

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01821

研究課題名(和文) 標識化バフィロマイシン誘導体の合成を基盤とした液胞型ATPアーゼ阻害機構の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of bafilomycin bound to V-ATPase for elucidating its inhibition mechanism based on synthetic chemistry

研究代表者

土川 博史 (Tsuchikawa, Hiroshi)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：30460992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では液胞型プロトン - A T P アーゼ (V-ATPase) を特異的に阻害するバフィロマイシン (Baf) に着目し、化学合成を基盤とした複合体構造解析を実施することで、阻害機構の解明を目指した。まず固体NMR測定に必須となるフッ素標識化Bafの合成および活性評価を行い、活性を保持した誘導体の創生に成功した。続いて合成した活性誘導体と不活性誘導体の脂質膜中での挙動解析を行った結果、顕著な運動性の違いを見出し、これが異なる活性の強さの要因である可能性を初めて示唆することに成功した。さらにV-ATPase含有試料を調製し、合成したフッ素標識化Bafを用いた固体NMRによる複合体構造解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：The structural analysis of bafilomycin (Baf), a specific inhibitor towards vacuolar-type ATPase (V-ATPase), was performed based on synthetic chemistry. First, the preparation of bioactive ¹⁹F-labelled Baf required for solid-state NMR measurement was achieved by synthesizing several Baf derivatives and evaluating their V-ATPase inhibitory effect. Next, behavior analysis of active and inactive F-Baf derivatives in model membrane resulted in finding the remarkable difference of their mobility, which may probably relate to the difference of their activity. Moreover, a large-scale preparation of V-ATPase as proteoliposomes was successfully accomplished and the structural analysis of F-Baf bound to V-ATPase was examined by solid-state NMR.

研究分野：ケミカルバイオロジー、合成有機化学

キーワード：バフィロマイシン ATPアーゼ フッ素標識 化学合成 構造解析 固体NMR

1. 研究開始当初の背景

液胞型プロトン-ATPアーゼ (V-ATPase) は、あらゆる真核生物の内膜系に存在する普遍的な膜タンパク質であり、ATP加水分解により生じたエネルギーを利用し、膜貫通部位 V_0 を介してプロトンの能動輸送を行っている。V-ATPase は、タンパク質の輸送・分解など種々の生命現象において重要な役割を担っているだけでなく、破骨細胞や腫瘍細胞の細胞膜にも多く発現し、本酵素の異常が骨粗鬆症やガン転位の原因の一つであると考えられている。そのため、古くからその機能と構造を結びつける構造生物学的研究が精力的に行われてきたが、その構成サブユニットの複雑性や高い不均一性から、特に膜貫通部位である V_0 ドメインについて、その詳細は未だに明らかにされていない。このような状況下、V-ATPase の特異的阻害剤は、これらの構造・機能解析において大きな役割を果たしており、さらに V-ATPase を分子標的とした新規薬剤開発の面からも注目を集めている。その中でもバフィロマイシン (Baf, 図 1) は代表的な V-ATPase 阻害剤であり、その特異的かつ強力な活性から阻害機構に関する研究が現在までに数多く行われてきた。しかしながら現状は、 V_0 ドメインのサブユニット c に結合することが示唆されている程度であり、その結合部位や相互作用の詳細は依然として不明のままである。この最大の要因として、前述したように膜タンパク質である V-ATPase の高い複雑性と不均一性が、有力な構造解析手法である X 線結晶構造解析や溶液 NMR の適用を困難にしていることが挙げられる。特に Baf の推定結合部位である V_0 ドメインについては、その構造解析への突破口も見出されていない状況といえる。

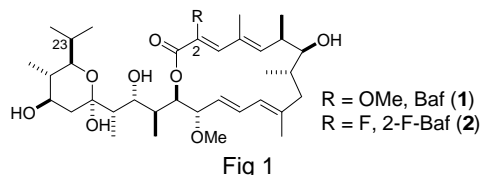
2. 研究の目的

そこで本研究では、視点をタンパク質側では無く、リガンド分子 (Baf) 側に切り替えてアプローチすることを考えた。すなわち、このような膜タンパク質系において威力を発揮する固体 NMR を適用することとし、標識化 Baf 誘導体の合成を基盤として、V-ATPase との複合体の構造解析を行うこととした。具体的にはまず、1) 固体 NMR 測定に必須である ^{13}C および ^{19}F 標識化 Baf 誘導体を設計、化学合成することで、解析に有用な標識化 Baf を創生しその合成法を確立することとした。次に 2) 合成した標識化 Baf を用いた固体 NMR 測定により、膜中での Baf の挙動解析を行うこととした。最後に 3) 固体 NMR 測定用の V-ATPase 含有サンプルを調製し、標識化 Baf 誘導体と複合体を形成させ、固体 NMR 測定を実施することで、 V_0 ドメインに結合した Baf 分子のかたち (活性型構造) を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

まず 1) について、活性を保持した ^{19}F

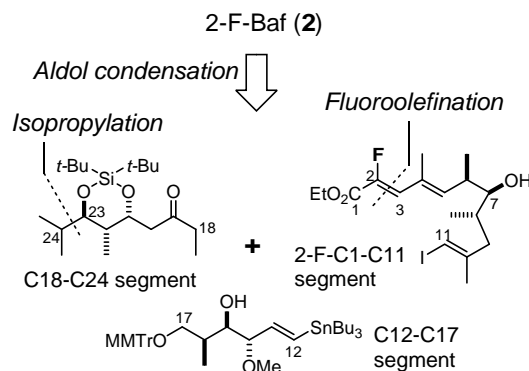
標識化 Baf の合成を行うこととした。我々はすでに 23 位に CF_3 基を有する 24-F-Baf 誘導体の合成に成功しているが、新たにマクロライド環を標識した誘導体として、2 位のメトキシ基をフッ素原子で置換した Baf 誘導体 (2) の合成を行い、その活性を確認することにした。さらに、固体 NMR の異種核間距離測定法の一つである REDOR 法を適用するために、 ^{19}F および ^{13}C で二重標識された誘導体の合成も行うこととした。



次に 2) について、活性を保持したフッ素標識体を用い、リポソーム中で固体 ^{19}F -NMR 測定を行うことで、脂質膜環境での Baf の構造解析を行うこととした。最後に 3) について、標的タンパク質である V-ATPase を調達すべく、まずは大量培養が容易な出芽酵母 (*S. cerevisiae*) を用い、V-ATPase を含む液胞膜小胞の単離精製を行うこととした。得られたタンパク質試料と標識化 Baf 誘導体を混合して複合体を形成させ、固体 NMR 測定 (^{19}F -NMR や REDOR 測定) を実施することで、 V_0 ドメインに結合した Baf 分子の挙動やかたち (活性型構造) の推定を行うこととした。

4. 研究成果

(1) 2-F-Baf は天然物の全合成例を参考に 3 つのセグメントを順次連結することで合成した (Scheme 1)。すなわち、まず文献既知のアルデヒドに対してフルオロオレフィン化反応を用いてフッ素原子を導入することでフッ素置換セグメント (C1-11) を合成した。その後、これと文献既知の C12-17 セグメントを Stille カップリングにより連結し、加水分解の後、山口条件で環化させることでマクロラクトンセグメントを構築した。さらに得られたマクロラクトンセグメントから数段階を経てアルデヒド体へと変換後、別途調製した C18-24 セグメントとアルドール反応に



Scheme 1

より連結し、最後に脱保護を行うことで 2-F-Baf の合成に成功した。続いて合成した 2-F-Baf の生物活性を評価した。酵母液胞膜を用いた V-ATPase 阻害活性試験を実施した結果、2-F-Baf は天然物に匹敵する強力な阻害活性を保持していることが示された。これによりマクロラクトンの配座解析を行うために必須である、活性を保持したフッ素標識化 Baf 誘導体を得ることに成功した。

続いて固体 NMR の異種核間距離測定法の一つである REDOR 法を適用するために、¹⁹F, ¹³C 二重標識体の合成を検討した。合成のし易さおよび分子内距離測定により得られる情報の有用性を考慮し、24-F-1,2-¹³C-標識体を合成標的とした。合成スキームについてはすでに 24-F-Baf の合成で確立しているので、残る課題として C1, C2 位を増炭する試薬の ¹³C 標識体の合成法を確立することを検討した。プロモ酢酸を出発原料とし、4 段階で α-ジメトキシ酢酸メチルへと変換後、五塩化リン、亜リン酸トリイソプロピルで処理することで、望む C2 ユニットの有するホスホン酸試薬の調製に成功した。これにより、目的とする 24-F-1,2-¹³C-標識体の合成法を確立した。

(2) すでに合成を達成している活性を保持したフッ素標識化 Baf 誘導体 (24-F-Baf(3)) および 2-F-Baf) と活性の無い誘導体 (6,8-ジデスメチル 24-F-Baf(4)) を用い、固体 NMR 測定を行うことで、膜中での挙動解析を行った(Fig 2)。POPC のリポソーム中に Baf 誘導体を添加し F-NMR 測定を実施したところ、まず Static な条件において、24-F-Baf および 6,8-ジメチル 24-F-Baf それぞれについて、CF₃ 由来のシグナルを観測した。このシグナルからオーダーパラメーター S_{mol} の値を算出したところ、24-F-Baf がジメチル 24-F-Baf よりも S_{mol} が大きく、運動性が低いことが明らかとなった。さらにマジック角回転下でサイドバンドの解析を行った結果、両誘導体とも運動性の異なる 2 成分の存在が示唆され、それらの割合が両者で異なることが明らかとなった。以上のことから、両化合物の膜中での挙動が大きく異なることが示唆され、これが両者の活性の違いに影響している可能性を示唆する結果を得た。

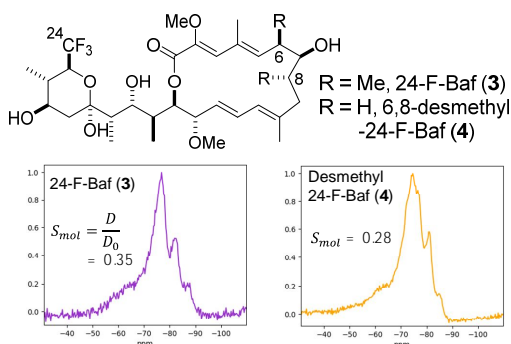


Fig 2

巨大な膜タンパク質と小分子の相互作用を議論する際、化合物の膜中での挙動とタンパク質への結合の両過程を区別して観測することは通常困難である。今回、固体 NMR を適用することで、前者の情報を選択的に取得することに成功し、また本過程が活性の違いを引き起こす要因の一つである可能性を初めて示唆することに成功した。

(3) 標的タンパク質である V-ATPase を調達すべく、まずは大量培養が容易な出芽酵母 (*S. cerevisiae*) を用い、V-ATPase を含む液胞膜小胞の単離精製を検討した。酵母を対数増殖期で集菌し、酵素処理により細胞壁を破壊してスフィロプラストとした後、遠心分離により液胞膜の単離を検討したが、望む膜成分は得られなかった。しかしながら遠心分離後、沈殿物の方に V-ATPase 活性があることを確認した(Fig 3)。これにより V-ATPase を含むタンパク質試料を得ることに成功した。現在、調製した V-ATPase 含有タンパク質サンプルをフッ素標識化 Baf と混合し固体 NMR 測定を実施している。本測定から得られる結果を解析することで、複合体形成時の Baf の構造を明らかにできると考えている。

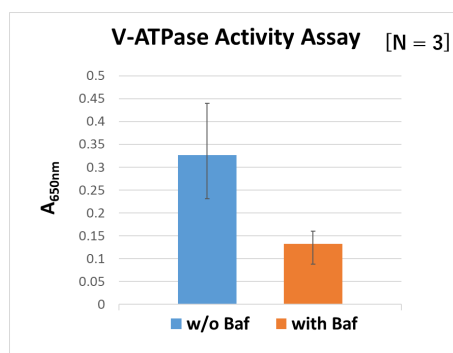


Fig 3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)すべて査読有

1. Futoshi Hasegawa; Kazushi Kawamura; Hiroshi Tsuchikawa; Michio Murata; Stable C-N axial chirality in 1-arylluracil scaffold and differences in in vitro metabolic clearance between atropisomers of PDE4 inhibitor; *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 4506-4511.
2. Hiroshi Tsuchikawa; Kou Minamino; Sho Hayashi; Michio Murata; Efficient Access to the Functionalized Bicyclic Pharmacophore of Spirolide C by Using a Selective Diels-Alder Reaction; *Asian J. Org. Chem.* **2017**, 6, 1322-1327.
3. Yasuo Nakagawa, Yuichi Umegawa, Naohiro Matsushita, Tomoya Yamamoto, Hiroshi

- Tsuchikawa, Shinya Hanashima, Tohru Oishi, Nobuaki Matsumori, Michio Murata; The Structure of the Bimolecular Complex between Amphotericin B and Ergosterol in Membrane is Stabilized by Face-to-Face Van der Waals Interaction with their Rigid Cyclic Cores; *Biochemistry* **2016**, 55, 3392-3402.
4. Hiroshi Tsuchikawa, Tatsuru Hayashi, Hajime Shibata, Michio Murata, Yoko Nagumo, Takeo Usui; Bafilomycin analogue site-specifically fluorinated at the pharmacophore macrolactone ring has potent vacuolar-type ATPase inhibitory activity; *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 2426-2429.
 5. Tomoya Yamamoto, Yuichi Umegawa, Hiroshi Tsuchikawa, Nobuaki Matsumori, Shinya Hanashima, Michio Murata, Resul Haser, Bernard J. Rawlings, Patrick Caffrey; Role of polyol moiety of amphotericin B in ion channel formation and sterol selectivity in bilayer membrane; *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 5782-5788.
 6. Hajime Shibata, Hiroshi Tsuchikawa, Tatsuru Hayashi, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, Takeo Usui; Modification of Bafilomycin Structure to Efficiently Synthesize Solid-State NMR Probes that Selectively Bind to Vacuolar-Type ATPase; *Chem. Asian J.* **2015**, 10, 915-924.

[学会発表](計10件)

1. Yoshifumi Yasukawa, Hiroshi Tsuchikawa, Michio Murata; Stereoselective construction of spiroacetal framework and evaluation of its thermodynamic/kinetic stability; 98th CSJ annual meeting 2018, Chiba
2. Masaki Yamagami, Hiroshi Tsuchikawa, Cui Jin, Satoshi Kawatake, Fuminori Sato, Yuichi Umegawa, Michio Murata, Seo Sangjar, Wataru Shinoda; Molecular orientation and conformation of archaeal membrane lipid PGP-Me by solid-state NMR and its interaction with bacteriorhodopsin; 98th CSJ annual meeting 2018, Chiba
3. Tatsuru Hayashi, Hiroshi Tsuchikawa, Yuichi Umegawa, Michio Murata, Yoko Nagumo, Takeo Usui; Elucidation of Bafilomycin-Vacuolar-type ATPase interaction based on solid-state NMR; 98th CSJ annual meeting 2018, Chiba
4. Hayashi, T, Tsuchikawa, H, Shibata, H, Murata, M, Nagumo, Y, Usui, T; Investigation of the interaction between vacuolar-type ATPase and bafilomycin by solid-state NMR; 18th Tetrahedron Symposium Asia Edition, July 2017, Melbourne, Australia
5. YASUKAWA, Yoshifumi; TSUCHIKAWA, Hiroshi; MURATA, Michio; Stereoselective

- Construction of Cisoidal Bisspiroacetal Framework Found in Marine Toxins; 97th CSJ annual meeting 2017, Kanagawa
6. YAMAGAMI, Masaki; TSUCHIKAWA, Hiroshi; JIN, Cui; KAWATAKE, Satoshi; SATO, Fuminori; UMEGAWA, Yuichi; MURATA, Michio; Enantioselective total synthesis of purple membrane lipid PGP-Me toward elucidation of protein-lipid interactions; 97th CSJ annual meeting 2017, Kanagawa
 7. 南野宏・土川博史・林翔・村田道雄, 海洋生物毒スピロリドCの立体構造解析を目指したスピロイミンユニットの効率的構築法の開発, 日本化学会 第97春季年会, 2017年3月, 神奈川
 8. YAMAGAMI, Masaki; JIN, Cui; TSUCHIKAWA, Hiroshi; UMEGAWA, Yuichi; HANASHIMA, Shinya; KAWATAKE, Satoshi; SATO, Fuminori; MURATA, Michio; Synthesis of purple membrane lipid PGP-Me for investigating bacteriorhodopsin-lipid interactions; 96th CSJ annual meeting 2016, Kyoto
 9. 南野宏・土川博史・林翔・花島慎弥・村田道雄, 海洋生物毒スピロリドCの効率的合成を目指した環化反応の開発, 日本化学会 第96春季年会, 2016年3月, 京都
 10. 林達・柴田一・土川博史・村田道雄・臼井健郎, 固体 NMR による配座解析を目指したフッ素標識化バフィロマイシンの合成と生物活性評価, 日本化学会 第96春季年会, 2016年3月, 京都

6. 研究組織

- (1)研究代表者
土川 博史 (TSUCHIKAWA HIROSHI)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 30460992
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし