

②  
ペプタイボール、Trichosporin-B類の電圧依存性  
イオンチャンネル形成機構に関する研究

1996

長岡康夫

ペプタイボール、Trichosporin-B類 の電圧依存性  
イオンチャンネル形成機構に関する研究

目次

理論の部

第1章 緒言	1
第2章 ペプタイボールに関する従来の研究概要	3
第1節 ペプタイボールの一次構造	3
第2節 ペプタイボールの二次構造	9
第3節 ペプタイボールのイオンチャンネル形成特性	11
第4節 ペプタイボールのチャンネル形成におけるPro残基の役割	12
第5節 ペプタイボールの残基数とチャンネル形成活性	13
第6節 ペプタイボールの合成誘導体	14
第7節 ペプタイボールの生物活性	14
第3章 Trichosporin-B-VIa, -VIbとその誘導体の合成	16
第1節 Trichosporin-B-VIaとtrichosporin-B-VIbの合成	16
第2節 [Aib <sup>14</sup> ]trichosporin-B-VIaの合成	22
第3節 残基数の異なるtrichosporin-B-VIa誘導体の合成	24
第4章 Trichosporin-B-VIaとその誘導体の2次構造	28
第1節 Trichosporin-B-VIaおよび[Aib <sup>14</sup> ]trichosporin-B-VIaの 2次構造	28
第2節 残基数の異なるtrichosporin-B-VIa誘導体の2次構造	45
第5章 Trichosporin-B-VIaとその誘導体のイオンチャンネル 形成特性	46
第1節 Trichosporin-B-VIaのイオンチャンネル形成特性	46
第2節 [Aib <sup>14</sup> ]trichosporin-B-VIaのイオンチャンネル形成特性	52
第3節 残基数の異なる誘導体のイオンチャンネル形成特性	54
第4節 Trichosporin-B-VIaとその誘導体の構造とイオンチャンネル 活性との相関	55

第6章 Trichosporin-Bの生物活性 .....	58
第1節 Trichosporin-Bのウシ副腎随質細胞に対するカテコールアミン分泌活性 .....	58
第2節 Trichosporin-Bのミトコンドリアに対する脱共役活性 .....	64
第7章 要約および結語 .....	68
謝辞 .....	70
実験の部	
第3章に関する実験 .....	71
第4章に関する実験 .....	89
第5章に関する実験 .....	90
第6章に関する実験 .....	91
論文目録 .....	94
引用文献 .....	95

理 論 の 部



イオンチャンネルは神経細胞の興奮の発生と伝達、細胞間の情報伝達など細胞内イオン濃度の変化に伴う生体機能の発現において本質的な役割を果たしている。近年、遺伝子工学的手法により電圧依存性のNaチャンネル<sup>1)</sup>、Kチャンネル<sup>2)</sup>、Caチャンネル<sup>3)</sup>のアミノ酸配列が解明された。これらの結果、いずれのチャンネルもきわめて類似した6本の膜貫通ヘリックス部位が存在し、この6本のヘリックスが束状に集まった時に形成される穴がチャンネルのイオン透過孔であると推定されている。しかしながら、生体のイオンチャンネルは分子量200,000以上の巨大なタンパク質であり、その詳細な高次構造の解析が困難であることなどから、チャンネルのゲイティングの仕組みやイオン選択性の仕組み等のチャンネル機構の解明は未だなされていない。

生体膜にイオンチャンネルを形成するペプチドが動物や菌類から多数得られている<sup>4)</sup>。これらのペプチドは生体チャンネルの単純化されたモデルとしてチャンネル機構の解明に寄与することが期待されている。特に土壌菌の代謝産物として得られるペプタイボール<sup>5)</sup>は、ヘリックス状の分子が生体チャンネルと同様に膜を貫通し、集合し、チャンネルを形成すると考えられている。ペプタイボールは分子量が約2000までのペプチドであり、その高次構造はX線結晶解析やNMRを用いて明らかにすることができる。さらに、誘導体を合成し、構造と活性との相関を調べることもでき、生体チャンネルのモデルとしてチャンネルメカニズムの研究やペプチドと脂質との相互作用の研究等に寄与すると考えられる。また、ペプタイボールは細胞膜のイオン透過性を変化させるため、イオノフォアとして、細胞のイオン流入による細胞応答を調べる研究に用いることができ、薬理学分野への応用が期待される。細菌学の面からは、菌類がペプタイボールを生産することが菌類の防御作用や代謝作用と関連すると考えられ興味を持たれる。

Tricosporin (TS)-Bはシイタケ栽培に大きな被害を与えたことで知られる木材腐朽菌、*Trichoderma polysporum* (TMI 60146)が生産する20残基のペプタイボールである<sup>6)</sup>。著者はTS-Bのイオンチャンネルの形成機構の解明を目的として、TS-Bおよびその誘導体の合成を行い、これら化合物の詳細な二次構造とチャンネル形成特性を調べた。また、TS-Bの生体細胞に対する作用として、牛副腎髄質細胞に対するカテコールアミン分泌活性とラット肝ミトコンドリアに対する脱共役活性を検討した。さらに、TS-Bとその誘導体の構造とイオンチャンネル形成特性ならびに、



(注) 本論文で使用したアミノ酸の略号は、IUPAC-IUBの生化学命名委員会勧告に従い三文字表記または一文字表記で示した<sup>7)</sup>。

Gly (G)	: glycine	Ser (S)	: serine	Gln (Q)	: glutamine
Ala (A)	: alanine	Thr (T)	: threonine	Phe (F)	: phenylalanine
Val (V)	: valine	Pro (P)	: proline	Trp (W)	: tryptophan
Leu (L)	: leucine	Asn (N)	: asparagine	Ile (I)	: isoleucine
Glu (E)	: glutamic acid				

異常アミノ酸、アミノアルコール、試薬、官能基、物理化学的手法は下記の略号を用いた。

〈異常アミノ酸、アミノアルコール〉

Aib (U)	: $\alpha$ -aminoisobutyric acid	Hyp (O)	: hydroxyproline
Iol	: isoleucinol	Iva (J)	: isovaline
Lol	: leucinol	Pheol (Fol)	: phenylalaninol
Wol	: tryptophanol	Vol	: valinol

〈試薬、官能基〉

Boc	: t-butyloxycarbonyl
DCC	: dicyclohexylcarbodiimide
EtOAc	: ethyl acetate
HOBt	: 1-hydroxybenzotriazole
HOSu	: N-hydroxysuccinimide
MeOH	: methanol
Z	: benzyloxycarbonyl

〈物理化学的手法〉

CD	: circular dichroism
CID	: collision induced-dissociation
EI-MS	: electron impact mass spectrometry
ESI-MS	: electrospray ionization mass spectrometry
FAB-MS	: fast atom bombardment mass spectrometry
MS/MS	: mass spectrometry / mass spectrometry
COSY	: correlated spectroscopy
DQF-COSY	: double quantum filtered correlated spectroscopy
NOESY	: nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
HPLC	: high performance liquid chromatography

そのほかの略号については、随時ことわった上で省略する。

藤多らは徳島市周辺で、シイタケ栽培の害菌として採取したオオボタンタケ (*Hypocrea peltata*)の子座より、抗シイタケ菌活性を有するペプチド、hypelcin-A および-Bを分離した<sup>8)</sup>。さらに藤多らは同様にシイタケ栽培に被害を与えた不完全菌 *Trichoderma polysporum*の培養濾液から抗生ペプチド、trichosporin-A、-B<sup>6)</sup>および trichopolyn類<sup>29)</sup>を分離した。これらのペプチドはN-末端をアシル基、C-末端をアミノアルコールで保護され、異常アミノ酸  $\alpha$ -アミノイソ酪酸(Aib)を高率に含むという特徴がある。同様の特徴をもつペプチドが子囊菌類、あるいはその不完全世代菌類から数多く得られてきた。Brücknerらはこれら一連のペプチドをペプタイボール (peptaibol) と総称することを提唱した<sup>5)</sup>。本章においてはペプタイボール全般について、その構造と活性について概説する。

### 第1節 ペプタイボールの一次構造

現在までに、構造決定または構造推定されているペプタイボールは150種あまりにも達している (Table 1)。ペプタイボールは全て直鎖状のペプチドでありその残基数が20, 19, 18, 16, 15, 14, そして11残基のものに分類される。hypelcin類や trichosporin類は20残基のペプタイボールの一つである。20, 19, 18残基のペプタイボールの一次構造を比べてみると、14位にPro残基、7, 18位に極性のGln残基が保存され (19および18残基の者についても残基番号は20残基を基準にしている)、常に7位GlnとProとの間に6残基の隔りがあることがわかる。16残基のペプタイボール、zervamicinも3位にGln、10位にHyp (hydroxyproline)が存在し、18残基以上のペプタイボールと同様に、このGlnとHypの間に6残基の隔りがある。ただし、16残基のペプタイボールのC-末端部分は18残基以上のペプタイボールとは異なり、1残基おきにHypまたはProが存在するという特徴的な構造を有する。さらにそのN-末端は芳香性のTrpかPhe残基である。15残基のemerimicinは16残基のantiamoebinのC-末端部分のProが1残基欠損した構造を有する。最近報告された14残基のharzianinと11残基のtrichorozinおよびtrichorovinはN-末端部分に極性のGlnまたはAsnを持ち、その後4残基おきにProをもつという点で共通している。一方、同じ11残基のペプタイボールであるtrichoginやtrichoninginは極性残基やProを持たない。これらは、Glyを高率で含有し、N-末端が高級脂肪酸のoctyl基で保護されている。

このようにペプタイボールの残基の配列には統一性や規則性が存在する。このよ



うな特徴的な残基の配置はペプタイボールの活性を発現する上で重要な要素であると考えられる。特にProやHypはhelixの折れ曲がり構造を形成する点で重要と考えられる。また、ペプタイボールを構成するアミノ酸のほとんどが疎水性である中で、極性残基の存在は分子に極性部位を形成するという点で重要と考えられる。そこでTable 1においてはProと極性残基を強調して示した。さらに、Table 1にはAibを含むリポペプチド、trichopolyn, leucinostatinとC-末端にポリアミン構造をもつAib含有ペプチド、efrapeptin, aibellin, MS-681の構造も示した。

**Table 1.** Sequences of Peptaibols and Aib Containing Peptides.

Aib Containing Peptide	Sequence						
<u>20 residue analogues</u>							
	Position	1	7	14	18	19	20
Alamethicin <sup>9)</sup> ( <i>Trichoderma viride</i> )	I	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-E-Q-Fol					
	II	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
Suzukacillin <sup>10)</sup> ( <i>Trichoderma viride</i> )		Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-U-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
		Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol					
Paracelsin <sup>5)</sup> ( <i>Trichoderma viride</i> )	A	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	C	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-V-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	D	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
Hypelcin <sup>8)</sup> ( <i>Hypocrea peltata</i> )	A-I	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Lol					
	A-II	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Lol					
	A-III	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Lol					
	A-IV	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Lol					
	A-V	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Iol					
	A-VI	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Iol					
	A-VII	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Lol					
	A-VIII	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-I-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Lol					
	A-IX	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Lol					
	B-I	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-E-Q-Lol					
	B-II	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-E-Q-Lol					
	B-III	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-E-Q-Lol					
	B-IV	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-U-U-P-V-U-U-E-Q-Lol					
	B-V	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-E-Q-Iol					
Trichosporin <sup>6)</sup> ( <i>Trichoderma polysporum</i> )	B-Ia	Ac-U-A-S-A-U-U-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B-IIIa	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B-IIIb	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-A-Q-Q-Fol					
	B-IIIc	Ac-U-A-A-A-A-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B-IIIId	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B-IVb	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol					
	B-IVc	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B-IVd	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol					
	B-V	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					
	B-VIa	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol					

**Table 1.** (continued)

	B-VIb	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	B-a-1	Ac-U-A-G-U-A-U-Q-U-X-A-A-Z-A-P-V-U-Z-Q-Q-Fol
	B-a-2	Ac-U-A-G-A-U-U-Q-U-X-A-A-Z-A-P-V-U-Z-Q-Q-Fol
	B-b	Ac-U-A-G-A-U-U-Q-U-X-U-G-X-A-P-V-U-A-Q-Q-Fol
	B-d	Ac-U-A-S-A-U-U-Q-U-X-A-G-X-A-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	B-e	Ac-U-A-G-A-U-U-Q-U-X-U-G-X-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	B-g	Ac-U-A-G-A-U-U-Q-U-X-U-G-X-A-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	B-h	Ac-U-A-G-A-U-U-Q-U-X-U-G-X-U-P-V-U-Z-Q-Q-Fol
Saturnisporin <sup>11)</sup> ( <i>Trichoderma saturnisporum</i> )	SA I	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	SA II	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	SA III	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	SA IV	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
Trichobrachin <sup>12)</sup> ( <i>Trichoderma longibrachiatum</i> )		Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-V-Q-Q-Fol
Gliodeliquescin A <sup>13)</sup> ( <i>Gliocladium deliquescens</i> )		Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
Trichocellin <sup>14)</sup> ( <i>Trichoderma viride</i> )	A-I	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	A-II	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	A-III	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-I-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	A-IV	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-I-U-G-U-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	A-V	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	A-VI	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	A-VII	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
	A-VIII	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	B-I	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-E-Q-Fol
	B-II	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-J-E-Q-Fol
Trichokonin <sup>15)</sup> ( <i>Trichoderma koningii</i> )	VI	Gliodeliquescin
	VII	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Fol
	VIII	Tricosporin-B-VIc
<u>19 residue analogues</u>		
Trichorzianine <sup>16)</sup> ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	A- IIa	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-Q-Wol
	A- IIIa	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-Q-Wol
	A-IIIb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-L-Q-Q-Wol
	A-IIIc	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-Q-Wol
	A-IVb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-Q-Wol
	A-Vb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-Q-Fol
	A-VIa	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-Q-Fol
	A-VIb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-Q-Fol
	A-VII	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-Q-Fol
	B-IIa	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-E-Wol
	B-IIIc	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-E-Wol
	B-IVb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-E-Wol
	B-Vb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-E-Fol
	B-VIa	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-L-U-I-Q-E-Fol
	B-VIb	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-E-Fol
	B-VII	Ac-U-A-A-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-I-Q-E-Fol
Tricholongin <sup>17)</sup> ( <i>Trichoderma longibrachiatum</i> )	B-I	Ac-U-G-F-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Lol
	B- II	Ac-U-G-F-U-U-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U-U-J-Q-Q-Lol



**Table 1. (continued)**

Trikoningin <sup>18)</sup> ( <i>Trichoderma koningii</i> )	KA V	Ac-U-G-A-U- I-Q-U-U-U-S-L-U-P-V-U- I-Q-Q-Lol
Trichokonin <sup>15)</sup> ( <i>Trichoderma koningii</i> )	V	Ac-U-A-U-A-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
Chrysospermin <sup>19)</sup> ( <i>Apiocrea chrysosperma</i> )	A	Ac-F-U-S-U-U-L-Q-G-U-U-A-A-U-P-U-U-U-Q-Wol
	B	Ac-F-U-S-U-U-L-Q-G-U-U-A-A-U-P- J-U-U-Q-Wol
	C	Ac-F-U-S-U- J-L-Q-G-U-U-A-A-U-P-U-U-U-Q-Wol
	D	Ac-F-U-S-U- J-L-Q-G-U-U-A-A-U-P- J-U-U-Q-Wol
<u>18 residue analogues</u>		
Trichotoxin <sup>20)</sup> ( <i>Trichoderma viride</i> )	A-50	Ac-U-G-U-L-U-Q-U-U-U-A-A-U-P-L-U-U-Q-Vol
		Ac-U-G-U-L-U-Q-U-U-U-A-A-U-P-L-U- J-Q-Vol
		Ac-U-G-U-L-U-Q-U-U-U-A-A-U-P-L-U- J-Q-Vol
		Ac-U-A-U-L-U-Q-U-U-U-A-A-U-P-L-U- J-Q-Vol
		Ac-U-G-U-L-U-Q-U-U-U-A-U-U-P-L-U- J-Q-Vol
		Ac-U-A-U-L-U-Q-U-U-U-A-U-U-P-L-U- J-Q-Vol
		Ac-U-G-U-L-U-Q-U-U-U-A-U-U-P-L-U- J-E-Vol
	A-40	Ac-U-G-U-L-U-Q-U-U-U-A-U-U-P-L-U-U-E-Vol
		Ac-U-A-U-L-U-Q-U-U-U-A-U-U-P-L-U-U-E-Vol
		Ac-U-S-A-U-U-Q- J-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q- Iol
		Ac-U-S-A-U- J-Q-U-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q- Iol
		Ac-U-S-A-U-U-Q-U-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q- Iol
		Ac-U-S-A-U- J-Q- J-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q-Lol
		Ac-U-S-A-U-U-Q- J-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q-Lol
Trichokindin <sup>21)</sup> ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	Ia	Ac-U-S-A-U-U-Q- J-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q- Iol
	Ib	Ac-U-S-A-U- J-Q-U-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q- Iol
	IIa	Ac-U-S-A-U-U-Q-U-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q- Iol
	IIb	Ac-U-S-A-U- J-Q- J-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q-Lol
	IIIa	Ac-U-S-A-U-U-Q- J-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q-Lol
	IIIb	Ac-U-S-A-U- J-Q-U-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q-Lol
	IV	Ac-U-S-A-U- J-Q- J-L-U-A-U-U-P-L-U-U-Q- Iol
Va	Ac-U-S-A-U-U-Q- J-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q- Iol	
Vb	Ac-U-S-A-U- J-Q-U-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q- Iol	
VI	Ac-U-S-A-U- J-Q- J-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q-Lol	
VII	Ac-U-S-A-U- J-Q- J-L-U-A- J-U-P-L-U-U-Q- Iol	
<u>16 residue analogues</u>		
Zervamicin <sup>22)</sup> ( <i>Emericellopsis salmosynnemata</i> )	IA	Ac-W- I-E- J-V-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	IB	Ac-W-V-E- J- I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	IB'	Ac-W- I-E-U- I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	IC	Ac-W- I-E- J- I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	IIA	Ac-W- I-Q-U- I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	IIB	Ac-W- I-Q- J- I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	II-1	Ac-W- I-Q-U-V-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	II-2	Ac-W- I-Q-U- I-T-U-V-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	II-3	Ac-W-V-Q-U- I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	II-4	Ac-W- I-Q- J-V-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
	II-5	Ac-W- I-Q- J-V-T-U- I-U-O-Q-U-O-U-P-Fol
Antiamoebin <sup>23)</sup> ( <i>Emericellopsis poonensis</i> , <i>E. synnematicola</i> )	I	Ac-F-U-U-U- J-G-L-U-U-O-Q- J-O-U-P-Fol
	II	Ac-F-U-U-U- J-G-L-U-U-P-Q- J-P-U-P-Fol

**Table 1. (continued)**

<u>15 residue analogues</u>			
Emerimicin <sup>24)</sup> ( <i>Emericellopsis microspora</i> )	III	Ac-F-U-U-U-V-G-L-U-U-O-Q- J-O-A-Fol	
	IV	Ac-F-U-U-U-V-G-L-U-U-O-Q- J-O-U-Fol	
<u>14 residue analogues</u>			
Harzianin <sup>25)</sup> ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	I	Ac-U-N-L-U-P-S-V-U-P-U-L-U-P-Lol	
	III	Ac-U-N-L-U-P-S-V-U-P- J-L-U-P-Lol	
	VI	Ac-U-N-L-U-P-A-V-U-P-U-L-U-P-Lol	
	VIII	Ac-U-N-L-U-P-A-V-U-P- J-L-U-P-Lol	
	IX	Ac-U-N-L-U-P-A- I-U-P- J-L-U-P-Lol	
	X	Ac-U-Q-L-U-P-A-V-U-P- J-L-U-P-Lol	
	XI	Ac-U-N-L-U-P-S- I-U-P-U-L-U-P-Lol	
	XII	Ac-U-N-L-U-P-S- I-U-P- J-L-U-P-Lol	
	XIII	Ac-U-Q-L-U-P-S- I-U-P- J-L-U-P-Lol	
	XIV	Ac-U-N-L-U-P-A- I-U-P-U-L-U-P-Lol	
	XV	Ac-U-Q-L-U-P-A- I-U-P- J-L-U-P-Lol	
	<u>11 residue analogues</u>		
	Trichorozin <sup>26)</sup> ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	I	Ac-U-N- I-L-U-P- I-L-U-P-Vol
		II	Ac-U-Q- I-L-U-P- I-L-U-P-Vol
		III	Ac-U-N- I-L-U-P- I-L-U-P-Lol
IV		Ac-U-Q- I-L-U-P- I-L-U-P-Lol	
Trichorovin <sup>27)</sup> ( <i>Trichoderma viride</i> )	Ia	Ac-U-N-V-X-U-P-X-X-U-P-Vol	
	Ib	Ac-U-N-V-V-U-P-X-X-U-P-Xol	
	IIa	Ac-U-N-V-V-U-P-X-X-U-P-Xol	
	IIb	Ac-U-N-X-V-U-P-X-X-U-P-Vol	
	IIIa	Ac-U-Q-V-V-U-P-X-X-U-P-Xol	
	IIIb	Ac-U-Q-V-X-U-P-X-X-U-P-Vol	
	IVa	Ac-U-Q-V-V-U-P-X-X-U-P-Xol	
	IVb	Ac-U-Q-X-V-U-P-X-X-U-P-Vol	
	IVc	Ac-U-N-V-X-U-P-X-X-U-P-Xol	
	Va	Ac-U-N-V-X-U-P-X-X-U-P-Xol	
	Vb	Ac-U-N-X-X-U-P-X-X-U-P-Vol	
	VIa	Ac-U-N-V-X-U-P-X-X-U-P-Xol	
	VIb	Ac-U-N-X-X-U-P-X-X-U-P-Vol	
	VIIa	Ac-U-N-X-V-U-P-X-X-U-P-Xol	
VIIb	Ac-U-Q-V-X-U-P-X-X-U-P-Vol		
VIII	Ac-U-Q-V-X-U-P-X-X-U-P-Xol		
IXa	Ac-U-Q-V-X-U-P-X-X-U-P-Xol		
IXb	Ac-U-Q-X-X-U-P-X-X-U-P-Vol		
Xa	Ac-U-Q-X-V-U-P-X-X-U-P-Xol		
Xb	Ac-U-N-X-X-U-P-X-X-U-P-Xol		
XI	Ac-U-N-X-X-U-P-X-X-U-P-Xol		
XIIa	Ac-U-N- I- I-U- P-L-L-U-P- Iol		
XIIb	Ac-U-N-X-X-U-P-X-X-U-P-Lol		
XIII	Ac-U-Q-X-X-U-P-X-X-U-P-Xol		
XIV	Ac-U-Q-X-X-U-P-X-X-U-P-Xol		



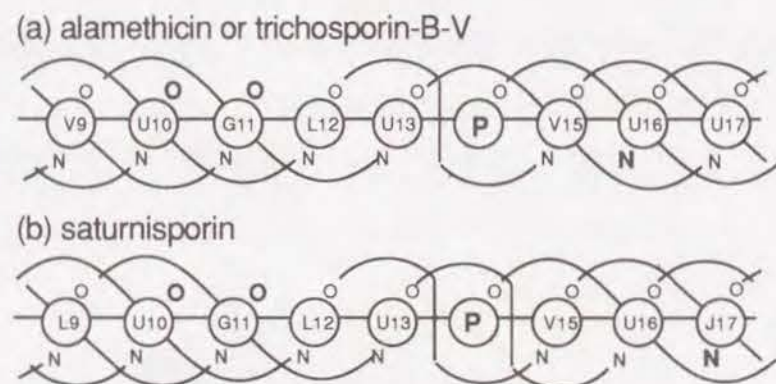




±(57°, 47°)]に限定されることが、示されている<sup>34)</sup>。したがって、Aibを高率に含むペプチドはヘリックス構造をとりやすいと考えられる。実際にAibを高率に含む合成ペプチドは $\alpha$ -ヘリックス構造や3<sub>10</sub>-ヘリックス構造をとることがX線結晶解析により明らかにされている<sup>35)</sup>。

Foxら(1982年)<sup>36)</sup>はalamethicinのX線結晶解析の結果から、alamethicinは主に $\alpha$ -ヘリックス構造をとり、14位Pro付近にヘリックスの折れ曲がり構造をもつことを明らかにした。この折れ曲がり構造はLeu<sup>12</sup>COとVal<sup>15</sup>NH間の1←4水素結合により安定化されていることが示された(Fig. 2a)。14位ProよりC-末端側には $\alpha$ -ヘリックス構造と3<sub>10</sub>-ヘリックス構造で形成される3通りの構造が示された。さらに、このProの影響で、alamethicinには水素結合を介さないAib<sup>10</sup>CO, Gly<sup>11</sup>CO (Fig. 2a)が存在する。これらのCOと極性のGln残基はともにヘリックスの折れ曲がりの凸面に位置し、凹面には疎水性の残基が位置することにより弱い両親媒性のヘリックス構造を形成すると考えられている(Fig. 3a)。

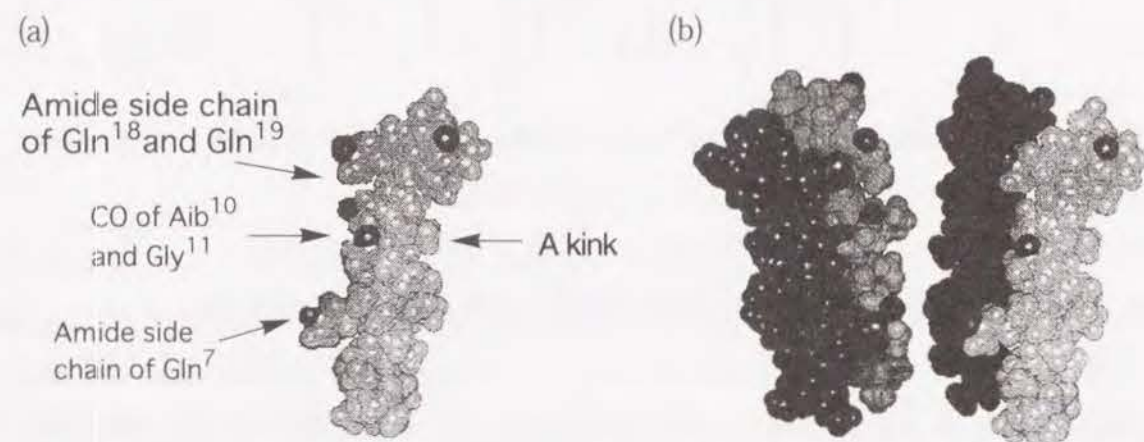
Espositoら(1987年)<sup>37)</sup>はalamethicinについて詳細な<sup>1</sup>H-NMR研究を行い、alamethicinのMeOH溶液中での構造がFoxらが示した結晶構造と基本的に同じであることを示した。飯田ら(1993年)<sup>38)</sup>は<sup>1</sup>H-NMRを用いてtrichosporin-B-VのMeOH中での構造を解析し、trichosporin-B-Vもalamethicinと同様の二次構造をとることを示した。



**Fig. 2. Hydrogen Bond Schemes Around Pro<sup>14</sup> supposed for Alamethicin, Trichosporin,(a) and Saturnisporin (b).** Pro kinked structure was stabilized by 1←4 hydrogen bonds. Alamethicin and trichosporin-B-Via has single 1←4 bond between Leu<sup>12</sup>CO and Val<sup>15</sup>NH. Saturnisporin has double 1←4 bonds between Leu<sup>12</sup>CO and Val<sup>15</sup>NH and between Aib<sup>18</sup>CO and Aib<sup>16</sup>NH. Since CO of Aib<sup>10</sup> and Gly<sup>11</sup> is not participate in the H-bonding, these COs can be regarded as polar groups.

1993年、Rebuffat<sup>39)</sup>らにより、同様の実験がsaturnisporin II, IVについて行われ、その結果、このペプチドはalamethicinやtrichosporin-B-Vとは異なり、Pro<sup>14</sup>付近の折

れ曲がり構造が、Aib<sup>12</sup>CO-Val<sup>15</sup>NHとAib<sup>13</sup>CO-Val<sup>15</sup>NHの2つの1←4水素結合により安定化されていることが示されている(Fig. 2b)。19残基のtrichorzianineや16残基のzervamicineの誘導体についてもX線結晶解析が行われ、trichorzianinはalamethicinと同様の構造を取り<sup>40)</sup>、zervamicineの誘導体はProよりN-末端側は $\alpha$ -ヘリックス構造、C-末端側は $\beta$ -bend ribbon構造をとることが示されている<sup>41)</sup>。



**Fig. 3. Kinked Helical Structure of Alamethicin Molecule (a) and a Bundle of the Helices (b).** Alamethicin has a helical structure with a kink around Pro<sup>14</sup>. Polar side chain of Gln and CO of Aib<sup>10</sup> and Gly<sup>11</sup> are lying one side of the helix. A bundle of the helices, which is the most probable form of alamethicin ion-channel, was stabilized by polar interaction between water and these polar side chains.

脂質中におけるペプチドの構造解析の試みが幾つかなされている。

Schwarzら(1983年)<sup>42)</sup>はalamethicinのCDスペクトルをdioxane / octanol系の溶媒で測定した場合、octanolの割合を増加させると $\alpha$ -ヘリックス含量が増加することを示した。Franklinら(1994年)<sup>43)</sup>はsodium dodecyl sulfate (SDS)ミセル中におけるalamethicinの構造を解析し、その結果、分子の12位LeuよりN-末端側は規則的な $\alpha$ -ヘリックス構造であるが、C-末端側はより不規則な構造であることが示されている。

### 第3節 ペプチドのイオンチャンネル形成特性

1968年にMuellerとRudinが初めて、脂質二分子膜にalamethicinを作用させると電圧依存性の電流を誘導することを見出した<sup>44)</sup>。それ以来alamethicinやその他のペプチドの電気的な特性について多くの研究がなされてきた<sup>45)</sup>。これらの研究から、ペプチドが誘導する巨視的な膜電流はペプチドの濃度の累乗根に比例することが示された。この結果は、ペプチドが形成するチャンネルがペプチド分子の複合体であることを強く示唆するものであった。さらに、ペプ



タイボールが形成する単チャンネル電流の解析によりこのチャンネルはペプタイボール分子のhelix bundle型の複合体であり(Fig. 3b)、分子の取り込みと、脱離によりチャンネル孔の直径が変化すると考えられている(Fig. 4)<sup>46)</sup>。

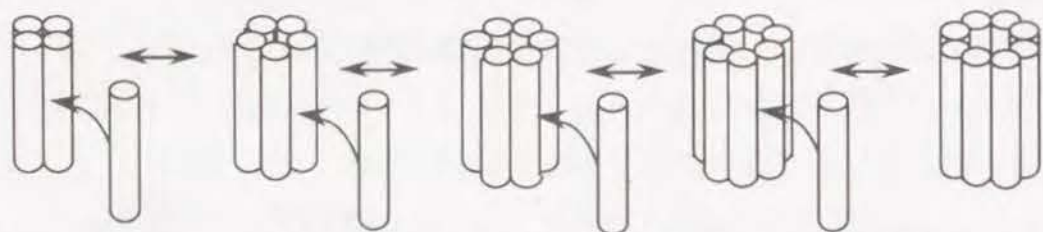


Fig. 4. Helix-Bundle Model of Peptaibol Ion-Channels. Channel diameter was changed by uptake and release of peptaibol monomer.

#### 第4節 ペプタイボールのチャンネル形成におけるPro残基の役割

第2節で述べたようにヘリックス中のProはヘリックスに折れ曲がり構造を形成する。このこのような折れ曲がりをもつヘリックスが平行(N-末端とC-末端が同じ向き)に集まり、bundleを形成するとチャンネル孔がろう斗状の形になる(Fig. 3b)。また、Proは水素結合に関与できるアミドプロトンを持たないため、Proの3ないし4残基N-末端側に水素結合を介さないカルボニル酸素を出現させる(Fig. 2a)。このカルボニル酸素はヘリックス上における極性領域としての働きをもつ。この極性領域はチャンネル孔の内側面に位置するため、孔内の水との親水性相互作用によるチャンネルbundleの安定化に寄与すると考えられる(Fig. 3b)。このようにProはチャンネル構造を規定するとともに、チャンネルの安定化にも関与すると考えられている。さらにこのProがチャンネル形成の電圧依存性発現に重要な役割を果たしていると言う考えがあるのでそれらについて以下に概説する。

FoxやRichardsらはalamethicinのX線構造解析の結果をもとに、脂質二分子膜中においてalamethicinのC-末端が、電圧の付加により、ランダムな構造からヘリックス構造へ変化する可能性があると考えた。そして、このPro残基の影響による構造変化がチャンネルの電圧依存性発現の原因ではないかと推測している<sup>36)</sup>。また、最近、分子動力学計算の結果(alamethicin, melittin, bacteriorhodopsinに関する研究)から、この折れ曲がりの角度にかなりの幅があることが示された<sup>47)</sup>。alamethicinについては、分子と電界との相互作用によるこの角度の変化と、alamethicinチャンネルの電圧依存性発現の機構との関連が示唆されている<sup>48)</sup>。

一般にPro残基はペプチドやタンパク中のヘリックス構成単位になりにくい<sup>49)</sup>。それにもかかわらず、Proは生体膜タンパク(チャンネルや受容体)の膜貫通ヘリックス部位と予想されるフラグメントに、高い割合で存在することが知られている<sup>50)</sup>。さらに、蜂毒の主成分で膜貫通チャンネル形成ペプチドとして知られるmelittin<sup>4a)</sup>、pardaxin<sup>4e)</sup>やcecropin<sup>4f)</sup>にもProが含まれる。このような事実からも、ペプタイボールを含む膜貫通ペプチドの構造と機能にProが果たす役割は大きいと考えられる。

#### 第5節 ペプタイボールの残基数とチャンネル形成活性

ペプタイボールによる膜電流特性を最もよく説明しているチャンネルモデルとしてhelix bundle modelが提唱されていることはすでに述べた(Fig. 3 and 4)<sup>46)</sup>。このチャンネルをイオンが通過するためには、チャンネルを構成するペプチド分子が膜を貫通できる長さ以上でなければならない。20残基のペプチドが $\alpha$ -ヘリックス構造をとると、分子の長さがちょうど3 nmになる。脂質二分子膜の疎水性部位の厚さは約3 nmなので、ヘリックス状のペプチドは20残基以上であれば膜を貫通できることになる。したがって、20残基のペプタイボールは主にヘリックス構造をとるので、膜を貫通するために丁度よい長さであるということになる。しかしながら、ペプタイボール類の中には19残基以下のもの、例えば、trichorzianine(19残基)<sup>16)</sup>、trichotoxin(18残基)<sup>20)</sup>、zervamicin(16残基)<sup>22)</sup>(Table 1)などがあり、これらも脂質二分子膜に対してイオンチャンネルを形成する。また、ペプタイボール類以外にも残基数19以下のチャンネル形成ペプチド<sup>51)</sup>が報告されている。しかし、これらのペプチドの詳細なイオン透過機構は報告されていない。また、もしも21残基以上のペプタイボールが存在するならば、それは膜を貫通できるので20残基の者と同様にイオン透過性をもつはずである。しかしながら、現在のところ21残基以上の天然のペプタイボール類は発見されていない。何故、菌類は膜を貫通できないはずの19残基以下のペプタイボールは生産するのに21残基以上のペプタイボールを生産しないのか興味を持たれる。

#### 第6節 ペプタイボールの合成誘導体

Hallらはalamethicinの合成中間体を膜に作用させて、巨視的な電流-電圧特性を調べている<sup>52)</sup>。その結果、電圧に対する電流の対称性が誘導体の電荷の位置で変



化することを明らかにしている。MolleらはalamethicinのAibを全てLeuに置換した誘導体を合成し、この誘導体がalamethicinと同様に脂質2分子膜に対しイオンチャンネルを形成することを示した<sup>53)</sup>。彼らは同様に21残基の誘導体<sup>54)</sup>、C末端がアミドの誘導体<sup>55)</sup>、2位、14位のProをそれぞれAlaに置換した誘導体<sup>56)</sup>を合成しこれらのチャンネル形成特性を調べている。

## 第7節 ペプチボールの生物活性

(1) 溶血作用：Irmscherら(1977年)はalamethicin, suzukacillinそしてtrichotoxinがいずれもヒト赤血球に対し溶血活性を有することを明らかにしている<sup>57)</sup>。この活性はペプチド濃度に依存して増加する。

(2) ATPaseの活性化作用：Jonesら(1980年)はalamethicinが膜結合酵素であるCa<sup>2+</sup>およびNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseを活性化することを報告している<sup>58a)</sup>。そしてこの作用を利用して心筋繊維のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseとadenylate cyclaseの酵素活性の測定法を確立している。Ritovら(1993年)<sup>58b)</sup>やSethiら(1993年)<sup>58c)</sup>はこの測定法を種々の組織のCa<sup>2+</sup>-ATPaseの酵素活性の測定に応用している。

(3) 脱共役作用：Takaishiらはhypelcinをラット肝ミトコンドリアに作用させると、第4ステイトの呼吸を刺激し、酸化的リン酸化の脱共役作用を示すことを明らかにしている<sup>59a)</sup>。Mathewらはalamethicinとその誘導体の脱共役活性を調べており、活性発現には13残基以上の長さが必要であること、カルボン酸をもつ誘導体よりもカルボン酸をエステル化した誘導体のほうが活性が強いこと等を明らかにしている<sup>59b)</sup>。

(4) カテコールアミンの分泌促進作用：Altalejo(1990年)らは灌流牛副腎随質にalamethicinを与えるとカテコールアミンの分泌が促進されることを報告している<sup>60)</sup>。同時期にTachikawaと著者ら(1991年)は培養した牛副腎随質細胞に対するtrichosporin-B-IIIのカテコールアミン分泌作用についての詳細な研究を報告した<sup>61)</sup>(第6章参照)。

(5) Ca<sup>2+</sup>チャンネルアゴニストとしての作用：Tachikawaと著者らはペプチボールが副腎随質細胞のCa<sup>2+</sup>チャンネルアゴニストとして働く可能性を指摘した<sup>61)</sup>。また、最近、Huangらはtrichokonin VIが心筋のCa<sup>2+</sup>チャンネルアゴニストとして作用することを報告している<sup>62)</sup>。

(6) 抗植物病原体作用：*T. harzianum*が生産するペプチボールは同じく同菌が生産するchitinase等の加水分解酵素と相乗作用し、真菌性の植物病原体の胞子の発芽や菌糸の伸長を抑制することが報告されている<sup>63)</sup>。

(1)から(4)の活性はペプチボールが生体膜のイオン透過性を亢進させることが直接の原因と考えられる。しかしながら、(5)と(6)のように、ペプチボールの細胞に対する作用については単に細胞膜へのチャンネル形成だけでは説明されない部分もあり今後、ペプチボールの新たな生体作用メカニズムの解明が期待される。



第1節 Trichosporin-B-VIa とTrichosporin-B-VIbの合成

3-1-1 目的と概略

生物活性試験や物理化学的実験を行うために、純粋なTS-B類を天然から必要十分分量得ることは非常に困難である。そこで、これらの実験に供する目的と同時に構造確認のために、すでに構造決定されている11種のTS-B類中、牛副腎髄質細胞に対するカテコールアミン分泌活性が強い<sup>64)</sup> TS-B-VIaとTS-B-VIbの合成を試みた。

合成は飯田らによる方法に準じた<sup>65)</sup>。すなわち、Fig.2に示すように、TS-B-VIaとTS-B-VIbを5つのフラグメント[1]~[5]に分けて合成し、これらのフラグメントを順次縮合した。この方法には以下の特徴がある。

1. フラグメント [2]~[5]のC-末端はアルカリ加水分解およびC-末端活性化によるラセミ化を防ぐために、 $\alpha$ -プロトンを持たないAibを配置させた。
2. TS-B-VIaとTS-B-VIbは3位と17位の残基のみ異なっている(Fig.2)。従って、3位と17位を含まないフラグメント[1], [3], [4]は両ペプチドに共通に用いることができる。
3. これらのフラグメントは後節に述べる誘導体合成にも用いることができる。

3-1-2 Trichosporin-B-VIaの合成

TS-B-VIaの合成フラグメント[1]~[5]はFig. 5に示すルートに従って合成した。縮合は原則としてDCC-HOBt法<sup>66)</sup>を用いた。ただし、以下に各フラグメント合成あるいはフラグメント縮合における問題とその解決について述べる。フラグメント[1]の合成にDCC-HOBt法を用いると、反応成績体からのDCUとHOBtの除去が困難であり目的物の精製が十分に行えなかった。そこで、フラグメント[1]におけるN-保護Glnの縮合には活性エステル法(HOSu)法<sup>67)</sup>を用いた。この場合、生成物を5% NaHCO<sub>3</sub>に懸濁し濾過することでほぼ完全にHOSuを除くことができた。目的物は再結晶により、精製した。アミノ酸のN-末端保護基には原則として、Z基を用いた。しかし、フラグメント[1]のZ保護体は溶剤への溶解性が低いため、接触還元によるZ基の脱保護が困難であった。また、Z保護体の30% HBr-CH<sub>3</sub>COOH処理による脱保護を試みたところ、副生成物としてC-末端アミノアルコールのアセチル体を生じた。そこでフラグメント[1]の合成ではN-末端保護基として、Boc基を

用いた。Boc基はアニソール存在下TFA処理により容易に除去することができた。

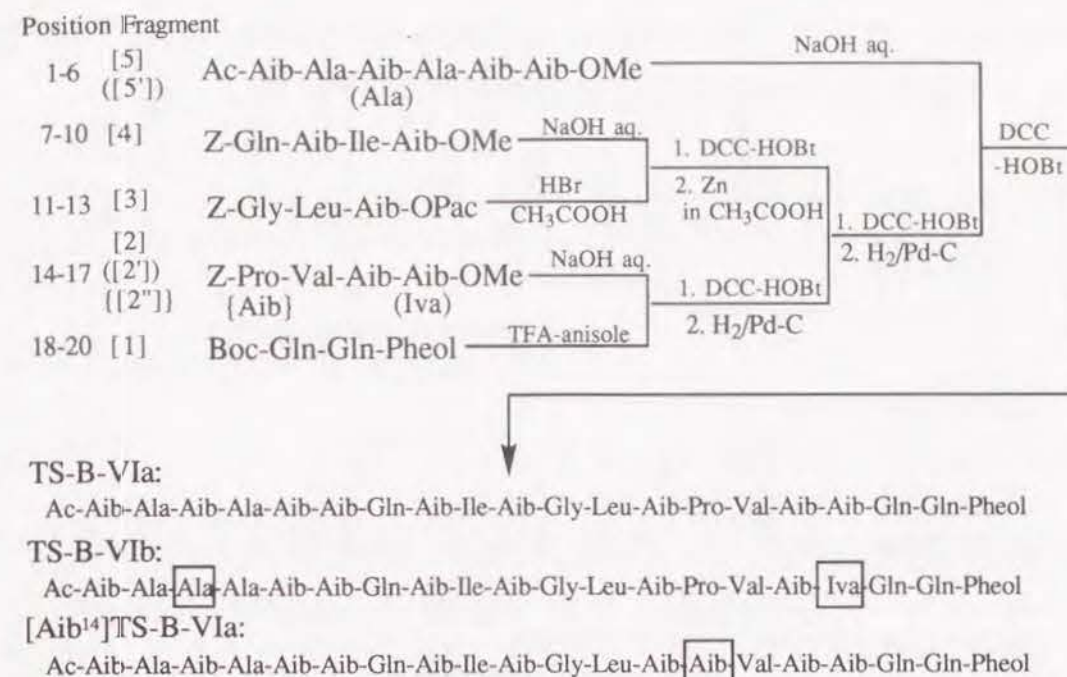


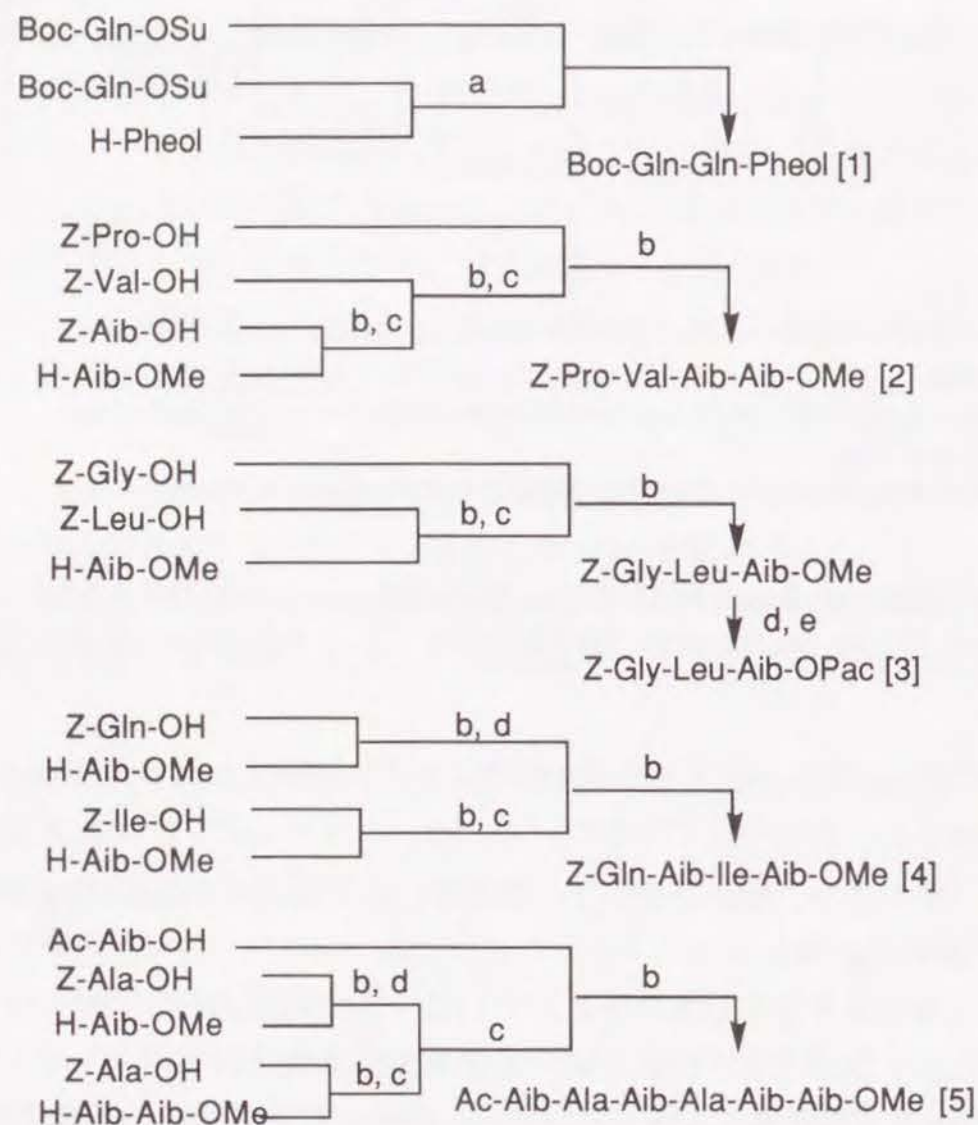
Fig. 5. Synthetic Route to TS-B-VIa, TS-B-VIb and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa. [2'] and [5'] are the fragments for TS-B-VIb. [2''] is a fragment for [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa.

7位から13位に対応するフラグメントのメチルエステル体のアルカリ加水分解は副反応が伴うことが知られている<sup>65)</sup>。そこで、フラグメント[3]のC-末端保護基はメチルエステルから、穏和な条件下、還元的に脱保護できるphenacyl (Pac) エステルへ変換した(Fig. 6)。

以上の方法により合成したフラグメント[1]~[5]をFig. 2に示すルートに従って順次縮合した。フラグメント縮合は全てDMF中DCC-HOBt法により行った。フラグメント[1]のBoc基を脱保護して得られたアミン成分とフラグメント[2]のC-末端メチルエステルのアルカリ加水分解により得られた酸成分を縮合し、14位から20位に相当するヘプタペプチド[Z-14-20]を80%の収率で得た。[Z-14-20]は接触還元して、アミン成分[H-14-20]にした。[3]と[4]も同様に脱保護後、縮合し7位から13位に相当する保護ヘプタペプチド[Z-7-13-OPac]を60%の収率で得た。[Z-7-13-OPac]のPac基を10%酢酸中Znにより還元的に脱保護することにより、対応する酸成分[Z-7-13-OH]を得た。[Z-7-13-OH]とアミン成分[H-14-20]を縮合させ、7位から20位に相当するテトラデカペプチド[Z-7-20]を40%の収率で得た。最後にフラグメント[5]のアルカリ加水分解により得られた酸成分と[Z-7-20]の接触還元により得たアミン成分とを縮合さ

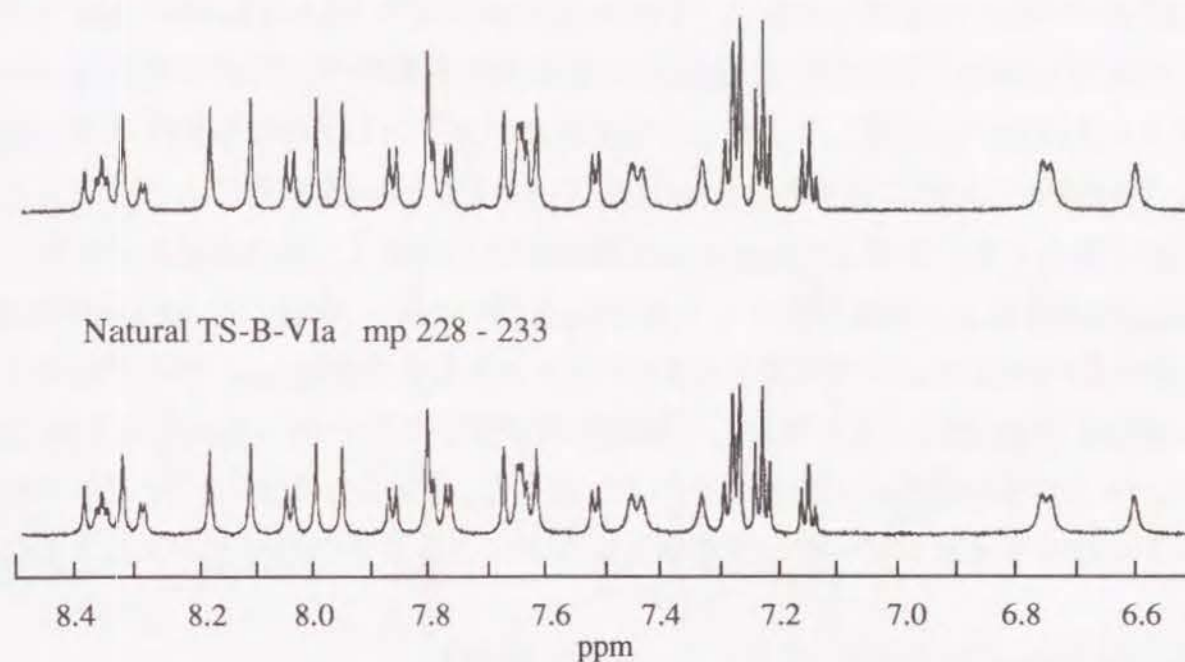


せた。生成物をセファデックスLH-20と逆相HPLCにより精製し、TS-B-VIaを30%の収率で得た。合成TS-B-VIaは逆相HPLCにおいて単一のピークを示し、その保持時間は天然物のそれと一致した(実験の部)。合成TS-B-VIaの融点、旋光度NMR及びCDのデータも天然物のそれと一致した(実験の部およびFig. 7a)。

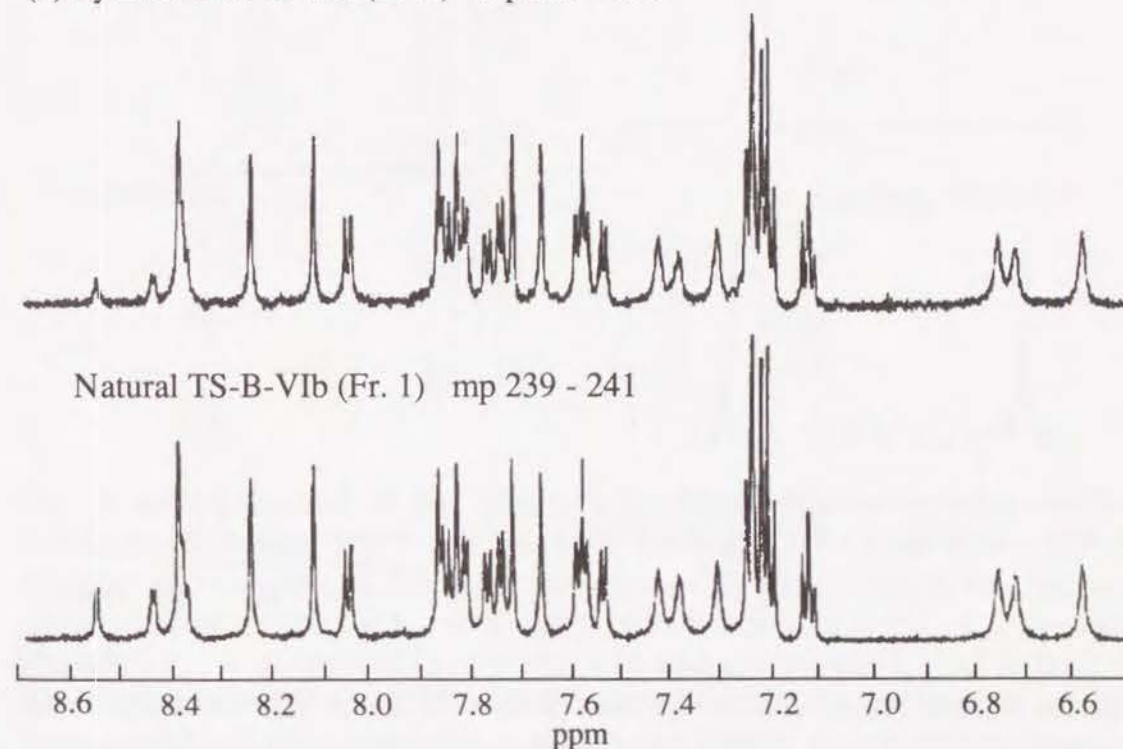


**Fig. 6. Synthetic Scheme for Fragments [1]-[5].** a, TFA-anisole; b, DCC-HOBT; c, H<sub>2</sub> / Pd-C; d, NaOHaq; e, phenacyl bromide.

(a) Synthetic TS-B-VIa mp 232 - 234



(b) Synthetic TS-B-VIb (Fr. 2) mp 238 - 239

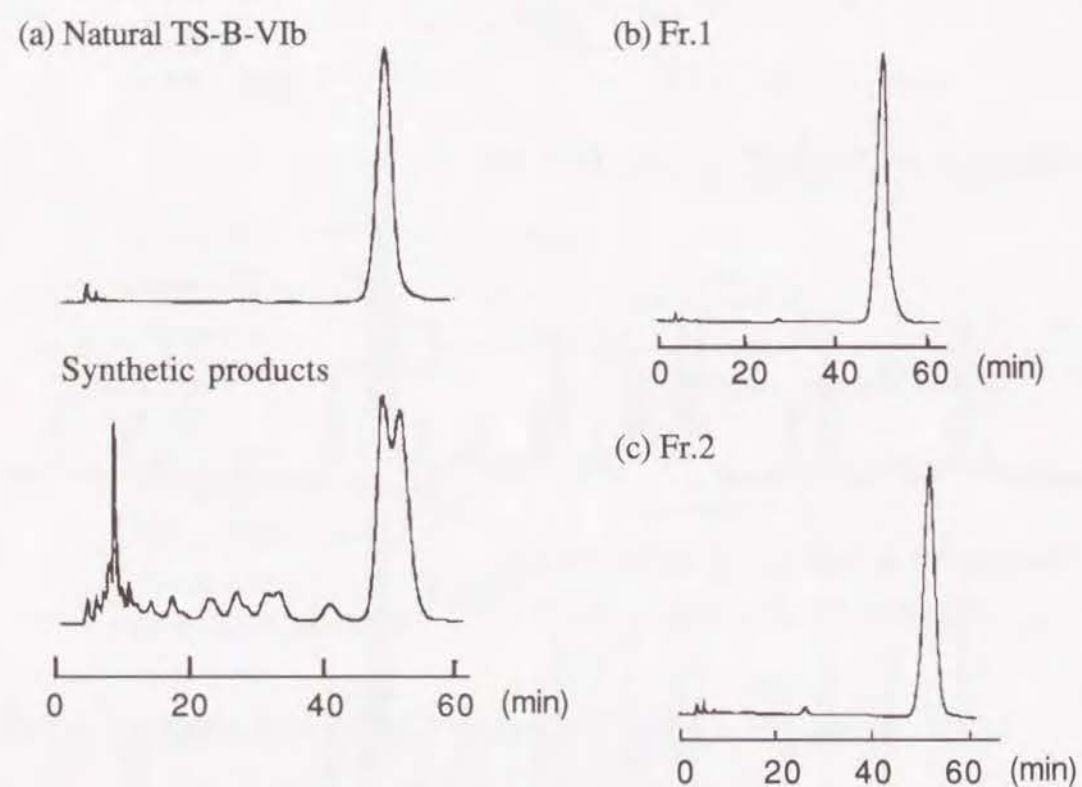


**Fig. 7. Parts of <sup>1</sup>H-NMR Spectra Compared between Synthetic and Natural products for TS-B-VIa (a) and TS-B-VIb (b) with Their Melting Points.**



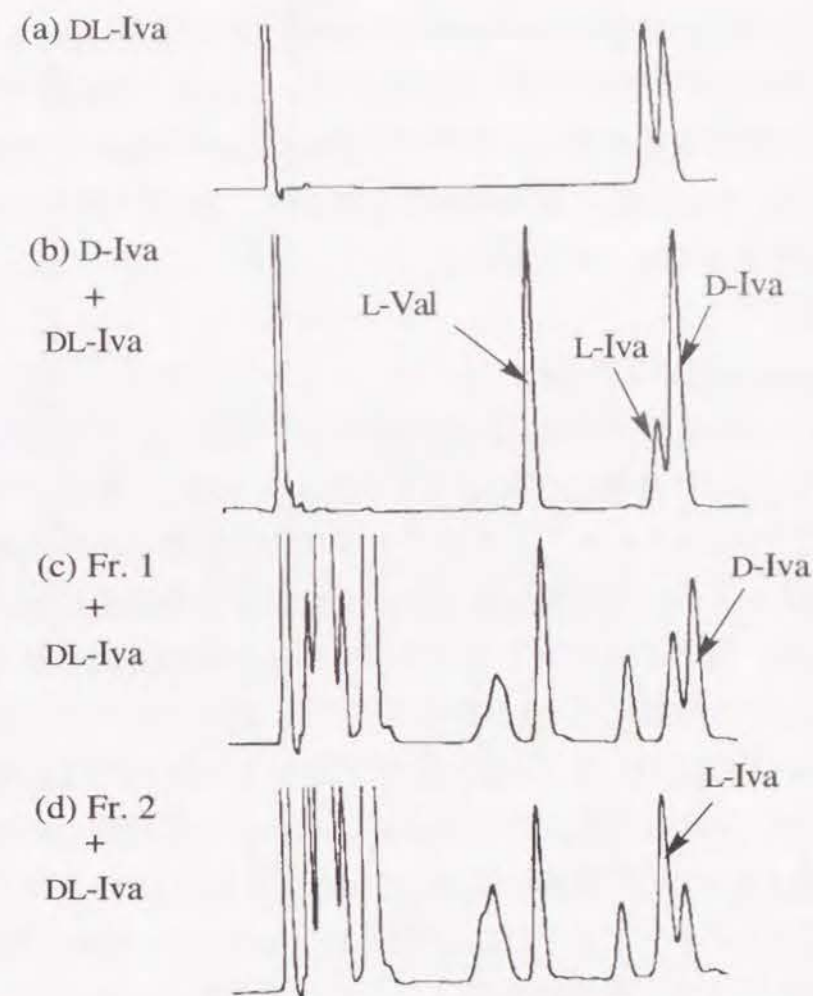
### 3-1-3 Trichosporin-B-VIbの合成

TS-B-VIbもTS-B-VIaの合成と同様の方法で合成した。ただし、TS-B-VIbとTS-B-VIaは3位と17位の残基のみ異なる (TS-B-VIb:Ala<sup>3</sup>, Iva<sup>17</sup>; TS-B-VIa:Aib<sup>3</sup>, Aib<sup>17</sup>) ため、TS-B-VIaの合成フラグメント[1], [3], [4]はそのまま使い、[2],[5]に対応するフラグメントは新たに合成した。新たに合成したフラグメントを[2'],[5']とした (Fig. 5)。TS-B-VIbの17位に含まれるIvaはD-体であるが、D-Ivaを大量に入手することが困難であるため、松浦らのhypelcin-A-IIIの合成と同様に、本合成においてもStreckerの方法により合成したラセミ体のIvaを用いた<sup>8e)</sup>。合成した [DL-Iva<sup>17</sup>]TS-B-VIbは逆相のHPLCにおいて近接した2本のピークを与えた (Fig.8a)。それぞれのピークの成分を分取HPLCにより単離し、保持時間が短いものをFr. 1長いものをFr. 2とした。Fr. 1の保持時間は天然物のそれと一致した。(Fig.8b)しかし、Fr. 2のマスペクトルは分子イオンピークの質量数とフラグメントイオンのパターンはともに



**Fig. 8. Separation of TS-B-VIb and [L-Iva<sup>17</sup>] TS-B-VIb from Synthetic Mixture by HPLC.** (a) HPLC chromatograms compared between natural TS-B-VIb (standard) and the synthetic mixture. The retention time of Fr. 1 in the synthetic mixture is identical to that of TS-B-VIb. (b) and (c) The chromatograms of the separated fractions of the synthetic mixture. HPLC conditions: mobile phase, CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O = 6 / 4; column, YMC-ODS (6 mm i.d. × 250mm); flow rate, 0.8 ml / min.

TS-B-VIbのそれと区別が付かなかった。そこで、光学活性なカラムを用いたHPLC分析により両成分のアミノ酸の絶対構造を決定した。その結果、Fr. 1が天然型の [D-Iva<sup>17</sup>]TS-B-VIbをFr. 2が非天然型の [L-Iva<sup>17</sup>]TS-B-VIbを含むことが明らかになった (Fig. 9)。合成TS-B-VIbの融点、旋光度、<sup>1</sup>H-NMR及びCDのデータは天然物のそれと一致した (実験の部および Fig. 7b)。



**Fig. 9. Determination of the Absolute Configuration of Isovaline in Two Synthetic Fractions (Fr. 1 and Fr. 2) of TS-B-VIb by Chiral Phase HPLC.** Analysis of synthetic DL-Iva gives two peaks (a), one of which has the same retention time as the synthetic D-Iva<sup>67)</sup> (which contains L-Val as a synthetic mixture) (b). A mixture of DL-Iva and acid hydrolysate of Fr. 1 (c) or Fr. 2 (d) increase the intensity of D-Iva or L-Iva, respectively, indicating that Fr. 1 contains D-Iva and Fr. 2 contains L-Iva. HPLC conditions: mobile phase, hexane / (CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>/ethanol = 94/5/1; column, Sumipax OA-4100 (4.6 mm i.d. × 250 mm); flow rate, 0.8 ml/min; column temperature, 35°C; detection, 254nm.



## 第2節 [Aib<sup>14</sup>] trichosporin-B-VIa の合成

### 3-2-1 目的と概略

第2章で述べたように、Pro残基はペプチドボールのみならず、チャンネルタンパクやトランスポーターの膜貫通ヘリックスに比較的高率に存在し、ヘリックスに折れ曲がり構造を形成するとともに、Pro周辺に極性の環境を形成する。このようなProの性質は膜貫通ヘリックスの機能に重要な役割を果たしていると考えられる。特に、TS-B-VIaを含め、20残基のペプチドボールは、全て14位にProを持ち（第2章、Table 1）、このProがペプチドボールチャンネルの構造と機能にどのような役割を果たしているか興味を持たれる。そこで、TS-B-VIaの14位Proの役割を明らかにすることを目的に、ProをAibに置換することにより、Proでの折れ曲がりもなくした誘導体、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa、を合成した。

### 3-2-2 [Aib<sup>14</sup>]trichosporin-B-VIaの合成

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの合成はTS-B-VIaの合成に用いたフラグメントを用いた。ただしフラグメント[2]のProはAibに置換したもの（フラグメント[2'']）を用いた。このAib置換フラグメント[2'']のメチルエステルのアルカリ加水分解は副生成物を与えた。そこでこのフラグメントのC-末端保護基をFig 10に示す合成経路に従い、phenacylエステルに変換した。対応するテトラペプチドのC-末端保護基は収率良く脱保護された。以上の方法により合成したAib置換フラグメント[2'']およびTS-B-VIaの合成に用いたフラグメント[1], [3]~[5]をFig. 5に示すルートに従って順次縮合した。生成物の高分解能FABマススペクトルの分子イオンピークの質量数([M+H]<sup>+</sup>; 1953.152)は[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの計算値(calcd for C<sub>91</sub>H<sub>154</sub>N<sub>23</sub>O<sub>24</sub>; 1953.154)を示した。また、主なフラグメントイオンピークは[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのacylium ion由来のものであり、ペプチドシーケンスに間違いがないことが確認された(Fig. 11)。

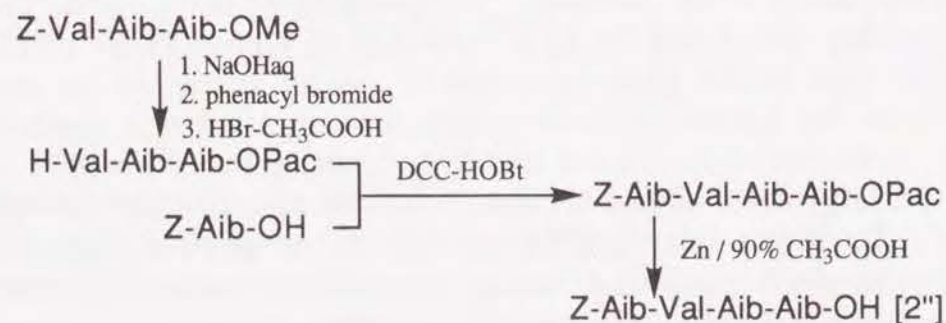
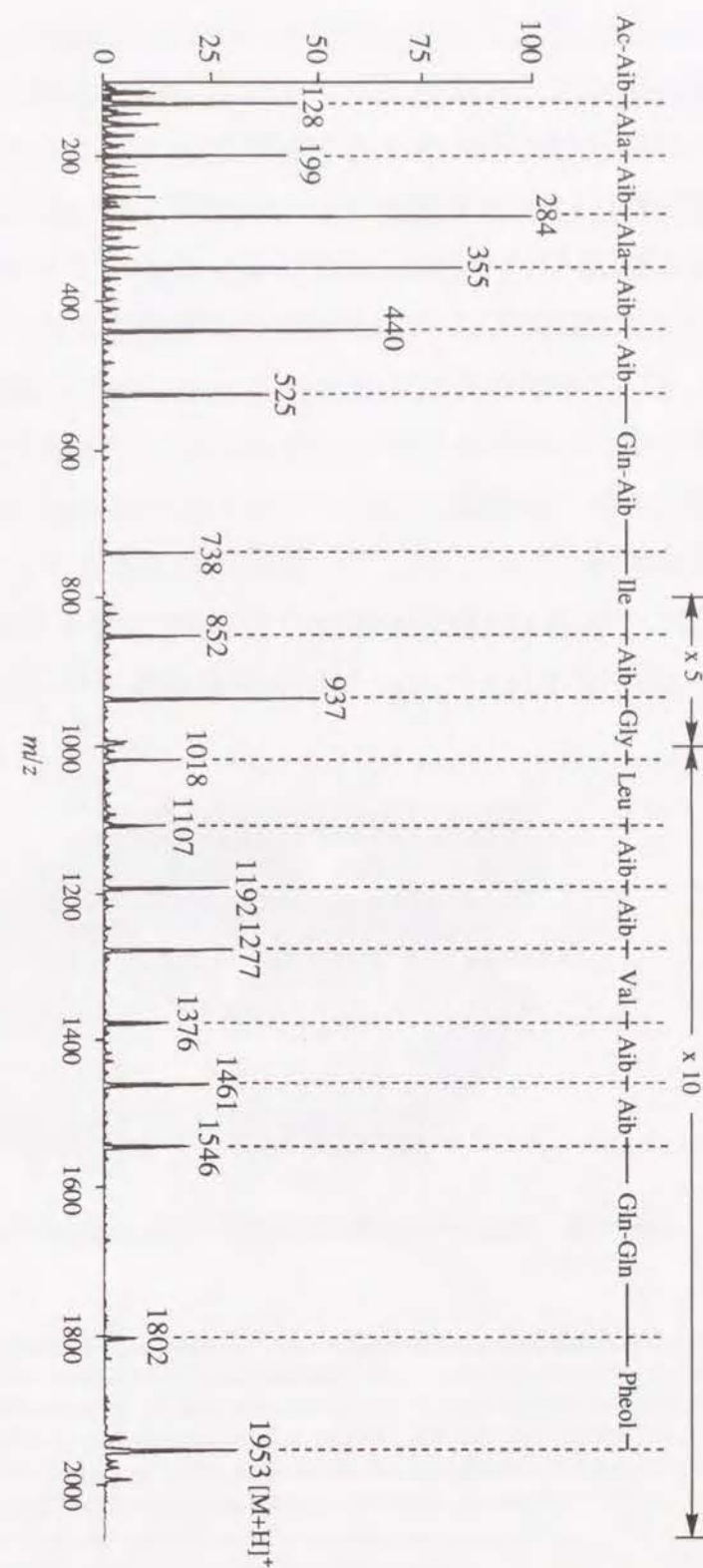


Fig. 10. Synthetic Scheme for Fragment [2''].

Fig. 11. FAB-MS Spectrum of [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa





### 第3節 残基数が異なるtrichosporin-B-VIa誘導体の合成

#### 3-3-1 目的と概略

第2章で述べたように、ヘリックスバンドルモデル(Fig. 12)で説明されるペプタイボールチャンネルはその構造上、チャンネル活性を発現させるためには、膜を貫通する長さが必要がある。第2章で述べたように、ヘリックス状のペプチドが膜を貫通するためには20残基以上でなければならない。しかしながら、19残基以下のチャンネル形成ペプタイボールやチャンネルペプチドが報告されている。また、現在までにかかなり多くのペプタイボール類が発見されてきたが(Table 1)、21残基以上のペプタイボールは未だ見出されていない。以上の事柄を考え合わせると、ペプタイボールがチャンネルを形成するには本当に20残基以上の長さ(残基数)が必要なのか、21残基以上のペプタイボールはどのようなチャンネル活性を示すのか興味を持たれる。そこで、著者は残基数とチャンネル形成能との相関を調べるために、TS-B-VIaをN-末端から1残基ずつ減らした誘導体及び1残基ずつAibを縮合し、長さを延長したFig. 13に示す誘導体を合成した。

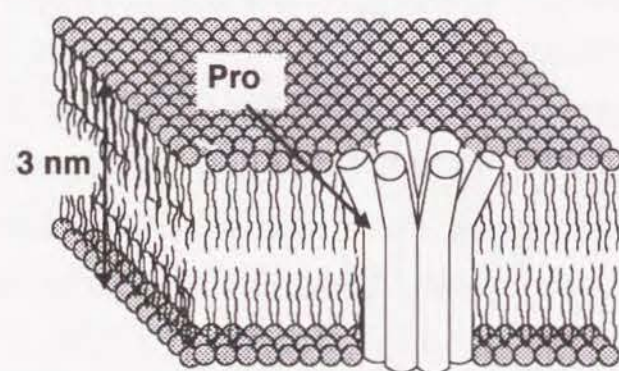


Fig. 12. Helix Bundle Model of Peptaibol Ion-Channel.

(+3)	Ac-Aib-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(+2)	Ac-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(+1)	Ac-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
TS-B-VIa	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(-1)	Ac-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(-2)	Ac-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(-3)	Ac-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
(-4)	Ac-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

Fig. 13. Primary Structure of TS-B-VIa and Its Derivatives with Elongation and Truncation.

#### 3-2-4 残基数が異なるTS-B-VIa誘導体の合成

TS-B-VIa合成に用いたC-末端テトラデカペプチド[H-7-20]に9残基~2残基のN-末端オリゴペプチドを縮合することにより、残基数23~16のTS-B-VIa誘導体([+3], [+2], [+1], [-1], [-2], [-3], および[-4]) (Fig. 13)を合成した。残基数の異なるN-末端オリゴペプチドはTS-B-VIa合成に用いたフラグメント[5]の合成中間体を有効に用いて合成した。合成された誘導体はすべて逆相のHPLCにおいて、単一のピークを与え、その組成は高分解能FAB-MS測定により確認された。各誘導体のESI-MSMSにおける主なフラグメントイオンピークは、目的物のアシリウムイオンピークであった(Fig. 14に例として[-1]誘導体のESI-MSおよびMSMSスペクトルを示す、そして、Table 2にその他の誘導体について得られた結果を要約する)。

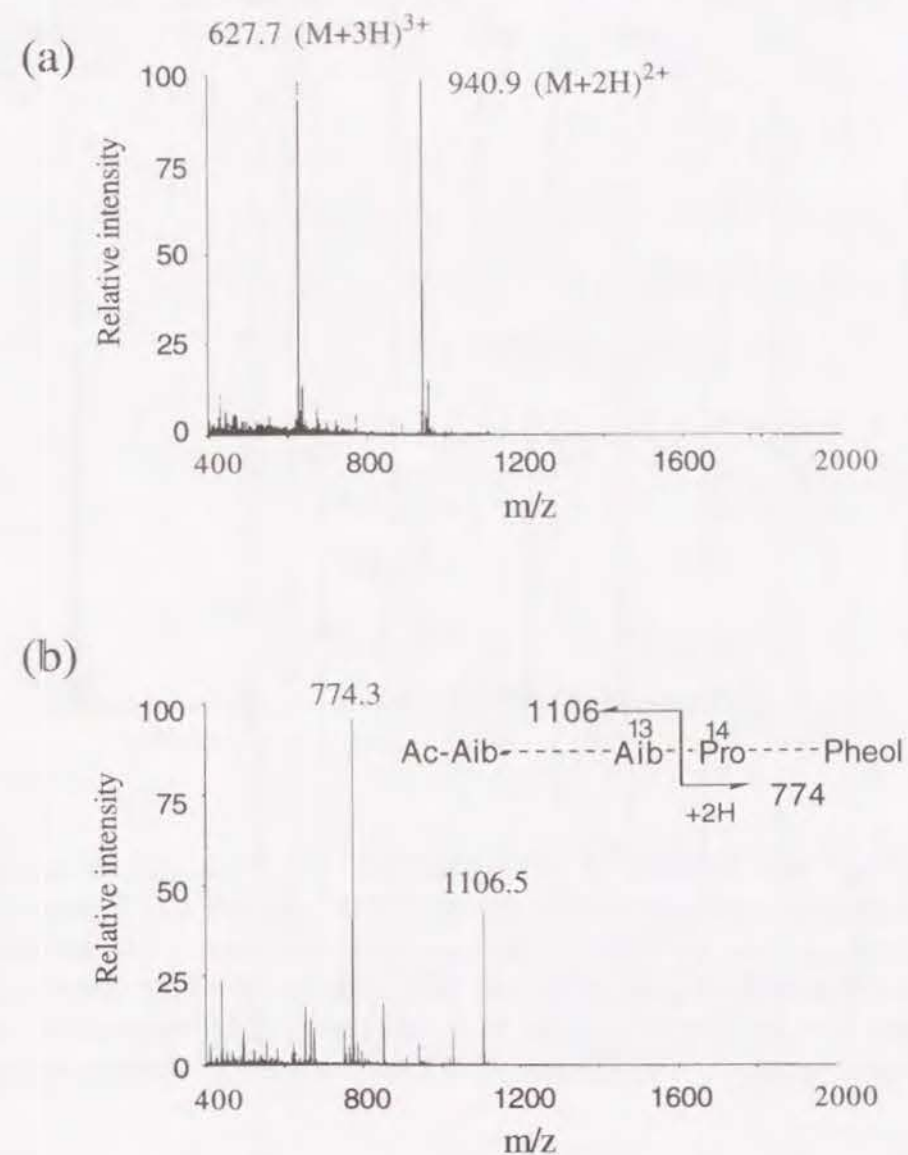


Fig. 14



Table 2. Molecular Ions and Fragment Ions Observed for Added and Truncated Derivatives of TS-B-VIa.

	Multiple charged ions			Acylium ion series assignable as the amino acid sequence of N-terminal oligopeptides <sup>a)</sup>																
	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+3H] <sup>3+</sup>	M	+3	+2	+1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
[+3]	1111.1	741.5	2220	Ac 43	Aib 128	Aib 213	Aib 298	Aib 383	Ala 454	Aib 539	Ala 610	Aib 695	Aib 780	Gln 908	Aib 993	Ile 1106	Aib 1191	Gly 1248	Leu 1361	Aib 1446
[+2]	1068	712	2134	Ac 43	Aib 128	Aib 213	Aib 298	Ala 369	Aib 454	Ala 525	Aib 610	Aib 695	Gln 823	Aib 908	Ile 1021	Aib 1106	Gly 1163	Leu 1276	Aib 1361	
[+1]	1025	684	2049	Ac 43	Aib 128	Aib 213	Ala 284	Aib 369	Ala 440	Aib 525	Aib 610	Gln 738	Aib 823	Ile 936	Aib 1021	Gly 1078	Leu 1191	Aib 1276		
[-1]	940.9	627.7	1880				Ac 43	Ala 114	Aib 199	Ala 270	Aib 355	Aib 440	Gln 568	Aib 653	Ile 766	Aib 851	Gly 908	Leu 1021	Aib 1106	
[-2]	905.4	603.8	1808				Ac 43	Aib 128	Ala 199	Aib 284	Aib 369	Gln 497	Aib 582	Ile 695	Aib 780	Gly 837	Leu 950	Aib 1035		
[-3]	862.6	575.4	1723					Ac 43	Ala 114	Aib 199	Aib 284	Gln 412	Aib 497	Ile 610	Aib 695	Gly 752	Leu 865	Aib 950		
[-4]	827.1	551.8	1652						Ac 43	Aib 128	Aib 213	Gln 341	Aib 426	Ile 539	Aib 624	Gly 681	Leu 794	Aib 879		

a) These ions are product ions of N-terminal fragment ions result from a cleavage at an Aib-Pro bond in each analogues. The product ions of the C-terminal fragments (*m/z* 774) was observed at *m/z* 196, 281, 367, 495 and 622, in common for every analogues, which are assignable as Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol.

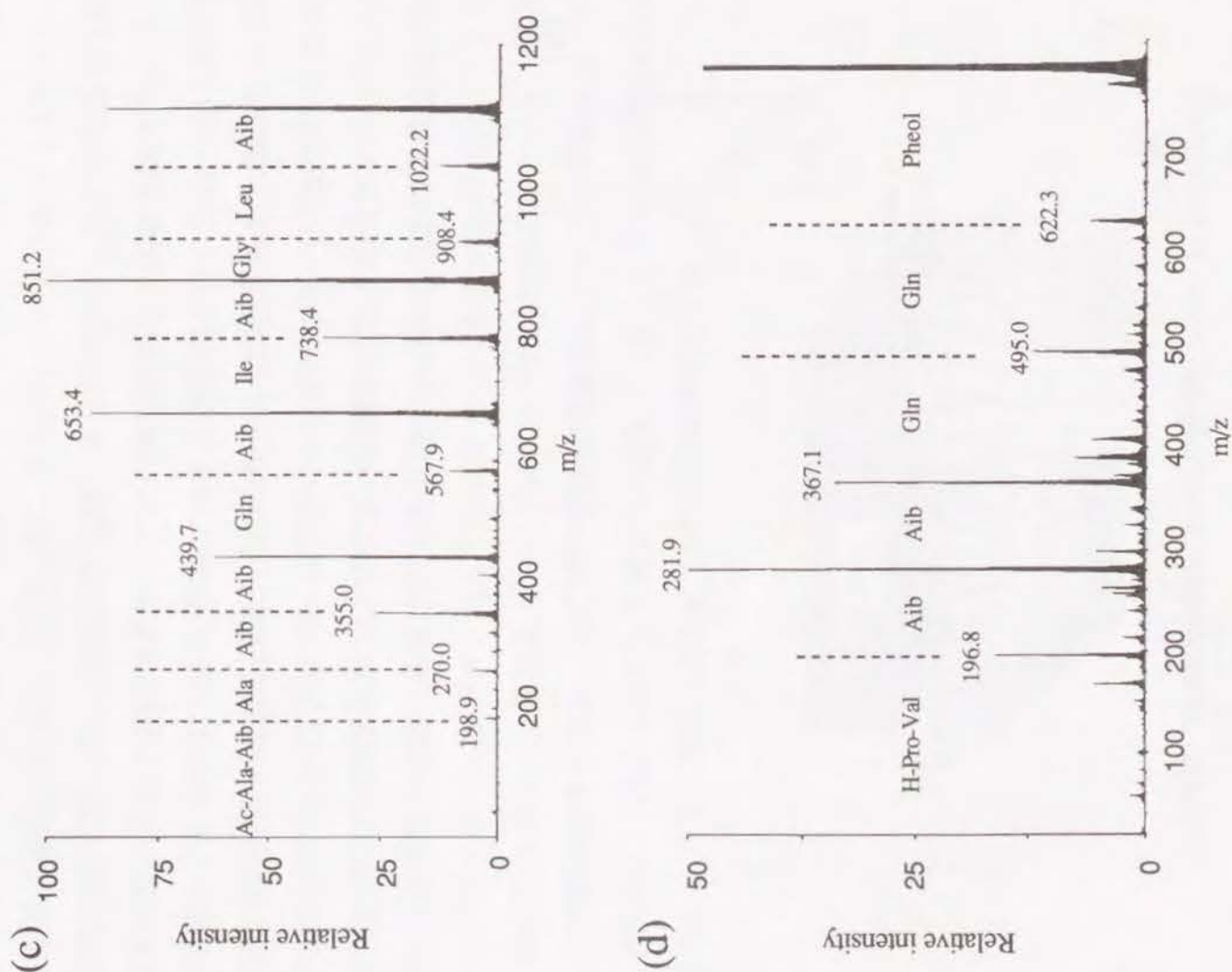


Fig. 14. ESI-MS and MS/MS of [-1] TS-B-VIa. (a) Two- and three- fold charged molecular ions were observed at *m/z* 940.9 and *m/z* 627.7 when the orifice (OR) voltage was set at 50 V. The monoisotopic mass, 1880, estimated from these ions was in agreement with that of the desired product. (b) Cluster buster fragmentation at OR=90V caused by a cleavage at Aib-Pro bond; (c) and (d), MS/MS spectra of *m/z* 1106.5 and 774.3 give sequence specific acylium ions.



第1節 Trichosporin-B-VIaおよび[Aib<sup>14</sup>]trichosporin-B-VIaの2次構造

4-1-1 目的と概略

TS-B-VIaおよび[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの構造と活性との相関性を明らかにするために、これらの化合物の詳細な2次構造をCDとNMRを用いて検討した。ペプチドは主に脂質中で作用するので、溶媒は脂質に疑似し得るメタノールを用いた<sup>37)</sup>。NMRを用いたペプチドの高次構造の推定には、正確なシグナルの帰属が不可欠である。そこで、まず、TS-B-VIaおよびその誘導体の<sup>1</sup>H-NMRシグナルを帰属した後、2次構造解析をした。

4-1-1 円二色性(CD)スペクトル

TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのMeOH中におけるCDスペクトルは全て、208と222nm付近に極小値をもつ負のCotton効果による吸収を示した(Fig. 15)。この結果はこれらのペプチドがMeOH中では主に右旋性のヘリックス構造をとることを示している。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの楕円率はTS-B-VIaのそれに比べてかなり増大している。

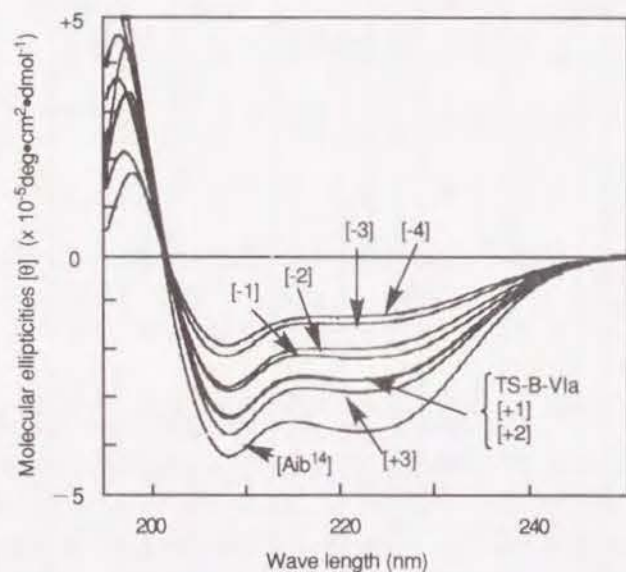


Fig. 15 CD Spectra of TS-B-VIa and Its Derivatives in MeOH (25 °C)

この結果は[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのヘリックス含量がTS-B-VIaよりも大きいことを示している。それぞれのヘリックス含量を208と222nmにおける一残基当たりのモル楕円

率の値から計算すると<sup>68)</sup>、TS-B-VIaが46%、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaが60%となる。

4-1-2 <sup>1</sup>H-NMRシグナルの帰属

TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの<sup>1</sup>H-NMRシグナルはDQF-COSY<sup>69)</sup> およびNOESY<sup>70)</sup>の2次元NMRを用いて帰属した。構成アミノ酸およびPheolのスピンスystemはDQF-COSYを用いて帰属した。しかし、Aibには $\alpha$ プロトンが存在しないため、DQF-COSYによるAibのC $\beta$ -H<sub>3</sub>プロトンシグナルの帰属は困難である。そこで、これらのシグナルはNOESYを用いてNHとC $\beta$ -H<sub>3</sub>間のNOEから帰属した。分子中に複数存在するAib, Ala, Glnの位置の特定はWagnerとWüthrichにより提出された方法<sup>71)</sup>を用いた。すなわち、隣接した残基間で観測されるd<sub>NN</sub>(i, i+1)型とd <sub>$\alpha$ N</sub>(i, i+1)型のNOE (前者はi番目とi+1番目の残基のNH間のNOEを、後者はi番目の $\alpha$ プロトンとi+1番目の残基のNH間のNOEを意味する) (Fig. 16)から、各 $\alpha$ プロトンとNHシグナルについて連続帰属を行った。

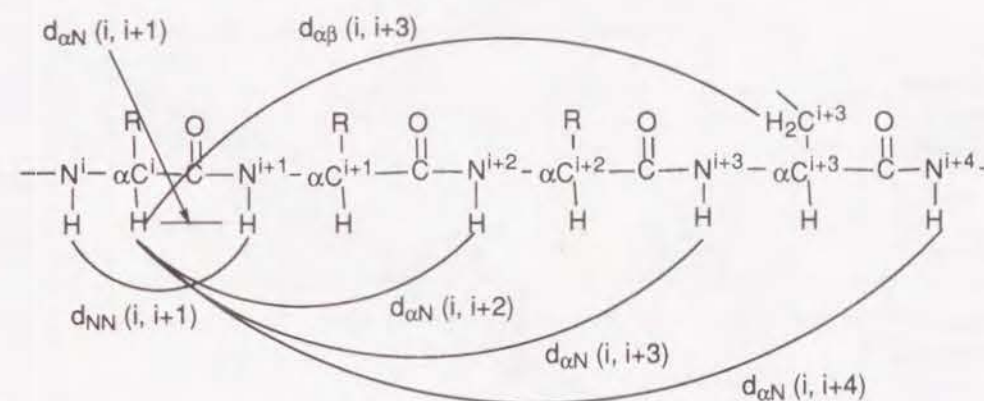
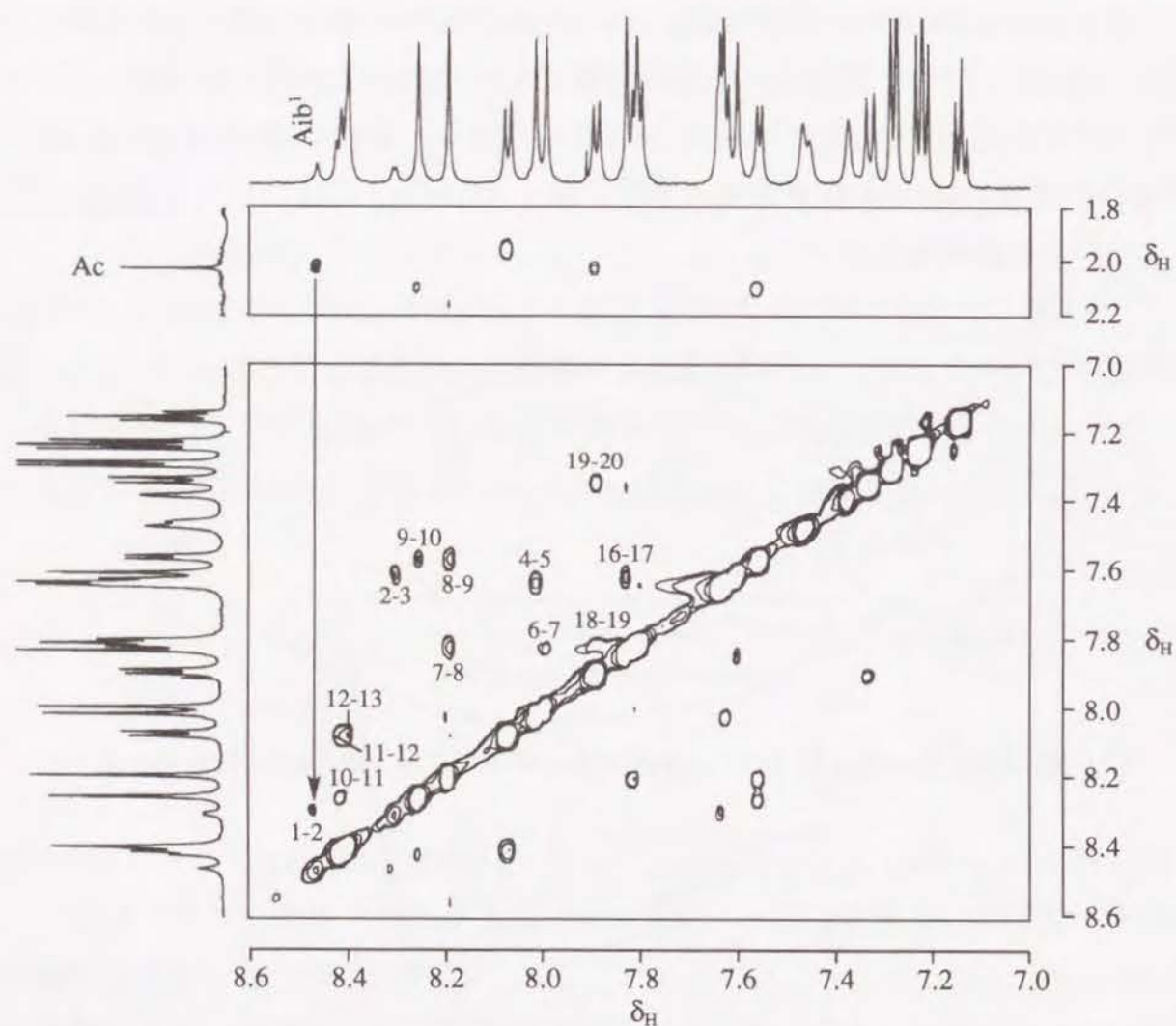


Fig. 16. Inter Residue H-H Connectivities of NOE in a Peptide Fragment.

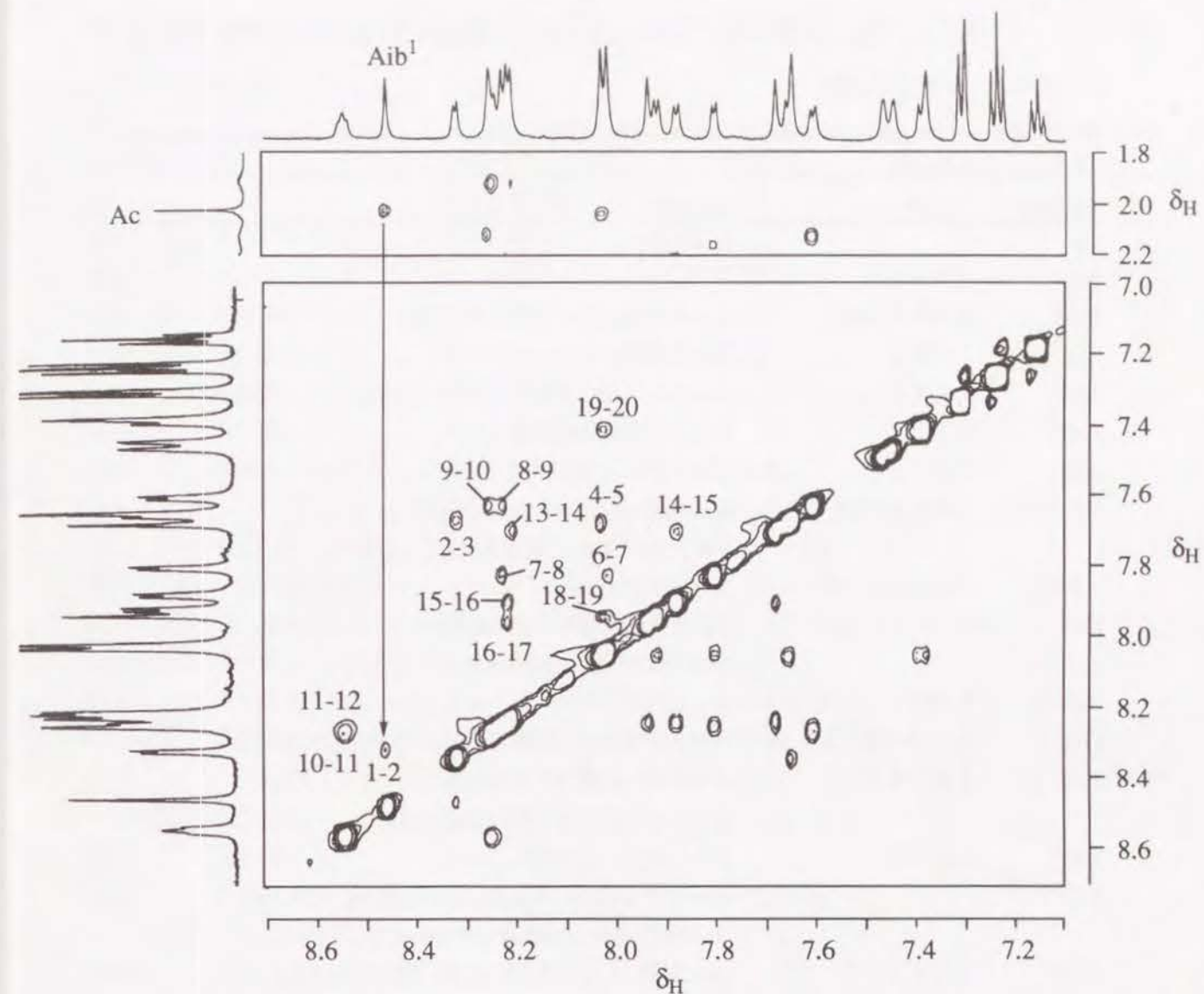
Fig. 17にTS-B-VIa、そしてFig. 18に[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのNOESYスペクトルの一部を示す。両図中、低磁場に認められるAibNHシグナルの一つは、アセチル基のC $\beta$ -H<sub>3</sub>とクロスピークを示した。よって、このシグナルはAib<sup>1</sup>NHであると帰属される。Fig. 17に示すように、TS-B-VIaのNH-NH領域には、隣接したアミノ酸残基間のNH-NHクロスピークが、Aib<sup>1</sup>~Aib<sup>3</sup>、Ala<sup>4</sup>~Aib<sup>5</sup>、Aib<sup>6</sup>~Aib<sup>13</sup>、およびGln<sup>18</sup>~Pheol<sup>20</sup>の間で連続して観測された。Fig. 18に示すように、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaについては、Aib<sup>1</sup>~Aib<sup>3</sup>、Ala<sup>4</sup>~Aib<sup>5</sup>、Aib<sup>6</sup>~Leu<sup>12</sup>、Aib<sup>13</sup>~Aib<sup>17</sup>、およびGln<sup>18</sup>~Pheol<sup>20</sup>の間で連続して観測された。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaについてはすべてのNHシグナルを連続帰属することができた。一方、TS-B-VIaのVal<sup>15</sup>~Gln<sup>18</sup>の間には連続したNH-NH



クロスピークが認められなかったために、 $\delta_{\text{H}}$  7.602と7.829のNHシグナルをAib<sup>1</sup>NHかAib<sup>17</sup>NHのシグナルとして区別することができなかった。しかし、 $\delta_{\text{H}}$  = 7.829のNHシグナルをもつAibのC <sup>$\beta$</sup> -H<sub>3</sub>とGln<sup>18</sup>NHとの間にクロスピークを示したことから、このNH( $\delta_{\text{H}}$  = 7.829)を17位に、もう一方( $\delta_{\text{H}}$  = 7.602)を16位と帰属することができた。以上のようにして、DQF-COSYとNOESYを用いて帰属したTS-B-VIaおよび[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのプロトンの化学シフト値ならびに結合定数をそれぞれTable 3とTable 4に示す。



**Fig. 17.** Parts of the 600 MHz NOESY Spectra of TS-B-VIa at 20 °C in CD<sub>3</sub>OH (20 mM). Sequential NH-NH and acetyl C $\alpha$ H-NH cross-peaks [ $d_{\text{NN}}(i, i+1)$  and  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ ] are shown. The NH proton which has a cross peak with the acetyl C <sup>$\beta$</sup> H<sub>3</sub> proton was assigned as the Aib<sup>1</sup> NH proton. The other NH protons were assigned from the NH-NH connectivities [ $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ ] extended from the Aib<sup>1</sup> NH proton. The signals of the Aib<sup>1</sup> and Ala<sup>2</sup> NHs were suppressed because of the transfer of solvent saturation.



**Fig. 18.** Parts of the 600 MHz NOESY Spectra of [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa at 20 °C in CD<sub>3</sub>OH (20 mM). Sequential NH-NH and acetyl C $\alpha$ H-NH cross-peaks [ $d_{\text{NN}}(i, i+1)$  and  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ ] are shown. The NH proton which has a cross peak with the acetyl C <sup>$\beta$</sup> H<sub>3</sub> proton was assigned as the Aib<sup>1</sup> NH proton. The other NH protons were assigned from the NH-NH connectivities [ $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ ] extended from the Aib<sup>1</sup> NH proton.



**Table 3.** Proton Chemical Shifts and Coupling Constant Values of TS-B-VIa in CD<sub>3</sub>OH at 20 °C (20 mM)

Trichosporin B-VIa		
Residue	NH <sup>a)</sup>	Others <sup>a)</sup>
Ac		$\alpha = 2.020$ s
Aib <sup>1</sup>	8.461 s	
Ala <sup>2</sup>	8.302 d (4.1)	$\alpha = 4.01$ m, $\beta = 1.425$ d (7.3)
Aib <sup>3</sup>	7.629 s	$\beta = 1.524$ s
Ala <sup>4</sup>	7.624 d (5.7)	$\alpha = 4.061$ dq (5.7, 7.1), $\beta = 1.463$ d (7.1)
Aib <sup>5</sup>	8.013 s	$\beta = 1.535$ s, 1.462 s
Aib <sup>6</sup>	7.991 s	$\beta = 1.571$ s, 1.520 s
Gln <sup>7</sup>	7.812 d (5.5)	$\alpha = 3.87$ m, $\beta = 2.26$ m, 2.16 m, $\gamma = 2.562$ ddd (5.6, 9.3, 15.2), 2.40 m
Aib <sup>8</sup>	8.192 s	$\beta = 1.585$ s, 1.52 s
Ile <sup>9</sup>	7.556 d (6.0)	$\alpha = 3.71$ m, $\beta = 2.08$ m, $\gamma = 1.75$ m, 1.35m, $\gamma^2 = 0.959$ d (7.2), $\delta = 0.870$ t (7.3)
Aib <sup>10</sup>	8.254 s	$\beta = 1.550$ s
Gly <sup>11</sup>	8.412 dd (5.0, 6.5)	$\alpha = 3.934$ dd (5.0, 16.5), 3.675 dd (6.5, 16.5)
Leu <sup>12</sup>	8.070 d (7.7)	$\alpha = 4.45$ m, $\beta = 1.95$ m, 1.60 m, $\gamma = 1.95$ m $\delta = 0.959$ d (6.7), 0.918 d (6.5)
Aib <sup>13</sup>	8.397 s	$\beta = 1.620$ s, 1.545 s
Pro <sup>14</sup>		$\alpha = 4.388$ dd (6.3, 8.7), $\beta = 2.32$ m, 1.81 m, $\gamma = 2.07$ m, 1.97 m, $\delta = 3.88$ m, 3.76 m
Val <sup>15</sup>	7.631 d (8.2)	$\alpha = 3.73$ m, $\beta = 2.33$ m, $\gamma = 1.978$ d (6.8), 1.071 d (6.5)
Aib <sup>16</sup>	7.602 s	$\beta = 1.545$ s
Aib <sup>17</sup>	7.829 s	$\beta = 1.535$ s
Gln <sup>18</sup>	7.802 d (6.2)	$\alpha = 4.00$ m, $\beta = 2.24$ m, $\gamma = 2.62$ ddd (6.4, 8.8, 15.2), 2.44 m
Gln <sup>19</sup>	7.890 d (7.4)	$\alpha = 4.16$ m, $\beta = 2.03$ m, $\gamma = 2.31$ m, 2.19 m
Pheol <sup>20</sup>	7.331 d (9.2)	$\alpha = 4.14$ m, $\beta = 2.939$ dd (5.5, 13.7), 2.729 dd (8.9, 13.7), $\beta^2 = 3.617$ d (5.1)

a) Chemical shifts (ppm) were measured either from the one-dimensional spectra ( $\Delta\delta = \pm 0.001$  ppm) or from the two-dimensional spectra ( $\Delta\delta = \pm 0.01$  ppm). Coupling constant values (Hz) in parentheses were measured from the one-dimensional spectra.

**Table 4.** Proton Chemical Shifts and Coupling Constant Values of [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa in CD<sub>3</sub>OH at 20 °C (20 mM)

Residue	NH <sup>a)</sup>	Others <sup>a)</sup>
Ac		$\alpha = 2.026$ s
Aib <sup>1</sup>	8.460 s	$\beta = 1.47$ s
Ala <sup>2</sup>	8.321 d (4.2)	$\alpha = 4.01$ m, $\beta = 1.430$ d (7.3)
Aib <sup>3</sup>	7.646s	$\beta = 1.526$ s
Ala <sup>4</sup>	7.652 d (5.7)	$\alpha = 4.04$ m, $\beta = 1.463$ d (7.5)
Aib <sup>5</sup>	8.030 s	$\beta = 1.546$ s
Aib <sup>6</sup>	8.018 s	$\beta = 1.58$ s, 1.511 s
Gln <sup>7</sup>	7.802 d (4.7)	$\alpha = 3.88$ m, $\beta = 2.25$ m, 2.15 m, $\gamma = 2.576$ ddd (5.5, 9.4, 15.1), 2.381 ddd (6.6, 9.2, 15.1)
Aib <sup>8</sup>	8.229 s	$\beta = 1.605$ s, 1.546 s
Ile <sup>9</sup>	7.604 d (5.5)	$\alpha = 3.677$ dd (5.5, 10.6), $\beta = 2.13$ m, $\gamma = 1.76$ m, 1.38m, $\gamma^2 = 0.967$ d (6.8), $\delta = 0.869$ t (7.4)
Aib <sup>10</sup>	8.254 s	$\beta = 1.58$ s, 1.533 s
Gly <sup>11</sup>	8.546 dd (4.5, 6.6)	$\alpha = 3.801$ dd (4.5, 15.7), 3.691 dd (6.6, 15.7)
Leu <sup>12</sup>	8.247 d (5.6)	$\alpha = 4.06$ m, $\beta = 1.91$ m, 1.66 m, $\gamma = 1.89$ m $\delta = 0.952$ d (6.1), 0.942 d (5.7)
Aib <sup>13</sup>	8.211 s	$\beta = 1.58$ s, 1.494 s
Aib <sup>14</sup>	7.679 s	$\beta = 1.633$ s
Val <sup>15</sup>	7.878 d (5.1)	$\alpha = 3.615$ dd (5.1, 9.6), $\beta = 2.22$ m, $\gamma = 1.138$ d (6.5), 0.992 d (6.7)
Aib <sup>16</sup>	8.219 s	$\beta = 1.502$ s
Aib <sup>17</sup>	7.936 s	$\beta = 1.608$ s
Gln <sup>18</sup>	7.918 d (5.5)	$\alpha = 4.02$ m, $\beta = 2.28$ m, $\gamma = 2.673$ ddd (5.5, 9.6, 14.8), 2.465 dt (8.4, 14.8)
Gln <sup>19</sup>	8.024 d (7.0)	$\alpha = 4.16$ m, $\beta = 2.03$ m, $\gamma = 2.338$ dt (15.0, 7.2), 2.24 m
Pheol <sup>20</sup>	7.385 d (8.8)	$\alpha = 4.15$ m, $\beta = 2.942$ dd (5.5, 13.8), $\beta = 2.750$ dd (9.0, 13.8), $\beta^2 = 3.63$

a) Chemical shifts (ppm) were measured either from the one-dimensional spectra ( $\Delta\delta = \pm 0.001$  ppm) or from the two-dimensional spectra ( $\Delta\delta = \pm 0.01$  ppm). Coupling constant values (Hz) in parentheses were measured from the one-dimensional spectra.



#### 4-1-3 $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値

CDスペクトルからは、TS-B-VIaおよび[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはそれぞれヘリックス含量が異なる右旋性ヘリックス構造をとることが示された。さらに、より詳細な2次構造の情報を得るため、各種NMR実験を試みた。

ペプチドやタンパクの主鎖のコンフォメーションが二面角 $\phi$ と $\psi$ で決まることは第2章で述べた(Fig. 1)。アミドプロトンと $\alpha$ 位のプロトン間のビシナルスピン結合定数である $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値は介在する結合の二面角 $\phi$ を決定する。それゆえ、 $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値はペプチドやタンパクの2次構造に関する有用な情報源となる。Pardiらはウシ臍臓トリプシンインヒビターの結晶構造と $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値との関係付けをしている。その結果、 $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値が7 Hz以下の連続した残基が存在するとき、そこがヘリックス構造である可能性が高く、7 Hz以上である場合は $\beta$ 構造である可能性が高いという経験則を導いている<sup>72)</sup>。

TS-B-VIaのGly<sup>11</sup>までのN-末端部の $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値は6 Hz以下であり(Table 3)、Pardiらの経験則から判断すると、この部分が規則的なヘリックス構造をとることが示唆される。一方、12位以降のC-末端部分において、Leu<sup>12</sup>、Val<sup>15</sup>、Gln<sup>19</sup>およびPheol<sup>20</sup>の $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値は7~9 Hzであり、この部分が $\beta$ 構造である可能性がある。しかしながら、計算上は二面角 $\phi$ が $-45^\circ$ から $-180^\circ$ までの広い範囲でペプチドはヘリックス構造をとることが可能である。この角度に対応する $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値は2~9 Hzであり、 $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値が7 Hz以上であってもヘリックス構造である可能性は否定できない。実際に、タンパク質の構造中にヘリックス構造で $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値が7 Hz以上の部分がいくつか見出されている<sup>72)</sup>。そこで、TS-B-VIaのC-末端部分の詳細な構造については、後に述べるNOESYスペクトルの結果に基づいてさらに考察する。

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはGln<sup>19</sup>、Pheol<sup>20</sup>以外は7 Hz以下であり、TS-B-VIaに見られたC-末端部分での $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値の増大が見られなかった。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaは分子全体が規則的なヘリックス構造をとると考えられる。

#### 4-1-4 残基間NOE

$^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値の比較から、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaは12位からC-末端側の構造がTS-B-VIaのそれと異なることが示唆された。そこで、TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaについてさらに詳細な構造を求めるために、これら二つの化合物の残基間NOEを検討した。

TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの分子量は約2000であり、CD<sub>3</sub>OH中、常温ではNOEが出にくかった。そこで、今回の実験は、低温( $-5^\circ\text{C}$ )で行った。低温においては溶

液中の分子運動が抑制され相関時間が大きくなるため、負のNOEの増大が期待できる。

この実験を行うのに先立ち、濃度変化、温度変化によるペプチドの構造変化や会合の有無を調べるため5 mMから40 mM、 $-5^\circ\text{C}$ から $34^\circ\text{C}$ 迄のスペクトルを検討した。その結果、極端なケミカルシフトの値の変化やピーク幅の増大は観察されず、 $^3J_{\text{NH},\alpha\text{H}}$ 値の変化もきわめて少なかったことから、この濃度範囲、温度範囲でのペプチド構造の変化や会合は無いものと考えられる。したがって、以下に述べる構造は $-5^\circ\text{C}$ に於けるものであるが、室温( $20^\circ\text{C}$ )での構造も同様であると考えられる。

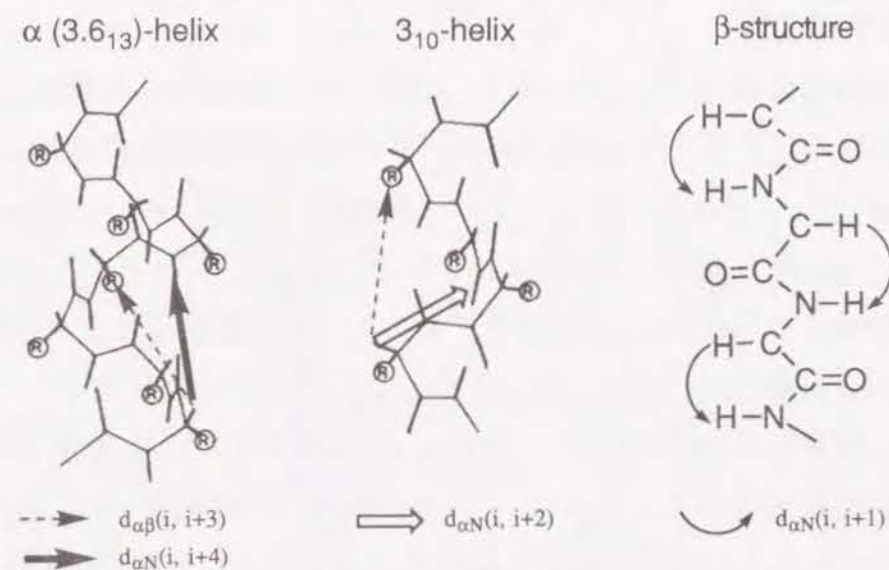


Fig. 19. Inter Residue H-H Connectivities Characteristic for  $\alpha$ -Helix,  $3_{10}$ -Helix and  $\beta$ -Structure.

NOESYスペクトルで観察される残基間NOEのパターンからペプチドの2次構造を推定する方法はWüthrichらにより確立されている<sup>73)</sup>。この方法を用いた構造推定の基準を示すと以下の様になる。以下に用いる、残基間NOEの表現方法は(Fig. 16)に示した通りである。

1.  $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ -,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ -,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ -,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ -,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ -そして $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ -タイプのNOEクロスピークが連続して観測されるときポリペプチドはヘリックス構造をとる。
2. ポリペプチド鎖が $\beta$ 構造をとるとき、 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ -タイプのNOEクロスピークは観測されるが $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ ,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$ ,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ そして $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ -タイプのNOEはH-H間距離が $4.5 \text{ \AA}$ 以上離れており、観測されない(Fig. 19)。
3.  $\alpha$ -ヘリックス構造と $3_{10}$ -ヘリックスは $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ と $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ -タイプのNOEを



用いて区別できる。すなわち、 $\alpha$ -ヘリックス構造では強い $d_{\alpha N}(i, i+4)$ -タイプのNOEが観測されるが $d_{\alpha N}(i, i+2)$ -タイプのNOEは観測されにくい。逆に、 $3_{10}$ -ヘリックスでは $d_{\alpha N}(i, i+2)$ -タイプのNOEが観測され、 $d_{\alpha N}(i, i+4)$ -タイプのNOEが観測されない(Fig. 19)。

Fig. 20とFig. 21にそれぞれTS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの低温で測定したNOESYスペクトルの一部を示す、そしてFig. 23に観測された残基間NOEを要約する。このデータを基に、上記の方法を使い、TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの2次構造を推定した。

#### 《TS-B-VIaの2次構造》

(1) Ac-Aib<sup>1</sup>~Gly<sup>11</sup>の構造: TS-B-VIaのAc-Aib<sup>1</sup>~Aib<sup>13</sup>の領域には隣接したアミノ酸残基間のNH-NHクロスピーク[ $d_{NN}(i, i+1)$ -タイプ]が全ての残基に連続して観察された(Fig.22)。また、 $\alpha$ プロトンをもつアミノ酸残基の大部分が[ $d_{\alpha N}(i, i+1)$ -タイプ,  $i = 0, 2, 7, 9, 11$ ], [ $d_{\alpha N}(i, i+3)$ -タイプ,  $i = 0, 4, 7, 9$ ], [ $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ -タイプ,  $i = 4, 9$ ]を有した。これらのNOEの存在はこの領域がヘリックス構造をとることを示唆している。TS-B-VIaのN-末端においては、強い $d_{\alpha N}(i, i+2)$ タイプのNOEがアセチルCH<sub>3</sub>とAla<sup>2</sup>NHとの間に観測されると同時に、強い $d_{\alpha N}(i, i+4)$ タイプのNOEがアセチルCH<sub>3</sub>とAla<sup>4</sup>NHとの間に観測される。よって、TS-B-VIaのN-末端は $\alpha$ -ヘリックス構造と $3_{10}$ -ヘリックス構造との中間的な構造であると考えられる。TS-B-VIaの4位から11位の領域では強い[ $d_{\alpha N}(i, i+4)$ タイプ,  $i = 4, 9$ ]のNOEが観測されることから、この領域は $\alpha$ -ヘリックス構造であると考えられる。しかし、 $d_{\alpha N}(i, i+4)$ タイプのNOEがGly<sup>11</sup>  $\alpha$  HとVal<sup>15</sup>NHとの間やLeu<sup>12</sup>  $\alpha$  HとAib<sup>16</sup>NHとの間に認められないことから $\alpha$ -ヘリックス構造は11位で終わっていると考えられる。

(2) Leu<sup>12</sup>~Pheol<sup>20</sup>の構造: TS-B-VIaのLeu<sup>12</sup>以降のC-末端領域は<sup>3</sup>J<sub>NH- $\alpha$ H値の結果からは $\beta$ 構造である可能性が示唆されていた。しかしながら、この領域で、 $\beta$ 構造では観測されない $d_{\alpha N}(i, i+2)$ ,  $d_{\alpha N}(i, i+3)$ ,  $d_{\alpha N}(i, i+4)$ そして $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ のNOEが観測されたことから、この部分が明らかにヘリックス構造であることが示された。TS-B-VIaのPro<sup>14</sup>以降のC-末端領域では強い[ $d_{\alpha N}(i, i+2)$ タイプ,  $i = 14, 15$ ]のNOEが観測されるので、この領域は主に $3_{10}$ -ヘリックス構造であると考えられる。しかし、弱いながらも[ $d_{\alpha N}(i, i+4)$ タイプ,  $i = 14, 15$ ]のNOEも同時に観測されることから、この領域の $3_{10}$ -ヘリックス構造は $\alpha$ -ヘリックス構造に近いものである可能性がある。典型的な $3_{10}$ -ヘリックス構造の $\phi$ は約 $-60^\circ$ であるのに対して、この領域の残基の二面角 $\phi$ は<sup>3</sup>J<sub>NH- $\alpha$ H値から $-80^\circ$ から $-120^\circ$ と計算される。この結果からもこの領域</sub></sub>

が特殊な $3_{10}$ -ヘリックス構造である可能性が示されている。

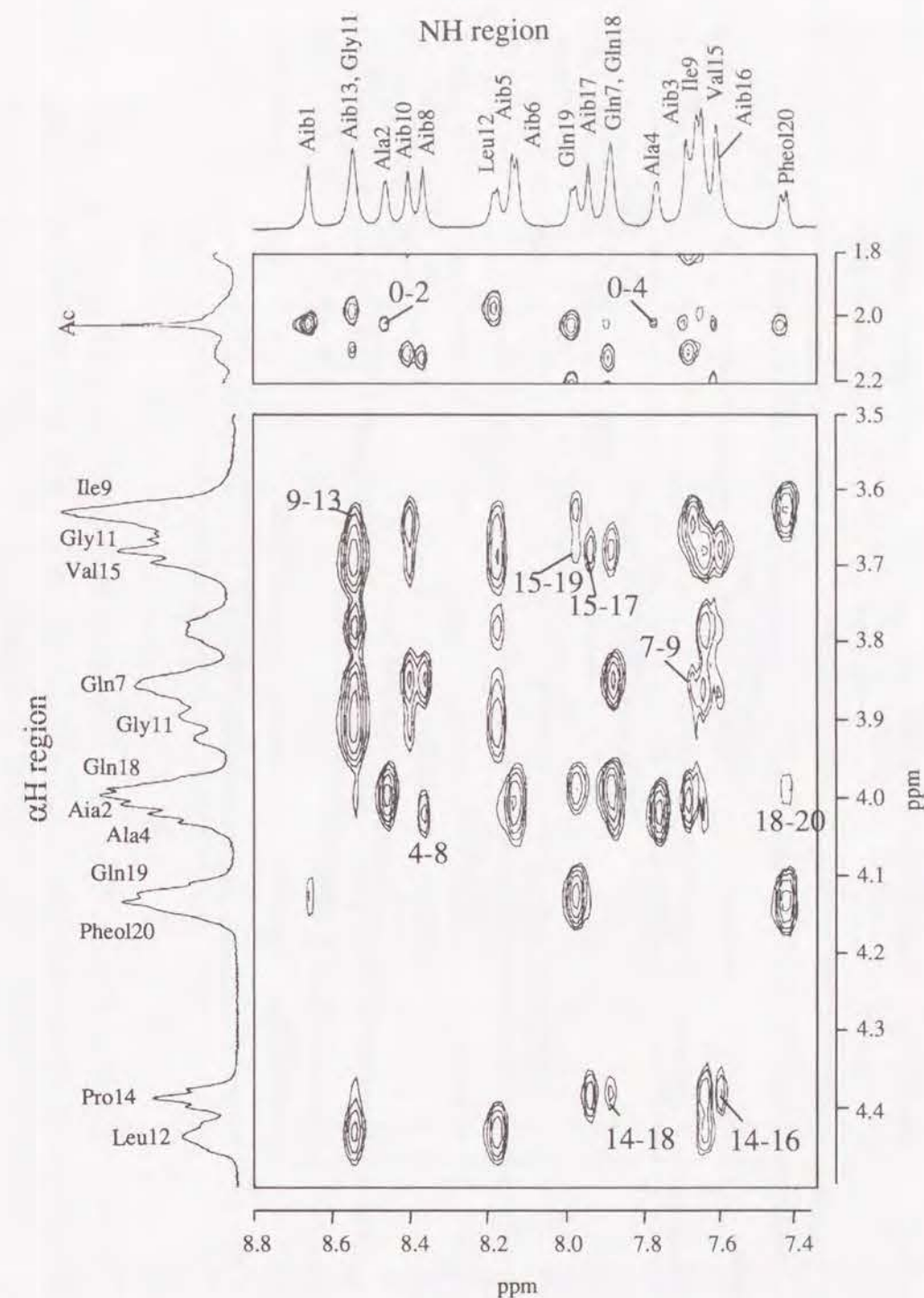
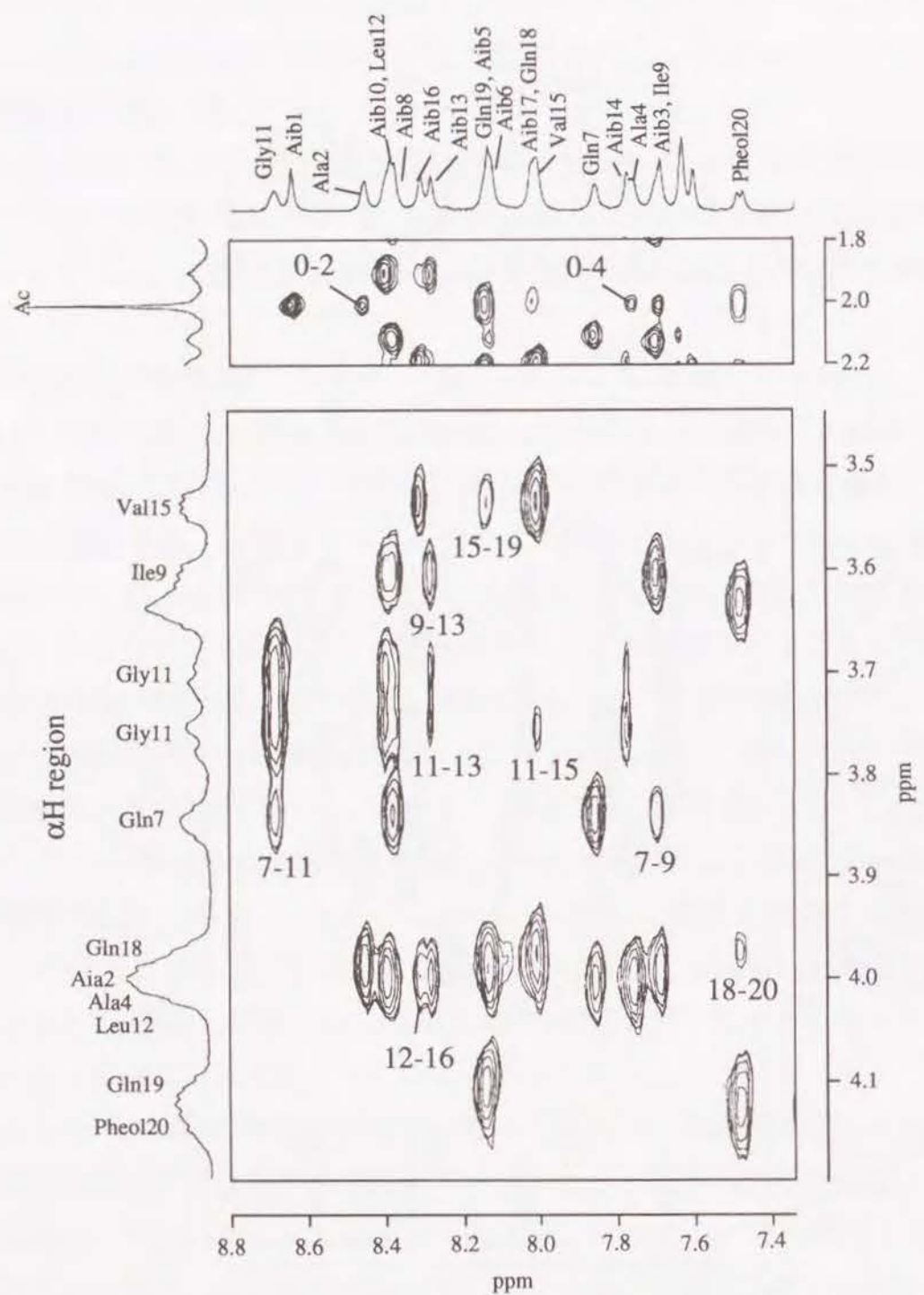


Fig. 20. Parts of The 600 MHz NOESY Spectra of 40 mM TS-B-VIa in CD<sub>3</sub>OH at 268 K, with a Mixing Time of 300 ms.

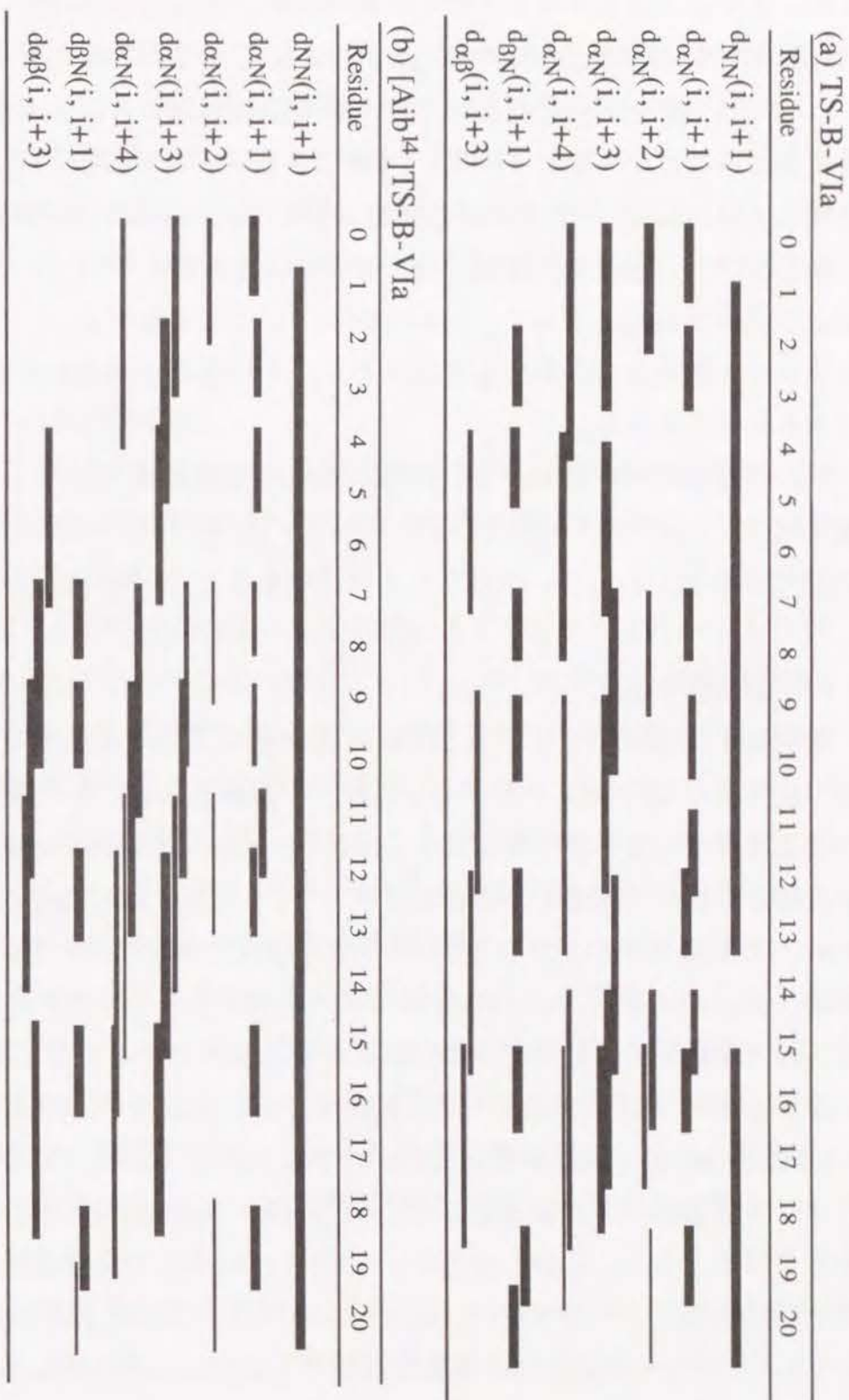
NOE cross-peaks [ $d_{\alpha N}(i, i+2)$  or  $d_{\alpha N}(i, i+4)$ ] are labeled with the numbers of two residues involving acetyl CH<sub>3</sub> (0). In order to enhance the NOEs, NOESY spectra were recorded at low temperature (268K) and the signals have been assigned by means of the same procedures as described in section 1.





**Fig. 21. Parts of The 600 MHz NOESY Spectra of 40 mM [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa in CD<sub>3</sub>OH at 268 K, with a Mixing Time of 300 ms.**

NOE cross-peaks [ $d_{\alpha N}(i, i+2)$  or  $d_{\alpha N}(i, i+4)$ ] are labeled with the numbers of two residues involving acetyl CH<sub>3</sub> (0). In order to enhance the NOEs, NOESY spectra were recorded at low temperature (268K) and the signals have been assigned by means of the same procedures as described in section 1.



**Fig. 22. Inter-Residual NOEs Observed in CD<sub>3</sub>OH at 268 K for TS-B-VIa (a) and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (b).** The observed NOEs are classified based on the cross-peak counter levels (represented by the thickness of the lines). Residue 0 represents the acetyl group.



### 《[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの2次構造》

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaは全ての残基にd<sub>N</sub>(i, i+1)-タイプのNOEが観察された(Fig.18)。また、 $\alpha$ プロトンとアミドプロトン間のNOE、[d <sub>$\alpha$ N</sub>(i, i+1)-タイプ, i = 0, 2, 4, 7, 9, 11, 12, 15, 18], [d <sub>$\alpha$ N</sub>(i, i+3)-タイプ, i = 0, 2, 4, 7, 9, 11, 12, 15], [d <sub>$\alpha\beta$</sub> (i, i+3)-タイプ, i = 4, 7, 9, 11, 15]を有した。これらのNOEの存在はこのペプチド全体がヘリックス構造をとることを示唆している。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのN-末端においては、TS-B-VIaと同様に、強いd <sub>$\alpha$ N</sub>(i, i+2)タイプのNOEと強いd <sub>$\alpha$ N</sub>(i, i+4)タイプのNOEが観測された。しかしながら、その他の領域では、強い[d <sub>$\alpha$ N</sub>(i, i+4)タイプ, i = 7, 9, 11, 12, 15]のNOEが観測された。よって、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはN-末端は $\alpha$ -ヘリックス構造と3<sub>10</sub>-ヘリックス構造との中間的な構造をとり、その他の領域は主に $\alpha$ -ヘリックス構造であると考えられる。

以上の残基間NOE情報から、TS-B-VIaはN-末端領域の $\alpha$ -ヘリックス構造とC-末端領域の3<sub>10</sub>-ヘリックス構造の2つのヘリックスで構成されるのに対し、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaは主に $\alpha$ -ヘリックス構造であることが明らかになった(Fig. 25)。

### 4-1-5 H-D交換速度

測定溶媒にCD<sub>3</sub>ODを用いると交換可能なNHプロトンと重水素(D)との交換が生じ、経時的なNHプロトンシグナルの減少が観測される。この減少率から、ペプチドの2次構造の基本骨格を形成するNHプロトンとカルボニル酸素との間の分子内水素結合の強さを推測することができる<sup>74)</sup>。 Fig. 23にTS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのH-D交換速度のグラフを示す。1位から12位は両ペプチド共に同様の交換速度を示した。Aib<sup>1</sup>NHとAla<sup>2</sup>NHは非常に早い交換を示した。これは、この2つのNHが分子内水素結合に関与せず、常に溶媒にさらされていることを示唆している。N-末端が $\alpha$ -ヘリックス構造をとると仮定すると、Aib<sup>3</sup>NHは水素結合に関与せず、Aib<sup>1</sup>NHやAla<sup>2</sup>NHと同様に早い交換速度を示すはずである。また、N-末端が3<sub>10</sub>-ヘリックス構造をとると仮定すると、Ala<sup>4</sup>NHは水素結合に関与せず、早い交換速度を示すはずである。しかしながら、Aib<sup>3</sup>NHとAla<sup>4</sup>NHの交換速度はAib<sup>1</sup>NHやAla<sup>2</sup>NHのそれに比較してかなり遅い。これは、両ペプチドのN-末端が $\alpha$ -ヘリックス構造と3<sub>10</sub>-ヘリックス構造との中間的な構造をとるという残基間NOEから得られた結果を支持するものである。

両ペプチドの5位から20位の交換速度は小さく、この領域のNHは全て分子内水素結合に関与していると考えられる。ここで、NOESYから得られた結果からVal<sup>15</sup>NH

とAib<sup>16</sup>NHは1 $\leftarrow$ 5 H-結合 (Gly<sup>11</sup> COとVal<sup>15</sup> NHまたはLeu<sup>12</sup> COとAib<sup>16</sup> NH間のH-結合) への関与が否定されている。しかしながら、H-D交換速度の測定の結果からはVal<sup>15</sup> NHとAib<sup>16</sup> NHは何らかの分子内H-結合への関与が示されている。したがって、TS-B-VIaのVal<sup>15</sup> NHとAib<sup>16</sup> NHはそれぞれLeu<sup>12</sup> COとAib<sup>13</sup> COとの間に1 $\leftarrow$ 4 H-結合をもつことが示唆される。TS-B-VIaのPro周辺での折れ曲がり構造はVal<sup>15</sup> NHとLeu<sup>12</sup> COとの間の水素結合で安定していると考えられる。

TS-B-VIaのAib<sup>16</sup> NHの交換速度は[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのそれに比べて速い。これは、TS-B-VIaのAib<sup>16</sup> NHとAib<sup>13</sup> CO, 間の結合距離がPro残基の影響で長くなっているためだと考えられる。

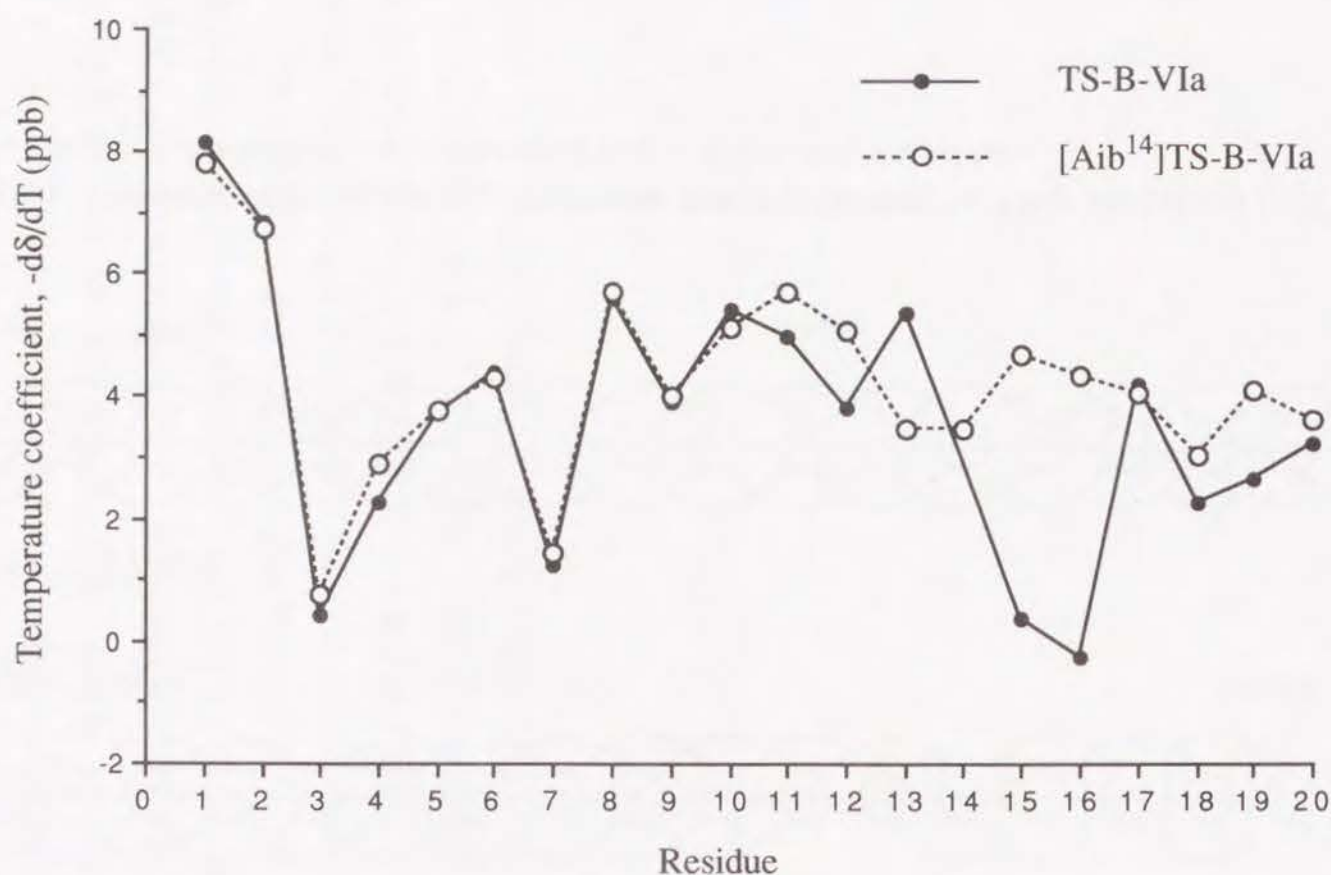
### 4-1-6 NH化学シフトの温度依存性

温度変化による、主鎖NHの化学シフトの移動率はNHの分子内水素結合の強さや、NHと溶媒との相互作用の強さに影響されるため、ペプチドのコンフォメーションについての情報を与えてくれる。

Fig. 19 にTS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの温度変化によるNHケミカルシフトの移動率を示した。TS-B-VIaも[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaもともに、Aib<sup>4</sup> NHからC-末端側の値はいずれも非常に小さい負の値(温度上昇により、高磁場シフト)であり、これらのNHが分子内水素結合に関与していることを示唆している。両ペプチドのN-末端領域(Aib<sup>1</sup> NHからAib<sup>10</sup> NH)の値は近似している。この結果は、両ペプチドがこの領域で同様の構造をとるといふ、今までに得られた結果を支持するものである。両ペプチドのAib<sup>1</sup> NHとAla<sup>2</sup> NHは非常に高い移動率をしめした。それゆえ、これらのNHは分子内H-結合に関与せずに、常に溶媒にさらされた状態にあると考えられる。一方、両ペプチドのAib<sup>3</sup> NH、およびTS-B-VIaのVal<sup>15</sup> NHとAib<sup>16</sup> NHの移動率は非常に低かった。これらのNHは3<sub>10</sub>-helix から $\alpha$ -helix、または $\alpha$ -helix から3<sub>10</sub>-helixへと構造が移行する領域において1 $\leftarrow$ 4 H-結合に関与しているという共通点がある。この移動率の低さはこのような位置特異的な効果に起因すると考えられる(Fig. 25)。

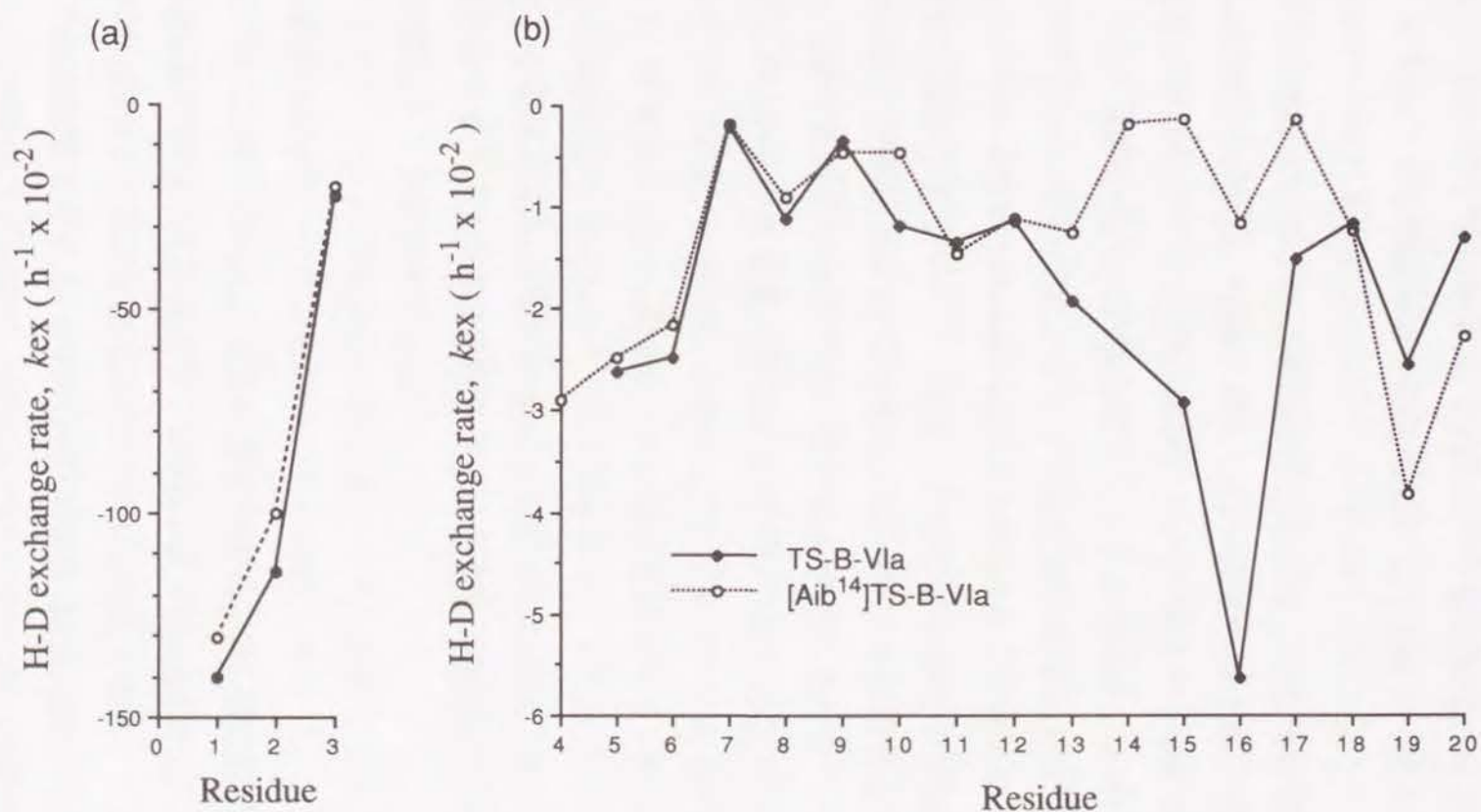
以上、NOESY、H-D交換速度、温度変化によるNHケミカルシフトの移動率の結果に基づき、TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの分子内水素結合の様式をFig.25に示すように推測した。





**Fig. 24. Temperature Coefficients of NH Chemical Shifts for TS-B-VIa and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa Obtained Over the Range of 286-307 K in CD<sub>3</sub>OH.**

Positive  $-d\delta/dT$  (ppb/K) values represent upfield shift of the NH signals with increasing temperature.



**Fig. 23. Hydrogen-Deuterium (H-D) Exchange Rates of the Amide Protons at 293 K.**

Exchanging rates ( $k_{ex}$ ) are defined as the slope of semilogarithmic plots of the decay of amide signal intensity versus the time (h) after dissolving the peptides in CD<sub>3</sub>OD. Because of an overlap of the signals, the rate of Ala<sup>4</sup>NH for TS-B-VIa was not detected. Note that the scales of  $k_{ex}$  for positions 1 to 3 (a) and for positions 4 to 20 (b) are different.



残基数を変化させた誘導体のMeOH中におけるCDスペクトルは全て、TS-B-VIaと同様に、208と222nm付近に極小値をもつ負のCotton効果による吸収を示した(Fig. 15)。この結果はこれらのペプチドがMeOH中では主に右旋性のヘリックス構造をとることを示している。残基数を増加させた誘導体のヘリックス含量はTS-B-VIaのそれと比較して減少した。残基数を減少させた誘導体のヘリックス含量もTS-B-VIaのそれと比較して減少した。特に、Aib残基が減少したとき(TS-B-VIaから[-1]、[-2]から[-3])にヘリックス含量の減少が顕著であることがわかる。

Aibがヘリックス指向性の非常に強いアミノ酸であることを考えると、Aib残基の減少によりヘリックス含量が減少することは理にかなっている。TS-B-VIaを100%としたときの、残基数を変化させた誘導体のヘリックス含量は以下のようになる: [+3], 93%; [+2], 89%; [+1], 93%; [-1], 90%, [-2], 90%; [-3], 70%; [-4], 65%。

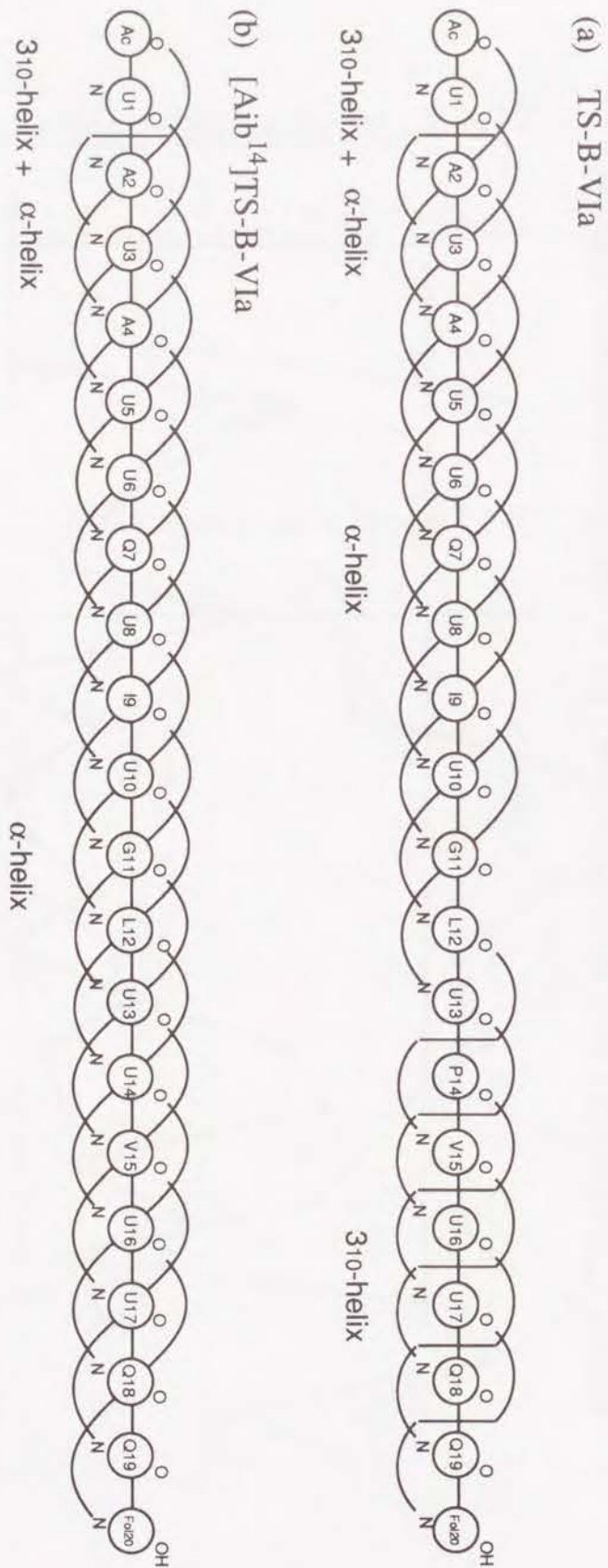


Fig. 25. Predominant Intramolecular Hydrogen Bonding Patterns for TS-B-VIa (a) and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (b). The one-letter code of amino acid residues is used with U = Aib, Fol = Pheol.



## 第5章 Trichosporin-B-VIa とその誘導体のイオンチャンネル形成特性

ペプチポールの多くは脂質二分子膜に対して、電圧依存性の膜電流を誘導することが知られている。この現象は、ペプチポールが膜中で束状の複合体 (Fig. 12) を形成し、その中心のポアをイオンが透過する、イオンチャンネルモデルによって説明されている<sup>46)</sup>。しかし、このチャンネル複合体の形成機構や膜中での安定化の機構については、未だ詳細には明らかになっていない。本章においては、これらの機構を解明することを目的として、TS-B-VIa とその誘導体のイオンチャンネル形成特性を調べ、構造と活性との相関について考察する。

### 第1節 Trichosporin-B-VIa のイオンチャンネル形成特性

#### 5-1-1 TS-B-VIa が誘導する巨視的な膜電流-電圧(I-V)特性

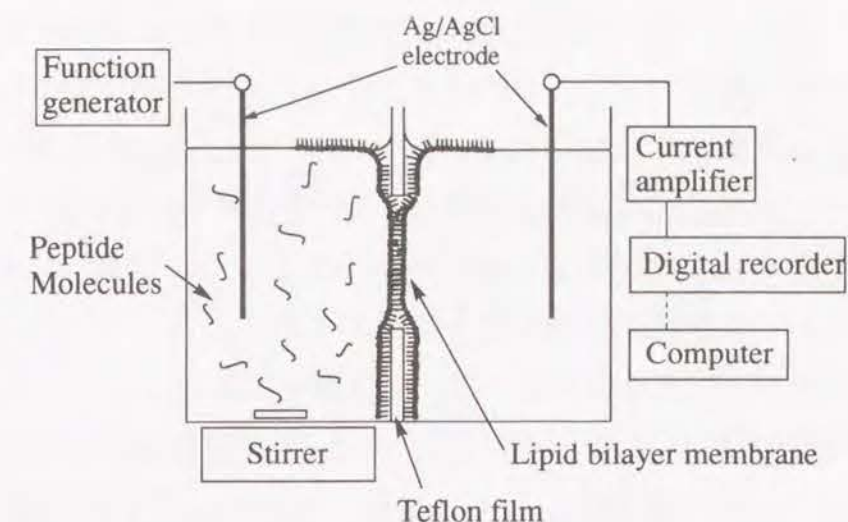
TS-B-VIa が誘導する膜電流は Fig. 26 に示す装置を用いて測定した。この装置は電解質が満たされた、2つのコンパートメントをテフロン膜で隔てている。このテフロン膜には小孔が開いており、そこにMontalらが考案した方法を用いて、脂質二分子膜を形成した<sup>75)</sup>。

TS-B-VIa のEtOH溶液をこの装置の一方のコンパートメント (cis面) のみに最終濃度が50 nM~400 nMになるように加えた。脂質はlecithin : cholesterol (4 : 1) の1% decane 溶液を用いて形成した。膜間に0.01 Hz ( $\pm 120$  mV) の三角波の交流を加えたところ、Fig. 27 に示す電流-電圧曲線が得られた。この測定ではcis面が正の時のみ電圧依存性の電流が観測された。同様の方法で、50, 100, 200 nM のTS-B-VIa が誘導する膜コンダクタンスを求めそのlog値を電圧に対してプロットした (Fig. 28)。

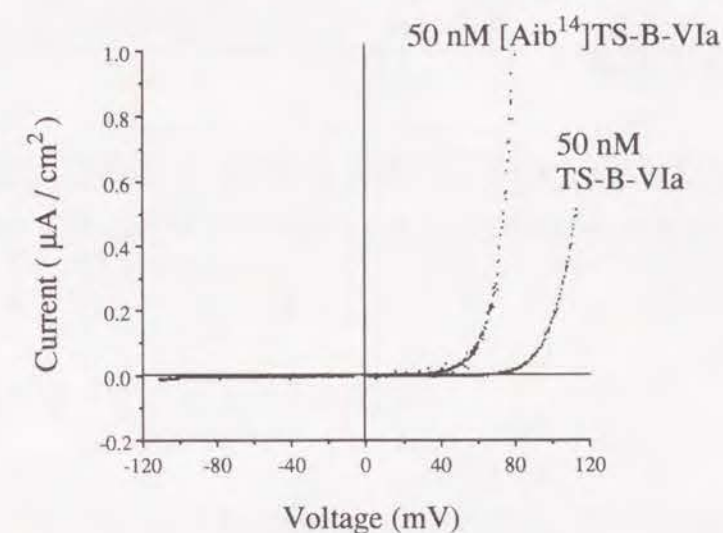
Roy らがalamethicinを用いた同様の実験<sup>76)</sup>で指摘するように、TS-B-VIa に誘導される膜コンダクタンスも電圧依存性のコンダクタンス部分 (Fig. 28 グラフ中、傾きのある直線部分) と電圧非依存性のコンダクタンス部分 (Fig. 28 グラフ中、傾きのない直線部分) があることが明らかになった。電圧依存性のコンダクタンスは電圧に対し指数関数的な増加を示したが、その増加率は濃度に依存しなかった。50 nM~400 nM の範囲において、ほぼ同様の値を示した。

電圧依存性のコンダクタンス( $G$ )は下記の式(1)により表される<sup>77)</sup>。

$$G = \Gamma C_p^n \exp(V/V_e), \quad (1)$$



**Fig. 26. Measurement of Trans-membrane-Current Induced by TS-B-VIa.** Membranes were formed on a 120  $\mu\text{m}$  hole in a Teflon film sandwiched between two half cells. The ethanolic solutions of peptides were added to one side (cis side) of the aqueous compartments which consisted of 1M KCl, unbuffered. The contents of cis compartment was stirred with a magnetic stirrer. After allowing for partitioning equilibrium, the membrane was submitted to a voltage and current-voltage curves were recorded.



**Fig. 27. Current-Voltage Curves of Lipid Bilayer Membranes Exposed to 50 nM TS-B-VIa and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa in 1M KCl.** Membranes were formed from lecithin with cholesterol in 1M KCl unbuffered. Peptides were added to the cis side of the membrane.



式(1)において、 $C_p$  はペプチド濃度、 $V_e$  は一定濃度においてコンダクタンスを  $e$ -倍するのに必要な電圧変化、 $n$  は一つのイオンチャンネルを構成するペプチド分子の数、そして  $\Gamma$  は実験条件に依存する定数である。 $V_e$  は  $\log G$ - $V$  プロットの傾きから 10.0 mV と求められる (Table 5)。式 (1) から一定の電圧におけるコンダクタンス値はペプチド濃度の  $n$ -乗に比例することがわかる。 $n$  は一定電圧におけるコンダクタンスのペプチド濃度依存性から導くことができる。

Fig. 28 から TS-B-VIa の濃度を 2 倍すると一定電圧におけるコンダクタンスは約 116 倍増加することがわかる。したがって、 $G$  と  $C_p$  の関係は  $G \propto [C_p]^{6.8}$  と表わすことができるので、 $n \approx 7$  となる (Table 5)。故に、TS-B-VIa チャンネルは 7 個の TS-B-VIa 分子により構成されていることが示唆された。

ヘリックス状のペプチドダイポールは膜中で電圧がかかると、電場と同じ向きに配向すると考えられる。このような dipole rearrangement モデル<sup>46, 78)</sup>を仮定すると、 $V_e$  は次式により表せられる<sup>77)</sup>。

$$V_e = kT / en\alpha, \quad (2)$$

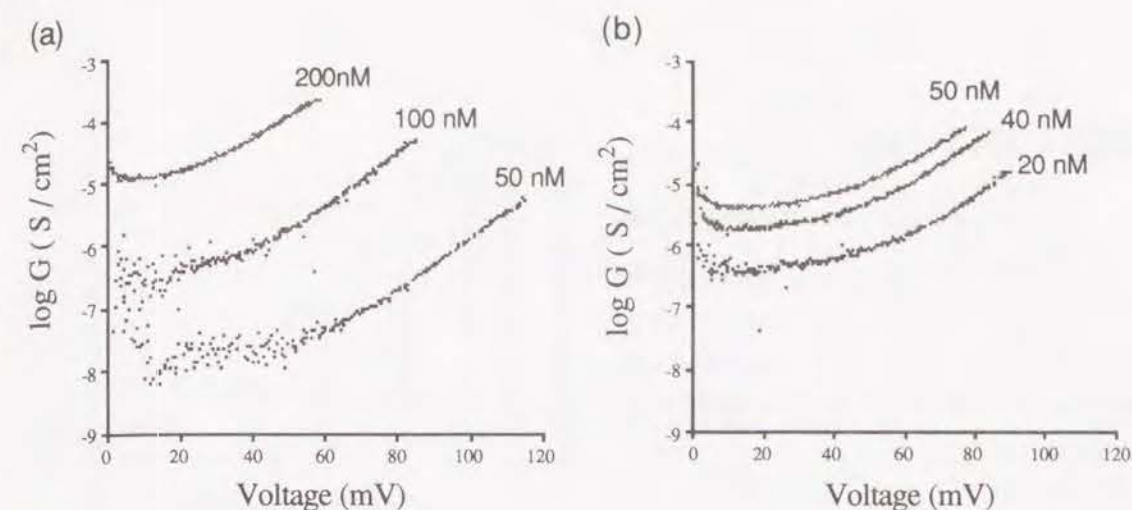
( $k$ : Boltzman 係数、 $T$ : 温度、 $e$ : 電荷、 $\alpha$ : ペプチド 1 分子当たりの電荷とゲーティングに伴う電荷の移動距離)

電場が存在しない状態では、ヘリックス状のペプチドが膜面に平行に存在すると仮定する。ある一定電圧以上の電圧を膜に加えたときにこのペプチドが膜面に垂直に配向したとすると、このペプチドのダイポールモーメント  $\mu$  は次式により表すことができる<sup>77)</sup>。

$$\mu = e\alpha d, \quad (3)$$

( $d$ : 膜の疎水性部)

$\alpha$  から求めたダイポールモーメントの値を Table 5 に示す。この計算では  $d = 3$  nm とした。TS-B-VIa のダイポールモーメント  $\mu$  は 53D であった。



**Fig. 28. Effect of Peptide Concentration on Conductance (Logarithmic Units)-Voltage Characteristics of TS-B-VIa (a) and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (b) Doped Membranes.** Membranes were formed from lecithin with cholesterol in 1M KCl containing TS-B-VIa (a) or [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (b) of the concentrations indicated.

**Table 5. Macroscopic Conductance Parameters for TS-B-VIa and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa**

	$V_e$ (mV)	$n$	$\alpha$	$\mu$ (D)
TS-B-VIa	10.0±1.2	6.8±0.4	0.37	53
[Aib <sup>14</sup> ]TS-B-VIa	9.4±0.2	4.3±0.3	0.62	92

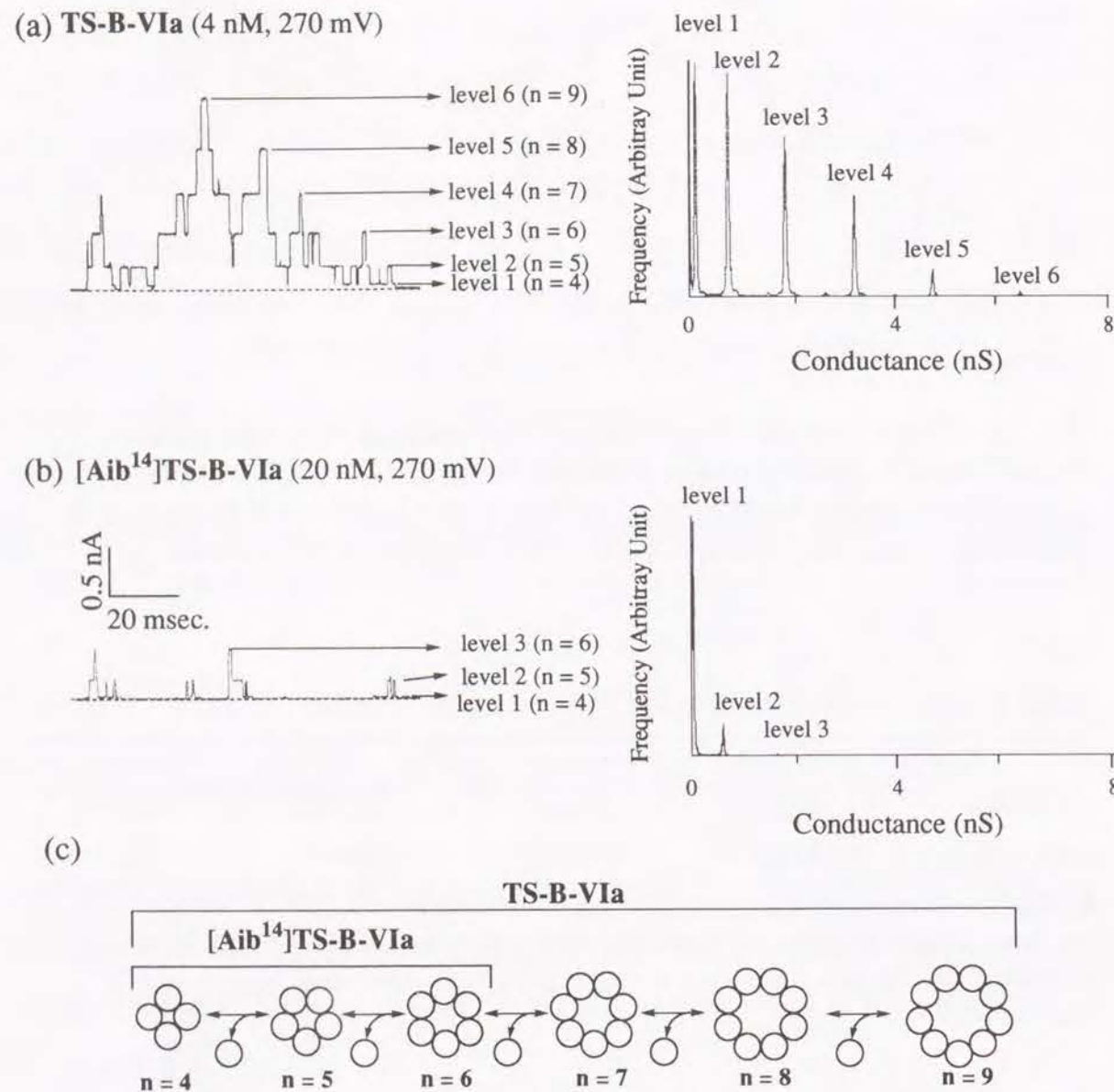
For the calculation of  $V_e$  and  $n$ ,  $\log G$  -  $V$  curves induced by 50, 100 and 200 nM TS-B-VIa or 20, 40 and 50 nM [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa were used. Data are mean  $\pm$  S.D. from four experiments for the each concentration.  $\alpha$  and  $\mu$  were calculated from Eqn. (2) and (3), respectively.

### 5-1-2 TS-B-VIaの単イオンチャンネル特性

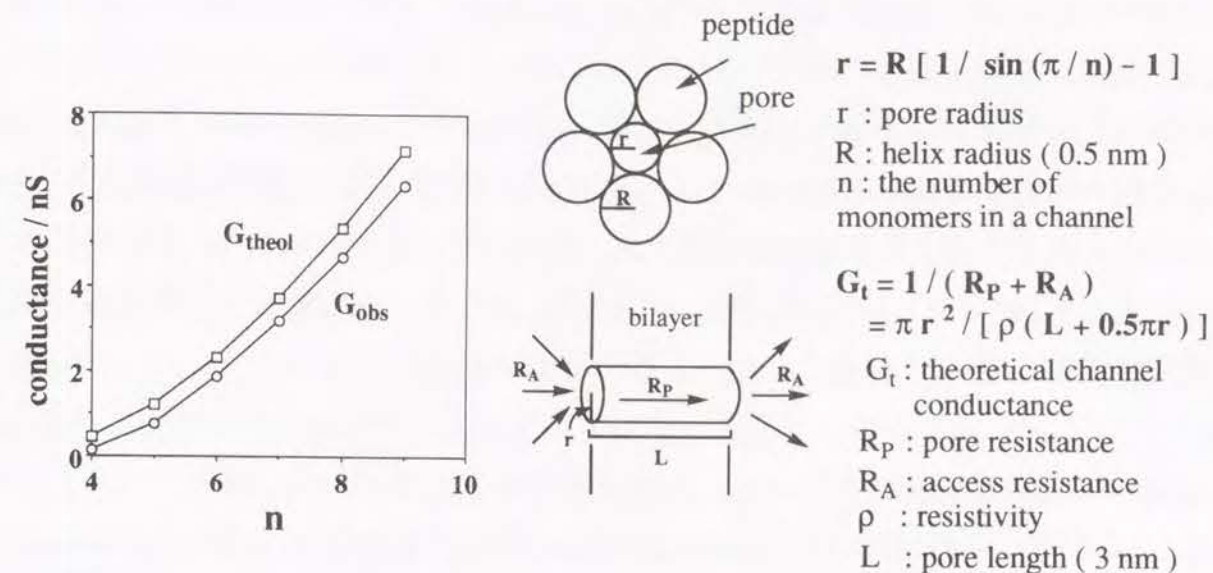
5-1-1ではTS-B-VIaを作用させた膜の巨視的な電流-電圧特性を観測した。この巨視的な電流は脂質二分子膜中に多数形成されたTS-B-VIaの単チャンネル電流の総和と考えられる。膜に作用させるTS-B-VIaの濃度を巨視的な電流測定のための1/10以下にし、検出感度を10倍にして膜電流を測定すると、TS-B-VIaの単チャンネル電流が観測された。脂質にdiphytanoylphosphatidylcholine (diphy PC)を用いたところ、より高い分解能を持つ単チャンネル電流を測定する事ができたので、この実験にはdiphy PCを使った。

Fig. 29aに示すようにTS-B-VIaはマルチレベルのシングルチャンネル電流を誘導

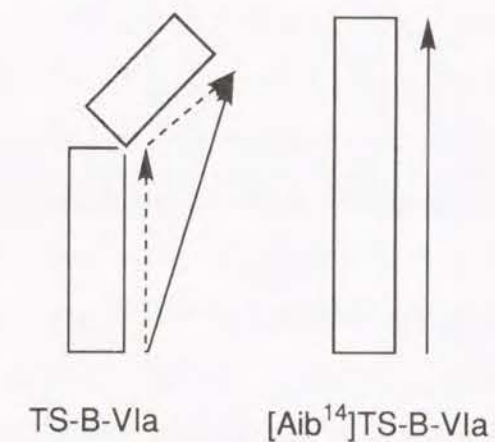




**Fig. 29. Single-Channel Current Fluctuations Induced by TS-B-VIa (a) and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (b) at 270 mV.** Each sublevel conductance is in good agreement with theoretical conductance estimated from the resistance of a pore in a peptide bundle models (Fig. 12). The pore diameter increase or decrease by uptake or release of the monomers. The results suggest that the TS-B-VIa-channel consist of 4 to 9 monomers and the [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa-channel consist of 4 to 6 monomers (c).



**Fig. 30. Comparison of Observed TS-B-VIa Channel Conductance ( $G_{obs}$ ) and Theoretical Channel Conductance ( $G_{theol}$ ).**<sup>80)</sup>  $G_{obs}$  was in good agreement with  $G_{theol}$  which was estimated from the bundle of ideal  $\alpha$ -helical peptides, suggesting that the TS-B-VIa-channel was a bundle of 4 to 9 monomers.  $G_{theol}$  was obtained from the equations on the right.



**Fig. 31. Molecular Dipole Moment of TS-B-VIa and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa.**

The arrows indicate the magnitude and direction of the molecular dipole moment. Since TS-B-VIa has a helical-bent around Pro<sup>14</sup>, mean dipole moment should be lower than that of [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa.



した。このように電流が各レベル間で転移するのは、チャンネル複合体へのペプチド分子の取込みと放出が繰り返されることにより、チャンネルポアの大きさが変わることが原因と考えられている(Fig. 29c)<sup>79)</sup>。

理想的なチャンネルのコンダクタンス値とTS-B-VIaチャンネルコンダクタンス値とを比較するとTS-B-VIaチャンネルはTS-B-VIa分子が4から9分子会合することにより形成されると考えられる(Fig. 30)。Fig. 29aに示したコンダクタンスのヒストグラムを見ると5から7分子の頻度が高いことがわかる。この結果は、巨視的な電流-電圧特性から導いたnの値7とよい一致を示す。

**Table 6** Single-Channel Parameters Compared Between TS-B-VIa and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa.

	Substate	Conductance (nS)	n	Probability of opening*	Mean life time (ms)
TS-B-VIa	1	0.41	4	0.271	0.89
	2	0.75	5	0.306	1.11
	3	1.85	6	0.233	1.14
	4	3.17	7	0.146	1.42
	5	4.66	8	0.037	0.79
	6	6.33	9	0.007	0.61
Aib <sup>14</sup> -TS-B-VIa	1	0.05	4	0.848	0.69
	2	0.60	5	0.145	0.40
	3	1.64	6	0.007	0.29

\*Open probability of each level within bursts. (Closed state was excluded.)

## 第2節 [Aib<sup>14</sup>] trichosporin-B-VIaのイオンチャンネル形成特性

### 5-2-1 [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaが誘導する巨視的な膜電流-電圧(I-V)特性

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaを膜に作用させると、TS-B-VIaと同様に電圧依存性の膜電流を誘導した(Fig. 27)。この事実は膜電流の電圧依存性や非対称性の発現にはProは必須ではないことを示唆している。しかし、同濃度のTS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのI-V曲線を比較すると、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのI-V曲線のほうが、低電圧側(左側)にシフトしている(Fig. 27)。この結果は、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのほうが、TS-B-VIaより同濃度において大きい膜電流を誘導することを示している。すなわち、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはTS-B-VIaより

強いチャンネル形成能があることを示している。

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaについても、10 nM, 20 nM, 50 nMにおけるlog G-Vプロットを用いて、5-1-1で述べたのと同様の方法でVeとnを求めた。その結果、Ve = 9.4 mV, n = 4.3になった。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのVeの値(9.4 mV)はTS-B-VIaのそれ(10.0 mV)とほぼ同等の値となったが、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのn(4.3)はTS-B-VIaのそれ(6.8)に比べて減少した(Table 5)。この結果は、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはTS-B-VIaよりも小さなチャンネルを形成することを示唆している。

さらに、5-1-1で述べたのと同様の方法で[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのダイポールモーメントμを求めると、TS-B-VIaのそれよりかなり大きい値になった(Table 5)。TS-B-VIaはヘリックスに折れ曲がり構造が存在するため、そのダイポールモーメントは真直なヘリックス構造を持つ[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaに比べて小さくなるはずである(Fig. 31)。両ペプチドのI-V特性から求めたダイポールモーメントの値はこの予測を支持するものである。

### 5-2-2 [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの単イオンチャンネル特性

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaについても、TS-B-VIaと同様の方法で単イオンチャンネル電流を測定した。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaもマルチレベルのシングルチャンネル電流を誘導した。しかしながら、そのチャンネル寿命はTS-B-VIaのそれに比較して、かなり短くサブレベル数も著しく減少していることがわかった(Fig. 29b, Table 6)。各コンダクタンスレベルの頻度を表すヒストグラム(Fig. 29b)を比較すると、TS-B-VIaチャンネルが4~9分子の広い範囲で分子数が変化する会合体であるのに対して、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaチャンネルはほとんどが4分子の会合体である。この結果は巨視的なI-V特性から求めたそれぞれのnの値とよい対応を示すものである。Table 6にTS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの各コンダクタンス値の比較を示す。[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの各コンダクタンス値はTS-B-VIaのそれに比べて小さいことがわかる。これは[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaにはC-末端側での折れ曲がり構造がないため、チャンネル複合体を形成したときに、立体障害が大きいC-末端Gln側鎖がイオンの透過を阻害するためだと考えられる。

以上の巨視的なI-V特性の結果と単チャンネル電流の測定の結果から、TS-B-VIaのProをAibに置換した場合、基本的にチャンネルの電圧依存性、電圧に対する非対称性は変化しないものの、チャンネルの安定性、チャンネル複合体を形成する分子の数、および、イオン透過性が減少することがわかった。

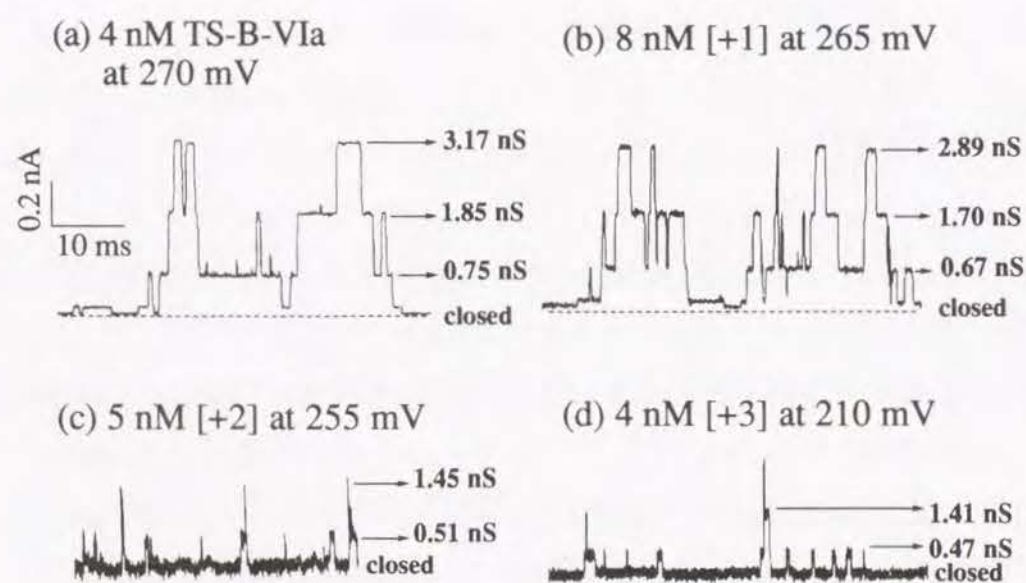


### 第3節 残基数異なる誘導体のイオンチャンネル形成特性

残基数異なる誘導体7種 (Fig. 13) についても、シングルチャンネル電流を測定した。

N-末端残基を延長した誘導体 ([+1], [+2], [+3]) のシングルチャンネル電流の記録をFig. 32に示す。N-末端にAibを1残基加えた誘導体 ([+1]) はTS-B-VIaと同様にマルチレベルのチャンネル電流を誘導した。[+2], [+3]もチャンネル電流を誘導したがその寿命は極めて短くなった。また、各レベルのコンダクタンス値は、残基数が多くなるほど減少した。これはチャンネルのイオン透過孔が長くなることによる、抵抗の増大に起因すると考えられる。

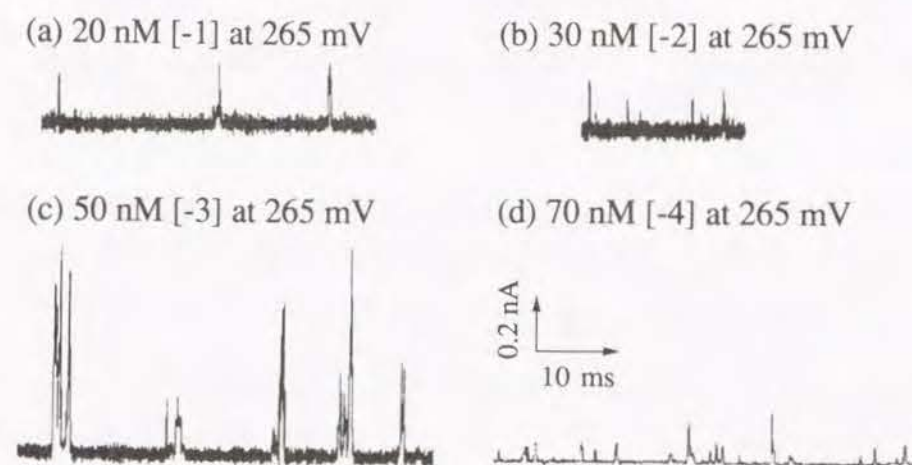
N-末端残基を減少した誘導体 ([-1], [-2], [-3], [-4]) はいずれも特徴的な電流を示したものの (Fig. 33)、それはTS-B-VIaや残基数を延長した誘導体で観測されるような矩形波状のチャンネル電流ではなかった。ここで、この短い誘導体が誘導する膜電流がTS-B-VIaチャンネルと同様にヘリックスバンドルモデルで説明される機構に基づいて誘導されているのか、全く異なる機構により誘導されているのかを、現在までに得られている結果から推察するのは困難である。



**Fig. 32. Current Fluctuations Induced by Elongated Derivatives.** (+1)TS-B-VIa doped membranes exhibited multilevel fluctuations which are almost identical in single-channel parameters to the TS-B-VIa-channel. (+2)TS-B-VIa and (+3)TS-B-VIa formed unstable channels and the conductance value of each level was smaller than that of TS-B-VIa-channel.

しかしながら、誘導体[-3],[-4]はヘリックス部分の長さが膜の疎水性部分の厚さ3 nmよりも短いにも関わらず、膜電流を誘導した。このことから、膜電流の誘導にはヘリックスの長さが膜の厚さよりも必ずしも長い必要はないことが示された。

以上、残基数異なる誘導体に誘導されるイオンチャンネル電流の測定結果より、安定なチャンネルを形成するには残基数が20または21に厳密に限定されることが明らかになった。しかしながら、23残基から16残基までの全ての誘導体が膜電流を誘導することから、安定性を無視した膜電流の誘導には残基数はあまり厳密には限定されないことも示された。



**Fig. 33. Current Fluctuations Induced by Truncated Derivatives.** In the membrane doped with truncated derivatives{(-1),(-2),(-3),(-4)TS-B-VIa}, residence time of bursts were so short that the conductance states could no longer be resolved.

### 第4節 Trichosporin-B-VIaとその誘導体の構造とイオンチャンネル活性との相関

膜電流測定の実験からTS-B-VIaは平均して7分子が束状に会合したチャンネル複合体を形成することが示唆された。この複合体の安定性は(1)ペプチド-ペプチド間、(2)ペプチド-脂質間、(3)ペプチドダイポール-膜電場間の各相互作用により決定されると考えられる。TS-B-VIaがチャンネル複合体を形成したときの高次構造を考慮すると、Gln<sup>7</sup>の極性のある側鎖アミド基と水素結合に関与しないカルボニル酸素 (Aib<sup>10</sup>CO, Gly<sup>11</sup>CO)がチャンネルポアの方角に向くことにより、複合体はポア内の水と親水性相互作用するので、安定化すると考えられる (Fig. 34b)。他方、C-末端に存在する極性のGln<sup>18</sup>およびGln<sup>19</sup>の側鎖アミド基は、ポアとは逆の方角に向いており、膜表面の親水性部位と極性相互作用をすることができる。また、



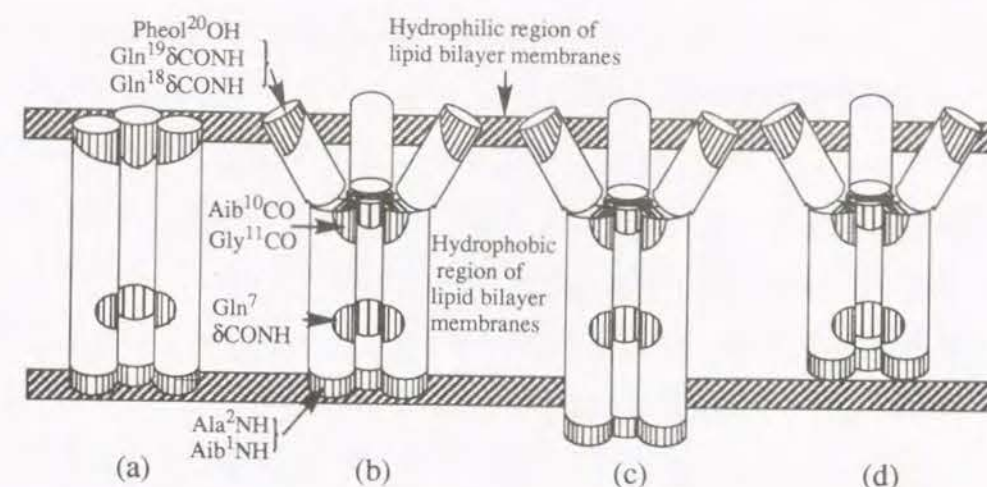
N-末端の水素結合を介さないアミドカルボニル (Aib<sup>1</sup>CONH, Ala<sup>2</sup>CONH) も反対側の膜の親水性部位と極性相互作用をしていると考えられる。これらの相互作用により、TS-B-VIa複合体は膜中で安定した状態で存在すると考えられる。

一方、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaヘリックスには水素結合に関与しないカルボニル酸素 (Aib<sup>10</sup>CO, Gly<sup>11</sup>CO) が存在しない (Fig. 25b)。したがって、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa複合体はTS-B-VIa複合体に比べてポア内の親水的相互作用が弱くなると考えられる (Fig. 34a)。これはチャンネル不安定化の一つの要因と考えられる。また、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはヘリックスの折れ曲がり構造が存在しないため、チャンネル複合体を形成したとき、TS-B-VIa複合体に見られるようなC-末端でのポアの漏斗状の広がりは無くなると考えられる (Fig. 34a)。また、C-末端での広がりが無いため、C-末端側の嵩高い残基が立体障害をもたらす。この立体障害もチャンネル不安定化の一つの要因と考えられる。さらに、ポアの内径が狭くなるため各レベルのコンダクタンス値が減少したものと考えられる。

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのチャンネルは不安定で unit conductance もTS-B-VIaのそれに比べて小さいにも関わらず、巨視的な電流が同濃度のTS-B-VIaに比べて大きくなった。この理由として、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの脂溶性が高いこと、そして、ダイポールモーメントが大きいことが挙げられる。脂溶性が高いと、膜へ分配されるペプチド数が増加すると考えられる。また、ダイポールモーメントが大きいと電場から膜の垂直方向に受ける力が強くなるため、膜面に対し垂直に位置するペプチドの数が増加する。その結果、全体的にチャンネル数が増加し、巨視的な電流が増加すると考えられる。

残基数を変化させた誘導体を作用させた膜の膜電流の測定から、安定なチャンネルの形成には残基数が20か21に厳密に限定されていることが示された。このことから、チャンネル複合体の安定にはヘリックスの長さや膜の厚さとの一致が重要であることがわかった (Fig. 34c,d)。この結果から、ヘリックスのN-末端とC-末端の極性部位と脂質膜の極性部位との相互作用がチャンネルの安定性の大きな要因であることが示唆される。

残基数を減少した誘導体のヘリックス部位は脂質膜を貫通することができないはずである。しかしながら、いずれの誘導体も膜電流を誘導することから、これらの誘導体は残基数20のペプタイボールによるチャンネル形成とは異なるメカニズムで膜電流を誘導していると考えられる。



**Fig. 34. Ion Channel Models Proposed for TS-B-VIa (b), [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (a), Elongated-TS-B-VIa (c), and Truncated-TS-B-VIa (d).** Polar parts (NHs of Aib<sup>1</sup> and Ala<sup>2</sup>; δCONHs of Gln<sup>7</sup>, Gln<sup>18</sup>, and Gln<sup>19</sup>; OH of Pheol<sup>20</sup>; COs of Aib<sup>10</sup> and Gly<sup>11</sup>) of the peptide monomers are shown by oblique lines.



第1節 Trichosporin-Bのウシ副腎髄質細胞に対するカテコールアミン分泌活性

副腎髄質クロマフィン細胞は生理的には、交感神経節前繊維末端のシナプスから分泌されたアセチルコリンの働きによりカテコールアミン（ドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン）を開口分泌する。この分泌は、アセチルコリンの受容体への結合に始まる一連の反応にもとづく、電位依存性Ca<sup>2+</sup>イオンチャンネルの開口によるCa<sup>2+</sup>の細胞内流入が直接の引き金となっている。

我々はすでに数種のTS-B類の混合物であるTS-B-IIIが培養した牛副腎髄質細胞に対してカテコールアミン分泌活性を持つことを近年明らかにした<sup>61)</sup>。この分泌は細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入と並行して引き起こされていることを、<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>を用いた実験により示した。しかし、このカテコールアミン分泌は下記の2相性を示した。

- (1) 一つは低濃度のTS-B-III (<10 μM)による分泌で、完全に細胞外Ca<sup>2+</sup>に依存した。
- (2) 他方は高濃度のTS-B-III (>10 μM)による分泌で、一部、細胞外Ca<sup>2+</sup>に非依存的であった。

高濃度のTS-B-III (>10 μM)は細胞内のマーカー酵素である乳酸脱水素酵素の遊離を引き起こした。したがって、高濃度のTS-B-IIIは一部、細胞膜を破壊することに伴うカテコールアミンの漏出をもたらすと考えている。

本章においては、さらに詳しくTS-Bとその誘導体のカテコールアミン分泌活性を調べ、それらのイオンチャンネル形成活性との相関について考察する。

6-1-1 TS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaのカテコールアミン分泌活性

TS-B-VIaを牛副腎髄質細胞とインキュベートするとTS-B-VIaの濃度に依存して細胞からのカテコールアミンの分泌が増加した。低濃度(2~10 μM)のTS-B-VIaによる分泌は完全に細胞外のCa<sup>2+</sup>に依存していたが(Ca<sup>2+</sup>が含まれるnormal medium中ではカテコールアミン分泌活性を示すが、Ca<sup>2+</sup>が含まれないmedium中では活性を示さない)、高濃度(20 μM)による分泌は一部Ca<sup>2+</sup>に非依存的であった(Ca<sup>2+</sup>が含まれないmedium中でも分泌活性を示す)(Fig. 35a)。これと同様の結果が本章の始めに述べたようにTS-B-IIIを用いた実験においてすでに得られている<sup>61)</sup>。

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaを牛副腎髄質細胞とインキュベートすると、10 μMまでは濃度

依存的に細胞からのカテコールアミンの分泌が増加した。しかしながら、10 μM以上の濃度においては活性の増加がほとんどみられなかった。さらに、高濃度(10-40 μM)において、Ca<sup>2+</sup>非依存性の分泌が見られなかった(Fig. 35b)。先に述べたように、Ca<sup>2+</sup>に非依存性の分泌は、TSの細胞膜破壊によるカテコールアミンの細胞外への漏出と考えられているので、高濃度においても[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaによるCa<sup>2+</sup>非依存性の分泌が認められないことは、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaが細胞膜を破壊する作用が小さいことを示唆している。

[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaによるCa<sup>2+</sup>依存性の分泌もTS-B-VIaのそれに比べて小さくなっている。これは脂質2分子膜の実験において[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの方がTS-B-VIaより大きな電流を誘導するという結果と矛盾する。さらに、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaはTS-B-VIaに比べ、逆相のHPLCの保持時間が長く、脂溶性が高いと考えられる。それにも関わらず、[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの活性がTS-B-VIaの活性より小さいという結果は、第1節で得られた脂溶性と活性とが相関するという結果と矛盾している。このように、TSにおいて得られた膜電流-カテコールアミン分泌活性-脂溶性間の相関性がTS-B-VIaと[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaの間には適応することができなかった。よって、Pro<sup>14</sup>が存在するTS-Bと、存在しない[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaとでは副腎髄質細胞に対する作用機序が異なる可能性がある。

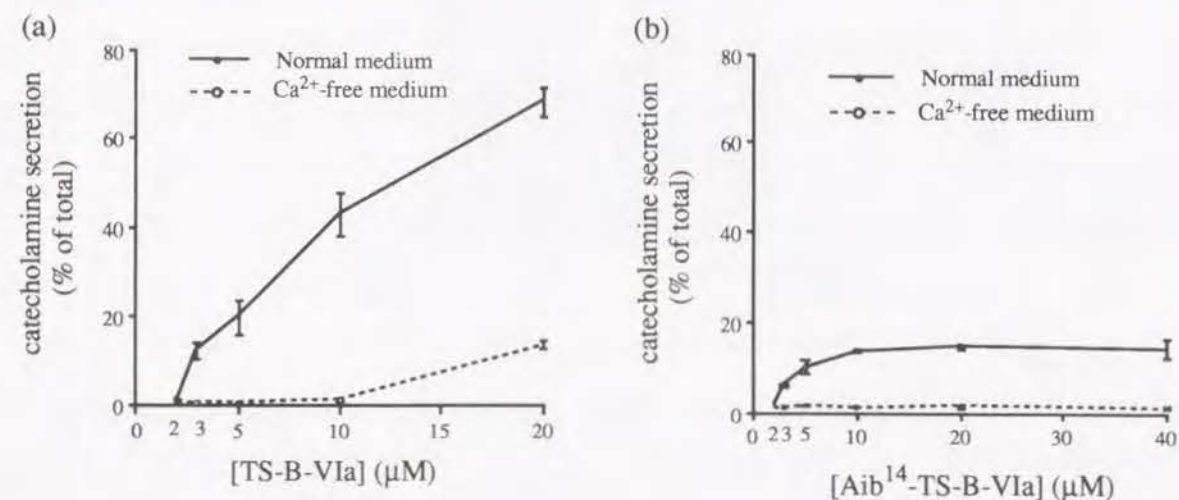


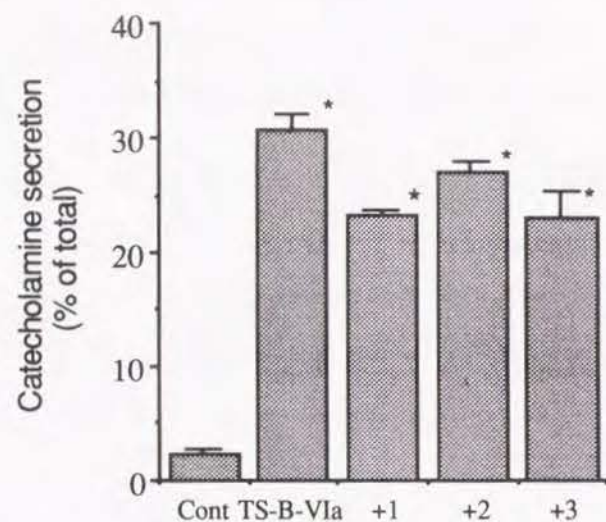
Fig. 35. Effect of TS-B-VIa (a) and [Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIa (b) on Catecholamine Secretion from Adrenal Chromaffin Cells. The cells were incubated for 10 min at 37°C with various concentrations of peptides, in 2.6 mM Ca<sup>2+</sup>-containing (●) or Ca<sup>2+</sup>-free (plus 0.2 mM EGTA) medium (○). Catecholamine secretion is shown as a percentage of total catecholamine content. Data are means ± S.D. from three experiments. \*, p < 0.001, significantly different from control.



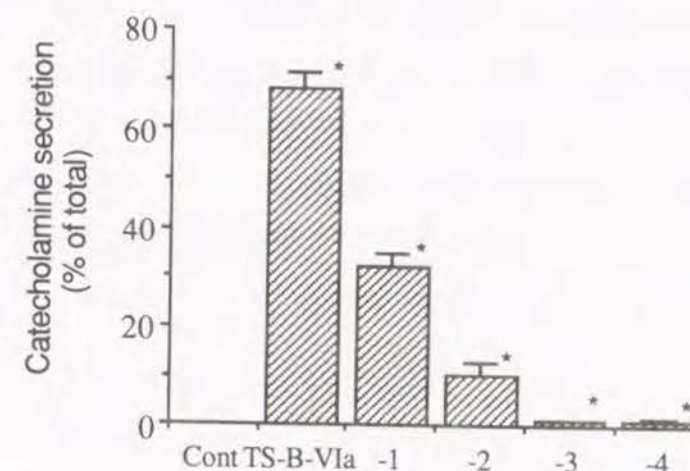
### 6-1-2 残基数が異なる誘導体のカテコールアミン分泌活性

残基数を増やした誘導体はいずれも  $5 \mu\text{M}$  において TS-B-VIa と同程度のカテコールアミン分泌活性を示した (Fig. 36)。一方、残基数を減少した誘導体は  $5 \mu\text{M}$  においては活性を全く示さなかった。しかしながら、それより高濃度 ( $20 \mu\text{M}$ ) にすると、活性を示した。活性は [-1] が TS-B-VIa の約 50%、[-2] は 15%、[-3] と [-4] は 1.6% であった。残基数を減らすと活性が著しく減少することがわかった (Fig. 37)。

5章で述べたように、脂質 2 分子膜に対するチャンネル実験において、残基数を延長した誘導体は TS-B-VIa と同程度の濃度で膜電流を誘導したが、残基数を減少した誘導体は、濃度を 5 ~ 18 倍にしないと膜電流を誘導しなかった。カテコールアミン分泌活性も残基数を延長した誘導体は TS-B-VIa と同程度の濃度で活性を示したのに対し、残基数を減少した誘導体は、濃度を 4 倍以上にしないと活性を発現しなかった。このように膜電流の誘導活性とカテコールアミン分泌活性が同様の濃度依存性を示したことは、これら 2 つの活性が関連することを示唆している。



**Fig. 36. Catecholamine Secretion Induced by TS-B-VIa and Elongated Derivatives ([+1], [+2] and [+3]) in  $5 \mu\text{M}$ .** The cells were incubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  with samples in  $5 \mu\text{M}$ . Catecholamine secretion is shown as a percentage of total cellular catechol-amine content. Data are means  $\pm$  standard deviations from four experiments. \*,  $p < 0.001$ , significantly different from the control (Cont).



**Fig. 37. Catecholamine Secretion Induced by TS-B-VIa and Truncated Derivatives ([-1], [-2], [-3] and [-4]) in  $20 \mu\text{M}$ .** The cells were incubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  with samples in  $20 \mu\text{M}$ . Catecholamine secretion is shown as a percentage of total cellular catecholamine content. Data are means  $\pm$  standard deviations from four experiments. \*,  $p < 0.001$ , significantly different from the control (Cont).

### 6-1-3 Trichosporin-Bのカテコールアミン分泌活性とイオンチャンネル形成活性

同濃度 ( $5 \mu\text{M}$ ) の 5 種の TS-B (TS-B-Ia, IIIa, V, VIa, VIb) (Table 7) について、カテコールアミン分泌活性を調べた。これらのペプチドは 3 位、9 位、17 位においてのみ残基が異なる、非常に類似した構造を持つにも関わらず、その活性にかなりの差があることが明らかになった (Fig. 38a)。また、この活性の順番がそれぞれのペプチドの逆相の HPLC の保持時間の順番 (Fig. 38b) と一致していた。この結果は TS-B のカテコールアミン分泌活性が分子の脂溶性に依存することを示唆している。

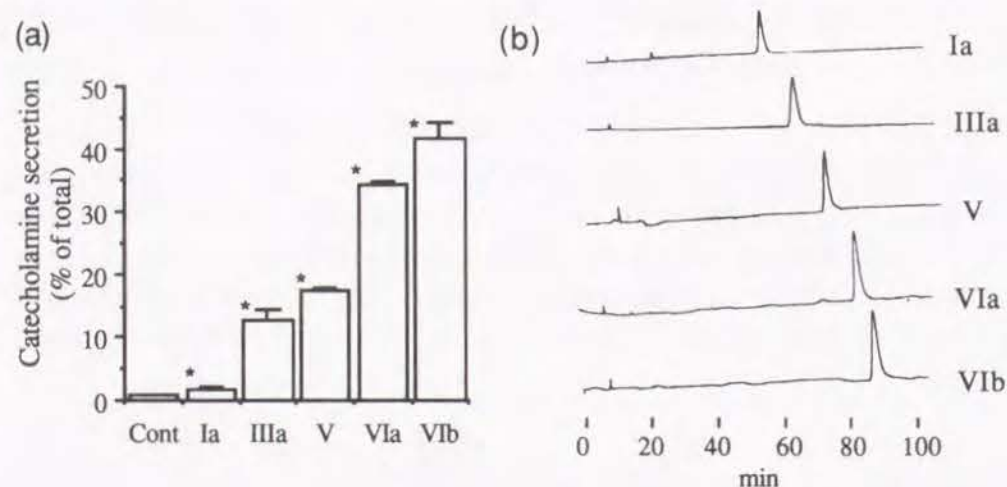
そこで、5 種の TS-B について脂溶性の指標である保持比  $k'$  の対数値  $\log k'$  を求めた。<sup>81)</sup> 保持比  $k'$  は TS-B の逆相の HPLC の保持時間  $t_R$  と担体に保持されない物質 ( $\text{NO}_3^-$ ) の保持時間  $t_0$  から、 $k' = (t_R - t_0) / t_0$  として求められる。 $\log k'$  値の大きさ、すなわち、脂溶性の大きさを比較すると、TS-B-VIb (0.963) > -VIa (0.946) > -V (0.912) > -IIIa (0.841) > -Ia (0.754) となった。さらに、 $\log k'$  とカテコールアミン分泌活性の  $\log$  値とは一次のよい相関を示した (Fig. 39)。すなわち、カテコールアミン分泌活性は TS 分子の脂溶性に依存し、脂溶性が高いものほど、強い活性を示すことが明らかになった。



**Table 7.** Primary Structures of Trichosporin-B<sup>a)</sup>

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TS-B-Ia	Ac-Aib-Ala-Ser-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol																			
TS-B-IIIa	Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol																			
TS-B-V	Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol																			
TS-B-VIa	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol																			
TS-B-VIb	Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol																			

<sup>a)</sup> Aib =  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, Pheol = phenylalaninol, Iva = isovaline.

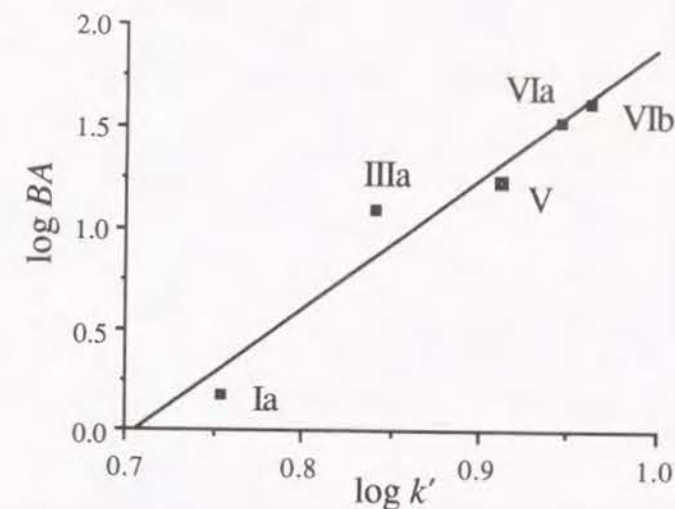


**Fig.38.** Activities of Catecholamine Secretion from Adrenal Chromaffin Cells (a) and HPLC Chromatogram (b) of TS-B-Ia, -IIIa, -V, -VIa, and -VIb. The cells were incubated for 5 min at 37°C with 5  $\mu$ M TS-Bs. Catecholamine secretion is shown as a percentage of total cellular catecholamine content. Data are means  $\pm$  standard deviations from four experiments. \*,  $p < 0.001$ , significantly different from the control (Cont). HPLC conditions are as follows: column, YMC A-413 S-5 120A Ph (6 mm i.d. x 250 mm); flow rate, 0.6 ml/min; mobile phase, MeOH : H<sub>2</sub>O = 85 : 5.

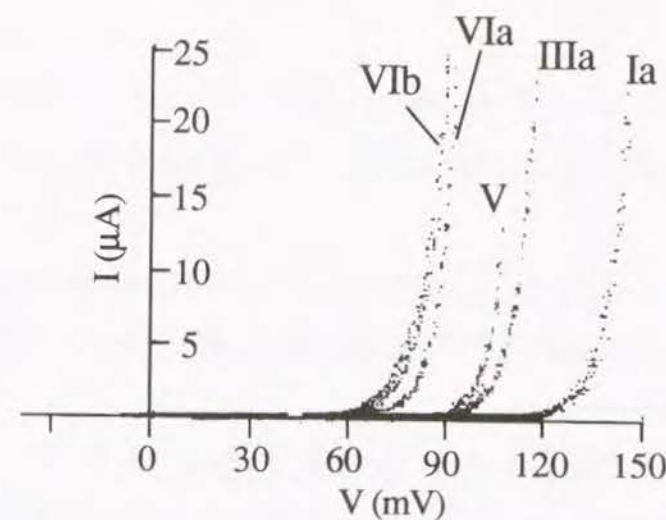
次に、この5種のTS-Bについて脂質2分子膜に対する膜電流の誘導活性を調べた。脂質はdiphytanoylphosphatidylcholineを用い、第5章に示した方法で膜電流を測定した。

いずれのTS-BもFig. 40に示すように、正の電圧の時のみ、電圧依存性の鋭い電流の上昇が観測された。TS-Bを作用させた膜の一定電圧(120 mV)におけるコンダクタンス(G)の対数値をlog  $k'$ に対してプロットしたところ、log G-log  $k'$ 間に一次のよい相関が得られた。この実験は3通りの濃度(50, 75, 100 nM)で行ったが、いずれの濃度でも同様に一次の相関が得られた(Fig. 41)。

この結果はTS-Bによる膜電流の誘導もその脂溶性の強さに依存し、脂溶性の高いものほど大きな膜電流を誘導することを示している。ここで観測された巨視的な膜電流は多数のTS-Bチャンネルが同時に開いた時のチャンネル電流であると考えられている。よって、TS-Bのイオンチャンネル形成による膜コンダクタンスはTS-B分子の脂溶性に依存すると考えられる。



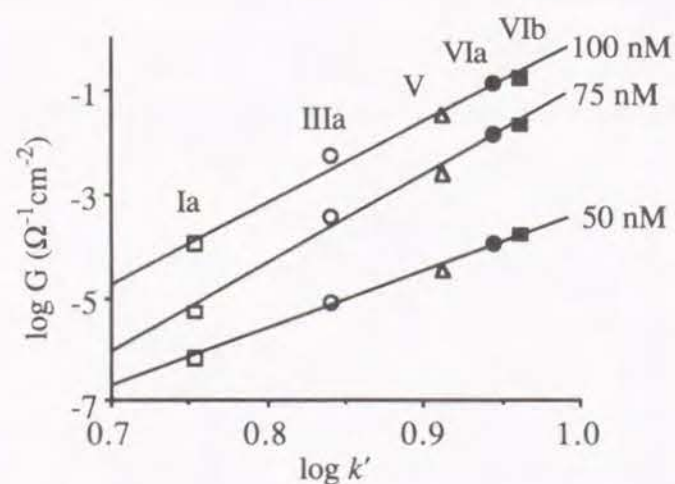
**Fig. 39.** Relationship between Log [catechol-amine-releasing activity (BA)] of TS-Bs and Their Relative Hydrophobicity (log  $k'$ ). Catecholamine-releasing activity and the  $k'$  value were obtained as shown in Fig. 30.



**Fig. 40.** Current-Voltage (I-V) Curves Induced by 75 nM TS-Bs in Planar Lipid Bilayers. The lipid bilayer membranes were formed from diphytanoylphosphatidylcholine according to the method of Montal and Mueller.<sup>75)</sup> The electrolyte solution was 1M KCl, unbuffered. A triangular voltage wave (100 s/period) was applied to the membranes.



TS-Bのカテコールアミンの分泌活性とイオンチャンネル形成活性はともに、分子の脂溶性と一次の相関が認められた。この結果は、カテコールアミン分泌の直接の原因である、細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入とイオンチャンネル形成が関連していることを示唆するものである。

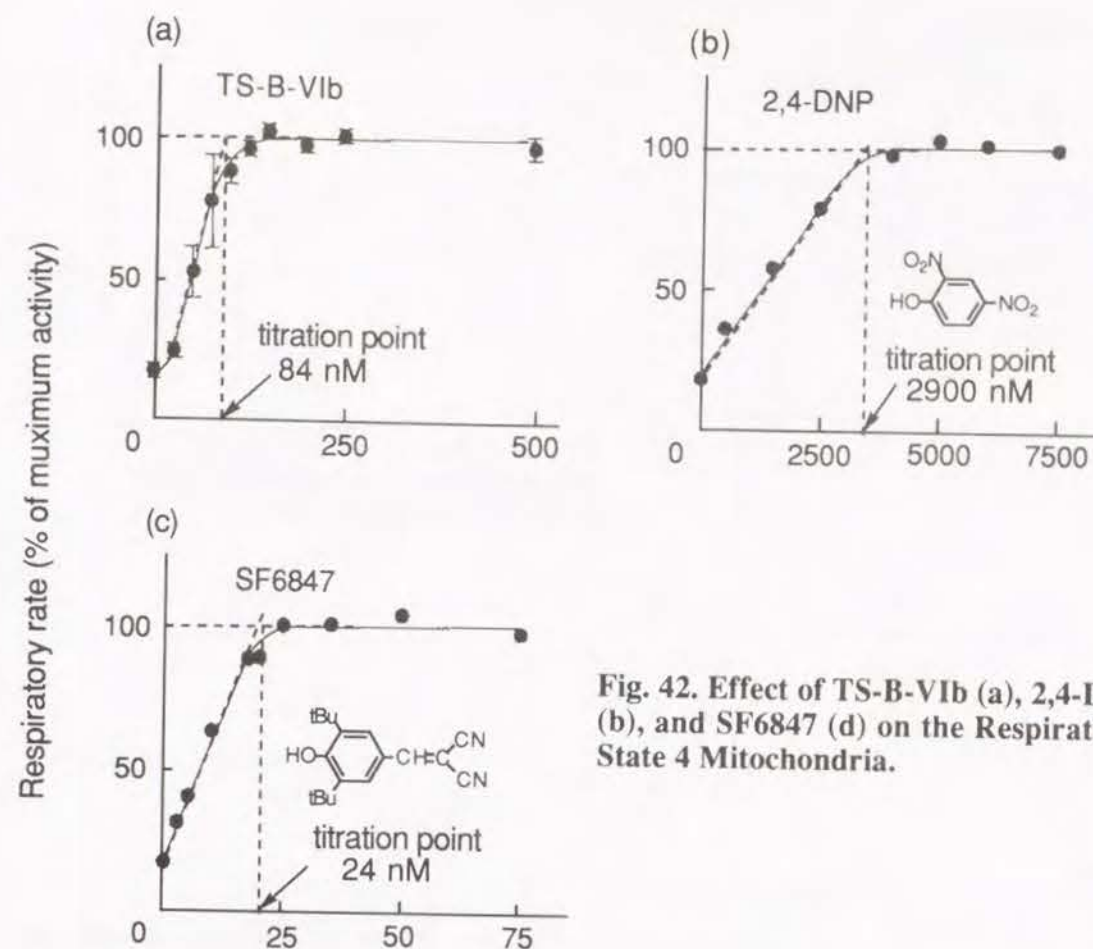


**Fig. 41. Double-Logarithmic Plots of  $k'$  Versus the Conductance ( $G$ ) of the Membranes at 120 mV with TS-Bs at the Concentration of 50, 75, or 100 nM.** The  $k'$  values were determined from the retention time of TS-Bs ( $t$ ) on HPLC using a phenyl column with the mobile phase MeOH-H<sub>2</sub>O (85:15) as  $k'=(t-t_0)/t_0$ , where  $t_0$  is the time for elution of unretained NO<sup>3-</sup> ion.  
■, TS-B-VIb, ●, -VIa, △, -V, ○, -IIIa, □, -Ia.

## 第2節 Trichosporin-Bのミトコンドリアに対する脱共役活性

Hypelcinおよびalamethicinはラット肝ミトコンドリアに対して脱共役作用を有する<sup>59)</sup> (第2章、第7節)。TS-Bもそれらと類似な構造を持つことから、同様に脱共役作用を有することが予測された。

ラット肝ミトコンドリアに対してTS-B-VIbを作用させたところ、その呼吸を促進し、脱共役活性を示した。脱共役剤 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) およびSF6847の滴定点濃度 (それぞれ容量-反応曲線において2900 nMと24 nM) とTS-B-VIbのそれ(84 nM)との比較から、TS-B-VIbは2,4-DNPの約35倍の活性があり、既知で最強の脱共役剤であるSF6847と比べても約25%の活性があることがわかった(Fig. 42)。



**Fig. 42. Effect of TS-B-VIb (a), 2,4-DNP (b), and SF6847 (d) on the Respiration of State 4 Mitochondria.**

TS-B-VIbの脱共役活性の特性を調べたところ、以下のような特性を示した。

- (1) TS-B-VIbはATPaseの特異的阻害剤であるoligomycinにより抑制されたミトコンドリアの呼吸を開放した(Fig. 43)。
- (2) 無機リン酸を含まない反応液中でTS-B-VIbを作用させ、無機リン酸を加えるとミトコンドリアの呼吸が促進されたが、酢酸やチオシアン酸を加えても活性は促進しなかった(Fig. 44)。

以上の特性はhypelcinやalamethicinにおいても観測されており、TS-B-VIbの脱共役作用がこれらのペプチドと同様の機構により発現されていることを示唆している。

他のTS-Bについても脱共役活性を測定し、滴定点濃度を求めた(Table 8)。各TS-Bの滴定点濃度の逆数と保持比 $k'$ (6-1-3)とを両対数プロットすると一次の相関が得られた(Fig. 45)。この結果はTS-Bの脱共役活性が、カテコールアミン分泌活性と同様に、分子の脂溶性に対して正の相関を持つことを示している。



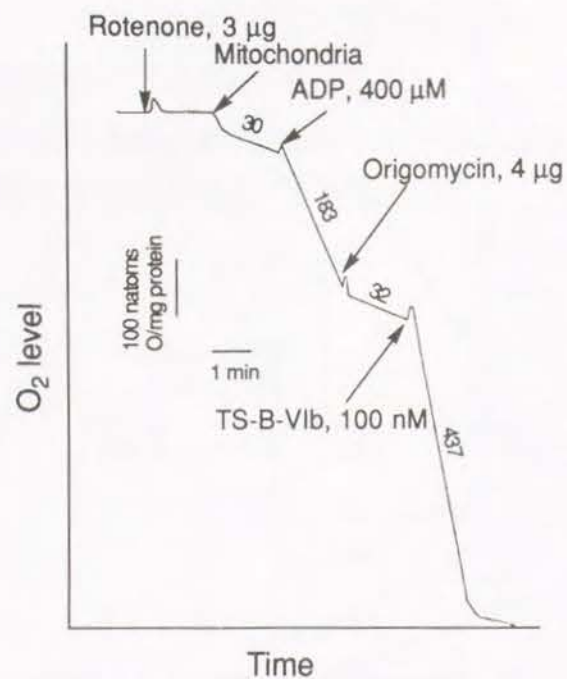


Fig. 43. Effect of TS-B-VIb on Oligomycin-Inhibited Respiration of Rat Liver Mitochondria.

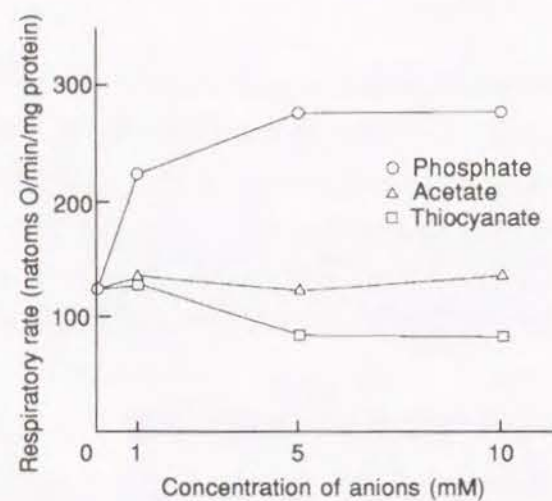


Fig. 44. Effect of Various Anions on the Stimulation of the Respiratory Rate of State Four Mitochondria Induced by TS-B-VIb.

Table 8. Concentration of TS-B at Maximum Mitochondrial Respiration.

	Concentration (nM)		Concentration (nM)
TS-B-		TS-B-	
Ia	490	IVc	240
IIIa	263	IVd	267
IIIb	312	V	155
IIIc	261	VIa	106
IVb	168	VIb	84

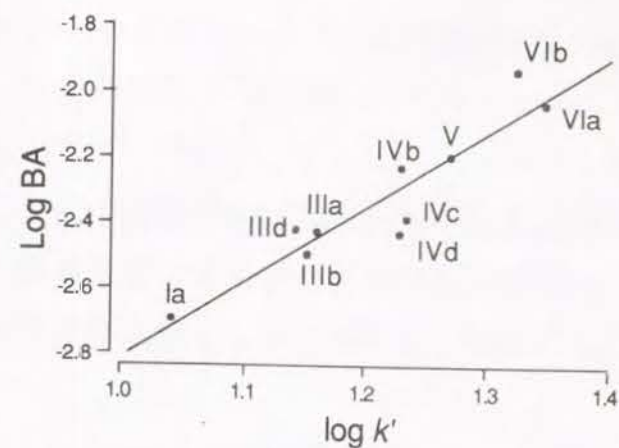


Fig. 45. Relationship between the log [Reciprocal Concentration] of TS-B at Maximum Respiratory Activity (log BA) and Their Relative Hydrophobicities (log  $k'$ )



1) Trichosporin (TS) -Bとその誘導体の合成

20残基のペプチドTS-B-VIaとTS-B-VIbをフラグメント縮合法を用いて合成した。合成物は天然物と一致した。天然物の合成に用いたフラグメントを活用してTS-B-VIaの誘導体を合成した。合成した天然物と誘導体のアミノ酸配列を下記に示す。

TS-B-VIb	Ac-U-A-A-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-J-Q-Q-Fol
TS-B-VIa	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
[Aib <sup>14</sup> ] TS-B-VIa	Ac-U-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-U-V-U-U-Q-Q-Fol
des-Aib <sup>1,3</sup> ,Ala <sup>2,4</sup> -TS-B-VIa	Ac-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
des-Aib <sup>1,3</sup> ,Ala <sup>2</sup> -TS-B-VIa	Ac-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
des-Aib <sup>1</sup> ,Ala <sup>2</sup> -TS-B-VIa	Ac-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
des-Aib <sup>1</sup> -TS-B-VIa	Ac-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
Aib-TS-B-VIa	Ac-U-U-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
(Aib) <sub>2</sub> -TS-B-VIa	Ac-U-U-U-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol
(Aib) <sub>3</sub> -TS-B-VIa	Ac-U-U-U-U-A-U-A-U-U-Q-U-I-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol

2) TS-B-VIaとその誘導体の2次構造

TS-B-VIaはそのN-末端が $\alpha$ -helixと<sub>310</sub>-helixの両方の構造を、3位から12位までは主に $\alpha$ -helix構造を、13位から20位は主に<sub>310</sub>-helix構造を有していることをCD、NMR、を用いて解明した。さらに、TS-B-VIaはPro付近にhelixの折れ曲がりをもつことを明らかにした。一方、TS-B-VIaのProをAibで置換した[Aib<sup>14</sup>]TS-B-VIaは分子全体が $\alpha$ -helix構造を取り、直線状であった。N末端側の残基数を変化させた誘導体のヘリックス含量はいずれもTS-B-VIaのそれに比べて減少した。

3) TS-B-VIaとその誘導体のイオンチャンネル形成特性

TS-B-VIaおよびその誘導体が誘導する膜電流の観測の結果下記のことが明らかになった。

- i) TS-B-VIaのPro<sup>14</sup>は電圧依存性のイオンチャンネル形成には必須ではないが、チャンネルの安定性に重要な寄与をしている。
- ii) 安定なイオンチャンネルの形成には残基数が20か21に厳密に限定されているが、16から23残基の全ての誘導体にも膜電流を誘導する能力がある。

4) TS-Bのカテコールアミン分泌活性と脱共役活性

TS-Bの脂質二分子膜におけるチャンネル形成能、牛副腎随質細胞からのカテコールアミン分泌能、そして、ラット肝ミトコンドリアに対する脱共役活性はともに、TS-Bの脂溶性の増加に比例して上昇することを明らかにした。この結果は、TS-Bの生物活性とチャンネル形成活性の発現に、分子の脂溶性が関与した共通の機構が存在することを示唆している。



## 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始ご懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、藤多哲朗元京都大学教授（現 摂南大学 教授）に心から感謝の意を表します。

本研究に有益な御指導、御助言を賜りました薬用植物化学講座 富岡清 教授、故上田伸一 助教授、ならびに、同講座 井上謙一郎 助教授（現 岐阜薬科大学教授）に謹んで感謝いたします。

直接の御指導、ご助言を賜りました、薬用植物化学講座助教授 飯田 彰 博士に深く感謝いたします。

カテコールアミン分泌活性試験について御指導いただいた岩手医科大学 立川英一 助教授、ならびに、チャンネル電流の測定について御指導いただいた本学化学研究所 浅見耕司 助教授 に深く感謝いたします。

質量分析測定をしていただいた本学薬学部質量分析室助手 秋元直茂 博士、ならびに、元素分析の労をとられた本学有機微量元素分析総合施設の各氏に感謝いたします。

さらに、実験に協力して頂いた 奥田真弘 博士、神原武志 修士、Neoh Lian-Pin 修士 をはじめ薬用植物化学講座の諸氏に合わせて感謝いたします。

## 実 験 の 部



### 3章に関する実験

融点はすべて柳本微量融点測定器で測定し未補正值である。旋光度はJASCO DIP-181 digital polarimeter、CDはJASCO J-720 spectropolarimeterを用いて測定した。HPLCには、Shimadzu LC-6A systemを使用した。EI-MSはJEOL O1-SG、FAB-MSはJEOL HX-110またはVG AutoSpec-Tを用いて測定した。FAB-MS測定にはマトリックスとしてglycerol-thioglycerolまたは*m*-nitrobenzyl alcohol-glycerolを用いた。ESI-MSはAPI-III (Perkin Elmer Sciex)を用いて測定した。ESI-MS測定においては試料は0.1%TFAを含むCH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (1:1) に溶解しMSに5 μl/minの流速で導入した。MS/MSにはコリジョンガスとしてArを用いた。NMRの測定には、JEOL JNM-FX 200 (200 MHz)、Bruker AC-300 (300 MHz)、ならびにAM-600 (600 MHz) スペクトロメータを使用した。内部標準として、TMS (tetramethylsilane)を用いた。

薄層クロマトグラフィー(TLC)にはKieselgel 60F 254 (Merck)を用い、以下の溶媒系(v/v)で展開した。R<sub>f1</sub> CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5), R<sub>f2</sub> CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1), R<sub>f3</sub> CHCl<sub>3</sub>-MeOH (8:2), R<sub>f4</sub> CHCl<sub>3</sub>-MeOH (7:3), R<sub>f5</sub> CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (5:4:1), R<sub>f6</sub> CHCl<sub>3</sub>-MeOH (6:4)。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーには、それぞれSilica gel 60 (70-230 mesh, Merck)とSephadex LH-20 (Pharmacia)を用いた。イオン交換樹脂は、Amberlite IR-120B, IRA-400、を使用した。

反応後の溶媒の乾燥には、特に記載しない限り無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いた。

#### <縮合反応>

特に記載のないかぎり、縮合反応はDCC-HOBt法を用いて、室温下24-72時間行った。反応混合物は、DCU (dicyclohexylurea)および溶媒を除去したあと操作A法あるいはB法により精製した。

操作A法: EtOAcに易溶の保護ペプチドの場合、抽出液を1 N HCl、5% NaHCO<sub>3</sub>、飽和食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ濃縮した。

操作B法: EtOAcに難溶の保護ペプチドの場合、粗生成物をMeOHに溶かし同じ溶媒を溶離液としてSephadex LH-20を用いてゲル濾過クロマトグラフィーに付した。目的物を含むフラクションを集め濃縮した。

#### <Z-ペプチドメチルエステルのアルカリ加水分解>

Z-ペプチドメチルエステルは特に記載のないかぎり、操作C法によりアルカリ加水分解した。

操作C法: Z-ペプチドメチルエステルはMeOH中35℃以下で1 N NaOH (2-3等量)を用いて加水分解した。反応液を1 N HClで中和、MeOHを除いた後、1 N HClでpH 3としEtOAcで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ濃縮した。残渣は通常それ以上の精製をすることなく次の反応に用いた。



### <接触還元>

接触還元は特に記載のないかぎり操作D法を用いた。

操作D法: Z基(benzyloxycarbonyl)は、10% Pd/Cを加え、H<sub>2</sub>ガスを導入し除去した。触媒を除去、濾液を濃縮して得た残渣は、通常それ以上の精製をすることなく次の反応に用いた。

## 1. 3-1-2 Trichosporin-B-VIaの合成

### A. Fragment [1] とその脱Boc体の合成

#### Z-Gln-Pheol

Z-Gln-OH (103.8 g, 370 mmol), HOBt (50g, 1当量), DCC (82.5g, 1.1当量), を順次 Pheol (56.0 g, 1 当量) のDMF (11)溶液に加え、室温で36時間攪拌した。DCUを濾過後、反応液を濃縮、エーテル中で残渣を砕き、それを数回飽和NaHCO<sub>3</sub>に懸濁し吸引濾過してHOBtを除き、水洗し、EtOAcで再結晶した。収量 4.60 g (71%)。mp 188-190°C.  $[\alpha]_D - 38.2^\circ$  (c = 1.0, MeOH). R<sub>f</sub> 0.44. EI-MS m/z: 413 (M<sup>+</sup>), 263 (M<sup>+</sup>-Pheol). Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 63.90; H, 6.58; N, 10.16. Found: C, 63.80; H, 6.54; N, 9.98.

#### H-Gln-Pheol

Z-Gln-Pheol (42.0 g, 108 mmol)をMeOH (1.2 l)に溶かしD法に従って接触還元した。収量 31.4 g (100%)。mp. 130-132°C. R<sub>f</sub> 0.50.

#### Boc-Gln-Gln-Pheol [1]

Boc-Gln-OSu (18.9 g, 55.0 mmol) を H-Gln-Pheol (15.4 g, 1 当量)の DMF (800 ml) 溶液に加え、室温で72時間攪拌した。反応液を濃縮、残渣を5% NaHCO<sub>3</sub>中で砕きろ過し残渣を水で洗浄後乾燥し、MeOH-EtOAcで再結晶した。収量 18.8 g (57%)。mp 218-221 °C. R<sub>f</sub> 0.25. ESI-MS m/z: 507 (M+H<sup>+</sup>), 357 (507-H<sup>+</sup>-Pheol), 229 (357-Gln). Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: C, 56.79; H, 7.35; N, 13.80. Found: C, 56.77; H, 7.46; N, 13.91.

#### H-Gln-Gln-Pheol

Boc-Gln-Gln-Pheol [1] (7.46 g, 14.7 mmol)をanisole (3.7 ml)に懸濁し、TFA (15 ml)を加え、20 min 攪拌した。反応液に無水エーテルを加え、生じた沈殿物を数回、無水エーテルを加えて洗浄した。沈殿物をMeOHに溶かし Amberlite IRA-400で処理した。収量 5.64g (94%)。R<sub>f</sub> 0.49.

### B. Fragment [2] とその脱メチル体の合成

#### Z-Aib-Aib-OMe

Z-Aib-OH (59.30 g, 250 mmol)、HOBt (33.80g, 1 当量)、DCC (51.60 g, 1 当量)を順次、TEA(34.7 ml, 1 当量)を含むHCl · H-Aib-OMe (38.40 g, 1 当量)の EtOAc (30 ml) 溶液に加え22時間攪拌した。A法に従って精製し残渣はEtOAcより再結晶した。収量 58.94 g (70%)。

mp 106-110°C. R<sub>f</sub> 0.56. EI-MS m/z: 336 (M<sup>+</sup>). Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 60.70; H, 7.19; N, 8.33. Found: C, 60.77; H, 7.21; N, 8.19.

#### HCl · H-Aib-Aib-OMe

Z-Aib-Aib-OMe (35.33 g, 105 mmol) を MeOH (265 ml)に溶かし3N HCl (35 ml, 1 当量)を加えD法に従って接触還元した。収量 26.0 g (100%)。R<sub>f</sub> 0.30.

#### Z-Val-Aib-Aib-OMe

Z-Val-OH (28.5 g, 113.3 mmol)、HOBt (15.3 g, 1 当量)、DCC (23.4 g, 1 当量)を順次、TEA (15.7 ml, 1 当量)を含むHCl · H-Aib-Aib-OMe (27.1 g, 1 当量)の EtOAc (500 ml) 溶液に加え48時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィ- (CHCl<sub>3</sub>: MeOH=98:2)に付し、R<sub>f</sub> 0.58のフラクションを集め減圧濃縮し目的物を得た。収量 40.5 g (82%)。mp 111-113 °C.  $[\alpha]_D - 4.0^\circ$  (c = 1.0, MeOH). R<sub>f</sub> 0.58. EI-MS m/z: 435 (M<sup>+</sup>), 418 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 404 (418-Aib), 319 (404-Aib). Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 60.67; H, 7.63; N, 9.64. Found: C, 60.50; H, 7.58; N, 9.50.

#### HCl · H-Val-Aib-Aib-OMe

Z-Val-Aib-Aib-OMe (45.6 g, 104.6 mmol) を、MeOH (200 ml)に溶かし3N HCl (35 ml, 1 当量)を加え、D法に従って接触還元した。収量 32.4 g (96%)。R<sub>f</sub> 0.32.

#### Z-Pro-Val-Aib-Aib-OMe [2]

Z-Pro-OH (23.9 g, 7.34mmol)、HOBt (13.0 g, 1 当量)、DCC (19.7 g, 1 当量)を順次、TEA (12.1 ml, 1 当量)を含むHCl · H-Val-Aib-Aib-OMe (29.5 g, 1 当量)の EtOAc(200 ml)溶液に加え24時間攪拌した。A法に従って精製した残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィ- (CHCl<sub>3</sub>: MeOH=9:1)により精製した。収量 40.0 g (86%)。mp 56-58 °C.  $[\alpha]_D - 45.2^\circ$  (c = 1.0, MeOH). R<sub>f</sub> 0.55. EI-MS m/z: 532 (M<sup>+</sup>), 501 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 416 (501-Aib), 331 (416-Aib), 232 (331-Val). Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: C, 60.89; H, 7.57; N, 10.52. Found: C, 60.62; H, 7.70; N, 10.42.

#### Z-Pro-Val-Aib-Aib-OH

上記保護tetrapeptide [2] (32.8 g, 61.5 mmol)を、MeOH (250 ml)に溶かしC法に従ってアルカリ加水分解した。収量31.4 g (98%)。R<sub>f</sub> 0.50.

### C. Fragment [3] とその脱Z体の合成

#### Z-Leu-Aib-OMe

Z-Leu-OH (32g, 120 mmol)、HOBt (16.20 g, 1 当量)、DCC (24.76g, 1 当量)を順次、TEA (16.6 ml, 1 当量) を含む HCl · H-Aib-OMe (18.43g, 1 当量)のEtOAc(320 ml)溶液に加え40時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィ- (CHCl<sub>3</sub>: MeOH=95:5)に付した。収量40.2g (92%)。mp 60-65°C.  $[\alpha]_D - 23.0^\circ$  (c = 1.0, MeOH). R<sub>f</sub> 0.76. EI-MS m/z: 364 (M<sup>+</sup>). Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 62.62; H, 7.74; N, 7.69. Found: C,



62.74; H, 7.63; N, 7.58.

#### HCl · H-Leu-Aib-OMe

Z-Leu-Aib-OMe (6.00 g, 16.5 mmol)を、90% aq. MeOH (15 ml)に溶かし1N HCl 16.5ml(1当量)を加えD法に従って接触還元した。触媒を濾去し濃縮し塩酸塩を得た。収量 4.23g (97%). Rf 0.45.

#### Z-Gly-Leu-Aib-OMe

Z-Gly-OH (16.40 g, 78.5 mmol)、HOBt (10.60g, 1 当量)、DCC (16.20 g, 1 当量)を順次、TEA (10.90ml, 1 当量)を含むHCl · H-Leu-Aib-OMe (20.85 g, 1 当量)の EtOAc (100 ml)溶液に加え65時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣は EtOAc - n-hexaneから再結晶した。収量 30.5 g (91%). mp 129-132°C.  $[\alpha]_D - 34.0^\circ$  (c = 1.0, MeOH). Rf 0.37. EI-MS m/z : 421 (M<sup>+</sup>), 390 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>). Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 59.84; H, 7.41; N, 9.97. Found: C, 59.65; H, 7.50; N, 9.67.

#### Z-Gly-Leu-Aib-OH

Z-Gly-Leu-Aib-OMe (27.08 g, 64 mmol)を、MeOH (150ml)に溶かしC法に従ってアルカリ加水分解した。残渣はEtOAc-n-hexaneより再結晶した。収量 20.60 g (79%). mp 150-154°C. Rf 0.56.

#### Z-Gly-Leu-Aib-OPac [3]

Z-Gly-Leu-Aib-OH (20.00g, 47mmol) と phenacyl bromide (10.80 g, 1 当量)のDMF (96ml)溶液にTEA (7.5 ml, 1 当量)を加え24時間攪拌した。反応液を濃縮、残渣をEtOAcで抽出した。EtOAc層を5% NaHCO<sub>3</sub>、飽和食塩水で順次洗浄、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し濃縮した。残渣はシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>: MeOH=98:2)を用いて精製した。収量 21.3g (83%). mp 55-58°C.  $[\alpha]_D - 33.0^\circ$  (c = 1.0, MeOH). Rf 0.56. ESI-MS m/z : 526 (M+H<sup>+</sup>). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O: C, 61.87; H, 6.86; N, 7.73. Found: C, 61.81; H, 7.01; N, 7.55

#### HBr · H-Gly-Leu-Aib-OPac

Z-Gly-Leu-Aib-OPac [3] (4.80g, 9.13mmol)のAcOH (10 ml) 溶液に30% HBr /AcOH (40ml)を加え2 時間攪拌した。無水エ-テルを加え、生じた沈殿物を集め、無水エ-テルで洗浄、KOH 上で乾燥した。収量 3.89 g (90%). Rf 0.40.

#### D. Fragment [4] とその脱メチル体の合成

##### Z-Ile-Aib-OMe

Z-Ile-OH (42.50g, 160mmol)、HOBt (21.60 g, 1 当量)、DCC (33.00 g, 1 当量)を順次、TEA (22.2 ml, 1 当量)を含むHCl · H-Aib-OMe (24.60 g, 1 当量)の EtOAc (250 ml) 溶液に加え40時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー-(CHCl<sub>3</sub>: MeOH = 95:5)に付した。収量 47.0 g (81%). mp 83-84°C.  $[\alpha]_D - 22.9^\circ$  (c = 1.0, MeOH). Rf 0.57. EI-MS m/z : 364 (M<sup>+</sup>), 333 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 248 (333-Aib). Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 62.62; H,

7.74; N, 7.69. Found: C, 62.59; H, 7.77; N, 7.41.

##### HCl · H-Ile-Aib-OMe

Z-Ile-Aib-OMe (20.00 g, 55mmol)を、90% aq. MeOH (130ml)に溶かし1N HCl 54.9ml (1 当量)を加えD法に従って接触還元した。触媒を濾去、濃縮し塩酸塩をえた。収量15.47 g (100%). Rf 0.35.

##### Z-Gln-Aib-OMe

Z-Gln-OH (25.2 g, 90mmol)、HOBt (12.20g, 1 当量)、DCC (18.60 g, 1 当量) を順次、TEA (12.5 ml, 1 当量)を含むHCl · H-Aib-OMe (13.8 g, 1 当量)の DMF (130ml) 溶液に加え44時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣は EtOH より再結晶した。収量 16.10g (47%). mp 135-137°C.  $[\alpha]_D - 16.0^\circ$  (c = 1.0, MeOH). Rf 0.55. EI-MS m/z : 379 (M<sup>+</sup>), 348 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 263 (348-Aib). Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 56.98; H, 6.64; N, 11.08. Found: C, 56.73; H, 6.71; N, 10.83.

##### Z-Gln-Aib-OH

Z-Gln-Aib-OMe (14.42 g, 38 mmol)を、MeOH (110ml)に溶かしC法に従ってアルカリ加水分解した。収量 13.57g (88%). mp 149-151°C. Rf 0.18.

##### Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OMe [4]

Z-Gln-Aib-OH (9.50 g, 26.00 mmol)、HOBt (3.51mg, 1 当量)、DCC (5.35g, 1 当量) を順次、TEA (3.60ml, 1 当量)を含むHCl · H-Ile-Aib-OMe (6.94g, 1 当量)の DMF (80ml)溶液に加え64時間攪拌した。DCUを濾去、濾液を濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>: MeOH = 9:1)付した。収量 13.02 g (87%). mp 90-92°C.  $[\alpha]_D - 17.4^\circ$  (c = 1.0, MeOH). Rf 0.46. EI-MS m/z : 577 (M<sup>+</sup>), 546 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 461 (546-Aib). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>: C, 58.22; H, 7.50; N, 12.12. Found: C, 57.98; H, 7.53; N, 12.32.

##### Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OH

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OMe [4] (1.01 g, 1.75 mmol)を、MeOH (10ml)に溶かしC法に従ってアルカリ加水分解した。収量7.58 g (60%). mp. 110-112°C. Rf 0.56

#### E. Fragment [5] とその脱メチル体の合成

##### Z-Ala-Aib-Aib-OMe

Z-Ala-OH (11.20g, 50.3 mmol)、HOBt (6.80g, 1 当量)、DCC (10.38 g, 1 当量)を順次、TEA (7.0ml, 1 当量)を含むHCl · H-Aib-Aib-OMe (12.00 g, 1 当量)の EtOAc (130 ml) 溶液に加え24時間攪拌した。A法に従って精製し 残渣はEtOAc より再結晶した。収量 18.57g (91%). mp 118-121°C.  $[\alpha]_D - 8.1^\circ$  (c = 1.0, MeOH). Rf 0.62. ESI-MS m/z : 408 (M+H<sup>+</sup>). Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 58.95; H, 7.17; N, 10.31. Found: C, 59.20; H, 7.33; N, 10.16.

##### H-Ala-Aib-Aib-OMe

Z-Ala-Aib-Aib-OMe (17.94 g, 44.0mmol) を、10滴のAcOHを含む 90% MeOH (122 ml)に溶か



しD法に従って接触還元した。収量 12.14 g (100%). Rf 0.48.

Z-Ala-Aib-OMe

Z-Ala-OH (3.46 g, 15.5 mmol) と DCC (3.20 g, 1 当量) を含む DMF (250 ml) 溶液に加え24時間攪拌する。A法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl3: MeOH=95:5)に付し、Rf 0.54のフラクションを減圧濃縮し、Z-Ala-Aib-OMeを得た。収量 3.60 g (76%), [α]D - 30.3° (c=1.0, MeOH), Rf 0.54, EI-MS m/z: 206 (M+, OCH3), 206 (291-Aib).

Z-Ala-Aib-OH

Z-Ala-Aib-OMe (9.45 g, 29.3 mmol) はC法に従ってZ-Ala-Aib-OHを得た。このジペプチドは EtOAc-n-hexane 混合溶媒により再結晶した。収量 7.60 g (84%), mp 181-183°C, Rf 0.67.

Z-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

Z-Ala-Aib-OH (1.00 g, 3.12 mmol), HOBt (440 mg, 1 当量) と DCC (670 mg, 1 当量) を含む TEA (0.45 ml, 1 当量) を含む HCl·H-Ala-Aib-OMe (1.00 g, 3.12 mmol) の DMF (9 ml) 溶液に加えた。72 時間後、溶液はA法に従って精製し、得られた残渣をB法に従って再精製した。収量 1.31 g (72 %). mp 220 - 221 °C, [α]D - 2.4° (c=1.0, MeOH), Rf 0.32, EI-MS m/z:

563 (M+), 447 (M+ - Aib-OCH3), 362 (447-Aib), 291 (447-Ala), 206 (291-Aib). Anal. Calcd for C27H44N2O8: C, 57.54; H, 8.86; N, 12.42. Found: C, 57.2; H, 8.2; N, 12.55.

H-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

上記の保護ペプチド (1.60 g, 3.72 mmol) を MeOH (40 ml) 中D法に従って接触還元し、目的物を得た。収量 1.57 g (86 %), Rf 0.69.

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (5)

Ac-Aib-OH は H-Aib-OH と Ac2O を AcOH 中還流して得た。Ac-Aib-OH (150 mg, 1.03 mmol), HOBt (139 mg, 1 当量) と DCC (212 mg, 1 当量) を順次 H-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (441 mg, 1 当量) の DMF (7 ml) 溶液に加え、攪拌した。48 時間後 DCC を濾過し除去、溶媒を減圧留去した。残渣は MeOH に溶解し Amberlite IR-120 と IRA-400 で処理した。溶媒を留去し残渣は MeOH と EtOAc により再結晶した。収量 180 mg (73 %), mp 174 - 176 °C, [α]D + 6.2° (c=0.3, MeOH), Rf 0.46, ES-MS m/z: 557 (M+ - H+), 525 (557 - OCH3 - H), 440 (525 - Aib), 355 (440 - Aib), 284 (355 - Ala), 199 (284 - Aib), 128 (199 - Ala). Anal. Calcd for C25H44N6O8 · 2H2O: C, 53.08; H, 8.02; N, 14.86. Found: C, 53.13; H, 8.09; N, 14.88.

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

上記の保護ヘキサペプチド (49.6 mg, 0.089 mmol) をC法に従いアルカリ加水分解した。反応溶液は Amberlite IR-120 で中和した。溶媒を留去し、目的物を得た。収量 46.9 mg (95 %). mp 210-212 °C. Rf 0.73.

F. Position 14-20のFragment合成

Z-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [Position 14-20]

Z-Pro-Val-Aib-Aib-OH (6.85 g, 13.2 mmol), HOBt (1.78 g, 1 当量), DCC (2.72 g, 1 当量) を順次、H-Gln-Gln-Pheol (A) (5.38 g, 1 当量) の DMF (80 ml) 溶液に加え24時間攪拌した。B法に従って精製し、濃縮残渣 11.5 g を得た。これを、シリカゲルクロマトグラフィー (CHCl3: MeOH = 9:1) に付し、TLC 上 Rf = 0.28 のフラクションを集めた。収量 9.10 g (76 %). mp 111-115 °C. [α]D - 36.1° (c=1.0, MeOH), Rf 0.33. FAB-MS m/z: 908 (M+H+), 629 (908-H-Pheol-Gln), 501 (629-Gln), 416 (501-Aib), 331 (416-Aib), 232 (331-Val). Anal. Calcd for C45H65N9O11 · H2O: C, 58.36; H, 7.29; N, 13.61. Found: C, 58.13; H, 7.30; N, 13.33.

H-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

Z-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol (707 mg, 0.78 mmol) を、MeOH (8 ml) に溶かしD法に従い接触還元した。収量 565 mg (94 %). Rf 0.35.

G. Position 7-13のFragment合成

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-OPac

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-OH (D) (4.65 g, 8.25 mmol), HOBt (mg, 1 当量), DCC (1.12 g, 1 当量) を順次、TEA (1.14 ml, 1 当量) を含む HBr · H-Gly-Leu-Aib-OPac (C) (3.89 g, 1 当量) の EtOAc (56 ml) 溶液に加え36時間攪拌した。A法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl3: MeOH=9:1) に付した。収量 2.98 g (48 %). [α]D - 10.2° (c=1.0, MeOH). mp 105-107 °C. Rf 0.41. FABMS m/z: 937 (M+H+), 801 (937-H-OPac), 716 (801-Aib), 603 (716-Leu), 546 (603-Gly), 461 (546-Aib), 348 (461-Ile), 263 (348-Aib). Anal. Calcd for C47H68N8O12 · 2H2O: C, 59.10; H, 7.39; N, 11.73. Found: C, 58.90; H, 7.18; N, 11.40.

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-OH

上記保護ヘプタペプチド (position 7-13) (2.04 g, 2.18 mmol) の 90% AcOH (62 ml) 溶液に、Zn 末 (6.2 g) を加え、0 °C で1時間、室温で2時間攪拌した。Zn 末を濾去、濾液を濃縮後、残渣を 5% citric acid に溶かし EtOAc で抽出した。EtOAc 層を飽和食塩水で洗浄、Na2SO4 上で乾燥させ濃縮した。収量 1.93 g (91 %). mp 145-148 °C. Rf 0.22.

H. Position 7-20のFragment合成

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [Posiiton 7-20]

上記ヘプタペプチド酸 (positions 7-13) (82 mg, 0.10 mmol), HOBt (13.5 mg, 1 当量), DCC (20.60 mg, 1 当量) を順次、脱保護 heptapeptide (positions 14-20) (F) (79 mg, 1 当量) の DMF (1.5 ml) 溶液に加え72時間攪拌した。B法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー (CH2Cl2: MeOH=8:2) に付した。収量 88.7 mg (56 %). mp 148-149 °C. [α]D - 12.3° (c=0.1, MeOH), Rf 0.64. FAB-MS m/z: 1574 (M+H+), 1295 (1574-H-Pheol-Gln), 1167 (1295-Gln),



1082 (1167-Aib), 997 (1082-Aib). Calcd for  $C_{76}H_{119}N_{17}O_{19} \cdot H_2O$ : C, 56.67; H, 7.70; N, 14.78  
Found: C, 56.80; H, 7.50; N, 14.91.

#### H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

上記テトラデカペプチド [Position 7-20] (75.5mg, 47.5  $\mu$ mol) を、MeOH (2.5 ml) に溶かし D 法に従って接触還元した。収量 70.4 mg (91%). Rf 0.83.

#### I. Trichosporin-B-VIa の合成

##### Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [trichosporin-B-VIa]

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (1 - 6位) (46.0 mg, 1.5 当量), HOBt (11.5 mg, 1.5 当量) と DCC (17.5 mg, 1.5 当量) は順次 H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (Position 7 - 20) (82.2 mg, 56.5 mmol) の DMF (1.2 ml) 溶液に加え攪拌した。反応溶液は 48 時間後 B 法に従い処理した。残渣 (70.0 mg) は分取 HPLC [conditions: mobile phase, MeOH-H<sub>2</sub>O (85 : 15, v/v); flow rate, 7 ml/min; detection, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i.d. x 250 mm); column temperature, 40°C] により精製し trichosporin B-VIa を得た。収量 37.7 mg (34%), mp 232-234°C (nat. 239-242°C<sup>4)</sup>),  $[\alpha]_D^{20} -16.0^\circ$  (c=0.2, MeOH), Rf 0.36, ESI-MS : 983 (M+2H<sup>2+</sup>), 655 (M+3H<sup>3+</sup>). Amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Glu 3.10 (3), Ala 1.94 (2), Val 0.99 (1), Gly 1.00 (1), Ile 0.94 (1), Leu 0.99 (1) and Pro 0.93 (1). HR-FABMS, Calcd for  $C_{92}H_{153}N_{23}O_{24}Na$ : 1987.136. Found: 1987.148.

#### 2. Trichosporin-B-VIb の合成

##### J. Fragment [2'] とその脱メチル体の合成

###### Z-Aib-Iva-OMe

Z-Aib-OH (53.60 g, 226mmol), HOBt (30.53 g, 1 当量), DCC (46.63g, 1 当量) を順次、TEA (31.30 ml, 1 当量) を含む HCl · H-Iva-OMe (37.88 g, 1 当量) の EtOAc (350 ml) 溶液に加え 48 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィ (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 95 : 5) に付し、TLC で Rf<sub>2</sub> = 0.62 のフラクションを集め、減圧濃縮しシロップ状の残渣 27.37g (36%) を得た。Rf 0.62. EI-MS m/z: 350 (M<sup>+</sup>), 251 (M<sup>+</sup>-Iva), 192 (251-COOCH<sub>3</sub>).  
Anal. Calcd for  $C_{18}H_{26}N_2O_5$ : C, 61.70; H, 7.48; N, 7.99. Found: C, 61.54; H, 7.65; N, 7.84.  
<sup>1</sup>H-NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.4-7.3 (5H, m,  $\phi$ ),  $\delta$  7.06 (1H, s, Iva-NH),  $\delta$  5.49 (1H, s, Aib-NH),  $\delta$  5.09 (2H, s,  $\phi$ -CH<sub>2</sub>),  $\delta$  3.73 (3H, s, -OMe),  $\delta$  2.35-2.15 (1H, m, Iva  $\beta$  CH<sub>2</sub>),  $\delta$  1.90-1.70 (1H, m, Iva  $\beta$  CH<sub>2</sub>),  $\delta$  1.53 (9H, s),  $\delta$  0.75 (3H, t, J=7.3Hz, Iva- $\gamma$  CH<sub>3</sub>)

###### HCl · H-Aib-Iva-OMe

Z-Aib-Iva-OMe (1.00 g, 2.90mmol) を、90% aq. MeOH (15 ml)、1N HCl (2.9ml, 1 当量) を加え、D 法に従って接触還元した。触媒をろ去、濃縮し塩酸塩を得た。収量 721 mg (98%). Rf 0.30.

###### Z-Val-Aib-Iva-OMe

Z-Val-OH (5.58 g, 22.2 mmol), HOBt (3.00 g, 1 当量), DCC (4.58 g, 1 当量) を順次、TEA (3.10 ml, 1 当量) を含む HCl · H-Aib-Aib-OMe (5.61g, 1 当量) の EtOAc (20 ml) 溶液に加え 48 時間攪拌した。A 法に従って精製し、残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィ (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 98 : 2) に付し、Rf 0.41 のフラクションを集め減圧濃縮しシロップ状の残渣を得た。収量 8.95g (71%). Rf 0.54. EI-MS m/z: 449 (M<sup>+</sup>), 418 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 319 (418-Aib), 291 (390-Val), Anal. Calcd for  $C_{23}H_{35}N_3O_6$ : C, 61.45; H, 7.85; N, 9.35. Found: C, 61.35; H, 7.81; N, 9.23. <sup>1</sup>H-NMR (200Mz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.5-7.3 (5H, m,  $\phi$ ),  $\delta$  7.07 (1H, s, Iva-NH),  $\delta$  6.58 (1H, d, J=8.6Hz, Val-NH),  $\delta$  5.12 (2H, s,  $\phi$ -CH<sub>2</sub>),  $\delta$  3.90 (1H, dd, J=6.1, 8.0, Val- $\alpha$  CH),  $\delta$  2.3-2.0 (2H, m, Iva- $\beta$  CH<sub>2</sub>),  $\delta$  2.0-1.7 (1H, m, Val- $\beta$  CH),  $\delta$  1.55 (3H, s, Iva or Aib- $\beta$  CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.54 (6H, s, Iva or Aib- $\beta$  CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.54 (3H, s, Iva- $\gamma$  CH<sub>3</sub>).

###### H-Val-Aib-Iva-OMe

Z-Val-Aib-Iva-OMe (3.55g, 7.90mmol) を、90% MeOH (14 ml) に溶かし D 法に従って接触還元しシロップ状生成物を得た。収量 2.32 g (93%). Rf 0.34.

###### Z-Pro-Val-Aib-Iva-OMe [2']

Z-Pro-OH (2.32g, 7.34mmol), HOBt (0.99 g, 1 当量), DCC (1.52g, 1 当量) を順次、H-Val-Aib-Iva-OMe (2.32g, 1 当量) の EtOAc (24 ml) 溶液に加え 40 時間攪拌した。A 法に従って精製した残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィ (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1) に付しシロップ状の残渣を得た。収量 3.28 g (82%); Rf 0.42; EI-MS m/z: 546 (M<sup>+</sup>), 515 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>), 416 (515-Iva), 331 (416-Aib), 232 (331-Val). Anal. Calcd for  $C_{28}H_{42}N_4O_7 \cdot 1/2H_2O$ : C, 60.63; H, 7.63; N, 10.10. Found: C, 60.78; H, 7.84; N, 9.93.

###### Z-Pro-Val-Aib-Iva-OH

上記保護 tetrapeptide [2] (3.00 g, 5.66 mmol) を、MeOH (25ml) に溶かし C 法に従ってアルカリ加水分解した。収量 2.35g (78%); Rf 0.62.

#### K. Position 14-20 の合成

##### Z-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol [Position 14-20]

Z-Pro-Val-Aib-Iva-OH (2.35 g, 4.41 mmol), HOBt (596mg, 1 当量), DCC (910 mg, 1 当量) を順次、H-Gln-Gln-Pheol (A) (1.80 g, 1 当量) の DMF (15 ml) 溶液に加え 48 時間攪拌した。B 法に従って精製し、濃縮残渣 6.42g を得た。これを、ゲル濾過 (20  $\phi$  x 1230 mm) に付し (B 法)、メタノールで溶出し 255 ~ 300ml のフラクションを集め、濃縮残渣 2.77g を得た。これを、シリカゲ



ルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1)に付し、TLC上R<sub>f</sub>=0.28のフラクションを集めた。収量1.74 g(43%)。mp 114-116°C。R<sub>f</sub> 0.28。FAB-MS m/z: 921 (M+H<sup>+</sup>), 643 (921-Pheol-Gln-H), 515 (643-Gln), 416 (515-Aib), 331 (416-Iva), 232 (331-Val)。Anal. Calcd for C<sub>46</sub>H<sub>67</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 63.06; H, 7.94; N, 14.39. Found: C, 62.88; H, 8.02; N, 14.21.

#### H-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol

Z-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol (100 mg, 0.109 mmol)を、MeOH (1.5 ml)に溶かしD法に従って接触還元した。収量 90 mg (100%)。R<sub>f</sub> 0.38.

#### L. Position 7-20の合成

##### Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol [Position 7-20]

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-OH (G) (82 mg, 0.10mmol), HOBt (13.5mg, 1 当量), DCC (20.60 mg, 1 当量)を順次、H-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol (K) (79 mg, 1 当量)の DMF (1.5 ml)に加え72時間攪拌した。B法に従って精製し、残渣はシリカゲルクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=8:2)に付した。収量 88.7mg (56%)。mp 148-149 °C。R<sub>f</sub> 0.64。FAB-MS m/z: 1593 (M+H<sup>+</sup>), 1309 (1593-Pheol-Gln-H), 1181 (1309-Gln), 1082 (1181-Iva), 997 (1082-Aib), Anal. Calcd for C<sub>77</sub>H<sub>121</sub>N<sub>17</sub>O<sub>19</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 57.55; H, 7.72; N, 14.81. Found: C, 57.40; H, 7.83; N, 15.02.

##### H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

上記テトラデカペプチド (75.5mg, 47.5 μmol)を、MeOH (2.5 ml)に溶かし D法に従って接触還元した。収量 70.4 mg (91%)。R<sub>f</sub> 0.83.

#### M. Trichosporin-B-VIbの合成

##### Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol [trichosporin-B-VIb]

Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-OH<sup>65)</sup> (442mg, 2 当量), HOBt (113 mg, 2 当量), DCC (172 mg, 2 当量)を順次、H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (L) (608 mg, 35.3 μmol)の DMF (5 ml)に加え48時間攪拌した。B法に従って精製し、残渣 (715 mg)は分取HPLCに付した。[分取条件: mobile phase, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (6:4, v/v); flow rate, 7 ml/min; detection, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. ×250 mm); column temperature, 40°C].

Trichosporin B-VIb: 収量 222 mg (27%)。mp 238-239 °C。[α]<sub>D</sub>-14.08° (c=1.0, MeOH)。R<sub>f</sub> 4 0.47。ESI-MS: 983 (M+2H<sup>2+</sup>), 656 (M+3H<sup>3+</sup>)。Amino acid ratios (6N HCl, 24 h): Glu 2.65 (3), Ala 2.83 (3), Val 0.91 (1), Gly 1.00 (1), Ile 0.85 (1), Leu 0.93 (1) and Pro 1.06 (1).

[17-L-Iva] trichosporin B-VIb: 収量134 mg(16%)。mp. 243-245°C。[α]<sub>D</sub>-18.54° (c=1.2,

MeOH)。ESI-MS: 983 (M+2H<sup>2+</sup>), 656 (M+3H<sup>3+</sup>)。R<sub>f</sub> 4 0.47。Amino acid ratios (6N HCl, 24 h): Glu 2.85 (3), Ala 2.33 (3), Val 0.91 (1), Gly 1.00 (1), Ile 0.90 (1), Leu 0.96 (1) and Pro 0.99 (1).

### 3. [Aib<sup>14</sup>]Trichosporin-B-VIaの合成

#### N. Fragment [2'']とその脱Pac体の合成

##### Z-Val-Aib-Aib-OH

Z-Val-Aib-Aib-OMe (B) (3.0 g, 7.12 mmol)を MeOH (70 ml)に溶解し、C法に従いアルカリ加水分解し、Z-Val-Aib-Aib-OHを得た。収量 3.0 g (99%)。mp 91-93 °C。R<sub>f</sub> 0.24.

##### Z-Val-Aib-Aib-OPac

上記のトリペプチド酸 (800 mg, 1.90 mmol)と phenacyl bromide (415 mg, 1.1 当量)を TEA (0.29 ml, 1.1 当量)を含む DMF (4 ml)溶解し攪拌する。12時間後、溶媒を減圧濃縮し、残渣をEtOAcに溶解し、この溶液を5% NaHCO<sub>3</sub>と飽和食塩水で洗浄した。溶液はNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥後濃縮し残渣 894 mgを得た。残渣はシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=95:5)で精製し、テトラペプチドフェナシルエステルを得た。収量 662 mg (65%)。mp 51-53 °C。[α]<sub>D</sub>+5.5°(c=0.4, MeOH)。R<sub>f</sub> 1 0.29。ESI-MS m/z: 540 (M+H<sup>+</sup>); 404 (M+H<sup>+</sup>-OPac); 319 (404-Aib); 234 (319-Aib)。Anal. Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: C, 64.55; H, 6.91; N, 7.79. Found: C, 64.48; H, 7.12; N, 8.02.

##### HBr·H-Val-Aib-Aib-OPac

Z-Val-Aib-Aib-OPac (300 mg, 0.556 mmol)を 30% HBr / AcOH (2 ml)で処理した。1.5時間後、dry etherを加え、その結果得られた結晶を吸引ろ過し集めた。結晶はdry ether洗浄しNaOH存在下、減圧で乾燥し、HBr·H-Val-Aib-Aib-OPacを得た。収量 256 mg (95%)。R<sub>f</sub> 4 0.60.

##### Z-Aib-Val-Aib-Aib-OPac [2'']

Z-Aib-OH (126 mg, 0.530 mmol), HOBt (72 mg, 1 当量), と DCC (109 mg, 1 当量)を HBr·H-Val-Aib-Aib-OPac (250 mg, 1 当量)の TEA (7.3 μl, 1 当量)を含む DMF溶液に攪拌下加えた。48時間後、溶液はA法に従い処理した。残渣はシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=95:5)で精製し、テトラペプチドフェナシルエステルを得た。収量 209 mg (63%)。mp 44-46 °C。[α]<sub>D</sub>+3.1°(c=0.3, MeOH)。R<sub>f</sub> 2 0.39。ESI-MS m/z: 625 (M+H<sup>+</sup>); 489 (M+H<sup>+</sup>-OPac); 404 (489-Aib); 319 (404-Aib)。Anal. Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>·1/2 H<sub>2</sub>O: C, 62.54 H, 7.16 N, 8.84. Found: C, 62.28; H, 7.23; N, 8.93.

##### Z-Aib-Val-Aib-Aib-OH

上記のテトラペプチド [2''] (160 mg, 0.256 mmol)は 90% AcOH (5 ml)に溶解し、氷冷下 Zn粉 (0.5 g)を加えた。溶液は氷冷下1時間攪拌し、更に室温で2時間攪拌した。Zn粉を



濾過し、溶媒を留去した。残渣に5%クエン酸を加え、水層はEtOAcで抽出した。抽出液は飽和食塩水で洗浄後Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し溶媒留去した。残渣はMeOHとetherで再結晶し、目的のテトラペプチド酸を得た。収量92 mg (79%). mp 85 - 89 °C. *R*<sub>f</sub> = 0.46.

#### O. Position 14-20の合成

##### Z-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

上記のテトラペプチド酸(N) (90 mg, 0.178 mmol), HOBt (24 mg, 1 当量), DCC (37 mg, 1 当量) を順次 H-Gln-Gln-Pheol (A) (73 mg, 1 当量) の DMF 溶液に攪拌下加えた。12 時間後、溶液は B 法に従い処理した。濃縮残渣は MeOH と ether から再結晶し目的のヘプタペプチドを得た。収量 125 mg (78 %). mp 112 - 113 °C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -18.0° (c=0.3, MeOH). *R*<sub>f</sub> 0.64. FAB-MS *m/z*: 896 (M + H<sup>+</sup>), 745 (M + H<sup>+</sup> - Pheol - H), 489 (745 - Gln - Gln), 404 (489 - Aib), 220 (404 - Aib - Val). *Anal.* Calcd for: C<sub>44</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub> · 1/2 H<sub>2</sub>O: C, 58.39; H, 7.35; N, 13.93. Found: C, 58.40; H, 7.29; N, 13.72.

##### H-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

上記のヘプタペプチド (92 mg, 0.103 mmol) を MeOH 中 D 法に従い接触還元し、目的物を得た。収量 71 mg (90 %). *R*<sub>f</sub> 0.58.

#### P. Position 14-20の合成

##### Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

Z-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-OH [3] (G) (76 mg, 0.093 mmol), HOBt (14 mg, 1.1 当量), DCC (21 mg, 1.1 当量) は順次 H-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (70 mg, 1 当量) の DMF 溶液に加えた。24 時間後、溶液は B 法に従い精製し、残渣は MeOH と ether で再結晶した。収量 58 mg (40 %). mp 145 - 147 °C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -23.8° (c=0.8, MeOH). *R*<sub>f</sub> 0.54. FAB-MS *m/z*: 1562 (M + H<sup>+</sup>), 1411 (1562 - Pheol - H), 1155 (1411 - Gln - Gln), 1070 (1155 - Aib), 985 (1070 - Aib), 886 (985 - Val), 801 (886 - Aib), 716 (801 - Aib), 603 (716 - Leu), 546 (603 - Gly), 461 (546 - Aib), 348 (461 - Ile). *Anal.* Calcd for C<sub>75</sub>H<sub>119</sub>N<sub>17</sub>O<sub>19</sub> · H<sub>2</sub>O: C, 56.98; H, 7.71; N, 15.06;. Found: C, 56.64; H, 7.48; N, 15.23.

##### H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

上記のテトラデカペプチド (33 mg, 0.021 mmol) を MeOH に溶解し、D 法に従い接触還元した。収量 28 mg (93 %). *R*<sub>f</sub> 0.58.

#### Q. [Aib<sub>14</sub>]Trichosporin B-VIaの合成

##### Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol ([Aib<sup>14</sup>]trichosporin-B-VIa)

Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (E) (16 mg, 0.03 mmol), HOBt (4 mg, 1.5 当量), DCC (6.2

mg, 1.5 当量) を順次 H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (P) (28 mg, 0.02 mmol) の DMF 溶液に加えた。48 時間後 溶液は B 法に従い処理した。残渣 (30 mg) は HPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (87:13, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40 °C] により精製した。収量 13 mg (33 %). mp 257 - 260 °C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -24.2° (c=0.2, MeOH). amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 3.0 (3); Ala 2.0 (2); Val 0.94 (1); Ile 0.94 (1); Leu 0.99 (1). FAB-MS: (see Fig. 11). HR-FABMS, Calcd for C<sub>91</sub>H<sub>154</sub>N<sub>23</sub>O<sub>24</sub>: 1953.154. Found: 1953.152.

#### 4. [+3]trichosporin-B-VIaの合成

##### Z-Aib-Aib-Aib-OMe

Z-Aib-OH (1.40 g, 5.9 mmol), HOBt (877 mg, 1.1 当量) と DCC (1.34 g, 1.1 当量) は順次 TEA (0.82 ml, 1.1 当量) を含む HCl · H-Aib-Aib-OMe (B) (1.41 g, 1 当量) の DMF (15 ml) 溶液に加えた。12 時間後、溶液は A 法に従って精製し、得られた残渣を EtOAc より再結晶した。収量 1.26 g (50 %). mp 147 - 149 °C. *R*<sub>f</sub> 0.35. ESI-MSMS *m/z*: 421 (M + H<sup>+</sup>), 305 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H). *Anal.* Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>: C, 59.84; H, 7.41; N, 9.97. Found: C, 59.84; H, 7.41; N, 9.97.

##### H-Aib-Aib-Aib-OMe

上記のトリペプチド (400 mg, 0.95 mmol) を MeOH 中 D 法に従い接触還元し、目的物を得た。収量 271 mg (94 %). *R*<sub>f</sub> 0.57.

##### Ac-Aib-Aib-Aib-OMe

H-Aib-Aib-Aib-OMe (245 mg, 0.85 mmol) に無水酢酸 (1 ml) とピリジン (1 ml) を加え、放置した。3 時間後 溶液に氷を加え、留去した。残渣を EtOAc より再結晶した。収量 258 mg (92 %). mp 183 - 185 °C. *R*<sub>f</sub> 0.40. ESI-MSMS *m/z*: 329 (M + H<sup>+</sup>), 213 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H). *Anal.* Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 54.70; H, 8.26; N, 12.76. Found: C, 54.63; H, 8.14; N, 12.62.

##### Ac-Aib-Aib-Aib-OH

Ac-Aib-Aib-Aib-OMe (214 mg, 0.65 mmol) を MeOH (6.5 ml) に溶解し、アルカリ加水分解した。反応溶液は Amberlite IR-120 で中和した。収量 91 mg (93 %). *R*<sub>f</sub> 0.44.

##### Z-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

H-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (E) (200 mg, 0.47 mmol) の DMF 溶液に、Z-Aib-OH (121 mg, 1.1 当量), HOBt (69 mg, 1.1 当量) と DCC (105 mg, 1.1 当量) を順次加え 12 時間攪拌した。溶媒留去後、残渣を MeOH に溶かし、その溶液を強塩基性陽イオン交換樹脂 IRA-400 で処理した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O = 98 : 2) で精製した。収量 208 mg (69 %). mp 86 - 89 °C. *R*<sub>f</sub> 0.37. ESI-MSMS *m/z*: 649 (M +



H<sup>+</sup>), 532 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 447 (532 - Aib), 376 (447 - Ala). *Anal.* Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>·1/2H<sub>2</sub>O: C, 56.61; H, 7.51; N, 12.78. Found: C, 56.65; H, 7.54; N, 12.93.

#### H-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

上記のヘキサペプチド (441 mg, 0.68 mmol) を MeOH 中D法に従い接触還元し、目的物を得た。収量 307 mg (99 %). *Rf* 0.46.

#### Ac-Aib-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe [Position 1-9]

H-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (60 mg, 0.12 mmol)のDMF溶液に、Ac-Aib-Aib-Aib-OH (40 mg, 1.1 当量), HOBt (17 mg, 1.1 当量) と DCC (27 mg, 1.1 当量) を順次加え48時間攪拌した。溶媒留去後、残渣をMeOHに溶かし、その溶液をIRA-400で処理した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O=9:1)で精製した。収量 58 mg (61 %). mp 285 - 286 °C. *Rf* 0.42. ESI-MSMS *m/z*: 812 (M + H<sup>+</sup>), 695 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 610 (695 - Aib), 539 (610 - Ala), 454 (539 - Aib), 383 (454 - Ala). *Anal.* Calcd for C<sub>37</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>: C, 54.73; H, 8.07; N, 15.52. Found: C, 54.71; H, 8.11; N, 15.43.

#### Ac-Aib-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

上記のナノペプチド(30 mg, 33 μmol) を MeOH (0.46 ml) に溶解し、アルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。収量 28 mg (97 %). *Rf* 0.38.

#### Ac-Aib-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol ([+3]trichosporin-B-VIa)

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (33 mg, 23 μmol)のDMF溶液に、Ac-Aib-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (28 mg, 1.4 当量), HOBt (4.4 mg, 1.4 当量), DCC (6.7 mg, 1.4 当量)を順次加えた。48時間後溶液はB法に従い処理した。残渣(32 mg)はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (88:12, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 23 mg (45 %), mp 277 - 278 °C, *Rf* 0.69, amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 2.80 (3); Ala 1.74 (2); Val 0.93 (1); Ile 0.90 (1); Leu 0.94 (1); Pro 0.90 (1). ESI-MS: 741 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 1111 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>104</sub>H<sub>175</sub>N<sub>26</sub>O<sub>27</sub>: 2220.312. Found: 2220.317.

### 5. [+2]trichosporin-B-VIaの合成

#### Ac-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

H-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (E) (124 mg, 0.29 mmol)のDMF溶液に、Ac-Aib-Aib-Aib-OH (91 mg, 1 当量), HOBt (39 mg, 1 当量) と DCC (60 mg, 1 当量) を順次加え12時間攪拌した。溶媒留去後、残渣をEtOAcで洗浄し、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー

(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O=9:1)で精製した。収量 102 mg (48 %). mp 289 - 291 °C. *Rf* 0.42. ESI-MSMS *m/z*: 727 (M + H<sup>+</sup>), 610 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 525 (610 - Aib), 454 (525 - Ala), 369 (454 - Aib), 298 (369 - Ala). *Anal.* Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: C, 54.53; H, 8.04; N, 15.42. Found: C, 54.41; H, 7.81; N, 15.37.

#### Ac-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

上記のオクタペプチド(68 mg, 95 μmol) を MeOH - CHCl<sub>3</sub> (95:5), (0.4 ml) に溶解し、アルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。溶媒留去後得られた結晶はEtOAcで再結晶した。収量 45 mg (67 %). *Rf* 0.40.

#### Ac-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [[+2]trichosporin-B-VIa]

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (37 mg, 26 μmol)のDMF溶液に、Ac-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (28 mg, 1.5 当量), HOBt (5.2 mg, 1.5 当量), DCC (8.0 mg, 1.5 当量)を順次加えた。36時間後溶液はB法に従い処理した。残渣(32 mg)はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (88:12, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 21 mg (38 %), mp 267 - 269 °C, *Rf* 0.49, amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 3.11 (3); Ala 1.90 (2); Val 0.97 (1); Ile 0.98 (1); Leu 0.97 (1); Pro 1.08 (1). ESI-MS: 712 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 1068 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>100</sub>H<sub>168</sub>N<sub>25</sub>O<sub>26</sub>: 2135.259. Found: 2135.266.

### 6. [+1]trichosporin-B-VIaの合成

#### Ac-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

H-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (307 mg, 0.60 mmol)のDMF(5 ml)溶液に、Ac-Aib-OH (87 mg, 1 当量), HOBt (81 mg, 1 当量) と DCC (123 mg, 1 当量) を順次加え48時間攪拌した。溶媒留去後、残渣をIRA-400とIRA-120で処理した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O=9:1)で精製した。収量 224 mg (48 %). mp 276 - 278 °C. *Rf* 0.52. ESI-MSMS *m/z*: 642 (M + H<sup>+</sup>), 525 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 440 (525 - Aib), 369 (440 - Ala), 284 (369 - Aib), 213 (284 - Ala). *Anal.* Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>: C, 54.28; H, 8.01; N, 15.28. Found: C, 54.11; H, 7.90; N, 15.49.

#### Ac-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

上記のヘプタペプチド(60 mg, 93 μmol) を MeOH (1 ml) に溶解し、アルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。収量 57 mg (97 %). *Rf* 0.36.



#### Ac-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [[+1]trichosporin-B-VIa]

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (52 mg, 36  $\mu$  mol)のDMF溶液に、Ac-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (34 mg, 1.5 当量), HOBt (7.3 mg, 1.5 当量), DCC (11 mg, 1.5 当量)を順次加えた。48時間後溶液はB法に従い処理した。残渣(50 mg)はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (88:12, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 27 mg (37 %). mp 252 - 254 °C. R<sub>f</sub> 0.51. amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 2.89 (3); Ala 1.88 (2); Val 0.96 (1); Ile 0.96 (1); Leu 0.97 (1); Pro 0.95 (1). ESI-MS: 684 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 1025 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>96</sub>H<sub>161</sub>N<sub>24</sub>O<sub>25</sub>: 2050.206. Found: 2050.201.

#### 7. [-1]trichosporin-B-VIaの合成

##### Ac-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

H-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe (E) (100 mg, 0.23 mmol)に無水酢酸(0.5 ml)とピリジン(0.2ml)を加え、放置した。3時間後溶液に氷を加え、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O = 9:1)で精製した。収量 87 mg (79 %). mp 216 - 219 °C. R<sub>f</sub> 0.41. ESI-MSMS m/z: 472 (M+H<sup>+</sup>), 355 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 270 (355 - Aib), 199 (270 - Ala). Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: C, 53.49; H, 7.91; N, 14.85. Found: C, 53.41; H, 8.07; N, 14.66.

##### Ac-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

上記のペントペプチド(243 mg, 515  $\mu$  mol)をMeOH (3 ml)に溶解し、アルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。収量 230 mg (97 %). R<sub>f</sub>s 0.37.

##### Ac-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [[-1]trichosporin-B-VIa]

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (80 mg, 56  $\mu$  mol)のDMF溶液に、上記のAc-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (51 mg, 2 当量), HOBt (15 mg, 2 当量), DCC (23 mg, 2 当量)を順次加えた。64時間後溶液はB法に従い処理した。残渣(66 mg)はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (85:15, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 42 mg (39 %). mp 238 - 240 °C. R<sub>f</sub> 0.55. amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 3.10 (3); Ala 1.80 (2); Val 0.94 (1); Ile 0.92 (1); Leu 0.98 (1); Pro 1.30 (1). ESI-MS: 627 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 940 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>88</sub>H<sub>147</sub>N<sub>22</sub>O<sub>23</sub>: 1880.101. Found: 1880.095.

#### 8. [-2]trichosporin-B-VIaの合成

##### Ac-Aib-Ala-Aib-Aib-OMe

H-Ala-Aib-Aib-OMe (E) (400 mg, 1.46 mmol)のDMF(5 ml)溶液に、Ac-Aib-OH (21 mg, 1 当量), HOBt (217 mg, 1.1 当量)とDCC (331 mg, 1.1 当量)を順次加え24時間攪拌した。溶媒留去後、残渣をEtOAcで再結晶した。収量 512 mg (87 %). mp 185 - 187 °C. R<sub>f</sub> 0.61. ESI-MSMS m/z: 401 (M + H<sup>+</sup>), 284 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 199 (525 - Aib). Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: C, 53.99; H, 8.05; N, 13.99. Found: C, 53.94; H, 7.86; N, 13.90.

##### Ac-Aib-Ala-Aib-Aib-OH

上記のテトラペプチド(400 mg, 1.0 mmol)をMeOH (6 ml)に溶解し、アルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。収量 344 mg (93 %). R<sub>f</sub>s 0.36.

##### Ac-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol [[-2]trichosporin-B-VIa]

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (70 mg, 49  $\mu$  mol)のDMF(1 ml)溶液に、上記のAc-Aib-Ala-Aib-Aib-OH (39 mg, 2 当量), HOBt (13 mg, 2 当量), DCC (20 mg, 2 当量)を順次加えた。72時間後溶液はB法に従い処理した。残渣(55 mg)はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 31 mg (35 %). mp 224 - 226 °C. R<sub>f</sub> 0.43. amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 3.21 (3); Ala 0.98 (1); Val 0.94 (1); Ile 0.94 (1); Leu 0.98 (1); Pro 1.31 (1). ESI-MS: 603 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 905 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>85</sub>H<sub>142</sub>N<sub>21</sub>O<sub>22</sub>: 1809.064. Found: 1809.055.

#### 9. [-3]trichosporin-B-VIaの合成

##### Ac-Ala-Aib-Aib-OMe

H-Ala-Aib-Aib-OMe (E) (200 mg, 0.73 mmol)に無水酢酸(1.5 ml)とピリジン(1.5 ml)を加え、放置した。3時間後溶液に氷を加え、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O = 9:1)で精製した。収量 133 mg (58 %). mp 95 - 97 °C. R<sub>f</sub> 0.54. ESI-MSMS m/z: 316 (M + H<sup>+</sup>), 199 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H), 114 (199 - Aib). Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 53.32; H, 7.99; N, 13.32. Found: C, 52.93; H, 8.23; N, 13.21.

##### Ac-Ala-Aib-Aib-OH

上記のトリペプチド(100 mg, 0.32 mmol)をMeOH (1.9 ml)に溶解し、1N NaOH (0.63 ml, 2当量)を加え室温でアルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。収量 93 mg (97 %). R<sub>f</sub>s 0.29.



**Ac-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol****[−3]trichosporin-B-VIa]**

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (70 mg, 49  $\mu$  mol)のDMF(0.6 ml)溶液に、上記のAc-Ala-Aib-Aib-OH (25 mg, 2 当量), HOBt (13 mg, 2 当量), DCC (20 mg, 2 当量)を順次加えた。24時間後溶液はB法に従い処理した。残渣はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (82:18, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 46 mg (53%), mp 224 - 228 °C, R<sub>f</sub> 0.42, amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 3.20 (3); Ala 0.99 (1); Val 0.94 (1); Ile 0.94 (1); Leu 0.95 (1); Pro 1.20 (1). ESI-MS: 575 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 862 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>81</sub>H<sub>135</sub>N<sub>20</sub>O<sub>21</sub>: 1724.011. Found: 1724.014.

## 10. [−4]trichosporin-B-VIaの合成

**Ac-Aib-Aib-OMe**

H-Aib-Aib-OMe (B) (200 mg, 0.99 mmol)に無水酢酸(1 ml)とピリジン(1 ml)を加え、放置した。3時間後溶液に氷を加え、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O=9:1)で精製した。収量 188 mg (78%), mp 99 - 103 °C. R<sub>f</sub> 0.31. ESI-MSMS m/z: 245 (M + H<sup>+</sup>), 128 (M + H<sup>+</sup> - Aib-OMe - H). Anal. Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 54.08; H, 8.25; N, 11.47. Found: C, 54.05; H, 8.23; N, 13.53.

**Ac-Aib-Aib-OH**

上記のジペプチド(97 mg, 0.4 mmol)をMeOH (2.4 ml)に溶解し、1N NaOH (0.8 ml, 2当量)を加え室温でアルカリ加水分解した。反応溶液はAmberlite IR-120で中和した。収量 82 mg (89%). R<sub>f</sub> 0.32.

**Ac-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol****[−4]trichosporin-B-VIa]**

H-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol (H) (55 mg, 38  $\mu$  mol)のDMF(0.6 ml)溶液に、上記のAc-Aib-Aib-OH (18 mg, 2 当量), HOBt (10 mg, 2 当量), DCC (16 mg, 2 当量)を順次加えた。24時間後溶液はB法に従い処理した。残渣はHPLC [conditions: mobile phase, MeOH - H<sub>2</sub>O (80:20, v/v); flow rate, 7 ml/min detector, UV (220 nm); column, YMC S-5 120A ODS (20 mm i. d. x 250 mm); column temperature, 40°C]により精製した。収量 28 mg (45%), mp 213-218 °C. R<sub>f</sub> 0.42. amino acid ratios (6 N HCl, 24 h): observed (calcd); Gly 1.0 (1); Gln 2.9 (3); Val 0.93 (1); Ile 0.93 (1); Leu 0.95 (1); Pro 1.22 (1). ESI-MS: 552 ([M + 3H]<sup>3+</sup>), 827 ([M + 2H]<sup>2+</sup>). HR-FABMS, Calcd for C<sub>78</sub>H<sub>130</sub>N<sub>19</sub>O<sub>20</sub>: 1652.974. Found: 1652.976.

CD測定は23 °CでJASCO J-720 スペクトロメーターを用い、セルは光路長 1 mm のものを用いた。NMR測定に用いた試料はCD<sub>3</sub>OHに溶解した。内部標準としてTMSを用いた。すべての<sup>1</sup>H-NMRスペクトルはBruker AM-600 (600 MHz) スペクトロメーターを用いて測定した。測定にはBruker標準プログラムを用いた。DQF-COSYスペクトルは位相検波方式で測定し、常時、溶媒のOH共鳴は選択的に照射し飽和させた。マトリックスの大きさは512のn-値に対して2048のデータポイントをとった。そして各nに対して32回の積算を行った。NOESYスペクトルも位相検波方式で測定した。検出時間以外は溶媒のOH共鳴は選択的に照射し飽和させた。マトリックスは512のn-値に対して2048のデータポイントをとった。そして各nに対して64回の積算を行った。DQF-COSYとNOESYのデータマトリックスのnとn方向に対するwindow関数はスクエアサインベル関数を用いた。スペクトル幅6000 Hz、緩和時間は2.4 sに設定した。NOESY測定の混合時間は300 msに設定し10%のrandom variationをつけた。スペクトルは対称化していない。



巨視的な電流-電圧特性の測定

脂質溶液としてlecithin : cholesterol (4 : 1)の1% n-decane溶液を調整した。この脂質溶液を側面に1mmの小孔を持つ円筒形のテフロン製ポットに前塗りした。このポットをバスに入れ1M KCl電解液でバスとポット内部を満たした。小孔に脂質溶液を小筆で塗付し、脂質2分子膜を形成した。バスの電解質の方にペプチド試料のエタノール溶液を加えた。電極はAg/AgCl電極を用いた。電流-電圧特性は膜間に0.01 Hzの三角波の交流電圧をKIKUSUI MODEL 459 Function Generator を用いて加た。その時の膜電流を試料を加えた電解質側が正の電圧となるようにして記録した。記録はTEAC DR-F2a Digital Recorderを用いた。

シングルチャンネルレベルの実験

脂質溶液としてdiphytanoylphosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids)のhexane溶液(10 mg/ml)を用いた。厚さ25  $\mu$ mのテフロンシートに針で約100  $\mu$ mの小孔をあけ、その小孔に0.5% hexadecane in hexaneを前塗りした。このテフロンシートを2つのハーフセルはさみ、小孔でのみつながった2つのコンパートメントを作った。この2つのコンパートメントにシートの小孔よりも液面が下になるように1M KCl水溶液を少量加えた。それぞれの液面に脂質溶液を2  $\mu$ lずつを加え、液面に脂質の単分子膜を形成した。コンパートメントの液面より下からシリンジで1M KCl水溶液を加えることにより、液面を片方ずつ上げて、単分子膜を小孔上で張り合わせ、2分子膜を形成した<sup>75)</sup>。膜形成後、一方のコンパートメントにペプチドのエタノール溶液を加え、マグネティックスタラーで攪拌し均一となった後に、膜間に直流電圧を加え、そのときの膜電流を測定した。膜電流の記録は巨視的な電流-電圧特性の測定と同様の方法で行った。

## 第1節

牛副腎髓質細胞の調整

副腎周囲の脂肪を除いた後、灌流をするために、皮質部に剃刀で10数条の切れ目をいれた。静脈より、Ca<sup>2+</sup>を含まないRinger A<sup>a)</sup>で37°C、10 min 灌流した。灌流後、皮質部を取り除き、スライサーを用いて、できるだけ薄い髓質切片を作成した。切片は氷冷したRinger A に集めた。集めた切片はRinger A で3回洗った。断片をフラスコへ移し、Ca<sup>2+</sup>-free digestion-medium Ringer (Ringer B<sup>b)</sup>) 液15 mlを加え、酸素気流下 37°Cで15 min、振とうした(Predigestion)。振とう後、フラスコの内容物をナイロンストッキング2枚を重ねた細胞ろ過器で濾過した。ろ液は捨て、ストッキング上に残った未消化の断片を再び、フラスコに入れ、そこに新しいRinger Bを45 ml加えた。40 min 酸素気流下、振とうした(1st degestion)。振とう後、濾過し、濾液を遠心管に集めた。未消化の断片はフラスコに入れ、Ca<sup>2+</sup>を含むdigestion-medium Ringer (Ringer C<sup>c)</sup>) 液40 mlを加え、酸素気流下37°Cで40 min、振とうした(2nd degestion)。振とう後、濾過し、残渣をRinger A で洗った。1st degestionと2nd degestionで得られたろ液をあわせ、遠心管に集めた。集められた細胞浮遊液を冷却遠心器を用いて、100 rpm, 2°C で2min 遠心した。上澄みは捨て、沈渣の細胞にRinger Aを40 ml加えた。ピペッティングを繰り返し、細胞を浮遊させ、再び遠心した。この操作を2回繰り返した。最後にCa<sup>2+</sup>を含むRinger D<sup>d)</sup>に細胞を浮遊させ、遠心し細胞を集めた。

a) Ringer A: Ca<sup>2+</sup>(-) KRP (2.4 l); 154 mM NaCl (21.6 g), 5.6 mM KCl, 1.6 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose (4.32 g), 3 mM Na-P buffer (pH 7.4) (0.3 M, 24 ml).

b) Ringer B: Ringer A 170 ml にBSA 850 mg溶解し、その中の60 mlにコラゲナーゼ32 mg, トリプシンインヒビター 4 mg を溶解させる。

c) Ringer C: Ringer B に2.2 mMのCaCl<sub>2</sub>を加える。

d) Ringer D: Ringer A に2.2 mMのCaCl<sub>2</sub>を加える。

細胞培養

以下は無菌操作で行った。分離直後の細胞を10倍濃度の抗生物質を含む培養液<sup>e)</sup>を加え、ピペッティングを約20回行い、1200 rps で2 min 遠心した。上澄みを捨て、通常の培養液で同様の操作を3回繰り返した。沈渣に培養液を加え1~2×10<sup>6</sup> cell/mlになるように調整した(ストライザー板を用いて細胞数を数える)。細胞浮遊液を4 mlずつ直径5.5 cmのシャーレに入れ、細胞が均一に広がるように、dishを上下左右に動かした。この細胞を炭酸



ガスインキュベーターで4日間培養した。培養液は毎日交換した。

e) 培養液: イーグルMEM (日水) 9.4 gに蒸留水を加え、1 lにする。121°Cで15 min 高压滅菌する。室温に戻し、7% NaHCO<sub>3</sub>でpH 7.3にする。Gln 292 mg, ファンギソン (三共) 0.3  $\mu$ g/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml, ペニシリン 100 units/ml を加える。

### 反応と定量

培養細胞をKRH buffer<sup>f)</sup>で2回洗い、37°Cで10 min プレインキュベートした。培養細胞に反応液 (検体のメタノール溶液を加えたKRH buffer) を1 ml加え、37°Cで5~10 min インキュベートする。インキュベート後反応液のみをを試験管中の0.5N過塩素酸水溶液にあける。この溶液を3000rpmで遠心し変性したタンパク質を除いた。上澄みを12.5% Al<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2M Tris-HCl Buffer (pH 7.8) 1 ml の溶液にあけ、激しく攪拌した。氷冷下、5N NaOH 600  $\mu$ lを加え直ちに激しく攪拌した。3000 rpmで10 min遠心した。上澄みを捨て、沈渣を1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 ml に溶解した。この溶液に4M 酢酸ナトリウムを加え攪拌後、3000 rpmで10 min遠心した。この上澄み1 ml に蒸留水0.5 ml を混合後、エチレンジアミン0.25 mlを加え、50°Cで60 min インキュベートする。この溶液の蛍光光度を励起波長420 nmで測定する蛍光波長はアドレナリンとノルアドレナリンの蛍光強度が一致する波長を選ぶ。蛍光光度の測定にはHITACHI 650-10s蛍光光度計を用いた。活性は10% 細胞内総カテコールアミンの蛍光強度との比較により行った。活性の基準となる10% 細胞内総カテコールアミン量は以下のように測定した: 培養細胞の入ったdishの一つに0.4N 過塩素酸1 mlを加えた。細胞をゴムベラでつぶし、その溶液から100  $\mu$ lを0.5N過塩素酸水溶液に加えた。この溶液を検体溶液と同様に処理した。

f) KRH buffer: 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPESに30 min O<sub>2</sub> を吹き込んだものに10 mM Glucose (4.32 g), 3 mM Na-P buffer (pH 7.4) (0.3 M, 24 ml).を加えたもの。

### 第2節

#### ラット肝ミトコンドリアの調整

ラット肝ミトコンドリアはD.K.Mayerらの方法で単離した<sup>82)</sup>。ミトコンドリア中のタンパクはビュレット法を用いて定量した。

#### 脱共役活性の測定

脱共役活性の測定には、Clark酸素電極を用いた。ラット肝ミトコンドリアは25°C, pH 7.4

の200 mM sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM リン酸カリウムを含む水溶液に懸濁させた。呼吸基質であるロテノン(3  $\mu$ g)と10 mM コハク酸を含む溶液に、ミトコンドリアの懸濁液(0.7 mg protein/ml)と試料のEtOH溶液を順次添加し測定した。反応溶液の総量は2.53 ml、酸素消費量はatoms oxygen/min/mg mitochondrial protein で示した。リン酸の影響を調べる試験においては、リン酸緩衝液の代わりにTris-Cl bufferを用いた。



本研究の内容は以下の論文に発表した。

Fungal Metabolites. XVII. Synthesis and NMR Study of Ion Channel-Forming Peptides, Trichosporin B-VIa and Its Derivative

*Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **42**, 1258-1263 (1994).

Fungal Metabolites. Part XX. Effect of Proline Residue on the Structure of Ion-Channel-Forming Peptide, Trichosporin B-VIa

*Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **43**, 1119-1124 (1995)

Roles of Proline Residue in Peptaibol, Trichosporin B-VIa, for Its Channel-Forming-Property and Catecholamine-Releasing-Activity

*Biochimica et Biophysica Acta*, in press.

Effect of Lipophilicity of Trichosporin-Bs on Ion-Channel Formation and Catecholamine-Releasing Activity

*Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **18**, 640-642 (1995).

Ion-Channel-Forming and Catecholamine-Releasing Activities of Elongated and Truncated Analogues of Trichosporin-B

*Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, 2203-2204 (1995).

Fungal Metabolites. X. The Effect of Peptide Antibiotics, Trichosporin-Bs, on the Respiratory Activity of Mitochondria

*Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **17**, 482-485 (1994).

- 1) a) Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai, T., Kayano T., Ikeda T., Takahasli H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino J.N., Kangawa K., Matsuo H., Rsferty M.A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S., *Nature*, **312**, 121-127 (1984).  
b) Noda M., Ikeda T., Kayano T., Suzuki H., Takeshima H., Kurasaki M., Takahashi H., Numa S., *Nature*, **320**, 188-192 (1986).  
c) Kayano, T., Noda M., Flockerzi V., Takahashi H., Numa S., *FEBS Lett.*, **228**, 187-194 (1988).  
d) Trimmer J.S., Cooperman S.S., Tomiko S.S., Zhou J., Crean S.M., Boyle M.B., Kallen R.G., Sheng Z., Barchi R.L., Sigworth F.J., Goodman R.H., Agnew W.S., Mandel G., *Neuron*, **3**, 33-49 (1989).
- 2) a) Tempel B.L., Papazian D.M., Schwarz T.L., Jan Y.N., Jan L.Y., *Science*, **237**, 770-775 (1987).  
b) Tempel B.L., Jan Y.N., Jan L.Y., *Nature*, **332**, 837-839 (1988)
- 3) a) Mori Y., Friedrich T., Kim M.-S., Mikami A., Nakai J., Ruth P., Bosse E., Hofmann F., Flockerzi V., Furuichi T., Mikoshiba K., Imoto K., Tanabe T., Numa S., *Nature*, **350**, 398-402 (1991).
- 4) a) Melittin: Habermann E., *Science*, **177**, 314-322 (1972); Tosteson M.T., Tosteson D.C., *Biophys. J.*, **36**, 109-116 (1981).  
b) Bombolitin: Argiolas A., Pisano J.J., *J. Biol. Chem.*, **260**, 1437-1444 (1985).  
c) Mastoparan: Hirai Y., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1942-1944 (1979).  
d) Magainin: Zasloff M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 5449-5453 (1987).  
e) Pardaxin: Primor N., Zlotkin E., *Toxicon*, **19**, 573-578 (1975); Lazarovici P., Primor N., Loew L.M., *J. Biol. Chem.*, **261**, 16704-16713 (1986).  
f) Cecropin: Boman H.G., Faye I., Hofsten V.P., Kockum K., Lee J.Y., Xanthopoulos K.G., *Dev. Comp. Immunol.*, **9**, 551-558 (1985); Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 5072-5076 (1988).  
g) Gramicidin: Sarges R., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2011-2020 (1965).  
h) d-Toxin (haemolysin): Fitton J.E., Dell A., Shaw W.V., *FEBS Lett.*, **115**, 209-215 (1980).
- 5) Brückner H., Przybylski M., *J. Chromatogr.*, **296**, 263 - 275 (1984).
- 6) a) Fujita T., Iida A., Uesato S., Takaishi Y., Shingu T., Saito M., Morita M., *J. Antibiot.*, **41**, 814-818 (1988).  
b) Iida A., Okuda M., Uesato S., Takaishi Y., Shingu T., Morita M., Fujita T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, 3249-3255.  
c) Iida J., Iida A., Takahashi Y., Takaishi Y., Nagaoka Y., Fujita T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 357-365.
- 7) *Eur. J. Biochem.*, **138**, 5 (1984); *ibid*, **138**, 9 (1984).
- 8) a) Fujita T., Takaishi Y., Shiromoto T., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1979**, 413-414.  
b) Fujita T., Takaishi Y., Moritoki H., Ogawa T., Tokimoto K., *Chem Pharm. Bull.*, **32**, 1822-1828 (1984).  
c) Matsuura K., Yesilada A., Iida A., Takaishi Y., Kanai M., Fujita T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 381-387.  
d) Matsuura K., Shima O., Takeda Y., Takaishi Y., Nagaoka Y., Fujita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42** (5), 1063-1069 (1994).  
e) Matsuura K., Yesilada A., Iida A., Nagaoka Y., Takaishi Y., Fujita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **41** (11), 1063-1069 (1994).
- 9) a) Meyer C.E., Reusser F., *Experientia*, **23**, 85-86 (1967).  
b) Pandey R.C., Cook J.C., Jr., Reinhart K. L., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8469-8483



- (1977).
- 10) a) Jung G., König W.A., Leibfritz D., Ooka T., Janko K., Boheim G., *Biochim. Biophys. Acta.*, **433**, 164-181 (1976).  
b) Katz E., Aydin M., Lucht N., König W.A., Ooka T., Jung G., *Liebigs Ann. Chem.*, 1041-1062 (1985).
  - 11) Rebuffat S., Conraux L., Massias M., Aubin-Guette C., Bodo B., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **41**, 74-84 (1993).
  - 12) Brükner H., Reinecke C., Kripp T., Kieb M., *Proceedings of the Fourth International Mycological Congress*, 224 (1990).
  - 13) Brükner H., Przybylski M., *Chromatographia*, **19**, 188-199 (1984).
  - 14) Wada S., Nishimura T., Iida A., Toyama N., Fujita T., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3095-3098 (1994).
  - 15) Huang Q., Tezuka Y., Kikuchi T., Nishi A., Tubaki K., Tanaka K., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 223-229 (1995).
  - 16) a) Bodo B., Rebuffat S., Hajji M.E., Davoust D., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6011 - 6017 (1985).  
b) El Hajji M., Rebuffat S., Lecommandeur D., Bodo B., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **29**, 207-215 (1987).  
c) Rebuffat S., Hajji M. E., Hennig P., Davoust D., Bodo B., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **34**, 200-210 (1989).
  - 17) Rebuffat S., Prigent Y., Auvin-Guette C., Bodo B., *Eur. J. Biochem.*, **201**, 661-674 (1991).
  - 18) Auvin-Guette C., Rebuffat S., Vuidepot I., Massias M., Bodo B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 249-255 (1993).
  - 19) a) Grigoriev P., Schlegel R., Dornberger K., Gräfe U., *Biochim. Biophys. Acta*, **1237**, 1-5 (1995).  
b) Dornberger K., Ihn W., Ritzau M., Gräfe U., Schlegel B., Fleck W.F., *J. Antibiot.*, **48**, 977-989 (1995).
  - 20) a) Brükner H., König W.A., Greiner M., Jung G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **18**, 476-477 (1979).  
b) Irmscher G., Bovermann G., Boheim G., Jung G., *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 470-484 (1978).
  - 21) Iida A., Sanekata M., Fujita T., Tanaka H., Enoki A., Fuse G., Kanai M., Rudewicz P.J., Tachikawa E., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1070-1075 (1994).
  - 22) Reinhart K.L., Jr., Gaudioso L.A., Moore M.L., Pandey R.C., Cook J.C., Jr., Barber M., Sedgwick R.D., Bordoli R.S., Tyler A.N., Green B.N., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6517-6520 (1981).
  - 23) a) Pandey R.C., Meng H., Cook J.C., Jr., Reinhart K.L., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5203-5205 (1977).  
b) Pandey R.C., Cook J.C., Jr., Reinhart K.L., Jr., *J. Antibiot.*, **31**, 241-243 (1978).
  - 24) a) Pandey R.C., Cook J.C., Jr., Reinhart K.L., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5205-5206 (1977).  
b) Reinhart K.L., Jr., Gaudioso L.A., Moore M.L., Pandey R.C., Cook J.C., Jr., Barber M., Sedgwick R.D., Bordoli R.S., Tyler A.N., Green B.N., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6517-6520 (1981).
  - 25) Rebuffat S., Goulard C., Bodo B., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1995**, 1849-1855.
  - 26) Iida A., Sanekata M., Wada S., Fujita T., Tanaka H., Enoki A., Fuse G., Kanai M., Asami K., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 392-397 (1995).
  - 27) Wada S., Iida A., Akimoto N., Kanai M., Toyama N., Fujita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 910-915 (1995).
  - 28) Auvin-Guette C., Rebuffat S., Prigent Y., Bodo B., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2170 (1992).

- 29) a) Fujita T., Takaishi Y., Okamura A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 585-587 (1981).  
b) 三原, 飯田, 秋元, 藤多, 高石, 井上, 久志, 第36回天然有機化合物討論会講演要旨集(広島), 713-720 (1994).
- 30) a) Isogai A., Suzuki A., Higashikawa S., Komiyama S., Tamura S., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 3029-3031 and 3033-3035 (1980).  
b) Sato M., Beppu T., Arima K., *ibid.*, **44**, 3037-3040 (1980).  
c) Mori Y., Tsuda M., Suzuki M., Fukushima K., Arai T., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1982**, 94-98.
- 31) Gupta S., Krasnoff S.B., Roberts D.W., Renwick J.A.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 707-709 (1991).
- 32) Kumazawa S., Kanda M., Aoyama H., Utagawa M., Kondo J., Sakamoto S., Ohtani H., Miyakawa T., Chiga I., Hayase T., Hino T., Takao T., Shimonishi Y., *J. Antibiot.*, **47**, 1136-1144 (1994).
- 33) 生稻, 嶋崎, 矢野, 好田, 斎藤, 第36回天然有機化合物討論会講演要旨集(広島), 792-798 (1994).
- 34) Burgess A.W., Leach S.J., *Biopolymers*, **12**, 2599-2605 (1973).
- 35) a) Karle I.L., Balaram P., *Biochemistry*, **29**, 6747-6756 (1990).  
b) Toniolo C., Benedotti E., *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 350 - 353 (1991).
- 36) Fox R.O., Jr., Richards F.M., *Nature (London)*, **300**, 325-330 (1982).
- 37) Esposito G., Carver J.A., Boyd J., Campbell I.D., *Biochemistry*, **26**: 1043-1050 (1987).
- 38) Iida A., Uesato S., Shingu T., Nagaoka Y., Kuroda Y., Fujita T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1993**, 375-379.
- 39) Rebuffat S., Conraux L., Massias M., Aubin-Guette C., Bodo B., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **41**, 74-84 (1993).
- 40) LeBars M., Bachet B., Mornon J.P., *Z Kristallogr* 185:588 (1988) (abstract)(1988).
- 41) Karle I.L., Flippen-Andersen J., Sukumar M., Balaram P., *Proc Natl Acad Sci, USA* **84**, 5087-5091 (1987).
- 42) Schwarz G., Savko P., Jung G., *Biochim. Biophys. Acta.*, **728**, 419 -428 (1983).
- 43) Franklin J.C., Ellena J.F., Jayasinghe S., Kelsh L.P., Cafiso D.S., *Biochemistry*, **33**, 4036-4045 (1994).
- 44) Mueller R.U., Rudin D.O., *Nature (London)*, **217**, 713-719 (1968).
- 45) a) Latorre R., Alvarez O., *Physiol. Rev.*, **61**, 77-150 (1981).  
b) Sansom M.S.P., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **55**, 139-236 (1991).
- 46) Boheim G., Hanke W., Jung G., *Biophys. Struct. Mech.*, **9**, 181-191 (1983).
- 47) Sansom M.S.P., *Eur. Biophys. J.*, **22**, 105-124 (1993).
- 48) Fraternali F., *Biopolymers*, **30**, 1083-1099 (1990).
- 49) Schollkopf U., *Top. Curr. Chem.*, **109**, 65 (1983).
- 50) Williams K.A., Deber C. M., *Biochemistry*, **30**, 8919-8923, (1991).
- 51) Molle G., Duclohier H., Dugast J.Y., Spach G., *Biopolymers*, **28**, 273-283 (1989).
- 52) Hall J.E., Vodyanoy I., Balasubramanian T.M., Marshall G.R., *Biophys. J.*, **45**, 233 -247 (1984).
- 53) Molle G., Dugast J.Y., Duclohier H., Spach G., *Biochim. Biophys. Acta.*, **938**, 310-314 (1988).
- 54) Molle G., Duclohier H., Dugast J.Y., Spach G., *Biopolymers*, **28**, 273-283 (1989).
- 55) Molle G., Duclohier H., Julien S., Spach G. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1064**, 365-369 (1991).
- 56) Duclohier H., Molle G., Dugast J.Y., Spach G., *Biophys. J.*, **63**, 868-873 (1992).
- 57) Irmscher G., Jung G., *Eur. J. Biochem.*, **80**, 165-174 (1977).
- 58) a) Johns L., Maddock S.W., Besch H.R., Jr., *J. Biol. Chem.*, **255**, 9971-9980 (1980).  
b) Ritov V.B., Murzakhmetova M.K., Trerdislova I.L., Menshikova E.V., Butylin A.A., Arakian T.Y., Yakovenko L.V., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1148**, 257-262 (1993).



- b) Sethi R., Dhalla K. S., Shah K. R., Dhalla N. S., *Mol. Cell. Biochem.*, **119** 185-193 (1993).
- 59) a) Takaishi Y., Terada H., Fujita T., *Experientia*, **36**, 550-552 (1980).  
 b) Mathew M.K., Nagaraj R., Balaram P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 548 (1981)  
 c) Das M. K., Raghothama S., Balaram P., *Biochemistry*, **25**, 7110 (1986).
- 60) a) Artalejo A.R., Montiel C., Sanchez-Garcia P., Uceda G., Guantes J.M., Garcia A.G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 1204-1210 (1990).  
 b) Fonteriz R.I., Lopez M.G., Garcia-Sancho J., Garcia A.G., *FEBS Lett.*, **283**, 89-92 (1991).
- 61) Tachikawa E., Takahashi S., Furumachi K., Kashimoto T., Iida A., Nagaoka Y., Fujita T., Takaishi Y., *Mol. Pharmacol.*, **40**, 790-797 (1991).
- 62) Huang Q., Tezuka Y., Kikuchi T., Momose Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **271**, R5-R6 (1994)
- 63) Schirmbock M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., Arisanatac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P., *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4364-4370, (1994).
- 64) Tachikawa E., Kashimoto T., Iida A., Nagaoka Y., Fujita T., Takaishi Y., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, s-10 (1992).
- 65) A. Iida, S. Yoshimatsu, M. Sanekata, T. Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2997-3003 (1990).
- 66) König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **103**, 2024 (1970).
- 67) Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1839 (1964).
- 68) Doty, P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**, 1175 (1966).
- 69) Marion D., Wüthrich K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967 (1983).
- 70) Kumar A., Wagner G., Ernst R., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3654 (1981).
- 71) Wagner G., Wüthrich K., *J. Mol. Biol.*, **155**, 347 (1982).
- 72) Pardi A., Billeter M., Wüthrich K., *J. Mol. Biol.*, **180**, 741-751 (1984).
- 73) Wüthrich K., Billeter M., Braun W., *J. Mol. Biol.*, **180**, 715 - 740 (1984).
- 74) Englander S.W., Kallenbach N., *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521 - 655 (1984).
- 75) Montal M., Mueller P., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **69**, 3561 - 3566 (1972).
- 76) Roy G., *J. Membrane Biol.*, **24**, 71-85 (1975).
- 77) Hall J.E., Vodyanoy I., Balasubramanian T.M., Marshall G.R., *Biophys. J.*, **45**, 233-247 (1984)
- 78) Baumann G., Mueller P., *J. Supramolec. Struct.*, **2**, 538-557 (1974).
- 79) Boheim G., *J. Membrane Biol.*, **19**, 277-303 (1974).
- 80) Sansom M.S.P., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **55**, 139-235 (1991).
- 81) Terada H., *Quant. Struct.-Act. Relant.*, **5**, 81 - 88 (1986).
- 82) Myers D.K., Slater E.C., *Biochem. J.*, **67**, 558 (1957).