The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Atomistic mechanism of cholesterol-dependent membrane activity of saponins with different glycosylation positions
Author(s)	Malabed, Raymond
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69363
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Raymond Samson Malabed)	
Title	Atomistic mechanism of cholesterol-dependent membrane activity of saponins with different glycosylation positions (糖修飾位置の異なるサポニン類のコレステロール依存的な膜活性機構の精密解析)

Abstract of Thesis

Saponins are naturally occurring amphiphilic compounds derived from various plant and marine organisms. They are mainly composed of a hydrophobic sapogenin backbone which could be of steroid or triterpenoid in origin. On the other hand, the hydrophilic moiety is comprised of sugar groups attached to the sapogenin backbone via an ester and ether linkage. The structure of sapogenin ring and sugar moiety could differ for every saponin. In addition, the attached sugar moiety can also differ in terms of the number of saccharide units, branching of sugars and functionalization of some of its portion. These variations gives each saponin a unique structure. Saponins have also been primarily used as foaming agents and ingredients in making soap. The pharmacological value of saponins has been cited in terms of its ability to reduce cardiovascular diseases and prevent cancer. Various saponins have already been studied including digitonin, soyasaponin Bb(I) and glycyrrhizin. These saponins have significant difference in their structures, but one common structural property among these saponins is the presence of sugar moiety attached to C3 of sapogenin backbone. However, some unusual saponins have already been isolated in plants including OSW-1. OSW-1 is a structurally unique steroidal saponin isolated from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*, and has exhibited highly potent and selective cytotoxicity in tumor cell lines. OSW-1 contains an acylated disaccharide moiety attached to C16 of steroid backbone. This study aimed to investigate the molecular mechanism for the membrane-permeabilizing activity of OSW-1 in comparison with those of other saponins by using various spectroscopic and microscopic approaches.

The membrane effects and hemolytic activity of OSW-1 were markedly enhanced in the presence of membrane cholesterol. Binding affinity measurements using fluorescent cholestatrienol and solid-state NMR spectroscopy of a 3-*d*-cholesterol probe suggested that OSW-1 interacts with membrane cholesterol without forming large aggregates while 3-*O*-glycosyl saponin, digitonin, forms cholesterol-containing aggregates. Fluorescence probes have also

facilitated the study of saponin-Chol interaction as a consequence of binding and aggregation. Furthermore, the fluorescent probes were also used in microscopic studies to observe saponin induced morphological changes and its effect on membrane integrity. The results suggest that digitonin exhibits detergent properties while OSW-1 promoted pore formation in a similar fashion with soyasaponin Bb(I). I hypothesized that OSW-1 induced barrel stave like pore formation due to OSW-1/cholesterol interaction and likely cause membrane permeabilization and pore formation without destroying the whole membrane integrity. This observation could be partly responsible for its highly potent cell toxicity.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ Raymond S. Malabed）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	村 田 道 雄
	副 査　教 授	梶 原 康 宏
	副 査　教 授	北 條 裕 信

論文審査の結果の要旨

Malabed 氏は、植物性サポニンの膜作用の分子機構解明を目指して学位論文研究を行った。なかでも、ユリ科オオアマナ属球根から得られるサポニン・OSW-1 の作用機構に関して重点的に研究した。OSW-1 は強い細胞毒性を有し、その生物活性発現に関して盛んに研究されてきた。強い活性発現には効率的な膜透過が必要であり、膜脂質との相互作用に興味が持たれていた。加えて、通常のサポニンでは 3 位に糖鎖が置換するが、OSW-1 では修飾を受けた糖鎖が異なる位置（16 位）に置換する点も際立った特徴であり、構造活性相関という観点でも注目された。

Malabed 氏は、まず OSW-1 のステロール依存的膜透過化活性を定量的に解析する目的で、リン脂質リポソームからの色素の遺漏実験および溶血試験を試みた。その結果、OSW-1 は膜中のステロールと相互作用することによって、代表的な溶血性サポニンであるジギトニンに匹敵する強い色素漏出活性を示すことを明らかにした。続いて、ステロールとの相互作用を直接観測する目的で、重水素置換したコレステロールの固体広幅 NMR を測定したところ、特徴的な相互作用を示す変化が認められた。さらに、OSW-1 による脂質二重膜構造の変化を選択的に検出するために、固体 ^{31}P NMR におけるシグナルパターンを観測し、OSW-1 の添加によって膜の平面性がほとんど変化しないことを見出した。これら NMR データは、顕著な膜断片化を示したジギトニンとは大きく異なるものであり、OSW-1 がリン脂質分子の配向の顕著な乱れを伴わない膜作用機構を有していることを示している。溶血試験における浸透圧保護実験から、OSW-1 が赤血球膜に形成する孔のサイズは 1 ～2 ナノメートル前後であると推定され、これは樽板型モデルによる孔形成を示唆していた。すなわち、サポニンで一般的に提唱されている界面活性剤型機構とは異なる仕方でステロールと複合体を形成することによって、OSW-1 が膜透過化活性を発現すると推定された。このように、従来の研究とは異なる分光学的手法に基づいて詳細にサポニンと膜脂質との相互作用を調べることによって、典型的サポニンとは異なった OSW-1 の生物活性発現メカニズムの一端を解明したことは、膜活性化合物の作用機構研究として大変意義深い。

Malabed 氏の博士論文研究はサポニンを取り上げ、特徴的な膜透過性増大作用を有する生物活性物質の研究を推進し、新知見を数多く得た点および一般性の高い研究手法を確立した点において学術的意義がある。以上のように、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。