

Title	固体NMRを用いた脂質二重膜中アンフォテリシンB複合体の分子間相互作用解析
Author(s)	梅川, 雄一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/49708
rights	Reprinted with permission from Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, and Michio Murata. Ergosterol Increases the Intermolecular Distance of Amphotericin B in the Membrane-Bound Assembly As Evidenced by Solid-State NMR. <i>Biochemistry</i> 2008 47 (51), 13463-13469 DOI: 10.1021/bi801875y. Copyright 2008 American Chemical Society.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【42】				
氏 名	うめ	がわ	ゆう	いち
	梅	川	雄	一
博士の専攻分野の名称	博 士（理 学）			
学 位 記 番 号	第 2 2 6 7 6 号			
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日			
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
	理学研究科化学専攻			
学 位 論 文 名	固体 NMR を用いた脂質二重膜中アンフォテリシン B 複合体の分子間相互作用解析			
論 文 審 査 委 員	(主査)			
	教 授 村田 道雄			
	(副査)			
	教 授 深瀬 浩一 教 授 藤原 敏道			

論 文 内 容 の 要 旨

アンフォテリシン B (AmB, 図 1-a) は抗真菌薬として広く感染症治療に用いられており、その活性は細胞膜中で AmB とステロールが形成するイオン透過性チャネル複合体に由来する。また、ヒト細

胞膜に含まれるコレステロール(図 1-b)よりも、真菌細胞膜に含まれるエルゴステロール(図 1-c)と強く相互作用することで選択毒性を発現すると考えられている。しかし、このチャネル複合体の詳細な構造については未だに解明されていない。近年このような脂質膜における構造解析の手法として固体 NMR が用いられており、特に $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR 法は標識原子間の距離測定に有用であることから、構造解析の強力な手段となる。そこで本研究では、 ^{13}C と ^{19}F で標識した AmB とステロール分子を用いた分子間 REDOR 測定により観測対象の相互作用を選択的に解析することを試みた。

1. AmB-AmB 分子間相互作用の解析

まず、 ^{13}C -AmB と ^{19}F -AmB を用いた AmB 分子間 REDOR 測定を行い、チャネル複合体のコアとなる AmB 分子間の相互作用を解析した。その結果、リン脂質に POPC を用いた場合、ステロール非含有膜では AmB 分子が平行に隣り合った”head-to-head”の配向と、反平行に隣り合った”head-to-tail”の配向の 2 種類が混在していることが明らかになった。一方、コレステロールおよびエルゴステロール含有膜では”head-to-head”配向が優位であった。また、REDOR 減衰の割合から AmB 分子間距離を求める、2 Å 程度増加していることが明らかになった。さらに、エルゴステロール含有膜においてのみ、AmB-POPC 間の REDOR 減衰が観測され、この 2 分子間の相互作用が安定に存在することが示唆された。また、エルゴステロールによる AmB 分子間の距離の増加は UV スペクトル測定によっても観測された。さらに、POPC リポソームに対する AmB のチャネル活性試験の結果を加味することで、脂質-AmB の相互作用を次のように推定した。すなわち、ステロール非含有膜では AmB と膜との相互作用が弱いため AmB は水中でミセルを形成し、活性を発現しない。コレステロール含有膜では AmB は膜に進入するものの、強く自己会合することで、周りのコレステロールやリン脂質から分離し、明確なチャネルの形成が起こらない。一方、エルゴステロール膜中では AmB-エルゴステロール-POPC のチャネル複合体が形成されており、この複合体が薬理活性の本体であると考えられる。

また、リン脂質に DMPC を用いた場合は POPC と異なり、エルゴステロールの有無にかかわらず”head-to-head”と”head-to-tail”の相互作用が観測された。これは AmB と DMPC の親和性が高く、ミセル状態で膜中に取り込まれた結果であると考えられる。また、DMPC 膜と POPC 膜ではエルゴステロールの効果が異なり、DMPC 膜ではエルゴステロールは AmB と複合体を形成せず、DMPC 膜の相状態を変化させることで 2 次的に AmB 会合体の構造を変化させている可能性が示唆された。

2. AmB-エルゴステロールの分子間相互作用解析

薬理活性に重要であるエルゴステロール含有膜中での相互作用に着目し、標識化 AmB と標識化エルゴステロールを用いた AmB-エルゴステロールの分子間 REDOR 測定を行い、より詳細な構造解析を行った。その結果、初めて AmB-エルゴステロール分子間の REDOR 測定に成功し、エルゴステロールが直接 AmB 分子と相互作用していることを示した。また、AmB-エルゴステロール間の配向には、従来想定されていた”head-to-head”の配向に加え、”head-to-tail”の配向も存在していることが示唆された(図 1-d)。さらに分子動力学計算を用いて、AmB-エルゴステロール、AmB-リン脂質の相互作用を検証し、固体 NMR 測定から考えられるモデル構造の妥当性を示すことができた。

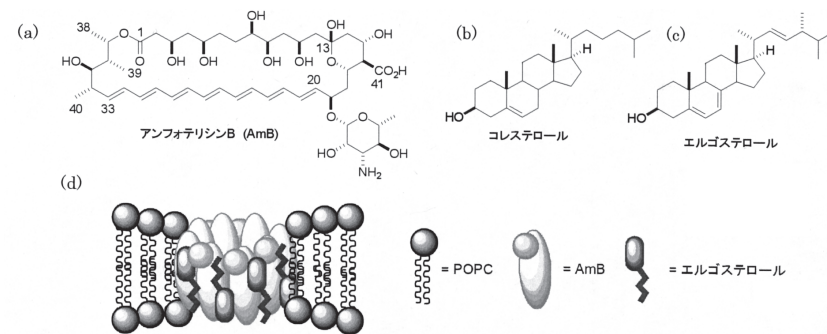


図 1 AmB(a)、コレステロール(b)、エルゴステロール(c)の化学構造と
AmB-エルゴステロール-POPC 複合体のモデル(d)

AmB のヘッドグループ側にエルゴステロールの側鎖が近接したものと、ヒドロキシ基が近接した 2 種類の配向が存在し、AmB の近傍の POPC はインターディジット構造をしている。

論文審査の結果の要旨

アンフォテリシン B (AmB) は抗真菌薬として広く感染症治療に用いられており、その活性は細胞膜中で AmB とステロールが形成するイオン透過性チャネル複合体に由来する。また、ステロールに対する親和性の違いによって選択毒性を発現すると考えられているが、詳細については未解明の部分が多い。近年このような脂質膜中における構造解析の手法として固体 NMR が用いられており、特に $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR 法は標識原子間の距離を求めるための強力な手段となる。そこで本研究では、 ^{13}C と ^{19}F で標識した AmB とステロール分子を用いた分子間 REDOR 測定により分子間相互作用の評価が行われている。

まず、 ^{13}C -AmB と ^{19}F -AmB を用いた AmB 分子間 REDOR 測定によって、チャネル複合体における AmB 分子間の相互作用が解析された。その結果、コレステロールおよびエルゴステロール含有膜では”head-to-head”配向が優位であることが明らかとなった。また、REDOR 減衰の割合から AmB 分子間距離を求めると、エルゴステロール膜では約 12 Å となり、コレステロール含有膜中に比べ、2 Å 程度増加していることが明らかになった。さらに、エルゴステロール含有膜においてのみ、AmB-リン脂質間の相互作用が観測され、この 2 分子間の相互作用が安定に存在することが示唆された。これらステロールの有無や種類による AmB 会合体の構造変化は UV スペクトル測定においても観測された。薬理活性に重要であるエルゴステロール含有膜中での構造に着目し、標識化 AmB と標識化エルゴステロールを用いた REDOR 測定が行われ、詳細な構造解析結果が得られた。その結果、初めて AmB-エルゴステロール間の分子間相互作用の R 測定に成功し、エルゴステロールが直接 AmB 分子と接していることが示された。AmB-エルゴステロール間の配向には、従来想定されていた”head-to-head”の配向に加え、”head-to-tail”の配向も存在していることが示唆された。さらに分子動力学計算を用いて、AmB-エルゴステロール、AmB-リン脂質の相互作用を検証し、固体 NMR 測定から考えられるモデル構造の妥当性を示すことができた。これらの結果は、従来困難視されていた膜中の複合体について、固体 NMR を用いることによって正確に解析できることを初めて実験的に示した例と言える。以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として十

分価値あるものと認める。