人工イオンチャネルペプチドの設計・合成・機能解析

## 東大院薬 〇伊藤寛晃、松岡茂、井上将行

【序論】ポリセオナミド<sup>1)</sup>は、八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* から単離・ 構造決定された、分子量が 5000 を超える非リボソーム由来の巨大ペプチ ド天然物であり、マウス白血病細胞 p388 に対して非常に強力な細胞毒性 を示す。ポリセオナミドは、多数の非蛋白質構成アミノ酸を含む 48 残基 の D,L-アミノ酸が交互に配列する特異な一次構造を有する。また、有機溶 媒中で内径 4 Å,長さ 45 Å の $\beta^{6.3}$ -ヘリックス構造をとり(Figure 1)<sup>21</sup>、脂質二 重膜中でイオンチャネルを形成する <sup>3)</sup>。このチャネルは整流性を示すこと から <sup>3)</sup>、ポリセオナミドが一方向から挿入し、形成した $\beta^{6.3}$ -ヘリックスが 単分子で膜を貫通するチャネルモデルが提唱されている <sup>2.3)</sup>。

ポリセオナミド B の全合成は当研究室において達成された<sup>4)</sup>。しかし、 非蛋白質構成アミノ酸合成に 58 工程を要し、全工程数は 162 工程である ため、ポリセオナミド B および合成誘導体の大量供給による詳細なイオン



**Figure 1.**  $\beta^{6.3}$ -Helix structure of polytheonamide B<sup>5)</sup>.

チャネル機能の解析と応用は 困難である。そこで我々は、 ポリセオナミドを構造基盤と した、新規人工イオンチャネ ルペプチドの創製研究に着手 した。

【計画】最初の合成標的とし て、ダンシル化ポリセオナミ ドミミック(1)を設計した (Figure 2)。分子設計にはイオ ンチャネル形成に重要である と予想されるβ<sup>6.3</sup>-ヘリックス

形成能を維持した上で、1) 合成工程数の短縮、2) 人工機能部位の導入の2点の実現を目指した。まず 1)を達成するために、ポリセオナミド配列内で多数 の合成工程を要するアミノ酸を、市販もしくはより 合成工程の短いアミノ酸に置換した (Figure 3)。こ の際、ポリセオナミドの安定なβ<sup>63</sup>-ヘリックス形成 要因と予想される主鎖および側鎖水素結合<sup>2)</sup>を保存 するようにアミノ酸を単純化した。また、2)の達成 のために第44 残基には側鎖アルキンを導入した。

この側鎖は後のクリックケミストリー<sup>6</sup>を用いた修飾によって、ダンシル基だけではなく種々の人工機 能部位を網羅的に導入するための足掛かりとした。



Figure 2. Structure of dansylated polytheonamide mimic (1).



*Figure 3.* Substituted amino acids for solid-phase peptide synthesis. Top: polytheonamide B, bottom: **1**. The number in parentheses indicate the required synthetic steps from commercially available materials.

【方法・結果・考察】配列に含まれる非蛋白質構成アミノ酸は、全て N<sub>α</sub>-Fmoc アミノ酸として調製した。な お、ポリセオナミド B の全合成で問題の一つであった自動固相合成収率とペプチドセグメントの溶解性を改 善するため、側鎖メチルアミドを有するアミノ酸として、2,4,6-トリメトキシベンジル基(Tmb)を導入した 9 を用いることにし、これを計 6 工程で調製した(Figure 3)。続いて調製したアミノ酸を用い、ペプチドセグメ ントの自動固相合成を行った(Scheme 1)。2-クロロトリチル樹脂を用い、側鎖保護基を残して樹脂から切断す



## Scheme 1. Total synthesis of 1.

ることで、第12-48 残基セグメント 17 を総収率1%で合成することに成功した。この17 は、続くクリックケ ミストリーによりダンシル化し、18 とした。また Wang 樹脂を用いた固相合成と続く液相でのチオエステル 化により、総収率7%で第1-11 残基セグメント15 を合成した。15 と18 を銀イオンを用いて連結し、2 を得 たのち<sup>7)</sup>、酸性条件下全ての保護基を同時に除去することで、総工程数128 にて1 の全合成を達成した。

合成した 1 の p388 に対する毒性試験を行ったところ、ポリセオナミド B (IC<sub>50</sub> = 0.30 nM)と比較して 1/50 程度に減弱したものの、依然として強力な毒性(IC<sub>50</sub> = 13 nM)を有することが明らかになった。また、100 mM

塩酸水溶液中で単一チャネル測定を行い、コンダクタンスが正電 位で 31.9 pS, 負電位で 51.9 pS の弱い整流性を示す H<sup>+</sup>チャネルを 形成することを見出した(Figure 4)。さらに、1 のリポソーム内で の蛍光波長を測定することで、導入したダンシル基が膜表面と水 の境界領域に位置することが分かった。これらの結果は、1 が単 分子で細胞膜に挿入し、チャネルを形成することで細胞毒性を発 現することを示唆した。

【結論】我々は本研究において、ポリセオナミドBから合成工程 数を34工程短縮した人工分子1の全合成を達成した。また1が p388マウス白血病細胞に対し細胞毒性を示し、脂質二重膜中にて 整流性を有するH<sup>+</sup>チャネルを形成することを見出した。





【参考文献】1) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Yano, G.; Fusetani, N. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 110-118. 2) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Fujiwara, M.; Fujita, K.; Hirota, H.; Schmucki, R.; Güntert, P.; Fusetani, N. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 12941-12945. 3) Iwamoto, M.; Shimizu, H.; Muramatsu, I.; Oiki, S. FEBS Lett. 2010, 584, 3995-3999. 4) Inoue, M.; Shinohara, N.; Tanabe, S.; Takahashi, T.; Okura, K.; Itoh, H.; Mizoguchi, Y.; Iida, M.; Lee, N.; Matsuoka, S. Nature Chem. 2010, 2, 280-285. 5) Image from the RCSB PDB (www.pdb.org) of PDB ID 2RQO (ref. 2) created with The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1, Schrödinger, LLC. 6) Kolb, H. C.; Finn, M. G; Sharpless, K. B. Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2004-2021. 7) Aimoto, S. Biopolymers 1999, 51, 247-265.