



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

学位論文

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

Surface Plasmon Resonance-Based Study on Interactions
between Biomembrane-Active Compounds and Biomolecules

平成 20 年度

大阪大学大学院理学研究科化学専攻

生体分子化学研究室

毛利 良太

学位論文

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

Surface Plasmon Resonance-Based Study on Interactions
between Biomembrane-Active Compounds and Biomolecules

平成 20 年度

大阪大学大学院理学研究科化学専攻

生体分子化学研究室

毛利 良太

目次

略語表

第1章 序 論

1-1 生体分子間相互作用	1
1-2 表面プラズモン共鳴	6
1-3 表面プラズモン共鳴を用いた生体分子間相互作用	18
1-4 研究目的	24
参考文献	25

第2章 アンフォテリシン B と脂質二重膜との親和性評価

2-1 序 論	27
2-2 表面プラズモン共鳴実験	33
2-3 速度論的解析	43
2-4 考 察	54
2-5 結 論	60
参考文献	61

第3章 梯子状ポリエーテルと膜タンパク質との相互作用解析

3-1 序 論	66
3-2 渦鞭毛藻の培養とイエッソトキシンの精製 および dsYTX の調製	75
3-3 梯子状ポリエーテルとタンパク質との 表面プラズモン共鳴測定	76
3-4 考 察	96
3-5 結 論	98
参考文献	99

第4章	固定化梯子状ポリエーテル化合物を用いた阻害測定法の開発と ホスホジエステラーゼに対する親和性評価	
4-1	序 論	106
4-2	直接測定法による梯子状ポリエーテル化合物と ホスホジエステラーゼとの相互作用解析	114
4-3	阻害測定法による梯子状ポリエーテル化合物と ホスホジエステラーゼとの相互作用解析	128
4-4	梯子状ポリエーテル化合物とホスホジエステラーゼとの 結合親和性の考察	144
4-5	梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ 活性化試験	146
4-6	結 論	152
	参考文献	153
第5章	結 論	155
第6章	実験項	
6-1	試薬, 使用機器等	157
6-2	試験用溶液の調製およびセンサーチップの作製	163
6-3	渦鞭毛藻の培養および YTX の精製, 誘導化	175
6-4	梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ 活性化試験	185
6-5	データ解析	186
	参考文献	192
	スペクトルデータ	194

発表論文および参考文献

謝 辞

略語表

ALP	artificial ladder shaped polyether
AmB	amphotericin B
AMP	adenosine monophosphate
Apaf1	apoptosis activating factor 1
APH	anterior pharynx defective
ATP	adenosine triphosphate
BCL2	B cell lymphoma 2
BH3	BCL2 Homology 3
Bn	benzyl
BSA	bovine serum albumin
BTX	brevetoxin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CBS	4-carboxybenzenesulfonamide
CD	circular dichroism
CHAPS	3-[(3-cholaminopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Chol	cholesterol
CSA	camphorsulfonic acid
CTX	ciguatoxin
DLPC	1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNSA	dansylamide
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DQF-COSY	double-quantum filtered correlation spectroscopy
DSC	differential scanning calorimetry
DSP	diarrheic shellfish poison
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
dsYTX	desulfo YTX

EC ₅₀	effect concentration 50
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
eggPC	egg phosphatidylcholine
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Erg	ergosterol
ESI	electrospray ionization
GpA	glycophorin A
GpATM	GpA transmembrane domain
GpATM 2G/2I	GpA transmembrane domain mutant 2G/2I
GST	glutathione S-transferase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperidinyl]ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	inhibition concentration 50
ITC	isothermal titration calorimetry
LOD	limited of detection
LOQ	limited of quantification
LUV	large unilamellar vesicles
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MBA	method of bioassay
MS	mass spectrometry
MLV	multi-lamellar vesicles
MTX	mitotoxin
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
NHS	N-hydroxysuccinimide
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PEG	polyethylene glycol
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
<i>p</i> -TsOH	para-toluen sulfonic acid
rt	room temperature
RU	response (resonance) unit

SA	streptavidine
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of mean
SFF	stopped flow fluorescence
S/N	signal-to-noise
SPR	surface plasmon resonance
SUV	small unilamellar vesicles
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TNT	trinitrotoluene
TPG	tripropylene glycol
TPG2Bn	tripropylene glycol dibenzyl ether
TTX	tetrodotoxin
UV	ultraviolet
VSSC	voltage sensitive sodium channel
YTX	yessotoxin

第1章 序 論

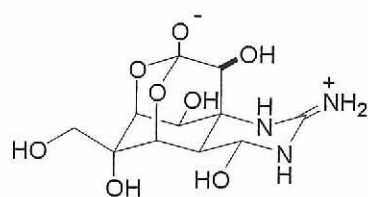
1-1 生体分子間相互作用

1-1-a 生理活性物質（毒物と薬物）^{1,2)}

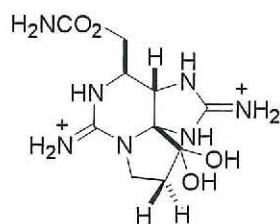
ヒトを含めた生物になんらかの作用を及ぼす化合物を「生理活性物質」という。天然には、動植物や微生物の生産する多くの「生理活性物質」が存在している。そして、これらの生理活性物質が、ヒトに都合の良いようにはたらく場合を「薬」、そして都合が悪いようにはたらく場合を「毒」といつている。動物に由来するものとして、有名なのはフグ毒である。これはフグの主として肝臓、卵巣に濃度が高く、その本体であるテトロドトキシン (tetrodotoxin, TTX, 図 1-1) は、神経や筋の電位依存性ナトリウムチャンネルをブロックして、神経の刺激伝達を妨害する。このため、嘔吐、頭痛、腹痛から四肢の麻痺、呼吸困難をきたして死に至る。このほかにも、南方海域で捕れる魚介類にみられるシガトキシン (ciguatoxin, 図 1-2) や、サキシトキシン (saxitoxin, 図 1-1) のような麻痺性貝毒、オカダ酸 (okadaic acid, 図 1-3) , ディノフィシストキシン (dinophysistoxin, 図 1-3) やペクチノトキシン (pectenotoxin, 図 1-3) などの下痢性貝毒が知られているが、これらは、渦鞭毛藻が生産する有毒物質を貝類が蓄積することによって毒化するとされている。また、ヘビ、サソリ、ハチなどの持つ毒も古くから知られている動物起源の毒である。このうち、メリチン (melittin, 図 1-4) はハチ (*Apis mellifera*) 毒の主要成分として単離された塩基数 26 の塩基性ペプチドである。

植物界では強力な薬理作用を持つアルカロイドや配糖体を含有する植物が数多く、その種類は動物由来のものよりはるかに多い。中でも主にアヘンに含まれるモルヒネ (morphine, 図 1-5) やトリカブトに含まれているアコニチン (aconitine, 図 1-5) などのアルカロイドは、鎮痛薬や強心剤など薬剤として使用される一方で、毒性が非常に高く、副作用としてしばしば中毒事故を引き起こす。また、テンゲダケ属の産生するキノコ毒も毒性が高いことが知られている。

食物に発生したカビの代謝産物が摂取されて、種々の中毒症を起こすことがあり、カビ毒 (マイコトキシン) とよばれている。その中でもアフラトキシン B1 (aflatoxin B1, 図 1-5) は最も急性毒性が強いのみならず、その慢性毒性として強い肝臓の発症性が認められている³⁾。

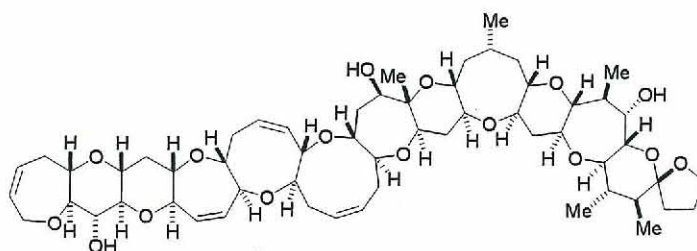


Tetrodotoxin

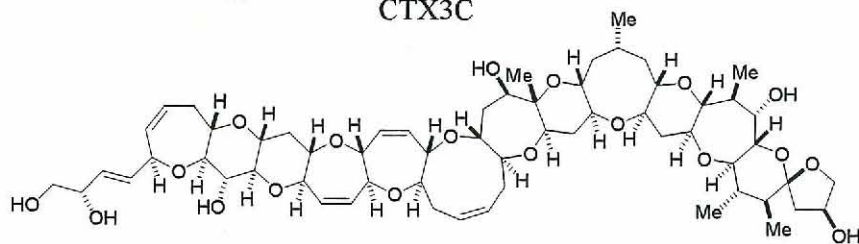


Saxitoxin

図 1-1 テトロドトキシシンおよびサキシトキシシンの化学構造

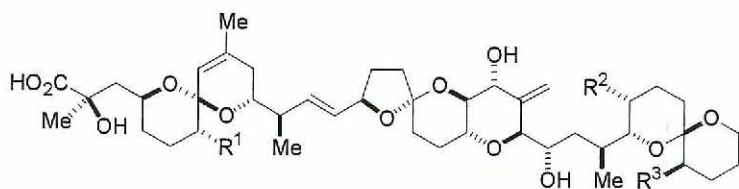


CTX3C

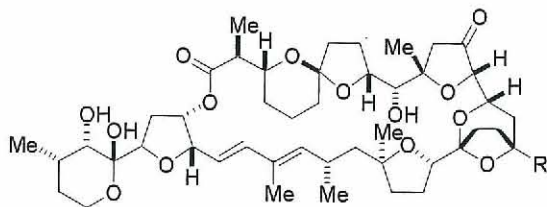


CTX1B

図 1-2 シガトキシシン類の化学構造

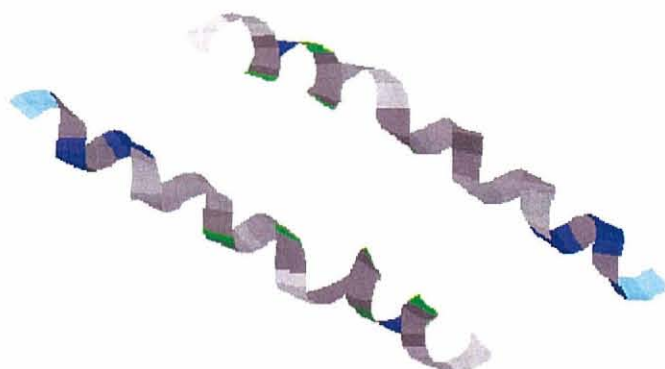


Okadaic acid: $R^1 = OH, R^2 = Me, R^3 = H$
 Dinophysistoxin 1: $R^1 = OH, R^2 = Me, R^3 = Me$
 Dinophysistoxin 2: $R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = Me$
 Dinophysistoxin 3: $R^1 = O\text{-acyl}, R^2 = Me, R^3 = Me$



Pectenotoxin 1: $R = CH_2OH$
 Pectenotoxin 2: $R = Me$
 Pectenotoxin 3: $R = CHO$

図 1-3 主な下痢性貝毒原因物質の化学構造



Melittin (MW 2846) : Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

図 1-4 メリチンのペプチド配列とそのリボン構造

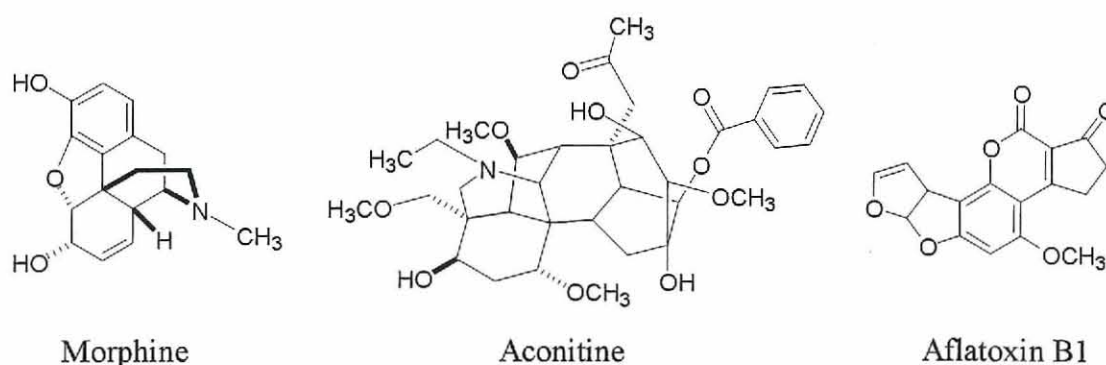


図 1-5 モルヒネ、アコニチンおよびアフラトキシン B1 の化学構造

1-1-b バイオセンサー

ヒトの生命現象を生物学および化学的に正しく理解することは、医薬品の開発や病気の治療には不可欠である。生命現象の正しい理解のためには、生命を構成する生体分子を様々な角度から解析する必要がある。近年、化学や生物学の分野で、バイオセンサーに注目が集まっている。生体分子間相互作用を検出するバイオセンサーとは、微生物、酵素、抗体、脂質膜、DNA、RNA 等の生物物質の分子認識能を利用、あるいは模倣した化学センサーのことである。バイオセンサーは、基質認識部（酵素、抗体、脂質膜、一本鎖 DNA など）と信号変換部（トランスデューサー）からなる。基質認識部は測定対象である基質を認識して何らかの変化、例えば、物質変化、発色や発光などの色変化、吸発熱、質量変化などを起こし、生じた変化を信号変換部（電極、受光素子、感熱素子、圧電素子など）によって電気信号に変換する。こうして得られた電気信号を処理することにより、基質の濃度や親和性などを知

ることが可能となる。

1-1-c バイオセンサーの分類と特徴⁴⁾

生物の示す様々な生体反応は、生体を構成する分子同士の特異的相互作用によって引き起こされ、制御されている。基質特異的な酵素反応、抗原抗体反応、レセプターとそのリガンドとの結合、あるいは転写因子と DNA 複合体の形成などの例に示されるとおり、すべての生体反応は生体分子の特異的結合、解離反応に集約されると言っても過言ではない。従って、生体反応を分子レベルで理解するためには、生体分子間の相互作用解析が不可欠である。こうした相互作用を測定する方法として、抗原抗体反応の場合にはラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素標識固相免疫測定 (ELISA) 法、レセプターとそのリガンドの結合にはフィルターバインディングアッセイ、転写因子と DNA の結合にはゲルシフトアッセイ等が従来用いられてきた。これらの方法はいずれも、一方の分子を放射性同位元素、あるいは蛍光色素などにより標識し、結合反応が平衡に達した状態での複合体の量を測定する手法であり、結合の時間変化を追跡するには適していない⁵⁾。

また、等温滴定カロリーメトリ法は検出のためのプローブ導入の必要がなく、分子間相互作用により発生する微小な熱量の変化から結合定数や結合の熱力学定数が得られる。しかし、結合の時間変化は追跡できないことが多い。最近、生体分子間相互作用の経時変化をプローブなしで検出する方法として、表面プラズモン共鳴 (SPR, surface plasmon resonance) 法⁶⁻¹²⁾や水晶発振子マイクロバランス (QCM, quartz crystal microbalance) 法¹³⁻¹⁴⁾が生化学ならびに分子生物学の分野で注目されている。両者とも表面における物質質量の変化を計測するものだが、その物質質量は SPR センサーの場合は屈折率 (誘電率) であり、QCM センサーの場合は質量 (共鳴振動数) である。生体分子間相互作用の検出に関して言えば、センサー表面への特異的な吸着などにより、表面における屈折率や質量など物質質量の変化が同時に起こる。SPR センサーは屈折率だけの変化を検出し、QCM センサーでは質量だけの変化を検出することによって、最終的には両者とも生体分子間相互作用を検出することになる。ただし、観測している物質質量が異なるため、全く同じ結果になるとは限らない。表 1-1 にそれぞれの生体分子間相互作用の検出方法とその特徴を簡単に示したが、いずれの方法も一長一短があり、その長所と短所を認識して使い分けることが必要である。

表 1-1 生体分子間相互作用の検出方法⁴⁾

	方法	プローブ (標識)	感度	経時変化
相対的 定量	ゲルシフトアッセイ	ラジオアイソトープ (RI)	~100 pg	×
	酵素標識固相免疫測定 (ELISA)	酵素結合抗体	~100 pg	×
	等温滴定カロリメトリ (ITC)	不要	~1 mg	×
絶対的 定量	水晶発振子マイクロバランス (QCM, 古典力学)	不要	~10 ng	○
	表面プラズモン共鳴 (SPR, 電磁力学)	不要	~10 ng	○

1-2 表面プラズモン共鳴

1-2-a 表面プラズモン共鳴法の概要

表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーは、表面感応型センサーの一つであり、SPR 現象が金属表面における屈折率変化に対して高感度に応答することに基づいた化学・生化学センサーである。金属として金や銀などの厚さ 50 nm 程度の薄膜が使われ、金属薄膜の表面から数百 nm 付近の屈折率（誘電率）を測定するものである。市販の SPR 装置では測定する際に、対象となる生体分子の一方をセンサーチップ上の金薄膜表面に固定化し、これに作用する分子を含む試料をカセット式のマイクロ流路系を介して添加する。2 分子間の結合、解離に伴うセンサーチップ表面での微量な質量変化を、屈折率の変化から SPR シグナルとして検出し、そのシグナルの経時変化を図 1-6 に示すようなセンサーグラムとよぶグラフとして表示する。SPR センサーが現在広く用いられている理由は、タンパク質や DNA などの生体分子を色素などの標識を必要なく、しかもリアルタイムで観測できるため、生体分子間相互作用の速度定数を比較的正確に決定できることによる^{11, 12)}。

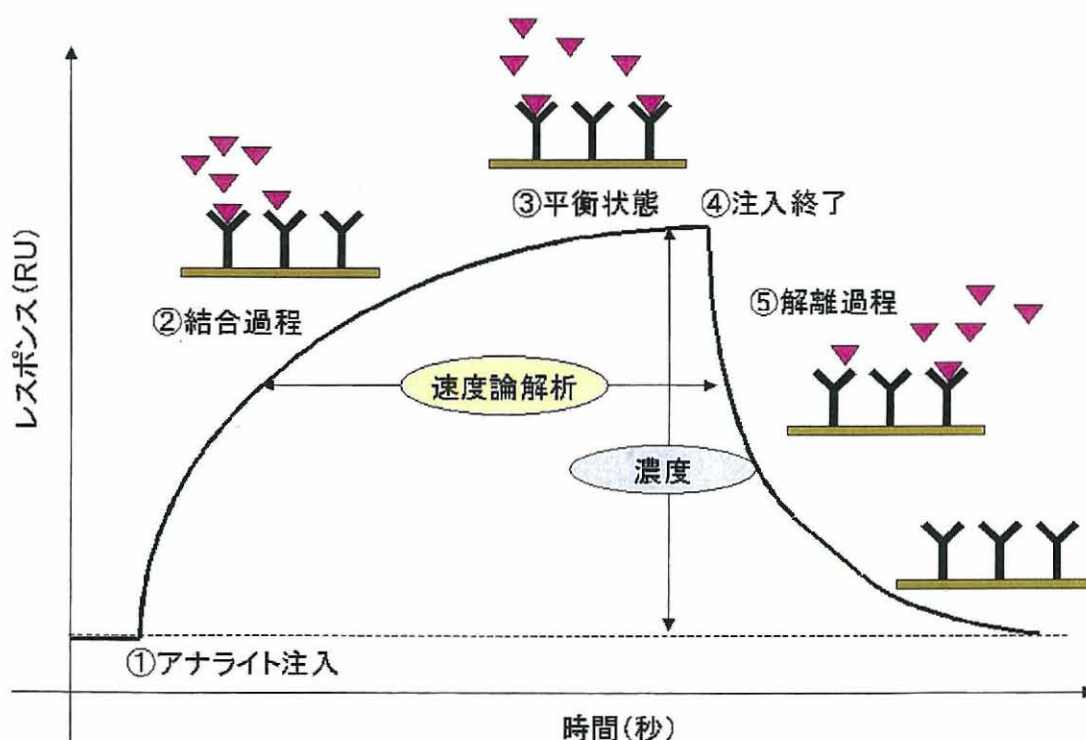


図 1-6 一般的な SPR センサーグラム

①アナライト（試料溶液）注入⇒②特異的結合反応に伴うレゾナンスシグナル上昇⇒③平衡状態⇒④アナライト注入終了⇒⑤解離の状態変化をリアルタイムに観測することができる。得られたセンサーグラムを以下に示す式で解析することにより、結合（association）と解離（dissociation）のカーブから、それぞれ結合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d を算出することができる。さらに、これらの定数から、親和性（結合定数 K_A および解離定数 K_D ）を求めることができる。



$$d[AB]/dt = k_a [A][B] - k_d [AB] \quad (\text{式 1-2-1})$$

$$= k_a [A]\{[B]_t - [AB]\} - k_d [AB] \quad (\text{式 1-2-2})$$

$$= k_a [A][B]_t - \{k_a [A] + k_d\}[AB] \quad (\text{式 1-2-3})$$

このとき A はアナライト、B はセンサーチップ上の結合していないリガンド、AB は複合体、括弧はそれぞれの濃度を表す。また $[B]_t$ はリガンドの全濃度を表す。この式を実際の測定値に置き換えると、

$$dR/dt = k_a [A]R_{max} - \{k_a [A] + k_d\}R \quad (\text{式 1-3})$$

となる。 R はレスポンス (RU) 値、 R_{max} はセンサーが飽和したときの RU 値である。縦軸に dR/dt 、横軸に R をとってグラフを描くと直線になり縦軸との切片を I 、傾斜を S とすれば、

$$k_a = I/[A]R_{max} \quad (\text{式 1-4})$$

$$k_d = S - k_a [A] \quad (\text{式 1-5})$$

となる。フローシステムを持つ装置においては、移動相中のアナライトは常に補給されているので、 $[A]$ は一定とみなすことができる。速度定数が求められれば、結合定数 K_A および解離定数 K_D は式 1-6 のように求めることができる。

$$K_A = k_a/k_d \text{ および } K_D = k_d/k_a \quad (\text{式 1-6})$$

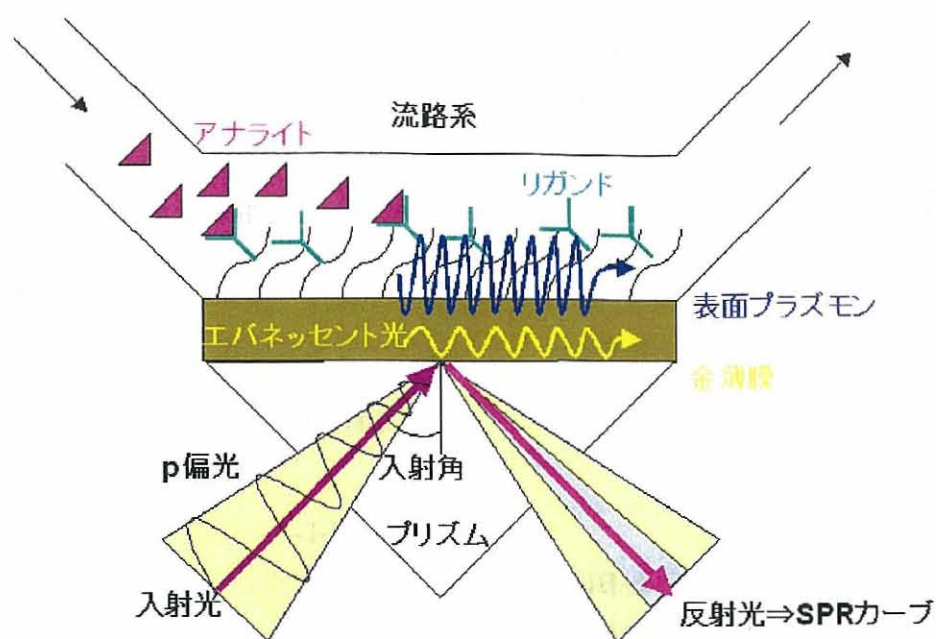


図 1-7 典型的な SPR センサー実験装置の概念図¹⁰⁾

また、図 1-7 に、生体分子間相互作用に用いられる、SPR センサーの典型的な実験配置を示した。SPR とは金属薄膜を塗布したプリズムに光を全反射以上の角度で入射させると、プリズム表面において発生したエバネッセント波と金表面において励起された表面プラズモン波が共鳴し、反射光が減少する現象である。SPR 現象を起こす入射角度は試料溶液の誘電率によって変化するので、金属薄膜の表面に測定対象物と相互作用する物質を固定化することで、界面における様々な分子間相互作用を観測することが可能である。

1-2-b 表面プラズモンの歴史

表面プラズモンの歴史を振り返ってみると、その発端は、20 世紀初めに Wood が回析格子の反射光のスペクトルに暗線を観測したことにある。その頃、理論的にも、前期量子論の研究で著名な Sommerfeld が地表面に沿った電磁波伝播の問題で表面プラズモンに相当する表面モードを導いている¹⁵⁾。そのため、SPR 現象は古くから知られていると思われがちであるが、歴史的な紆余曲折を経て、SPR 現象が報告されたのは 1960 年代末であり、比較的最近のことである¹⁶⁾。その理由として実験の難しさが挙げられる。それは、表面プラズモンが空中を伝播する光では励起できないことに起因する。

1-2-c 表面プラズモン

金属は自由電子固体とよばれ、その中では電子（－イオン）と原子核（＋イオン）が自由に動き回ることが出来るため、固体のプラズマ状態とみなすことができる。このプラズマの定義は、正および負の荷電粒子が不規則に動き回っているが、全体として中性な状態、すなわち電子と陽子が共存しながらも電子が陽子から解き放たれて自由に動き回れる状態である。これら電子は金属内を集団で波のように進行する。この時、電子密度の勾配（電荷密度の波あるいは振動）により金属表面付近でプラズマ波が生じる（図 1-8）。プラズマ波の振動数はプラズマ振動数とよばれ、これを量子化して考える時は、プラズモンとよぶ。さらに、金属表面で起こる時に、表面プラズモンとよび、これは金属表面を伝播する電磁気的な波である。

この表面プラズモンの振動数が高ければ、電波は光の領域となり、すなわち光が発生する。すなわち、表面プラズモンが存在すれば、必ず光が存在する。ただし、この光は金属表面を走るだけで、離れたところへは放射されない。外部へ伝わらない光の表面波をエバネッセント波（evanescent wave）という。このエバネッセントは、「急激に消失する」という意味を持つ。一般に、表面プラズモン現象の観測に用いられる、金、銀およびアルミニウムのプラズマ振動数は、それぞれ 2.4 eV, 3.9 eV および 15.8 eV 程度であり、銀の場合、紫外線 320 nm に対応する。この表面プラズモンは、金属表面上では、それに接する媒質（誘電体：空気、水、無機塩や生体分子など）によって、その進行速度が制限される。

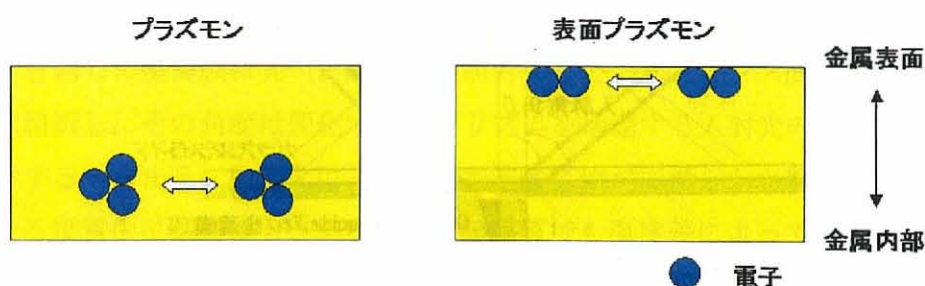


図 1-8 表面プラズモン

1-2-d SPR 検出装置の光学配置

現在、表面プラズモンを外部からの光と共鳴させるための光学的な 3 つの配置が知られている。いずれの方法も、回折光やプリズム等を用い、また入射角 θ を変えることにより、普通に伝搬する光よりも速度が遅い光を発生させる工夫が取られており、表面プラズモンに伴うエバネッセント波と共鳴することができる（全反射光学配置、図 1-9）。まず、Wood 配置

は、金属表面に細かい溝が刻まれており、高次の回折光がエバネッセント場化している。このためプリズムを設置することなく、エバネッセント波を発生させることが可能である（図 1-9A）。また、Otto 配置¹⁶⁾では、プリズム底面と金属の間に波長程度の広さのギャップを設けることにより、全反射条件下でプリズム底面にエバネッセント波を発生させることが可能である（図 1-9B）。そして一般に広く採用されている Kretschmann 配置では、数十 nm の金属薄膜を用いることにより、この金属薄膜底面での媒質の変化を屈折率の変化として捉えることができる（図 1-9C）。また、このとき、全反射角で入射した光は一旦低屈折率媒質側にしみだして、境界面に添って伝播した後、入射した位置からは少しずれて、入射側に戻っていくと考えられている。これを Goos-Hänchen シフトとよぶ（図 1-10）。

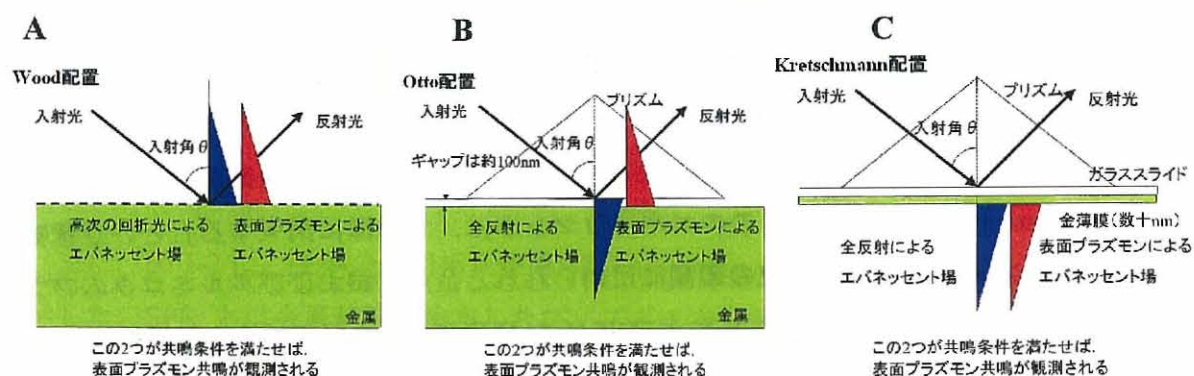


図 1-9 全反射光学配置

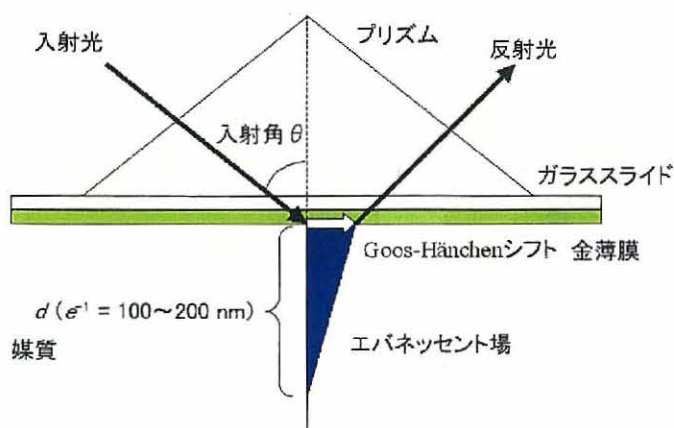


図 1-10 Goos-Hänchen シフトの概念図

全反射角で入射した光は一旦低屈折率媒質側にしみだして、境界面に添って伝播した後、入射した位置からは少しずれて、入射側に戻っていく。また光源が可視光の場合、skin depth (光強度が e^{-1} になる深さ) d は、100~200 nm になる。

1-2-e 全反射と臨界角¹⁷⁾

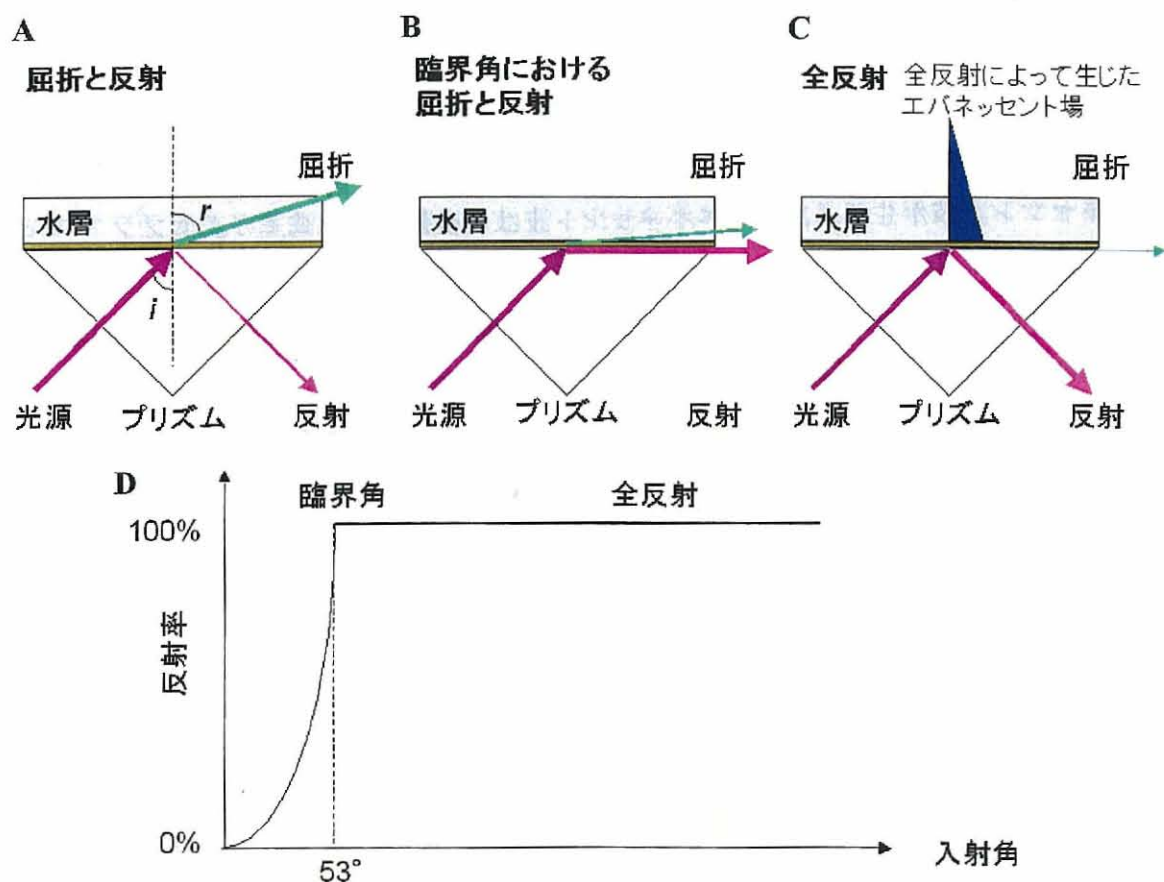


図 1-11 屈折と反射 (A) , 臨界角 (B) , 全反射 (C) および入射角と反射率の相関 (D)

プリズムを通して金薄膜に光 (P 偏光) を照射すると、水とガラス間の屈折特性の違いのために光は屈折し、その角度は変化する。プリズムを通過する入射光の角度によって、屈折するか反射するか決まる。屈折とは、進行波が波長に比べて滑らかな境界面を超えてもとの媒質と異なる媒質中に進む場合、あるいは同一媒質でも温度差によって波の速度が変化する時に、進行方向が変わる現象を言う (図 1-11A)。臨界角では、屈折の代わりに光は反射し、界面に平衡に進行する。つまり、全ての光は屈折せずに、内部反射する (図 1-11B)。また、入射角が臨界角より大きければ、光が全反射する (図 1-11C)。

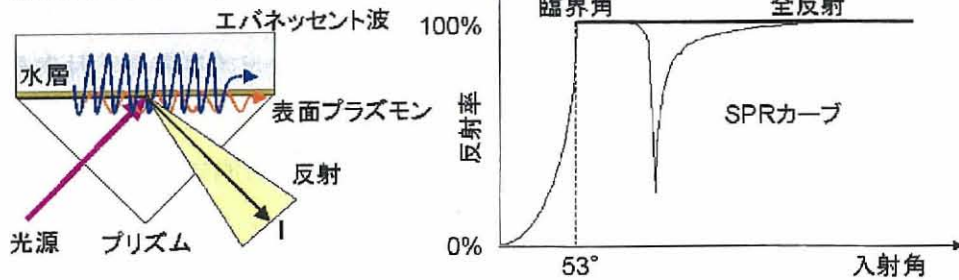
このとき、エバネッセント波と呼ばれる磁場が生じるが、これは表面から急激に減衰する。この全反射とは、絶対屈折率 n_1 の媒質中の光が絶対屈折率 n_2 が n_1 より小さい媒質 (絶対屈折率が $n_2/n_1 < 1$) との境界面に入射する時、入射角が一定の角 i より大きい (臨界角) と光線が全て反射される現象のことをいう。 i を臨界角と言い、境界面が平面の時 $\sin i = n_2/n_1$ である。

1-2-f 表面プラズモン共鳴と共鳴角のシフト

プリズム表面で常時発生している表面プラズモンのエバネッセント波と、全反射条件下金表面において励起された磁場エネルギー（エバネッセント波）が一致すれば、エネルギーの移動が起こり、共鳴が起こる。チップと試料の界面に、光源として発光ダイオードを用いた波長 760 nm の P 偏光をくさび型の光に集光し、全反射条件下で照射すると、金属薄膜側にエバネッセント波が生じる。このエバネッセント波は金属膜の自由電子の表面プラズモンと共鳴し、光のエネルギーの一部が表面プラズモンの波動エネルギーに変化する。その結果として、反射光のある特定の角度に I のような反射光強度の減衰した「光の谷」が認められる。反射光の消失角度（共鳴角）は金薄膜近傍での媒質の屈折率に依存して変動する（図 1-12）。

SPR バイオセンサーはこの現象を利用して、2 分子の結合、解離を測定する。例えば、リガンドを固定化したセンサーチップに、このリガンドに特異的に相互作用する測定対象（アナライト）を含む試料を添加すると、分子間相互作用によりセンサーチップ表面の質量が増加するとともにセンサーチップ表面の屈折率が増加する。その結果、図 1-12B に示す通りこの屈折率の変化に応じて、「光の谷」は I から II（結合時）あるいは II から I（解離時）へと移動する。この移動の経時変化をセンサーグラムとして表示することにより、センサーチップ表面での分子の相互作用をリアルタイムにモニターする（図 1-13）。SPR 角度の 0.1° の変化を 1,000 レスポンスユニット（Response unit, RU）と定義する。1,000 RU はセンサーチップ表面で約 1 ng/mm^2 の質量変化に相当する。実際の測定においては、10 RU 程度（約 10 pg/mm^2 ）からの変化を観測することができる。センサーチップ上に観測する二つの分子のうち片方（リガンド）を固定化しておき、そこにもう片方の分子（アナライト）を流す。相互作用による二分子の結合が起こるとセンサーチップ表面の濃度が変化し、それが表面プラズモンを起こすことのできるレーザー光の入射角の変化として測定される。この方法を用いることで、数十ナノモル程度の少量のサンプルにおいてもリアルタイムでの親和性の測定が可能となる。

A 表面プラズモン共鳴



B 共鳴角のシフト

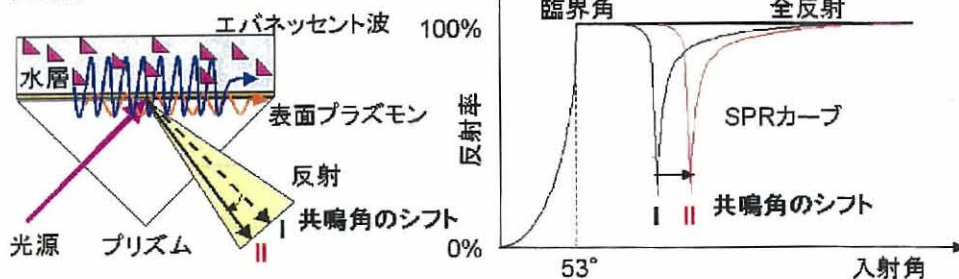


図 1-12 表面プラズモン共鳴と SPR カーブ

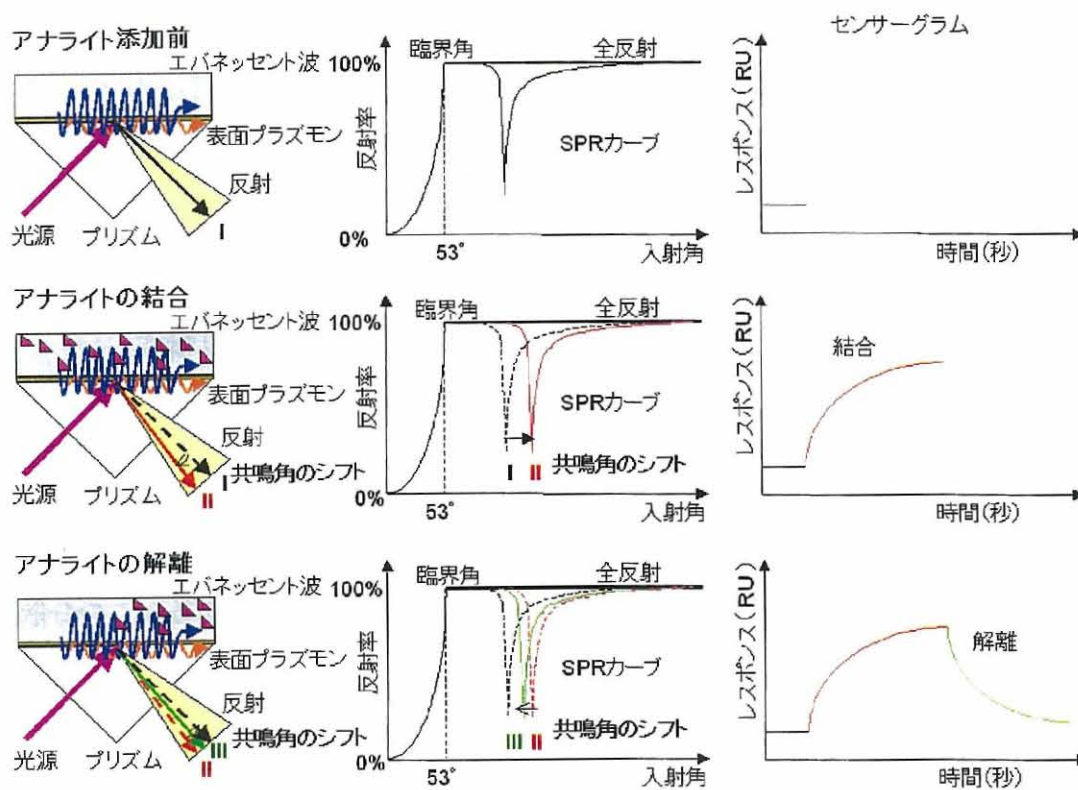


図 1-13 アナライトの結合および解離に伴う共鳴角のシフトとそのセンサーグラム

1-2-g SPR カーブと共鳴角¹⁰⁾

SPR センサーの原理を理解する上で重要な概念は、「SPR カーブ」である。SPR カーブは、入射光を単色光として、入射角と反射率の関係である。SPR カーブの最小反射率を与える入射角度は「共鳴角」とよばれ、共鳴角は表面屈折率の変化に対して比例した応答を示す。現在、この共鳴角を測定することで生体分子間相互作用の観測を可能にしているのが、本研究でも使用した Biacore AB 社（現 GE ヘルスケアバイオサイエンス社）から市販されている BIACORE[®] という測定装置である¹⁸⁾。その測定条件（入射波長 760 nm, 金薄膜 50 nm, プリズム屈折率 1.51）で水（屈折率 1.333）を観測すると、図 1-14 の図中に示すような SPR カーブが得られ、数値計算によるシミュレーション結果と良く一致することがわかる。

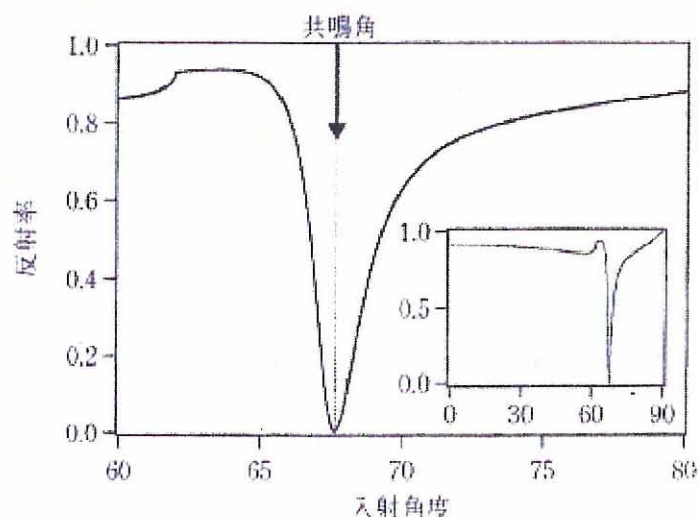


図 1-14 SPR カーブと共鳴角（理論曲線と実測値）

栗原一嘉, 鈴木孝治 (2002) 「ぶんせき」 4, 161-167.より転載

1-2-h 分散曲線¹⁰⁾

共鳴角は、SPR カーブの最小反射率に対応する角度であり、この共鳴角の理解には、SPR 現象の波動力学的な理解を必要とする。具体的には、エバネッセント光による表面プラズモンの共鳴励起を分散関係（周波数 ω と波数 k の関係）で理解することである。この分散関係における真空中の光の波数 k は次式で与えられる。

$$k = \omega / c \quad (\text{式 1-7})$$

真空中の光速 c に対して、屈折率 n の媒質中では、光の速度は c/n である。誘電率 ϵ は電束密度 D と電場 E より $D = \epsilon E$ と定義されるが、誘電率 ϵ と屈折率 n には $\epsilon = n^2$ の関係がある。

図 1-15 に数値計算によって求められた SPR 現象に関連する分散曲線を示す。測定条件は、図 1-14 と同様に、金薄膜 50 nm、プリズム屈折率 1.51 で、水（屈折率 1.333）を観測したものである。

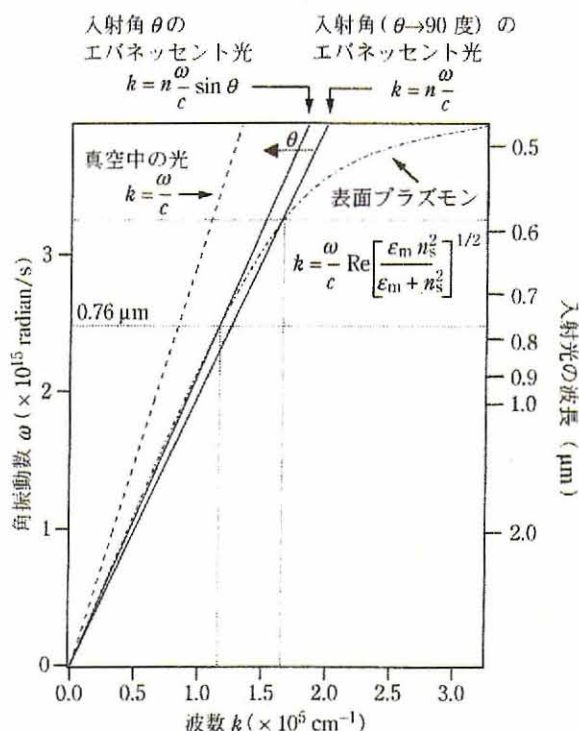


図 1-15 数値計算による表面プラズモンと SPR 現象に関連する分散曲線
栗原一嘉, 鈴木孝治 (2002) 「ぶんせき」 4, 161-167.より転載

図 1-15 において、表面プラズモンの分散曲線と真空を伝播する光の分散曲線は交差していないことがわかる。このことは、表面プラズモンは真空中を伝播する光では励起できないことを意味する。従って、表面プラズモンを励起するためには、金属表面に局在するエバネッセント光（波）を使う必要がある。屈折率 n のプリズムに入射角 θ （ラジアン単位）で光が入射して金薄膜で反射するとき、エバネッセント光（波）が反射面と反対側に発生する。そのエバネッセント光（波）は、プリズム界面に平行な方向に波数ベクトルを持ち、その分散関係は次式で与えられる。

$$k = n \frac{\omega}{c} \sin \theta \quad (\text{式 1-8})$$

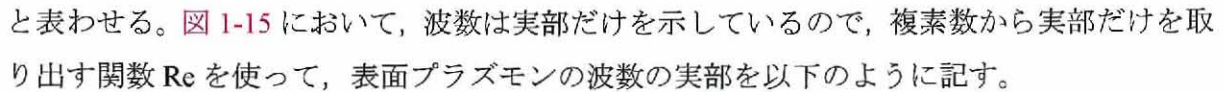
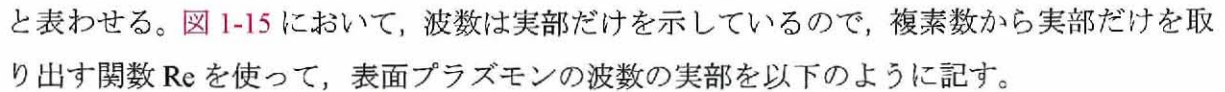
入射角が 90 度（ $\theta = 90^\circ$ ）の極限において、その分散関係は次式で与えられる。

$$k = n \frac{\omega}{c} \quad (\text{式 1-9})$$

すなわち、屈折率 n のプリズム中を伝播する光の分散関係と全く同じになる。

表面プラズモンの波数 k_0 は、センシング層の屈折率 n_s 、誘電率 ϵ_m を使って、

$$k_0 = \frac{\omega}{c} \left[\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2} \right]^{1/2} \quad (\text{式 1-10})$$

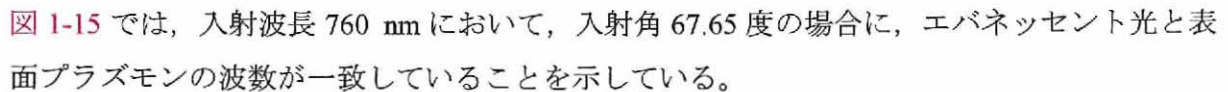
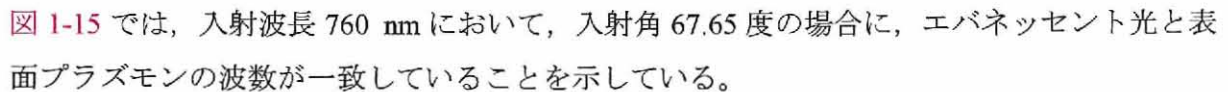
と表わせる。  において、波数は実部だけを示しているの、複素数から実部だけを取り出す関数 Re を使って、表面プラズモンの波数の実部を以下のように記す。

$$k = \frac{\omega}{c} \text{Re} \left[\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2} \right]^{1/2} \quad (\text{式 1-11})$$

エバネッセント光（波）と表面プラズモンの分散曲線が交わるため、すなわち、エバネッセント光（波）で表面プラズモンを励起させるためには、（式 1-9）と（式 1-11）において、共通の周波数 ω と波数 k を持つような入射角 θ を決定すれば良い。（式 1-9）と（式 1-11）の右辺を等しいと置き、 ω を消去して、

$$\sin\theta = \frac{1}{n} \text{Re} \left[\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2} \right]^{1/2} \quad (\text{式 1-12})$$

より得られる共鳴角 θ で入射すれば、表面プラズモンを共鳴的に強く励起できる。

  では、入射波長 760 nm において、入射角 67.65 度の場合に、エバネッセント光と表面プラズモンの波数が一致していることを示している。

1-2-i 表面プラズモン共鳴の長所と短所

この方法には、従来の測定法と比べて、以下に述べるような大きな長所がある。

- ① センサー表面で起こる媒質の屈折率の変化がその場で（リアルタイムに）検出できるので、実験の状況が常に見え、また速度論的解析も可能である。
- ② 光は試料溶液の中を通らない。従って、試料の着色、不透明さ、不要物や気泡の存在から影響を受け難い。
- ③ 目的物の光学特性とは無関係に光の吸収が起こるので、目的物の吸収スペクトルなどを考慮する必要がない。

④屈折率の変化（主として誘電率の変化を反映する）を検出するので、対象物に光親和標識や放射性標識などをつける必要がない。

⑤センサー表面から 1 μm 以内というごく狭い範囲内の媒質の性質だけが寄与するので、試料溶液の必要量はきわめて少ない。セルの容量もきわめて小さくてすむ。

⑥同じ理由から、センサーに充分近づいた（センサー表面に濃縮された）成分についての情報だけを抽出でき、バックグラウンドノイズが少ない。

⑦本質的に面が関与した現象なので、特異的リガンドを固定化するのにその面を利用できる。また、分子が相互作用の場まで速やかに到達できる。固定化そのものの成否、固定化された量などの情報も直ちに得られる。

特に、①速度論的解析、②精製不要、④標識不要、そして⑤微量測定可能なことから、生物、化学および薬学の分野で生体分子相互作用解析に広く用いられるようになった。

一方、他の測定法との共通点も一部あるが、その短所には、

①一般的に広く用いられるリガンド-アナライト間の直接測定法の場合、共有結合を介したリガンドの固定化を行う際に、その活性部位を損なう恐れがある。

②特異的結合と非特異的吸着の区別が難しく、測定結果を正しく判断するためには複数濃度での繰返し実験や阻害実験などを必要とする。

③ランニングバッファーとして使用する溶媒に制限があり、疎水性の高い化合物に関しては、測定が難しい。

④近年、生物、化学および薬学の分野の研究者に広く使用されつつあるが、まだ汎用性は十分とは言えず、また専用の試薬、器具および装置が高価で、一測定当りのランニングコストが高い。

SPR 用いて相互作用解析を行う際に、ここで示した長所ならびに短所を理解し、その上で適した測定方法を実施し、解析結果を判断することが不可欠と言える。

1-3 表面プラズモン共鳴を用いた生体分子間相互作用

1-3-a 表面プラズモン共鳴の適用¹⁹⁾とその精度および信頼性²⁰⁾

表面プラズモン共鳴 (SPR) は、以前からタンパク質、抗体、レセプター、ペプチドやオリゴヌクレオチドなどの相互作用解析に広く用いられてきた。また最近では、生命科学研究や創薬などの分野においても、このバイオセンサーの有用性が広く知られるようになり、脂質や自己集合単分子膜、細胞外マトリックス、糖質や薬物などの低分子化合物の研究においても、益々利用されるようになってきた。さらには、生産工程の追跡、品質コントロールや食品や環境中の成分の定量・定性試験にも次第に適用されるようになってきている。

多くの研究者によって、この表面プラズモン共鳴は、反応速度論解析や相互作用親和性評価に広く用いられている。また、定性分析、すなわち結合パートナーの特定、エピトープマッピング (抗原性を示す部位の特定)、分子集合や結合メカニズムの解析や比較に用いられている。また、食品中の栄養成分や薬物、農薬や毒物などの定量のほか、熱力学的相互作用解析にも用いられている。このように広範な分野で、多種多様の試験目的に使用されていることから、SPR バイオセンサーの信頼性と汎用性が高いことは明白である。また、SPR による測定結果を評価する上で、その実験誤差による変動を検証することは重要である。Myszka らは測定結果の変動と等温滴定カロリメトリ法 (ITC) との親和性の比較、検証を行った²⁰⁾。その結果、異なる測定者、異なる測定機器における実験誤差は小さく、また ITC の解離定数および測定誤差とよく一致している ($K_D^{SPR} = 0.90 \pm 0.22 \mu\text{M}$ および $K_D^{ITC} = 1.00 \pm 0.22 \mu\text{M}$) ことが示された。

1-3-b 低分子化合物-タンパク質相互作用

また、Day ら²¹⁾ は、carbonic anhydrase II (CAII) をリガンドとして固定化し、2 種類のアシルスルホンアミド化合物をアナライトとして、SPR を用いた低分子化合物-タンパク質相互作用解析を行った。同時に、リガンドとアナライトが溶解した状態で行う等温滴定カロリメトリ法 (ITC) やストップドフローフルオレセンス法 (SFF) との比較実験を行った。その結果、測定結果が良く一致していることを明らかにし、SPR 表面修飾の際に用いたデキストランの高い柔軟性と低い立体障害を証明した。また、SPR においては他の測定法と比べて、結合および解離速度定数のほか、エントロピーやエンタピーも算出可能であり、相互作用解析における有益な情報が得られるという利点もある (表 1-2)。

表 1-2 Day らにより実施された 3 種の異なる測定法での解離定数 (K_D) , 結合 (k_a)
および解離速度定数 (k_d) , ΔG° , ΔH° および ΔS° の比較 ²¹⁾

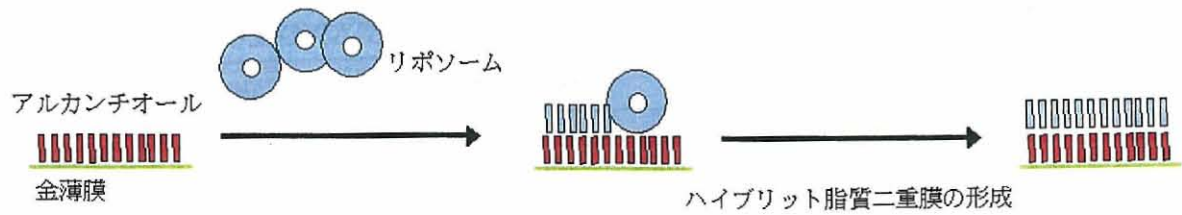
測定方法	化合物	$k_a(10^4/\text{Ms})$	$k_d(10^{-2}/\text{s})$	$K_D(\text{nM})$	$\Delta G^\circ(\text{kcal/mol})$	$\Delta H^\circ(\text{kcal/mol})$	$\Delta S^\circ(\text{cal/mol K})$
SPR	CBS	4.8 ± 0.2	3.65 ± 0.006	760 ± 30	-8.3 ± 0.3	-11.6 ± 0.4	-11 ± 1
ITC	CBS	—	—	730 ± 20	-8.4 ± 0.2	-11.9 ± 0.4	-12 ± 1
SPR	DNSA	39 ± 5	13 ± 1	340 ± 40	-8.8 ± 0.9	-5.7 ± 0.4	11 ± 1
ITC	DNSA	—	—	360 ± 40	-8.8 ± 0.9	-4.8 ± 0.4	13 ± 1
SFF	DNSA	38 ± 9	16 ± 3	420 ± 100	—	—	—

— : 測定不可能, CBS : 4-carboxybenzenesulfonamide, DNSA : dansylamide

1-3-c 表面プラズモン共鳴を用いた生理活性物質と脂質二重膜との相互作用研究

タンパク質やペプチドをはじめ, 体内に投与された薬物や毒物などの生体分子は, 細胞膜に作用し, あるいは内部に取り込まれ, その生理作用を発現する。したがって, 生体膜の基本構造である脂質二重膜と生理活性物質との相互作用は重要な研究課題である。BIAcore[®]では, 生体分子との相互作用を解析するために, 脂質二重膜が固定可能な, センサーチップを市販している。センサーチップ HPA は疎水表面にリポソームを融合させることによって, ハイブリット脂質二重膜 (単分子膜) を作成するのに使用される。ただし単分子膜を形成するため, 貫通型ペプチドやタンパク質の取り込みには制限がある。一方, センサーチップ L1 は, 金表面上に脂溶性化合物によって修飾された薄いデキストランマトリックスからなり, 脂溶性化合物によるリポソームのキャプチャーを通じて脂質二重膜が得られる (図 1-16)。この他にも図 1-17 に示すように, センサーチップ上に脂質二重膜を形成する様々な研究 ²²⁾ が行われてきた。

センサーチップ HPA



センサーチップ L1

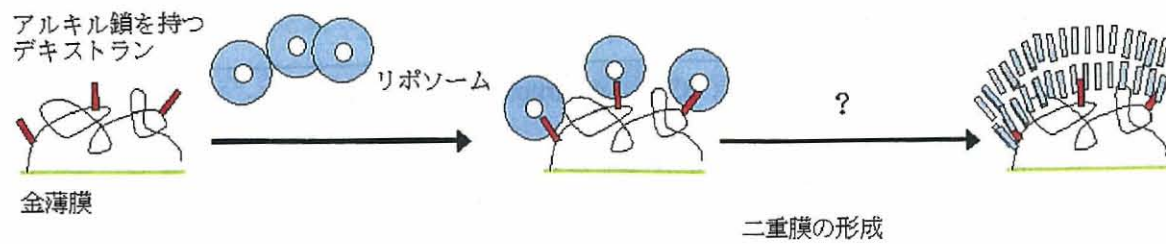


図 1-16 センサーチップ HPA とセンサーチップ L1 の概要

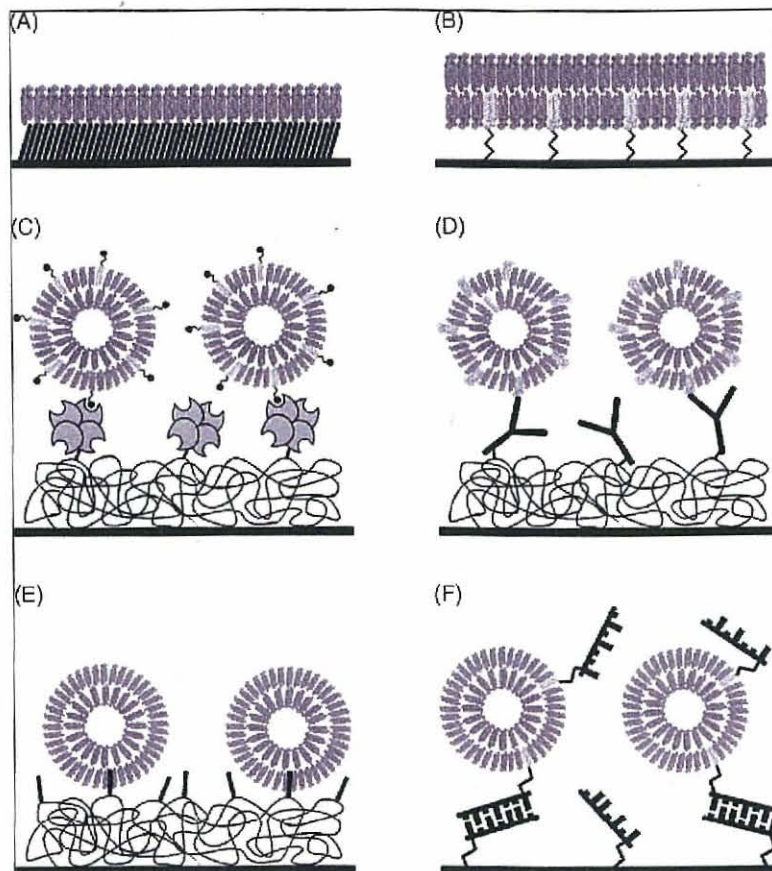


図 1-17 SPR センサーチップ上に様々な膜を形成する方法²²⁾

図 1-17 に示す通り、これまで (A) センサーチップ HPA にそのままハイブリット二分子膜（単分子膜）を形成する方法（試薬に対する安定性は高いが、極めて疎水性が高く、流動性が低い）、(B) リンカーを経由して、自由度の高い脂質二重膜を形成する方法、(C) 一旦ストレプトアビジンを介してビオチン化リポソームを捕捉する方法、(D) 抗原抗体を利用しリポソームを捕捉する方法、(E) 最も一般的なアルキル鎖を持つ市販のセンサーチップ L1 に直接リポソームを捕捉する方法および (F) DNA 交配によりリポソームを捕捉する方法などの研究が行われてきた。

1-3-d センサーチップ L1 表面上での脂質二重膜の状態

現在、特に抗原抗体や DNA などを用いた誘導化を必要としないことから、1-3-c で示したセンサーチップ L1 上での脂質二重膜の形成が、最も広く利用されている（図 1-16）。しかし、リポソームがセンサーチップ表面に原型を保った状態であるか、あるいは平面脂質二重膜を形成しているのか不明である²³⁾。

Anderluh ら²⁴⁾ は、センサーチップ L1 に蛍光剤としてカルセイン (calsein) を取り込ませたリポソームを捕捉させた後、膜中にポアを形成し、蛍光剤の流出効果を持つ Equinatoxin の作用を、コントロールと比較した。その結果、リポソーム捕捉過程において SPR センサーチップ上で蛍光が観測され、一方、Equinatoxin 添加過程においては蛍光が観測されず、ポアの形成によりカルセインの流出が生じたことを示した。このことは、このセンサーチップ上にリポソームが原型のまま保持されていることを示唆している。さらに Höning ら²⁵⁾ は、電子顕微鏡を用いてはじめてセンサーチップ L1 上にリポソームが捕捉されていることを明らかにした（図 1-18）。

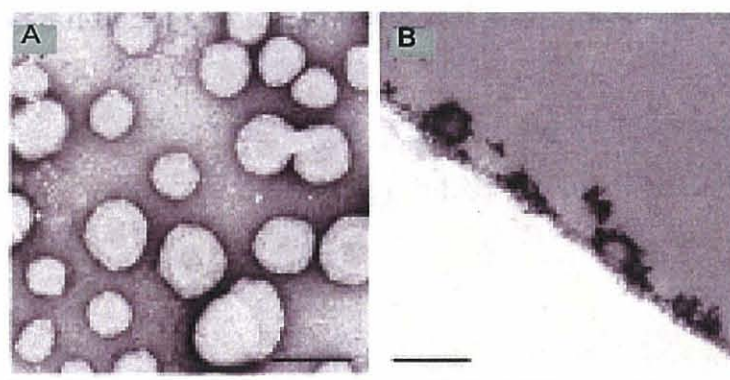


図 1-18 電子顕微鏡を用いたセンサーチップ L1 上のリポソームの観測
(A ; センサーチップ上方からの観測, B ; センサーチップ側面からの観測)

Höning et al. *Molecular Cell* 2005, 18, 519–531 より転載

1-3-e 膜作用分子と脂質二重膜との相互作用解析

膜作用分子、タンパク質やペプチドとリポソームとの相互作用解析は、その作用機構や膜中での複合体構造形成を理解するうえで重要である。Abdiche ら²⁶⁾は、薬物と脂質二重膜との相互作用を SPR ハイスループット解析により、様々な薬剤候補と脂質二重膜との親和性のランキングや分類に適用した。その際、異なるリン脂質からなる脂質二重膜においても同様に比較し、その親和性から薬剤の効果や作用機構の評価を行った。また、タンパク質やペプチドと脂質二重膜との相互作用解析における定性および定量データから、タンパク質やペプチドの脂質特異性を明らかにすることが可能である。SPR が提示する最も有用な情報の 1 つは、特定のアミノ酸側鎖が、膜との結合や解離に関わる影響である。Papo ら²⁷⁾は、メリチン (図 1-4) とマガイニンのポリペプチドと脂質二重膜との相互作用解析からその作用機構の解明を試みた。その際に、メリチン、メリチンのミュータント (*D*-アミノ酸) やマガイニンを用い、また、ヘッドグループの電荷の異なるリン脂質を用い、異なるセンサーチップで単分子膜 (センサーチップ HPA) と二分子膜 (センサーチップ L1) を調製して、解析を行った。その結果、マガイニンとメリチンで挙動が異なることを明らかにした。また、メリチンのミュータントは、メリチンとは異なり、マガイニンと類似した挙動を示すことを明らかにした。すなわち、このようなペプチドは、(A) 膜表面にカーペット状に広がり、濃度を上げると、(B) PC/コレステロール膜ではマガイニンは表面に堆積するのみである。一方、(C) 負電荷を持つ PE/PG (7:3) 膜では、マガイニンは膜を崩壊する。(D) メリチンは二分子膜中に挿入し、ポアを形成すると考えられる。このとき、メリチンのミュータントは α -ヘリックスを形成できないので、メリチンとは異なる挙動を示したと考えられる。その結果、これらペプチドが、一旦膜表面に結合したのち、膜内部に挿入されるという二状態反応モデル (Two-state reaction model) により膜と相互作用していることが示された (図 1-19)。

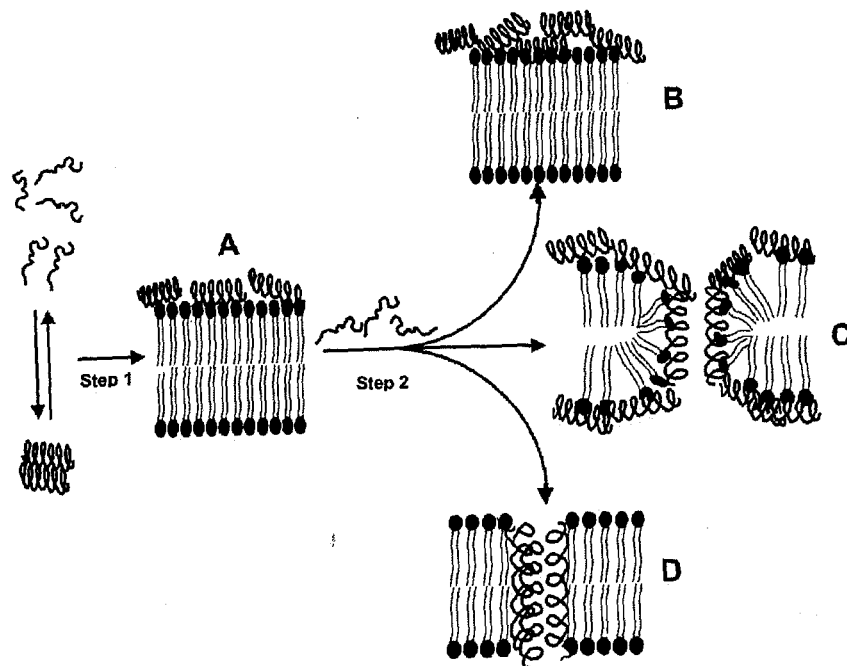


図 1-19 膜作用ペプチド（メリチンおよびマガイニン）と脂質膜との相互作用モデル²⁷⁾
 Papo et al. *Biochemistry* 2003, 42, 458–466.より転載

1-4 研究目的

1-1-a で示した化合物をはじめ、様々な生理活性物質が天然物として報告され、これらはヒトに対して、ときには「毒」として、ときには「薬」として作用する。現在、多くの研究者が、様々なアプローチから、これら生理活性物質の作用機構解明を目指した研究を行っているが、未だ解明されていない部分が多い。ラジオイムノアッセイ (RIA) , 酵素標識固相免疫測定 (ELISA) 法や等温滴定カロリーメトリ法 (ITC) などが、従前より広く採用されてきたが、これらの方法は、一般性が高いものの試験方法が煩雑である。そこで私は、より簡便で、迅速な相互作用解析法として、表面プラズモン共鳴法 (SPR) に注目し、生理活性物質の作用機構解明ならびに親和性評価法の構築を目指すことにした。

その際、数多くの生理活性物質のなかで、放線菌により生産されるアンフォテリシン B (AmB) に注目した。AmB は、現在抗真菌剤として広く用いられているポリエンマクロライド化合物である。AmB は、ヒト細胞におけるコレステロールを含む脂質二重膜よりも真菌細胞におけるエルゴステロールを含む脂質二重膜に対して高い親和性を持つことにより選択毒性を発現することが知られている。さらに、生体膜中でイオン透過性チャネル複合体を形成すると考えられているが、これらの作用機構は未解明であり、その解明は AmB の医薬品としての特性を高めるために重要である。そこで、アシル鎖の異なる脂質二重膜を用い、また異なるステロール (コレステロールおよびエルゴステロール) を用いて、脂質二重膜に対する親和性の違いを評価することを試み、AmB の作用機構ならびに AmB 会合体について分子間相互作用を定量的に評価することを目指した。

一方、数多く報告されてきた梯子状ポリエーテル化合物のなかで、ブレベトキシシン (BTX) 類やシガトキシシン類 (CTX) が、神経細胞膜の電位依存性ナトリウムイオンチャネル (VSSC) に特異的に結合することが知られているが、これら以外の天然物は未だ毒性と作用標的との関連は不明な部分が多い。そこで、一般的な梯子状ポリエーテルとタンパク質や脂質二重膜などとの作用機構の解明を試みるとともに、簡便な親和性評価法、さらには梯子状ポリエーテルの簡便な検出法の構築を目指すことにした。

参考文献

- 1) 中澤泰男訳「毒物と生体との相互作用」, 1992.
- 2) 船山信次「毒と薬の科学」, 2007.
- 3) Phizicky. E. M.; Fields. S. *Microbiol. Rev.* 1995, 59, 94-123. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis.
- 4) 梅澤喜夫, 澤田嗣郎, 寺部 茂「先端の分析法－理工学からナノ・バイオまで」, 2004, 306-315. 「QCM センサ」, 「SPR センサ」
- 5) 江原靖人, 岡畑恵雄「油化学」, 1994, 43, 796-804.
- 6) 笠井献一「タンパク質 核酸 酵素」, 1992, 37, 2977-2984. 「表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用したバイオセンサー」
- 7) 河田 聡, 高木俊夫「タンパク質 核酸 酵素」, 1992, 37, 3005-3010. 「表面プラズモン共鳴センサーとは」
- 8) 牧 正敏「バイオサイエンスとインダストリー」, 1995, 53, 26.
- 9) 夏目 徹「実験医学別冊 タンパク質の分子間相互作用実験法 竹縄忠臣, 渡邊俊樹編」, 1996, 211.
- 10) 栗原一嘉, 鈴木孝治「ぶんせき」, 2002, 4, 161-167. 「表面プラズモン共鳴センサーの光学測定原理」
- 11) 永田和宏, 半田 宏「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法」, 1998.
- 12) 橋本せつ子「ぶんせき」, 1997, 5, 362-368. 「表面プラズモン共鳴現象を利用する生態分子相互作用の解析」
- 13) Okahata, Y.; Niikura, K.; Furusawa, H.; Matsuno, H. *Analytical Sciences* 2000, 16, 1113-1119. A highly sensitive 27 MHz quartz-crystal microbalance as a device for kinetic measurements of molecular recognition on a DNA strands.
- 14) Fägerstam, L. G.; Frostell, A.; Karlsson, R.; Kullman, M.; Larsson, A.; Malmqvist, M.; Butt, H. J. *Mol. Recognit.* 1990, 3, 208-214. Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance: application to epitope mapping.
- 15) Salmon, Z.; Macleod, H. A.; Tollin, G. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1331, 117-129. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles.
- 16) Otto, A. *Z. Phys.* 1968, 216, 398-410. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection.
- 17) <http://www.bio-rad.com>

- 18) <http://www.biacore.co.jp>
- 19) Rich, R. L.; Myszka, D. G. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 1-39. Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature.
- 20) Myszka, D. G.; Abdiche, Y. N.; Arisaka, F.; Byron, O.; Eisenstein, E.; Hensley, P.; Thomson, J. A.; Lombardo, G. R.; Schwarz, F.; Stafford, W.; Doyle, M. L. *J. Biomol. Tech.* **2003**, *14*, 247-269. The ABRF-MIRG'02 Study: assembly state, thermodynamic, and kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction.
- 21) Day, Y. S. N. D.; BAIRD, C. L.; Rich, R. L.; Myszka, D. G. *Protein science* **2002**, *11*, 1017-1025. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods.
- 22) Beseničar, M.; Maček, P.; Jeremy, H. L. Anderluh, G. *Chemistry and Physics of Lipids* **2006**, *141*, 169-178. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions.
- 23) Mozsolits, H.; Aguilar, M-I. *Biopolymer* **2002**, *66*, 3-18. Surface plasmon resonance spectroscopy: an emerging tool for the study of peptide-membrane interactions.
- 24) Anderluh, G.; Beseničar, M.; Kladnik, A.; Lakey, J. H.; Maček, P. *Anal. Biochem.* **2005**, *344*, 43-52. Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic poreformingtoxin.
- 25) Höning, S.; Ricotta, D.; Krauss, M.; Späte, K.; Spolaore, B.; Motley, A.; Robinson, M.; Robinson, C.; Hauske, V.; Owen, D. *J. Mol. Cell* **2005**, *18*, 519-531. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2.
- 26) Abdiche, Y. N.; Myszka, D. G. *Anal. Biochem.* **2004**, *328*, 233-243. Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore.
- 27) Papo, N.; Shai, Y. *Biochemistry* **2003**, *42*, 458-466. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides.

第2章 アンフォテリシン B と脂質二重膜との親和性評価

2-1 序 論

2-1-a 抗真菌剤としてのアンフォテリシン B

放線菌によって生産されるポリエンマクロライド化合物群は幅広い抗菌スペクトルをもつ強力な抗生物質として知られている(図 2-1)。ポリエン抗生物質は比較的強固な分子配座をもっており、マクロライド環の片側が親水的なポリオール部分、他方が疎水的なポリエン部分からなる特異な分子構造を有する。現在臨床的に使用可能なものはアンフォテリシン B (AmB)、ナスタチン、ナタマイシンである。中でも最も広く知られている AmB は重症の真菌感染症の治療薬として約 50 年間使用されている¹⁻³⁾。長年にわたる臨床での使用から AmB は非常に耐性菌がでにくい性質を持っていることが明らかとなっており、その作用メカニズムは多くの科学者の興味を惹きつけてきた。また近年、臓器移植や後天的免疫不全症候群(AIDS)の増加にともない、人為的あるいは病的に免疫機能が低下した患者の潜在性真菌症が問題となっている。特に全身感染症は治療が困難であり、AmB はこれに対する有効な治療薬として使用されている⁴⁾。

強い抗真菌活性と耐性菌の少なさから AmB はきわめて優秀な抗真菌剤と言える。しかし、医療薬としては、水難溶性および腎臓毒性が問題となり、溶解性の向上と副作用の軽減が長年の研究課題とされてきた。薬物輸送と化学誘導の両面から研究が進められ、溶解性の向上については幾つかの成功例が知られている。すでに市販されている代表的な AmB 製剤としてはリポソーム製剤 AmBisome (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.)、AmB-リン脂質複合体 Abelect (The Liposome Company, Inc.)、AmB-界面活性剤混合物 Fungizone (Bristol-Myers Squibb Company) などが挙げられる(表 2-1)。これらの医薬品は、AmB をリン脂質や無害な界面活性剤と混合することで可溶化し、血液中の AmB 濃度を薬効量まで高める工夫がなされている^{5,6)}。しかし、調製が煩雑でありコストが高いことが問題となっている。また、依然として腎臓毒性は強く、現在も副作用の軽減が望まれている⁷⁾。このほかにも、AmB を化学修飾することで、選択毒性を向上させる研究も行われており、*in vitro* では良好な結果を示す誘導体も報告されているものの、医薬品として利用されるには至っていない。

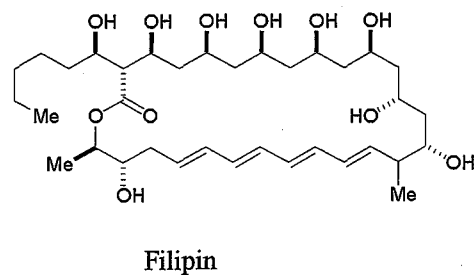
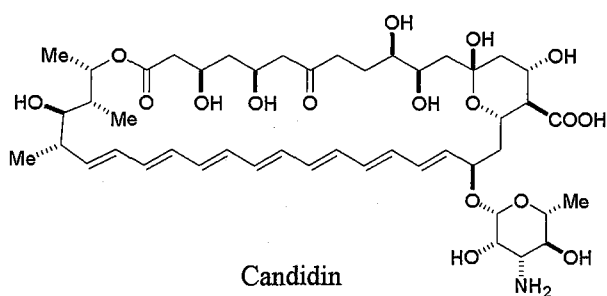
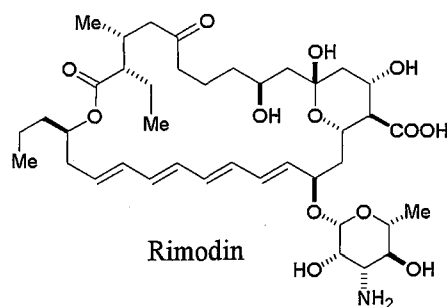
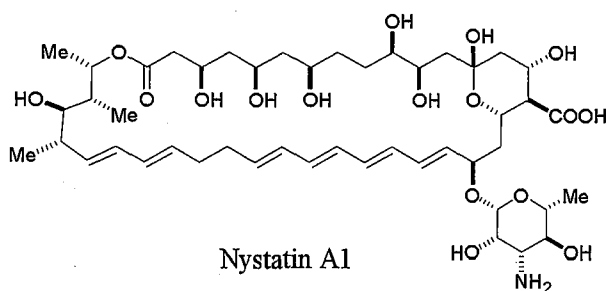
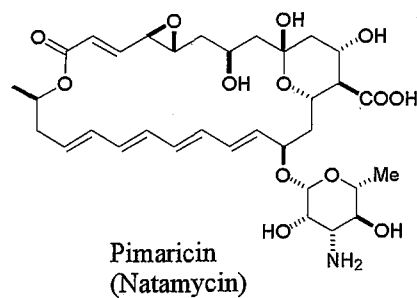
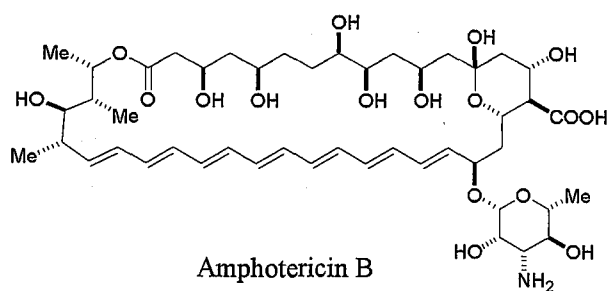


図 2-1 ポリエン抗生物質

表 2-1 代表的な医療用 AmB 製剤

AmB 製剤 (製造会社)	組成
Fungizone (Bristol-Myers Squibb Company)	AmB/deoxycholate
Amphotec (Sequus Pharmaceuticals, Inc.)	AmB/cholesteryl sulfate (1/1)
Abelect (The Liposome Company, Inc.)	AmB/DMPC/DMPG (3/10/7)
AmBisome (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.)	AmB/HSPC/cholesterol/DPPG (2/10/5/4)

2-1-b 初期の活性機構研究

耐性菌ができていくポリエン抗生物質の作用機構は古くから注目され、その機構解明を目指した数多くの研究が行われてきた。1959 年に真菌感染症に対する AmB 使用例が報告されたが⁸⁾、当時は作用機構も作用標的も不明であった。1960 年代初頭、作用標的を探索する研

究が盛んに行われ、ポリエン抗生物質の毒性がステロールを細胞膜に含む生物に限定されることが判明し、ステロールが AmB の作用標的分子である可能性が指摘された^{9,10)}。その後の人工リン脂質二重膜を用いた作用機構研究からコレステロールが卵黄ホスファチジルコリン (eggPC) 膜中の AmB によるイオン透過能を増大することが確認された^{11,12)}。また、イオン透過性の大きさが AmB の濃度の 5~10 乗に比例することが明らかとなり、AmB の会合体がイオン透過能をもつことが予想された^{13,14)}。

2-1-c AmB の分子構造から推定されるチャネル構造

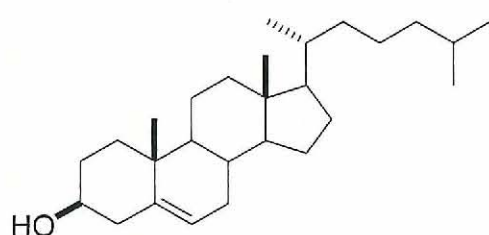
1971 年、Ganis らによって *N*-ヨードアセチル AmB の X 線結晶解析から AmB の全立体配置が決定されると¹⁵⁾、次に AmB の会合体構造に注目が集まった。先の研究から AmB は会合体としてチャネル活性を発現すること、およびステロール要求性を持つことが知られていた。Andreoli らは AmB のイオン性官能基もしくはコレステロールの 3 β -OH を化学修飾すると活性が低下することを明らかにし、AmB とコレステロールがそれぞれのカルボキシ基とヒドロキシ基の間で形成される水素結合により安定化し、チャネル会合体を形成することを推定した¹⁶⁾。さらに Demel らは space-filling モデルを用いたシミュレーションにより AmB とステロールの 16 分子会合体の存在を推定した (図 2-2)¹⁷⁾。現在、一般的に広く受け入れられているこれらのモデルは、AmB とコレステロールの自己会合によりチャネルを形成するという独特の概念であったために多くの科学者の興味を惹きつけ、以後の AmB の活性機構研究はこのモデルに従って解釈されるようになった。



図 2-2 Demel および De Kruijff の提唱した AmB-ステロール会合モデル¹⁷⁾

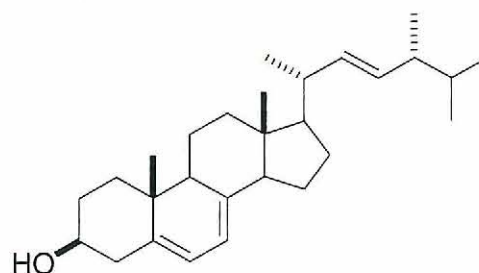
2-1-d 選択毒性発現機構

AmB の選択毒性は、AmB-ステロール会合体の形成とその構造によって説明できると考えられている。哺乳類と真菌では細胞膜に含まれる主なステロールの構造が異なる。前者ではコレステロールが主成分であるのに対し、後者ではエルゴステロールが主成分である。1975 年、Archer らによりコレステロールおよびエルゴステロールを含有する培地でステロール依存性バクテリア *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* が培養され、ポリエン抗生物質の毒性が調べられ、AmB のメチルエステル誘導体 (AmE) がコレステロールよりもエルゴステロールを含む培地で *Mycoplasma* に対して高いカリウムイオン透過活性を示すことが明らかにされた¹⁸⁾。この結果から、AmB は真菌細胞膜に含まれるエルゴステロールに対してより強く結合し、安定な AmB-ステロール会合チャネルを形成して高いイオン透過性を示すと考えられた。さらに人工リン脂質二重膜を用いた実験から様々な構造のステロールに対する親和性が求められた。Bittman らの報告では、ステロールを 25% 含有する卵黄フォスファチジルコリン (eggPC) リポソームに対する結合定数は、コレステロール含有膜の $K_A = (5.2 \pm 1.4) \times 10^4 \text{ M}$ に対して、エルゴステロール含有膜では $K_A = (6.9 \pm 1.1) \times 10^5 \text{ M}$ であり、10 倍ほどエルゴステロール含有膜の方が親和性が高くなっている (図 2-3)¹⁹⁾。



Cholesterol (コレステロール)

$$K_A = (5.2 \pm 1.4) \times 10^4 \text{ M}$$



Ergosterol (エルゴステロール)

$$K_A = (6.9 \pm 1.1) \times 10^5 \text{ M}$$

図 2-3 哺乳類 (コレステロール) および真菌細胞 (エルゴステロール) における主要ステロール成分と AmB の結合定数 (K_A)¹⁹⁾

2-1-e AmB-ステロール会合体モデルの妥当性

AmB-ステロール会合モデルによる AmB の活性発現機構の解釈は 1980 年代にすでに提出されていた。その後、会合体の存在を直接またはシミュレーションにより証明しようとした研究は多いが、AmB とコレステロールの間に強い相互作用が認められたことはなかった。Dufourc らは DMPC 二分子膜中の ^2H 標識コレステロールの運動性を固体 NMR 測定により観測し、AmB 添加前後での ^2H 標識コレステロールの分子運動の変化から AmB との直接相互作用

用を検出しようとした。しかし、AmB の添加によって運動性が低下したのはコレステロールではなくリン脂質であり、コレステロールとの相互作用は確認できなかった^{20,21)}。また、Baginski らは分子力場 (MD) 計算により、AmB-コレステロール会合体の最安定構造を求めた。初期構造として AmB-ステロール会合モデルが設定されたにもかかわらず、AmB-コレステロール間に特異的な相互作用は見られなかった²²⁾。さらに、ステロールを含まないリン脂質二重膜中で形成される AmB チャンネルも数多く報告されており、AmB-コレステロール会合モデルの妥当性に疑問が持たれており、現在も議論が続いている²³⁻³³⁾。

2-1-f AmB-ステロール会合体モデルの形成

これまで、図 2-4 に示すような樽板モデルをもとに、AmB-ステロール会合体モデルを明らかにするための多くの研究が行われてきた。Fujii ら³⁴⁾は、AmB と脂質の割合を変えて、その UV/CD スペクトルの変化を調べ、AmB の比率が高まるほど、AmB 会合体が形成しやすくなることを見い出した。

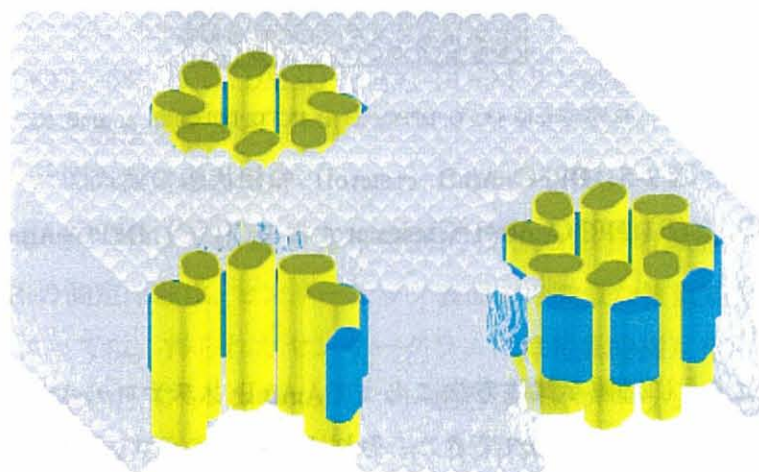
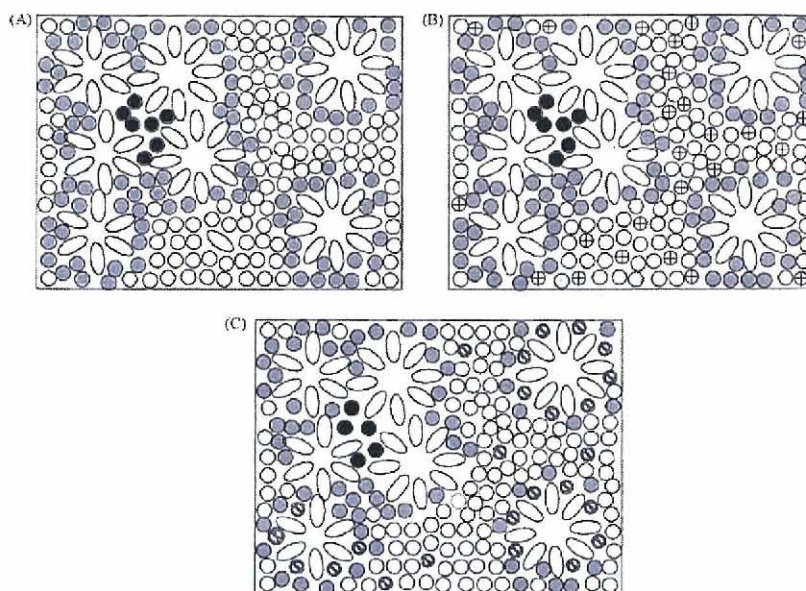


図 2-4 AmB-ステロール会合体の樽板モデル

また、Bolard ら³⁵⁾は、UV/CD スペクトルの変化とステロール含有膜での活性発現に必要な AmB 濃度を比較し、エルゴステロール含有膜 (ergosterol-eggPC) では AmB が水中で自己会合する濃度以下で活性を発現する一方、コレステロール含有膜 (cholesterol-eggPC) での活性発現には AmB が自己会合濃度以上であることが必要であることを明らかにした。

さらに、Fournier ら³⁶⁾は、FTIR スペクトルを用い、リン脂質アシル鎖の運動に由来する極大吸収のシフトを観測することにより、AmB が DPPC 膜と相互作用し、DPPC 膜中で単分子ではなく会合体として存在すること、さらにステロール選択性を明らかにした。すなわち、DPPC には 3 種類の状態が存在する。①AmB の影響を受けていない状態、②AmB 会合体付近

に位置している状態, ③AmB 会合体同士の間にはさまれている状態。コレステロールは AmB と相互作用していないが, エルゴステロールは AmB 付近に位置し, 相互作用をしているものがあることを示した (図 2-5)。



40.5°Cまたは 41.5°C DPPC (○), 42.7°Cまたは 43.5°C DPPC (◎), 45.3°C DPPC (●), AmB (○), Chol (⊗), Erg (⊙)

図 2-5 DPPC+AmB (+sterol) の相状態の模式図³⁶⁾

(A) DPPC+AmB, (B) DPPC+AmB+Cholesterol および (C) DPPC+AmB+Ergosterol

2-1-g 研究目的

以上述べてきたように, 種々試験方法によって, AmB とステロールや脂質二重膜との作用機構の解明を目指した研究が行われてきた。それにもかかわらず, いまだに AmB チャネル会合体の構造解明には至っていない。一般に, 複合体構造を解明する手段として, X 線結晶構造解析や NMR が用いられている。ところが, この AmB チャネル会合体の場合は, NMR 測定が非常に困難であり, その報告例はあまりない³⁷⁾。それは, 主に化学シフト異方性の存在および AmB-リン脂質, AmB-ステロール, およびリン脂質-ステロールの分子間相互作用が弱いことに起因する。そこで本研究では, この比較的弱い分子間相互作用を, 簡便に観測する方法として, 表面プラズモン共鳴法 (SPR) を採用することにした。すなわち, AmB とステロールの濃度を変化させた脂質二重膜や異なるステロールを含む脂質二重膜との相互作用を, 実時間で観測することにより, AmB の選択毒性や作用機構を明らかにすることを目的とし, 合わせてこのような低分子化合物と脂質二重膜との親和性評価法に最適な実験条件の確立を目指した。

2-2 表面プラズモン共鳴実験

アンフォテリシン B (AmB) と種々脂質二重膜との親和性評価および AmB の脂質二重膜に対する作用機構を解明するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いた。SPR 装置はピアコア X (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) を用い、センサーチップは市販のセンサーチップ L1 およびセンサーチップ CM5 (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いることにした。このうちセンサーチップ L1 は、金薄膜上のデキストラン層に予め脂質アンカーが固定しており、リポソーム³⁸⁾を加えることにより脂質アンカーを介してセンサーチップ上に脂質二重膜を固定化することが可能となる。続いて膜作用分子である AmB を含む溶液を添加すると、AmB-脂質二重膜間の結合及び解離に伴うセンサーチップ表面での微量な質量変化を SPR シグナルとして検出することができる。今回の実験において非特異的吸着および機械的ノイズを抑えるために、レファレンスとしてリガンド (ここでは脂質二重膜) を固定していないフローセルを用い、そこにアナライト (AmB 溶液) を添加し、測定した。これを脂質二重膜を固定したセンサーグラムから差し引いたものを使用した。特に指示のない限り、ランニングバッファーは、超音波処理により十分に脱気した 5% DMSO-PBS 緩衝溶液 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5% (v/v) DMSO を含む 10 mM リン酸緩衝溶液, pH 7.4) を用い、流速 10 μ L/min, 25°C で測定を行った。

2-2-a AmB のセンサーチップに対する非特異的吸着の影響の検証

前述の通り、SPR の測定原理は、センサーチップ表面での微量な質量変化に基づいており、添加する化合物によっては、得られたセンサーグラムには特異的相互作用に加えて、測定試料そのものによる質量変化 (バルクレスポンス) およびデキストラン層や脂質アンカーに対する非特異的吸着が含まれる場合がある。そこで、まず最初にセンサーチップ CM5 (カルボキシメチルデキストラン層) とセンサーチップ L1 (カルボキシメチルデキストラン層+脂質アンカー) を用意し、それぞれのセンサーチップに対して 20 μ M AmB 溶液を添加した。その時のセンサーグラムを図 2-6 に示した。その結果、センサーチップ CM5 において、AmB の非特異的吸着はほとんど観測されなかった (図 2-6A) のに対し、未処理のセンサーチップ L1 表面 (脂質アンカー, 図 2-6B) においては、AmB は脂質二重膜を固定化したフローセル (脂質アンカー+脂質二重膜, 図 2-6C) と同程度の非特異的吸着が観測された。この現象は、ポリエチレングリコール (PEG) のような親水性の高い化合物においては起こらないことから、センサーチップ L1 表面の脂質アンカーに対する AmB の疎水性相互作用に起因するものであると考えられる。以上の結果、センサーチップ L1 を用いた AmB の親和性評価において、レファレンスを差し引くことができないことが判明した。

したがって、AmB のセンサーチップ表面に対する非特異的な疎水性相互作用を抑制し、AmB のような疎水性が高い化合物においても、正確にレファレンスを差し引くことができるセンサーチップの作製を試みた。センサーチップ L1 は、カルボキシメチルデキストラン層にオクタデシル基 (C₁₈) を導入したセンサーチップであることが知られている³⁹⁾。そこで、疎水的相互作用を抑制するために、センサーチップ CM5 に比較的少量のドデシルアミン (C₁₂) を共有結合させた新規センサーチップ (センサーチップ C12) をアミンカップリング法により作製し、AmB の非特異的結合の影響を比較、検証した。調製したセンサーチップ C12 に AmB 溶液を添加 (図 2-6D) したところ、AmB による非特異的吸着は、センサーチップ L1 の場合 (図 2-6B) と比べて低かったが、完全に抑制することはできなかった。ドデシル基を導入したフローセルに、リポソームを添加したところ、センサーチップ L1 と同等のレスポンスでリポソームを捕捉することができた。さらに、リポソームを捕捉したフローセルに対して AmB 溶液を添加した場合、センサーチップ L1 と同等のレスポンスが得られることがわかった (図 2-6E)。また、センサーチップ C12 において、脂質二重膜固定化後、さらにリポソームを加えたが、更なるレスポンスの上昇は見られないことから、脂質二重膜の固定化の際に、ドデシル基は十分にブロックされており、AmB の脂質二重膜固定化センサーチップ表面への非特異的吸着は起こらないことが示された。以上の結果から、本研究では、市販のセンサーチップ L1 の代わりに、今回新たに作製したドデシルアミン固定化センサーチップ (サンプルセル, ドデシルアミン固定化; レファレンスセル, 未処理の CM5) を用いることにより、レファレンスを差し引いて相互作用解析を行うことにした。

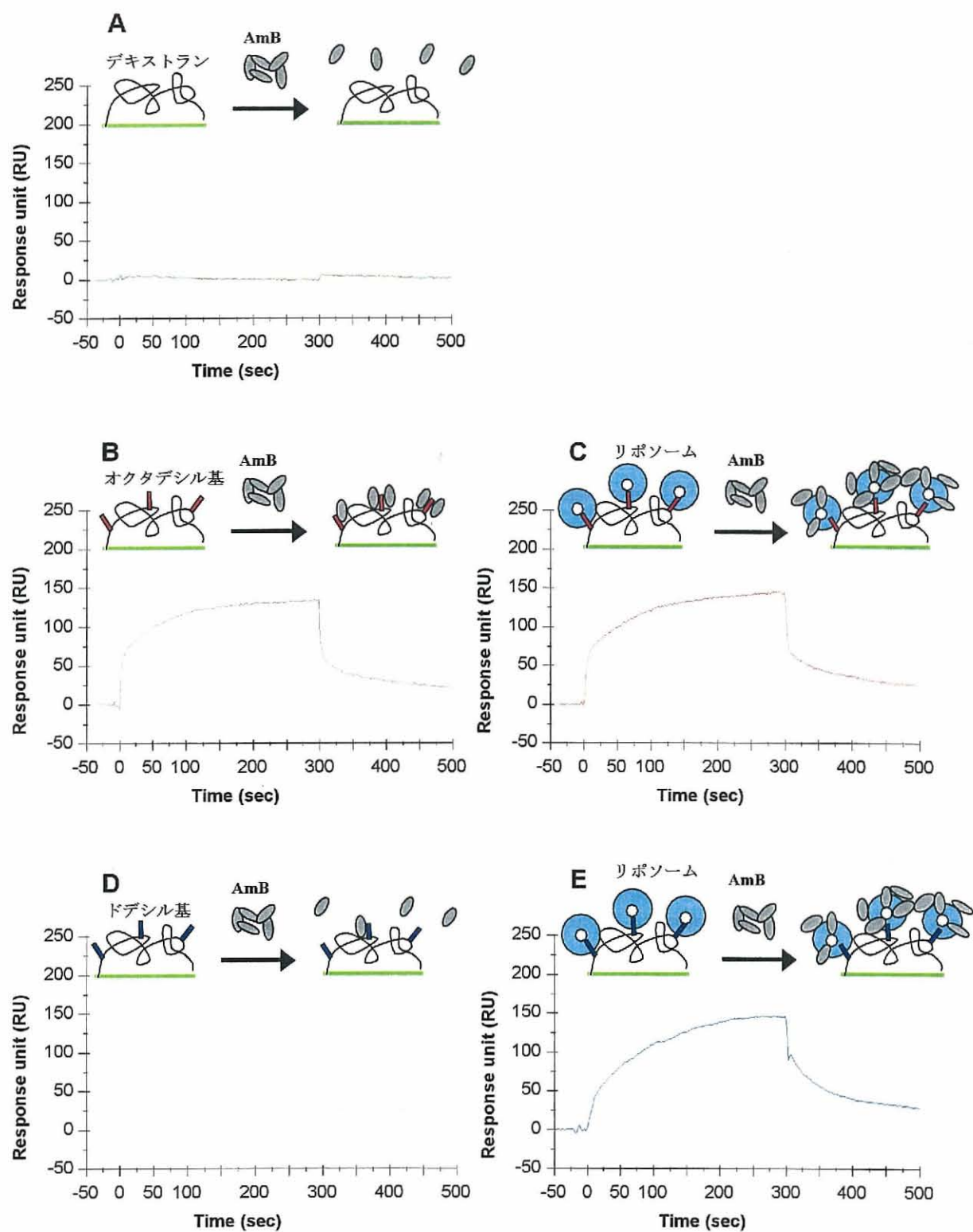


図 2-6 AmB のセンサーチップ L1 に対する非特異的結合の影響の検証 (A, 未処理のセンサーチップ CM5 ; B, 未処理のセンサーチップ L1 ; C, 脂質二重膜固定化センサーチップ L1 ; D, センサーチップ C12 および E, 脂質二重膜固定化センサーチップ C12)

2-2-b AmB とアシル鎖の異なる脂質二重膜との SPR 測定

種々のリポソーム懸濁液（脂質濃度，0.5 mM）をセンサーチップ C12 に固定化した後，0～50 μM AmB 溶液を添加した。各々脂質二重膜を固定化した際の，SPR センサーチップに対する脂質二重膜固定化量に違いが見られたので（POPC, 10,848 RU; DLPC, 5,515 RU; DMPC, 8,510 RU; DPPC, 8,102 RU; DSPC, 6,083 RU），SPR レスポンスはそれぞれ脂質二重膜 10,000 RU あたりに換算した結果を用いた。得られたセンサーグラムを図 2-7 に示した。また，AmB 添加後 100～110 秒間の平均レスポンス（RU）を縦軸に，加えた AmB 溶液の濃度（ μM ）を横軸にプロットし，各種脂質二重膜に対する AmB の結合レスポンスを比較した（図 2-8）。

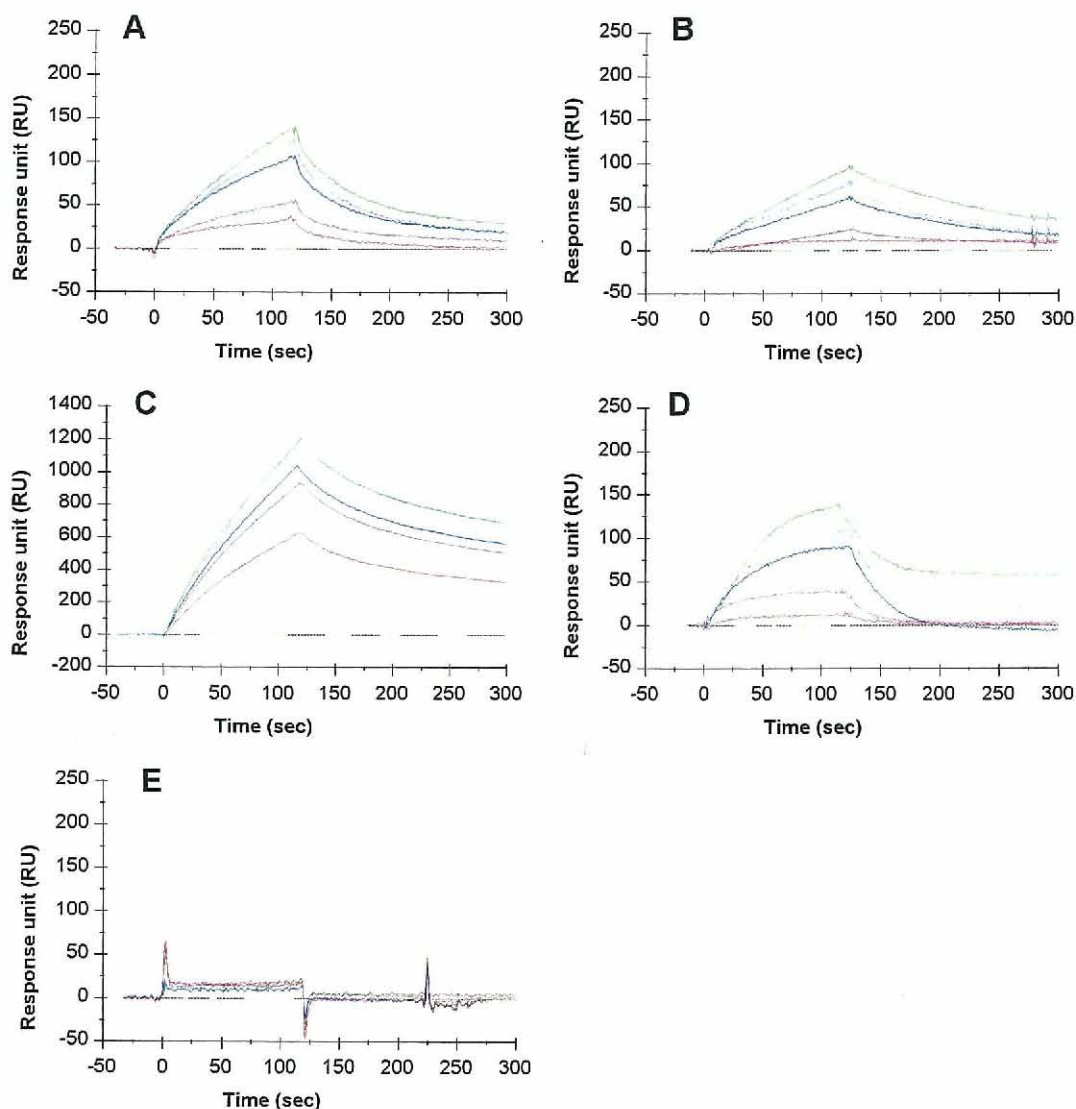


図 2-7 アシル鎖の異なる脂質二重膜に対する 0～50 μM AmB 溶液添加時のセンサーグラム（A, POPC；B, DLPC；C, DMPC；D, DPPC, DSPC 脂質二重膜。グレー，0；赤，10；マゼンタ，20；青，30；水色，40 および緑，50 μM 。縦軸のスケールが異なる。）

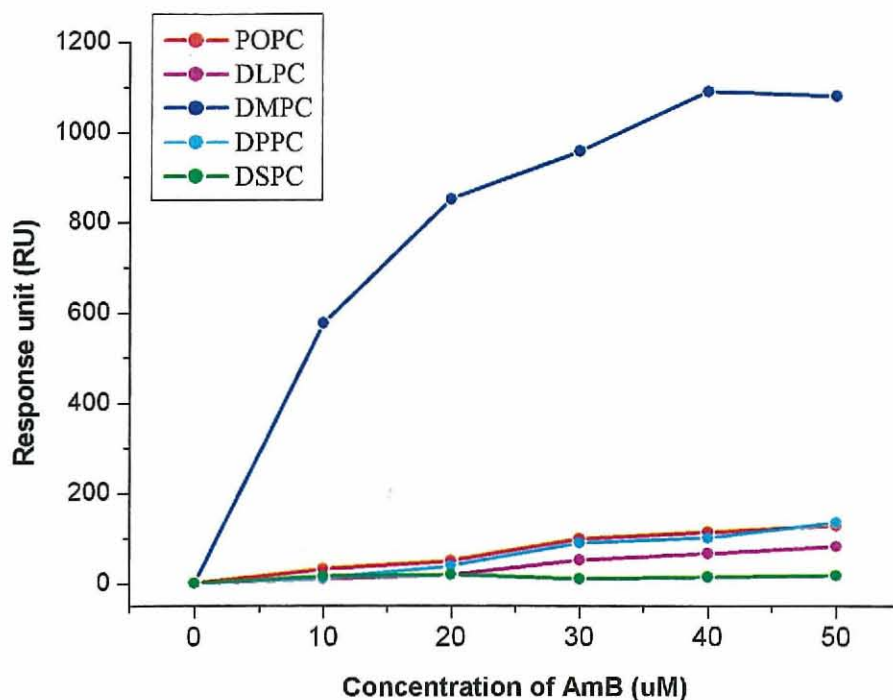


図 2-8 アシル鎖の異なる脂質二重膜に対する 0~50 μM AmB 溶液添加時のレスポンス (RU) (赤, POPC ; マゼンタ, DLPC ; 青, DMPC ; 水色, DPPC および緑, DSPC 脂質二重膜)

以上の結果, DSPC を除き AmB は添加した濃度に依存して脂質二重膜に結合することが示された。さらに AmB は $\text{DSPC (C}_{18}\text{)} \ll \text{DLPC (C}_{12}\text{)} < \text{POPC (C}_{16}, \text{C}_{18}\text{)} = \text{DPPC (C}_{16}\text{)} \ll \text{DMPC (C}_{14}\text{)}$ の順で脂質二重膜に対してより多く結合することが示された。今回使用したリン脂質は全てフォスファチジルコリン (PC) であり, このことは AmB がリン脂質のアシル鎖の違いを認識し, 脂質二重膜と相互作用する⁴⁰⁻⁴²⁾ことを示しており, 非常に興味深い結果といえる。その詳細については, 2-3 でさらに解析を行うことにする。

2-2-c AmB とステロール含有脂質二重膜との SPR 測定

2-2-b の結果から, AmB がリン脂質のアシル鎖の違いを認識し, 脂質二重膜と相互作用していることが明らかとなった。また本章序論で述べた通り, AmB はヒト細胞中に存在するコレステロールよりも真菌細胞中に存在するエルゴステロールに対して強い親和性を持つことで選択毒性を発現する。したがって, これらの作用機構を解明するために, コレステロール

あるいはエルゴステロールを含む脂質二重膜を調製し、表面プラズモン共鳴装置を用いた AmB との相互作用解析を行った。ステロール選択性を検証するために、リン脂質は AmB と強く相互作用した DMPC と、あまり強くはないが AmB 濃度依存的に相互作用した POPC を選択した。

それぞれステロール非含有脂質二重膜および 20%ステロール（エルゴステロールまたはコレステロール）含有脂質二重膜を調製した。また、POPC については、さらに 10%ステロール含有脂質二重膜もあわせて調製した。前項と同様に表面プラズモン共鳴にはピアコア X とセンサーチップ C12 を使い、ランニングバッファーとして 5% DMSO-PBS 緩衝溶液を使用した。各々 0.5 mM 脂質二重膜懸濁液をセンサーチップ C12 に捕捉した後、0~50 μ M AmB 溶液を添加した。

2-2-c1 AmB とステロール含有 POPC 脂質二重膜との SPR 測定

各々ステロール含有 POPC 脂質二重膜を固定化した際に、SPR センサーチップに対する固定化量に若干の違いが見られたので(POPC, 14,068 RU; 10%コレステロール含有 POPC, 15,457 RU; 20%コレステロール含有 POPC, 15,572 RU; 10%エルゴステロール含有 POPC, 15,061 RU; 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜, 14,836 RU) , SPR レスポンスは、それぞれ脂質二重膜 10,000 RU あたりに換算した結果を用いた。得られたセンサーグラムを図 2-9 に示した。また、図 2-9 の各々センサーグラムにおいて、AmB 添加後 550~560 秒間の平均レスポンス (RU) を縦軸に、加えた AmB 溶液の濃度 (μ M) を横軸にプロットし、比較した(図 2-10)。

図 2-9 において、AmB はそれぞれの脂質二重膜に対して濃度依存的に相互作用することが示された。また、POPC にステロールを添加することによりそのステロール含有率に比例して、脂質二重膜に対する AmB 結合量が増加することが示された。また、その効果はコレステロールよりもエルゴステロールの方が大きいことが示された。

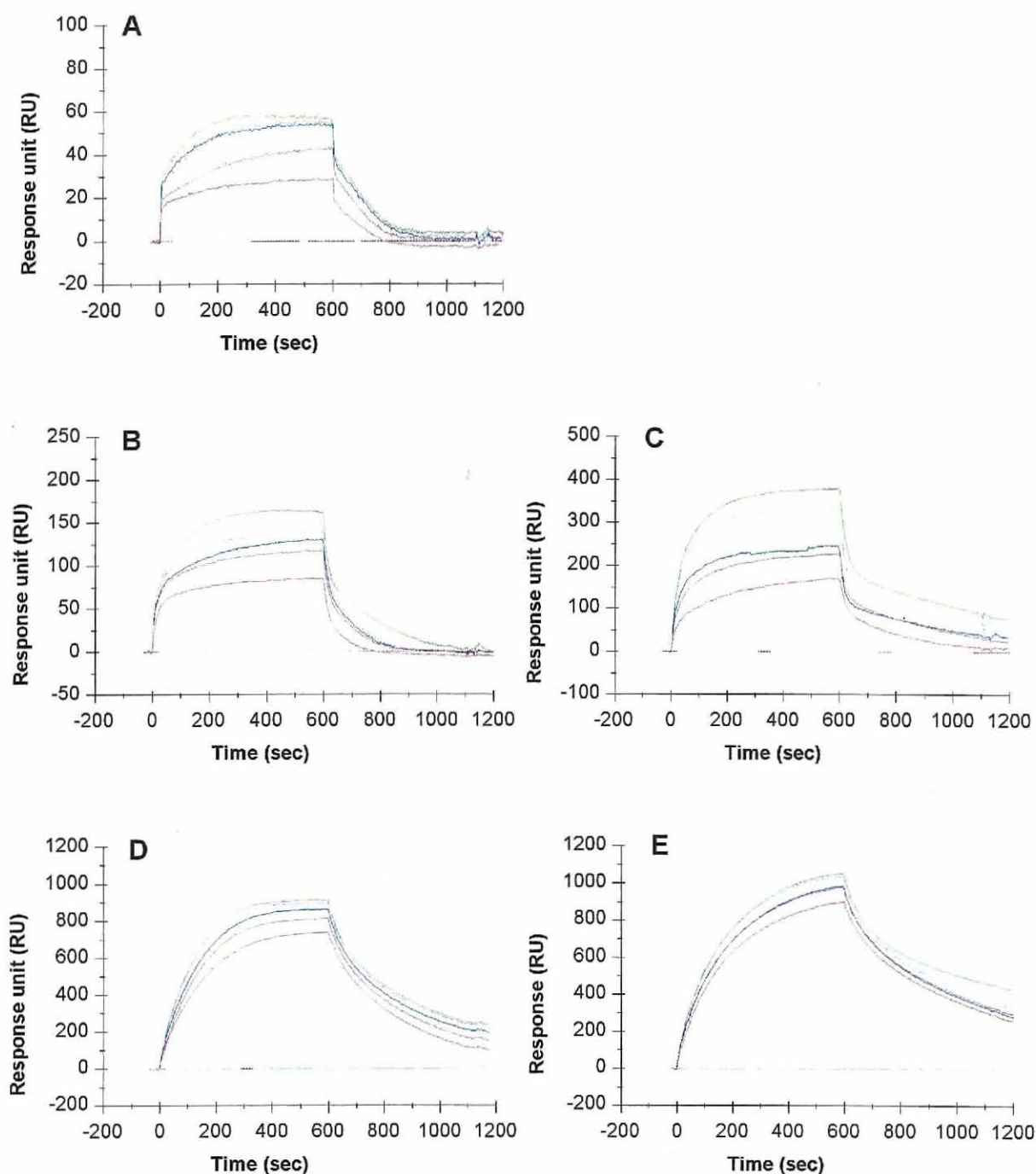


図 2-9 ステロールの種類および含有率が異なる POPC 脂質二重膜に対する 0~50 μM AmB 溶液添加時のセンサーグラム (A, POPC ; B, 10%コレステロール含有 POPC ; C, 20%コレステロール含有 POPC ; D, 10%エルゴステロール含有 POPC および E, 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜。グレー, 0 ; 赤, 10 ; マゼンタ, 20 ; 青, 30 ; 水色, 40 および 緑, 50 μM 。縦軸のスケールが異なる)

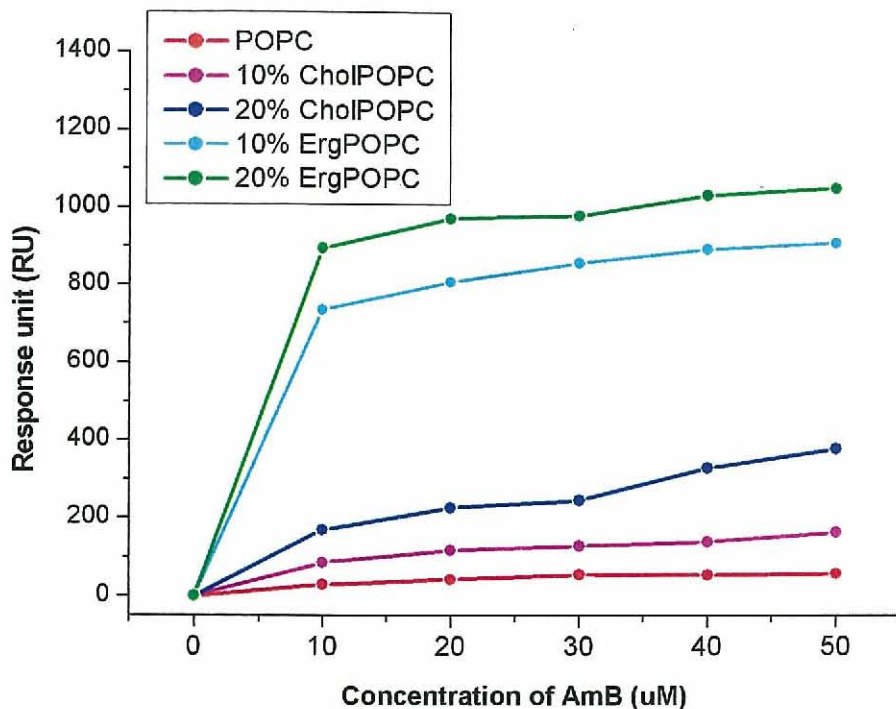


図 2-10 ステロールの種類および含有率が異なる POPC 脂質二重膜に対する 0～50 μM AmB 溶液添加時のレスポンス (RU) (赤, POPC ; マゼンタ, 10%コレステロール含有 POPC ; 青, 20%コレステロール含有 POPC ; 水色, 10%エルゴステロール含有 POPC および緑, 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜。)

2-2-c2 AmB とステロール含有 DMPC 脂質二重膜との SPR 測定

次に, DMPC に対して 20%の含有率でステロールを加えた DMPC 脂質二重膜を用いて, POPC と同じ測定条件で試験した。固定化の際に, 各々脂質二重膜に対して, 以下に示す結合量が得られたので, POPC の場合と同様に 10,000 RU に補正した (DMPC, 8,510 RU ; 20% コレステロール含有 DMPC, 11,822 RU ; 20%エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜, 10,754 RU)。得られたセンサーグラムを図 2-11 に示した。また, AmB 添加後 100～110 秒間の平均レスポンス (RU) を縦軸に, 加えた AmB 溶液の濃度 (μM) を横軸にプロットし, 比較した (図 2-12)。その結果, POPC の場合とは異なり, DMPC においてはステロールの添加により結合量が少なくなるという結果が得られた。一方ステロールの違いについては, わずかではあるが, AmB はコレステロールよりもエルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜の方に対して結合量が大きいという結果が得られた。

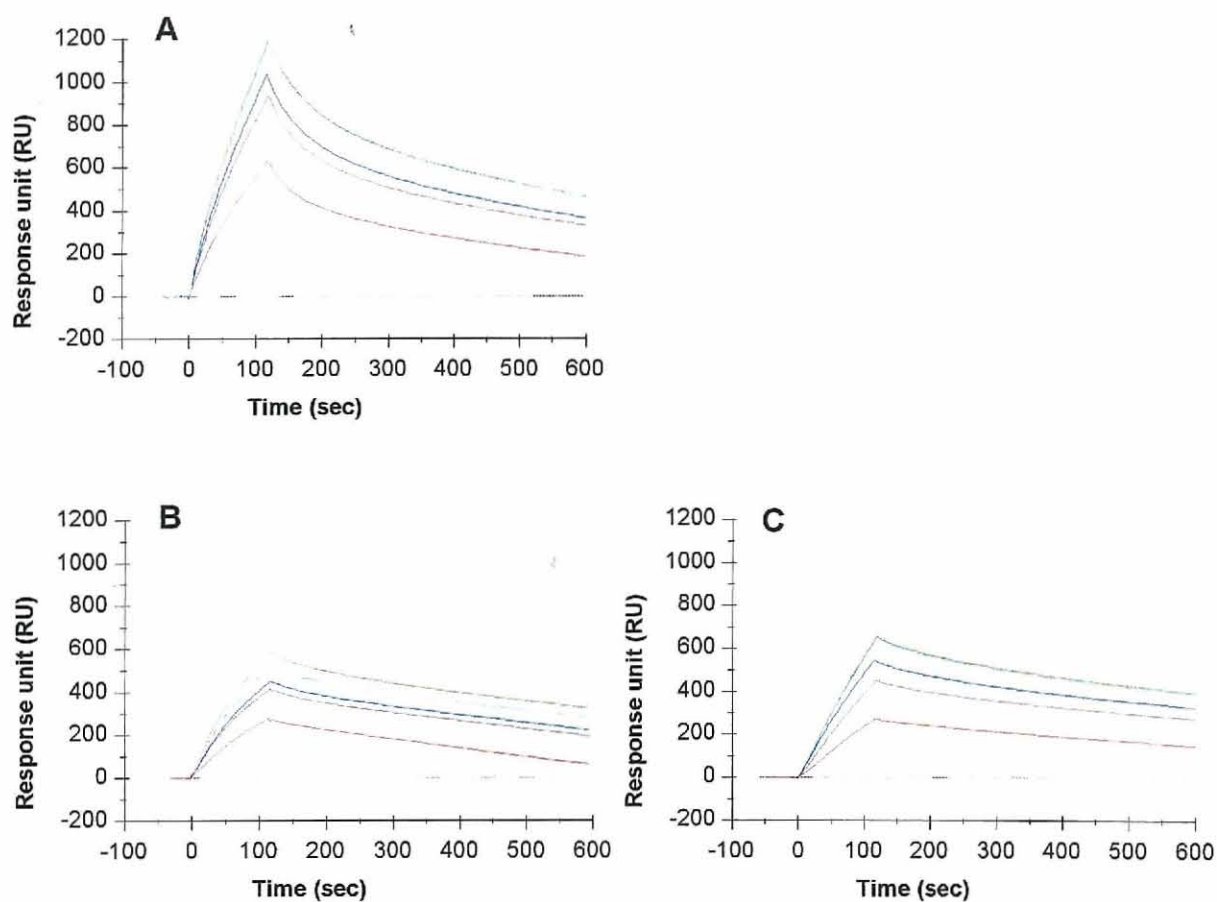


図 2-11 ステロールの種類が異なる DMPC 脂質二重膜に対する 0~50 μ M AmB 溶液添加時のセンサーグラム (A, DMPC ; B, 20%コレステロール含有 DMPC および C, 20%エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜。グレー, 0 ; 赤, 10 ; マゼンタ, 20 ; 青, 30 ; 水色, 40 および緑, 50 μ M。縦軸のスケールが異なる。)

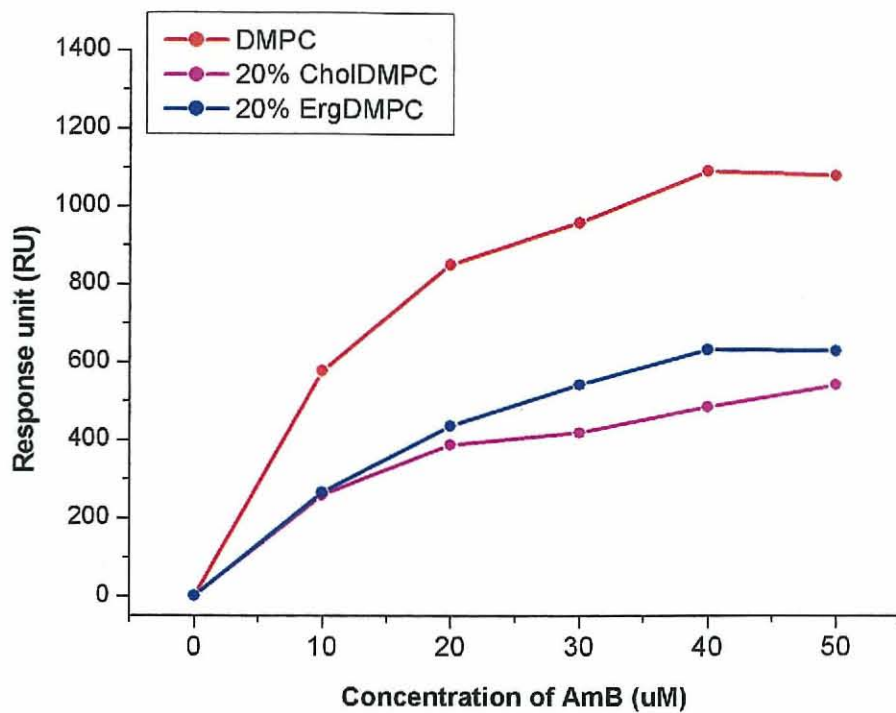


図 2-12 種類の異なるステロールを含む DMPC 脂質二重膜に対する 0~50 μM AmB 溶液添加時のレスポンス (RU) (赤, DMPC ; マゼンタ, 20%コレステロール含有 DMPC および青, 20%エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜。)

2-3 速度論的解析

2-2-c において, AmB は POPC 脂質二重膜に対してステロール選択性, すなわちステロールを含まない POPC よりもステロールを含む脂質二重膜に対して結合量が多く, その効果はエルゴステロールを含む POPC 脂質二重膜の方がコレステロールを含む POPC 脂質二重膜よりも大きいことが示された。これまで脂質二重膜中における AmB-ステロール会合体モデルとして, 図 2-4 に示した樽板モデルが広く知られているが, その会合体形成の分子機構の解明には至っていない。AmB が膜中でその毒性を発現する際には, 脂質二重膜の表面または内部と相互作用し, 膜物性の改変あるいはチャネル会合体の形成が必要である。そこで今回, AmB と脂質二重膜との相互作用において, 図 2-13 に示す 3 種類の相互作用モデルを仮定し, 先ほど得られた AmB と 20%ステロール含有および非含有 POPC 脂質二重膜との相互作用結果 (センサーグラム) をモデルフィットすることにより, 最適な相互作用モデルを推定することにした。実験の部に示す計算式を用い, 分配モデルはソフトウェア Origin® 6.1 (Originlab corporation 社製) を, また吸着および二状態反応モデルは, ソフトウェア BIAevaluation (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて理論曲線を作成した。

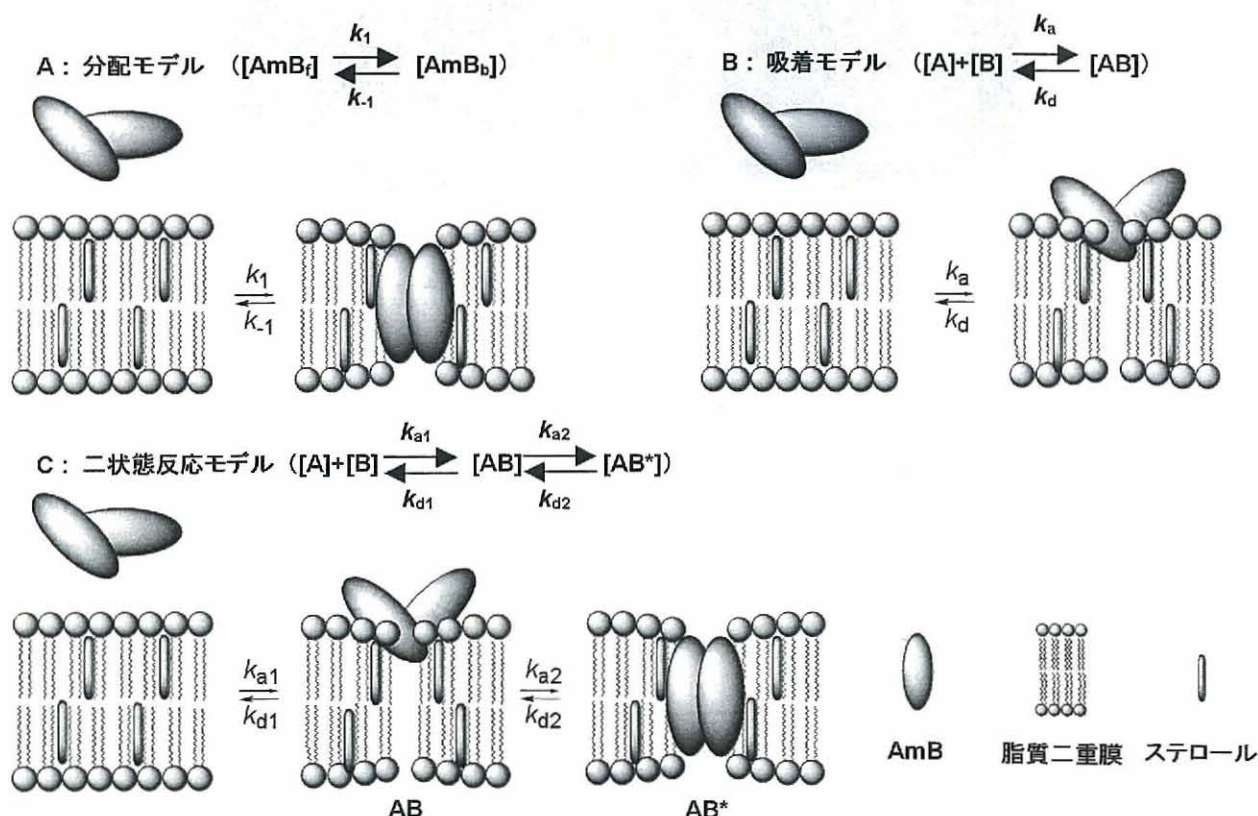


図 2-13 AmB と脂質二重膜との相互作用モデル
(A, 分配モデル; B, 吸着モデルおよび C, 二状態反応モデル)

また、それぞれの解析において、当初 AmB 濃度を変化させて得られるグローバルフィッティング法を試みたが、定量的な親和性評価には至らなかった。この原因としてそれぞれ濃度が異なる AmB 溶液中での AmB の会合状態が異なることが考えられた。したがって今回は、十分な SPR レスポンスおよび良好な S/N (signal-to-noise) 比が得られる一方で、マストランスポートリミテーション効果 (図 2-14 上、濃淡はアナライトの濃度を示す) を避けることが可能な濃度として、20 μ M AmB 溶液を試験に用いた。このマストランスポートリミテーション効果とは、アナライトのセンサーチップ表面への供給が反応の律速になっている状態をいう。具体的にはセンサーチップ上のリガンドが多過ぎる場合、アナライト濃度が薄いあるいは流速が遅い場合にこの現象が起こる。この状態で反応速度論定数を求めると実際よりも小さな値を与える。図 2-14 下にマストランスポートリミテーションが生じたセンサーグラムを示す。5 および 20 μ M AmB 溶液の場合とは異なり、1 μ M AmB 溶液において、直線的なレスポンスの上昇が得られているが、このことはアナライトの拡散速度によって、アナライトの結合に制限が掛かっていることを示唆している。

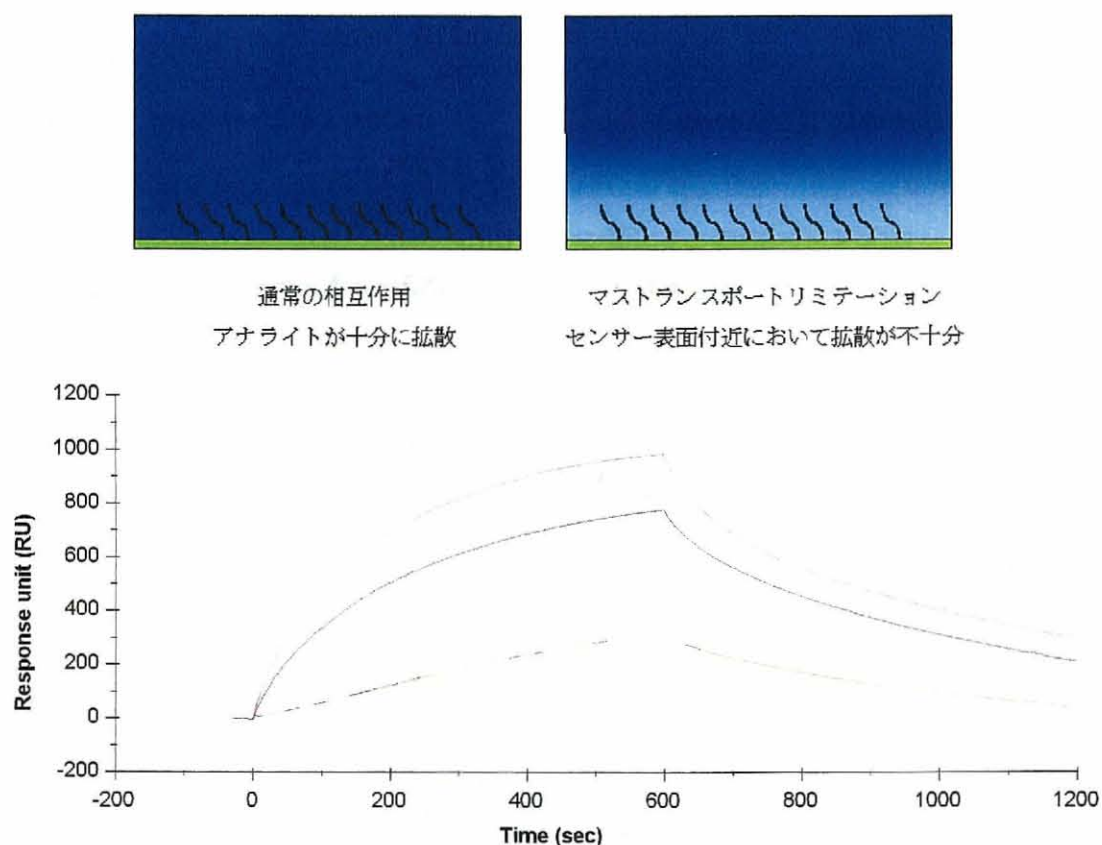


図 2-14 マストランスポートリミテーション (上: 濃淡はアナライトの濃度を示す) とマストランスポートリミテーションが生じたセンサーグラム (下: 黄, 1 μ M; 茶, 5 μ M およびマゼンタ, 20 μ M AmB と 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜とのセンサーグラム)

2-3-a 分配モデルによる解析

まず最初に、低分子薬剤と脂質二重膜との相互作用解析に、広く用いられている「分配モデル」の適用を試みた。これは、溶液中の AmB がその濃度と分配係数に比例して脂質二重膜に分配されるモデルを仮定している（図 2-13A）。図 2-15 は、ステロール非含有 POPC 脂質二重膜（A および B），20%コレステロール含有 POPC 脂質二重膜（C および D）および 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜（E および F）に対する AmB の結合を計測した SPR センサーグラムおよび理論曲線を示している（A, C および E：0～20 秒間の解析結果；B, D および F：0～500 秒間の解析結果。赤，5 μ M；青，20 μ M および緑，50 μ M AmB 溶液）。解析の結果，0～20 秒間においては，すべての脂質二重膜について分配モデルの式で良い理論曲線が得られた。AmB 溶液（20 μ M）を加えた際に得られた分配係数は，ステロール非含有 POPC 脂質二重膜に対して 110，20%コレステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して 401 および 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して 1,330 であった（表 2-2）。一方，0～500 秒間においては，その理論曲線にわずかにずれが生じた。この原因として，20 秒間においては，脂質二重膜中に AmB の結合サイトが十分に存在しているため，この分配モデルにおいて，良好な理論曲線が得られたのではないかと考えられる一方，500 秒間では，時間経過とともに結合サイトの減少が起こり，この分配モデルは結合サイトの飽和を考慮していないモデルのために，良好な理論曲線が得られなかったのではないかと考えられる。

表 2-2 分配モデルにより求めた AmB 溶液（20 μ M）添加時の速度定数および分配係数

脂質二重膜の種類	k_1	k_{-1}	k_1 / k_{-1}
POPC	48.9	0.445	110
POPC/コレステロール 8:2	26.4	0.0659	401
POPC エルゴステロール 8:2	65.9	0.0497	1,330

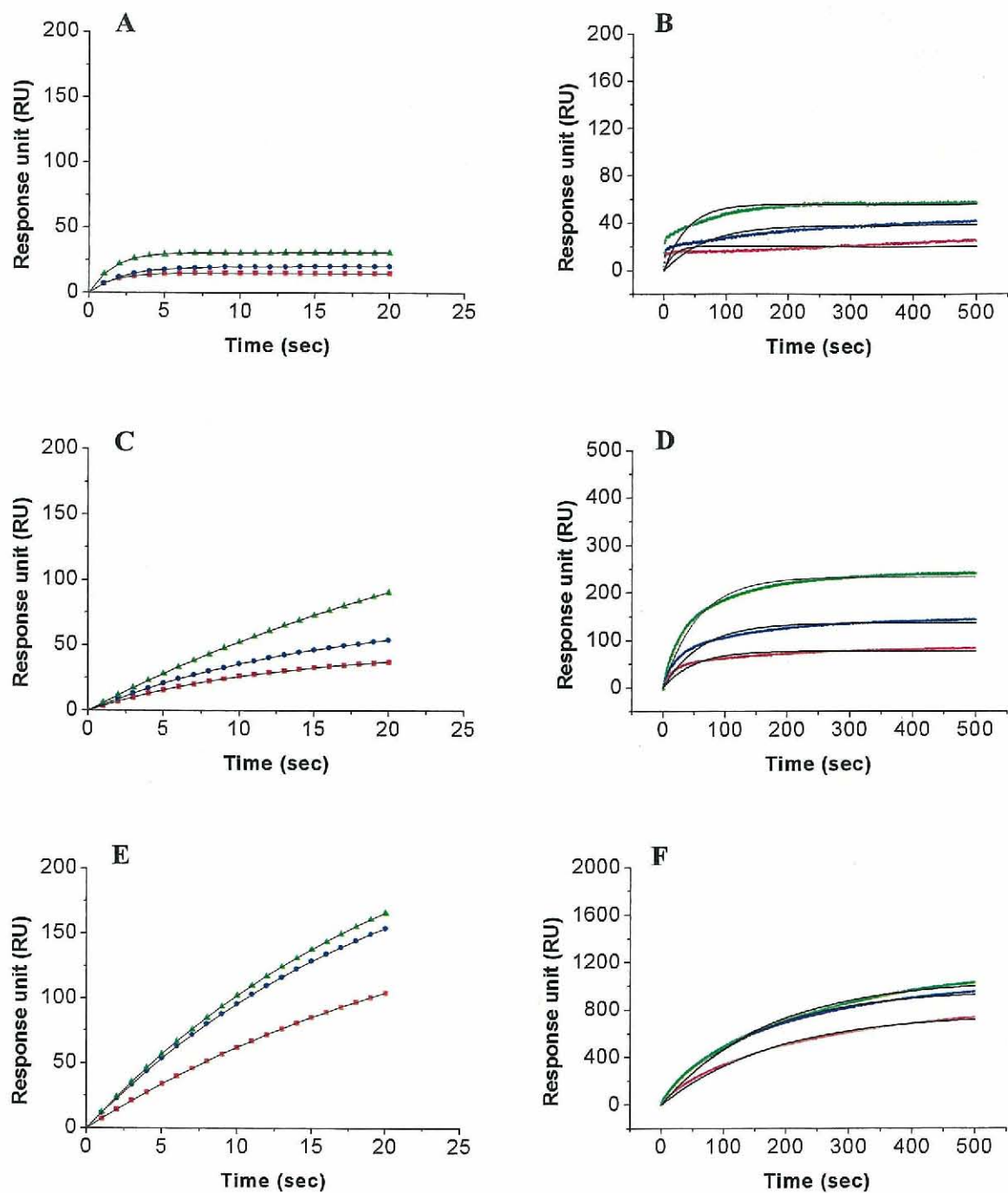


図 2-15 SPR センサーグラムおよび分配モデル解析による理論曲線。A および B, ステロール非含有 POPC 脂質二重膜; C および D, 20% コレステロール含有 POPC 脂質二重膜, E および F : 20% エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜。A, C および E : 0~20 秒間の解析結果, B, D および F : 0~500 秒間の解析結果。AmB 溶液の濃度 : 赤, 5 μM ; 青, 20 μM および 緑, 50 μM 。

2-3-b 吸着モデルによる解析

次に、図 2-13B に示した「吸着モデル」による解析を試みた。これは、有限の結合サイトが脂質二重膜に存在し、そこに溶液中の AmB が吸着するモデルを仮定している。図 2-16 は、ステロール非含有 POPC 脂質二重膜 (A)、コレステロール含有 POPC 脂質二重膜 (B) およびエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜 (C) に対する AmB の結果を計測した SPR センサーグラムと理論曲線を示す。図 2-16A のフィッティング結果から、ステロール非含有 POPC 脂質二重膜において、良好な理論曲線が得られることが示された。ところが、ステロール含有 POPC 脂質二重膜の場合は、300 秒以降の結合過程および解離過程において、良好な理論曲線は得られなかった。このことは、ステロール含有 POPC 脂質二重膜、とりわけ 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜においては、添加した AmB が脂質二重膜に吸着後、さらに状態変化を引き起こしている可能性を示唆している。

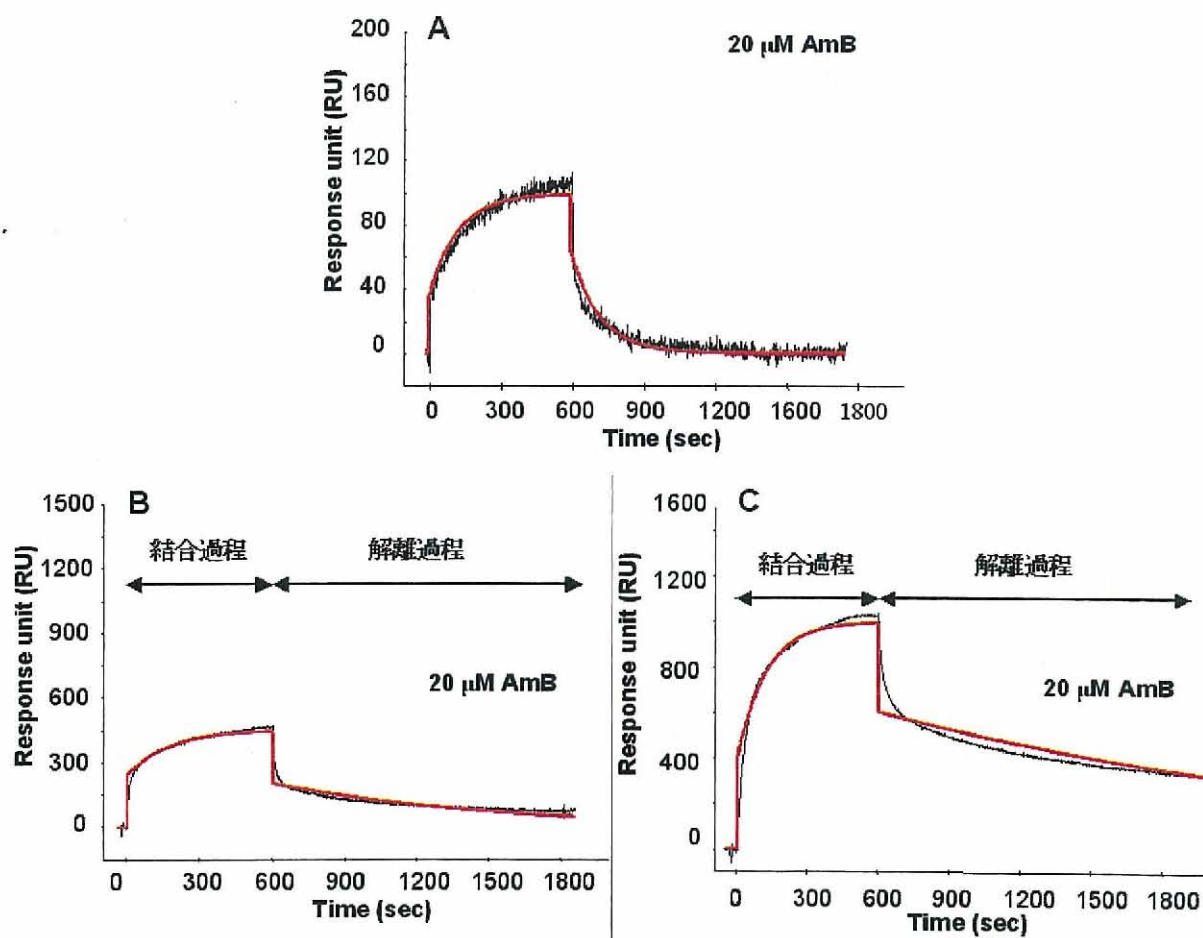


図 2-16 SPR センサーグラム (黒) と吸着反応モデル解析による理論曲線 (赤)。20 μM AmB とステロール非含有 POPC 脂質二重膜 (A)、コレステロール含有 POPC 脂質二重膜 (B) およびエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜 (C)

2-3-c 二状態反応モデルによる解析

前述の通り、AmB が脂質二重膜と相互作用し、安定な複合体を形成することが広く支持されている。また、これまでのモデルフィッティングによる解析結果から、AmB が脂質二重膜へ吸着後、更なる状態変化が起こっていることが示唆された。そこで、図 2-13C に示した「二状態反応モデル」による解析を試みた。これは、AmB が一旦脂質二重膜の表面に吸着し、中間体 AB を形成後、脂質二重膜の内部に取り込まれ、例えばイオンチャネルのような状態変化 AB* を形成するモデルを仮定している。図 2-17 は、AmB とステロール非含有 POPC 脂質二重膜 (A)、コレステロール含有 POPC 脂質二重膜 (B) およびエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜 (C) との SPR センサーグラムと理論曲線を表わしている。その結果、全ての脂質二重膜に対して良好な理論曲線との一致が認められた。

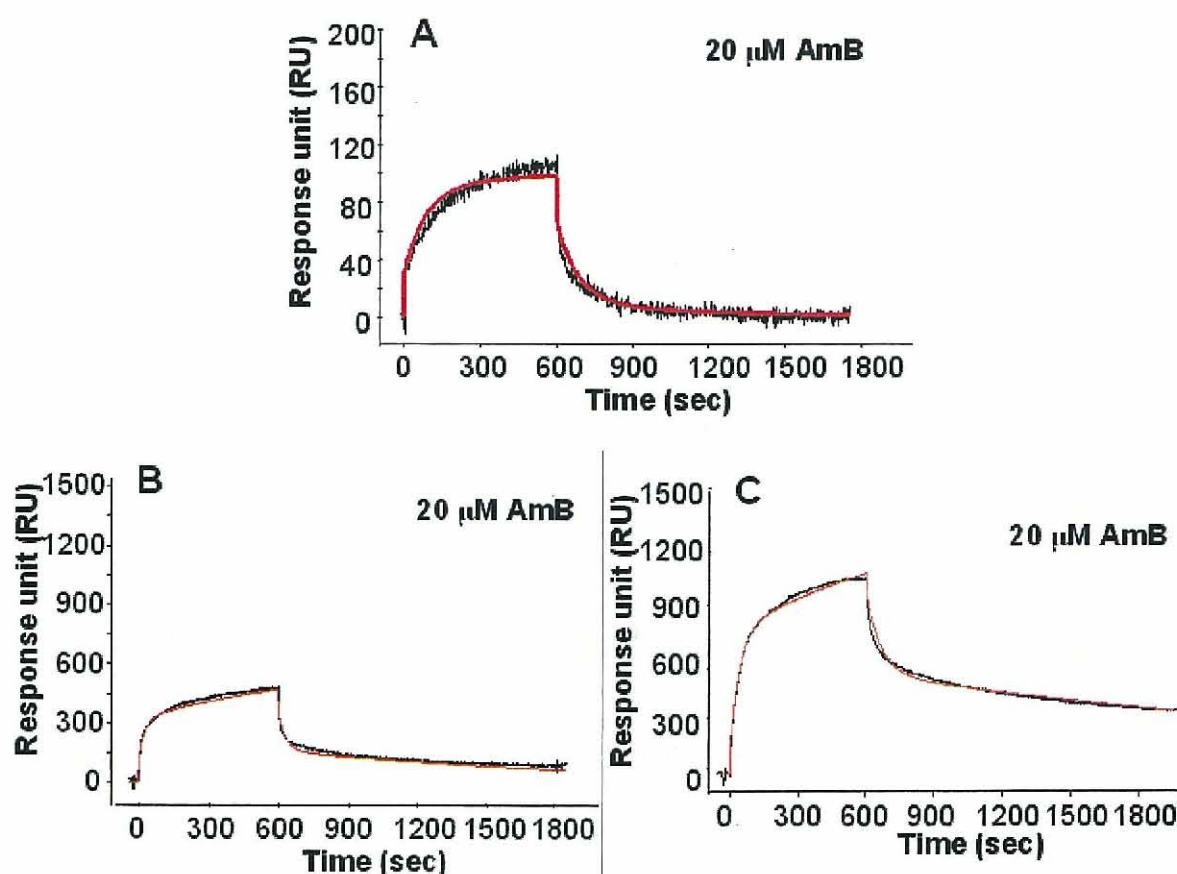


図 2-17 SPR センサーグラム (黒) と二状態反応モデル解析による理論曲線 (赤)。20 μM AmB とステロール非含有 POPC 脂質二重膜 (A)、コレステロール含有 POPC 脂質二重膜 (B) およびエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜 (C)

また、得られた理論曲線を、脂質二重膜との吸着過程 **AB** と脂質二重膜への内部化過程 **AB*** のセンサーグラムに成分分離したところ、ステロール非含有 POPC 脂質二重膜において、内部化過程がほとんど起こらないことが確認された (図 2-18A)。また、ステロール含有 POPC 脂質二重膜についても同様に、得られた理論曲線を脂質二重膜との吸着過程 **AB** と脂質二重膜への内部化過程[**AB***]のセンサーグラムに成分分離したところ、非常に高い割合で **AB*** が形成し、脂質二重膜中で AmB が安定に存在することが示唆された (図 2-18B および C)。

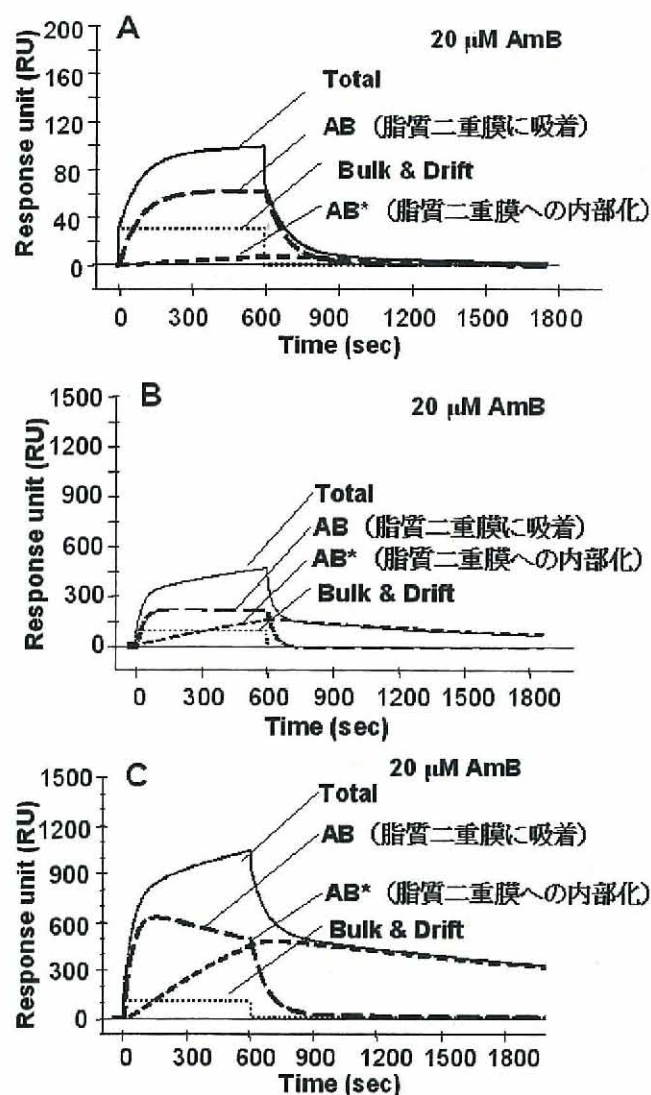


図 2-18 二状態反応モデルにおけるセンサーグラムの成分分離。AB, 脂質二重膜への吸着 ; AB*, 脂質二重膜への内部化 ; A, ステロール非含有 POPC 脂質二重膜 ; B, 20%コレステロール含有 POPC 脂質二重膜および C, 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜。Bulk&Drift; ランニングバッファーとサンプル溶液の僅かな溶媒組成の違いで生じるベースラインの変化。

2-3-d 二状態反応モデルにおける AmB と POPC 脂質二重膜との速度論的解析

以上理論曲線によるフィッティング結果から、AmB が脂質二重膜表面と相互作用し、中間体を形成した後、ステロールの効果により脂質二重膜内部へと取り込まれることが示唆された。そこで、AmB とそれぞれの POPC 脂質二重膜について得られた理論曲線から、速度論的解析を行った。表 2-3 に解析結果を示す。脂質二重膜表面への吸着過程に注目すると、結合速度定数 k_{a1} の結果から、AmB がステロール濃度に依存して脂質二重膜表面への吸着を起こし、さらにコレステロールよりもエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対してより大きな結合速度定数を持つことが確認された。その結果として、20 μM AmB 溶液中から脂質二重膜表面への結合定数 K_A は、ステロール非含有 POPC 脂質二重膜 ($2.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) よりもコレステロール含有 POPC 脂質二重膜 (10%および 20%コレステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して、 $3.48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ および $4.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) の方が大きく、またエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜 (10%および 20%エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して、 $26.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ および $44.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) の方がはるかに大きいという結果が得られた。次に、脂質二重膜への内部化過程に注目すると、結合速度定数 k_{a2} の結果から、一旦脂質二重膜内部へ取り込まれた AmB は、ステロール濃度に依存して、脂質二重膜からの解離が抑制され、さらにコレステロールよりもエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対してより小さな解離速度定数を持つことが確認された。ステロールの添加により、脂質二重膜への内部化 (k_{a2}) が促進され、またステロール濃度に依存して、膜内部からの解離が遅くなり、その結果親和性が高くなることが示された。

表 2-3 二状態反応モデルにおける AmB と POPC 脂質二重膜との速度論的解析結果

リン脂質/ステロール	$k_{a1}(\text{fMs})$	$k_{d1}(\text{fs}) \times 10^{-2}$	$K_{A1}(\text{fM}) \times 10^3$	$k_{a2}(\text{fs}) \times 10^{-4}$	$k_{d2}(\text{fs}) \times 10^{-4}$	K_{A2}	$K_A(\text{fM}) \times 10^3$
POPC	29.2	1.14	2.56	3.08 ^{*1}	18.2 ^{*1}	0.17 ^{*1}	0.44 ^{*1}
POPC/コレステロール 9:1	73.1	2.10	3.48	18.4	11.0	1.67	5.81
POPC/コレステロール 8:2	118	2.91	4.05	13.7	7.90	1.73	7.01
POPC/エルゴステロール 9:1	307	1.18	26.0	15.0	4.96	3.02	78.5
POPC/エルゴステロール 8:2	579	1.30	44.5	12.9	1.86	6.94	309

結合速度定数 k_{a1} および k_{a2} , 解離速度定数 k_{d1} および k_{d2} , 結合定数 K_{A1} (k_{a1}/k_{d1}), K_{A2} (k_{a2}/k_{d2}) および K_A ($K_{A1} \times K_{A2}$), *1: ステロール非含有 POPC 脂質二重膜においては、内部化は起こり難い。

2-3-e 二状態反応モデルにおける AmB とその他の脂質二重膜との相互作用解析

2-3-d の結果から、AmB は脂質二重膜の膜表面と一旦結合した後に、ステロールの効果により膜内部へと取り込まれ、安定化されることが示唆された。そこで次に、前に示したアシル鎖の異なる脂質二重膜 (DLPC, DMPC, DPPC および DSPC) やステロール含有 DMPC 脂質二重膜についても同様に、二状態反応モデルを用いた理論曲線を作成し、AmB の脂質二重膜に対する親和性評価を行った。ランニングバッファーには、前項と同様に 5% DMSO-PBS 緩衝溶液を用い、センサーチップ C12 のセンサー表面に各種脂質二重膜を捕捉し、20 μ M AmB 溶液を加え、得られたセンサーグラムから理論曲線を作成した。図 2-19 に 20 μ M AmB 溶液と種々脂質二重膜とのセンサーグラムおよび理論曲線を示した (A, DLPC ; B, DMPC ; C, 20%コレステロール含有 DMPC ; D, 20%エルゴステロール含有 DMPC および E, DPPC 脂質二重膜)。その結果、DSPC (レスポンスが低いため、図 2-7E) を除いて良好な理論曲線が得られた。したがって、図 2-19 に示した様々な脂質二重膜においても、POPC 脂質二重膜と同様に、AmB は二状態反応モデルで脂質二重膜と相互作用していることが示唆された。これらの理論曲線から得られた速度論的解析結果を表 2-4 に示した。

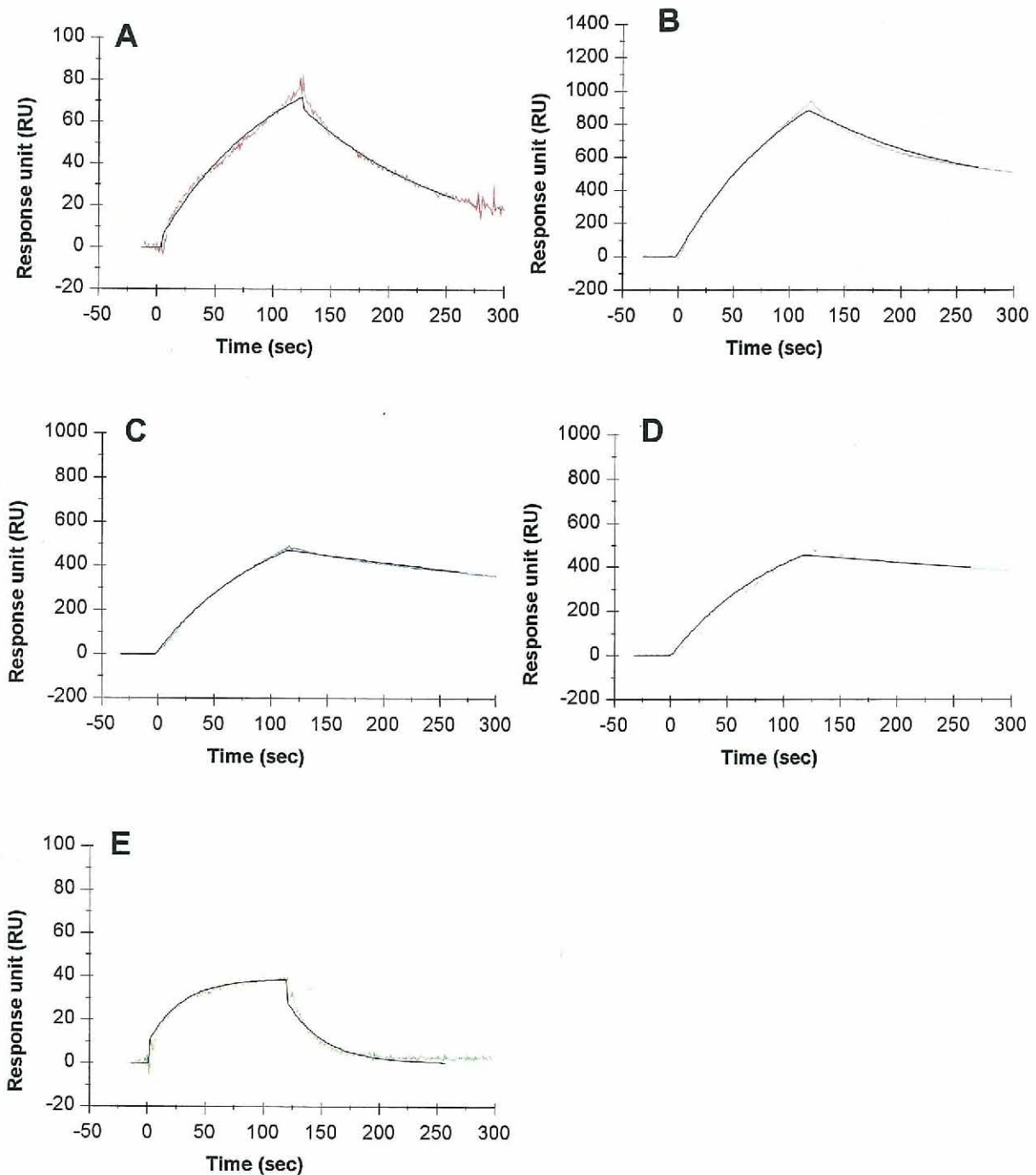


図 2-19 20 μM AmB 溶液と種々脂質二重膜とのセンサーグラムおよび理論曲線 (A, DLPC ; B, DMPC ; C, 20%コレステロール含有 DMPC ; D, 20%エルゴステロール含有 DMPC および E, DPPC 脂質二重膜)。DSPC 脂質二重膜については、レスポンスが低いため解析不可能であった。

表 2-4 二状態反応モデルにおける AmB と種々脂質二重膜との速度論的解析結果

リン脂質/ステロール	$k_{a1}(\text{fMs})$	$k_{d1}(\text{fs}) \times 10^{-2}$	$K_{A1}(\text{fM}) \times 10^3$	$k_{a2}(\text{fs}) \times 10^{-4}$	$k_{d2}(\text{fs}) \times 10^{-4}$	K_{A2}	$K_A(\text{fM}) \times 10^3$
DLPC	62.1	0.36	17.3	<0.02	-	-	-
DMPC	247	0.46	114	18.2	0.14	130	14,800
DMPC/コレステロール 8:2	371	0.15	247	0.42	1.82	0.23	56.8
DMPC/エルゴステロール 8:2	442	0.10	441	1.30	0.12	10.8	4,760
DPPC	161	3.11	44.5	<0.02	-	-	-

結合速度定数 k_{a1} および k_{a2} , 解離速度定数 k_{d1} および k_{d2} , 結合定数 K_{A1} (k_{a1}/k_{d1}), K_{A2} (k_{a2}/k_{d2}) および K_A ($K_{A1} \times K_{A2}$)。DSPC については、レスポンスが低いため、解析不可能であった。また、DLPC および DPPC については、結合速度定数 k_{a2} が低いため、膜内部化過程は解析不可能であった。

以上の結果から、AmB のアシル鎖の分子長が異なる脂質二重膜 (DLPC, DMPC, DPPC および DSPC) に対する速度論的解析結果を比較すると、膜表面への吸着時の結合定数 K_{A1} および膜内部への取込み時の結合定数 K_{A2} は共に、DMPC が非常に高く、特に膜内部への取込み時の結合定数 K_{A2} は他の脂質二重膜と比べて 1,000 倍以上高い親和性が観測された。また、DLPC および DPPC については、結合速度定数 k_{a2} が低いため、膜内部化過程の解析は不可能であった。なお、DSPC については、レスポンスが低いため解析不可能であった。

この親和性の傾向は、結合量とほぼ一致している。また、POPC の場合と同様にステロール非含有 DMPC 脂質二重膜と 20%コレステロール含有 DMPC 脂質二重膜および 20%エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜について比較したところ、膜表面への吸着過程においては、POPC の場合と同様にステロール含有脂質二重膜の方が高い親和性を示し (k_{a1} , k_{d1} および K_{A1} 全てにおいて), またエルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜の方がコレステロール含有 DMPC 脂質二重膜と比べてより高い親和性を示した (K_{A1} ; ステロール非含有 DMPC 脂質二重膜 $114 \times 10^3/\text{M} < 20\% \text{コレステロール含有 DMPC 脂質二重膜 } 247 \times 10^3/\text{M} < 20\% \text{エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜 } 441 \times 10^3/\text{M}$)。ところが、膜内部への取り込み過程においては、ステロール含有 DMPC 脂質二重膜は、ステロール非含有 DMPC 脂質二重膜と比べて非常に取り込みが遅く、また取り込まれた AmB は素早く解離するという結果が得られ、その影響はエルゴステロールよりもコレステロールの方が顕著であった。

2-4 考 察

従来は、センサーチップ L1 を用いて、脂質二重膜と膜作用ペプチドとの相互作用解析が研究されてきた⁴³⁻⁴⁵⁾。本研究において、SPR を用いて簡便な脂質二重膜と生体分子の相互作用解析を試みた結果、センサーチップ L1 では AmB についてはその疎水性の高さの問題から、レファレンスセルへの結合が生じ、正確な相互作用解析を行うことができなかった(図 2-20)。そこで、センサーチップ CM5 のフローセル 2 のみにドデシル基を導入したセンサーチップを作製することにより、その問題を解決することができた(図 2-21)。このセンサーチップ C12 に対する POPC 脂質二重膜の固定化は、 $15,800 \pm 100$ RU であり、繰り返し再現性においても問題はなかった。ただし、リン脂質の種類が異なる脂質二重膜を固定した場合、その固定化量に違いが観測されたので、固定化量を全て 10,000 RU に換算して、相互作用解析を行った。また速度論的解析には、レスポンスの安定性およびマストランスポートリミテーション(図 2-13)を考慮した結果、 $20 \mu\text{M}$ AmB 溶液について、解析を行うことにした。

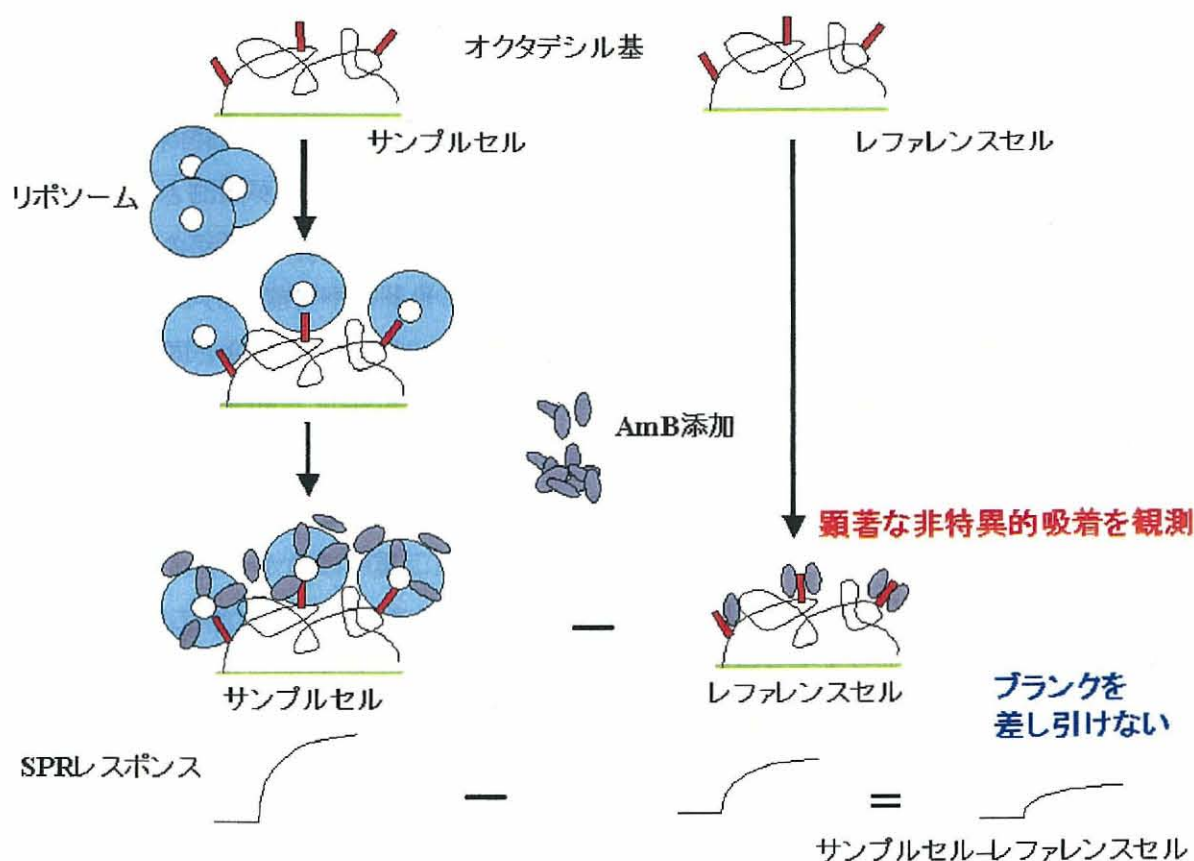


図 2-20 センサーチップ L1 の非特異的吸着の影響

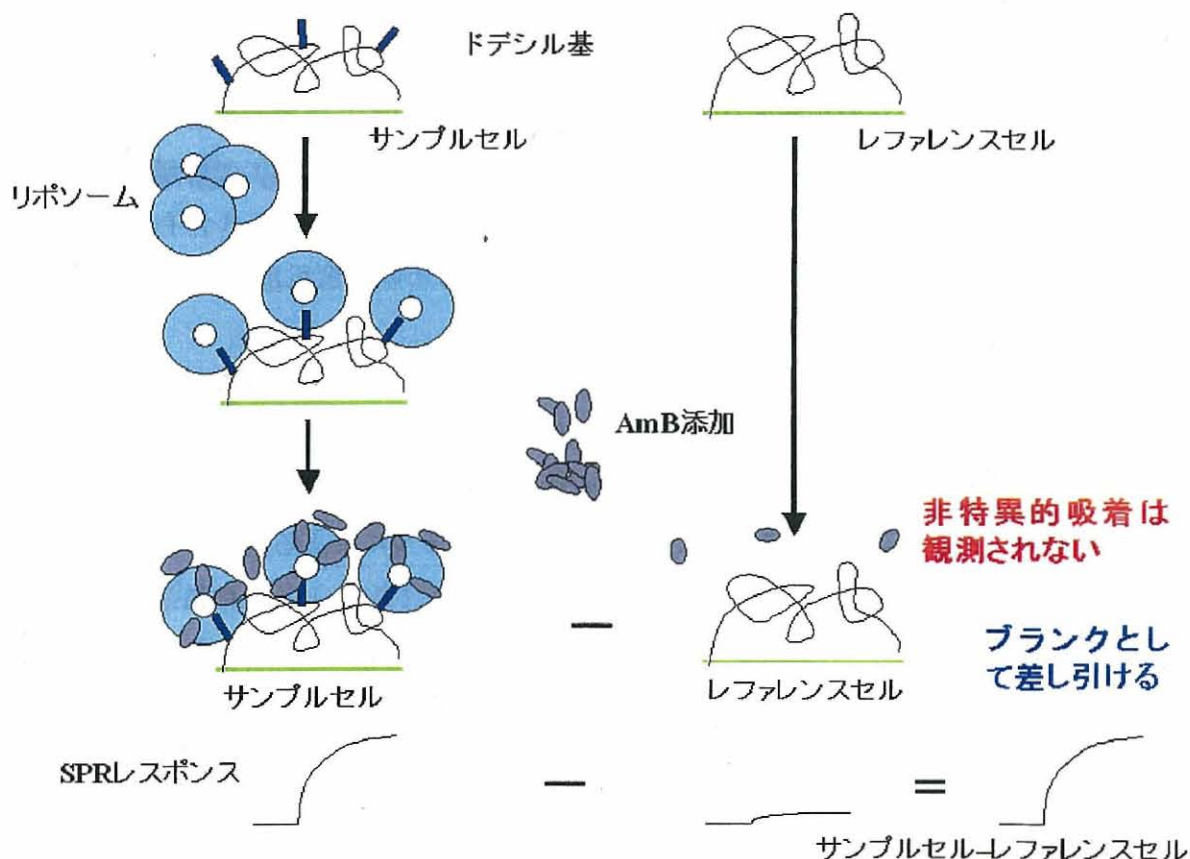


図 2-21 ドデシル基を導入した CM5 (C12) の非特異的吸着の影響

次に、この新規センサーチップを用いて、リン脂質選択性を検証した。すなわち、同じリン脂質ヘッドグループ（フォスファチジルコリン基、PC）を持ち、それぞれリン脂質のアシル鎖の長さおよび種類が異なる脂質二重膜 {DLPC (C₁₂) , DMPC (C₁₄) , DPPC (C₁₆) , DSPC (C₁₈) , POPC (C₁₆/C₁₈) } を調製し、SPR センサーチップに捕捉した。このセンサーチップに AmB 溶液を添加したところ、DMPC >> DPPC = POPC > DLPC >> DSPC の順に高いレスポンスが得られた（図 2-7 および図 2-8）。

そこで次に、高いレスポンスが得られた DMPC とレスポンスは低いが濃度依存性が得られた POPC を用い、ステロール選択性を検証した。まずは POPC 脂質二重膜について、図 2-14 に示した 3 種類の相互作用モデルを仮定しモデルフィッティングを行った。分配モデルは、一般に低分子薬剤と膜との相互作用解析に広く採用されている。その結果、0～20 秒間でモデルフィッティングした場合理論曲線との良好な一致が認められたが、長時間（500 秒間）でモデルフィッティングした場合は良好な一致は認められなかった（図 2-15）。この原因として、分配係数が AmB の膜への結合量に依存していることが考えられるが、しかしこの分配

モデルは分配係数の変化を考慮していないために、良好な理論曲線が得られなかったのではないかと推定した。そこで次に、AmB が有限の結合サイトに吸着するモデル（吸着モデル）で解析したところ、ステロール非含有 POPC 脂質二重膜について、理論曲線との良好な一致が認められたのに対し、ステロール含有 POPC 脂質二重膜においては、特に解離過程においてフィッティングにずれが生じた（図 2-16）。このことから、ステロール含有 POPC 脂質二重膜において、AmB は脂質二重膜内表面に吸着後、更なる状態変化が起こることによって、膜への親和性が増大していることが示唆された。

最近、センサーチップ L1 を用いて、膜作用ペプチドであるメリチンと脂質二重膜間の相互作用解析が行われ、メリチンはまず静電的相互作用により膜表面と相互作用した後、疎水部位を膜内部に挿入し、その結果、膜にポアを形成するという二状態反応モデルによる解析結果が報告された⁴³⁾。そこで本研究においても、二状態反応モデルによる解析を試みたところ、良好な理論曲線が得られ、速度定数の算出が可能となった（表 2-3）。その結果、脂質二重膜表面への吸着過程では、ステロール濃度に依存して、脂質二重膜に対する吸着が促進され、またコレステロールよりもエルゴステロール含有脂質二重膜との親和性が高いことが確認された。また、内部化過程に注目すると、ステロールの添加により、脂質二重膜への内部化が促進され、またステロール濃度に依存して、膜内部からの解離が遅くなり、その結果、親和性が高くなることが明らかとなった。SPR 測定は、25℃で実施しており、この測定温度において POPC 脂質二重膜は無秩序液体 (l_d) 相である。このときステロールが含まれると、その PC アルキル鎖の秩序は増加することが知られている（図 2-22）⁴⁶⁾。また過去の研究から、AmB は無秩序液体 (l_d) 相よりも秩序液体 (l_o) 相に対して高い親和性を有することが知られている^{33,47)}。したがって、ステロールの添加による濃度依存的な親和性の増加は、相状態の変化が原因の一つであると考えられる。また、これらステロールは 3 β 位にヒドロキシ基を有していることから、これが膜表面に向いている場合、ステロールの添加により AmB の脂質二重膜表面への吸着時の親和性が増大したと考えられる。また、エルゴステロール添加による、特に膜内部化過程における顕著な親和性の増加は、UV/CD スペクトル測定⁴⁷⁻⁵⁰⁾やカリウムイオン透過活性試験⁵¹⁾の結果と良く一致している。エルゴステロールがコレステロールよりも AmB との相互作用が大きい原因は、そのわずかな構造上の違いにある。すなわち、エルゴステロールはコレステロールと比べて不飽和結合を多く有し、AmB ヘプタエン部位とのファンデルワールス相互作用が大きいためであると考えられる^{37,50,52-54)}。

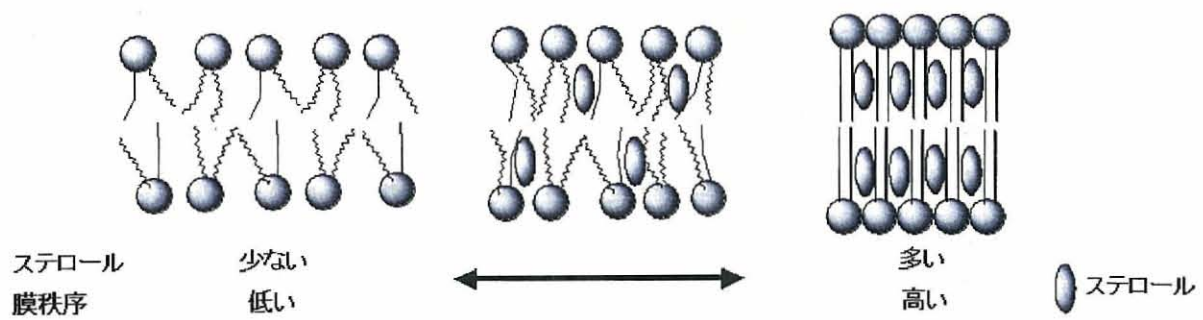


図 2-22 ステロール添加による脂質二重膜の相状態の変化

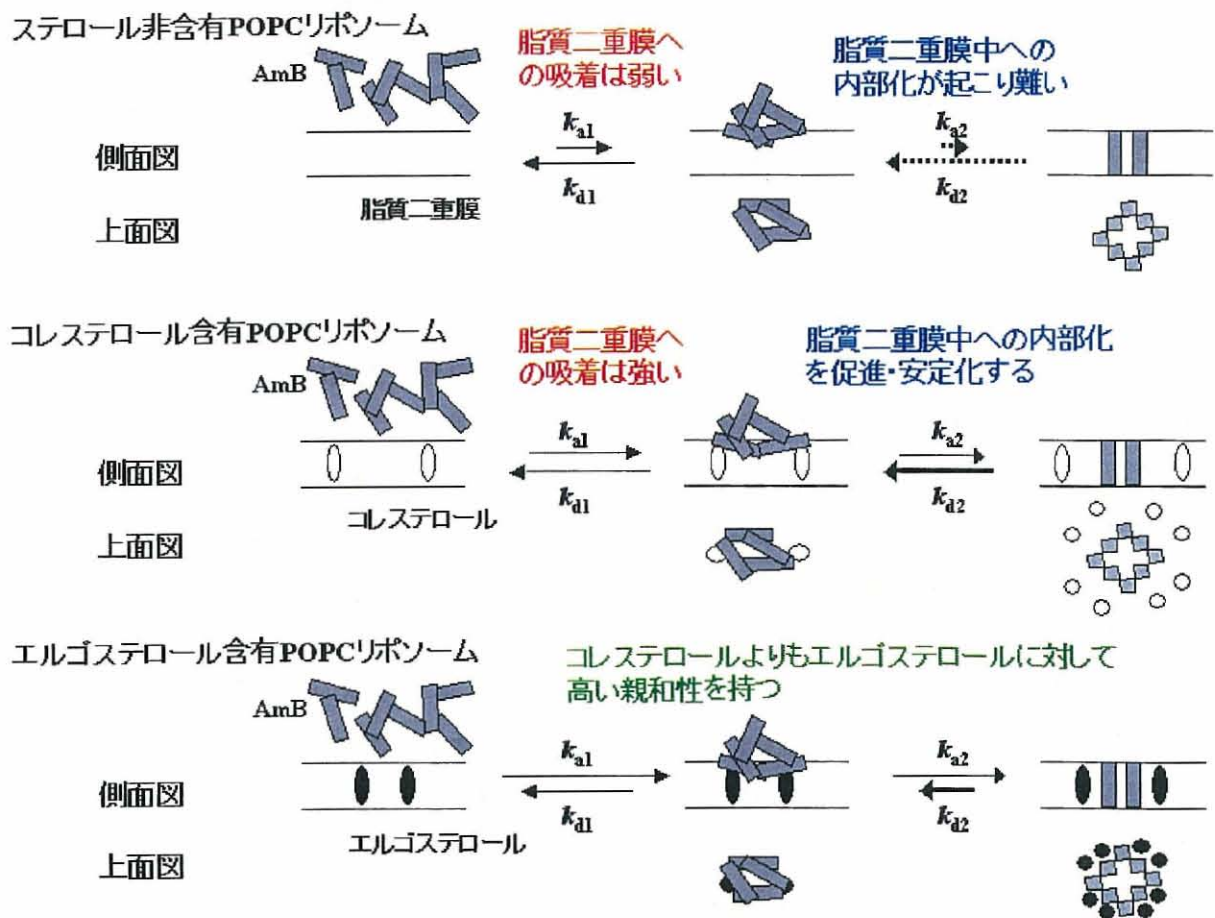


図 2-23 AmB と POPC 脂質二重膜との相互作用機構の推定

以上の結果, AmB の POPC 脂質二重膜との相互作用機構を図 2-23 のように推定した。すなわち, ステロール非含有 POPC 脂質二重膜においては, 脂質二重膜の表面への吸着は弱く, さらに脂質二重膜中への内部化もほとんど起きないと考えられる。一方, ステロール含有 POPC 脂質二重膜では, 膜表面への吸着は促進され, またステロールは脂質二重膜中への内

部化を促進することによって膜からの解離を抑制し、その安定化に寄与している。その効果はコレステロールよりもエルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜の方が大きい。

以上の結果を踏まえ、ヘッドグループは共通のフォスファチジルコリン基 (PC) を持ちアシル鎖の分子長のみが異なる脂質二重膜 (DLPC, DMPC, DPPC および DSPC) についても同様に、二状態反応モデルで理論曲線を作成し、速度論的解析を行ったところ、膜表面への吸着時の結合定数 K_{A1} および膜内部への取込み時の結合定数 K_{A2} は共に、DMPC 脂質二重膜において高く、特に脂質二重膜中への内部化の結合定数 K_{A2} は他の脂質二重膜と比べて非常に高い親和性が観測された (DLPC および DPPC は膜内部への取り込みは殆ど起こらない、DSPC は解析不可能)。この原因として、二分子膜の相状態と疎水領域の長さが考えられる。表 2-5 に二分子膜の疎水領域の長さを示した^{55,56)}。二分子膜の疎水領域の長さと親和性の関係を図 2-24 に示した。AmB 分子の長軸方向は約 24 Å であるが、ヘプタエン疎水領域は 22 Å である³⁵⁾。したがって、DMPC 二分子膜の疎水領域長とほぼ一致していることから、膜を貫通したとき非常に強い親和性を持つことが示唆される。DLPC においては二分子膜の疎水領域の長さが短すぎるため、膜内部との相互作用 (K_{A2}) は弱いと考えられる。また POPC においては幾分二分子膜の疎水領域の長さが長いため、わずかな膜内部との相互作用 (K_{A2}) が観測され、さらに DPPC および DSPC においては、二分子膜の疎水領域の長さが長過ぎるため、膜内部との相互作用 (K_{A2}) はほとんど起こらなかったと推定している。

また、POPC の場合と同様にステロール非含有 DMPC 脂質二重膜と 20%コレステロール含有 DMPC 脂質二重膜および 20%エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜について比較したところ、膜表面への吸着過程においては、POPC の場合と同様に、ステロール含有脂質二重膜の方が高い親和性を示し (k_{a1} , k_{d1} および K_{A1} 全てにおいて)。これは、ステロールの添加により相状態の秩序が高くなったこと⁴⁶⁾、およびステロールの 3 β 位のヒドロキシ基を有していることから、これが膜表面に面し、AmB の脂質二重膜表面への吸着時の親和性が増大したと考えられる。一方、膜内部化過程において、その親和性はステロール非含有 DMPC 脂質二重膜が最も高く、次いでエルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜、コレステロール含有 DMPC 脂質二重膜と続く。これには幾つかの要因が重なっていると考えられる。まず、第一に POPC の場合と同様にステロールの添加により AmB の脂質二重膜に対する親和性が高められ、その効果はファンデルワールス力に起因^{37,50,52-54)}し、エルゴステロールの方がコレステロールよりも高い親和性を示していると考えられる。ところが、実際の親和性はステロール非含有 DMPC 脂質二重膜が最も高く、エルゴステロール含有 DMPC 脂質二重膜、コレステロール含有 DMPC 脂質二重膜の順に親和性は下がっている。これは、二分子膜の疎水領域の長さで説明できる。すなわち、ステロール非含有 DMPC 脂質二重膜の疎水領域の長さは、最も AmB の疎水領域

の長さとも一致しており、AmB は非常に安定して脂質二重膜中に存在していると考えられる。ところが、ステロールを添加することにより、この疎水領域の長さが一致していた DMPC 分子はステロールに押し退けられ、またステロールの添加により、脂質二重膜の疎水領域の長さは長くなり、親和性が減少したと考えられる。これらの効果が組み合わさった結果、POPC の場合とは異なるステロールの効果が発現したと考えられる。また、この DMPC へのステロール添加による AmB 親和性の減少は、Dufourc らによる、コレステロール含有 DMPC 脂質二重膜に対する AmB の添加によって運動性が低下したのがコレステロールではなくリン脂質であったという報告と一致している^{20,21)}。

表 2-5 AmB または二分子膜の疎水領域の長さ

AmB または二分子膜	疎水領域の長さ (Å)
AmB	22
POPC (16:0, 18:1)	25.8
DLPC (12:0)	19.5
DMPC (14:0)	23
DPPC (16:0)	26
DSPC (18:0)	29.5

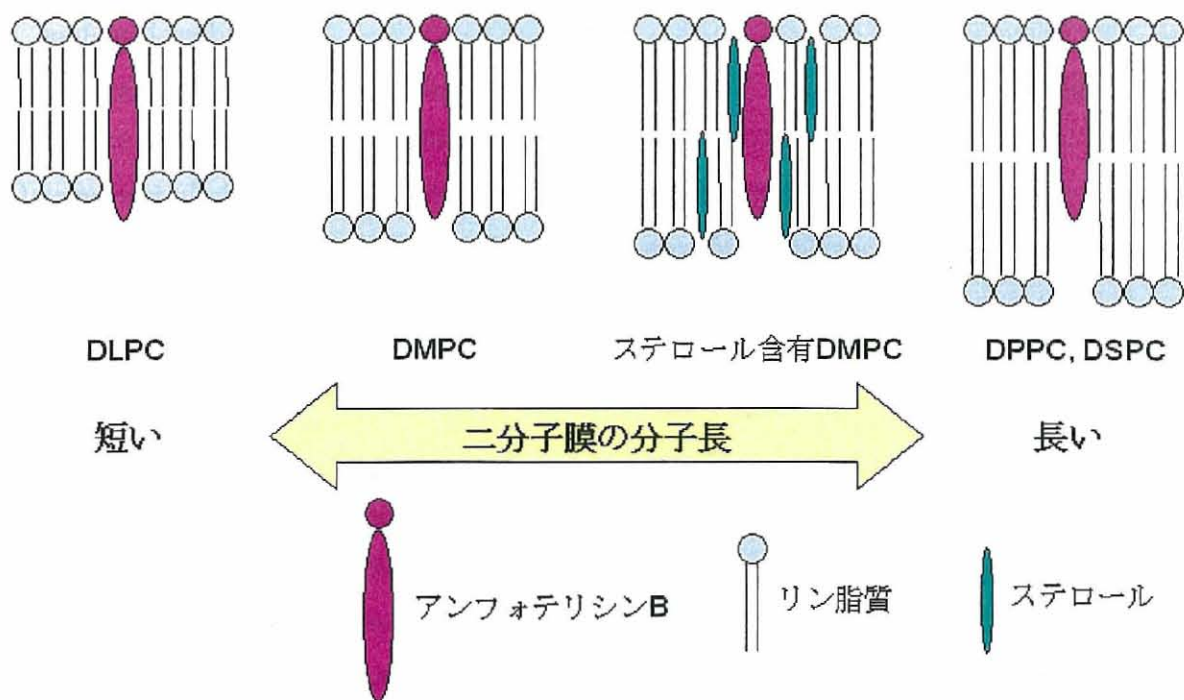


図 2-24 二分子膜の疎水領域の長さと親和性の関係

2-5 結 論

- ドデシル基を導入したセンサーチップを作製することによって、アンフォテリシン B の脂質膜以外への吸着を軽減し、この新規センサーチップを用いたアンフォテリシン B の脂質二重膜に対する親和性評価を可能にした。
- アンフォテリシン B と脂質二重膜との相互作用機構についての速度論的解釈に成功し、アンフォテリシン B が一旦脂質二重膜の表面に吸着した後、膜内部化を起こすことにより、二状態反応モデルで相互作用していることを推定した。
- 上記センサーチップを用いて、脂質二重膜中におけるステロール選択性を定量的に評価し、特に内部化過程において、アンフォテリシン B がステロール非含有 POPC 脂質二重膜やコレステロール含有 POPC 脂質二重膜と比べて、エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して親和性が高いことを明らかにした。
- アシル鎖が異なる脂質二重膜中において、アンフォテリシン B の内部化の起こりやすさと二分子膜の疎水領域長の関連性を調べ、アンフォテリシン B と脂質二重膜の疎水領域長の一致が、内部化過程における親和性に重要であることを明らかにした。

参考文献

- 1) Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. *Clin. Microb. Rev.* **1999**, *12*, 501-517. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.
- 2) Hartsel, S. C.; Bolard, J. *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *12*, 445-449. Amphotericin B: new life for an old drug.
- 3) Gallis, H. A.; Drew, R. H.; Pickard, W. W. *Rev. Infect. Dis.* **1990**, *12*, 308-329. Amphotericin B: 30 years of clinical experience.
- 4) Barnes, R. A.; Johnson, E. M.; Odds, F. C. (Eds). *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, suppl. S1, 31-36.
- 5) Dupont, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, suppl. S1, 31-36.
- 6) Szoka, F. C.; Tang, M. J. *Liposome Res.* **1993**, *3*, 363-375. Amphotericin B formulated in liposomes and lipid based systems: a review.
- 7) Deray, G. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, suppl. S1, 37-41. Amphotericin B nephrotoxicity.
- 8) Utz, J. P.; Treger, A. *Ann. Int. Med.* **1959**, *51*, 1220-1229. The current status of chemotherapy of systemic fungal disease.
- 9) Kinsky, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1962**, *USA* *48*, 1049-1056. Nystatin binding by protoplasm and a particulate fraction of *Neurospora crassa*, and a basis for the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics.
- 10) Lampen, J. O.; Arnow, P. M.; Borowska, Z.; Laskin, A. I. *J. Bact.* **1962**, *84*, 1152-1160. Location and role of sterol at nystatin-binding sites.
- 11) Lampen, J. O. *Sym. Soc. Gen. Microbiol.* **1966**, *16*, 111-130. Interference by polyenic antifungal antibiotics (especially nystatin and filipin) with specific membrane functions. In biochemical studies of antimicrobial drugs.
- 12) Kinsky, S. C.; Luse, S. A.; Van Deenen, L. L. M. *Fed. Proc.* **1966**, *25*, 1503-1510. Interaction of polyene antibiotics with natural and artificial membrane systems.
- 13) Cass, A.; Finkelstein, A.; Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 100-124. The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B.
- 14) De Kruijff, B.; Gerritsen, W. J.; Oerlemans, A.; Van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 30-43. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes I Specificity of membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics.

- 15) Ganis, P.; Auitabile, G.; Meclinski, W.; Scaffer, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564.
Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the *N*-iodoacetyl derivative.
- 16) Andreoli, T.E. *Kidney Int.* **1973**, *4*, 337-345. On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes.
- 17) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57-70. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complex.
- 18) Archer, D. B.; Gale, E. F. *J. Gen. Microbiol. capli.* **1975**, *90*, 187-190. Antagonism by sterols of the action of amphotericin and filipin on the release of potassium ions from *Candida albicans* and *Mycoplasma mycoides* subsp.
- 19) Josephine, D. R.; Robert, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219-224. Equilibrium binding of amphotericin B and methyl ester and borate complex to sterols.
- 20) Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P. *Biochemistry* **1985**, *24*, 2420-2424. ²H NMR Evidence for antibiotic-induced cholesterol immobilization in biological model membranes.
- 21) Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P.; Jarrell, H. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *776*, 317-329. Amphotericin and modelmembranes: the effect of amphotericin B on cholesterol-containing systems as viewed by ²H-NMR.
- 22) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. A. *Molecular Pharmacol.* **1997**, *52*, 560-570. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation.
- 23) HsuChen, C. C.; Feingold, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *51*, 972-978. Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: effect of cholesterol and fatty acyl chains.
- 24) Van Hoogevest, P.; De kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *511*, 397-407. Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine.
- 25) Milhaud, J.; Hartmann, M.; Bolard, J. *Biocimie* **1989**, *71*, 49-56. Interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with model membranes: differences between small and large unilamellar vesicles.
- 26) Whyte, B. S.; Peterson, R. P.; Hartsel, S. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 609-614. Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol-free vesicles.
- 27) Hartsel, S. C.; Benz, S. K.; Peterson, R. P.; Whyte, B. S. *Biochemistry* **1991**, *30*, 77-82. Potassium selective amphotericin B channels are predominant in vesicles regardless of sidedness.
- 28) Cohen, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1108*, 49-58. A sequential mechanism for the

formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition.

- 29) Wolf, B. D.; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1238*, 156-162. Osmotic stress sensitizes sterol-free phospholipid bilayers to the action of amphotericin B.
- 30) Cohen, B. E. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 95-106. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels.
- 31) Ruckwardt, T.; Scott, A.; Scott, J.; Mikulecky, P.; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1372*, 283-288. Lipid and stress dependence of amphotericin B ion selective channels in sterol-free membranes.
- 32) Cotero, B. V.; Rebolledo-Antunez, S.; Ortega-Blake, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1375*, 43-51. On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel.
- 33) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 429-434. Cholesterol markedly reduces ion permeability induced by membrane-bound amphotericin B.
- 34) Fujii, G.; Chang, J. E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayer.
- 35) Bolard, J.; Legrand, P.; Heitz, F.; Cybulska, B. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5707-5715. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium.
- 36) Fournier, I.; Barwicz, J.; Auger, M.; Tancrede, P. *Chemistry and Physics of Lipids* **2008**, *151*, 41-50. The chain conformational order of ergosterol- or cholesterol-containing DPPC bilayers as modulated by amphotericin B: a FTIR study.
- 37) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185. Self-assembled amphotericin B is probably surrounded by ergosterol: biomolecular interactions as evidenced by solid-state NMR and CD spectra.
- 38) MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B.M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L. *Biochim. Biophys. Acta*. **1991**, *1061*, 297-303. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles.
- 39) Mohri, I.; Taniike, M.; Okazaki, I.; Kagitani-Shimono, K.; Aritake, K.; Kanekiyo, T.; Yagi, T.; Takikita, S.; Kim, H-S.; Urada, Y.; Suzuki, K. *J. Neurochemistry* **2006**, *97*, 641-651. Lipocalin-type prostaglandin D synthase is up-regulated in oligodendrocytes in lysosomal storage diseases and binds gangliosides.
- 40) Mozsolits, H.; Wirth, H-J.; Werkmeister, J.; Aguilar, M-I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1512*,

- 64-76. Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance.
- 41) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2003**, *1617*, 109-115. Membrane permeabilizing activity of amphotericin B is affected by chain length of phosphatidylcholine added as minor constituent.
- 42) Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3882-3884. Amphotericin B-phospholipid covalent conjugates: dependence of membrane-permeabilizing activity on acyl-chain length.
- 43) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614. Membrane interaction of amphotericin B as single-length assembly examined by solid state NMR for uniformly ¹³C-enriched agent.
- 44) Papo, N.; Shai, Y. *Biochemistry* **2003**, *42*, 458-466. Exploring Peptide Membrane Interaction Using Surface Plasmon Resonance: Differentiation between Pore Formation versus Membrane Disruption by Lytic Peptides.
- 45) Abdiche, Y. N.; Myszka, D. G. *Anal. Biochem.* **2004**, *328*, 233-243. Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore.
- 46) Hubbell, W. L.; McConnell, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 314-326. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes.
- 47) Coutinho, M.; Prieto, M. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 2541-2547. Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study.
- 48) Castanho, M. A. R. B.; Prieto, M.; Jameson, D. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1419*, 1-14. The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: a fluorescence pressure dependence study.
- 49) Bolard, J.; Vertut-Croquin, A.; Cybulska, B. E.; Gary-Bobo, C. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *647*, 241-248. Transfer of the polyene antibiotic amphotericin B between single-walled vesicles of dipalmitoylphosphatidylcholine and egg-yolk phosphatidylcholine.
- 50) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667-10675. Mycosamine orientation of amphotericin B controlling interaction with ergosterol: sterol-dependent activity of conformation-restricted derivatives with an amino-carbonyl bridge.
- 51) Matsumori, N.; Umegawa, U.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565-3567. Bioactive fluorinated derivative of amphotericin B.
- 52) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63-78. Comparative

- molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels.
- 53) Baran, M.; Mazerski, J. *Biophys. chem.* **2002**, *95*, 125-133. Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water.
- 54) Langlet, J.; Berges, J.; Caillet, J.; Demarret, J-P. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1191*, 79-93. Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols.
- 55) Nezil, F. A.; Bloom, M. *Biophys. J.* **1992**, *61*, 1176-1183. Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes.
- 56) Dumas, F.; Lebrun, M. C.; Tocanne, J. F.; *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 271-277. Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions?

第3章 梯子状ポリエーテルと膜タンパクとの相互作用解析

3-1 序 論

3-1-a 梯子状ポリエーテル化合物

シガテラは、カリブ海、太平洋、インド洋のサンゴ礁海域で発生する主に魚類による食中毒であり、その症状は下痢を主体とする消化器系の症状、知覚神経障害、血圧降下や脈拍の減少に見られる循環器症状の三つに分けられる。世界的な患者発生数は毎年 4.6 万件に及ぶと推定され、自然毒食中毒としては世界最大の規模であり、現在でも公衆衛生および水産業に多大な被害を与え続けている。この食中毒の原因物質として、脂溶性のシガトキシン類 (ciguatoxin, CTX, 図 3-1)¹⁻⁴⁾、また藻食魚による中毒に関与すると考えられている水溶性のマイトトキシン (maitotoxin, MTX, 図 3-2)^{5,6)}が単離、構造決定された。これらは、渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* や *Gambierdiscus polynesiensis* などの二次代謝産物であり、食物連鎖の過程で蓄積され、食中毒は藻食魚および肉食魚いずれでも発生する。なお、*G. toxicus* は CTX3C, CTX4A, CTX4B を産生し、CTX1B は CTX4A, CTX4B が食物連鎖を介し、代謝の過程で酸化されて生成すると考えられている⁷⁾。

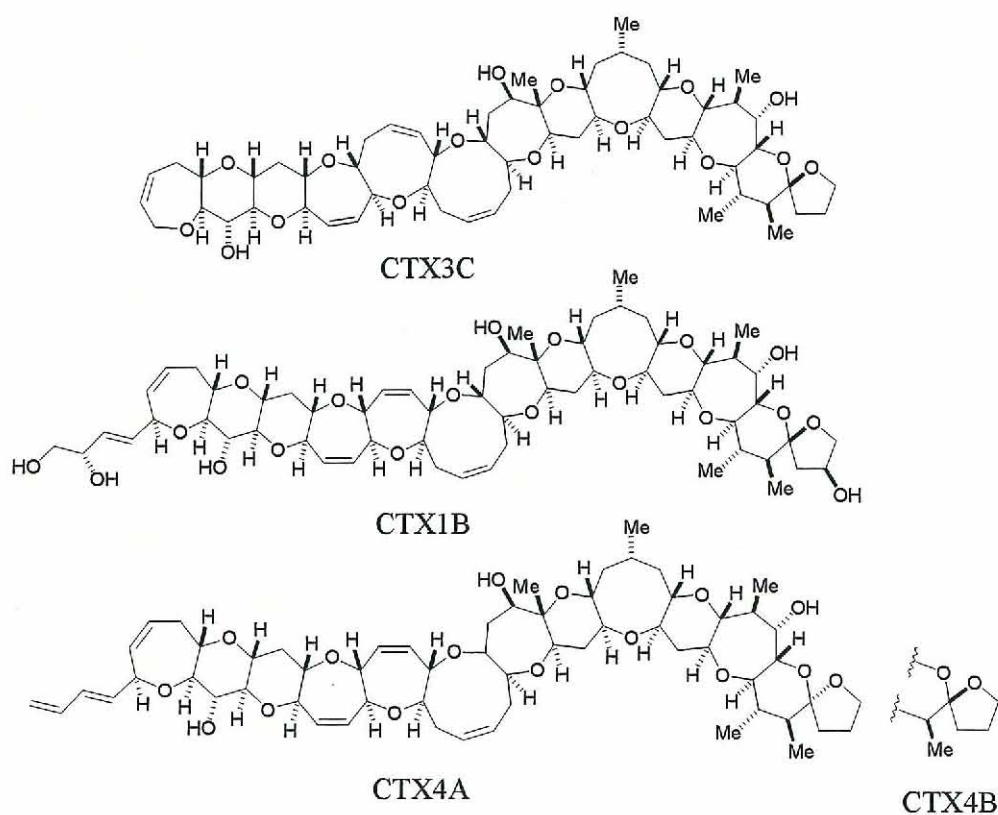


図 3-1 シガトキシン類の化学構造

一方、*G. toxicus* からは CTX 類, MTX 以外に、アンフォテリシン B (amphotericin B, AmB) の 2000 倍もの強力な抗カビ活性を有するガンビエル酸 (gambieric acid)^{8,9)}、神経毒性を有するガンビエロール (gambierol)¹⁰⁻¹²⁾などが単離・構造決定されているが (図 3-2)、シガテラ中毒との関連は明らかではない。

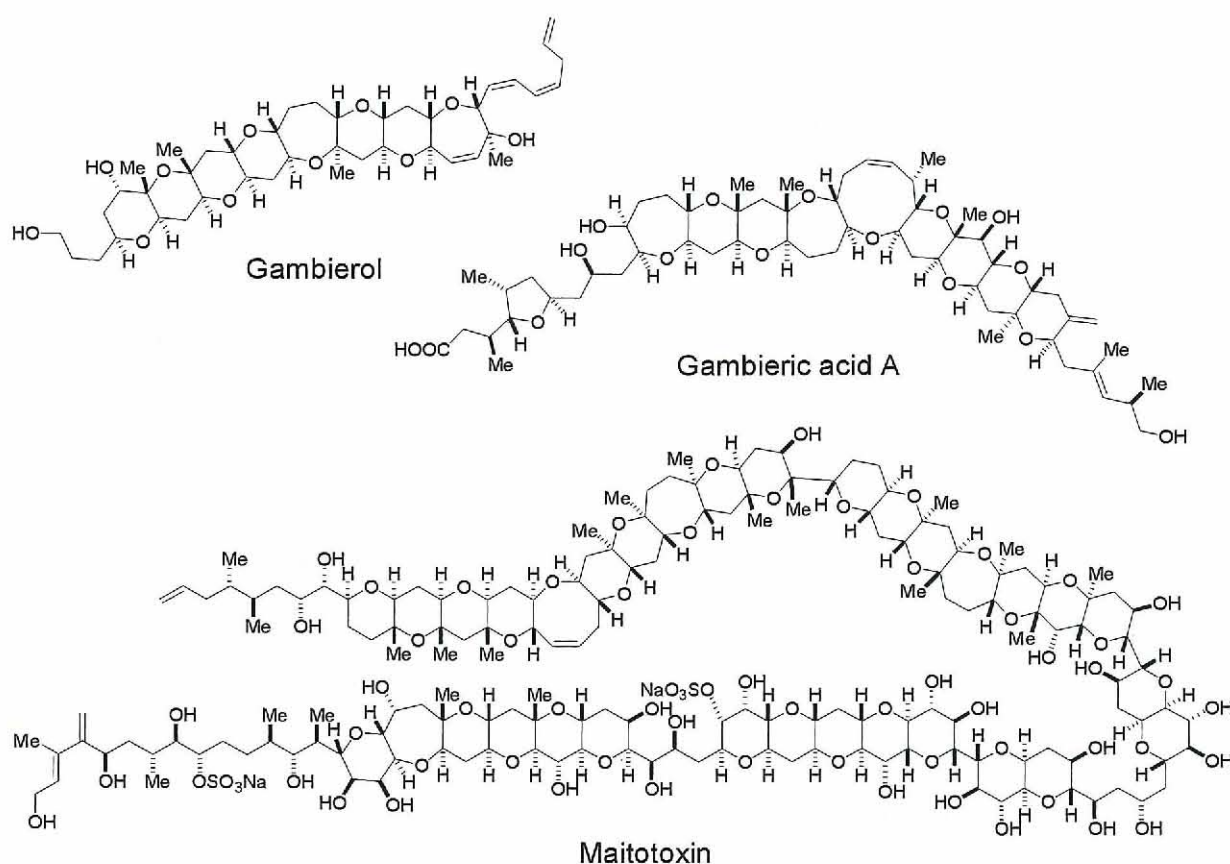


図 3-2 ガンビエロール、ガンビエル酸およびマイトトキシンの化学構造

また、フロリダ沖で赤潮を形成し魚類の大量へい死を起こすことでよく知られた渦鞭毛藻 *Karenia brevis* (旧称 *Gymnodinium breve*) により生産されるブレベトキシン類 (brevetoxin, BTX, 図 3-3) の化学構造は^{13, 14)}、1981 年に Nakanishi らの X 線結晶構造解析により決定された¹³⁾。エーテル環が梯子状に連結した特異な分子構造の最初の例として有名である。それ以降、ブレベトキシン A (brevetoxin A)¹⁴⁾や、ブレベトキシン B (brevetoxin B) の骨格を持った類縁体が単離、構造決定されている。

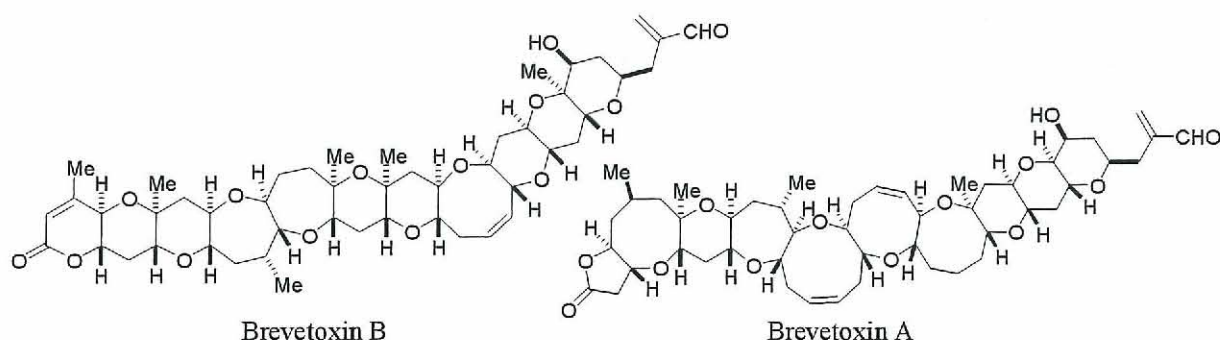


図 3-3 プレベトキシンの化学構造

その他にも *K. brevis* からはヘミプレベトキシシン B (hemibrevetoxin B, 1989 年, 清水ら¹⁵⁾), プレベナール (brevenal, 2004 年, Baden ら^{16, 17)}) など, 比較的分子長の短い化合物が単離, 構造決定されている (図 3-4)。このうち, プレベナールは, 最近, 佐々木らの全合成^{18, 19)}によって, 最初の提出構造の誤りが改正された五環性化合物であり (図 3-4 には改訂後の構造を記した), それ自体の魚毒性は非常に弱い, プレベトキシシン類の毒性を阻害することが知られている¹⁶⁾。

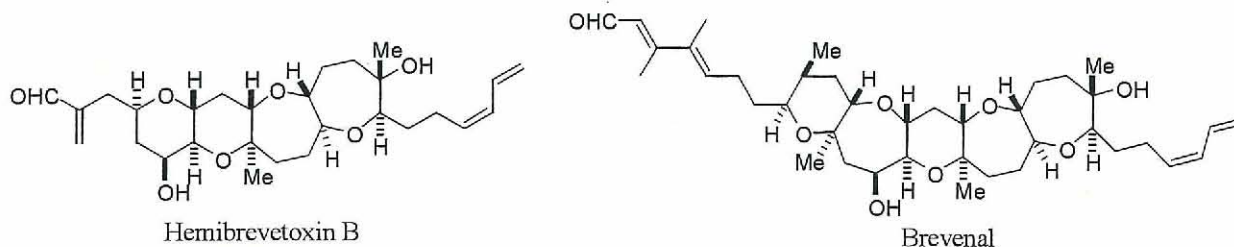


図 3-4 ヘミプレベトキシシン B およびプレベナールの構造

また, 赤潮を形成するその他の渦鞭毛藻からも同様の天然物が単離されている。*Karenia mikimotoi* が生産するジムノシン類²⁰⁻²²⁾ (gymnocin, 図 3-5) は, 14~15 のエーテル環が縮環した分子で, プレベトキシシンなどと比べて魚毒性は弱いものの, マウス白血病細胞に対して細胞毒性を有することが知られている ($EC_{50}=1.3\sim1.7\text{ }\mu\text{g/mL}$, P388 マウス白血病細胞)²⁰⁾。構造の面では飽和の六, 七員環からなる点に特徴があり, またジムノシン B のエーテル環の縮環数は 15 であり, このクラスの天然物の中で最多である。これら一連の化合物は五~九員環のエーテル環が *trans/syn/trans* に縮環した共通の構造を有することから, 梯子状ポリエーテル化合物と呼ばれている。

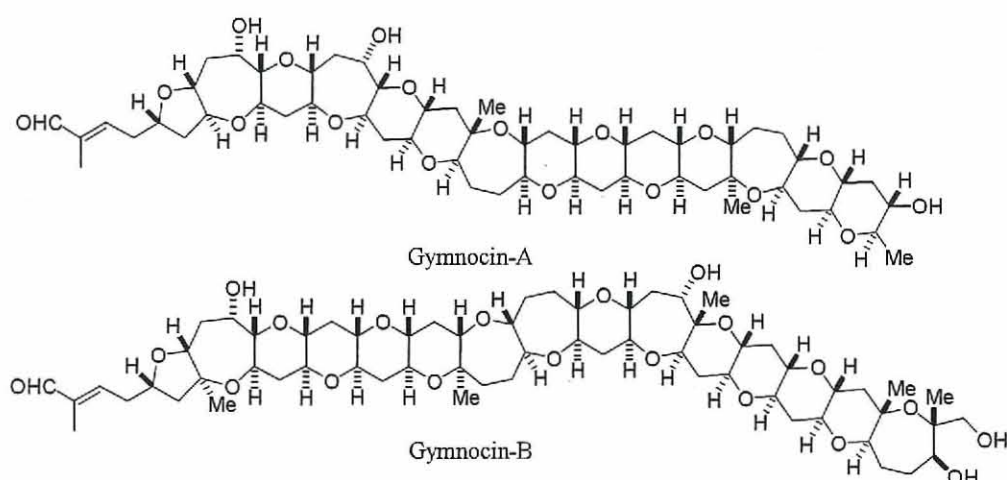
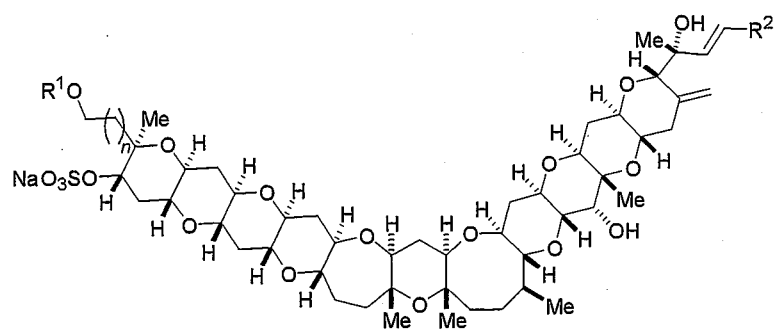


図 3-5 ジムノシン類の構造

3-1-b イエツトキシシ

渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* や *Lingulodinium polyedrum* などにより生産されたイエツトキシシ (yessotoxin, YTX, 図 3-6) は, 1986 年に陸奥湾産の毒化したホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) の中腸腺から単離された梯子状ポリエーテル化合物の 1 つである²³⁻²⁷。その構造は, 1987 年に相対配置が二次元 NMR を用いて決定され^{23, 24}), その後 1996 年にキラル異方性試薬を用いた実験によって絶対配置が決定された²⁵。当初下痢性貝中毒 (Diarrhetic Shellfish Poison, DSP) の 1 つとして考えられていたが, その後の研究から実際には下痢毒性を示さず, むしろ神経毒性を示すことが明らかとなった^{23, 28-30}。その生物活性に関しては, マウスに対する急性致死毒性^{23, 30})は腹腔内投与で 100 $\mu\text{g/kg}$ と高いものの, 経口毒性は低く, 人体に及ぼす影響については明らかにされていない。構造上の特徴として, 分子中央部に七, 六, 八員環エーテル E, F, G 環部が連続し, F 環部には 1,3-ジアキシャル結合した 2 個のメチル基を持つ。また, A 環末端に 2 個の硫酸エステル及び K 環末端にトリエン側鎖を有することも特徴的である。また, 基本骨格が類似した様々な同族体 (図 3-6) も二枚貝から単離・構造決定されている^{23-24, 30-34}。



Yessotoxin (YTX): $n = 1, R^1 = SO_3Na, R^2 =$

45-HydroxyYTX: $n = 1, R^1 = SO_3Na, R^2 =$

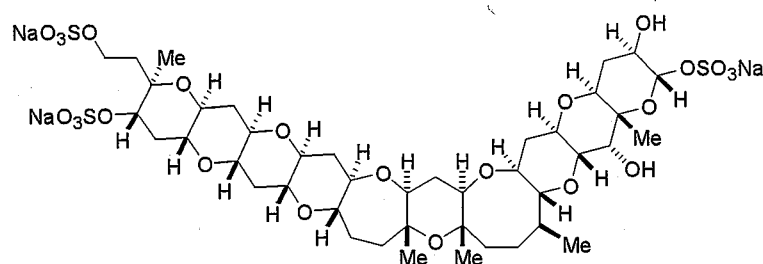
45, 46, 47- TrinorYTX: $n = 1, R^1 = SO_3Na, R^2 =$

CarboxyYTX: $n = 1, R^1 = SO_3Na, R^2 =$

1-DesulfoYTX: $n = 1, R^1 = H, R^2 =$

HomoYTX: $n = 2, R^1 = SO_3Na, R^2 =$

45-HydroxyhomoYTX: $n = 2, R^1 = SO_3Na, R^2 =$



Adoriatxin (ATX)

図 3-6 イエットキシンおよびその同族体の化学構造

3-1-c 梯子状ポリエーテル天然物の作用機構と分子認識機構

これまで述べてきたように一連の梯子状ポリエーテル天然物が海洋より単離・構造決定されてきた。ブレベトキシンを初めとしてシガトキシンや、イエットキシンなどのエーテル環が連結した構造の分子では、共通して分子中央に七～九員環が存在して分子に柔軟性を与えており、活性発現に必要な要因ではないかと考えられる。しかし、天然から得られる試料は極微量のために、詳細な作用機構はあまり解明されていない。

作用標的が解明されている数少ない梯子状ポリエーテル天然物として、ブレベトキシン (BTX) 類、シガトキシン (CTX) 類およびガンビエロール類がある。BTX と CTX は神経

細胞膜の電位依存性ナトリウムチャネル (VSSC) に特異的に結合することで毒性を発現する³⁵⁻⁴¹⁾。またガンビエロールに関しては、低濃度ではカリウムチャネルを阻害し、高濃度ではナトリウムチャネルを活性化すること、さらにカルシウムチャネルにも関与している可能性を示唆する結果も出ている^{42,43)}。VSSC に結合する毒としてテトロドトキシン (TTX) を第1章に挙げたが⁴⁴⁾、チャネルを阻害する TTX に対し、BTX 類や CTX 類はチャネルを活性化しナトリウムイオンの流入を促進することによって神経毒性を発現すると推定されている。

これら以外の天然物は未だ毒性と作用標的との関連が不明な部分が多い。活性は弱いものの、ガンビエロールおよびガンビエル酸は、VSSC のサイト 5 と呼ばれる部分に対して、BTX と競争的に結合することがトリチウム標識化実験で確認されている (ガンビエロール: $K_i = 1.4 \mu\text{M}$, ガンビエル酸: $K_i = 0.11 \mu\text{M}$)⁴⁵⁾。その他、マイトトキシン (MTX) はカルシウムイオンの細胞内への過剰流入を引き起こして毒性を発現することが分かっている⁴⁶⁻⁴⁹⁾。

また、梯子状ポリエーテル天然物としては二枚貝や渦鞭毛藻から調達可能な YTX に関しては、近年の研究によって様々な生理活性が明らかになっている。まず、ヒトのリンパ細胞に YTX を投与すると、カルシウムイオンの流入が認められ、細胞内カルシウムイオン濃度を増加させることが確認された^{50,51)}。また、カルシウムイオン存在下、YTX をヒトリンパ細胞に投与すると細胞内セカンドメッセンジャーである環状ヌクレオチド (cAMP) の濃度が減少する⁵²⁾。環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase, PDE) は、ATP からアデニル酸シクラーゼにより生成した cAMP を、5'-AMP に加水分解し、その濃度を調節し、シグナル伝達に重要な役割を担っている⁵³⁾。PDE は、多くの α -ヘリックスを有する水溶性タンパク質であり、11 種類の PDE ファミリー (PDE1~11) の存在が明らかになっている。cAMP は二価金属イオンとキレートし、PDE の触媒ドメインで酵素反応をうける。PDE の中にはカルシウムイオンによって活性化を受けるものがあり、YTX によるカルシウムイオンの流入が PDE の活性化を招き、cAMP の分解を促進していると考えられている (図 3-7)。

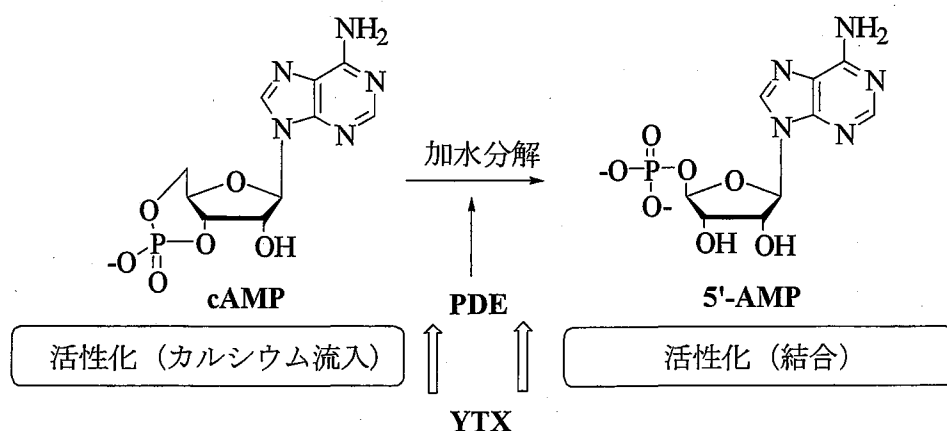


図 3-7 YTX による cAMP 加水分解促進の模式図

また、Botana らは YTX が PDE 混合物のほか、ウシの脳および脾臓に存在する PDEI および PDEII（それぞれ、5'-および 3'-エクソヌクレアーゼ）に対して、それぞれ解離定数 $K_D = 2.80 \pm 1.21 \mu\text{M}$ および $K_D = 7.36 \pm 0.60 \mu\text{M}$ などの親和性をもつことを報告した^{54, 55)}。すなわち、PDE の活性化はカルシウムイオン以外に、YTX が直接 PDE と相互作用した結果とも考えられる（図 3-7）。

そのほか、アポトーシスはプロテアーゼの一種であるカスパーゼが活性化されて起こる細胞の自然死であるが、YTX がヒトガン細胞のアポトーシスを誘引することがわかってきた⁵⁶⁾。

3-1-d 梯子状ポリエーテル天然物の作用機構と分子認識機構の解明

このように、渦鞭毛藻が生産する梯子状ポリエーテル天然物は、その強力な生理活性から、生理学者の興味を惹き、現象論的には様々なことが分かりつつあるが、一方分子レベルで作用標的との相互作用に言及した報告はあまり多くない。Gawley らは、1995 年ブレベトキシン B の活性発現には、約 30 Å の分子長が重要であることを提唱した⁵⁷⁾。また中員環が分子全体の柔軟性を増すことで活性発現に重要であると言われており^{58, 59)}、さらに角間メチル基も同様の効果により活性発現に重要であると言われている。VSSC に対する結合阻害実験を通して、梯子状ポリエーテルのエーテル酸素原子が水素結合アクセプターとして機能することで、VSSC と相互作用するのではないか、という仮説も提起されている⁴³⁾。この時点では作用標的として VSSC のみを想定していたが、2005 年、我々のグループ⁶⁰⁾と大栗ら^{61, 62)}は時期を同じくして、同様の仮説を提唱した。すなわち、梯子状ポリエーテル骨格に存在するエーテル酸素原子間の距離が、膜タンパク質に多く存在する α -ヘリックスのピッチに近い（約 5 Å）ことから、多点水素結合を介して膜タンパク質の膜貫通領域に多く含まれる α -ヘリックスと相互作用するのではないか、というものである（図 3-8）。

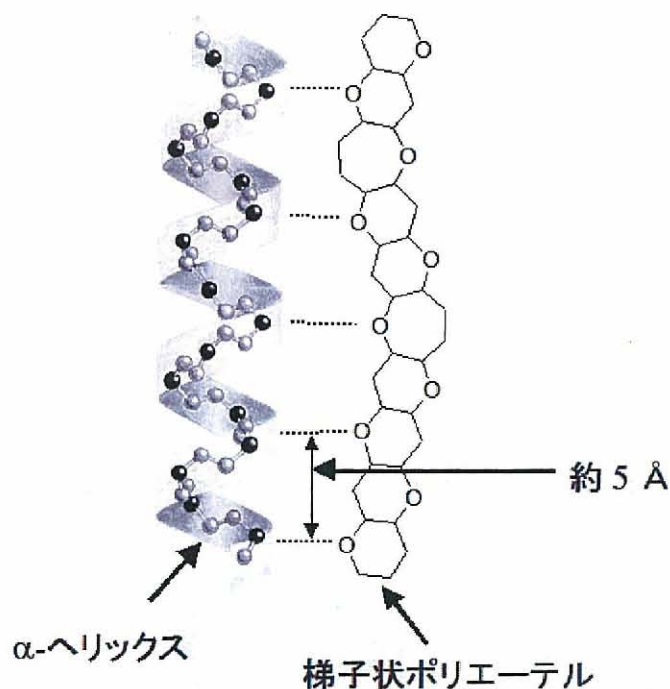


図 3-8 梯子状ポリエーテルと α -ヘリックスの相互作用仮説

この仮説は現在最も広く受け入れられているものであり、作用標的が未知である多くの梯子状ポリエーテル化合物が、イオン流入に関わる生理活性を有し、また毒性の高い化合物の分子長が生体膜の厚さに近いことから妥当であると言える。この仮説に基づき、当研究室の森らは、梯子状ポリエーテルモデルとして脱硫酸化イエソトキシシン (dsYTX) を、また膜タンパク質モデルとしてグリコフォリン A (GpA) を用いて、これらの間に相互作用があるかを SDS-PAGE 実験によって調べた⁶⁰⁾。GpA は赤血球膜に存在する分子量約 38 KDa の糖タンパク質で、ミセル中などの疎水的環境下多点水素結合によりホモ二量体を形成することが知られている^{63, 64)}。もし梯子状ポリエーテルが、図 3-8 に示したような多点水素結合を膜タンパク質との間に形成するならば、梯子状ポリエーテルは競争的に GpA の二量化を阻害し単量体へと解離すると考えられる。実際に、GpA の多量体および二量体が単量体へと解離する様子が、天然物(ブレベトキシシン B およびイエソトキシシン)で処理した場合に加え、dsYTX で処理した場合にも観測され (図 3-9A)、dsYTX は GpA 脱会合活性を示すことが明らかになった (図 3-9B)⁶⁰⁾。この結果は VSSC 以外の膜タンパク質と梯子状ポリエーテルの相互作用の存在を実験的に示した初めての例であり、同時にポリエーテルと膜タンパク質との相互作用を一般的に評価する方法論の確立という見地からも有意なものであったと言える。

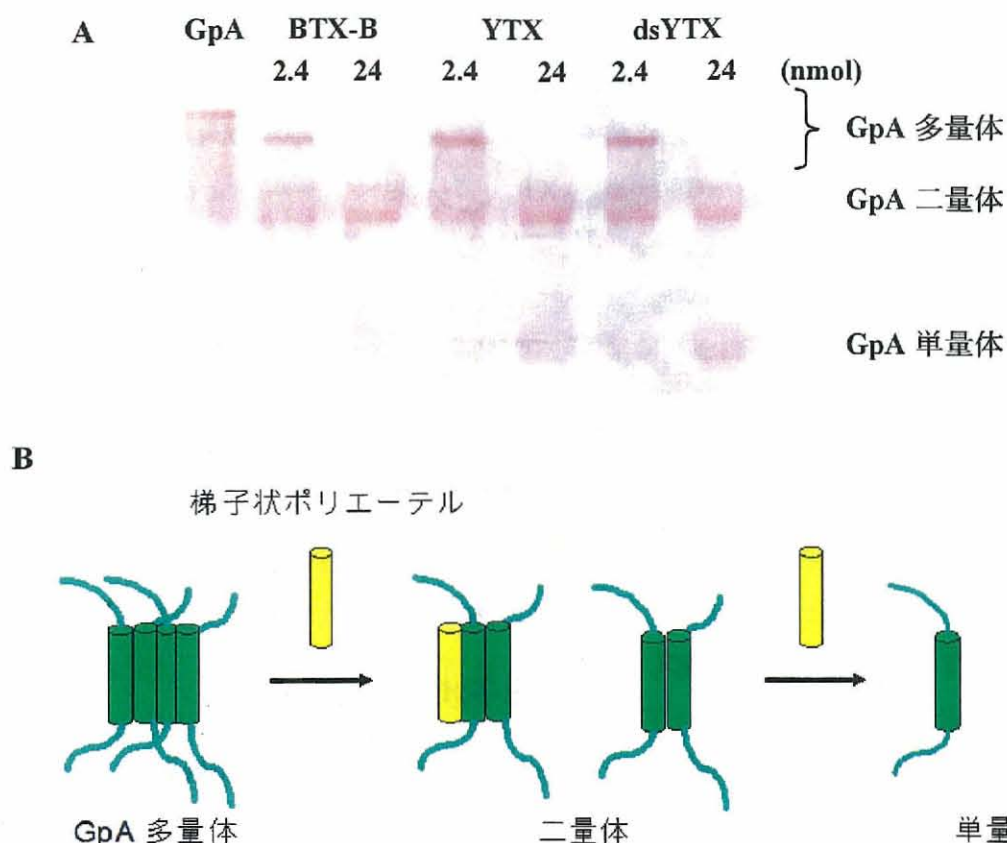


図 3-9 森らによる梯子状ポリエーテルの GpA 脱会合活性試験

A : プレベトキシシン B (BTX-B), YTX および dsYTX など梯子状ポリエーテル化合物の GpA 脱会合活性, B : 多点水素結合による梯子状ポリエーテル化合物の GpA 脱会合スキーム

3-1-e 研究目的

現在までに、プレベトキシシン (BTX) 類、シガトキシシン (CTX) 類およびガンビエロール類が膜タンパク質である電位依存性カチオンチャンネルに結合することが明らかになっている。その他の梯子状ポリエーテルについても同様にイオンの流入にかかわることで生理活性を示しており、このうちガンビエロールおよびガンビエール酸はプレベトキシシンの毒性を阻害することが明らかになっている。さらに、当研究室の森、氏原らは SDS-PAGE 実験あるいは SPR 測定により、イエソトキシシンがグリコフォリン A 会合体を脱会合すること、さらに $K_D=27 \mu\text{M}$ の親和性を持つことを明らかにしている。以上のことから、梯子状ポリエーテルが広く膜タンパク質と相互作用していることが示唆されている。これら梯子状ポリエーテルの毒性は、我々ヒトをはじめ、魚類、海洋哺乳類等、多くの生物にとって、深刻な被害をもたらすため、作用標的分子の同定および毒性発現機構の解明は急務であり、これらが達成されれば、毒の検出、摂取予防、解毒法の開発へとつながることが期待できる。現に、作用標的分子が明ら

かになっているシガトキシン類や、徐々に研究が進んできているイエッソトキシンに関しては、サンドイッチ ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法⁶⁵⁻⁶⁷⁾やマイクロプレート蛍光検出法^{51, 68)}などにより、梯子状ポリエーテル化合物の検出が可能になりつつあるが、まだ操作が煩雑である。そこでこの章では、簡便で、迅速な相互作用解析法として、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を採用し、様々な梯子状ポリエーテル化合物とタンパク質間の親和性を定量的に評価する方法を確立する。それを用いて、分子レベルでの梯子状ポリエーテルの作用標的認識について定量的評価を行うことを目指した。

3-2 渦鞭毛藻の培養とイエッソトキシンの精製および dsYTX の調製

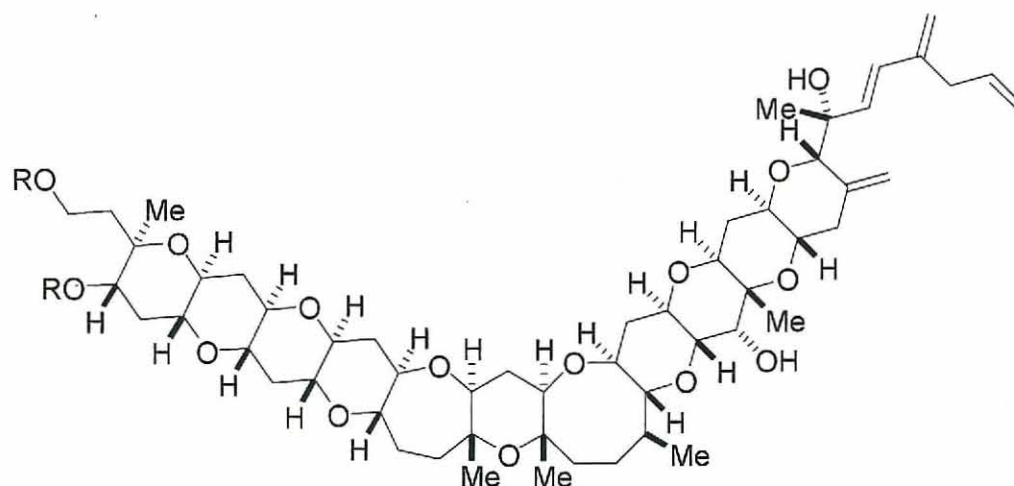
タンパク質との相互作用を調べるためには、数 mg の梯子状ポリエーテルを入手する必要がある。そこで、本研究では梯子状ポリエーテルのモデル分子として、渦鞭毛藻の培養によって調達が可能なイエッソトキシン (YTX) を用いることにした。また、YTX は他の梯子状ポリエーテルであるシガトキシンやブレベトキシン等と比較して、骨格部分は類似しているが、側鎖に 2 つの硫酸基を持つために高い極性を有する。そこで、以前の研究⁶⁰⁾に習って YTX の側鎖に存在する硫酸基を除去した脱硫酸イエッソトキシン (dsYTX) を調製し、これも同時に梯子状ポリエーテルのモデル分子として使用することにした (実験項参照)。

3-3 梯子状ポリエーテルとタンパク質との表面プラズモン共鳴測定

SPR 測定および SDS-PAGE 実験においてイエソトキシシン (YTX) および脱硫酸化イエソトキシシン (dsYTX) が膜タンパク質であるグリコフォリン A (GpA) と相互作用し、その結果 GpA 会合体を脱会合することが既に報告されている (図 3-9)⁶⁰⁾。これは、梯子状ポリエーテルが膜タンパク質の膜貫通領域に多く含まれる α -ヘリックス、さらにはグリシンジッパー (GxxxG)⁶⁹⁻⁷³⁾ と相互作用するためであると考えられている⁷⁴⁾。その後の研究において氏原らは、GpA 膜貫通ペプチド (GpATM, GxxxG) と GpA 膜貫通ペプチド変異体 (GpATM2G/2I, IxxxI) を合成し、SPR 実験により梯子状ポリエーテルがむしろ GpA 膜貫通ペプチド変異体に対して強い親和性を有することを明らかにした⁷⁵⁾。このことは、梯子状ポリエーテル化合物が必ずしもグリシンジッパー (GxxxG) のみを標的としているわけではなく、膜貫通領域全体を広く認識していること示唆している。ところが、その詳細な分子認識機構についてはまだ明らかにされてはいない。したがって、この一般性を確かめるために、GpA 以外の膜タンパク質として、APH1B, NIP3 BH3 Domain peptide (BH3) および BCL2 を用い、また膜タンパク質以外では、ストレプトアビジンを用いて、梯子状ポリエーテル化合物との相互作用解析を SPR 測定により実施した。APH1B および BH3 は GpA と同様に、その膜貫通領域にグリシンジッパーを持っており、一方 BCL2 はグリシンジッパーを持たない膜タンパク質として本実験に用いた。今回の実験において非特異的な吸着、機械的ノイズを抑えるため、解析に用いるセンサーグラムは、リガンドを固定化していない個所にも同時にアナライトを流し、これをリファレンスとして差し引いたものを使用した。またランニングバッファーとしては、梯子状ポリエーテルの溶解性および膜タンパク質のセンサーチップ表面での安定性を考慮し、DMSO 1 % および 0.05% Tween 20 を含む HEPES 緩衝液 (1%DMSO-HBSEP) を用いた。特に記載のない場合は、測定温度は 25℃、流速は 10 μ L/min で、20 μ L のサンプル溶液を添加した。

本実験では梯子状ポリエーテルとして、YTX, dsYTX (図 3-10), ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A, ALP7A および ALP10A (図 3-11)^{74,76)} を用いた。YTX は梯子状ポリエーテル天然物として、dsYTX は YTX の 2 つの硫酸基を化学的に除去することにより調製し、一般的な梯子状ポリエーテルモデルとして使用した。ALP1B, ALP4B および ALP7B (ジオール, ジベンジル体) は、側鎖に共通の置換基である 2 つのヒドロキシ基とベンジル基 (Bn) を持ち、分子長のみが単環性、4 環性および 7 環性とその環の数が異なるために、分子長のみの影響を見積もるために使用した^{74,76)}。また、ALP4A および ALP7A (テトラオール体) は、そのジベンジル体との比較により、側鎖置換基の影響 (疎水性) を見積もるために使用した。また、非環状ポリエーテルモデル化合物としてトリプロピレングリコール (TPG) およびそのジベ

ンジル体であるトリプロピレングリコールジベンシルエーテル (TPG2Bn) を使用した (図 3-12)。トリプロピレングリコールは、ALP テトラオール体とは異なり、梯子状ではない直鎖のポリエーテル骨格を持ち、さらにトリプロピレングリコールジベンシルエーテルは、ALP ジベンシル体と同様に側鎖にベンジル基を持つことから、梯子状構造の影響を調べるために用いた。



R=SO₃Na ; yessotoxin (YTX)
R=H ; desulfated YTX (dsYTX)

図 3-10 イエッソトキシシン (YTX) と脱硫酸化イエッソトキシシン (dsYTX) の化学構造

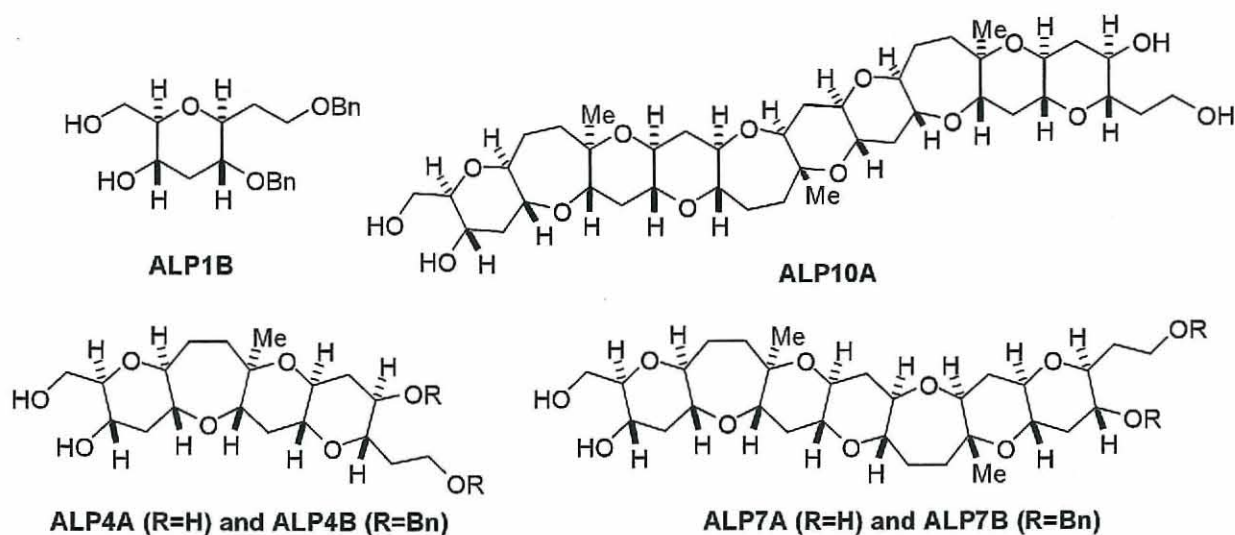


図 3-11 人工梯子状ポリエーテル単環性 ALP1B, 四環性 ALP4A と ALP4B, 七環性 ALP7A と ALP7B および十環性 ALP10A の化学構造^{74,76)}

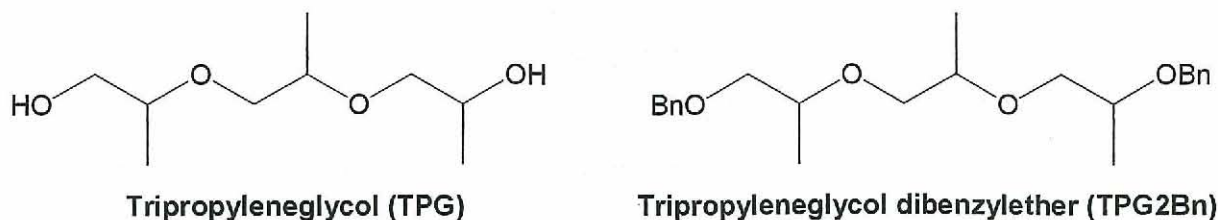


図 3-12 非環状ポリエーテルトリプロピレングリコール (TPG) およびトリプロピレングリコールジベンジルエーテル (TPG2Bn) の化学構造

3-3-a 梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX とタンパク質との相互作用解析

3-3-a1 APH1B^{77,78)}

APH1 は、線虫 *Caenorhabditis elegans* の遺伝子に確認された 7 回通過膜貫通タンパク質であり、その 4 番目の膜貫通領域 (PSMRLLAYVSGLGFGIMSGVFSFVN) にはグリシンジッパー (GxxxG) を有し、このグリシンジッパーを介してプレセニリンとヘテロダイマーを形成し、さらに NCT や PEN-2 とヘテロタンパク複合体である γ -セクレターゼを形成することが知られている。この γ -セクレターゼはアミロイド β からアミロイド β ペプチドを切り出し、このペプチドの蓄積がアルツハイマーに関与していると考えられている。膜タンパク質であること、グリシンジッパーが複合体形成に関与していることなど、GpA との共通点も多く梯子状ポリエーテル化合物との親和性評価に興味を持たれる。

3-3-a2 APH1B-YTX 相互作用解析および APH1B-dsYTX 相互作用解析

センサーチップ CM5 の基板の上にアミンカップリング法を用いて共有結合により APH1B を固定化した。このセンサーチップにアナライトとして種々の濃度で YTX を流し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-13A に示す。YTX 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し、ほぼ一定値で平衡となった後、ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られたが、これは YTX がセンサーチップ上の APH1B と速い結合、解離をしている事を示すものである。以上の結果から、YTX は APH1B と相互作用することが分かった。また YTX の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし、用量依存曲線を作成した (図 3-13B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D=56 \mu\text{M}$ となり、GpA 以外の膜タンパク質においても親和性を定量的に求めることに成功した。

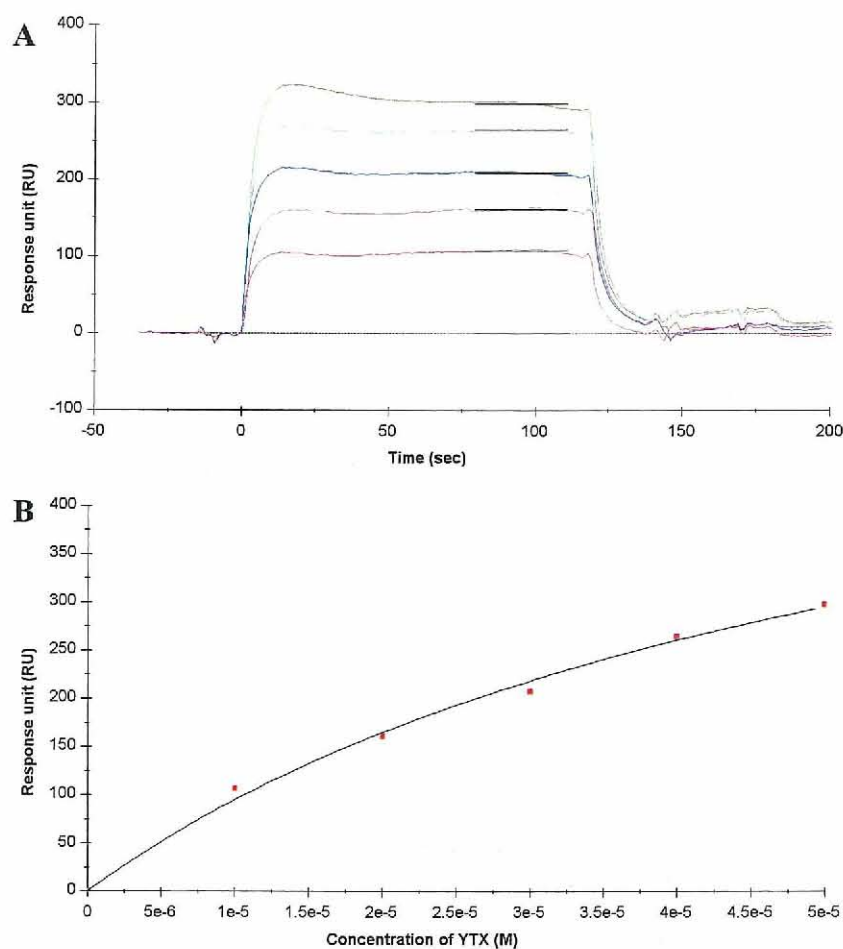


図 3-13 (A) YTX の APH1B に対するセンサーグラム, YTX 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μ M, (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび YTX-APH1B 用量依存曲線

次に種々の濃度で dsYTX を添加し, YTX と同様に相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-14A に示す。その結果, YTX と同様に「箱型」のセンサーグラムが得られた。また dsYTX の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし, 用量依存曲線を作成した (図 3-14B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ, 解離定数 $K_D=24 \mu$ M であった。

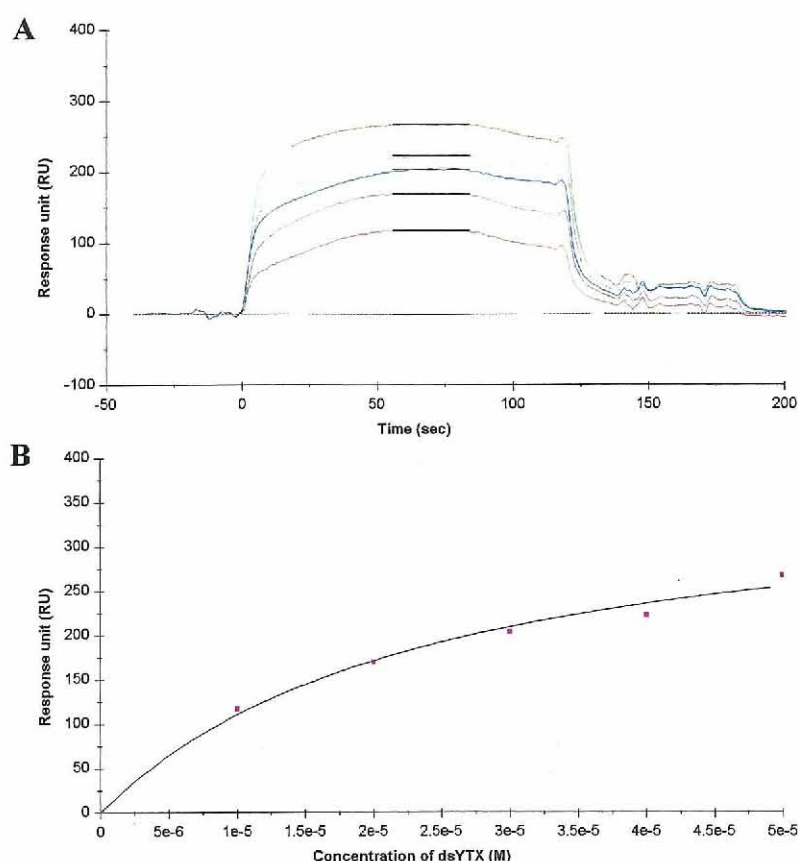


図 3-14 (A) dsYTX の APH1B に対するセンサーグラム, dsYTX 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) dsYTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび dsYTX-APH1B 用量依存曲線

3-3-a3 BCL2 および BH3 ドメインペプチド

BCL2 ファミリーはリンパ球などの細胞死 (アポトーシス) の制御に不可欠であり, ミトコンドリア外膜中でアポトーシスを促進あるいは阻害することが知られている。Apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf1) は, カスパーゼ 9 さらにはカスパーゼ 3 を活性化し, アポトーシスを引き起こす。BCL2 は, この Apaf1 と相互作用することにより, 細胞死を阻害する。その一方, BH3 ドメインペプチド (BH3) は, この BCL2 と相互作用することにより, BCL2 の制御機能を阻害し, その結果としてアポトーシスを活性化する。BH3 は, その膜貫通領域付近 (PSLLLSHLLAIGLGIYIG) にグリシンジッパー (GxxxG) を持ち安定なホモダイマーを形成している。一方, BCL2 は膜貫通領域 (DFSWLSLKTLLSLALVGACITLG) にグリシンジッパー (GxxxG) を持たないが, これらはホモダイマーを形成し, 安定化していることが知られている。そこで, APH1B と同様にグリシンジッパーを持つ BH3 ペプチドと持たない BCL2 について同様に梯子状ポリエーテル化合物との相互作用解析を行い, 比較した。

3-3-a4 BCL2-YTX 相互作用解析および BCL2-dsYTX 相互作用解析

前項と同様に作製した BCL2 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で YTX を流し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-15A に示す。YTX 添加直後にセンサーグラムは上昇しほぼ一定値で平衡となった後、ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られたが、これは YTX がセンサーチップ上の BCL2 と速い結合、解離をしている事を示すものである。以上の結果から、YTX はグリシンジッパーを持たない BCL2 とも相互作用することが分かった。また YTX の濃度（横軸）と平衡に達した時の RU 値（縦軸）をプロットし、用量依存曲線を作成した（図 3-15B）。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D=45\text{ }\mu\text{M}$ であった。

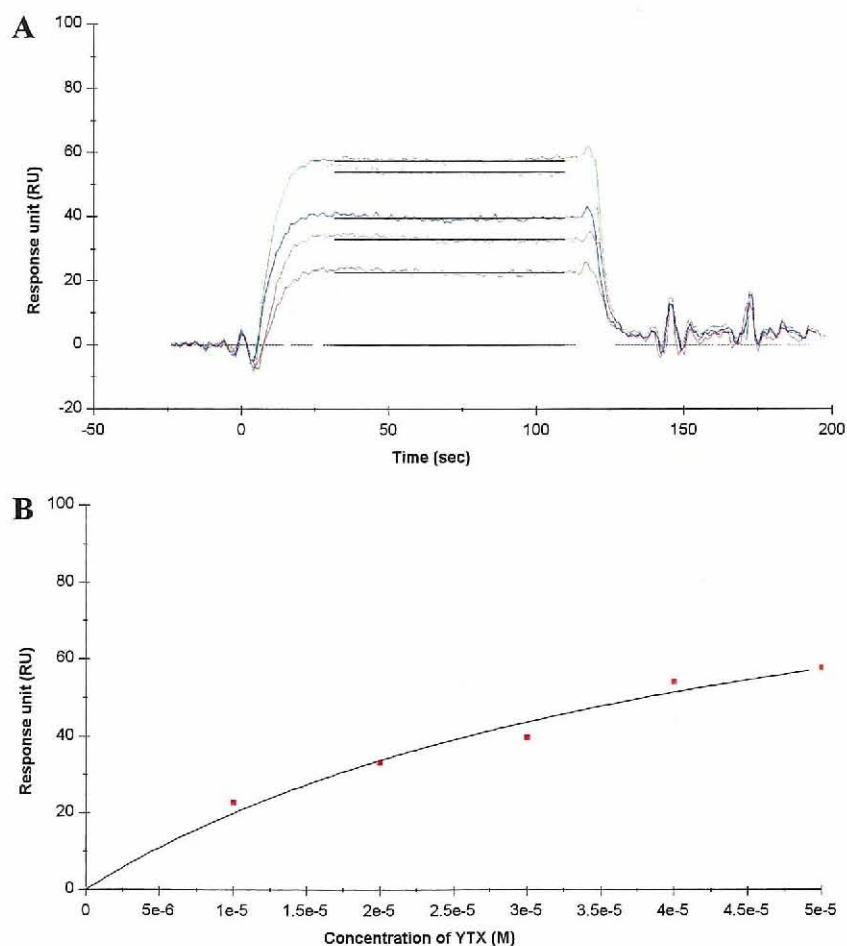


図 3-15 (A) YTX の BCL2 に対するセンサーグラム, YTX 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび YTX-BCL2 用量依存曲線

次に同様に種々の濃度で dsYTX を流し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-16A に示す。その結果、YTX と同様のセンサーグラムが得られた。また dsYTX の濃度（横軸）と平衡に達した時の RU 値（縦軸）をプロットし、用量依存曲線を作成した（図 3-16B）。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D=12$ μM であった。

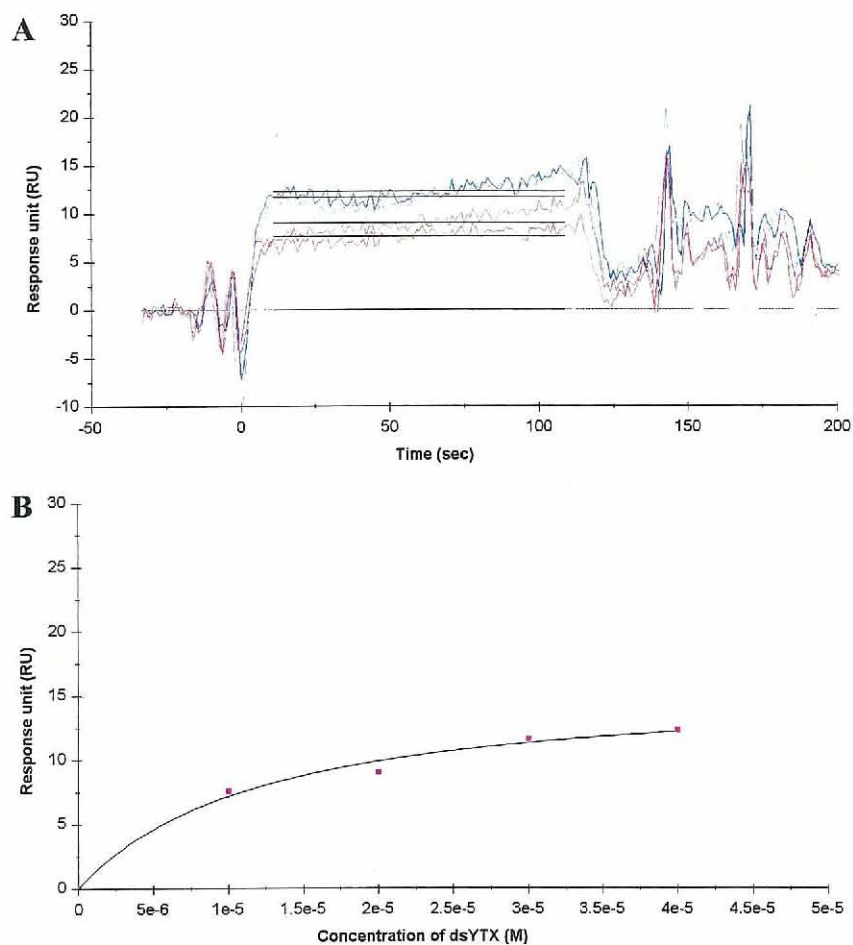


図 3-16 (A) dsYTX の BCL2 に対するセンサーグラム, dsYTX 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青) および 40 (水色) μM , (B) dsYTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび dsYTX-BCL2 用量依存曲線

3-3-a5 BH3-YTX 相互作用解析および BH3-dsYTX 相互作用解析

前項と同様に作製した BH3 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度の YTX を添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-17A に示す。YTX 添加直後にセンサーグラムは上昇しほぼ一定値で平衡となった後、ランニングバッファーに切り替わっても APH1B および BCL2 の場合とは異なりベースラインまで下がらなかった。しかし、高塩濃度のバッファー (2 M 塩化ナトリウム溶液) および界面活性剤 (0.5% SDS 溶液) を添加すると、ベースラインまで下がった。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ、これは YTX がセンサーチップ上の BH3 と速い結合、解離をしている事を示している。以上の結果から、YTX は BH3 と相互作用することが分かった。また YTX の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし、用量依存曲線を作成した (図 3-17B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D=78 \mu\text{M}$ であった。

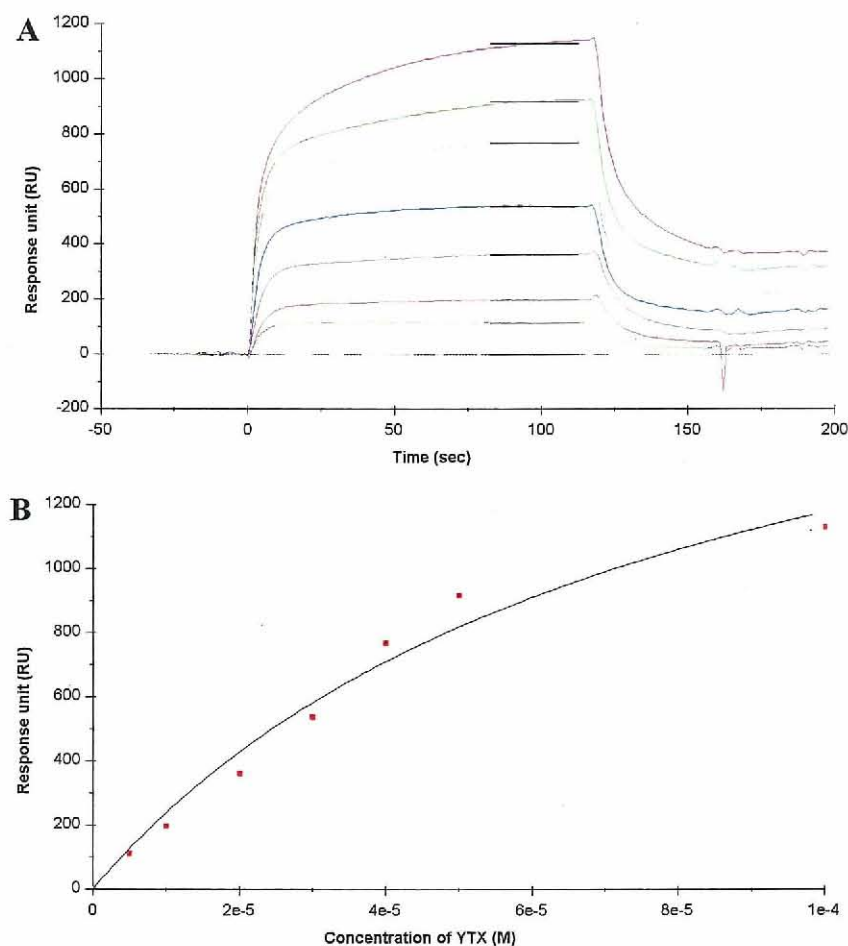


図 3-17 (A) YTX の BH3 に対するセンサーグラム, YTX 濃度 ; 0 (グレー), 5 (黄), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色), 50 (緑) および 100 (紫) μM , (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロット及び YTX-BH3 用量依存曲線

作製した BH3 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で dsYTX を添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-18A に示す。dsYTX 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し、ほぼ一定値で平衡となった後、ランニングバッファーに切り替えると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ、これは dsYTX がセンサーチップ上の BH3 と速い結合、解離をしている事を示すものである。以上の結果から、dsYTX は BH3 と相互作用することが分かった。また dsYTX の濃度（横軸）と平衡に達した時の RU 値（縦軸）をプロットし、用量依存曲線を作成した（図 3-18B）。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D=55 \mu\text{M}$ であった。

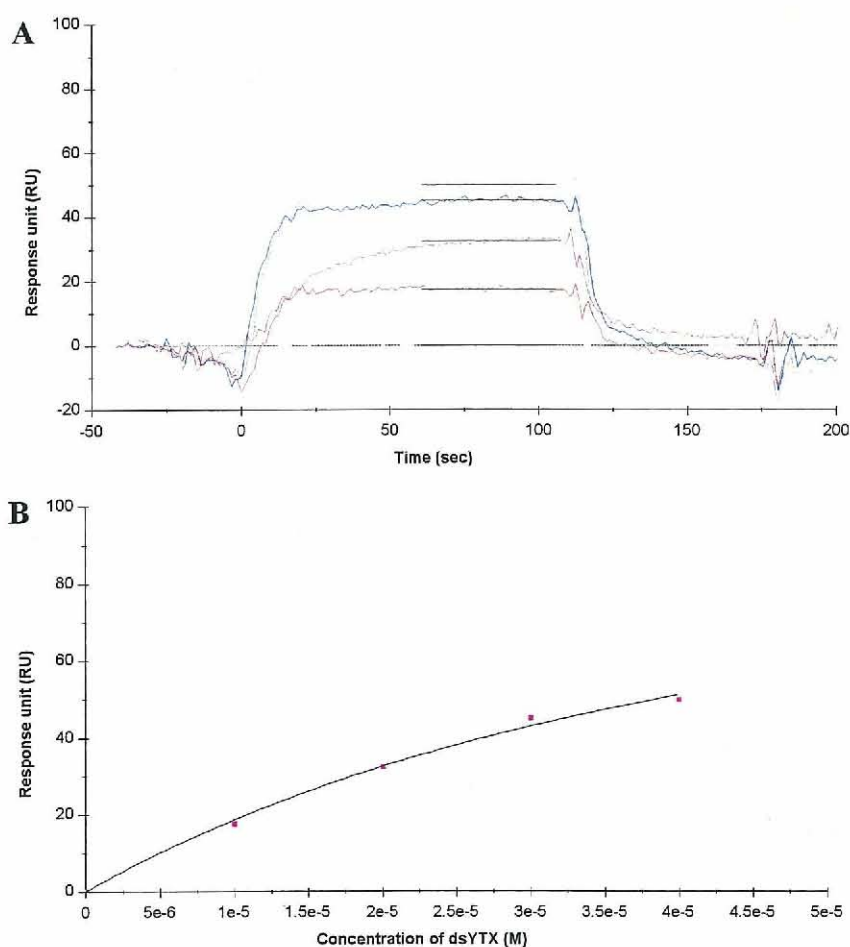


図 3-18 (A) dsYTX の BH3 に対するセンサーグラム, dsYTX 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青) および 40 (水色) μM , (B) dsYTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび dsYTX-BH3 用量依存曲線

3-3-a6 ストレプトアビジン-YTX 相互作用解析

前項と同様に作製したストレプトアビジン (SA) 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で YTX を添加し相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-19A に示す。YTX 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し、ほぼ一定値で平衡となった後、ランニングバッファーに切り替わっても APH1B および BCL2 の場合とは異なりベースラインまで下がらなかった。しかし、高塩濃度溶液 (2 M 塩化ナトリウム溶液) および界面活性剤 (0.5% SDS 溶液) を添加すると、ベースラインまで下がった。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ、これは YTX がセンサーチップ上の SA と速い結合、解離をしている事を示している。以上の結果から、YTX は SA と相互作用することが分かった。また YTX の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし、用量依存曲線を作成した (図 3-19B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D = 60 \mu\text{M}$ であった。

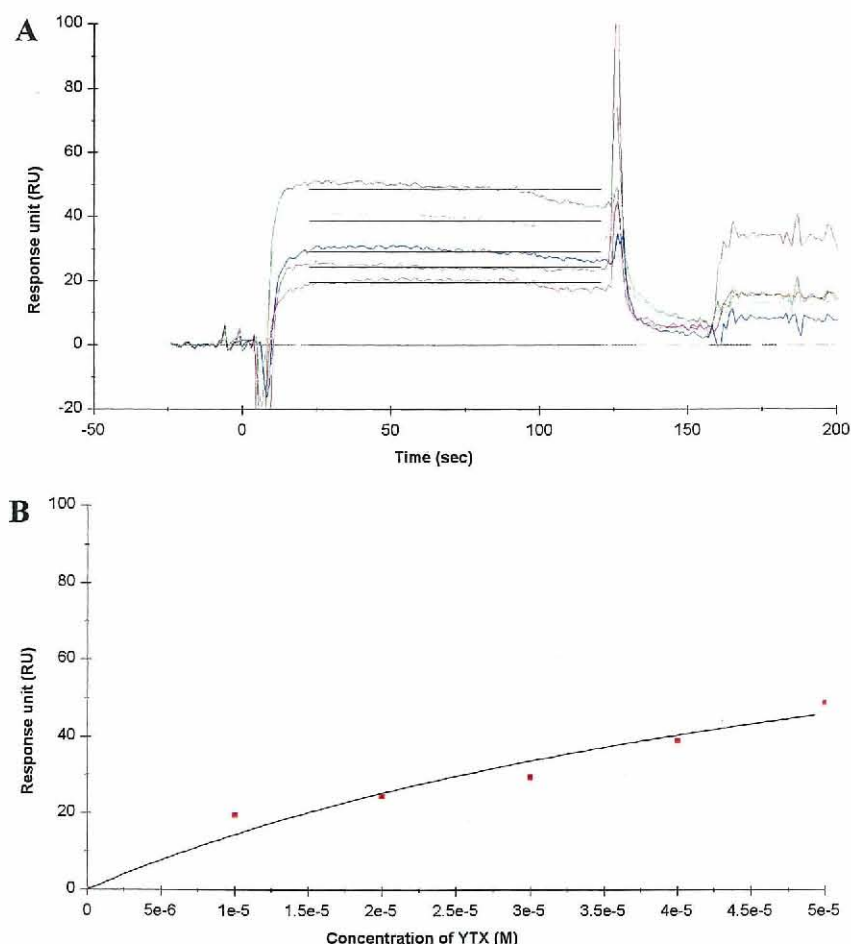


図 3-19 (A) YTX のストレプトアビジン (SA) に対するセンサーグラム, YTX 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロット及び YTX-SA 用量依存曲線

作製したストレプトアビジン (SA) 固定化チップにアナライトとして種々の濃度で dsYTX を添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-20A に示す。その結果、dsYTX を添加してもレスポンスの上昇はほとんど観測されず、また濃度依存性も観測されなかった。以上の結果から、dsYTX とストレプトアビジンとの相互作用は非常に弱い（ほとんど相互作用しない）ことが分かった。また dsYTX の濃度（横軸）と平衡に達した時の RU 値（縦軸）をプロットし、用量依存曲線を作成した（図 3-20B）。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 $K_D > 1,000 \mu\text{M}$ であった。

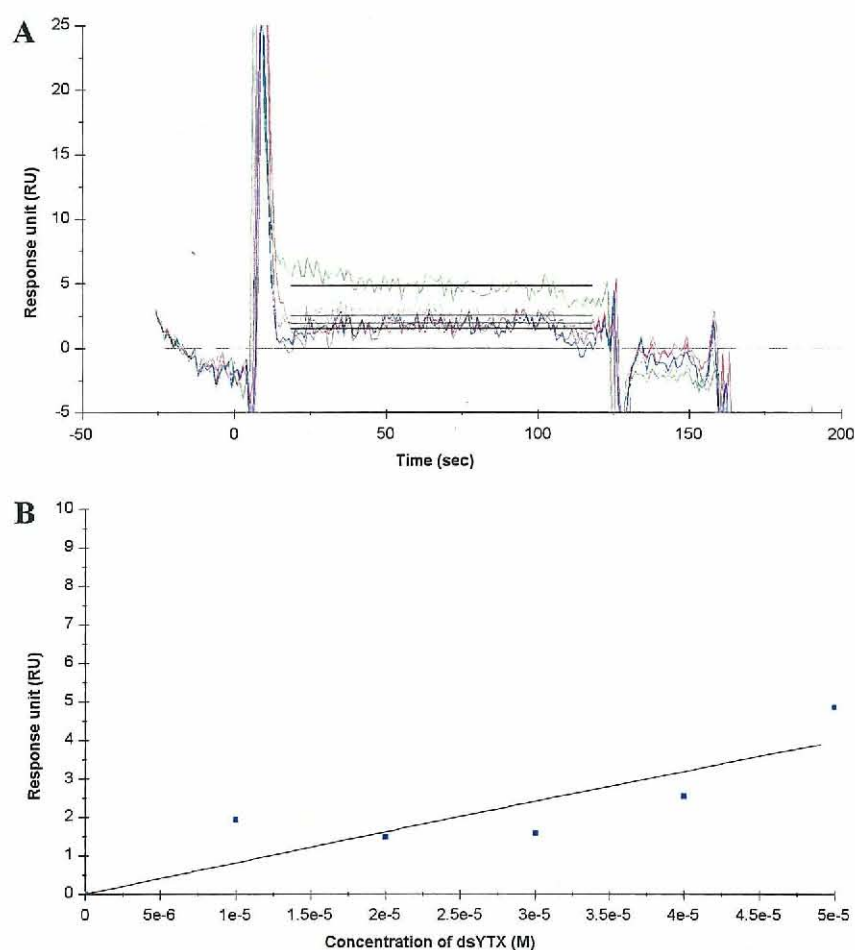


図 3-20 (A) dsYTX のストレプトアビジン (SA) に対するセンサーグラム, dsYTX 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) dsYTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび dsYTX-SA 用量依存曲線

3-3-a7 これまでの相互作用解析のまとめ

これまで SPR によって求められた梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX とタンパク質との親和性を、表 3-1 にまとめた。

表 3-1 から YTX および dsYTX は膜タンパク質 APH1B および BCL2, あるいは膜ペプチド BH3 に対して中程度の親和性を有することが分かった。また、その親和性は、全てにおいて YTX よりも dsYTX の方が高かった (2~4 倍程度)。これは、2 つの硫酸基を持っている YTX と比べて、その脱硫酸体である dsYTX は疎水性が高いため、この親水的な測定条件 (ランニングバッファー; 1% DMSO, 0.05% Surfactant20 を含む HEPES 生理水) では、疎水性相互作用の強さにより、膜タンパク質との親和性に違いが表れたと推測される。また、BH3-YTX の相互作用においては、他の膜タンパク質の場合とは異なり、添加終了時のレスポンスがベースラインまで下がらなかった。これは、BH3 が分子内に多くのリシン (L) とアルギニン (R) を持ち、これらのアミノ基と YTX 側鎖の 2 つ硫酸基との間に静電的相互作用が生じた結果、添加終了後もレスポンスが下がらなかったと考えられる。実際に、高塩濃度バッファー (2 M 塩化ナトリウム溶液) や界面活性剤 (0.5% SDS 溶液) を添加するとレスポンスはベースラインまで下がったこと、および dsYTX ではこの現象が起らなかったことから、この YTX におけるレスポンスが静電的相互作用によることが示唆される。

また、水溶性タンパク質であるストレプトアビジン (SA) においては、YTX は膜タンパク質と同程度の親和性を示したのに対し、dsYTX はストレプトアビジンとほとんど親和性を示さなかった。これは、YTX の 2 つの硫酸基によって溶液中で 2 価のアニオンとして存在しており、正電荷を帯びたストレプトアビジンとの静電相互作用に起因するものであると考えられる。また、dsYTX との親和性は非常に弱い (YTX の解離定数 $K_D=60 \mu\text{M}$ に対して、dsYTX の解離定数 $K_D > 1,000 \mu\text{M}$) ことから、梯子状ポリエーテルとの特異的な相互作用ではないことは明らかである。

以上の結果、梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX は、膜タンパク質と広く相互作用し、中程度 ($K_D=10\sim100 \mu\text{M}$) の親和性を示すことが分かった。さらに、dsYTX は 2 つの硫酸基を有する YTX とは異なり、静電的相互作用の影響を排除することができるため、膜タンパク質を標的とした一般的な梯子状ポリエーテルモデルとして有効なことが示された。この様に梯子状ポリエーテル構造が広範な膜タンパク質に対して親和性を示すことが示唆されたので、次により一般性の高いモデル分子を用いて、分子長 (エーテル環の数) や側鎖置換基の影響を評価することにした。

表 3-1 梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX とタンパク質との親和性

梯子状 ポリエーテル	解離定数 K_D (μM)			
	APH1B	BCL2	BH3	SA
YTX	56	45	78	60 (静電的結合)
dsYTX	24	12	55	> 1,000

3-3-b 梯子状ポリエーテルモデル化合物と膜タンパク質 APH1B との相互作用解析

これまで、梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX が、グリシンジッパーに限らず広く膜タンパク質の構造モチーフを認識し、さらに静電的相互作用の影響を排除した dsYTX が膜タンパク質を標的とした一般的な梯子状ポリエーテルモデルとして有効であることが分かった。次に、梯子状ポリエーテル合成モデル化合物 (ALP) や非環状ポリエーテルを用いて、3-3-a と同様に APH1B との親和性を比較し、膜タンパク質との相互作用に必要な構造的要因について調べることにした。

3-3-b1 単環性ジベンジル体 ALP1B との相互作用解析

3-3-a で作製した APH1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で単環性ジベンジル体 ALP1B 溶液を添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-21A に示す。ALP1B 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し、ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ、これは ALP1B がセンサーチップ上の APH1B と速い結合、解離をしていることを示すものである。以上の結果から、ALP1B は APH1B と相互作用することが分かったが、特に低濃度の ALP1B 溶液においてセンサーグラムがあまり安定していないことから、dsYTX の場合とは異なり非常に弱い相互作用であると考えられる。また ALP1B の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし、用量依存曲線を作成した (図 3-21B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、解離定数 K_D は約 130 μM であった。

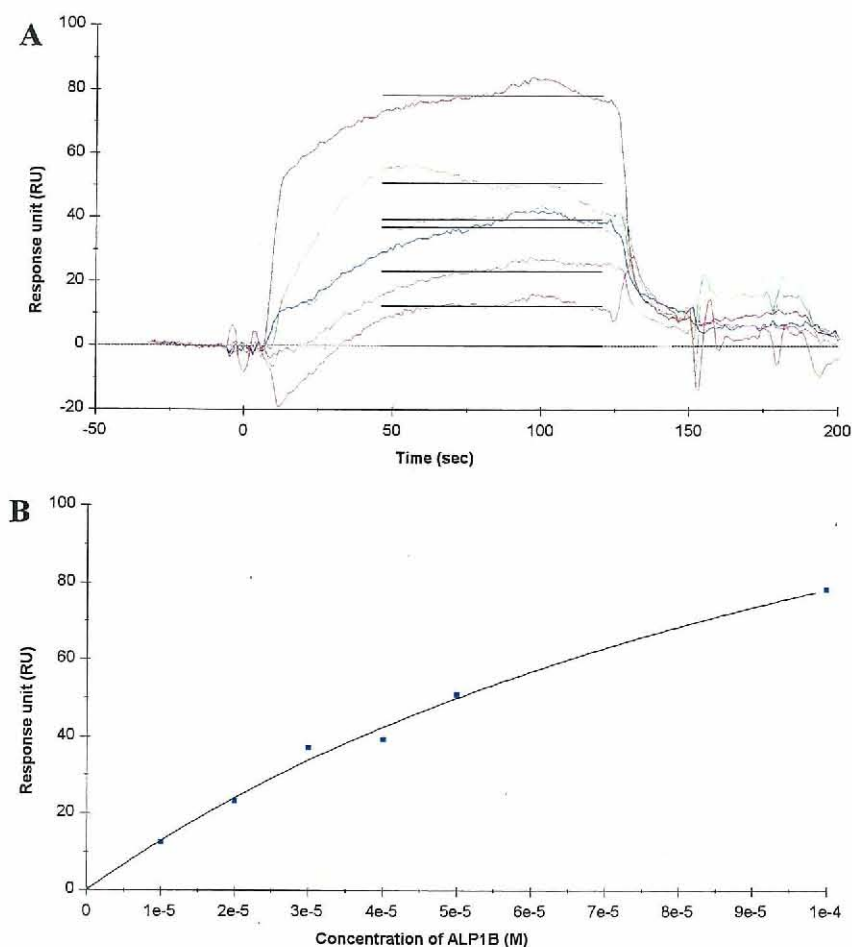


図 3-21 (A) 単環性ジベンジル体 ALP1B の APh1B に対するセンサーグラム, ALP1B 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色), 50 (緑) および 100 (茶) μM , (B) ALP1B の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP1B – APh1B 用量依存曲線

3-3-b2 四環性ジベンジル体 ALP4B との相互作用解析

前項と同様に作製した APh1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で ALP4B を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-22A に示す。ALP4B 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し, ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ, これは ALP4B がセンサーチップ上の APh1B と速い結合, 解離をしていることを示すものである。以上の結果から, ALP4B は APh1B と相互作用することが分かった。また ALP4B の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし, 用量依存曲線を作成した (図 3-22B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ, 解離定数 $K_D = 77 \mu\text{M}$ であった。

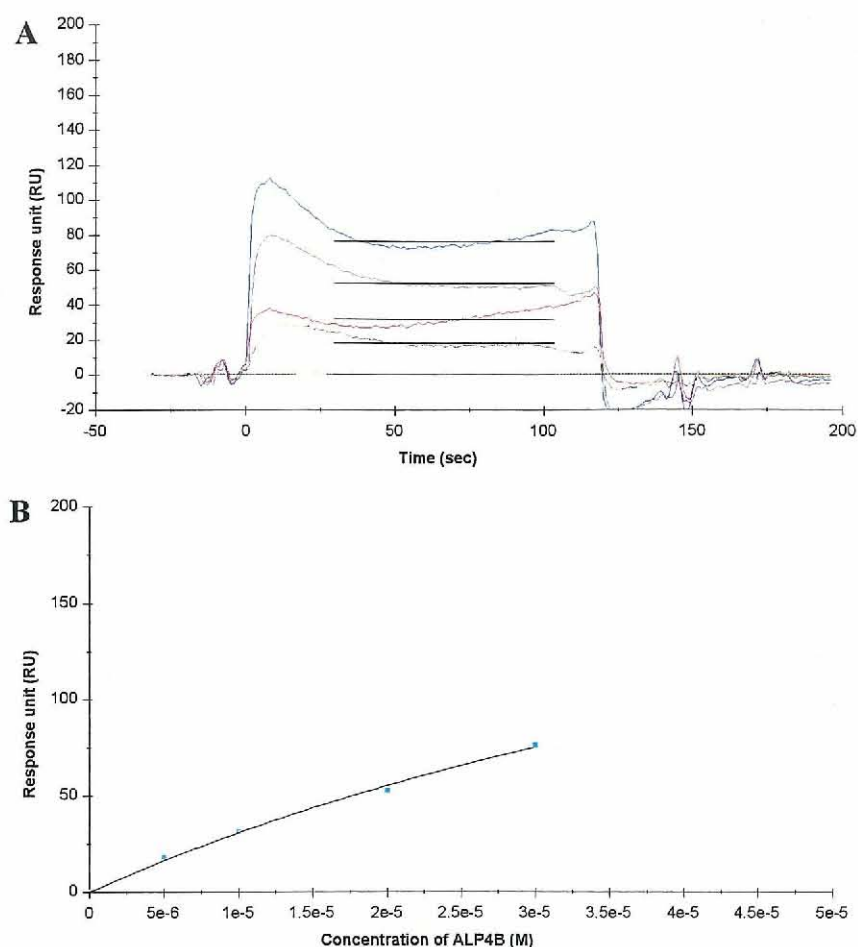


図 3-22 (A) ALP4B の APh1B に対するセンサーグラム, ALP4B 濃度; 0 (グレー), 5 (黄), 10 (赤), 20 (マゼンタ) および 30 (青) μM , (B) ALP4B の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP4B-APh1B 用量依存曲線

3-3-b3 七環性ジベンジル体 ALP7B との相互作用解析

前項と同様に作製した APh1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で ALP7B を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-23A に示す。ALP7B 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し, ほぼ一定値で平衡となった後, ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ, これは ALP7B がセンサーチップ上の APh1B と速い結合, 解離をしていることを示すものである。以上の結果から, ALP7B は APh1B と相互作用することが分かった。また ALP7B の濃度 (横軸) と平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし, 用量依存曲線を作成した (図 3-23B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ, 解離定数 $K_D = 67 \mu\text{M}$ であった。

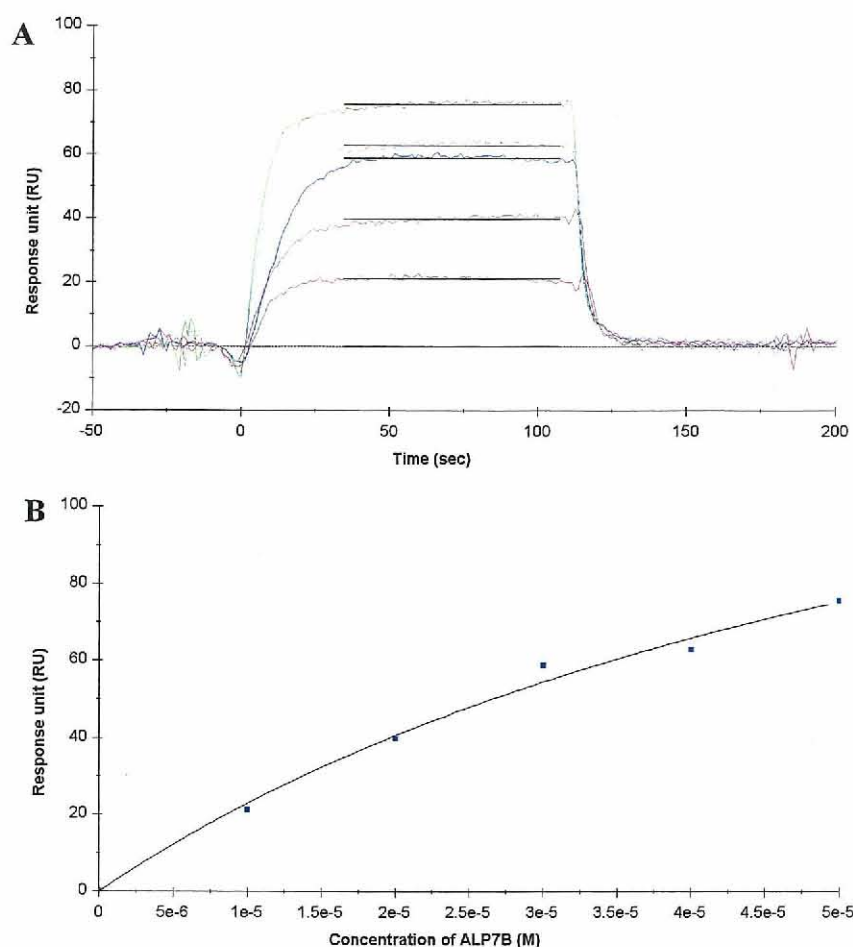


図 3-23 (A) ALP7B の APh1B に対するセンサーグラム, ALP7B 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) ALP7B の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP7B-APh1B 用量依存曲線

3-3-b4 四環性テトラオール体 ALP4A との相互作用解析

前項と同様に作製した APh1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で ALP4A を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-24A に示す。ALP4A 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し, ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ, これは ALP4A がセンサーチップ上の APh1B と速い結合, 解離をしていることを示すものである。以上の結果から, ALP4A は APh1B と相互作用することが分かったが, ALP1B と同様にセンサーグラムが安定していないことから, 弱い相互作用であるといえる。また ALP4A の濃度 (横軸) と比較的平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし, 用量依存曲線を作成した (図 3-24B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ, 解離定数 K_D は約 290 μM であった。

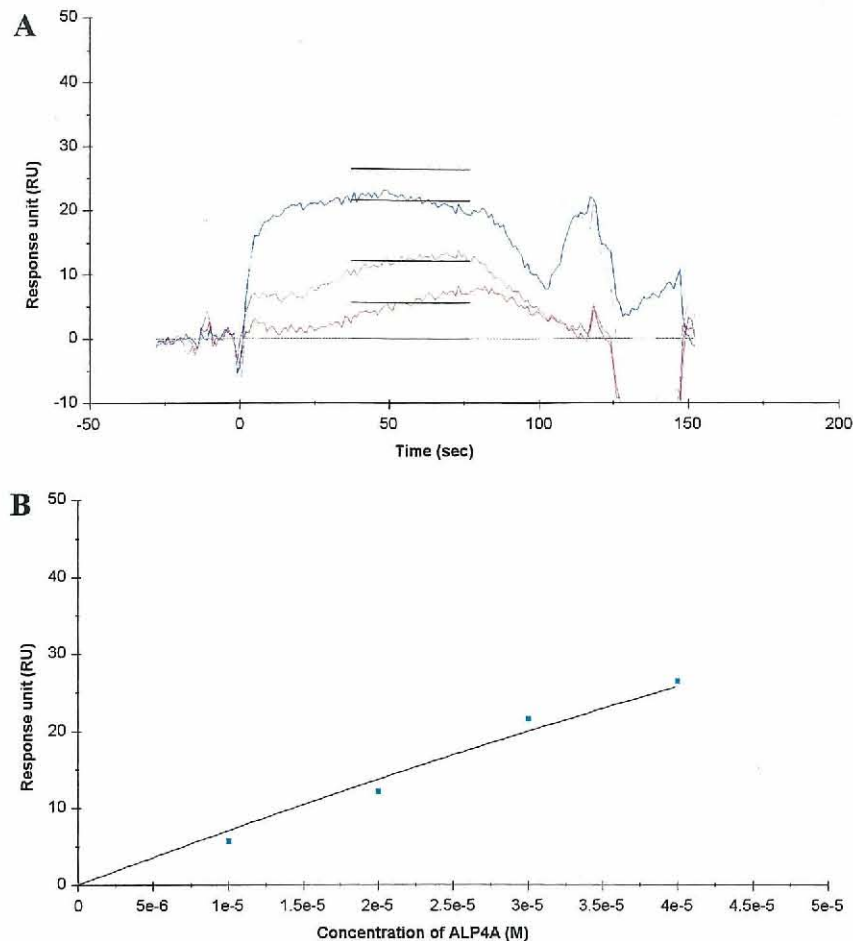


図 3-24 (A) ALP4A の APh1B に対するセンサーグラム, ALP4A 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) μM , (B) ALP4A の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP4A-APh1B 用量依存曲線

3-3-b5 七環性テトラオール体 ALP7A との相互作用解析

前項と同様に作製した APh1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で ALP7A を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-25A に示す。ALP7A 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し, ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ, これは ALP7A がセンサーチップ上の APh1B と速い結合, 解離をしている事を示すものである。以上の結果から, ALP7A は APh1B と相互作用することが分かったが, ALP7A 溶液において添加中のセンサーグラムが安定していないことから, 弱い相互作用であるといえる。また ALP7A の濃度 (横軸) と比較的平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし, 用量依存曲線を作成した (図 3-25B)。フィッティングにより解離定数 (K_D) を算出すると, K_D は約 190 μM であった。

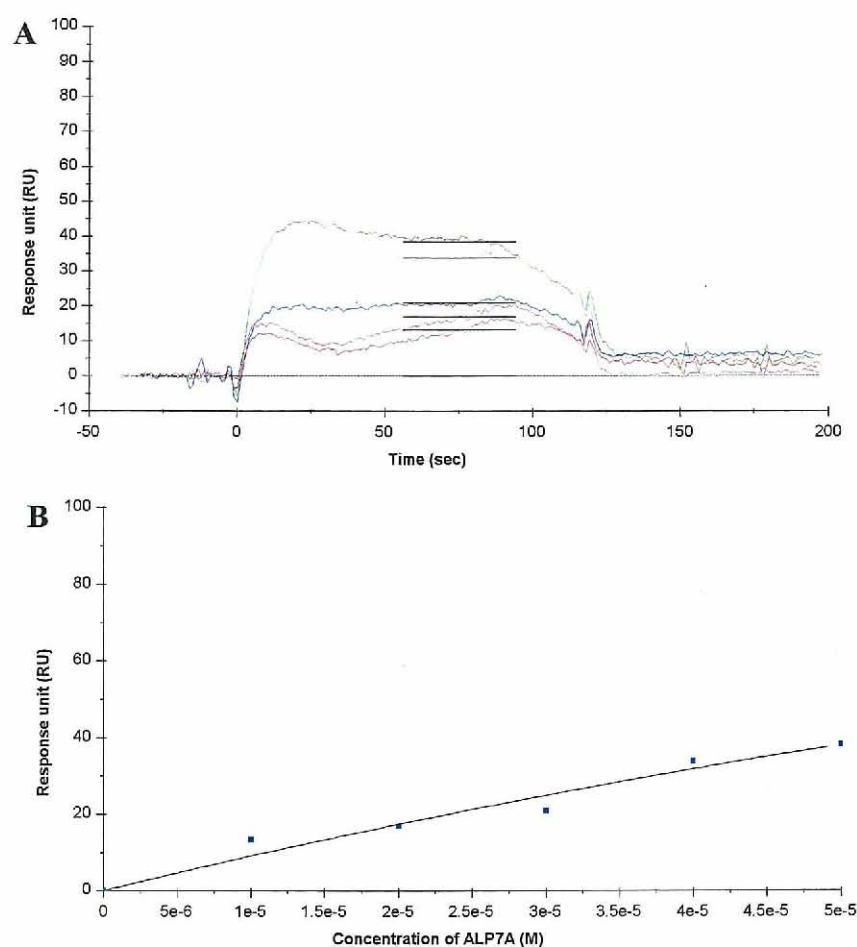


図 3-25 (A) ALP7A の APh1B に対するセンサーグラム, ALP7A 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) ALP7A の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP7A-APh1B 用量依存曲線

3-3-b6 十環性テトラオール体 ALP10A との相互作用解析

前項と同様に作製した APh1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で ALP10A を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 3-26A に示す。ALP10A が流れ始めるとすぐにセンサーグラムは上昇しほぼ一定値で平衡となり, また流れ終わってランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ, これは ALP10A がセンサーチップ上の APh1B と速い結合, 解離をしていることを示すものである。以上の結果から, ALP10A は APh1B と相互作用することが分かった。また ALP10A の濃度と平衡に達した時の RU 値をプロットし, 用量依存曲線を作成した (図 3-26B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ, 解離定数 $K_D = 51 \mu\text{M}$ であった。

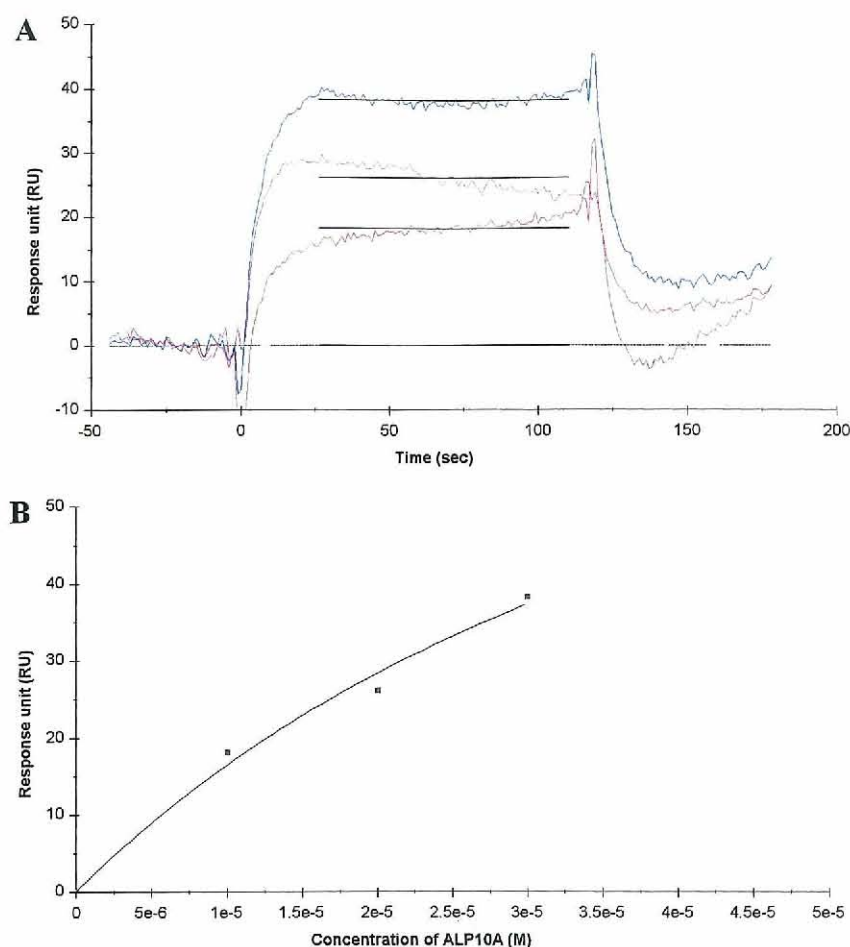


図 3-26 (A) ALP10A の APH1B に対するセンサーグラム, ALP10A 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ) および 30 (青) μM , (B) ALP10A の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP10A-APH1B 用量依存曲線

3-3-b7 トリプロピレングリコールとの相互作用解析

前項と同様に作製した APH1B 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度でトリプロピレングリコール (TPG) およびトリプロピレングリコールジベンジルエーテル (TPG2Bn) を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムをそれぞれ図 3-27A と図 3-27B に示す。TPG においては濃度依存的なセンサーグラムの上昇は観測されなかった。一方 TPG2Bn の場合は, 添加直後に濃度依存的にレスポンスの上昇が観測されたが, すぐに解離が始まり添加終了直前にはレスポンスがほぼゼロに近づいた。ベンジル基の寄与により一時的にセンサーチップ表面への濃縮が起こったが, 相互作用が非常に弱いために, すぐに解離が始まったことが原因と考えられる。以上により, 非環状ポリエーテル TPG および TPG2Bn は APH1B と相互作用しないことが分かった。

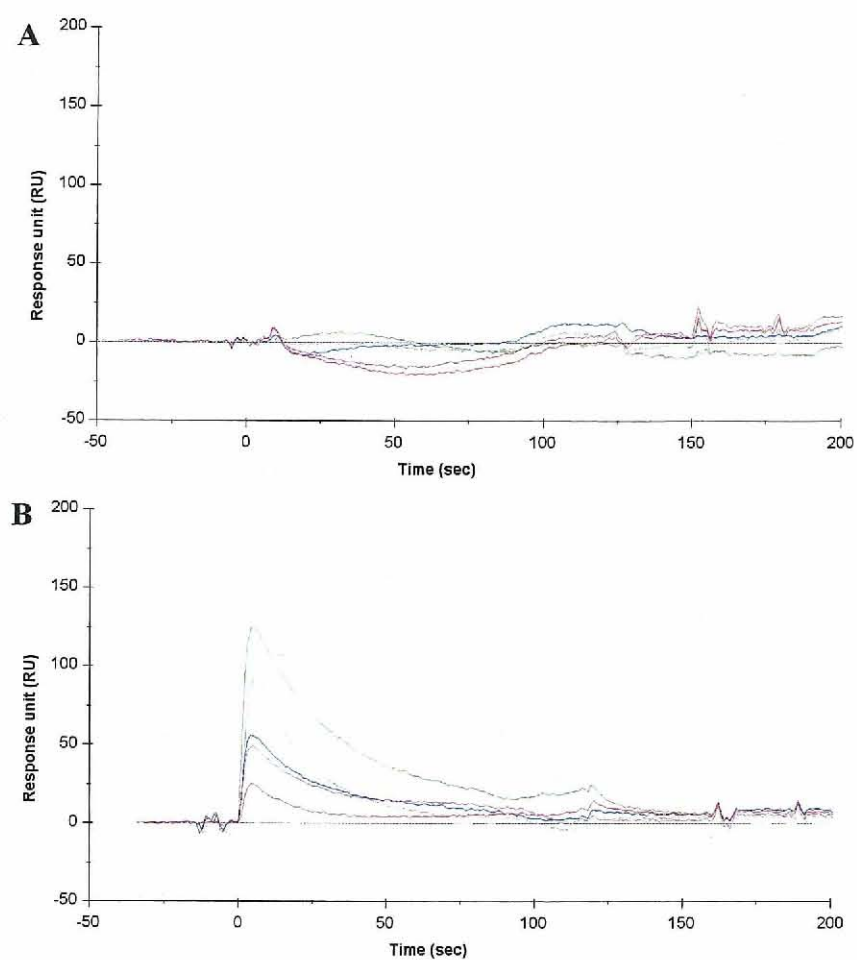


図 3-27 (A)TPG および(B)TPG2Bn の APT1B に対するセンサーグラム, TPG および TPG2Bn 濃度 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μ M

3-4 考 察

梯子状ポリエーテル化合物とタンパク質との相互作用解析結果から、梯子状ポリエーテル YTX と dsYTX は広く膜タンパク質と相互作用することが分かった。また、YTX は今回用いたタンパク質（ストレプトアビジン）やペプチド（BH3）との間に、静電的相互作用を生じやすいことが分かった。一方、dsYTX はその影響が観測されなかったため、一般的な梯子状ポリエーテル化合物のモチーフとして有効であることが分かった。また YTX および dsYTX は、今回用いた膜タンパク質および膜ペプチドに関して、グリシンジッパーを持つ APH1B および BH3 とグリシンジッパーを持たない BCL2 の両方に親和性を持つことから、氏原らの報告⁷⁵⁾と同様に、梯子状ポリエーテルはグリシンジッパーに限らず広く膜タンパク質と相互作用することが分かった。

次に、種々合成ポリエーテルモデル化合物と APH1B との相互作用解析を行い、膜タンパク質との相互作用に必要な構造的要因を検証した。ポリエーテル化合物の構造上の特徴と APH1B との相互作用解析結果を表 3-2 にまとめた。表 3-2 から、梯子状ポリエーテル合成モデル化合物（ALP）が膜タンパク質 APH1B と相互作用することが分かった。まず側鎖の置換基に注目すると、ジベンジル体（ALP4B および ALP7B）は、テトラオール体（ALP4A および ALP7A）と比べて、それぞれ約 3 倍程度強い親和性を持つことから、側鎖置換基の疎水性が膜タンパク質との相互作用に重要であることが明らかとなった。また、分子長（エーテル環の数）に注目すると、ジベンジル体については、ALP1B（単環性）<ALP4B（四環性）<ALP7B（七環性）の順に親和性が高くなっており、またテトラオール体についても同様に、ALP4A（四環性）<ALP7A（七環性）<ALP10A（十環性）の順に親和性が高くなっていることから、その親和性には分子長も大きく影響することが分かった。なお、十環性ジベンジル体 ALP10B は溶解性の問題から、測定不可能であった。さらには、非梯子状ポリエーテルトリプロピレングリコール（TPG）およびそのジベンジル誘導体であるトリプロピレングリコールジベンジルエーテル（TPG2Bn）と APH1B との相互作用解析の結果、共に親和性を持たないことが示され、側鎖置換基の疎水性のみでは親和性を持つことができず、梯子状構造が重要であることが分かった。

以上の結果、梯子状ポリエーテル化合物は、膜タンパク質との相互作用において、その梯子状ポリエーテル構造が不可欠であり、またその親和性を高める要因として、側鎖置換基の疎水性と分子長が重要であることが分かった。

このように梯子状ポリエーテル構造が様々な膜タンパク質に対して親和性を示す事実は、膜タンパク質中に相互作用にかかわる構造モチーフが広く存在することを示唆している。次章では、さらにこの分子認識の特異性を調べるために、dsYTX を梯子状ポリエーテルモデル

化合物として用いた阻害測定法の開発を行うことにした。

表 3-2 種々ポリエーテル化合物の APH1B に対する親和性

ポリエーテル化合物	特徴	解離定数 K_D (μM)
YTX	2つの硫酸基	56
dsYTX	脱硫酸 YTX	24
ALP1B	単環性, ジベンジル体	130
ALP4B	四環性, ジベンジル体	77
ALP7B	七環性, ジベンジル体	67
ALP4A	四環性, テトラオール体	290
ALP7A	七環性, テトラオール体	190
ALP10A	十環性, テトラオール体	51
TPG	非梯子状, ジオール体	—
TPG2Bn	非梯子状, ジベンジル体	—

— : 解析不可能

3-5 結 論

- SPR を用いた梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX と種々タンパク質との相互作用解析結果から, YTX および dsYTX が広く膜タンパク質と相互作用することが分かり, またその親和性を定量的 (解離定数 $K_D = 10 \sim 100 \mu\text{M}$ 程度) に求めることに成功した。また, 2つの硫酸基を持つ YTX の場合とは異なり, dsYTX は静電的相互作用を排除できるため, タンパク質と相互作用する一般的な梯子状ポリエーテルモデル化合物として有効であることが示された。
- 種々ポリエーテル化合物と膜タンパク質 APH1B との親和性を定量的に求めることに成功し, またその親和性評価の結果から, 二分子間の相互作用には梯子状ポリエーテル構造が不可欠であり, さらに親和性を高める要因として, 分子長 (エーテル環の数) および側鎖置換基の疎水性が重要であることを明らかにした。

参考文献

- 1) Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8929-8931. Structures of ciguatoxin and its congener.
- 2) Murata, M.; Legrand, A.-M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4380-4386. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 3) Satake, M.; Morohashi, A.; Oguri, H.; Oishi, T.; Hirama, M.; Harada, N.; Yamamoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11325-11326. The Absolute Configuration of Ciguatoxin.
- 4) Yasumoto, T.; Igarashi, T.; Legrand, A.-M.; Cruchet, P.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4988-4989. Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy.
- 5) Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2060-2062. Structure of maitotoxin.
- 6) Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7098-7107. Structure and Partial Stereochemical Assignments for Maitotoxin, the Most Toxic and Largest Natural Non-Biopolymer.
- 7) 安元健 (編). 化学同人 化学増刊 **1992**, *121*, 23-31. 化学で探る海洋生物の謎.
- 8) Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 361-362. Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 9) Morohashi, A.; Satake, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 97-100. Asymmetric synthesis of cyclic ethers by rearrangement of oxonium ylides generated from chiral copper carbenoids.
- 10) Nagai, H.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T.; Hirota, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1102-1103. Gambieric acids: unprecedented potent antifungal substances isolated from cultures of a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 11) Nagai, H.; Murata, M.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5448-5453. Gambieric acids, new potent antifungal substances with unprecedented polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 12) Morohashi, A.; Satake, M.; Nagai, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8995-9001. The Absolute Configuration of Gambieric Acids A-D, Potent Antifungal Polyethers, Isolated from the Marine Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 13) Lin, Y.-Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van, Engen, D.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J. C.; Nakanishi,

- K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6773-6775. Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium brevis*).
- 14) Shimizu, Y.; Chou, H. -N.; Bando, H.; Van Duyne, G.; Clardy, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 514-515. Structure of brevetoxin A (GB-1 toxin), the most potent toxin in the Florida red tide organism *Gymnodinium brevis* (*Ptychodiscus brevis*).
 - 15) Prasad, A. V. K.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6476-6477. The structure of hemibrevetoxin-B: a new type of toxin in the Gulf of Mexico red tide organism.
 - 16) Bourdelais, A. J.; Campbell, S.; Jacocks, H.; Naar, J.; Wright, J. L. C.; Carsi, J.; Baden, D. G. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2004**, *24*, 553-563. Brevenal is a Natural Inhibitor of Brevetoxin Action in Sodium Channel Receptor Binding Assays.
 - 17) Bourdelais, A. J.; Jacocks, H. M.; Wright, J. L. C.; Bigwarfe, P. M. Jr.; Baden, D. G. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 2-6. A new polyether ladder compound produced by the dinoflagellate *Karenia brevis*.
 - 18) Fuwa, H.; Ebine, M.; Sasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9650. Total Synthesis of the Proposed Structure of Brevenal.
 - 19) Fuwa, H.; Ebine, M.; Bourdelais, A. J.; Baden, D. G.; Sasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16989-16999. Total Synthesis, Structure Revision, and Absolute Configuration of (-)-Brevenal.
 - 20) Satake, M.; Shoji, M.; Oshima, Y.; Naoki, H.; Fujita, T.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5829-5832. Gymnocin-A, a cytotoxic polyether from the notorious red tide dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi*.
 - 21) Satake, M.; Tanaka, Y.; Ishikura, Y.; Oshima, Y.; Naoki, H.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3537-3540. Gymnocin-B with the largest contiguous polyether rings from the red tide dinoflagellate, *Karenia* (formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi*.
 - 22) Tanaka, K.; Itagaki, Y.; Satake, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T.; Nakanishi, K.; Berova, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9561-9570. Three Challenges toward the Assignment of Absolute Configuration of Gymnocin-B.
 - 23) Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5869-5872. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.
 - 24) Satake, M.; Terasawa, K.; Kadowaki, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5955-5958. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallops.
 - 25) Takahashi, H.; Kusumi, T.; Kan, Y.; Satake, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*,

- 7087-7090. Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy(2-naphthyl)acetic acid.
- 26) Satake, M.; MacKenzie, L.; Yasumoto, T. *Natural toxins* **1997**, *5*, 164-167. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin.
 - 27) Paz, B.; Riobo, P.; Luisa F. M.; Fraga, S.; Franco, J. M. *Toxicon* **2004**, *44*, 251-258. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture.
 - 28) Ogino, H.; Kumagai, M.; Yasumoto, T. *Natural Toxins* **1997**, *5*, 255-259. Toxicologic evaluation of yessotoxin.
 - 29) de la Rosa, L. A.; Alfonso, A.; Vilariño, N.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 827-833. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin.
 - 30) Konishi, M.; Yang, X.; Li, Bo.; Fairchild, C. R.; Shimizu, Y. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1309-1313. Highly Cytotoxic Metabolites from the Culture Supernatant of the Temperate Dinoflagellate *Protoceratium cf. reticulatum*.
 - 31) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R. *Toxicon* **1999**, *37*, 689-693. Isolation of 45-hydroxyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea.
 - 32) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Poletti, R.; Viviani, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 291-295. A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic Sea Mussels.
 - 33) Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Poletti, R.; Viviani, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8897-8900. Isolation of adriatoxin, a new analog of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea.
 - 34) Daiguji, M.; Satake, M.; Ramstad, H.; Aune, T.; Naoki, H.; Yasumoto, T. *Natural toxins* **1998**, *6*, 235-239. Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway.
 - 35) Catterall, W. A.; Risk, M. *Mol. Pharmacol.* **1981**, *19*, 345-348. Toxin T4 from *Ptychodiscus brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) enhances activation of voltage-sensitive sodium channels by veratridine.
 - 36) Bidard, J. N.; Vijverberg, H. P.; Frelin, C.; Chung, E.; Legrand, A.-M.; Badnis, R.; Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8353-8357. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin.

- 37) Trainer, V. L.; Baden, D. G.; Catterall, W. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19904-19909. Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels.
- 38) Ohizumi, Y. *Bioactive Molecules* **1989**, *10*, 407-416. The mode of cardiotoxic and cardiotoxic action of maitotoxin and ciguatera toxins.
- 39) Ohizumi, Y.; Shibata, S.; Tachibana, K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *217*, 475-480. Mode of the excitatory and inhibitory actions of ciguatera toxin in the guinea pig vas deferens.
- 40) Lombet, A.; Bidard, J. -N.; Lazdunski, M. *FEBS Lett.* **1987**, *219*, 355-359. Ciguatera toxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent sodium channel.
- 41) Dechraoui, M.-Y.; Naar, J.; Pauillac, S.; Legrand, A. -M. *Toxicon* **1999**, *37*, 125-143. Ciguatera toxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels.
- 42) Louzao, M. C.; Cagide, E.; Vieytes, R.; Sasaki, M.; Fuwa, H.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Cell. Physiol. Biochem.* **2006**, *17*, 257-268. The Sodium Channel of Human Excitable Cells is a Target for Gambierol.
- 43) Cuypers, E.; Abdel-Mottaleb, Y.; Kopljar, I.; Rainier, J. D.; Raes, A. L. Snyders, D. J.; Tytgat, J. *Toxicon* **2008**, *51*, 974-983. Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels.
- 44) Narahashi, T.; Moore, J. W.; Posten, P. N. *Science* **1967**, *156*, 976-979. Tetrodotoxin derivatives: chemical structure and blockage of nerve membrane conductance.
- 45) Inoue, M.; Hiramata, M.; Satake, M.; Sugiyama, K.; Yasumoto, T. *Toxicon* **2003**, *41*, 469-474. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A.
- 46) Takahashi, M.; Ohizumi, Y.; Yasumoto, T. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7287-7289. Maitotoxin, a Ca^{2+} channel activator candidate.
- 47) Murata, M.; Gusovsky, F.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T.; Daly, J. W. *Toxicon* **1991**, *29*, 1085-1096. Effect of maitotoxin analogs on calcium influx and phosphoinositide breakdown in cultured cells.
- 48) Daly, J. W.; Lueders, J.; Padgett, W. L.; Shin, Y.; Gusovsky, F. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1187-1197. Maitotoxin-elicited calcium influx in cultured cells. Effect of calcium-channel blockers.
- 49) Nakahata, N.; Ohkubo, S.; Ito, E.; Nakano, M.; Terao, K.; Ohizumi, Y. *Toxicon* **1999**, *37*, 1375-1389. Comparison of maitotoxin with thromboxane A₂ in rabbit platelet activation.

- 50) Alfonso, A.; de la Rosa, L.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 193-208. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.
- 51) Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 93-99. A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases.
- 52) Leira, F.; Alvarez, C.; Vieites, J. M.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M. *Toxicology in Vitro* **2002**, *16*, 23-31. Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line.
- 53) Huai, Q.; Colicelli, J.; Ke, H. *Biochemistry* **2003**, *42*, 13220-13226. The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis.
- 54) Pazos, M-J.; Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Vieites, J. M.; Botana, L. M. *Anal. Biochem.* **2004**, *335*, 112-118. Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions.
- 55) Pazos, M-J.; Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1155-1160. Kinetic Analysis of the Interaction between Yessotoxin and Analogues and Immobilized Phosphodiesterases Using a Resonant Mirror Optical Biosensor.
- 56) Malaguti, C.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Rossini, G. P. *Toxicology in Vitro* **2002**, *16*, 357-363. Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells.
- 57) Gawley, R. E.; Rein, K. S.; Jeglitsch, G.; Adams, D. J.; Theodorakis, E. A.; Tiebes, J.; Nicolaou, K. C.; Baden, D. G. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 533-541. The relationship of brevetoxin length and A-ring functionality to binding and activity in neuronal sodium channels.
- 58) Yasumoto, T.; Murata, M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1897-1909. Marine toxins.
- 59) Candenas, M. L.; Pinto, F. M.; Cintado, C. G.; Morales, E. Q.; Brouard, I.; Díaz, M. T.; Rico, M.; Rodríguez, E.; Rodríguez, R. M.; Pérez, R.; Pérez, R. L.; Martín, J. D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1921-1942. Synthesis and biological studies of flexible brevetoxin/ciguatoxin models with marked conformational preference.
- 60) Mori, M.; Oishi, T.; Matsuoka, S.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Murata, M.; Satake, M.; Oshima, Y.; Matsushita, N.; Aimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5099-5103. Ladder-shaped polyether compound, desulfated yessotoxin, interacts with membrane-integral α -helix peptides.
- 61) Oguri, H.; Oomura, A.; Tanabe, S.; Hirama, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2179-2183. Design

and synthesis of a trans-fused polycyclic ether skeleton as an α -helix mimetic scaffold.

- 62) Oguri, H.; Tanabe, S.; Oomura, A.; Umetsu, M.; Hirama, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5801-5805. Synthesis and evaluation of α -helix mimetics based on a trans-fused polycyclic ether: sequence-selective binding to aspartate pairs in α -helical peptides.
- 63) Smith, S. O.; Song, D.; Shekar, S.; Groesbeek, M.; Ziliox, M.; Aimoto, S. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6553-6558. Structure of the Transmembrane Dimer Interface of Glycophorin A in Membrane Bilayers.
- 64) MacKenzie, K. R.; Prestegard, J. H.; Engelman, D. M. *Science* **1997**, *276*, 131-133. A transmembrane helix dimer: structure and implications.
- 65) Nagumo, Y.; Oguri, H.; Shindo, Y.; Sasaki, S.; Oishi, T.; Hirama, M.; Tomioka, Y.; Mizugaki, M.; Tsumuraya, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2037-2040. Concise Synthesis of Ciguatoxin ABC-Ring Fragments and Surface Plasmon Resonance Study of the Interaction of their BSA Conjugates with Monoclonal Antibodies.
- 66) Oguri, H.; Hirama, M.; Tsumuraya, T.; Fujii, I.; Maruyama, M.; Uehara, H.; Nagumo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7608-7612. Synthesis-Based Approach toward Direct Sandwich Immunoassay for Ciguatoxin CTX3C.
- 67) Briggs, L. R.; Miles, C. O.; Fitzgerald, J. M.; Ross, K. M.; Garthwaite, I.; Towers, N. R. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5836-5842. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Yessotoxin and Its Analogues.
- 68) Alfonso, A.; de la Rosa, L.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 193-208. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.
- 69) Senes, A.; Engel, D. E.; DeGrado, F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 465-479. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs.
- 70) Russ, W. P.; Engelman, D. M. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 911-919. A Framework for Transmembrane Helix-Helix Association.
- 71) Kim, S.; Chamberlain, A. K.; Bowie, J. U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5988-5991. Membrane channel structure of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin: role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels.
- 72) Doura, A. K.; Kobus, F. J.; Dubrovsky, L.; Hibbard, E.; Fleming, K. G. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 991-998. Sequence Context Modulates the Stability of a GxxxG-mediated Transmembrane Helix-Helix Dimer.

- 73) Polgar, O.; Robey, R. W.; Morisaki, K.; Dean, M.; Michejda, C.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V.; Tarasova, N.; Bates, S. E. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9448-9456. Mutational Analysis of ABCG2: Role of the GXXXG Motif.
- 74) Torikai, K.; Yari, H.; Mori, M.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6355-6359. Design and synthesis of an artificial ladder-shaped polyether that interacts with glycoporphin A.
- 75) Ujihara, S.; Oishi, T.; Torikai, K.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oshima, Y.; Aimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6115-6118. Interaction of ladder-shaped polyethers with transmembrane α -helix of glycoporphin A as evidenced by saturation transfer difference NMR and surface plasmon resonance.
- 76) Torikai, K.; Oishi, T.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Konoki, K.; Murata, M.; Aimoto, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10217-10226. Design and Synthesis of Ladder-Shaped Tetracyclic, Heptacyclic, and Decacyclic Ethers and Evaluation of the Interaction with Transmembrane Proteins.
- 77) Lee, S-F.; Shah, S.; Yu, C.; Wigley, W. C.; Li, Harry.; Lim, M.; Pedersen, K.; Han, W.; Thomas, P.; Lundkvist, J.; Hao, Y-H.; Yu, G. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4144-4152. A Conserved GXXXG Motif in APH-1 Is Critical for Assembly and Activity of the γ -Secretase Complex.
- 78) Araki, W.; Saito, S.; Takahashi-Sasaki, N.; Shiraishi, H.; Komano, H.; Murayama, K. S. *J. Mol. Neurosci.* **2006**, *29*, 35-43. Characterization of APH-1 mutants with a disrupted transmembrane GxxxG motif.

第4章 固定化梯子状ポリエーテル化合物を用いた阻害測定法の開発とホスホジエステラーゼに対する親和性評価

4-1 序 論

第3章で示したブレベトキシン類(図 3-3)やシガトキシン類(図 3-1)は神経細胞膜の電位依存性ナトリウムチャンネル(VSSC)に特異的に結合して毒性を発現すると言われている¹⁻³⁾。また、ガンビエロールやカンビエル酸(図 3-2)は、この VSSC に対してブレベトキシンと競争的に結合することが確認されている⁴⁻⁶⁾。さらにマイトトキシンは細胞膜に作用してカルシウムイオンの細胞内への過剰流入を引き起こし、非常に強い毒性を発現することが知られている^{7,8)}。また、当研究室の森、氏原らは梯子状ポリエーテル化合物として脱硫酸化イエソトキシン(dsYTX, 図 3-10)を、膜タンパク質としてグリコフォリン A(GpA)を用いて、これらの間に相互作用があるかどうかを SDS-PAGE 実験^{9,10)}、表面プラズモン共鳴法(SPR)¹⁰⁾および NMR¹⁰⁾によって調べ、相互作用の結果 GpA 会合体が脱会合されることを確認した。このように梯子状ポリエーテル化合物は膜タンパク質と相互作用して、その活性を発現することが示唆された。第3章では、膜タンパク質をリガンドとしてセンサーチップ表面に固定化し、イエソトキシン(YTX, 図 3-10)および dsYTX などの梯子状ポリエーテル化合物を含む溶液をアナライトとして加え、この二分子間の相互作用(直接測定法)を、表面プラズモン共鳴装置を用いて解析し、梯子状ポリエーテル化合物のタンパク質モチーフの探索を試みた。その結果、これら YTX および dsYTX の様々な膜タンパク質に対する相互作用を定量的に評価することに成功した。また同時に、当研究室の鳥飼らによって合成された人工梯子状ポリエーテル(ALP, 図 3-11)あるいは非梯子状ポリエーテルについても相互作用解析を行い、その分子長(エーテル環の数)および側鎖置換基の疎水性ならびに梯子状骨格が、これら膜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。ところが、このとき用いた直接測定法(その詳細は 4-1-a で解説)には以下に示すような幾つかの問題点が挙げられる。

- ① 非特異的吸着等の影響を受け易く、擬陽性が生じやすいこと。
- ② SPR はセンサーチップ表面で相互作用した分子の質量を認識していることから、より信頼性の高い測定を行うためには、アナライトが 1,000 Da 以上の分子量であることが望ましいこと。
- ③ 梯子状ポリエーテル化合物とタンパク質との相互作用解析において、アナライトに対して複数のタンパク質を解析したい場合、その都度センサーチップにタンパク質を固定化する必要があり煩雑であること。

- ④ 共有結合により固定化した場合、タンパク質の活性部位を損なう恐れがあること。
 - ⑤ センサーチップ上に固定したタンパク質の劣化に注意を払わなければならないこと。
- これらの問題点を解決することは、より信頼性の高いデータの取得につながると考えられる。

4-1-a SPR 測定に用いられる測定モード¹¹⁾

これまで SPR 測定において、様々な測定モードが研究に用いられてきた。測定モードは、対象となるアナライト分子の大きさや相互作用分子間の結合特性、測定する濃度範囲、サンプルのマトリックスなど多くの要因に基づいて選択可能である。このうち主な方法は、[図 4-1](#) に示す 4 種類のモードである。

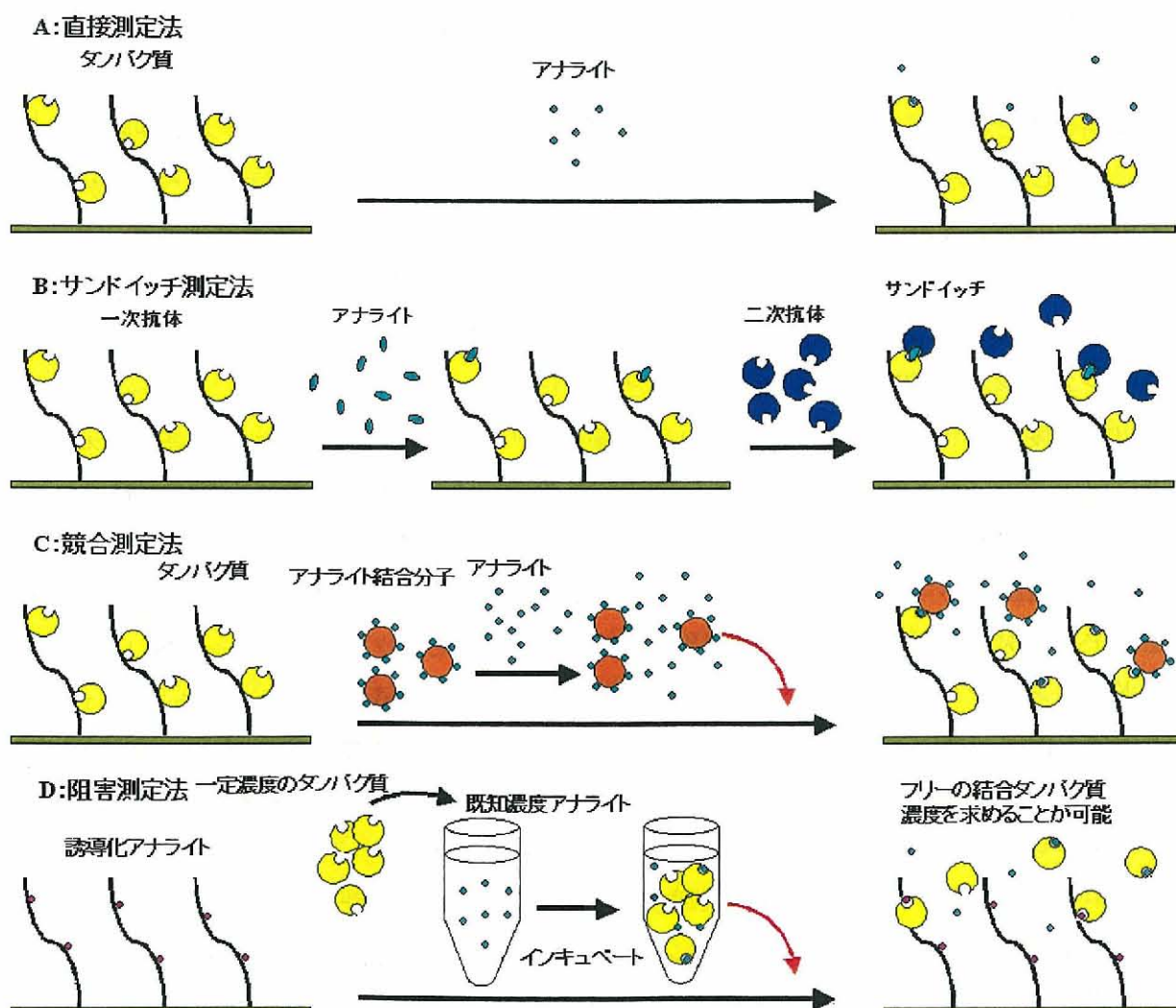


図 4-1 4 種類の測定モード (A ; 直接測定法, B ; サンドイッチ測定法, C ; 競合測定法および D ; 阻害測定法)


直接測定法（図 4-1A）は、一方の相互作用分子（例えば抗体など）を SPR センサーチップ表面に固定化し、アナライト（測定対象分子）溶液を加え固定化した抗体との相互作用を観測する方法である。その結果として、SPR センサーは相互作用に伴う質量（屈折率）の変化を SPR レスポンスとして測定することができ、その単純さおよび簡便性のために、最も広く使用されている方法である。しかし前述の通り、その測定には①擬陽性が生じやすく、また②アナライトが低分子量の場合に検出が困難であることなど幾つもの問題点が挙げられる。

また、サンドイッチ測定法（図 4-1B）は、①特異性と②検出限界（LOD, limited of detection）に関して改良した方法であり、固定化した抗体に低分子量アナライトを加え一旦相互作用させた後、高分子量の二次抗体を加えることにより間接的ではあるがより高感度に相互作用を観測する方法である。またこの方法では、非特異的に結合した分子の影響を回避できる。しかし、2 種類の抗体を準備する必要がある、またアナライトに対して一次および二次抗体がお互いに同一の結合サイト（エピトープ）を持たないこと、一次抗体とアナライトとの親和性が高いことなどが必須条件となる。低分子量（1,000 Da 以下）のアナライトを使用した場合、しばしば十分な（センサー表面の質量変化に伴う）レスポンスが得られないことがある。その場合、競合測定法（図 4-1C）かあるいは阻害測定法（図 4-1D）が有効である。




競合測定法（図 4-1C）は、予めセンサーチップ表面にアナライトと相互作用する抗体などを固定化しておき、例えば BSA などのタンパク質と共有結合で連結したアナライトを加え、そのレスポンスを観測する。タンパク質と結合したアナライトを一定にし、フリーのアナライトの濃度を少しずつ高くすると、この 2 種類のアナライトの競合により、結合レスポンスは低分子アナライトの濃度に反比例して減少するので、これを観測することにより低分子アナライトの親和性評価が可能となる。

阻害測定法（図 4-1D）では、まずアナライトあるいはその誘導体をセンサーチップ上に固定化する。次にアナライトに対して親和性を持つ抗体などのタンパク質を一定にし、アナライトをサンプルとして添加し、インキュベートする。この溶液を、アナライトあるいはその誘導体を固定したセンサーチップに加えると、インキュベートの際にアナライトと結合していないフリーのタンパク質のみが、固定したアナライトあるいはその誘導体と相互作用する。この結合レスポンスは、加えたアナライトの濃度に反比例する。

図 4-1A-C に示した 3 種の方法に共通する問題点は、一次抗体などのタンパク質を固定しなければならないことである。一般にタンパク質や抗体の固定化は、その末端アミノ残基のアミノ基やカルボキシル基の他、官能基であるリシンのアミノ基、システインのチオール基などが結合にかかわっている。その問題点として、タンパク質がランダムに結合され、タンパク質の結合状態が不均一になっている恐れがある。また、リシンやシステインは、分子間相

相互作用において重要な役割を持つことが多く、センサーチップ表面に対する固定化により結合（活性）部位を損なう恐れがある。一方、 4-1D に示した阻害測定法は、溶液中での 2 分子間相互作用をセンサーチップ上に固定したアナライトあるいはその誘導体によって間接的に観測する方法である。すなわち、測定対象は一般に高分子量のタンパク質であるため、高いレスポンスが得られ、またセンサーチップ上に固定した場合とは異なり、タンパク質は常に非変性状態で使用でき、さらに非特異的吸着も抑制される。表面化学である SPR の欠点であった測定対象の固定化を回避でき、溶液中での反応のため、結合または活性部位を損なう心配もない。また、同じ結合部位（エピトープ）に結合する異なるアナライトについても、先に作製した同じセンサーチップを用いて評価可能であることが大きな利点と言える。

4-1-b 阻害測定法の実験例

SPR を用いた阻害測定法は、食品の品質管理や毒素による食品の汚染に対する安全性試験、例えば食品中のビタミン類の検出やカビ毒（マイコトキシン）の一つであるアフラトキシン B₁ (312.27 Da) の検出に使用されている。Caelen らはビタミン B₂（リボフラビン, 376.36 Da）の定量法を開発している。誘導化したリボフラビンをセンサーチップ表面に固定化し、ミルクのようなマトリックスが複雑なサンプルとリボフラビン結合タンパク質（鶏卵卵白由来）をインキュベート後、先ほどのセンサーチップに加え、フリーのリボフラビン結合タンパク質を観測することにより間接的にミルク中に含まれるリボフラビンの定量に成功した。その結果、広い濃度範囲（3～1,000 ng/mL）と低検出限界（LOD, 17.1 ng/mL）で良好な検量線が得られ、ミルク中のリボフラビンの定量結果は、従前より広く採用されている HPLC 法とほぼ一致していることを示した（ 4-2）¹²⁾。このほかにも、様々なビタミンの定量が行われている。例えば、ビタミン B₁₂（シアノコバラミン, 1,355.4 Da）は通常食品や生体内に微量しか存在せず、サンプルマトリックスの複雑さもあってその定量は非常に困難である。そのため、ビタミンプレミックスなどビタミン B₁₂ が高濃度含まれるサンプルのみしか HPLC 法での測定はできず、通常大抵の食品の場合、定量には微生物定量法が用いられている。この微生物定量法は、感度が良く、目的の成分を総量（例えば、ピリドキシン、ピリドキサーールおよびピリドキサミンなどをビタミン B₆ 総量として、 4-3）として算出できるなどの長所がある。一方、微生物の管理、操作が煩雑、有効な検量線の範囲が狭い、測定（培養）に時間が掛かる（2 日）などの短所がある。ビタミン B₁₂（シアノコバラミン）においても、ビタミン B₁₂ 結合タンパク質を用いて同様に阻害測定法による研究が行われた。この測定法は、操作が簡便で、測定時間も数時間で実施され、0.08～2.40 ng/mL の範囲で良好な検量線が得られ、従前より実施されている微生物定量法に対して、相関係数 0.999 以上の良好な結果が得られた（ 4-4）。

4-4)。また、Daly らは BSA と結合したアフラトキシン B₁ を用いてポリクローナル抗体を得た後、BSA と結合したアフラトキシン B₁ をセンサーチップ表面に固定化し、先ほどのポリクローナル抗体とアフラトキシン B₁ をインキュベートした溶液を添加することにより、食品中のアフラトキシン B₁ の定量に成功した (図 4-5)¹³⁾。

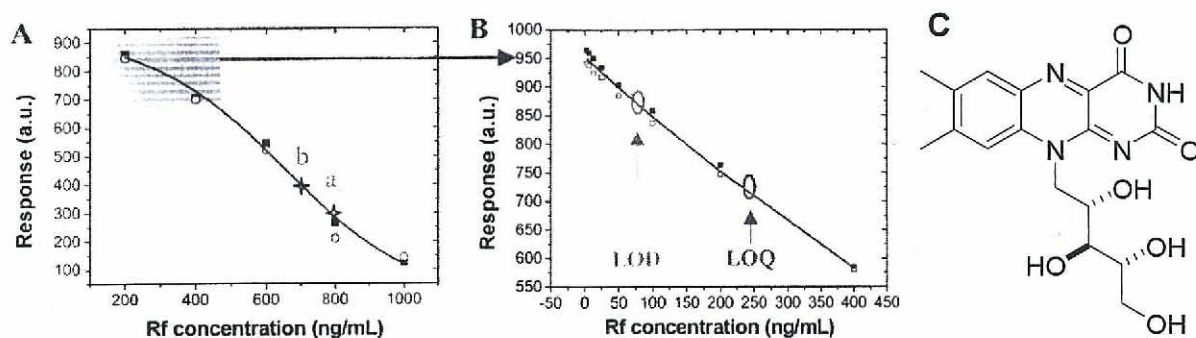


図4-2 リボフラビン結合タンパクを用いた阻害測定法による食品中のリボフラビンの定量 (A) キャリブレーションカーブ (200~1,000 ng/mL リボフラビン), (B) キャリブレーションカーブ¹²⁾ (3~400 ng/mL リボフラビン), LOD (検出限界, limited of detection), LOQ (定量限界, limited of quantification (LOQ)と(C) リボフラビンの化学構造



図4-3 ビタミンB₆の化学構造

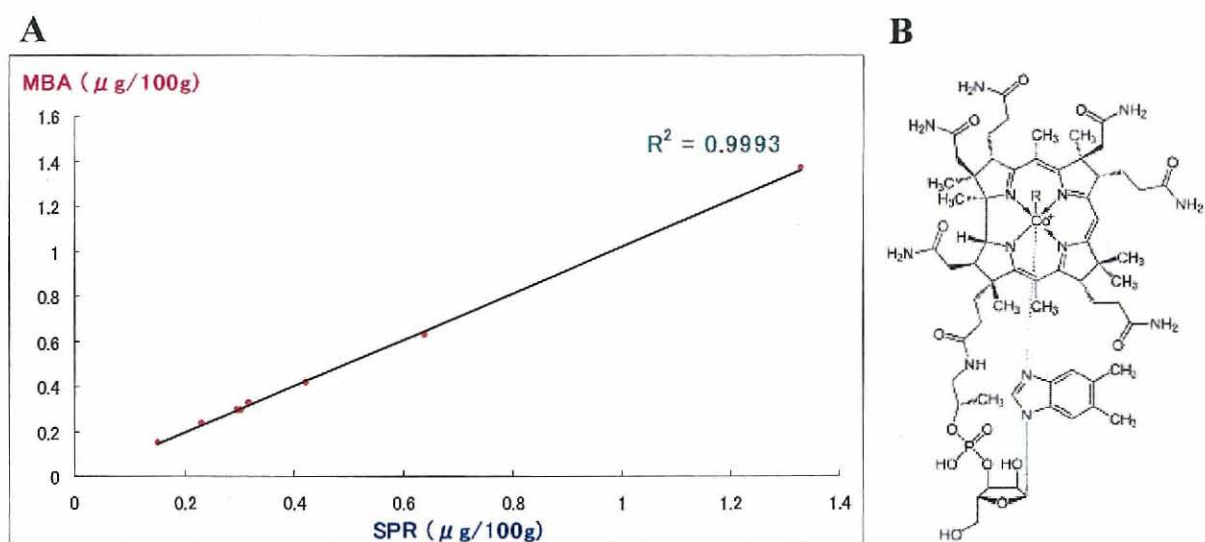


図 4-4 (A) 表面プラズモン共鳴法 (SPR) と微生物定量法 (MBA) におけるビタミン B₁₂ (シアノコバラミン) の定量結果の比較, (B) シアノコバラミン (R=CN) の化学構造

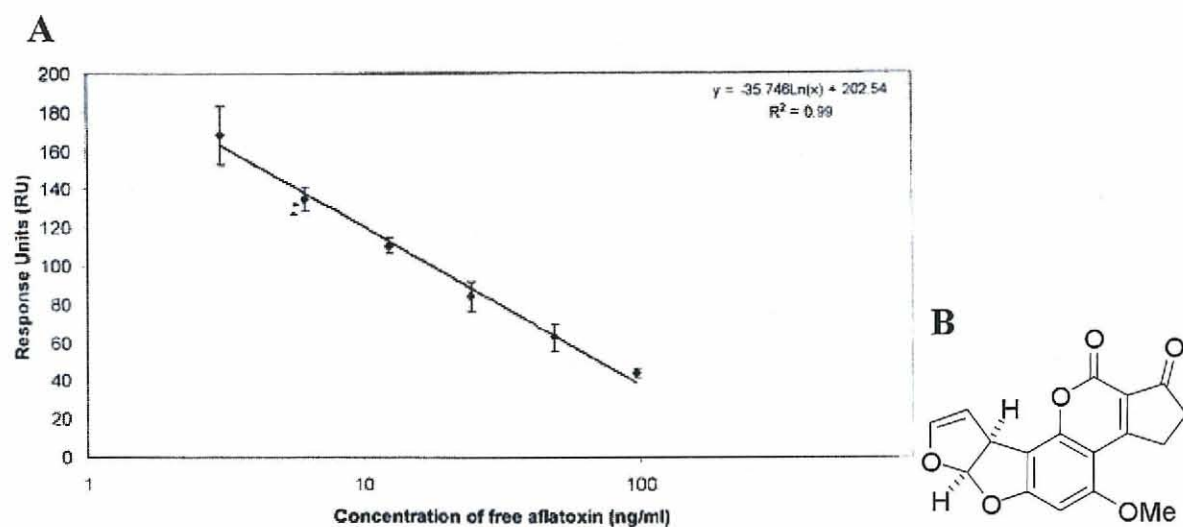


図 4-5 (A) アフラトキシシン B₁ のキャリブレーションカーブ (5~100 ng/mL)¹³⁾ と (B) 化学構造

また、本方法は医療診断の現場でも広く研究されている。例えば Li らはヒスタミンのような低分子量 (111.14 Da) の化合物においても阻害測定法を用いることにより、抗アレルギー試験を可能にした (図 4-6)¹⁴⁾。

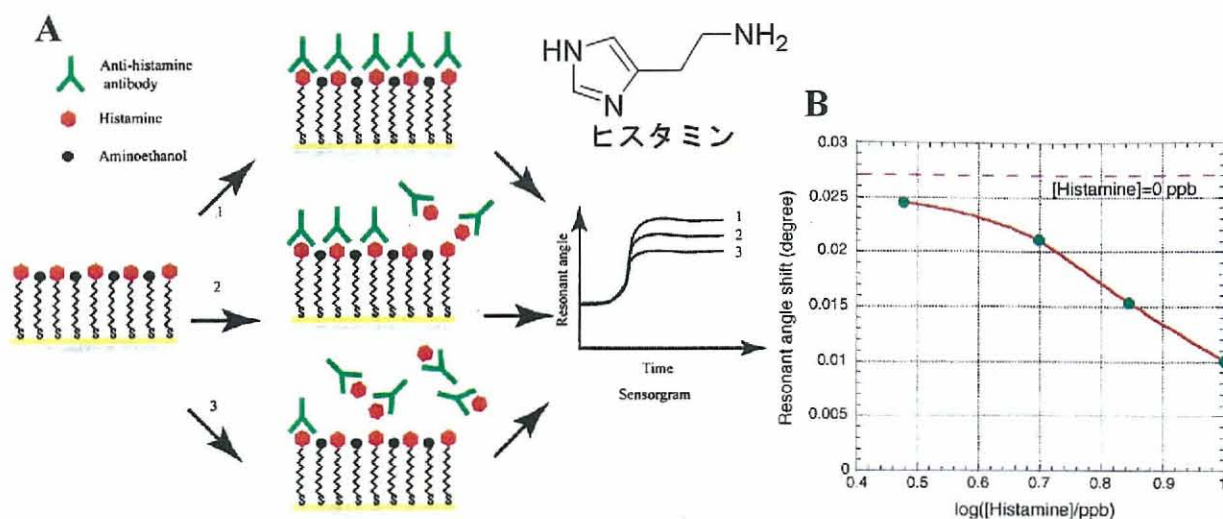


図 4-6 ヒスタミンおよび抗ヒスタミン抗体の阻害測定法の原理 (A) ヒスタミンをセンサーチップ表面に固定化し，抗ヒスタミン抗体と測定対象のヒスタミンを予めインキュベートした溶液を，先ほどのセンサーチップに加えると，測定対象のヒスタミン濃度に反比例してレスポンスが減少する (B) このときのヒスタミン濃度に対するレスポンスをプロットしたキャリブレーションカーブ¹⁴⁾

また環境分野においては，三浦らは爆薬や地雷の原料でもある 2, 4, 6-トリニトロトルエン (TNT, 227.13 Da) やその同族体 (168.11~287.14 Da) の阻害測定法による検出に成功した。当初，抗 TNT 抗体をセンサーチップ上に固定化し，TNT 溶液を加え相互作用解析（直接測定法）を試みたが，十分なレスポンスは得られなかった。そこで，アラニンと結合させた TNT をセンサーチップ上に固定化し，TNT および同族体と抗 TNT 抗体をインキュベートした溶液を加えることにより，定量を可能にし，さらには TNT および同族体の固定した TNT に対する 50%阻害濃度 IC_{50} の算出にも成功している (図 4-7, 表 4-1)¹⁵⁾。

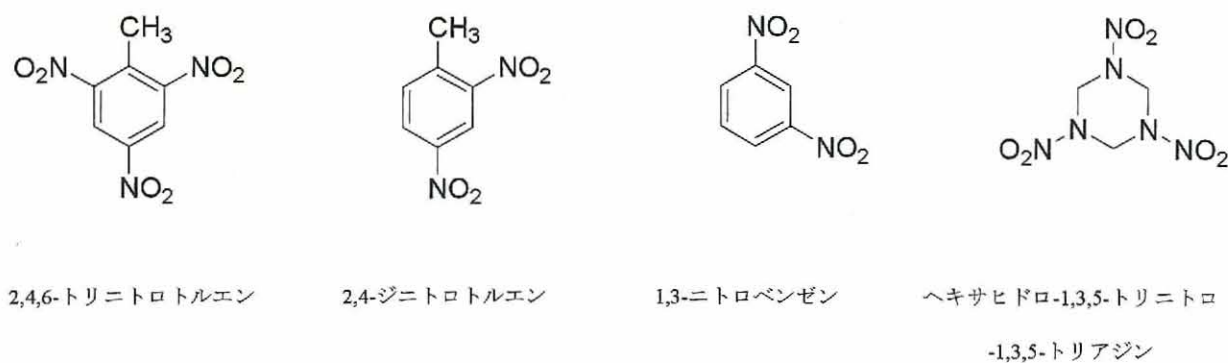


図 4-7 TNT 同族体の化学構造

表 4-1 試験に用いた TNT 同族体の固定化した TNT に対する IC₅₀ 値¹⁵⁾

TNT 同族体	50%阻害濃度 IC ₅₀ [ng/mL]
2,4,6-トリニトロトルエン (TNT)	0.7
ヘキサヒドロ-1,3,5-トリニトロ-1,3,5-トリアジン	1420
2,4-ジニトロトルエン	82
1,3-ニトロベンゼン	185

4-1-c 研究目的

近年，食品中に含まれるビタミンをはじめ様々な生理活性物質や環境物質において，表面プラズモン共鳴法（SPR）を用いて，定量および解析が行われてきた。第 3 章でも示した通り，当研究室においても，SPR の簡便性および迅速性から，梯子状ポリエーテル化合物とタンパク質との相互作用解析に使用してきた。しかし，そこで用いた直接測定法は，検出感度や特異性の問題があるために，さらに信頼性の高い測定法の開発が望まれる。また公衆衛生の観点からも，梯子状ポリエーテル化合物による汚染食品の迅速，微量測定法の開発は急務であるといえる。したがって，この章では阻害測定法による梯子状ポリエーテル化合物の検出法および評価法を開発し，その手法を適用することにより，梯子状ポリエーテルとタンパク質との親和性評価を行うことを目指した。

4-2 直接測定法による梯子状ポリエーテル化合物とホスホジエステラーゼとの相互作用解析

4-2-a ホスホジエステラーゼ

環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ（ホスホジエステラーゼ, phosphodiesterase, PDE）は細胞セカンドメッセンジャーである環状ヌクレオチド（cAMP および cGMP）をそれぞれ 5'-AMP および 5'-GMP に加水分解し、そのシグナル伝達を調節している。cAMP は、細胞内のアデニル酸シクラーゼが活性化されることにより生産され、一方 cGMP は一酸化窒素により活性化される細胞質型グアニル酸シクラーゼ、または膜結合型グアニル酸シクラーゼにより生産される。PDE は酵素化学的性質、触媒部位のアミノ酸配列の相同性、および構造モチーフに基づいて 11 種類のファミリー（PDE1～11）に分類される。さらに PDE ファミリーによってはアミノ酸配列の相同性の高いアイソザイムが存在し、ゲノム（遺伝子）上の区分けとしては、PDE ファミリーは 21 遺伝子から構成されることになる（例えば、PDE4 ファミリーは、PDE4A, PDE4B, PDE4C および PDE4D に分かれる）。

第3章で述べた通り、カルシウムイオン存在下、YTX をヒトリンパ細胞に投与すると細胞内セカンドメッセンジャーである環状ヌクレオチド（cAMP）の濃度が減少する¹⁶⁻¹⁸⁾ことが報告されている。また、Botana らは YTX が PDE 混合物のほか、ウシの脳および脾臓に存在する PDEI および PDEII に対して相互作用し、それぞれ解離定数 $K_D = 2.80 \pm 1.21 \mu\text{M}$ および $K_D = 7.36 \pm 0.60 \mu\text{M}$ の親和性をもつことを報告した^{19, 20)}。すなわち、PDE の活性化はカルシウムイオン以外に、YTX が直接 PDE と相互作用した結果であることが示唆されている。第3章では、梯子状ポリエーテル化合物が広く膜タンパク質と相互作用することが示された一方で、水溶性タンパク質であるストレプトアビジンとは相互作用しなかった。したがって、この水溶性タンパク質であるホスホジエステラーゼとの相互作用は、膜タンパク質に対する一般的な疎水性相互作用とは別の基質特異的な作用が働いていることが考えられる。そこで、まず梯子状ポリエーテル化合物と PDE との相互作用解析を直接測定法を用いて行い、その親和性および活性について調べた。また、阻害測定法を適用するにあたって PDE が梯子状ポリエーテル化合物を検出するためのタンパク質モチーフとして有効かどうか検証した。

4-2-b 直接測定法による梯子状ポリエーテル化合物と PDE4D および PDEII との相互作用解析

本実験では市販の PDE4D（Abnova 社製, Full-length human Recombinant with GST-tag (28 KDa), 82.72 KDa, 0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）と PDEII（Sigma-Aldrich 社製, phosphodiesteraseII, bovine spleen, 5 units/mg, 25 units）の 2 種類の PDE を用いた。また、梯子状ポリエーテル化合物は、PDE4D

に対して、YTX, dsYTX (図 3-10) , ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A および ALP7A (図 3-11) を用いた。YTX は天然梯子状ポリエーテル化合物として、dsYTX は YTX の 2 つの硫酸基を除去することにより一般的な梯子状ポリエーテルモデル化合物として使用した。ALP1B, ALP4B および ALP7B (ジオール, ジベンジル体) は、側鎖に共通の置換基である 2 つずつのヒドロキシ基とベンジル基 (Bn) を持ち、分子長のみが単環性、4 環性および 7 環性とその環の数が異なるために、分子長のみの影響を見積もるために使用した。また、非梯子状ポリエーテル化合物として、今回はサリノマイシン塩酸塩 (以下、サリノマイシンと呼ぶ、図 4-8) を使用し、PDE とポリエーテル化合物との相互作用解析は SPR 測定装置を用いて実施した。一方 PDEII に対しては、YTX, dsYTX のほか、ブレベトキシン B (BTX-B) についても相互作用解析を行った。今回の実験において非特異的な吸着、機械的ノイズを抑えるために、解析に用いるセンサーグラムは、リガンドを固定化していない個所にも同時にアナライトを添加し、これをリファレンスとして差し引いたものを使用した。またランニングバッファーとしては、梯子状ポリエーテル化合物の溶解性およびタンパク質のセンサーチップ表面での安定性を考慮し、DMSO 1 % および 0.005% Tween 20 を含む HEPES 緩衝液 (1%DMSO-HBSEP 溶液) を用いた。特に記載のない場合は、測定温度は 25°C、流速は 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で、20 μL のサンプル溶液を添加した。

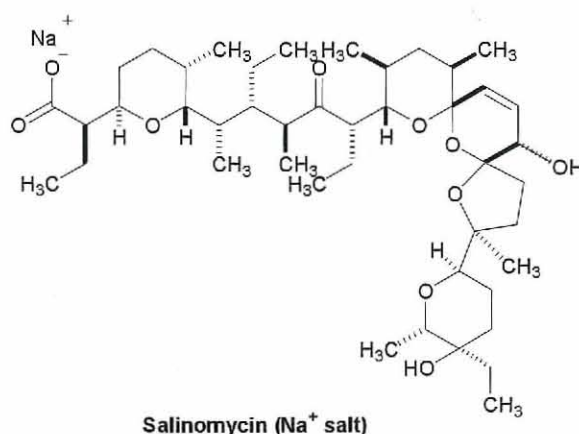


図 4-8 サリノマイシン塩酸塩 (サリノマイシン) の化学構造

4-2-b1 YTX および dsYTX と PDE4D との相互作用解析

作製した PDE4D 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で YTX および dsYTX を添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-9A および図 4-10A に示す。YTX および dsYTX 添加開始直後にセンサーグラムは上昇し、ほぼ一定値で平衡と

なった後、ランニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体としてともに「箱型」のセンサーグラムが得られ、これは YTX および dsYTX がセンサーチップ上の PDE4D と速い結合、解離をしていることを示すものである。以上より、YTX および dsYTX は PDE4D と相互作用することが分かった。また YTX および dsYTX の濃度（横軸）に対して平衡に達した時の RU 値（縦軸）をプロットし、用量依存曲線を作成した（図 4-9B および図 4-10B）。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、YTX および dsYTX においてそれぞれ解離定数 $K_D=1.0\ \mu\text{M}$ および $K_D=2.0\ \mu\text{M}$ であった。

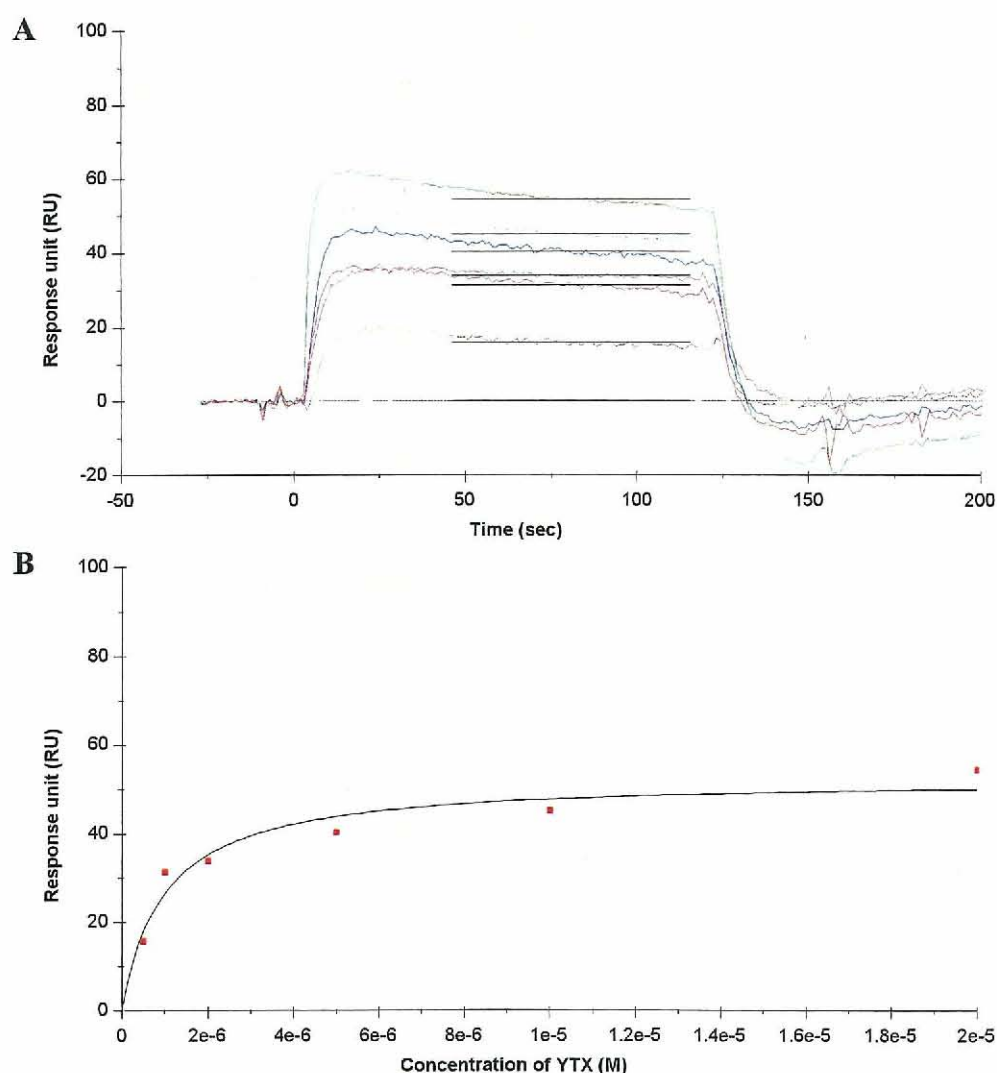


図 4-9 (A) YTX の PDE4D に対するセンサーグラム, YTX 濃度 ; 0 (グレー), 0.5 (黄), 1 (赤), 2 (マゼンタ), 5 (青), 10 (水色) および 20 (緑) μM , (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび YTX-PDE4D 用量依存曲線

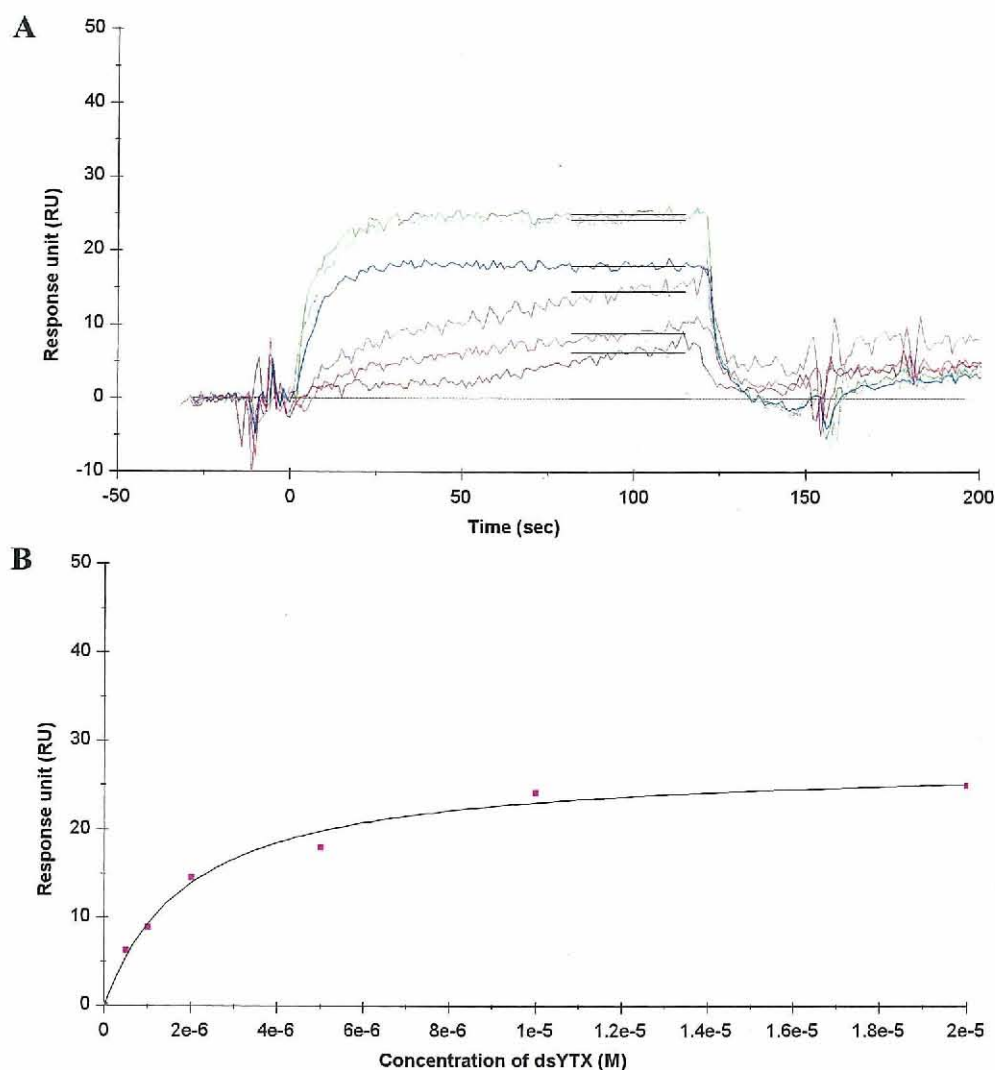


図 4-10 (A) dsYTX の PDE4D に対するセンサーグラム, dSYTX 濃度; 0 (グレー), 0.5 (茶), 1 (赤), 2 (マゼンタ), 5 (青), 10 (水色) および 20 (緑) μM , (B) dsYTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび dsYTX-PDE4D 用量依存曲線

4-2-b2 ALP と PDE4D との相互作用解析

前項と同様に作製した PDE4D 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で ALP (ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A および ALP7A) を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-11A~15A に示す。ジベンジル体 ALP1B, ALP4B および ALP7B において, サンプル溶液が添加開始直後にセンサーグラムは上昇し, ほぼ一定値で平衡となり, ラニングバッファーに切り替わると素早くもとの値に戻った。全体として「箱型」のセンサーグラムが得られ, これはジベンジル体 ALP がセンサーチップ上の PDE4D と速い結合, 解離をしている事を示すものである。一方, テトラオール体 ALP4A および ALP7A において

は、添加開始後ゆっくりとセンサーグラムが上昇し、100 秒後にはほぼ一定値で平衡となり、ランニングバッファーに切り替わるとゆっくりとセンサーグラムは減少が観測された。ジベンジル体 ALP と比べて、テトラオール体 ALP は、非常に低いレスポンス (30 μM のとき、ジベンジル体 ALP4B および ALP7B でそれぞれ約 30 または 60 RU に対して、テトラオール体 ALP4A および ALP7A では約 10 RU 以下) が観測されたが、濃度依存性は全ての ALP において確認された。以上より、今回用いた ALP は PDE4D と相互作用することが分かった。また、ALP の濃度 (横軸) に対して平衡に達した時の RU 値 (縦軸) をプロットし、用量依存曲線を作成した (図 4-11B~15B)。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ、ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A および ALP7A に対して、解離定数 K_D はそれぞれ 80 μM , 11 μM , 4.8 μM , 29 μM および 24 μM であった。

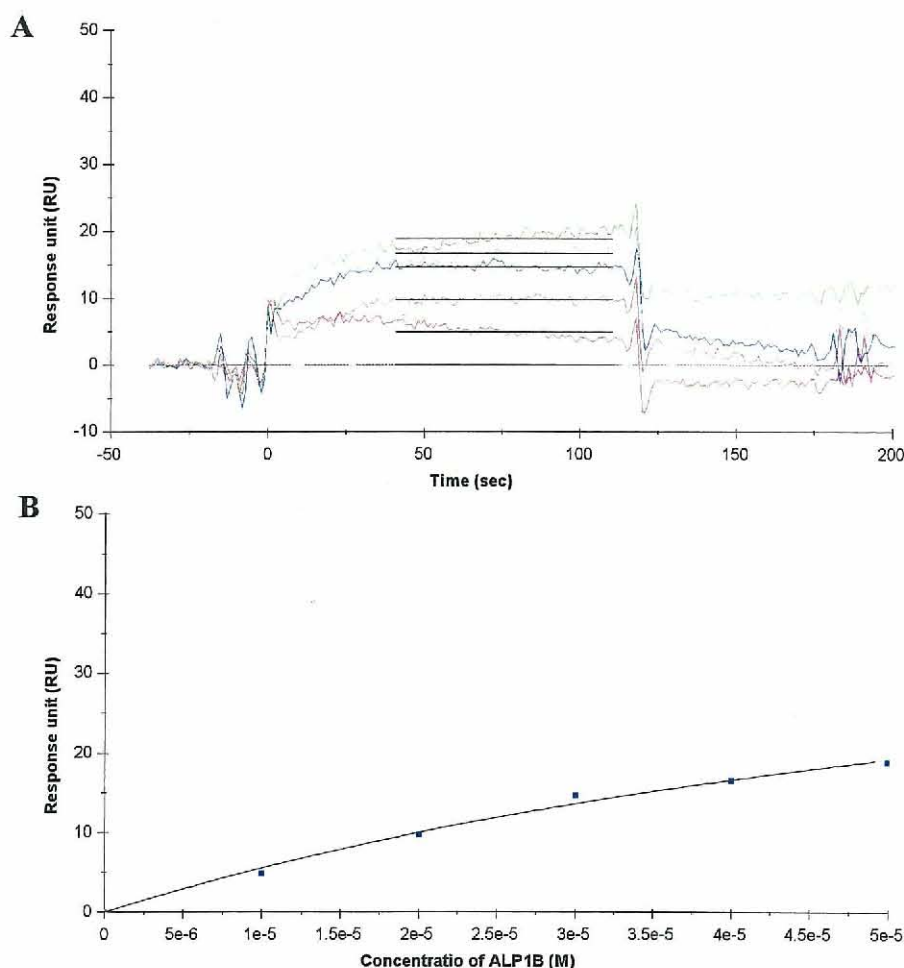


図 4-11 (A) ALP1B の PDE4D に対するセンサーグラム, ALP1B 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) ALP1B の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP1B-PDE4D 用量依存曲線

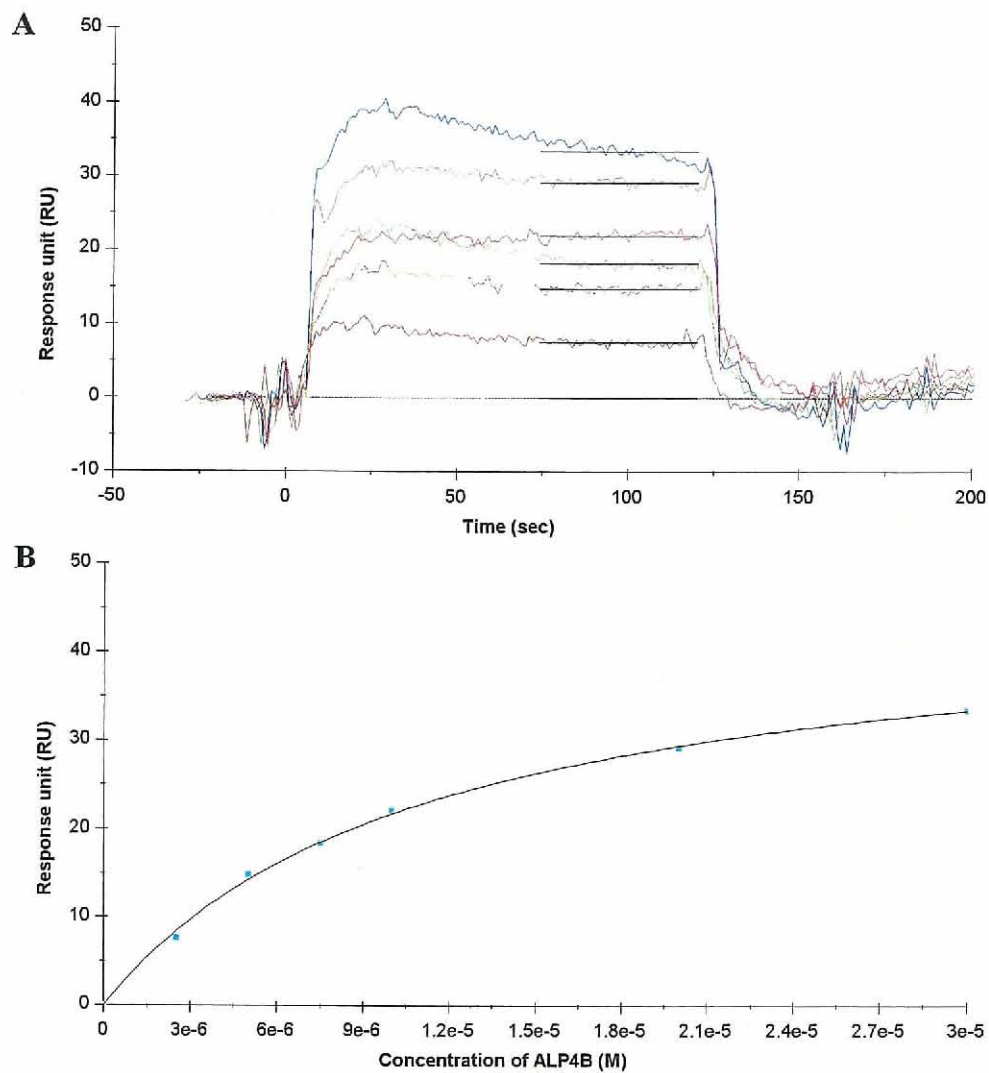


図 4-12 (A) ALP4B の PDE4D に対するセンサーグラム, ALP4B 濃度; 0 (グレー), 0.25 (茶), 0.5 (黄), 0.75 (黄緑), 10 (赤), 20 (マゼンタ) および 30 (青) μM , (B) ALP4B の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP4B-PDE4D 用量依存曲線

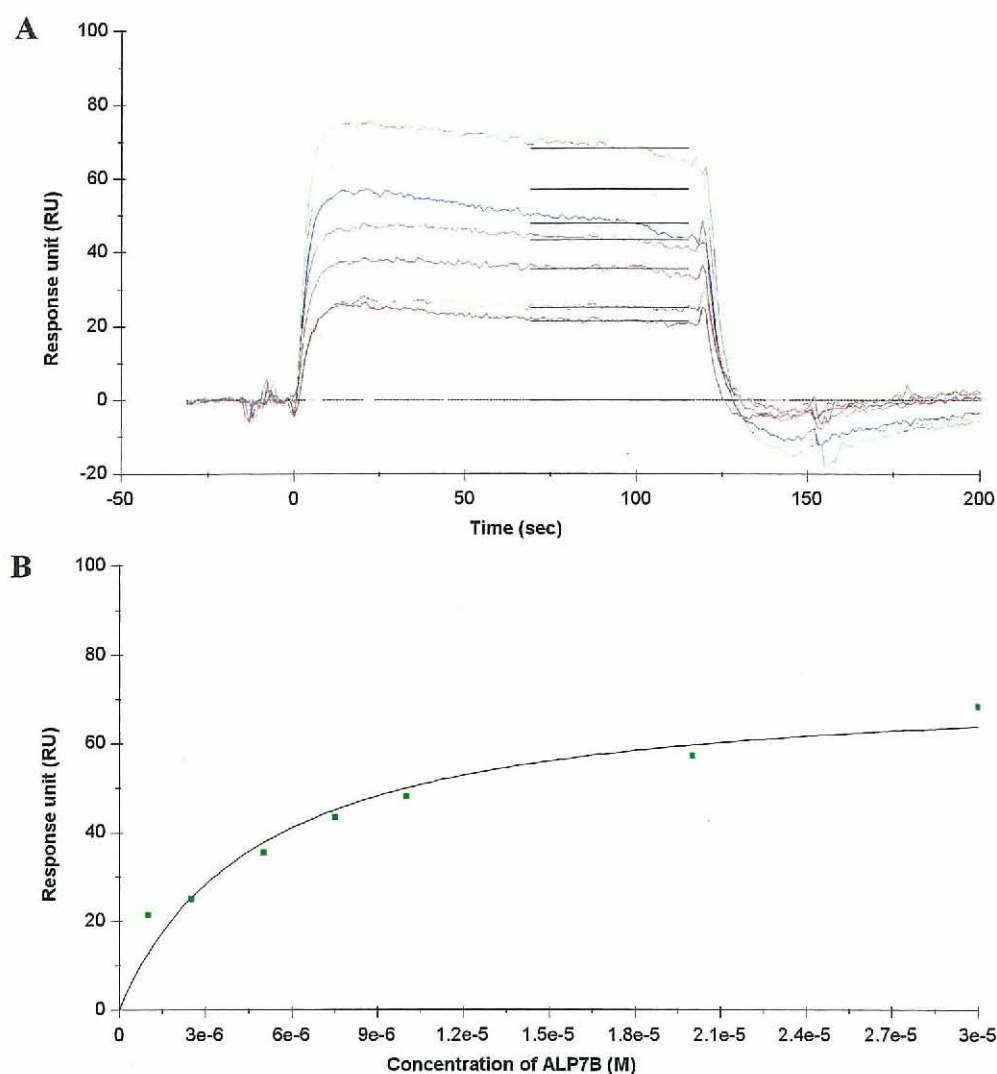


図 4-13 (A) ALP7B の PDE4D に対するセンサーグラム, ALP7B 濃度; 0 (グレー), 1 (茶), 2.5 (黄), 5 (赤), 7.5 (マゼンタ), 10 (青), 20 (水色), 30 (緑) μM , (B) ALP7B の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP7B-PDE4D 用量依存曲線

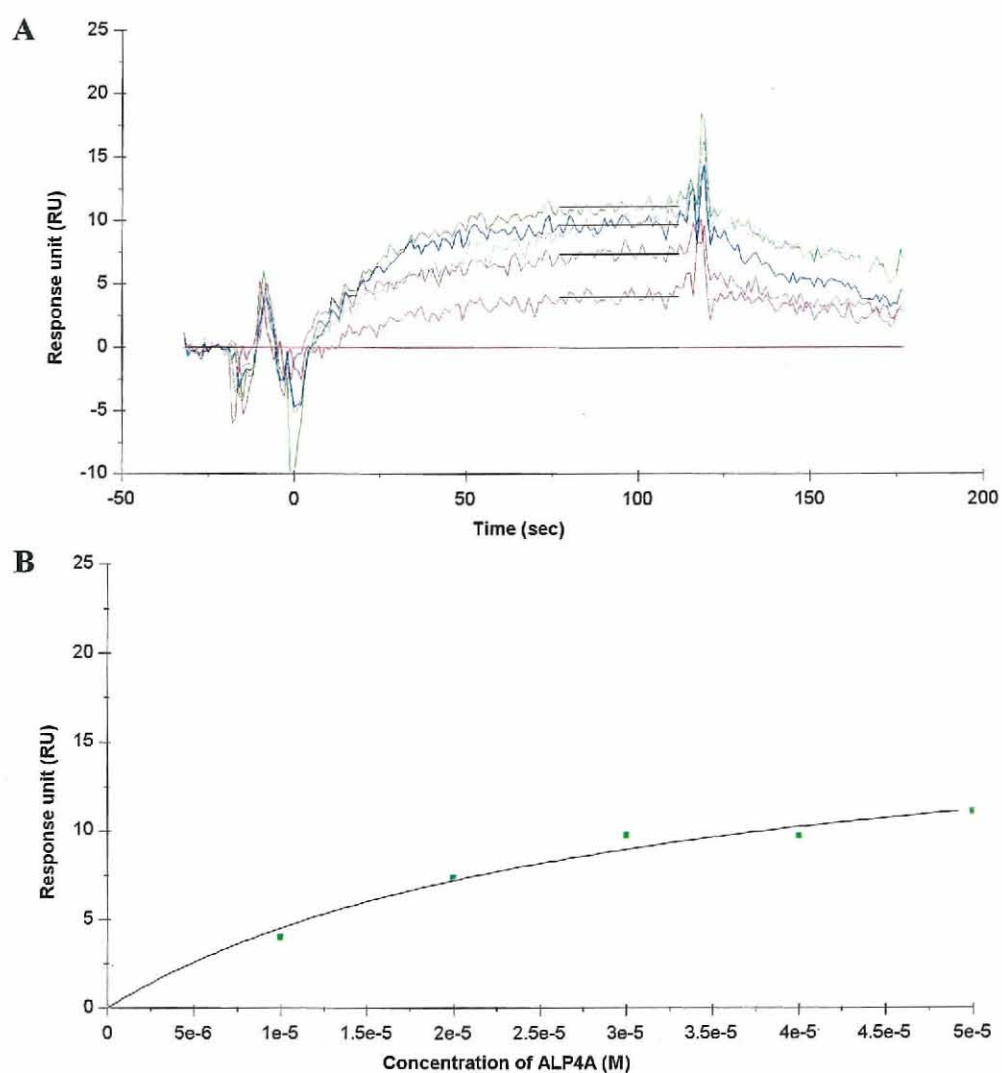


図 4-14 (A) ALP4A の PDE4D に対するセンサーグラム, ALP4A 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) ALP4A の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP4A-PDE4D 用量依存曲線

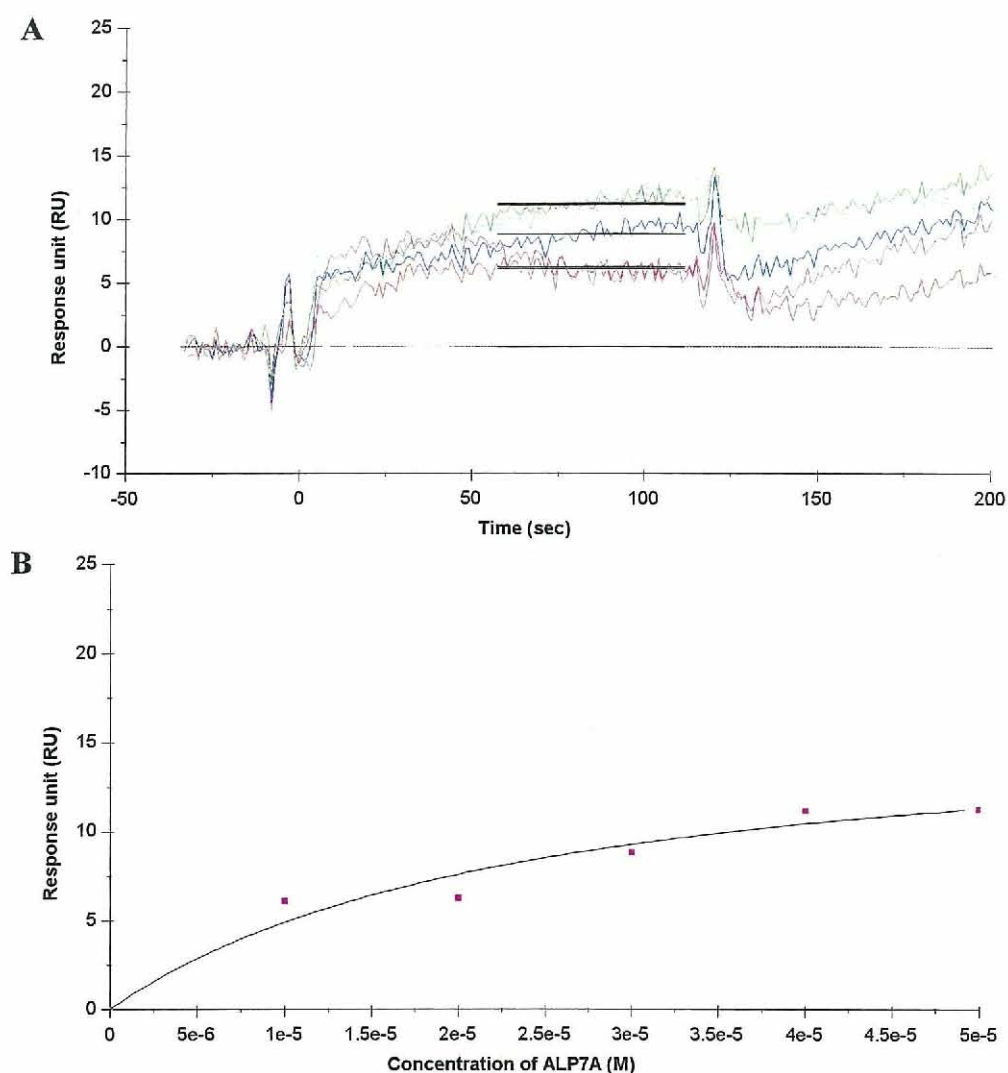


図 4-15 (A) ALP7A の PDE4D に対するセンサーグラム, ALP7A 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μ M, (B) ALP7A の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび ALP7A-PDE4D 用量依存曲線

4-2-b3 サリノマイシンと PDE4D との相互作用解析

前項と同様に作製した PDE4D 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度でサリノマイシンを添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-16 に示す。サリノマイシンを加えても, ほとんどレスポンスの上昇は見られず, センサーグラムが安定しなかった。以上の結果, サリノマイシンとセンサーチップ上の PDE4D との間の相互作用は非常に弱く, 親和性を求めることはできなかった。

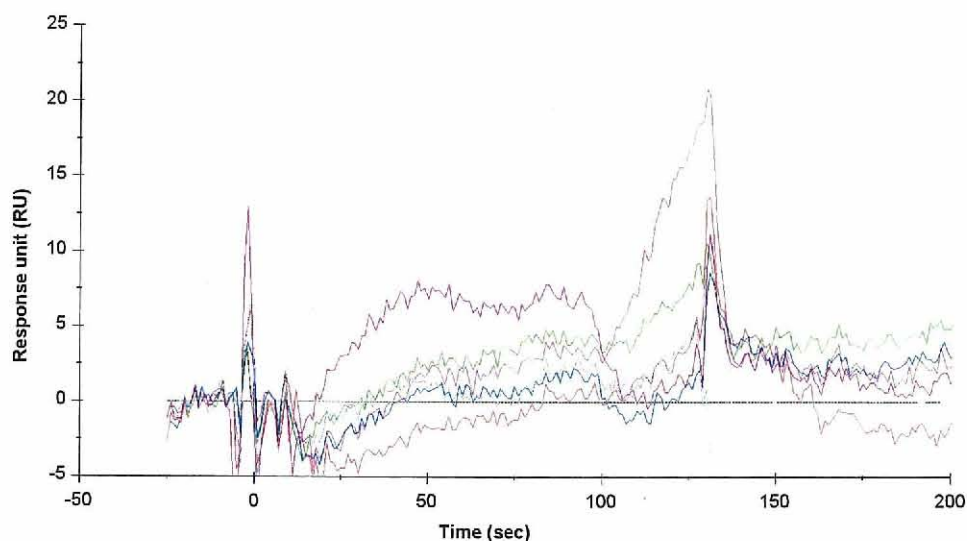


図 4-16 サリノマイシンの PDE4D に対するセンサーグラム，サリノマイシン濃度；0（グレー），10（赤），20（マゼンタ），30（青），40（水色），50（緑）および 100（紫） μM

4-2-b4 YTX および dsYTX と PDEII との相互作用解析

前項と同様に作製した PDEII 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で YTX および dsYTX を流し，相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-17A および図 4-18 に示す。YTX および dsYTX を添加すると，低いレスポンスのセンサーグラムが得られたが，YTX においては濃度依存性が確認された。このことから YTX がセンサーチップ上の PDEII と非常に弱い相互作用をしていると考えられる。一方，dsYTX においては，得られたレスポンスは非常に低く，相互作用解析は不可能であった。YTX の濃度（横軸）に対して平衡に達した時の RU 値（縦軸）をプロットし，用量依存曲線を作成した（図 4-17B）。実験項に示した平衡値解析法に従ってフィッティングしたところ，解離定数 $K_D = 25 \mu\text{M}$ であった。

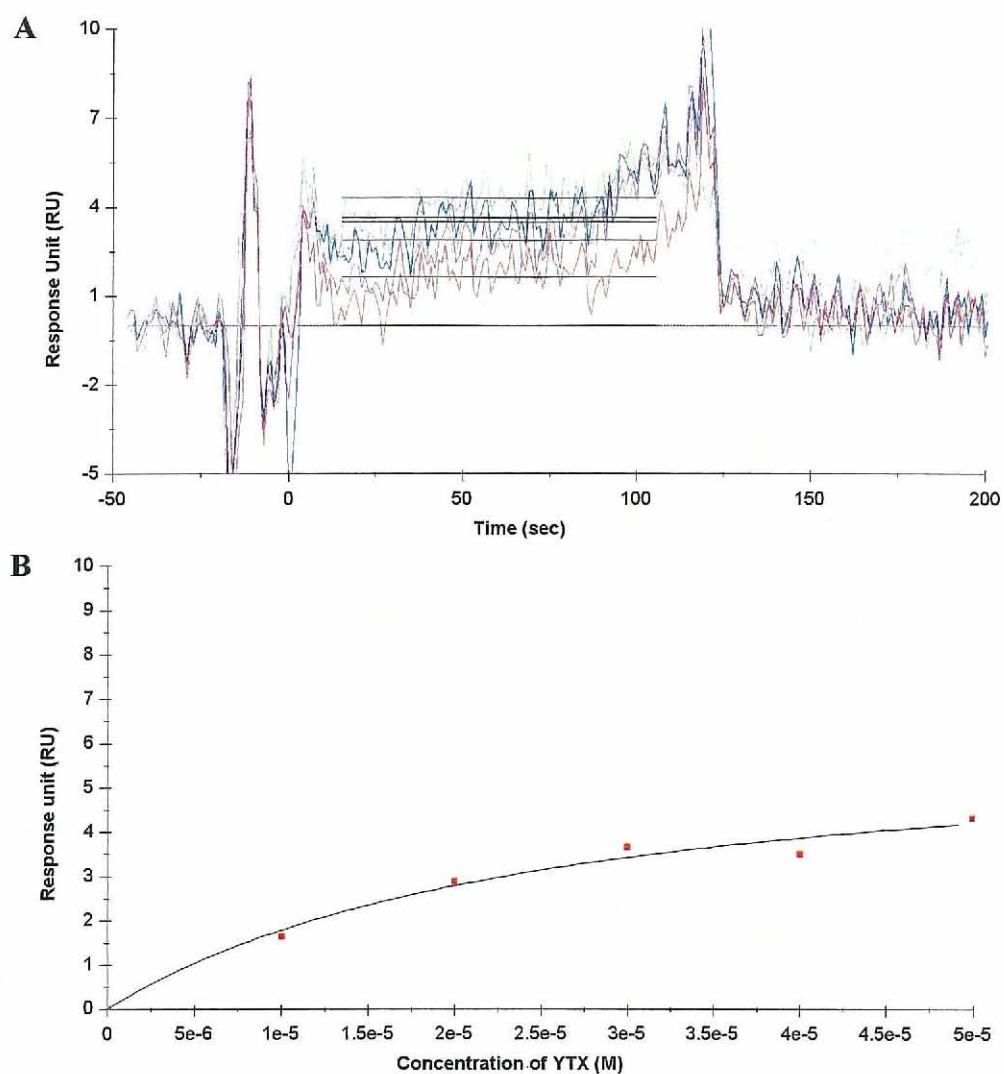


図 4-17 (A) YTX の PDEII に対するセンサーグラム, YTX 濃度 ; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM , (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡値に達したときの RU 値 (縦軸) のプロットおよび YTX-PDEII 用量依存曲線

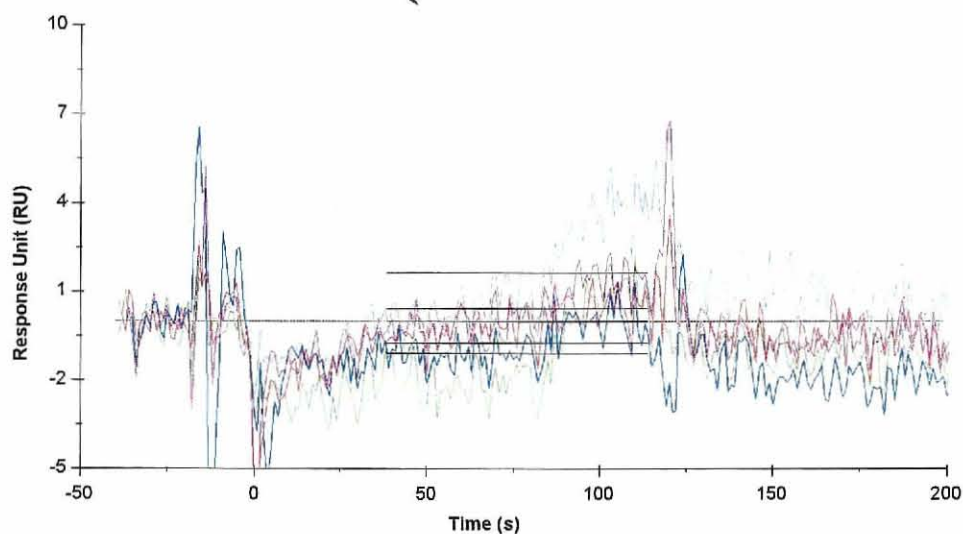


図 4-18 dSYTX の PDEII に対するセンサーグラム, dSYTX 濃度 ; 0 (グレー) , 10 (赤) , 20 (マゼンタ) , 30 (青) , 40 (水色) および 50 (緑) μM

4-2-b5 BTX-B と PDEII との相互作用解析

前項と同様に作製した PDEII 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で BTX-B を添加し, 相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-19 に示す。BTX-B を加えると, 非常に低いレスポンスのセンサーグラムが得られ, 相互作用解析は不可能であった。

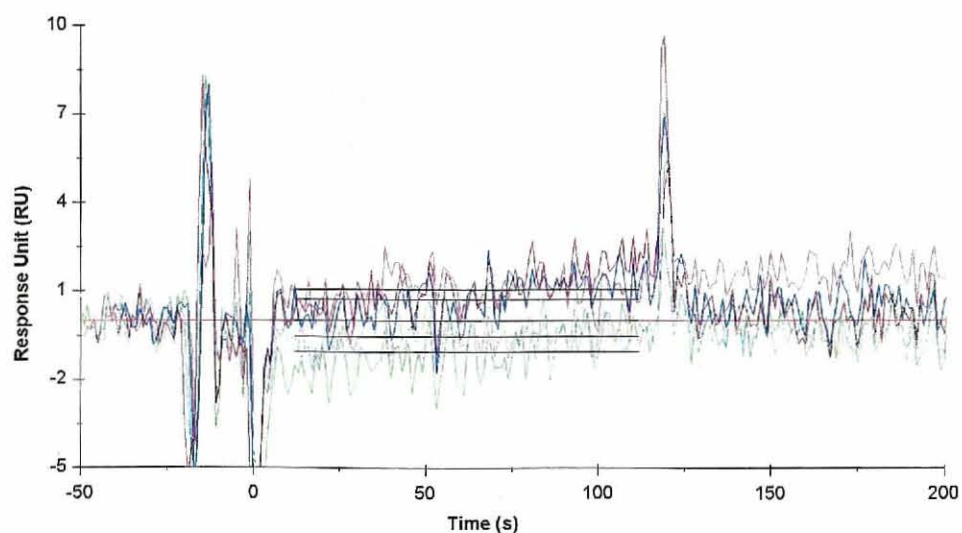


図 4-19 BTX-B の PDEII に対するセンサーグラム, BTX-B 濃度 ; 0 (グレー) , 10 (赤) , 20 (マゼンタ) , 30 (青) , 40 (水色) および 50 (緑) μM

4-2-b6 サリノマイシンと PDEII との相互作用解析

前項と同様に作製した PDEII 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度でサリノマイシンを添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-20 に示す。サリノマイシンを加えると、非常に低いレスポンスのセンサーグラムが得られ、相互作用解析は不可能であった。

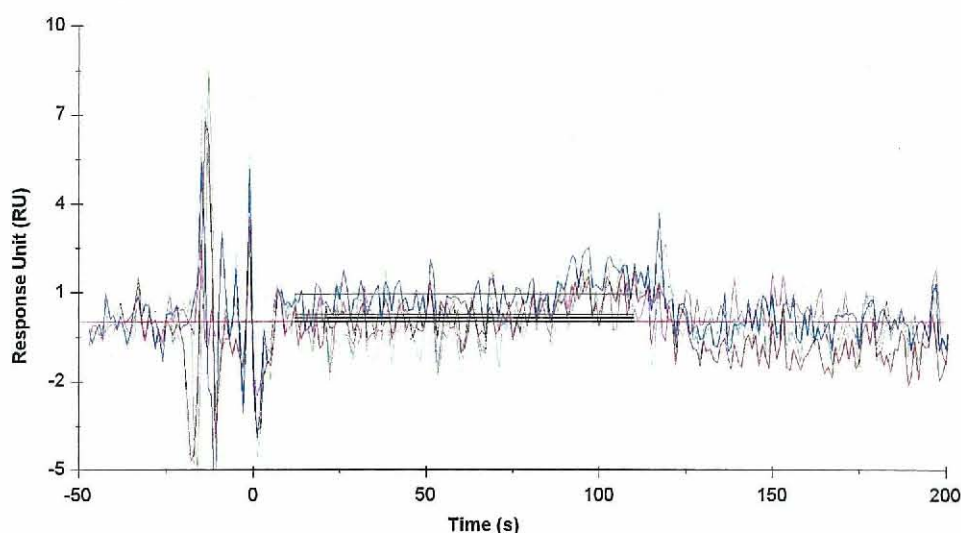


図 4-20 Salinomycin の PDEII に対するセンサーグラム, Salinomycin 濃度; 0 (グレー), 10 (赤), 20 (マゼンタ), 30 (青), 40 (水色) および 50 (緑) μM

4-2-c 直接測定法によるポリエーテル化合物と PDE との相互作用解析結果のまとめ

これまで直接測定法による SPR 測定によって求められたポリエーテル化合物と PDE4D との親和性を、表 4-2 にまとめた。YTX および dsYTX は、PDE4D に対してそれぞれ $K_D=1.0 \mu\text{M}$ および $K_D=2.0 \mu\text{M}$ の比較的強い親和性を持つことが示された。また、人工梯子状ポリエーテル ALP においては、まずジベンジル体注目すると、分子長（エーテル環の数）が長くなるほど、より強い親和性を持ち（ALP1B; $K_D=80 \mu\text{M}$, ALP4B; $K_D=11 \mu\text{M}$, ALP7B; $K_D=4.8 \mu\text{M}$ ）, ALP7B においては、dsYTX と同等の親和性を持つことがわかった。またテトラオール体では、ジベンジル体と比べてやや親和性は劣るが、比較的強い親和性を持ち、またジベンジル体の場合と同様に分子長が長い方が親和性は高いことがわかった（ALP4A; $K_D=29 \mu\text{M}$, ALP7A; $K_D=24 \mu\text{M}$ ）。一方、非梯子状ポリエーテル化合物であるサリノマイシンでは、得られたレスポンスは低く、また親和性を求めることはできなかった。このことから、梯子状ポリエーテル化合物と PDE4D との相互作用には、梯子状骨格が重要であることがわかった。第 3 章で求めた膜タンパク質と YTX および dsYTX との親和性は、 $K_D=10\sim 100 \mu\text{M}$ 程度であったことから、YTX および dsYTX が PDE4D を膜タンパク質と比べて 10～50 倍程度高く認識して相互

作用していることが示された。また ALP においても同様に、膜タンパク質である APH1B と比べて、5～10 倍程度高い親和性を持つことが示された。これらの結果は、梯子状ポリエーテル化合物が膜タンパク質以外の水溶性タンパク質である PDE4D に対して高い親和性を持ち、特異性の高い分子認識をしていることを示唆している。一方、PDEII については、得られたレスポンスは低く、YTX に関してはわずかに濃度依存性が観測されたが、dsYTX や BTX-B との親和性は見られなかった（解析不可能）。また、サリノマイシンにおいても同様に得られたレスポンスは低く、親和性は見られなかった（解析不可能）。

表 4-2 ポリエーテル化合物と PDE4D, APH1B との親和性の比較

ポリエーテル化合物	解離定数 K_D (μM)	
	PDE4D	APH1B
YTX	1.0	56
dsYTX	2.0	24
ALP1B	80	130
ALP4B	11	77
ALP7B	4.8	67
ALP4A	29	290
ALP7A	24	190
Salinomycin	—	—

— ; 解析不可能

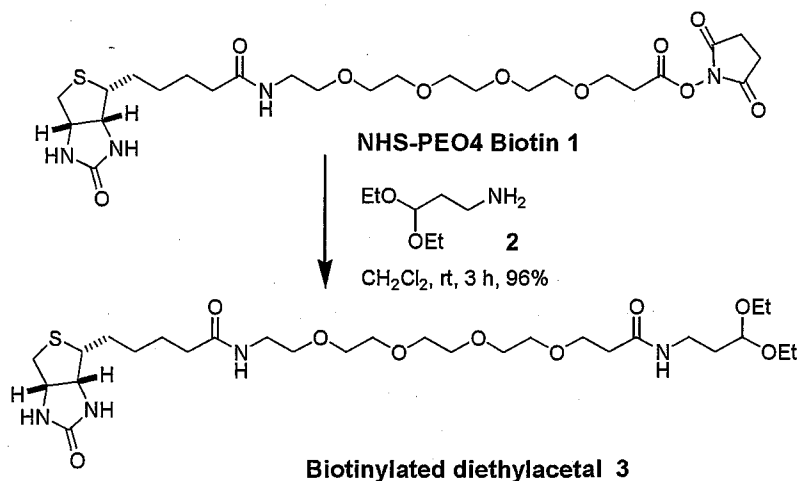
4-3 阻害測定法による梯子状ポリエーテル化合物とホスホジエステラーゼとの相互作用解析

直接測定法による SPR 測定結果から、種々梯子状ポリエーテル化合物が PDE4D と相互作用し、その親和性 ($K_D=1\sim30\ \mu\text{M}$) は膜タンパク質の場合 ($K_D=10\sim300\ \mu\text{M}$) と比べて約 10 倍程度高く、特異的に認識していることが示唆された。PDE4D は、第 3 章で示した膜タンパク質と比べて、ランニングバッファーに対する溶解性が高く、また梯子状ポリエーテル化合物に対する親和性も高いので、阻害測定法の検討に用いることにした。また、PDEII においては、得られたレスポンスが非常に低く、親和性評価には至らなかった。この原因として、実際に親和性が低いことのほかに、PDEII のセンサーチップ上への固定化量が少ないこと (PDE4D ; 9,800 RU, PDEII ; 4,600 RU) , あるいは固定化により結合 (活性) 部位が損なわれており、相互作用出来なかったことなどが考えられる。そこで、この PDEII に対しても同様に阻害測定法による SPR 測定を行い、親和性評価を試みることにした。

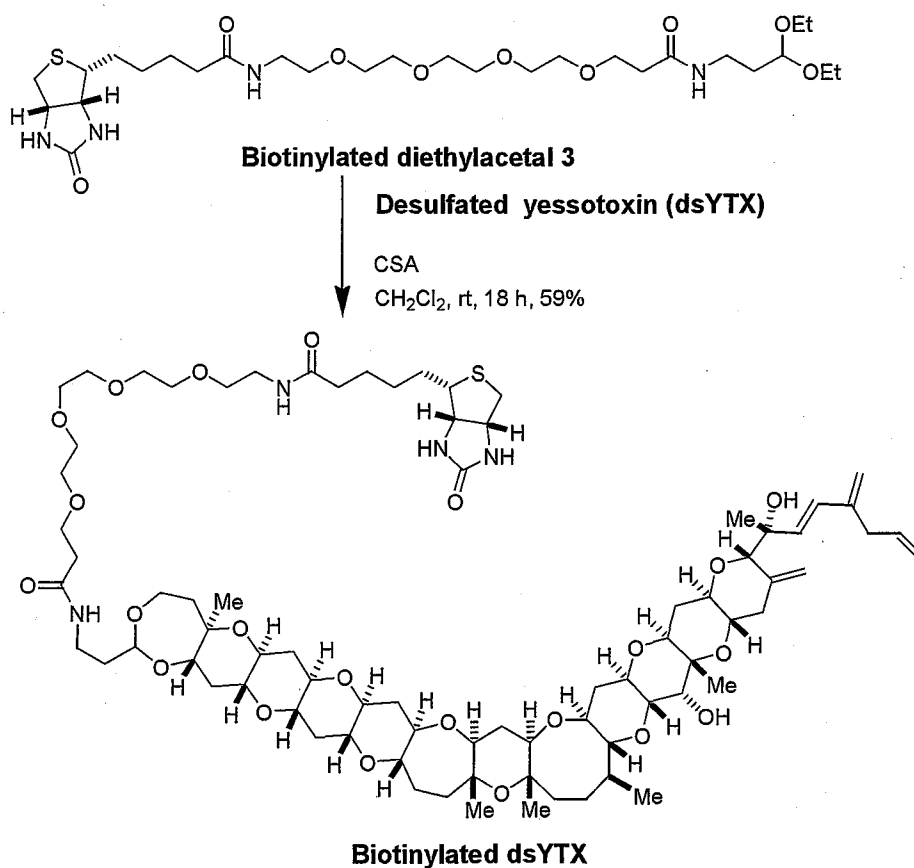
したがって、本実験では 4-2 と同様に、PDE4D と PDEII の 2 種類の PDE を測定タンパク質として用いた。また、梯子状ポリエーテル化合物としては、PDE4D に対して、YTX, dsYTX (図 3-10) , ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A および ALP7A (図 3-11) を用いた。YTX は天然梯子状ポリエーテル化合物として、dsYTX は YTX の 2 つの硫酸基を除去することにより一般的な梯子状ポリエーテルモデルとして使用した。ALP1B, ALP4B および ALP7B (ジオール, ジベンジル体) は、側鎖に共通の置換基である 2 つずつのヒドロキシ基とベンジル基 (Bn) を持ち、分子長のみが単環性、4 環性および 7 環性とその環の数が異なるために、分子長 (エーテル環の数) のみの影響を見積もるために使用した。一方、PDEII に対しては、梯子状ポリエーテル化合物として、YTX, dsYTX (図 3-10) , ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A (図 3-11) のほかに BTX-B (図 3-3) を用いた。また、非梯子状ポリエーテル化合物として、サリノマイシン (図 4-8) を用いた。

第 3 章において一般的な梯子状ポリエーテル化合物のモチーフとして dsYTX が有効であることが示唆された。そこで、この dsYTX のビオチン誘導体であるビオチン化脱硫酸 YTX をセンサーチップ上に固定化し、PDE (PDE4D および PDEII) に対する梯子状ポリエーテル化合物 (アナライト) とビオチン化脱硫酸 YTX との阻害測定を行った。まず、市販の NHS-PEO4 Biotin **1** と 3-アミノプロピオンアルデヒドジエチルアセタール **2** を反応させ、ビオチン化ジエチルアセタール **3** を調製し (スキーム 4-1) , CSA 存在下得られた **3** と dsYTX を混合することにより、ビオチン化脱硫酸 YTX を調製した (スキーム 4-2) 。同様に、ネガティブコントロールとして、ALP1B についても dsYTX の場合と同様に調製した (スキーム 4-3) 。このようにして得られたビオチン誘導化梯子状ポリエーテル化合物を、実験項に示す通り、予め

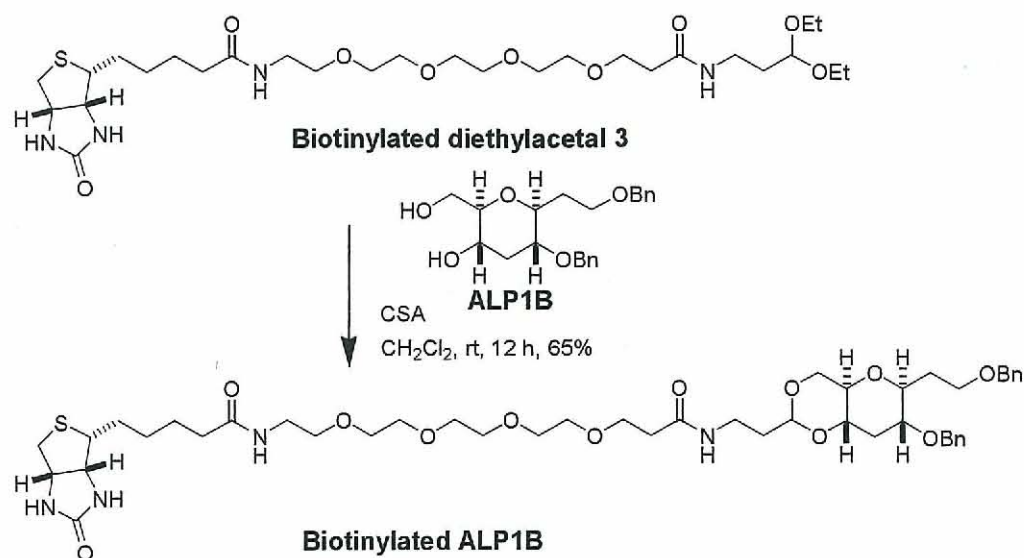
アミンカップリング法でストレプトアビジン固定化したセンサーチップに添加し、ビオチン誘導化梯子状ポリエーテル化合物をセンサーチップ上に固定化し、阻害測定法に用いた。



スキーム 4-1 ビオチン化ジエチルアセタールの調製



スキーム 4-2 ビオチン化脱硫酸 YTX の調製



スキーム 4-3 ビオチン化 ALP1B の調製

今回の実験において非特異的吸着，機械的ノイズを抑えるため，解析に用いるセンサーグラムは，リガンドを固定化していない個所にも同時にアナライトを流し，これをリファレンスとして差し引いたものを使用した。またランニングバッファーおよびアナライトの溶解には，梯子状ポリエーテルの溶解性を考慮し，DMSO 1%および 0.05% Tween 20 を含む HEPES 緩衝液 (1%DMSO-HBSEP+) を用いた。特に記載のない場合は，測定温度は 25℃，流速は 10 μ L/min で，20 μ L のサンプル溶液を添加した。

4-3-a ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いた PDE4D とビオチン化脱硫酸 YTX との親和性評価

作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いて，PDE4D に対する梯子状ポリエーテル化合物とビオチン化脱硫酸 YTX との競争阻害実験を行うために，まず固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と PDE4D との親和性測定を行った。

すなわち，作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で PDE4D (1~5 nM, 1%DMSO-HBSEP+溶液) を添加し，相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-21 に示す。センサーグラムは PDE4D が流れ始めるとすぐに結合と解離を繰り返しながらレスポンスの上昇が起こり，また流れ終わってランニングバッファーに切り替わるとゆっくりとした解離によるレスポンスの減少が起こった。全体として「抗体-抗原反応」のようなセンサーグラムが得られ，これは PDE4D がセンサーチップ上のビオチン化脱硫酸 YTX と強くそして特異的に相互作用していることを示唆している。以上より，

直接測定法の結果と同様に、PDE4D が固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と相互作用することが分かった。この曲線を実験項に示したラングミュア吸着モデル（1 種類のリガンドと 1 種類のアナライトの反応）でフィッティングにかけ解離定数 (K_D) を算出すると、 $K_D=0.20 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($k_a=3.9 \pm 1.4 \times 10^4 / \text{Ms}$ および $k_d=6.7 \pm 1.7 \times 10^{-3} / \text{s}$) であった。

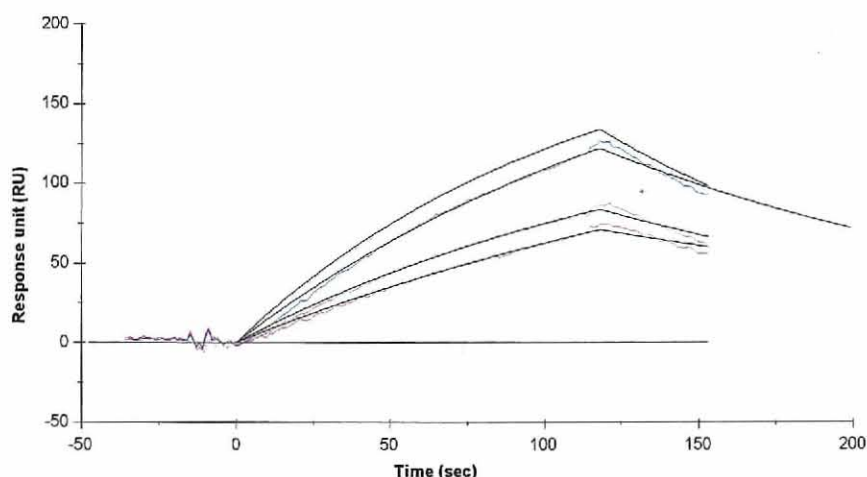


図 4-21 PDE4D の固定化したビオチン化脱硫酸 YTX に対するセンサーグラムとラングミュア吸着モデルによるフィッティングカーブ、PDE4D 濃度；0（グレー），2（赤），3（マゼンタ），4（青）および 5（水色）nM

4-3-a1 ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いた PDE4D に対する梯子状ポリエーテル化合物とビオチン化脱硫酸 YTX との競争阻害実験

以上の結果から、作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップに対して、PDE4D が強く相互作用することが示された。また、数 nM PDE4D 溶液についても十分なレスポンスが得られることがわかった。そこで、このビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いて、1 nM PDE4D を測定タンパク質とし、種々の梯子状ポリエーテル化合物の競争阻害実験を行った。

測定に用いた PDE4D-梯子状ポリエーテル溶液の調製は、0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PDE4D 溶液を 10 μL とり、1% DMSO-HBSEP+溶液 1,561 μL 加えて調製した（10 nM PDE4D 溶液）。また、各々梯子状ポリエーテル化合物を 10, 20, 50 および 100 μM になるように、1% DMSO-HBSEP+溶液で希釈した。10, 20, 50 および 100 μM 梯子状ポリエーテル溶液 10 μL をとり、それぞれ 10 nM PDE4D 溶液 10 μL を加え、さらに 1% DMSO-HBSEP+溶液 80 μL を加え、ボルテックスで均質化した後、遠心分離した。この溶液を室温（25℃）で 30 分間インキュベートし、1 nM に希釈した PDE4D 溶液（梯子状ポリエーテル添加なし）と共に試験溶液とし、それぞれ 20 μL をビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップに添加し、相互作用解析を行った。

4-3-a2 PDE4D に対する種々梯子状ポリエーテル化合物と固定化したビオチン化脱硫酸 YTX との競争阻害実験結果

固定化したビオチン化脱硫酸 YTX を用いた PDE4D と種々梯子状ポリエーテル（アナライト）との競争阻害実験のセンサーグラムを図 4-22～28A に示した。また，添加したポリエーテルの濃度（横軸）と平衡時（添加 100～110 秒後）の RU 値（縦軸）をプロットし，実験項に示した 4-パラメーターフィッティングにより阻害曲線を作成した。（図 4-22～28B）。

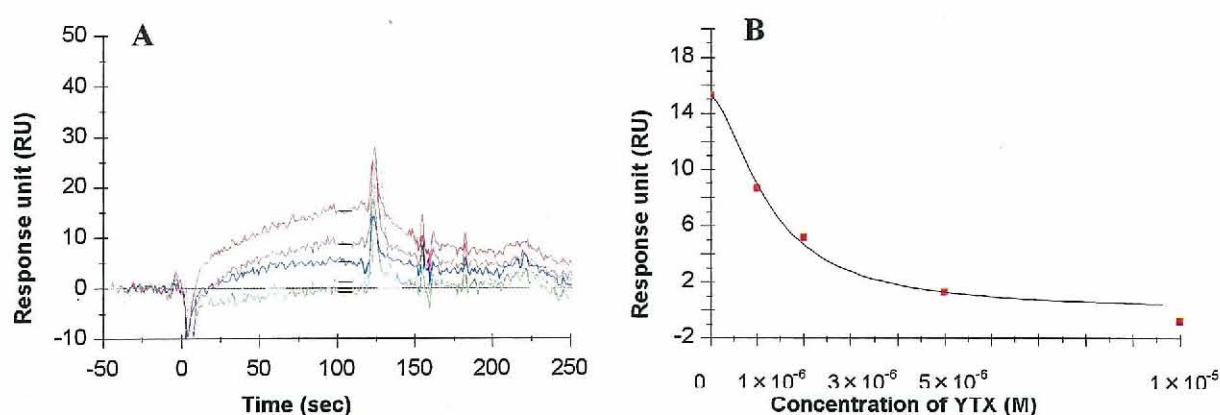


図 4-22 (A) 阻害測定法による YTX (0～10 μM) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム（グレー，ベースライン；赤，0；マゼンタ；1，青；2，水色；5 および緑，10 μM YTX）と (B) YTX の濃度（横軸）と平衡時（添加 100～110 秒後）の RU 値（縦軸）のプロットと阻害曲線

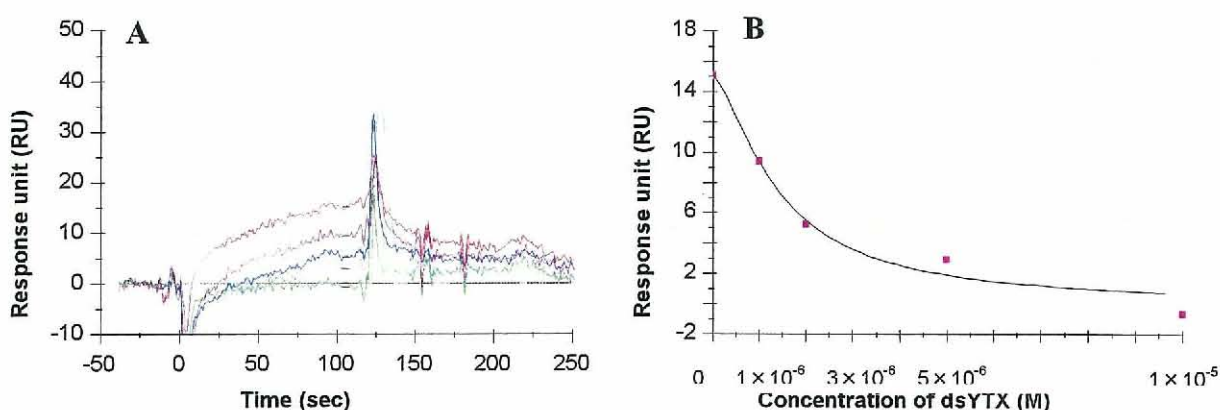


図 4-23 (A) 阻害測定法による dsYTX (0～10 μM) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム（グレー，ベースライン；赤，0；マゼンタ；1，青；2，水色；5 および緑，10 μM dsYTX）と (B) dsYTX の濃度（横軸）と平衡時（添加 100～110 秒後）の RU 値（縦軸）のプロットと阻害曲線

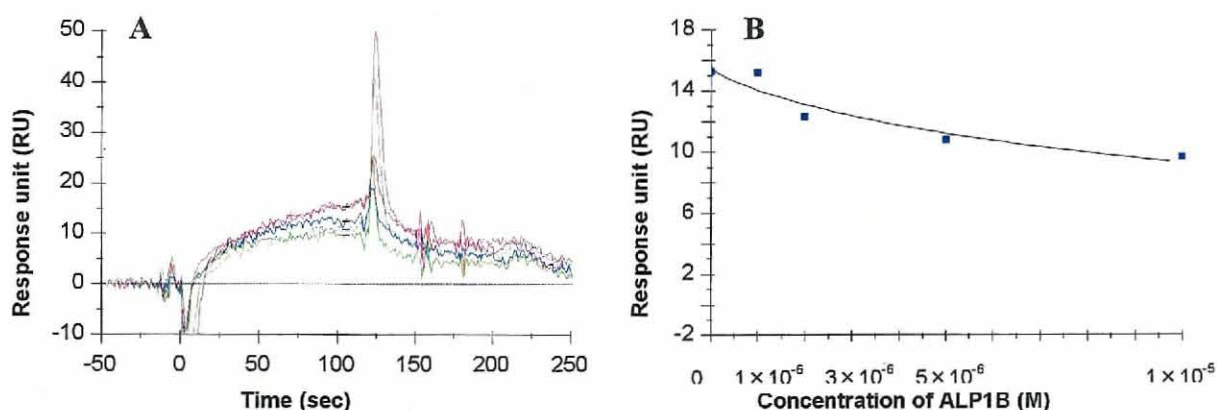


図 4-24 (A) 阻害測定法による ALP1B (0~10 μ M) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム (グレー, ベースライン; 赤, 0; マゼンタ; 1, 青; 2, 水色; 5 および緑, 10 μ M ALP1B) と (B) ALP1B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

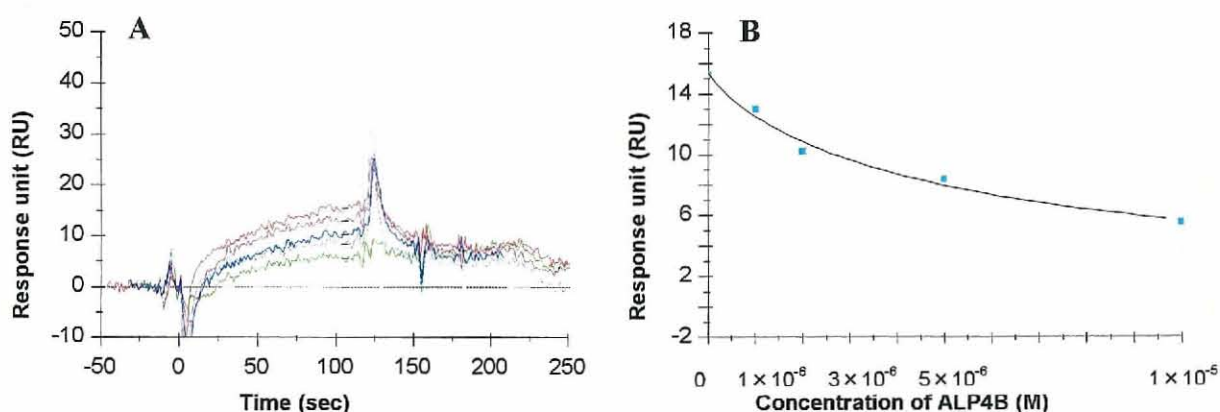


図 4-25 (A) 阻害測定法による ALP4B (0~10 μ M) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム (グレー, ベースライン; 赤, 0; マゼンタ; 1, 青; 2, 水色; 5 および緑, 10 μ M ALP4B) と (B) ALP4B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

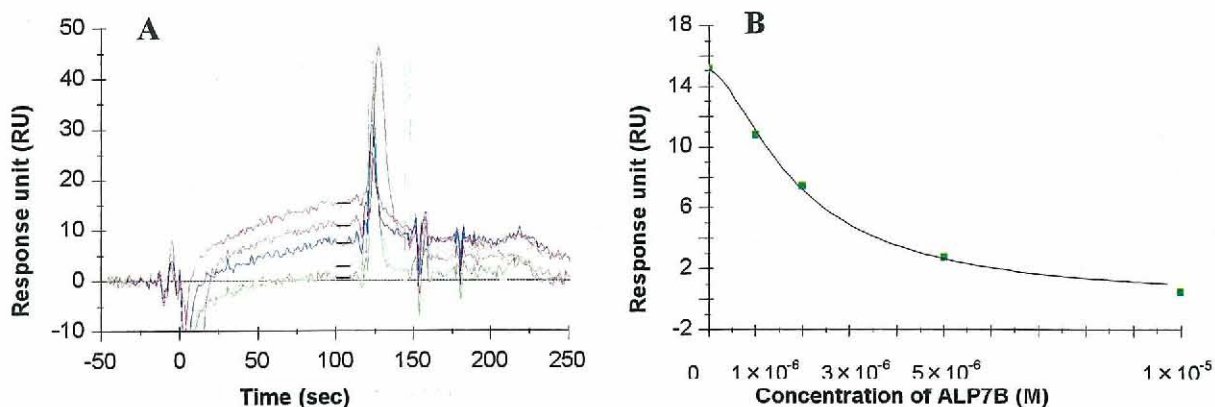


図 4-26 (A) 阻害測定法による ALP7B (0~10 μ M) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム (グレー, ベースライン; 赤, 0; マゼンタ; 1, 青; 2, 水色; 5 および緑, 10 μ M ALP7B) と (B) ALP7B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

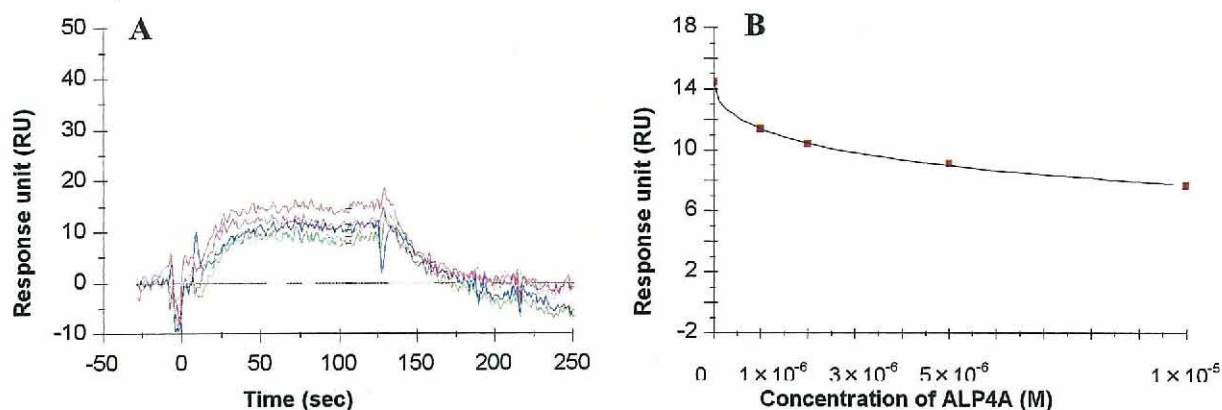


図 4-27 (A) 阻害測定法による ALP4A (0~10 μ M) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム (グレー, ベースライン; 赤, 0; マゼンタ; 1, 青; 2, 水色; 5 および緑, 10 μ M ALP4A) と (B) ALP4A の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

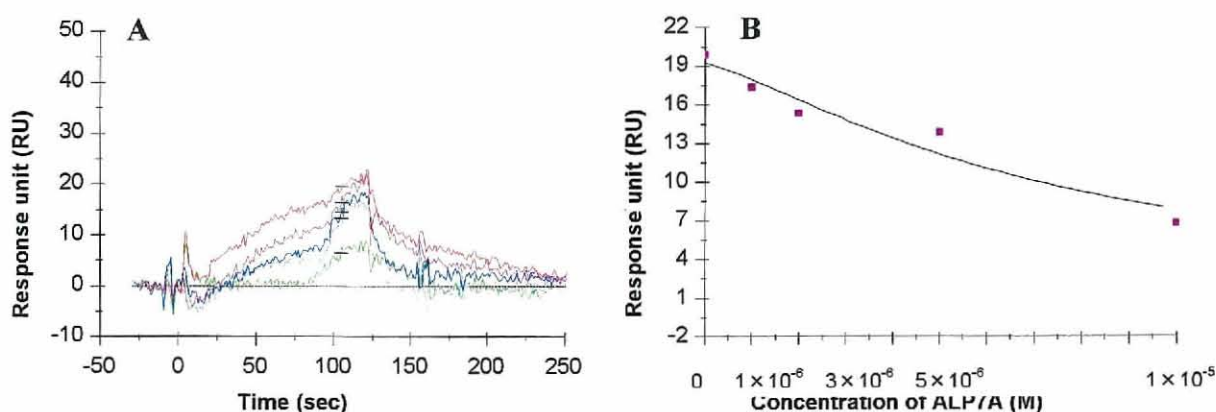


図 4-28 (A) 阻害測定法による ALP7A (0~10 μ M) と 1 nM PDE4D を含んだ試料のセンサーグラム (グレー, ベースライン; 赤, 0; マゼンタ; 1, 青; 2, 水色; 5 および 緑, 10 μ M ALP7A) と (B) ALP7A の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

ビオチン化脱硫酸 YTX を固定したセンサーチップに, PDE4D と YTX をインキュベートした溶液を添加したところ, 結合量が小さく S/N 比がよくないものの YTX の濃度増加に伴ってレスポンスが減少し, 10 μ M の濃度でほぼベースラインに達した (図 4-22)。また, dsYTX および ALP7B の場合も同様の結果が得られ, 実験項に示した 4-パラメータフィッティングで解析したところ, YTX, dsYTX および ALP7B に対して, それぞれ 1.2, 1.4 および 1.9 μ M の 50%阻害濃度 IC_{50} (固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と溶液中の PDE4D との結合を 50%阻害する濃度) が得られた。また, ALP4B および ALP7A においては, 加えた ALP の濃度に伴って中程度レスポンスが減少し, 得られた IC_{50} はそれぞれ 5.5 および 7.6 μ M であった。一方, ALP1B および ALP4A においては, レスポンスの減少は小さく, 得られた IC_{50} 値はそれぞれ 17 および 13 μ M であった。競争阻害実験より得られた各々梯子状ポリエーテルの IC_{50} 値を, 4-2 で得られた直接測定法の結果と合わせて表 4-3 に示す。その結果, 梯子状ポリエーテルの構造的特徴による傾向は, 第 3 章で得られたタンパク質との親和性に関する知見 (側鎖置換基の疎水性および分子長) とほぼ一致した。また, 50%阻害濃度 IC_{50} と解離定数 K_D は $IC_{50} = K_D + C/2$ で表され, PDE4D の濃度である C が IC_{50} や K_D と比べて低い場合 (今回は 1 nM) は, $IC_{50} = K_D$ とみなすことができる。したがって, 阻害測定法によって得られた IC_{50} 値と直接測定法による K_D 値が一致していることが分かった。以上の結果, 本研究で実施した阻害測定法により, 梯子状ポリエーテル化合物と PDE4D との親和性評価に成功し, また本研究で実施した阻害測定法が有効であることが示された。

表 4-3 競争阻害実験より求められた PDE4D における各々梯子状ポリエーテルの IC_{50} (μM) と直接測定実験より求められた PDE4D に対する解離定数 K_D (μM) の比較

梯子状ポリエーテル (アナライト)	50%阻害濃度 IC_{50} (μM)	解離定数 K_D (μM)
YTX	1.2	1.0
dsYTX	1.4	2.0
ALP1B	17	80
ALP4B	5.5	11
ALP7B	1.9	4.8
ALP4A	13	29
ALP7A	7.6	24

4-3-b ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化チップを用いた PDEII とビオチン化脱硫酸 YTX との親和性評価

前節の結果から、作製したビオチン化脱硫酸 YTX を固定化したセンサーチップが PDE4D と相互作用することが示された。また、PDE4D と種々梯子状ポリエーテル化合物をインキュベートした溶液をこのセンサーチップに流すことにより、溶液中の PDE に対して、固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と溶液中の梯子状ポリエーテル化合物の間に競争阻害が起こり、その親和性を求めることに成功した。前述の通り、この阻害測定法は直接測定法と比べて、一般に高い特異性と高感度のレスポンスが得られることがわかっている。そこで、このビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用い、直接測定法においてほとんどレスポンスが得られなかった PDEII を測定対象分子として、固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と溶液中の梯子状ポリエーテル間における阻害測定実験を PDE4D の場合と同様に行った。

作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化チップを用いて、PDEII に対する梯子状ポリエーテル化合物とビオチン化脱硫酸 YTX との阻害実験を行うために、まず固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と PDEII との親和性測定を行った。

すなわち、作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップにアナライトとして種々の濃度で PDEII (1~5 $\mu g/mL$, 1%DMSO-HBSEP+溶液) を添加し、相互作用測定を行った。得られたセンサーグラムを図 4-29 に示す。センサーグラムは PDEII が流れ始めるとすぐに結合と解離を繰り返しながらレスポンスの上昇が起こり、また流れ終わってランニングバッファに切り替わるとゆっくりとした解離によるレスポンスの減少が起こった。全体として「抗体-抗原反応」のようなセンサーグラムが得られ、これは PDEII がセンサーチップ上のビオ

チン化脱硫酸 YTX と強くそして特異的に相互作用していることを示唆している。以上より、直接測定法の結果とは異なり PDEII は固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と相互作用することが分かった。この曲線を実験項に示したラングミュア吸着モデル (1 種類のリガンドと 1 種類のアナライトの反応) でフィッティングにかけ解離定数 (K_D) を算出すると、 $K_D=10.7 \mu\text{g/mL}$ であった。

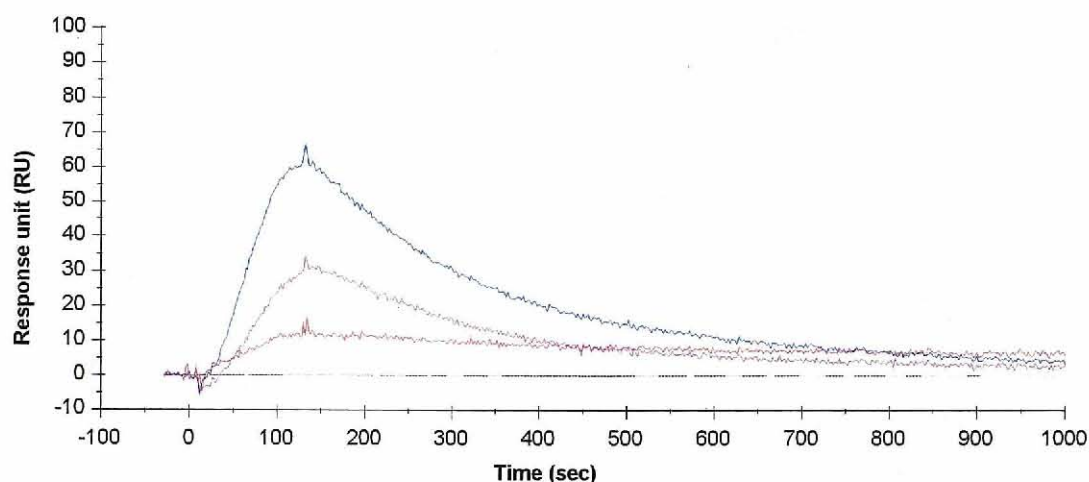


図 4-29 ビオチン化脱硫酸 YTX-PDEII センサーグラム, PDEII 濃度; 0 (グレー), 1 (赤), 2 (マゼンタ) および 5 (青) $\mu\text{g/mL}$

4-3-b1 ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化チップを用いた PDEII に対する梯子状ポリエーテル化合物とビオチン化脱硫酸 YTX との競争阻害実験

以上の結果から、作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップに対して、PDE4D の場合と同様に、PDEII は強く相互作用することが示された。また、 $5 \mu\text{g/mL}$ PDEII 溶液について十分なレスポンス (60 RU 程度) が得られることがわかった。そこで、 $5 \mu\text{g/mL}$ PDEII を測定タンパク質濃度とし、種々の梯子状ポリエーテル化合物と固定化したビオチン化脱硫酸 YTX との競争阻害実験を行った。

PDEII $100 \mu\text{g}$ をとり、1% DMSO-HBSEP+溶液を $100 \mu\text{L}$ 加え溶解した ($1,000 \mu\text{g/mL}$ PDEII 溶液)。 $1,000 \mu\text{g/mL}$ PDEII 溶液 $50 \mu\text{L}$ とり、1% DMSO-HBSEP+溶液を $950 \mu\text{L}$ 加え、 $50 \mu\text{g/mL}$ PDEII 溶液を調製した。また、各々梯子状ポリエーテル化合物を 1, 10 および $100 \mu\text{M}$ (または $200 \mu\text{M}$) になるように 1% DMSO-HBSEP+溶液を用いて調製した。 $50 \mu\text{g/mL}$ PDEII 溶液 $10 \mu\text{L}$ をとり、梯子状ポリエーテル溶液の終濃度がそれぞれ 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 および 50 (+100) μM となるように、先ほど調製した梯子状ポリエーテル化合物の溶液を加え、さらに 1% DMSO-HBSEP+溶液で $100 \mu\text{L}$ に定容した。ボルテックスを用いて均質化した後、遠

心分離した。この溶液を室温 (25°C) で 30 分間インキュベートし、5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した PDEII 溶液 (梯子状ポリエーテル添加なし) と共に試験溶液とし、それぞれ 20 μL をビオチン化脱硫酸 YTX 固定化チップに加え、相互作用解析を行った。

4-3-b2 PDEII に対する種々梯子状ポリエーテルと固定化したビオチン化脱硫酸 YTX との競争阻害測定結果

固定化したビオチン化脱硫酸 YTX を用いた PDEII と種々梯子状ポリエーテル化合物 (アナライト) との競争阻害測定のセンサーグラム (ここでは、0, 0.5, 2 および 20 μM のみを表示) を図 4-30A~37A に示した。また、添加したポリエーテル化合物の濃度におけるの RU 値 (添加 100~110 秒後) をプロットし、実験項に示した 4-パラメーターフィッティングにより阻害曲線を作成した (図 4-30B~37B)。阻害曲線から YTX, dsYTX, BTX-B および ALP7B に対して 3 実験実施し、標準誤差 (SEM) を求めたところ、それぞれ 3.5 ± 0.7 , 2.1 ± 0.4 , 2.4 ± 0.5 および 5.6 ± 0.7 μM の 50% 阻害濃度 IC_{50} が得られ、これら梯子状ポリエーテル化合物が PDEII に対して強い親和性を持つことが確認された (表 4-4)。また、ALP4B においては 20 ± 1.2 μM の IC_{50} が得られ、PDEII と中程度の親和性を持つことが示された一方で、ALP1B, ALP4A および Salinomycin における阻害活性は弱かった (> 100 μM , 表 4-4)。以上の結果、ビオチン化脱硫酸 YTX を用いた阻害測定法により、直接測定法では求められなかった PDEII と梯子状ポリエーテル化合物との親和性の評価に成功した。

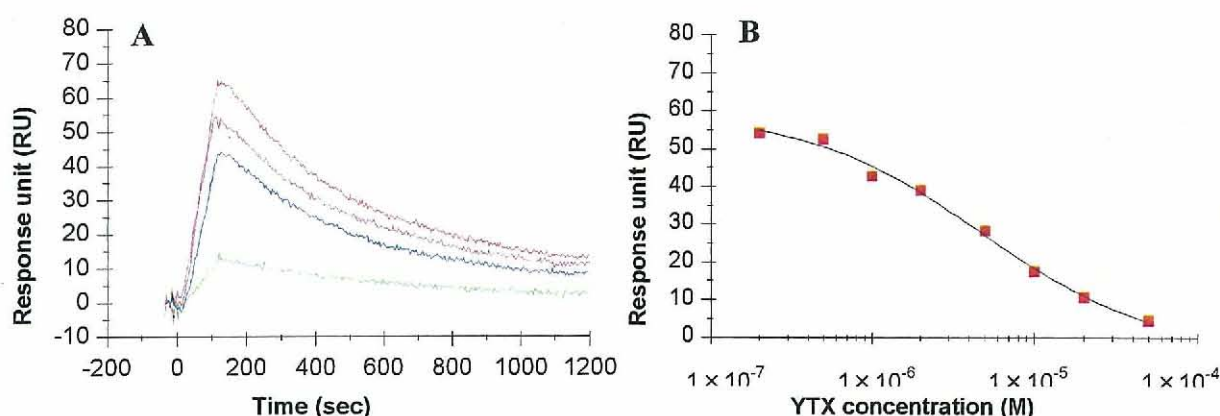


図 4-30 (A) 阻害測定法による YTX と 5 $\mu\text{g/mL}$ PDEII を含んだ試料のセンサーグラム (赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および緑, 20 μM YTX) と (B) YTX の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

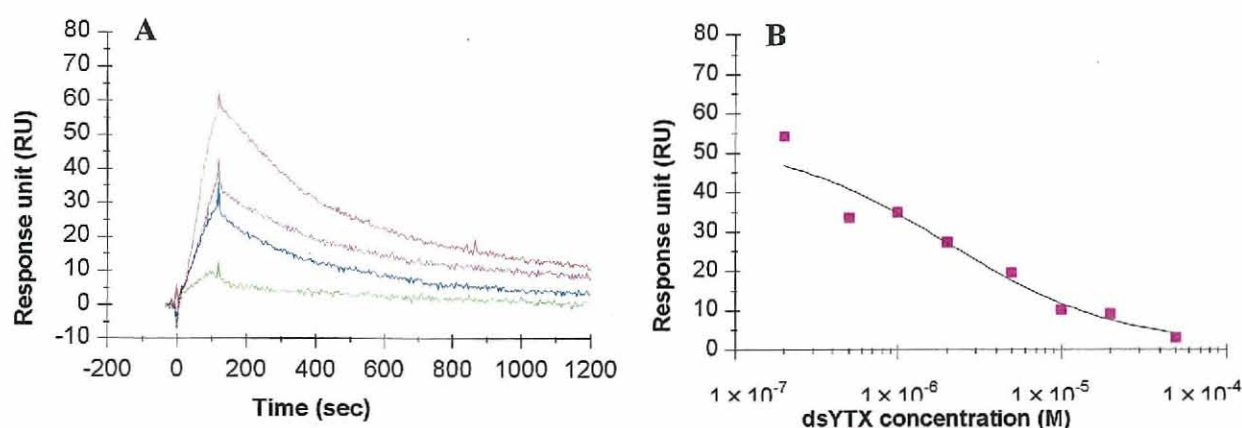


図 4-31 (A)阻害測定法による dsYTX と 5 μ g/mL PDEII を含んだ試料のセンサーグラム(赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および緑, 20 μ M dsYTX) と (B) dsYTX の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

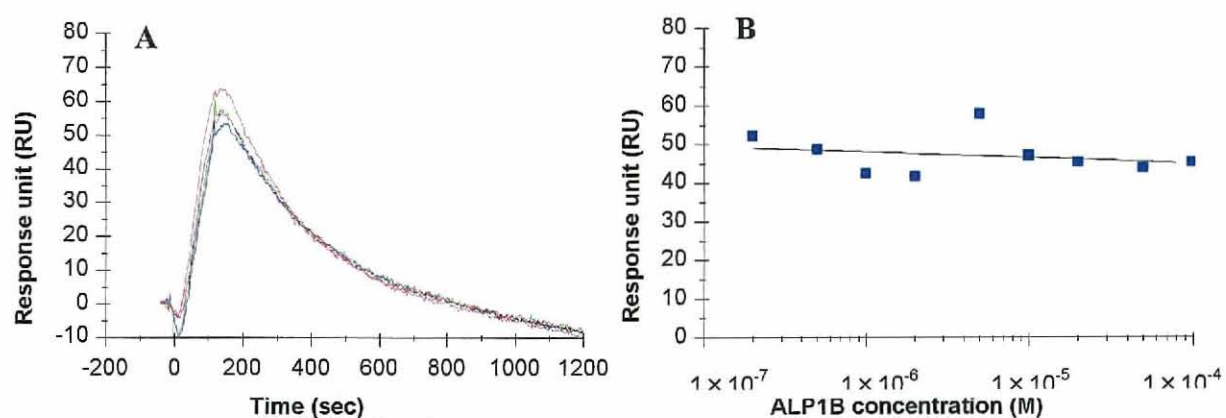


図 4-32 (A)阻害測定法による ALP1B と 5 μ g/mL PDEII を含んだ試料のセンサーグラム(赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および緑, 20 μ M ALP1B) と (B) ALP1B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

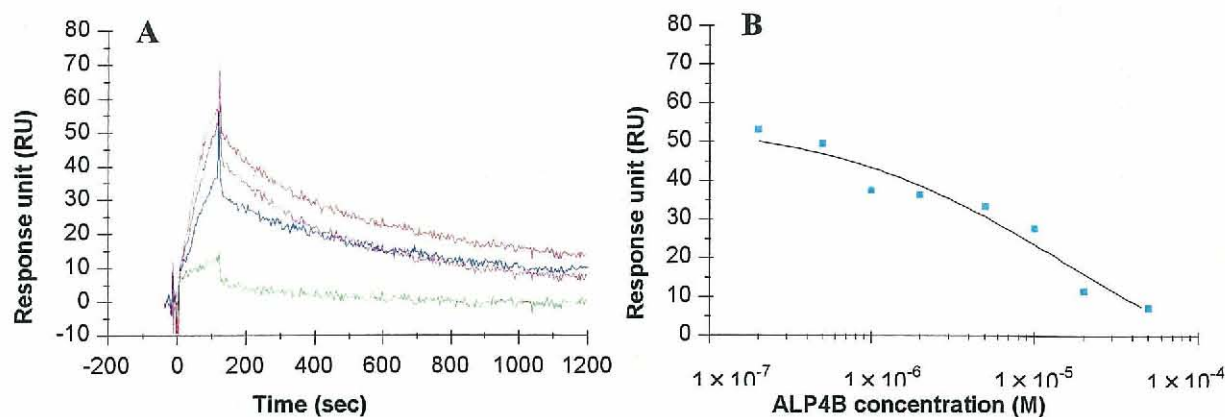


図 4-33 (A)阻害測定法による ALP4B と 5 $\mu\text{g/mL}$ PDEII を含んだ試料のセンサーグラム (赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および 緑, 20 μM ALP4B) と (B) ALP4B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

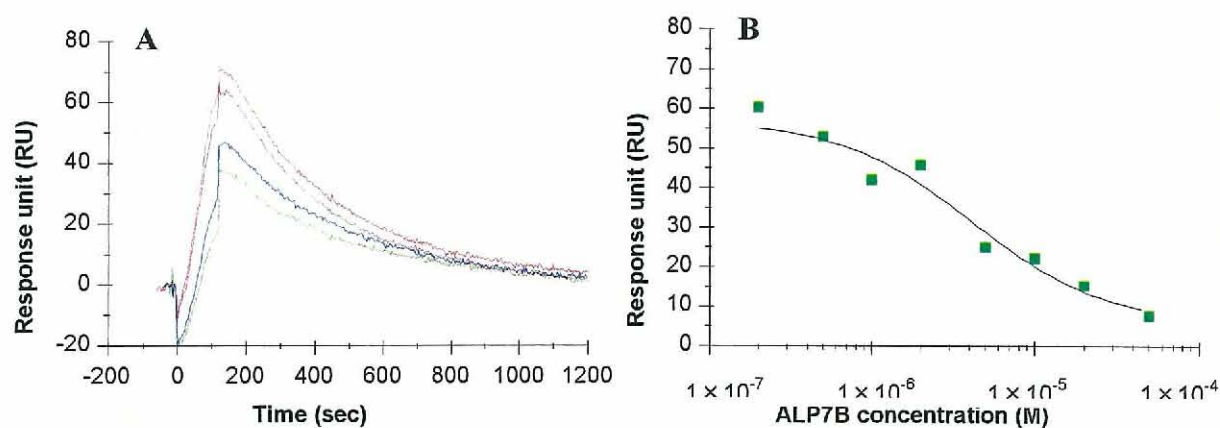


図 4-34 (A)阻害測定法による ALP7B と 5 $\mu\text{g/mL}$ PDEII を含んだ試料のセンサーグラム (赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および 緑, 20 μM ALP7B) と (B) ALP7B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

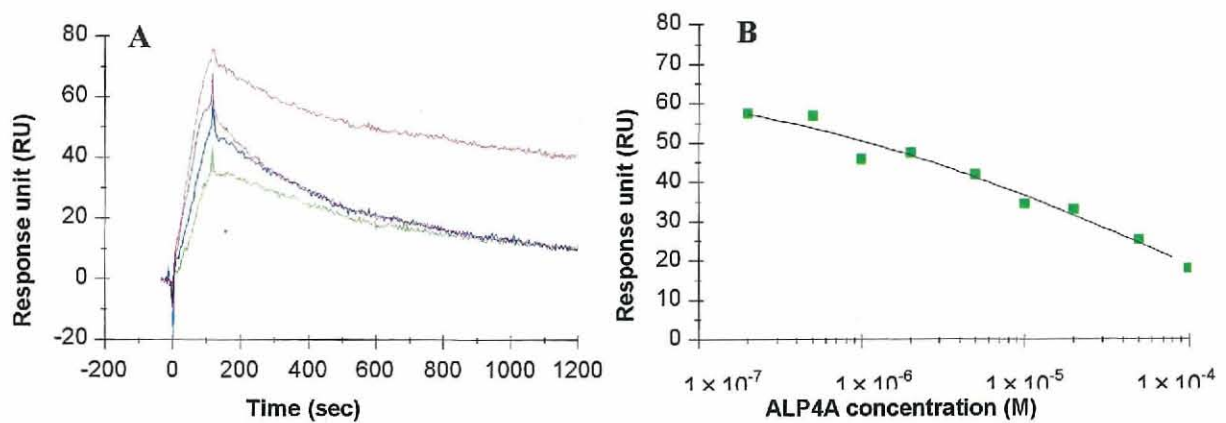


図 4-35 (A) 阻害測定法による ALP4A と 5 $\mu\text{g/mL}$ PDEII を含んだ試料のセンサーグラム (赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および 緑, 20 μM ALP4A) と (B) ALP4A の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

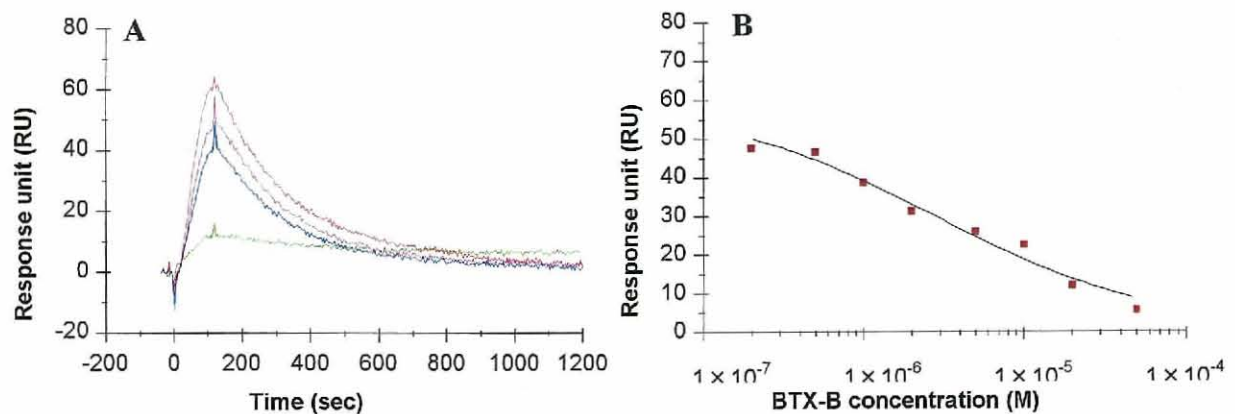


図 4-36 (A) 阻害測定法による BTX-B と 5 $\mu\text{g/mL}$ PDEII を含んだ試料のセンサーグラム (赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および 緑, 20 μM BTX-B) と (B) BTX-B の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

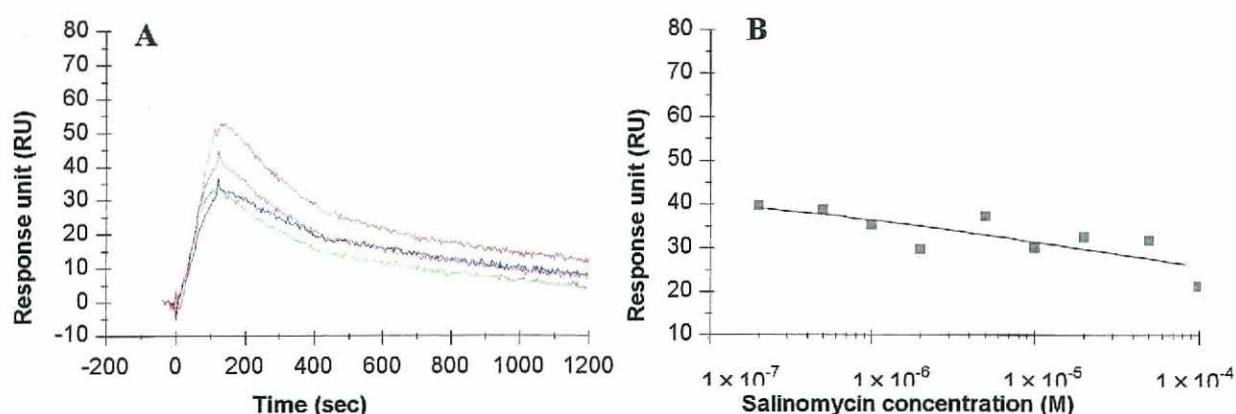


図 4-37 (A) 阻害測定法による Salinomycin と 5 $\mu\text{g/mL}$ PDEII を含んだ試料のセンサーグラム (赤, 0 ; マゼンタ, 0.5 ; 青, 2 および緑, 20 μM Salinomycin) と (B) Salinomycin の濃度 (横軸) と平衡時 (添加 100~110 秒後) の RU 値 (縦軸) のプロットと阻害曲線

表 4-4 競争阻害測定実験より求められた PDEII における各々ポリエーテル化合物の 50% 阻害濃度 IC_{50} (μM)

ポリエーテル化合物	50%阻害濃度 $\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$ (μM)
YTX	3.5 ± 0.7
dsYTX	2.1 ± 0.4
BTX-B	2.4 ± 0.5
ALP1B	—
ALP4B	20 ± 1.2
ALP7B	5.6 ± 0.7
ALP4A	—
Salinomycin	—

SEM (標準誤差) ; 3 回の測定結果から算出, — ; $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$

4-3-b3 ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化チップの有効性の検証

以上の結果, ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いることにより, 梯子状ポリエーテル化合物と PDEII との親和性を評価することができた。その結果, dsYTX や ALP7B など分子長が長く, 疎水性が高い梯子状ポリエーテルは PDEII に対し高い親和性を持ち, 一方単環性 ALP1B においては親和性が低いことが明らかとなった。この阻害測定法ならびにセンサーチップの有効性を検証するために, ネガティブコントロールとして, ALP1B を dsYTX と同様にこの手法でセンサーチップに固定化し, PDEII 溶液を加え, その相互作用解析を行

った。そのときのセンサーグラムを図 4-38 に示した。

その結果、ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップの場合（図 4-29）とは異なり、レスポンスの上昇は確認されなかった。このことから、ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップが PDE など梯子状ポリエーテルと相互作用するタンパク質の観測に有効であり、同時にビオチン化 ALP1B 固定化センサーチップがそのネガティブコントロールとして使用可能であることが示された。

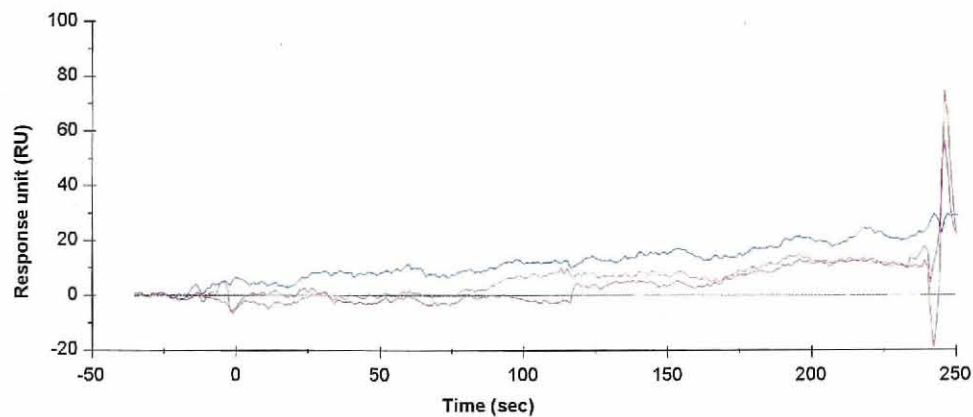


図 4-38 ビオチン化 ALP1B-PDEII センサーグラム, PDEII 濃度 ; 0 (グレー) , 1 (赤) , 2 (マゼンタ) および 5 (青) $\mu\text{g/mL}$

4-4 梯子状ポリエーテル化合物とホスホジエステラーゼとの結合親和性の考察

直接測定法を用いて、PDE4D と種々梯子状ポリエーテル化合物との相互作用解析を行い、梯子状ポリエーテル化合物が、水溶性タンパク質である PDE4D と相互作用することを明らかにした。その相互作用には、側鎖置換基の疎水性および分子長（エーテル環の数）が重要であることがわかった。また、その親和性は、第3章で測定した膜タンパク質よりも10倍程度高く、膜タンパク質の場合とは異なり、ALP4A や ALP7A などテトラオール体においても、比較的強い親和性が得られたことから、PDE4D が強く梯子状ポリエーテル構造を特異的に認識していることが示唆された。

次に PDEII についても同様に、種々梯子状ポリエーテル化合物との相互作用解析を試みたが、得られるレスポンスが低く、解析不可能であった。この原因として、PDEII の固定化量（4,600 RU）が PDE4D（9,800 RU）と比べて少ないこと、梯子状ポリエーテル（アナライト）の分子量が小さいこと（約 300~1,200 Da 程度）、PDEII 固定化の際に結合（活性）部位を損なっていることなどの理由が考えられ、これらは一般的に直接測定法を実施する上で常に問題となっている。したがって、これらの問題点を解決するために、阻害測定法の検討を行った。

まず、ビオチン化脱硫酸 YTX の合成を行い、ストレプトアビジンを介したセンサーチップ上への固定化に成功した。次に、直接測定法において既に梯子状ポリエーテルとの親和性が求められている、PDE4D をこのセンサーチップに添加したところ、結合量は小さいものの強い親和性が認められた。そこで、測定分子を PDE4D とし、種々梯子状ポリエーテル化合物とインキュベートした溶液をビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップに添加したところ、それぞれ 50%阻害濃度 IC_{50} が求められ、その結果は直接測定法で求められた結果と良く一致し、このセンサーチップを用いた阻害測定法の有効性が認められた。

直接測定法では親和性評価ができなかった PDEII を用いて同様に測定したところ、固定化したビオチン化脱硫酸 YTX との相互作用が観測された。次にこの PDEII を用いて、固定化したビオチン化脱硫酸 YTX と種々梯子状ポリエーテル化合物との競争阻害測定実験を行った結果、その親和性を評価することに成功した。直接測定法でできなかった原因として以下のことが考えられる。すなわち、直接測定法で常に問題視される固定化量とアナライトの分子量に関しては、PDEII の固定化量は PDE4D と比べて半分程度であるため、得られるレスポンスが半分であっても、十分観測可能であることが推測されるが、ほとんど観測されなかった（PDE4D-20 μ M YTX において 50 RU のレスポンス得られたのに対して、PDEII-20 μ M YTX において 3 RU 程度）。また分子量に関しても、同じポリエーテルを用いた際に PDE4D で十分なレスポンスが得られていることから、大きな原因とは考え難い。やはり、固定化による

結合 (活性) 部位を損なったことがその主な原因であったと考えられる。Botana らは, Resonant Mirror Optical Biosensor を用い, PDEII を固定化し, YTX との相互作用解析を行い, $K_D = 7.36 \pm 0.60 \mu\text{M}$ という親和性を得ている¹⁹⁾。彼らは, PDEII の固定化にタンパク質のカルボキシ基を介しているのに対し, 本研究ではアミノ基を介して直接測定法を試みた。したがって, この固定化の際の結合部位の違いにより, 親和性に大きな違いが出たことが考えられ, リガンドの固定化が必要な直接測定法ではその固定化法にも注意を払う必要が出てくることが考えられる。

本研究で実施した競争阻害測定実験のメリットは他にも, 検出感度の高さ, 非特異的な吸着を軽減できること, センサーチップにタンパク質を固定化する必要がないため, センサーチップ保存中のタンパク質の劣化を避けることができることなどが挙げられる。検出感度については, 高分子量のタンパク質を測定分子にすることにより, $0.2 \mu\text{M}$ YTX を加えた PDEII 溶液と加えていない PDEII 溶液におけるレスポンスの違いを十分に観測できた。また, 分子量, 構造および分子全体の疎水性が類似したサリノマイシンにおいて, 擬陽性が見られないことから, 非特異的相互作用の影響が低い測定法であることがわかる。また, 本研究を行うにあたり, 直接測定法において固定化してから時間の経った PDE4D 固定化センサーチップ (1 年以上) を使用した際に, センサーチップに固定したタンパク質の劣化が原因と考えられる非特異的な吸着が観測され, 当初の測定結果と比べて親和性が著しく下がるという結果が得られた。このような理由からも, 直接測定法と比べて阻害測定法は信頼性の高い手法であるといえる。

PDEII はサリノマイシンとほとんど相互作用しないのに対して, YTX をはじめ, BTX-B や ALP などの梯子状ポリエーテルは広く認識することが, この競争阻害測定法によって示された。また前述の通り, SPR は迅速性および簡便性の高い測定法で, 実時間でのハイスループット分析が可能である。したがって, 今回作製したビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップおよび PDEII を用いることにより, また同時にビオチン化 ALP1B をネガティブコントロールとして用いることにより, YTX や BTX-B などの梯子状ポリエーテル化合物による汚染の可能性のある魚貝類など海産物を迅速に信頼性の高い試験を実施することができ, 渦鞭毛藻がもたらす食中毒による漁業被害を最小限に食い止めることができるのではないかと考えられる。

4-5 梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ活性化試験

これまでの直接測定法および阻害測定法による結果から、梯子状ポリエーテル化合物が、ホスホジエステラーゼ PDE4D および PDEII と相互作用し、その結合親和性 ($K_D=1\sim$ 数 $10\ \mu\text{M}$) には、分子長（エーテル環の数）および側鎖置換基の疎水性が重要であることが明らかとなった。前述の通り、ホスホジエステラーゼは cAMP を AMP に加水分解することが知られており、カルシウムイオン存在下、YTX をヒトリンパ細胞に投与すると細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP の濃度が減少することが報告され、それを定量的に求める研究が行われてきた¹⁶⁻¹⁸⁾。また、Botana らは YTX が PDE 混合物のほか、ウシの脳および脾臓に存在する PDEI および PDEII に対して相互作用し、それぞれ解離定数 $K_D=2.80\pm 1.21\ \mu\text{M}$ および $K_D=7.36\pm 0.60\ \mu\text{M}$ の親和性を持ち、その結果 YTX がホスホジエステラーゼによる cAMP の加水分解を活性化することを報告した^{19,20)}。そこで次に、以下に示す PDE Assay Kit を用いて、種々梯子状ポリエーテル化合物と PDE との結合親和性と、cAMP 加水分解の活性化との関連性について調べ、分子長や側鎖置換基の影響を評価することにした。

4-5-a PDE Assay Kit

市販の TranscreenerTM PDE Assay Kit (Bellbrook Labs 社製) を用いて、梯子状ポリエーテル化合物のホスホジエステラーゼ (PDE) 活性化について調べた。このキットの原理は、cAMP または cGMP から、ホスホジエステラーゼによる加水分解により生じた AMP または GMP を、競合蛍光偏光法を用いて測定する。このキットは一般に、cAMP または cGMP を加水分解する PDE の測定のためにデザインされているが、AMP または GMP を生成する様々な酵素の測定のほか、それらの阻害測定や活性化測定にも使用可能である (図 4-39)。測定原理の詳細は以下の通りである。キットに同梱の AMP/GMP 結合抗体とそれに対して親和性を有する蛍光標識化 (Alexa® 633, $\text{Ex}=635\text{nm}$, $\text{Em}=670\text{nm}$) トレーサーを予め混合すると、強い蛍光強度を生じる。この溶液に cAMP あるいは cGMP と PDE などの酵素を予め混合した酵素反応溶液を添加する。この酵素反応によって cAMP あるいは cGMP は、AMP あるいは GMP に加水分解されるのであるが、その加水分解された AMP あるいは GMP は AMP/GMP 結合抗体に対して、トレーサーと比べて約 1,000 倍もの親和性を持つことがわかっており、したがって混合により、蛍光標識化トレーサーは次第に AMP あるいは GMP と置換され、蛍光標識化トレーサーが抗体から解離することにより次第に蛍光強度は減少する。すなわち、酵素活性が高いほど蛍光強度が減少することになる。したがって、この蛍光強度の減少をモニターすることにより、酵素活性の強さを観測することが可能となる。さらに、一定濃度の cAMP-酵素溶液あるいは cGMP-酵素溶液などに酵素反応阻害剤または酵素反応活性化剤（ここで

は、梯子状ポリエーテル化合物)を添加することにより、PDEと梯子状ポリエーテル化合物との結合親和性が酵素反応に及ぼす影響を評価することができるのではないかと考えられる。図 4-40 に Matt ら²¹⁾により実施された阻害実験例を示す。PDE4A4 特異的阻害剤の Rolipram, PDE 非特異的阻害剤の IBMX を用いて、PDE4A4 の選択的阻害を検証している。アッセイには 1 μM cAMP 及び 25mU/mL PDE4A4 を使用し、種々濃度で阻害剤を使用し、用量依存曲線を作成している。その結果、Rolipram (■) および IBMX (◆) の IC_{50} 値はそれぞれ、4.4 μM および 29.1 μM と求められた。一方、PDE5 特異的阻害剤の MMQZ (▲) による PDE4A4 の阻害は観測されなかった。

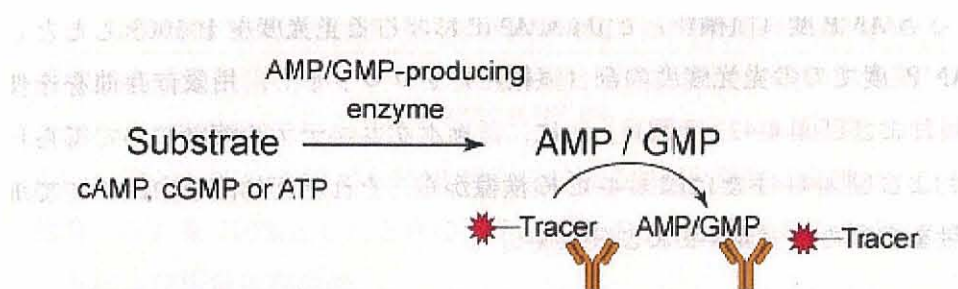


図 4-39 Transcreener™ PDE Assay Kit の測定原理²¹⁾

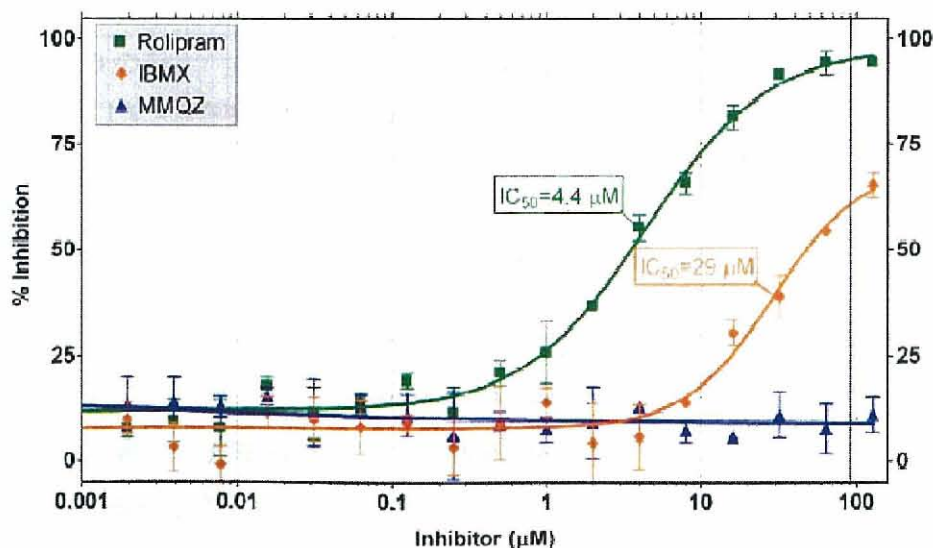


図 4-40 PDE4A4 の選択的阻害実験²¹⁾ ; 種々濃度で添加した特異的阻害剤 Rolipram (■), 非特異的阻害剤 IBMX (◆) および PDE5 特異的阻害剤 MMQZ (▲) の添加濃度 (横軸) と阻害率 (縦軸) のプロットおよび用量依存曲線。

4-5-b Transcreener™ PDE Assay Kit を用いた梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ (PDE4D) 活性化試験

実験項に示す通り、マイクロプレート (greiner bio-one 社製, 96 ウェル, 容量 200 μ L, ブラック/クリアボトム) のウェル中, 種々濃度に調製した cAMP 溶液, PDE4D 溶液および梯子状ポリエーテル溶液を混合し, 室温 (25°C) で 30 分間放置した。この溶液に, 前述の AMP/GMP 抗体および蛍光標識化トレーサーを混合した溶液を一定量加え, さらに室温で 60 分間放置した。この溶液に EDTA を含む Stop&Detect 溶液を加え, 30 分間放置し, 酵素反応を失活させた後, 蛍光プレートリーダー (SpectraMax M5 microplate reader, Molecular Devices 社) を用いて, 励起波長 635 nm, 測定波長 670 nm で測定した。0.1, 0.25, 1 および 10 μ M AMP 溶液における AMP 濃度 (横軸) と 0 μ M AMP における蛍光強度を 100%としたときの, それぞれの AMP 濃度での蛍光強度の割合 (縦軸) をプロットし, 用量依存曲線を作製した (図 4-41-1 回目および図 4-42-2 回目)。次に, 種々ポリエーテル溶液において得られた蛍光強度 (%FP) および図 4-41 または図 4-42 の検量線から, それぞれ溶液中において加水分解された AMP 含量を求めた (表 4-5 および表 4-6)。

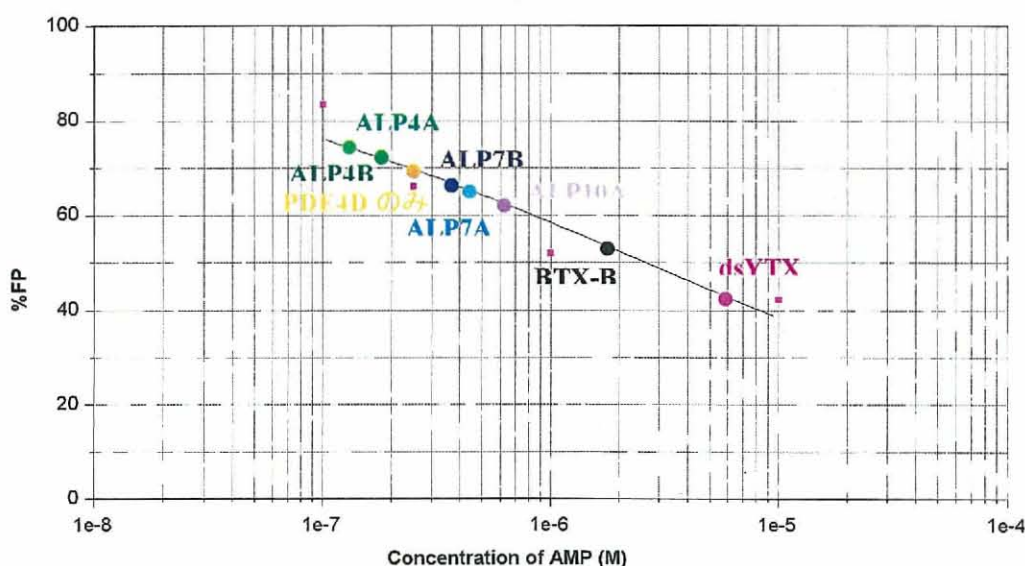


図 4-41 0.1, 0.25, 1 および 10 μ M AMP 溶液における AMP 濃度 (横軸) と 0 μ M AMP における蛍光強度 (FP) を 100%としたときの, それぞれの AMP 濃度での蛍光強度の割合 (縦軸) のプロットおよび用量依存曲線 (VTX, ALP1B および Salinomycin は検量線外のため測定不能)

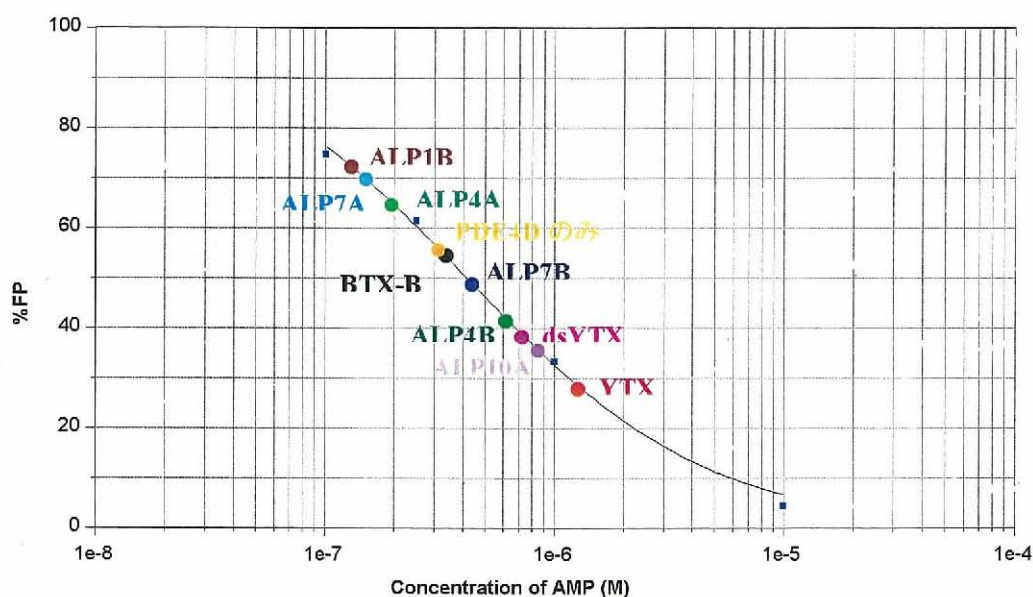


図 4-42 0.1, 0.25, 1 および 10 μM AMP 溶液における AMP 濃度（横軸）と 0 μM AMP における蛍光強度（FP）を 100%としたときの、それぞれの AMP 濃度での蛍光強度の割合（縦軸）のプロットおよび用量依存曲線

表 4-5 1 nM PDE4D-10 μM cAMP-種々ポリエーテル化合物混合溶液における蛍光強度 (%FP) と検量線 (図 4-41) より求められた AMP 定量結果 (μM)

ポリエーテル	%FP ^{*1}	AMP 濃度 (μM)
1 nM PDE4D のみ	69.6	0.02
16.7 μM YTX	33.8	> 1
16.7 μM dsYTX	42.6	0.60
16.7 μM BTX-B	53.2	0.19
16.7 μM ALP1B	84.7	< 0.01
16.7 μM ALP4A	75.8	0.01
16.7 μM ALP4B	73.3	0.02
16.7 μM ALP7A	65.9	0.04
16.7 μM ALP7B	67.1	0.03
10 μM ALP10A	63.0	0.06
16.7 μM Salinomycin	96.6	< 0.01

*1 ; n2 あるいは n3 の平均値

表 4-6 1 nM PDE4D-10 μ M cAMP-種々ポリエーテル化合物混合溶液における蛍光強度 (%FP) と検量線 (図 4-42) より求められた AMP 定量結果 (μ M)

ポリエーテル	%FP*1	AMP 濃度 (μ M)
1 nM PDE4D のみ	55.3	0.33
8.3 μ M YTX	59.3	0.27
16.7 μ M YTX	28.3	1.36
4.2 μ M dsYTX	50.2	0.42
8.3 μ M dsYTX	44.7	0.57
16.7 μ M dsYTX	39.3	0.75
16.7 μ M BTX-B	54.0	0.36
16.7 μ M ALP1B	73.3	0.12
16.7 μ M ALP4A	64.3	0.20
16.7 μ M ALP4B	41.8	0.66
16.7 μ M ALP7A	70.0	0.14
16.7 μ M ALP7B	49.2	0.45
10 μ M ALP10A	36.7	0.87
16.7 μ M Salinomycin	85.4	0.04

*1 ; n2 あるいは n3 の平均値

4-5-c Transcreener™ PDE Assay Kit を用いた梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ (PDE4D) 活性化試験の結果および考察

表 4-5 および表 4-6 から, SPR を用いた結合親和性が認められなかったサリノマイシンにおいては, 測定 PDE4D の活性化は観測されなかった。一方, SPR 測定において, わずかに結合親和性が認められた単環性 ALP1B ジベンジル体, 4 環性 ALP4A および 7 環性 ALP7A テトラオール体においても, PDE4D の活性化は認められず, これらの相互作用は非特異的吸着に起因するのではないかと考えた。ところが, 4 環性 ALP4B, 7 環性 ALP7B ジベンジル体, および 10 環性 ALP10A テトラオール体においては, とりわけ表 4-6 の結果からわかるとおり 1.5 ~2.5 倍程度の (PDE4D のみ, AMP 濃度 0.33 μ M ; ALP4B, AMP 濃度 0.66 μ M ; ALP7B, AMP 濃度 0.45 μ M および ALP10A, AMP 濃度 0.87 μ M) PDE4D の活性化が観測され, PDE4D との結合に伴いホスホジエステラーゼの活性化を引き起こしていることが示唆された。また表 4-6 の結果から, YTX および dsYTX 溶液においても同様に, 2~4 倍程度の (PDE4D のみ, AMP 濃度 0.33 μ M ; YTX, AMP 濃度 1.36 μ M および dsYTX, AMP 濃度 0.75 μ M) PDE4D の活性化が観測され, これらの結果から, 梯子状ポリエーテル化合物の分子長および側鎖置換基の疎

水性が SPR 測定により観測された PDE4D との結合親和性のみならず，PDE4D のホスホジエステラーゼ作用の活性化に重要であることが示された。また，表 4-6 に示した通り，YTX および dsYTX の濃度を変化させた場合，その濃度に反比例して蛍光強度 (%FP) が小さくなり，すなわち加水分解された AMP の濃度が上昇することが確認された。このことから，YTX および dsYTX が PDE4D を認識し，ホスホジエステラーゼ作用を活性化していることが示唆される。

4-6 結 論

- 直接測定法を用いて、PDE4D と種々梯子状ポリエーテルとの相互作用解析を行った結果、梯子状ポリエーテル化合物が、水溶性タンパク質である PDE4D と相互作用し、側鎖置換基の疎水性、分子長および梯子状ポリエーテル構造が重要であることを明らかにした。
- ビオチン化脱硫酸 YTX を合成、センサーチップ上への固定化に成功し、阻害測定法を用いた PDE4D と種々梯子状ポリエーテルとの相互作用解析に成功し、得られた親和性が直接測定法の結果と良く一致することを明らかにした。
- 直接測定法においてレスポンスが低いため解析不可能であった PDEII と種々梯子状ポリエーテル化合物との親和性評価を、ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いた阻害測定法を用いることにより成功した。
- Transcreener™ PDE Assay Kit を用いた梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ（PDE4D）活性化試験を実施したところ、SPR 測定を用いて求められた結合親和性の傾向と一致する結果が得られ、分子長（エーテル環の数）および側鎖置換基の疎水性がホスホジエステラーゼの活性化に対しても重要であることを明らかにした。

参考文献

- 1) Ohizumi, Y. *Bioactive Molecules* **1989**, *10*, 407-416. The mode of cardiotoxic and cardiotoxic action of maitotoxin and ciguatera toxins.
- 2) Ohizumi, Y.; Shibata, S.; Tachibana, K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *217*, 475-480. Mode of the excitatory and inhibitory actions of ciguatera toxin in the guinea pig vas deferens.
- 3) Lombet, A.; Bidard, J. -N.; Lazdunski, M. *FEBS Lett.* **1987**, *219*, 355-359. Ciguatera toxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent sodium channel.
- 4) Nagai, H.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T.; Hirota, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1102-1103. Gambieric acids: unprecedented potent antifungal substances isolated from cultures of a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 5) Nagai, H.; Murata, M.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5448-5453. Gambieric acids, new potent antifungal substances with unprecedented polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 6) Morohashi, A.; Satake, M.; Nagai, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8995-9001. The Absolute Configuration of Gambieric Acids A-D, Potent Antifungal Polyethers, Isolated from the Marine Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*.
- 7) Takahashi, M.; Ohizumi, Y.; Yasumoto, T. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7287-7289. Maitotoxin, a Ca^{2+} channel activator candidate.
- 8) Daly, J. W.; Lueders, J.; Padgett, W. L.; Shin, Y.; Gusovsky, F. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1187-1197. Maitotoxin-elicited calcium influx in cultured cells. Effect of calcium-channel blockers.
- 9) Mori, M.; Oishi, T.; Matsuoka, S.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Murata, M.; Satake, M.; Oshima, Y.; Matsushita, N.; Aimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5099-5103. Ladder-shaped polyether compound, desulfated yessotoxin, interacts with membrane-integral α -helix peptides.
- 10) Ujihara, S.; Oishi, T.; Torikai, K.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oshima, Y.; Aimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6115-6118. Interaction of ladder-shaped polyethers with transmembrane α -Helix of glycophorin A as evidenced by saturation transfer difference NMR and surface plasmon resonance.
- 11) Homola, J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 462-493. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species.
- 12) Caelen, I.; Kalman, A.; Wahlström, L. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 137-143. Biosensor-based determination of riboflavin in milk samples.

- 13) Daly, S. J.; Keating, G. J.; Dillon, P. P.; Manning, B. M.; O'Kennedy, R.; Lee, H. A.; Morgan, M. R. A. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5097-5104. Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B₁.
- 14) Li, Y.; Kobayashi, M.; Furui, K.; Soh, N.; Nakano, K.; Imato, T. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *576*, 77-83. Surface plasmon resonance immunosensor for histamine based on an indirect competitive immunoreaction.
- 15) Miura, N.; Shankaran, D. R.; Kawaguchi, T.; Matsumoto, K.; Toko, K. *Electrochemistry* **2007**, *75*, 13-22. High-performance surface plasmon resonance immunosensors for TNT detection.
- 16) Leira, F.; Alvarez, C.; Vieites, J. M.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M. *Toxicology in Vitro* **2002**, *16*, 23-31. Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line.
- 17) Alfonso, A.; de la Rosa, L.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 193-208. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity Effect of yessotoxin on camp levels in human lymphocytes.
- 18) Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 93-99. A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases.
- 19) Pazos, M-J.; Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Vieites, J. M.; Botana, L. M. *Anal. Biochem.* **2004**, *335*, 112-118. Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions.
- 20) Pazos, M-J.; Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Yasumoto, T.; Botana, L. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1155-1160. Kinetic Analysis of the Interaction between Yessotoxin and Analogues and Immobilized Phosphodiesterases Using a Resonant Mirror Optical Biosensor.
- 21) <http://www.bellbrooklabs.com>

第5章 結 論

これまで、多くの生理活性物質が天然物として発見され、様々なアプローチからこれら生理活性物質の作用機構解明を目指した研究が行われてきたが、未だ解明されていない部分が多い。そこで本研究では、生理活性物質とタンパク質や生体膜などの生体分子との相互作用解析の手法として、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いることにした。

まずは、脂質二重膜中におけるアンフォテリシン B の作用機構を解明するために、アンフォテリシン B と様々な脂質二重膜との親和性を簡便に解析する測定法の開発を目指した。

その結果、ドデシル基を導入したセンサーチップを作製することによって、アンフォテリシン B の脂質膜以外への吸着を軽減し、この新規センサーチップを用いたアンフォテリシン B の脂質二重膜に対する親和性評価を可能にした。

次に、アンフォテリシン B と脂質二重膜との相互作用機構についての速度論的解釈に成功し、アンフォテリシン B が一旦脂質二重膜の表面に吸着した後、膜内部化を起こすことにより、二状態反応モデルで相互作用していることを推定した。

また、上記センサーチップを用いて、脂質二重膜中におけるステロール選択性を定量的に評価し、特に内部化過程において、アンフォテリシン B がステロール非含有 POPC 脂質二重膜やコレステロール含有 POPC 脂質二重膜と比べて、エルゴステロール含有 POPC 脂質二重膜に対して親和性が高いことを明らかにした。

さらに、アシル鎖が異なる脂質二重膜中においても同様に、二状態反応モデルを用いて、アンフォテリシン B の内部化の起こりやすさと二分子膜の疎水領域長の関連性を調べ、アンフォテリシン B と脂質二重膜の疎水領域長の一致が、内部化過程における親和性に重要であることを明らかにした。

次に、SPR を用いた梯子状ポリエーテル YTX および dsYTX と種々タンパク質との相互作用解析を行った結果、YTX および dsYTX が広く膜タンパク質と相互作用することが分かり、またその親和性を定量的 (解離定数 $K_D = 10 \sim 100 \mu\text{M}$ 程度) に求めることに成功した。また、2つの硫酸基を持つ YTX の場合とは異なり、dsYTX は静電的相互作用を排除できるため、タンパク質と相互作用する一般的な梯子状ポリエーテルモデル化合物として有効であることが示された。

また、種々ポリエーテル化合物と膜タンパク質 APH1B との親和性を定量的に求めることに成功し、その親和性評価の結果から、二分子間の相互作用には梯子状ポリエーテル構造が不可欠であり、さらに親和性を高める要因として、分子長 (エーテル環の数) および側鎖置換基の疎水性が重要であることを明らかにした。

さらに直接測定法を用いて、PDE4D と種々梯子状ポリエーテルとの相互作用解析を行った結果、梯子状ポリエーテル化合物が、水溶性タンパク質である PDE4D と相互作用し、側鎖置換基の疎水性、分子長および梯子状ポリエーテル構造が重要であることを明らかにした。

次に、ビオチン化脱硫酸 YTX を合成、センサーチップ上への固定化に成功し、阻害測定法を用いた PDE4D と種々梯子状ポリエーテルとの相互作用解析に成功し、得られた親和性が直接測定法の結果と良く一致することを明らかにした。

また、直接測定法においてレスポンスが低いため解析不可能であった PDEII と種々梯子状ポリエーテル化合物との親和性評価を、ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを用いた阻害測定法を用いることにより成功した。

さらに、Transcreener™ PDE Assay Kit を用いた梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ（PDE4D）活性化試験を実施したところ、SPR 測定を用いて求められた結合親和性の傾向と一致する結果が得られ、分子長（エーテル環の数）および側鎖置換基の疎水性がホスホジエステラーゼの活性化に対しても重要であることを明らかにした。

第6章 実験項

6-1 試薬, 使用機器等

6-1-a 使用機器

表面プラズモン共鳴装置:	BIACORE®X (GE ヘルスケアバイオサイエンス)
HPLC システム 1:	SCL-10Avp, SPD-M10Avp, LC-10ADvp, LC-10ADvp, DGU-12A (島津製作所)
HPLC システム 2:	SCL-10Avp, SPD-10Ai, LC-10Ai, LC-10Ai DGU-12A (島津製作所)
UV 測定器:	UV-2500 (島津製作所)
MS スペクトル装置:	LCQ deca (Thermo electron)
NMR 測定:	JNM GSX400-spectrometer, JNM ECA500-spectrometer (日本電子)
クリーンベンチ:	MCV-711ATS (サンヨー)
インキュベーター:	FLI-301N (東京理化器械)
オートクレーブ:	BS-325 (TOMY)
純水製造装置:	Elix-UV, Simpli Lab (MILLIPORE)
電子天秤:	GR-202, HF-3200 (研精工業)
pH メーター:	HM-40S (東亜ディーケーケー), TwinpH B-212 (堀場製作所)
ロータリーエバポレーター:	N-1000, WATER BATH SB-350, COOLACE CA-1111 (東京理化器械), NVC-2000 (テクノシグマ)
マイクロプレートリーダー:	SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices)
遠心分離器:	KUBOTA5200 (クボタ), CENTRIFUGE (HSIANGTAI), E-centrifuge (WEALTEC)
電気泳動装置	
泳動槽:	ミニリアルゲルスラブ電気泳動装置 BE-210 (バイオクラフト)
パワーサプライ:	Power Supply EPS-1001 (Amasham)
泳動ゲル:	ミニリアルゲルプレート SDG-591 (バイオクラフト)
振とう器:	SHM-100 (旭テクノグラス)

蛍光プレートリーダー：	SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices)
プレート遠心器：	Plate Spin (クボタ)
凍結乾燥器：	FRD-50M (旭テクノグラス)
ボルテックスミキサー：	NS-80 (アズワン), VORTEX GENIE-2 (エムエス機器)
超音波発生装置：	BRANSON 1200 (ヤマト科学)
マグネチックスターラー：	CORNING (旭テクノグラス)
リポソファスト	LiposoFast Basic [®] (Avestin)
マイクロピペット：	Nichipet EX (ニチリョー)

6-1-b 試薬および溶媒

6-1-b1 試薬

Amphotericin B, 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, コレステロール, リン酸水素二ナトリウム・12 水和物, リン酸水素カリウム, 水酸化ナトリウム, {3-(3-コールアミドプロピル)ジメチルアミノ}-1-プロパンスルホン酸 (CHAPS), シスタミン二塩酸塩, 炭酸水素ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム, エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム 2 水和物, 水素化ナトリウム, チアミン塩酸塩 (ビタミン B₁) ビオチン, シアノコバラミン (ビタミン B₁₂), プレステイン Dtan パク質マーカー (Law range), 塩化マグネシウム・6 水和物, HEPES{2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸}およびストレプトアビジン (60 KDa) はナカライテスクから購入した。

エルゴステロール, パラトルエンルホン酸 1 水和物, 臭化ベンジル (蒸留後使用), サリノマイシン塩酸塩, 硝酸カリウム, グリセロリン酸二ナトリウム 5.5 水和物, 三塩化鉄, ほう酸, 塩化マンガン 4 水和物, 塩化鉛, 二塩化コバルト 6 水和物, 亜セレン酸および小麦胚芽レクチン (Wheat germ agglutinin, WGA) は和光純薬工業から購入した。

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC), N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS), センサーチップ L1 およびセンサーチップ CM5 は GE ヘルスケアバイオサイエンスから購入した。

APH1B (Full-length human Recombinant, 16 KDa + 28.5 KDa-tag, 100 ng/μL) および BCL2 (Full-length human Recombinant, 26.3 KDa + 7 KDa-tag, 100 ng/μL) は American Proteomics から購入した。NIP3 BH3 Domain peptide (BH3, sequence ; CPSLLLSHLLAIGLYIGRRL, 2,377 Da) は ABGENT から購入した。PDE4D (Full-length human Recombinant, 82.72 KDa with GST-tag (28 KDa), 0.13 μg/μL) は Abnova から購入した。マイクロプレート (96 ウェル, 容量 200 μL, ブラック/クリアボトム) は greiner bio-one から購入した。

POPC は日本油脂から、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC は Avanti から購入した。

Transcreener™ PDE Assay Kit は Bellbrook から、NHS-PEO4-Biotin は Thermo Fisher Scientific から、3-アミノプロピオンアルデヒドジエチルアセタールは東京化成工業から、MARINE ART HI は富田製薬から、HP20 は三菱化学から、Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) は Merck から、ドデシルアミン、トリプロピレングリコール、グリコホリン A (From blood type MM), cAMP, BTX-B および PDEII (phosphodiesteraseII, from bovine spleen, 5 units/mg, 25 units) は Sigma-Aldrich から、ペプチドマーカークットは amasham から購入した。

6-1-b2 溶媒

Dimethyl sulfoxide (DMSO) は Sigma-Aldrich 社より、HBS-EP, HBS-EP+ buffer 10×1 M エタノールアミン (pH 8.5), 酢酸緩衝液 (10 mM 酢酸ナトリウム, pH4.0), 酢酸緩衝液 (10 mM 酢酸ナトリウム, pH4.5), 酢酸緩衝液 (10 mM 酢酸ナトリウム, pH5.0), 0.5% SDS 溶液および 50 mM NaOH は GE ヘルスケアバイオサイエンス社より購入した。塩酸 (35%), 酢酸エチル, メタノール, クロロホルム, ジクロロメタン, 1,4-ジオキサンおよびナカライテスクの HPLC 用のものを使用した。

無水反応用に使用したジクロロメタンおよびテトラヒドロフランは関東化学から購入した。

また、水は Elix-UV (MILLIPORE), 続いて Simpli Lab (MILLIPORE) により精製した超純水を使用した。

6-1-c 試液の調製

6-1-c1 ランニングバッファー, HPLC 移動相および TLC 展開溶媒の調製

・リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) の調製

1 L 容メスフラスコに塩化ナトリウム 8.00 g, 塩化カリウム 0.20 g, リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 2.90 g およびリン酸水素カリウム 0.20 g を量り取り, 超純水 800 mL を加え溶解した。1 M 塩酸および 1 M 水酸化ナトリウムを用いて, pH7.4 に調整後, 超純水で 1 L に定容した後, 超音波をかけて脱気した。

・5%または 10% DMSO-PBS 溶液の調製

500 mL 容メスフラスコに, DMSO を 25 または 50 mL とり, 先ほど調製したリン酸緩衝液を加え, 500 mL に定容した後, 超音波をかけて脱気した。

・1%DMSO-HBSEP 溶液の調製

DMSO 5 mL をとり, HBS-EP 溶液を加え, 500 mL に定容した後, 超音波をかけて脱気した。

- ・ 1%DMSO-HBSEP 溶液の調製

DMSO 5 mL をとり、HBS-EP+溶液を 50 mL 加え、超純水で 500 mL に定容した後、超音波をかけて脱気した。

- ・ 35 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液の調製

リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 0.730 g とリン酸水素ナトリウム 0.714 g をとり、超純水 300 mL を加え、溶解した。

- ・ メタノール：35 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液（HPLC 条件 1）の調製

35 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 300 mL とメタノール 700 mL を混合し、かくはん後、超音波をかけて脱気した。

- ・ 85%メタノール溶液（HPLC 条件 2）の調製

メタノール 850 mL と超純水 150 mL を混合し、かくはん後、超音波をかけて脱気した。

- ・ 20%メタノール溶液の調製

メタノール 200 mL と超純水 800 mL を混合した。

- ・ 70%メタノール溶液の調製

メタノール 700 mL と超純水 300 mL を混合した。

6-1-c2 固定化試薬の調製

- ・ 5 mM ドデシルアミン固定化溶液の調製

ドデシルアミン 9.27 mg を DMSO 1 mL に溶解した。この溶液 20 μ L に DMSO 80 μ L を加えた後、酢酸緩衝液（10 mM 酢酸ナトリウム，pH4.5）を 100 μ L 加え、5 mM ドデシルアミン溶液（pH 4.5，ドデシルアミン固定化用溶液）を調製した。

- ・ 10 μ g/mL APh1B 固定化溶液

100 μ g/mL APh1B 溶液を 10 μ L とり、酢酸緩衝液（pH4.0）90 μ L を加え 10 μ g/mL APh1B 固定化溶液を調製した。

- ・ 10 μ g/mL BCL2 固定化溶液

100 μ g/mL BCL2 溶液を 10 μ L とり、酢酸緩衝液（pH5.0）90 μ L を加え 10 μ g/mL BCL2 固定化溶液を調製した。

- ・ 50 μ g/mL BH3 固定化溶液

BH3 100 μ g をとり、DMSO を 200 μ L 加え溶解した後、この溶液を 10 μ L をとり、酢酸緩衝液（pH4.0）90 μ L を加え、50 μ g/mL BH3 固定化溶液を調製した。

- ・ 400 µg/mL ストレプトアビジン固定化溶液

ストレプトアビジン (SA) 1 mg をとり、超純水 1 mL を加え 1 mg/mL ストレプトアビジン溶液を調製した。この溶液 40 µL をとり、酢酸緩衝液 (pH4.0) 60 µL を加え、400 µg/mL ストレプトアビジン固定化溶液を調製した。

- ・ 100 µg/mL ストレプトアビジン固定化溶液

ストレプトアビジン (SA) 1 mg をとり、超純水 1 mL を加え 1 mg/mL ストレプトアビジン溶液を調製した。この溶液 10 µL をとり、酢酸緩衝液 (pH4.0) 90 µL を加え、100 µg/mL ストレプトアビジン固定化溶液を調製した。

- ・ 20 µg/mL PDE4D 固定化溶液

0.13 µg/µL PDE4D 19.7 µL をとり、酢酸緩衝液 (pH4.0) 42.4 µL を加え、20 µg/mL PDE4D 固定化溶液とした。

- ・ 100 µg/mL PDEII 固定化溶液

PDEII 100 µg をとり、超純水 100 µL を加え 1 µg/µL PDEII 溶液を調製した。さらに、この溶液 20 µL をとり、酢酸緩衝液 (pH4.0) 180 µL を加え、PDEII 固定化溶液を調製した。

固定化には PDEII (Sigma-Aldrich 社製, phosphodiesteraseII, bovine spleen, 5 units/mg, 25 units)

- ・ 20 µg/mL ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化溶液

0.5 mg/mL ビオチン化 ds YTX (メタノール溶液) を 4 µL とり、溶媒留去後、1%DMSO-HBSEP+溶液 100 µL に溶解し、20 µg/mL ビオチン化 ds YTX 溶液を調製した。

6-1-c3 その他の試薬の調製

- ・ 400 mM EDC 溶液の調製

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 750 mg を 10 mL の超純水に溶解し、マイクロピペットを用いて 0.6 mL マイクロチューブに 100 µL ずつ分注し、-20℃で冷凍保存した。

- ・ 100 mM NHS 溶液の調製

N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 115 mg を 10 mL の超純水に溶解し、マイクロピペットを用いて 0.6 mL マイクロチューブに 100 µL ずつ分注し、-20℃で冷凍保存した。

- ・ 20 mM CHAPS 溶液の調製

{3-(3-コールアミドプロピル)ジメチルアミノ}-1-プロパンスルホン酸 (CHAPS) 123 mg に超純水を加えて溶解し、10 mL に定容した。

・ 0.1 M ほう酸緩衝液の調製

ほう酸 618 mg を 80 mL の超純水を加え溶解し、1 M 塩酸及び 1M 水酸化ナトリウム溶液を用いて、pH 7.4 に調整した後、超純水を加えて 100 mL に定容した。

・ 40 mM シスタミン溶液の調製

シスタミン二塩酸塩 90.1 mg に 0.1 M ほう酸緩衝液を加え溶解し、10 mL に定容した。

・ 1 % DMSO 含有 50 mM HEPES, 150 mM 塩化ナトリウム, 2 mM EDTA, 10 mM 塩化マグネシウム溶液の調製

HEPES{2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸} 119 mg, 塩化ナトリウム 87.7 mg, エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム 2 水和物 (EDTA) 7.44 mg および塩化マグネシウム・6 水和物 20.3 mg を加え、さらに DMSO 100 μ L を加えた後、超純粋で 10 mL に溶解した。

・ GSe ストック溶液

表 6-1 の組成で調製した溶液をクリーンベンチ内でメンブレンフィルターをつけたメジウム瓶に濾過をした。クリーンベンチ内で蓋をした後、冷蔵庫で保存した。

表 6-1 栄養塩 (GSe) ストック溶液の組成

栄養塩類		終濃度
無機塩類		
	硝酸カリウム	0.2 M
	グリセロリン酸二ナトリウム 5.5 水和物	20 mM
	エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム 2 水和物	8.06 mM
	三塩化鉄	0.54 mM
	ほう酸	55.5 mM
	塩化マンガン 4 水和物	1.72 mM
	塩化鉛	0.22 mM
	二塩化コバルト 6 水和物	60 μ M
	亜セレン酸	1 mM
ビタミン類		
	D-ビオチン (ビタミン H)	70 nM
	シアノコバラミン (ビタミン B ₁₂)	0.3 mM
	チアミン塩酸塩 (ビタミン B ₁)	0.82 μ M

6-2 試験用溶液の調製およびセンサーチップの作製

6-2-a 試験用溶液の調製

6-2-a1 アンフォテリシン B 溶液

アンフォテリシン B 4.62 mg (AmB, 5 μ mol) を量り取り, 1 mL の DMSO を加えて溶解し, 5 mM AmB 溶液 (100% DMSO 溶液) を調製した。5 mM AmB 溶液 50 μ L をとり, DMSO 200 μ L を加え, 1 mM AmB 溶液 (100% DMSO) を調製した。さらに, 1 mM AmB 溶液を 50 μ L をとり, PBS (137 mM 塩化ナトリウム, 2.7 mM 塩化カリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝溶液, pH 7.4) 950 μ L を加え, 50 μ M AmB 溶液 (5% DMSO-リン酸緩衝溶液) を調製し, 試験溶液とした。また, 50 μ M AmB 溶液を 5% DMSO-リン酸緩衝溶液で適宜希釈し, 5, 10, 20, 30 および 40 μ M AmB 溶液 (5% DMSO-リン酸緩衝溶液) を調製し, 試験溶液とした。なお, 5 mM AmB 溶液を保存溶液として冷蔵庫にて保管した。

6-2-a2 YTX 溶液の調製

1 mg/mL YTX を 59.3 μ L とり, 溶媒留去後, 1%DMSO-PBS, 1%DMSO-HBSEP または 1%DMSO-HBSEP+溶液 500 μ L に溶解し, 100 μ M YTX 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度の YTX 溶液を得た。

6-2-a3 dsYTX 溶液の調製

1 mg/mL dsYTX (メタノール溶液) を 49.2 μ L とり, 溶媒留去後, 1%DMSO-PBS, 1%DMSO-HBSEP または 1%DMSO-HBSEP+溶液 500 μ L に溶解し, 100 μ M dsYTX 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度の dsYTX 溶液を得た。

6-2-a4 ビオチン化 dsYTX 溶液の調製

0.5 mg/mL ビオチン化 ds YTX (メタノール溶液) を 37.8 μ L とり, 溶媒留去後, 1%DMSO-PBS, 1%DMSO-HBSEP または 1%DMSO-HBSEP+溶液 500 μ L に溶解し, 50 μ M ビオチン化 ds YTX 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度のビオチン化 ds YTX 溶液を得た。

6-2-a5 BTX-B 溶液の調製

2 mg/mL BTX-B (メタノール溶液) を 44.8 μ L とり, 溶媒留去後, 1%DMSO-PBS, 1%DMSO-HBSEP または 1%DMSO-HBSEP+溶液 500 μ L に溶解し, 100 μ M BTX-B 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度の BTX-B 溶液を得た。

6-2-a6 ALP1A 溶液の調製

12 mM ALP1A (DMSO 溶液) を 10 μ L とり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 120 μ M ALP1A 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファで適宜希釈し, 種々濃度の ALP1A 溶液を得た。

6-2-a7 ALP4A 溶液の調製

12 mM ALP4A (DMSO 溶液) を 10 μ L とり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 120 μ M ALP4A 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファで適宜希釈し, 種々濃度の ALP4A 溶液を得た。

6-2-a8 ALP7A 溶液の調製

12 mM ALP7A (DMSO 溶液) を 10 μ L とり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 120 μ M ALP7A 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファで適宜希釈し, 種々濃度の ALP7A 溶液を得た。

6-2-a9 ALP10A 溶液の調製

6 mM ALP10A (DMSO 溶液) を 10 μ L とり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 60 μ M ALP10A 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファで適宜希釈し, 種々濃度の ALP10A 溶液を得た。

6-2-a10 ALP1B 溶液の調製

ALP1B を 3.72 mg とり, DMSO 500 μ L に溶解し, 20 mM ALP1B 溶液を調製した。この溶液 10 μ L をとり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 200 μ M ALP1B 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファで適宜希釈し, 種々濃度の ALP1B 溶液を得た。

6-2-a11 ALP4B 溶液の調製

12 mM ALP4B (DMSO 溶液) を 10 μ L とり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 120 μ M ALP4B 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファで適宜希釈し, 種々濃度の ALP4B 溶液を得た。

6-2-a12 ALP7B 溶液の調製

12 mM ALP7B (DMSO 溶液) を 10 μ L とり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 120 μ M ALP7B 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度の ALP7B 溶液を得た。

6-2-a13 Salinomycin 溶液の調製

Salinomycin を 9.09 mg とり, DMSO 500 μ L に溶解し, 20 mM Salinomycin 溶液を調製した。この溶液 10 μ L をとり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 200 μ M Salinomycin 溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度の Salinomycin 溶液を得た。

6-2-a14 トリプロピレングリコール溶液の調製

トリプロピレングリコールを 1.92 mg とり, DMSO 500 μ L に溶解し, 20 mM トリプロピレングリコール溶液を調製した。この溶液 10 μ L をとり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 200 μ M トリプロピレングリコール溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度のトリプロピレングリコール溶液を得た。

6-2-a15 トリプロピレングリコールジベンジルエーテル溶液の調製

トリプロピレングリコールを 3.72 mg とり, DMSO 500 μ L に溶解し, 20 mM トリプロピレングリコールジベンジルエーテル溶液を調製した。この溶液 10 μ L をとり, PBS, HBSEP または HBSEP+溶液 990 μ L を加え, 200 μ M トリプロピレングリコールジベンジルエーテル溶液を調製した。この溶液を, ランニングバッファーで適宜希釈し, 種々濃度のトリプロピレングリコールジベンジルエーテル溶液を得た。

6-2-b リポソームの調製

図 6-1A に本研究で使用したアシル鎖の異なるリン脂質を示した。POPC は, 標準的なリン脂質として選択した。また, DLPC, DMPC, DPPC 及び DSPC は, それぞれ飽和アシル鎖の長さが, C₁₂, C₁₄, C₁₆ 及び C₁₈ であり, AmB との親和性に及ぼす二重膜の厚さの影響を見積もるために使用した。10 mL 容ナス型フラスコにそれぞれの脂質を量り取り, クロロホルム 2 mL を加え溶解した。さらにステロール含有脂質二重膜を調製するときは, 目的の割合になるようにステロールを添加し, さらにメタノール 1 mL を加えて同様に溶解した。室温で遮光下, エバポレーターを用いて溶媒を留去した後, さらに真空ポンプにより 2 時間以上減圧。

させ、ナス型フラスコ内壁に脂質フィルムを調製した。これに、リン酸緩衝液（PBS）を加え水和させた後、超音波発生装置及びボルテックスミキサーを用いて脂質フィルムを壁面から剥がして懸濁させた。さらに凍結（-80℃）と融解（60℃）を3回以上繰り返し、5 mMのMLV懸濁液を調製した。さらに孔径100 nmのポリカーボネート製フィルム（Avestin社製）を取り付けたリポソファスト¹⁾を用い、5 mM LUV懸濁液を調製した（図6-1B）。また、表6-2に、5 mM リポソーム懸濁液1 mLを調製した際の、各々リン脂質の採取量を示した。また、表6-3に、コレステロールまたはエルゴステロール含有5 mM リポソーム（POPCまたはDMPC）1 mLを調製した際の、ステロールの添加量を示した。これらのリポソーム懸濁液を、保存溶液として2ヶ月間保存した。種々リポソームをセンサーチップへ捕捉する際は、この溶液をランニングバッファーで10倍に希釈した0.5 mM LUV懸濁液を用いた。

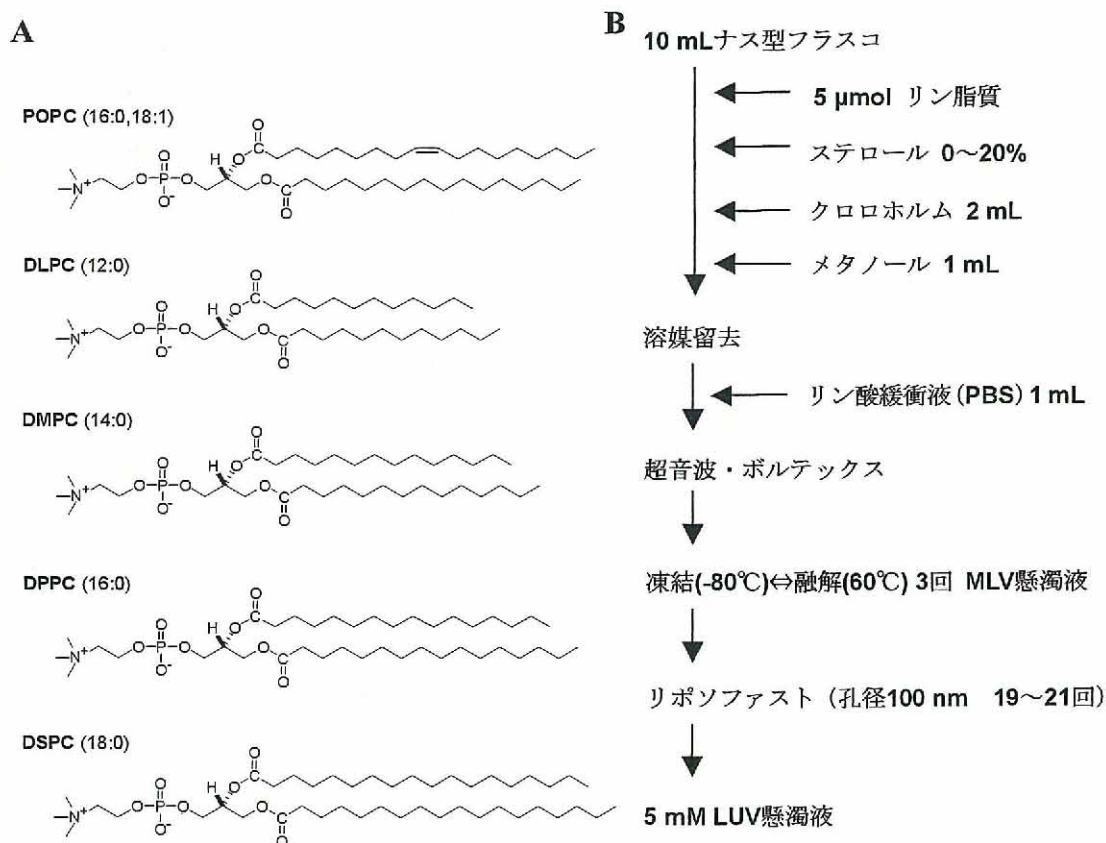


図 6-1 試験に用いたアシル鎖の異なる様々なリン脂質 (A) とリポソーム調製 (B)

表 6-2 5 mM リポソーム懸濁液^{*1} 調製時の各種リン脂質の採取量

脂質	採取量
POPC	3.81 mg
DLPC	3.11 mg
DMPC	3.39 mg
DPPC	3.67 mg
DSPC	3.95 mg

*1 最終的に 1 mL の PBS に溶解

表 6-3 ステロール含有 5 mM リポソーム懸濁液^{*2} 調製時のステロール添加量

脂質	コレステロール	エルゴステロール
10%ステロール含有 POPC	0.19 mg	0.20 mg
20%ステロール含有 POPC	0.39 mg	0.40 mg
20%ステロール含有 DMPC	0.39 mg	0.40 mg

*2 POPC または DMPC は、それぞれ 3.81 mg または 3.39 mg 採取

最終的に 1 mL の PBS に懸濁

6-2-c センサーチップの作製

センサーチップの作製は、特に記載のない限り、フローセル 2 に対して行い、5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で行った。センサーチップ CM5 をビアコア X に設置した後、ランニングバッファーを流し、ベースラインが安定化後、アミノカップリング法により実施した。使用したランニングバッファーは、ドデシルアミン固定化の際は 10% DMSO-PBS 溶液を、その他の固定化は 1% DMSO-HBSEP 溶液を用いた。

6-2-c1 ドデシルアミン固定化センサーチップ（センサーチップ C12）の作製

アミノカップリング試薬（50 mM NHS + 200 mM EDC 混合液）35 μL （7 分間）で活性化した後、5 mM ドデシルアミン溶液を 35 μL （7 分間）加え、ドデシルアミンをセンサーチップ上に固定した。さらに 1 M エタノールアミンを 35 μL （7 分間）加え、残余活性カルボキシ基をブロッキング後、0.5% SDS 溶液で物理的にチップ上に吸着しているドデシルアミンを洗い流し、ドデシルアミン固定化センサーチップ（図 6-2, センサーチップ C12, ドデシルアミン固定化量 1,720 RU）を作製した。

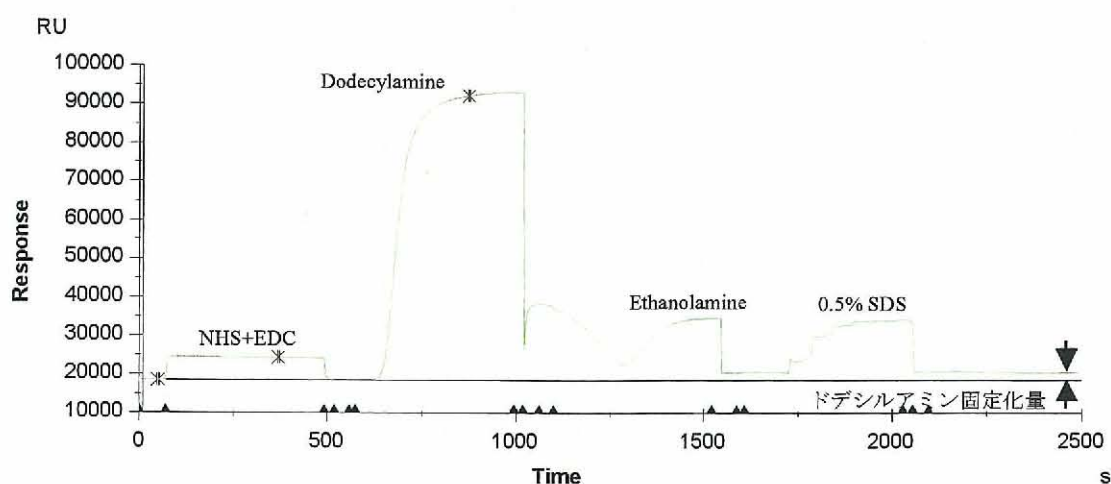


図 6-2 ドデシルアミン固定化センサーグラム

6-2-c2 APH1B 固定化センサーチップの作製

アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS 混合液) 35 μ L (7 分間) で活性化した後, 10 μ g/mL APH1B 固定化溶液を 35 μ L (7 分間) 添加し, APH1B をチップ上に固定化した。1M エタノールアミンを 35 μ L (7 分間) 加え, 残余活性カルボキシ基をブロック後, さらに 0.5% SDS で洗浄し, APH1B 固定化センサーチップを作製した (図 6-3, APH1B 固定化量 11,640 RU)。

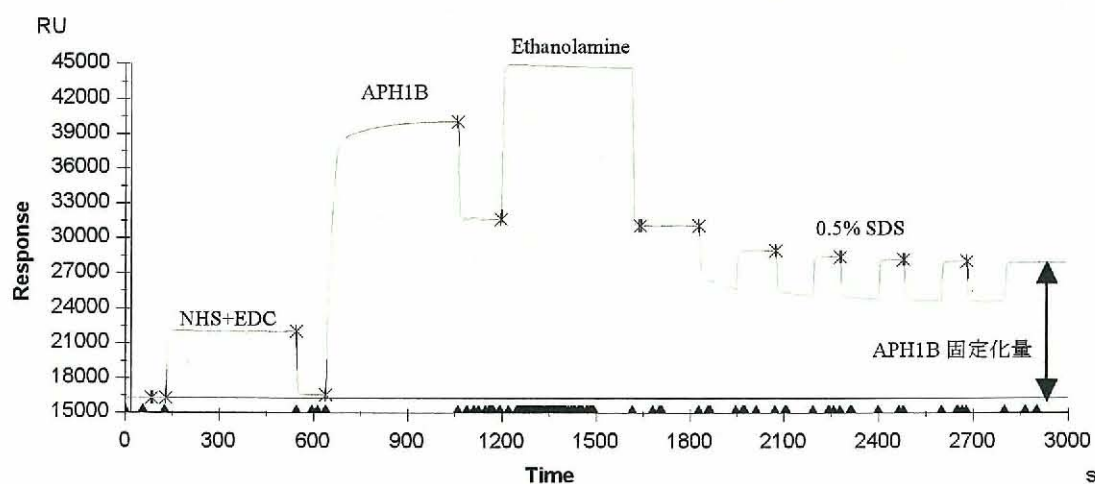


図 6-3 APH1B 固定化センサーグラム

6-2-c3 BCL2 固定化センサーチップの作製

アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS 混合液) 35 μ L (7 分間) で活性化した後, 10 μ g/mL BCL2 固定化溶液を 35 μ L (7 分間) 添加し, BCL2 をチップ上に固定化した。

1M エタノールアミンを 35 μ L (7 分間) 加え、残余活性カルボキシ基をブロッキング後、さらに 0.5% SDS 溶液で洗浄し BCL2 固定化センサーチップを作製した (図 6-4, BCL2 固定化量 6,220 RU)。

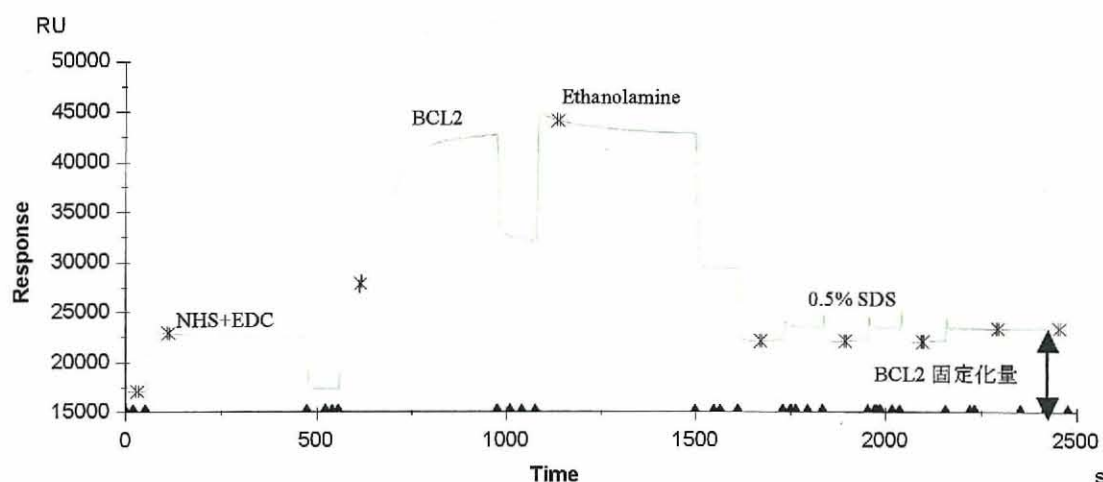


図 6-4 BCL2 固定化センサーグラム

6-2-c4 NIP3 BH3 Domain peptide (BH3) 固定化センサーチップの作製

アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS 混合液) 70 μ L (14 分間) で活性化した後、50 μ g/mL BH3 固定化溶液を 50 μ L (10 分間) 添加し、BH3 をチップ上に固定化した。1M エタノールアミンを 70 μ L (14 分間) を 2 回加え、残余活性カルボキシ基をブロッキング後、さらに 0.5% SDS 溶液で洗浄し、BH3 固定化センサーチップを作製した (図 6-5, BH3 固定化量 8,350 RU)。

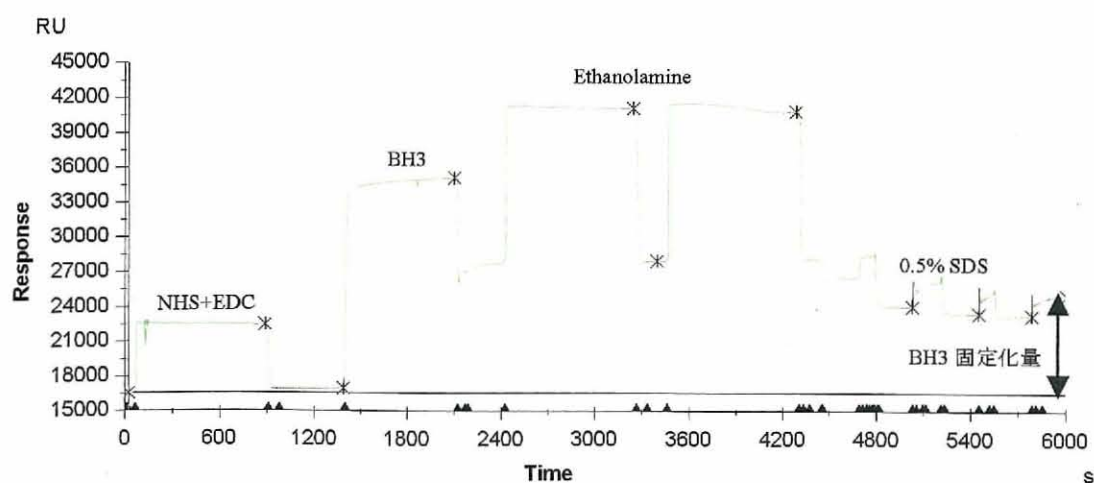


図 6-5 BH3 固定化センサーグラム

6-2-c5 ストレプトアビジン固定化センサーチップの作製

アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS 混合溶液) を 35 μ L (7 分間) で活性化した後, 400 μ g/mL ストレプトアビジン固定化溶液を 35 μ L (7 分間) 添加し, ストレプトアビジンをチップ上に固定化した。次に, 2 M 塩化ナトリウム溶液を 10 μ L (2 分間) を 2 回加え, 非特異的に結合したストレプトアビジンを除去し, 1 M エタノールアミンを 35 μ L (7 分間) 加え, 残余活性カルボキシ基をブロックした後, さらに 0.5% SDS で洗浄しストレプトアビジン固定化センサーチップを作製した (図 6-6, ストレプトアビジン固定化量 9,990 RU)。

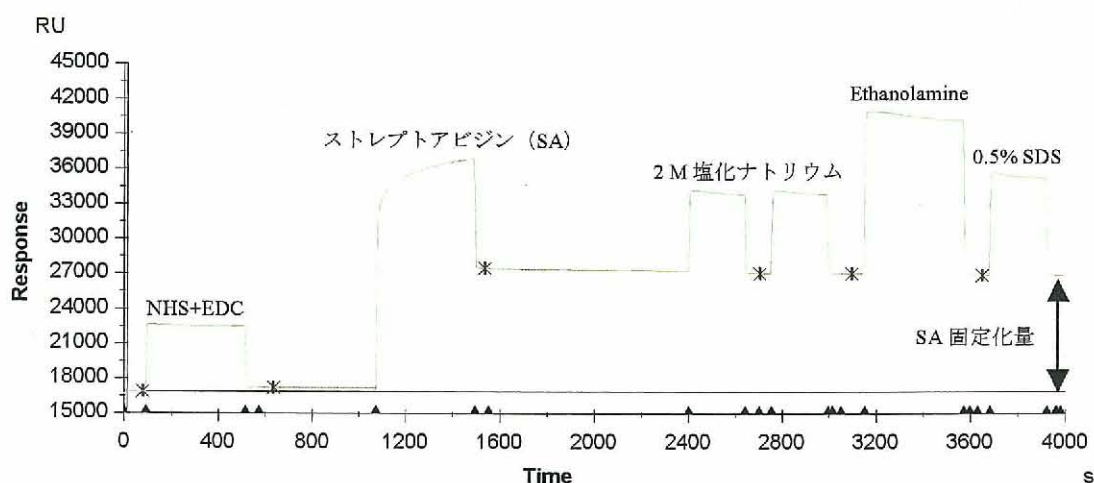


図 6-6 ストレプトアビジン (SA) 固定化センサーグラム

6-2-c6 PDE4D 固定化センサーチップの作製

アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS 混合液) 35 μ L (7 分間) で活性化した後, 次いで 20 μ g/mL PDE4D 固定化溶液を 35 μ L (7 分間) 添加し, PDE4D をチップ上に固定化した。1 M エタノールアミンを 35 μ L (7 分間) 加え, 残余活性カルボキシ基をブロックした後, さらに 50 mM NaOH で洗浄し, PDE4D 固定化センサーチップを作製した (図 6-7, PDE4D 固定化量 9,800 RU)。

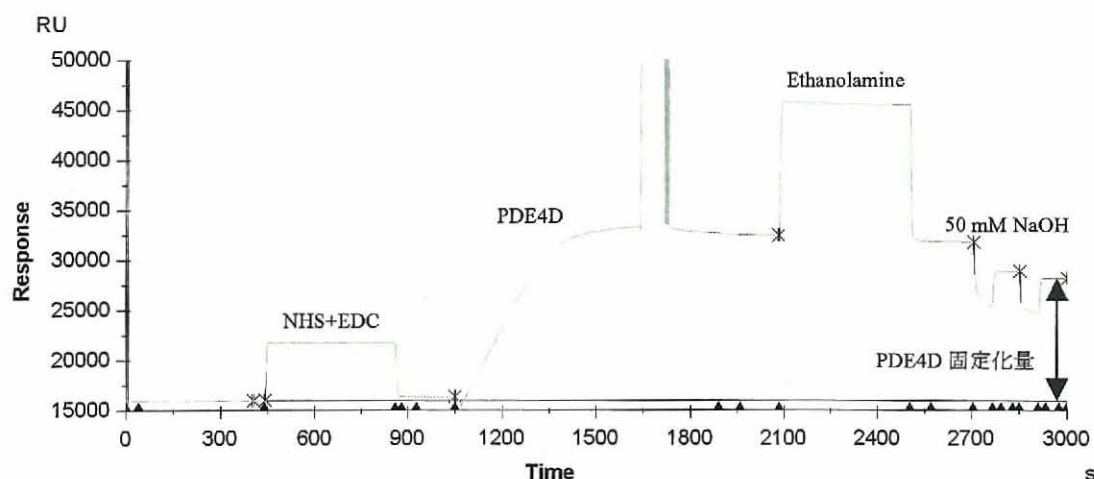


図 6-7 PDE4D の固定化

6-2-c7 PDEII の固定化

アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS 混合液) 35 μ L (7 分間) で活性化した後、次いで 100 μ g/mL PDEII 固定化溶液を 35 μ L (7 分間) 添加したところ、PDE4D と比べて固定化量が少なかったのをさらに 100 μ g/mL PDEII 固定化溶液を 35 μ L (7 分間) 添加し、PDEII をチップ上に固定化した。1 M エタノールアミンを 35 μ L (7 分間) 加え、残余活性カルボキシ基をブロッキング後、さらに 0.5% SDS で洗浄し、PDEII 固定化センサーチップを作製した (図 6-8, PDEII 固定化量 4,600 RU)。

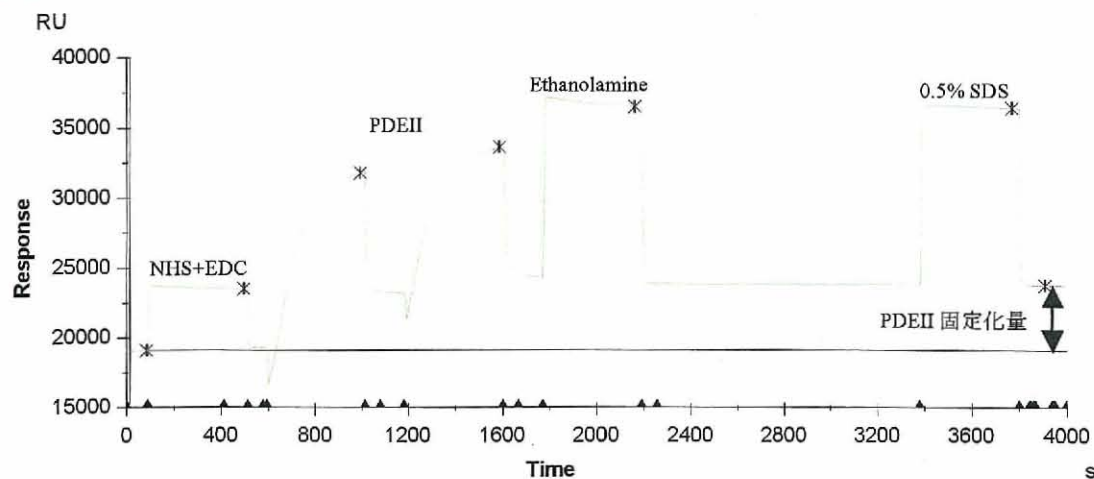


図 6-8 PDEII の固定化

6-2-c8 ビオチン化脱硫酸 YTX の固定化

固定化にはストレプトアビジンおよび調製したビオチン化脱硫酸 YTX を使用した。フローセル 2 (Fc2) に対して、ストレプトアビジンを固定化した後、ビオチン化脱硫酸 YTX を加え、ビオチン-アビジンアフィニティ結合により、ビオチン化脱硫酸 YTX の固定化を行った。また、アナライトのストレプトアビジンへの非特異的結合の影響を除去するため、フローセル 1 (Fc1) に対してストレプトアビジンのみを固定化し、レファレンスセルとした。

両フローセルに対して、アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS) 40 μ L (8 分間) で活性化した後、次いで 100 μ g/mL ストレプトアビジン固定化溶液を 40 μ L (8 分間) 添加し、ストレプトアビジンをチップ上に固定化した。次に、1 M エタノールアミンを 40 μ L (8 分間) 加え、残余活性カルボキシ基をブロッキングした。フローセル 2 についてはさらに、20 μ g/mL ビオチン化脱硫酸 YTX 溶液を 70 μ L 加え、ビオチン化脱硫酸 YTX を固定化した。両フローセルに 0.5% SDS を加え、物理的に結合したストレプトアビジンおよびビオチン化脱硫酸 YTX を除去し、ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化センサーチップを作製した。Fc1 (図 6-9 上; ストレプトアビジン固定化量 4,550 RU) および Fc2 (図 6-9 下; ストレプトアビジン固定化量 3,840 RU, ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化量 220 RU)。

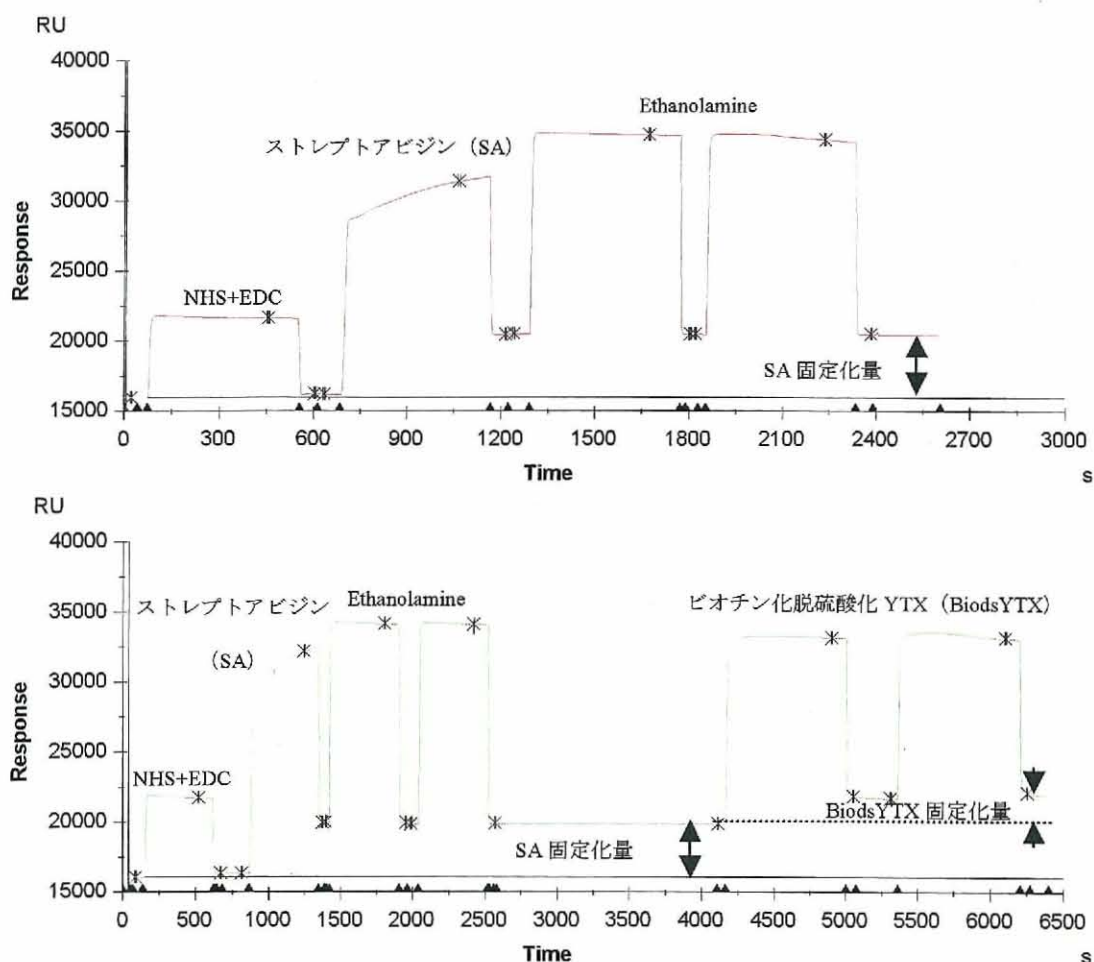


図 6-9 ストレプトアビジン (SA) 固定化センサーグラム (上, Fc1, レファレンスセル) と ストレプトアビジン+ビオチン化脱硫酸 YTX (BiodsYTX) 固定化センサーグラム (下, Fc2, サンプルセル)

6-2-c9 ビオチン化 ALP1B の固定化

固定化にはストレプトアビジンおよび調製したビオチン化 ALP1B を使用し、ビオチン化脱硫酸 YTX と同様に行った。

すなわち、両フローセルに対して、アミノカップリング試薬 (50 μ M EDC+200 μ M NHS) 70 μ L (14 分間) で活性化した後、次いで 100 μ g/mL ストレプトアビジン固定化溶液を 70 μ L (14 分間) を 2 回添加し、ストレプトアビジンをチップ上に固定化した。次に、1 M エタノールアミンを 70 μ L (14 分間) を 2 回加え、残余活性カルボキシ基をブロッキングした (図 6-10 上)。フローセル 2 についてはさらに、100 μ M ビオチン化 ALP1B 溶液を 60 μ L を 2 回加え、ビオチン化 ALP1B を固定化した。両フローセルに 0.5% SDS を加え、物理的に結合したストレプトアビジンおよびビオチン化 ALP1B を除去し、ビオチン化 ALP1B 固定化センサー。

チップを作製した。Fc1 (図 6-10 上 ; ストレプトアビジン固定化量 3,650 RU) および Fc2 (図 6-10 ; ストレプトアビジン固定化量 3,310 RU, ビオチン化脱硫酸 YTX 固定化量 140 RU)。

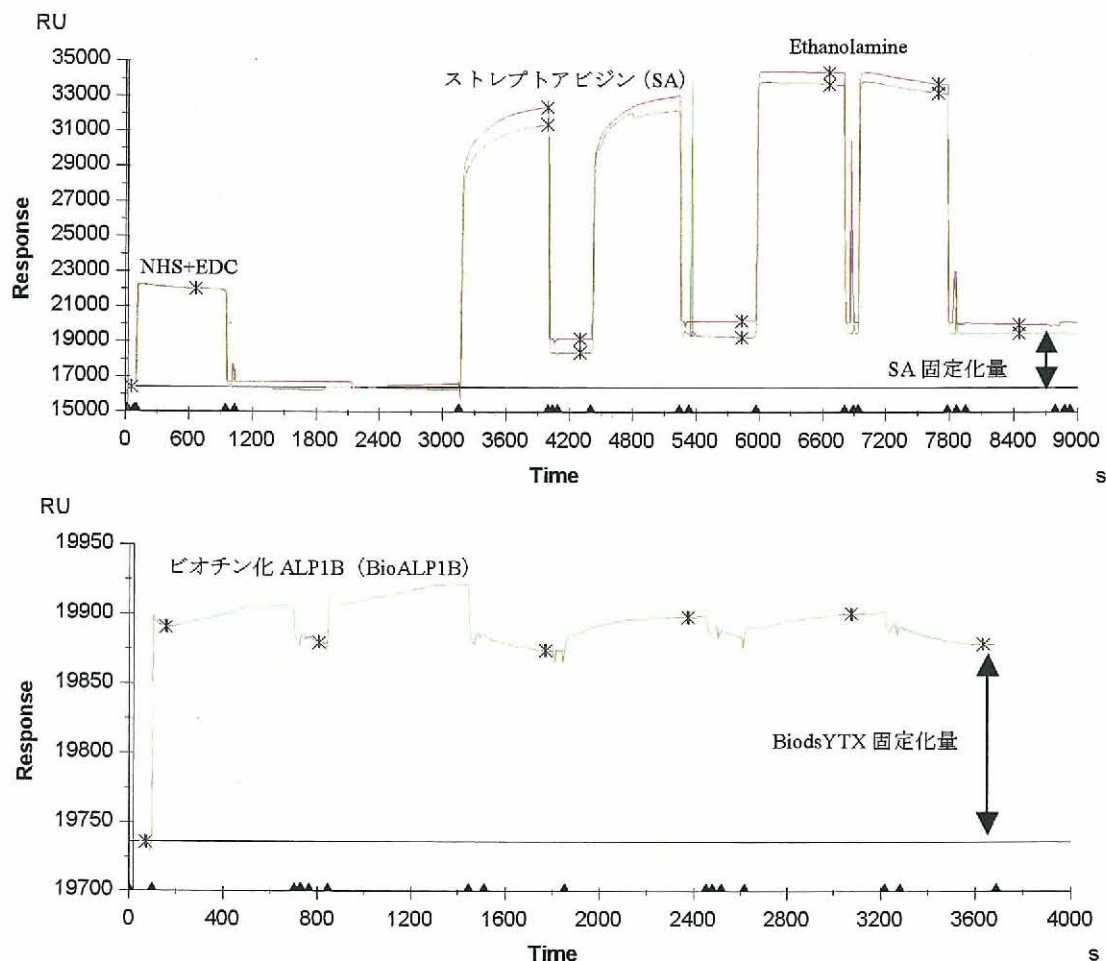


図 6-10 ストレプトアビジン (SA) 固定化センサーグラム (上, レファレンスセル Fc1 ; 赤, サンプルセル Fc2 ; 緑) とビオチン化 ALP1B (BioALP1B) 固定化センサーグラム (下, Fc2, サンプルセル)

6-2-d センサーチップ表面へのリポソームの固定化

センサーチップ L1 またはセンサーチップ C12 をピアコア X に設置した後, 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で 40 mM シスタミン溶液および 20 mM CHAPS 溶液をそれぞれ 40 μL (4 分間) 加え, センサーチップを洗浄した。さらに一晩超純水を流し, センサーチップ表面のデタージェントを除去した。次に, フローセル 2 のみに対して, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速でランニングバッファー (5% DMSO-PBS 溶液) を流し, ベースラインを安定化させた。続けて, 6-2-b で調製した種々 0.5 mM リポソームを 60 μL (30 分間) 加えた。添加終了後, 流速を 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ に変更し, 50 mM NaOH

40 μ L (2 分間) 加え、非特異的に結合したリポソームを除去し、表面を均一にした。この除去操作を 3 回繰り返し、リポソームを捕捉した安定なセンサーチップを得た ($\sim 16,000$ RU, 得られるレスポンスは加えるリポソームの種類, 添加量およびセンサーチップの状態により大きく異なる)。

またセンサーチップ C12 に対して、0.5 mM POPC リポソームを 5 回添加したところ、リポソームの結合量は $15,800 \pm 100$ RU にまで達し、良好な繰り返し再現性が確認された。

6-3 渦鞭毛藻の培養および YTX の精製, 誘導化^{2,3)}

6-3-a 培地の調製・植え継ぎ

ニュージーランド沖の海水より単離した渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum*⁴⁾ の培養液には、人口海水を用いた。蒸留水に MARINE ART HI を 30 g/L の濃度で添加し、塩酸により pH 7.9 に調整した。その後、微量の不溶化物は自然濾過により取り除いた。濾液を 2 L または 3 L カブ型フラスコに入れ、120°C, 20 分間のオートクレイブにより滅菌した。

室温に戻した後、24 時間以内にクリーンベンチ (予め、紫外線を 2 時間以上照射し滅菌した) 内で GSe ストック溶液 (10 mL/L) を添加し、培養 2~3 週間目の渦鞭毛藻 (50 mL/L) を植え継いだ。また、栄養塩の添加、植え継ぎの操作は、乾熱滅菌 (150°C, 2 時間以上) した器具を使い、クリーンベンチ内で行った。

6-3-b 培養条件および収穫

渦鞭毛藻の培養は、20°C のインキュベーター内で、光照射は 16 時間—明, 8 時間—暗で行った。フラスコのふたには、通気性があるが滅菌状態を保てるシリコ栓を用いた。藻体は植え継ぎ後、7~10 週間目に吸引ろ過により収穫した。藻体を除いた培地は、藻体の収穫直後にポリスチレン樹脂である HP20 に流速 1 L/h で通した。

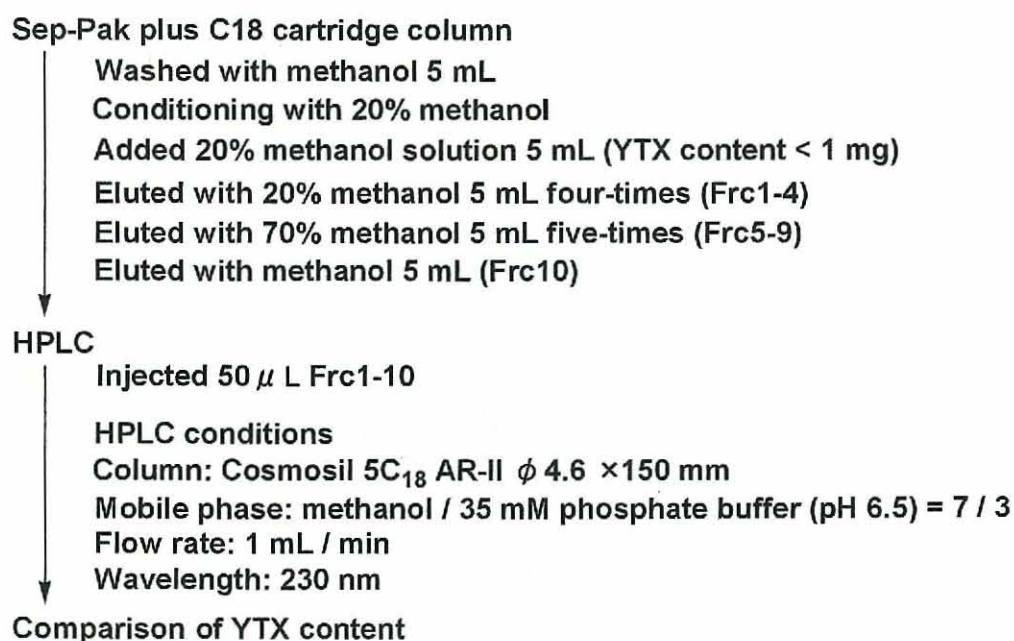
6-3-c YTX の抽出および精製

6-3-c1 培地からの抽出^{2,3)}

YTX を吸着させた HP20 をガラスフィルター上に吸引濾過して集め、水 500 mL を流して脱塩後、YTX をメタノール 100 mL で 5 回抽出した。溶媒を減圧留去後、残渣を水 2 mL に溶かし、ODS カラムに吸着させた。これに水 10 mL を流した後、メタノールで抽出し、粗精製を行った。6-3-c2 に示す YTX 固相精製条件検討の結果から、メタノール抽出液に含まれる塩は、従来法に加え、Sep-pak plus C18 カートリッジカラムを用いたプレ精製を加えたスキーム 6-2 の手順で除去し、YTX を精製することにした。

6-3-c2 YTX 精製条件の検討

従来の HP20 を用いた脱塩および精製操作³⁾では、十分な脱塩および精製が行えず、測定時の HPLC カラム圧の上昇および HPLC カラムの劣化が起こっていた。そこで、HPLC 精製前の YTX 固相精製条件検討（脱塩および精製）を行った。使用したカートリッジカラムは、Waters Sep-Pak plus C18（充填剤量 130 mg）で、スキーム 6-1 に示す方法で、フラクションを分画し、HPLC でそのピーク面積値を求めた（表 6-4）。すなわち、Sep-Pak plus C18 カートリッジをメタノール 5 mL で洗浄後、20%メタノール溶液を加えコンディショニングを行った。このカラムに YTX 含量が 1 mg 未満になるように、未精製 YTX-20%メタノール溶液を加え吸着させた。このカラムに 5 mL の 20%メタノール溶液を 4 回加え、溶出させた（フラクション 1~4）。さらに、5 mL の 70%メタノール溶液を 5 回加え、溶出させた（フラクション 5~9）。最後に、メタノール 5 mL で溶出した（フラクション 10）得られたフラクションのうち、それぞれ 50 μ L について HPLC 測定（HPLC 条件 1, 6-3-e2）を行った。



スキーム 6-1 Sep-pak plus C18 カートリッジカラムを用いたプレ精製操作

以上の結果、スキーム 6-1 の条件で、フラクション 5 と 6 を回収することにより、95%程度の割合で YTX が得られることが確認された。ただし、フラクション 4 と 7 にも 1~2%程度の YTX が含まれている（フラクション 5 と 6 と比べて、夾雑ピークも見られる）ことから、これらのフラクションは別に集めておき、後からまとめて再精製することにした。

表 6-4 各分画における YTX の HPLC ピーク面積

分画	1 回目		2 回目	
	ピーク面積値	割合 (%)	ピーク面積値	割合 (%)
1	107929	0.7	5774	<0.1
2	53172	0.3	12283	<0.1
3	92450	0.6	29711	0.1
4	317348	2.0	220258	1.0
5	13660193	85.6	18173027	83.9
6	1345638	8.4	2845428	13.1
7	264361	1.7	258907	1.2
8	72813	0.4	75713	0.3
9	52503	0.3	64550	0.3
10	10832	<0.1	25507	0.1

Extracts of HP20 (culture media)

↓
Evaporated by Ar flow

Added 20% methanol solution, containing 0.1 mg/mL YTX

Sep-Pak plus C18 cartridge column (pre-purification and desalting)

↓
Washed with methanol 5 mL

Conditioning with 20% methanol

Added 20% methanol solution 5 mL

Washed with 20% methanol 5 mL four-times

Eluted with 70% methanol 5 mL twice

Evaporated

↓
Dissolved in methanol 0.5 mL

HPLC

↓
HPLC conditions

Column: Cosmosil 5C₁₈ AR-II φ 4.6 ×150 mm

Mobile phase: methanol / 35 mM phosphate buffer (pH 6.5) = 7 / 3

Flow rate: 1 mL / min

↓
Wavelength: 230 nm

Sep-Pak plus C18 cartridge column (desalting)

↓
Conditioning with 20% methanol

Added 20% methanol solution 5 mL

Washed with 20% methanol 5 mL four-times

Eluted in 70% methanol 5 mL twice

Evaporated

↓
Dissolved in methanol 0.5 mL

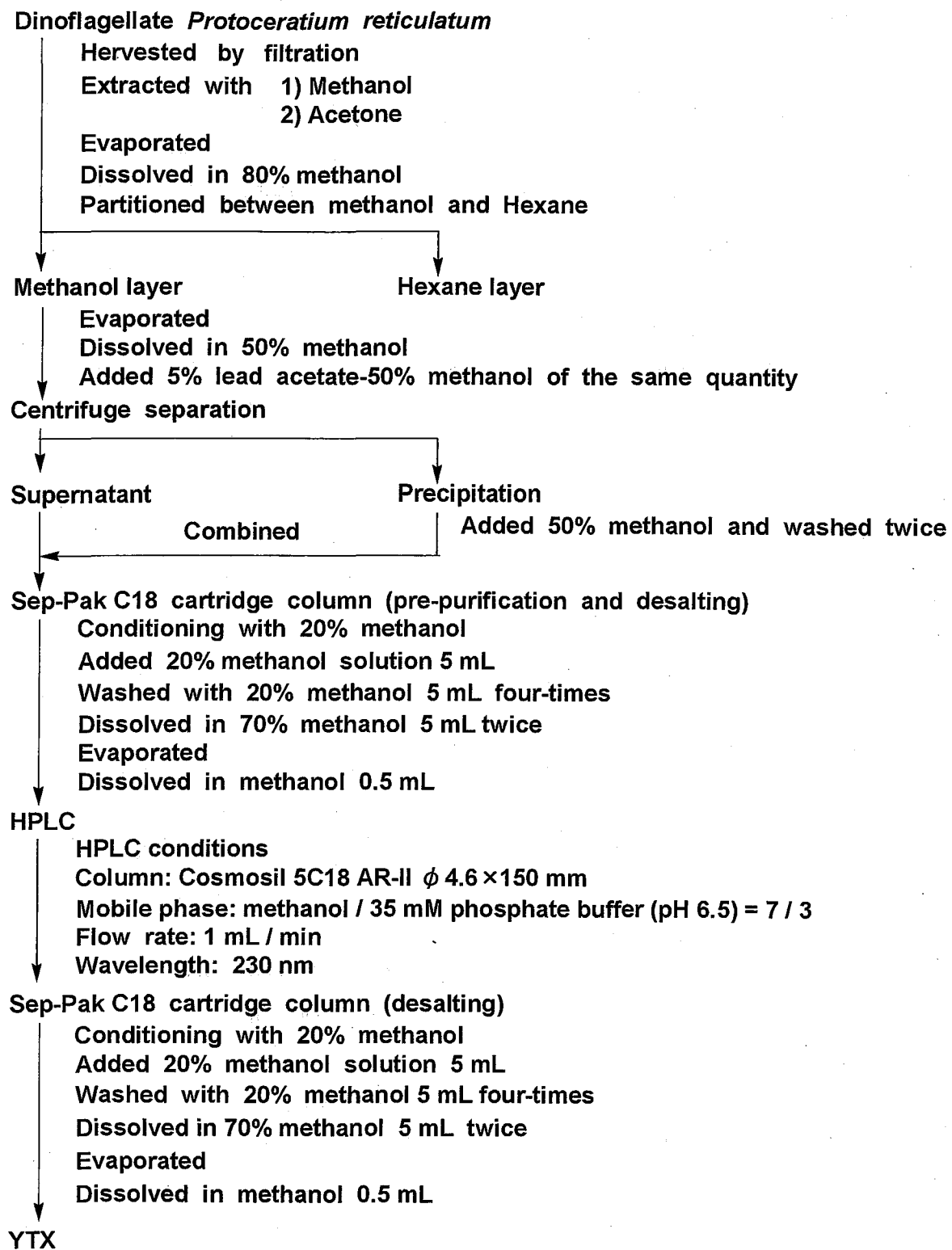
YTX

スキーム 6-2 培地抽出物からの YTX 抽出

6-3-c3 藻体からの抽出

藻体を収穫した濾紙を細かく切り、ビーカーに入れ、これにアセトン、メタノールを加え YTX を抽出した。溶媒を減圧留去後、残渣を 80%メタノール溶液に溶かし、ヘキサンを加えて、分液操作を行った。メタノール層の溶媒を減圧留去し、50%メタノール溶液に溶解した。同量の 5%酢酸鉛含有 50%メタノール溶液を加え、かくはん・遠心分離後、上清をデカンテーションした。この操作をさらに 2 回繰り返し、上清を合わせ、溶媒留去後、残渣を 20%メタノール溶液に溶解した。これを 6-2-c1 と同様にカートリッジカラム Sep-pak plus C18 を用いて、脱塩およびプレ精製処理を行った（カラム条件：Sep-pak, 6-2-e1）後、再度 HPLC で精製を行い（カラム条件：HPLC 条件 1, 6-2-e2）、再度 Sep-pak plus C18 を用いて、脱塩処理を行った。

（スキーム 6-3）

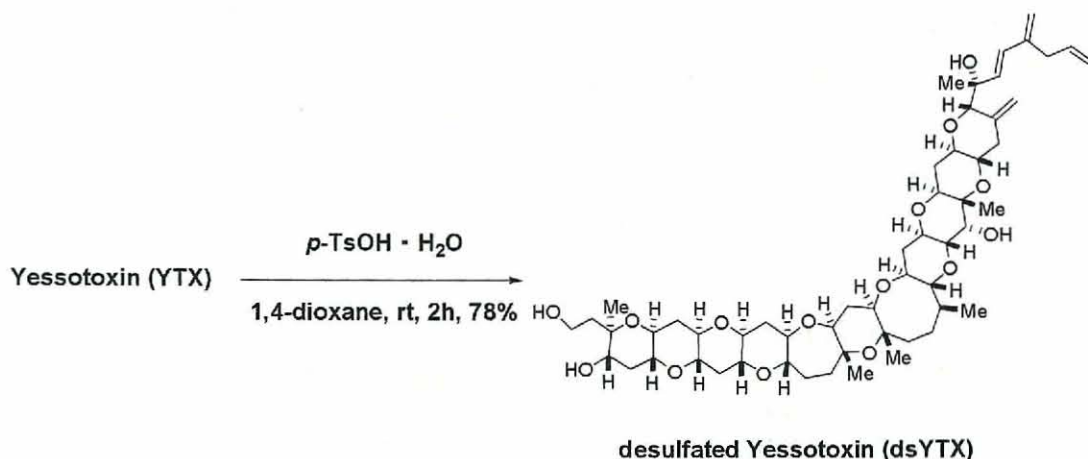


スキーム 6-3 藻体からの YTX 抽出

6-3-d ポリエーテル化合物の誘導化

6-3-d1 dsYTX の調製^{3,5)}

YTX はその側鎖に 2 つの硫酸基を持ち、第 3 章で示した数多くの梯子状ポリエーテルの中でも特徴的である。したがって、梯子状ポリエーテル化合物としての一般性を高めるために、他の梯子状ポリエーテル化合物と極性を揃え、すなわち YTX の側鎖に存在する 2 つの硫酸基を除去した。すなわち、YTX (1,382 mg, 1.164 μmol)、パラトルエンスルホン酸 1 水和物 (1,382 μg , 7.274 μmol) を 1,4-ジオキサン 300 μL に溶解し、室温で 2 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム溶液を 500 μL 加えることで反応をクエンチし、生成物は酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水 2 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られた酢酸エチル層を減圧留去させ、残渣をメタノールに溶解し、HPLC で精製し(HPLC 条件 2, 6-3-e3)、目的物である dsYTX を得た(スキーム 6-4 および表 6-5, 925 μg , 0.941 μmol , 78.1%)。このようにして調製した dsYTX 2 は、以後梯子状ポリエーテル化合物のモデル分子として使用した。Colorless; R_f 0.28 (クロロホルム : メタノール = 2 : 1); UV λ_{max} 230 nm (ϵ_{max} 10600); MS (ESI) m/z 1006.3 (M+Na)⁺



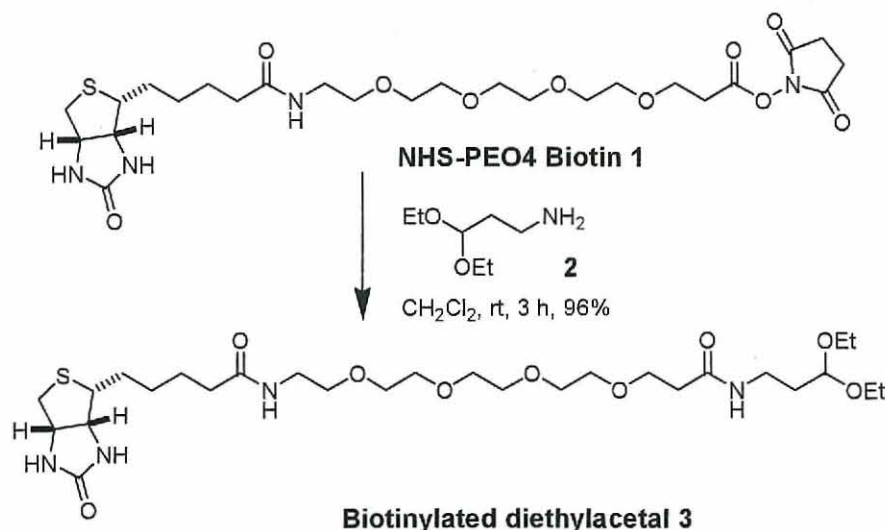
スキーム 6-4 dsYTX の調製 (YTX の脱硫酸化)

表 6-5 dsYTX の調製 (YTX の脱硫酸化)

Entry	YTX (μg)	YTX (μmol)	<i>p</i> -TsOH (μg)	<i>p</i> -TsOH (μmol)	Reaction time (h)	dsYTX (μg)	Yield (%)
1	1,000	0.842	1,000	5.26	2	559	67.5
2	640	0.539	640	3.36	1	329	62.0
3	1,382	1.164	1,382	7.27	2	925	78.1
4	2,315	1.952	2,315	9.91	2	1,362	71.0

6-3-d2 ビオチン化ジエチルアセタール (Biotinylated diethylacetal) の調製

NHS-PEO4-Biotin **1** (20 mg, 34.0 μmol) および 3-アミノプロピオンアルデヒドジエチルアセタール **2** (100 mg, 679 μmol) をジクロロメタン 500 μL に溶解し、室温で3時間攪拌した。酢酸緩衝液を4 mL 加えることで反応をクエンチし、過剰な3-アミノプロピオンアルデヒドジエチルアセタール **2** を水層に転溶し、生成物はジクロロメタンで抽出した。ジクロロメタン層を飽和食塩水 2 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られたジクロロメタン層を減圧留去させ、残渣をクロロホルム：メタノール=8：1 に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル 1 g を充填、溶離液はクロロホルム：メタノール=8：1）で精製し、目的物であるビオチン化ジエチルアセタール **3** を得た（スキーム 6-5 および表 6-6, 20.3 mg, 32.7 μmol , 96.2%）。Colorless; R_f 0.38（クロロホルム：メタノール=8：1）; MS (ESI) m/z 643.3 (M+Na)⁺



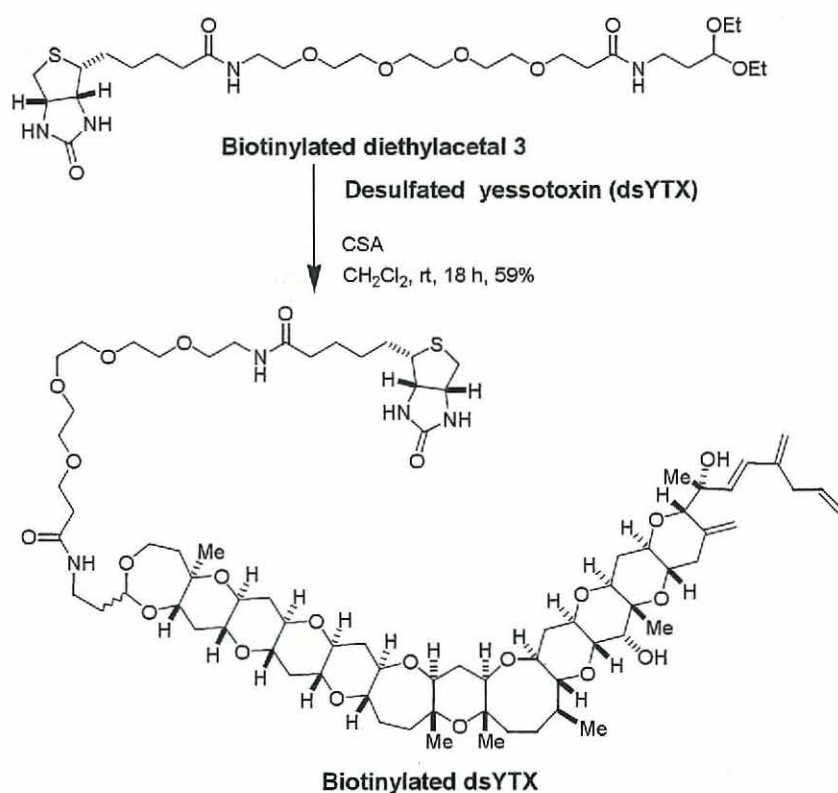
スキーム 6-5 ビオチン化ジエチルアセタールの調製

表 6-6 ビオチン化ジエチルアセタールの調製

Entry	1 (mg)	1 (μmol)	2 (μg)	2 (μmol)	Reaction time (h)	3 (mg)	yield (%)
1	6.6	11.2	3.0	20.4	3	5.5	79.0
2	8.3	14.1	4.1	27.8	7	5.2	59.1
3	8.0	13.6	5.0	34.0	3	8.8	104.7
4	13.1	22.3	11.3	76.8	3	10.1	73.2
5	20.0	34.0	100	679	3	20.3	96.2
6	13.4	22.8	11.5	78.1	3	10.2	63.0

6-3-d3 ビオチン化 dsYTX の調製

dsYTX (626 μg , 0.637 μmol), ビオチン化ジエチルアセタール **3** (BioPEG, 3,954 μg , 6.37 μmol) をジクロロメタン 1 mL に溶解し, さらに CSA (444 μg , 1.91 μmol) を加え, 18 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム溶液を 500 μL を加えることで反応をクエンチし, 生成物はジクロロメタンで抽出した。ジクロロメタン層を飽和食塩水 2 mL で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られたジクロロメタン層を減圧留去させ, 残渣をメタノールに溶解し, HPLC で精製し (HPLC 条件 2, **6-3-c3**), 目的物であるビオチン化 dsYTX (BiodsYTX) を得た (**スキーム 6-6** および **表 6-7**, 572 μg , 0.378 μmol , 59.4%)。Colorless; UV λ_{max} 230 nm (ϵ_{max} 10600); MS (ESI) m/z 1533.5 ($M+\text{Na}^+$)



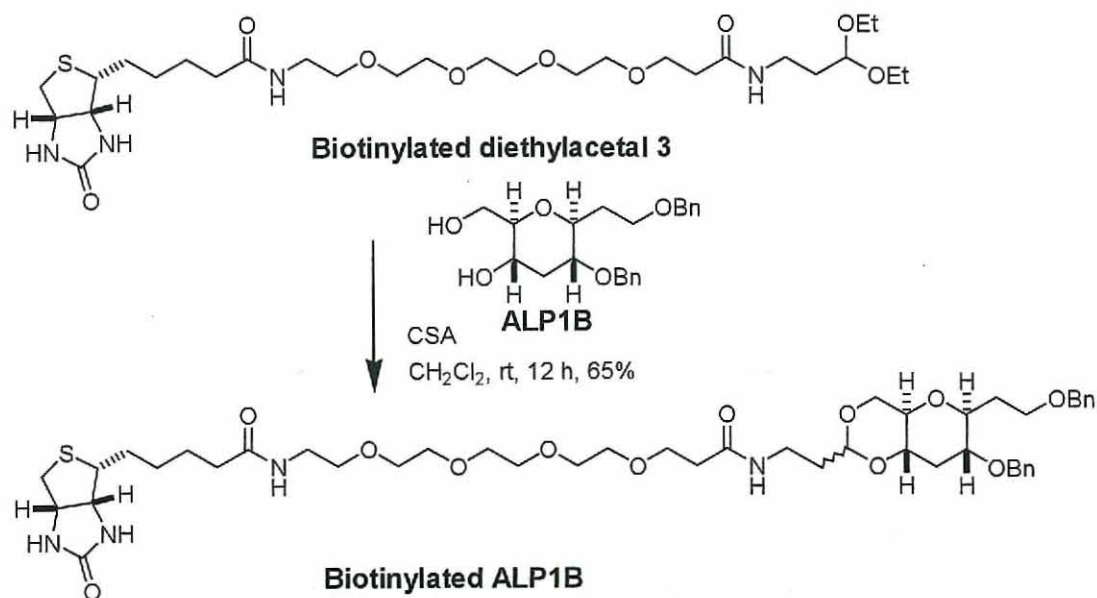
スキーム 6-6 ビオチン化 dsYTX の調製

表 6-7 ビオチン化 dsYTX の調製

Entry	dsYTX (μg)	dsYTX (μmol)	3 (μg)	3 (μmol)	Reaction time (h)	BiodsYTX (μg)	yield (%)
1	90	0.092	1,115	1.80	36	70.8	51.3
2	126	0.128	1,560	2.51	18	110	56.9
3	626	0.637	3,954	6.37	18	572	59.4

6-3-d4 ビオチン化 ALP1B の調製

ALP1B (1.9 mg, 5.10 μmol), ビオチン化ジエチルアセタール **3** (BioPEG, 3.2 mg, 5.15 μmol) をジクロロメタン 320 μL に溶解し, さらに CSA (2.3 mg, 9.90 μmol) を加え, 12 時間攪拌した。トリエチルアミンを 2 滴および飽和食塩水 5 mL を加えることで反応をクエンチし, 生成物は 5 mL ジクロロメタン 3 回で抽出した。ジクロロメタン層を飽和食塩水 5 mL で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られたジクロロメタン層を減圧留去させ, 残渣をクロロホルム : メタノール = 8 : 1 溶液に溶解し, シリカゲルを 0.5 g 充填したカラムに負荷した。クロロホルム : メタノール = 8 : 1 溶液 5 mL ずつ溶出, 分画し, 分画 4~6 を集めることにより目的物であるビオチン化 ALP1B (BioALP1B) を得た (スキーム 6-7, 3.0 mg, 3.33 μmol , 65.2%)。Colorless; MS (ESI) m/z 923.8 ($M+\text{Na}$)⁺

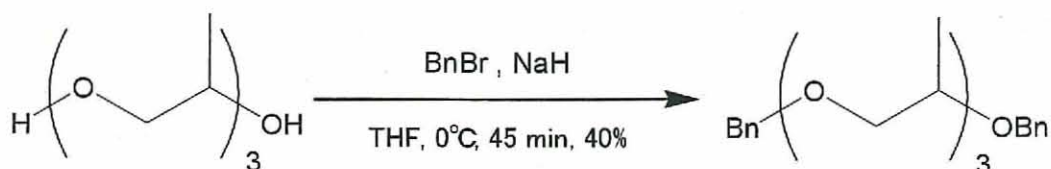


スキーム 6-7 ビオチン化 ALP1B の調製

6-3-d5 トリプロピレングリコールジベンジルエーテル (TPG2Bn) の調製

臭化ベンジル (747.8 mg, 4.37 mmol) をとり, THF 2 mL を加え, さらにトリプロピレングリコール (TPG) 280.2 mg (1.46 mmol) を加え, 0°C でかくはんした。水素化ナトリウム 233.2 mg (5.84 mmol) を THF 2 mL で洗い込んだ後, 45 分間かくはんした。水を 10 mL 加えることで反応をクエンチし, 生成物はジクロロメタン 5 mL \times 4 回で抽出した。ジクロロメタン層を飽和食塩水 5 mL で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られたジクロロメタン層を減圧留去させ, 残渣をヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1 に溶解し, シリカゲルカラムクロマト

グラフィー（シリカゲル 7 g を充填，溶離液はヘキサン：酢酸エチル＝4：1）で精製し，目的物であるトリプロピレングリコールジベンジルエーテル（TPG2Bn，5 mL ずつ溶出し，分画 5～10）と副生成物としてトリプロピレングリコールモノベンジルエーテル（TPG1Bn）を得た（スキーム 6-8，137 mg，438 μmol ，25.2%）。Colorless oil; Rf 0.77（ヘキサン：酢酸エチル＝2：1）；MS (ESI) m/z 390.1 ($M+H_3O$)⁺



スキーム 6-8 ポリエチレングリコールジベンジルエーテルの調製

6-3-e カラム条件

6-3-e1 Sep-pak plus C18

カラム：Waters Sep-pakC18

コンディショニング：メタノール 5 mL→超純水 5 mL→20%メタノール 5 mL

吸着：YTX 粗精製溶液（YTX 0.2mg/mL 以下，メタノール含量 20%未満水溶液）5 mL

洗浄：20%メタノール 5 mL×5 回

溶出：70%メタノール 5 mL×2 回

カラム洗浄：メタノール 5 mL

6-3-e 2 HPLC 条件 1³⁾

カラム：Cosmosil 5C₁₈-AR-II ϕ 4.6×150 mm

溶出液：メタノール：35 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH6.5) = 70：30

流速：0.5 mL/min

検出：UV 230 nm

6-3-e 3 HPLC 条件 2³⁾

カラム：Cosmosil 5C₁₈-AR-II ϕ 4.6×150 mm

溶出液：85%メタノール溶液

流速：1 mL/min

検出：UV 230 nm

6-4 梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ活性化試験

第4章で実施した Transcreener™ PDE Assay Kit を用いた梯子状ポリエーテル化合物によるホスホジエステラーゼ (PDE4D) 活性化試験は、キット付属の取扱説明書に準じて以下のフローに従って試験した。

マイクロプレート (96 ウェル, 容積 200 μ L, ブラック/クリアボトム)

①ブランク用 HEPES 緩衝液 30 μ L,

②検量線作成用 0, 0.4, 1, 4, および 40 μ M AMP-HEPES 緩衝液 15 μ L + HEPES 緩衝液 15 μ L,

③**PDE4D 活性試験ブランク用** HEPES 緩衝液 15 μ L + 40 μ M cAMP-HEPES 緩衝液 15 μ L,

④**PDE4D 活性試験用** HEPES 緩衝液 10 μ L + 40 μ M cAMP-HEPES 緩衝液 15 μ L + 1 nM PDE4D-HEPES 緩衝液 5 μ L,

⑤**PDE4D-Polyether 活性試験用** 40 μ M cAMP-HEPES 緩衝液 15 μ L + 1 nM PDE4D-HEPES 緩衝液 5 μ L + 100 μ M LSP 10 μ L (YTX, dsYTX, BTX-B, ALP1B, ALP4B, ALP7B, ALP4A, ALP7A, ALP10A, Salinomycin)

↓

インキュベート (25°C, 30 分)

↓

遠心分離, 振とう

↓

酵素反応 (25°C, 60 分)

↓

1×AMP/GMP Stop & Detect 溶液 30 μ L

酵素反応停止・AMP/GMP 検出反応 (37°C, 30 min)

↓

測定 Instrument : SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices 社)

Wavelength : Ex 635, Em 670

Endpoint measurement

6-5 データ解析

第2章に示した AmB と脂質二重膜との相互作用に関しては、以下に示す 6-5-a (分配モデル)、6-5-b (ラングミュア吸着モデル) および 6-5-c (二状態反応モデル) を用いて解析を行った。また、第3章および第4章に示した直接測定法による梯子状ポリエーテル化合物とタンパク質との相互作用のような親和性が低く、特に解離が極めて早く平衡状態へと移行する場合は、6-5-d (アフィニティ解析モデル) による平衡値解析を行った。一方、第4章後半に示した梯子状ポリエーテルを固定化し、タンパク質 PDE をアナライトにした相互作用においては、6-5-b (ラングミュア吸着モデル) を用いて解析を行った。同じく第4章後半に示した梯子状ポリエーテルを固定化し、PDE を用いた溶液中での競争阻害実験においては、6-5-e (4-パラメータモデル) を用いて解析を行った。

6-5-a 分配モデル⁶⁾

溶液 (水層) 中の AmB がリポソーム (有機層) に対して、結合速度定数 k_1 と解離速度定数 k_{-1} で分配が生じていると仮定すると、その反応は以下の式で表される。



ここで、 AmB_f および AmB_b は、それぞれ溶液中フリーの AmB およびリポソームに分配した AmB を示す。したがって、リポソームに分配した AmB の変化量は、式 6-2 で定義される。

$$\frac{d[\text{AmB}_b]}{dt} = k_1[\text{AmB}_f] - k_{-1}[\text{AmB}_b] \quad (\text{式 6-2})$$

$$[\text{AmB}_b] = \frac{k_1}{k_{-1}} [\text{AmB}_f] (1 - e^{-k_{-1}t}) \quad (\text{式 6-3})$$

$[\text{AmB}_b]$ と $[\text{AmB}_f]$ は、それぞれ溶液中のフリーの AmB 濃度とリポソームに分配した AmB 濃度を表している。

ここで、1 RU はセンサーチップ表面上において、1 pg/mm² に相当し⁷⁾、AmB の分子量は 924 g/mol であり、リポソームの密度を 1 g/mL と仮定すると、センサーチップ表面 1 mm² に結合した AmB のモル数は、捕捉したリポソームを 10,000 RU に換算しているため 10 pL/mm² あたり、RU/924×10⁻⁹ mol となり、式 6-3 は以下の式に変換できる。

$$\text{RU} = 9,240 \frac{k_1}{k_{-1}} [\text{AmB}_f] (1 - e^{-k_{-1}t}) \quad (\text{式 6-4})$$

したがって、リポソームに対する AmB 結合の経時変化は指数関数で示され、Origin ® 6.1J (Originlab Corporation) で求めたカーブフィッティングから、結合速度定数 k_1 と解離速度定数 k_{-1} と分配係数 k_1/k_{-1} を算出した。

6-5-b ラングミュア結合モデル

有限のレセプターであるリポソームに対する AmB の結合において、溶液中のフリーの AmB (A) と固定したリポソーム (B) 間に有限サイトへの 1 : 1 の吸着が起こっていると仮定すると、AmB がリポソーム表面への吸着あるいは内部への分配 (AB) に式 6-5 に示すラングミュア型吸着等温式が適用可能である⁸⁾。



このモデルにおいて、結合および解離速度定数 (k_a および k_d) は、以下の式で表すことができる。

$$dB/dt = -k_a[A][B] + k_d[AB] \quad (\text{式 6-6})$$

$$dAB/dt = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (\text{式 6-7})$$

ここで、[A]、[B]および[AB]は、それぞれフリーの AmB、固定したリポソームおよびその複合体の濃度を表している。 $K_A (= k_a/k_d)$ と $K_D (= k_d/k_a)$ は、それぞれ結合定数および解離定数を表している。

従来の溶液反応では、A、B の濃度は AB 複合体の形成に伴い減少するために、一般的にはどちらか片方の濃度を大過剰にして、その減少量が無視し、擬似一次反応として取り扱うことが多い。本実験では、リガンド (B) の量は固定化量として一定であり、

$$[B]_{\text{free}} = [B]_{\text{total}} - [AB] \quad (\text{式 6-8})$$

で表わすことができる。

またアナライト (A) 濃度 C も送液によって一定に保たれるので、AB 複合体形成は以下の式 6-9 で与えられる。

$$dR/dt = k_a C(R_{\max} - R) - k_d R \quad (\text{式 6-9})$$

ここで、 R_{\max} は最大結合量、 R はある時点でのレスポンス (RU) および C はアナライトのモル濃度を表している。

まず、数段階の濃度のアナライトで相互作用の解析を行う (図 6-11A)。式 6-9 は、次のように展開されるので、

$$dR/dt = k_a C R_{\max} - (k_a C + k_d) R \quad (\text{式 6-10})$$

得られたセンサーグラムから、 dR/dt を求め、これを R に対してプロットし (図 6-11B)、この直線の傾きを K_s とし、次に $-K_s$ を C に対してプロットする。

$$K_s = k_a C + k_d \quad (\text{式 6-11})$$

得られた直線の傾きが結合速度定数 K_a であり、切片が解離速度定数 K_d である (図 6-11C)。最後に、 K_a 及び K_d から、結合定数 $K_A (=k_a/k_d)$ と解離定数 $K_D (=k_d/k_a)$ が求められる。

このようにして吸着モデルによる解析は、BIAevaluation software (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) で求めたカーブフィッティングを用いて、親和性を評価した。

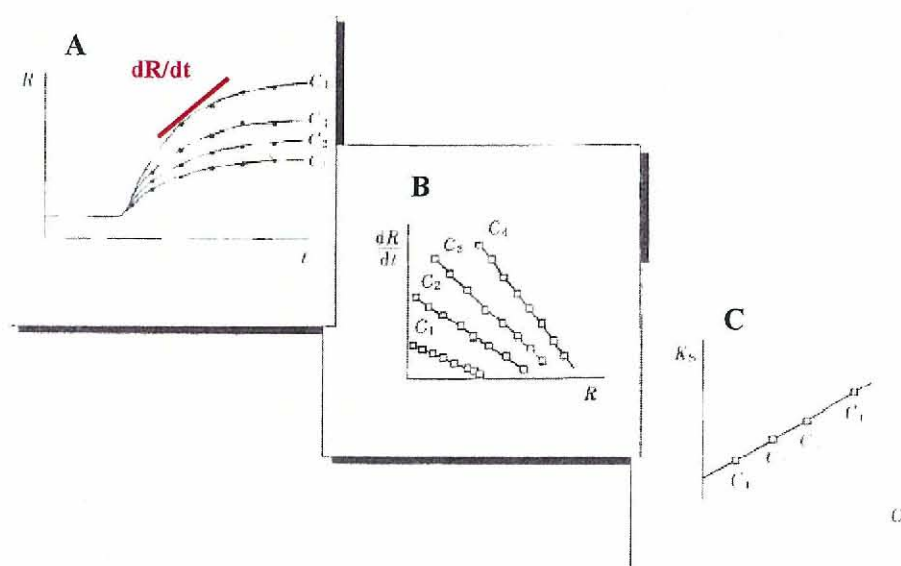


図 6-11 ラングミュア吸着モデルにおける解析法⁹⁾

6-5-c 二状態反応モデル

この二状態反応モデルは、二段階の薬剤と脂質二重膜との相互作用を含んでいる。最近、AmB が脂質二重膜中で2つの配向状態（一つは膜平面に対して平衡、もう一つは膜平面に対して垂直）をとることが明らかになってきている¹⁰⁾。すなわち、一段階目において、AmB (A) は膜脂質 (B) の表面に平衡（あるいはランダム）になって吸着し複合体 (AB) を形成した後、二段階目において、複合体 (AB) は再配向し膜内部に取り込まれ膜に対して垂直に安定複合体 (AB*, 例えばチャネルのような) を形成する (式 6-12)。



ここで、 k_{a1} および k_{d1} は、それぞれ溶液中でフリーの AmB の脂質二重膜表面への結合および解離速度定数を表し、また k_{a2} および k_{d2} は、それぞれ AmB の脂質二重膜表面と脂質二重膜内部との分配に関する結合および解離速度定数を表している。したがって、二状態反応モデルにおける反応速度式は以下のように表される。

$$dA/dt = -k_{a1}[A][B] + k_{d1}[AB] \quad (\text{式 6-13})$$

$$dAB/dt = (k_{a1}[A][B] - k_{d1}[AB]) - (k_{a2}[AB] - k_{d2}[AB^*]) \quad (\text{式 6-14})$$

$$dAB^*/dt = k_{a2}[AB] - k_{d2}[AB^*] \quad (\text{式 6-15})$$

$$K_{A1} = (k_{a1}/k_{d1}) ; K_{A2} = (k_{a2}/k_{d2}) ; K_A = (k_{a1}/k_{d1})(k_{a2}/k_{d2}) \quad (\text{式 6-16})$$

ここで、[A]と[B]は、それぞれフリーの AmB と固定したリポソームの濃度を表しており、[AB]と[AB*]は、それぞれコンフォメーション変化を起こす前後の複合体の濃度を表している。 K_{A1} 、 K_{A2} および K_A はそれぞれ、一段階目、二段階目および全体の結合定数を表している。BIAevaluation software (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) で求めたカーブフィッティングから、その親和性を評価した。

なお、このモデルの詳細については、Morton *et al* によって報告されている¹¹⁾。

6-5-d 平衡値解析法

解離定数 K_D の簡便な推定方法として、アナライトの結合飽和量の半値から推定する方法がある。センサーグラムが平衡に達した時のレゾナンスユニット R をその濃度 C におけるアナライト結合量とする。 C に対する R をプロットし、最大結合容量 R_{\max} が求められるように解析曲線をフィッティングさせ、この時の R_{\max} の 1/2 となる濃度を見かけの解離定数 K_D とする (図 6-12)。

A (アナライト) - B (リガンド) 2 分子間の結合、解離はラングミュア吸着モデルの場合と同様に、以下の反応式で表される。



$$K_A = [AB]/([A]_{\text{free}} \times [B]_{\text{free}}) \quad (\text{式 6-17})$$

ここで $[B]_{\text{total}}$ は固定化リガンドなので一定であり、ラングミュア吸着モデルの場合と同様に、

$$[B]_{\text{free}} = [B]_{\text{total}} - [AB] \quad (\text{式 6-8})$$

と表わすことができる。したがって、式 6-17 は以下のように表される。

$$K_A = [AB]/\{[A]_{\text{free}} \times ([B]_{\text{total}} - [AB])\} \quad (\text{式 6-18})$$

ここで $[A]$ は相液により一定濃度 C 、 $[B]_{\text{total}} = R_{\max}$ 、 $AB = R_{\text{eq}}$ と表すことができるので、

$$K_A = R_{\text{eq}}/\{C \times (R_{\max} - R_{\text{eq}})\} \quad (\text{式 6-19})$$

このとき、解離定数は $K_D = 1/K_A$ より求めることができる。

BIAevaluation software (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) で求めた用量依存曲線から、その親和性を評価した。

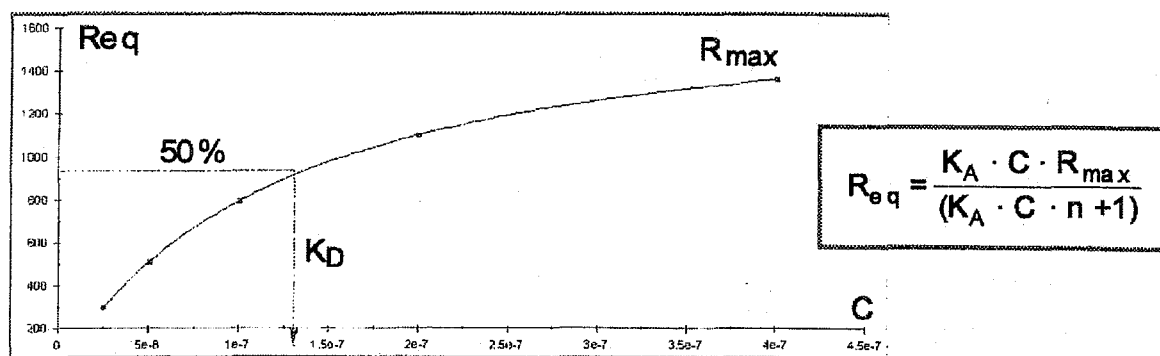


図 6-12 平衡値解析法の概要

6-5-e 4-パラメーターフィッティング

阻害測定法におけるカーブフィッティングと 50%阻害濃度 IC_{50} の計算は、BIAevaluation software (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を用いて、用量反応ロジスティック方程式 (4-パラメーターフィッティング) で解析した¹²⁾。

$$Y = (a - d) / \{1 + (X/c)^b\} + d \quad (\text{式 6-20})$$

ここで、 Y は測定分子 (ここでは PDE) の SPR レスポンス、 X はアナライト (ここでは梯子状ポリエーテル) 濃度、 a は $X=0$ (アナライト濃度がゼロ) のときの SPR レスポンス、 d は X が無限のときの SPR レスポンス、 c は 50%阻害濃度 IC_{50} 、(例えば、SPR レスポンスが半分のときの、 X の濃度)、そして b はそのカーブフィッティングによって求められたスロープファクターを表している。

また、一般に式 6-21 が成り立つ。

$$IC_{50} = K_D + C/2 \quad (\text{式 6-21})$$

ここで、 IC_{50} は 50%阻害濃度、 K_D は解離定数、 C は測定分子 (ここでは PDE) の濃度を表している。

このとき、 C が IC_{50} と比べて非常に小さくて無視できる場合、

$$IC_{50} = K_D \quad (\text{式 6-22})$$

と見なすことができる。

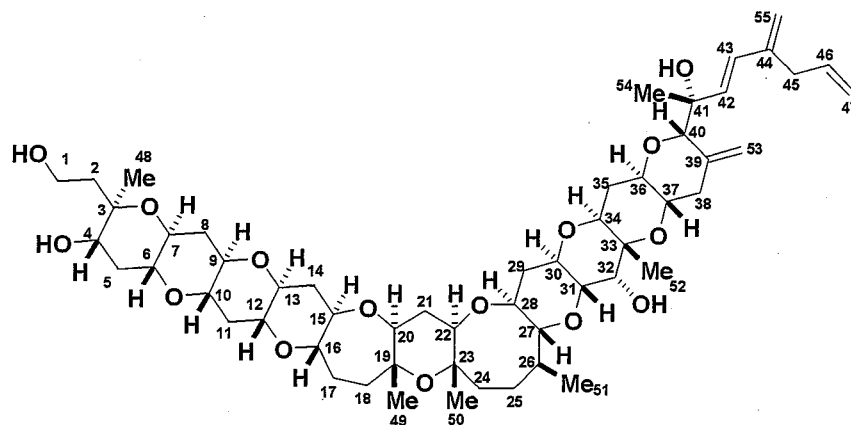
参考文献

- 1) MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B.M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1061*, 297-303. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles.
- 2) Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J-S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5869-5872. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.
- 3) Mori, M.; Oishi, T.; Matsuoka, S.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Murata, M.; Satake, M.; Oshima, Y.; Matsushita, N.; Aimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5099-5103. Ladder-shaped polyether compound, desulfated yessotoxin, interacts with membrane-integral α -helix peptides.
- 4) Eiki, K., Satake, M., Koike, K., Ogata, T., Mitsuya, T., Oshima, Y. *Fish. Sci.* **2005**, *71*, 633-638. Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay.
- 5) Singh, S-B. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6973-6976. A new mild PTSA-catalyzed method for sulfate ester hydrolysis and acid-catalyzed rearrangement of 12-acetyl-diene-11-ol tetracyclic triterpenoids involving an angular methyl migration.
- 6) Balon, K.; Riebesehl, B. U.; Muller, B. W. *Pharmac. Res.* **1999**, *16*, 882-888. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption.
- 7) Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *143*, 513-526. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins.
- 8) Stahelin, R. V.; Cho, W. *Biochemistry* **2001**, *40*, 4672-4678. Differential Roles of Ionic, Aliphatic, and Aromatic Residues in Membrane-Protein Interactions: A Surface Plasmon Resonance Study on Phospholipases A2.
- 9) 橋本せつ子 ぶんせき **1997**, *5*, 362-368. 表面プラズモン共鳴現象を利用する生体分子間相互作用の解析.
- 10) Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Herec, M. *J. Photochem. Photobiol.* **2003**, *B 69*, 49-57. Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: molecular organization in solution and in lipid membranes.
- 11) Morton, T. A.; Myszka, D. G.; Chaiken, I. M. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 176-185. Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration.

- 12) De Lean, A.; Munson, P. J.; Rodbard, D. *Am. J. Physiol.* **1978**, *235*, E97. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves.

dsYTX の ^1H NMR スペクトルデータ (CDCl_3)

position	δH	position	δH	position	δH
1	3.77	18	1.77	34	3.67
	3.84		1.77	35	1.54
2	1.81	19	-		2.10
	1.88	CH_3 -19	1.24	36	3.79
3	-	20	3.26	37	3.41
CH_3 -3	1.25	21	1.74	38	2.48
4	3.67		1.79	39	-
5	1.62	22	3.30	CH_2 =39	4.87
	2.18	23	-		5.00
6	3.01	CH_3 -23	1.14	40	3.93
7	3.29	24	1.67	41	-
8	1.40		1.75	CH_3 -41	1.34
	2.21	25	1.42	42	5.72
9	3.09		1.47	43	6.33
10	3.07	26	1.69	44	-
11	1.43	CH_3 -26	1.01	CH_2 =44	5.07
	2.28	27	2.72		5.07
12	2.97	28	3.22	45	2.92
13	3.08	29	1.54		2.92
14	1.45		2.28	46	5.82
	2.31	30	3.59	47	5.00
15	3.25	31	3.09		5.00
16	3.17	32	3.90		
17	1.80	33	-		
	1.96	CH_3 -33	1.23		





```

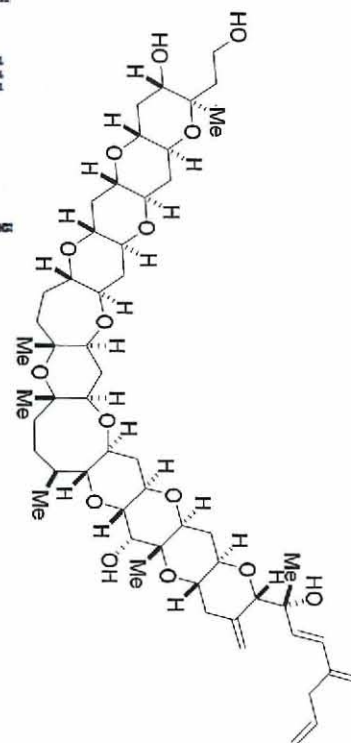
Filename      = 001203 DAY12_12-A-j.d
Author        = delta
Experiment    = single_pulse.sm1
Sample id     = 1
Solvent       = CHLOROFORM-D
Acquisition time = 2008-12-03 09:45:12
Serviced time  = 2008-12-03 09:45:14
Current time   = 2008-12-03 09:46:12

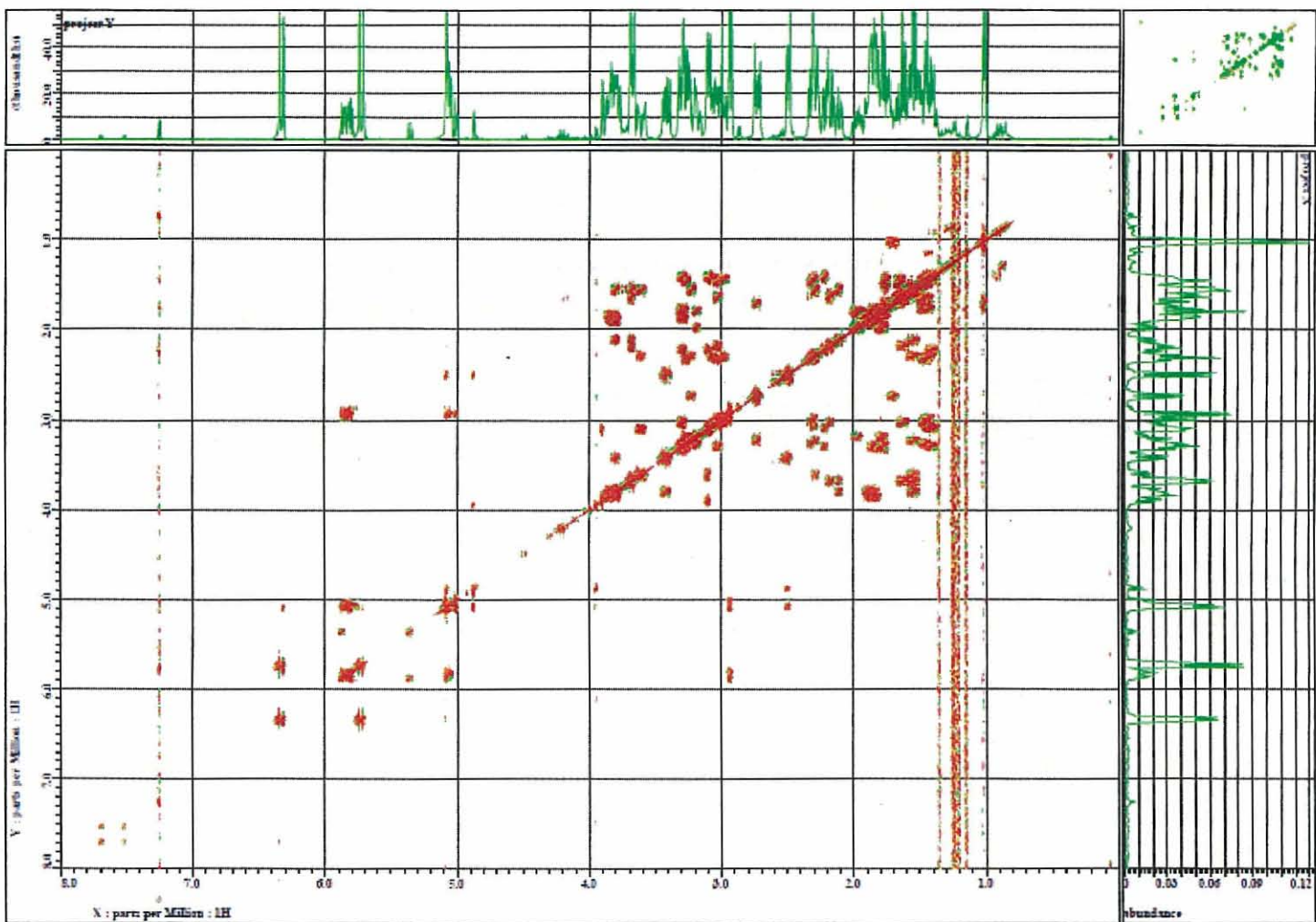
Comment       = single pulse
Data format   = 4D COMFILT
Data size     = 21214
Data title    = 1R
Data units    = [ppm]
Dimensions    = 1
Site          = RZA 500
Spectrometer  = DELTA 500

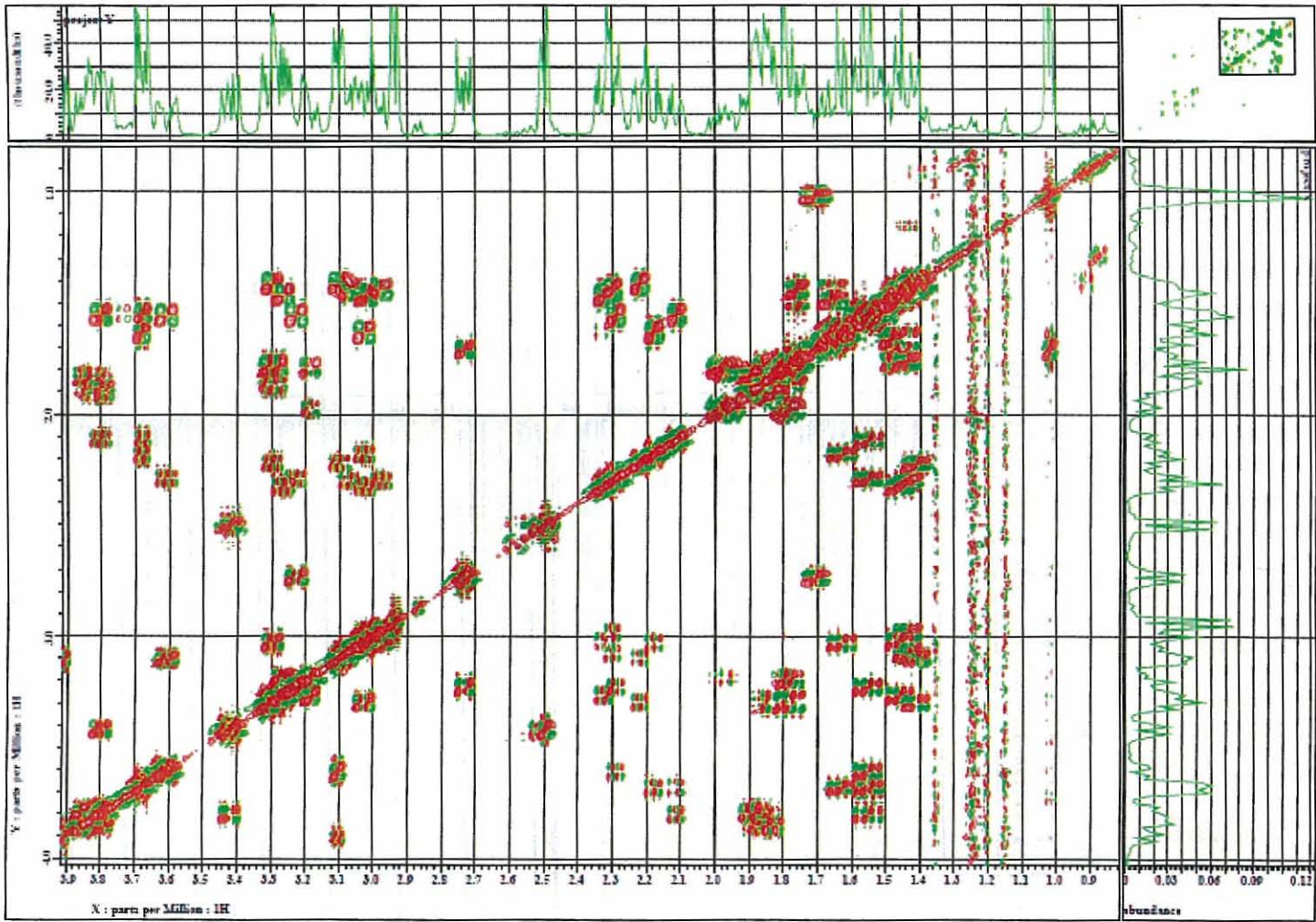
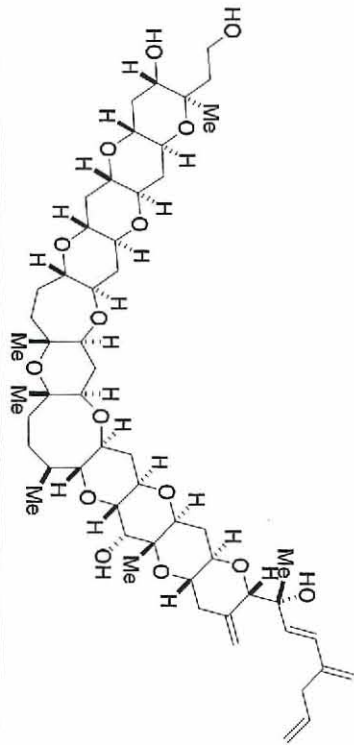
Field strength = 11.7473579 [T] 1500 [MG]
F2 acq duration = 5.54035712 [s]
F2 domain      = 1R
F2 freq        = 500.15091521 [MG]
F2 offset      = 0 [ppm]
F2 pulses      = 17763
F2 programs    = 1
F2 resolution  = 0.18271806 [Hz]
F2 sweep       = 5.50440012 [MG]
F2 start domain = 1R
F2 stop domain = 1R
F2 freq        = 500.15091521 [MG]
F2 offset      = 5.0 [ppm]
F2 mode        = 1D
Mod return     = 1
Scans          = 120
Total scans    = 120

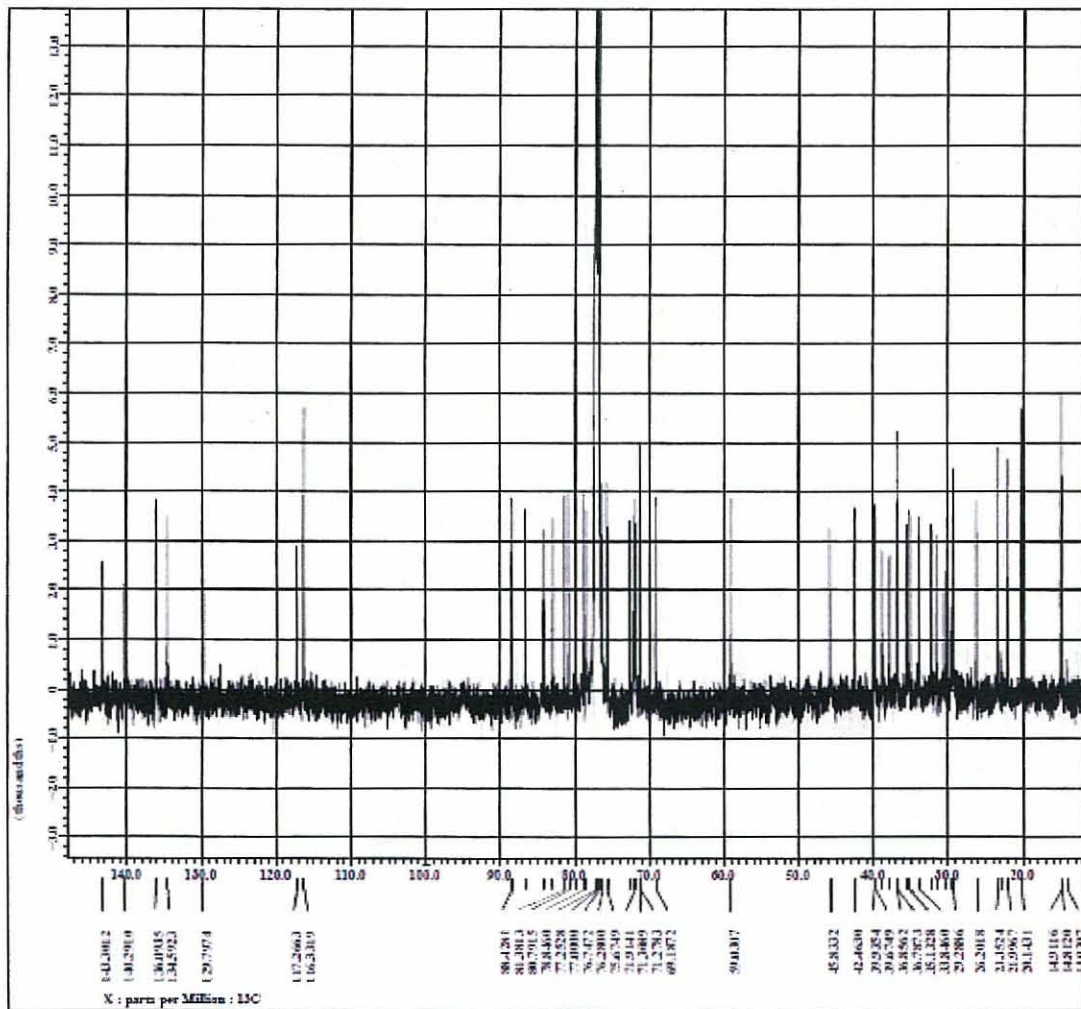
F3 90 width    = 12.4 [us]
F3 acq time    = 5.54035712 [s]
F3 angle       = 45 [deg]
F3 atm         = 2.7 [us]
F3 pulse       = 6.2 [us]
F3 mode        = 1D
F3 mode        = 0E2
F3 mode        = PULSE2
F3 initial wait = 1 [s]
F3 recycle gain = 50
F3 relaxation delay = 1 [s]
F3 relaxation time = 5.54035712 [s]
F3 temp set    = 25 [C]

```









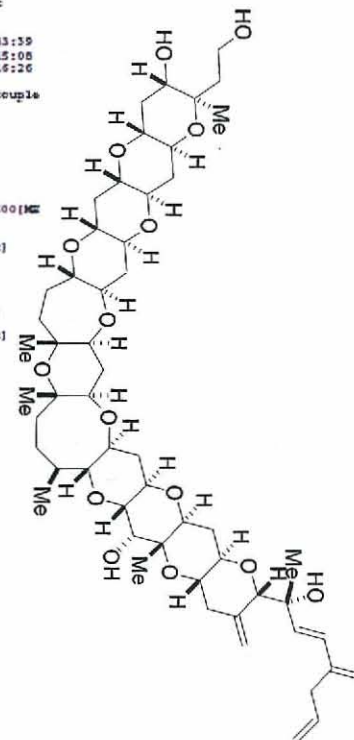
```

Comment      = single pulse decouple
Data format  = 1D COMPACT
Dim size     = 16214
Dim title    = 13C
Dim units    = [ppm]
Dimensions   = 1
Site         = ECA 500
Spectrometer = DELTA2 500

```

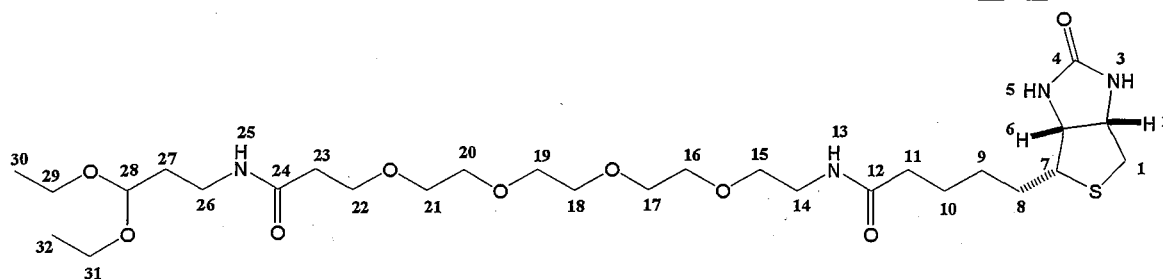
```
Field_strength = 11.7473579 [J] (50)
I_acc_duration = 1.03689024 [s]
I_domain = 13C
I_freq = 125.76523768 [MGHz]
I_offset = 200 [ppm]
I_points = 32768
I_programs =
I_resolution = 0.96330739 [Hz]
I_sweep = 11.56565657 [kHz]
Isr_domain = 1H
Isr_freq = 500.13599322 [MGHz]
Isr_offset = 5.0 [ppm]
Clipped = FALSE
Mod Return = 1
Scans = 65000
Total_scans = 65000
```

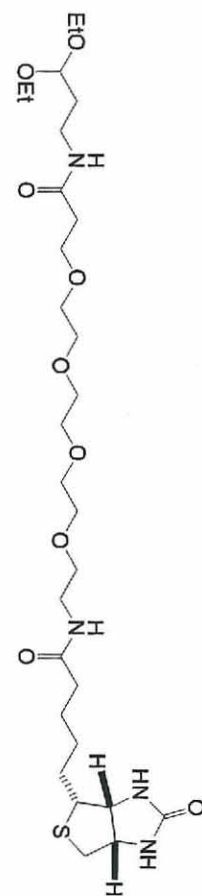
```
X 90 width = 10.4[um]
X acq time = 1.03809024[s]
X angle = 30[deg]
X atm = 7.7[dB]
X pulses = 1.46666667[us]
X irr_sch dec = 10.2[dB]
X irr_atm dec = 20.2[dB]
X irr_gain = 10.2[dB]
Decoupling = TRUE
Initial_wait = 1[s]
Noc = TRUE
Noc_time = 1[s]
Recvr_gain = 56
Relaxation_delay = 1[s]
Repetition_time = 2.03809024[s]
Temp_get = 24.9[C]
```

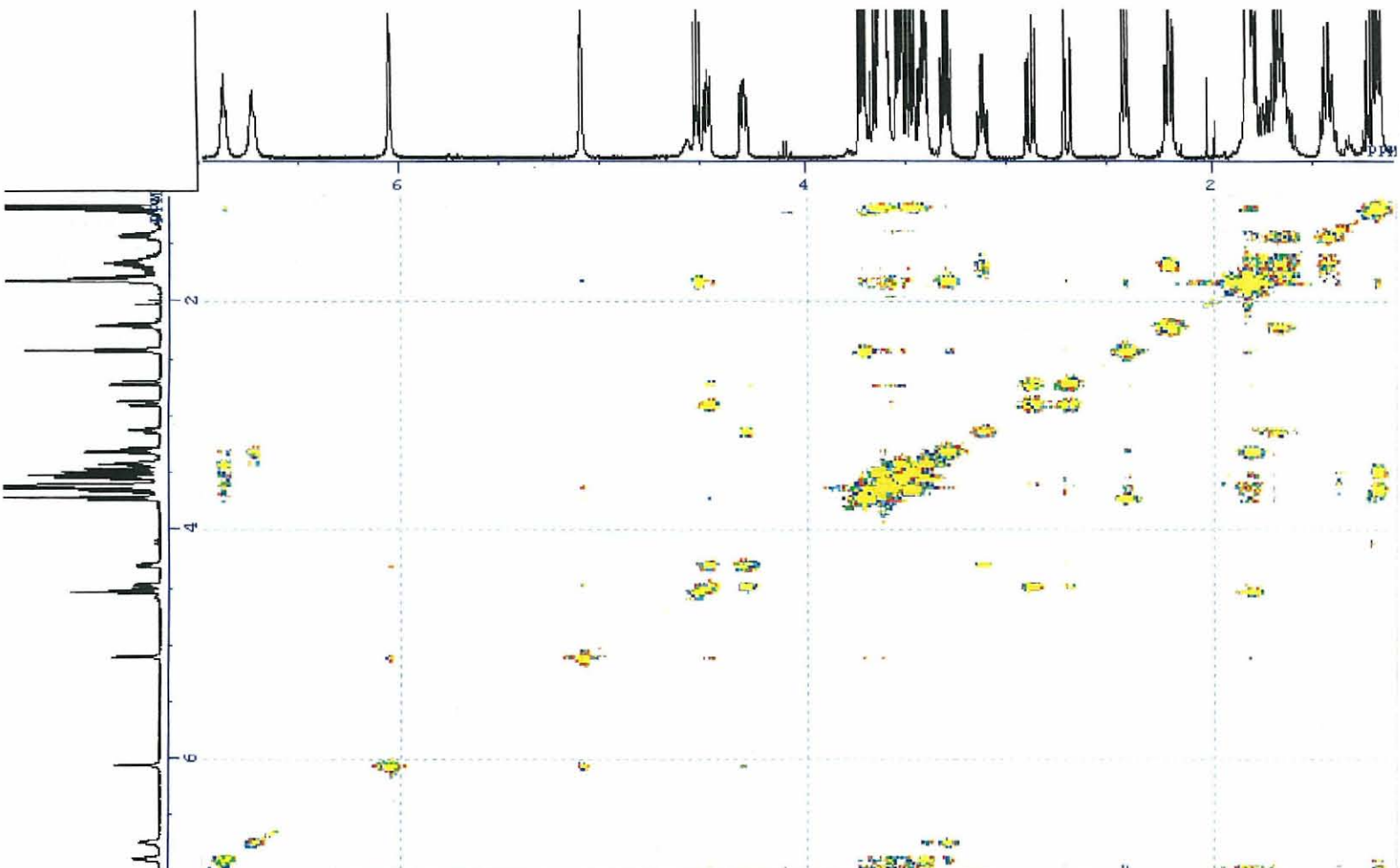


ビオチン化ジエチルアセタールの¹H NMR スペクトルデータ (CDCl₃)

position	δH	position	δH	position	δH
1	2.73	17	(3.3-3.7)	30	1.19
	2.88		(3.3-3.7)		1.19
2	4.30	18	(3.3-3.7)		1.19
3	6.05		(3.3-3.7)	31	(3.3-3.7)
4	-	19	(3.3-3.7)		(3.3-3.7)
5	5.10		(3.3-3.7)	32	1.19
6	4.47	20	(3.3-3.7)		1.19
	4.47		(3.3-3.7)		1.19
7	3.13	21	(3.3-3.7)		
8	1.67		(3.3-3.7)		
	1.67	22	(3.3-3.7)		
9	1.44		(3.3-3.7)		
	1.44	23	(3.3-3.7)		
10	1.81		(3.3-3.7)		
	1.81	24	-		
11	1.81	25	6.72		
	1.81	26	3.31		
12	-		3.31		
13	6.86	27	1.81		
14	(3.3-3.7)		1.81		
	(3.3-3.7)	28	4.53		
15	(3.3-3.7)	29	(3.3-3.7)		
	(3.3-3.7)		(3.3-3.7)		
16	(3.3-3.7)				
	(3.3-3.7)				

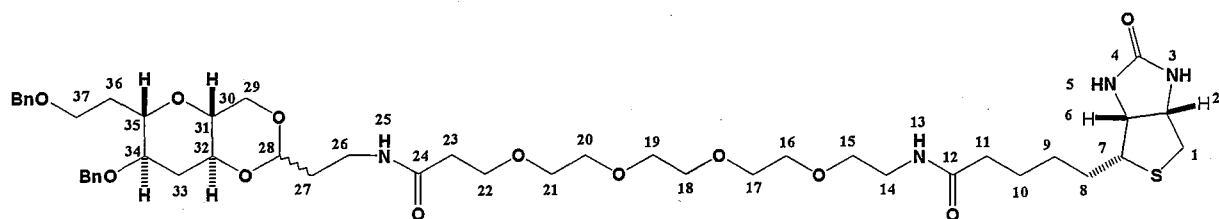


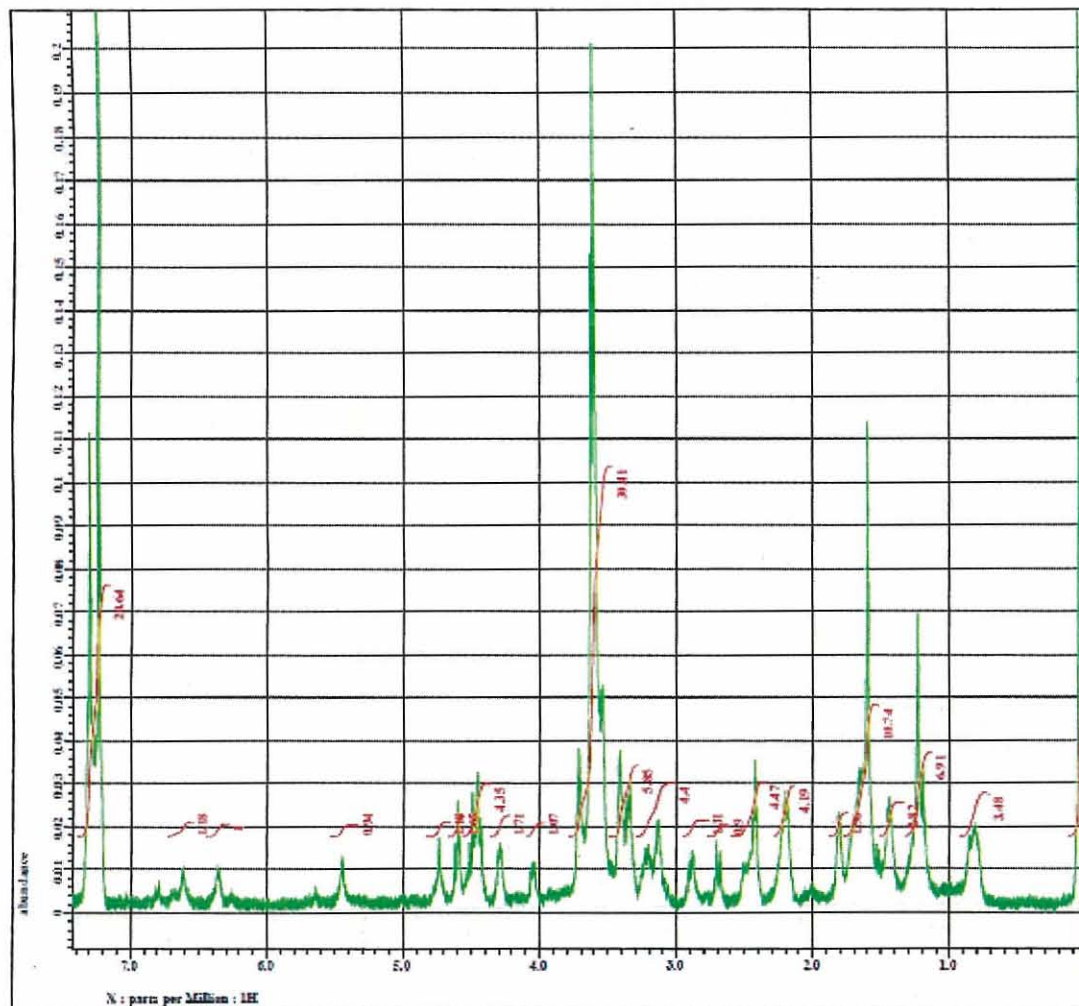




ビオチン化 ALPIB の ^1H NMR スペクトルデータ (CDCl_3)

position	δH	position	δH	position	δH
1	2.73	17	(3.3-3.7)	30	1.19
	2.88		(3.3-3.7)		1.19
2	4.30	18	(3.3-3.7)		1.19
3	6.05		(3.3-3.7)	31	(3.3-3.7)
4	-	19	(3.3-3.7)		(3.3-3.7)
5	5.10		(3.3-3.7)	32	1.19
6	4.47	20	(3.3-3.7)		1.19
	4.47		(3.3-3.7)		1.19
7	3.13	21	(3.3-3.7)		
8	1.67		(3.3-3.7)		
	1.67	22	(3.3-3.7)		
9	1.44		(3.3-3.7)		
	1.44	23	(3.3-3.7)		
10	1.81		(3.3-3.7)		
	1.81	24	-		
11	1.81	25	6.72		
	1.81	26	3.31		
12	-		3.31		
13	6.86	27	1.81		
14	(3.3-3.7)		1.81		
	(3.3-3.7)	28	4.53		
15	(3.3-3.7)	29	(3.3-3.7)		
	(3.3-3.7)		(3.3-3.7)		
16	(3.3-3.7)				
	(3.3-3.7)				





```

Filename      = 001202 EtoALPHE-6.jdx
Author        = Delta
Experiment    = single_pulse.sm2
Sample id     = 1
Solvent       = CMCROFORM-D
Creation time  = 2-DEC-2008 22:39:29
Revision time  = 6-DEC-2008 02:01:56
Current time   = 6-DEC-2008 02:03:16

```

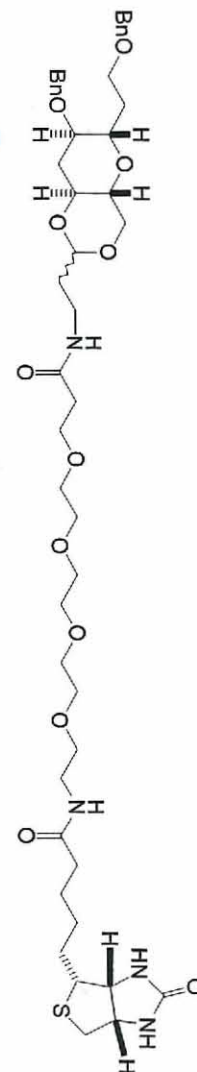
```

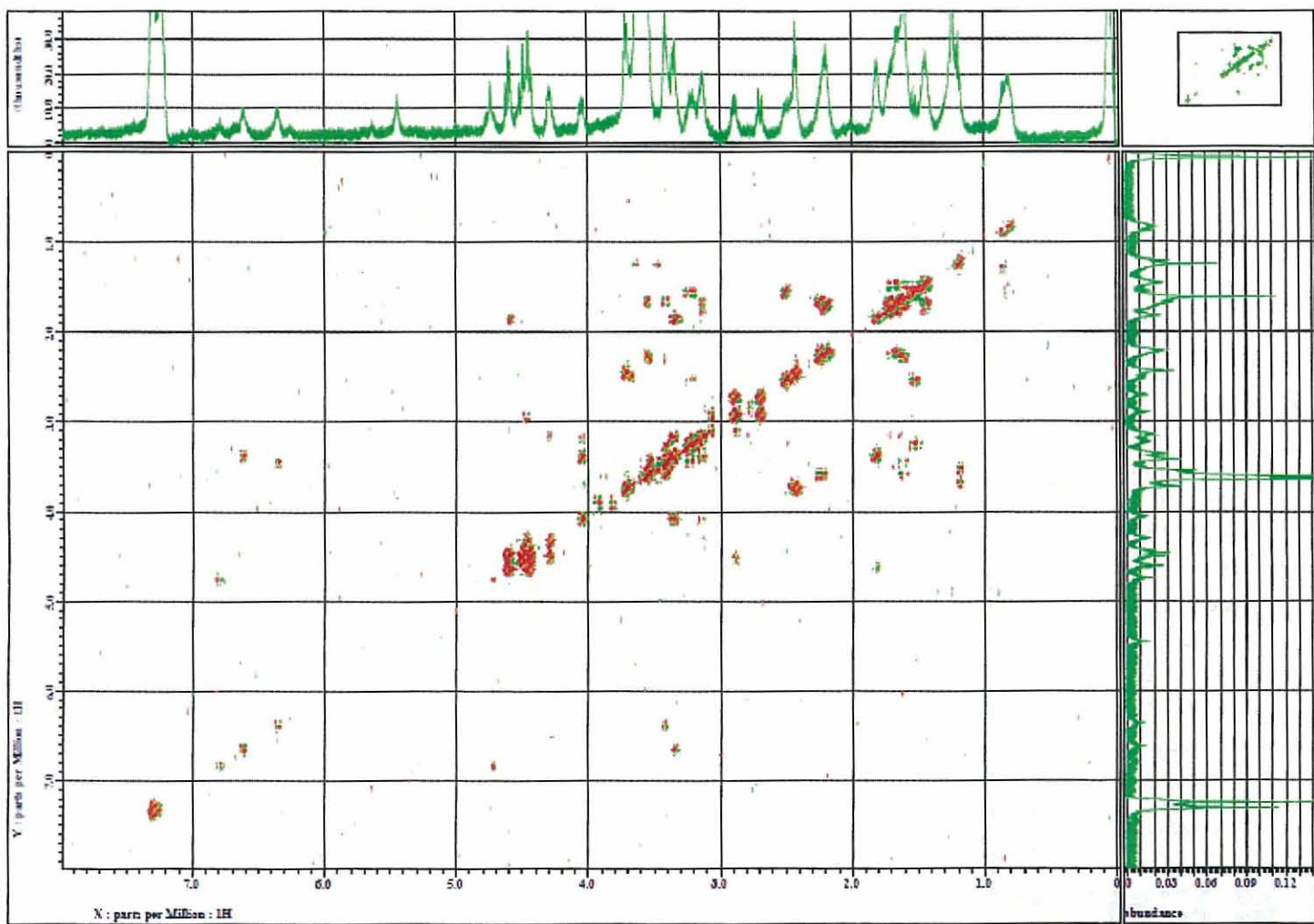
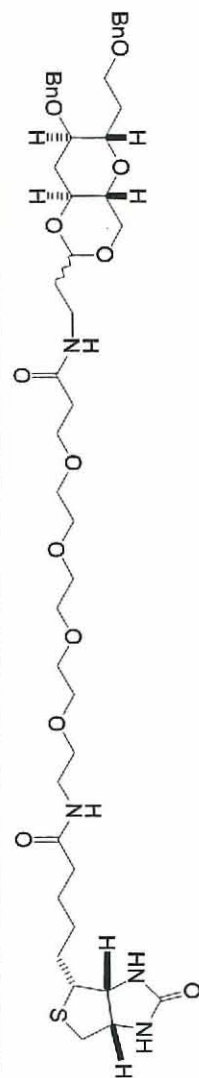
Comment      = single pulse
Data format  = 1D COMPLEX
Dim_0_size   = 262144
Dim_0_title  = 1X
Dim_0_units  = [ppm]
Dimensions   = 1
Site         = RGA 500
Spectrometer = DELTA 500

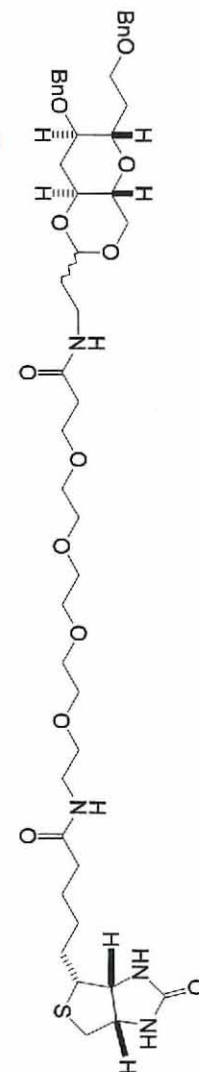
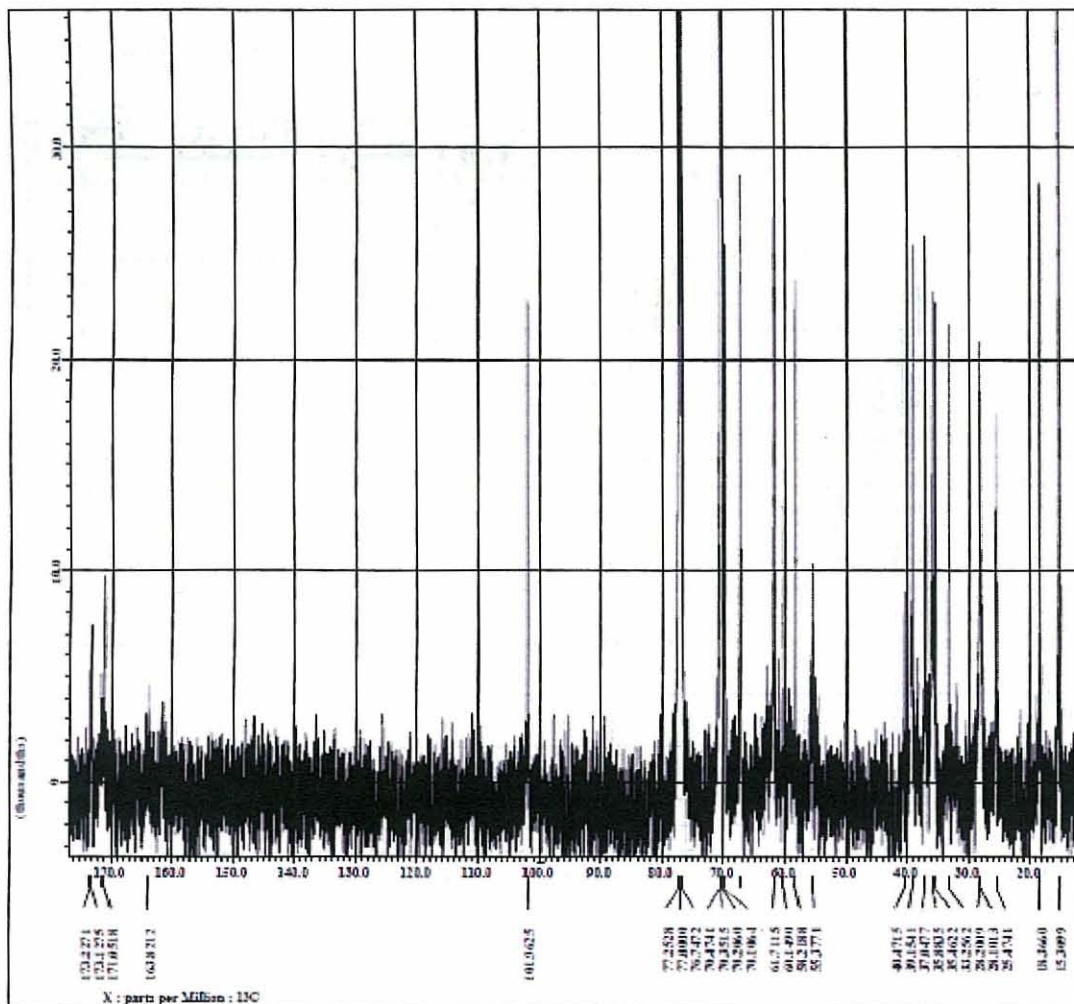
```

```
Field strength      = 11.747575 Hz [1500 MHz]
X acq_duration      = 6.544835712[s]
X domain            = 128
X freq              = 500.15951521 [MHz]
X offset            = 4 [ppm]
X points            = 21798
X processing        =
X resolution         = 0.15271066 [Hz]
X samps             = 5.00440032 [MHz]
Tr1_domain          = 128
Tr1_freq            = 500.15951521 [MHz]
Tr1_offset          = 4 [ppm]
Tr1_domain          = 128
Tr1_freq            = 500.15951521 [MHz]
Tr1_offset          = 5.0 [ppm]
Clipped             = PAL32
Mod                 =
Scans               = 129
Total scans        = 129
```

```
X_90_width      = 32.4[um]
X_ach_time      = 6.54435712[s]
X_angle         = 45[deg]
X_atn           = 2.7[dB]
X_pulse         = 6.2[us]
Int_mode        = Off
Tri_mode        = Off
Dante_present   = PADCX
Initial_wait    = 1[s]
Levcr_gain      = 56
Relaxation_delay = 3[s]
Repetition_time = 6.54435712[s]
Temp_set        = 15[degC]
```







```
Filename      = D:\1129_EicP2E_13C-4.j
Author        = Gelta
Experiment    = Single_pulse_dec
Sample id     = 1
Solvent       = CDCl3/CD3COOH-D
Creation time  = 19-NOV-2006 15:22:04
Revision time  = 18-DEC-2006 09:27:15
Current time   = 18-DEC-2006 09:18:11
```

```

Comment      . single pulse decoupling
Data format  . 1D COMPLEX
Dim size     . 1024
Dim title    . 13C
Dim units    . [ppm]
Dimensions   . 1
Site         . RGA 500
Spectrometer . DELTA 500

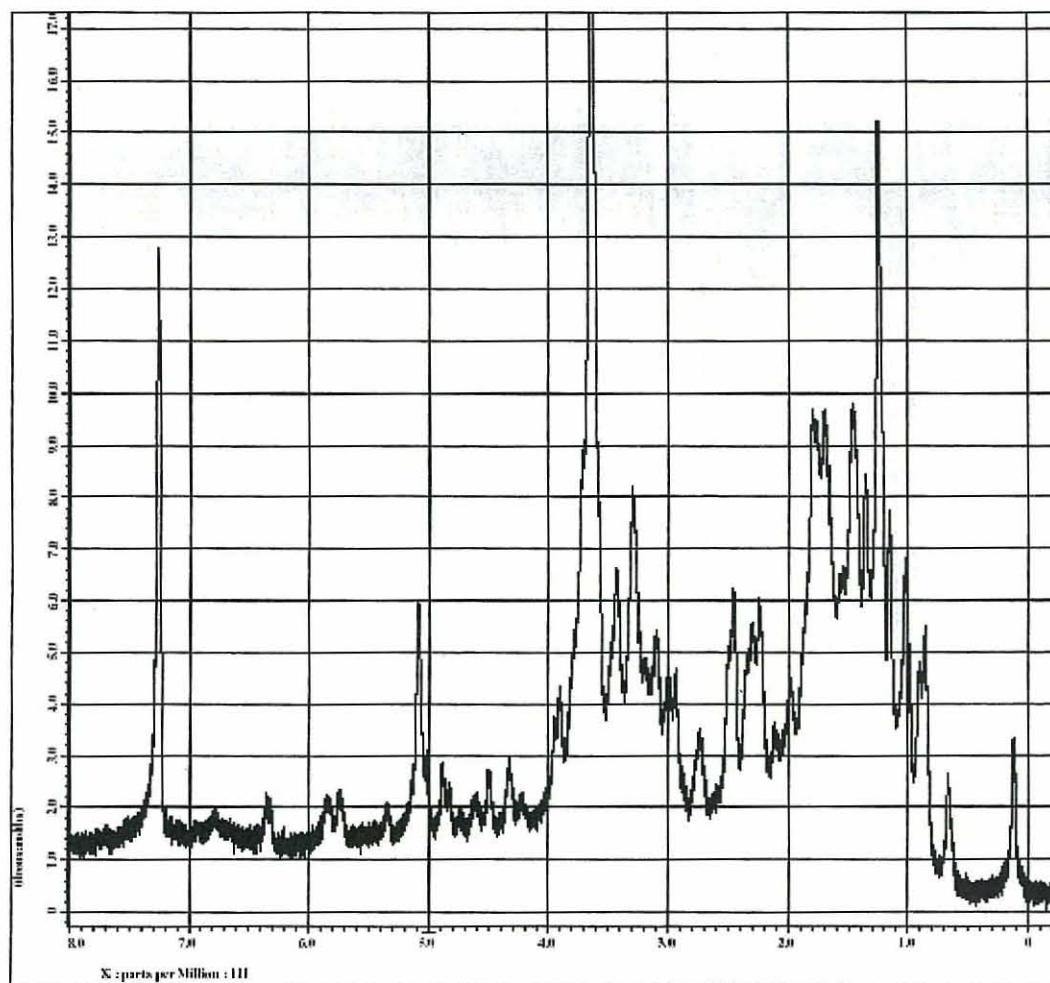
```

```
Field strength      = 11.7475577 [T] [5000 MG]
I acq duration      = 1.034090026 [s]
I domain            = 131C
I freq              = 125.765217588 [MGs]
I offset            = 1000 [ppm]
I points            = 121748
I precursors         = 4
I resolution         = 9.643307139 [Hz]
I sweep             = 11.585653027 [Hz/s]
Irr domain          = 12E
Irr freq            = 500.159915521 [MGs]
Irr offset          = 5.0 [ppm]
Clipped             = FALSE
Mod id              = 3300
Scans               = 1300
Total scans         = 1300
```

```

I 90 width          = 10.4 [um]
I seq time          = 1.038089024 [s]
I angle             = 30 [deg]
I pulse             = 1.7 [dB]
I att               = 3.486666667 [um]
Irr str dec         = 20.2 [dB]
Irr str soc         = 20.2 [dB]
Irr str dec soc     = 20.2 [dB]
Decoupling          = TRUE
Initial wait        = 1 [s]
Noc                 = TRUE
Noc time            = 1 [s]
Recvr gain          = 60
Relaxation delay     = 1 [s]
Registration_time    = 2.038089024 [s]
Temp set            = 31.7 [dC]

```

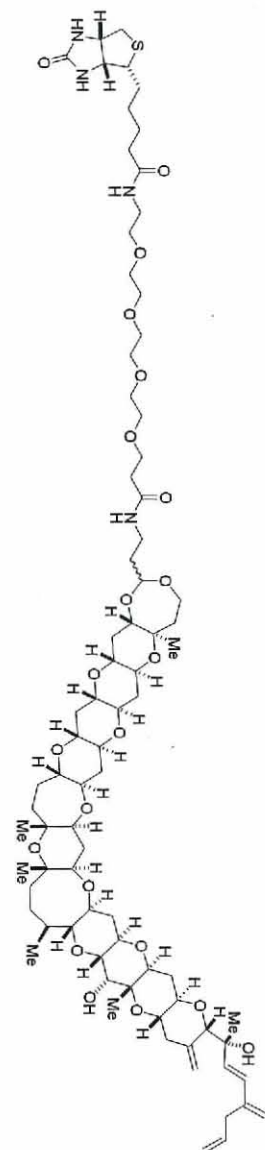


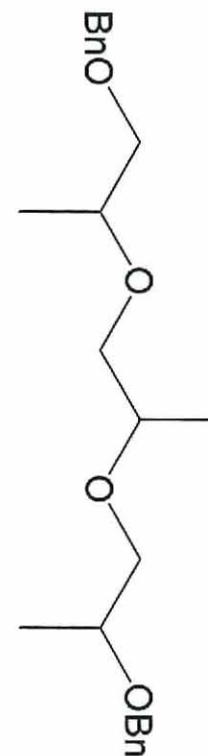
Filename = 050107 HiedaYEX1_1H-1
 Author = delta
 Experiment = single pulse.wsz
 Sample id = 1
 Solvent = CHLOROFORM-D
 Creation time = 7-JAN-2009 20:05:14
 Revision time = 9-JAN-2009 03:42:13
 Current time = 9-JAN-2009 03:42:52

Comment = single pulse
 Data format = 1D CONTIN
 Bin size = 33428
 Bin title = 1H
 Bin units = (ppm)
 Dimensions = 1
 Site = RCA 500
 Spectrometer = DELTA 500

Field strength = 500.13579 [T] (500 MHz)
 X acq duration = 6.90251616 [s]
 X domain = 1H
 X freq = 500.135791521 [MHz]
 X offset = 5.0 [ppm]
 X points = 65536
 X prescan = 1
 X resolution = 0.14219424 [Hz]
 X sweep = 9.38438438 [kHz]
 Irr domain = 1H
 Irr freq = 500.135791521 [MHz]
 Irr offset = 5.0 [ppm]
 Trf domain = 1H
 Trf freq = 500.135791521 [MHz]
 Trf offset = 5.0 [ppm]
 Clipped = FALSE
 Mod return = 1
 Scans = 64
 Total scans = 64

X 90 width = 11.4 [us]
 X acq time = 6.90251616 [s]
 X angle = 45 [deg]
 X ath = 2.7 [dB]
 X pulse = 6.2 [us]
 Irr mode = Off
 Trf mode = Off
 Dnate preset = FALSE
 Initial wait = 1 [s]
 Recv gain = 46
 Relaxation delay = 2 [s]
 Repetition time = 6.90251616 [s]
 Temp get = 25 [dC]





```

Filename      = tripropyleneglycolidb
Author        = delta
Reperiment    = single_pulse.ex2
Sample_id     = 1
Solvent       = MKTHANOL-D3
Creation time  = 8-JAN-2009 13:48:32
Revision time = 9-JAN-2009 03:44:16
Current time  = 9-JAN-2009 03:44:42

```

```

Comment      = single pulse
Data Format   = 1D COMPLEX
Dim_1_size   = 524288
Dim_1_title  = 1H
Dim_1_unit   = [ppm]
Dimensions   = X
Site         = RGA 500
Spectrometer = DELTA2 NMR

```

```
Field strength      = 1.74773576 [T] (500 [MHz])
K_ssd_distrallen    = 0.983536 [1/s]
K_domain            = 1 [H]
K_freq              = 500.15991521 [MHz]
K_offset             = 5.0 [ppm]
K_points             = 55536
K_procscan          = 1
K_resolution         = 0.143219434 [Hz]
K_sweep             = 0.254326450 [kHz]
Irr_domain          = 1 [H]
Irr_freq            = 500.15991521 [MHz]
Irr_offset           = 0.0 [ppm]
Trd_domain          = 1 [H]
Trd_freq            = 500.15991521 [MHz]
Trd_offset           = 5.0 [ppm]
Clipped             = FALSE
Wwd_return          = 0
pcname              = 64
Total scans         = 64
```

```

X 90 width      = 12.4[us]
X seq time      = 5.98351616[us]
X angle         = 45[deg]
X atn           = 2.7[db]
X pulse         = 5.2[us]
lfr mode        = OFF
Trd mode        = OFF
Bante preset    = FALSE
Initial wait    = 1[us]
Recvr gain      = 40
Relaxation_delay = 2[us]
Repetition time = 5.98351616[us]
Temp set        = 25[degC]

```

付録

公表論文

Complex Formation of Amphotericin B in Sterol-Containing Membranes As Evidenced by Surface Plasmon Resonance. Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807-7815.

Surface plasmon resonance-based detection of ladder-shaped polyethers by competitive binding method. Mouri, R.; Oishi, T.; Torikai, K.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oshima, Y. In review.

参考文献

Structure of Diethyl(2-pyridyl)boranes : Rigid Cyclic Dimers. Murafuji, T.; Mouri, R.; Sugihara, Y. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13933-13938.

Complex Formation of Amphotericin B in Sterol-Containing Membranes As Evidenced by Surface Plasmon Resonance[†]

Ryota Mouri,[‡] Keiichi Konoki, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, and Michio Murata*

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

Received February 28, 2008; Revised Manuscript Received May 29, 2008

ABSTRACT: Amphotericin B (AmB) is a membrane-active antibiotic that increases the permeability of fungal membranes. Thus, the dynamic process of its interaction with membranes poses intriguing questions, which prompted us to elaborate a quick and reliable method for real-time observation of the drug's binding to phospholipid liposomes. We focused on surface plasmon resonance (SPR) and devised a new modification method of sensor chips, which led to a significant reduction in the level of nonspecific binding of the drug in a control lane. With this method in hand, we examined the affinity of AmB for various membrane preparations. As expected, AmB exhibited much higher affinity for sterol-containing palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine membranes than those without sterol. The sensorgrams recorded under various conditions partly fitted theoretical curves, which were based on three interaction models. Among those, a two-state reaction model reproduced well the sensorgram of AmB binding to an ergosterol-containing membrane; in this model, two states of membrane-bound complexes, AB and AB*, are assumed, which correspond to a simple binding to the surface of the membrane (AB) and formation of another assembly in the membrane (AB*) such as an ion channel complex. Kinetic analysis demonstrated that the association constant in ergosterol-containing POPC liposomes is larger by 1 order of magnitude than that in the cholesterol-containing counterpart. These findings support the previous notion that ergosterol stabilizes the membrane-bound assembly of AmB.

Amphotericin B (AmB),¹ a polyene antibiotic produced by *Streptomyces nodosus*, is clinically used for treatment of systemic fungal infections (1–4). Its molecular structure (Figure 1) is characterized by a glycosylated 38-member lactone encompassing an amphiphilic polyhydroxy part, a conjugated heptaene chromophore, and an amphoteric ion pair (5, 6). It is generally accepted that an ion-permeable channel formed across the bilayer membrane is responsible for the biological activity of AmB (7, 8). In the well-known “barrel-stave” hypothesis (Figure 2), approximately eight molecules of AmB assemble to form an ion channel, where the polyhydroxy region of AmB composes the lining of a channel pore while its heptaene moiety faces the hydrophobic membrane interior (9, 10). The antibiotic activity of AmB is usually attributed to a higher affinity for ergosterol, a primary fungal sterol, than for cholesterol in the mammalian

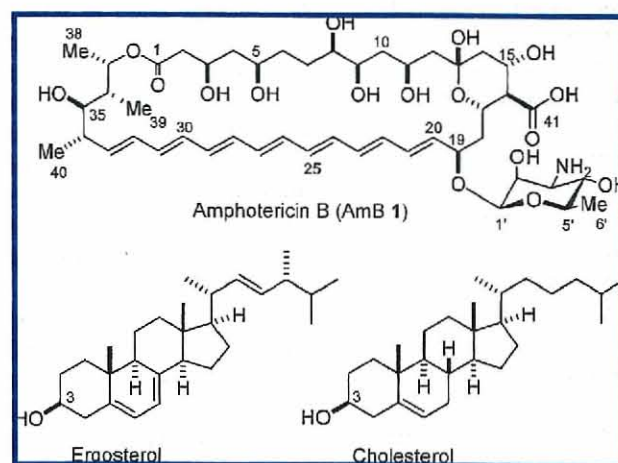


FIGURE 1: Structures of amphotericin B, cholesterol, and ergosterol.

[†] This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (A) (15201048) and (S) (18101010), for Priority Area (A) (16073211), and for Young Scientists (A) (17681027) from MEXT, Japan. We are grateful to Japan Food Research Laboratories for generous support of R.M.

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: +81-6-6850-5775. Fax: +81-6-6850-5785. E-mail: murata@ch.wani.osaka-u.ac.jp.

[‡] Joint Appointment with Japan Food Research Laboratories, 3-1 Toyotsu, Suita, Osaka 564-0051, Japan.

Abbreviations: AmB, amphotericin B; CD, circular dichroism; DMSO, dimethyl sulfoxide; LUV, large unilamellar vesicle; MLV, multilamellar vesicle; NMR, nuclear magnetic resonance; PBS, phosphate-buffered saline; PC, phosphatidylcholine; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; RU, resonance unit; SPR, surface plasmon resonance.

membranes (11–14). Despite extensive physicochemical investigations of this channel over many years, details of its architecture remain unelucidated except for some bimolecular interactions between AmB and AmB (15–17), AmB and phospholipid (18–20), and AmB and sterol (21, 22).

The preference of fungus sterol over human sterol is reported to be no more than 10-fold (13), which is presumably responsible for the serious side effects of the drug such as nephrotoxicity or hypokalemia (23, 24). To develop a new drug based on the AmB skeleton with better antibiotic efficacy and fewer side effects, we must examine diverse drug candidates for membrane affinity. For this purpose, it

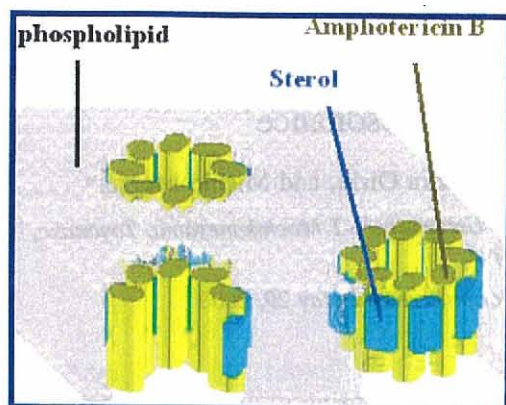


FIGURE 2: Schematic representation of the barrel-stave model for the AmB ion channel.

is particularly important to establish a simple and reliable method for quantitatively evaluating drug–membrane interaction.

Drug–membrane interaction is one of the most important subjects in pharmacokinetics (25–31). Nevertheless, practical methods for quantitatively evaluating the affinity of small molecules for biomembranes are rather unexploited. For drug–membrane interaction under equilibrium, calorimetric measurements (27–29) were successfully applied to reveal some thermodynamic properties, yet these methods are not suitable for measuring the time course of the interactions. Recently, surface plasmon resonance (SPR) has emerged as a versatile tool for assessing interactions between biomolecules (30–34). Membrane-bound peptides and drugs have been investigated by SPR (32–34), some of which produced otherwise unobtainable information about their mode of action. For cationic amphiphilic drugs such as chlorpromazine and desipramine (32), SPR sensor chips with a hydrophobic surface were successfully utilized to evaluate the binding affinity of these drugs for membranes. To extend this method to complex amphiphilic molecules such as amphotericin B, the level of nonspecific binding to the basis of a sensor chip, which sometimes prevents the observation of membrane interactions, has to be reduced.

In this study, we devised a new SPR method for reducing the extent of nonspecific interaction between analytes and sensor chip basis, which led to a simple, quick, and sensitive methodology for evaluating interaction between AmB and lipid bilayers. This method greatly facilitated kinetic analysis for AmB binding to sterol-containing PC membranes.

MATERIALS AND METHODS

Materials. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) was purchased from NOF Corp. (Tokyo, Japan). Amphotericin B (AmB), cholesterol, chloroform, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), disodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, [3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), and cystamine dihydrochloride were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Ergosterol was purchased from WAKO Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). 1-Ethyl 3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 10 mM acetate buffer (pH 5.0), 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5), and 50

mM sodium hydroxide (50 mM NaOH) were purchased from BIAcore AB (Uppsala, Sweden). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and dodecylamine were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). All of these chemicals were of the highest grade and used without further purification. Water was purified with a Millipore Simpli Laboratory system (Millipore Inc., Bedford, MA) and used within a few hours.

Preparation of Liposomes. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared according to the protocol of Herve et al. (35). POPC and sterol (cholesterol or ergosterol) were mixed in chloroform (1 mL) in a round-bottom flask. The mixture was evaporated and dried in vacuo for more than 2 h, and then hydrated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing KCl (2.7 mM) and NaCl (137 mM) (PBS buffer, 1 mL). The mixture was vortexed and sonicated to prepare multilamellar vesicles (MLVs). The resultant suspension was subjected to three cycles of freezing (−80 °C), thawing (60 °C), and vortexing (5 s) to form LUVs. The LUVs were passed through double 100 nm polycarbonate filters 19 times with LiposoFast-Basic (AVESTIN Inc., Ottawa, ON) at room temperature and diluted with PBS buffer to furnish a LUV solution with a lipid concentration of 0.5 mM.

Surface Plasmon Resonance Experiments. AmB (4.62 mg, 5 μ mol) was dissolved in DMSO (1 mL) and stored as a 5 mM AmB stock solution. For SPR measurements, the stock solution was first diluted with PBS buffer to 250 μ M and then diluted again with PBS buffer containing 5% DMSO to give 5, 10, 20, and 50 μ M AmB solutions. The experiments were performed at 25 °C using either the L1 sensor chip or the CM5 sensor chip mounted in a BIAcore X analytical system (BIAcore AB). A washing solution was comprised of 20 mM CHAPS, 40 mM cystamine, and 50 mM sodium hydroxide. After a routine pretreatment of the BIAcore instrument, the sensor chip was washed with distilled water overnight to remove trace amounts of detergent. The sensor chip surface was treated with 20 mM CHAPS (40 μ L) and 40 mM cystamine (40 μ L) at a flow rate of 20 μ L/min. Dodecylamine was immobilized to one of the flow cell lanes in the CM5 sensor chip by an amino coupling method, while the other lane was left intact as a control lane. The immobilization reaction was performed at a flow rate of 5 μ L/min; briefly, the sensor chip was activated for 7 min by injecting a solution mixture (1:1, v/v, 35 μ L) of 390 mM EDC and 100 mM NHS. Dodecylamine (50 μ g/mL) in 10 mM acetate buffer containing 10% DMSO (pH 5.0, 35 μ L) was then injected for cross-linking. The remaining activated *N*-hydroxysuccinimide ester groups were converted to amide groups by 1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5, 35 μ L). The sensor chip thus obtained was washed with 10% DMSO (35 μ L) to remove nonspecifically bound substances.

The running buffer was PBS buffer containing 5% DMSO (pH 7.4). Prior to being used, the buffer was passed through a 0.45 μ m filter and degassed by sonication. The liposome solution (60 μ L) was injected to the sensor chip at a flow rate of 2 μ L/min, and then 50 mM sodium hydroxide (40 μ L) was added at a flow rate of 20 μ L/min. The NaOH treatment was repeated three times, resulting in a stable baseline which indicated formation of stable liposome layers on the sensor chip. AmB at various concentrations dissolved

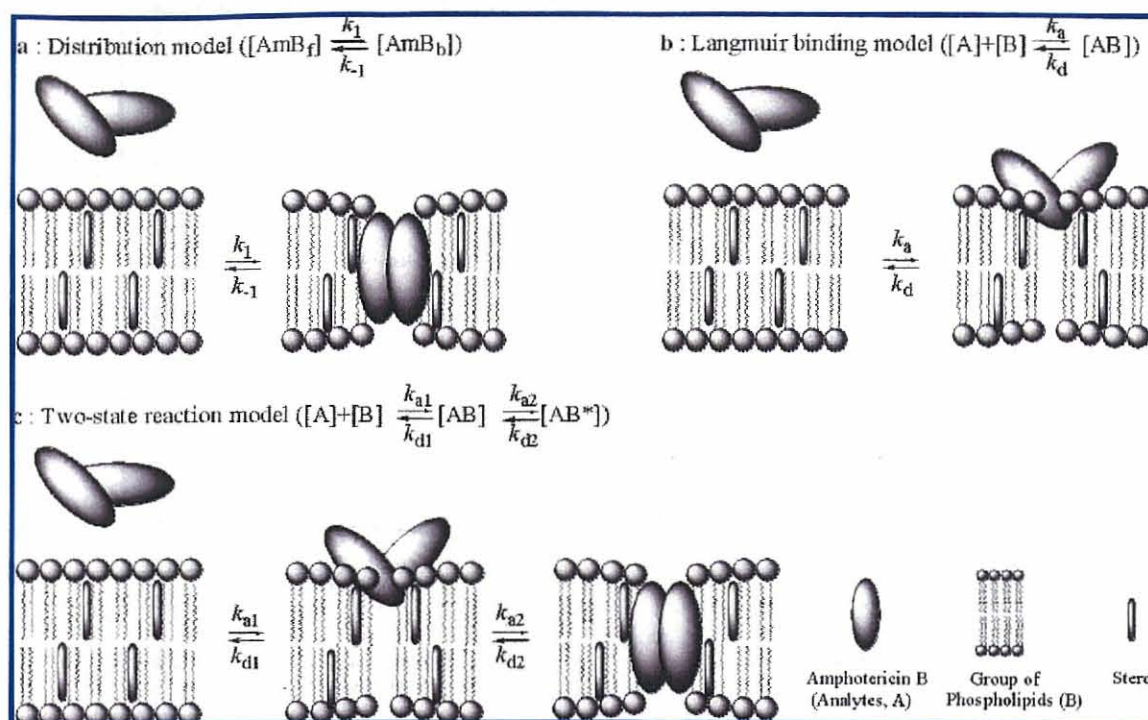


FIGURE 3: Schematic illustrations of three interaction models which may account for the binding of AmB to liposome membranes: (a) distribution model, (b) Langmuir binding model, and (c) two-state reaction model.

in the running buffer (100 μ L) was introduced to the sensor chip at a flow rate of 10 μ L/min, and the time course of its association and dissociation was monitored.

Data Analysis. As shown in Figure 3, we assumed three reaction models for AmB binding to liposome membranes. In the distribution model, the binding process can be expressed by two kinetic constants for phase transfer regardless of the concentration of a drug in the membrane (Figure 3a). In the Langmuir binding model, where a finite amount of receptor for drug binding is assumed, a simple model is provided by hypothesizing stoichiometric interaction between AmB (A) and a group of lipid molecules in immobilized liposomes (B) (Figure 3b). In the two-state reaction model, two steps of drug–membrane interactions are assumed. This first step where analytes (A) bind to a finite number of lipid molecules (B) is stoichiometric as is the case with the Langmuir model. The second step involves conversion from the initial complex (AB) to another complex (AB*) where interactions between the complex (AB or AB*) and uncomplexed lipids are not rate-limiting (Figure 3c) as reported for membrane-lytic peptides (33). Detailed descriptions of how to determine kinetic parameters on the basis of these models are given in the Supporting Information and literature (33, 36).

RESULTS

Newly Devised Sensor Chip for Detecting AmB–Liposome Interactions. In SPR experiments, choice of a sensor chip is particularly important. There are two types of sensor chips, L1 and HPA, which are frequently used for membrane systems; in the L1 chip, lipophilic groups are covalently attached to carboxymethylated dextran, making the surface suitable for direct attachment of liposomes, and in the HPA chip, a flat hydrophobic sensor surface consisting of long chain alkanethiol is attached directly to the gold film. The

hydrophobic surface is supposed to facilitate adsorption of lipid monolayers.

The L1 sensor chips with no pretreatment were first used for interaction measurements, resulting in a large amount of nonspecific binding of AmB (Figure 4a). The CM5 chip, which consisted of carboxymethylated dextran covalently attached to a gold surface, was alkylated with dodecylamine to prepare a modified surface, which mimicked that of an L1 chip but probably possessed fewer alkyl substituents. This chip also exhibited significant nonspecific binding of AmB. On the other hand, an unmodified CM5 chip gave rise to a negligible amount of AmB bound to the chip (Figure 4b). We deduced that the hydrophobic chains of the modified CM5 (or L1) chip were responsible for the nonspecific binding of AmB. Thus, one of two flow cell lanes in the CM5 chip was modified with dodecylamine, while the other lane remained intact for the use of a control run. In the modified lane, POPC liposomes were stably captured (Figure 5). When the liposomes at a phospholipid concentration of 0.5 mM were introduced, the SPR response due to liposome association reached 15800 ± 100 RU. The sensor chip was tolerant of NaOH treatments (50 mM), and the amount of captured liposomes was essentially unchanged after repetitive use and wash. For kinetic analysis, the binding of AmB to liposome membranes was standardized as an amount of AmB in RU bound to the amount of lipids equivalent to 10000 RU.

Interaction between AmB and Liposomes on a Modified CM5 Chip. Using this newly devised sensor chip, we evaluated AmB binding to liposomes which were composed of various lipid constituents. The SPR response in the control lane was subtracted from that in the liposome-captured lane. The sensorgrams showed AmB concentration-dependent responses (Figure 6). AmB bound preferentially to sterol-containing liposomes as compared with

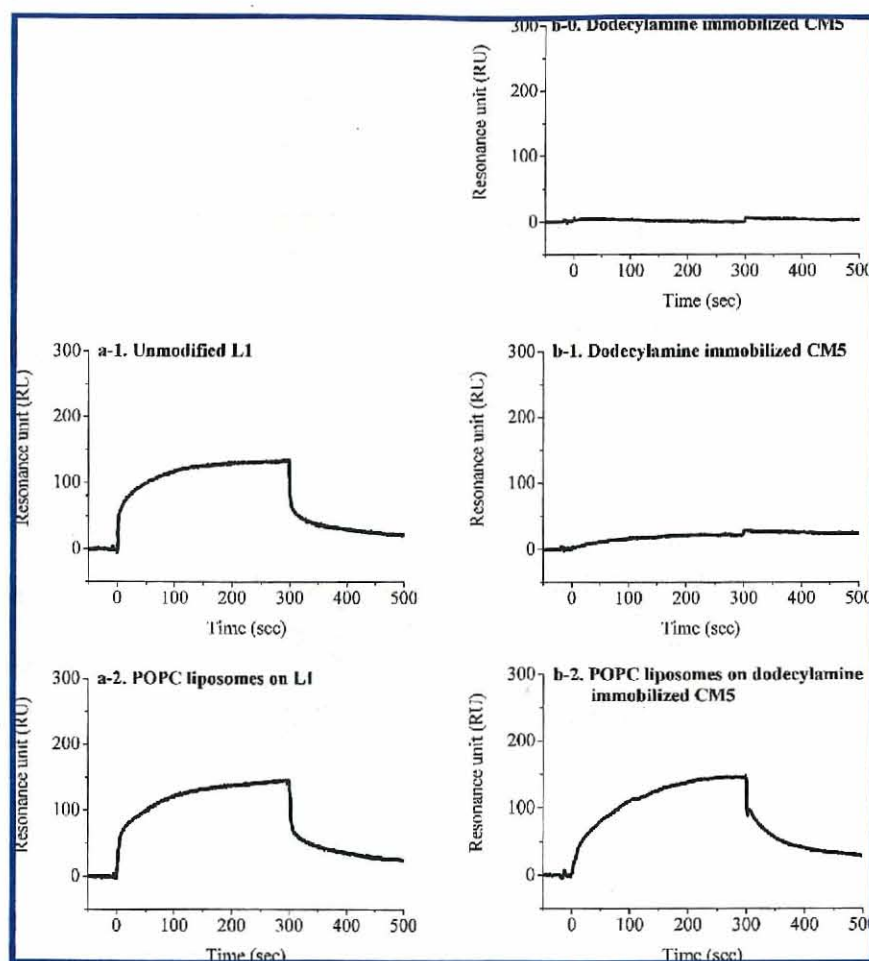


FIGURE 4: Binding of AmB (20 μM) to L1 (a-1 and a-2), unmodified CM5 (b-0), and modified CM5 (b-1 and b-2) sensor chips. Dodecylamine was immobilized on the chips of b-1 and b-2. The unmodified CM5 chip was run with the other lot of a CM5 chip; a similar sensorgram where the trace always stayed below 5 RU was obtained with the same chip that was used for b-1 and b-2.

those of pure POPC. These marked differences unambiguously demonstrate that the drug specifically interacts with liposomes but not with the dodecylamide moiety that was introduced to capture liposomes. Thus, the RU changes upon AmB addition are largely responsible for the drug–liposome interaction. Sensorgrams for 5, 20, and 50 μM AmB solutions are shown in Figure 6a with pure POPC liposomes, Figure 6b with 20% cholesterol-containing POPC liposomes, and Figure 6c with 20% ergosterol-containing POPC liposomes. These traces clearly revealed the dose-dependent binding of AmB, where either cholesterol or ergosterol significantly increased the level of AmB binding. We next carried out kinetic analysis of the drug's binding to membrane using ORIGIN for the distribution model and BIAevaluation software for the Langmuir binding and two-state reaction models. The distribution model fits excellently the experimental sensorgram in the initial 20 s as shown in Figure 7. The plots clearly reveal that AmB binds much more efficiently to sterol-containing POPC membranes and ergosterol further enhances membrane binding as compared with cholesterol. The partition coefficients thus determined were 110 for pure POPC liposomes, 401 for 20% cholesterol-containing ones, and 1330 for 20% ergosterol-containing ones at 20 μM AmB (Supporting Information, Table S1). On the other hand, the fitting using the distribution model for a longer time period did not work well, thus suggesting that

the partition coefficient depends on an amount of membrane-bound AmB (Supporting Information, Figure S1). In addition, the coefficient turned out to be influenced also by the concentration of AmB in the aqueous phase (Table S1); in particular, the association rate (k_1) markedly decreased as the concentration increased. This may be ascribed to the concentration-dependent formation of aggregates in the aqueous phase, whose size should significantly affect AmB binding to membranes. This characteristic feature of AmB prevents us from evaluating kinetic parameters in detail using the global fitting method, in which the parameters are usually determined by changing the concentration of an analyte (36).

Drug–Membrane Interactions As Analyzed by the Two-State Reaction Model. We then examined the other two models for their fitting to the experimental data. The Langmuir binding and two-state reaction models are based upon the stoichiometric interaction between ligands and a finite number of receptors (Figure 3). Both of the models closely mimic the experimental sensorgrams (Figure S2 of the Supporting Information). Since the two-state reaction model theoretically includes the Langmuir model (when $k_{a2} = 0$), we determine kinetic parameters of AmB binding to sterol-containing membranes on the basis of the two-state reaction model. Since the parameters appeared to depend on AmB concentration, we adopted sensorgrams at 20 μM AmB to obtain a better signal-to-

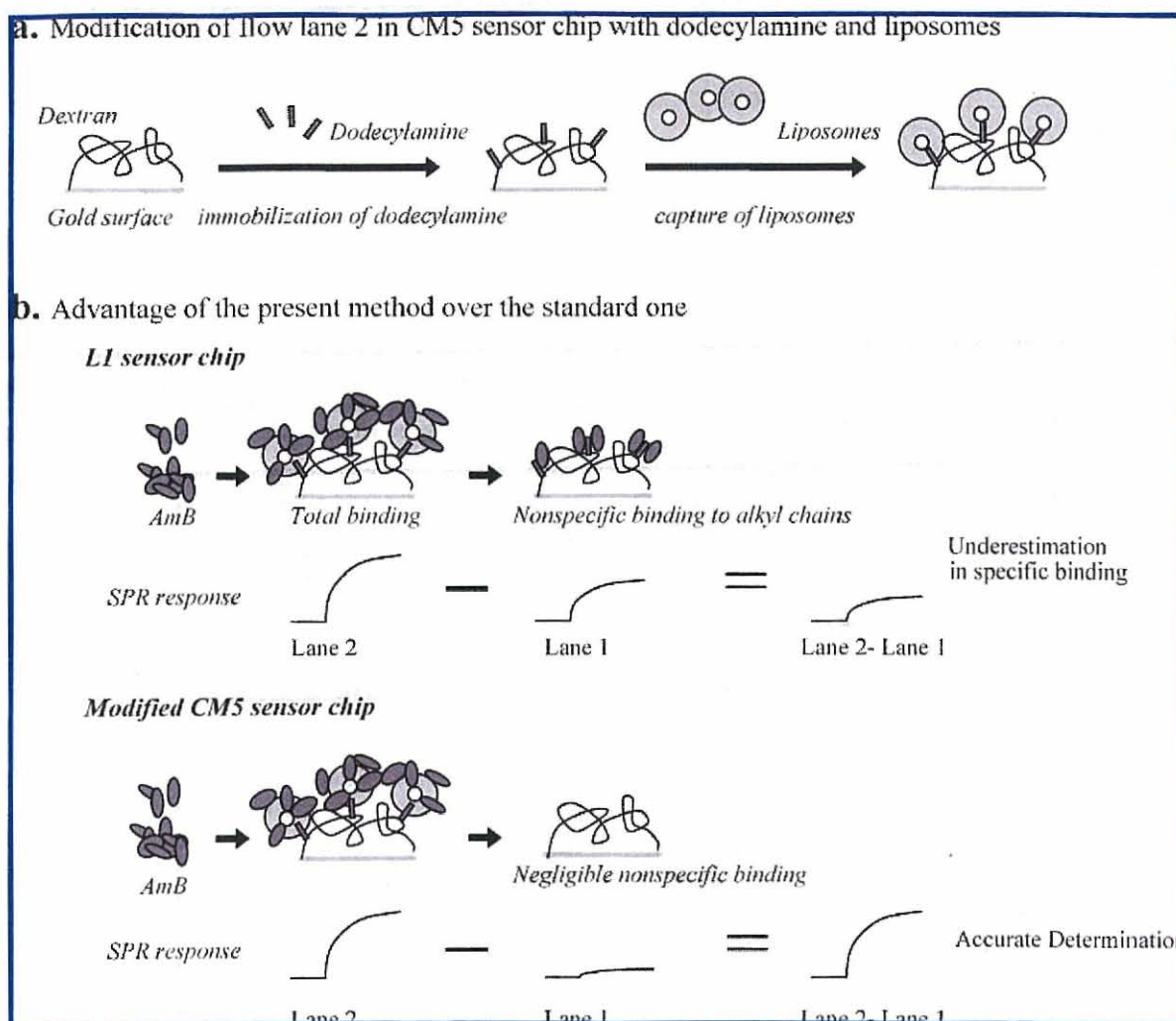


FIGURE 5: Schematic illustration of (a) modification of flow cell lane 2 in the CM5 sensor chip with dodecylamine and (b) the advantage of our method over the standard one. The alkyl chain in the L1 sensor chip showed significant nonspecific binding, yielding underestimated specific binding response (the middle scheme). There was negligible nonspecific binding in the CM5 sensor chip, yielding a more appropriate response for specific binding of AmB (the bottom scheme).

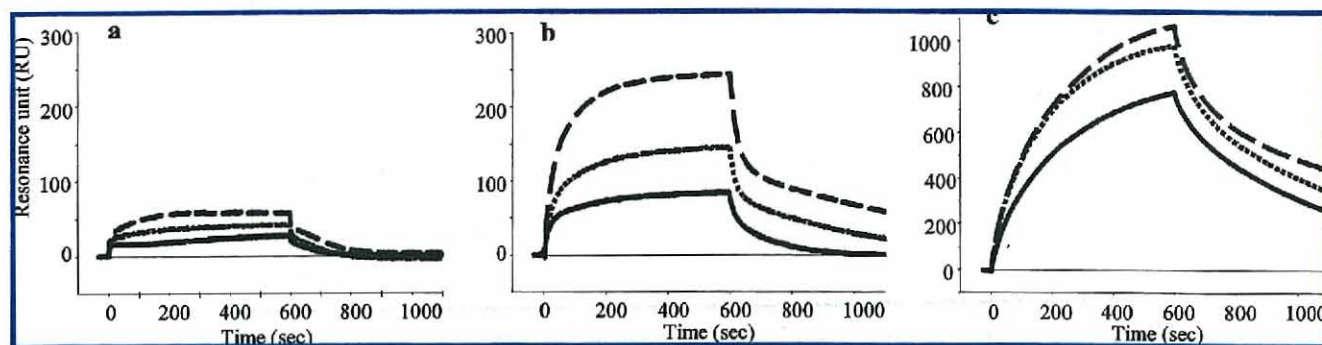


FIGURE 6: SPR sensorgrams for AmB binding to liposomes captured on the dodecylamine-modified CM5 sensor chip. (a) Pure POPC liposomes, (b) 20% cholesterol-containing POPC liposomes, and (c) 20% ergosterol-containing POPC liposomes were captured onto the dodecylamine-bound CM5 sensor chip: 5 (—), 20 (···), and 50 μ M AmB (---). Note the scale of the y-axis in panel c is different from that in panels a and b.

noise ratio and to reduce mass transport effects. In the two-state reaction model, two steps are assumed in formation of the ligand-bound complex; the first step represents the initial binding of AmB (A) to the liposome (B) by direct interaction between AmB and the head groups of POPC, and the second step corresponds to the insertion of AmB from the liposome interface into the liposome interior to form the other type of complex (AB*) that may correspond to an ion channel assembly as shown

in Figure 3c. Figure 8 shows curve fitting of the SPR sensorgrams to the two-state reaction model (in the top) and three components in the two-state reaction model (in the bottom). Table 1 lists kinetic constants obtained from the analysis of AmB binding to cholesterol- or ergosterol-containing POPC liposomes as well as those for the pure POPC membrane, where k_{d2} and k_{d2} could not be accurately determined due to low binding affinity of AmB. Interestingly, the ergosterol has drastic effects on binding

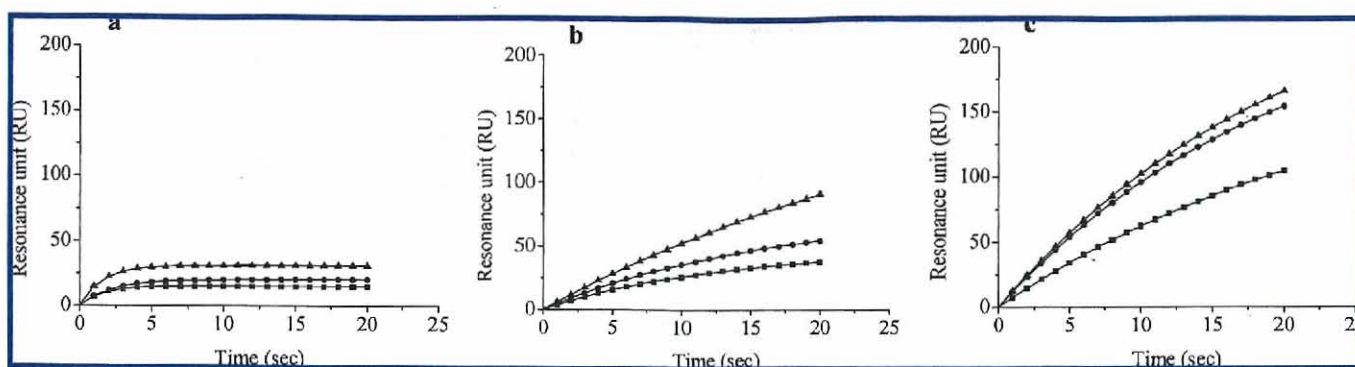


FIGURE 7: Curve fitting of the SPR sensorgrams to the distribution model: (a) pure POPC liposomes, (b) 20% cholesterol-containing POPC liposomes, and (c) 20% ergosterol-containing POPC liposomes. Experimental RU values were recorded for AmB concentrations of 5 (\blacksquare), 20 (\bullet), and 50 μ M (\blacktriangle) during the initial 20 s, and solid curves are theoretical ones based on the distribution model (Figure 3a).

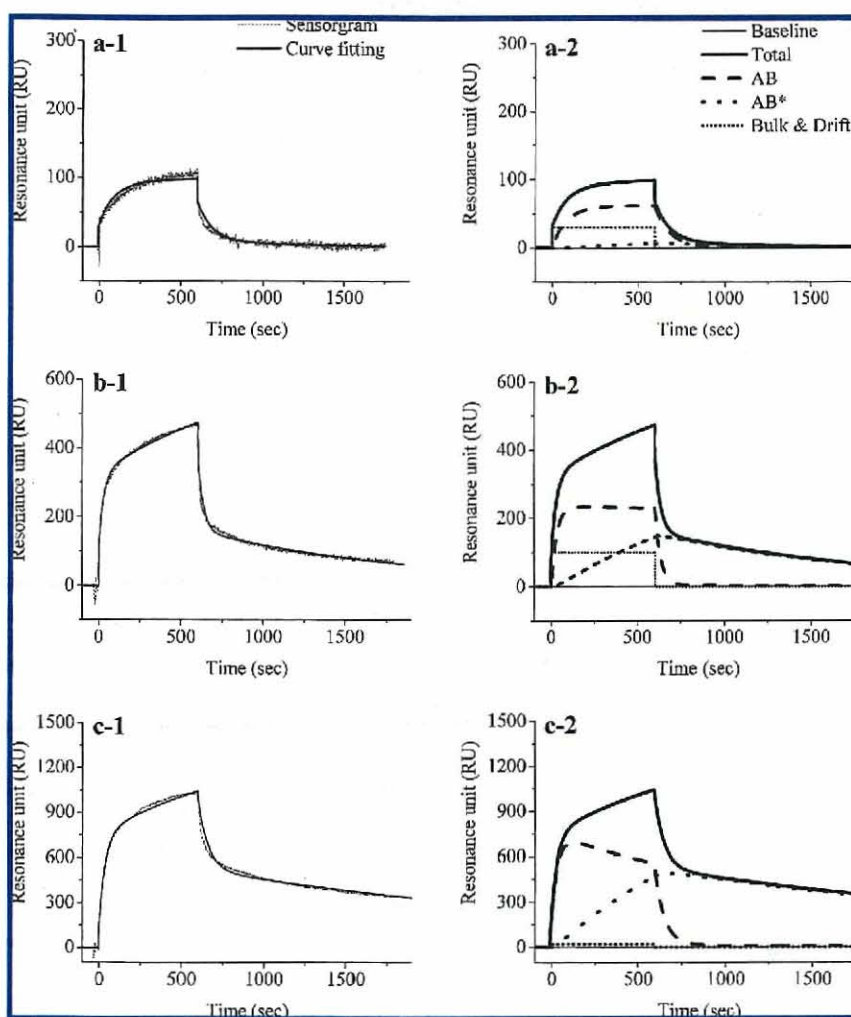


FIGURE 8: Curve fitting of the SPR sensorgrams to the two-state reaction model: (a) pure POPC liposome, (b) 20% cholesterol-containing POPC liposomes, and (c) 20% ergosterol-containing POPC liposomes. Experimental RU values were recorded for 20 μ M AmB. In the top traces, a-1, b-1, and c-1, experimental sensorgrams are presented as dashed lines and theoretical curves as solid lines. In the bottom traces, a-2, b-2, and c-2, three components in the two-state reaction model are separated: (—) total, (---) AB, (····) bulk effect of the solvent, and (— · —) AB*. Note the scales of the y-axis are different.

of AmB to membrane and the stability of the membrane-bound complex, AB*, as revealed by k_{a1} and k_{d2} , respectively.

DISCUSSION

In this study, we aimed to establish a simple and quick method that could be utilized in the screening of membrane-active agents. Several SPR studies have been carried out

for detecting interactions of antimicrobial peptides and lipid bilayer membranes (32–34), most of which adopted HPA and/or L1 sensor chips. In our experiments, the strong nonspecific binding of AmB hampered the use of the L1 chip, chiefly due to the strong amphiphilicity of an AmB molecule, where hydrophobic polyene and hydrophilic polyol faces are clearly segregated. We built a novel sensor chip by modifying a CM5 sensor chip with

Table 1: Kinetic and Affinity Constants for Interaction between AmB (20 μ M) and Sterol-Containing POPC Liposomes Obtained from the Two-State Reaction Model^a

liposome/sterol	k_{a1} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{d1} ($\times 10^{-2} s^{-1}$)	k_{a2} ($\times 10^{-3} s^{-1}$)	k_{d2} ($\times 10^{-5} s^{-1}$)	K_{A1} ($\times 10^4 M^{-1}$)	K_{A2}	K_A ($\times 10^4 M^{-1}$)
POPC	29.2	1.14	—	—	0.256	—	—
9:1 POPC/cholesterol	73.1	2.10	1.84	110	0.348	1.67	0.581
8:2 POPC/cholesterol	118	2.91	1.37	79.0	0.405	1.73	0.701
9:1 POPC/ergosterol	307	1.18	1.50	49.6	2.60	3.02	7.85
8:2 POPC/ergosterol	579	1.30	1.29	18.6	4.45	6.94	30.9

^a The association rate constants (k_{a1} and k_{a2}), the dissociation rate constants (k_{d1} and k_{d2}), and the equilibration constants K_{A1} (k_{a1}/k_{d1}), K_{A2} (k_{a2}/k_{d2}), and K_A ($k_{a1}/k_{d1} \times k_{a2}/k_{d2}$).

dodecylamine in one of the two flow cell lanes, which markedly reduced the level of nonspecific binding of AmB. With this sensor chip in hand, we succeeded in selectively observing the interaction of AmB with sterols embedded in lipid bilayers. To the best of our knowledge, this is the first example of SPR observation of AmB–membrane interactions. We also demonstrated that AmB has higher affinity for ergosterol-containing POPC liposomes than cholesterol-containing ones (Figures 6 and 7), which is consistent with previous reports (22, 37–39). We performed the SPR experiments at 25 °C where POPC liposomes were in the fluid phase and sterols increased the order of POPC lipid bilayers (40). Thus, the enhanced affinity for sterol membranes can be ascribed to not only direct interactions as described later but also, in part, the previous observation that AmB has a higher affinity for ordered membranes than disordered ones (37, 41). The efficacious concentration of the drug is assumed to be at the submicromolar level, where the distribution model is potentially applicable. The markedly high affinity for ergosterol membranes, which was demonstrated in a real-time and direct manner in this study, supports the previous observations chiefly obtained from measurements of ion permeability across membranes or UVCD spectra (22, 37–39, 42).

We attempted to determine kinetic parameters implicated in formation of the AmB complex from the SPR experiments. We fitted sensorgrams to three different models which were usually used for membrane systems. Theoretical curves from the distribution model mimicked the experimental sensorgrams very closely during the initial 20 s (Figure 7). Fitting over a longer period with the distribution model, however, did not work well. We next compared the other two models (Figure 3b,c) which were expected to account for the drug–membrane interactions in a more realistic manner. The two-state reaction model provided significantly closer fitting, particularly for sterol-containing POPC liposomes (Figure S2). We thus hypothesized the presence of another state for AmB upon interaction with lipid bilayer membranes (Figure 9). Recently, the interaction between melittin and lipid bilayer membranes was observed by SPR experiments using HPA and LI sensor chips and analyzed with the two-state reaction model (34); melittin first binds to the outer membrane surface mainly by electrostatic interactions, then penetrates into the hydrophobic interior of lipid bilayers, and eventually forms transmembrane pores by self-assembling into oligomers (34). AmB is also known to form an ion-permeable channel, where several molecules of the drugs assemble into an ion channel complex with ergosterol but form a different type of sterol-free channel in a cholesterol-containing membrane (42). We

have previously disclosed that AmB elicits an all-or-none type K^+ flux in ergosterol-containing PC liposomes, implying the presence of highly conductive and stable ion channels (43). In either pure PC or cholesterol-containing PC liposomes, however, less conductive ion channels are dominantly formed (43). These previous findings agree well with our results which show that the second complex AB* assumed in the two-state reaction model is stable in the ergosterol-containing POPC liposomes; the kinetic parameters estimated in Table 1 imply that the AmB assembly in the ergosterol membrane dissociates slowly (Figure 9). It has been suggested in the previous study by Bolard et al. that the CD spectrum of membrane-bound AmB is being gradually changed over hours (44) and in the electrophysiological study that the mean opening time of AmB channels is markedly longer in ergosterol membranes than in cholesterol ones (45). These observations for ergosterol membranes support the direct involvement of ergosterol in AmB assemblies (22, 43, 46, 47). Moreover, the formation of complex AB*, which may be implicated in conductive ion channels, is approximately 1 or 2 orders of magnitude higher in ergosterol membranes than in cholesterol ones as depicted by the K_A values in Table 1. This difference agrees well with the different magnitudes of ion conductivity of AmB between ergosterol and cholesterol membranes (22). The higher affinity of AmB for ergosterol as opposed to cholesterol is caused by minute differences in their structures; one is a hydrogen bond between the 3β -OH group of sterol and the amino sugar moiety of AmB either directly or mediated by water molecules (10, 22, 48, 49), and the other is a van der Waals contact between AmB heptaene chromophore and hydrophobic steroid rings (46, 48, 50). The high affinity of AmB for ergosterol over cholesterol is explained by the presence of an additional conjugated double bond, which allows the molecular proximity necessary to maximize the van der Waals interactions with AmB (10, 50). The K_A value of AmB in 20% ergosterol-containing membranes exceeds that in the cholesterol counterpart by 40-fold (Table 1), which roughly corresponds to 2.3 kcal/mol. This energy stabilization may be derived from the difference in the van der Waals force between AmB and ergosterol and between AmB and cholesterol.

In conclusion, we devised a new SPR sensor chip which enabled capture of PC liposomes and facilitated kinetic analysis of interactions between AmB and phospholipid membranes. Furthermore, we were able to investigate the effects of membrane constituents on the affinity of AmB by changing the species and concentration of sterols. Our method will open the way to highly efficient screening of

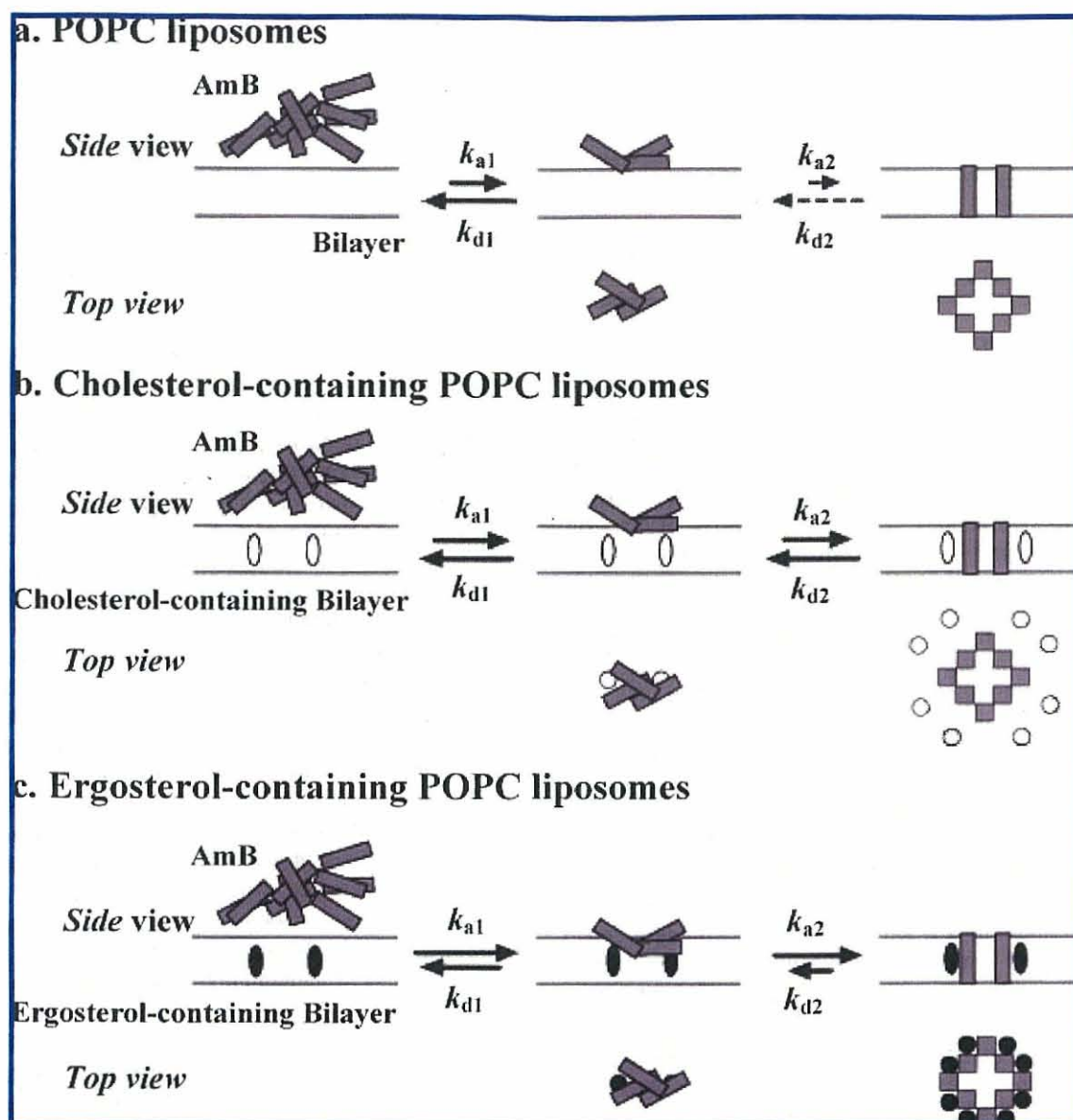


FIGURE 9: Hypothetical schemes of sterol effects as implied by the SPR results. Dynamic processes of AmB–POPC/sterol interaction can be summarized as shown in the following cases: (a) pure POPC liposomes, (b) cholesterol-containing POPC liposomes, and (c) ergosterol-containing POPC liposomes. The lengths of the arrows correspond to the magnitudes of the rate constants. The higher affinity of AmB for ergosterol-containing POPC membranes is largely ascribed to a higher association rate k_{a1} in binding to membrane and a lower dissociation rate k_{d2} in disassembling of the second complex AB*. Detailed accounts of these schemes are described in the text.

membrane-active agents and their binding affinity for biologically relevant membranes.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Toshiyuki Yamaguchi in our laboratory for discussion.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Equations and descriptions of interaction models and additional sensorgrams used for fitting to interaction models. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Gallis, H. A., Drew, R. H., and Pickard, W. W. (1990) Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* 12, 308–329.
- Hann, I. M., and Prentice, H. G. (2001) Lipid-based amphotericin B: A review of the last 10 years of use. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 161–169.
- Gold, W., Stout, H. A., Pagano, J. F., and Donovio, R. (1955) Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.*, 579–586.
- Stenberg, T. H., Wright, E. T., and Oura, M. (1956) A new antifungal antibiotic, amphotericin B. *Antibiot. Annu.*, 566–573.
- Mechlinski, W., Schaffner, C. P., Ganis, P., and Avitabile, G. (1970) Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B. *Tetrahedron Lett.* 44, 3873–3876.
- Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W., and Scaffer, C. P. (1971) Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4560–4564.
- Bolard, J. (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* 864, 257–304.
- Hartel, S. C., and Bolard, J. (1996) Amphotericin B: New life for an old drug. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 445–449.
- De Kruijff, B., and Demel, R. A. (1974) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and Lecithin

- liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complex. *Biochim. Biophys. Acta* 339, 57–70.
10. Baginski, M., Resat, H., and Borowski, E. (2002) Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1567, 63–78.
11. Readio, J. D., and Bittman, R. (1982) Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols. *Biochim. Biophys. Acta* 685, 219–224.
12. Vertut-Croquin, A., Bolard, J., Chabbert, M., and Gary-Bobo, C. (1983) Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochemistry* 22, 2939–2944.
13. Milhaud, J., Hartmann, M., and Bolard, J. (1989) Interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with model membranes: Differences between small and large unilamellar vesicles. *Biochimie* 71, 49–56.
14. Vertut-Croquin, A., Bolard, J., and Gary-Bobo, C. M. (1984) Enhancement of amphotericin B selectivity by antibiotic incorporation into gel state vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 360–366.
15. Matsumori, N., Yamaji, N., Matsuoka, S., Oishi, T., and Murata, M. (2002) Amphotericin B covalent dimers forming sterol-dependent ion-permeable membrane channels. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4180–4181.
16. Yamaji, N., Matsumori, N., Matsuoka, S., Oishi, T., and Murata, M. (2002) Amphotericin B dimers with bisamide linkage bearing powerful membrane-permeabilizing activity. *Org. Lett.* 4, 2087–2089.
17. Matsumori, N., Masuda, R., and Murata, M. (2004) Amphotericin B covalent dimers bearing a tartrate linkage. *Chem. Biodiversity* 1, 346–352.
18. Matsuoka, S., and Murata, M. (2003) Membrane permeabilizing activity of amphotericin B is affected by chain length of phosphatidylcholine added as minor constituent. *Biochim. Biophys. Acta* 1617, 109–115.
19. Matsuoka, S., Matsumori, N., and Murata, M. (2003) Amphotericin B-phospholipid covalent conjugates: Dependence of membrane-permeabilizing activity on acyl-chain length. *Org. Biomol. Chem.* 1, 3882–3884.
20. Matsuoka, S., Ikeuchi, H., Matsumori, N., and Murata, M. (2005) Dominant formation of a single-length channel by amphotericin B in dimyristoylphosphatidylcholine membrane evidenced by ^{13}C - ^{31}P rotational echo double resonance. *Biochemistry* 44, 704–710.
21. Matsumori, N., Eiraku, N., Matsuoka, S., Oishi, T., Murata, M., Aoki, T., and Ide, T. (2004) An amphotericin B-ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chem. Biol.* 11, 673–679.
22. Matsumori, N., Sawada, Y., and Murata, M. (2005) Mycosamine orientation of amphotericin B controlling interaction with ergosterol: Sterol-dependent activity of conformation-restricted derivatives with an amino-carbonyl bridge. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 10667–10675.
23. Cybulska, B., Gadowska, I., Mazerski, J., Grzybowski, J., Borowski, E., Cheron, M., and Bolard, J. (2000) *N*-Methyl-*N*-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MF-AMB), a novel antifungal agent of low toxicity: Monomer/micelle control over selective toxicity. *Acta Biochim. Pol.* 47, 121–131.
24. Sedlak, M., Buchta, V., Kubicek, L., Simunek, P., Holcapek, M., and Kasparova, P. (2001) Synthesis and characterization of a new amphotericin B-methoxy polyethylene glycol conjugate. *Bioorg. Med. Lett.* 11, 2833–2835.
25. Chen, W. C., and Bittman, R. (1977) Kinetics of association of amphotericin B with vesicles. *Biochemistry* 16, 4145–4149.
26. Balon, K., Riebeschl, B. U., and Müller, B. W. (1999) Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm. Res.* 16, 882–888.
27. Abraham, T., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (2005) Isothermal titration calorimetry studies of the binding of the antimicrobial peptide gramicidin S to phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry* 44, 11279–11285.
28. Zhao, L., Feng, S.-S., Kocherginsky, N., and Kostetski, I. (2007) DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *Int. J. Pharm.* 338, 258–266.
29. Panicker, L. (2008) Interaction of propyl paraben with dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer: A differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance study. *Colloids Surf., B* 61, 145–152.
30. Myszk, D. G., and Rich, R. L. (2000) Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 310–317.
31. Danelian, E., Karlén, A., Karlsson, R., Winiwarter, S., Hansson, A., Löfås, S., Lennernäs, H., and Hämäläinen, M. D. (2000) SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: Correlation with fraction absorbed in humans. *J. Med. Chem.* 43, 2083–2086.
32. Abdiche, Y. N., and Myszk, D. G. (2004) Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore. *Anal. Biochem.* 328, 233–243.
33. Papo, N., and Shai, Y. (2003) Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: Differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry* 42, 458–466.
34. Mozzolits, H., Wirth, H.-J., Werkmeister, J., and Aguilar, M.-I. (2001) Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 64–76.
35. Hervé, M., Debouzy, J. C., Borowski, E., Cybulska, B., and Gary-Bobo, C. M. (1989) The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A phosphorus-31 NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 980, 261–272.
36. Morton, T. A., Myszk, D. G., and Chaiken, I. M. (1995) Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: A comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal. Biochem.* 227, 176–185.
37. Coutinho, M., and Prieto, M. (1995) Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: A time-resolved fluorescence study. *Biophys. J.* 69, 2541–2547.
38. Castanho, M. A. R. B., Prieto, M., and Jameson, D. M. (1999) The pentaene macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: A fluorescence pressure dependence study. *Biochim. Biophys. Acta* 1419, 1–14.
39. Bolard, J., Vertut-Croquin, A., Cybulska, B. E., and Gary-Bobo, C. M. (1981) Transfer of the polyene antibiotic amphotericin B between single-walled vesicles of dipalmitoylphosphatidylcholine and egg-yolk phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 647, 241–248.
40. Hubbell, W. L., and McConnell, H. M. (1971) Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 314–326.
41. Matsuoka, S., and Murata, M. (2002) Cholesterol markedly reduces ion permeability induced by membrane-bound amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 429–434.
42. Bolard, J., Legrand, P., Heitz, F., and Cybulska, B. (1991) One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry* 30, 5707–5715.
43. Matsumori, N., Umegawa, U., Oishi, T., and Murata, M. (2005) Bioactive fluorinated derivative of amphotericin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3565–3567.
44. Bolard, J., Seigneuret, M., and Boudet, G. (1980) Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. Lipid state and cholesterol content dependence. *Biochim. Biophys. Acta* 599, 280–293.
45. Brutyan, R. A., and McPhic, P. (1996) On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 107, 69–78.
46. Kasai, Y., Matsumori, N., Umegawa, Y., Matsuoka, S., Ueno, H., Ikeuchi, H., Oishi, T., and Murata, M. (2008) Self-assembled amphotericin B is probably surrounded by ergosterol: Biomolecular interactions as evidenced by solid-state NMR and CD spectra. *Chem.—Eur. J.* 14, 1178–1185.
47. Fournier, I., Barwicz, J., and Tancrede, P. (1998) The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: A differential scanning calorimetry study. *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 76–86.
48. Baran, M., and Mazerski, J. (2002) Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water. *Biophys. Chem.* 95, 125–133.
49. Langlet, J., Berges, J., Caillet, J., and Demarret, J.-P. (1994) Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 79–93.
50. Baginski, M., and Borowski, E. (1997) Distribution of electrostatic potential around amphotericin B and its membrane targets. *THEOCHEM* 389, 139–146.

謝辞

本研究は、平成 18 年度から平成 20 年度にかけて、大阪大学大学院理学研究科化学専攻生体分子化学研究室において行われました。本研究を進めるにあたり、大変多くの方々にご指導とご協力をいただいた方々に、ここで感謝の辞を述べさせていただきます。

研究を行う機会を与えてくださり、親身にご指導を賜りました本研究室 村田道雄教授に深く感謝いたします。

本論文作成にあたり、副査として多くのご助言を頂きました、本学蛋白質研究所 相本三郎教授、本学産業科学研究所 中谷和彦教授、並びに本学理学研究科化学専攻 小川琢治教授に深く感謝致します。

有機合成化学の基礎を教えていただき、また有益なご助言をくださいました本研究室 大石 徹准教授に感謝いたします。研究の進め方や論文作成に関して、貴重なご助言をいただきました東北大学大学院農学研究科 此木敬一准教授ならびに本研究室 松森信明助教に深く感謝いたします。

貴重な合成フラグメントをご恵与くださり、誘導反応に関する適切なご助言を賜りました東京大学先端科学技術研究センター 鳥飼浩平博士に感謝いたします。渦鞭毛藻の培養、イエッソトキシンの抽出ならびに本研究を行うにあたり多大なご助言をくださいました本研究室 氏原 悟修士に心から感謝いたします。また数々のご助言を賜りました東北大学大学院生命化学研究科 葛西祐介博士、本研究室 梅川雄一博士、松下直広博士、高野哲郎修士ならびに山口敏幸修士に感謝いたします。また、有意義な研究室生活を支えてくださいました本研究室の皆様感謝いたします。

また、山口大学在籍時において様々な方々にお世話になりました。4 年次の 1 年間御指導いただきました西脇太郎三衛門名誉教授、博士前期課程の 2 年間にわたり御指導いただきました杉原美一名誉教授、阿部憲孝教授ならびに村藤俊宏准教授には、有機化学や研究への取り組み方について色々と教えていただきました。

進学のお機曾を与えて頂き、常に有形無形の後押しをくださいました財団法人 日本食品分析センター 栄養科学部 五十嵐友二部長に感謝いたします。同じく進学のお機曾を与えてくださいました同センター 齋藤文一理事長ならびに丹野憲二専務理事をはじめ理事の皆様に感謝いたします。また多忙な時期であったにもかかわらず、快く送り出してくださいました同センター ビタミン分析課の皆様にらびに出向中様々なご支援をいただきました大阪支所 総務課の皆様に感謝いたします。

また、いつも暖かく激励し支えてくださいました私の両親に感謝いたします。

最後に、不在にすることが多かった家庭を切り盛りし、いつも激励してくださいました妻 綾子、ならびに私に最高の元氣を与えてくれた長女 幸、長男 真に感謝いたします。

