

生体分子化学研究室

教授：村田道雄， 准教授：大石 徹， 助教：松森信明

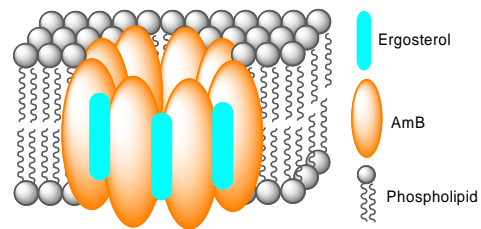
URL:<http://www.ch.wani.osaka-u.ac.jp/lab/murata/>

E-mail: murata@ch.wani.osaka-u.ac.jp



膜系での分子複合体の構造

アンフォテリシンB (AmB) は、放線菌が生産する抗真菌剤であり、現在でも重篤な真菌感染症の治療に広く用いられている。AmBは、脂質膜中でイオンチャネル複合体を形成することによって活性を発現し、真菌に特異的なエルゴステロールが選択毒性において重要な役割を果たしていると考えられている。私たちは、固体NMRを用いてイオンチャネル複合体の構造を解明することを目的として研究を行っており、同位体等で標識したAmB、すなわち ^{13}C -、 ^{19}F -、および ^2H -で標識したAmBを合成あるいは化学合成により調製した。標識したAmBをPOPCと混合し固体NMRの測定を行った。 ^{19}F -および ^{13}C -で標識したAmBを用いた $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDORスペクトル測定の結果から、ステロールを含まない膜に比べ、エルゴステロールを含む膜において原子間の相互作用が大幅に弱くなっている事が明らかになった。この結果は、エルゴステロールがAmBによって形成される複合体の運動性を上げているか、あるいは、AmBの会合体において分子間距離が増大していることを示唆している。 ^2H -で標識したAmBを用いた重水素固体NMRの測定の結果から、エルゴステロールはAmBの運動性を顕著に増大させるが、ステロールを含まない膜では殆ど運動性が制限されていることが示された。これらの観測結果は、ステロールを含まない膜ではAmBは会合して相分離を起こしており、エルゴステロールを含むPC膜中では、イオン透過性チャネルに対応する小さな会合体を形成していることを示唆している。



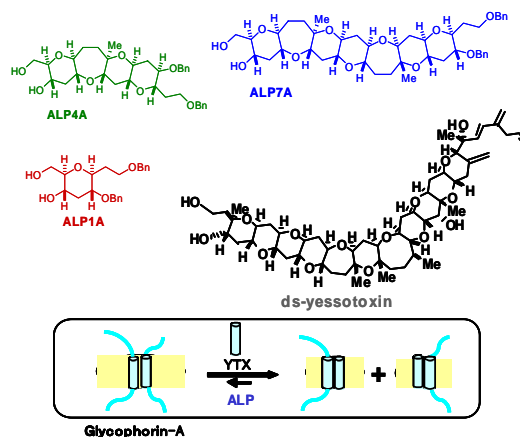
Ion Channel Model Formed by AmB and Lipids

スフィンゴミエリンとコレステロールは、生体膜においてマイクロドメイン (脂質ラフト) を形成することが知られており、シグナル伝達など多くの生物機能において重要な役割を果たしている。しかしながら、脂質ラフトにおける詳細な分子認識は明らかになっていない。私たちは、 ^{13}C -および ^{19}F -で標識したスフィンゴミエリンおよび ^{19}F -で標識したコレステロールを合成し、脂質ラフトにおける分子間距離を ^{13}C - ^{19}F REDOR法により測定した。さらに、 ^2H -で標識したスフィンゴミエリンも合成し、脂質ラフトを形成した際の運動性や配向を決定するために重水素固体NMRの測定を行った。

梯子状ポリエーテル毒と膜ペプチドの相互作用

梯子状ポリエーテル(LSP)は、単細胞藻類が生産する特異な代謝産物であり、非常に強力な毒であるブレベトキシンやシガトキシンと同様に膜貫通蛋白質に結合すると考えられている。LSPは、膜貫通蛋白質に遍在するモチーフと相互作用すると考えられている。私たちは、LSPと膜貫通蛋白質モチーフとの相互作用を表面プラズモン共鳴(SPR)や、ゲル電気泳動(SDS-PAGE)や、NMRを用いて評価した。魚介類による食中毒に関連した毒としてよく知られている化合物としてイェットキシン(YTX)やその脱硫酸体(dsYTX)を用いたところ、 α -ヘリックスを有する膜蛋白質と親和性 (解離定数: 約10-100 μM) を有することが、SPR実験から明らかになった。一方、水溶性や β -シート構造を形成する蛋白質との相互作用は非常に弱かった。これらの結果から、LSPは膜蛋白質、特に膜貫通 α -ヘリックスを認識することが示唆された。

LSP と膜貫通蛋白質との相互作用を解明する一連の研究過程において、6/7/6/6 四環性(ALP4A, Figure)、 6/7/6/6/7/6/6 七環性(ALP7A)、および 6/7/6/6/7/6/6/7/6/6 十環性人工梯子状ポリエーテル(ALP)を α -シアノエーテルを経由する収束的合成法によって合成した。単純な繰返し構造を有し、かつ環の数が異なるこれらの ALP は、天然の LSP が毒性を発現する際に重要であるとされている分子長に関する構造活性相関(SAR) 研究を行う上で有用である。膜貫通蛋白質との相互作用を評価する予備的な SAR 実験により、これらの ALP は、多量体あるいは二量体を形成しているグリコフォリン A(GpA) を単量体に脱会合させることが明らかになった(図)。七環性 ALP(ALP7A)は、最も強い脱会合活性を示し、一方、十環性 ALP(ALP10A)は、GpA を濃度依存的に沈殿させるという興味深い現象を引き起こすことが明らかになった。これら ALP による活性の違いは、「ハイドロフォobicマッチング(疎水性部分の適合)」という概念と関連づけられる。すなわち、ALP7A において側鎖を含む疎水性部分の長さが約 2.5 nm であり、それは膜貫通蛋白の α -ヘリックス部分の長さ、および脂質二分子膜の疎水性部分に匹敵している。これらの知見は、LSP の強力な生物活性における分子認識機構を理解する上で重要な手掛りになると期待される。



発表論文 (2006~2007 年の主な論文)

Polycyclic Ethers Interacting with Integral α -Helix

- (1) Amphotericin B Covalent Dimers with Carbonyl-Amino Linkage: a New Probe for Investigating Ion Channel Assemblies, Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, and Michio Murata, *Tetrahedron Lett.*, **48**(19), 3393-3396 (2007).
- (2) Conformation and Position of Membrane-Bound Amphotericin B Deduced from NMR in SDS Micelles, Nobuaki Matsumori, Toshihiro Houdai, and Michio Murata, *J. Org. Chem.*, **72**(3), 700-706 (2007).
- (3) Design and Synthesis of an Artificial Ladder-Shaped Polyether that Interacts with Glycophorin A, Kohei Torikai, Hiroshi Yari, Megumi Mori, Satoru Ujihara, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, and Tohru Oishi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(24), 6355-6359 (2006).
- (4) Membrane Interaction of Amphotericin B as Single-Length Assembly Examined by Solid State NMR for Uniformly ^{13}C -enriched Agent. Shigeru Matsuoka, Hiroki Ikeuchi, Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori, and Michio Murata, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(19), 6608-6614 (2006).
- (5) Structures of New Amphidinols with Truncated Polyhydroxyl Chain and their Membrane-Permeabilizing Activities, Nagy Morsy, Toshihiro Houdai, Shigeru Matsuoka, Nobuaki Matsumori, Seiji Adachi, Tohru Oishi, Michio Murata, Takashi Iwashita, and Tsuyoshi Fujita, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(19), 6548-6554 (2006).
- (6) Large Molecular Assembly of Amphotericin B Formed in Ergosterol-Containing Membrane Evidenced by Solid-State NMR of Intramolecular Bridged Derivative. Nobuaki Matsumori, Yuri Sawada, and Michio Murata, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(36), 11977-11984 (2006).
- (7) Synthesis of 28- ^{19}F -Amphotericin B Methyl Ester, Hiroshi Tsuchikawa, Naohiro Matsushita, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, and Tohru Oishi, *Tetrahedron Lett.*, **47**(35), 6187-6191 (2006).
- (8) Detailed Description of the Conformation and Location of Membrane-Bound Erythromycin A Using Isotropic Bicelles. Nobuaki Matsumori, Atsushi Morooka, and Michio Murata, *J. Med. Chem.*, **49**(12), 3501-3508 (2006).
- (9) Synthesis of the ABC and IJ Ring Fragments of Yessotoxin. Tohru Oishi, Miho Suzuki, Koji Watanabe, and Michio Murata, *Tetrahedron Lett.*, **47**(24), 3975-3978 (2006).

その他の論文: <http://www.ch.wani.osaka-u.ac.jp/lab/murata/>