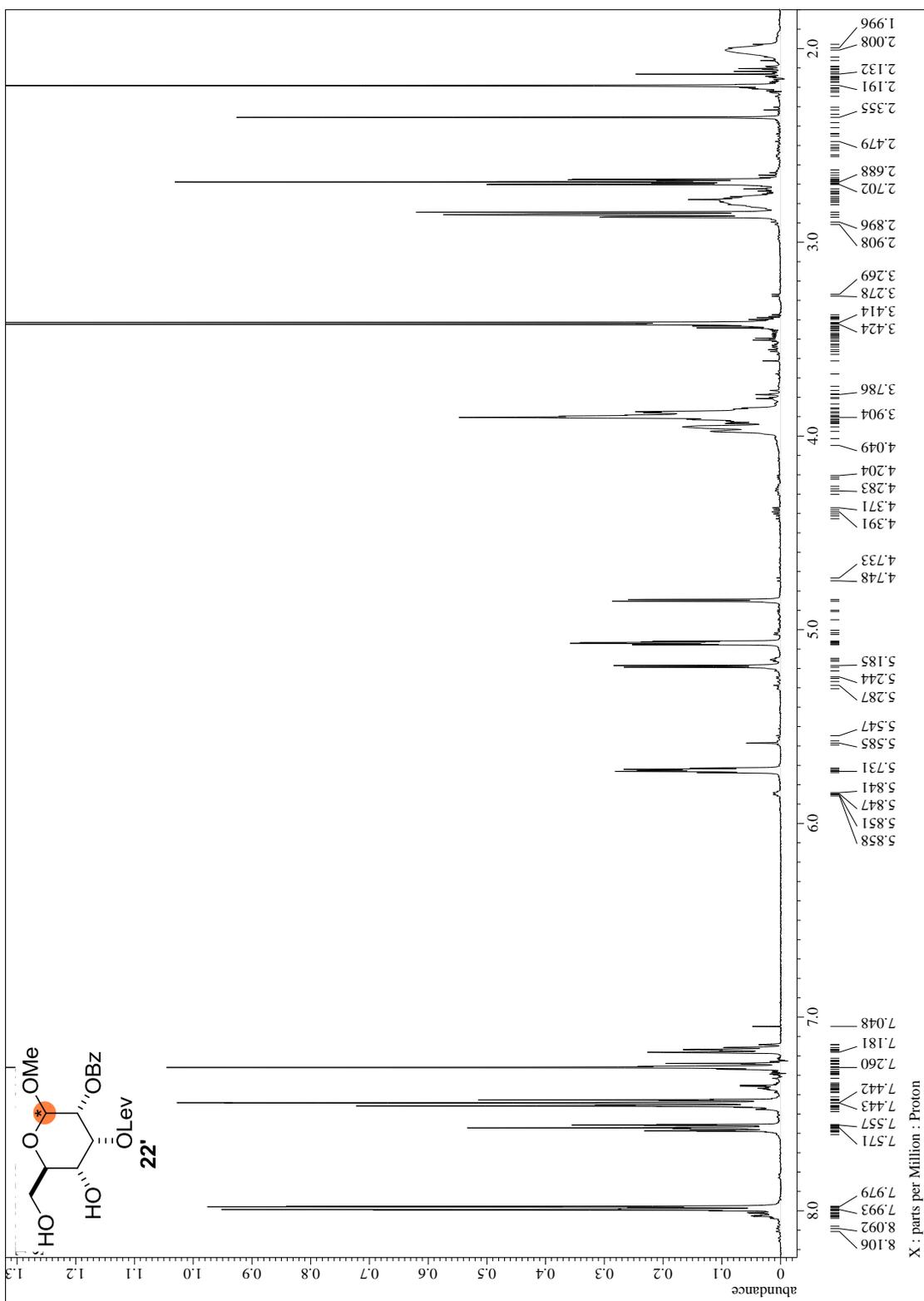


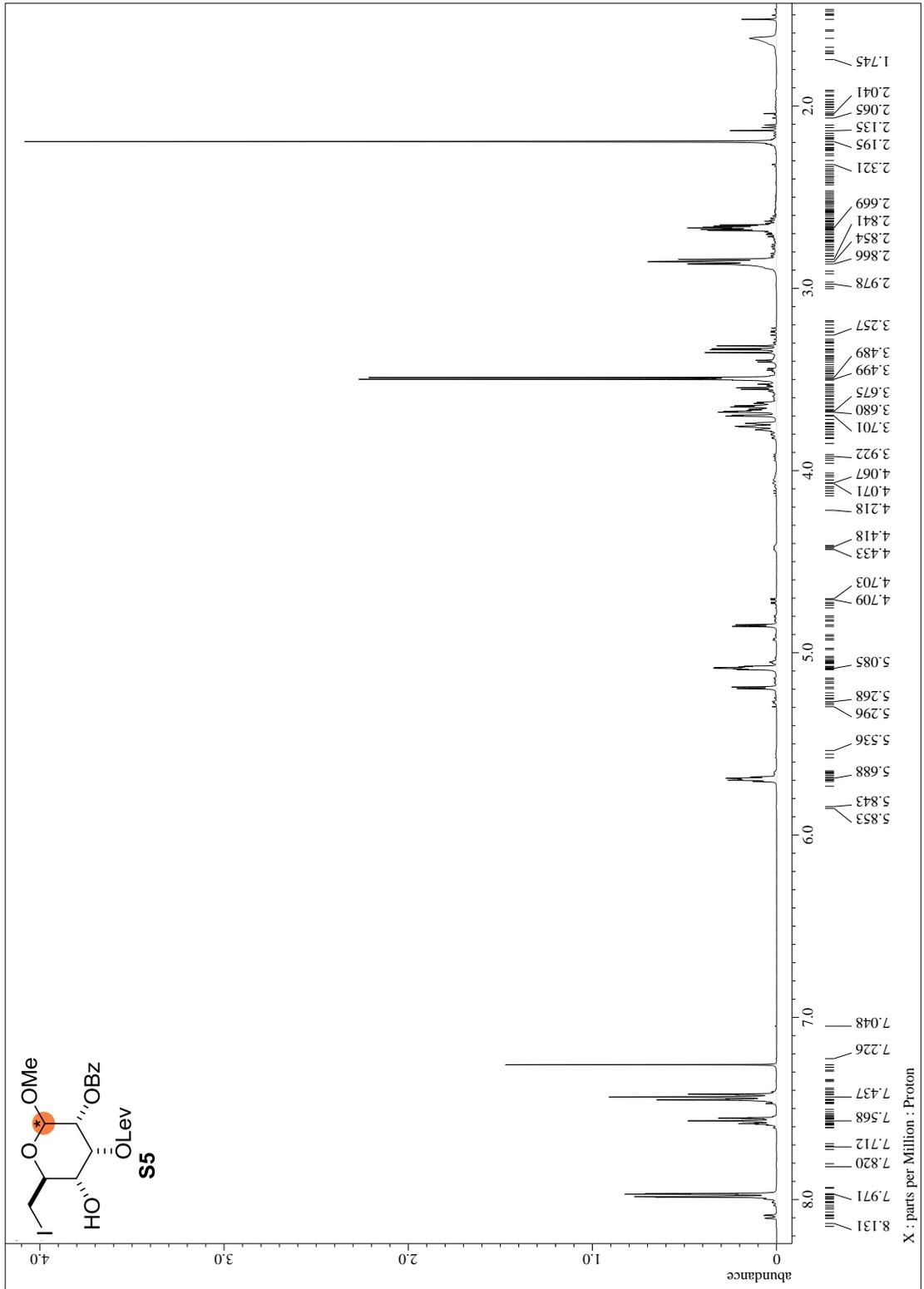


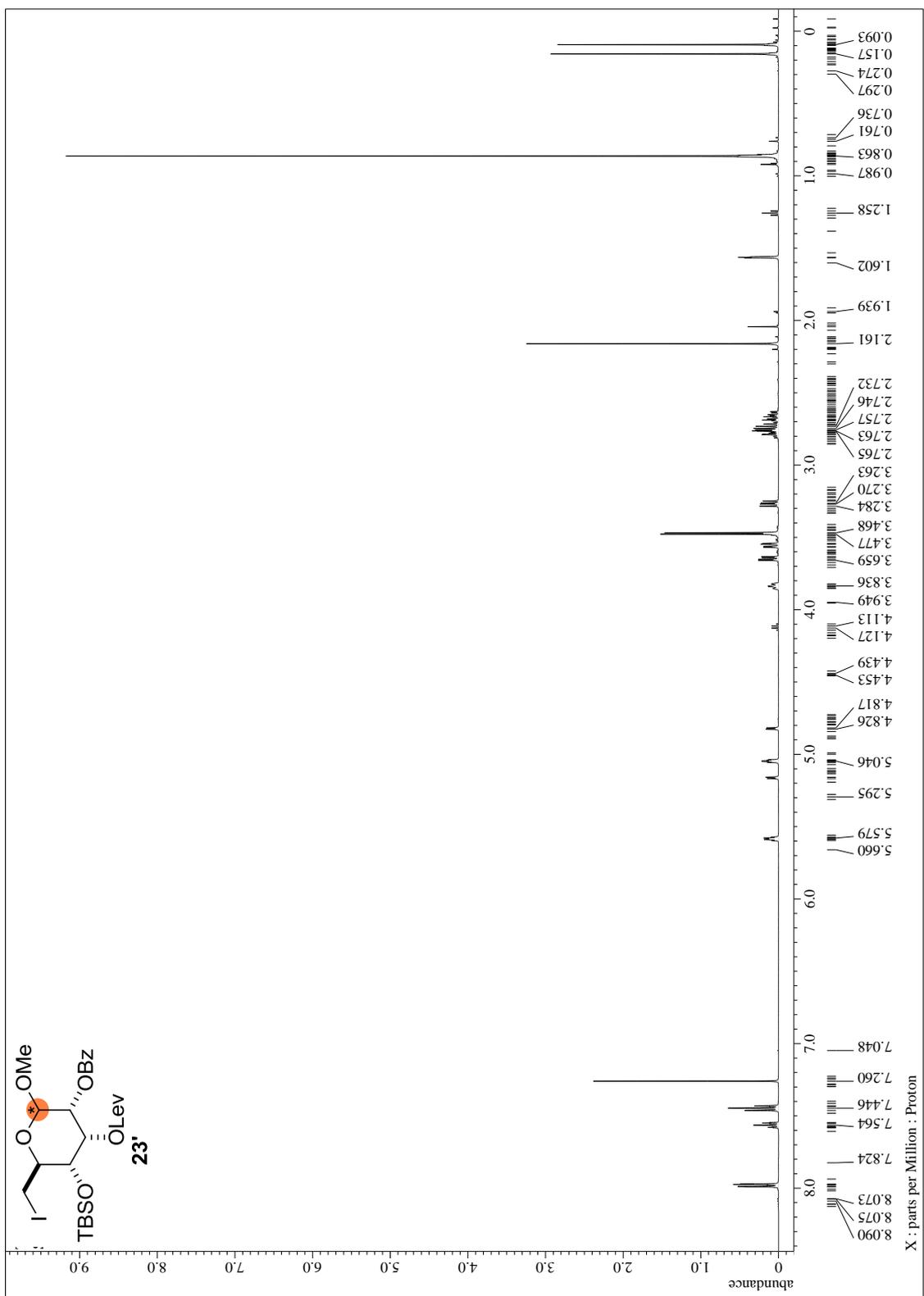


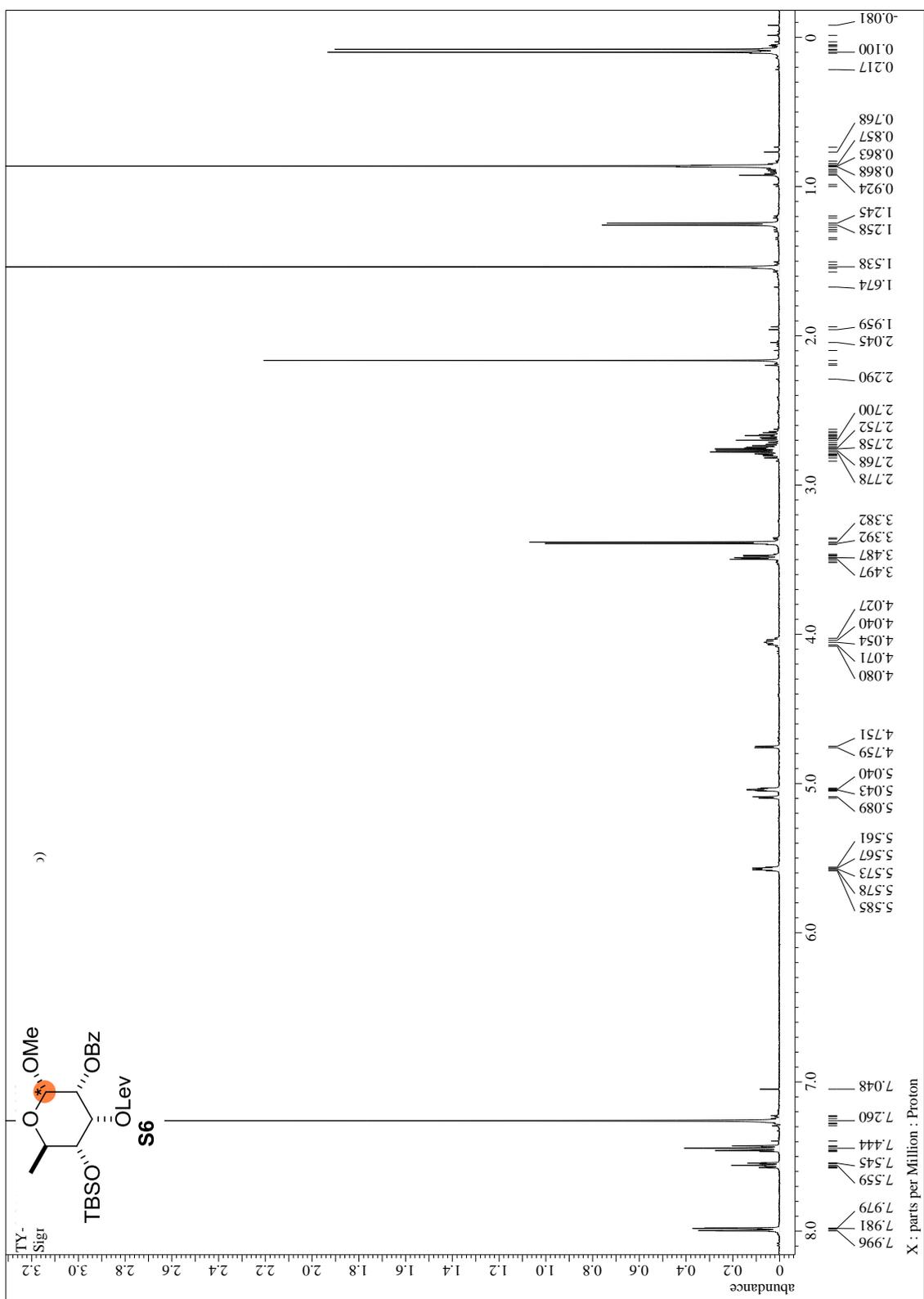


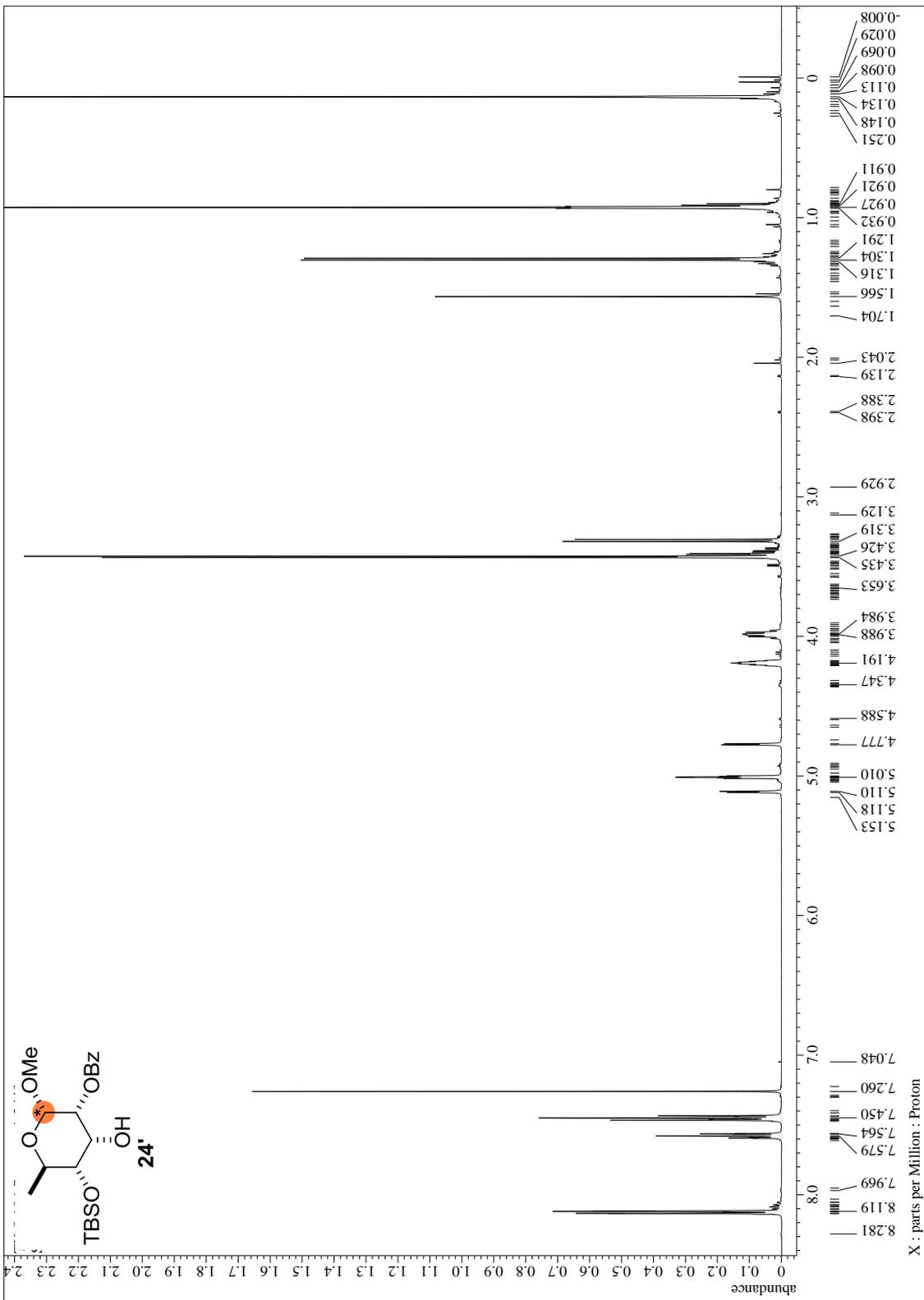


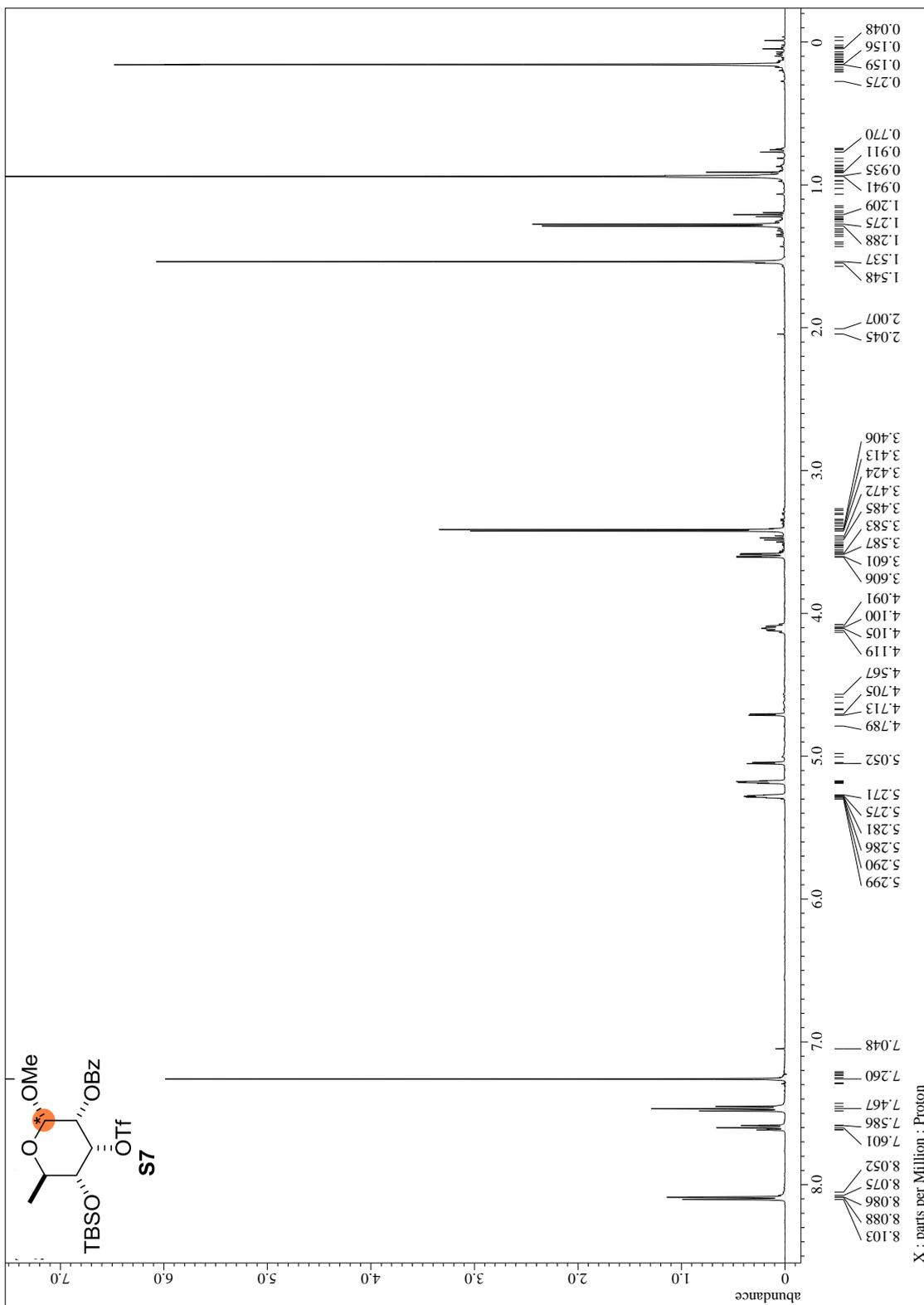


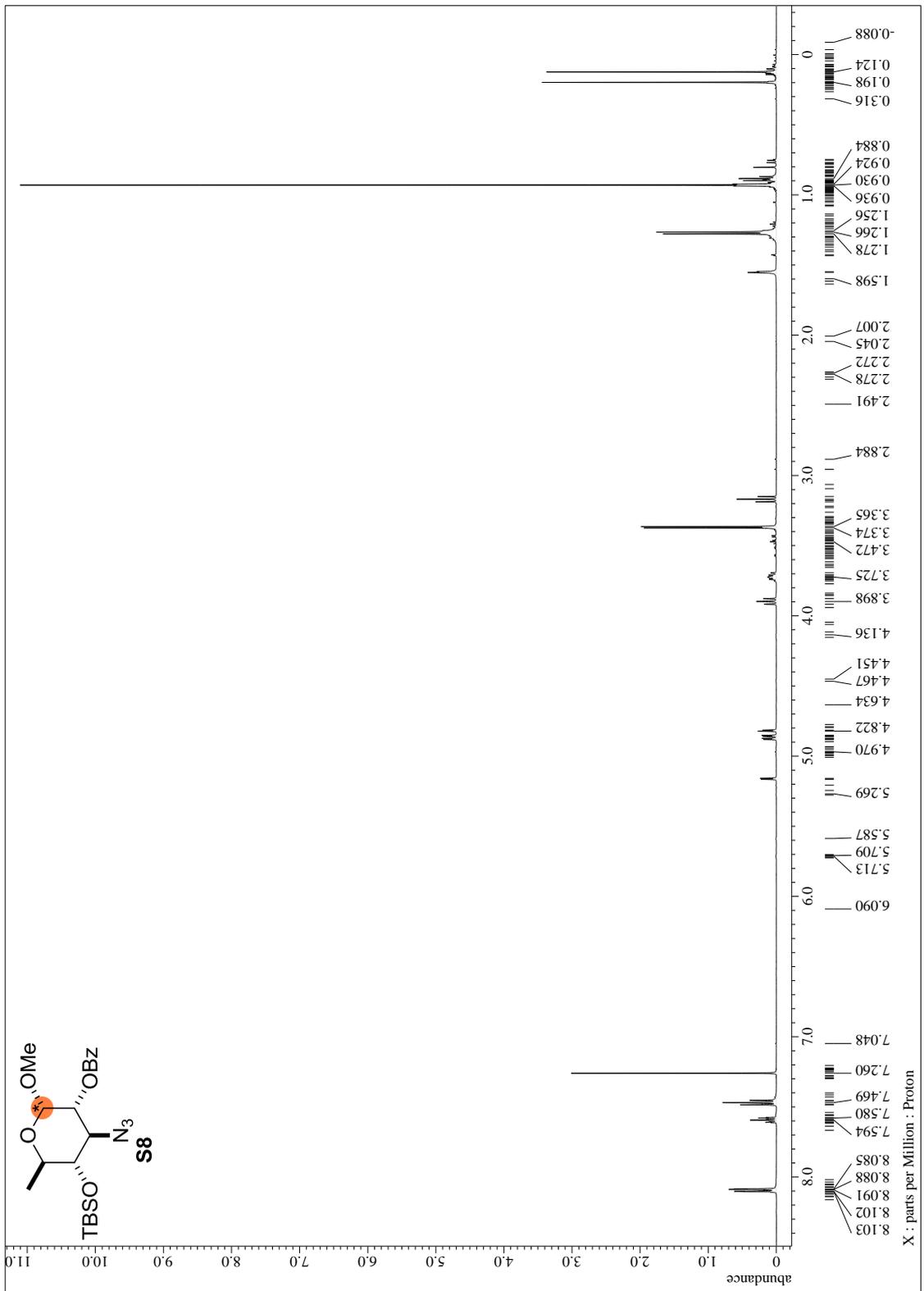


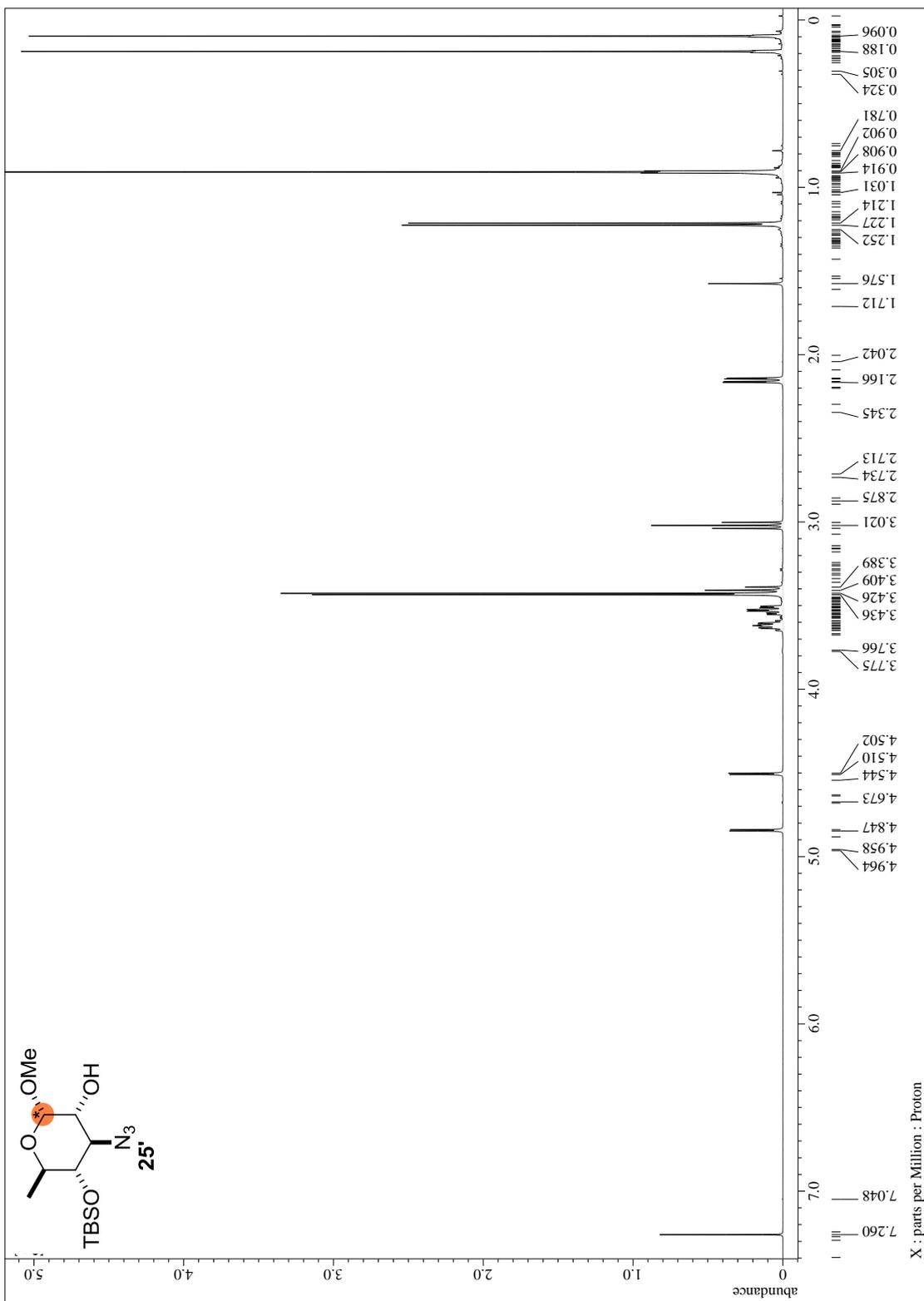


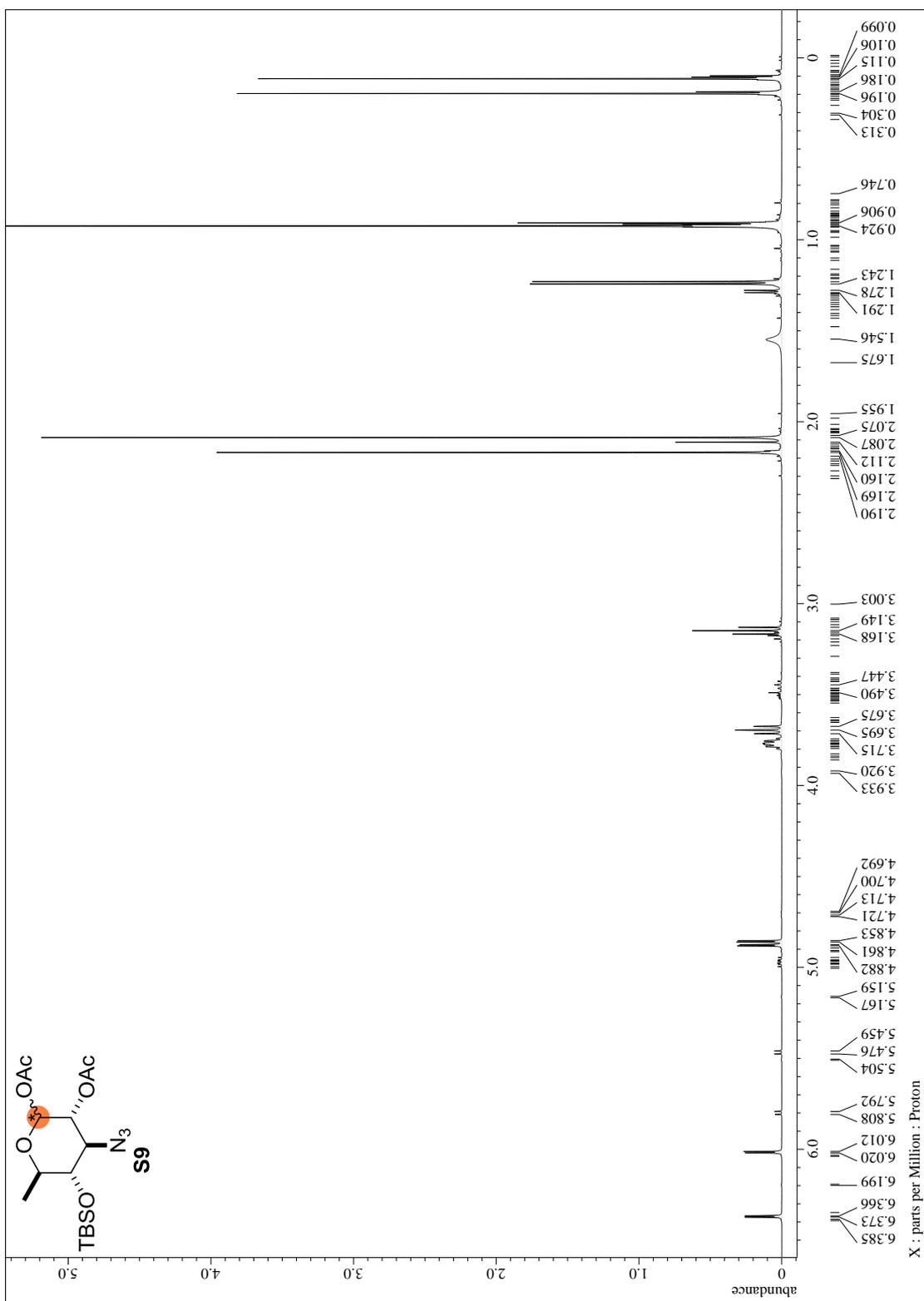


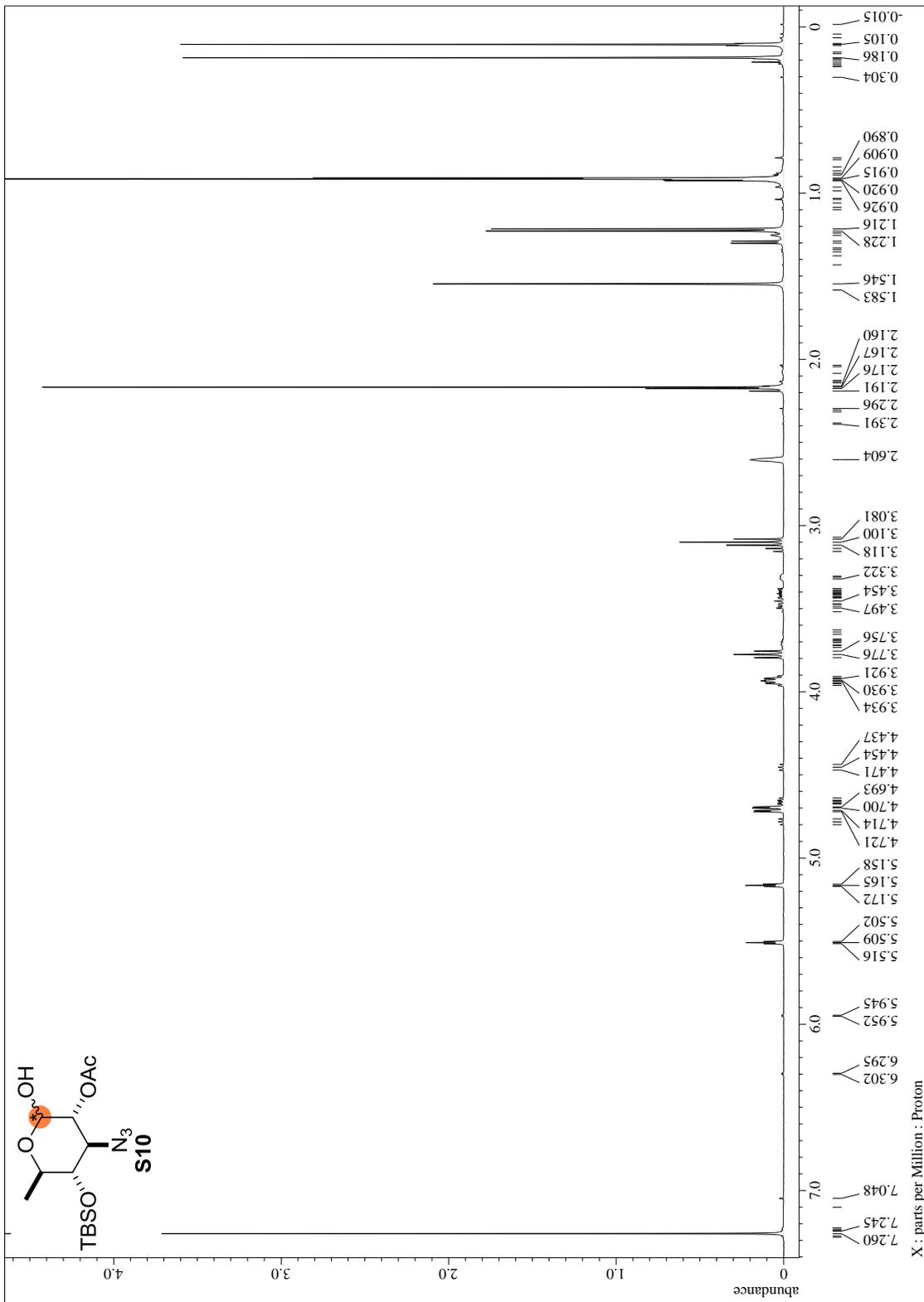


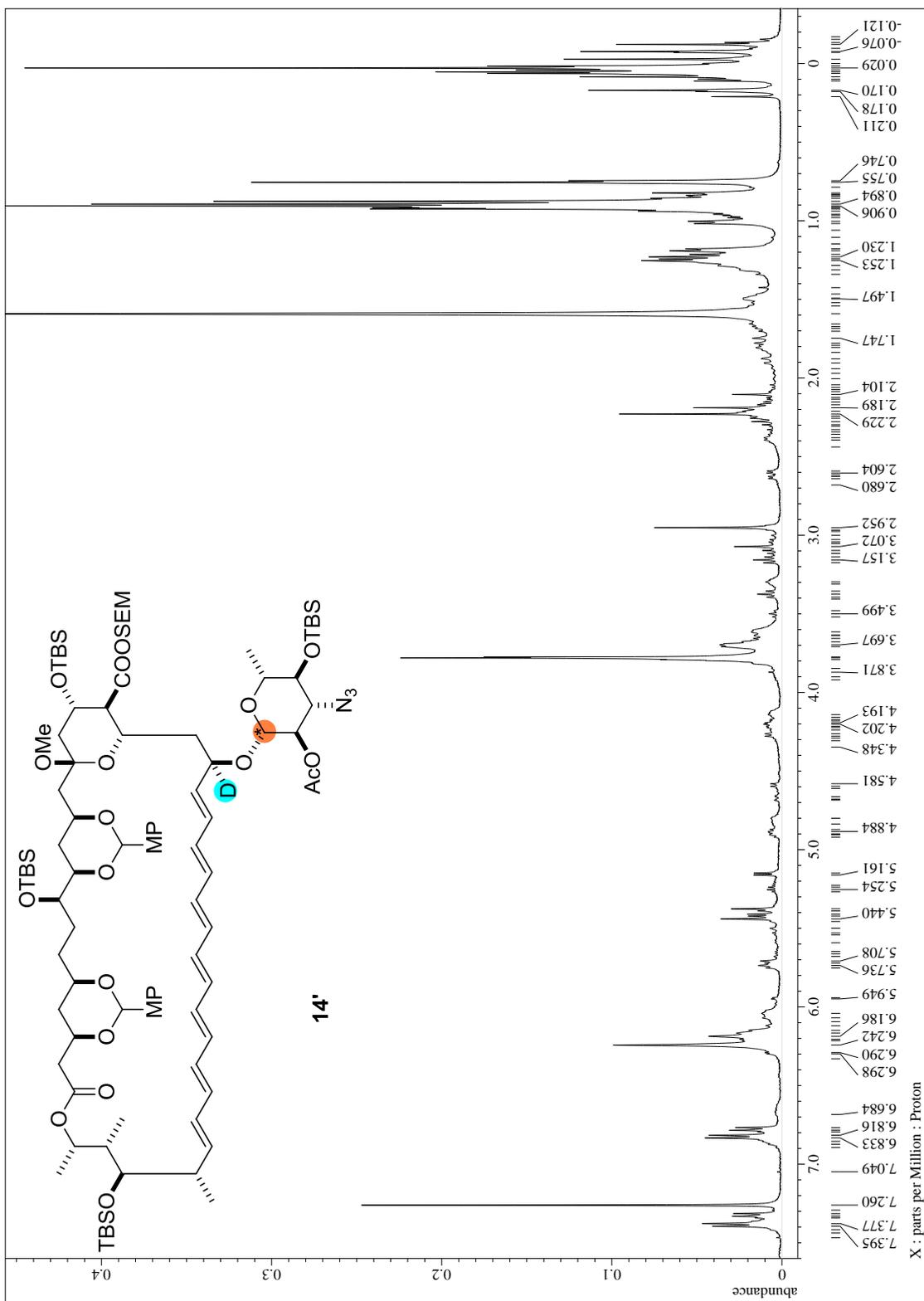


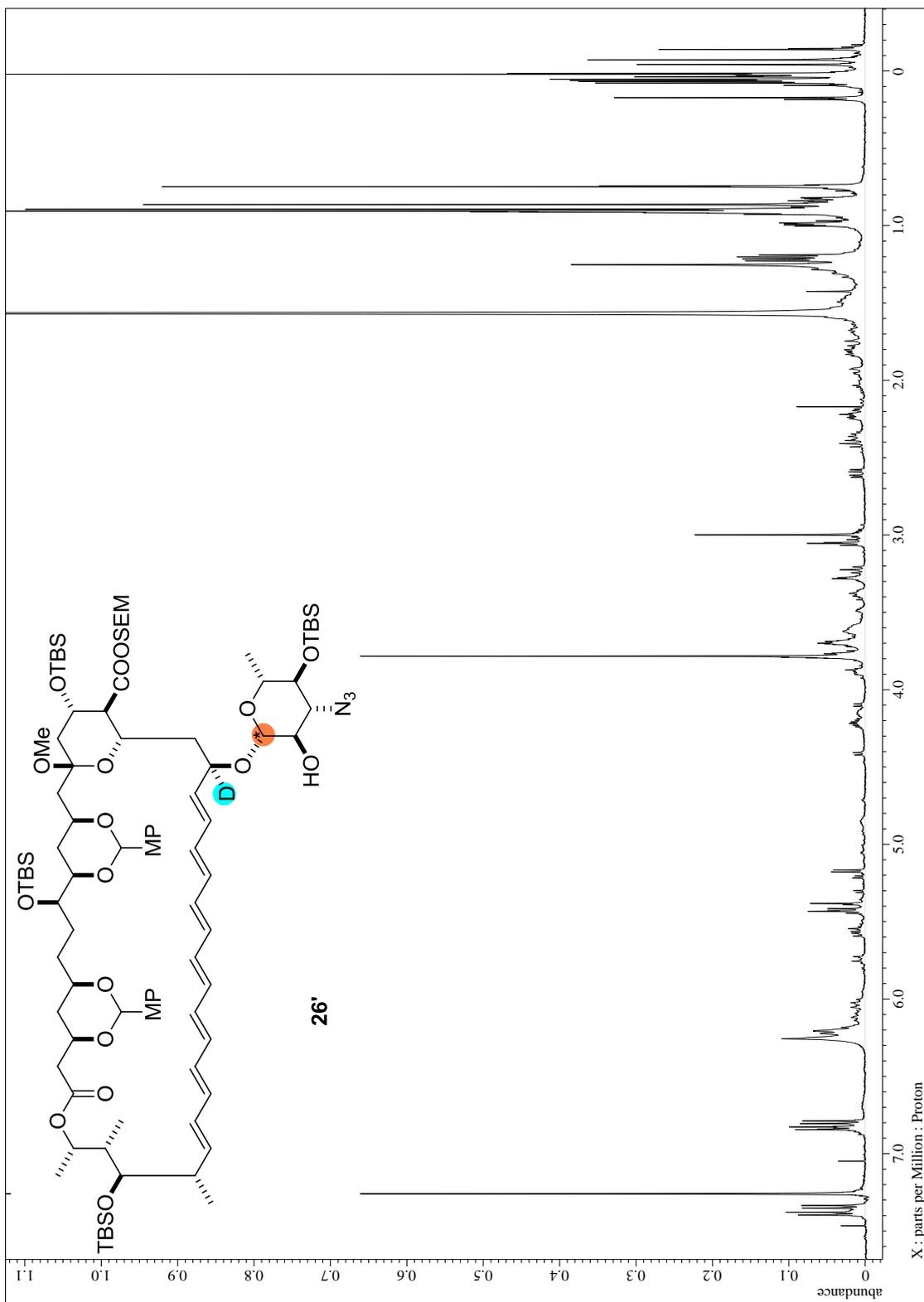


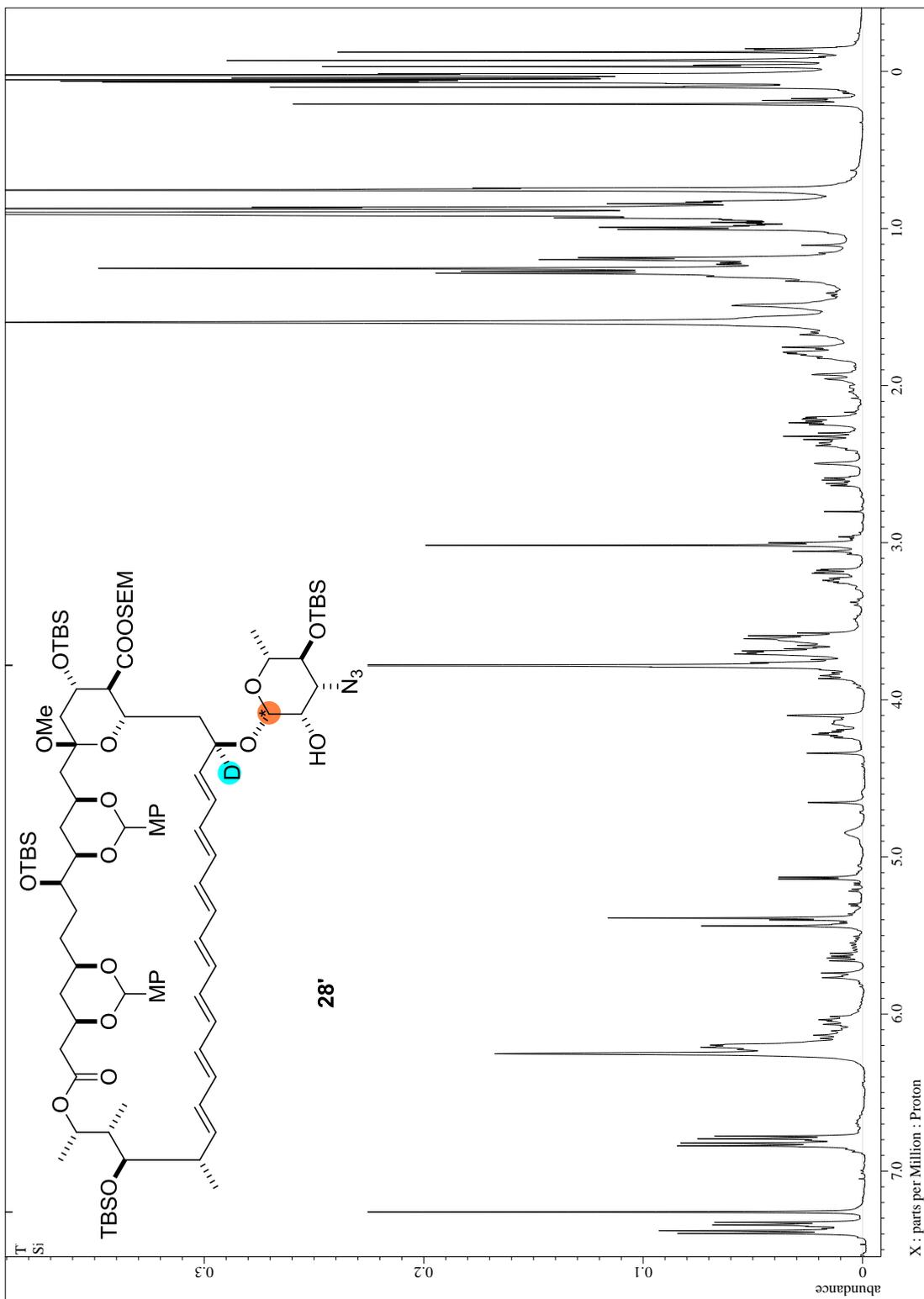


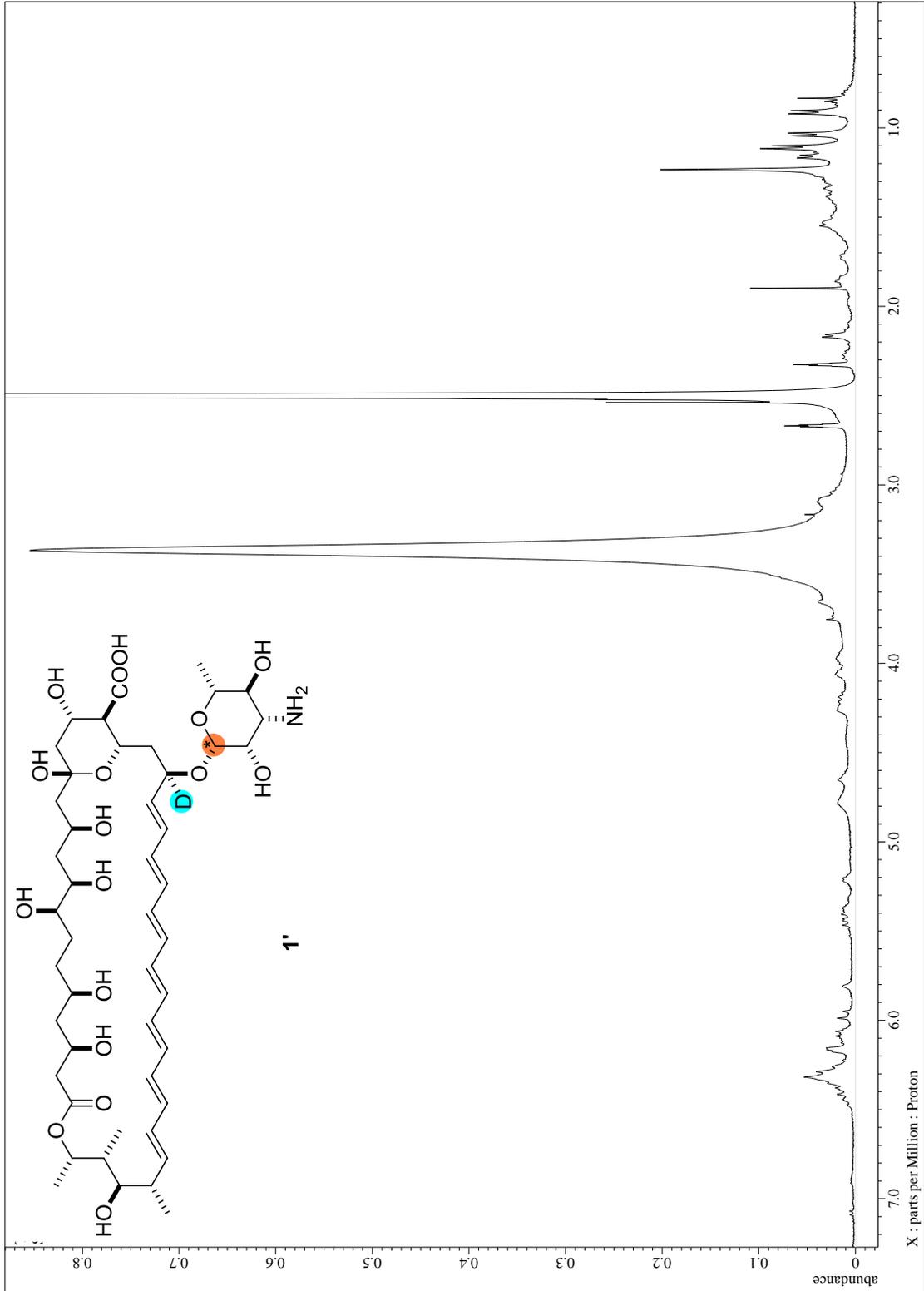




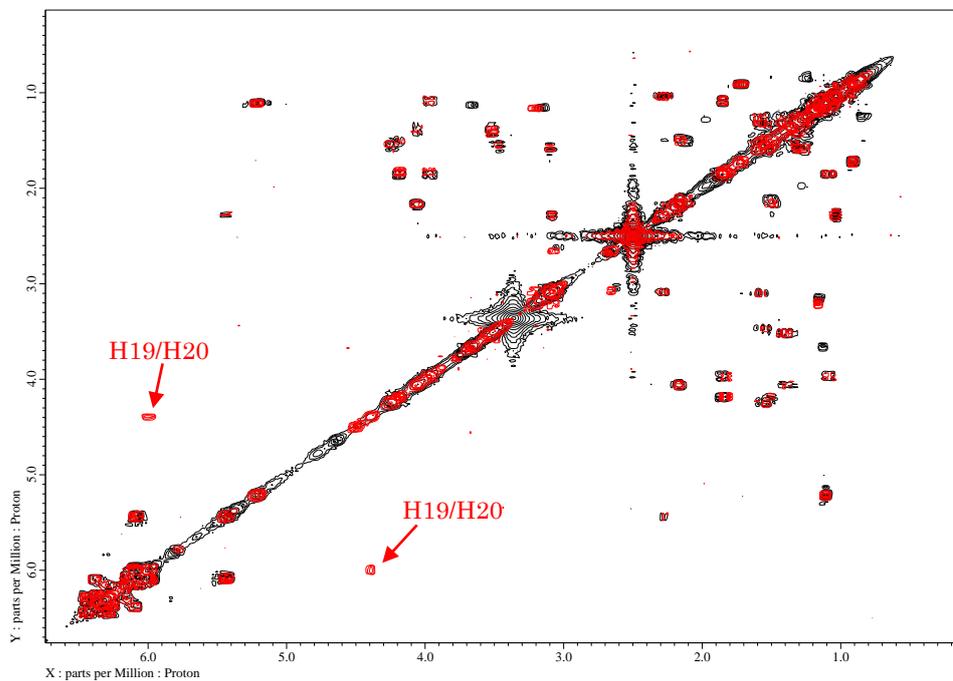




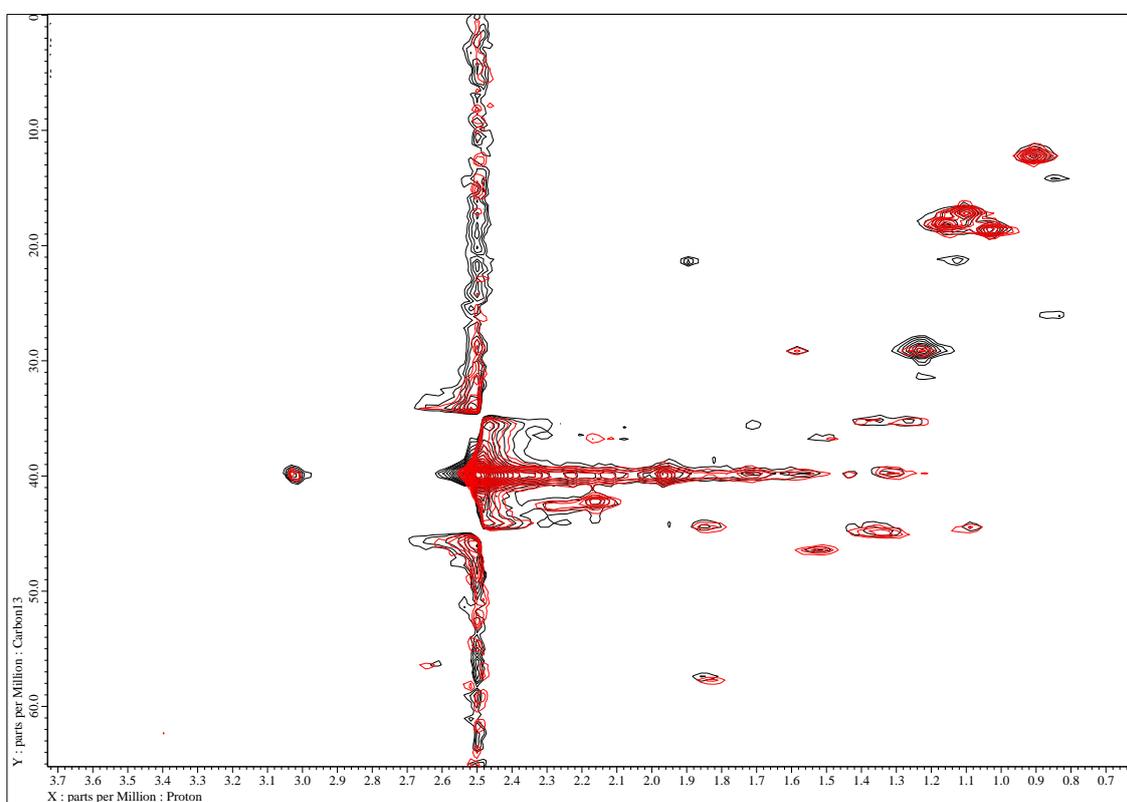
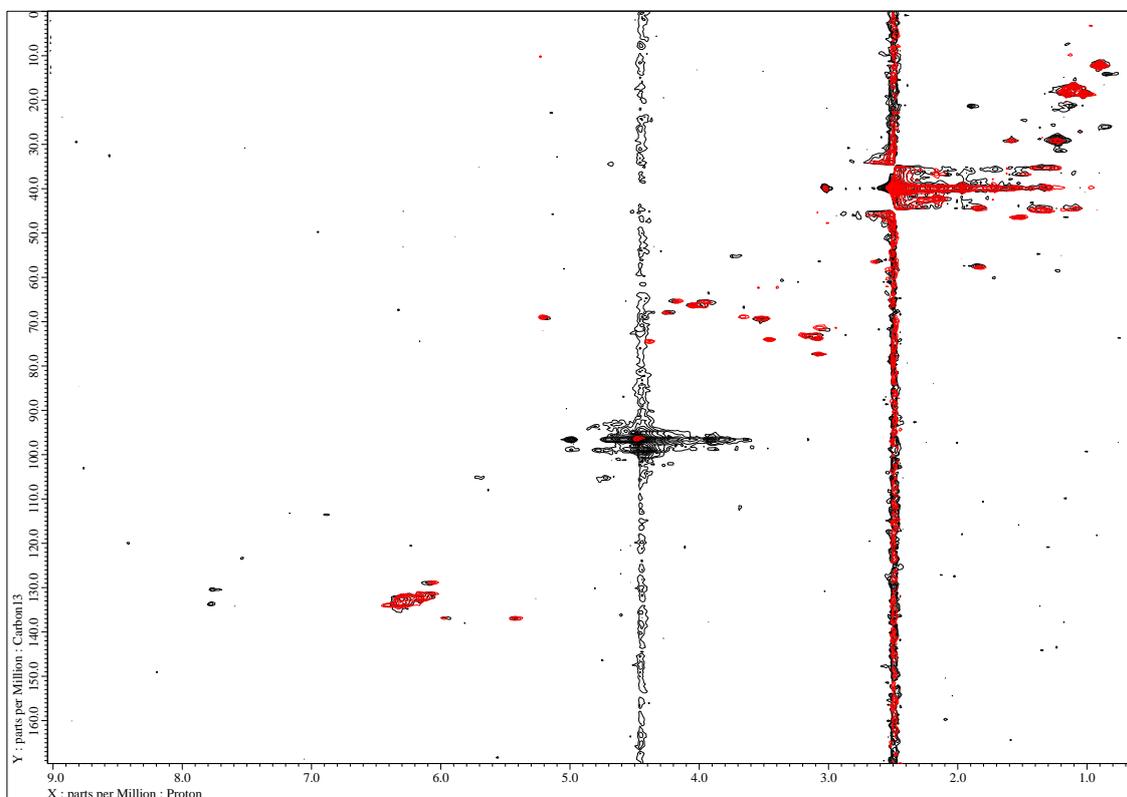


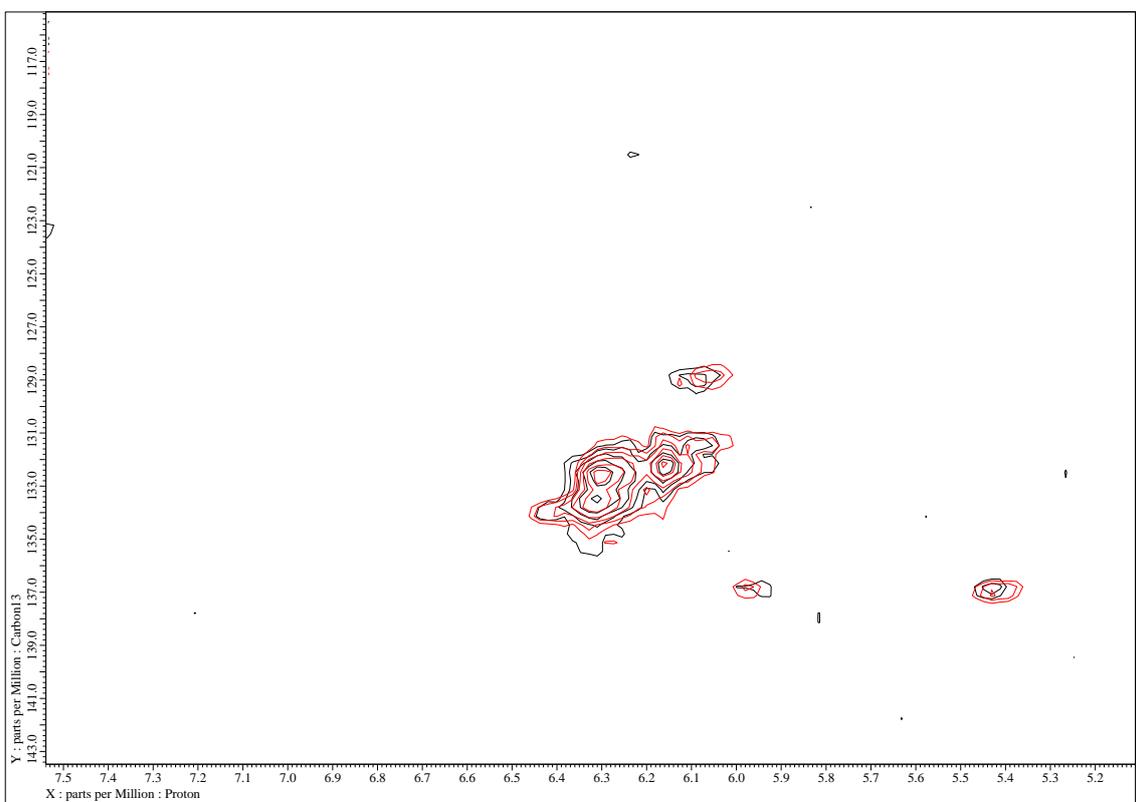
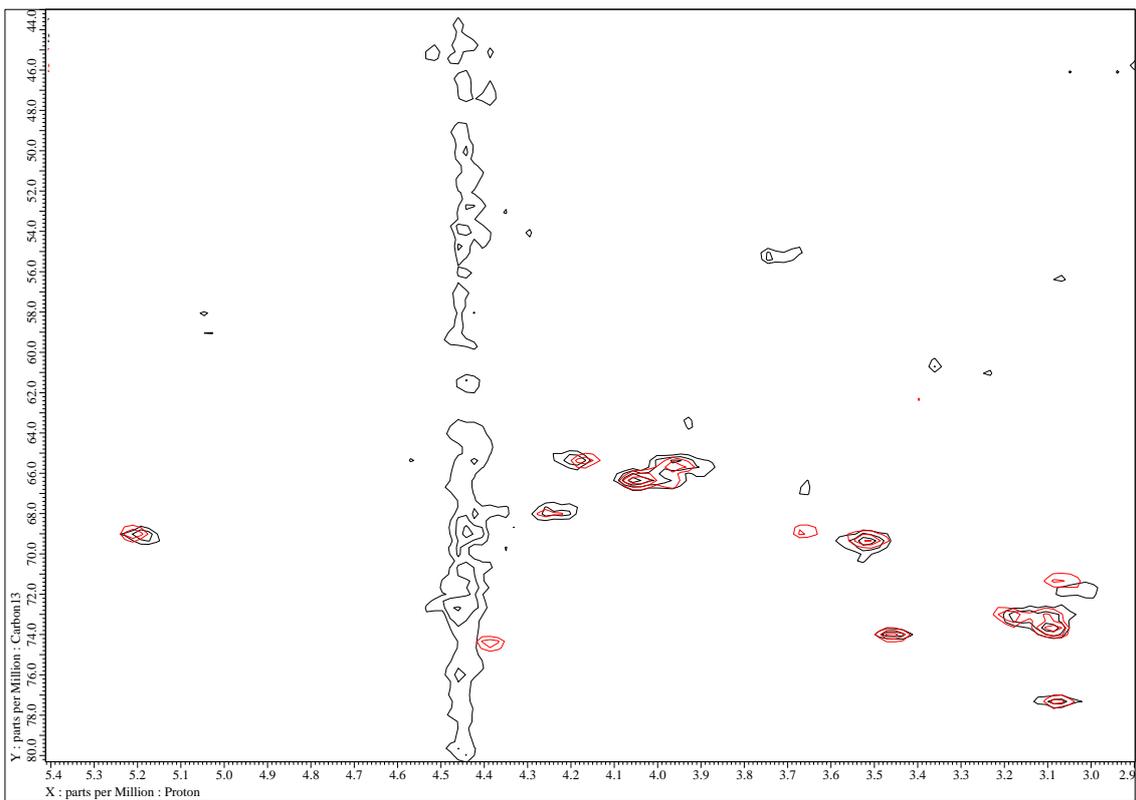


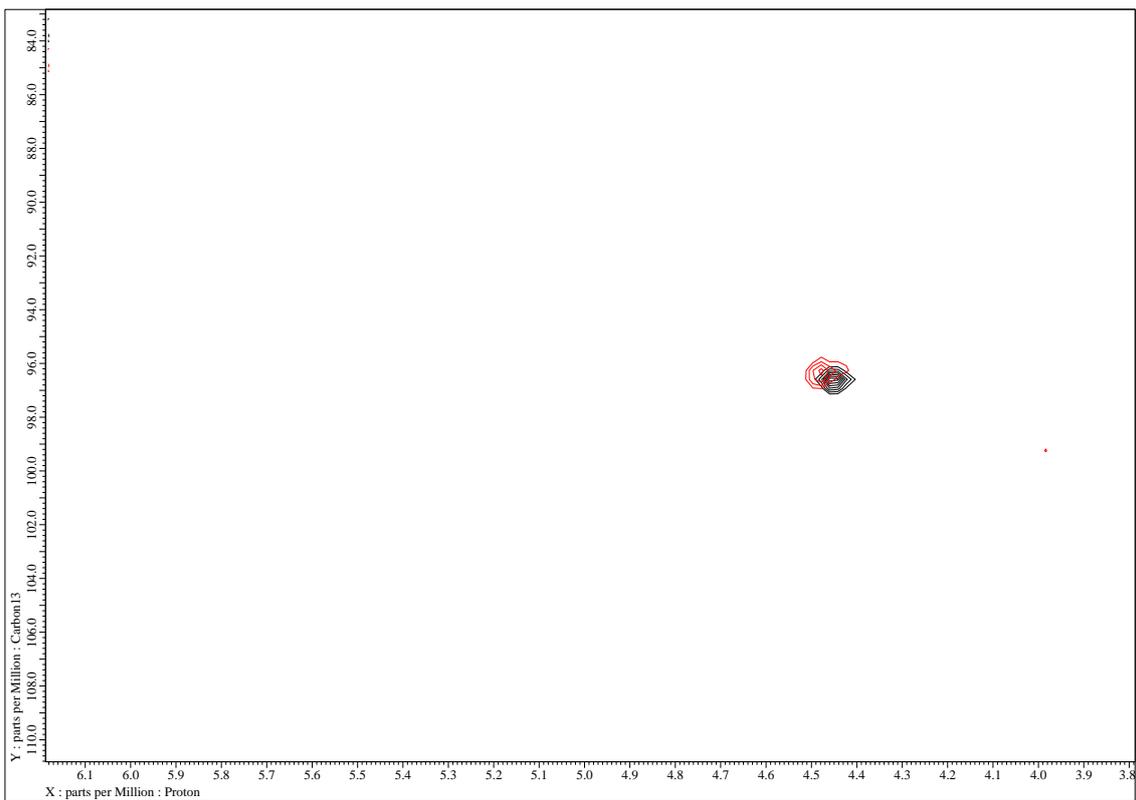
19-d<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトル (黒色)、市販の AmB のもの (赤色) との比較



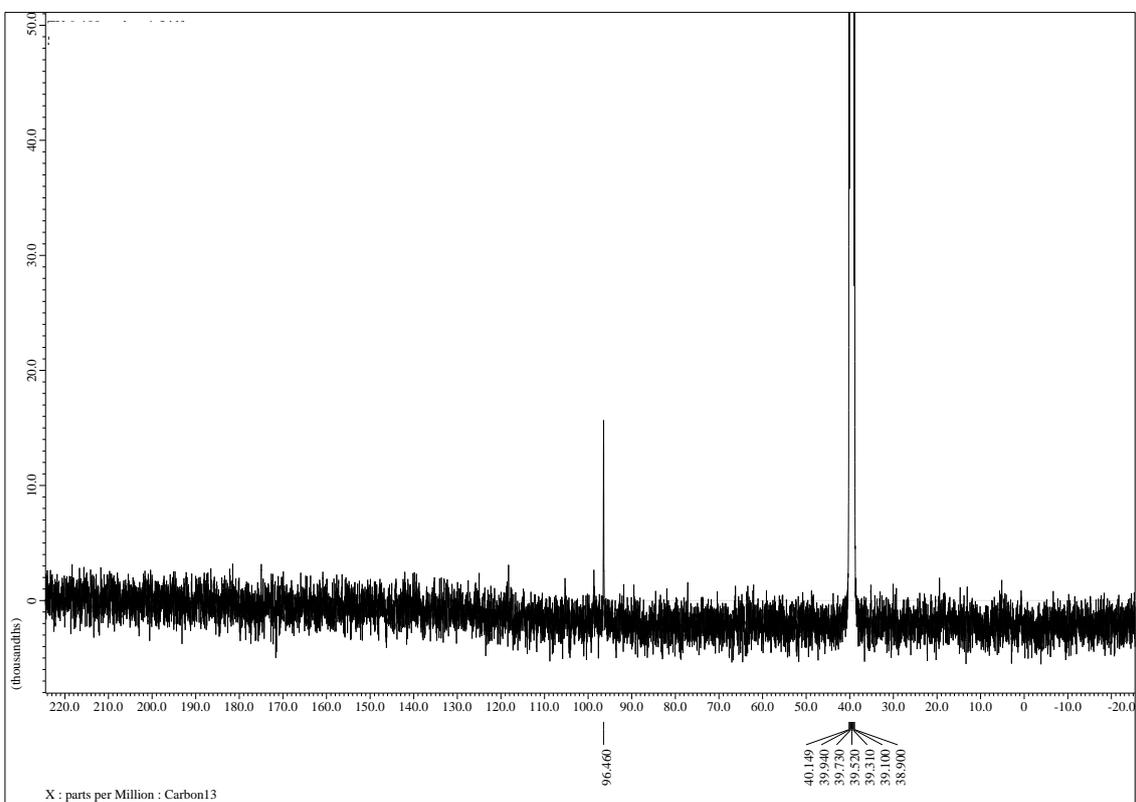
19-*d*<sub>1</sub>-1'-<sup>13</sup>C-AmB の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトル (黒色)、市販の AmB のもの (赤色) との比較







19- $d_1$ -1'- $^{13}\text{C}$ -AmB の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル

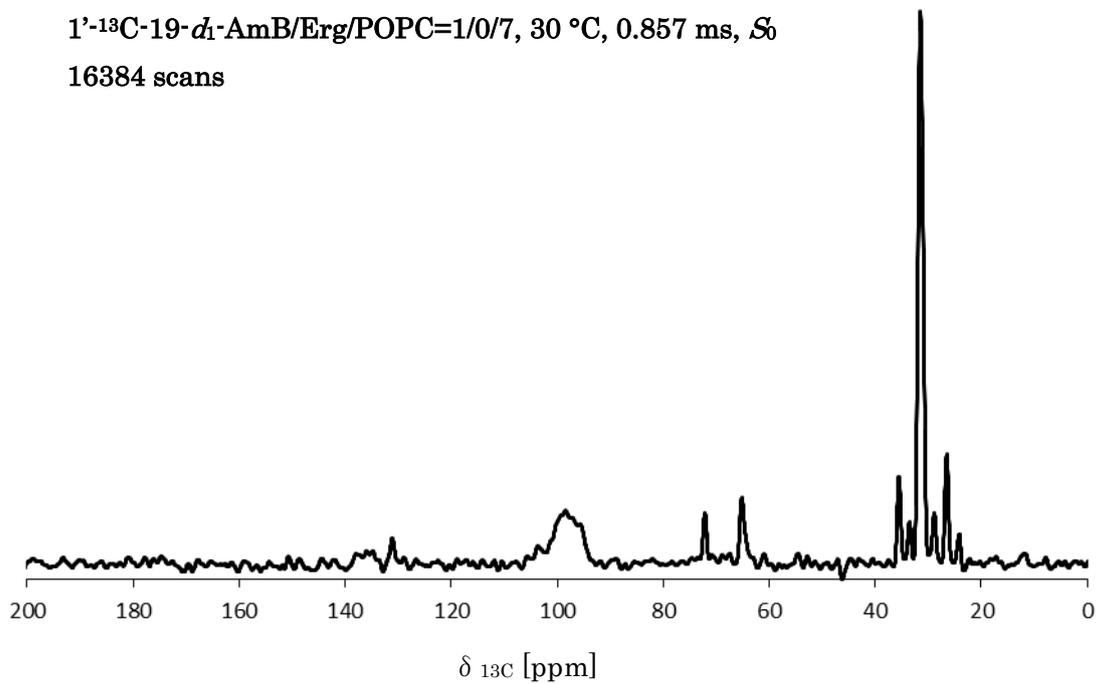


固体 NMR スペクトル

$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/0/7$ , 30 °C, 0.857 ms,  $S_0$

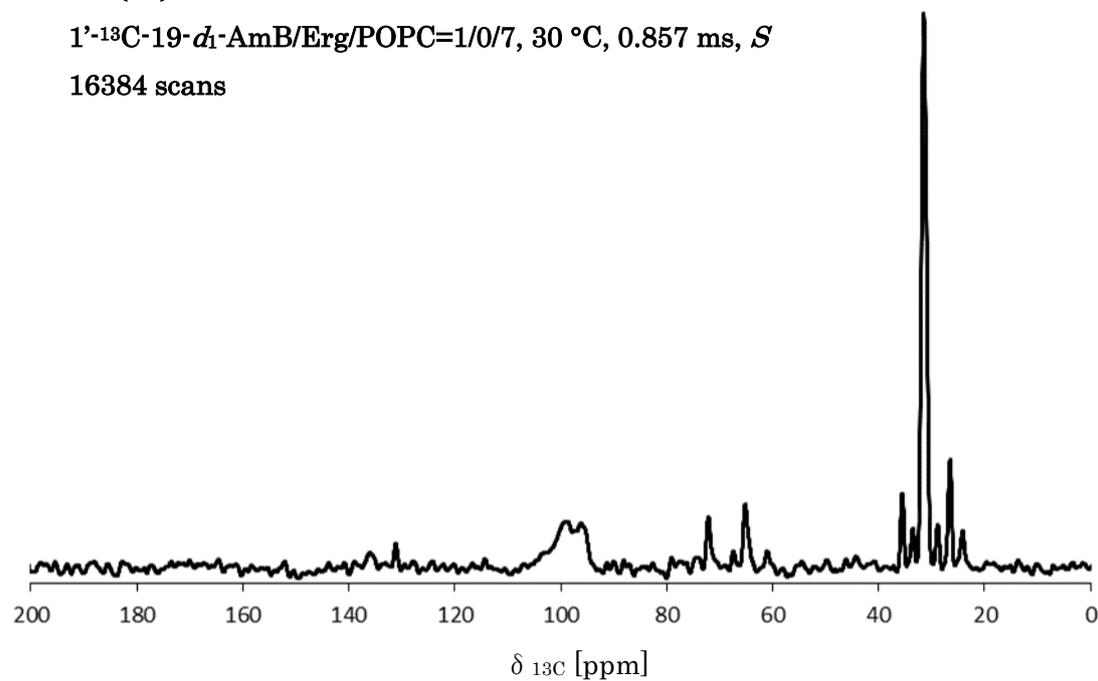
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/0/7$ , 30 °C, 0.857 ms,  $S_1$

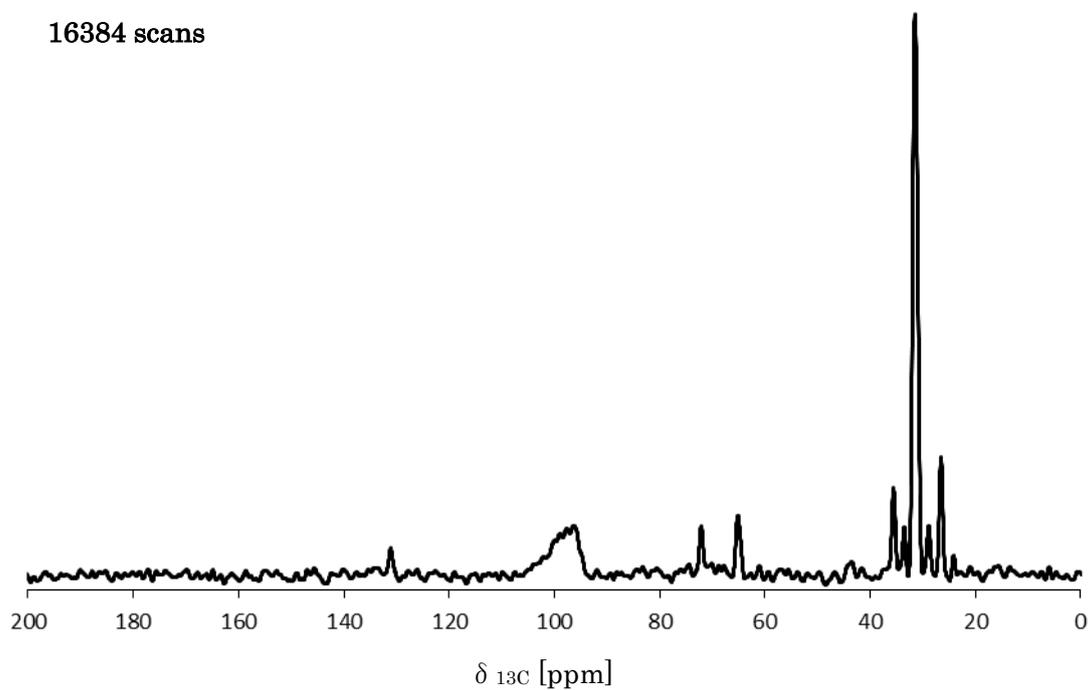
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/0/7$ , 30 °C, 1.429 ms,  $S_0$

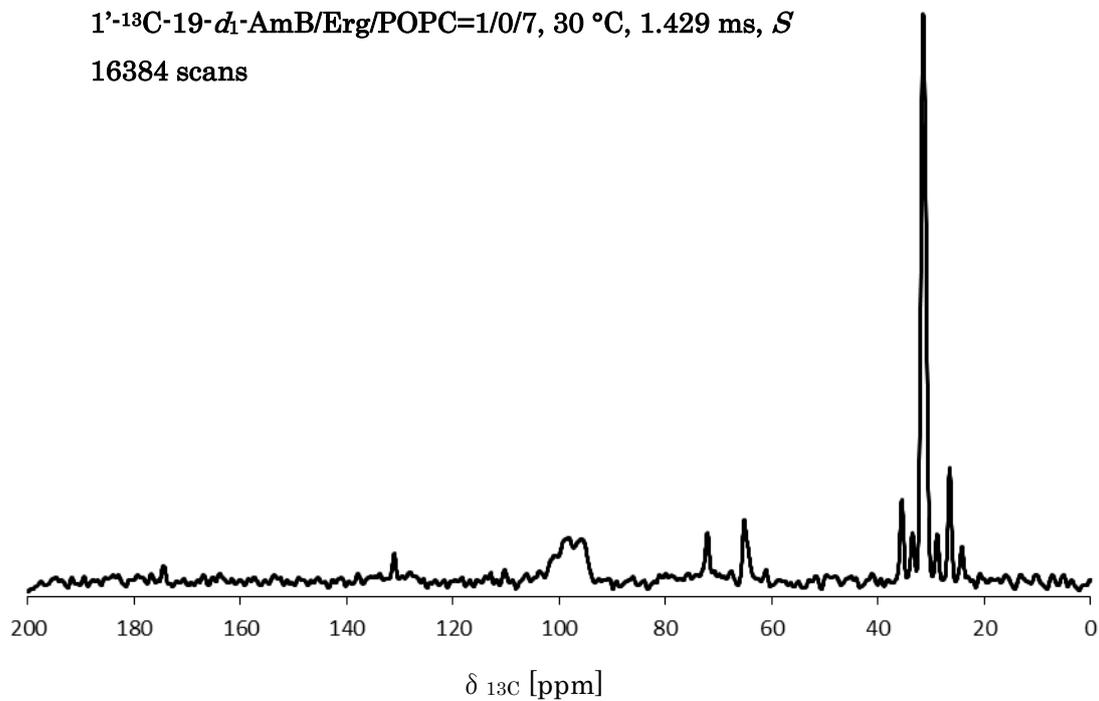
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/0/7$ , 30 °C, 1.429 ms,  $S$

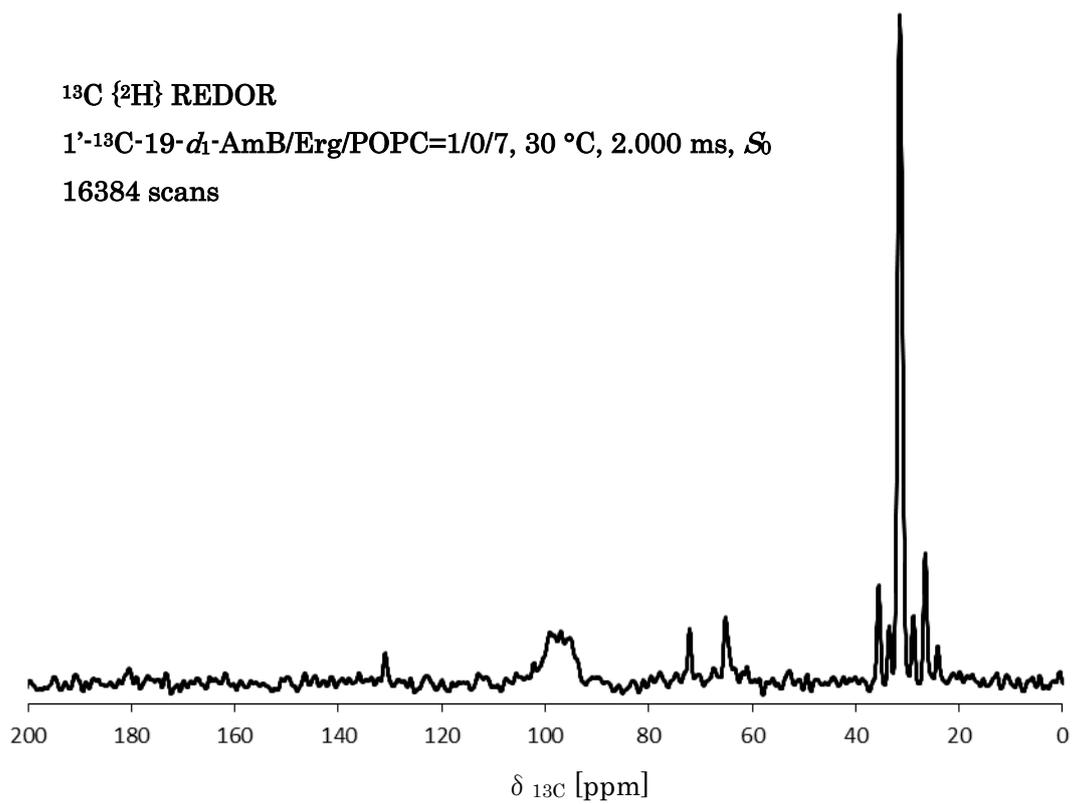
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/0/7$ , 30 °C, 2.000 ms,  $S_0$

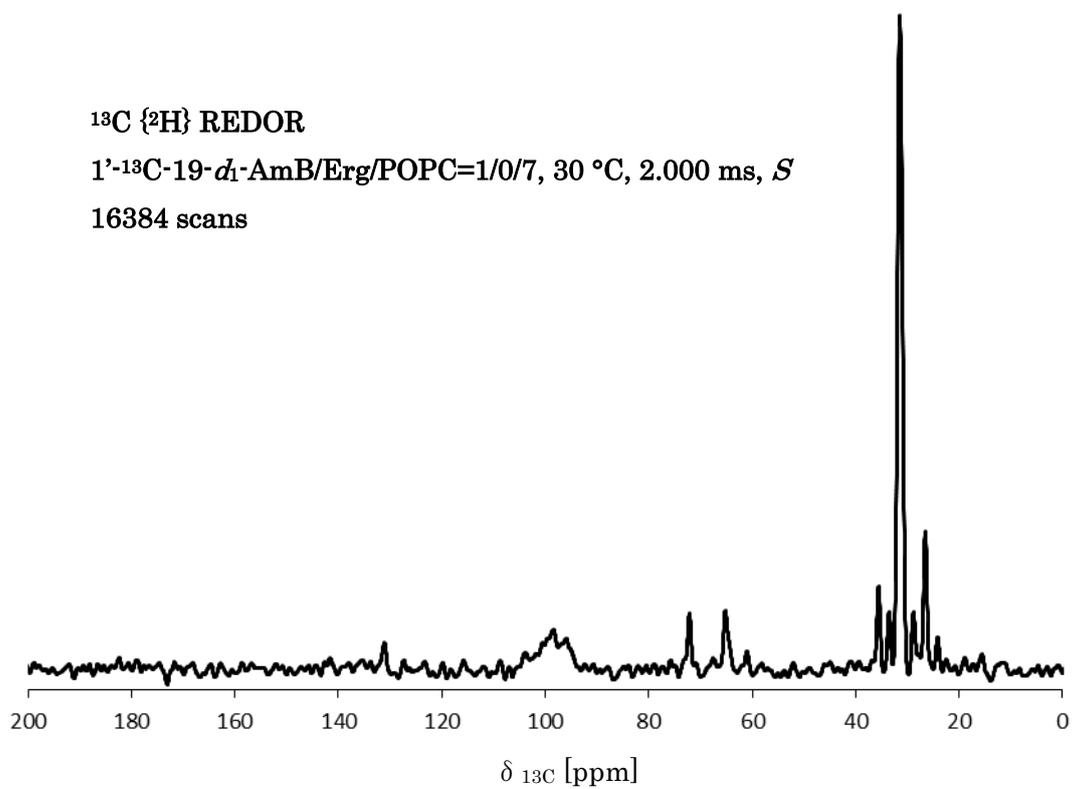
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/0/7$ , 30 °C, 2.000 ms,  $S$

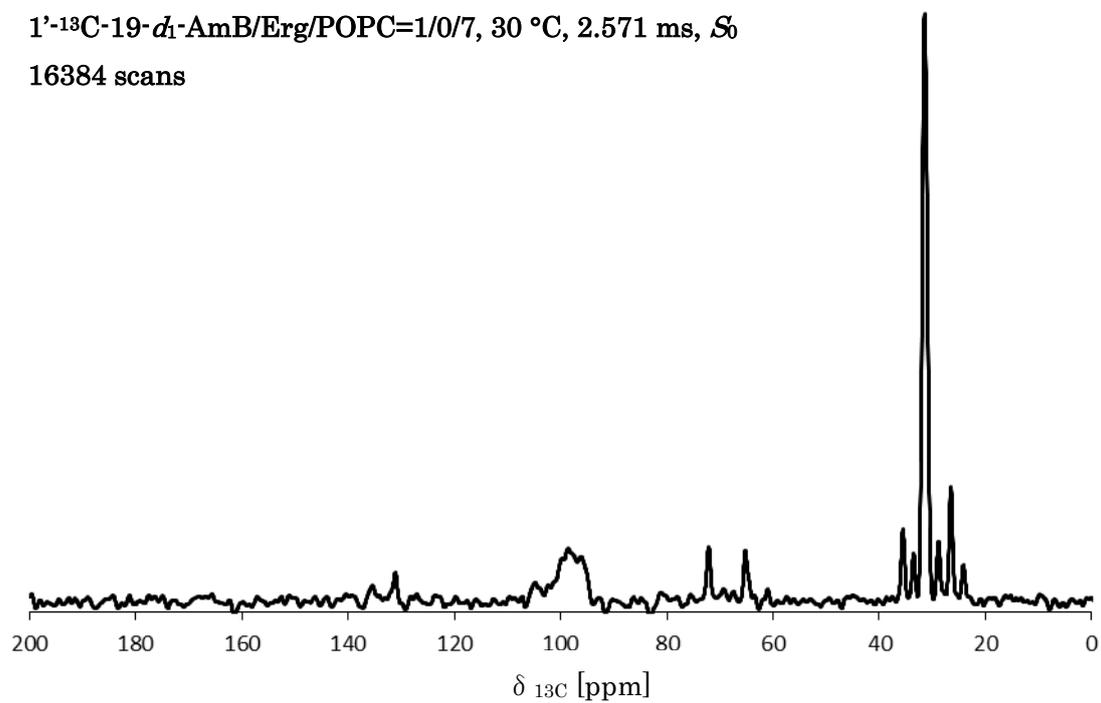
16384 scans



$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR

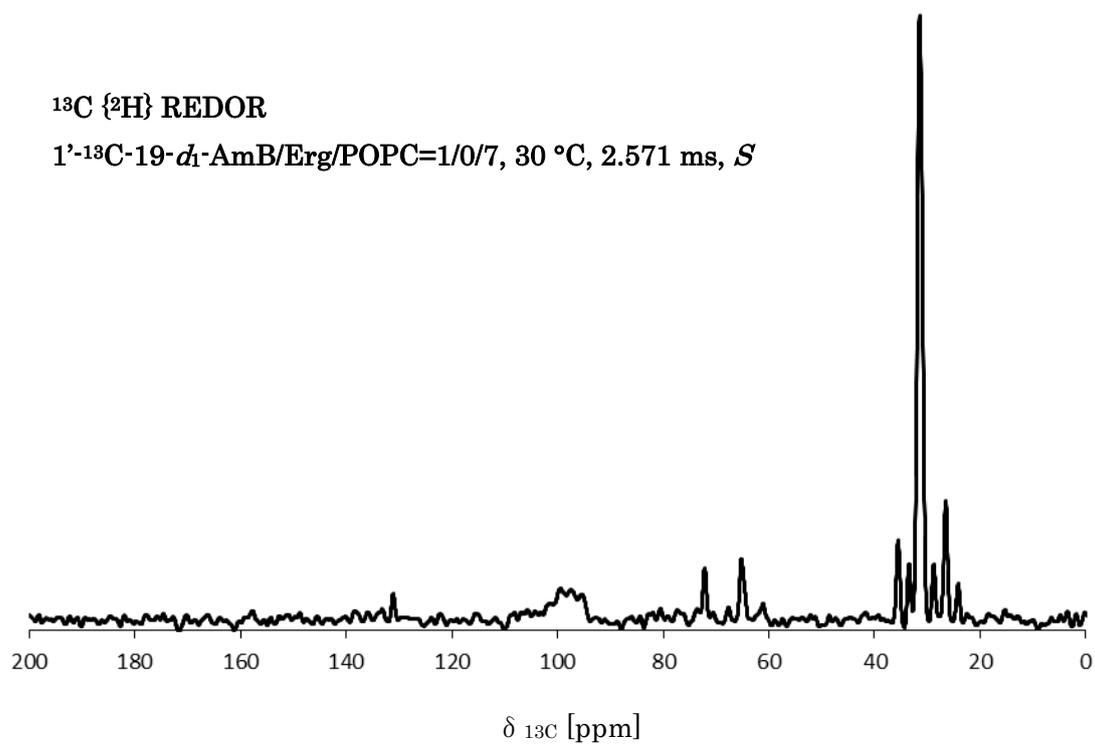
$1\text{'-}^{13}\text{C-}19\text{-}d_1\text{-AmB/Erg/POPC=1/0/7}$ , 30 °C, 2.571 ms,  $S_0$

16384 scans



$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR

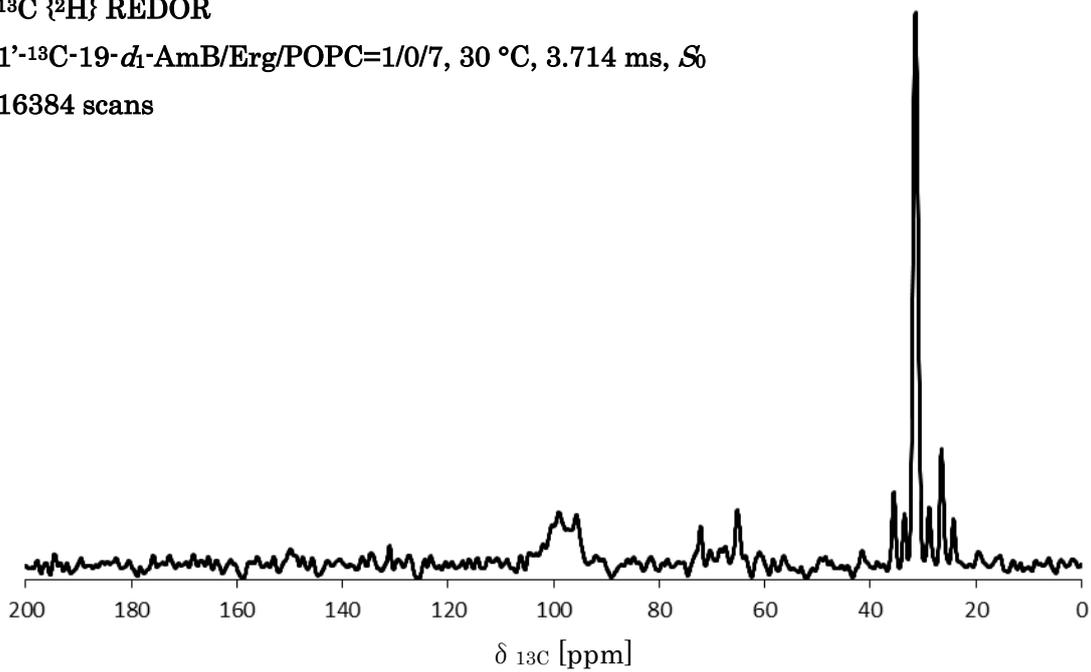
$1\text{'-}^{13}\text{C-}19\text{-}d_1\text{-AmB/Erg/POPC=1/0/7}$ , 30 °C, 2.571 ms,  $S$



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/0/7, 30 °C, 3.714 ms,  $S_0$**

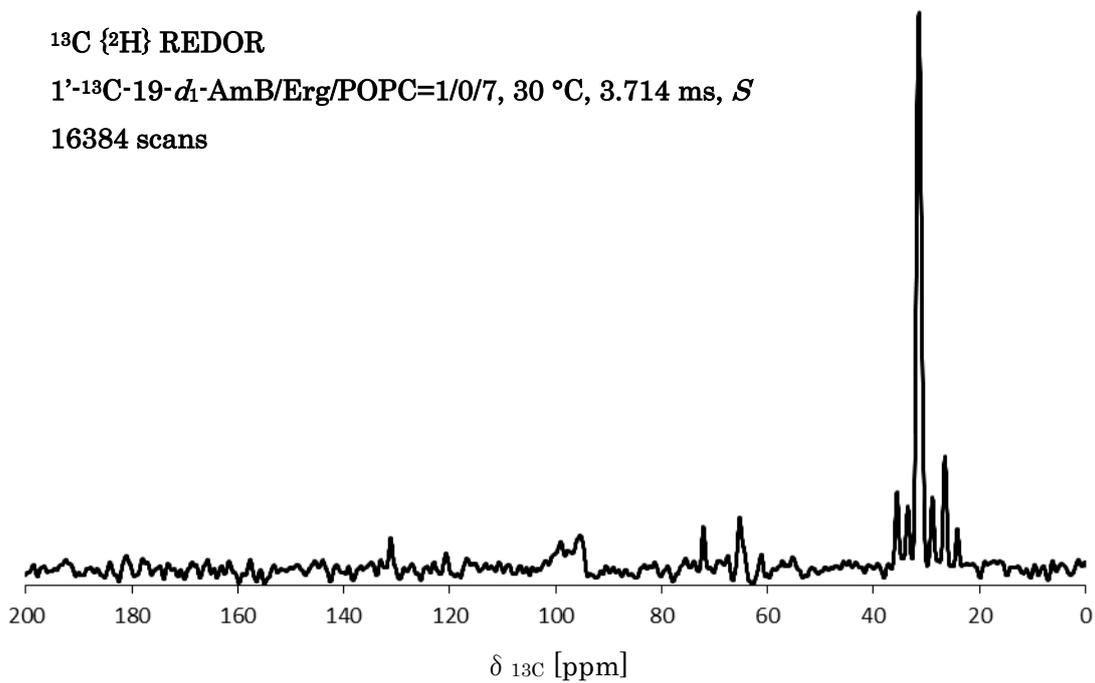
**16384 scans**



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/0/7, 30 °C, 3.714 ms,  $S$**

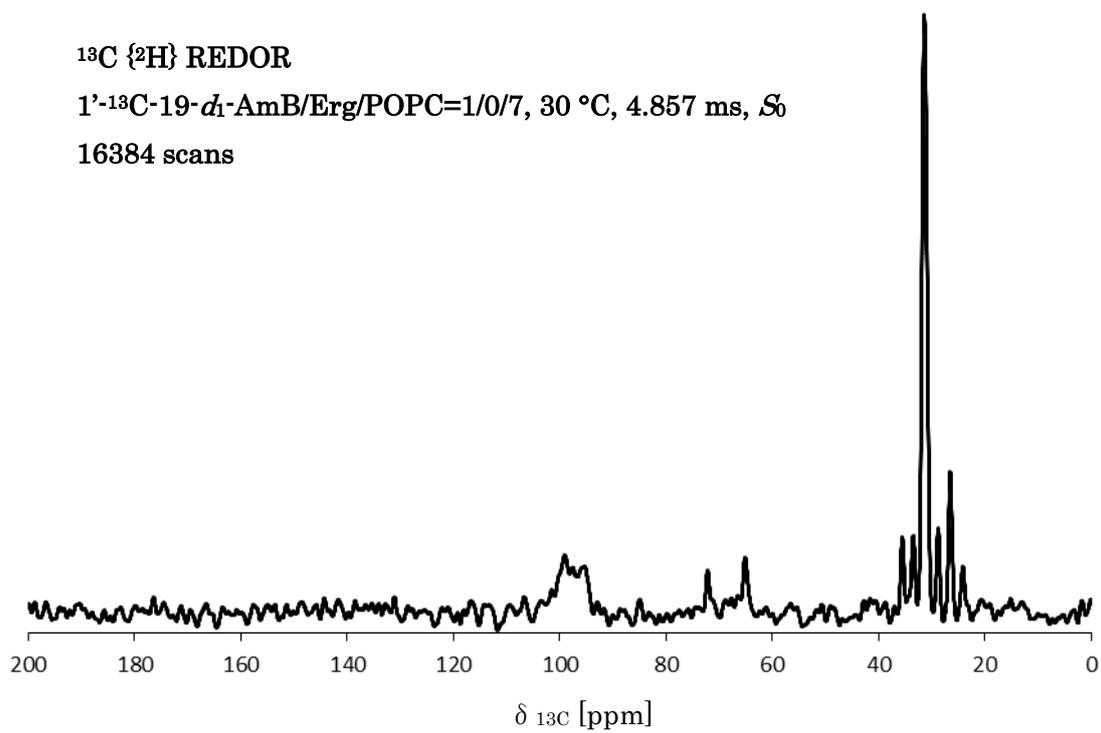
**16384 scans**



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/0/7, 30 °C, 4.857 ms,  $S_0$

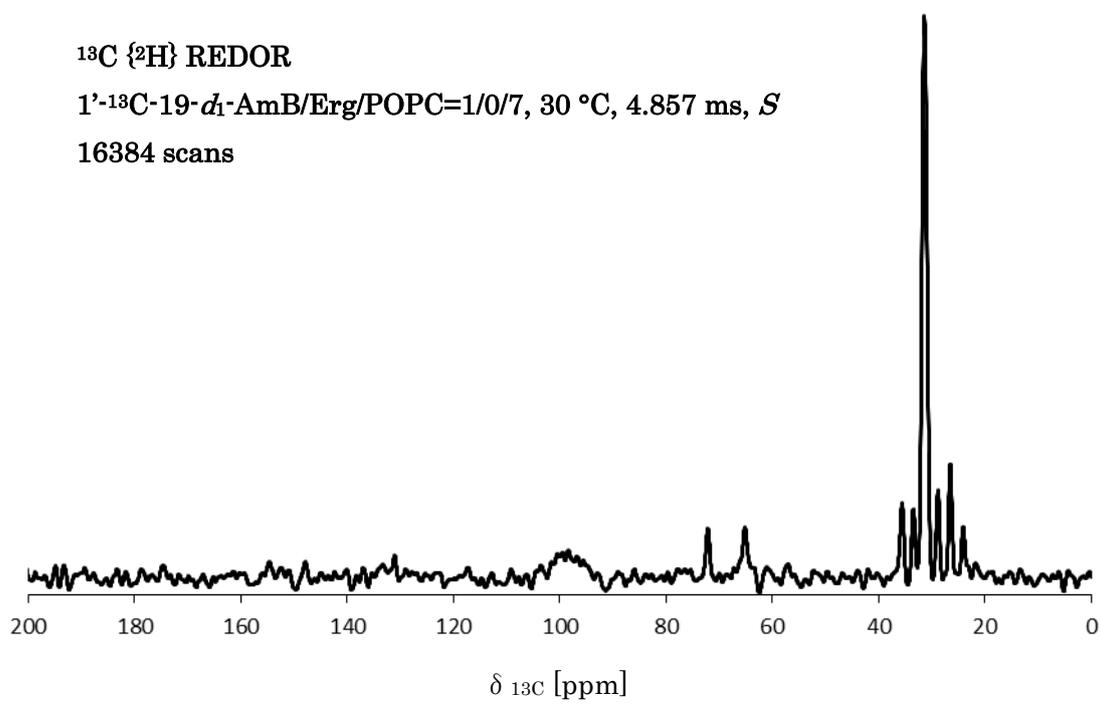
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/0/7, 30 °C, 4.857 ms,  $S$

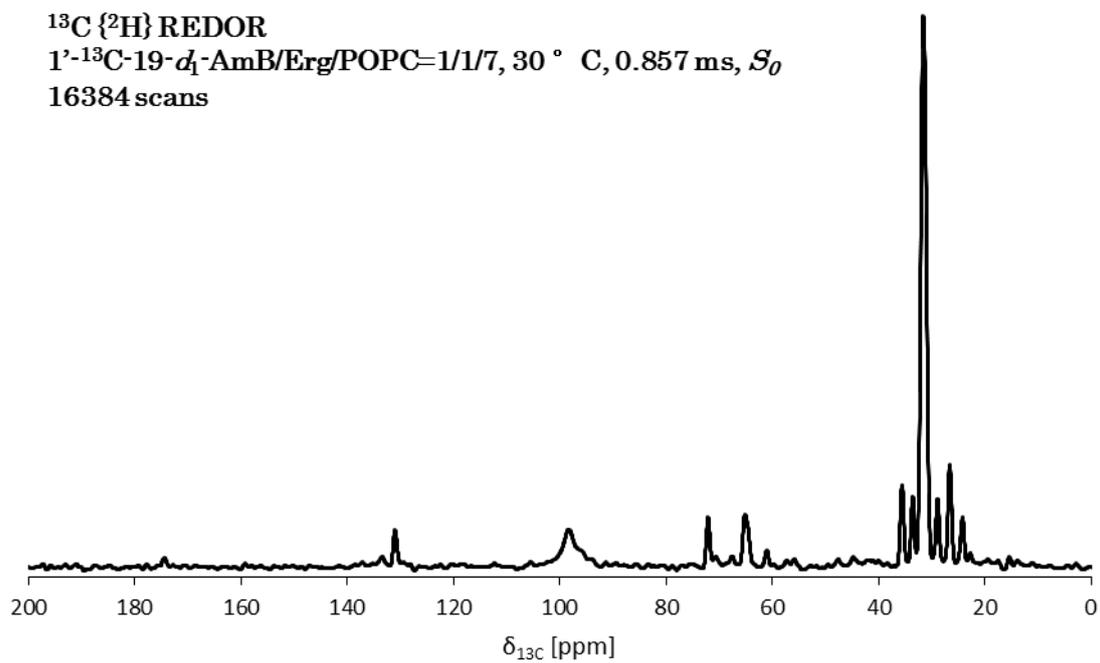
16384 scans



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 0.857 ms,  $S_0$**

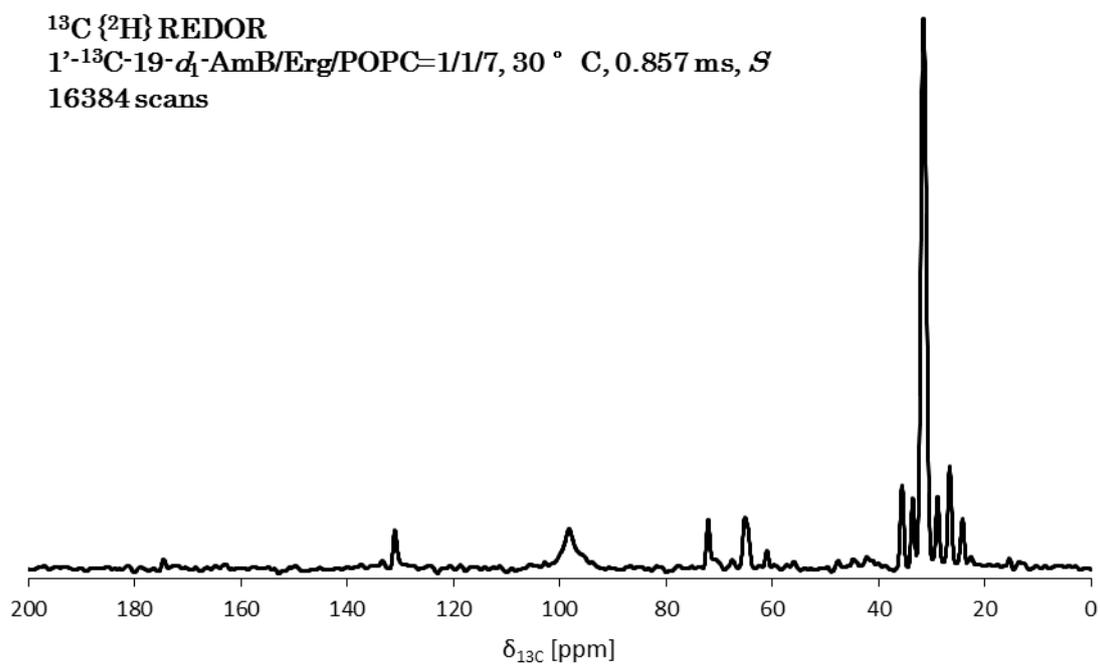
**16384 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 0.857 ms,  $S$**

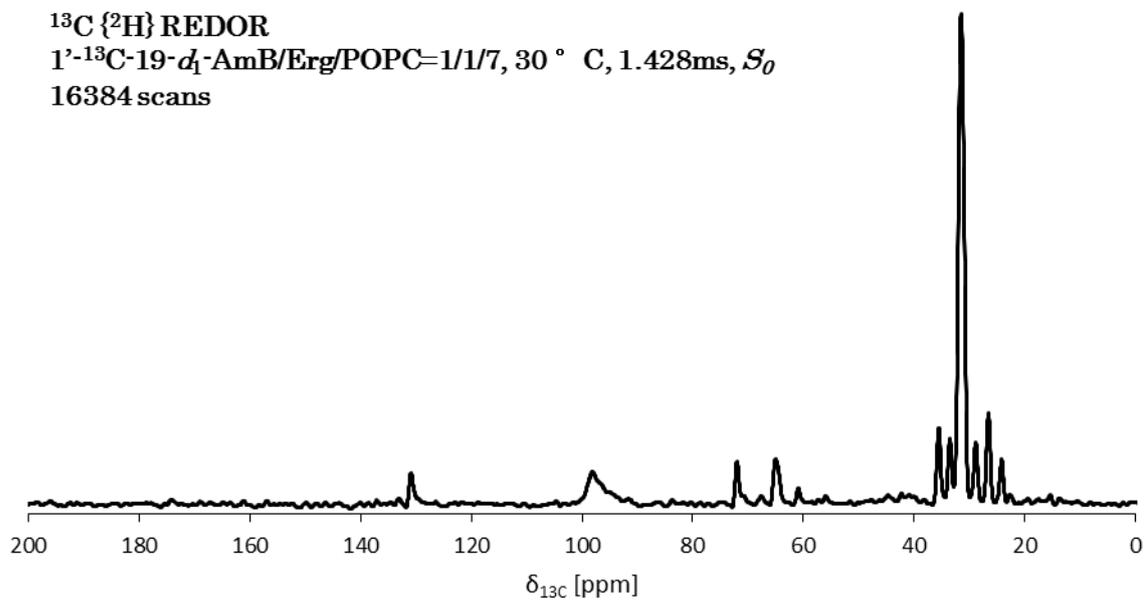
**16384 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/1/7, 30^\circ \text{C}, 1.428\text{ms}, S_0$**

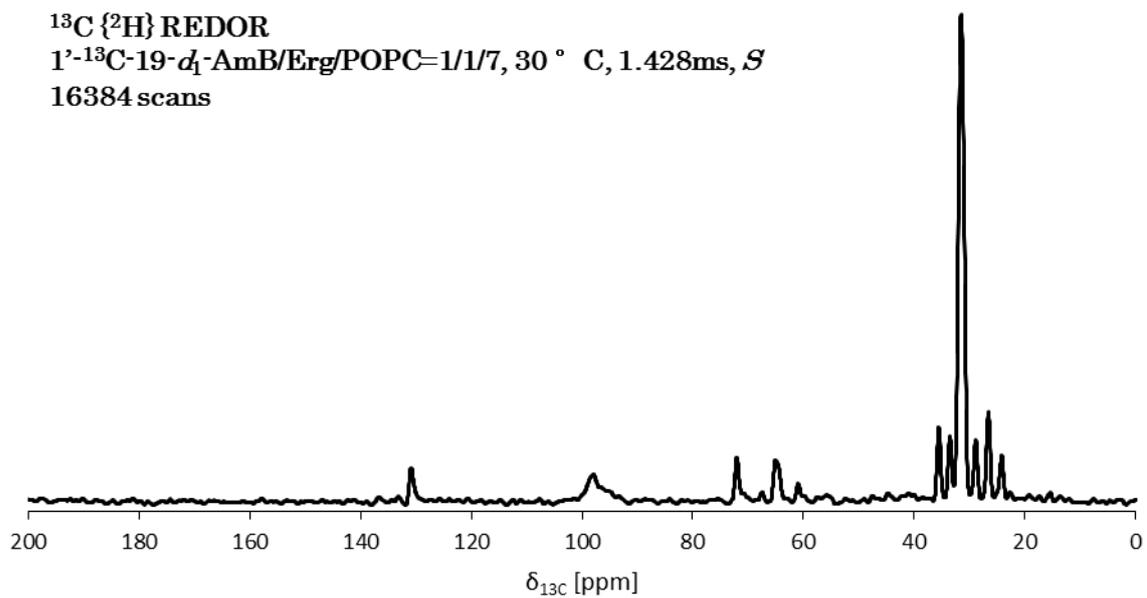
**16384 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/1/7, 30^\circ \text{C}, 1.428\text{ms}, S$**

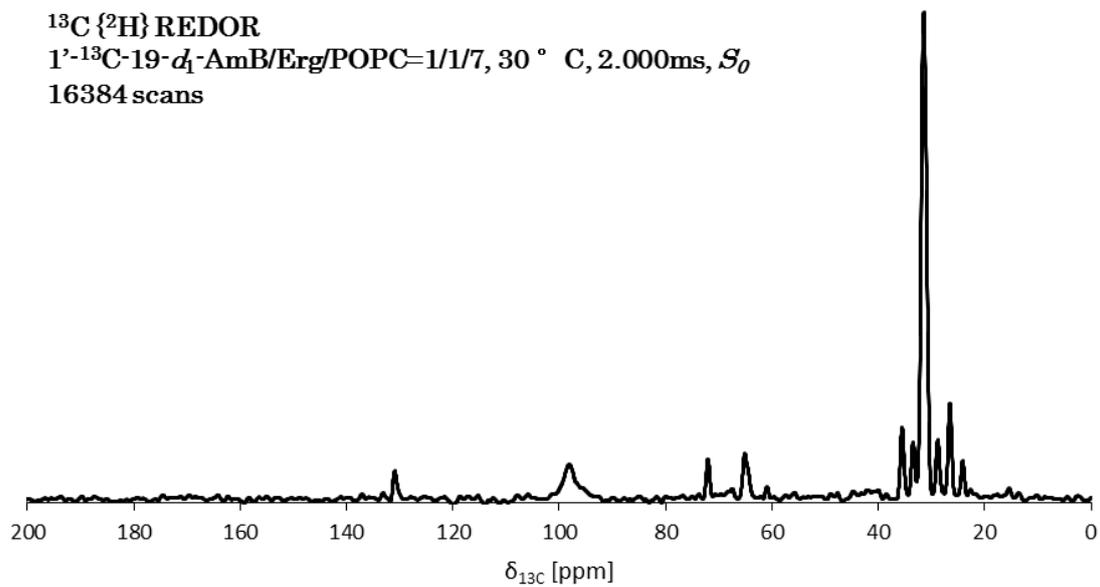
**16384 scans**



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 2.000ms,  $S_0$**

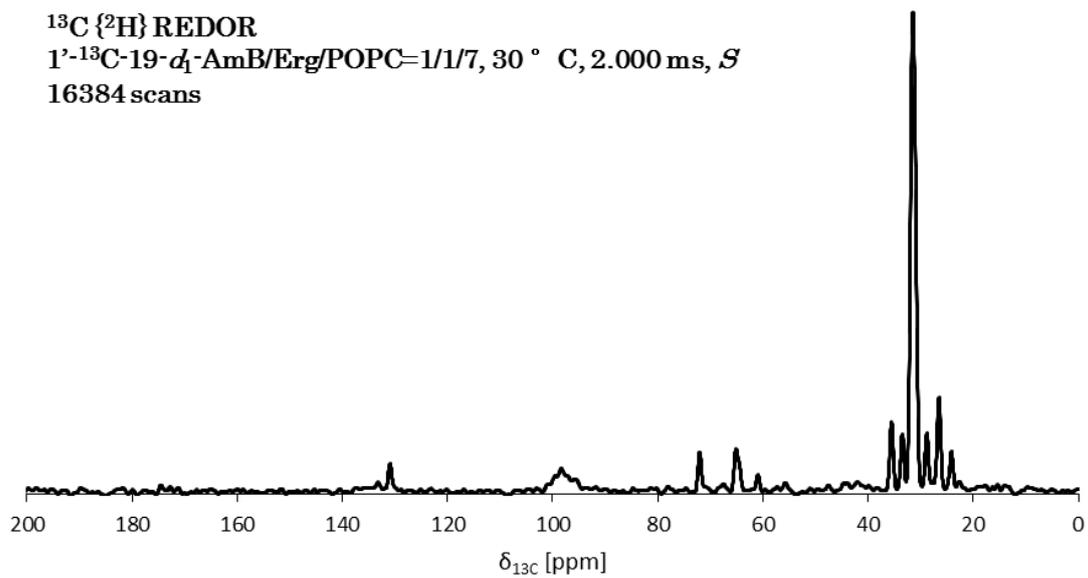
**16384 scans**



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 2.000 ms,  $S$**

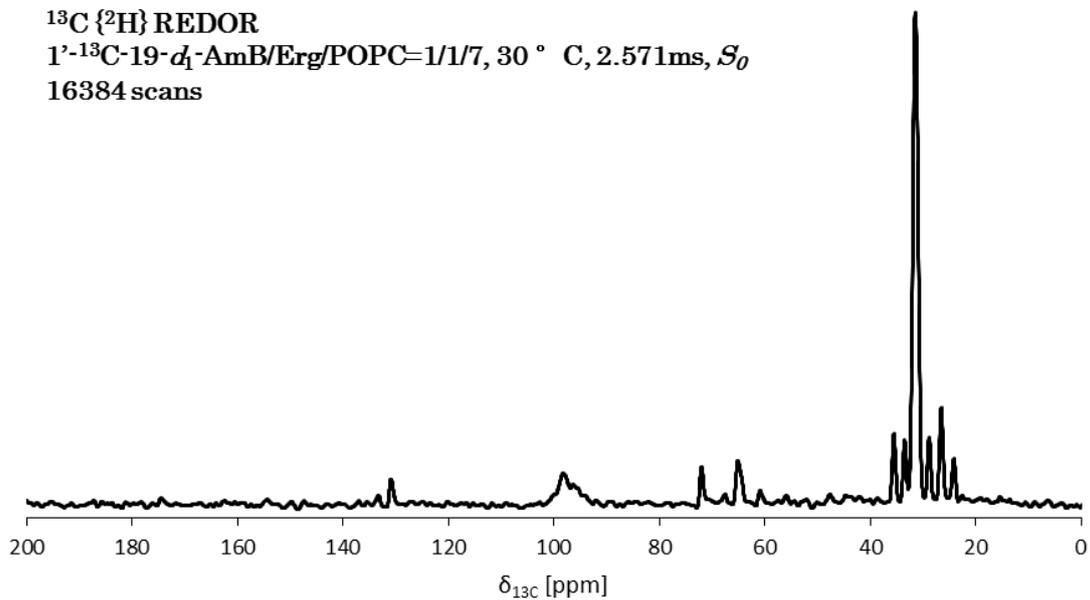
**16384 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/1/7, 30^\circ \text{C}, 2.571\text{ms}, S_0$**

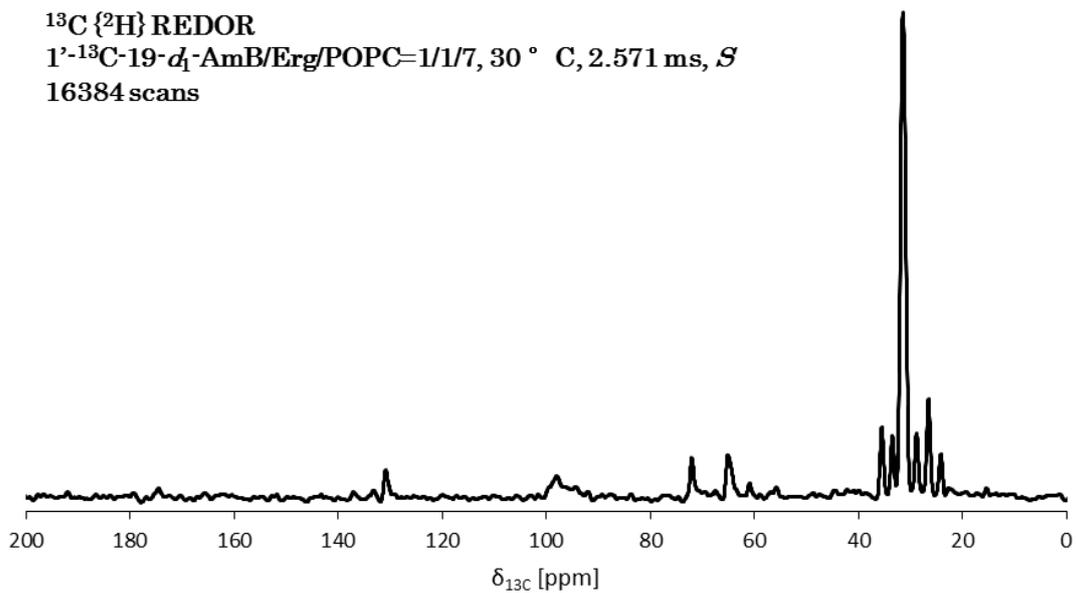
**16384 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/1/7, 30^\circ \text{C}, 2.571\text{ms}, S$**

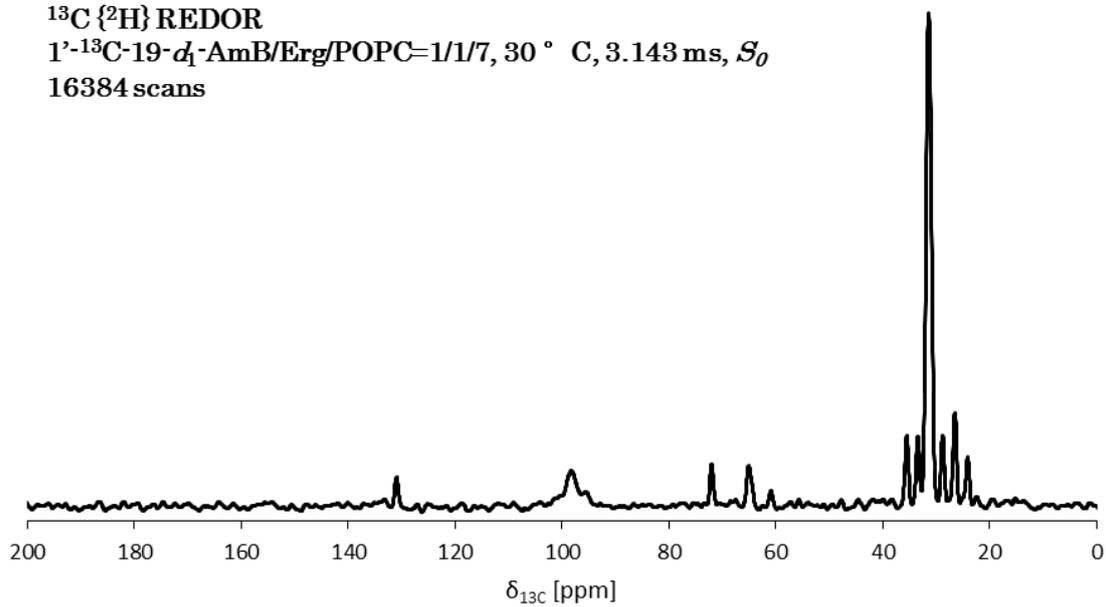
**16384 scans**



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'^{-13}\text{C}$ -19- $d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 3.143 ms,  $S_0$

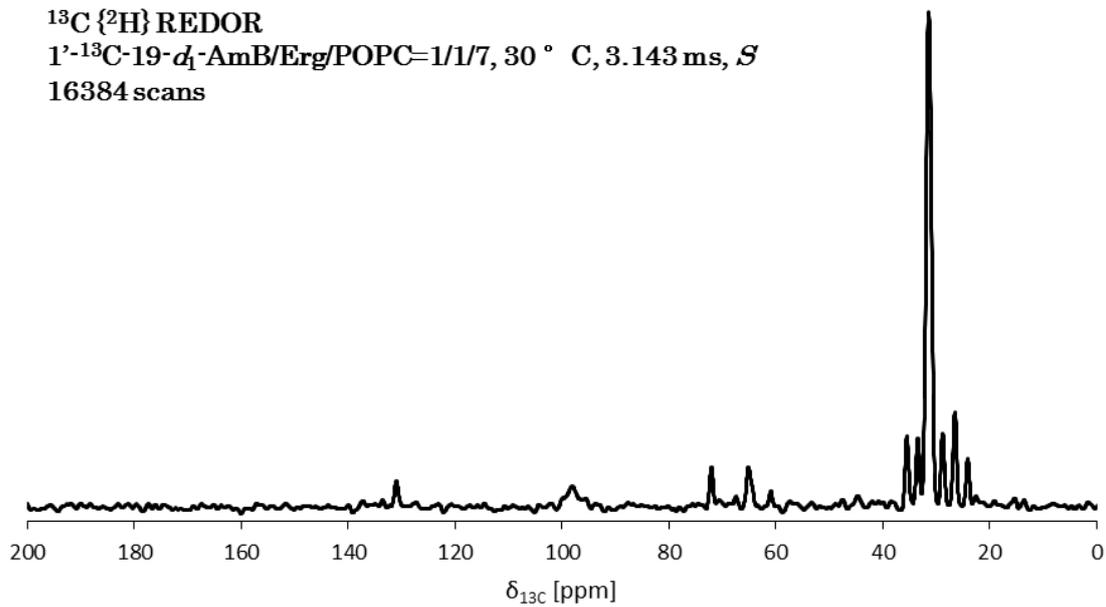
16384 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'^{-13}\text{C}$ -19- $d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 3.143 ms,  $S$

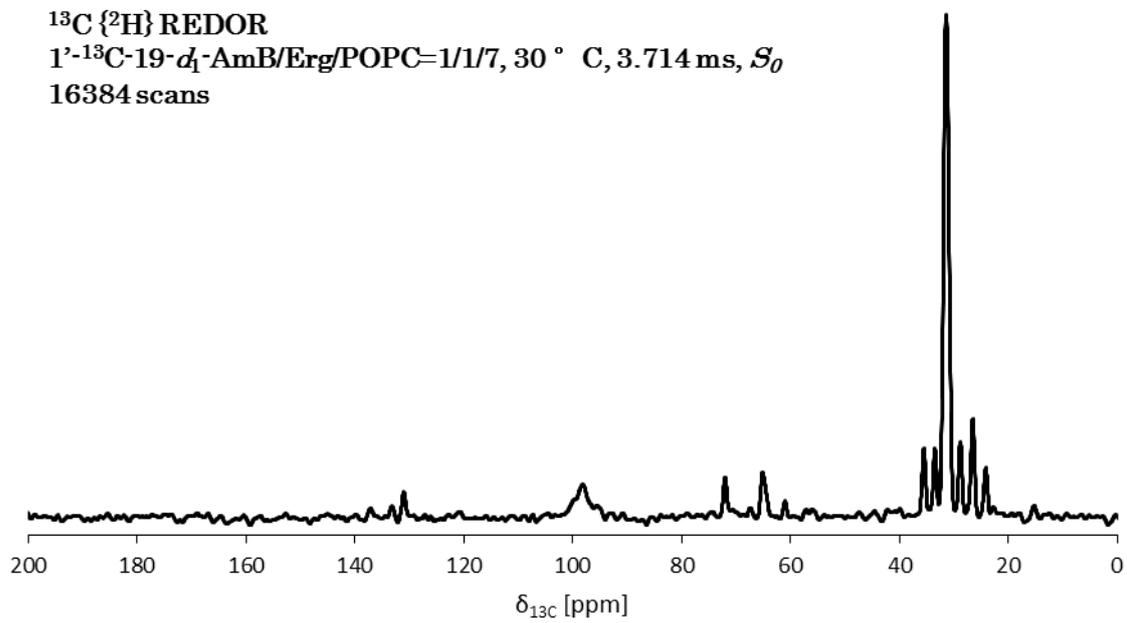
16384 scans



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 3.714 ms,  $S_0$**

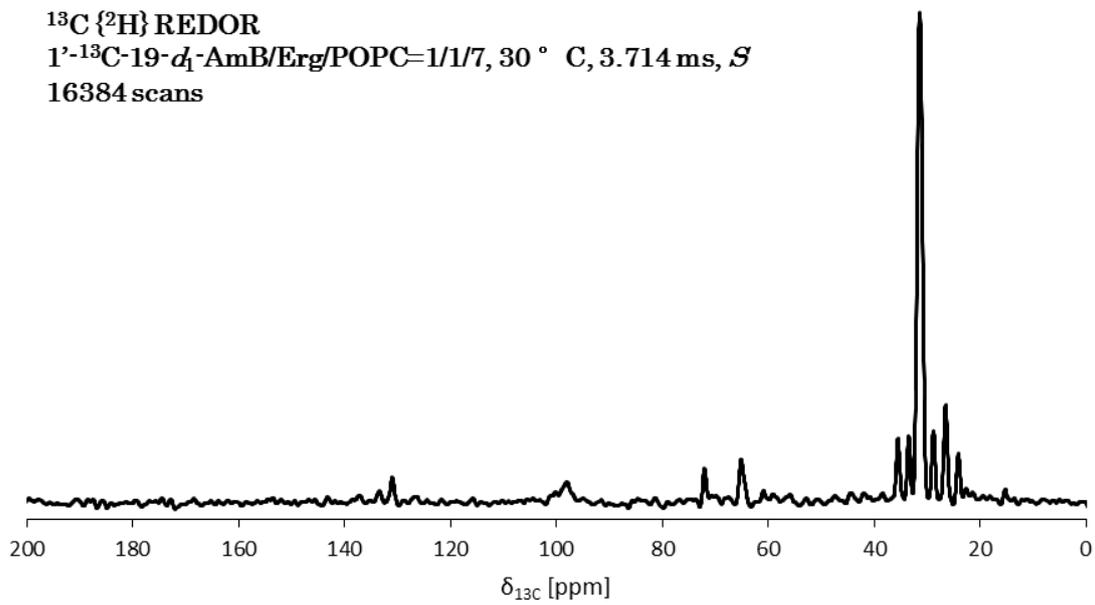
**16384 scans**



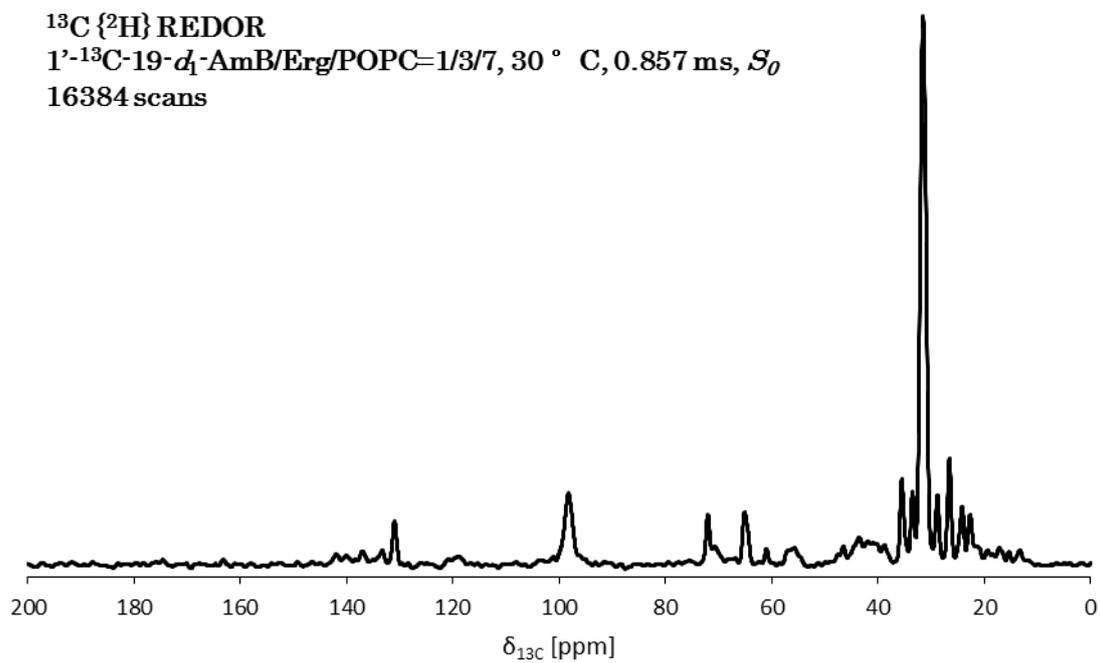
**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/1/7, 30 ° C, 3.714 ms,  $S$**

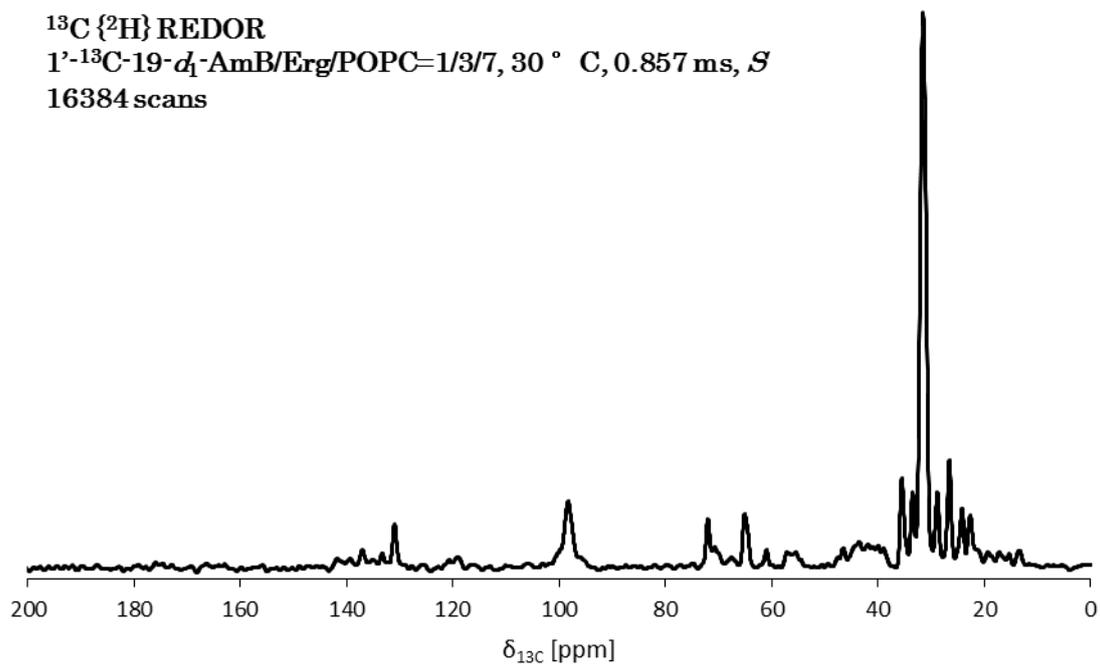
**16384 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**  
 **$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/3/7$ ,  $30^\circ \text{C}$ ,  $0.857 \text{ ms}$ ,  $S_0$**   
**16384 scans**



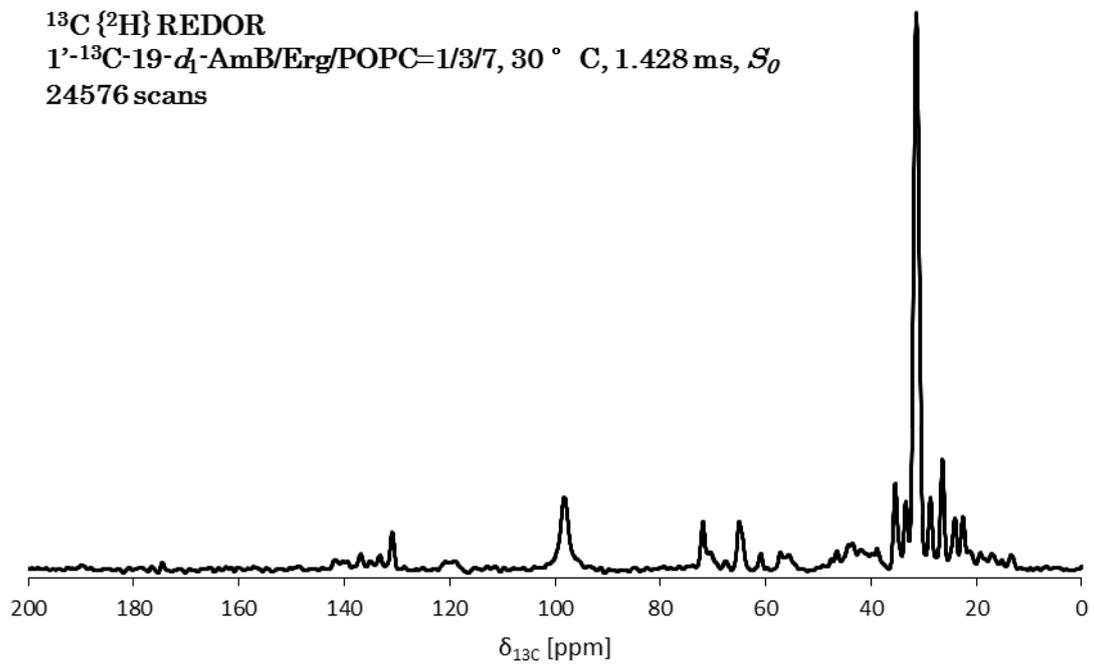
**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**  
 **$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/3/7$ ,  $30^\circ \text{C}$ ,  $0.857 \text{ ms}$ ,  $S$**   
**16384 scans**



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'^{-13}\text{C}$ - $19\text{-}d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 1.428 ms,  $S_0$**

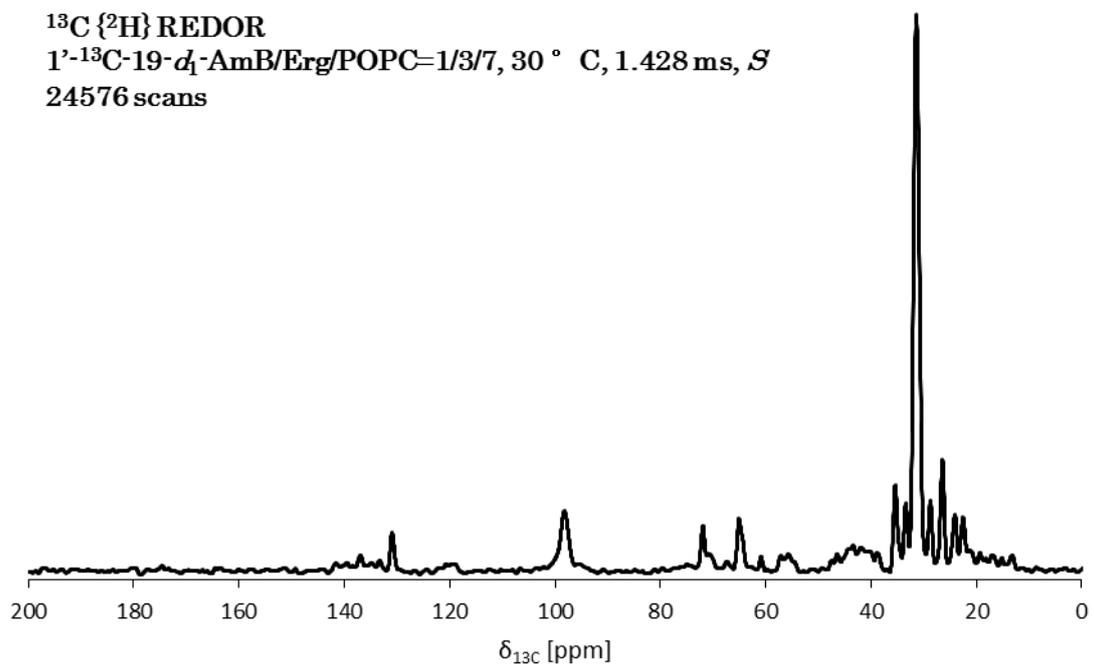
**24576 scans**



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'^{-13}\text{C}$ - $19\text{-}d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 1.428 ms,  $S$**

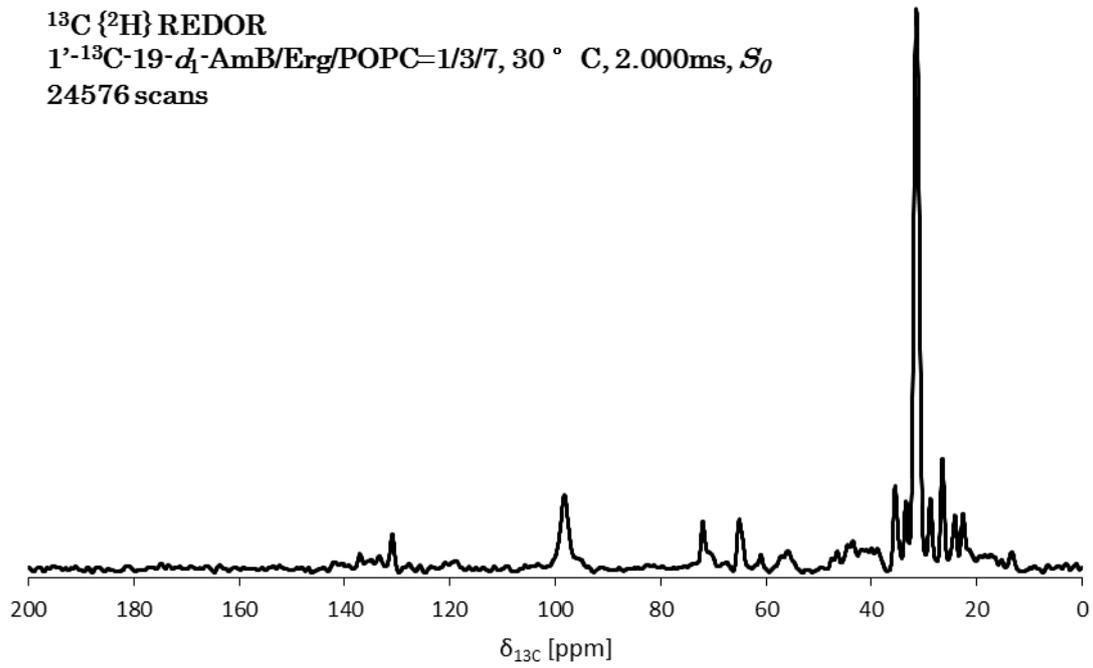
**24576 scans**



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 2.000ms,  $S_0$

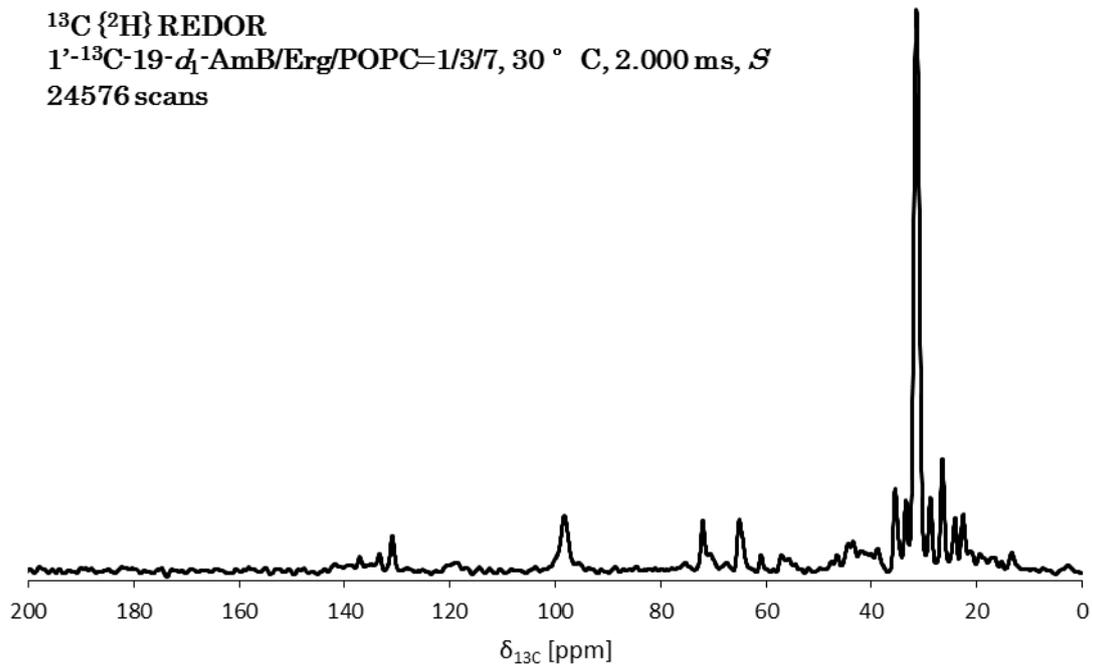
24576 scans



$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR

$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 2.000 ms,  $S$

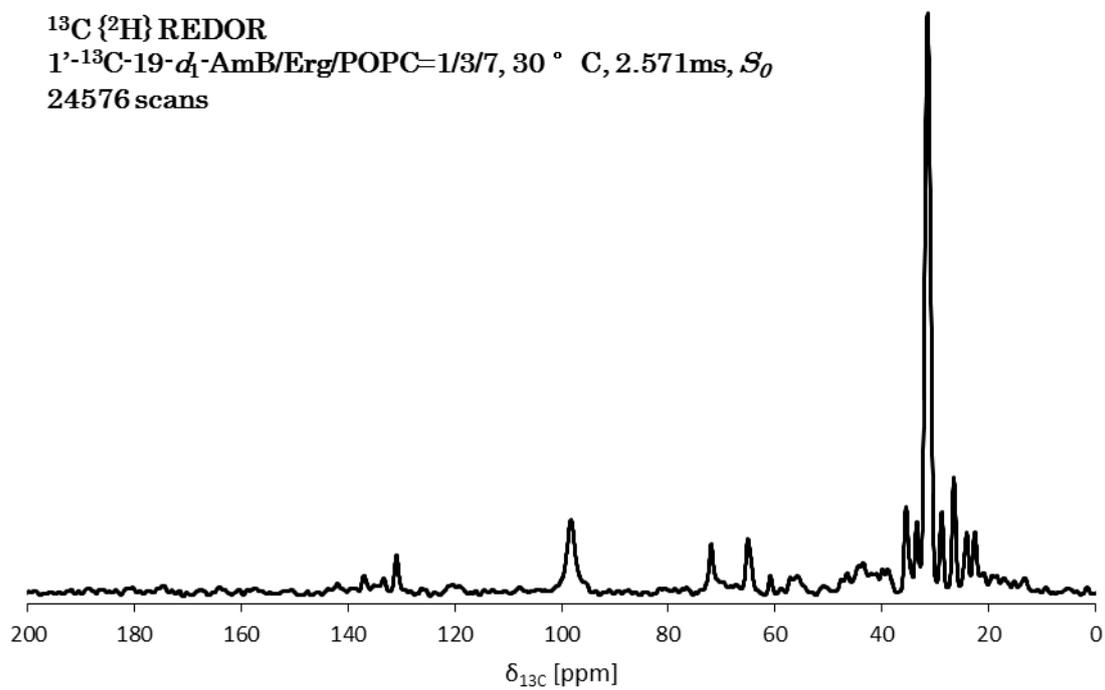
24576 scans



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 2.571ms,  $S_0$**

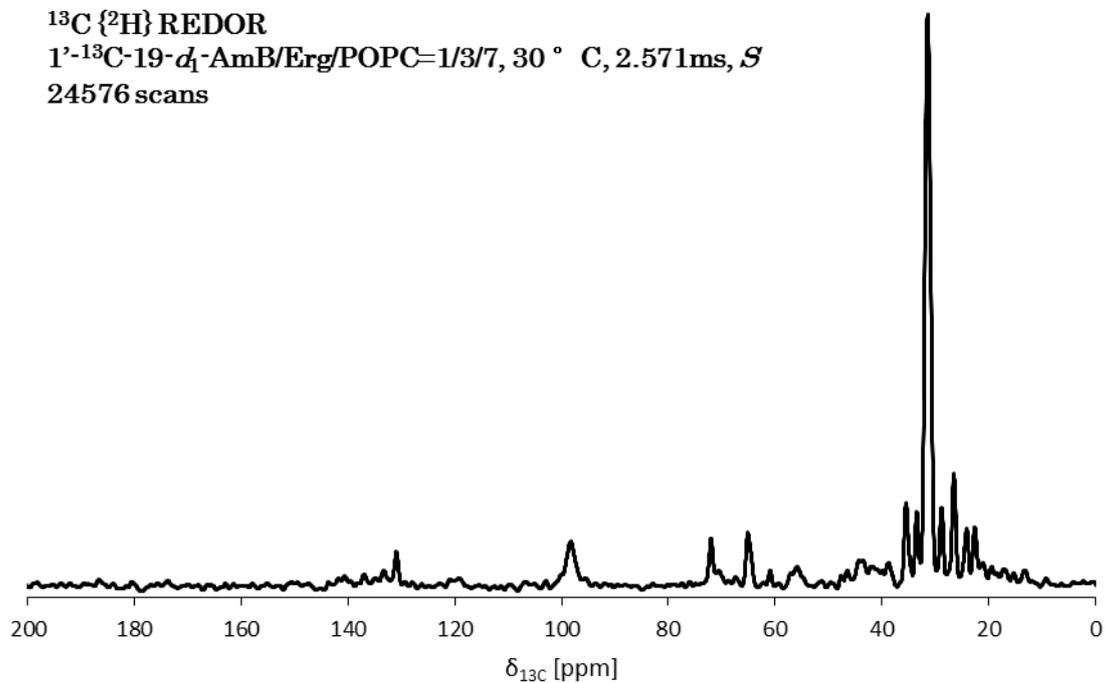
**24576 scans**



**$^{13}\text{C}$   $\{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 2.571ms,  $S$**

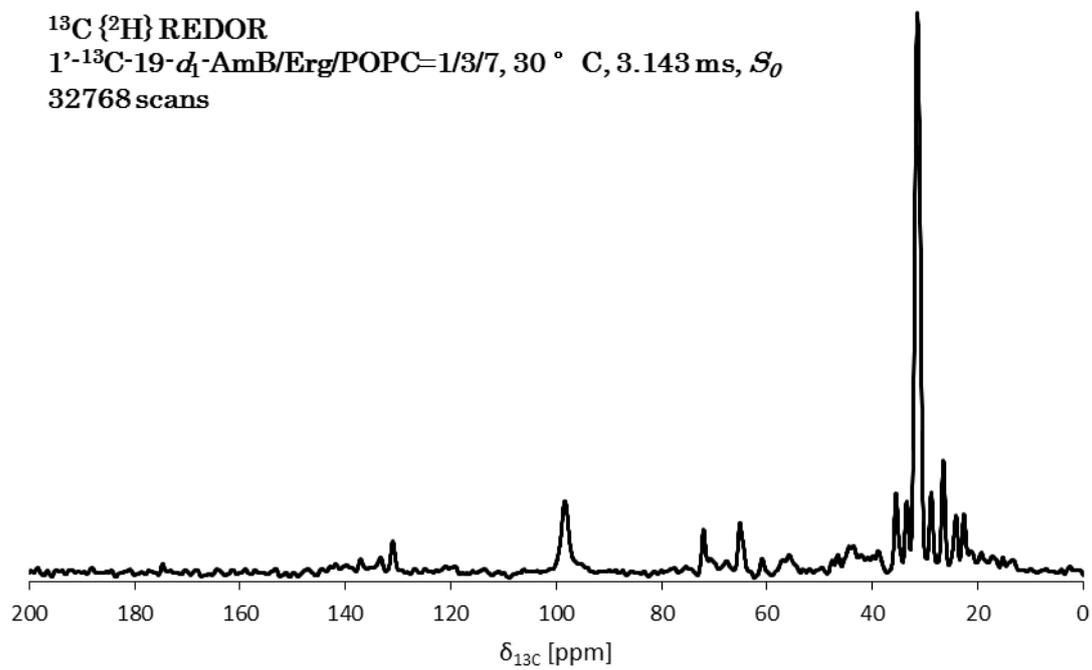
**24576 scans**



**$^{13}\text{C}$  { $^2\text{H}$ } REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 3.143 ms,  $S_0$**

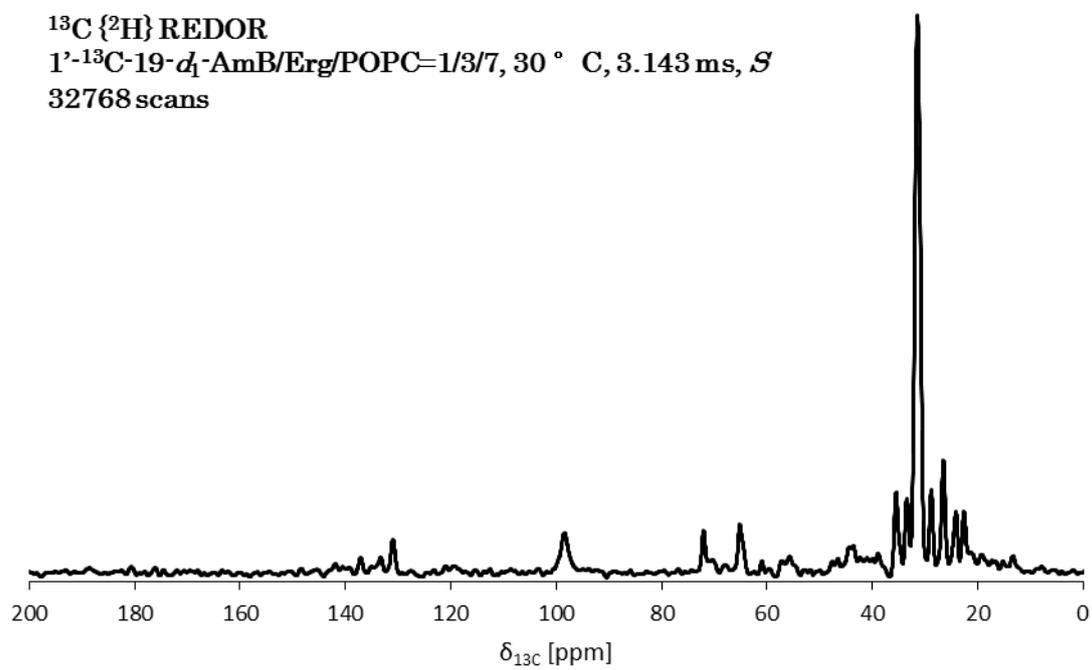
**32768 scans**



**$^{13}\text{C}$  { $^2\text{H}$ } REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}$ - $19-d_1$ -AmB/Erg/POPC=1/3/7, 30 ° C, 3.143 ms,  $S$**

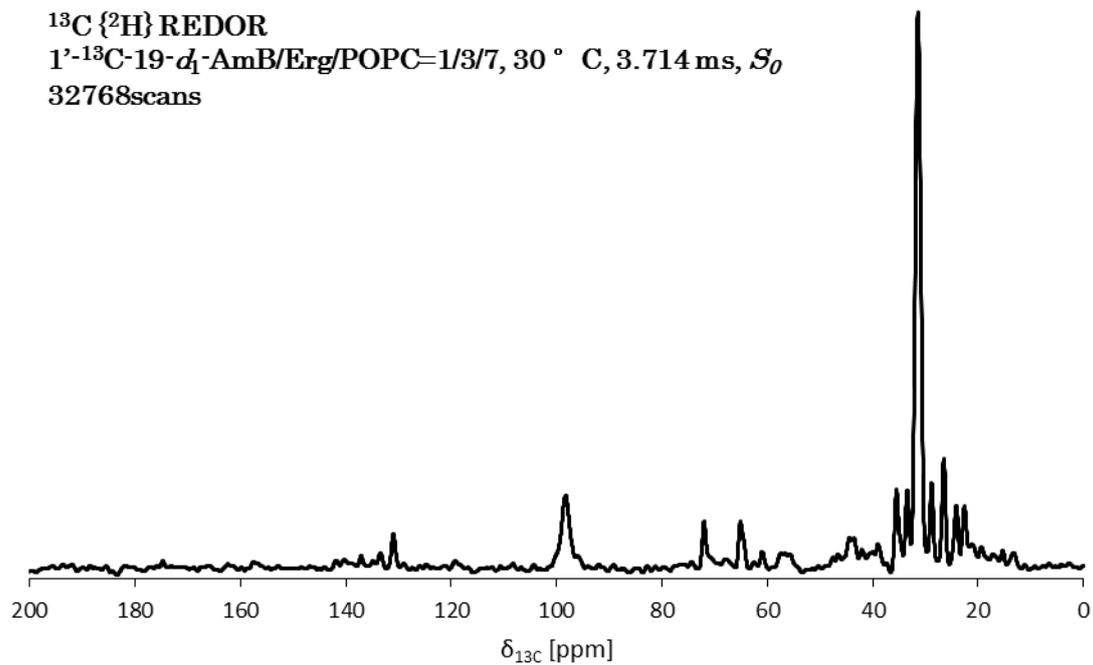
**32768 scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/3/7$ , 30 ° C, 3.714 ms,  $S_0$**

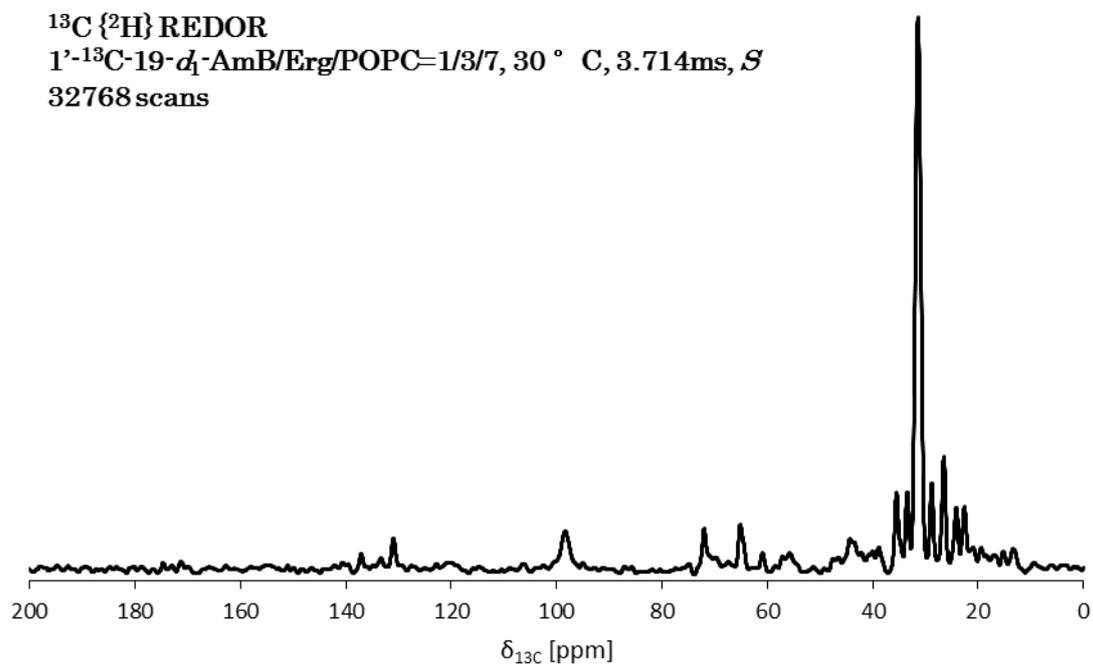
**32768scans**



**$^{13}\text{C} \{^2\text{H}\}$  REDOR**

**$1'-^{13}\text{C}-19-d_1\text{-AmB/Erg/POPC}=1/3/7$ , 30 ° C, 3.714ms,  $S$**

**32768 scans**



## 謝辞

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、遂行するにあたり大変多くの方々の御指導、御助言を賜りましたことに対して、ここに感謝の意を表明させていただきます。

大変興味深い研究テーマや研究を行う場を与えてくださると共に、研究や人生などの様々な面において、多大な御指導を頂きました本研究室 村田道雄教授に深く感謝致します。

本研究の遂行、計画にあたって数々の御助言を賜りました、九州大学大学院理学研究院、松森信明教授に深く感謝いたします。また、有機合成において多大なる御指導、御助言を頂きました、花島慎弥講師、土川博史助教に深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたって直接の御指導を賜りました梅川雄一特任助教に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、貴重な試料を提供していただきました Dublin 大学の Patrick Caffrey 教授、Leicester 大学の Bernard Rawlings 博士に深く感謝致します。

抗真菌活性試験を遂行していただきました塩野義製薬株式会社 卷秀樹様、堀田幸夫様に深く感謝致します。

また、NMR 測定の際に多大なご協力をしていただきました大阪大学大学院理学研究科技術部 稲角直也博士、戸所泰人博士に深く感謝致します。

また、共に研究を行い支えて頂きました本研究室の皆様にも深く感謝致します。

最後に、精神的、経済的に支えて頂きました、家族に感謝致します。