

電位依存性チャネルの完全化学合成と新機能創製

井上 将行

東京大学大学院・薬学系研究科

我々の神経の細胞膜に存在するイオンチャネルは、リガンドや電気的刺激により迅速に開閉が制御され、特定の無機イオンを選択的に透過させる。神経細胞はこの基本構成分子を巧妙に使い、信号伝達を制御する。巨大かつ高機能な膜タンパク質であるイオンチャネルの分子量は、一般に 10 万を超える。

ポリセオナミド B (1) は、伏谷・松永らによって、海綿 *Theonella swinhoei* より単離・構造決定された天然有機化合物である(図 1)。現在までに知られるペプチド天然物の中で、最大の分子であり(分子量 5000)、培養癌細胞に対して、イオン透過に由来する強力な毒性を示す。多くの非タンパク質構成アミノ酸を含む 48 残基が D 体, L 体交互に並ぶことが、最大の構造的長である。この特異なアミノ酸ユニットの存在と配列によって、タンパク質にはないフォールディング様式であるβ-ヘリックスを形成する。結果的に、長さ 3 nm・内径 0.4 nm の細胞膜貫通型ナノチューブとなり、単分子でイオンチャネル機能をもつ。また、一価カチオンの自由な透過の際に、電位依存性を示すことが知られる。我々は、1 が一般的イオンチャネルタンパク質に比べて、10 分の 1 以下の分子量でありながら類似の機能を有することに着目し、1 を分子基盤とした有機合成化学によるチャネル機能の構築と人工制御を計画した。まず、1 に含まれる多くの非タンパク質構成アミノ酸などの部分構造と、細胞毒性・ナノチューブの構造安定性・チャネル挙動との関係の解明を第一の研究目的とした。さらに、得られる構造-機能相関の合理的デザインへの活用による、チャネル機能の人工制御を第二の目的とした。すなわち、化学物質・光・電位変化などの外部刺激に応答する部位の有機合成化学的な付加による、新たな人工制御チャネル、選択的細胞毒性物質の創造を計画した。以上の研究には、1 の効率的な分子供給が最も重要な研究基盤となる。本講演では、ポリセオナミド B の世界初の化学合成を主に紹介する。

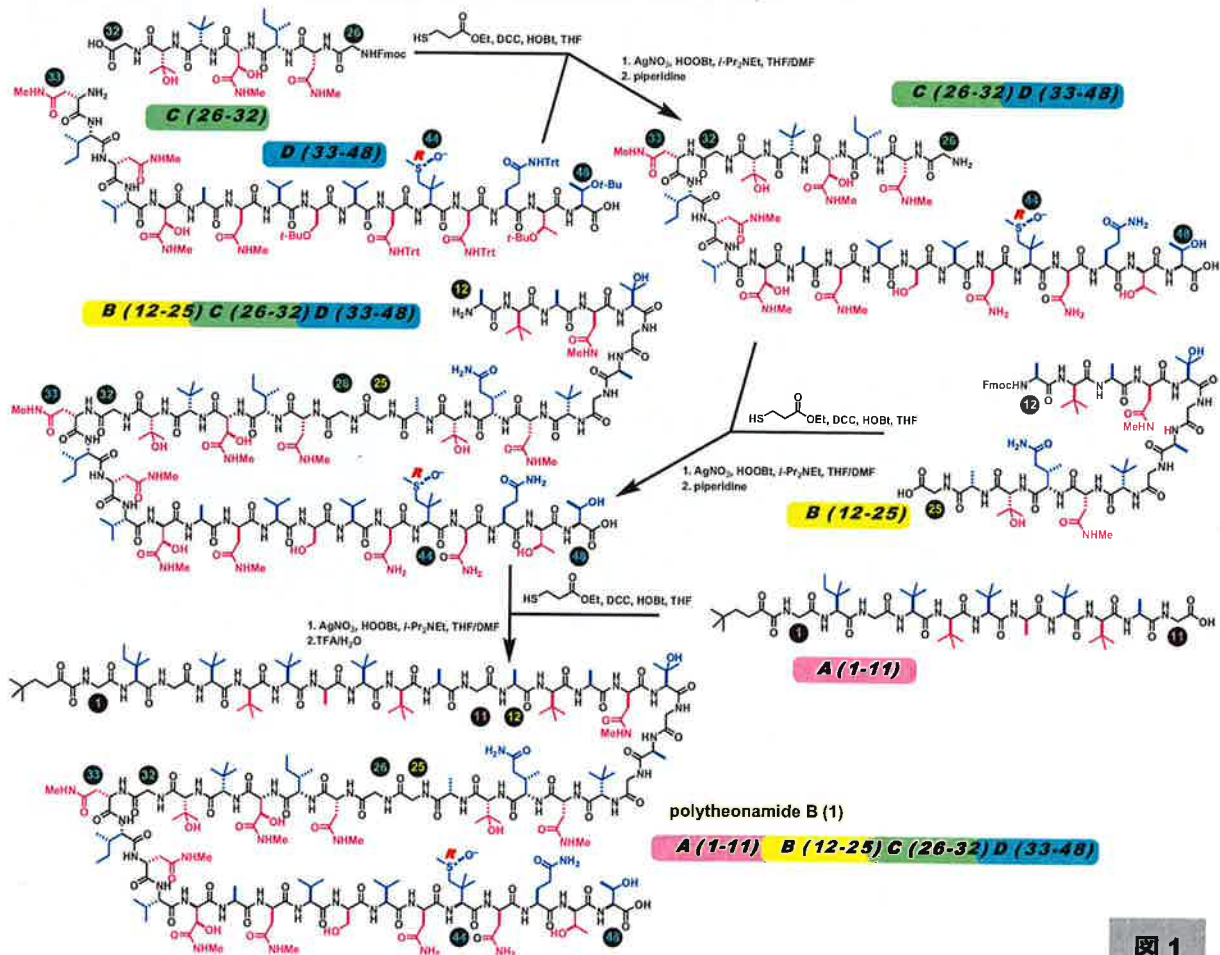


図 1

非リボソーム由来ペプチドは、通常の遺伝子にコードされていないことから遺伝子発現による調達は極めて困難であり、有機化学的構築が唯一の大量供給方法である。我々は、1 とその合成類縁体の詳細な機能解析、さらに新機能付与を実現するため、柔軟かつ収束的な合成戦略を立案した。すなわち、アミノ酸・ペプチド部分構造・ポリセオナミド B 全体構造の三種の階層構造に合成戦略を分割した。自動固相合成した非タンパク質構成アミノ酸を含むペプチド部分構造を順次連結し、全合成を達成する計画である。本戦略は、自由自在なアミノ酸の置換、ペプチド部分構造の置換を可能にし、合成類縁体の網羅的構築に適している。

まず、1 に存在する数多くの非タンパク質構成アミノ酸に対して、それぞれ異なるルートを開発し、合成した。特に、1 にのみに含まれる特徴的なアミノ酸である、*R*-スルホキンドを有する第 44 番目残基に対して新たな合成ルートを開発し、その不斉合成を果たした。

合成した非タンパク質構成アミノ酸を含むペプチドを自動固相合成機により調達した。その際、担持するポリマー・アミノ酸の縮合条件・ペプチドの長さ等を、最適化した。15 残基以上のペプチドの合成では、収率が極端に低下したため、48 残基のポリセオナミド B の全体構造を 10 残基程度の 4 大フラグメント [A(1-11), B(12-25), C(26-32), D(33-48)] に分割した(図 1)。フラグメント連結反応の効率を考慮し、各フラグメントの C-末端(第 11, 25, 32 番目残基)は、連結反応の際にラセミ化する可能性がない Gly とし、N-末端(第 12, 26, 33 番目残基)は、立体的に小さいアミノ酸を配置した。また、フラグメント D(33-48)は、多くの極性官能基を含むため、アルコールを *t*-ブチル(*t*-Bu)基で、第 1 級アミド基をトリフェニルメチル(Tr)基で保護した。以上のように設計したフラグメント A(1-11), B(12-25), C(26-32), D(33-48)の Fmoc 法による固相合成に成功した。

合成した 4 大フラグメントの連結反応を検討した。フラグメント同士の連結は、一般的なアミノ酸縮合条件では、極めて困難であった。例えば、自動固相合成と同様な条件では、フラグメント縮合は、まったく進行せず、より強力な連結法が必要となった。そこで、相本らによって開発されたチオエステルを経由する連結法を適用した。フラグメント C(26-32)の C-末端のカルボン酸をチオエステルへと誘導し、フラグメント D(33-48)存在下、銀塩で処理すると、全体構造の半分に相当する CD(26-48)が高収率で得られた。続いて、CD(26-48)をチオエステル化した B(12-25)と連結し、BCD(12-48)を合成した。さらに、チオエステルへと誘導した A(1-11)を BCD(12-48)と縮合し、ポリセオナミド B 保護体の合成に成功した。最後に、計 6 個の保護基を、酸条件で同時除去し、非リボソーム由来の最大のペプチドであるポリセオナミド B の世界初の全合成を達成した。本研究で開発した合成戦略は、他の誘導体の創出にも極めて有効であった。

柔軟かつ収束的な全合成ルートの開発は、フラグメントの機能評価を初めて可能にした。全合成した 1 と、フラグメントの細胞毒性を評価した(図 2)。その結果、ポリセオナミドは、強力な毒性(72 pM)を示したが、その他のフラグメントはほとんど活性を示さなかった。またチャネル機能の評価をした結果、フラグメントは細胞膜にイオンを透過させないことがわかった。以上の結果から、ポリセオナミドの全体構造の毒性・チャネル機能への重要性が初めて明らかになった。

分子量 5000 の巨大ペプチドであるポリセオナミド B の全合成ルートの開発を達成した。本合成では、728 原子の三次元的配列を有機合成化学により完全制御したことになる。結果的に、アミノ酸・ペプチド部分構造・全体構造の階層に分けた合成戦略が極めて有効であった。ポリセオナミドのチャネル機能の原子レベルでの解明と、本分子を構造基盤とした有機合成化学的な新機能付与・創造に向けて、現在研究を進めている。

発表論文

1. Inoue, M.; Shinohara, N.; Takahashi, T.; Tanabe, S.; Mizoguchi, Y.; Okura, K.; Itoh, H.; Iida, M.; Matsuo, S. manuscript in preparation.

P388 (mouse leukemia) cytotoxicity	EC ₅₀ (nM)
A (1-11) B (12-25) C (26-32) D (33-48) polytheonamide B (1)	0.072
A (1-11)	>22,300
B (12-25)	1,500
C (26-32)	>8,000
D (33-48)	2,050
A (1-11) B (12-25)	>2,000
C (26-32) D (33-48)	1,040
B (12-25) C (26-32) D (33-48)	864