The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	液胞型ATPアーゼ阻害剤バフィロマイシンの作用機構と脂質二重膜における分子挙動に関する化学的研究
Author(s)	林, 達
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73515
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

液胞型 ATP アーゼ阻害剤バフィロマイシンの作用機構と脂質二重膜における分子挙動に関する化学的研究

平成 31 年度

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

林　達

目次

第 1 章　序論　1
1-1　膜タンパク質と脂溶性リガンド　1
1-2　液胞型 ATP アーゼとバフィロマイシン　8
1-3　固体 NMR 測定とフッ素標識化バフィロマイシン　19
1-4　研究目的　25
参考文献

第 2 章　本論 I －脂質膜環境下におけるバフィロマイシン誘導体の挙動解析－　32
2-1　フッ素化バフィロマイシン誘導体の改良合成　33
2-2　バフィロマイシン誘導体の物性評価　36
2-3　固体 NMR による膜環境下での運動性解析　40
2-4　デスメチル化が及ぼす影響の評価　41
2-5　膜挿入過程の推定モデル　45
2-6　リガンドの活性に対する脂質膜親和性の寄与　45
2-7　他の脂溶性リガンドとの比較　46
2-8　小括
実験項
参考文献

第 3 章　本論 II －固体 NMR 解析に向けた V-ATP アーゼの単離精製－　76
3-1　酵母液胞膜画分を用いた解析　76
3-2　V-ATP アーゼの単離精製　79
3-3　V_O ドメインの単離精製　86
実験項
参考文献

第 4 章　結論　94

謝辞　95

付録　96

略語表

2-FBaf	2-desmethoxy-2-fluoro-bafilomycin derivative
$ACTH_{1-24}$	adrenocorticotropin-(1-24)-tetracosapeptide
ATP	adenosine 5'-triphosphate
Baf	bafilomycin
BCA	bicinchoninic acid
bCG	bovine chromaffin granules
Bn	benzyl
Bu	butyl
cOc	chicken osteoclasts
dba	dibenzylideneacetone
desFBaf	6,8,24,24-tetradesmethyl-24-F_3-bafilomycin derivative
DDM	dodecyl maltoside
DEIPS	diethylisopropylsilyl
DFT	density functional theory
DMAP	dimethylaminopyridine
DMPC	1,2-dimyristoyl-glycero-3-phosphocholine
DMSO	dimethylsulfoxide
DOPC	1,2-dioleoyl-glycero-3-phosphocholine
DTT	dithiothreitol
EC_{50}	half maximal effective concentration
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EPR	electron paramagnetic resonance
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
FBaf	24,24-didesmethyl-24-F_3-bafilomycin derivative
GPCR	G protein coupled receptor
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectra
HRP	horseradish peroxidase
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
i-	iso

IAM	immobilized artificial membrane
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration
IgG	immunoglobulin G
IR	infrared
KHMDS	potassium hexamethyldisilazide
MAS	magic angle spinning
MD	molecular dynamics
Me	methyl
ML	macrolactone
MMTr	mono-methoxytrityl
n-	normal
NMP	N-methylpyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
OD_{600}	optical density at a wavelength of 600 nm
OECD	organization for economic co-operation and development
p-	para
PAGE	poly acrylamide gel electrophoresis
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
P_{app}	apparent permeability coefficient
Ph	phenyl
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine
$P_{O/W}$	partition coefficient between octanol and water
ppm	parts per million
PPTS	pyridinium *p*-toluenesulfonate
Pr	propyl
PRCG	Powell-Reeves conjugate gradient
PVDF	polyvinylidenedifluoride
Py	pyridine
R	hydrocarbon group
REDOR	rotational echo double resonance
rpm	round per minute

rt	room temperature
S_{CF3}	order parameter of trifluoromethyl group
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	standard error
t-	tertiary
TAP	tandem affinity purification
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBS	tertiary butyl dimethylsilyl
TEV	tobacco etch virus
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
TLC	thin layer chromatography
TOF	time of flight
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ts	*p*-toluenesulfonyl
UV	ultraviolet
V-ATPase	vacuolar-type ATPase
WT	wild type
YPD	yeast extract peptone dextrose

第1章　序論

1-1　膜タンパク質と脂溶性リガンド

1-1-a　緒言

我々ヒトを含む生命の生命活動はタンパク質、ペプチド、ホルモン、核酸など無数の生体分子が織りなす多種多様な化学反応により形作られている。中でも膜タンパク質は人体に含まれるタンパク質のうちおよそ 2~3 割を占める生体分子群であり[1]、細胞内外でのシグナル伝達、物質輸送をはじめとした種々の生命現象を担っている。またこれら膜タンパク質の働きはしばしば有機小分子により制御されていることが知られている。例えば G タンパク質共役受容体(GPCR)の一種であるカンナビノイド受容体は 2-アラキドニルグリセロールなどのリガンド分子により活性化され、後に続く経路にシグナルを伝達することで食欲や記憶、痛覚などの重要な生命機能に寄与している[2]。また海産生物毒の一種として知られるブレベトキシン[3]は、神経細胞中などに存在し、電気信号の伝達に寄与しているナトリウムイオンチャネルの機能を過度に活性化することでその毒性を発現することが知られている[4]。

このような有機小分子のうち、膜タンパク質の細胞質ドメインに結合するものは良く研究されており、医薬品開発などへの展開もなされている一方、膜貫通ドメインに結合するもの(脂溶性リガンド)については、ほとんど研究が進んでいないのが現状である。しかしこれら脂溶性リガンドは細胞質部分に結合するリガンドとは全く異なる作用部位、作用機序を有しており、膜タンパク質の機能を自在に制御できる可能性を秘めている。そのため脂溶性リガンドは膜タンパク質の機能を解析するためのツールや新規薬剤開発におけるリード化合物として関心が寄せられており、その作用メカニズム解明は生命科学分野における重要な研究課題と言える。

脂溶性リガンドに代表される有機分子が標的膜タンパク質に作用してその生理活性を発現するまでのプロセスとして二つの過程に大別することができる(図 1-1)。一段階目はリガンドが細胞膜などを透過しながら拡散し、標的タンパク質のもとに到達する過程(薬物動態)、二段階目はリガンドが標的タンパク質と実際に相互作用する過程である。有機小分子と膜タンパク質が関与する生理活性を正しく理解するためには、これら二つの段階を区別して評価する必要がある。以降の節ではそれぞれの段階について評価方法や問題点などについて概説していく。

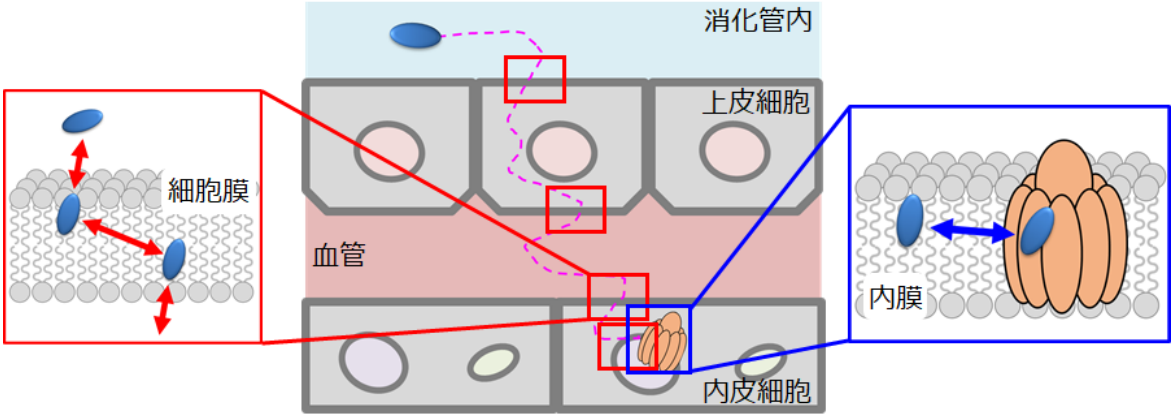


図 1-1：脂溶性リガンドが活性発現に至るまでのプロセス

(赤)：リガンド分子が細胞膜を透過しなら標的タンパク質の元まで到達する過程、(青)：リガンド分子が標的タンパク質と相互作用する過程について消化器官を例にそれぞれ図示した

1-1-b　脂溶性リガンドー膜タンパク質間相互作用の化学的評価

一段階目である薬物動態については、後述のように系の複雑さゆえに解析が困難である。そのため膜タンパク質に作用する有機小分子の作用機構解明を志向した化学的研究では、主にリガンドー膜タンパク質間相互作用に焦点が当てられてきた。

リガンドー膜タンパク質間相互作用を研究する上で最も重要な物性の一つにリガンドの標的タンパク質に対する結合親和性がある。脂溶性リガンドの結合親和性は水溶性タンパク質の系などの場合と同様に、リガンド分子をタンパク質に添加した際の応答(例えば膜タンパク質の活性化/不活化、リガンド分子のスペクトル変化など)をリガンドータンパク質間の単純な結合ー解離平衡に基づいて解析することで見積もられる(スキーム 1-1、図 1-2a,b)。また既に標的タンパク質へ結合することが知られているリガンドプローブを活用し、プローブ分子と目的のリガンド分子の競合阻害実験より結合親和性が評価される場合もある(図 1-2c)。特に後者の方法は特定のタンパク質にのみ結合するプローブ分子を用いれば低純度のタンパク質試料による評価が可能である。そのため本法は、水溶性タンパク質に比べて構造・機能を維持したまま単離精製することが困難な膜タンパク質系において有効な方法とされている。しかしそのような系には標的の膜タンパク質以外にも脂質や界面活性剤のような脂溶性リガンドが相互作用できる分子が多く含まれている。このような場合では、リガンド分子が標的タンパク質の元に到達するまでのプロセス(図 1-1 中赤四角)の寄与が無視できな

くなると考えられ、得られた結果を単純にタンパク質との親和性として扱うことに疑問が残る。

$$[Ligand] + [Protein] \rightleftarrows [Complex] \qquad (スキーム 1-1)$$

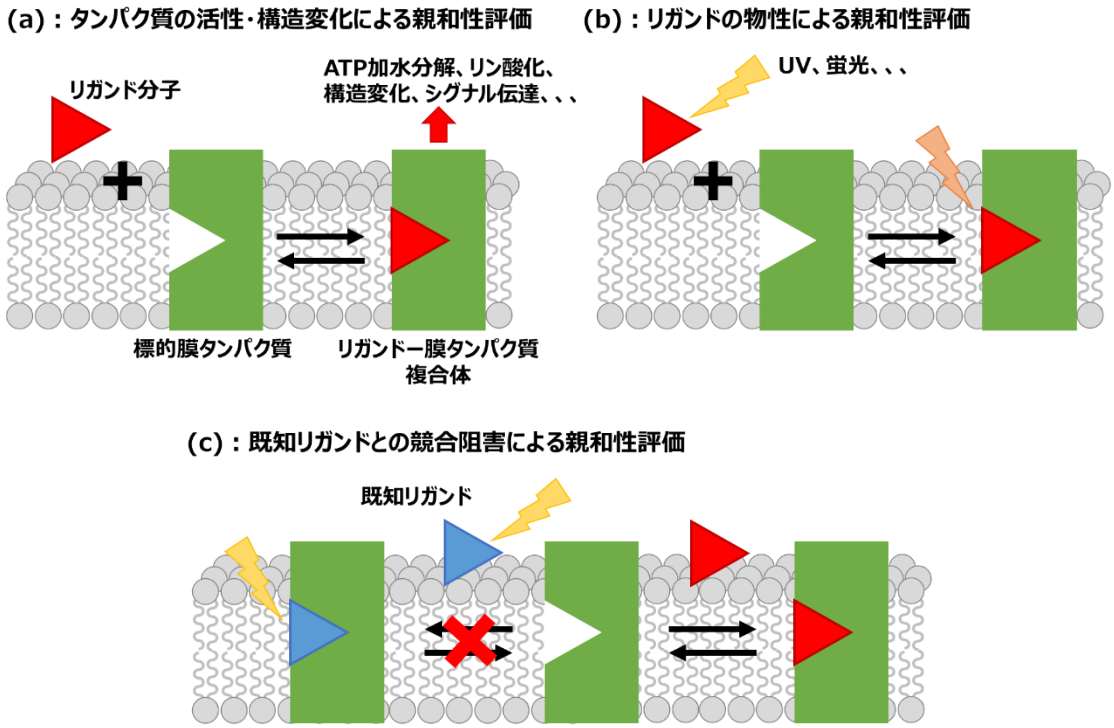


図 1-2：脂溶性リガンドの代表的な親和性評価法

(a)：リガンドの結合によって引き起こされる膜タンパク質の活性化/不活化、構造変化などの応答より評価する方法、(b)：UV 吸収や蛍光発光などリガンド分子が持つ物性により評価する方法、(c)：既知のリガンドプローブ(放射性標識リガンドなど)の結合を阻害する程度より評価する方法

1-1-c　脂溶性リガンドの薬物動態の化学的評価

前項で述べたように脂溶性リガンドの結合親和性は主として *in vitro* 系において単純な結合－解離平衡に基づいて解析されてきた。しかし一方で *in vitro* 系より得られた実験結果は、生体そのものあるいはそれに近い細胞組織を用いた *in vivo* 様の系で得られるものとしばしば異なることがある。これは *in vivo* 様の系ではリガンドータンパク質間相互作用以外に、リガンドがタンパク質のもとに到達する過程(薬物動態)において、標的タンパク質が存在しない組織への分配や系外への排出など多様なパスが存在しており、それらをリガンドとタンパク質間の結合－解離平衡のみで記述することが本質的に不可能なためである。このような系の複雑さは、主に細胞膜などの脂質膜

が系中を分画しているために生じており、リガンド分子の脂質膜への分配・透過性の違いが、最終的に標的タンパク質に結合することができるリガンドの量(濃度)に大きく寄与すると考えられる。またこのような脂質との相互作用の寄与は水溶性リガンドの場合よりも脂溶性リガンドの場合の方がより顕著であると考えられる。したがって生体中での脂溶性リガンド分子の活性を正しく理解するためには、その膜分配性や透過性といった脂質膜環境下における挙動を正確に評価する必要がある。

リガンド分子の脂質膜環境下における動態を考慮する指標としてはオクタノール－水間の分配係数 $P_{O/W}$ が最も一般的に用いられている。これはすなわち細胞膜環境を水相と疎水性溶媒相の二相系に近似し、そこでのリガンド分子の挙動を細胞膜環境における分子挙動として取り扱っていることを意味している。分配係数 $P_{O/W}$ は Hansch らによる報告[5]以後汎用されるようになり、新規薬剤を開発する際の基準の一つにもなっている[6,7]。Log $P_{O/W}$ は古典的にはオクタノール－水の二相系に分子を溶解させた際にそれぞれの相に存在する分子の量を定量することで決定されてきた(フラスコ振盪法)。しかしフラスコ振盪法は多量かつ高純度のサンプルを要することや効率化が困難であることから、近年では逆相 HPLC あるいは逆相 TLC を用いた方法や Immobilized Artificial Membrane (IAM)を用いた方法など種々の代替法が開発されている(図 1-3)。特に汎用性および再現性の高さ、必要とする試料の少なさなどの面から逆相 HPLC を用いる手法が主流となっており、有機分子の脂溶性評価法としてガイドラインも制定されている[8]。いずれの方法においても、有機分子の固定相中での担持時間がその分子の固定相－移動相間の分配に依存しており、オクタノール－水間の分配係数と良い相関を示すことを利用している。

(a)：逆相HPLC(C18-アルキル鎖)　(b)：IAM (C14-PC, C3&10-アルキル鎖)

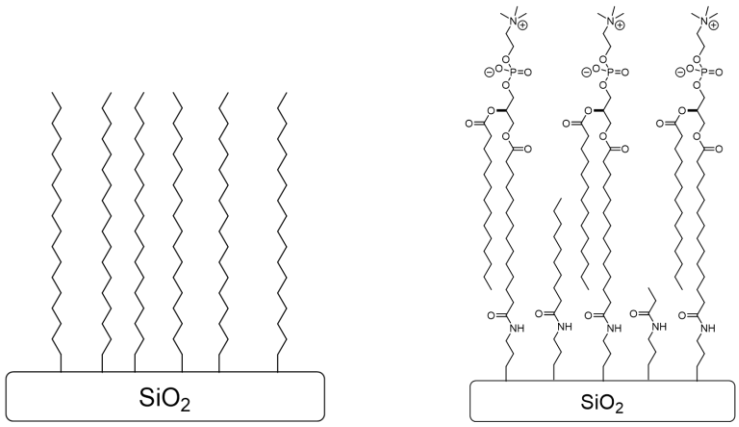


図 1-3：逆相 HPLC および IAM の固定相の模式図

またより大量の分子について効率的に脂溶性を評価することを目的に、分子構造に基づいた計算により分配係数を予測する方法論が開発されている[9,10]。厳密な計算方法はプログラムによって異なるが、フラグメンテーション法に基づいた計算予測が最も一般的である。本法では対象となる分子を各原子、あるいは部分構造に分割し、それらに対応するパラメータを足し合わせることで分子の log $P_{O/W}$ を予測する。なお各部分構造のパラメータは数千個におよぶ化合物群の構造と log $P_{O/W}$ の実験値を用いた回帰分析により決定されている[11]。そのため計算予測の精度はパラメータ決定に用いる化合物群の構造情報および log $P_{O/W}$ の実験値の正確さに依存することになる。さらにより高精度に log $P_{O/W}$ 値を予測するために、溶媒接触面積を考慮することで分子の三次元構造の効果を取り入れたものや、非経験的に化学ポテンシャルを算出することで log $P_{O/W}$ 値を予測する方法なども開発されている[12,13]。このようにリガンドの動態の重要性から化学的評価が行われているものの、単純化したモデルではしばしば脂質膜の影響を十分に評価できていない場合がある。

1-1-d　脂質膜がリガンド分子に与える影響

前項で述べたようにリガンド分子の脂質膜環境下における動態は、疎水性溶媒－水系におけるリガンド分子のふるまいに近似することで評価されてきた。しかしながら脂質膜は単なる疎水性溶媒とは異なり、高極性な頭部基と膜法線方向に配向した疎水性アシル鎖が規則的に配列した異方的な構造を有している。そのため脂質膜はリガンド分子の配座や配向、動態などに分子構造に起因した影響を与えることが近年明らかになっている[14]。

例えば脂質膜はホルモンペプチドの受容体に対する結合を促進することが報告されている[15,16]。この現象は以下に示す"Membrane catalysis model"によって説明されている(図 1-4 左)。このモデルではリガンドータンパク質間相互作用を両者の結合－解離平衡のみで表すのではなく、複数の過程で記述している。すなわちまずペプチド中の塩基性残基と脂質膜中のアニオン脂質との静電相互作用によりペプチドが膜表面に集積し(過程①)、次いで集積したペプチドが膜中に適切な配座で挿入され(過程②)、最後に標的タンパク質と相互作用する(過程③)。このモデルにおいて脂質膜はペプチドとの相互作用により受容体周辺におけるホルモンペプチドの局所濃度を増加させ、さらにはペプチドの構造を受容体の結合に適した形に変形させることでペプチドの受容体への結合を"触媒"していると考えられている。Sargent らはホルモンペプチ

ドの一種である副腎皮質刺激ホルモン ACTH$_{1\text{-}24}$ について上述のモデルに基づいた理論解析を行っている。その結果、脂質膜によるタンパク質への結合促進効果は脂質膜－ペプチド間の相互作用が全くない場合に比べて最大で 10^5 に及び、脂質膜がリガンドの活性に多大な影響を与えていることを明らかにしている[15]。しかし上述のモデルでは脂質膜中に架空のペプチド結合サイトを仮定している。そのためより現実に即したモデルとして膜表面への集積および膜内への挿入の過程を脂質膜への分配で表したモデルも提唱されている(図 1-4 右)[16]。このモデルに基づいて脂溶性リガンドの膜タンパク質への結合を考慮すると、実験より得られるリガンド－タンパク質複合体の見かけの解離定数 K_D は次の式で表すことができる。

$$K_D = \frac{[L]_a[P]_m}{[LP]_m} = \frac{K_D{}'}{K_p}$$

ここで$[X]_x$ は分子 X の x 中での濃度を表しており、L はリガンド分子を、P は標的タンパク質を、LP はリガンド－タンパク質複合体を、a は水中を、m は脂質膜中をそれぞれ表している。また K_D'は脂質膜中における複合体の解離定数を、K_p はリガンド分子の脂質膜－水系における分配係数を表している。この式より分配係数 K_p が大きい、すなわち膜親和性が高い脂溶性リガンドほど、標的タンパク質周辺の局所濃度が脂質膜によって高められ、より強い結合を示すことが読み取れる。

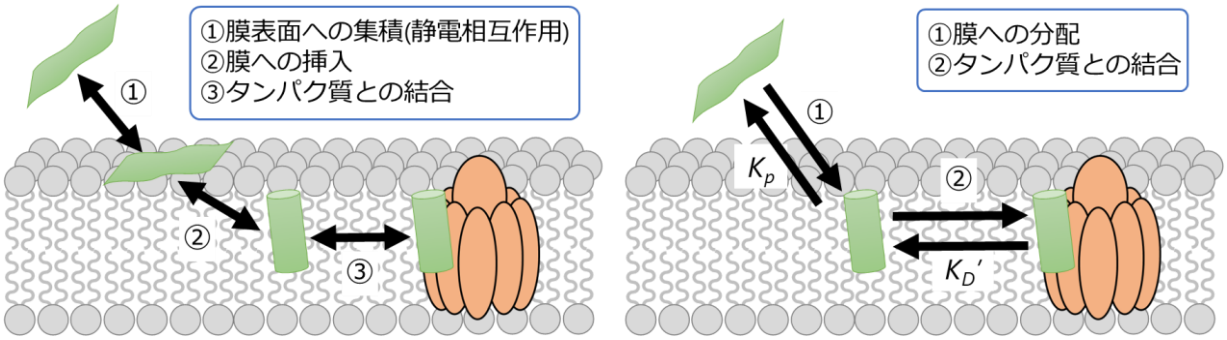


図 1-4："Membrane catalysis"モデルの概要[15,16]

(左)：Sargent らによって提唱された"Membrane catalysis"モデル。このモデルではまずペプチド中の塩基性残基と脂質膜中のアニオン脂質との静電相互作用によりペプチドが膜表面に集積し(過程①)、次いで集積したペプチドが膜中に適切な配座で挿入され(過程②)、最後に標的タンパク質と相互作用する(過程③)。(右)：一般化した"Membrane catalysis"モデル。この場合には膜への結合・挿入の過程を脂質膜－水系における分配係数 K_p で、標的タンパク質への結合を脂質膜中における複合体の解離定数 K_D'でそれぞれ表している。

また脂質膜は有機小分子の構造にも直接影響することが報告されている[17,18,19,20]。例えば Matsumori らはナトリウムイオンなどのカチオンを運搬するイオノフォアとして知られているサリノマイシンの膜環境下における構造が疎水性溶媒中のものと異なっていることを明らかにしている(図 1-5)[17]。著者らはモデル膜環境として DMPC/DHPC バイセルを活用し、バイセル存在下でのサリノマイシン－ナトリウムイオン複合体の構造および膜中での位置を溶液 ^{1}H NMR により解析した。その結果、サリノマイシンは主として二重膜の表面付近に存在し、疎水性溶媒中とは異なる配座をとっていることが明らかとなった。特に C24－25 結合周辺の配座が大きく変化しており、疎水性溶媒中ではナトリウムイオンを包み込むような構造をとっているのに対して膜環境下ではナトリウムイオンが出入りできるような開いた構造をとっていることが明らかになった。またこの構造変化は E 環の酸素性官能基と脂質頭部基または膜表面の水分子との水素結合により安定化されていることも推察された。

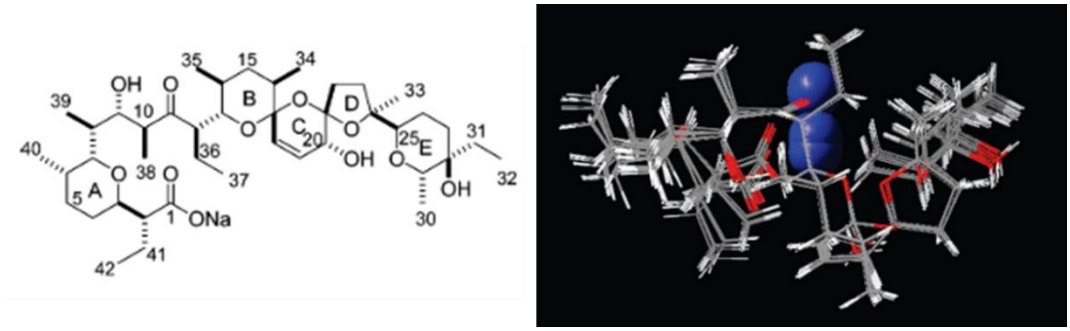


図 1-5：膜環境下におけるサリノマイシン－ナトリウムイオン複合体の構造[17]

以上のように脂質膜はリガンド分子との分子間相互作用によりリガンド分子の動態・構造に対して特異な影響を及ぼしているため、それらを単純な疎水性溶媒中でのリガンド分子の挙動により正確に推し量るのは困難であると考えられる。特に天然物のような三次元的に複雑な構造を持つ分子の場合、膜を構成する脂質分子による影響は顕著であると予想される。しかしながらそのような分子の膜環境における構造解析例は解析の困難さゆえにごく少数にとどまっており、脂質膜がリガンド分子にもたらす影響がリガンド分子の活性・動態にどの程度寄与するかについての知見は現状不足している。またこのような影響を予測する試みとして、前述の計算による物性予測法の開発が現在進められているが、より高精度な予測法を開発するためには脂質膜環境下におけるリガンド分子の実験的な構造情報が必要不可欠である。よってこれらの問題を解決し脂溶性リガンドの活性発現機構の実態に迫るためには、脂溶性リガンドの

脂質膜環境下における構造や動態を分子構造に基づいて詳細に解析することが期待される。

1-2　液胞型 ATP アーゼとバフィロマイシン

前節で述べてきたような脂溶性リガンドの一つにバフィロマイシン(Baf)がある。Baf は液胞型 ATP アーゼ(Vacuolar-type ATPase, V-ATP アーゼ)と呼ばれる膜タンパク質複合体の選択的阻害剤として種々の生命科学研究において汎用されているが、その生理活性発現機構は完全に明らかになっているとは言い難い。また後述するように Baf の活性発現には前節で述べた 1 つ目の過程(薬物動態)が大きく寄与している可能性が示唆されており、その寄与を評価する上で適切なモデルと考えられる。本節ではまず V-ATP アーゼの生理機能や構造およびこれまでに明らかにされている機能発現の分子基盤について概説し、その後 Baf についてその概要や現在明らかになっている作用機序について述べる。

1-2-a　液胞型 ATP アーゼ

液胞型 ATP アーゼは ATP 加水分解により生じるエネルギーを駆動力としてプロトンを輸送する膜タンパク質複合体である。本酵素は 1981 年に Ohsumi らによって酵母の液胞におけるアルギニンの能動輸送に関与している酵素として初めて見出された[21]。その後、V-ATP アーゼは酵母の液胞以外にもリソソーム、エンドソーム、ゴルジ体および分泌顆粒など、あらゆる真核生物の細胞内膜系に広範に発現し、タンパク質の分解や膜輸送、シグナル伝達など種々の細胞内プロセスの維持に不可欠なことが明らかとなっている[22,23,24]。さらに V-ATP アーゼは細胞内膜系以外に破骨細胞やがん細胞、腎臓の尿細管細胞および精巣上体の細胞など特定の細胞の細胞膜上にも発現しており、V-ATP アーゼの機能異常が骨粗鬆症やガンの転移などにつながることが報告されている[23,25,26,27]。そのため V-ATP アーゼは上述した疾病に対する治療薬の標的分子としても注目を集めている。

V-ATP アーゼの構造解析は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* やアカパンカビ *Neurospora crassa* などから単離された V-ATP アーゼを用いて各サブユニットの X 線結晶構造解析[28,29,30,31]や類縁体の構造を利用したホモロジーモデリング[32,33,34,35,36]により進められてきた。さらに透過型電子顕微鏡や原子間力電子顕微

鏡などによりその全体構造が解析されており、近年ではクライオ電子顕微鏡を用いた解析により活性状態の V-ATP アーゼについては分解能約 7 Å の原子分解能に近いレベルでの解析が達成されている[37]。V-ATP アーゼの厳密なサブユニット組成は生物種に依存するが、その全体的な構造・機能は概ねどの真核生物においても共通している。一般に V-ATP アーゼは膜外に存在する V_1 ドメインと膜貫通領域に存在する V_O ドメインの二つのドメインに大別され、計 15 種程度のサブユニットにより構成されている(図 1-6)。

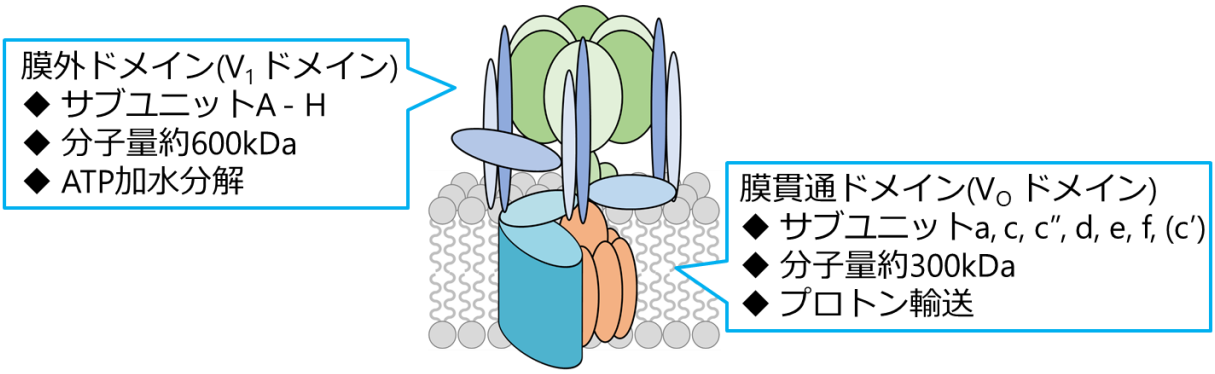


図 1-6：V-ATP アーゼの構造モデル

可溶性ドメインである V_1 ドメインは 8 つのサブユニット(サブユニット A－H)より構成されており、ATP を加水分解し、そこで生じたエネルギーを回転運動として V_O ドメインに伝達する役割を担っている。V_1 ドメインのうちサブユニット A および B はそれぞれのサブユニットが 3 つずつ交互に並んだ $A_3B_3$6 量体を形成しており、この 6 量体が ATP を加水分解している。サブユニット D および F は回転軸として機能しており、ATP 加水分解によって生じたエネルギーを回転運動として V_O ドメインに伝達している。残りのサブユニット C、E、G および H は V-ATP アーゼ全体が回転してしまうのを防ぐ固定子として機能している。

V_O ドメインは 6~8 つのサブユニット(a, c, c', c", d, e, f,)より構成されており、V_1 ドメインから伝達された回転力によってプロトンを能動輸送する役割を担っている。サブユニット a は 100 kDa 程度の巨大なサブユニットであり、N 末端ドメインは V_1 ドメイン側にあり、固定子として機能している。またサブユニット a の C 末端ドメインは 8 つの膜貫通 α-ヘリックスより構成されており、プロトンを膜内に通すチャネルを形成していると考えられている。サブユニット c, c'および c"は分子量 17－21kDa 程度の疎水性タンパク質であり、4 つまたは 5 つの膜貫通 α-ヘリックスより構成されている。

これらのサブユニットは膜貫通領域でプロテオリピドリングと呼ばれるリングを形成しており、V_1ドメインより伝達される回転運動を利用してプロトンを運搬する役割を担っている。このプロテオリピドリングは種々の実験結果より、サブユニット c、c'、c"の比が 4:1:1(哺乳類では 5:0:1)より構成される 6 量体であると考えられてきたが、近年、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析によって酵母由来の V-ATP アーゼのプロテオリピドリングが 10 量体であることが明らかにされた[37,38]。サブユニット d はサブユニット D、F とプロテオリピドリングを接続し、V_1ドメインで生じた回転運動をプロテオリピドリングに伝達する役割を担っている。またサブユニット e, f はクライオ電子顕微鏡によりその存在が認められているが、その機能の詳細は未だ研究途上にある。

V-ATP アーゼの構造、機能は ATP 合成酵素として知られる F 型 ATP アーゼ(F-ATPase)と類似していることから、V-ATP アーゼによるプロトン輸送メカニズムも F-ATPase と同様のものであると考えられている(図 1-7)[23]。すなわちまず初めにサブユニット a の細胞質側のヘミチャネルよりプロトンが膜の内部に侵入し、そのプロトンによってプロテオリピドリングを形成しているサブユニット c のグルタミン酸残基のカルボキシル基がプロトン化される(図 1-7a)。その後 ATP の加水分解に伴ってプロテオリピドリングが回転することでプロトンが膜の疎水性領域内を輸送される(図 1-7b)。膜内側のヘミチャネルまでプロトンが輸送されると、プロトン化したグルタミン酸とサブユニット a のアルギニン側鎖が相互作用する。その結果グルタミン酸が脱プロトン化され、プロトンは膜内に移動する(図 1-7c)。脱プロトン化されたグルタミン酸はプロテオリピドリングの回転によって再び細胞質側のヘミチャネルまで移動し、再度プロトン化される。以上の過程を繰り返すことでプロトンが小器官内腔へ輸送されていると考えられている。

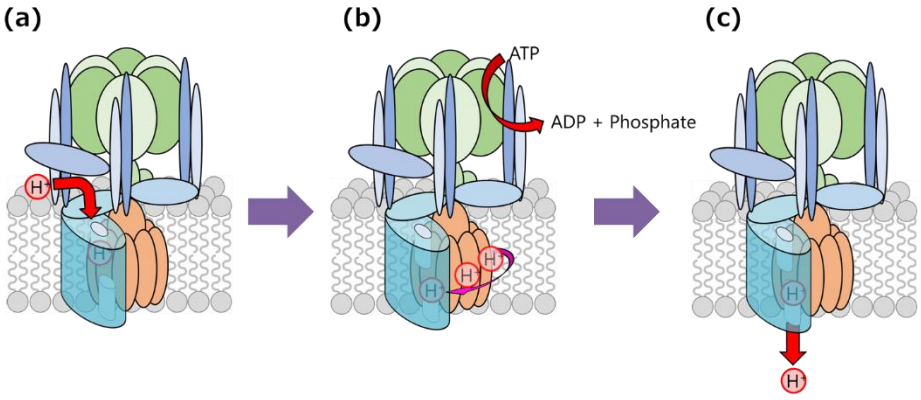


図 1-7：V-ATP アーゼによるプロトン輸送の推定機構

V-ATP アーゼが上述したメカニズムによってプロトンを輸送していることを実験的に証明するために、これまでに数多くの実験がなされてきた。

V_1 ドメインにおける ATP 加水分解と回転運動が共役していることは可視化プローブを用いた一分子観察実験によって巨視的に観測され[39,40]、その後種々の ATP 誘導体を利用した系統的な X 線結晶構造解析[41]および分子動力学計算[42]によりその分子レベルでの構造変化も解析されている。

プロトン輸送に関与するアミノ酸残基の同定はアミノ酸変異導入実験によって行われた[43,44,45,46]。その結果サブユニット c、c'、c"のおよそ中央に位置するグルタミン酸残基およびサブユニット a の膜貫通領域に存在するアルギニン残基が特にプロトン輸送に寄与していることが明らかにされている(酵母由来サブユニット c の Glu^{137}, サブユニット c'の Glu^{145}, サブユニット c"の Glu^{108}、サブユニット a の Arg^{735})。またこれら残基は互いに近接していることがシステイン架橋実験や電子顕微鏡解析から明らかになっている[47,48]。これらの結果は、「グルタミン酸側鎖がプロトン化されたままプロテオリピドリングが回転することでプロトンが膜中を輸送され、グルタミン酸とアルギニンの側鎖間相互作用によりヘミチャネル近傍で脱プロトン化が進むことでプロトンを輸送している」可能性を示唆しており、前述のモデルとも一致している。

1-2-b　バフィロマイシン

タンパク質やペプチドなどの生体分子を対象とした研究を行う上で、その生体分子に特異的に作用する化合物は非常に有用なツールである。V-ATP アーゼを対象とした研究に関しても、その研究の進展には V-ATP アーゼ特異的阻害剤(図 1-8)が大きく貢献してきた。なかでも強力な V-ATP アーゼ特異的阻害剤として早期に見いだされたバフィロマイシン(Baf)[49,50,51]やコンカナマイシン[52,53]は、V-ATP アーゼを標的とした研究において汎用されており、V-ATP アーゼが生体内に広範に発現し、数多くの生命現象に関与していることを明らかにしてきた。また現在ではアルカゾリド[54]、サリシリハラミド[55]、ロバタミド[56,57]、アピクラレン[58,59]、イエジマリド[60,61]など多くの V-ATP アーゼ特異的阻害剤が見いだされている。またこれらの阻害剤は Baf やコンカナマイシンと異なり、V-ATP アーゼが発現している組織や生物種依存的にその阻害能が変化することが見いだされており、特に新規医薬品開発の分野で盛んに研究されている。また Baf は強力な阻害剤であるが、構造が複雑でなおかつ比較的

不安定であることから、Baf の構造を基盤とした人工的な V-ATP アーゼ特異的阻害剤も開発されている[62,63,64,65]。

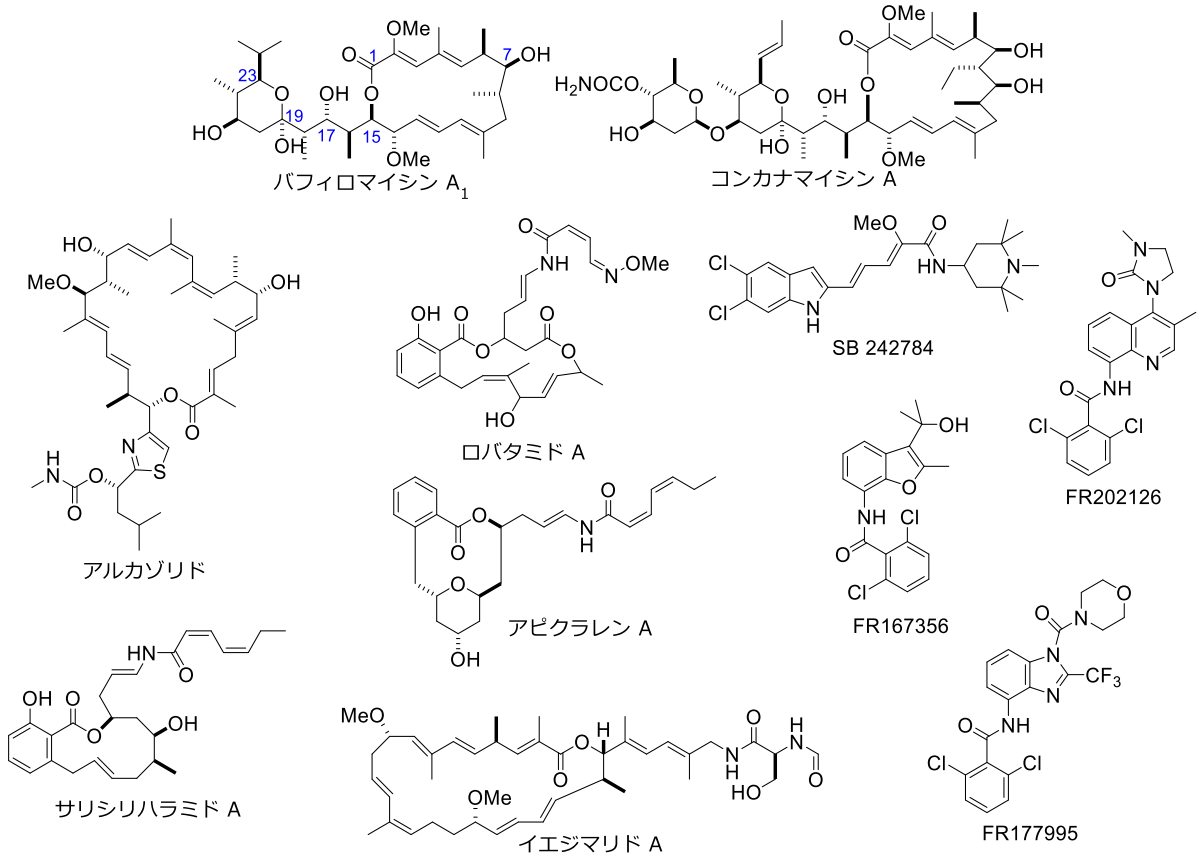


図 1-8：代表的な V-ATP アーゼ特異的阻害剤の構造

バフィロマイシンの構造中の数字は炭素番号を表している。

Baf は放線菌 *Streptomyces griseus* より単離されたマクロリド系化合物で、Baf A_1 といくつかの類縁体の構造が明らかとなっている。また Baf はコンカナマイシンなどとともに plecomacrolides と呼ばれる化合物群に分類されている[66]。これらの化合物の特徴として環状ヘミアセタールを有すること、不飽和結合を多数含む 16 または 18 員環を有すること、およびそれら二つの環が炭素数 3 の炭素鎖と水素結合によって強固に連結されていることなどが挙げられる。また Baf は既に述べたように V-ATP アーゼを特異的かつ強力に阻害することが報告されて以来[67]、代表的な V-ATP アーゼ阻害剤あるいはリソソーム阻害剤として数多くの研究で用いられている。また Baf 自身も研究の対象とされており、構造解析や作用機構解析、全合成研究など種々の研究が展開されてきた。

Baf の構造は X 線による結晶構造解析および溶液 NMR によって決定された(図 1-9)[68,69]。Baf はテトラヒドロピラン(THP)環と炭素数 16 のマクロラクトン(ML)環が炭素数 3 の炭素鎖によって連結された構造をしている。また Baf は 1 位カルボニル基、17 位ヒドロキシ基および 19 位ヒドロキシ基間で分子内水素結合を形成している。そのため THP 環と ML 環は sp^3 炭素によって連結されているにも関わらず、その相対配置は固定されており、分子全体の構造は比較的剛直である。その証拠に THP 環、ML 環およびその連結部分を構成する炭素原子の ^{13}C 核縦緩和時間はほぼ等しいことが報告されている。また Baf が溶液、結晶両状態においてほぼ同じ配座をとっていることからも、Baf は比較的安定かつ剛直であることが示唆される。

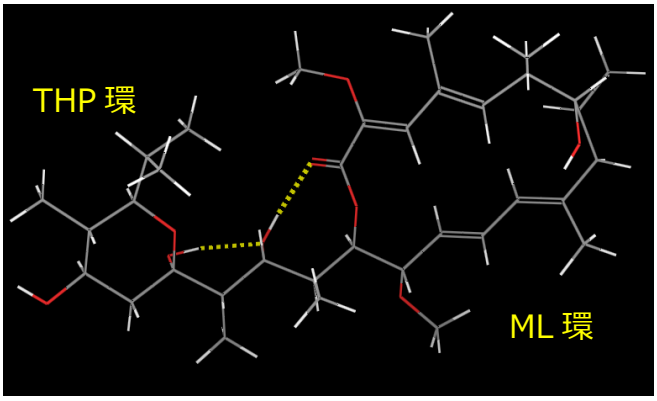


図 1-9：実験的に決定された Baf の構造

黄色の点線は分子内水素結合を表している。

1-2-c　バフィロマイシンの作用機構研究

Baf の作用機構解明を目指し、これまで数多くの研究が展開されてきた。まず Baf の活性発現に重要である部位については構造活性相関研究により明らかとなっている(図 1-10, 表 1-1)[70,71,72]。まず THP 環側については、21 位ヒドロキシ基や 19 位ヒドロキシ基などの官能基に修飾を施しても活性に大きな変化は見られず(Compd. 2~7)、THP 環を開環させた誘導体においても一桁程度の活性低下しか見られない(Compd. 13)。しかしながら THP 環を完全に取り除いてしまうとその活性は著しく低下する(Compd. 14)。マクロラクトン環上の置換基については 7 位ヒドロキシ基に保護基を導入した場合や、酸化した場合に比較的大きな活性低下が観測された(Compd. 8 ~ 12, 18, 19)。またマクロラクトン環を開環させた誘導体においても活性が二桁程度低下しており(Compd. 15)、さらにマクロラクトン環を還元してしまうと活性がほぼ失わ

れた(Compd. 16, 17)。以上の結果から、活性発現には 7 位ヒドロキシ基を含むマクロラクトン環の構造が特に重要であると考えられている。また Baf と類似の構造・活性を有するコンカナマイシンの構造活性相関研究においてマクロラクトン環上の 16 位不斉メチル基(Baf の 14 位不斉メチル基に対応)をヒドロキシ基に置換した誘導体がほぼ活性を示さないことから、その近傍に存在する 1 位カルボニル基－17 位ヒドロキシ基間の水素結合が活性発現に寄与している可能性も示唆されている[73]。実際、Baf の誘導体についても 17 位ヒドロキシ基がケトンになっている誘導体はそうでないものに比べて一桁程度活性が低下していることが見て取れる(Compd. 18 vs 19)。これらの誘導体は 17 位ヒドロキシ基以外の官能基についても酸化されてしまっているものの、この結果は Baf の分子内水素結合が活性発現に寄与している可能性を支持していると言える。

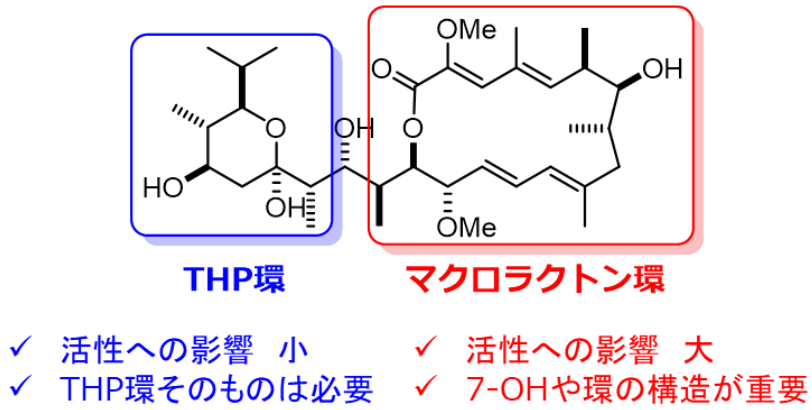
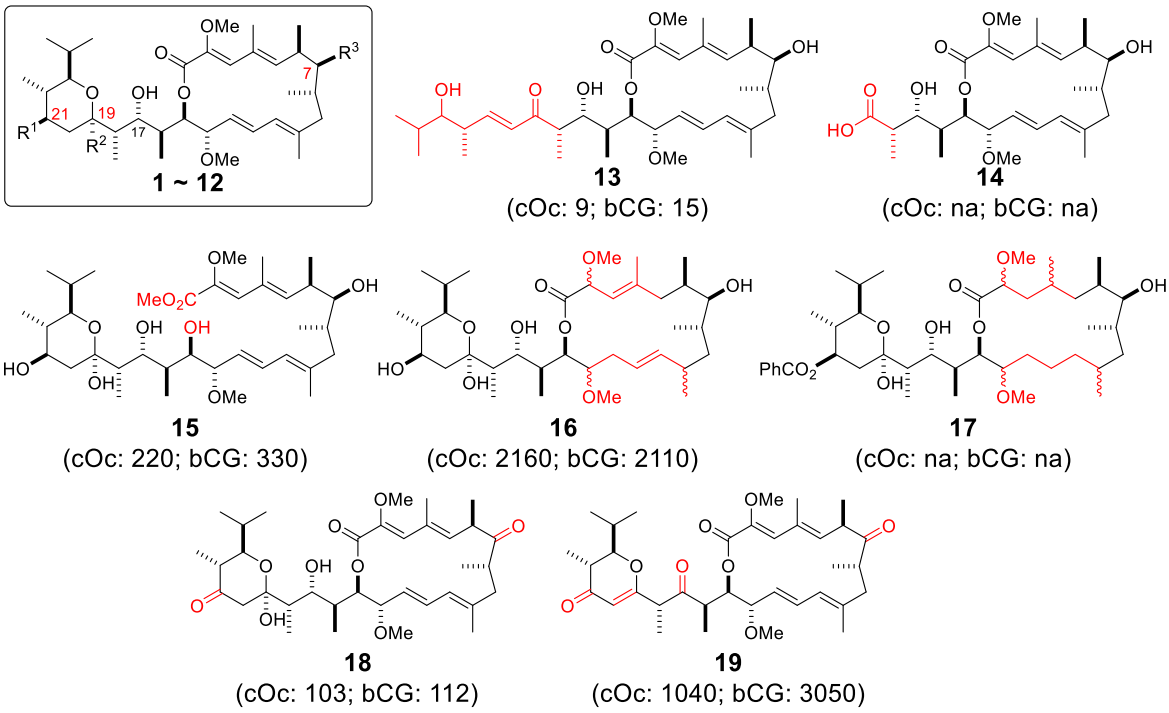


図 1-10：構造活性相関の要約

表 1-1：Baf の構造活性相関

Compd.	R^1	R^2	R^3	活性比(IC_{50}/IC_{50} Baf)	
				cOc	bCG
1	OH	OH	OH	1	1
2	$MeCO_2$	OH	OH	2	1.4
3	$NH_2CH_2CO_2$	OH	OH	3.5	3.2
4	$PhCO_2$	OH	OH	4	1.6
5	$HO_2C(CH_2)_2CO_2$	OH	OH	1.6	2.3
6	$C_5H_{10}N$	OH	OH	5.5	6.7
7	OH	OMe	OH	1.4	1.4
8	MeO	OH	$MeCO_2$	430	738
9	$MeCO_2$	OH	$MeCO_2$	49	280
10	OH	OH	=O	34	32
11	$MeCO_2$	OH	=O	531	552
12	$PhCO_2$	OH	=O	na	na

Baf の IC_{50} はニワトリの破骨細胞由来の試料(cOc)で 1-3 nM、ウシクロマフィン顆粒由来の試料(bCG)で 0.6-1.5 nM; na は IC_{50} が 10 μM 以上であったことを意味する。



Baf の結合部位の特定を目指した実験は比較的早期よりなされており、種々の実験結果より V-ATP アーゼの膜貫通領域に結合することが示唆されている。

Huss らは Baf と同じく代表的な V-ATP アーゼ特異的阻害剤であるコンカナマイシン誘導体を用いた実験により Baf がサブユニット c に結合することを示した(図 1-11)[74]。彼らはまずコンカナマイシンの光親和性標識体である J-concanolide A を用いて、その結合部位の特定を行った。J-concanolide A は V-ATP アーゼ結合時に UV 照射することで結合サブユニットと共有結合を形成でき、なおかつヨウ素 125 由来の放射線により検出することが可能な標識体である(図 1-11c)。この標識体を用いて結合サブユニットの特定を行ったところ、サブユニット c が結合部位であることが明らかとなった(図 1-11a)。さらに V-ATP アーゼと Baf を前もって共存させた後に J-concanolide A を加えて同様の実験を行った場合には、J-concanolide A がサブユニット c に結合しておらず(図 1-11b)、Baf も J-concanolide A と同様にサブユニット c に結合していることが示された。なおその後 Baf に光親和性標識を施した誘導体を用いての実験においても Baf のサブユニット c への結合が観測されている[75]。

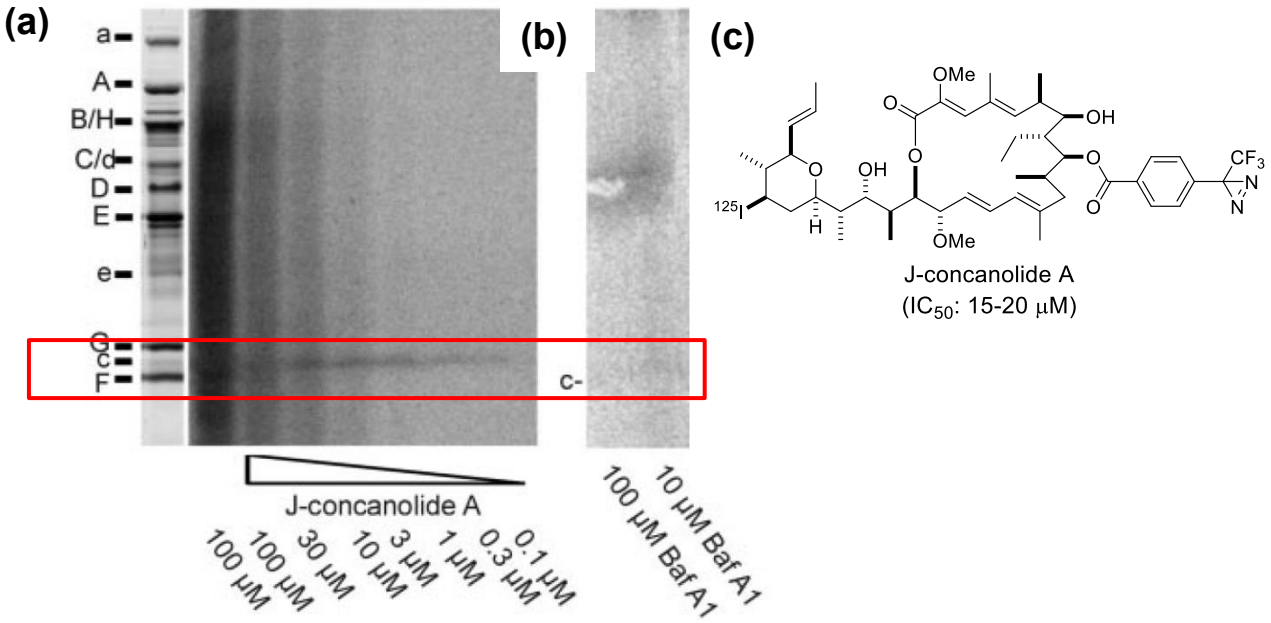


図 1-11：光親和性標識体による結合部位の同定[74]

(a) J-concanolide A を用いた光親和性標識実験のオートラジオグラフ、(b)バフィロマイシン共存下での光親和性標識実験のオートラジオグラフ、(c) J-concanolide A の構造、赤枠で囲まれているバンドがサブユニット c に対応する分子量

さらに Bowman らはアカパンカビ *Neurospora crassa* 由来の V-ATP アーゼを用いたアミノ酸変異導入実験により Baf の結合部位を推定している[76,77,78]。彼らはアカパンカビの Baf 耐性株を生成させ、その遺伝子を解析することで Baf に対する耐性がサブユニット c のアミノ酸変異によって生じることを明らかにした。さらに変異が生じていたアミノ酸残基を元にしてサブユニット c の様々な箇所に位置選択的に変異導入した V-ATP アーゼを調製し、Baf に対する耐性を評価することで Baf の結合に寄与しているアミノ酸残基を特定した。その後 V-ATP アーゼのホモログのプロテオリピドリングの結晶構造[36]を鋳型として V-ATP アーゼのプロテオリピドリングを構成させることで、先の実験で特定したアミノ酸残基が二つのサブユニット c の間に集中していることを見出した(図 1-12)。彼らはこの位置を Baf の結合部位であると推定している。

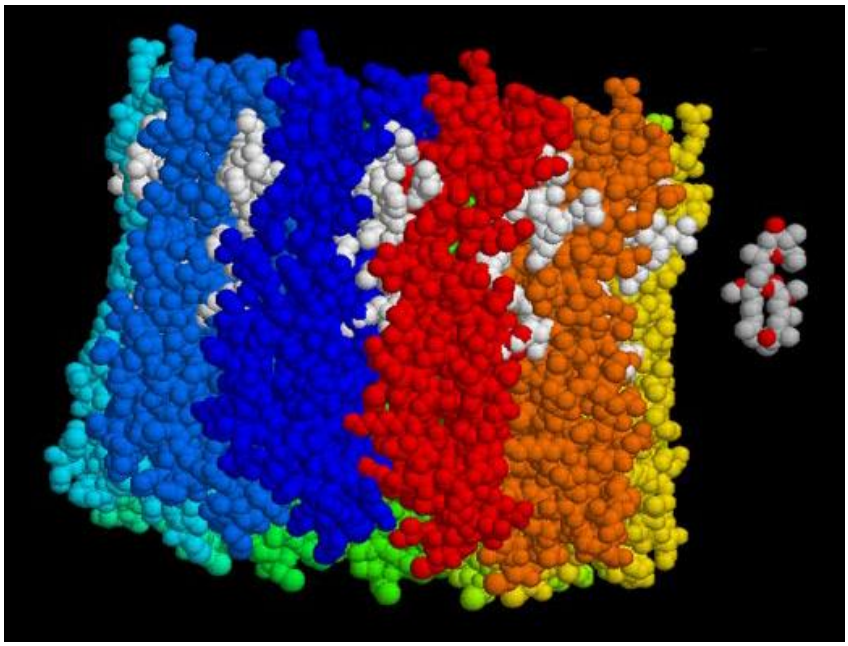


図 1-12：変異導入実験による Baf の結合部位推定[78]

図中の白い部分が推定された Baf の推定結合部位を、色つきで描かれている部分はサブユニット c を、右側の灰色と赤色の分子は Baf をそれぞれ表している。

1-2-d　in vivo 様系におけるバフィロマイシンの活性

これまでに紹介してきた実験は酵母などの生物種から単離した V-ATP アーゼ含有画分を用いた実験の結果であり、その中で Baf は IC_{50} が nM オーダーの非常に強力な活性を示してきた。しかしより系が複雑な細胞を用いた実験においては Baf の示す活

性がしばしば異なることが報告されている。例えば Beyenbach らはマルピーギ管と呼ばれる蚊の消化器官における電解質の取り込みにおいて V-ATP アーゼが機能の一翼を担っていることを明らかにしているが、そこで Baf は単離画分を用いた試験とは異なる挙動を示している(図 1-13)[79]。マルピーギ管は主細胞と呼ばれる細胞が連結することで構成される管状の消化器官である。V-ATP アーゼは主細胞の細胞膜のうち管の内腔に面した膜に局在することが知られており、そのプロトン輸送機能を他のカチオン輸送酵素と連動させることでマルピーギ管内にナトリウムおよびカリウムイオンを能動輸送している。本系では V-ATP アーゼが阻害されると上述のカチオン輸送も阻害され電流が流れなくなる。このことを利用して Beyenbach らはマルピーギ管に Baf を添加した際の応答を評価したところ、その阻害活性は IC_{50} 値 5 μM 程度であることが明らかになった。これは単離精製系で評価した際に得られる活性に比べておよそ 3 桁も低下しており、主細胞が作り出す非平衡的な環境により V-ATP アーゼ周辺での Baf の有効濃度が低減していると予想される。また興味深いことに V-ATP アーゼの局在している膜に近い管内腔から Baf を添加した場合には Baf は阻害活性を示さないことが報告されている。この結果は管外側の細胞膜に比べて管内腔側の細胞膜に対する Baf の結合親和性あるいは膜透過性が低くなっている可能性を示唆している。以上の様に Baf の活性発現には V-ATP アーゼ結合能に加えて脂質膜環境下における動態や脂質膜に対する親和性も重要な要素であると考えられる。

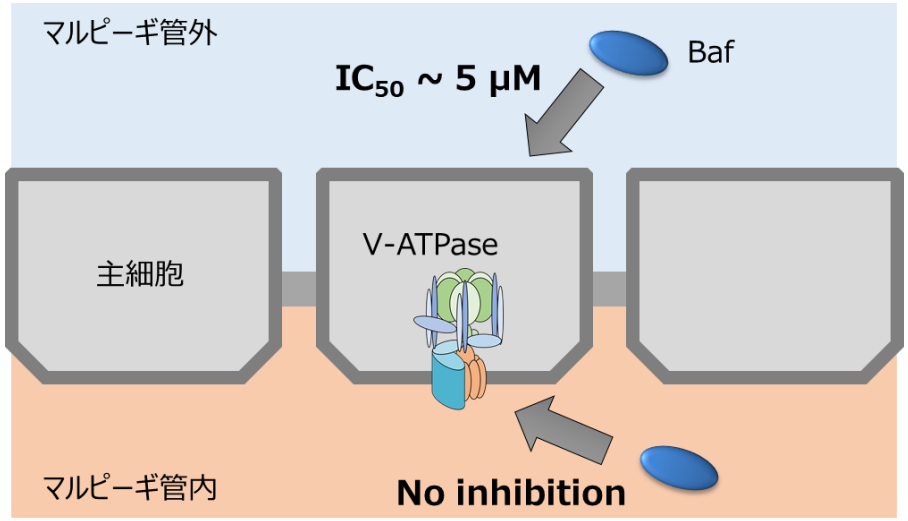


図 1-13：蚊のマルピーギ管を用いた V-ATP アーゼ阻害活性試験

マルピーギ管外から Baf を添加した際の IC_{50} は 5 μM 程度であるのに対して、管内から添加した際には 10 μM の Baf を添加しても阻害活性が見られない[79]。

本節で説明してきたようにV-ATPアーゼの代表的阻害剤であるBafの作用機構研究はこれまでに種々行われており、その結合部位を推定することに成功している。一方でBafの結合様式やV-ATPアーゼとの間に働く分子間相互作用についての詳細な知見は現状得られていない。この問題を克服しBafによる阻害機構の分子基盤を解明するためには、V-ATPアーゼとBafが直接相互作用している状態を原子レベルで解析する必要がある。またBafの活性はV-ATPアーゼ周辺の膜環境によっても大きく変化していることから、Bafの活性発現機構をより正確に理解するためにはV-ATPアーゼ結合の前段階にあたる膜分配・透過など膜環境下におけるBafの挙動を明らかにすることが必須であると考えられる。

1-3　固体NMR測定とフッ素標識化バフィロマイシン

1-3-a　固体NMRによる構造解析

リガンドー膜タンパク質の結合様式解明には可溶性タンパク質の場合と同様に、リガンドータンパク質複合体の共結晶構造をX線により解析する手法が強力な手法として用いられてきた[80,81,82]。しかし膜タンパク質の場合には脂質膜環境下でなければ安定に存在できないものや、活性な構造を維持できないものが多数あることからその適用は未だ一部に限られている。それに対して脂質膜環境下での構造解析が可能な手法として固体NMRが近年注目されている[83,84]。固体NMRでは試料の結晶化や可溶化を必要とせず、人工膜あるいは生体膜環境下での測定が可能である。固体NMR測定ではNMR観測核間の距離や配向、観測核周辺の局所的な運動性など種々の構造情報を抽出することができる。したがって対象となる分子の適切な位置に^{13}Cや^{15}N、^{19}FなどのNMR観測核を導入し、それらを用いた固体NMR解析を実施することで複合体の構造情報を取得することができる。例えばHongらはインフルエンザウイルスのM2タンパク質とコレステロールとの複合体構造を脂質膜環境下、固体NMR測定により解析している[85]。具体的には、M2タンパク質の膜貫通領域に相当する配列に位置選択的に^{13}C標識を施した標識ペプチドと^{19}Fなどで標識を施したコレステロール誘導体からなるリガンドータンパク質複合体を脂質モデル膜中で形成させ、標識核間距離を固体NMRにより計測することで複合体構造を推定することに成功している(図1-14)。この他にも固体NMRによりリガンドー膜タンパク質複合体の構造を解析した例は報告されており[86,87,88,89]、固体NMRは膜環境下における構造解析に有

用な手法であると考えられる。

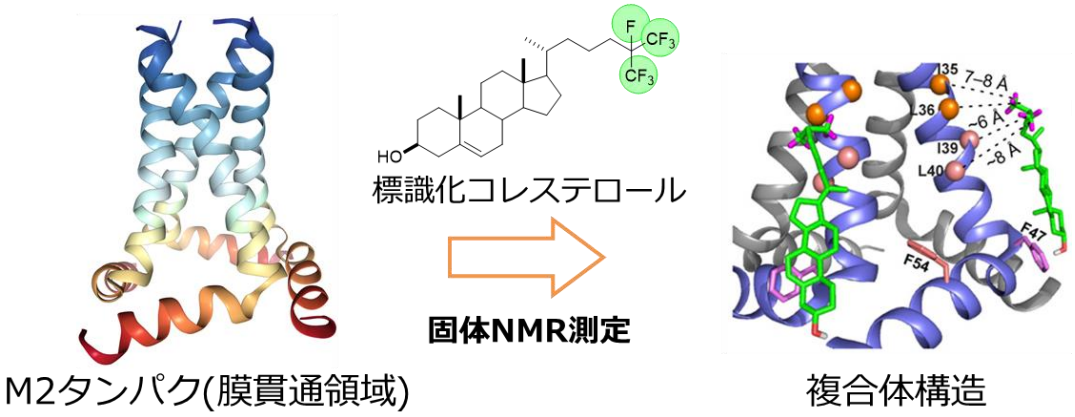


図 1-14：M2 タンパク質の膜貫通領域と脂溶性有機分子の複合体構造[85]

以上の様に固体 NMR は膜タンパク質－リガンド複合体を脂質膜環境下で解析できる有用な測定手法である。そこで当研究室ではこれまで固体 NMR を活用した Baf－V-ATP アーゼ複合体の解析を目指し、そのプローブとして Baf の分子骨格内にフッ素原子を導入したフッ素標識化 Baf 誘導体の合成が進められてきた。以降の節ではその経緯と残された課題について概説する。

1-3-b　フッ素標識化バフィロマイシンの設計・合成

固体 NMR 解析に用いるプローブ分子として我々は図 1-15 に示した三種の誘導体を設計した[90,91,92]。標識体を設計するにあたり、まず標識核としてフッ素原子を選択した。フッ素原子は数ある NMR 観測核の中でも ^{1}H に次いで高感度であること、および生体中にあまり含まれていないために低ノイズでの観測が可能なことから標識核種として適切であると考えられたためである。一方でフッ素原子の導入はしばしば分子の物性・生理活性に影響を及ぼすため、フッ素原子を用いたプローブ化には適切な標識位置の選定が必要不可欠である。そこで当研究室では 23 位イソプロピル基をトリフルオロメチル基に変更した FBaf、さらにそこから 6, 8 位不斉メチル基を取り去り合成簡略化をはかった desFBaf、および 2 位メトキシ基をフッ素原子に置換した 2-FBaf が設計された。これらの位置を選定したのは、23 位イソプロピル基がエチル基やペンタジエニル基になっている化合物および2位メトキシ基がメチル基になっている化合物が天然の Baf と同程度の生理活性を示すことから、これらの位置は Baf の

活性発現に大きく寄与していないことが推察されたためである。

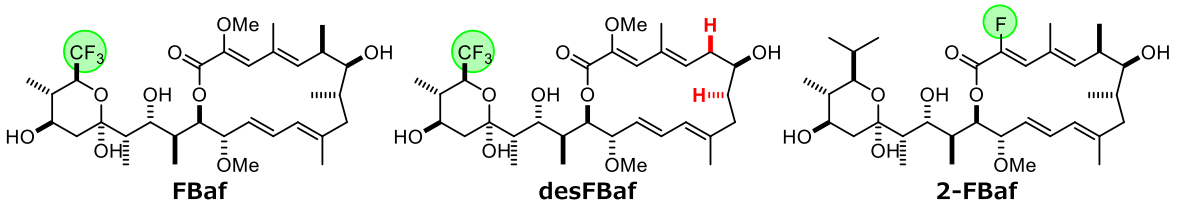


図 1-15：これまでに合成されたフッ素標識化 Baf[90,91,92]

フッ素標識化 Baf の合成経路は、天然の Baf の全合成例に基づいて考案された。Baf はその特徴的な構造から多くの化学者の関心を集め、1993 年の Evans らによる初の全合成を筆頭に数多くの合成研究がこれまでなされてきた[93,94,95,96,97]。Baf の全合成法にはいくつかの共通点がある(図 1-16)。まずいずれの全合成においても Baf をいくつかのセグメントに分割し、それらを鍵反応により連結していく収束的合成法により合成を進めている。また THP 環部分についてはアルドール反応により、マクロラクトン環部分についてはパラジウム触媒によるクロスカップリング反応と続くマクロラクトン化反応によりそれぞれ構築されている傾向にある。

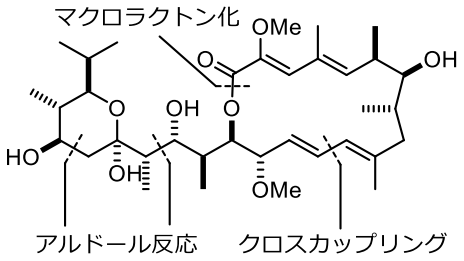


図 1-16：Baf の全合成に用いられてきた鍵反応

フッ素標識化 Baf の合成は上述の全合成例を参考に、三つのセグメントを順次連結する収束的合成法により実施された(図 1-17)。すなわち不斉アルドール反応、Yamaguchi 条件でのマクロラクトン化および Stille カップリングを鍵反応として対応するセグメント A, B, C を連結することで三種の標識体が合成された。このような収束的合成法をとることにより合成の効率化を図ると共に、セグメントの標識位置を変更することで標識位置の多様化にも対応可能となっている。

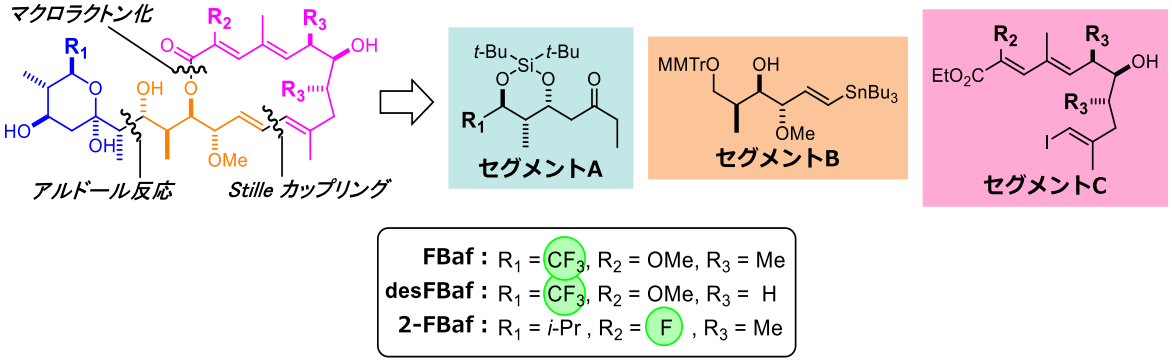


図 1-17：フッ素標識化 Baf の逆合成解析

1-3-c　標識体の活性評価

合成した誘導体について二種の生物活性評価が実施された[90,91,92]。一つが酵母液胞膜画分を用いた V-ATP アーゼ阻害活性試験、もう一つがアクリジンによる細胞染色試験である。前者の実験では V-ATP アーゼが機能する際に ATP 加水分解によりリン酸を生成することを利用し、V-ATP アーゼを含む酵母液胞膜画分に Baf 誘導体を添加した際に生成したリン酸を定量することで Baf 誘導体により V-ATP アーゼの機能がどの程度阻害されているかを評価している[98,99]。その結果、FBaf および 2-FBaf は天然の Baf とほぼ同程度の活性を示したのに対して、desFBaf にのみ顕著な活性低下が見られた(表 1-2)。また同様の傾向はアクリジンによる細胞染色試験においても見られた。本実験では V-ATP アーゼが細胞内膜系を酸性化していることを利用し、酸性条件下でのみ赤色発光するアクリジンを添加した細胞に Baf 誘導体を共存させた時の発光を観察することで細胞中の V-ATP アーゼが阻害されているかを評価している[99]。図 1-18 に示したように 100 nM の Baf, FBaf および 2-FBaf を添加した場合では V-ATP アーゼによる内膜系の酸性化が阻害されたために赤色発光が観察されなくなっている一方で、desFBaf の場合には 10 μM 添加した際にもネガティブコントロールと同様の赤色発光が観察されており、V-ATP アーゼが阻害されていないことが窺える。

表 1-2：フッ素標識化 Baf の V-ATP アーゼ阻害活性評価[91,92]

化合物	IC_{50} 比(化合物 / Baf)
FBaf	1.1
desFBaf	> 5000
2-FBaf	1.2

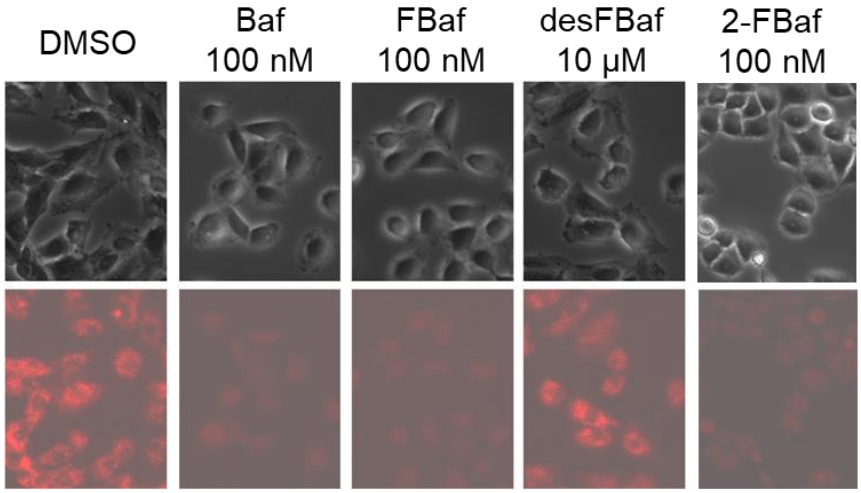


図 1-18：フッ素標識化 Baf の細胞染色阻害実験[91,92]

desFBaf の顕著な活性低下の原因について考察すべく、溶液 NMR による解析が行われた[91]。その結果、天然の Baf および活性を保持していた誘導体では類似の NOE シグナルが観測されたのに対して、デスメチル体については NOE シグナルのパターンが異なった。NMR 情報を加味した配座計算の結果、デスメチル体は活性に関与していると考えられている 7 位ヒドロキシ基周辺の配座、特に 7 位ヒドロキシ基の方向が活性のある誘導体と異なることが示唆された(図 1-19)。この結果よりデスメチル体の活性低下は上述の配座変化による V-ATP アーゼ結合能低下によるものであることが推察された。

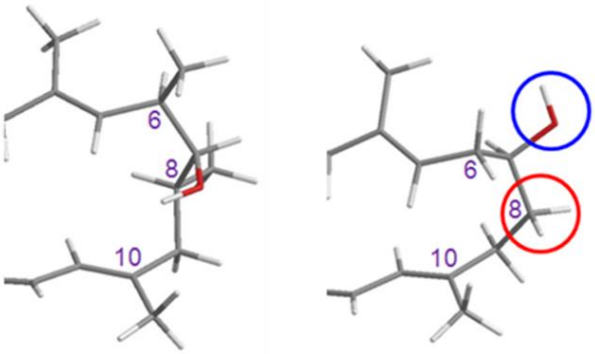


図 1-19：メチル基除去に伴う構造変化[91]

(左)：溶液 NMR 解析に基づく配座探索より得られた FBaf の最安定配座。天然の Baf と類似の配座をとっている。(右)：同様の計算で得られた desFBaf の最安定配座、8 位メチレン基に加えて 7 位ヒドロキシ基の方向が顕著に変化していることが見て取れる。

1-3-d　作用機構解析に向けた課題

以上の結果より Baf と V-ATP アーゼの相互作用を固体 NMR により解析する際に必要となるプローブとして、活性を保持したままフッ素原子を骨格に導入した誘導体を開発することに成功した。またその過程で 6 位と 8 位のメチル基を取り去った誘導体ではその活性が大幅に低下することも見出した。しかしながら 7 位ヒドロキシ基に改変を施した過去の構造活性相関研究の結果と比較すると、デスメチル体に見られた活性低下は単に 7 位ヒドロキシ基を修飾したものより一桁程度大きく(図 1-20)[71,91]、V-ATP アーゼ結合能の低下以外の要因が存在している可能性が高いと考えられる。特に Baf の結合部位が V-ATP アーゼの膜貫通領域に存在していることを考慮すると、Baf の活性は V-ATP アーゼ結合能のみならず脂質膜親和性にも依存することが予想される。したがって、ここで得られた生物活性とリガンド構造の知見を踏まえ、さらにこれら誘導体の脂質膜環境下における挙動を詳細に解析することができれば、Baf の作用機構をより正確に理解することができると考えられる。

加えて活性を保持したフッ素標識体を活用した固体 NMR 解析を実施するためには、固体 NMR 測定に用いる V-ATP アーゼの単離精製が必要不可欠である。しかしながら、これまで V-ATP アーゼを固体 NMR により解析した例はなく、測定に必要な試料の純度も必要量も不明である。したがって、固体 NMR 解析に向けた V-ATP アーゼ試料調製法の確立も、成し遂げるべき重要課題の一つと言える。

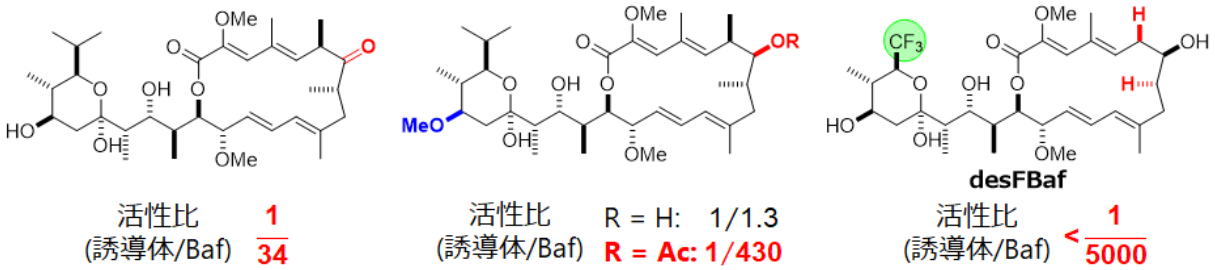


図 1-20：7 位周辺の構造改変に伴う活性低下

1-4　研究目的

膜タンパク質の機能を選択的かつ新しい作用機序で制御できる可能性のある脂溶性リガンドは、膜タンパク質の機能理解や新規薬剤開発の観点から重要な研究対象である。代表的な V-ATP アーゼ選択的阻害剤である Baf もそのような脂溶性リガンドのひとつであり、長年にわたり多くの分野で研究対象となっているが、その阻害機構の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、脂質膜環境下において分子レベルでの解析が可能な固体 NMR を活用し、Baf による V-ATP アーゼ阻害機構の分子基盤を明らかにすることを目指した。特に Baf の作用部位が膜貫通領域にあり、なおかつ膜環境によってその活性の強さが変化することを鑑み、本研究ではまず Baf の脂質膜環境下における挙動を解析することで、その作用機構を解明することを目的とした。すなわち、Baf および活性の異なる誘導体の脂質膜環境下における立体配座と膜に対する配向を化学的に解析することで、Baf の分子構造が脂質膜環境下における挙動にどのように影響しているか、さらにはそれが Baf の生物活性にどの程度寄与しているかを明らかにすることにした。さらに、固体 NMR による複合体構造解析において最大の問題点となる V-ATP アーゼの単離精製法を確立することも本研究の目的に設定した。

本研究は従来深く議論されることのなかった「脂溶性リガンドの構造が脂質膜親和性に及ぼす影響」について詳細な解析を行うものであり、本研究を達成することで確立される方法論は天然物や薬剤分子など数ある脂溶性リガンドの作用機構の理解をより一層深めることができるものである。また本研究により Baf－V-ATP アーゼ間相互作用を分子レベルで解析することができれば、長年未解決のままの Baf による V-ATP アーゼ阻害機構について解明の糸口になることが期待される。

参考文献

[1] Wallin, E.; von Heijne, G. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1029-1038.

[2] Yamamoto, T. *Folia Pharmacol. Jpn.* **2007**, *130*, 135-140.

[3] Lin, Y.-Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J. C.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6773-6775.

[4] Dechraoui, M. Y.; Naar, J.; Pauillac, S.; Legrand, A. M. *Toxicon*. **1999**, *37*, 125-143.

[5] Hansch, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616-1626.

[6] Lipinski C. A.; Lombardo F.; Dominy B. W.; Feeney P. J.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.

[7] Leeson P. D.; Springthorpe B.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881-890.

[8] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, "Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method", Adopted by the Council on 30th March 1989.

[9] Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 3762-3772.

[10] Pyka, A.; Babuśka, M.; Zachariasz, M. A *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* **2006**, *63*, 159-167.

[11] Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1136-1145.

[12] Matsuda, T.; Jikihara, T.; Nakamura, K.; Kimura, A.; Takagi, T.; Fujiwara, H. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 57-63.

[13] Michalík, M.; Lukeš, V. *Acta Chimica Slovaca* **2016**, *9*, 89-94.

[14] Vauquelin, G.; Packeu, A. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *311*, 1-10.

[15] Sargent, D. F.; Schwyzer, R. *Biochemistry* **1986**, *83*, 5774-5778.

[16] Castanho, M. A. R. B.; Fernandes, M. X. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 92-103.

[17] Matsumori, N.; Morooka, A.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14989-14995.

[18] Kimura, T.; Cheng, K.; Rice, K. C.; Gawrisch, K. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4916-4924.

[19] Matsumori, N.; Morooka, A.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14989-14995.

[20] Yang, H.; Staveness, D.; Ryckbosch, S. M.; Axtman, A. D.; Loy, B. A.; Barnes, A. B.; Pande, V. S.; Schaefer, J.; Wender P. A.; Cegelski, L. *ACS. Cent. Sci.* **2018**, *4*, 89-96.

[21] Ohsumi, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2079-2082.

[22] Nishi, T.; Forgac, M. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3*, 94-113.

[23] Forgac, M. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *8*, 917-929.

[24] Holliday, L. S. *New J. Sci.* **2014**, 1-21.

[25] Yao, G.; Feng, H.; Cai, Y.; Qi, W.; Kong, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *357*, 821-827.

[26] Qin, A.; Cheng, T. S.; Pavlos, N. J.; Lin, Z.; Dai, K. R.; Zheng, M. H. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2012**, *44*, 1422-1435.

[27] Sennoune, S. R.; Bakunts, K.; Martínez, G. M.; Chua-Tuan, J. L.; Kebir, Y.; Attaya, M. N.; Martínez-Zaguilán, R. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2004**, *286*, C1443-C1452.

[28] Drory, O.; Frolow, F.; Nelson, N. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 1148-1152.

[29] Sagermann, M.; Stevens, T. H.; Matthews, B. W. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7134-7139.

[30] Balakrishna, A. M.; Basak, S.; Manimekalai, M. S. S.; Gruber, G. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 3183-3196.

[31] Oot, R. A.; Huang, L. S.; Berry, E. A.; Wilkens, S. *Structure* **2012**, *20*, 1881-1892.

[32] Arai, S.; Saijo, S.; Suzuki, K.; Mizutani, K.; Kakinuma, Y.; Ishizuka-Katsura, Y.; Ohsawa, N.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S.; Iwata, S.; Yamato, I.; Murata, T. *Nature* **2013**, *493*, 703-707.

[33] Numoto, N.; Hasegawa, Y.; Takeda, K.; Miki, K. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1228-1234.

[34] Iwata, M.; Imamura, H.; Stambouil, E.; Ikeda, C.; Tamakoshi, M.; Nagata, K.; Makyio, H.; Hankmer, B.; Barber, J.; Yoshida, M.; Yokoyama, K.; Iwata S. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 59-64.

[35] Srinivasan, S.; Vyas, N. K.; Baker, M. L.; Quiocho, F. A. *J. Mol. Biol.* **2011**, *412*, 14-21.

[36] Murata, T.; Yamato, I.; Kakinuma, Y.; Leslie, A. G.; Walker, J. E. *Science* **2005**, *308*, 654-659.

[37] Zhao, J.; Benlekbir, S.; Rubinstein, J. L. *Nature* **2015**, *521*, 241–245.

[38] Rubinstein, J. L.; Mazhab-Jafari, M. T.; Bueler, S. A.; Benlekbir, S.; Rohou, A.; Schmidt, C.; Robinson, C. V. *Nature* **2016**, *539*, 118-122.

[39] Imamura, H.; Nakano, M.; Noji, H.; Muneyuki, E.; Ohkuma, S.; Yoshida, M.; Yokoyama, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2312-2315.

[40] Yokoyama, K.; Nakano, M.; Imamura, H.; Yoshida, M.; Yamakoshi, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24255-24258.

[41] Suzuki, K.; Mizutani, K.; Maruyama, S.; Shimono, K.; Imai, F. L.; Muneyuki, E.; Kakinuma, Y.; Ishizuka-Katsura, Y.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S.; Yamato, I.; Murata, T. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13235-13244.

[42] Isaka, Y.; Ekimoto, T.; Kokabu, Y.; Yamato, I.; Murata T.; Ikeguchi M.; *Biophys. J.* **2017**, *112*, 911-920.

[43] Hirata, R.; Granham, L. A.; Takatsuki, A.; Stevens, T. H.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4795-4803.

[44] Noumi, T.; Beltrán, C.; Nelson, H.; Nelson, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 1938-1942.

[45] Leng, X-H.; Manolson, M. F.; Forgac, M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6717-6723.

[46] Kawasaki-Nishi, S.; Nishi, T.; Forgac, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, *98*, 2397-12402.

[47] Kawasaki-Nishi, S.; Nishi, T.; Forgac, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41908-41913.

[48] Wang, Y.; Inoue, T.; Forgac, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44628-44638.

[49] Werner, G.; Hagenmaier, H.; Albert, K.; Kohlshorn, H.; Drautz, H. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5193-5196.

[50] Werner, G.; Hagenmaier, H.; Drautz, H.; Baumgartner, A.; Zähner, H. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 110-117.

[51] Kretschmer, A.; Dorgerloh, M.; Deeg, M.; Hagenmaier, H. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2509-2511.

[52] Kinashi, H.; Someno, K.; Sakaguchi, K.; Higashijima, T.; Miyazawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3861-3864.

[53] Westley, J. W.; Liu, C. M.; Sello, L. H.; Evans, R. H.; Troupe, N.; Blount, J. F.; Chiu, A. M.; Todaro, L. J.; Miller, P. A. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1738-1740.

[54] Sasse, F.; Steinmetz, H.; Höfle, G.; Reichaenbach, H. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 520-525.

[55] Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8188-8192.

[56] Galinis, D. L.; McKee, T. C.; Pannell, L. K.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8968-8969.

[57] McKee, T. C.; Galinis, D. L.; Pannell, L. K.; Cardellina, J. H.; Laakso, J.; Ireland, C. M.; Murray, L.; Capon, R. J.; Boyd, M. R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7805-7810.

[58] Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Höfle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 1075-1080.

[59] Jansen, R.; Kunze, B.; Reichenbach, H.; Höfle, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 913-919.

[60] Kobayashi, J.; Cheng, J.; Ohta, T.; Nakamura, H.; Nozoe, S.; Hirata, Y.; Ohizumi, Y.;

Sasaki, T. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 6147-6150.

[61] Kikuchi, Y.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Kobayashi, J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 797-798.

[62] Nadler, G.; Morvan, M.; Delimoge, I.; Belfiore, P.; Zocchetti, A.; James, I.; Zembryki, D.; Lee-Rycakzewski, E.; Parini, C.; Consolandi, E.; Gagliardi, S.; Farina, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3621-3626.

[63] Niikura, K.; Takano, M.; Sawada, M. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 558-566.

[64] Niikura, K. *J. Periodontol.* **2006**, *77*, 1211-1216.

[65] Niikura, K.; Nakajima, S.; Takano, M.; Yamazaki, H.; *Bone* **2007**, *40*, 888-894.

[66] Ohta, E.; Kubota, N. K.; Ohta, S.; Suzuki, M.; Ogawa, T.; Yamasaki, A.; Ikegami, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8463-8467.

[67] Bowman, B. J.; Siebers, A.; Altendorf, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1988**, *85*, 7972-7976.

[68] Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgon, R. J. J.; Everett, J. R.; Ley, S. V.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5565-5568.

[69] Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgon, R. J. J.; Everett, J. R. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II* **1989**, 1073-1079.

[70] Dröse, S.; Bindseil, K. U.; Bowman, E. J.; Siebers, A.; Zeeck, A.; Altendorf, K. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3902-3906.

[71] Gagliardi, S.; Gatti, P. A.; Belfiore, P.; Zocchetti, A.; Clarke, G. D.; Farina, C. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1883-1893.

[72] Gagliardi, S.; Rees, M.; Farina, C. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 1197-1212.

[73] Dröse, S.; Boddien, C.; Gassel, M.; Ingenhorst, G.; Zeeck, A.; Altendorf, K. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2816-2825.

[74] Huss, M.; Ingenhorst, G.; König, S.; Gaßel, M.; Dröse, S.; Zeeck, A.; Altendorf, K.; Wieczorek, H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40544-40548.

[75] Qsteresch, C.; Bender, T.; Grond, S.; von Zezschwitz, P.; Kunze, B.; Jansen, R.; Huss, M.; Wieczorek, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 31866-31876.

[76] Bowman, B. J.; Bowman, E. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3965–3972.

[77] Bowman, E. J.; Graham, L. A.; Stevens, T. H.; Bowman, B. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33131-33138.

[78] Bowman, B. J.; McCall, M. E.; Baertsch, R.; Bowman, E. J. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31885-31893.

[79] Beyenbach, K. W.; Pannabecker, T. L.; Nagel, W. *J. Exp. Biol.* **2000**, *203*, 1459-1468.

[80] Moraes, I.; Evans, G.; Sanchez-Weatherby, J.; Newstead, S.; Stewart, P. D. S. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2014**, *1838*, 78-87.

[81] Luecke, H.; Schobert, B.; Richter, H. T.; Cartailler, J. P.; Lanyi, J. K. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 899-911.

[82] Symersky, J.; Osowski, D.; Walters, D. E.; Mueller, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 13961-13965.

[83] Watts, A. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 555-568.

[84] Wang, S.; Ladizhansky, V. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2014**, *82*, 1-26.

[85] Elkins, M. R.; Williams, J. K.; Gelenter, M. D.; Dai, P.; Kwon, B.; Sergeyev, I. V.; Pentelute, B. L.; Hong, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2017**, *114*, 12946-12951.

[86] Cady, S. D.; S-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; DeGrado, W. F.; Hong, M. *Nature* **2010**, *463*, 689-693.

[87] Middleton, D. A.; Rankin, S.; Esmann, M.; Watts, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 13602-13607.

[88] Cegelski, L.; Steuber, D.; Mehta, A. K.; Kulp, D. W.; Axelsen, P. H.; Schaefer, J. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 1253-1262.

[89] Whittaker, C. A. P.; Patching, S. G.; Esmann, M.; Middleton, D. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2664-2668.

[90] Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 474-476.

[91] Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; Hayashi, T.; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Asian. J.* **2015**, *10*, 915-924.

[92] Tsuchikawa, H.; Hayashi, T.; Shibata, H.; Murata, M.; Nagumo, Y.; Usui, T. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2426-2429.

[93] Evans, D. A.; Calter, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6871-6874.

[94] Toshima, K.; Jyojima, T.; Yamaguchi, H.; Noguchi, Y.; Yoshida, T.; Murase, H.; Nakata, M.; Matumura, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3271-3284.

[95] Scheidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Savall, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6981-6990.

[96] Hanessian, S.; Ma, J.; Wang, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10200-10206.

[97] Kleinbeck, F.; Fettes, G. J.; Fader, L. D.; Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*,

3598-3610.
[98] Uchida, E.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 1090-1095.
[99] Kazami, S.; Takaine, M.; Itoh, H.; Kubota, T.; Kobayashi, J.; Usui, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 1944-1947.

第2章　本論Ⅰ －脂質膜環境下におけるバフィロマイシン誘導体の挙動解析－

これまでに述べてきたように、Baf は V-ATP アーゼの膜貫通領域に結合する脂溶性リガンドであることから、その活性発現機構の描像を正確に理解するためには、脂質膜中での Baf の挙動を明らかにする必要がある。しかし Baf の膜親和性に関する報告はこれまでほとんどされておらず、Baf と類似の構造・生物活性を有するコンカナマイシン A が膜に分配されやすいことが定性的に示唆されている程度である[1]。具体的には、Páli らはあらかじめコンカナマイシンを脂質に混合させて調製したリポソームの膜物性が、リポソームに後からコンカナマイシンを添加した場合のものと同等であることを、ラジカル脂質を用いた EPR スペクトルにより明らかにしている(図 2-1)。この結果はリポソーム溶液に添加されたコンカナマイシンが速やかに脂質膜内に挿入されている、またはコンカナマイシンが高い膜親和性を有していることを示唆している。しかしながら、より定量的な評価や Baf そのものの膜親和性に関する評価は未だに報告されていない。そこでまず膜物性の基礎的な知見から収集するために、Baf および誘導体の脂溶性を評価することにした。

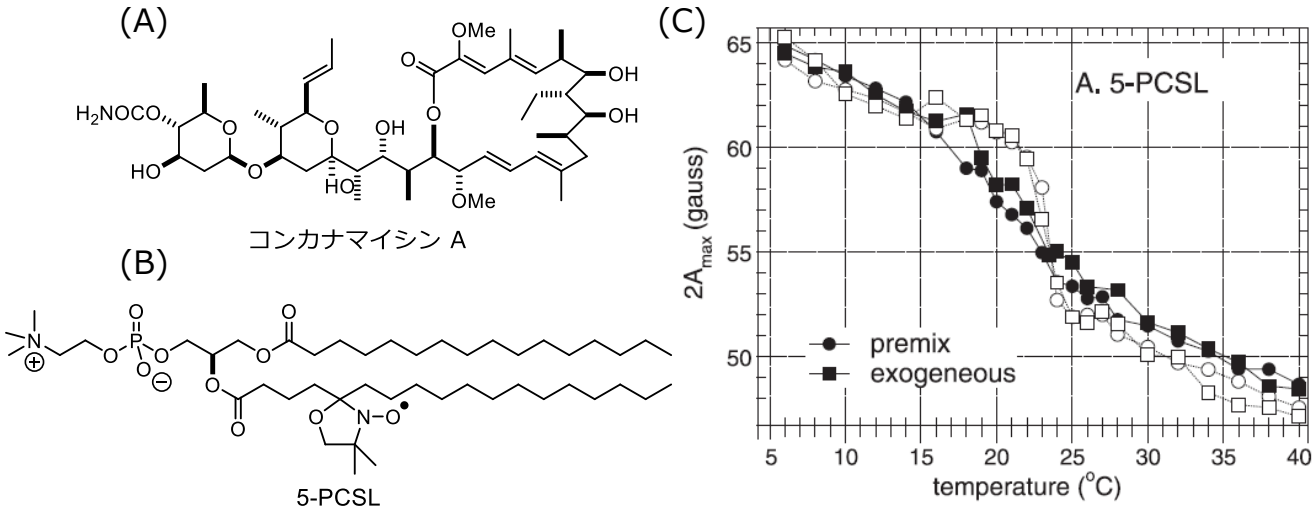


図 2-1：(A)コンカナマイシン A の構造、(B)ラジカル脂質の構造、(C)DMPC リポソーム中における outer hyperfine 分裂の温度依存性

2-1　フッ素化バフィロマイシン誘導体の改良合成

脂溶性評価に先立ち、評価に使用する FBaf の合成を実施した。FBaf の合成は当研究室で確立された手法に従い、三つのセグメントを順次連結することで合成することにした(図 2-2)。さらに本研究では固体 NMR による Baf の配座解析を見据え、FBaf にさらに ^{13}C 標識を導入するための合成経路を検討することにした。具体的には FBaf の 1 位および 2 位を ^{13}C で標識することを試みた。なおこの位置を標識位置として選択したのは、このプローブの ^{13}C－^{19}F 間距離を固体 NMR により計測すれば、Baf の構造の決定的要因である THP 環とマクロラクトン環の相対配置を決定することができると考えたためである。

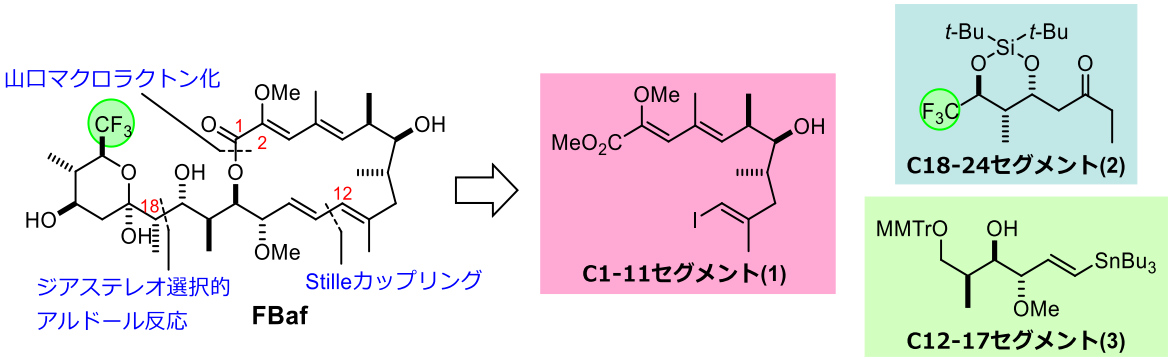


図 2-2：FBaf の逆合成解析

^{13}C 標識化 C1-11 セグメント(**1**)の逆合成解析を行った。C1-11 セグメント(**1**)への ^{13}C の導入はアルデヒド **4** と ^{13}C 標識を施したホスホン酸エステル **5** を Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)反応によって連結することで合成しようと考えた。またホスホン酸エステル **5** は Scheidt らの報告[2]を参考に、アセタール **6** の塩素化および Michaelis-Arbuzov 反応により合成することにした。アセタール **6** についてはグリオキシル酸メチル **7** をジメチルアセタール化することで、グリオキシル酸メチル **7** は Kornblum らが報告している塩基触媒による亜硝酸イオンの脱離反応[3]によって硝酸エステル **8** から合成することにした。硝酸エステル **8** は硝酸イオンによる S_N2 反応およびエステル化によって市販の 1,2-^{13}C-ブロモ酢酸 **10** より合成することを計画した。

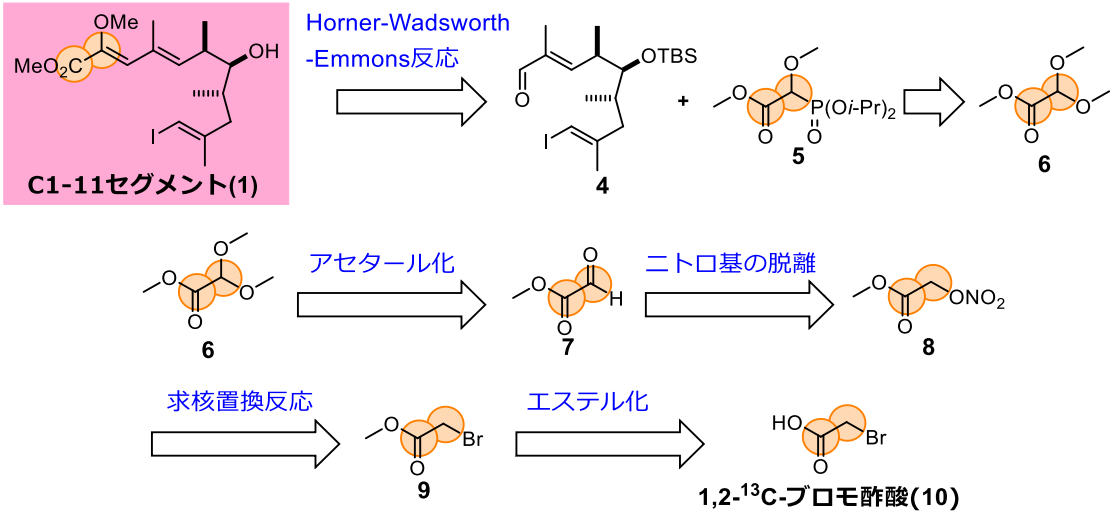


図 2-3：^{13}C 標識化 C1-11 セグメントの逆合成解析

まず合成検討の第一段階として無標識のブロモ酢酸 **10** を出発原料にして、グリオキシル酸メチル **7** の合成に取り組んだ。まずブロモ酢酸のメチルエステル化と続く硝酸イオンによる S_N2 反応をワンポットで行うことを狙い、メチルエステル化にはワークアップを必要としないジアゾメタンを用いる方法を選択した。その結果、両反応は問題なく進行した。その後 Kornblum らの報告する亜硝酸イオンの脱離反応によってグリオキシル酸メチル **7** の合成を試みたが、目的物を得ることはできなかった。この原因として反応自体は進行したものの、グリオキシル酸メチル **7** の水溶性が高すぎたために有機層への抽出が困難であることが考えられた。

そこで合成経路を一部変更して、まずブロモ酢酸をベンジルエステルに誘導し、その後先程と同様のスキームで合成を進めることにした(図 2-4)。その結果、エステル化、求核置換反応は問題なく進行し、亜硝酸イオンの脱離反応についても反応の進行が確認されたが、得られたクルードの ^{1}H NMR スペクトルにはアルデヒド基に特有のシグナルが微弱にしか観測されなかった。この原因については、他のグリオキシル酸エステルが容易に水和することから、今回合成したグリオキシル酸ベンジル **13** も水和してアルデヒド基がジェミナルジオールとなっているためであると考察した。またクルードの MS を測定したところ m/z = 219.0625 がメインのピークとして観測され、これは目的物のナトリウム・メタノール付加体の分子イオンピーク m/z = 219.6333 と概ね一致する(誤差~3.7 ppm)ことからも目的物が得られていると判断した。得られたクルードをメタノール中でオルトギ酸トリメチルとパラトルエンスルホン酸一水和物で処理したところ目的のアセタール **6** が 2 段階収率 30%で

得られた。その後、Scheidt らの報告に従って、得られたアセタール **6** を五塩化リンによって塩素化した後、亜リン酸トリイソプロピルとの Michaelis-Arbuzov 反応によって無標識のホスホン酸エステル **5** を 2 段階収率 38%で得た。これは Scheidt らの報告と比べると低収率である。この原因としては以下の二点が挙げられる。第一に非常に高価な ^{13}C 標識化試薬を用いることを想定しているために小スケールでの合成となってしまっているという点である。そして第二に、Scheidt らは塩素化で得られた化合物を蒸留により精製しているが、今回の検討では小スケールでの合成であったため蒸留での精製ができていない点である。目的である ^{13}C 標識化ホスホン酸エステル **5** の合成経路は確立されたものの、収率にはさらなる改善の余地があり、さらなる検討が期待される。

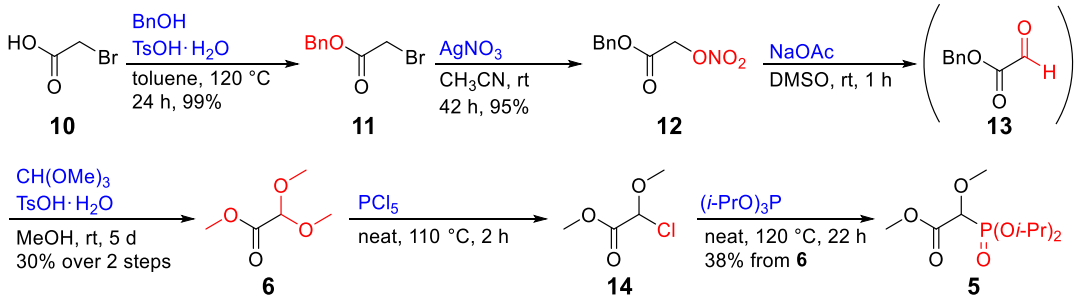


図 2-4：ホスホン酸エステル 5 の合成

次に得られたホスホン酸エステル **5** を用い、FBaf の合成を試みた(図 2-5)。まずホスホン酸エステル **5** と別途調製したアルデヒド **4** を 1:1 の比で HWE 反応の条件に付したところ反応は完全に進行せず、35%のアルデヒド **4** が回収された。アルデヒドや試薬の当量などの検討も実施したが、収率の改善は見られなかった。その後、得られたエステル **15** の TBS 基を取り除くことで目的の C1-11 セグメント(**1**)を得ることに成功した。続いて C1-11 セグメント(**1**)と別途調製した C12-17 セグメント(**3**)を Stille カップリングにより連結し、エステル部分の加水分解と続く山口条件下でのマクロラクトン化によりマクロラクトン **18** を合成した。その後、フリーのヒドロキシ基を *i*-PrEt$_2$Si 基で保護した後に、MMTr 基の除去、および生じたヒドロキシ基の酸化によりアルデヒド **19** を得た。なお *i*-PrEt$_2$Si 基は MMTr を取り除く際の酸性条件に耐えることができ、なおかつ最後の脱保護の段階で問題なく取り外せることから選択された。次いで得られたアルデヒド **19** と別途調製した C18-24 セグメント(**2**)を、ホウ素試薬を用いたジアステレオ選択的アルドール反応により連結することでアルドール付加体 **20** を得た。アルドール付加体 **20** の収率は過去のものに比べ

て低いものとなってしまったが、これは前段階の Swern 酸化において反応温度制御が不十分であったために、アルデヒド **19** のエピ化が生じてしまったためであると考察している。最後に 18%HF·py および TBAF と酢酸をそれぞれ用いた二段階のシリル基除去により目的の FBaf を合成することに成功した。

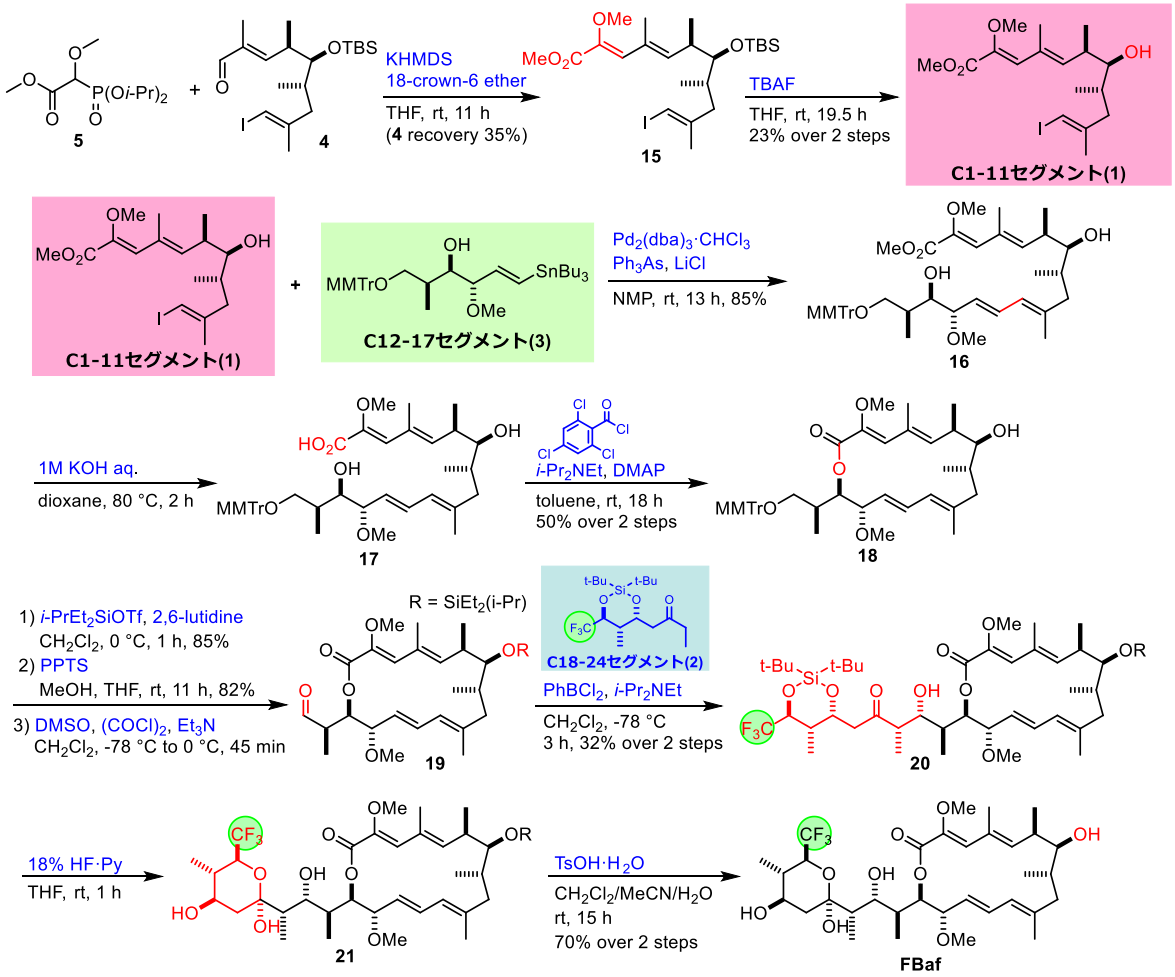


図 2-5：FBaf の合成

2-2　バフィロマイシン誘導体の物性評価

まず天然の Baf および二つの Baf 誘導体の脂溶性を一般的な脂溶性の指標であるオクタノール－水間の分配係数 log $P_{O/W}$ により評価した。分配係数の算出は経済協力開発機構(OECD)の定めたガイドラインに則り[4]、逆相 HPLC 法により実施した。有機分子の逆相 HPLC 中での保持時間は、固定相であるオクタデシル基と移動相である極性溶媒の間での分子の分配平衡に依存し、オクタノール－水間の分配係数で

ある log $P_{O/W}$ と良い相関を示すことが知られている。この性質を利用しているのが逆相 HPLC 法であり、log $P_{O/W}$ 既知の化合物群(実験項 表 2-8)および log $P_{O/W}$ 未知の化合物の逆相 HPLC 中における担持時間を実験的に決定し、そこから回帰分析により未知化合物の log $P_{O/W}$ を推定する。

log $P_{O/W}$ 推定の結果を表 2-1 に示す。この表から見て取れるように、Baf と FBaf はほぼ同等の log $P_{O/W}$ を示した一方で、desFBaf の log $P_{O/W}$ は他に比べて顕著に小さいことが明らかとなった。このメチル基の有無による log $P_{O/W}$ の差は、より単純な化合物間の比較で観測された差よりも著しく大きいことから(diMe-benzophenone：3.84 vs. benzophenone：3.11)、今回観測された log $P_{O/W}$ の低下にはメチル基除去による単純な脂溶性低下のみならず、二次的な要因が存在していることが推察される。

表 2-1：逆相 HPLC 法による log $P_{O/W}$ 推定

化合物	実験値	標準誤差
Baf	4.74	0.0002
FBaf	4.54	0.0001
desFBaf	2.81	0.0004
diMe-benzophenone	3.84	0.0005
benzophenone	3.11	0.0081

次に Baf 誘導体の log $P_{O/W}$ を計算により算出し、得られた実験値と比較した。本研究では Schrodinger 社のプログラム Macromodel[5]および QikProp[6]を利用し、配座変化を考慮にいれて log $P_{O/W}$ を算出した。Qikprop はフラグメンテーション法により log $P_{O/W}$ を算出するプログラムの一種で、溶媒接触面積を元に計算を行うことで分子の三次元構造の影響を取り入れている。具体的には対象とする分子を部分構造に分割し、各部分構造の溶媒接触面積に経験的パラメータを掛け合わせ、それらを足し合わせることで log $P_{O/W}$ を予測している。このような方法をとることで本プログラムは多くの有機分子の log $P_{O/W}$ を比較的精度よく予測できることが報告されている[7]。このプログラムによる log $P_{O/W}$ 予測を配座探索プログラム Macromodel によって得られた配座全てに対して実施し、各配座のエネルギーによる加重平均をとることで Baf の配座変化を取り入れた log $P_{O/W}$ の予測を試みた(表 2-2)。その結果、計算より得られた log $P_{O/W}$ の絶対値は、全ての Baf 誘導体において実験値と一致しなかった。しかし最も実験条件に近い水和条件下での場合、天然物と FBaf の値の差

については実験値と良い一致を示した(計算値 : -0.20 vs 実験値 : -0.20)。また計算ではいかなる条件においても desFBaf に見られた顕著な log $P_{O/W}$ の低下は観測されなかった。

表 2-2 : Macromodel および QikProp より算出された log $P_{O/W}$ 値と実験値の比較

化合物	実験値	配座計算時の溶媒条件			
		Water	None	$CHCl_3$	Octanol
Baf	4.74 (0)	5.28 (0)	5.25 (0)	5.51 (0)	5.41 (0)
FBaf	4.54 (-0.20)	5.08 (-0.20)	5.22 (-0.03)	5.48 (-0.03)	5.12 (-0.29)
desFBaf	2.81 (-1.93)	4.64 (-0.64)	4.81 (-0.44)	4.81 (-0.70)	4.62 (-0.79)

()内の値は Baf との差を表している。

続いて実際の脂質膜に対する Baf および誘導体の親和性を評価するべく、並行人工膜透過性試験(PAMPA)による解析を実施した。この試験は図 2-6 に示したようにドナーウェルに添加したリガンド分子が脂質膜を透過してアクセプターウェルに受動拡散する過程を、両ウェル中に存在するリガンド分子の量から評価する手法である[8,9,10,11]。本研究では過去の報告と同様に[10,11]、系中に添加されたリガンド分子はドナーウェル、アクセプターウェルおよび脂質膜のいずれかに分配されていると仮定し、ドナーおよびアクセプターウェル中のリガンド分子の量から各コンパートメントに存在する分子のモル分率を算出した(図 2-7、表 2-3)。なお、各ウェル中に存在するリガンド分子の定量は任意の時間経過した際の UV スペクトルの吸光度変化を解析することにより実施した。その結果、いずれの誘導体においてもドナーウェル中に存在するリガンド分子のモル分率が時間経過に伴って減少し、脂質膜中に存在するリガンド分子のモル分率が増加した。しかし、モル分率の変化量は誘導体間で差が見られた。すなわち Baf は脂質膜中に速やかに分配され、16 時間経過後にはほぼ脂質膜に分配されていたのに対して、desFBaf は 16 時間経過時点でも全体の 60%程度しか脂質膜に分配されていないことが明らかとなった。また、FBaf に関しては、Baf よりは若干割合が少ないものの、大部分が脂質膜中に分配することが示された。

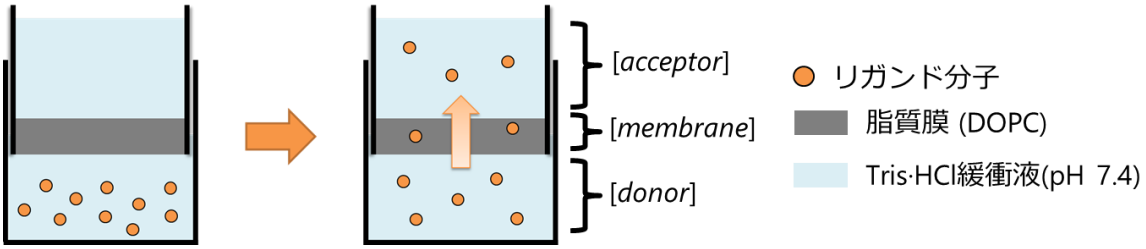


図 2-6：PAMPA における実験系の模式図

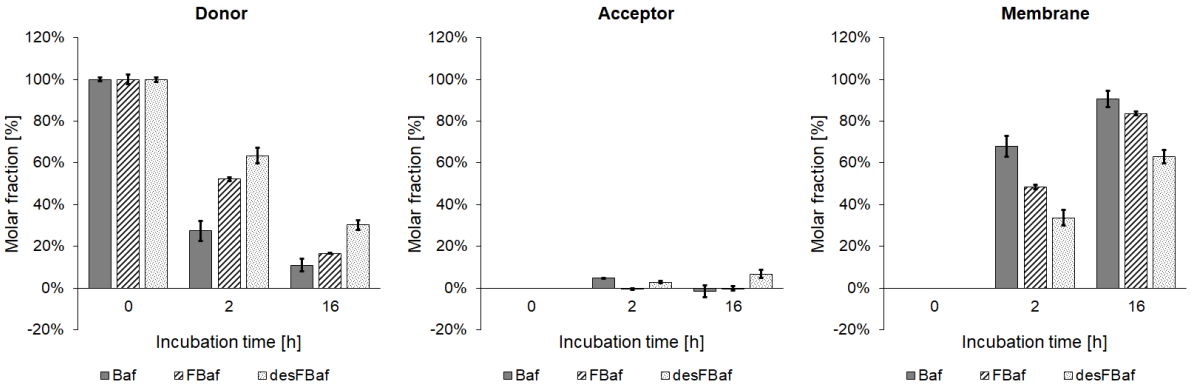


図 2-7：PAMPA における Baf 誘導体のモル分率変化

表 2-3：PAMPA における Baf 誘導体のモル分率

	ドナー			アクセプター			脂質膜		
time [h]	0	2	16	0	2	16	0	2	16
Baf	100 ± 0.9	27.4 ± 4.8	11.0 ± 3.0	0	4.8 ± 0.1	-1.5 ± 2.7	0	67.9 ± 4.9	90.5 ± 3.9
FBaf	100 ± 2.2	52.2 ± 0.9	16.6 ± 0.1	0	-0.5 ± 0.4	-0.2 ± 1.1	0	48.3 ± 1.1	83.7 ± 0.9
desFBaf	100 ± 1.1	63.4 ± 3.6	30.2 ± 2.2	0	2.8 ± 0.6	6.7 ± 1.8	0	33.7 ± 3.9	63.1 ± 3.2

(n = 3, mean ± SE)

さらに Baf 誘導体の膜環境下における挙動をより詳細に解析するために、Baf の膜挿入・透過過程を速度論的観点からも解析した。具体的にはリガンド分子が実験系中において一次の速度定数 k_{in}, k_{out} でそれぞれ水中(ドナーまたはアクセプター)から脂質膜中、および脂質膜中から水中に移動すると仮定し(スキーム 2-1)、このモデルに基づいて各コンパートメント中のリガンドのモル分率を経時的に解析すること

で、k_{in}, k_{out} および平衡定数 K (=k_{in}/k_{out})を推定した(表 2-4)。

$$[donor] \underset{k_{out}}{\overset{k_{in}}{\rightleftarrows}} [membrane] \underset{k_{in}}{\overset{k_{out}}{\rightleftarrows}} [acceptor] \qquad \text{(スキーム 2-1)}$$

得られた平衡定数 K を比較すると、デスメチル体(1.43×10^2)の方が Baf(11.7×10^2)よりおよそ一桁小さく、log $P_{O/W}$ からも推定されたように天然の Baf に比べてデスメチル体は脂質膜親和性が低いことが本解析より裏付けられた。また k_{in}, k_{out} の比較より desFBaf は Baf に比べて膜に挿入されづらく、膜外に出やすいことが読み取れた。

表 2-4: PAMPA より算出された Baf 誘導体の速度論的パラメータ(n = 3, mean ± SE)

化合物	k_{in} [10^{-5} s^{-1}]	k_{out} [10^{-7} s^{-1}]	$K\times10^2$ [= k_{in}/k_{out}]
Baf	20.7 ± 3.00	3.25 ± 1.54	11.7 ± 3.86
FBaf	9.55 ± 0.26	2.47 ± 0.19	3.93 ± 0.29
desFBaf	7.08 ± 1.29	5.91 ± 1.71	1.43 ± 0.28

2-3　固体 NMR による膜環境下での運動性解析

前節までの実験で膜親和性の違いを観測することに成功したが、より詳細に考察するためには、膜中での挙動の違いを直接的に観測する必要がある。そこで、本化合物がフッ素を有していることに着目し、膜中での構造解析に有用な固体 NMR を適用することを考えた。固体 ^{19}F NMR 測定で得られるスペクトルには CF_3 基の官能基内双極子相互作用に起因する分裂が観測される[12]。この分裂幅は CF_3 基の揺らぎを反映しており、その大きさはオーダーパラメータ S_{CF3} として表される(式 2-1)。このオーダーパラメータから Baf 分子の局所的な運動性を評価することができる。

$$D_{obs} = S_{CF3} \times D_0 = S_{CF3} \times \left(\frac{1}{2} \times \frac{\mu_0 \hbar \gamma^2}{4\pi r^3}\right) \qquad (2\text{-}1)$$

ここで D_{obs} は観測される双極子分裂の大きさ、S_{CF3} は CF_3 基のオーダーパラメータ、D_0 は揺らぎが存在しない場合での双極子分裂の大きさ、γ はフッ素原子の磁気回転比、r はフッ素原子間の平均距離をそれぞれ表している。図 2-8 に示すように、一般に分子の運動性が小さいほど分裂幅は広く、オーダーパラメータは 1 に近づき、分子の運動性が高いほど分裂幅は狭く、オーダーパラメータは 0 に近づく。

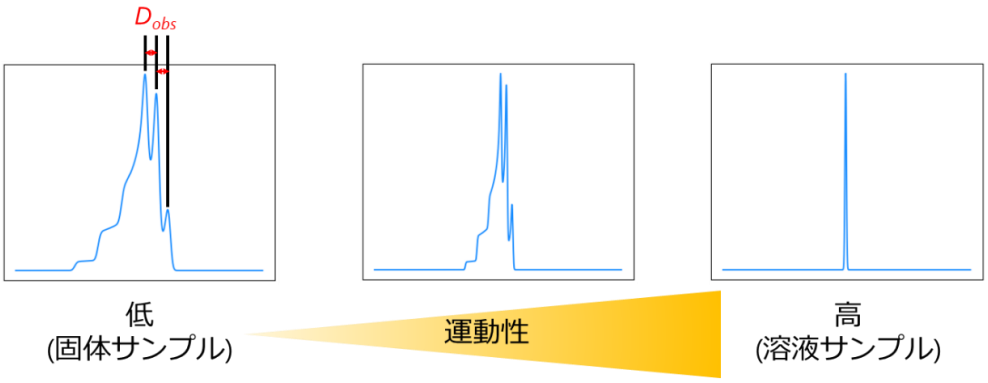


図 2-8：スペクトルの分裂幅と分子の運動性の相関

実際の測定結果を図 2-9 に示す。なお測定の際にはモデル脂質膜として調製した 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC)のリポソームに FBaf または desFBaf を添加した試料を使用した。さらに得られたスペクトルの分裂幅からオーダーパラメータを算出したところ、FBaf では S_{CF3} = 0.37, desFBaf では S_{CF3} = 0.30 となっており、desFBaf の方が有意に小さな値を示していた。これは、FBaf に比べて desFBaf の方が、C-CF_3 結合ひいては THP 環の揺らぎが大きいことを示唆している。

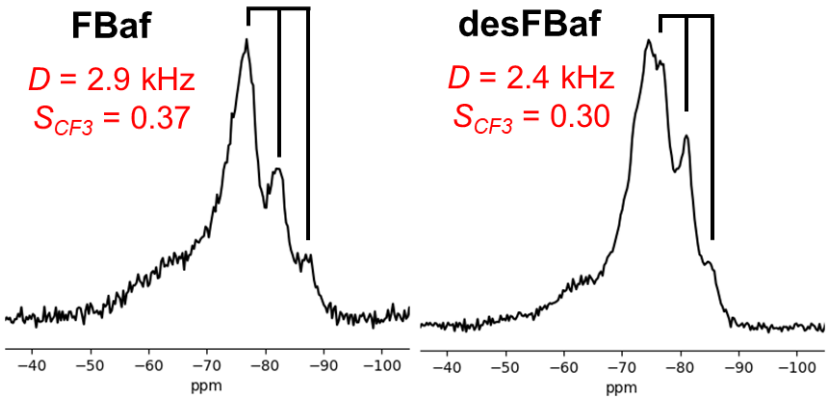


図 2-9：FBaf(左)・desFBaf(右)の POPC リポソーム中における固体 ^{19}F NMR スペクトル

2-4　デスメチル化が及ぼす影響の評価

前節の固体 NMR の結果は、フッ素原子が結合する THP 環周辺の運動性が顕著に異なることを意味しており、この違いが分子の反対側に存在する二つのメチル基によって引き起こされたことを明確に示している。すなわち、これは二つのメチル基を取り除いたことによって生じたマクロラクトン環の配座あるいは剛直性の変化が、

THP 環側の局所的な運動性に影響していることを示唆している。そこで二つのメチル基が失われたことによる配座の剛直性について評価するべく、Macromodel[5]による MD 計算を実施した。具体的には水溶媒条件下、Baf および desFBaf を 30 ns の間運動させた際のマクロラクトン環内の二面角の分布を比較することで両者のマクロラクトン環の剛直性を評価した(図 2-10、図 2-11)。その結果、C4-C7 位などマクロラクトン環上部においてデスメチル化による二面角の分布拡大が見られた。一方、C10-C13 位などマクロラクトン環下部では上部ほど顕著な差が見られなかった。またデスメチル化により共役カルボニル平面の二面角の平均角度が 180 度から離れており、平面がよりひずみやすくなっていることが明らかになった。

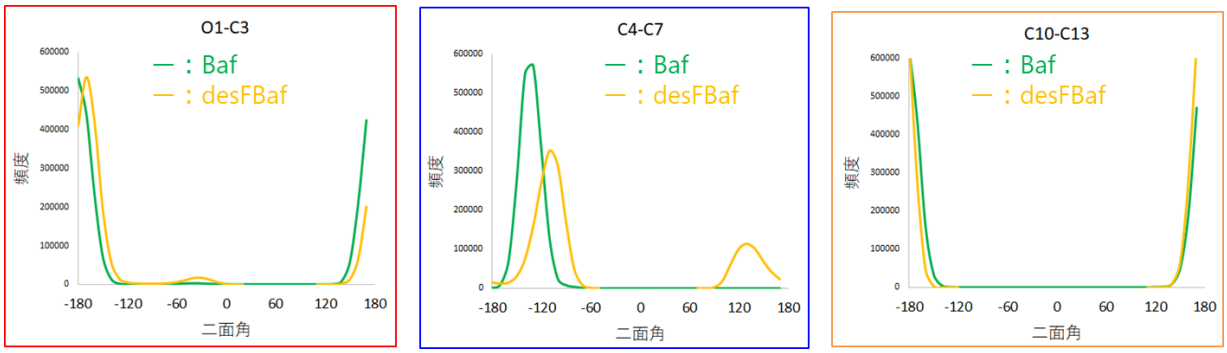


図 2-10：水中におけるマクロラクトン環内の二面角分布

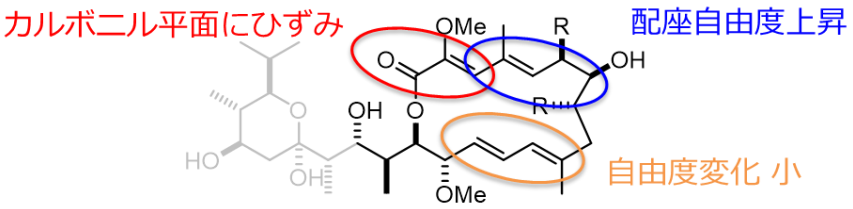


図 2-11：計算で観測されたデスメチル化による配座自由度の変化

以上の結果より、マクロラクトン環のデスメチル化はカルボニルを含む共役平面の柔軟性を向上させていることが明らかとなった。そこで次にマクロラクトン環と THP 環をつないでいる Baf の分子内水素結合に着目した。Baf の分子内水素結合は Baf 分子全体の配座を固定し[13,14]、なおかつ Baf を含む plecomacrolide 群の活性発現への関与が示唆されている重要な構造的特徴である[15]。また一般に水素結合に関与できる官能基は極性溶媒への分配に多大な寄与をもつことが知られているため、本水素結合の違いは膜親和性の違いにも寄与する可能性があることから[16,17]、デ

スメチル化が分子内水素結合に及ぼす影響に興味がもたれる。

Baf およびその誘導体の分子内水素結合強度は溶液 ^{1}H NMR により評価することにした。第一章でも述べたように Baf は 1 位カルボニル基と 17 位ヒドロキシ基、および 17 位と 19 位のヒドロキシ基の間に 2 つの分子内水素結合を形成していることが知られている。また、19 位ヒドロキシ基をメトキシ基などに変換しても Baf の活性に大きな変化は生じないことから、特に 1 位カルボニル基と 17 位ヒドロキシ基間の水素結合に着目した。Abraham らはヒドロキシ基の溶媒分子に対する水素結合供与能と DMSO-d_6 および $CDCl_3$ 中での化学シフト差 $\Delta\delta = \delta$(DMSO-d_6) - δ($CDCl_3$)の間に比例関係があることを見出している[18,19]。また分子内水素結合の形成は溶媒分子に対する水素結合供与能を低下させる方向に働くことで、$\Delta\delta$ の値を負の方向にシフトさせることが報告されている。そこで本性質を利用することで、Baf 誘導体の分子内水素結合強度を評価した(表 2-5)。その結果、全ての Baf 誘導体において 17 位ヒドロキシ基の化学シフトは DMSO-d_6 中に比べて $CDCl_3$ 中で低磁場シフトしていた。これは 17 位ヒドロキシ基が水素結合供与体となっていることを示している。また観測された化学シフト差 $\Delta\delta$ の値は、天然の Baf と FBaf では-0.16 ppm であったのに対して desFBaf の場合は-0.10 ppm であった。先程述べたように分子内水素結合の強度が強いほど $\Delta\delta$ の値は負に傾くため、今回の結果は desFBaf の水素結合強度が天然の Baf および FBaf に比べて弱いことを示している。

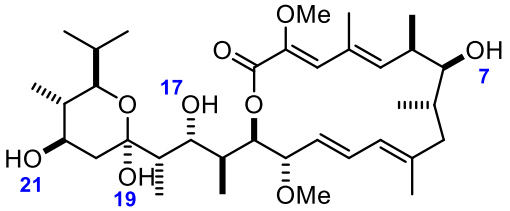
表 2-5：17 位ヒドロキシ基 ^{1}H 化学シフトの溶媒依存的変化

化合物	δ (DMSO-d_6) [ppm]	δ ($CDCl_3$) [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]
Baf	4.50	4.66	-0.16
FBaf	4.71	4.87	-0.16
desFBaf	4.73	4.83	-0.10

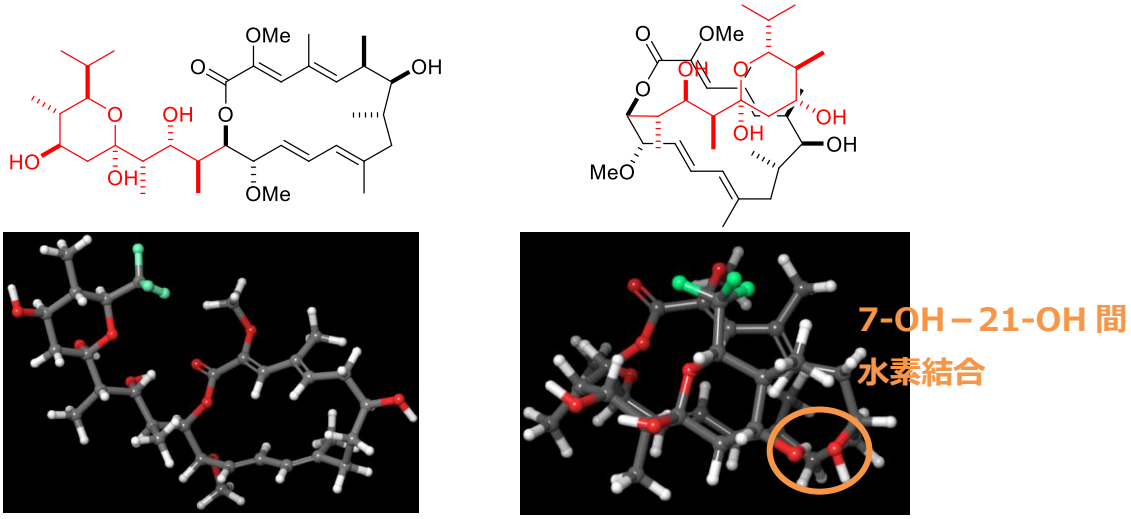
Baf 誘導体の構造に関してさらなる知見を得るために、Baf と desFBaf についてヒドロキシ基の化学シフトの温度依存性を比較した(表 2-6)。一般に溶媒分子と水素結合しているヒドロキシ基の化学シフトは分子内水素結合を形成している状態に比べて高い温度依存性を示すことが知られている[20]。表 2-6 より、分子内水素結合を形成している 17-OH および 19-OH について Baf の方が desFBaf より温度依存性が小さく、より強固に分子内水素結合を形成していることが示唆された。この結果は

表 2-5 と同様に desFBaf の分子内水素結合強度が天然の Baf に比べて弱いことを示している。それに対して desFBaf の 7-OH と 21-OH は Baf の同 OH より温度依存性が小さく、溶媒との分子間水素結合が弱いことが示唆された。この結果については以下のように考察した。すなわち配座がより柔軟な desFBaf は極性環境中においては疎水面を隠すために THP 環とマクロラクトン環が折りたたまれたような配座をとる割合が増加していると考えられる(図 2-12)。そのような配座をとっていた場合には 7-OH－21-OH 間で水素結合を形成することができるため、化学シフトの温度依存性は低下すると考えられる。ただし後者の仮説については決定的な実験的証拠は未だに得られておらず、さらなる検証が必要である。

表 2-6：DMSO-d_6 中におけるヒドロキシ基 ^{1}H 化学シフトの温度依存性



化合物	化学シフトの温度依存性 [ppb/K] (DMSO-d_6 中)			
	7-OH	17-OH	19-OH	21-OH
Baf	-5.02	-3.73	-3.14	-4.46
desFBaf	-4.04	-4.38	-3.21	-3.96



通常の配座　　折りたたみ配座

図 2-12：想定される Baf 誘導体の配座変化

2-5　膜挿入過程の推定モデル

以上の結果を踏まえると、メチル基の有無により性質に差が生じた要因は次のようなモデルで説明できる(図 2-13)。すなわち天然の Baf および FBaf は分子内水素結合により X 線回折、溶液 NMR などで見られるような平面性の高い立体配座に固定されていることから、脂質膜のアシル鎖のパッキングをあまり乱さずに膜中に入り込むことができ、膜中で安定に存在することができる。一方で desFBaf は、有機溶媒中と同様に脂質二重膜中でも分子内水素結合による配座の固定が Baf ほど強くないために前述のような配座をとれる割合が相対的に減っており、なおかつ水中で水分子と分子間水素結合を形成することでより安定に存在できることから Baf に比べて膜に挿入されにくく、膜に対する親和性が低下したものと考えられる。

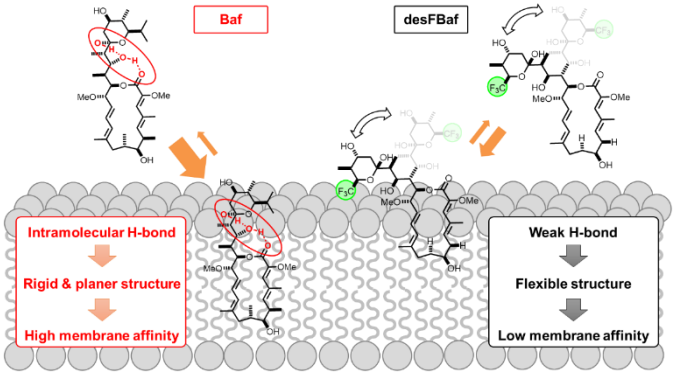


図 2-13：Baf および desFBaf の脂質二重膜への挿入過程(推定モデル)

2-6　リガンドの活性に対する脂質膜親和性の寄与

PAMPA を活用した脂質膜親和性評価により Baf と desFBaf の膜親和性の差がおよそ $\Delta\log K \sim 1$ であることが明らかとなった。また過去の研究結果より両者の液胞膜画分における阻害活性差がおよそ $\Delta pIC_{50} \sim 3.8$ であることが明らかとなっている[25]。これらの事実を考慮すると、desFBaf の活性低下のうちおよそ 4 分の 1 程度が膜親和性低下に起因する V-ATP アーゼ周辺の有効濃度の低下によるものであると推察される。これは Baf の特徴的な構造が V-ATP アーゼに対する結合親和性のみならず膜親和性に対しても寄与していることを示している。ただし PAMPA より導かれる膜親和性の値には深度情報は含まれていないため、リガンド分子の結合部位の深度によっては PAMPA より見積もられる膜親和性と実際の標的タンパク質周辺における有効濃度に差が生じる可能性もあるため注意が必要である。

2-7　他の脂溶性リガンドとの比較

次に Baf の脂質膜環境下における挙動について他の有機小分子との比較を実施した。まずは Baf と有機分子について PAMPA より得られた速度論的パラメータを評価した(表 2-7、図 2-14)。なお比較する有機分子としては比較的高い膜透過性を示すことが知られており PAMPA のポジティブコントロールとしてしばしば使用される verapamil、ならびに脂溶性の異なるリガンド分子として chlorpromazine、indomethacin、および terfenadine を選択した。PAMPA より得られた速度定数を比較すると、膜への挿入過程は Baf が最も速く、膜親和性についても膜透過が観測されなかった terfenadine を除く全ての分子より高いことが明らかとなった。この結果は Baf が他の脂溶性リガンドと比較して、膜中で高い安定性を獲得できることを示唆している。また今回の実験結果より、脂質膜への親和性と分子の脂溶性が必ずしも対応しないことが示された。よって脂溶性リガンドの動態を正確に理解するためには、脂溶性評価などの物理的な指標のみならず、本実験で実施しているような化学構造を含めた観点からの詳細な解析も必要であると言える。

表 2-7：Baf と他の有機分子との物性および速度論的パラメータ比較

化合物	分子量	log $P_{O/W}$	k_{in} [10^{-5} s^{-1}]	k_{out} [10^{-7} s^{-1}]	K [= k_{in}/k_{out}]
Baf	622.84	4.74	20.7 ± 3.00	3.25 ± 1.54	(11.7 ± 3.86) × 10^2
Verapamil	454.61	3.45[21]	3.53 ± 0.08	14.5 ± 0.09	(0.24 ± 0.01) × 10^2
Chlorpromazine	318.86	5.35[22]	7.31 ± 1.18	2.20 ± 0.51	(3.66 ± 0.52) × 10^2
Indomethacin	357.79	4.27[23]	0.38 ± 0.04	15.0 ± 2.11	2.64 ± 0.41
Terfenadine	471.68	5.69[24]	6.82 ± 0.64	< 1 × 10^{-5}	> 6.81 × 10^5

(n = 3, mean ± SE)

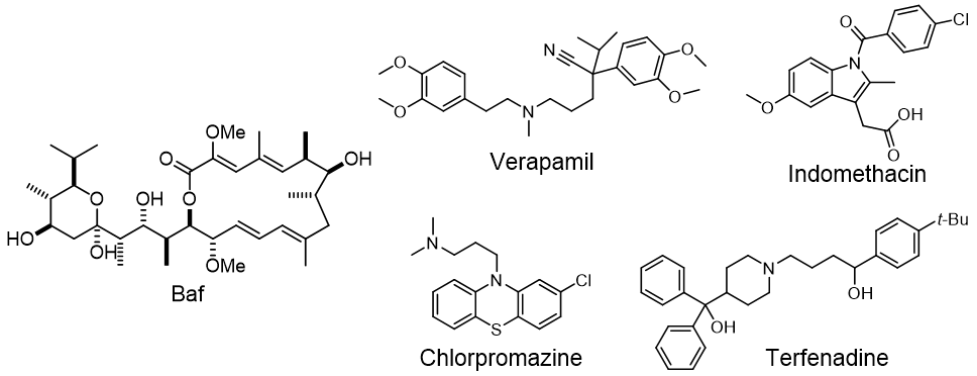


図 2-14：比較に使用した有機分子の構造

さらにリガンド分子の膜中挙動についてさらなる知見を得ることを目指し、PAMPA を用いた熱力学的解析を試みた。反応速度定数および平衡定数の温度変化は、その反応に伴うエンタルピーやエントロピー、ギブズ自由エネルギーの変化の大きさに依存することが知られており、式 2-2~2-4 として表される。

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \qquad (2\text{-}2)$$

$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^{\ddagger}}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} \qquad (2\text{-}3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (2\text{-}4)$$

ここで K は平衡定数、k は反応速度定数、ΔH はエンタルピー変化、ΔS はエントロピー変化、ΔG はギブズ自由エネルギー変化、T は温度、R は気体定数、k_b はボルツマン定数、h はプランク定数をそれぞれ表している。また上付きの ‡ は遷移状態に移る際の物理量変化を表している。

本研究では異なる温度における k_{in}、k_{out}、および K を PAMPA により推定し、得られた値と式 2-2~2-4 を用いることでリガンド分子の膜への挿入/離脱過程における熱力学パラメータの算出を試みた。まずこのような解析が PAMPA によって可能かを確かめるために、リガンド分子として Baf および verapamil を用い、20 °C、30 °C および 40 °C における k_{in}、k_{out}、および K を PAMPA により算出し、そこから膜挿入/離脱過程における熱力学パラメータを推定した(図 2-15)。まず両分子のギブズエネルギー変化を比較したところ、水中から膜中に入ることで生じるエネルギーゲインの大きさは Baf の方が大きく、verapamil に比べて Baf は膜中でより安定に存在できることが示唆された。また図中赤丸で示したように Baf は膜挿入がエンタルピー駆動によるものであることから、脂質分子と相互作用することで安定化されていると考えられる。一方で verapamil の膜挿入はエントロピー駆動であることが示唆された。よって verapamil は Baf とは異なり脂質分子との分子間相互作用による安定化はあまり受けておらず、水中に存在すると周囲の水分子を構造化させて系を不安定化させてしまうため、膜中に分配されているものと予想される。

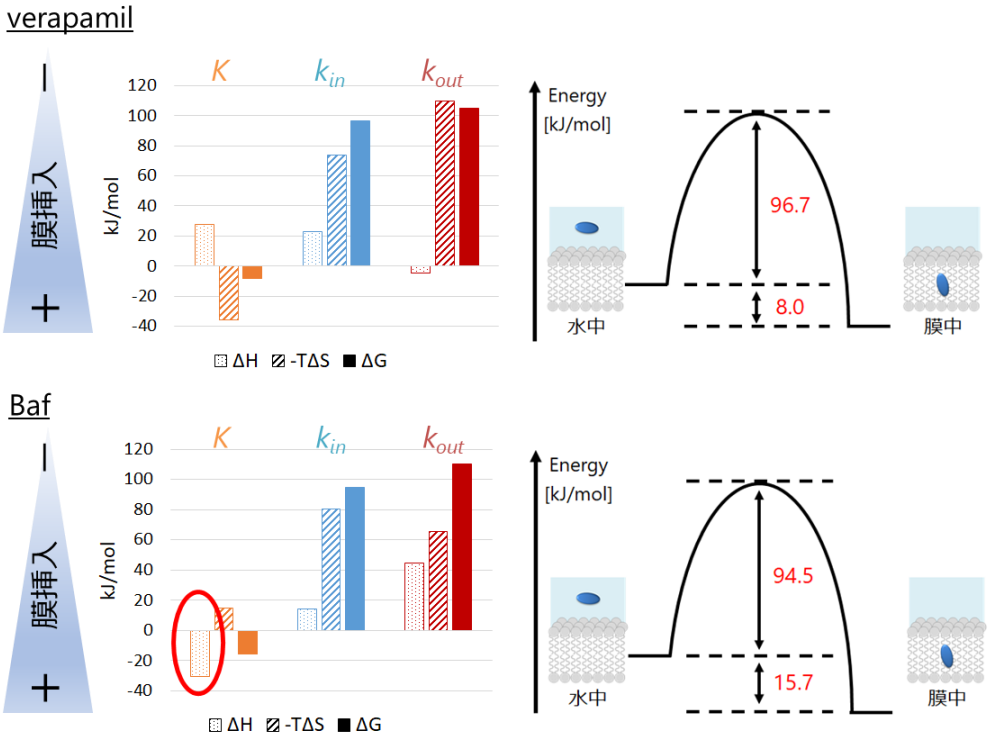


図 2-15：PAMPA による熱力学パラメータの推定(上：verapamil、下：Baf)

今回PAMPA より熱力学パラメータを得る際に行った式2-2~2-4 へのフィッティングは、パラメータによっては精度が十分ではなかった(図 2-16)。しかし今回得られた結果からも、直線の傾き・切片の正負からエンタルピーおよびエントロピーのどちらが膜挿入に対して有利に働いているのかということは評価できていると考えられる。よってリガンド分子の膜中挙動を正確に理解する上で必要不可欠な興味深い知見を本実験より得ることができたと言える。

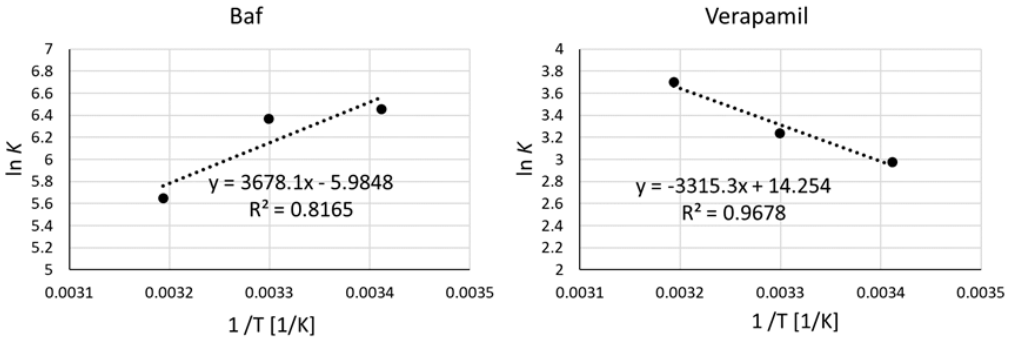


図 2-16：PAMPA より得られた結果に基づいて作成した van't Hoff プロット
(左：Baf、右：verapamil)

2-8　小括

Baf および生物活性の異なる誘導体の脂質膜環境下における挙動を化学的に解析した結果、デスメチル化した誘導体 desFBaf について他の分子では見られないような顕著な挙動変化を観測することに成功した。この結果より天然物のような高度な立体構造を有する分子の膜中挙動が配座変化によって著しく変化しうること、およびそのような変化を捉えるには本研究で実施したような詳細な解析が必要であることを示すことができた。また分子内水素結合によって形作られている Baf の特徴的な構造が V-ATP アーゼへの結合親和性のみならず、高い膜親和性の発現にも貢献していることが示唆された。このような知見は、膜中に結合部位を持つ脂溶性リガンドの作用機構の理解やそれら分子をリード化合物とした機能性分子創成において必要不可欠なものであり、本研究のような膜挙動解析の必要性を示すものであると考えられる。今後の展望として、本研究で得られた知見をさらに深めより明確に分子挙動を理解するためには脂質膜中での深度情報や配座決定などさらなる解析が必要と考えられる

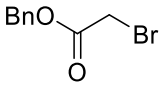
実験項

1．マテリアル

Bafilomycin A_1 はフナコシより購入した。desFBaf は過去の報告に従い合成した[25]。1,2-dioleoyl-glycero-3-phosphocholine (DOPC)は東京化成工業、POPC は日油株式会社または Avanti からそれぞれ購入した。その他の試薬はナカライテスクを通して購入し、精製することなく使用した。

2．FBaf の合成

FBaf は[26]を参考に合成した。以下にその合成法の詳細と未知化合物のスペクトルを示す。

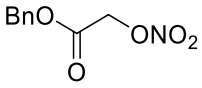


11

ベンジルエステル 11: 撹拌したブロモ酢酸 **10** (1 g, 7.20 mmol)のトルエン溶液(14 ml)にベンジルアルコール(1.49 ml, 14.4 mmol)およびパラトルエンスルホン酸一水和物(13.7mg, 72.0 μmol)を添加した。得られた反応混合物を 120 ºC まで昇温し 24 時間撹拌した。室温まで冷却後、減圧条件下で溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 100/0 to 97/3)により精製することで目的のベンジルエステル **11** (1.64 g, 7.16 mmol, 99%)を得た。

ベンジルエステル 11: colorless oil; R_f = 0.57 (silica gel, hexane/ethyl acetate = 4/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41-7.33 (5H, m), 5.21 (2H, s), 3.88 (2H, s).

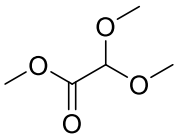
得られた ^{1}H NMR スペクトルは既報のものと一致した[27]。



12

硝酸エステル 12: 撹拌したベンジルエステル **11** (1.64 g, 7.15 mmol)のアセトニトリル溶液(7.2 ml)に硝酸銀(2.43 g, 14.3 mmol)を添加した。遮光条件下で 42 時間撹拌後、桐山ロートで反応混合物をろ過した。得られたろ液を減圧条件下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 100/0 to 91/9)により精製することで硝酸エステル **12** (1.44 g, 6.82 mmol, 95%)を得た。

硝酸エステル **12**: colorless oil; R_f = 0.31 (silica gel, hexane/ ethyl acetate = 3/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.42-7.34 (5H, m), 5.25 (2H, s), 4.93 (2H, s); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 165.71, 134.49, 128.81, 128.73, 128.49, 67.75, 67.07; IR (neat) 2925, 1755, 1643, 1410, 1390, 1361, 1289, 1199, 1056, 996, 841, 735, 696, 660, 615, 595, 571, 497, 478, 445, 436 cm^{-1}; HRMS (ESI-TOF) *m*/*z* calcd for $C_9H_9NO_5Na$ [M+Na$^+$] 234.0378, found: 234.0375.



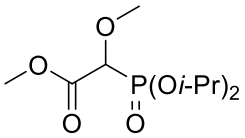
6

アセタール **6**: 撹拌した硝酸エステル **12** (444.8mg, 2.11 mmol)の DMSO 溶液(4.2 ml)に酢酸ナトリウム(172.8 mg, 2.11 mmol)を添加した。室温で 1 時間撹拌後、反応混合物を氷冷した飽和食塩水に加えることで反応を停止した。水層をジエチルエーテルにより抽出し、得られた有機層を飽和重曹水溶液により洗浄した。硫酸ナトリウムにより乾燥後、ろ過、溶媒の減圧留去により粗精製のグリオキシル酸メチル **13** を得た。

撹拌したグリオキシル酸メチル **13** のメタノール溶液(0.5 ml)にオルトギ酸トリメチル(0.48 ml, 4.42 mmol)とパラトルエンスルホン酸一水和物(20.0 mg, 0.105 mmol)を添加した。室温で 5 日間撹拌後、反応混合物に飽和重曹水を添加することで反応を停止させた。水層をジクロロメタンにより抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥、ろ過、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 100/0 to 80/20)により精製することでアセタール **6** (42.5 mg, 0.317 mmol, 30% over 2 steps)を得た。

アセタール **6**: yellow oil; R_f = 0.30 (silica gel, hexane/ethyl acetate = 3/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.83 (1H, s), 3.81 (3H, s), 3.43 (3H, s).

得られたスペクトルは既報のものと一致した[28]。

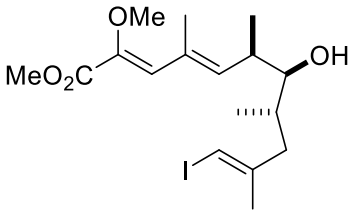


5

ホスホン酸エステル 5: 五塩化リン(147.5 mg, 0.708 mmol)にアセタール **6** (85.5 µl, 0.701 mmol)を添加後、110 ºC で 2.5 時間撹拌した。室温に冷却し、粗精製の 2-クロロ-2-メトキシ酢酸メチル **14** を得た。これに対して亜リン酸イソプロピル(1.24 ml, 5.44 mmol)を添加し、120 ºC で 12 時間撹拌した。反応混合物を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 1/1)により精製することでホスホン酸エステル **5** (72.1 mg, 0.269 mmol, 38% over 2 steps)を得た。

ホスホン酸エステル 5: colorless oil; R_f = 0.13 (silica gel, hexane/ethyl acetate = 1/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.86-4.73 (2H, m), 4.17 (1H, d, *J* = 18.8 Hz), 3.82 (3H, s), 3.51 (3H, s), 1.36-1.34 (12H, m).

得られた ^{1}H NMR スペクトルは既報のものと一致した[29]。



C1-11セグメント(**1**)

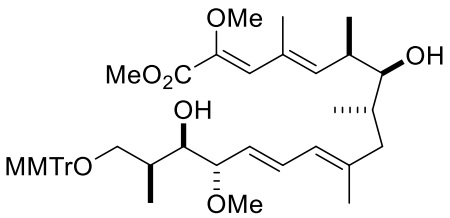
C1-11 セグメント(1): ホスホン酸エステル **5** (32.0 mg, 0.119 mmol)と 18-クラウン-6 (37.8 mg, 0.143 mmol)を混合物しトルエン共沸により水分を除いた。その後、これに THF (0.6 ml)を加え、0 ºC に冷却した。KHMDS の 0.5 M トルエン溶液(0.24 ml, 0.119 mmol)を添加し、室温で 30 分撹拌後、再び 0 ºC に冷却した。アルデヒド **4** (53.7 mg, 0.119mmol)の THF 溶液(0.2 ml)を添加し、室温で 11 時間撹拌した。リン酸緩衝液(pH 7.0)を添加することで反応を停止させ、水層をジエチルエーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 100/0 to 90/10)により精製することでエステル **15** とアルデヒド **4** (35%)を分離不能の混合物として得た。

撹拌した上述の混合物の THF 溶液(84 µl)に TBAF の 1M THF 溶液(0.336 ml, 0.336 mmol)を 0 ºC で添加した。室温で 19.5 時間撹拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液を添加することで反応を停止させた。水層をジエチルエーテルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 100/0 to 87/13)により精製することで C1-11 セグメント(**1**) (11.6 mg, 27.5 µmol, 23% over 2 steps)

を得た。

C1-11 セグメント(1): yellow oil; R*f* = 0.23 (hexane/ethyl acetate = 3/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.62 (1H, s), 5.89 (1H, s), 5.78 (1H, d, J = 10.0 Hz), 3.79 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.27-3.24 (1H, m), 2.79-2.67 (1H, m), 2.52 (1H, d, *J* = 13.6 Hz), 2.08-2.00 (1H, m), 2.00 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.82-1.74 (1H, m), 1.02 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.82 (3H, d, *J* = 6.8 Hz).

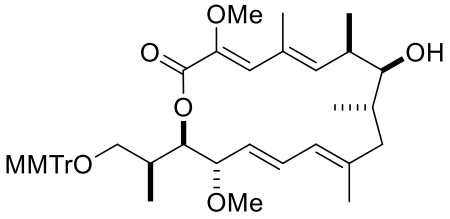
得られた ^{1}H NMR スペクトルは既報のものと一致した[30]。



16

メチルエステル 16: 撹拌した C1-11 セグメント **1** (564 mg, 1.34 mmol)および C12-17 セグメント **3**[31] (967 mg, 1.34 mmol)の混合溶液(溶媒: NMP 17 ml)に塩化リチウム(227 mg, 5.35 mmol)、トリフェニルヒ素(1.23 g, 4.01 mmol)およびトリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0)クロロホルム錯体(341 mg, 0.33 mmol)の混合溶液(溶媒: NMP 29 ml)を添加した。室温で 13 時間撹拌後、反応混合物に水を添加することで反応を停止させた。水層をジエチルエーテルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥させた。ろ過後、ろ液を濃縮し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 5/1 to 1/2)により精製することでメチルエステル **16** (831 mg, 1.14 mmol, 85% estimated from ^{1}H NMR)を分離不能の不純物との混合物として得た。

メチルエステル 16: red amorphous material; R*f* = 0.26 (hexane/ethyl acetate = 2/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.46-7.40 (4H, m), 7.34-7.25 (6H, m), 7.23-7.18 (2H, m), 6.85-6.80 (2H, m), 6.63 (1H, s), 6.25 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.5 Hz), 5.87 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.81 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.44 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz), 3.82-3.75 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.66 (3H, s), 3.41-3.35 (1H, m), 3.28-3.20 (1H, m), 3.20 (3H, s), 3.07-3.01 (1H, m), 2.80-2.69 (1H, m), 2.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 2.42-2.35 (1H, m), 2.00 (3H, s), 1.90-1.65 (2H, m), 1.72 (3H, s), 1.15 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.02 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.80 (3H, d, *J* = 6.5 Hz).

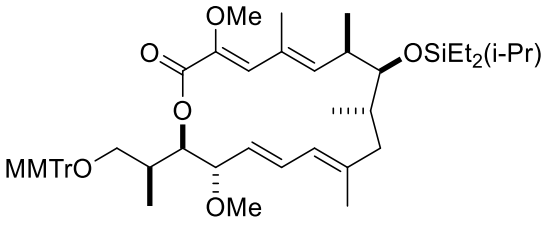


18

ラクトン **18**:撹拌したメチルエステル **16** (831 mg, 1.14 mmol)のジオキサン溶液(38 ml)に 1 M 水酸化ナトリウム溶液(17 mL, 17 mmol)を添加した。80 ºC で 2 時間撹拌した後、反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えることで反応を停止させた。水層をジクロロメタンで抽出後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、濃縮した。得られたセコ酸は精製することなく次の反応に使用した。

セコ酸のトルエン溶液(73 ml)にジイソプロピルエチルアミン(4.33 mL, 25.1 mmol)と 2,4,6-塩化トリクロロベンゾイル(1.95 mL, 12.5 mmol)を 0 °C で添加した。室温で 3 時間撹拌後、反応混合物をトルエン 733 ml で希釈し、そこに DMAP (1.98 g, 16.2 mmol)のトルエン溶液(73 mL)を添加した。室温で 18 時間撹拌後、飽和重曹水を添加することで反応を停止させた。水層をジエチルエーテルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 10/1 to 1/1)により精製することでラクトン **18** (396 mg, 0.570 mmol, 50% in 2 steps)を得た。

ラクトン **18**: colorless amorphous material; R*f* = 0.60 (hexane/ethyl acetate = 2/1); IR (film) 3522, 2958, 1711, 1510, 1447, 1357, 1248, 1095, 1034, 756, 709 cm^{-1}; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48-7.44 (4H, m), 7.35-7.32 (2H, m), 7.31-7.15 (6H, m), 6.84-6.81 (2H, m), 6.60 (1H, s), 6.39 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz), 5.84 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.76 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 5.24 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz), 5.00 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.82-3.78 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.40-3.37 (1H, m), 3.18 (1H, dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz), 3.15 (3H, s), 3.10 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz), 2.53-2.45 (1H, m), 2.36 (1H, br), 2.21-2.13 (2H, m), 2.03-1.98 (1H, m), 1.95 (3H, d, *J* = 1.0 Hz), 1.92-1.83 (1H, m), 1.74 (3H, s), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.05 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 164.3, 158.5, 144.8, 144.7, 141.9, 141.4, 140.8, 136.0, 132.3, 131.9, 131.2, 130.5, 128.7, 127.9, 126.9, 126.2, 125.4, 113.1, 86.4, 83.0, 81.5, 65.7, 60.0, 56.0, 55.3, 41.6, 38.4, 37.8, 36.7, 23.3, 18.6, 18.4, 14.0, 13.7; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{44}H_{54}O_7Na$ [M+Na+] 717.3767, found: 717.3768.

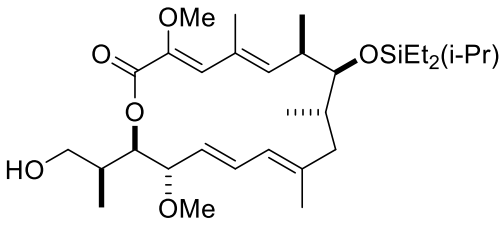


S1

シリルエーテル**S1**: 撹拌したラクトン**18** (60.1 mg, 86.5 μmol)のジクロロメタン溶液(0.9 mL)に2,6-ルチジン(113 μL, 973 μmol)とDEIPSOTf (94 μL, 389 μmol)を0 °Cで添加した。室温で一時間撹拌後、反応を飽和重曹水で停止させた。水層をジクロロメタンで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 20/1 to 3/1)により精製することでシリルエーテル**S1** (60.5 mg, 73.5 μmol, 85%)を得た。

シリルエーテル**S1**: colorless amorphous material; R*f* = 0.69 (hexane/ethyl acetate = 2/1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.49-7.44 (4H, m), 7.36-7.19 (8H, m), 6.86-6.81 (2H, m), 6.70 (1H, s), 6.44 (1H, ddd, *J* = 15.5, 11.0, 1.0 Hz), 5.95 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.90 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 5.40 (1H, dd, *J* = 15.5, 4.0 Hz), 5.16 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz), 3.88-3.84 (1H, m), 3.79 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.63 (1H, br s), 3.22 (3H s), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz), 3.07 (1H, dd, *J* = 9.5, 5.0 Hz), 2.61 (1H, dd, *J* = 14.5, 9.5 Hz), 2.45-2.36 (1H, m), 2.06-1.98 (1H, m), 1.93 (3H, s), 1.76-1.60 (2H, m), 1.54 (3H, s), 1.13-1.08 (22H, m), 0.77-0.65 (4H, m).

得られた^{1}H NMRスペクトルは既報のものと一致した[32]。



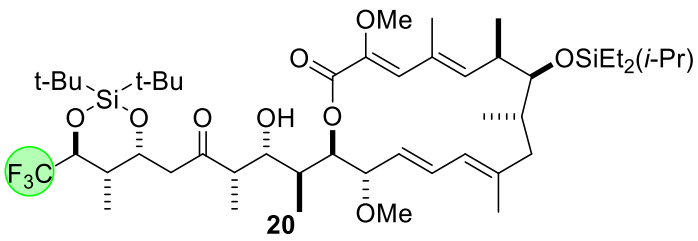
S2

アルコール**S2**: 撹拌したシリルエーテル**S1** (41.2 mg, 50.0 μmol)のTHF・メタノール混合溶液(各0.83 ml)にPPTS (18.8 mg, 75.0 μmol)を0 °Cで添加した。室温で11時間撹拌後、反応を飽和重曹水で停止させた。水層をジエチルエーテルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 95/5 to 70/30)により精製するこ

とでアルコール**S2** (22.6 mg, 41.0 μmol, 82%)を得た。

17-alcohol S2: colorless amorphous material; R*f* = 0.33 (hexane/ethyl acetate = 2/1); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.67 (1H, d, *J* = 0.5 Hz), 6.47 (1H, dd, *J* = 15.5, 11.0 Hz), 5.92 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.88 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 1H, 5.39 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.5 Hz), 5.10 (1H, dd, *J* = 4.5, 4.0 Hz), 3.95 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.67 (3H, s), 3.61 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 3.57-3.50 (1H, m), 3.40-3.33 (1H, m), 3.29 (3H, s), 3.04 (1H, br), 2.52-2.43 (2H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 1.94 (3H, s), 1.79-1.72 (2H, m), 1.68 (3H, s), 1.10-0.99 (19H, m), 0.90 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.76-0.65 (4H, m).

得られた^{1}H NMRスペクトルは既報のものと一致した[32]。



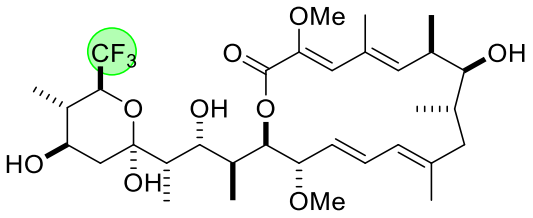
ヒドロキシケトン20: 撹拌した塩化オキサリル(29 μL, 328 μmol)のジクロロメタン溶液(0.65 mL)にDMSO (35 μL, 493 μmol)を-78 °Cで添加した。-78 °Cで30分撹拌後、アルコール**S2** (18.1 mg, 32.8 μmol)のジクロロメタン溶液(0.25 mL)を添加した。-78 °Cで1時間撹拌後、トリエチルアミン(137 μL, 987 μmol)を添加し、-78 °Cで15分、0 °Cで30分撹拌した。反応を飽和塩化アンモニウム水溶液により停止させ、水層をジエチルエーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、および濃縮することでアルデヒド**19**を得た。

撹拌したC18-C24セグメント**2**[26] (36.3 mg, 98.6 μmol)のジクロロメタン溶液(0.95 mL)にジクロロフェニルボラン(51 μL, 394 μmol)とジイソプロピルエチルアミン(85 μL, 493 μmol)を-78 °Cで添加した。-78 °Cで30分、0 °Cで30分撹拌後、反応混合物を-78 °Cに冷却した。ここにアルデヒド**19**のジクロロメタン溶液(0.30 mL)を-78 °Cで添加した。-78 °Cで3時間撹拌後、リン酸緩衝液(pH 7.0)を添加することで反応を停止させた。水層をジエチルエーテルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 50/1 to 3/1)により精製することでヒドロキシケトン**20** (9.5 mg, 10.4 μmol, 32% over 2 steps)を得た。

ヒドロキシケトン20: colorless amorphous material; R*f* = 0.33 (hexane/ethyl acetate = 3/1);

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.68 (1H, s), 6.46 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.5 Hz), 5.91 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 5.89 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 5.39 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.5 Hz), 5.23 (1H, dd, *J* = 4.5, 2.5 Hz), 4.79 (1H, dt, *J* = 9.5, 3.5 Hz), 4.08 (1H, quin, *J* = 6.5 Hz), 3.92 (1H, dd, *J* =5.5, 5.5 Hz), 3.78 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz), 3.66 (3H, s), 3.61 (1H, t, *J* = 2.5 Hz), 3.27 (3H, s), 2.87 (1H, dd, *J* = 15.5, 9.5, Hz), 2.74 (1H, qd, *J* = 7.0, 2.5 Hz), 2.53-2.43 (2H, m), 2.40 (1H, dd, *J* = 15.5, 3.0 Hz), 2.33-2.25 (1H, m), 2.00 (1H, ddq, *J* = 9.0, 7.0, 2.0 Hz), 1.94 (3H, s), 1.80-1.73 (2H, m), 1.68 (3H, s), 1.17 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.11-0.98 (40H, m), 0.92 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.78-0.65 (4H, m).

得られた^{1}H NMRスペクトルは既報のものと一致した[26]。



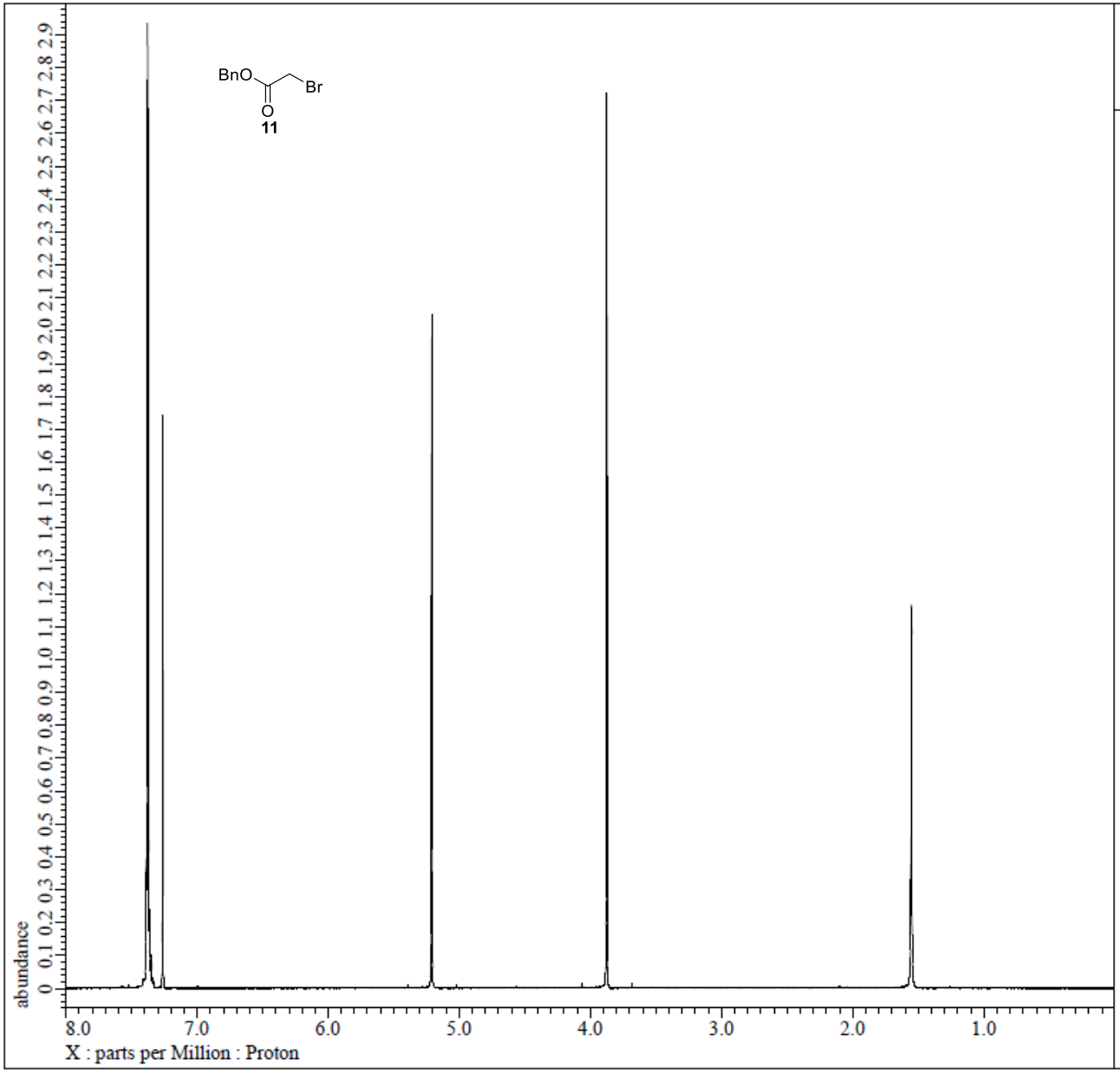
FBaf

FBaf: 撹拌したヒドロキシケトン**20** (5.9 mg, 6.43 μmol)のTHF溶液(0.6 mL)に18% HF·Py (13 μL, 129 μmol)を0 °Cで添加した。室温で1時間撹拌後、反応混合物を飽和重曹水に加えることで反応を停止させた。水層をジエチルエーテルで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムで粗精製(hexane/ethyl acetate = 7/1 to 2/1)することで7位保護FBaf を得た。

撹拌した7位保護FBafのジクロロメタン(48 μL)・アセトニトリル(476 μL)・水(119 μL)混合溶液にパラトルエンスルホン酸一水和物(18.3 mg, 96.5 μmol)を0 °Cで添加した。室温で15時間撹拌後、飽和重曹水で反応を停止させた。水層をジクロロメタンで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過および濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate = 3/1 to 1/1)により精製しFBaf (2.9 mg, 4.47 μmol, 70% over 2 steps)を得た。

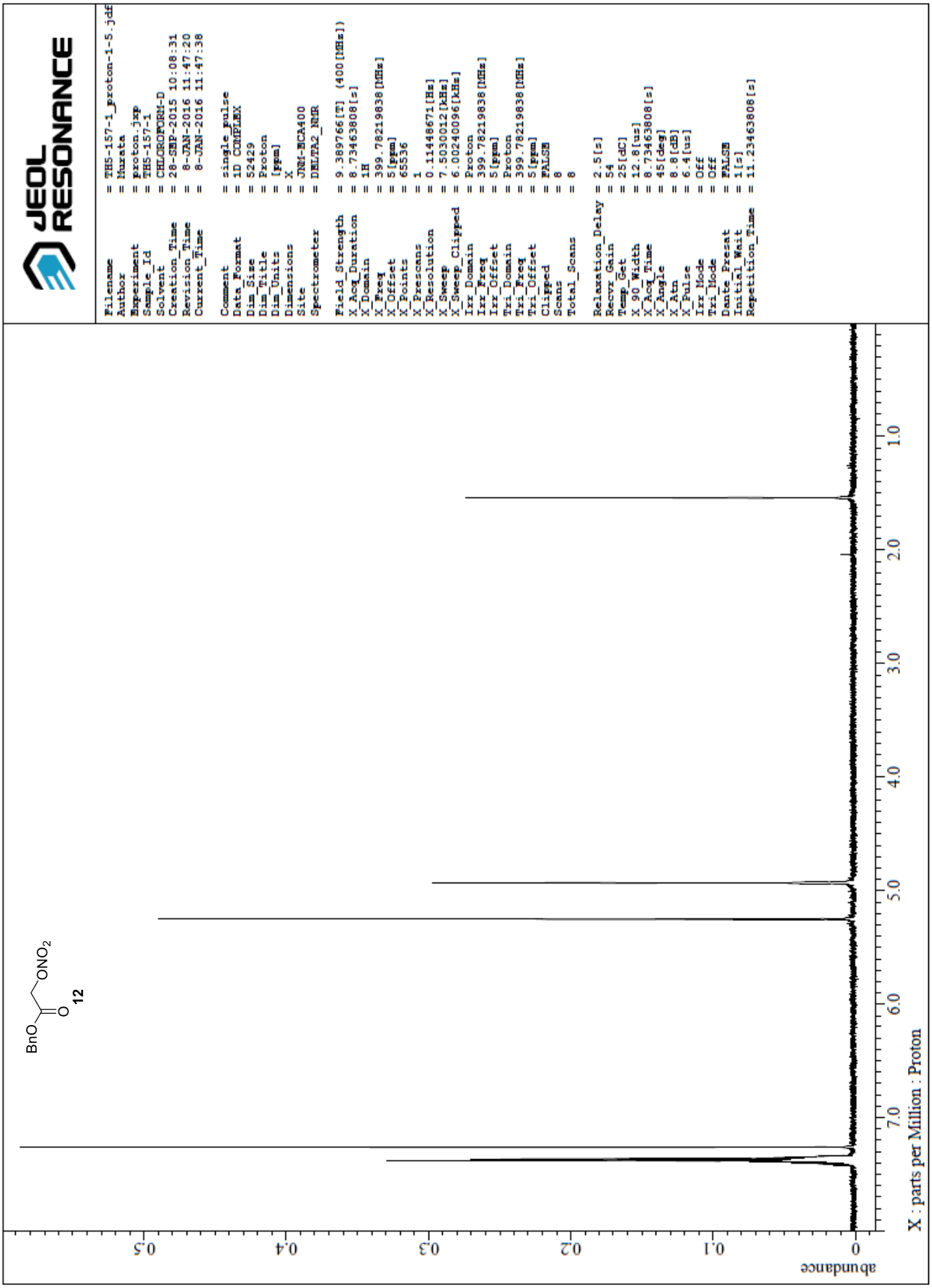
FBaf: white solid; R*f* = 0.38 (hexane/ethyl acetate = 1/1); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.63 (1H, s), 6.51 (1H, d, *J* = 15.0, 10.5 Hz), 6.17 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 5.81 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 5.75 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.15 (1H, dd, *J* = 15.5, 9.0 Hz), 4.94 (1H, dd, *J* = 9.0, 1.0 Hz), 4.87 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 4.09-4.02 (1H, m), 4.04 (1H, qd, *J* = 11.0, 6.5 Hz), 3.90 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 3.75 (1H, ddd, *J* = 11.0, 11.0, 5.0 Hz), 3.63 (3H, s), 3.33-3.26 (1H, m), 3.25 (3H, s),

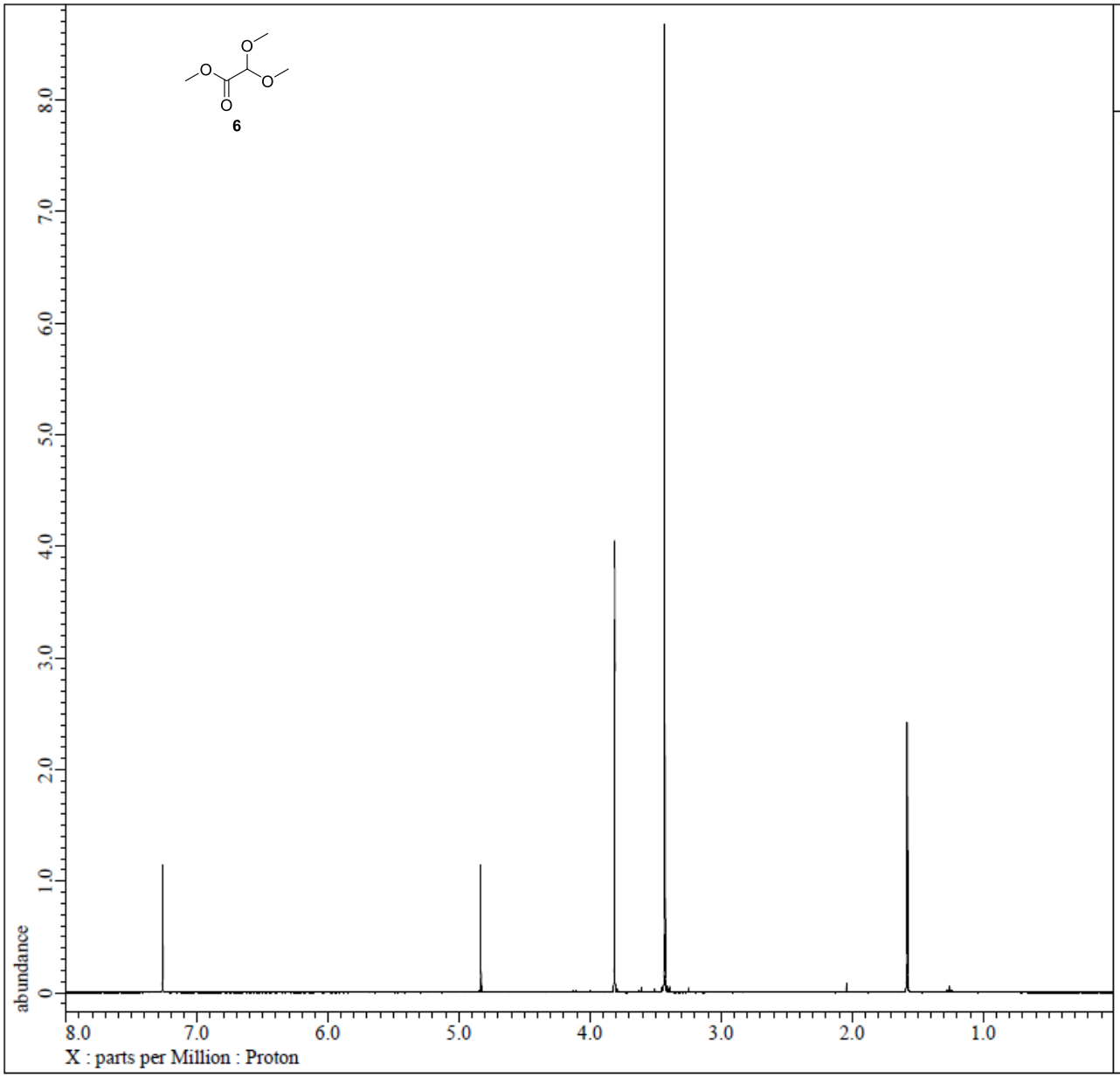
2.56-2.49 (1H, m), 2.34 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz), 2.18-2.10 (1H, m), 2.15 (1H, ddq, *J* = 10.5, 7.0, 1.0 Hz), 2.00-1.92 (1H, m), 1.95-1.86 (1H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.98 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.65-1.55 (1H, m), 1.31-1.20 (1H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.06 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.93 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.83 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).
得られた^{1}H NMRスペクトルは既報のものと一致した[26]。



JEOL RESONANCE

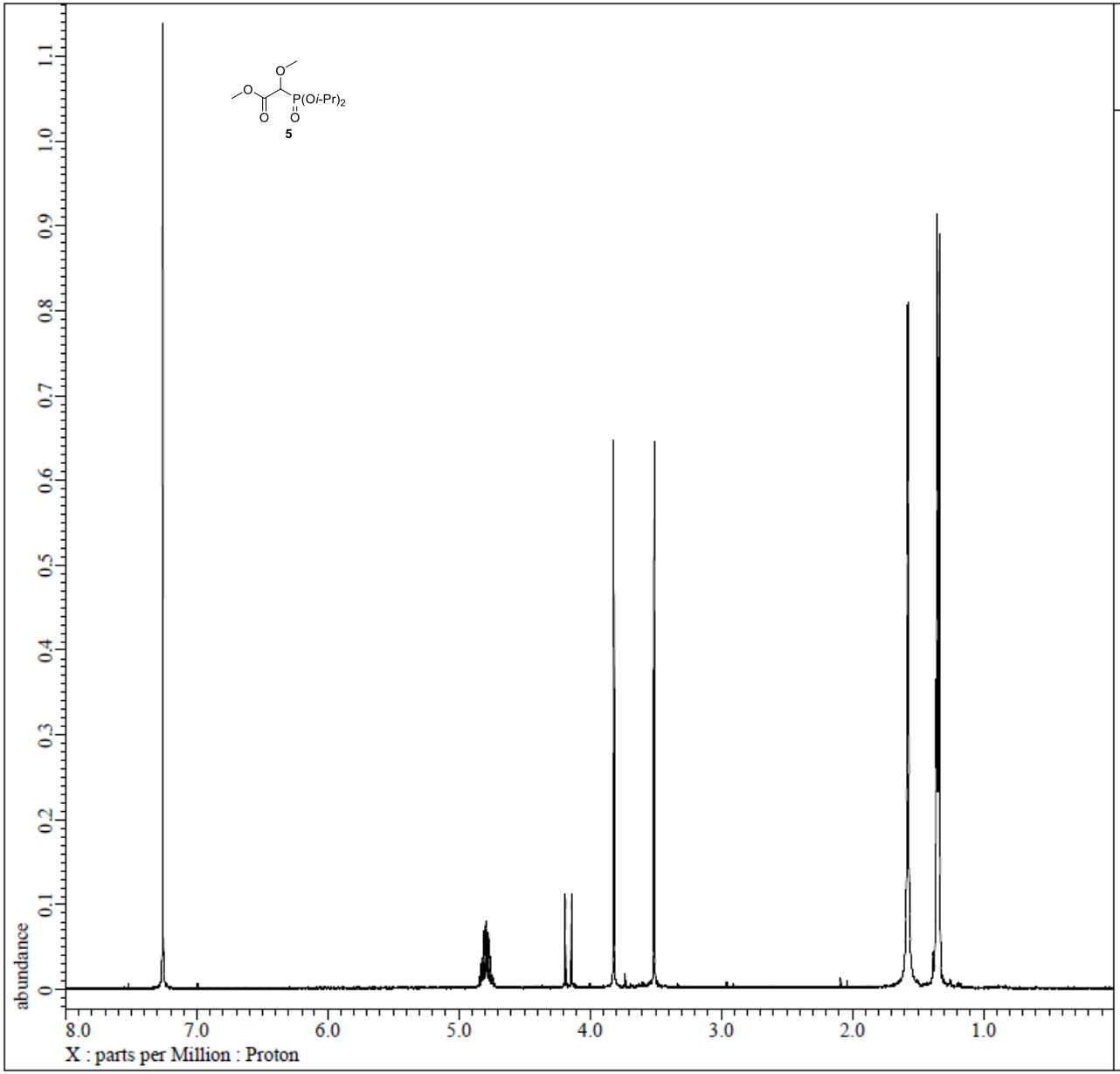
```
Filename          = TH5-87-3_proton-1-3.jdf
Author            = Murata
Experiment        = proton.jxp
Sample_Id         = TH5-87-3
Solvent           = CHLOROFORM-D
Creation_Time     = 16-AUG-2015 20:13:10
Revision_Time     =  8-JAN-2016 13:35:22
Current_Time      =  8-JAN-2016 13:35:51

Comment           = single_pulse
Data_Format       = 1D COMPLEX
Dim_Size          = 52429
Dim_Title         = Proton
Dim_Units         = [ppm]
Dimensions        = X
Site              = JNM-ECS400
Spectrometer      = DELTA2_NMR

Field_Strength    = 9.389766[T]  (400[MHz])
X_Acq_Duration    = 8.73463808[s]
X_Domain          = 1H
X_Freq            = 399.78219838[MHz]
X_Offset          = 5[ppm]
X_Points          = 65536
X_Prescans        = 1
X_Resolution      = 0.11448671[Hz]
X_Sweep           = 7.5030012[kHz]
X_Sweep_Clipped   = 6.00240096[kHz]
Irr_Domain        = Proton
Irr_Freq          = 399.78219838[MHz]
Irr_Offset        = 5[ppm]
Tri_Domain        = Proton
Tri_Freq          = 399.78219838[MHz]
Tri_Offset        = 5[ppm]
Clipped           = FALSE
Scans             = 8
Total_Scans       = 8

Relaxation_Delay  = 2.5[s]
Recvr_Gain        = 48
Temp_Get          = 25[dC]
X_90_Width        = 10.4[us]
X_Acq_Time        = 8.73463808[s]
X_Angle           = 45[deg]
X_Atn             = 0.7[dB]
X_Pulse           = 5.2[us]
Irr_Mode          = Off
Tri_Mode          = Off
Dante_Presat      = FALSE
Initial_Wait      = 1[s]
Repetition_Time   = 11.23463808[s]
```


JEOL RESONANCE
Filename = TH5-157-1_proton-1-5.jdf
Author = Murata
Experiment = proton.jxp
Sample_Id = TH5-157-1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation_Time = 28-SEP-2015 10:08:31
Revision_Time = 8-JAN-2016 11:47:20
Current_Time = 8-JAN-2016 11:47:38
Comment = single_pulse
Data_Format = 1D COMPLEX
Dim_Size = 52429
Dim_Title = Proton
Dim_Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECA400
Spectrometer = DELTA2_NMR
Field_Strength = 9.389766[T] (400[MHz])
X_Acq_Duration = 8.734638080[s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 399.782198380[MHz]
X_Offset = 5[ppm]
X_Points = 65536
X_Prescans = 1
X_Resolution = 0.114486710[Hz]
X_Sweep = 7.503000120[kHz]
X_Sweep_Clipped = 6.002400960[kHz]
Irr_Domain = Proton
Irr_Freq = 399.782198380[MHz]
Irr_Offset = 5[ppm]
Tri_Domain = Proton
Tri_Freq = 399.782198380[MHz]
Tri_Offset = 5[ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_Scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5[s]
Recvr_Gain = 54
Temp_Get = 25[dC]
X_90_Width = 12.8[us]
X_Acq_Time = 8.734638080[s]
X_Angle = 45[deg]
X_Atn = 8.8[dB]
X_Pulse = 6.4[us]
Irr_Mode = OFF
Tri_Mode = OFF
Dante_Presat = FALSE
Initial_Wait = 1[s]
Repetition_Time = 11.234638080[s]
BnO
ONO2
O
12
abundance
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
X : parts per Million : Proton



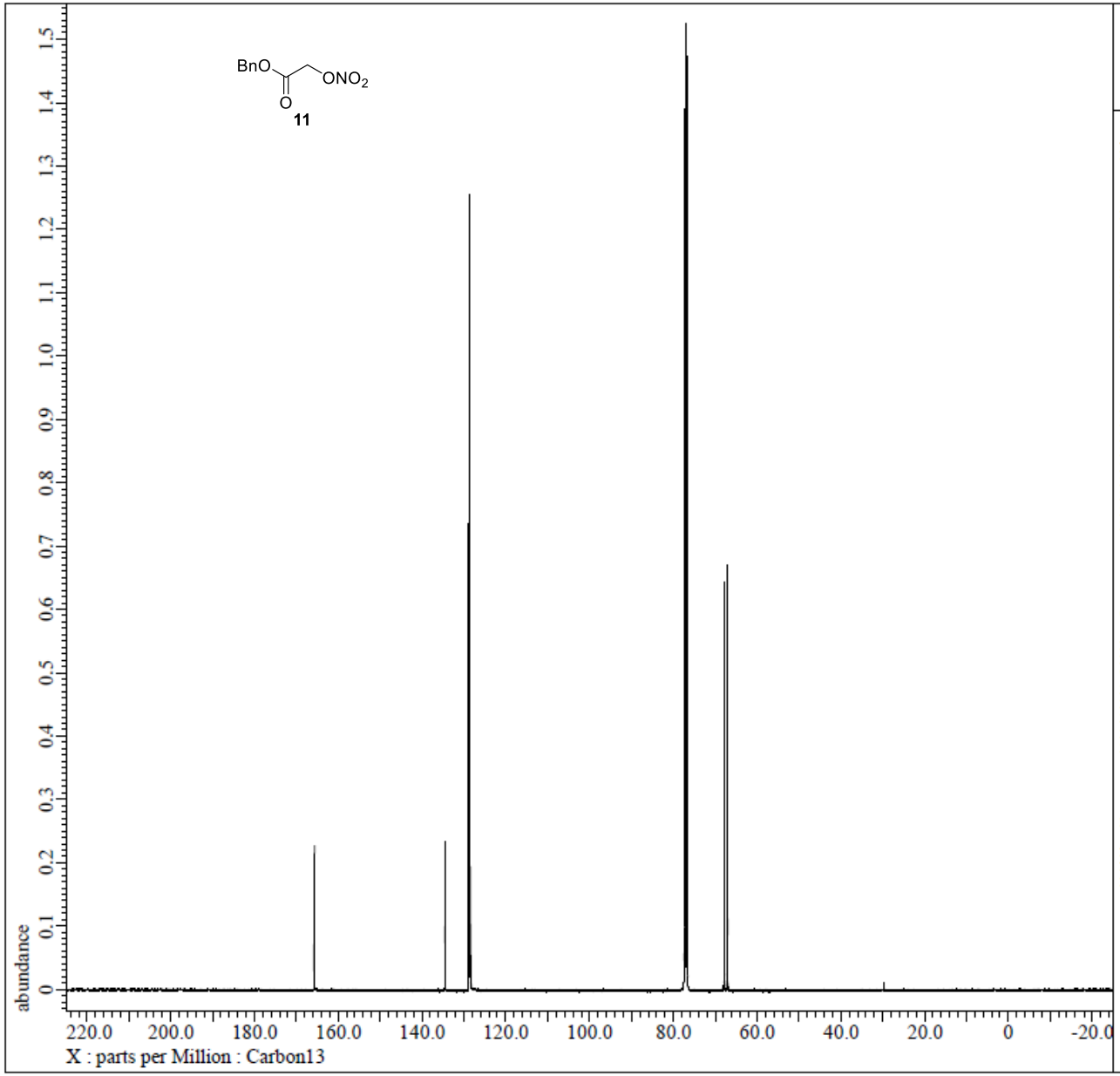
JEOL RESONANCE

```
Filename          = TH5-181-1_proton-1-5.jdf
Author            = Murata
Experiment        = proton.jxp
Sample_Id         = TH5-181-1
Solvent           = CHLOROFORM-D
Creation_Time     =  3-NOV-2015 23:08:28
Revision_Time     =  8-JAN-2016 11:48:05
Current_Time      =  8-JAN-2016 11:48:23

Comment           = single_pulse
Data_Format       = 1D COMPLEX
Dim_Size          = 52429
Dim_Title         = Proton
Dim_Units         = [ppm]
Dimensions        = X
Site              = JNM-ECS400
Spectrometer      = DELTA2_NMR

Field_Strength    = 9.389766[T]  (400[MHz])
X_Acq_Duration    = 8.73463808[s]
X_Domain          = 1H
X_Freq            = 399.78219838[MHz]
X_Offset          = 5[ppm]
X_Points          = 65536
X_Prescans        = 1
X_Resolution      = 0.11448671[Hz]
X_Sweep           = 7.5030012[kHz]
X_Sweep_Clipped   = 6.00240096[kHz]
Irr_Domain        = Proton
Irr_Freq          = 399.78219838[MHz]
Irr_Offset        = 5[ppm]
Tri_Domain        = Proton
Tri_Freq          = 399.78219838[MHz]
Tri_Offset        = 5[ppm]
Clipped           = FALSE
Scans             = 8
Total_Scans       = 8

Relaxation_Delay  = 2.5[s]
Recvr_Gain        = 46
Temp_Get          = 19.7[dC]
X_90_Width        = 10.4[us]
X_Acq_Time        = 8.73463808[s]
X_Angle           = 45[deg]
X_Atn             = 0.7[dB]
X_Pulse           = 5.2[us]
Irr_Mode          = Off
Tri_Mode          = Off
Dante_Presat      = FALSE
Initial_Wait      = 1[s]
Repetition_Time   = 11.23463808[s]
```



JEOL RESONANCE

```
Filename          = TH5-141-6_proton-1-3.jdf
Author            = Murata
Experiment        = proton.jxp
Sample_Id         = TH5-141-6
Solvent           = CHLOROFORM-D
Creation_Time     =  9-SEP-2015 16:35:44
Revision_Time     = 13-JAN-2016 22:24:24
Current_Time      = 13-JAN-2016 22:25:05

Comment           = single_pulse
Data_Format       = 1D COMPLEX
Dim_Size          = 52429
Dim_Title         = Proton
Dim_Units         = [ppm]
Dimensions        = X
Site              = JNM-ECS400
Spectrometer      = DELTA2_NMR

Field_Strength    = 9.389766[T]  (400[MHz])
X_Acq_Duration    = 8.73463808[s]
X_Domain          = 1H
X_Freq            = 399.78219838[MHz]
X_Offset          = 5[ppm]
X_Points          = 65536
X_Prescans        = 1
X_Resolution      = 0.11448671[Hz]
X_Sweep           = 7.5030012[kHz]
X_Sweep_Clipped   = 6.00240096[kHz]
Irr_Domain        = Proton
Irr_Freq          = 399.78219838[MHz]
Irr_Offset        = 5[ppm]
Tri_Domain        = Proton
Tri_Freq          = 399.78219838[MHz]
Tri_Offset        = 5[ppm]
Clipped           = FALSE
Scans             = 8
Total_Scans       = 8

Relaxation_Delay  = 2.5[s]
Recvr_Gain        = 50
Temp_Get          = 25[dC]
X_90_Width        = 10.4[us]
X_Acq_Time        = 8.73463808[s]
X_Angle           = 45[deg]
X_Atn             = 0.7[dB]
X_Pulse           = 5.2[us]
Irr_Mode          = Off
Tri_Mode          = Off
Dante_Presat      = FALSE
Initial_Wait      = 1[s]
Repetition_Time   = 11.23463808[s]
```



JEOL RESONANCE

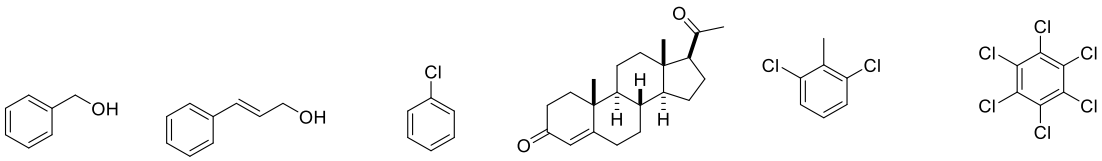
```
Filename          = 151105 TH5-157-1_carbon-
Author            = Murata
Experiment        = carbon.jxp
Sample_Id         = 151105 TH5-157-1
Solvent           = CHLOROFORM-D
Creation_Time     =  5-NOV-2015 00:32:29
Revision_Time     =  8-JAN-2016 11:51:17
Current_Time      =  8-JAN-2016 11:51:34

Comment           = single pulse decoupled g
Data_Format       = 1D COMPLEX
Dim_Size          = 26214
Dim_Title         = Carbon13
Dim_Units         = [ppm]
Dimensions        = X
Site              = ECA 500
Spectrometer      = DELTA2_NMR

Field_Strength    = 11.7473579[T]  (500[MHz])
X_Acq_Duration    = 0.83361792[s]
X_Domain          = 13C
X_Freq            = 125.76529768[MHz]
X_Offset          = 100[ppm]
X_Points          = 32768
X_Prescans        = 4
X_Resolution      = 1.19959034[Hz]
X_Sweep           = 39.3081761[kHz]
X_Sweep_Clipped   = 31.44654088[kHz]
Irr_Domain        = Proton
Irr_Freq          = 500.15991521[MHz]
Irr_Offset        = 5.0[ppm]
Clipped           = FALSE
Scans             = 10534.0
Total_Scans       = 10534.0

Relaxation_Delay  = 2[s]
Recvr_Gain        = 58
Temp_Get          = 25[dC]
X_90_Width        = 13[us]
X_Acq_Time        = 0.83361792[s]
X_Angle           = 30[deg]
X_Atn             = 10[dB]
X_Pulse           = 4.33333333[us]
Irr_Atn_Dec       = 21.552[dB]
Irr_Atn_Noe       = 21.552[dB]
Irr_Noise         = WALTZ
Irr_Pwidth        = 92[us]
Decoupling        = TRUE
Initial_Wait      = 1[s]
Noe               = TRUE
Noe_Time          = 2[s]
Repetition_Time   = 2.83361792[s]
```

3. Log $P_{O/W}$推定

Log $P_{O/W}$の推定はOECDの定めたガイドラインに則り逆相HPLC法により実施した[4]。まず、Log $P_{O/W}$既知の化合物6種とBafを含水アセトニトリル(アセトニトリル/水 = 3/1)に溶解させた混合溶液を作成した。その後、この溶液を流速0.5 ml/min, 30 ºCで逆相HPLCカラム(COSMOSIL 5C18-MS-II, 4.6 × 150 mm, ナカライテスク)により分析し、各化合物のUV吸収(吸収波長220 or 254 nm)より保持時間を決定した。既知のlog $P_{O/W}$の値と決定した保持時間から式2-5のような検量線を作成し、そこからBafのlog $P_{O/W}$を推定した。(t_RはHPLC中での保持時間、t_0は溶媒がHPLCカラムを通過するのに要する時間をそれぞれ表している。) 同一条件下、検量線の作成およびlog $P_{O/W}$の推定を三回繰り返し、得られた値の平均値を実験値とした。また同様の実験をFBaf、desFBaf、benzophenoneおよびdiMe-benzophenoneについても実施した。

$$\log P_{O/W} = a \times \log k + b \quad \left(k = \frac{t_R - t_0}{t_0}\right) \qquad (2\text{-}5)$$

表 2-8：基準化合物群のlog $P_{O/W}$値



Benzylalcohol　Cinnamylalcohol　Chlorobenzene　Progesterone　2,6-Dichlorotoluene　Hexachlorobenzene

化合物	CAS 番号	分子量	Log $P_{O/W}$値	リファレンス
Benzylalcohol	100-51-6	108.14	1.1	ref. [4]
Cinnamylalcohol	104-54-1	134.17	1.9	ref. [4]
Chlorobenzene	108-90-7	112.56	2.8	ref. [4]
Progesterone	57-83-0	314.47	3.87	ref. [33]
2,6-dichlorotoluene	118-69-4	161.03	4.29	ref. [34]
Hexachlorobenzene	118-74-1	284.78	5.73	ref. [35]

表 2-9：HPLC による log $P_{O/W}$ 推定の結果

$$\log P_{O/W} = a \times \log k + b \quad \left(k = \frac{t_R - t_0}{t_0}\right)$$

t_R：HPLC 中での保持時間

t_0：溶媒が HPLC カラムを通過するのに要する時間

化合物	entry	t_R [min]	t_0 [min]	log k	平均値
Baf	1	17.737	3.049	0.683	4.736
	2	17.755	3.057	0.682	
	3	17.755	3.051	0.683	
FBaf	1	15.404	3.074	0.603	4.538
	2	15.403	3.069	0.604	
	3	15.407	3.071	0.604	
desFBaf	1	5.737	3.077	-0.063	2.811
	2	5.749	3.087	-0.064	
	3	5.722	3.061	-0.061	
diMe-benzophenone	1	9.771	3.068	0.339	3.842
	2	9.798	3.078	0.339	
	3	9.791	3.070	0.340	
benzophenone	1	6.582	3.071	0.058	3.112
	2	6.659	3.065	0.069	
	3	6.583	3.073	0.058	

4. 計算による log $P_{O/W}$ 予測

計算による log $P_{O/W}$ 予測は Macromodel[5]と QikProp[6]を用いて表 2-10 に示した計算条件により実施した。Baf および誘導体の初期構造は Baf の結晶構造[36]を元に作成し、Powell-Reeves conjugate gradient (PRCG)法によりエネルギー最小化を施した。この最小化構造を出発構造に力場として OPLS3[37]を用いて配座探索を実施し、生成した配座のうち重原子の位置が近しいものをクラスター化することで各誘導体の安定配座を得た。得られた安定配座全てについて QikProp により log $P_{O/W}$ の値を算出し、各配座のエネルギーにより加重平均したものを計算値とした。配座探索時の溶媒条件を変化させて同様の計算を実施し、得られた結果を表 2-2 に示した。

表 2-10：Log $P_{O/W}$ 予測に用いた計算条件

Minimization	
- Potential tab	
Force field:	OPLS3
Solvent:	None or $CHCl_3$ or Water or Octanol
- Mini tab	
Method:	PRCG
Maximum iterations:	7,000
Conformational Search	
- Potential tab	
Force field:	OPLS3
Solvent:	None or $CHCl_3$ or Water or Octanol
- Mini tab	
Method:	PRCG
Maximum iterations:	2,000
- CSearch tab	
Method:	MCMM
[uncheck Multi-ligand, Perform Automatic Setup]	
Torsional sampling option:	Extended
Maximum number of steps:	100,000
Energy window for saving structures:	21.0 kJ/mol (5.02 kcal/mol)
Redundant Conformer Elimination	
Comparison atoms:	Heavy Atoms
Maximum atom deviation:	0.5 Å
Source of energy:	OPLS3
QikProp	
初期条件のまま計算を実施	

5. PAMPA

PAMPA は過去の報告[8]を参考に実施した。まず Baf 誘導体のサンプル溶液は、対応する化合物のアセトニトリル溶液(ca. 0.5 mM)を 10 mM Tris·HCl 緩衝液(pH7.4)により 50 倍希釈することで調製した。また DOPC を *n*-dodecane で希釈することで 2%(w/v)の DOPC 溶液を調製した。この際、DOPC を完全に溶解させるためにボルテックスによる撹拌およびソニケーションを入念に行った。次にドナープレート[MultiScreen (R) 96-well transport receiver plates, cat. No. MATRNPS50, Millipore, Bedford, PA, USA]の各ウェルに 300 µl のサンプル溶液を添加した。その後、アクセプタープレート[MultiScreen (R)-IP plates, cat. No. MAIPNTR10, Millipore]に 6 µl の DOPC 溶液を均一に広がるように添加し、続けて 150 µl の Tris 緩衝液(2%アセトニトリル含有)を添加することで脂質膜を形成させた。ドナープレートとアクセプタープレートを重ね合わせ、20 ºC、50 rpm で 2 または 16 時間インキュベートした。この際、アクセプターウェルを濡れたペーパータオルとラップフィルムで蓋をすることでアクセプター溶液の蒸発を防止した。インキュベーション終了後、二つのプレートを分離し各ウェル中の Baf 誘導体の量を UV スペクトルより定量した。また Baf 誘導体以外の分子についても同様の手順で実施した。

PAMPA に基づく速度論的パラメータはスキーム 2-1 に示したモデルに基づき、実験値を式 2-6 ~ 2-8 より求められる理論値とフィッティングすることで算出した。なお k_{in} はドナーまたはアクセプターウェル中のリガンド分子が膜中に挿入される速度定数を、k_{out} は膜中のリガンド分子がドナーまたはアクセプターウェルに出ていく速度定数を表している。また x および V は各コンパートメントに含まれるリガンド分子のモル分率および各コンパートメントの体積をそれぞれ表しており、添え字の d, a, m はドナーウェル、アクセプターウェル、および脂質膜中をそれぞれ表している。また以下に示す式は[38]を参考にした Python スクリプトにより導出した。

$$[donor] \underset{k_{out}}{\overset{k_{in}}{\rightleftarrows}} [membrane] \underset{k_{in}}{\overset{k_{out}}{\rightleftarrows}} [acceptor] \qquad \text{(スキーム 2-1)}$$

$$x_d = \frac{V_d}{V_m}\frac{k_{out}}{k'} + \frac{V_d}{V_d + V_a}\frac{k_{in}}{k'}\exp(-k't) + \frac{V_a}{V_d + V_a}\exp(-k_{in}t) \quad \cdots (2-6)$$

$$x_m = \frac{k_{in}}{k'}[1 - \exp\{-k't\}] \quad \cdots (2-7)$$

$$x_a = \frac{V_a}{V_m}\frac{k_{out}}{k'} + \frac{V_a}{V_d + V_a}\frac{k_{in}}{k'}\exp(-k't) - \frac{V_a}{V_d + V_a}\exp(-k_{in}t) \quad \cdots (2-8)$$

$$\left(k' = k_{in} + \frac{V_d + V_a}{V_m}k_{out}\right)$$

式の導出を以下に示す。まず、ドナーウェルおよびアクセプターウェルにおけるリガンド分子のモル濃度の経時変化は以下のような式で表される。ここで[X]は任意の時刻 t におけるコンパートメント X 中の分子の濃度を表している。

$$\frac{d[acceptor]}{dt} = -k_{in}[acceptor] + k_{out}[membrane]$$

$$\frac{d[donor]}{dt} = -k_{in}[donor] + k_{out}[membrane]$$

これらの式は以下の様に変形することができる。

$$\frac{d[acceptor]}{dt} = -k_{in}[acceptor] + k_{out}[membrane] \iff \frac{1}{V_a}\frac{dx_a}{dt} = -k_{in}\frac{x_a}{V_a} + k_{out}\frac{x_m}{V_m}$$

$$\iff \frac{dx_a}{dt} = -k_{in}x_a + \frac{V_a}{V_m}k_{out}x_m \quad \cdots (2-9)$$

$$\frac{d[donor]}{dt} = -k_{in}[donor] + k_{out}[membrane] \iff \frac{1}{V_d}\frac{dx_d}{dt} = -k_{in}\frac{x_d}{V_d} + k_{out}\frac{x_m}{V_m}$$

$$\iff \frac{dx_d}{dt} = -k_{in}x_d + \frac{V_d}{V_m}k_{out}x_m \quad \cdots (2-10)$$

系中の全てのリガンド分子がドナーウェル、アクセプターウェルおよび脂質膜のいずれかに分配しているとすると

$$x_m = 1 - x_a - x_d \Rightarrow \frac{dx_m}{dt} = -\frac{dx_a}{dt} - \frac{dx_d}{dt}$$

$$= k_{in}(x_a + x_d) - \frac{V_d + V_a}{V_m}k_{out}x_m \quad \cdots (2-11)$$

式 2-9 ~ 2-11 を行列で表すと次のようになる。

$$\frac{d}{dt}\begin{pmatrix} x_d \\ x_m \\ x_a \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{in} & \frac{V_d}{V_m}k_{out} & 0 \\ k_{in} & -\frac{V_d+V_a}{V_m}k_{out} & k_{in} \\ 0 & \frac{V_a}{V_m}k_{out} & -k_{in} \end{pmatrix}\begin{pmatrix} x_d \\ x_m \\ x_a \end{pmatrix} = KX \quad \cdots (2-12)$$

式 2-12 の解は一般に式 2-13 のようになることが知られている。

$$X(t) = \exp(Kt)X(0) \quad \cdots (2-13)$$

このうち exp 項は次のような式で表せる。

$$\exp(Kt) = Y \cdot \exp(K't) \cdot Y^{-1}$$

$$Y = \begin{pmatrix} \frac{V_d}{V_a} & -1 & \frac{V_d}{V_a} \\ k_{in}\frac{V_m}{V_a k_{out}} & 0 & -\frac{V_a+V_d}{V_a} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

$$K' = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{in} & 0 \\ 0 & 0 & -\frac{V_a k_{out} + V_d k_{out} + V_m k_{in}}{V_m} \end{pmatrix}$$

なおここで Y は X の固有ベクトルよりなる行列を、K'は X の固有値を対角成分にもつ対角行列をそれぞれ表している。

したがって式 2-13 は次のように書き表せる。

$$X(t) = Y \cdot \exp(K't) \cdot Y^{-1}X(0) \quad \cdots (2-14)$$

式 2-14 を展開することで、式 2-6, 2-7, 2-8 が得られる。

$$x_d = \frac{V_d}{V_m}\frac{k_{out}}{k'} + \frac{V_d}{V_d+V_a}\frac{k_{in}}{k'}\exp(-k't) + \frac{V_a}{V_d+V_a}\exp(-k_{in}t) \quad \cdots (2-6)$$

$$x_m = \frac{k_{in}}{k'}[1 - \exp\{-k't\}] \quad \cdots (2-7)$$

$$x_a = \frac{V_a}{V_m}\frac{k_{out}}{k'} + \frac{V_a}{V_d+V_a}\frac{k_{in}}{k'}\exp(-k't) - \frac{V_a}{V_d+V_a}\exp(-k_{in}t) \quad \cdots (2-8)$$

$$\left(k' = k_{in} + \frac{V_d+V_a}{V_m}k_{out}\right)$$

6. 固体 NMR 測定

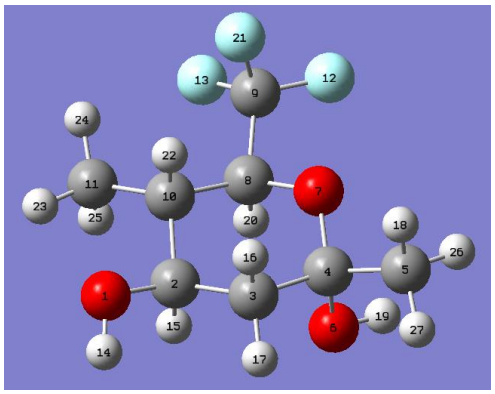
固体 NMR 測定に先立ち、測定に用いる Baf 誘導体含有リポソームを調製した。まず 20 ml バイアルに POPC 20 mg をはかりとり、少量のジクロロメタンに溶解させた。次いでここに FBaf または desFBaf のジクロロメタン溶液を混合させ、高速エバポレーションシステム V-10 touch (Biotage, Upsala, Sweden)により溶媒を留去することで Baf 誘導体を含む POPC フィルムを調製した。真空下で一晩乾燥させた後に、0.5 ml の蒸留水で水和させ凍結融解を 5 回繰り返した。一晩凍結乾燥させた後に、サンプルと同重量の重水で水和させ凍結融解を 10 回繰り返した。得られたサンプルを NMR サンプル管に移し、測定に使用した。

固体 NMR 測定は BRUKER AVANCE600WB (^{19}F 共鳴周波数 564.7 MHz, Bruker corporation, Billerica, MA, USA)を用いて実施した。プローブには 4-mm quadruple MAS probe (^{1}H/^{19}F/^{13}C/^{15}N)を使用し、静的条件で測定を実施した。またリンギングノイズと呼ばれるノイズを抑えるために[39]に報告されているコンポジットパルスを使用した。なおパルス幅は 4.5 μs、遅延時間は 5 s で測定を実施した。概ね一晩以上の積算(> 7200 scans)で十分な分解能のスペクトルが得られた。化学シフトは重水中における 1%トリクロロ酢酸の化学シフト(−76.55 ppm)を外部標準として使用した。

得られたスペクトルの分裂幅より式2-1を用いてオーダーパラメータ S_0 を算出した。この時、静止状態における分裂幅 D_0 は密度汎関数法(DFT)により最適化した Baf 誘導体の部分構造中における ^{19}F−^{19}F 間の平均距離 r より算出した。DFT による構造最適化は Gaussian 09, Revision E.01[40]を用いて実施した。汎関数として Becke 3 パラメータ混成交換汎関数[41]および Lee-Yang-Parr 相関汎関数[42]を、基底関数として 6-31G+(d,p)をそれぞれ使用して最適化を実施したところ、^{19}F−^{19}F 間の平均距離は 2.162 Å となり、D_0 はおよそ 7.9 kHz となった。

$$D_{obs} = S_{CF3} \times D_0 = S_{CF3} \times \left(\frac{1}{2} \times \frac{\mu_0 \hbar \gamma^2}{4\pi r^3}\right) \qquad (2\text{-}1)$$

表 2-11：DFT 最適化した FBaf の部分構造およびその座標



Number	Atomic number	Coordinates (Å)		
		X	Y	Z
1	8	1.805831	2.640068	-0.406753
2	6	1.365016	1.415802	0.158990
3	6	2.171680	0.242985	-0.392068
4	6	1.592854	-1.094828	0.056519
5	6	2.223129	-2.283182	-0.644901
6	8	1.774359	-1.160065	1.453650
7	8	0.209153	-1.157242	-0.255522
8	6	-0.563191	-0.114686	0.306568
9	6	-2.001378	-0.457685	-0.058981
10	6	-0.116320	1.264065	-0.196491
11	6	-0.939387	2.419634	0.373145
12	9	-2.282990	-1.739996	0.206475
13	9	-2.868224	0.288333	0.650968
14	1	2.711781	2.810123	-0.126069
15	1	1.460106	1.448609	1.255594
16	1	2.144804	0.289537	-1.486053
17	1	3.216257	0.302496	-0.066959
18	1	2.053993	-2.219643	-1.721535
19	1	1.466427	-2.023113	1.760588
20	1	-0.508586	-0.149771	1.405013
21	9	-2.261593	-0.246521	-1.358174

22	1	-0.189252	1.259826	-1.292318
23	1	-0.458690	3.363130	0.109723
24	1	-1.956958	2.425497	-0.020919
25	1	-0.999286	2.354802	1.465707
26	1	1.769162	-3.210012	-0.280993
27	1	3.296335	-2.302544	-0.442889

7. 配座自由度の評価

Baf および desFBaf のマクロラクトン環における配座自由度の評価は Macromodel[5]を用いて実施した。力場には OPLS3[37]を、溶媒条件には水をそれぞれ使用した。また MD 計算の条件としては表 2-12 に示したものを使用し、マクロラクトン環内の二面角をモニターした。

表 2-12：配座自由度評価における計算条件

Dynamics tab	
Method	Molecular dynamics
SHAKE	Bonds to hydrogens
Simulation temperature	300.0 K
Time step	1.5 fs
Equilibration time	3.0 ps
Simulation time	30000 ps

8. 溶液 NMR 測定

溶液 NMR 測定は JEOL RESONANCE ECA-500 (^{1}H 共鳴周波数 500MHz)を用いて実施した。各誘導体の化学シフトは過去の報告[25,26]を参考に帰属した。化学シフトの温度依存性は Baf および desFBaf の ^{1}H NMR を 25 ºC, 30 ºC, 35 ºC および 40 ºC で測定し、その変化を観測することで評価した。

参考文献

[1] Páli, T.; Dixon, N.; Kee, T. P.; Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1663*, 14-18.

[2] Sceidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Saval, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6981-6990.

[3] Kornblum, S.; Frazier, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 865-866.

[4] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, "Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method", Adopted by the Council on 30th March 1989.

[5] Schrödinger Release 2017-2: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2017.

[6] Schrödinger Release 2017-2: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2017.

[7] Ioakimidis, L.; Thoukydidis, L.; Mirza, A.; Naeem, S.; Reynisson, J. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 445-456.

[8] Fortuna, A.; Alves, G.; Soares-da-silva, P.; Falcão, A. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 530-540.

[9] Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *1*, 1007-1010.

[10] Avdeef, A.; Strafford, M.; Block, E.; Balogh, M. P.; Chambliss, W.; Khan, I. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, *14*, 271-280.

[11] Velkov, T.; Horne, J.; Laguerre, A.; Jones, E.; Scanlon, M. J.; Porter, J. H. C. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 453-465.

[12] Grage, S. L.; Ulrich, A. S. *J. Magn. Reson.* **2000**, *146*, 81-88.

[13] Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgon, R. J. J.; Everett, J. R.; Ley, S. V.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5565-5568.

[14] Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgon, R. J. J.; Everett, J. R. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II* **1989**, 1073-1079.

[15] Dröse, S.; Boddien, C.; Gassel, M.; Ingenhorst, G.; Zeeck, A.; Altendorf, K. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2816–2825.

[16] Alex, A.; Millan, D. S.; Perez, M.; Wakenhut, F.; Whitlock, G. A. *Med. Chem. Commun.* **2011**, *2*, 669-674.

[17] Ashwood, V. A.; Field, M. J.; Horwell, D. C.; Julien-Larose, C.; Lewthwaite, R. A.; McCleary S.; Pritchard, M. C.; Raphy, J.; Singh L. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2276-2285.

[18] Abraham, M. H.; Abraham, R. J.; Acree, W. E. Jr.; Aliev, A. E.; Leo, A. J.; Whaley, W.

L. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11075-11083.

[19] Abraham, M. H.; Abraham, R. J.; Byrne, J.; Griffiths, L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3389-3394.

[20] Kroon, J.; Kroon-Batenburg, L. M. J.; Leeflang, B. R.; Vliegenthart, J. F. G. *J. Mol. Struct.* **1994**, *322*, 27–31.

[21] Fortuna, A.; Alves, G.; Soares-da-silva, P.; Falcão, A. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 530-540.

[22] Pyka, A.; Babuśka, M.; Zachariasz, M. *Acta Pol. Pharm.* **2006**, *63*, 159-167.

[23] Ottaviani, G.; Martel, S.; Carrupt, P.-A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 742-748.

[24] ter Laak, A. M.; Tsai, R. S.; Donné-Op den Kelder, G. M.; Carrupt, P.-A.; Testa, B.; Timmerman, H. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1994**, *2*, 373-384.

[25] Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; Hayashi, T.; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Asian. J.* **2015**, *10*, 915-924.

[26] Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 474-476.

[27] He, R.; Ching, S. M.; Lam, Y. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 923-928.

[28] Coppola, G. M.; Damon, R. E. *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, *27*, 815-817.

[29] Sceidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Saval, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6981-6990.

[30] Marshall, J. A.; Adams, N. D.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 733-740.

[31] Toshima, K.; Jyojima, T.; Miyamoto, N.; Katohno, M.; Nakata, M.; Matsumura, S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1708-1715.

[32] Toshima, K.; Jyojima, T.; Yamaguchi, H.; Noguchi, Y.; Yoshida, T.; Murase, H.; Nakata, M.; Matumura, M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3271-3284.

[33] Ottaviani, G.; Martel, S.; Carrupt, P.-A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 742-748.

[34] Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. *Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants.* American Chemical Society., Washington, DC: 1995.

[35] Puzyn, T. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *192*, 970-977.

[36] Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgon, R. J. J.; Everett, J. R.; Ley, S. V.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5565-5568.

[37] Harder, E.; Damm, W.; Maple, J.; Wu, C.; Reboul, M.; Xiang, J. Y.; Wang, L.; Lupyan, D.; Dahlgren, M. K.; Knight, J. L.; Kaus, J. W.; Cerutti, D. S.; Krilov, G.; Jorgensen, W.

L.; Abel, R.; Friesner, R. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 281-296.

[38] Korobov, V.; Ochkov, V. "Chemical Kinetics with Mathcad and Maple" 2011, 344, 252, ISBN: 978-3-7091-0530-6

[39] Zhang, S.; Wu, X.; Mehring, M. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *173*, 481-484.

[40] Gaussian 09, Revision E.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

[41] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.

[42] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev.* **1988**, *B37*, 785-789.

第3章　本論 II －固体 NMR 解析に向けた V-ATP アーゼの単離精製－

第一章で述べたように、著者は柴田らと共同で固体 NMR 解析に用いるプローブとして活性を保持したフッ素標識化 Baf を合成することに成功している。また第二章では、脂質膜環境下における Baf 誘導体の挙動を解析し、Baf の特徴的な構造が高い脂質膜親和性につながることを明らかにした。そこで次に固体 NMR による Baf－V-ATP アーゼ間の相互作用に必要不可欠な V-ATP アーゼの単離精製を試みた。これまで固体 NMR により V-ATP アーゼを解析した例は存在しない。したがって本研究では、固体 NMR 測定用のタンパク質試料が精製条件、およびどの程度の純度・量が必要か検討することから始めた。

3-1　酵母液胞膜画分を用いた解析

V-ATP アーゼは 10 以上のサブユニットより構成される膜タンパク質複合体であることから、その構造・機能を保持したまま単離精製することは容易でない。そのため V-ATP アーゼを対象とした初期の研究においては、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)[1]やアカパンカビ(*Neurospora crassa*)由来[2]の液胞膜、ウシ副腎髄質由来のクロマフィン顆粒[3]、ニワトリの髄骨由来の膜画分[4]など V-ATP アーゼを比較的多く含む画分が用いられてきた。

そこでまず過去の報告を参考に[1]、V-ATP アーゼ含有画分として酵母液胞膜の単離を検討することとした(図 3-1)。まず天然型の酵母を YPD 培地中、対数増殖期に至るまで振盪培養した。これを集菌後、還元条件下 zymolyase 処理することで酵母の細胞膜強度を弱め、均質化させた後に遠心処理することで膜画分および沈殿成分を得た。本法では zymolyase により一旦細胞膜強度を弱めるため、より温和な条件で細胞破砕が可能となりタンパク質の活性を極力保持した状態で精製することができる。

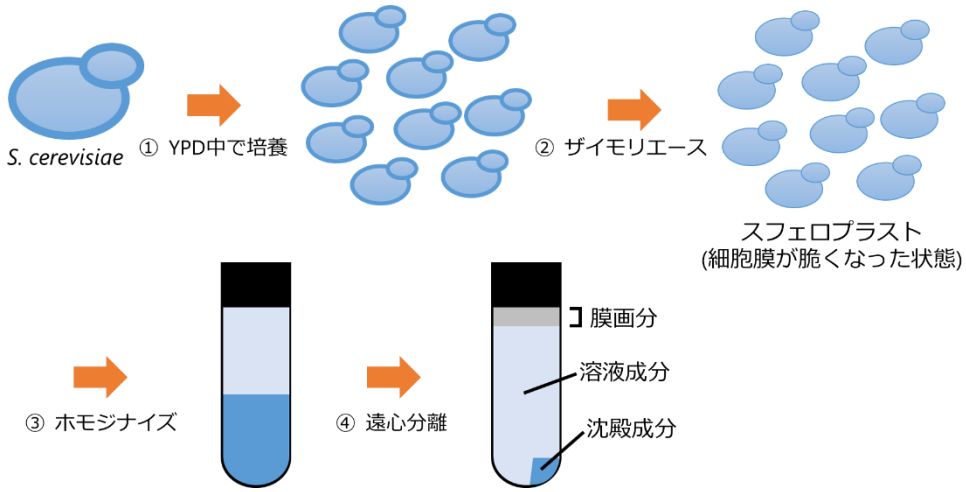


図 3-1：V-ATP アーゼ含有画分単離の流れ

次に得られた膜画分および沈殿成分の V-ATP アーゼ活性を評価した。V-ATP アーゼの活性は ATP 加水分解により生じる無機リン酸の量を V-ATP アーゼ選択的阻害剤である Baf 存在下および非存在下で定量することで実施した(図 3-2)[1,5]。本実験では V-ATP アーゼが活性を保持していた場合、Baf の添加の有無により生成するリン酸量に差が見られるが、本実験結果より活性を維持した V-ATP アーゼは膜画分ではなく沈殿成分に多く存在していることが明らかとなった。この結果は膜画分に V-ATP アーゼが局在していた過去の報告とは異なっている。そこで zymolyase の当量や遠心分離時の密度勾配を変更し同様の実験を実施したが、いずれの条件においても結果に大きな差は見られず V-ATP アーゼの大部分は沈殿成分に含まれていることが示唆された。この結果については使用した遠心分離機の種類に起因するものであると考察している。すなわち過去の報告ではスイング型の超遠心機が使用されていたのに対し、本実験では固定角型のローターを使用したために、サンプルに対する遠心力のかかり方が過去の報告とは異なってしまい、その結果として多くの V-ATP アーゼが沈殿してしまったのではないかと考察している。

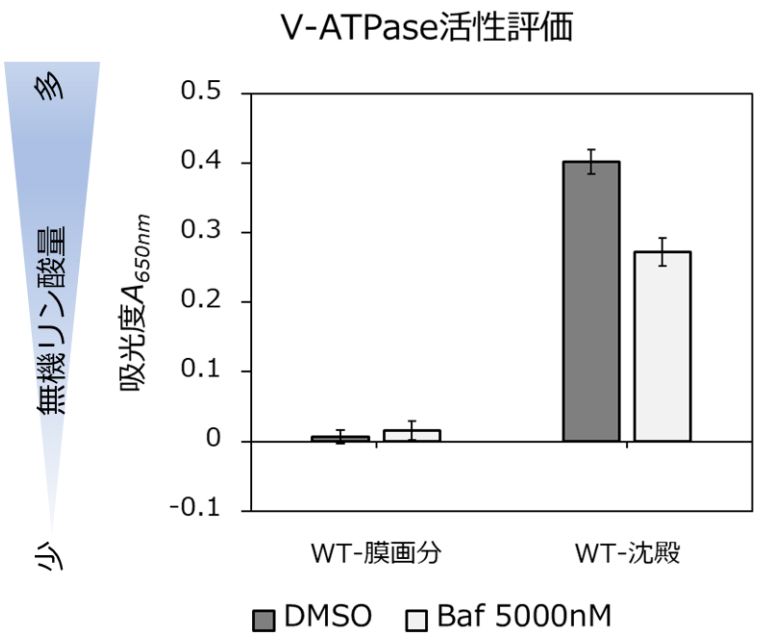


図 3-2：V-ATP アーゼ含有画分の V-ATP アーゼ活性評価

ATP アーゼ活性により生じた無機リン酸を、無機リン酸ーマラカイトグリーン錯体の UV 吸収より定量した[n = 3]。WT：天然型酵母由来。

沈殿成分に活性な V-ATP アーゼが存在することが明らかとなったので、次にこれを用いて固体 NMR 測定を実施し、本混合物の状態で解析が可能か検討した。具体的には上述と同様の方法で得られた沈殿成分に FBaf を添加した試料を調製し、これを用いて固体 ^{19}F および ^{31}P NMR スペクトルを測定した(図 3-3)。まず、^{19}F NMR においては FBaf の CF_3 基に由来する単一のシャープなシグナルのみが観測された。前章でも述べたように FBaf の運動性が高いほど観測されるスペクトルはシャープなものになることから[6]、本測定条件下において FBaf の大部分は V-ATP アーゼに結合しておらず、高い運動性を有していると考えられる。また、本試料の ^{31}P NMR スペクトルにおいても、シャープなシグナルが複数観測された。これらスペクトルより系中において酵母液胞膜由来の脂質は運動性・等方性の高いミセルとして存在していると考えられる。以上の結果と FBaf の高い脂溶性を合わせて考えると、本実験条件において FBaf の大部分は酵母由来脂質が形成するミセル中に取り込まれていると推察される。この問題を解決し、V-ATP アーゼに結合している FBaf を選択的に観測するためには、より高純度の V-ATP アーゼ試料を調製する必要があると考えられる。そこで次に、アフィニティタグを使用した V-ATP アーゼの単離精製を検討することとした。

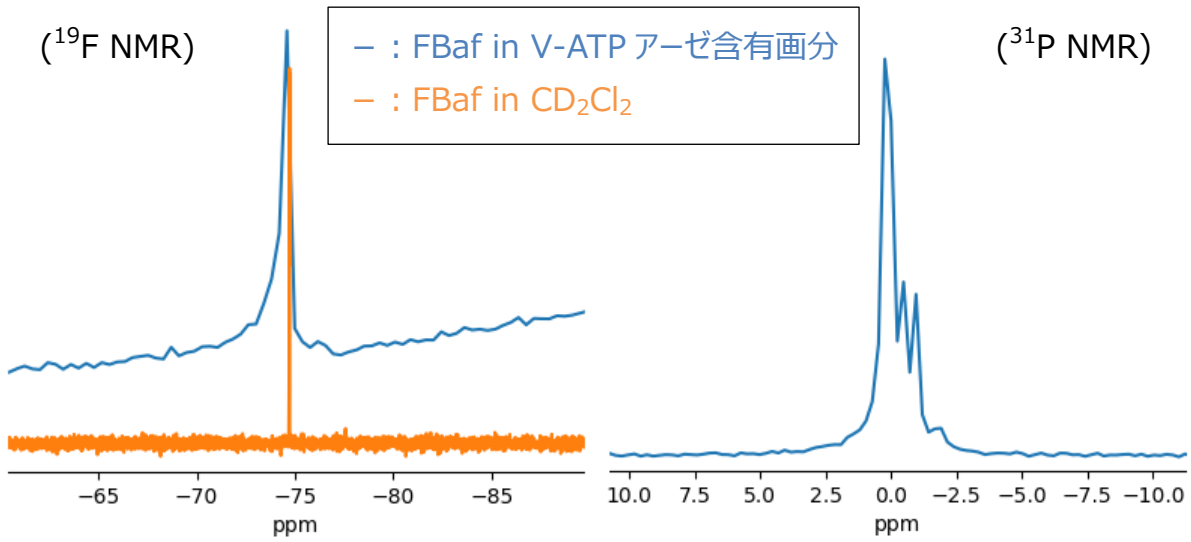


図 3-3：V-ATP アーゼ含有画分における FBaf の固体 NMR スペクトル

(左上)：FBaf を V-ATP アーゼ含有画分に添加した際の固体 ^{19}F NMR スペクトル。高運動性成分に由来するシャープなシグナルしか観測されていないことから本条件下において FBaf の大部分は V-ATP アーゼに結合していないことが予想される。(左下)：FBaf の CD_2Cl_2 中における ^{19}F NMR スペクトル。(右)：FBaf を V-ATP アーゼ含有画分に添加した際の固体 ^{31}P NMR スペクトル。シャープなシグナルが複数観測されていることから酵母由来のリン脂質数種がミセルを形成していることが推定される。

3-2　V-ATP アーゼの単離精製

近年、V-ATP アーゼのいずれかのサブユニットにタグを導入し、これを利用した精製により特定のサブユニットやドメイン、ひいては V-ATP アーゼ全体を単離精製する試みが報告されている[7,8]。そこでこれらの報告を参考に、TAP タグを利用した V-ATP アーゼおよび V_O ドメインの単離精製を検討することとした。

TAP タグの名称は Tandem Affinity Purification に由来しており、その名の通りアフィニティ精製を複数回行うことで目的のタンパク質を純度良く得ることを狙い設計されたタグである(図 3-4)[9,10]。実際にこのタグは V-ATP アーゼ以外にも様々なタンパク質複合体の単離精製を実現している[11,12]。一般的に TAP タグとは Protein A 領域とカルモジュリン結合領域を TEV 切断領域でつないだものを指すが、異なる組み合わせのタグを TAP タグと呼称することもある。

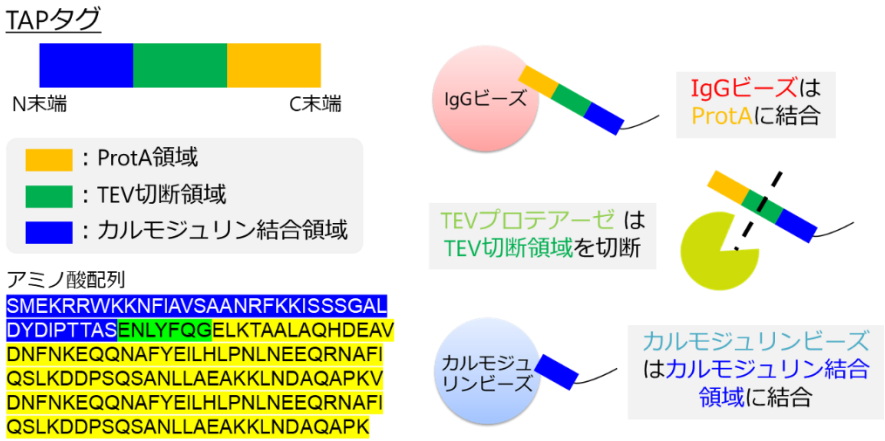


図 3-4：TAP タグの概要

TAP タグによる精製の概略を図 3-5 に示す。本精製ではまず遺伝子操作により目的のタンパク質の C 末端側に TAP タグを発現させ、細胞破砕・遠心分離等の操作により目的タンパク質を含む粗精製サンプルを得た。次に粗精製サンプルを IgG ビーズと一定時間混合させた(Step 1)。IgG ビーズは免疫グロブリン G (IgG)をビーズ担体に結合させているもので、TAP タグの Protein A 領域と高い親和性を示す。そのため IgG ビーズには一部の非特異的吸着を除き、TAP タグを有する目的タンパク質のみが吸着する。IgG ビーズを洗浄することで不要なタンパク質を除いた後に TEV プロテアーゼと呼ばれる酵素を添加した(Step 2)。TEV プロテアーゼは TAP タグの TEV 切断領域を特異的に認識・切断する酵素であり目的タンパク質を IgG ビーズから切り離すことができる。その後 TEV プロテアーゼによって切り離されたタンパク質サンプルに Ca イオン存在下カルモジュリンビーズを添加した(Step 3)。このビーズにはカルモジュリンを結合させており、TAP タグに存在するカルモジュリン結合領域は Ca イオン結合時のカルモジュリンに対して高い親和性で結合する。この状態でカルモジュリンビーズを洗浄することで IgG ビーズを用いた精製で除ききれなかった不純物を取り除く。最後に EGTA など Ca イオンに対するキレート剤により Ca イオンを系中から除去し、カルモジュリンの構造を変化させることで目的タンパク質をビーズから遊離させた(Step 4)。

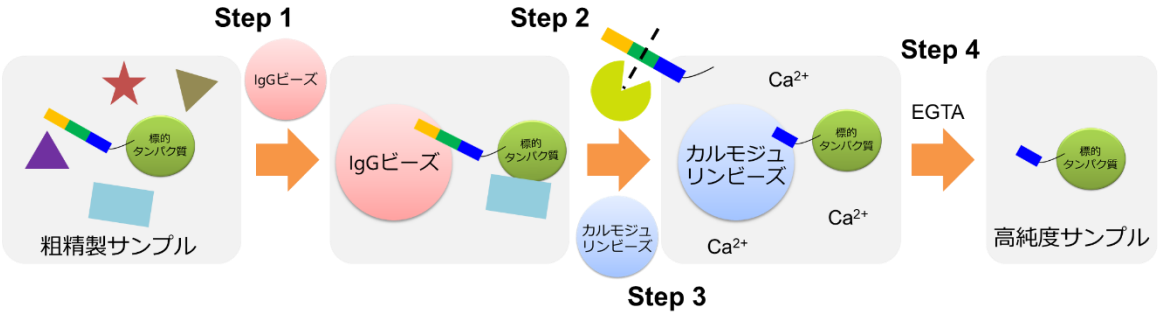


図 3-5：TAP タグ精製の流れ

以下に、酵母の培養と V-ATP アーゼの精製について詳細に述べる。TAP タグ精製の検討を行うにあたり、まず遺伝子操作によりサブユニット a の C 末端側に TAP タグを有する V-ATP アーゼを発現する酵母の培養に取り組んだ。なお、遺伝子組み換え酵母は筑波大学生命環境系 臼井健郎教授よりご提供していただいた[10,13,14]。天然型酵母の場合と同様の手順で培養したところ、概ね同程度の収率で目的の菌体が得られた。得られた菌体を図 3-1 の場合と同様に zymolyase 法により破砕後、遠心分離することで TAP タグを有する V-ATP アーゼの含有画分を得た。次いで TAP タグを有する V-ATP アーゼが活性を保持しているか確認を行った(図 3-6)。その結果、TAP タグ付き V-ATP アーゼを発現させた酵母においても、天然型酵母と同程度の V-ATP アーゼ活性が沈殿成分に観測され、TAP タグの導入による活性低下は見られなかった。

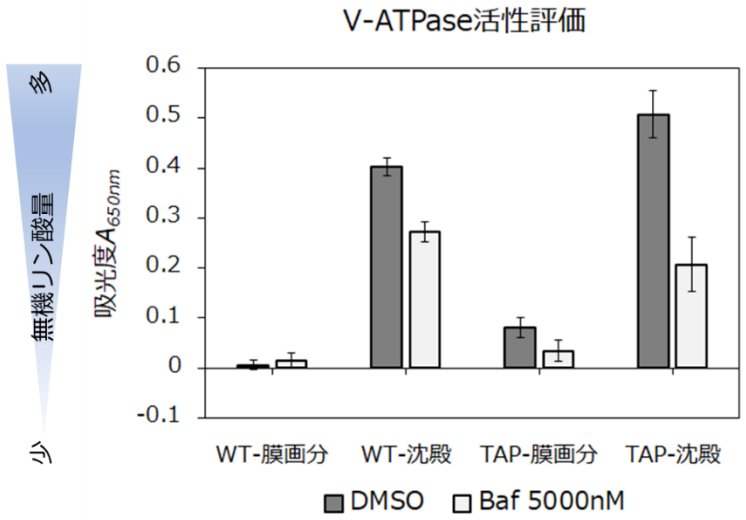


図 3-6：天然型および TAP タグ発現型 V-ATP アーゼの ATPase 活性

ATP アーゼ活性により生じた無機リン酸を、無機リン酸－マラカイトグリーン錯体の UV 吸収より定量した[n = 3]。WT：天然型酵母由来、TAP：TAP タグ付き V-ATP アーゼ発現型酵母由来

続いて得られた膜画分および沈殿成分についてウエスタンブロットによる解析を行った。ウエスタンブロットには先に得られた膜画分および沈殿成分に加え、後の TAP 精製を見据えてドデシルマルトシド(DDM)により可溶化した後に超遠心による分離操作を施したものについても評価した(図 3-7)。その結果、サブユニット a + TAP タグに相当する分子量(約 120 kDa)には発光が観測されず、約 20 kDa 付近にかすかな発光が観測された。これは TAP タグ単体の分子量に概ね相当することから細胞壁処理に用いた zymolyase などの影響により TAP タグが V-ATP アーゼより切り離されてしまったことが考えられる。また今回実施した zymolyase による V-ATP アーゼ含有画分単離法では一度に大量の酵母を処理することが困難であったので、大スケールでの処理が可能でなおかつ分解酵素を用いない V-ATP アーゼ含有画分単離法の検討を実施することにした。

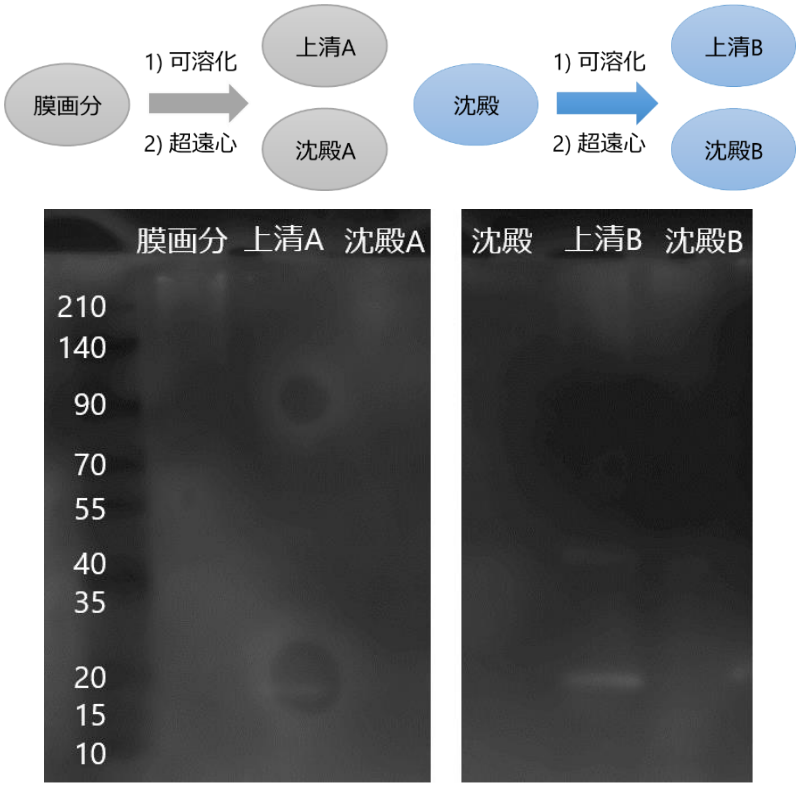


図 3-7：ウエスタンブロットによる TAP タグの検出

一次抗体に抗 TAP タグ抗体、二次抗体に抗ウサギ IgG を用い、Horseradish peroxidase(HRP)を利用した化学発光法により検出を行った。図中左の数字は分子量マーカーの位置を示している(単位は kDa)。

多量の酵母を得るために培養法の変更を検討した(図 3-8)。具体的には YPD 培地中で培養し、対数増殖期中に培地の成分を追加することで対数増殖期の延長をはかった。その結果、表 3-1 に示したように培地 1L あたりの菌体の収量が飛躍的に増加した。新規培養法により得られた菌体を zymolyase 法により破砕し、先ほどと同様にして V-ATP アーゼ活性を評価したところ(図 3-9)、活性は問題なく保持されていた。

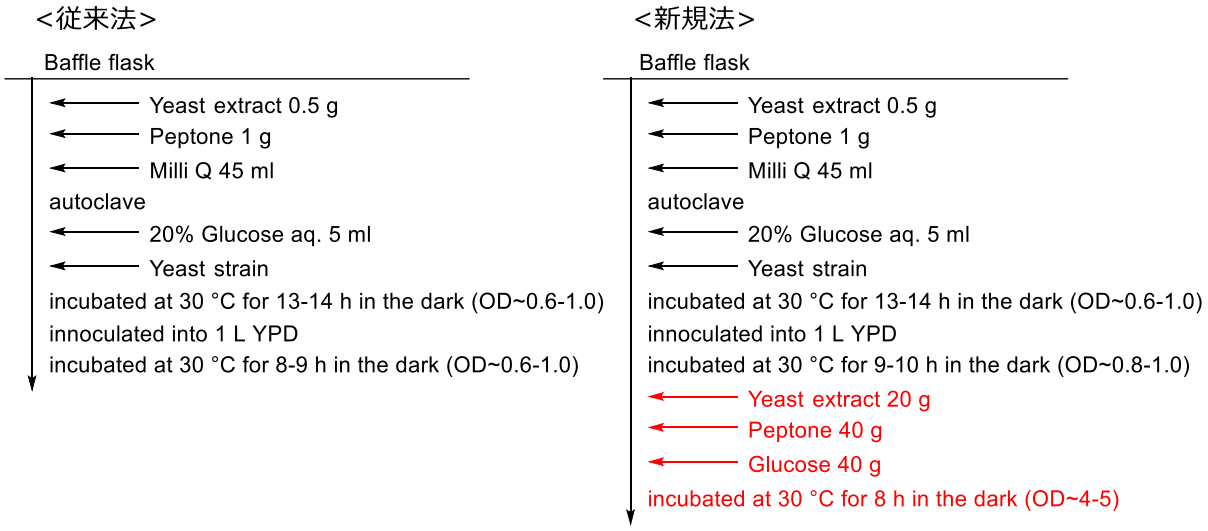


図 3-8：酵母培養法の検討

表 3-1：培養法変更に伴う酵母収量の変化

Method	培養時間[h]	収量
Previous	21 – 23	0.7 – 1.0 g / 1 L YPD
New	30 – 32	15 – 16 g / 1 L YPD

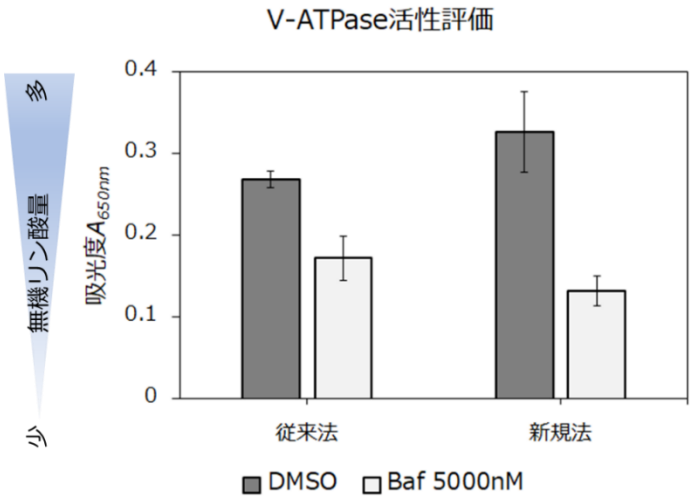


図 3-9：新規培養法より得られた V-ATP アーゼ含有画分の V-ATP アーゼ活性評価

続いて得られた菌体を用いて V-ATP アーゼの単離精製を試みた(図 3-10)。まず過去の報告[15,16]を参考にして、新規培養法によって得た菌体をガラスビーズにより破砕後、遠心分離により粗精製タンパク質試料を得た(図 3-11)。次いで得られた粗精製試料の TAP タグ精製を試みた(図 3-12)。具体的にはまず粗精製試料に IgG ビーズを混合させることで TAP タグをビーズに吸着させた(STEP1)。次いで TEV プロテアーゼを加え 4 °C で 16 時間撹拌した。なお過去の報告[15]では室温で 1~2 時間程度撹拌しているが、それでは反応が不十分であったので低温にすることでタンパク質の分解を防ぎつつ反応時間を延長させた。反応時間を延長することで TEV プロテアーゼによる切断は十分に進行した。その後、バッファーによりカラムを洗浄し、洗液をカルモジュリンビーズと混合させた。カラムを再び洗浄後、EGTA により系中からカルシウムイオンを除くことでタンパク質試料を溶出した。

ウエスタンブロットによる解析の結果、TAP タグ精製前の粗精製試料および TAP タグ精製後の画分に TAP タグを有するサブユニット a に対応する分子量のバンドが観測された。しかし、Ponceau を用いた全タンパク質の染色ではサブユニット a 以外のサブユニットに対応するバンドが明確に確認されなかった。この原因として単離精製を行っている過程で他のサブユニットがサブユニット a から乖離してしまったことが考えられる。

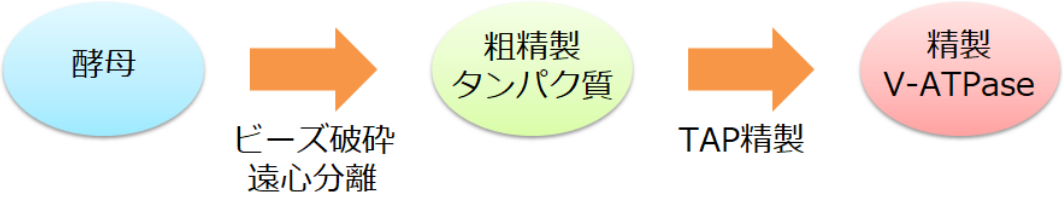


図 3-10：V-ATP アーゼ単離精製の流れ

実験スキーム(氷上または4度で実施)

- ← 酵母細胞
- ← 緩衝液 (25 mM Tris HCl pH7.5, 500 mM sorbitol, 2 mM EDTA; 0.2 ml/0.8 g酵母)
- ← プロテアーゼインヒビターカクテル (50 ml/1 g酵母)

13 ml丸底PP試験管に移す(1 ml/試験管)

- ← ガラスビーズ (0.7 ml)

ボルテックスと静置を10サイクル
(ボルテックス30秒　氷上静置30秒)
遠心分離 (3,000 rpm, 4度, 5分)
遠心分離 (15,000 rpm, 4度, 10分)
超遠心 (53,000 rpm, 4度, 2時間)

図 3-11：ビーズ破砕による粗精製タンパク質調製法

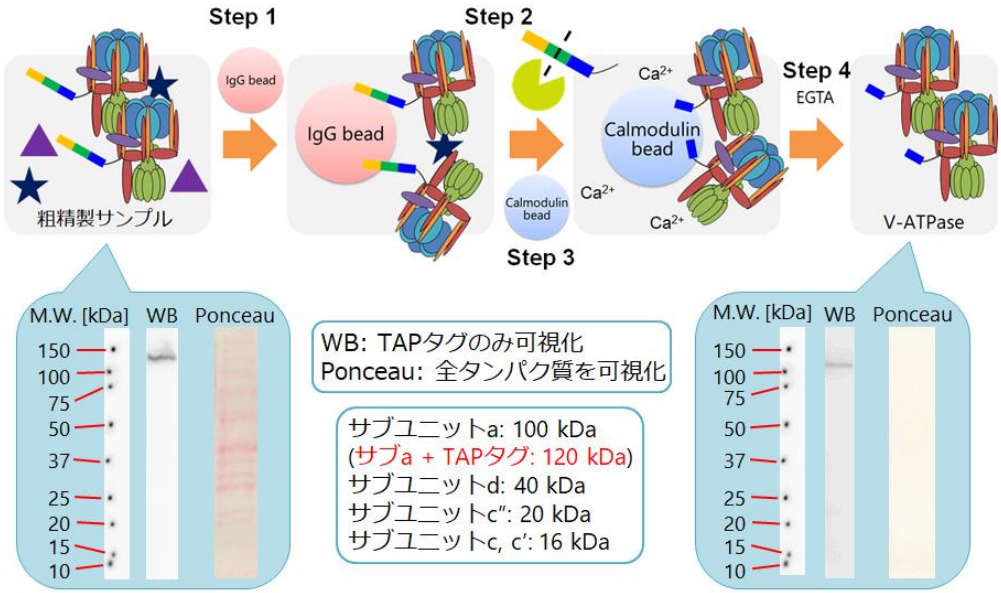


図 3-12：V-ATP アーゼの TAP タグ精製検討(I)

一次抗体に抗 TAP タグ抗体、二次抗体に抗ウサギ IgG を用い、HRP を利用した化学発光法により検出を行った。図中左の数字は分子量マーカーの位置を示している(単位は kDa)。WB: ウエスタンブロット、M.W.: Molecular weight

3-3　V_Oドメインの単離精製

そこで系をより単純化するべく、タンパク質試料として V-ATP アーゼ全体ではなく V_O ドメインのみを用いることにした。Couoh-Cardel らは V-ATP アーゼのサブユニット B を発現する遺伝子を欠損させた酵母より V_O ドメインを切り離せることを報告している[8]。そこで、サブユニット a に TAP タグを有し、なおかつサブユニット B をノックアウトした酵母株(Vph1-TAP Δvma2)を用いた V-ATP アーゼの単離精製を試みた。なお本酵母株についても筑波大学生命環境系 臼井健郎教授よりご提供いただいた[10,13,14]。先ほどと同様に Vph1-TAP Δvma2 を新規培養法により大量培養し、菌体をビーズ破砕することで V_O ドメインを含む粗精製サンプルを得た。続いて得られた粗精製サンプルを用いて TAP 精製を試みた(図 3-13、Entry 1)。今回の検討では V_O ドメインがカルモジュリンビーズに結合していることを確認するために、最終段階であるビーズからの溶出は行わず、ビーズの洗浄のみ行った。その結果、サブユニット a についてはカルモジュリンビーズに結合していることがウエスタンブロットより明らかになった。一方で銀染色により全タンパク質を可視化した際にはいずれのサブユニットに対応するバンドも明確には観測されなかった。

そこで次の検討では IgG ビーズによる精製工程を省略し、カルモジュリンビーズによる精製のみを試みた(図 3-13、Entry 2)。その結果、カルモジュリンビーズ上にサブユニット c、d などサブユニット a 以外のサブユニットに対応するバンドが観測された。この結果は、V_O ドメインがカルモジュリンビーズに結合していたことを示唆している。この結果を踏まえ、カルモジュリンビーズによる V_O ドメインの精製を試みた(図 3-13、Entry 3)。溶出条件として EGTA の濃度を 0.1 mM にして実験を行ったところ、溶出力が不十分であったために全てのサブユニットが同一のフラクションに溶出されなかった。そこで次の検討として EGTA の濃度を 10 mM まで増加させることで溶出力を高めたところ、同一のフラクションに全てのサブユニットが観測された(図 3-13、Entry 4)。一方で、洗浄操作が不十分であったために目的外のタンパク質もいくらか混合されてしまった。

以上の検討により酵母から V_O ドメインを単離することに成功した。今回確立した単離法では一度に数十 μg 程度のタンパク質が得られるため、本手法をより大スケールで複数回行うことで、固体 NMR 測定に必要な mg スケールでタンパク質試料を調製でき、さらなる解析につなげることが可能になると期待される。

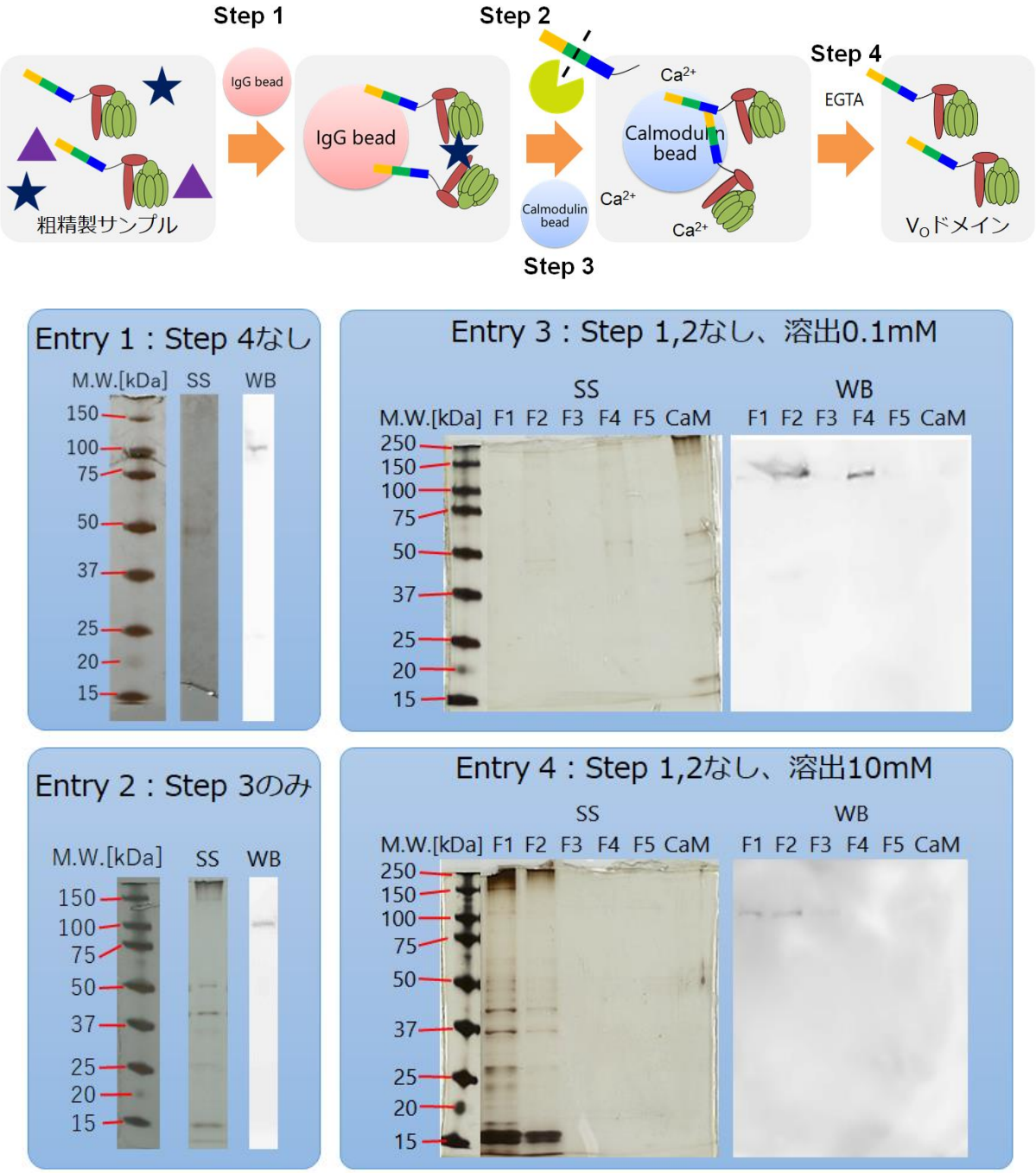


図 3-13 : V_Oドメインの TAP タグ精製検討

一次抗体に抗 TAP タグ抗体、二次抗体に抗ウサギ IgG を用い、HRP を利用した化学発光法により検出を行った。図中左の数字は分子量マーカーの位置を示している(単位は kDa)。WB: ウエスタンブロット、SS: 銀染色、F1~F5: 溶出フラクション、CaM: カルモジュリンビーズ、M.W.: Molecular weight

実験項

1．マテリアル

遺伝子組み換え酵母(Vph1-TAP および Vph1-TAP Δvma2)は筑波大学生命環境系臼井健郎教授よりご提供いただいた。WT 酵母としては BY23849 を使用した[17]。その他の試薬類は各種代理店において購入した。

2．酵母の培養

WT, Vph1-TAP および Vph1-TAP Δvma2 は寒天プレート上に一カ月おきに植え継ぎを行い、各種実験にはプレート上のコロニーを液体培地中でさらに培養したものを使用した[1,18]。

寒天プレートの作成は以下の手順で実施した。まず酵母エキスとペプトンを Milli-Q 水に溶解させたものに寒天を加え、オートクレーブ(121 °C, 20 分間)により滅菌した。その後、寒天培地が冷え固まる前に 20%グルコース水溶液(滅菌フィルターにより滅菌したもの)をクリーンベンチ内で加えることで YPD 培地を調製した。この培地をプレート容器に分注し、クリーンベンチ内で UV 照射したまま一晩静置した。なお各培地成分の最終濃度は酵母エキス 1%(w/v)、ペプトン 2%(w/v)、グルコース 2%(w/v)、寒天 2%(w/v)になるように調製し、一枚のプレートあたりおよそ 20 ml の培地を使用した。次に作成したプレート上に酵母のコロニーあるいは冷凍保存した酵母のグリセロールストックの一部を塗り広げ、遮光条件下 30 °C で静置した。プレート上に十分な数のコロニーを生成させた段階(およそ 2~3 日)でプレートを回収し、4 °C で保存した。

液体培地での培養は次の手順で実施した。まず酵母エキス 0.5 g とペプトン 1 g をバッフルフラスコ中で Milli-Q 水に溶解させたもの(最終容積 45 ml)をオートクレーブ(121 °C, 20 分間)により滅菌し、これに滅菌フィルターを通した 20%グルコース水溶液 5 ml をクリーンベンチ内で加えることで YPD 培地を調製した。この培地に酵母のコロニーを一つ加え、遮光条件下 30 °C、140 rpm で振盪培養した。対数増殖期に至った段階(OD_{600} ~ 0.6－1.0)でこの培地 12.5 ml × 4 を別途調製した YPD 培地 250 ml × 4 に移し、同条件で振盪培養した。対数増殖期に至った段階で培養を止め、遠心分離(3,000 rpm, 3 分, 室温)で集菌後、Milli-Q 水 50 ml で洗浄(Milli-Q 水で菌を懸濁後、同条件で遠心分離をかけ上清を破棄する)し-78 °C で冷凍保存した。大量培養の場合には、250 ml × 4 の YPD 培地での培養が対数増殖期に到達した段階で振盪培養を中断し、クリーンベンチ内で酵母エキス 5 × 4 g、ペプトン 10 × 4 g、グルコ

ース 10 × 4 g を YPD 培地に新たに添加した。同条件で振盪培養を再開し OD_{600} が 4 ~ 5 になった段階で菌体を遠心分離(3,000 rpm, 3 分, 室温)により回収、Milli-Q 水で洗浄し-78 °C で冷凍保存した。なおサブユニット B の欠落により V-ATP アーゼが不活性な Vph1-TAP Δvma2 の場合、通常の条件では増殖が著しく遅かったことから YPD 培地に 6 M HCl 溶液を添加することで pH を 5 程度に調節することで菌体の増殖を促進させた。

3. V-ATP アーゼ活性評価

V-ATP アーゼ活性評価は Uchida らの報告[1]を参考に酵母より V-ATP アーゼ含有画分を単離して実施した。まず対数増殖期まで培養した酵母を D バッファー[10 mM DTT in 100 mM Tris·HCl (pH9.4)]に懸濁し、30 °C で 15 分間、低速回転させながらインキュベートした。遠心分離(3,000 rpm, 3 分, 室温)の後に上清を捨て、S バッファー[1 M Sorbitol, 0.02% NaN_3 in 10 mM Tris·HCl (pH 7.0)]に懸濁させた。ここでこの懸濁液を別容器に 50 µl 分取した。その後 Zymolyase-20T を添加し(最終濃度 0.075%(w/v))、30 °C で 1 時間、低速回転させながらインキュベートした。Zymolyase 処理前後の溶液 50 µl に対してそれぞれ Milli-Q 水 1 ml を加えた後の OD_{600} の値を比較し、処理後の値が処理前の値の 10%以下になっていることを確認した。遠心分離(2,500 rpm, 3 分, 室温)で菌体を回収した後に S バッファーおよび 1%グルコースを含む S バッファーでそれぞれ一回ずつ洗浄した。これ以後の操作は全て 4 °C または氷上で実施した。まず洗浄した菌体に F バッファー[12%(w/v) Ficoll-400, 0.02% NaN_3 in 10 mM Tris·HCl (pH 7.0)]を加え、ダウンス型ホモジナイザーに移した。サンプル溶液をホモジナイズ(15 往復)した後に超遠心管に移し、超遠心による分離を行った(20,000 rpm, 1 h, 4 °C)。超遠心後、溶液上部に浮いている白い層およびペレットを回収し BCA 法によりタンパク質量を定量した後に V-ATP アーゼ活性評価に使用、もしくは-78 °C で冷凍保存した。

R バッファー[5 mM $MgCl_2$, 10 mM NH_4Cl, 5 mM NaN_3, 0.1 mM Na_3VO_4 in 25 mM Mes·Tris(pH 6.9)]、50 mM ATP 水溶液、およびマラカイトグリーン溶液[0.03%(w/v) Malachite green oxalate, 0.2%(w/v) $NaMoO_4$, 0.05%(w/v) Triton X-100 in 0.7 M HCl aq.]を事前に調製し氷上で冷却した。また Baf の DMSO 溶液(5 µM)を別途調製し、湯浴は 37 °C に設定した。その後、マイクロチューブ中で V-ATP アーゼ含有画分(タンパク質量 5 µg)、R バッファーおよび Baf 溶液(または DMSO)を全溶液量が 135 µl になるように混合し、氷上に静置した。ATP 水溶液 15 µl を添加させることで反応

を開始させ、37 °C の湯浴に 20 分間静置した。その後 0.6 M 過塩素酸を 150 µl 添加することで反応を停止させ、次いでマラカイトグリーン溶液 600 µl を添加し軽く混合させた後に室温で 40 分間静置した。最後に 650 nm の吸光度より Baf の存在・非存在下での無機リン酸生成量の差を観測した。なお本試験は反応時間に大きく影響を受けるため、ATP 溶液添加以降の操作は 1 サンプルにつき 20 秒間隔で実施し、全サンプルの反応時間を秒単位で厳密に統一した。

4. TAP タグ精製

TAP タグ精製は前述の方法で単離した V-ATP アーゼ含有画分もしくは酵母をガラスビーズにより破砕したサンプルを用いて実施した。

酵母のビーズ破砕は過去の報告[15,16]を参考に実施した。上述の方法で培養した菌体をプロテアーゼインヒビターカクテル(菌体 1 g に対して 50 µl)を含む緩衝液 A(25 mM Tris·HCl pH 7.5, 500 mM sorbitol, 2 mM EDTA)に懸濁させた。懸濁液をポリプロピレン製丸底試験管(13 ml)に 1 ml ずつ分注し、そこに約 0.7 ml のガラスビーズを加えた。30 秒間のボルテックスした後に 30 秒間氷上に静置する操作を計 10 回繰り返した。遠心分離(3,000 rpm, 4 °C, 5 min)後に上清を回収し、続く遠心分離(15,000 rpm, 4 °C, 10 min)により細胞壁などを取り除いた。最後に超遠心操作(53,000 rpm, 4 °C, 2 h)により V-ATP アーゼを含む画分を沈殿させ、ペレットとして得た。得られたペレットは使用まで-78 °C で冷凍保存した。

以後の操作は全て氷上または 4 °C で実施した。最初にタンパク質試料を 10 mg/ml になるように緩衝液 A で懸濁し、プロテアーゼインヒビターカクテルを添加した。その後、最終濃度が 0.6 mg DDM/1 mg protein になるように 20% DDM 水溶液を加え、1 時間ゆっくりと撹拌した。続いて超遠心(106,000×g, 4 °C, 1 h)を実施し、上澄みを回収した。

本段落の操作は IgG ビーズによる精製を行う場合のみ実施した。さきほど回収した上澄みに IgG sepharose beads 200 µl を加えて、4 °C で 2 時間回しながら反応させた。上澄みを捨て、緩衝液 I(10 mM Tris·HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% NP40) 1ml で 3 回、緩衝液 T(10 mM Tris·HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT) 1ml で 1 回 wash を行なった。緩衝液 T 1ml、TEV protease 10 µl を加え、4 °C で 16 時間回しながら反応させた。2,000 rpm、2 分遠心し、上澄みをカラムに移した。

得られた上澄みに 1 M $CaCl_2$ 水溶液を混合させた(最終濃度 4 mM)。次に、これを

前もって緩衝液 B(10 mM Tris·HCl pH 8, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.02% DDM, 2 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl)で洗浄しておいたカルモジュリンビーズ(Calmodulin Sepharose 4B, GE Healthcare)と共にカラム内で混合させ、一時間ゆっくりと撹拌した。その後、カラム内のビーズをカラム量の 20 倍の緩衝液 B で洗浄した。さらにビーズをカラム量の 20 倍の緩衝液 B'(10 mM Tris·HCl pH 8, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.02% DDM, 2 mM $CaCl_2$)で洗浄した後、バッファーB"(10 mM Tris·HCl pH 8, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.02% DDM, 0.5 or 10 mM EGTA)によりタンパク質試料を溶出した。各フラクションは SDS-PAGE による分離後、ウエスタンブロットにより解析した。

5. SDS-PAGE

SDS-PAGE に用いる試料は以下の要領で作成した。まずタンパク質試料を 1 ml の Milli-Q 水で希釈し、55%トリクロロ酢酸水溶液を 150 µl 添加後、氷上で 10 分間静置した。遠心分離(14,000 rpm, 4 °C, 10 min)により上澄みを取り除き、緩衝液 HU(8 M 尿素, 5% SDS, 0.1 mM EDTA, 15 mg/ml DTT, ごく微量のブロモフェノールブルー)で懸濁させた。65 °C で 10 分間静置した後に卓上遠心機により不溶成分を沈殿させ、上澄みを SDS-PAGE 用試料として使用した(1 レーンに対して 10 ~ 15 µl)。

電気泳動に使用するポリアクリルアミドゲルでは TGX™ FastCast™ アクリルアミド溶液(BioRad)を用いて作成した。また緩衝液は 25 mM Tris·HCl, 192 mM グリシン, 0.1%SDS を混合したものを 10 倍希釈して使用した。タンパク質試料を作成したゲルにアプライ後、200 V で 36 分間泳動させた。タンパク質試料を銀染色する場合には、Silver stain KANTO III (関東化学)を使用して得られたゲルを染色した。

6. ウエスタンブロット

ウエスタンブロットによる検出は以下の操作で実施した。まずゲル上のタンパク質試料を PVDF メンブレン上に転写させた後(10 V, 20 min)、5%スキムミルクを含む T バッファー(137 mM NaCl, 20 mM Tris·HCl pH 7.5, 0.05% Tween20)中でメンブレンを 1 時間振盪させることでブロッキングした。ここに終濃度 0.1%となるように抗 TAP タグ抗体を添加した。振盪後、T バッファーで三度洗浄し、0.01%の抗ウサギ IgG を含む T バッファーを添加し、室温で 30 分振盪した。T バッファーで三度洗浄した後に、メンブレン上にイモビロン(WBKL S0500, Merck)を均一に滴下し化学発光を ImageQuant LAS 500 (GE ヘルスケア)により観察した。また Ponceau での染色

を行う場合には、タンパク質試料を PVDF メンブレンに転写させた後、0.1%の Ponceau を含む 1%酢酸水溶液にメンブレンを浸し、5 分間振盪した。染色を観察した後に、1%酢酸水溶液で 2 回、水で 2 回洗浄することで Ponceau を取り除いた。ブロッキング以降の作業は前述の通りに実施した。

参考文献

[1] Uchida, E.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 1090-1095.

[2] Bowman, E. J.; Bowman, B. J. *Methods Enzymol.* **1988**, *157*, 562-573.

[3] Cidon, S.; Nelson, Nathan. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2892-2898.

[4] Väänänen, H. K.; Karhukorpi, E.-K.; Sundquist, K.; Wallmark, B.; Roininen, I.; Hentunen, T.; Tuukkanen, J.; Lakkakorpi, P. *J. Cell. Biol.* **1990**, *111*, 1305-1311.

[5] Kazami, S.; Takaine, M.; Itoh, H.; Kubota, T.; Kobayashi, J.; Usui, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 1944-1947.

[6] Grage, S. L.; Ulrich, A. S. *J. Magn. Reson.* **2000**, *146*, 81-88.

[7] Benlekbir, S.; Bueler, S. A.; Rubinstein, J. L. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1356-1362.

[8] Couoh-Cardel, S.; Milgrom, E.; Wilkens, S. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 27959-27971.

[9] Rigaut, G.; Shevchenko, A.; Rutz, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Séraphin, B. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 1030-1032.

[10] Puig, O.; Caspary, F.; Rigaut, G.; Rutz, B.; Bouveret, E.; Bragado-Nilsson, E.; Wilm, M.; Séraphin, B. *Methods* **2001**, *24*, 218-229.

[11] Tanny, J. C.; Kirkpatrick, D. S.; Gerber, S. A.; Gygi, S.P.; Moazed, D. *Mol. Cell. Biol.* **2004**; *24*, 6931-6946.

[12] Cestari, I.; Kalidas, S.; Monnerat, S.; Anupama, A.; Phillips, M. A.; Stuart, K. *Mol. Cell. Biol.* **2013**; *33*, 4872-4888.

[13] Usui, T.; Murai, T.; Tanaka, T.; Yamaguchi, K.; Nagakubo, D.; Lee, C. M.; Kiyomi, M.; Tamura, S.; Matsuzawa, Y.; Miyasaka. M. *Int. Immunol.* **2002** *14*, 1273-1282.

[14] Shiobara, T.; Usui, T.; Han, J.; Isoda, H.; Nagumo, Y. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e79954.

[15] Gerace, E.; Moazed, D. *Methods Enzymol.* **2015**, *559*, 37-52.

[16] Sattlegger, E.; Visweswaraiah, J.; Dautel, M. *Protoc. Exch.* **2018**, 62, 13-16.

[17] Brachmann, C. B.; Davies, A.; Cost, G. J.; Caputo, E.; Li, J.; Hieter, P.; Boeke, J. D. *Yeast* **1998**, *30*, 115-132.

[18] Bertl, A.; Slayman, C. L. *J. Exp. Biol.* **1992**, *172*, 271-287.

第4章　結論

本研究では脂溶性リガンドの一種として代表的な V-ATP アーゼ選択的阻害剤である Baf に着目し、Baf による V-ATP アーゼ阻害機構の分子基盤を明らかにすることを最終目標に掲げて種々の実験を実施した。

まず、Baf の結合部位が脂質膜中の V-ATP アーゼ膜貫通ドメインに存在することに着目し、Baf および活性の異なる Baf 誘導体について脂質膜環境下における物性・挙動解析を実施した。その結果、分子内水素結合に起因する Baf の特徴的な構造が V-ATP アーゼに対する親和性のみならず脂質膜に対する親和性の向上にも寄与しており、強力な V-ATP アーゼ阻害活性を生み出していることが示唆された。一般に脂溶性リガンドの活性発現機構は、リガンド分子と標的タンパク質との間の相互作用によって評価されており、膜親和性の構造的要因についてはこれまで深く議論されることは少なかった。本研究では、脂質二重膜への親和性がリガンド分子の活性に顕著な影響を及ぼしうることを明らかにすることができた。したがって、本研究で得られた知見、および確立された手法は、脂溶性リガンドの活性発現機構を正確に理解し、さらなる研究につなげるために必要不可欠なものであると考える。

また、本研究では固体 NMR により Baf－V-ATP アーゼ間の相互作用を解析する上で欠かせない V-ATP アーゼの単離精製法についての検討も行った。その結果、TAP タグを利用することで Baf の結合部位である V_o ドメインを単離精製することに成功した。本研究で確立した方法は、固体 NMR を基盤とした V-ATP アーゼの機能解析に道を開いた。具体的には、V-ATP アーゼ結合時の Baf の立体配座や Baf－V-ATP アーゼ間相互作用の詳細な様式など Baf による V-ATP アーゼ阻害機構、ひいては V-ATP アーゼ自身の機能を解明することにつながると期待される。

謝辞

本研究において遺伝子組み換え酵母のご提供ならびにタンパク質の単離精製実験について多大なるご助言を賜りました筑波大学生命環境系 臼井健郎教授に深く感謝いたします。

本研究は大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻 生体分子化学研究室において行われたものであり、終始御指導、御鞭撻頂きました村田道雄教授に深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり副査として多大なる御助言を頂きました本学理学研究科 化学専攻 久保孝史教授、ならびに本学蛋白質研究所 高尾敏文教授に深く感謝いたします。

実験の実施に際して直接御助言および御指導頂きました土川博史助教に深く感謝いたします。

本研究を行う上で親身に御指導頂きました花島慎弥講師、梅川雄一特任助教に深く感謝いたします。

日々の実験において多大な御指導頂きました柴田一博士、安川佳史博士に深く感謝いたします。

研究生活において様々な面で支えてくださいました研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に経済的、精神的に支えてくださいました家族に深く感謝いたします。

付録

公表論文

1. Small structural alterations greatly influence the membrane affinity of lipophilic ligands: Membrane interactions of bafilomycin A_1 and its desmethyl derivative bearing ^{19}F-labeling. **Hayashi, T.**; Tsuchikawa, H.; Umegawa, Y.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1677-1682.

参考論文

1. Modification of Bafilomycin Structure to Efficiently Synthesize Solid-State NMR Probes that Selectively Bind to Vacuolar-Type ATPase. Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; **Hayashi, T.**; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Asian. J.* **2015**, *10*, 915-924.

2. Site-specifically fluorinated bafilomycin analogue at the pharmacophore macrolactone ring has potent vacuolar-type ATPase inhibitory activity. Tsuchikawa, H.; **Hayashi, T.**; Shibata, H.; Murata, M.; Nagumo, Y.; Usui, T. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2426-2429.