

論文内容要旨（和文）

平成24年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏名 菊池 真理



論文題目 海綿由来環状デプシペプチド callipeltin B の全合成と構造活性相関研究

海綿由来の天然物は抗菌活性や細胞毒性などを示すものが多く、その新規な構造から薬剤開発のリード化合物として期待されている。1996年、海綿 *Callipelta* 種から強い抗 HIV 活性、抗菌活性を示す異常アミノ酸含有環状デプシペプチド callipeltin A が単離・構造決定された。Callipeltin A は鎖状部と環状部から構成されるが、生物活性発現に必要なモチーフは明らかにされていない。そこで筆者は callipeltin A の環状部にあたる callipeltin B に着目した。Callipeltin B は幅広い細胞毒性を示すものの、他の海綿由来環状デプシペプチドと比較して唯一鎖状部を有していない。一方で海綿 *Latrunculia* 種より2002年に直鎖ヘキサペプチド callipeltin E, 2007年に直鎖オクタペプチド callipeltin M が単離・構造決定されており、それぞれ callipeltin B の部分構造を有する。特に callipeltin M は生合成の過程において callipeltin B との相関があると示唆される。これら callipeltin 類の全合成ならびに生物活性に関する詳細な研究は進んでいないことから、筆者は構造活性相関研究への適用も視野に入れた合成法の確立を目指し、Fmoc 固相合成法と液相法を用いた callipeltins E, M および B の全合成とそのアナログ体の合成を検討した。さらに、得られたペプチドは HeLa 細胞に対する毒性評価を行い callipeltin 類の構造活性相関研究へと展開した。

Callipeltin 類を構成するアミノ酸のうち、Fmoc-L-Leu-OH ならびに Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH は市販のものを用いることにし、その他の入手が困難な異常アミノ酸については合成を試みた。既報に従い、対応する Fmoc-アミノ酸から2工程で Fmoc-L-MeAla-OH, Fmoc-L-MeGln-OH をそれぞれ導き、Fmoc-(2R,3R)-D-βMOY(MEM)-OH はジアステレオ選択的手法を用いて9工程で得た。H-D- α Thr-OH は、Yajima らの方法を参考に安価な H-L-Thr-OH を原料とした改良合成法を見いだすことに成功し、Fmoc-D- α Thr-OH、さらに Fmoc-D- α Thr(tBu)-OH へと導いた。また、(2S,3S,4R)-dimethylpyroglutamic acid (pDME) は L-pyroglutamic acid または L-serine から考えられる4つのジアステレオマーを合成し、¹H NMR スペクトルと安定配座解析のデータを比較することで天然物の立体化学を確認した。

構成するアミノ酸を全て入手した後、まず callipeltin E の合成を行った。2-クロロトリチルクロリド樹脂

を選択し、C 末端から N 末端へと合成を進めた。Fmoc-L-MeAla-OH を樹脂に担持した後、カップリング剤に HATU/HOAt または PyBOP/HOBt を用いて Fmoc-D- β MOY(MEM)-OH, Fmoc-L-MeGln-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D- α Thr-OH を順次縮合した。樹脂からの切り出し後、TFA/CH₂Cl₂ 条件下処理することで callipeltin E を得た。さらに Fmoc-D- α Thr(*t*Bu)-OH と pDME をペプチド鎖に組み込み、脱保護することで callipeltin M の最初の全合成に成功した。一方で、callipeltins E, M の合成時に副産物の生成が確認されたため、その副成したペプチドの解析を行った。¹H NMR, MS によるフラグメント解析、Sanger 法を用いたアミノ酸分析から、 β MOY 部が β Ala に置換されたペプチドであることが明らかとなった。このペプチドが得られた要因は、H-D- β MOY(MEM)-OH の Fmoc 化の過程で β Ala が副成するためであった。

次に、callipeltin B の合成に向けてモデルペプチドを用いた環化、脱保護反応を検討した。環化部位を Thr-Arg とすると MeAla 含有時にジケトピペラジンが生成し、 β MOY-MeAla とした場合環化時に副反応が生じるため callipeltin B へと導くことは困難だった。そこで、callipeltin M 誘導体を用いたデプシ部(MeAla と D- α Thr) での環化を経て callipeltin B への変換を試みた。環化条件を探索した結果、DIPCDI/DMAP/DMF, 45°C の条件でマクロラクトン化が進行することを確認し、保護 callipeltin B へと導くことができた。さらに、10% TIPS/TFA で処理することで callipeltin B を得ることに成功した。得られたスペクトルデータは天然物と一致することを確認し、全合成を達成した。

合成した callipeltins B, E および M に加え、天然 callipeltin B と得られた14種の直鎖、環状ペプチドについて HeLa 細胞に対する毒性評価を行った。その結果、callipeltin B を含む全ての合成ペプチドにおいて毒性は0~20%程度であった。しかし、天然 callipeltin B のみに CC₅₀=130 μ M の毒性が見られたため解析したところ、天然 callipeltin B 中にわずかに callipeltin C の混入が示唆された。このことから、callipeltin B の毒性の由来は callipeltin C にあるものと推測された。

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成27年 2月 9日

理 工 学 研 究 科 長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 今野 博行

副査 佐藤 慎吾

副査 伊藤 和明

副査

副査



印

印

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	バイオ工学専攻 バイオ化学分野 氏名 菊池真理		
論文題目	海綿由来環状デプシペプチド callipeltin B の全合成と構造活性相関研究		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	平成27年 1月28日～ 平成27年 2月 6日
論文公聴会	平成27年 2月 6日	場所	工学部3号館3-2307教室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	平成27年 2月 6日

学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)

海綿由來の天然物は様々な生物活性を示すものが多く存在し、その新奇な化学構造から医薬品創製のリード化合物として注目されている。本論文では環状デプシペプチド callipeltin B に着目し、その化学構造の解明と創薬研究への橋渡しと成りうる効率的な合成ルートの開拓を主眼に置き研究を展開している。

第1章では研究の背景や環状デプシペプチド類に関する研究の動向について詳細に述べられている。そこから問題点を指摘し、本論文研究に着手するまでの道筋について議論している。第2章では研究計画が綿密に練られており、誘導体合成がスムーズに行えるように工夫がなされている。環状デプシペプチド callipeltin B の合成戦略として dimethylpyroglutamic acid の立体構造の確認、D-allothreonine の実践的調製法、Fmoc-固相合成法を駆使した callipeltin E と M の効率的合成法の開発さらに環化部位の探索が必要と判断し計画している。続く第3章では、実際の合成について詳細に説明している。Dimethylpyroglutamic acid の立体構造の確認のため4つのジアステレオマーを作り分け、スペクトル等の詳細な解析から天然体を(2S, 3S, 4R)と決定した。また D-allothreonine の効率合成法の開発では安価な L-threonine の α 位異性化反応と t-ブチル基の位置選択的脱保護反応を鍵反応に用いている。その後、Fmoc-固相合成により callipeltin E ならびに M の合成を達成し、callipeltin 類のペプチド鎖伸長法を確立している。さらに様々な部位での直鎖ペプチドの環化反応を検討し、構成アミノ酸に依存して最適環化部位が異なることを見出している。特に callipeltin B に関しては C 末端カルボン酸と D-allothreonine の水酸基での環化という生合成模倣型方法論の確立に成功し、過去に例を見ない素晴らしい成果であった。さらに合成品ならびに天然品を用いた細胞毒性試験を行い、結果として callipeltin B には細胞毒性がなく callipeltin C の混入がその活性本体であることを突き止めている。この事実は過去の報告を覆すものであった。以上の結果は今後の医薬品創製研究へ向けた大きな足がかりとなり、その応用が期待できるものと結論づけている。

本研究の成果は、5報の学術論文（英文）に掲載され、当該専攻の審査基準を満たしている。以上より、博士（工学）の学位論文として価値と水準を十分に満たしており、合格と判断した。

最終試験の結果の要旨

本学の規定に従い、主査及び副査2名が同席した学位論文に関する40分の口頭発表、ならびに20分の質疑応答を最終試験とした。研究の背景、目的、研究結果と考察に至るまでの内容について明確な説明を行った。そこから導き出された結論は合理的であり十分納得のいくものであった。また質疑応答では本論文に関する様々な質疑に対して的確で丁寧な回答を行った。以上のことから、博士（工学）として必要とされる専門知識および研究能力を十分に備えているものと判断し、最終試験を合格と判定した。