OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	表面プラズモン共鳴法を用いた膜作動性生理活性物質と生体分子の相互作用解析
Author(s)	毛利, 良太
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23461
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	毛　利　良　太（もう　り　りょう　た）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　２２６８１　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	**表面プラズモン共鳴法を用いた膜作動性生理活性物質と生体分子の相互作用解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　村田　道雄 （副査） 教　授　小川　琢治　　教　授　中谷　和彦　　教　授　相本　三郎

論文内容の要旨

アンフォテリシンB（AmB）は，放線菌 *Streptomyces nodosus* の生産する抗真菌性抗生物質であり，生体膜中でイオン透過性チャネルを形成することによって，薬理活性を発現すると考えられている。AmB の選択毒性は，ヒト細胞膜中のコレステロールよりも真菌細胞膜中のエルゴステロールに対して高い親和性を有することに起因するが，その詳細は解明されていない。その作用機構を明らかにするために，多様な脂質二重膜との相互作用を簡便に解析する分析法が必要である。そこで本研究では，表面プラズモン共鳴（SPR）装置を用いた AmB と脂質二重膜との親和性評価系の構築を試みた。まず，市販の SPR センサーチップにドデシル基を導入し，これに脂質二重膜懸濁液（POPC リポソーム）を加えたところ，再現性良く脂質二重膜が捕捉されることがわかった。この基板上に異なる濃度の AmB 溶液を加えた結果，AmB 濃度に依存して SPR シグナルの上昇が見られ，AmB が POPC 脂質二重膜やコレステロール含有 POPC 脂質二重膜よりもエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して，高い親和性を示すことが確認された。さらに，結合過程と解離過程における反応速度論的解析により，AmB がエルゴステロール含有 POPC リポソームに対して，膜表面への吸着，続いて膜内部への分配という 2 つの段階を経て複合体を形成するという反応モデルが示唆された。

梯子状ポリエーテル構造を有する天然物は，渦鞭毛藻の二次代謝産物であり，特異な構造と強力な生理活性を持つ。これらは食物連鎖を経て魚貝類等に蓄積し，人に食中毒や神経障害などをもたらす。このうち，イエッソトキシン（YTX）は，神経毒性やアポトーシス誘導活性のほか，ホスホジエステラーゼ（PDE）の活性化を引き起こすことが知られている。そこで本研究では，梯子状ポリエーテル天然物 YTX およびその脱硫酸体 dsYTX，また当研究室で合成された梯子状ポリエーテルモデル化合物（ALP）を用いて，種々タンパク質との相互作用解析を行い，作用標的分子との相互作用に必要な梯子状ポリエーテル化合物（LSP）の構造的特徴を調べることにした。

まず，SPR を用いた直接測定実験により，種々タンパク質との親和性評価を行ったところ，エーテル環の数（分子長）および側鎖置換基の疎水性とともに梯子状構造が，タンパク質との相互作用に重要であることを明らかにした。さらに信頼性の高い LSP の評価法を開発するために，固定化したビオチン化 dsYTX（図 1）に対する競争阻害測定実験を検討した。この方法を用いて，水溶性タンパク質である PDE に対する天然および合成梯子状ポリエーテル化合物の親和性を評価した。

すなわち，渦鞭毛藻の培養により得られた YTX を脱硫酸化した後，ビオチン誘導化し，ビオチン標識プローブの調製を行った。このビオチン化 dsYTX をストレプトアビジンを介して，SPR 基板上に固定化した。この SPR センサーチップに，予め濃度の異なる YTX と PDE4D をインキュベートした混合溶液を添加したところ， YTX の濃度に比例して，溶液中の PDE4D の結合量の減少が観測された（50%阻害定数 IC_{50}＝1.2 μM）。このことは，溶液中に添加した YTX が，固定化した dsYTX と PDE4D の結合を阻害していることを示している。さらに，ALP を含む種々の LSP について，同様に競争阻害測定法を用いた親和性評価を行ったところ，dsYTX および分子長が長い梯子状ポリエーテルにおいて，固定化した dsYTX への PDE の結合を強く阻害することが明らかとなった。

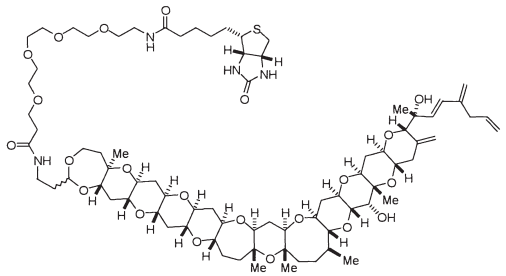

図 1 脱硫酸化イエッソトキシンのビオチン標識体（ビオチン化 dsYTX）

論文審査の結果の要旨

本研究では、表面プラズモン共鳴（SPR）装置を用いたAmBと脂質二重膜との親和性評価系の構築が検討されている。まず，市販のSPRセンサーチップにアルキル基を導入し，これに脂質二重膜懸濁液（POPCリポソーム）を加えることによって，再現性良く脂質二重膜が捕捉されることを明らかにした。この基板上に異なる濃度の抗生物質（アンフォテリシンB, AmB）溶液を加えた結果，抗生物質の濃度に依存してSPRシグナルの上昇が見られ，AmBが脂質二重膜やコレステロール含有脂質二重膜よりもエルゴステロール含有POPC脂質二重膜に対して，高い親和性を有することが確認された。さらに，結合過程と解離過程における反応速度論解析により，AmBがエルゴステロール含有POPCリポソームに対して，膜表面への吸着，続いて膜内部への分配という段階を経て，複合体を形成するという反応モデルを提出するに至った。

続いて、本SPR法を膜タンパク質に結合する生物毒に適用している。すなわち，渦鞭毛藻の二次代謝産物である梯子状ポリエーテル構造を有する天然物は、強力な生理活性を持つ。これらは食物連鎖を経て魚貝類等に蓄積し，人に食中毒や神経障害などをもたらすが、このうちイエッソトキシン（YTX）は，神経毒性、アポトーシス誘導活性、ホスホジエステラーゼ（PDE）の活性化を引き起こすことから注目を集めている。そこで本研究では，梯子状ポリエーテル天然物YTX，および合成梯子状ポリエーテル化合物に注目し，種々タンパク質との相互作用解析を行い，作用標的分子との相互作用に必要な梯子状ポリエーテル化合物（LSP）の構造要因を同定することを試みている。まず，表面プラズモン共鳴法を用いた直接測定実験により，種々の膜タンパク質との親和性評価を行っているが，エーテル環の数（分子長）および側鎖置換基の疎水性とともに梯子状構造が相互作用に重要であることを明らかにした。さらに、信

頼性の高いLSPの評価法を開発するために，固定化したビオチン化dsYTXに対する競争阻害測定実験を検討している。この方法では，水溶性タンパク質を用いる必要があるのでPDEを利用して、梯子状ポリエーテル化合物の親和性を評価している。具体的には、渦鞭毛藻の培養により得られたYTXをビオチン・ストレプトアビジン相互作用によって基板上に固定化し、予め濃度の異なるYTXとPDE4Dをインキュベートした混合溶液を添加した。その結果、添加したYTXの濃度に比例して，溶液中のPDE4Dの結合量の減少を観測している。このことは，溶液中のYTXが，固定化したdsYTXとPDE4Dの結合を阻害していることを示しており、SPR法の適用範囲を膜結合分子群に広げるための重要な手法を示したと考えられる。以上のように、本論文は新しい試みによって膜作動性化合物の分析に新展開をもたらしたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。