The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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. Biochemistry 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

理甲 13165

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

平成 20 年度

学位論文

梅川　雄一

化学専攻

大阪大学大学院理学研究科

目次

第 1 章　序論
1-1　アンフォテリシン B　1
1-2　活性発現機構と樽板モデル　4
1-3　AmB のステロール選択性と会合体の構造解析　5
1-4　固体 NMR　8
1-5　固体 NMR の生体膜への応用　14
1-6　アンフォテリシン B への適用　15
1-7　本研究の目的　19
参考文献　21

第 2 章　AmB-AmB 分子間相互作用の解析
2-1　REDOR 法により AmB 分子間相互作用解析を行うにあたって　24
2-2　標識体と固体 NMR 測定用サンプルの調製　25
2-3　[tri-^{13}C]AmB と 14-F AmB を用いた
^{3}C{^{19}F}REDOR 測定による AmB 分子間距離測定　27
2-4　全標識 AmB を用いた ^{13}C{^{19}F}RDX 測定による
AmB 分子間の距離測定　37
2-5　POPC 膜中での UV 吸収スペクトル測定　40
2-6　POPC 膜中での AmB のチャネル活性試験　43
2-7　AmB-AmB 相互作用と活性発現機構　45
実験項　48
参考文献　60
補章
距離計算の補足　62
SIMPSON input files　67

第 3 章　AmB-エルゴステロールの分子間相互作用解析
3-1　AmB とエルゴステロールの分子間相互作用　73
3-2　標識体の調製　74
3-3　14-F AmB/^{13}C-Ergosterol/POPC の ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定　74

3-4　[U-^{13}C]AmB/6-F-Ergosterol/POPC の ^{13}C{^{19}F}RDX 測定　78
3-5　AmB-Ergosterol の相互作用　82
3-6　分子動力学計算によるエルゴステロール-POPC 膜中での複合体モデルの検証　83
実験項　90
参考文献　96

第 4 章　リン脂質に DMPC を用いた場合の AmB 分子間相互作用の解析
4-1　AmB と DMPC の相互作用　98
4-2　14-F AmB と[tri-^{13}C]AmB の分子間 REDOR 測定　98
4-3　UV スペクトル測定　101
4-4　DMPC 膜中での AmB 会合体とエルゴステロールの相互作用　103
4-5　DMPC と POPC の比較とステロールの役割　105
実験項　108
参考文献　112

第 5 章　結論　113

スペクトル　115

謝辞　212

付録　213

略語表

AmB	amphotericin B
CD	circular dichroism
CP	cross polarization
DLC	double length channel
DLPC	dilauroyl phosphatidylcholine
DMF	*N*, *N*-dimethylformamide
DMPC	dimyristoyl phosphatidylcholine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSPC	distearoyl phosphatidylcholine
EDTA	*N*, *N*, *N'*,*N'*-ethylenediaminetetraaceticacid
EggPC	egg yolk phosphatidylcholine
ESI	electrospray ionization
FCCP	carbonyl cyanid-*p*-trifluoro-methoxyphenyl hydrazone
Fmoc-	9-fluorenylmethylsuccinimidylcarbonate
GROMACS	groningen machine for chemical simulations
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
LVU	large unilamellar vesicles
MAS	magic angle spinning
MD	molecular dynamics
MLV	multi lamellar vesicles
NMR	nuclear magnetic resonance
ODS	octadecylsilica
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
RDX	REDOR for X clusters
REDOR	rotational echo double resonance
SIMPSON	a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy
SLC	single length channel
SPR	surface plasmon resonance
TMS	trimethylsilyl

THF	tetrahydrofuran
TPPM	two pulse phase modulation
UV	ultraviolet-visible

第 1 章　序論

1-1 アンフォテリシン B

1-1-a　ポリエン系抗生物質であるアンフォテリシン B

真菌による感染症は、癌治療や臓器移植に伴う免疫抑制剤の使用、HIV 感染による免疫機能の低下といった観点から近年大きな問題となっている。しかし、真菌はヒトと同じく真核生物であるために、優れた選択毒性を発揮できる生理的ターゲットが少ない。そのため抗真菌薬の開発は抗菌剤に比べて遅れている。さらに、薬剤に耐性を持つ病原菌の増加、拡散により、より効果的で信頼のおける抗真菌剤が求められている。

ポリエンマクロライド化合物はその強い抗真菌活性や、幅広い抗菌スペクトルを示すことから、現在に至るまで最もよく用いられてきた抗真菌剤である。また耐性菌の出現頻度が低いことも特徴に挙げられる。現在では抗真菌活性を示すポリエンマクロライド化合物は 200 種以上発見されており、一部は実際の感染症治療に用いられている [1)] (図 1-1)。しかし、同時に強い副作用を示すことが使用上の限界となっている。

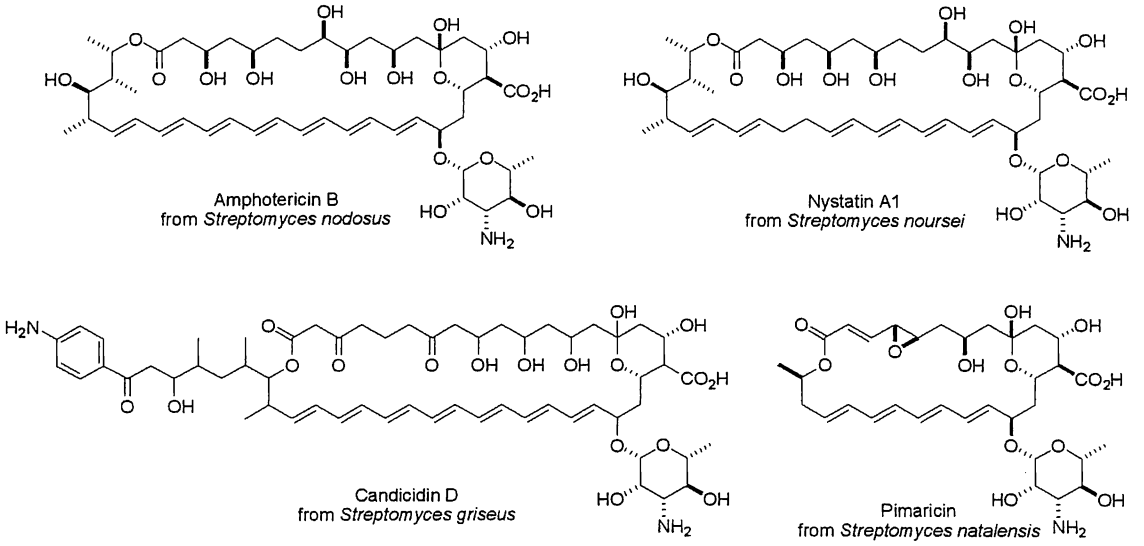


図 1-1　感染症治療に用いられるポリエンマクロライド抗生物質

アンフォテリシン B[2)]（AmB, 図 1-1）はポリエンマクロライド系化合物に属する抗生物質で、1955 年に放線菌 *Streptomyces nodosus* から単離された[3)]。1956 年に抗真菌活性が確認され[3)]、更に 1959 年には感染症治療への適用例が報告された[4)]。AmB の全立体構造は 1971 年に *N*-iodoacetyl 誘導体の X 線解析により明らかとなった[5)]。これ以降 AmB の活性本体の解明に向けた研究が行われるようになり、De Kruijff らは AmB の構造から樽板モデルを提唱し[6)]、現在でも広く受け入れられている。また AmB の全成は 1988 年に Nicolaou らにより達成されている[7)]。

AmB の選択毒性は膜に含まれるステロールの違いにより説明される。つまりヒト細胞膜に含まれるステロールがコレステロール(図 1-2 左)であるのに対し、真菌の膜に含まれるステロールはエルゴステロール(図 1-2 右)である。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、コレステロールでは K_a= 5.2±1.4×10^4、エルゴステロールでは K_a= 6.9±1.1×10^5 であり、10 倍ほどエルゴステロールのほうが大きくなっている[8)]。

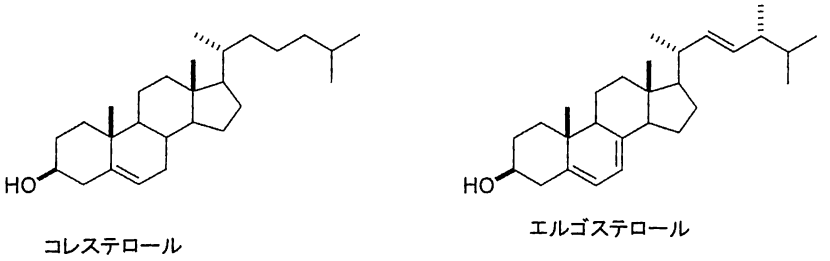


図 1-2　コレステロールおよびエルゴステロールの構造

1-1-b　アンフォテリシン B 製剤

AmB は感染症治療に極めて有効であり、静脈注射による深在性真菌症の化学療法には欠くことのできない医薬品であるが、強い腎毒性を示す[9)]。これは AmB の標的と考えられている真菌のエルゴステロール含有膜とヒトのコレステロール含有膜に対する選択性が低いことに起因している。また、水への溶解度が低いことから、その投与法にも工夫が必要となる。現在では数種の薬剤が開発され臨床で用いられている[2a)]（表 1-1）。これらは主に AmB と脂質分子や界面活性剤を混合して可溶化させることで、血中濃度を薬効量まで高めることを目的とされている。また、脂質複合体製剤は AmB 分子が徐々にリリースされることで、副作用の原因と考えられている AmB の巨大ミセル（1-3 参照）の形成を抑制する効果もある。ただし、調製が煩雑であり

コストが高いことがネックになっている。AmB を化学誘導することで、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、薬として利用されるには至っていない[10)]。

表 1-1　代表的な医薬用 AmB 製剤[2a)]

AmB preparation	Composition	Mole ratio	Net charge	Physical state	Size/μm
Fungizone	DOC/AmB	7:3	Negative	Micelles	< 0.4
AmB-lipid complex (ABLC, Abelcet)	DMPC/DMPG/AmB	7:3:3	Negative	Sheets	1.6-11
Ampholiposome	EPC/Chol/SA/AmB	4:3:1:0.5	Positive	Oligolamellar vesicles	0.2-0.3
AmBisome	HSPC/Chol/DSPG/AmB	2:1:0.8:0.4	Negative	Small unilamellar vesicles	0.06
AmB-colloidal dispersion (ABCD, Amphocil)	CS/AmB	1:1	Negative	Discs	0.12

Chol, cholesterol; CS, cholesteryl sulphate; DMPC, dimyristoyl phosphatidylcholine; DMPG. dimyristoyl phosphatidylglycerol; DOC, deoxycholate; DSPG, distearoyl phosphatidylcholine; EPC, egg yolk phosphatidylcholine; HSPC, hydrogenated phosphatidylcholine; SA, stearylamine; SPC, soya phosphatidylcholine.

1-1-c　アンフォテリシン B の生合成

AmB は放線菌 *Streptomyces nodosus* により図 1-3 の生合成経路を経て合成される[11)]。まずポリケチド系合成経路に従い、酢酸由来の 16 個の C_2-unit とプロピオン酸由来の 3 個の C_3-unit によって、アグリコンのみの中間体が形成される。次に酸化や糖転移が起こり、AmB が生合成される。酢酸は酢酸由来の場所にもプロピオン酸由来の場所にも取り込まれるが、プロピオン酸はプロピオン酸由来部分の場所にしか取り込まれないことも分かっている。また、糖部分のマイコサミンは直接グルコースに由来している。既に Rawlings らにより ^{13}C 標識された酢酸塩やプロピオン酸の取り込み実験が行われており、それぞれに対応する ^{13}C 標識された AmB が生合成されている[11)]。また、生体中において C_2-unit や C_3-unit は解糖系によるグルコースの代謝産物として生産されることから、既に本研究室において全炭素 ^{13}C 標識グルコースを *Streptomyces nodosus* に与えることにより全ての炭素が ^{13}C 標識化された AmB の調製に成功している[12)]。さらに近年は AmB の生合成を司る遺伝子が解明され[13)]、遺伝子操作による AmB 誘導体の調製も報告されている[14)]。

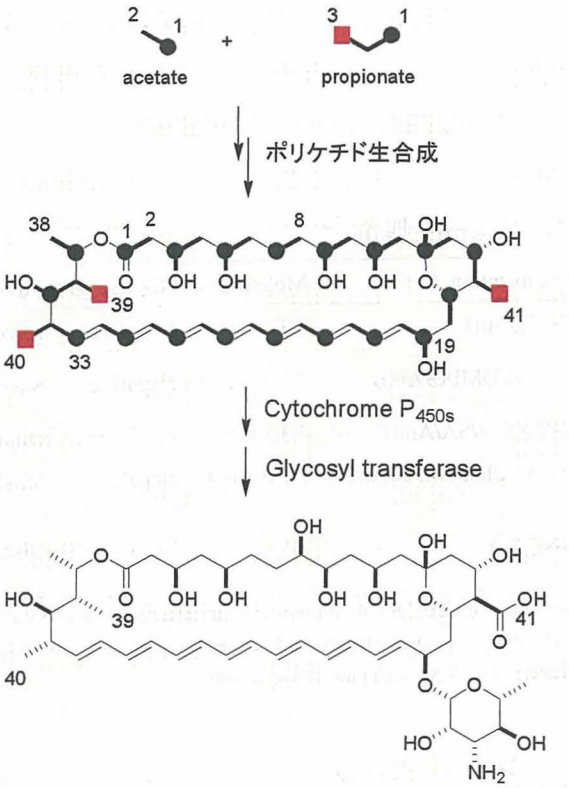


図 1-3　AmB の C_2 および C_3 ユニットの取り込みパターン

1-2　活性発現機構と樽板モデル

AmB の活性試験に人工のリン脂質二重膜が用いられるようになって以降、そのステロール選択性をより明確に評価することが可能となり、AmB はステロール含有膜に対してより活性を発現しやすいことが明らかになった[15]。Andreoli らは、AmB が濃度依存的にリン脂質膜の電気抵抗を低下させること、またその効果はステロール含有膜に対し選択的に発現することから、ステロール分子を伴った自己会合により、リン脂質膜中でポアを形成していると考えた。そこで彼らは、分子サイズの異なる非電解質を用い、それらのリン脂質膜透過試験を行った。その結果、AmB 共存下、分子サイズと膜透過係数の間に明確な相関が見られ、これを基に、AmB のポアサイズを 7～10.5 Å と計算した[16]。

また、Cass らは、AmB の濃度とリン脂質膜のコンダクタンスの関係性を速度論的に解釈し、AmB チャネルの会合数を 4～12 と求めた[17]。さらに *N*-acetyl 誘導体は活性をもたないこと、ステロールの 3 位のヒドロキシ基が活性に重要であることも明らかになり[18]、1974 年に De Kruijff らは AmB 分子が親水性部分を内側に、疎水的部分

を外側にして円形に並ぶことでポアを形成、その AmB 分子間にステロールが挿入された樽板モデルを提唱した[6] (図 1-4)。このモデル構造は多くの科学者に支持され、その後の研究基盤となった。

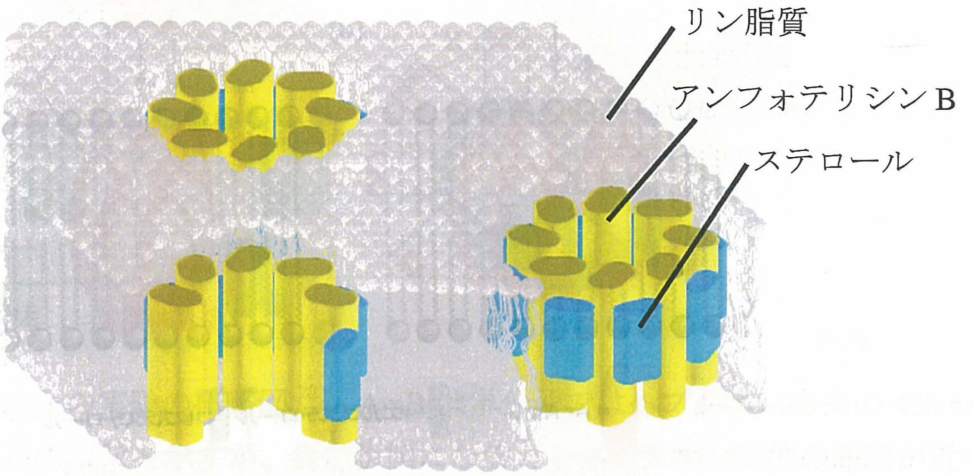


図 1-4　樽板モデルの概念図。AmB 分子が親水性部位を内側に円形に配列し、外側の疎水性部位がステロールやリン脂質と相互作用している。

1-3　AmB のステロール選択性と会合体の構造解析

樽板モデルが提唱されて以降、このモデルを基にその作用機構を明らかにするべく多くの研究がなされてきた。AmB はヘプタエン発色団を持ち、メタノールなどの有機溶媒中では特徴的な UV 吸収スペクトルを示すが、リン脂質膜中ではその形状が変化することが知られている[19]。樽板モデルを基に、このスペクトル変化は AmB が自己会合することで、即ちチャネルを形成することで分子間距離が近づき、ヘプタエン発色団同士の励起子相互作用が起こった結果であると解釈されている[19]。

Bolard らはこのスペクトル変化とステロール含有膜での活性発現に必要な AmB 濃度を比較した[20]。その結果、エルゴステロール含有膜では AmB が限界ミセル濃度以下で活性発現が可能であるのに対し、コレステロール含有膜に対する活性の発現には限界ミセル濃度以上の AmB 濃度が必要であることが明らかになった。これらの結果から、彼らはエルゴステロール含有膜では AmB は単分子で膜に挿入され、エルゴステロールとチャネル複合体を形成する一方、コレステロール含有膜では AmB は単分子では膜に挿入できず、水中で自己会合体を形成した後に膜に入りイオンを透過すると考察している(図 1-5)。

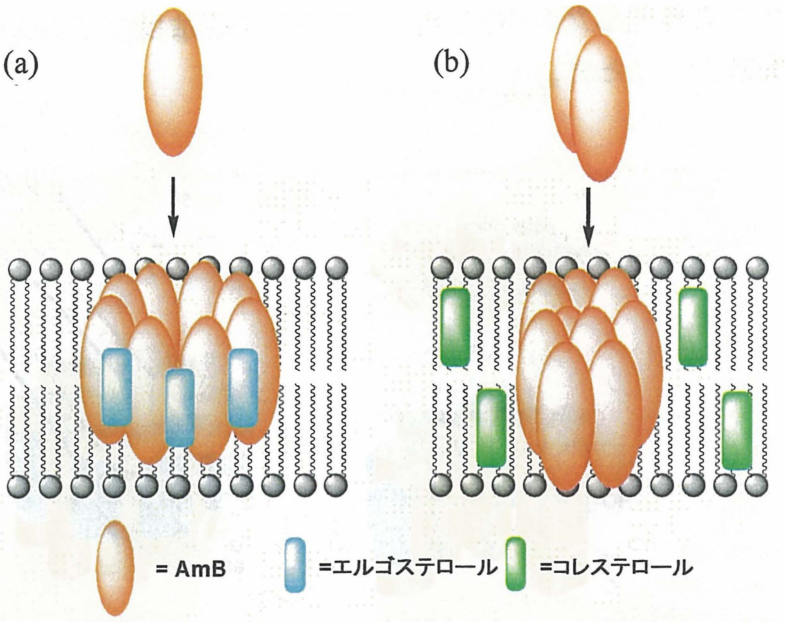


図 1-5　Bolard らの提唱した選択毒性の発現機構[20]。AmB に対する親和性の大きなエルゴステロール含有膜では、AmB-ステロール複合体が形成され、イオンの透過が起こる(a)。一方、AmB に対する親和性の低いコレステロール含有膜では単分子溶解している AmB はステロールとの複合体の形成が起きないため活性を示さないが、AmB 濃度が高くなり、水中で会合状態になると膜に挿入されイオンを透過する(b)。

また、当研究室の松岡らの研究により、AmB の活性発現には AmB のリン脂質膜への分配とチャネルの形成という二段階があり、エルゴステロールは両方の段階を促進するのに対し、コレステロールは膜への分配には促進的に働くが、チャネルの形成には阻害的に働くことが明らかになっている[21]。

Gruszecki らのグループも UV スペクトル変化を基により定量的な解析を試みている[22]。AmB の吸収波長が有機溶媒中の 408 nm から脂質膜中で 332 nm へシフトすることついて、励起子カップリングの理論式から発色団間の距離を求め(図 1-6-a)、脂質膜中におけるヘプタエンの分子間距離は 4.7 Å と算出した(図 1-6-b)。ただし、この値ではチャネルの内径が 1～2 Å 程となり、実験結果(7～10 Å[16]、1-2 参照)と必ずしも一致しない。また、配向膜サンプルに対する UV 偏光スペクトル測定により、膜表面に存在する AmB と膜に挿入された AmB の割合に関しても考察を行っており、AmB が脂質膜に対し 1 mol%の割合で存在する場合、38%が膜表面に、62%が膜に垂直に挿入されていると指摘している。さらに、これらの割合は膜の相転位温度前後で大きく変

化することから、AmB 会合体の形成には脂質の相状態も影響を与えることが示唆されている。最近では IR スペクトルや、中性子散乱等を用いた測定でも同様に濃度依存的な膜への挿入の過程が報告されている[23)]。

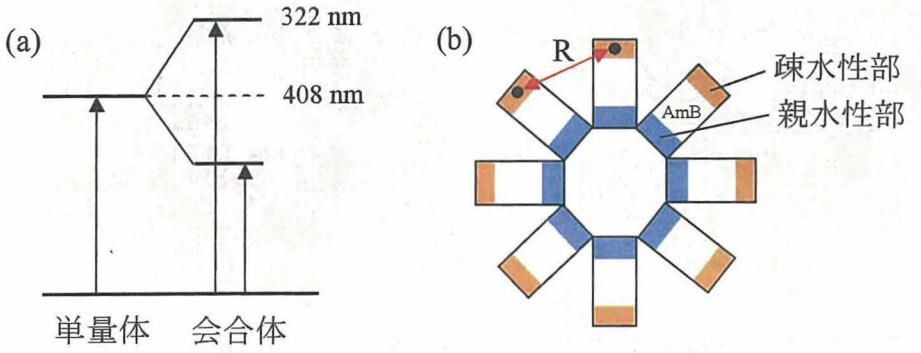
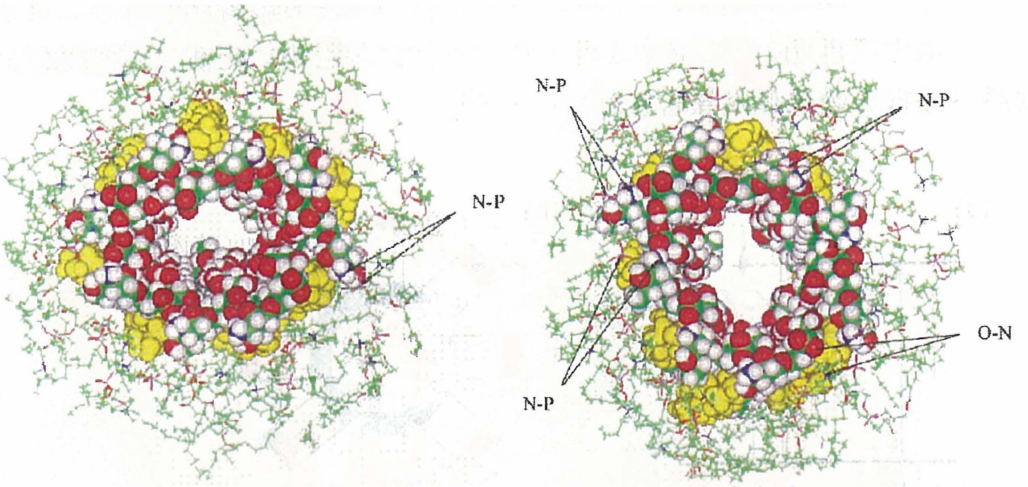


図 1-6　Gruszecki らの実験の概略図[22)]。AmB は単分子ではヘプタエン由来の 408 nm に UV スペクトルの吸収を示すが、会合状態になると、ヘプタエン部位の距離が近づきエネルギー順位が分裂する(a)。この分裂幅から、ヘプタエン部位の距離 R を計算した(b)。

Baginskiらのグループは分子動力学計算による解析を積極的に行っており[24)]、DMPC膜中(34分子, 片面17分子の二重膜, 1666の水分子)、8分子のAmBと8分子のステロールを用いた計算を行うことで、エルゴステロールとコレステロールがAmB会合体に与える影響を検討した[24b)](図1-7)。その結果、以下に示すような違いが見られた。(1)AmBチャネルのポアサイズはAmB-エルゴステロールの方がAmB-コレステロールよりも大きい。(2)AmBのアミノ基とカルボキシル基との間の分子間水素結合はAmB-エルゴステロールチャネルの方が多いが、AmB全体の水素結合数はAmB-コレステロールチャネルの方が多い。(3)エルゴステロールはコレステロールに比べ分子の運動性は低く、ヒドロキシ基がAmBの糖部分と水素結合を形成しやすい。(4)AmB-DMPCの相互作用はAmB-エルゴステロールチャネルの方が多い。彼らはこれらの計算結果をもとに、AmBの分子間相互作用をエルゴステロールが僅かに阻害することでチャネルの内径を増加させ、イオンの透過をより容易にさせることが選択毒性の由来であると考察している。



AmB-コレステロールチャネル　　AmB-エルゴステロールチャネル

図1-7　BaginskiらのMD計算で得られたチャネル構造[24b)]

ただし、分子動力学計算は初期状態の設定に依存する部分も多く、また計算時間が平衡状態に達するまでの時間に比べはるかに短いといった課題もある。

またチャネル電流測定を中心にAmBチャネルにコレステロールは直接関与していないという報告もされており[25)]、分子レベルでの相互作用、チャネル複合体構造は未知の部分が多い。また結果が断片的であったり信頼性等に問題があったりと解決すべき点も多く、更なる研究が求められている。

1-4　固体 NMR

1-4-a　固体 NMR における相互作用

固体 NMR[26-28)]では対象とする分子の運動性が低いため、様々な相互作用が平均化されずに残っている。固体 NMR における主な相互作用は以下の通りである。

$$H = H_Z + H_\sigma + H_{CSA} + H_J + H_D + H_Q$$

H_Z: ゼーマン相互作用, H_σ: 化学シフトの等方項, H_{CSA}: 化学シフトの異方項,
H_J: スピン - スピン相互作用, H_D: 双極子相互作用, H_Q:四極子相互作用

これらの相互作用はシグナルをブロードにするため解析を困難にするが、一方で分子

の配向や運動性、原子間距離情報など溶液 NMR では得られない情報を含んでいる。そこで、シグナルを先鋭化しつつこれらの情報を得る手法が開発されてきた。そしてその手法の多くが生体膜系への応用が可能である。

生体膜は様々な生理活性発現の場であり、その相互作用には多くの関心が寄せられているが、未だにその解析、特に原子レベルでの解析は困難である。その理由には、生体膜試料は結晶化しにくく、また膜平面方向と膜法線方向でその物理的性質が大きく異なるなることから、従来のX線回折や溶液 NMR の適用の困難さが挙げられる。一方固体 NMR ではこれらの生理的条件下でも解析が可能である。生体膜系での固体 NMR 測定で用いられる核種および方法の一例を表 1-2 および 1-3 に示した。

表 1-2　生体膜系の測定で主に用いられる核種 [29)]

Isotope	Spin	Natural abundance x / %	Magnetgyric ratio γ / 10^7 rad s^{-1} T^{-1}	Frequency ratio Ξ / %
^{1}H	1/2	99.9885	26.752	100
^{2}H	1	0.0115	4.107	15.350
^{13}C	1/2	1.07	6.728	25.145
^{15}N	1/2	0.368	−2.713	10.137
^{19}F	1/2	100	25.181	94.094
^{31}P	1/2	100	10.839	40.481

表 1-3　固体 NMR から得られる情報

得られる情報	観測する相互作用
原子間距離	双極子相互作用（REDOR, TEDOR, RR 等)
運動性	四極子分裂幅（^{2}H-NMR 等)
配向	化学シフト異方性（^{13}C-NMR, ^{15}N-NMR, ^{19}F-NMR, ^{31}P-NMR 等)

1-4-b　双極子相互作用

核スピンは磁石と考えることができ、原子 S の感じる Z 軸方向の磁場は、外部磁場 B_0 に加え原子 I からの影響を受ける(図 1-8)。

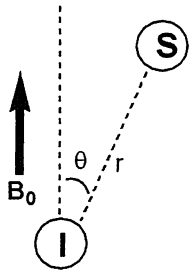


図 1-8　核スピン間の相互作用。S 核の位置により I から受ける影響が異なる。

このときのスピン I と S の距離を r、外部磁場 B_0 に対する角度を θ とすると(図 1-8)、双極子相互作用の大きさ ω_D は(1)式で表される[30]。

$$\omega_D(\theta) = \pm \pi D(3\cos^2\theta - 1) \qquad (1)$$

また、距離との関係は(2)式で表され、双極子カップリング(Hz)と呼ばれる。

$$D = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar \mu_0}{8\pi^2 r^3} \qquad (2)$$

γ_I : I 核の核磁気回転比、γ_S: S 核の核磁気回転比、μ_0: 真空の透磁率

つまり、双極子相互作用には距離と角度という貴重な情報が含まれている。しかし、双極子相互作用はシグナルをブロードにする一因でもあり、通常の測定ではマジック角回転という手法により消去している。

1-4-c　マジック角回転

双極子交互作用は(1)式のように角度 θ によって決まっており、$(3\cos^2\theta-1)$ に比例する。従って、θ=54.74°（マジック角, θ_M）の時に $(3\cos^2\theta-1)$ の項が 0 になり、極子相互作用が消失することになる。しかし、現実に試料を 54.74°に配置するのは不可能である。そのため、54.74°を軸にして高速回転を行う(Magic Angle Spinning, MAS)ことで 54.74°に配置した状態と同じ効果をもたらすことができ、スペクトルを単純化することができる。

1-4-d　REDOR 法

MAS 条件により消去された双極子カップリングを復活させ、原子間距離を測定する方法の 1 つが Rotational Echo Double Resonance（REDOR）法[31, 32]である(図 1-9)。この測定ではローターの周期に同期して、180° パルスを双極子結合をもつ核の片方(S 核)に照射する。このパルスの影響で回転エコーの再結像が妨げられた結果、I 核のシ

グナル強度が減衰する。この減衰の割合から異種核間双極子相互作用の大きさを見積もることが可能となり、I 核と S 核の原子間距離の情報が得られる。

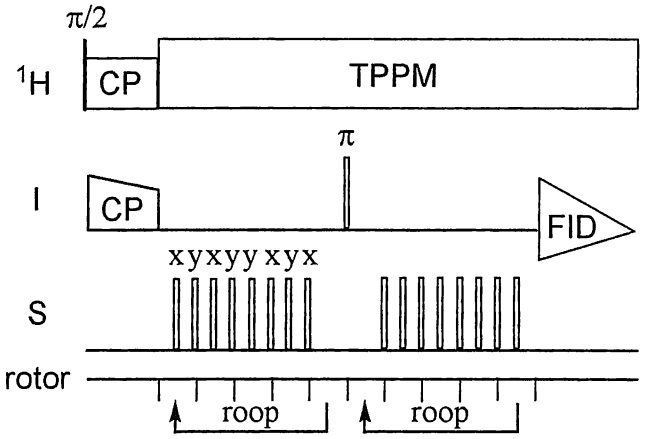


図 1-9　REDOR のパルスシークエンス

以下に REDOR 法の原理について述べる。

MAS 条件下では原子の位置が時間と共に変化するため、双極子カップリングの周波数も時間の関数となり(3)式で表される(図 1-10)。

$$\omega_D(\alpha,\beta,t) = \pm\pi D[\sin^2\beta\cos 2(\alpha+\omega_r t) - \sqrt{2}\sin 2\beta\cos(\alpha+\omega_r t)] \qquad (3)$$

ω_r: MAS の回転速度(rads per sec)　(4)

α, β: ベクトルの方向を規定するパラメータ（図 1-10）

この値はローターの回転により平均化され、1 回転後における双極子カップリングの積分値

$$\int_0^{\tau_r} \omega_D(\alpha,\beta,t)dt$$

(τ_r はローター1 周期の時間)は 0 になる。REDOR 法ではこの MAS による双極子カップリングの消失を防ぐため、180 度パルスを照射する。そこで、ローター1 回転中、時間 t_1 とローターサイクルの半分

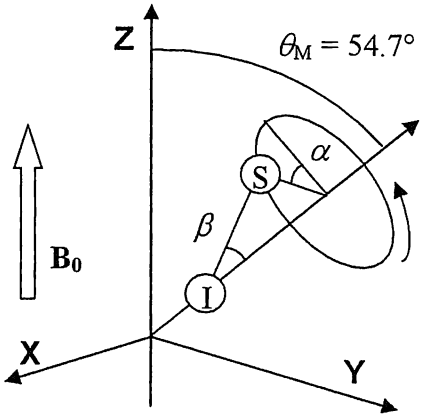


図 1-10　MAS 条件下での I-S 核の位置の規定

の時間に180度パルスを照射した場合のdephasing angle($\Delta\phi$)を計算すると(5)式となる。

$$\Delta\phi = \int_0^{t_1} \omega_D(\alpha,\beta,t)dt - \int_{t_1}^{t_1+\tau_r/2} \omega_D(\alpha,\beta,t)dt + \int_{t_1+\tau_r/2}^{\tau_r} \omega_D(\alpha,\beta,t)dt$$
$$= \mp 4\sqrt{2}D\tau_r \sin\beta\cos\beta\sin\left[\alpha + \frac{2\pi t_1}{\tau_r}\right] \qquad (5)$$

τ_r: ローターが1回転する時間

一般的なREDOR測定では180度パルスをローター周期の中間と最後に照射するため、t_1にτ_rを代入すると(5)式は単純化され(6)式となる。

$$\Delta\phi = \mp 4\sqrt{2}D\tau_r \sin\beta\cos\beta\sin\alpha \qquad (6)$$

またnローターサイクル後のdephasing angleは

$$\Delta\phi_n = \mp 4\sqrt{2}Dn\tau_r \sin\beta\cos\beta\sin\alpha \qquad (7)$$

で表される。このとき180度パルス照射を行わなかった場合(S_0)と照射した場合(S)のシグナル強度比は次のように計算される。

$$\frac{\Delta S}{S_0} = 1 - \frac{1}{4\pi}\int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^{\pi} \sin\beta d\beta \cos(\Delta\phi_n) \qquad (8)$$
$$\Delta S = S_0 - S \qquad (9)$$

この式を厳密に解くことは困難であるが、第1種Bessel関数$J_k(x)$を用いることでより扱いやすい(10)式に変形できる[30]。

$$\frac{\Delta S}{S_0} = 1 - \left[J_0\left(\sqrt{2}Dn\tau_r\right)\right]^2 + 2\sum_k^{\infty} \frac{1}{16k^2-1}\left[J_k\left(\sqrt{2}Dn\tau_r\right)\right]^2 \qquad (10)$$

(10)式の$\Delta S/S_0$と展開時間(dephasing time, $n\tau_r$)の関係を図1-11に示した。REDOR測定ではローターサイクル数n、すなわちdepahsing timeを変化させ$\Delta S/S_0$の測定を行うこ

とで双極子カップリングの値を決定する。この値は(2)式のように原子間距離を含むため、REDOR 測定により原子間距離を求めることができる。

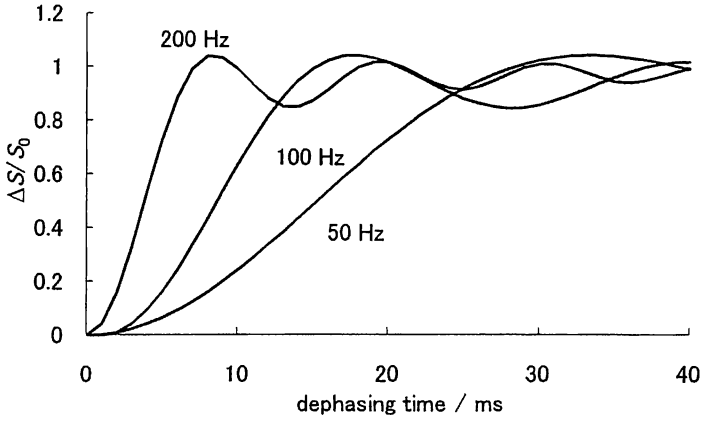


図 1-11　Bessel 関数を用いて計算した REDOR 減衰曲線（k=6 まで計算）

REDOR 測定は、孤立した一対のスピン系の距離測定において極めて有用な手法であるが、多スピン系、特に全炭素標識体などに対し REDOR 法を用いると、双極子の展開時間に同核種間の *J*-カップリングの展開も起こってしまう。その結果、スペクトルの位相が合わなり、距離の算出が不可能になる。この問題を回避するため、幾つかの方法が提案されている。

Griffin らは *I* 核に選択的 180 度パルスを用いることで、同核種同士の相互作用を打ち消した *J*-decoupled REDOR を開発した [33] (図 1-12-a)。ただしこの方法ではシグナルの分離の良い炭素にしか適用できないという欠点かある。Schaefer らはソリッドエコーを用いることで *J*-カップリングによる磁化の展開を減少させる RDX (REDOR for X Clusters,　図 1-12-b) を報告している [34]。この手法では全ての炭素において一度に異種核間の相互作用を測定することがでるため、分子全体の距離情報が得られる。ただし、測定の感度は REDOR 法に比べ低下しており、また正確な距離の計算も困難である。しかしながら、これらの手法が開発されたことで REDOR 測定の応用範囲が広がり、位置特異的な標識が困難な生体試料でも利用可能となった。

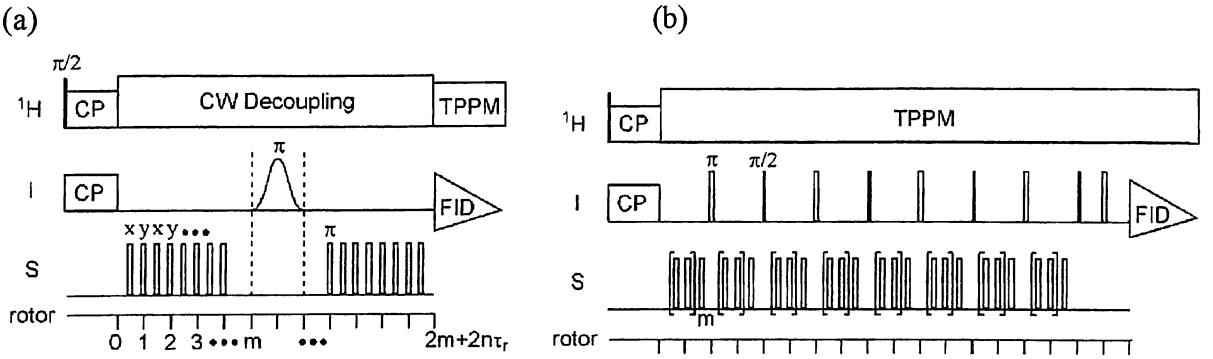


図 1-12　*J*-decoupled REDOR(a)と RDX(b)のパルスシークエンス [33, 34)]

1-5　固体 NMR の生体膜への応用

高分解能の NMR 装置および測定法の普及に伴い、固体 NMR は生体膜系へ適用されるようになった [35)]。特に REDOR 法は分子間の距離情報をもとに相互作用を解析できるため、重要なツールとなっている [36)]。

Schaefer らは両親媒性のペプチド K3((KIAGKIA)$_3$-NH$_2$)に関して、複数の標識体を用いて分子間 REDOR 測定を行い、ペプチドの形成するポアの構造を解析した [37)]。マガイニン [38)]や PGLa[39)]に代表される抗菌ペプチドは、片側に親水性残基が、反対側に疎水性の残基が集中した両親媒性の性質を有し、細胞膜と相互作用することで活性を発現する [40)]。K3 も同様の化学的性質を有した 21 残基のペプチドであり [41)]、その会合体の構造が注目された。Schaefer らは K3 ペプチドと膜との相互作用形式として、樽板モデル、カーペットモデル、トロイダルモデルを仮定し、実際の分子の位置関係を固体 NMR により求めモデル構造と比較した。

彼らはまず、リン脂質のヘッドグループとの位置関係を求めるため ^{13}C, ^{15}N で標識された K3 を調製し、^{13}C{^{31}P}REDOR と ^{15}N{^{31}P}REDOR を測定した [36a)]。分子中央付近の 12 残基目のリジン側鎖のアミノ基、または 10 残基目のカルボニル炭素が標識された K3 を用いた場合でも、リン脂質頭部の ^{31}P の間に REDOR 減衰が観測されたことから、K3 は分子全体に亘ってリン脂質頭部と相互作用していることが明らかとなった。次に、末端のメチル基にフッ素を導入した標識化リン脂質を用いて、K3 とリン脂質末端部位との位置関係を求め、ペプチドがリン脂質のアシル鎖と強く相互作用していることを示した [37a)]。

次の段階として、K3 分子間の相互作用に注目し、標識化 K3 を用いた分子間 REDOR 測定を行った [37b)]。^{19}F 標識体と ^{13}C 標識体を 1:1 でリン脂質膜に取り込み、2 箇所で

分子間の距離を求めた。その結果、10 残基目同士が 4.5 Å、14 残基目と 17 残基目が 10.4 Å 離れていることが明らかとなった。これらの結果を基に彼らは図 1-13 に示すチャネルモデルを提唱した。

このように固体 NMR では生体膜を模倣した環境下においても原子レベルでの解析が可能であり、構造解析の強力な手段となる。また、原子核そのものが観測対象であることから、蛍光測定や ESR 測定のように大きな標識プローブを導入する必要がなく、測定対象の分子に与える影響を最小限に抑えることができる。しかし、解析の困難さや測定ごとに最適な標識体を調製する必要性があることから、現在のところ適用範囲はペプチドなど単純な構造の化合物に限られている。

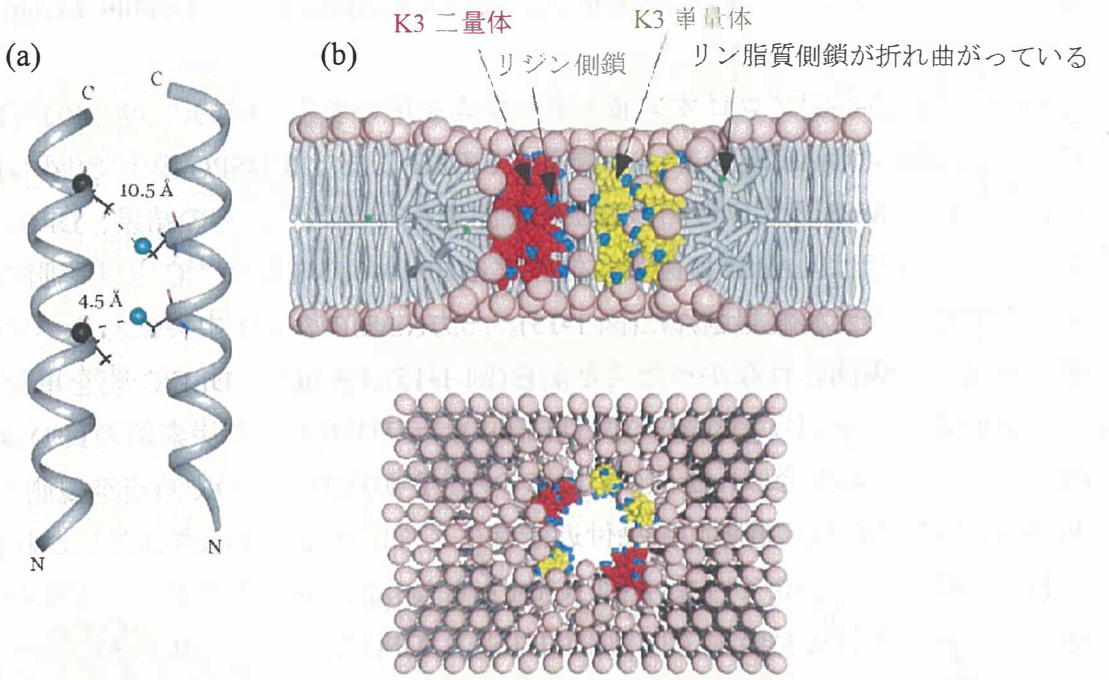


図 1-13 固体 NMR 測定により推定された K3 のチャネルモデル [37)]
(a)REDOR 測定により明らかになった原子間距離。(b)提唱されたチャネルモデル構造。

1-6 アンフォテリシン B への適用

アンフォテリシン B 会合体の研究にも固体 NMR を用いた例が報告されているが [42-44)]、それらは重水素化リン脂質等を用いた分子の運動性の評価にとどまっており、分子間の相互作用を直接検出した例は無い。これは、AmB が非ペプチド化合物であり、かつ化学的に複雑な構造をしているため、標識体の調製が困難であることが大きな理由である。

当研究室では AmB 生産菌の ^{13}C 強化培養による ^{13}C-AmB の調製や、化学誘導による ^{13}C, ^{19}F 標識化 AmB やステロールの調製に成功しており、これら標識体を用いることで AmB チャネルの分子間相互作用を直接観測することが可能になった。

まず、AmB とリン脂質の相互作用に関して、AmB とリン脂質のヘッドグループに存在する ^{31}P との相関を ^{13}C{^{31}P}REDOR を用いることで評価し、AmB とリン脂質の位置関係を調べた[12, 45]。AmB の長軸方向の分子長は約 24 Å である。一方、一般的なリン脂質膜の厚さは、親水的なヘッドグループの厚みが 8 Å、疎水的なアシル鎖部分が 27 Å で、合わせて約 35 Å 程度である。このことから、樽板モデルが提唱された当初は AmB 単一分子長（Single Length Channel, SLC）では膜を貫通できず、AmB が膜を貫通するために 2 つのチャネルが二階建て構造になった Double Length Channel（DLC）が想定されていた。

松岡らは、[3-^{13}C]プロピオン酸ナトリウムを用いて生合成的に 39、40、41 位が ^{13}C 標識された[tri-^{13}C]AmB(図 1-14)を調製し、DMPC または DSPC 膜中で(図 1-14)、リン脂質の ^{31}P と AmB の ^{13}C の間の REDOR 測定を行った[45]。その結果、DMPC（C14）を用いた場合では、AmB の両端に位置する 39、40、41 位の ^{13}C とリン脂質の ^{31}P の間に REDOR 減衰が観測された(図 1-15)。一方、AmB の分子中央にあるヘプタエン炭素には減衰が観測されなかったことから(図 1-15)、AmB は DMPC 膜を単分子長で貫通していることが明らかになった(図 1-16-a)。一方 DMPC より炭素鎖の長い DSPC（C18）(図 1-14)を用いた場合は、41 位の ^{13}C にのみ ^{31}P からの REDOR 減衰が観測され、39、40 位の ^{13}C は脂質二重膜の中央付近に存在していることが示された。これは、AmB が DSPC 膜を貫通できていない(図 1-16-b)、もしくは AmB 会合体が二重になり膜を貫通している可能性を示唆している(図 1-16-c)。DMPC と一般的な生体膜の厚さはほぼ同じであることから、AmB の活性本体は SLC であることを実験的に示した。

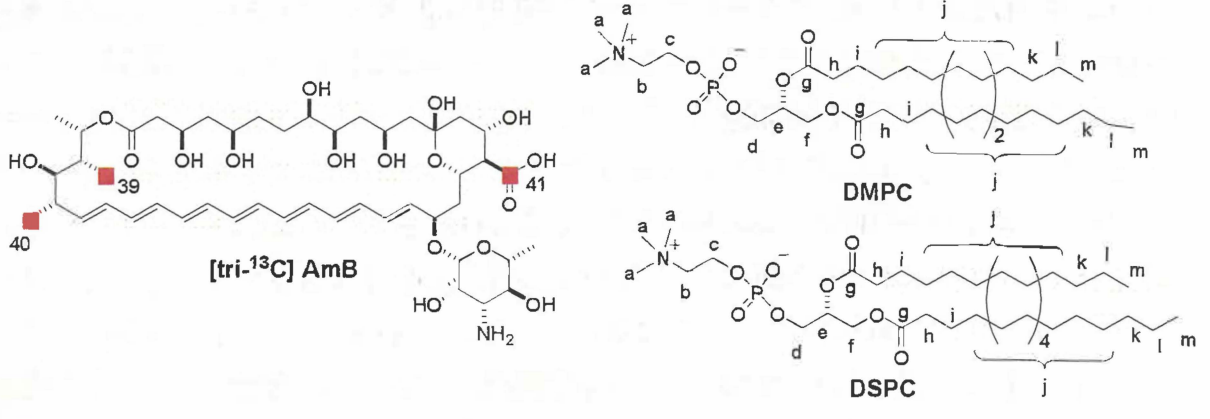


図 1-14　[tri-^{13}C]AmB と DMPC, DSPC の化学構造

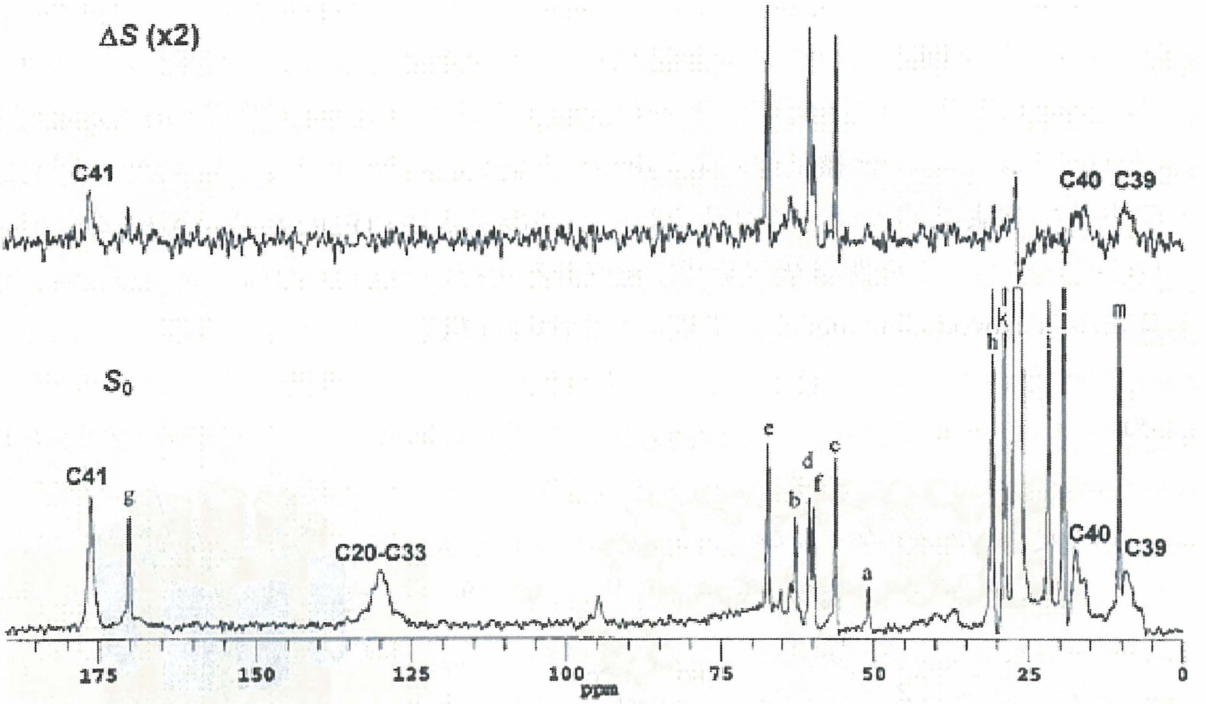


図 1-15　AmB/DMPC の $^{13}C\{^{31}P\}$REDOR スペクトル。AmB/DMPC=1/10, 展開時間 22.9 ms。C39, 40, 41 の 3 箇所で REDOR 減衰が確認され、これらの部位が膜表面に近いことが明らかになった。一方で、ヘプタエン部分には減衰が見られないことから、膜中央部に存在していると考えられる[45]。

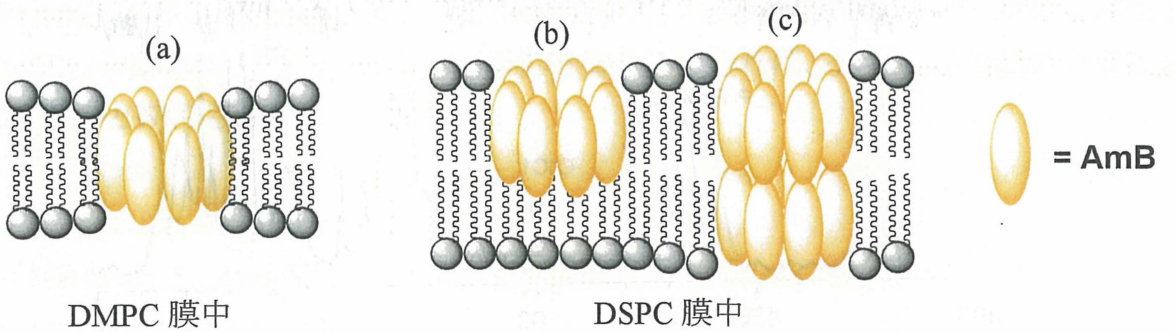


図 1-16　DMPC および DSPC 膜中での AmB-PC 相互作用の模式図[45]
DMPC 膜中では AmB は単分子で膜を貫通している(a)。DSPC 膜中では、二重で膜を貫通(b)、もしくは単分子で通できていない(c)。

また、当研究室では AmB-ステロールの相互作用に関しても同様に固体 NMR を用いることで解析を行った。REDOR スペクトルにおいて減衰が観測されるためには、

分子間相互作用が十分に安定である必要がある。しかし、一般的に AmB-ステロールの相互作用は弱いと考えられており、AmB とステロールを混ぜただけでは分子間の REDOR 減衰が観測されないことが予想された。そこで AmB とステロールを共有結合で連結しステロール分子の交換を抑制することで、弱い相互作用の検出を試みた[46, 47]。図 1-17-a に示した標識化連結体を用いた結果、ステロールの 6 位のフッ素と AmB のポリエン炭素およびマイコサミンの一部の炭素に REDOR 減衰が確認された(図 1-17-b)。さらにこの距離情報を基に配座計算を行い、AmB の周りをステロールが取り囲んだ"surrounding model"が提唱された(図 1-17-c)。

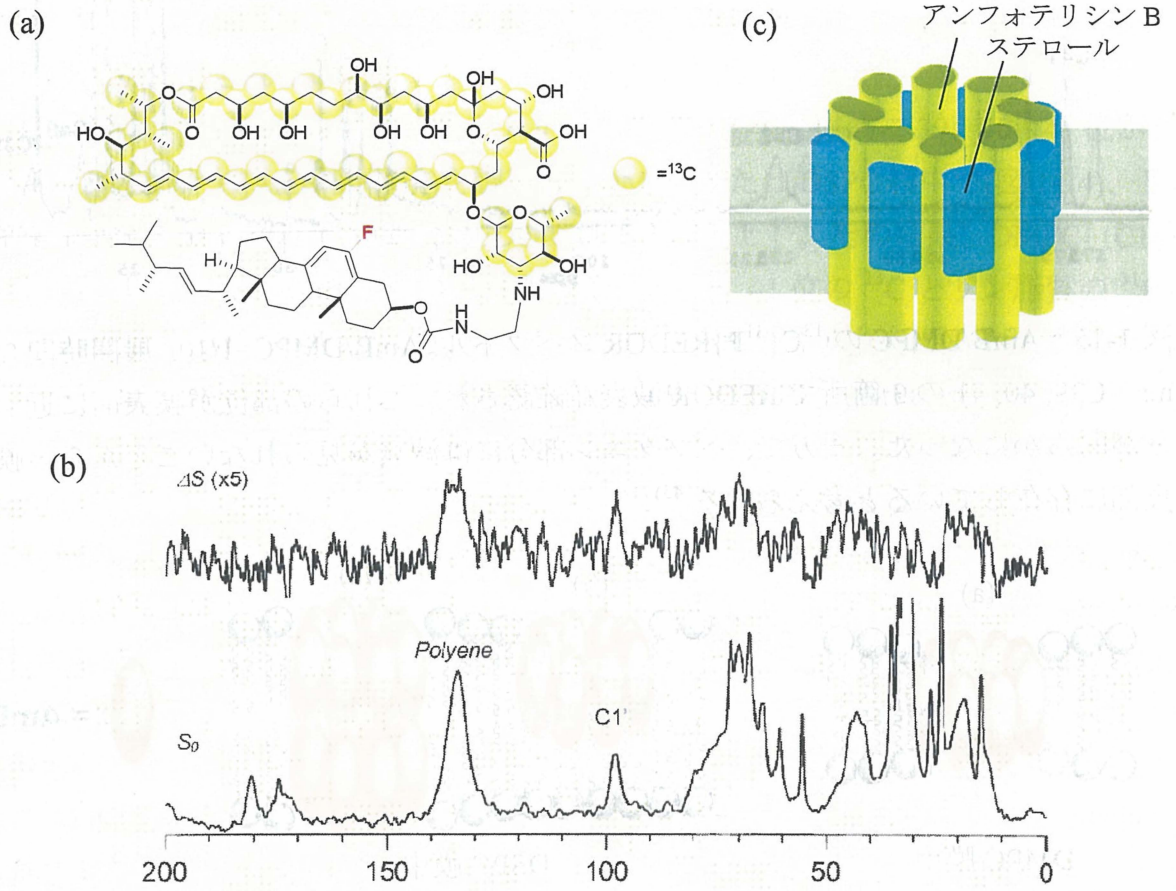


図 1-17 AmB-ステロール連結を用いた固体 NMR による構造解析[47]。(a) AmB-Sterol 連結体の構造。(b)連結体/DMPC=1/10 の $^{13}C\{^{19}F\}$RDX スペクトル。展開時間: 8 ms。(c) 配座計算により提唱された"surrounding model"。AmB 会合体の周りをエルゴステロールが取り囲んでいる。

1-7. 本研究の目的

アンフォテリシンBはその医薬品としての重要性、また自己会合によるイオン透過性チャネルの形成という基礎科学的観点から多くの注目を集め、構造解明に向けた研究がなされてきたがその詳細は未知のままである。当研究室ではチャネル形成に働く相互作用をAmB-AmB、AmB-ステロール、AmB-リン脂質の3つに分け、それぞれについて詳しく検証することでチャネルの全体像に迫ること目指している。上記のように選択的標識体と固体NMRを用いたアプローチにより、既にAmB-リン脂質、AmB-ステロールの相互作用解析に成功しており、残るAmB分子間の相互作用に興味が持たれた。そこで、本研究では^{13}Cと^{19}Fで標識されたAmBを用い、その分子間REDOR測定を行うことでAmBチャネルのコアとなるAmB-AmB相互作用を原子レベルで明らかにすることを目的とした(図 1-18-a)。さらに最近当研究室で重水素標識ステロールを用いた^{2}H-NMR測定が行われ、リン脂質にPOPCを用いた場合にAmBーステロールの相互作用をより選択的に観測できることが示された[48]。そこで、AmBーステロールの非連結状態でのREDOR測定を行うことで、連結による影響を一切取り除いた状態でのAmBとステロールの相互作用観測を行うことも本研究の目的とした(図 1-18-b, c)。

さらに本研究では、AmB-AmBおよびAmB-ステロールの相互作用に加え、今までの固体NMRの測定結果を考慮に入れることで、AmBチャネル全体の構造を明らかにすることを目指した。また、本研究によってリン脂質の種類やステロールの種類によるAmB会合体の構造変化を明らかにすることができれば、選択毒性発現の由来に迫れるものと期待される。

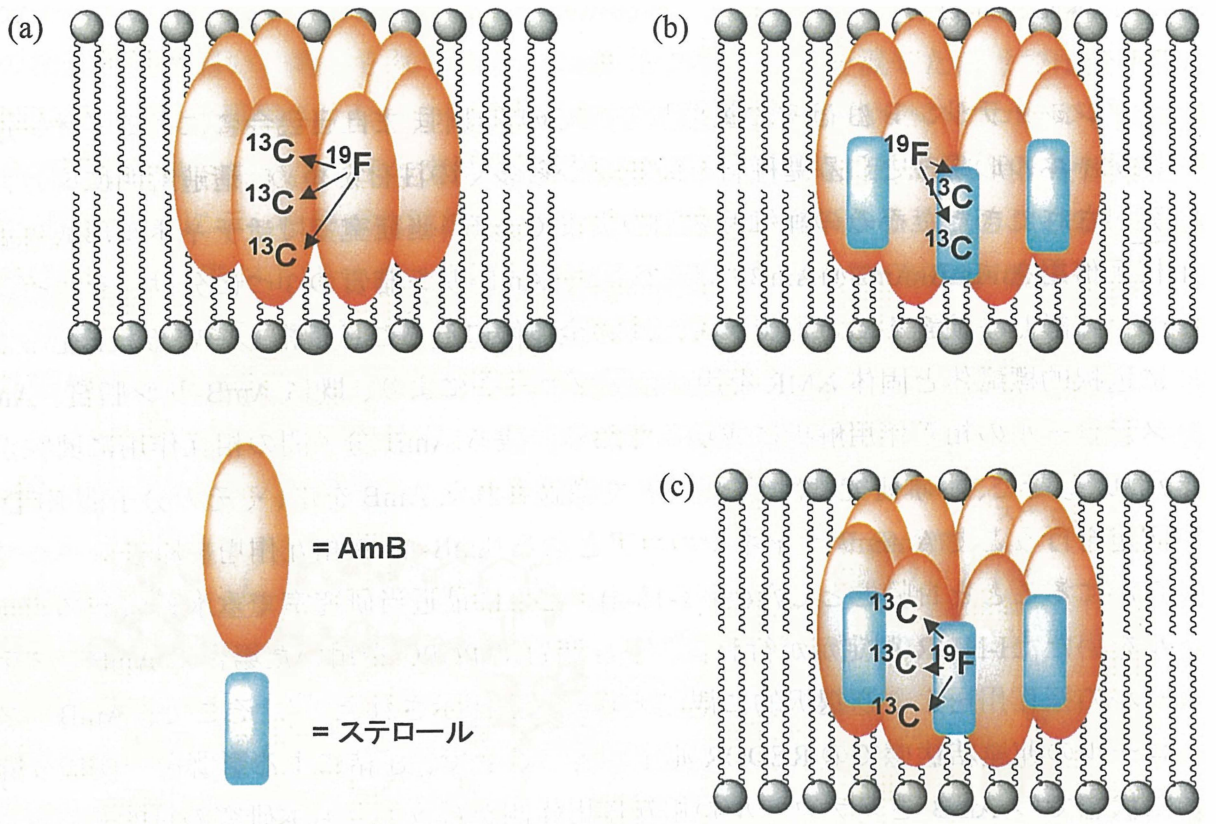


図 1-18 固体 NMR による AmB 複合体の分子間相互作用解析

(a)^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB を用いた分子間 REDOR 測定により AmB 分子間の相互作用を解析する。 (b)^{19}F-AmB と ^{13}C-sterol、および(c)^{13}C-AmB と ^{19}F-sterol を用いた分子間 REDOR 測定。この測定で AmB-エルゴステロール間の距離や相互作用を解析する。これらの測定を基に分子間の相互作用を解明する。

参考文献

1) Zotchev, S. B., *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 211-223.

2) (a) Hartsel, S.; Bolard, J. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 445-449. (b) Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 151-162.

3) (a) Gold, W.; Stout, H. A.; Pagano, J. F.; Donovick, R. *Antibiot. Annu.* **1956**, 579-586. (b) Stemberg, T. H.; Wright, E. T.; Oura, M. *Antibiot. Annu.* **1956**, 566-573.

4) Utz, J. P.; Treger, A. *Ann. Int. Med.* **1959**, 51, 1220-1229.

5) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564

6) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.

7) (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2208-2210. (b) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2821-2822. (c) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4660-4672. (d) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Uenishi, J.; Li, W. S.; Papahatjis, D. P.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672-4685. (e) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4685-4696. (f) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4696-4705.

8) Readio, J. D.; Bittman, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219-224.

9) Deray, G. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, suppl. S1, 39-41.

10) Grzybowska, J.; Sowinski, P.; Gumieniak, J.; Zieniawa, T.; Borowski, E. *J. Antibiotics* **1997**, *50*, 709-711.

11) McNamara, C. M.; Box, S.; Crawforth, J. M.; Hickman, B. S.; Norwood, T. J.; Rawlings, B. J. *J.Chem.Soc., Perkin Trans 1* **1998**, 83-87.

12) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614.

13) Ca ffey P.; Lynch, S.; Flood, E.; Finnan, S.; Oliynyk, M.; *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 713-723.

14) Byrne, B.; Carmody M.; Gibson, E.; Rawlings, B.; Caffrey, P. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1215–1224.

15) Kinsky, S. C.; Luse, S. A.; Van Deen, L. L. M. *Fed. Proc.* **1966**, *25*, 1503-1510.

16) Andreoli, T. E.; Dennis, V. M.; Weigl, A. M. *J. Gen. Physiol.* **1969**, *53*, 133-156.

17) Cass, A.; Finkelstein, A.; Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 100-124.

18) Andreoli, T. E. *Kidny Int.* **1973**, *4*, 337-345.

19) Fujii, G.; Chang, J. E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968.

20) Bolard, J.; Legrand, P.; Heitz, F.; Cybulska, B. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5707-5715.

21) Matsuoka, S. Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 439-434.

22) (a) Gruszecki, W. I.; Gagoś, M.; Hereć, M.; Kernen, P. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, *8*, 161-170. (b) Gagoś, M.; Koper, R. Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90-98. (c) Gruszecki, W. I.; Gagoś, M.; Hereć, M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2003**, *69*, 49-57.

23) (a) Hereć, M.; Islamov, A.; Kuklin, A.; Gagoś, M.; Gruszecki, W. I. *Chem. Phys. Lip.* **2007**, *147*, 78-86. (b)Fournier, I.; Barwicz, J.; Auger, M.; Tancrede, P. *Chem. Phys. Lip.* **2008**, *151*, 41-50.

24) (a) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. A. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 560-570. (b) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63-78. (c) Sternal, K.; Czub, J.; Baginski, M. *J. Mol. Model.* **2004**, *10*, 223-232. (d) Czub, J. Baginski, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16743-16753. (e) Baginski, M.; Czub, J.; Sternal, K. *Chem. Rec.* **2006**, *6*, 320-332.

25) (a) Cotero, B. V.; Rebolledo-Antunez, S.; Ortega-Blake, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1375*, 43-51. (b) Venegas, B.; Gonzalez-Damian, J.; Celis, H.; Ortega-Blake, I. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2323-2332.

26) Duer, M. J. "Introduction to Solid-State NMR" *Blackwell Publishing Ltd.* **2004**

27) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. "Multidimensional Solid-State NMR and Polymers" *Academic Press Ltd.* **1994**

28) 「固体 NMR 実践編」日本電子株式会社

29) Harris, R. K.; Becker, E. D.; Cabral de Menezes, S. M.; Goodfellow, R.; Granger, P. *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* **2002**, *9*, 5-19.

30) Mueller, K. T. *J. Magn. Reson.* **1995**, *113*, 81-93.

31) (a) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57-83. (b) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.

32) Gullion, T. *Conc. Magn. Res.* **1998**, *10*, 277-289.

33) Jaroniec, C. P.; Tounge, B. A.; Rienstra, C. M.; Herzfeld, J.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1999,** *121,* 10237-10238.

34) Mehta, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 188-191.

35) (a) Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Concepts Magn. Reson.* **2004**, *23*, 89-120. (b)Hong, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10340-10351.

36) Toke, O.; Cegelski, L.; Schaefer, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1314–1329.

37) (a) Toke, O.; Maloy, W. L.; Kim, S. J.; Blazyk, J.; Schaefer, J. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 662–674. (b) Toke, O.; O'Connor, R. D.; Weldeghiorghis, T. K.; Maloy, W. L.; Glaser, R. W.; Ulrich, A. S.; Schaefer, J. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 675–687.

38) Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 5449-5453.

39) Hoffmann, W., Richter, K., and Kreil, G. *EMBO J.* **1983**, *2*, 711-714.

40) Matsuzaki, K.; Mitani, Y.; Akada, K.; Murase, O.; Yoneyama, S.; Zasloff, M.; Miyajima K.

41) Maloy, L. M.; Kari, U. P. *Biopolymers* **1995**, *37*, 105–122.
Biochemistry **1998,** *37*, 15144-15153.

42) (a) Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P.; Jarrell, H. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *776*, 317-329. (b) Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P.; Jarrell, H. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *778*, 435-442.

43) Paquet, M. J.; Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancrède P.; Auger, M. *Chem. Phys. Lip.* **2002**, *119*, 1-11.

44) Hing, A. W.; Schaefer, J.; Kobayashi G. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 323-332.

45) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704-710.

46) Matsumori, N., Eiraku, N., Matsuoka, S., Oishi, T., Murata, M., Aoki, T. Ide, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 673-679.

47) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.

48) 多原主哲　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 20 年度修士論文

2-1　REDOR 法により AmB 分子間相互作用解析を行うにあたって

一般に AmB の様に自己会合することでチャネルを形成する分子はリン脂質膜中で会合状態と非会合状態の平衡にあると考えられているが[1)]、固体 NMR 測定で会合体の解析を行うためには、会合体状態を選択的に観測し、かつその会合体がミリ秒単位の寿命で安定に存在する必要がある。当研究室で行われた ^{2}H 標識化 AmB の固体 ^{2}H-NMR 測定による分子の運動性評価の結果、高濃度で膜に取り込まれた AmB の運動性は低く、多くの分子が会合状態にあることが明らかになった[2)]。よって、AmB とリン脂質の比を調整することで、チャネル会合体の解析が可能であると考えた。

また最近 AmB のステロール選択性の発現にはリン脂質の種類も重要であることが明らかとなった。当研究室の毛利らは表面プラズモン共鳴法を用いることで様々な種類のリン脂質と AmB の相互作用を解析した結果、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)(図 2-1)膜を用いた場合にステロールの選択性を最もよく再現できる事を確認した[3)]。さらに多原らは重水素標識化ステロール(図 2-1)を用いて分子の運動性を評価した結果、POPC ではエルゴステロールの運動性が AmB の存在により抑制されること見出した(図 2-2)[4)]。これらの結果は AmB-エルゴステロールの直接的な相互作用を示唆している。従ってステロールの種類による AmB 分子間の相互作用の変化を観測するためにはリン脂質として POPC を用いることが最適であると考えた。

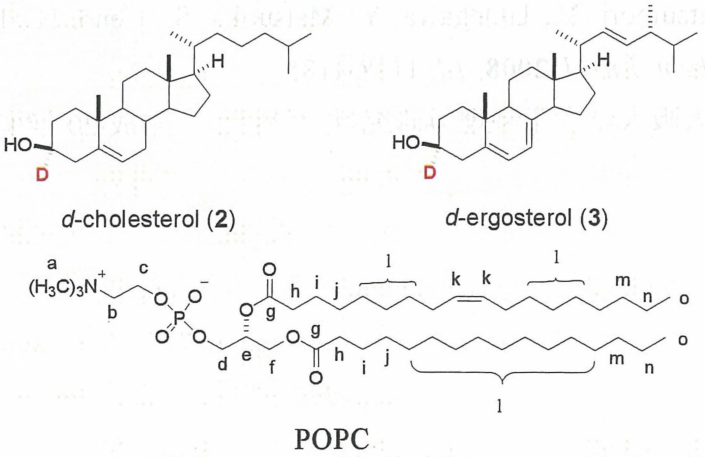


図 2-1　^{2}H 標識化コレステロール(左)とエルゴステロール(右)および POPC(下)の化学構造

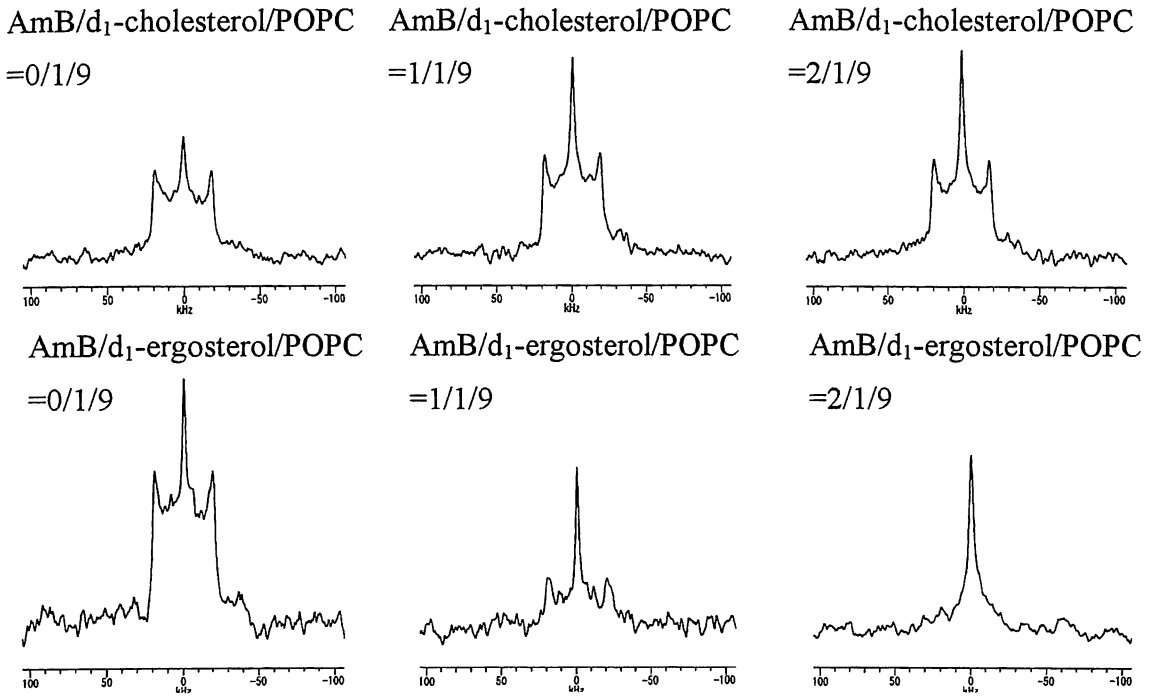


図 2-2　標識化ステロールを用いた固体 ^{2}H-NMR スペクトル [4)]

コレステロール膜と AmB の無いエルゴステロール膜では、明確な四極子分裂が観測され、ステロール分子が速い軸回転運動をしていることが確認できる。一方 AmB を添加したエルゴステロール膜ではシグナルがブロードニングしており、エルゴステロールの運動性が抑制されていることを示している。

2-2　標識体と固体 NMR 測定用サンプルの調製

2-2-a　^{13}C 標識化 AmB の調製

REDOR 法により観測する双極子相互作用の大きさは標識部位の運動性の影響を受ける。そのため、より正確な距離を求めるためには、AmB の炭素骨格を直接 ^{13}C で標識することが望ましい。幸い AmB は生合成的手法で容易に ^{13}C 標識化が可能であり、この手法を用いることにした。

AmB 生産菌 *Streptomyces nodosus* の培養培地に様々な標識化前駆体を添加することで、複数の標識体の調製が可能であり ^{13}C 標識化前駆体に[3-^{13}C]プロピオン酸ナトリウムを用いた場合は、39, 40, 41 位の炭素が標識された[tri-^{13}C]AmB**4**(図 2-3 左)[5)]を、また[U-^{13}C]グルコースを用いた場合は全ての炭素が標識された[U-^{13}C]AmB**5**(図 2-3 右)[6)]

を得ることができる。しかし、McNamara らの報告では ^{13}C 標識化前駆体に[3-^{13}C]プロピオン酸ナトリウムを用いた場合、得られる[tri-^{13}C]AmB の ^{13}C 標識率は 7~10%と低く、固体 NMR 測定に用いるには不十分であった。標識率が低い主な原因は、放線菌が AmB を生合成する際に、標識化前駆体だけでなく、培地成分も炭素源として取り込んでしまうためである。そこで、培地成分の炭素源を減らすことで標識率を上昇させることにした。その結果、[tri-^{13}C]AmB の標識率は 15%、[U-^{13}C]AmB の標識率は 50%まで上昇し、それぞれを測定に用いた。

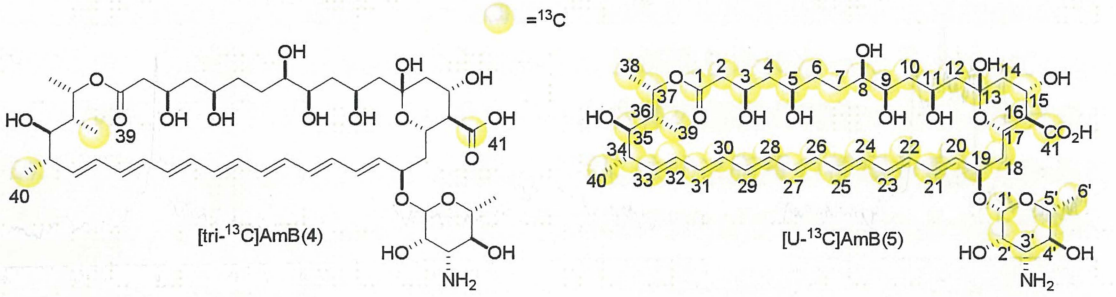


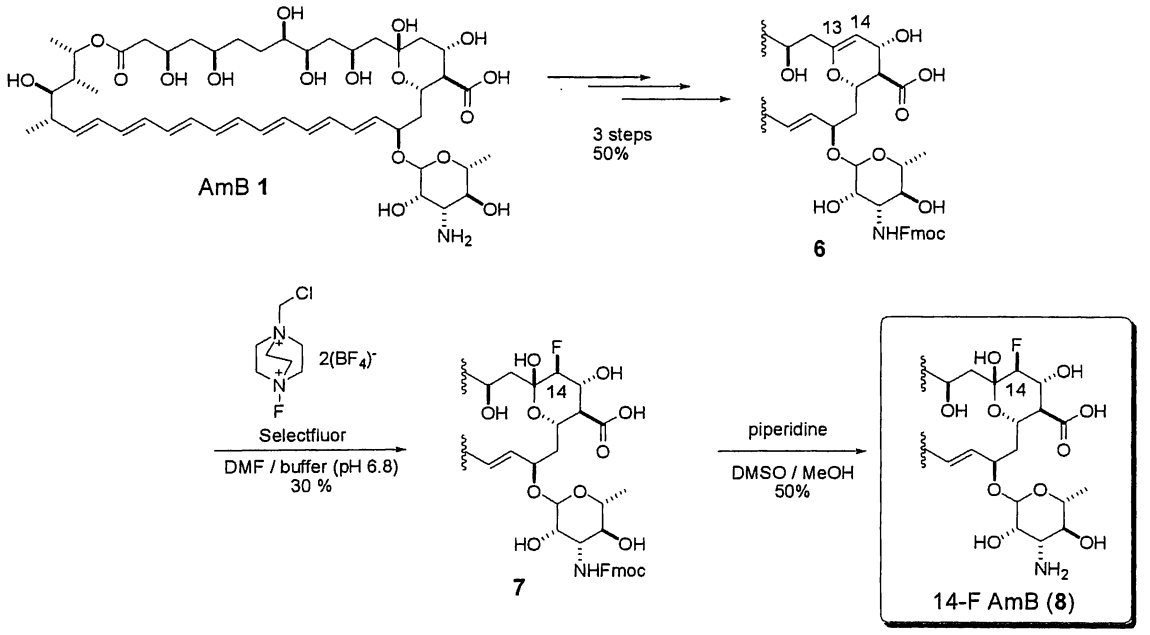
図 2-3　生合成的手法によって得られた ^{13}C 標識化 AmB の標識部位

2-2-b　^{19}F 標識化 AmB の調製

^{19}F 標識体には既に報告した方法に従い、AmB から化学的に誘導した 14-F AmB(**8**)[7]を用いることにした(スキーム 2-1)。この標識体は ^{19}F がポリオール側に導入されていることから、主に親水性ポア付近の距離情報が得られ、また分子のヘッドグループ側に位置していることから AmB の配向に関する情報も得られると期待される。

まず、AmB のアミノ基を Fmoc 基で保護した後、TMSOTf を作用させることで、ヒドロキシ基が TMS 保護されるのと同時に 13, 14 位を脱水した。続けて HF·pyridine で TMS 基の除去を行いグリカール体(**6**)を得た。このグリカール体(**6**)に求電子的フッ素化試薬である Selectfluor を反応させることで 14 位にフッ素を導入しフッ化体(**7**)を得た。最後にアミノ基を脱保護し、目的の 14-F AmB(**8**)を得た。

HPLC 精製後、14-F AmB(**8**)の各種活性試験を行い、容血活性の EC_{50} は 1.3 μM(AmB は 1.4 μM)であり、また、ペーパーディスク法による抗カビ活性試験から 10 μg/disk でカビの成長を阻害した(AmB は 10 μg/disk)。さらに、後述(2-6 参照)の ^{31}P NMR によるチャネル活性試験の結果からも AmB と同様の活性を保持していることを確認した。



スキーム 2-1　14-F AmB の調製

2-2-c　固体 NMR 測定用膜サンプルの調製

固体 NMR 測定に用いる多重膜リポソーム(MLV)サンプルは、予め標識体とリン脂質を混合した後に水和を行い、MLV を調製した。この方法では、高濃度の AmB をリン脂質膜に取り込ませることができ、AmB の自己会合の促進と NMR 感度の向上が期待できる。組成比は ^{13}C-AmB/^{19}F-AmB/POPC=1/1/20 とし、ステロールを含有させたサンプルでは POPC の 10%をステロールに置き換えた。

2-3　[tri-^{13}C]AmB と 14-F AmB を用いた ^{3}C{^{19}F}REDOR 測定による AmB 分子間距離測定

2-3-a　粉末サンプルの ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定

AmB は水中でミセルを形成するため、膜サンプルの固体 NMR 測定から得られた結果が、膜中での AmB チャネル複合体を観測したものなのか、それとも単に水中の AmB ミセルを観測したものかを区別する必要がある。そこで膜サンプルの固体 NMR 測定に先立ち、まず粉末状態での測定を行った。[tri-^{13}C]AmB と 14-F AmB の両標識体を

1:1 の比で水中に分散させて、ミセルを形成させた後に凍結乾燥したサンプルを測定した(図 2-4)。下側に ^{19}F にπパルスを照射していないスペクトル(S_0)を、上側に ^{19}F にπパルスを照射していないスペクトル(S_0)から ^{19}F にπパルスを照射したスペクトル(S)を差し引いた差スペクトル(ΔS)を示した。また差スペクトルは縦軸を 2 倍に拡大している。差スペクトルで観測された REDOR 減衰は 14-AmB 分子内の REDOR 減衰と 14-F AmB と[tri-^{13}C]AmB の分子間 REDOR 減衰の両方が重なっているため、これらを別々に考慮する必要がある。14-F AmB の分子内 REDOR 減衰の寄与は、AmB の結晶構造を基に 14-F AmB 分子内の各炭素と 14 位のフッ素との原子間距離を求め、^{13}C の存在確率を 1.1%として計算した。観測された減衰からこの 14-F AmB 分子内の REDOR 減衰の割合を引くことで、分子間での REDOR 減衰の割合を求めた(表 2-1)。

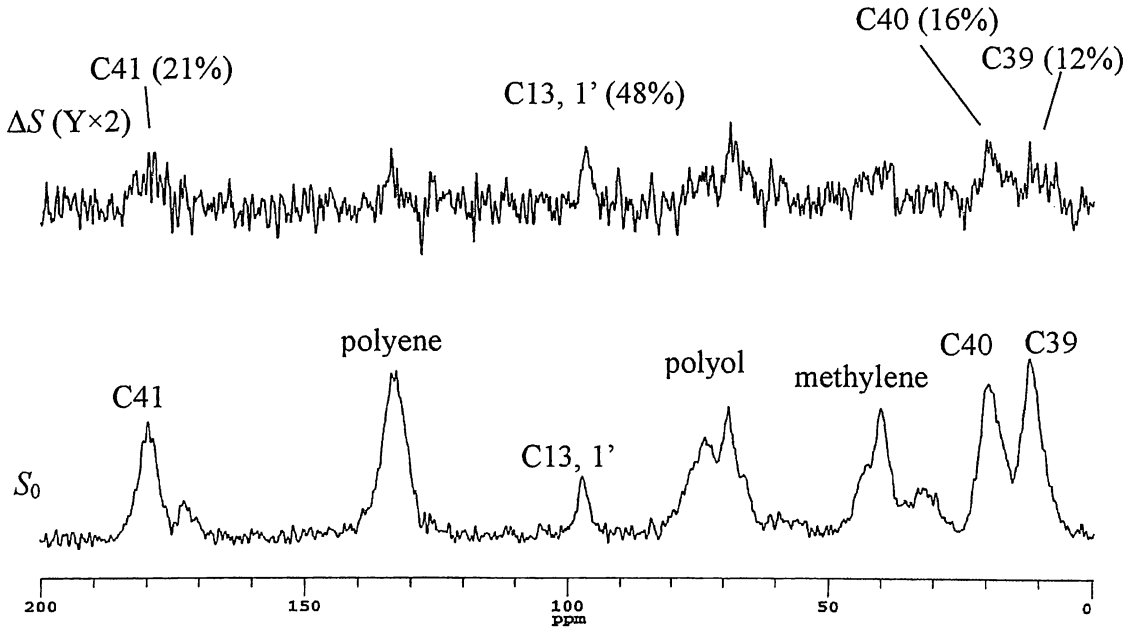


図 2-4 ^{13}C-AmB(**4**)/^{19}F-AmB(**8**)= 1/1 の ^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル（下：非照射スペクトル、上：差スペクトル)。測定温度 30 °C、MAS 速度 6 kHz、展開時間 5.7 ms、積算回数 65088 回。

表 2-1　粉末サンプルの REDOR 減衰の割合

position	dephasing time / ms	$\Delta S/S_0$ (%) 実測値	分子内 a)	分子間 b)
C39	3.4	8	0	8
	5.7	12	0	12
	11.4	24	0	23
C40	3.4	14	0	14
	5.7	16	0	16
	11.4	25	0	25
methylene	3.4	20	10	10
	5.7	19	14	5
	11.4	35	18	17
polyol	3.4	15	12	3
	5.7	21	15	6
	11.4	29	24	5
C13, C1'	3.4	51	26	25
	5.7	48	29	19
	11.4	55	39	16
polyene	3.4	9	1	8
	5.7	7	3	4
	11.4	14	9	5
C41	3.4	19	4	15
	5.7	21	6	15
	11.4	34	5	29

a) X 線構造を基に、REDOR 減衰の理論値を計算

b)実測値から分子内理論値を引いた値

図 2-4 から分かるように固体 NMR シグナルがブロードであることから、AmB が複数の化学シフトの異なる環境下に置かれていることが示唆された。また表 2-1 に示した分子間 REDOR の値を比較すると、AmB のヘッドグループに位置する C41 や末端に位置する C39, 40 で顕著な減衰を与えた。一方で分子中央部のヘプタエン部位の減

衰は比較的弱いことから、ミセル中において AmB の配向は完全なランダムではなく、特定の優位な配向の存在が示唆される。AmB の X 線結晶構造解析によると、AmB はヘプタエン部分を重ね合わせかつ反平行("head-to-tail")で配向している [8]。本実験の REDOR 減衰の結果も 14-F AmB のヘッドグループと[tri-^{13}C]AmB の末端部位が近接した構造を示唆しており、結晶状態と近い"head-to-tail"の相互作用でミセルを形成していると考えられる。また、これら減衰の値から原子間距離を求めるべく理論曲線によるフィッティングを試みたが、単純なモデルでは良いフィッティングカーブが得られなかった。これは、AmB 分子が密にパッキングしており、最も近接した 2 分子間以外にも分子間 REDOR 減衰を与える AmB が存在するためだと考えられる。

2-3-b　ステロール非含有 POPC 膜中での ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定

次にリン脂質膜で AmB 分子間の相互作用がどの様に変化するかを観測した。

図 2-5 にステロールを含まない純粋な POPC 膜に ^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB を混合し ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定を行った結果を示した。

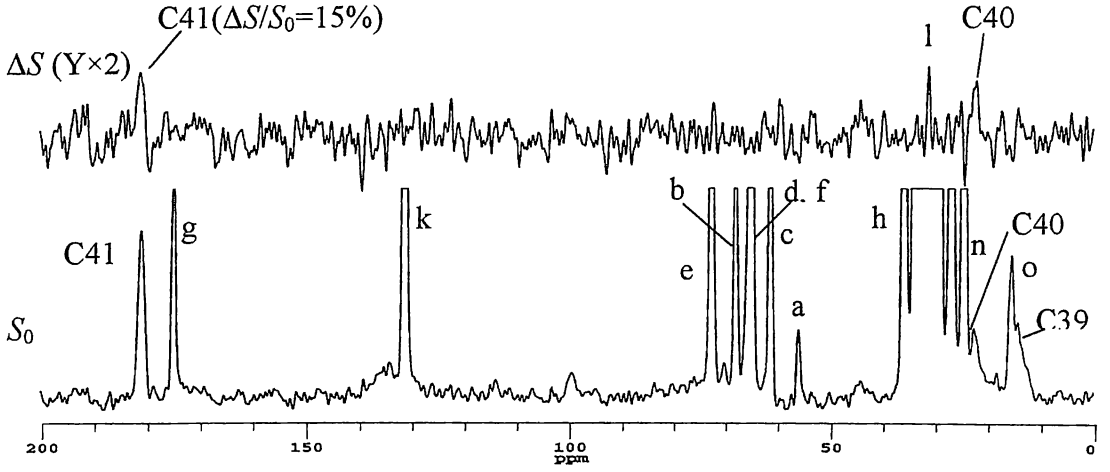


図 2-5　^{13}C-AmB(**4**)/^{19}F-AmB(**8**)/POPC=1/1/20 の ^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル（下：非照射スペクトル、上：差スペクトル)。図中のアルファベットは POPC 由来のシグナル(図 2-1 参照)。測定温度 30 °C MAS 速度 5 kHz、展開時間 12.8 ms、積算回数 62336 回。

AmB 分子間の REDOR として 41 位と 40 位の炭素で顕著な減衰が確認された。^{19}F 標識体のフッ素は AmB のヘッドグループ付近にあり、41 位の炭素も同じくヘッドグ

ループに位置していることから、41 位での減衰は AmB 分子が互いに同じ方向に配向した"head-to-head"構造に由来すると考えられる。一方で、40 位の炭素は AmB の末端側に位置しており、この部分に減衰が観測されたことは AmB 分子が反平行に配列した"head-to-tail"構造を示唆している。MD 計算等からチャネルを形成した AmB は"head-to-head"の相互作用をしていると考えられている[9]。従って、このサンプルで観測された会合体はチャンネル以外の会合体であると考えられる。先の粉末サンプルでの測定でも 40 位の炭素で減衰が起きていたことから、ステロール非含有膜では AmB のミセル構造が一部残っている、または膜から抜け出した AmB がミセルを形成していることが示唆された。

また、30 ppm 付近の POPC 由来のシグナルにも REDOR 減衰が観測されているようにみえるので(図 2-5)、一部の AmB が POPC と相互作用している可能性もあるが、減衰の割合は非常に小さく($\Delta S/S_0$=0.3%)、また再現性が得られていないことから更なる検証が必要である。

2-3-c　コレステロール含有 POPC 膜を用いた測定

次にステロールが AmB 会合体の構造に与える影響を調べるため、コレステロールを 10%含む POPC 膜を用いて同様に REDOR 測定を行い、結果を図 2-6 に示した。

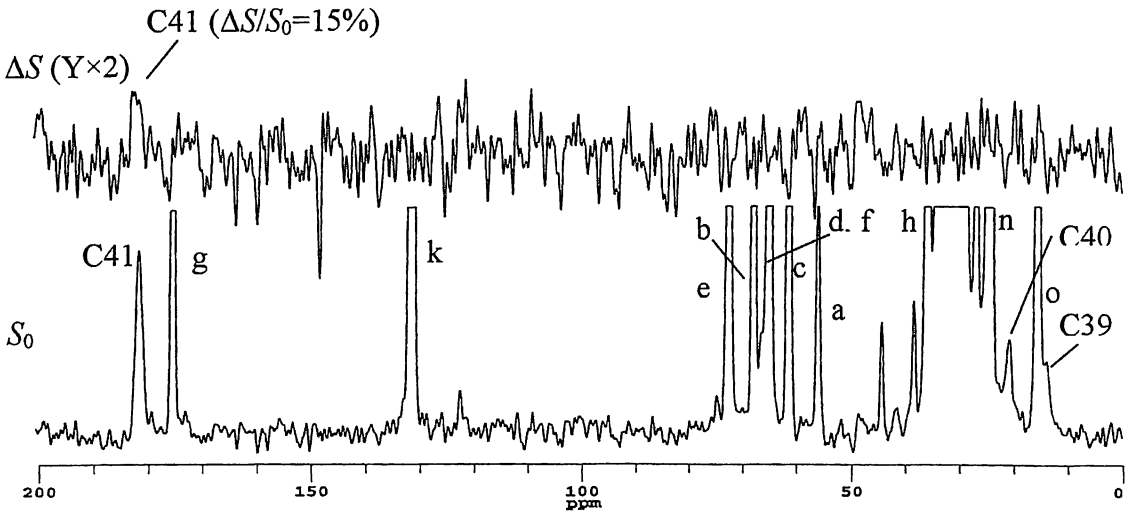


図 2-6　^{13}C-AmB(**4**)/^{19}F-AmB(**8**)/cholesterol/POPC=1/1/2/18 の ^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル（下：非照射スペクトル、上：差スペクトル）。図中のアルファベットは POPC 由来のシグナル(図 2-1 参照)。測定温度 30 °C MAS 速度 5 kHz、展開時間 12.8 ms、積算回数 61440 回。

41位の炭素のREDOR減衰はステロール非含有膜同様コレステロール含有膜でも観測されたが、40位での減衰はほとんど観測されなかった。このことはコレステロールがAmB分子間の"head-to-tail"相互作用に影響する一方で、"head-to-head"の構造には影響しないことを意味している。"head-to-tail"構造をミセル由来だとすると、ステロールが存在することでAmBと脂質膜との親和性が増加し、AmBが膜中で"head-to-head"構造を主体とした会合状態にあると考えることができる。コレステロールがAmBの膜への分配を促進することはよく知られており[3, 10]、本測定の"head-to-tail"の消失もこの過程を見ているものと考えられる。

2-3-d　エルゴステロール含有膜での測定

次にAmBの選択毒性の発現対象であるエルゴステロール含有膜での測定を行った(図2-7)。

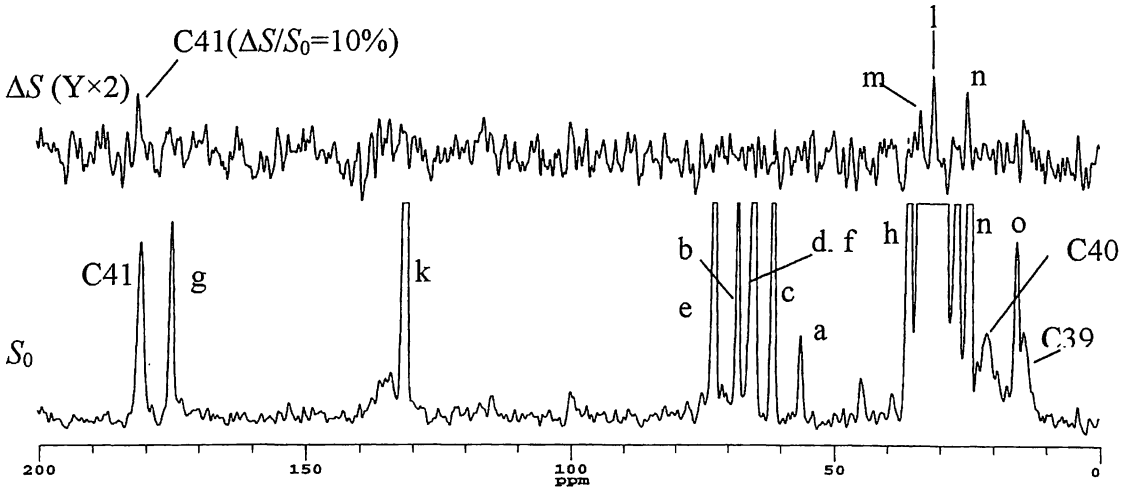


図2-7　^{13}C-AmB(**4**)/^{19}F-AmB(**8**)/ergosterol/POPC=1/1/2/18の^{13}C{^{19}F}REDORスペクトル（下：非照射スペクトル、上：差スペクトル）。図中のアルファベットはPOPC由来のシグナル(図2-1参照)。測定温度30 °C、MAS速度5 kHz、展開時間12.8 ms、積算回数61440回。

AmB分子間の相互作用に関して、エルゴステロール含有膜においてもコレステロール含有膜と同様、41位の炭素のみにREDOR減衰が観測されたが、減衰の割合(10%)はステロール非含有膜やコレステロール含有膜(15%)に比べ低下していた。REDOR減

衰は原子間距離および分子の運動性に依存する。そこで、今回観測された減衰の低下がどちらに由来しているかを確かめるため、同じ測定を低温下で行った(図 2-8)。その結果、41 位の炭素の REDOR 減衰の割合(10%)は室温測定時と変化しなかった。このことからエルゴステロールは AmB の分子の運動性の増加ではなく、原子間距離を増加させる働きがあることが明らかになった。

また POPC との間にも顕著な REDOR 減衰が観測された(図 2-7)。このことはエルゴステロール含有膜において AmB と POPC の相互作用が安定化されていることを示している。前章で述べたように、AmB とリン脂質のヘッドグループとの相互作用は以前の研究により明らかになっていたが[6)]、今回の測定により観測された減衰部位はアシル鎖の末端付近である。これらの結果は、リン脂質のアシル鎖の末端付近とヘッドグループが共に AmB 分子のヘッドグループ付近にあることを意味しており、リン脂質二重膜のアシル鎖がお互いに指組構造（インターディジット構造）をとった状態にあることを示唆している。また、Nguyen らも高濃度で膜に取り込まれた AmB が脂質二重膜の厚みを減少させることを報告しており[11)]、REDOR 測定の結果と一致している。これは AmB（疎水性部の長さは 22 Å[12)]）が単分子で膜を貫通できるように周りの POPC がインターディジット構造をとることで、疎水部位の厚さを調節しているものと考えられる。当研究室でも AmB の活性にリン脂質のアシル鎖の長さが重要であることが確認されており[13)]、このインターディジット構造の形成がチャネルの活性に重要である可能性が示唆された。

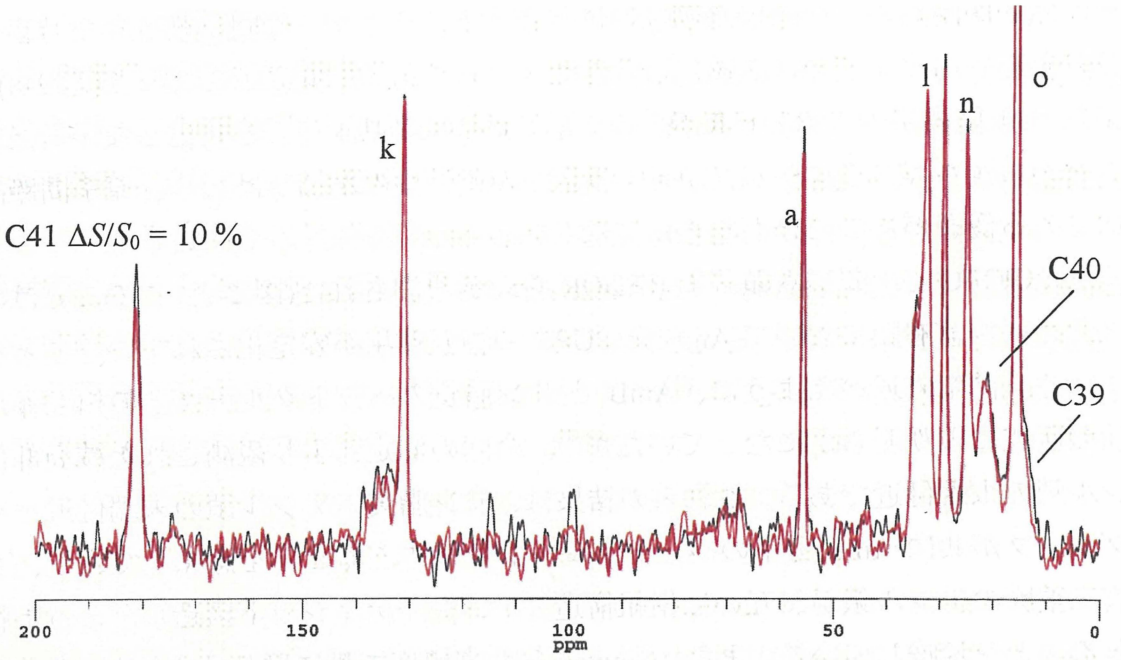


図 2-8　−20 °C での ^{13}C-AmB(**4**)/^{19}F-AmB(**8**)/ergosterol/POPC=1/1/2/18 の ^{13}C{^{19}F} REDOR スペクトル。(黒：非照射スペクトル、赤：照射スペクトル)。図中のアルファベットは POPC 由来のシグナル(図 2-1 参照)。MAS 速度 5 kHz、展開時間 12.8 ms、積算回数 28256 回。

2-3-e　原子間距離の計算

AmB のチャネル構造は AmB 分子が"head-to-head"の配向で会合することにより形成されると考えられている。そこで 41 位の減衰に着目し原子間距離を求めることにした。REDOR 測定の展開時間を 4.8, 8.0, 12.8, 16.0, 24.0, 32.0 ms と変化させ REDOR 測定をし（図 2-9)、S_0 と S スペクトルの面積値から $\Delta S/S_0$ を求めた（表 2-2)。この値を基に 14-F AmB と隣り合う[tri-^{13}C]AmB の F14-C41 の原子間距離を計算した。

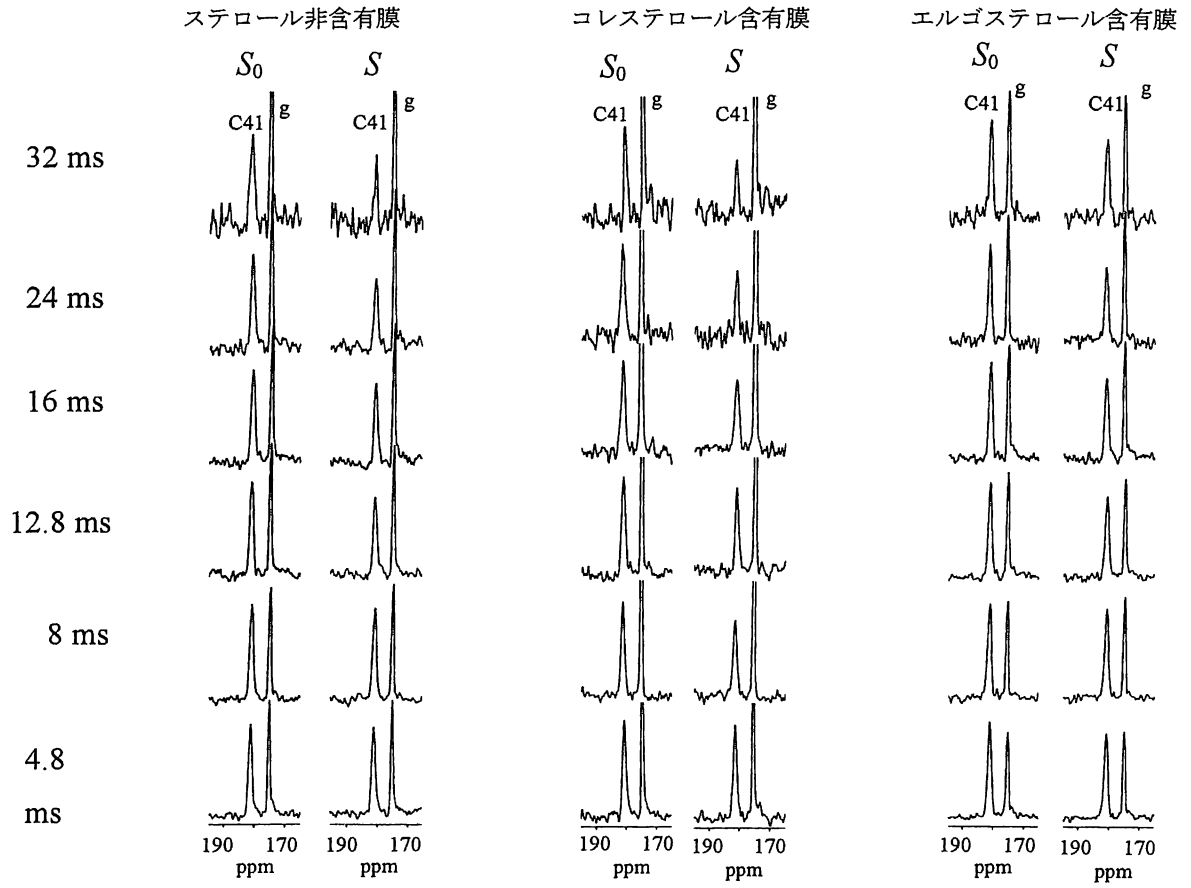


図 2-9　41 位(182 ppm)での REDOR 減衰の展開時間による変化
異なる展開時間で測定した非照射 (S_0, 左)および照射 (S,右)スペクトルのカルボニル領域。左の列からステロール非含有、コレステロール含有、エルゴステロール含有膜。展開時間は上から 32, 24, 26, 12.8, 8, 4.8 ms。

表 2-2　各サンプルの 41 位での REDOR 減衰の割合
（各シグナル強度の積分強度から計算）

	$\Delta S/S_0$					
展開時間 / ms	4.8	8	12.8	16	24	32
ステロール非含有膜	0.015	0.06	0.15	0.17	0.3	0.5
コレステロール含有膜	0.01	0.12	0.15	0.14	0.35	0.5
エルゴステロール含有膜	0.07	0.05	0.1	0.12	0.19	0.23

今回用いたサンプルは ^{13}C 標識体と ^{19}F 標識体を単に混合しただけであるので、REDOR 減衰から原子間距離を求めるためには、両標識体が隣り合う確率を考慮する必要がある。まず距離を計算するにあたり、次のような前提条件を設定した。

1. 14-F AmB と[tri-^{13}C]AmB の物理的性質は同一（ランダムに混ざり合うことができる）。
2. ^{19}F の標識位置は親水性部であり、チャネル間では REDOR 減衰を起こさない(距離が十分離れている)。また、2 分子以上はなれた分子間でも REDOR 減衰を起こさない。
3. AmB 会合体の運動性は低い。

1 番に関しては 14-F AmB は非標識 AmB と同様のイオンチャネル活性、および生物活性を保持していることから [7]、非標識体と同程度の物理的性質を保持しているものと考えることができる。また 2 番に関しても AmB は分子の厚みが 6 Å 程度あるので 2 分子以上離れた場合は 15 Å 以上離れることになる。この距離では REDOR 減衰をほとんど起こさないので、隣り合う 2 分子のみを考慮すればよい。3 番の条件も低温測定を行うことでその妥当性が確認された。また当研究室の ^{2}H NMR 測定の結果も AmB の運動性がほとんどないことを示唆している [4]。

樽板型の複合体を考えた場合、チャネル内の REDOR 減衰について、^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB を 1:1 で混合すると、^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB が隣り合う確率は 75%なる（図 2-10）。

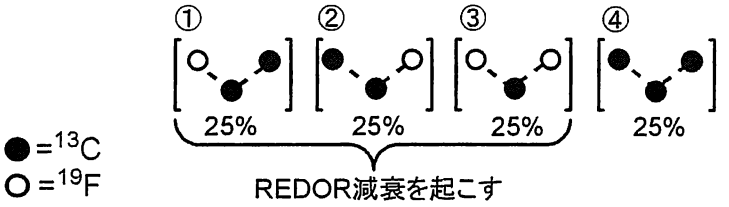


図 2-10　AmB 会合体中の配向

^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB が完全にランダムに並んだ場合の隣り合う 3 分子の組み合わせ。

また[tri-^{13}C]AmB の ^{13}C 標識率は 15%であり、14-F AmB にも天然存在比 1.1%の ^{13}C があるので、NMR で観測される C41 のシグナルのうち 1.1/(1.1+15)=6.8% は 14-F AmB 由来となる。よって残りの 15/(1.1+15)=93.2%が[tri-^{13}C]AmB 由来のシグナルとなる。

F14-C41 の分子内距離は X 線データをもとに 14 位の水素をフッ素に置き換えることで計算し、4.9 Å となった。

最も単純に 2 spin 系で考えると、REDOR 減衰は以下の式(1)で表すことができる。

$\Delta S/S_0$={分子内(4.9 Å)由来の減衰}×6.8%+{分子間(r)由来の減衰×75%}×93.2% ･･･(1)

この式で実験値のフィッティングを行った結果を図 2-11 示した。

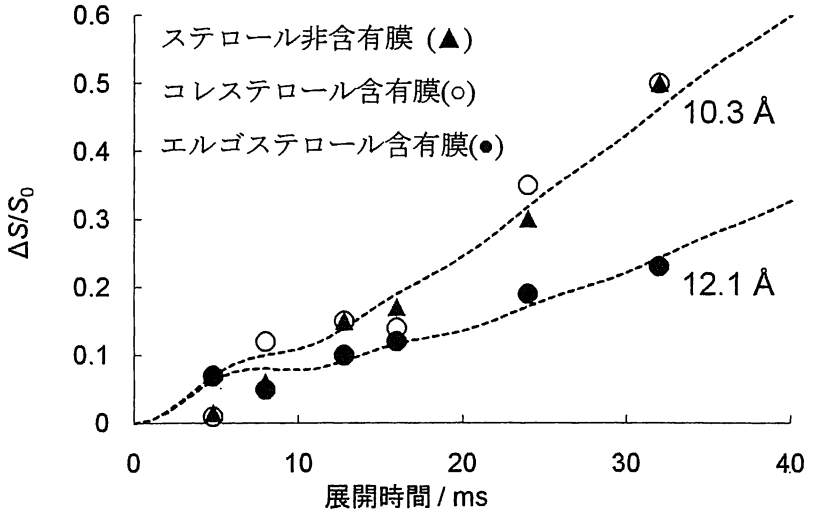


図 2-11　^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB が隣り合う確率を 75%とし、2 spin 系で計算した場合の ^{13}C{^{19}F}REDOR 減衰曲線と分子間距離。▲: ステロール非含有膜、○: コレステロール含有膜、●: エルゴステロール含有膜での 14 位のフッ素と 41 位の炭素との REDOR 減衰の実測値。

この計算により"head-to-head"の構造に関してステロール非含有、またはコレステロール含有膜では AmB の分子間距離は 10.3 Å、エルゴステロール含有膜では 12.1 Å と求めることができ、エルゴステロールの影響で、2 Å 程度分子間距離が増加していることが明らかとなった。この結果は、AmB 分子間にエルゴステロールが挟まった樽板モデルとも一致するものである。またスペクトルのノイズレベルから距離の誤差を見積もると、ステロール非含有膜とコレステロール含有膜では±0.5 Å、エルゴステロール含有膜では±1 Å となった。

2-4　全標識 AmB を用いた ^{13}C{^{19}F}RDX 測定による AmB 分子間の距離測定

AmB 分子間の位置関係を求めるためには複数点での距離情報が必要である。そこで、^{13}C 標識体に全標識 AmB（[U-^{13}C]AmB(**5**)、標識率 50%）を用いて測定を行うことにした。この標識体は全ての炭素が標識されているため、[tri-^{13}C]AmB(**4**)では標識されていなかった炭素についても距離情報を得ることができる。ただし、通常の REDOR 法を全炭素標識体に適用すると、双極子の展開時間に ^{13}C 同士の J カップリングの展開も起こり、スペクトルの位相が合わなくなってしまい距離を求めることができない。そこで、Schaefer らの開発した REDOR for X clusters(RDX)法 [14] (図 1-12)を用いることにした。この方法では同核種間の J カップリングによる相互作用を抑えることができ、位相のゆがみの少ないスペクトルを得ることができる。

サンプルには活性に関与する複合体を形成していると考えられるエルゴステロール含有膜に着目し、測定を行った(図 2-12)。

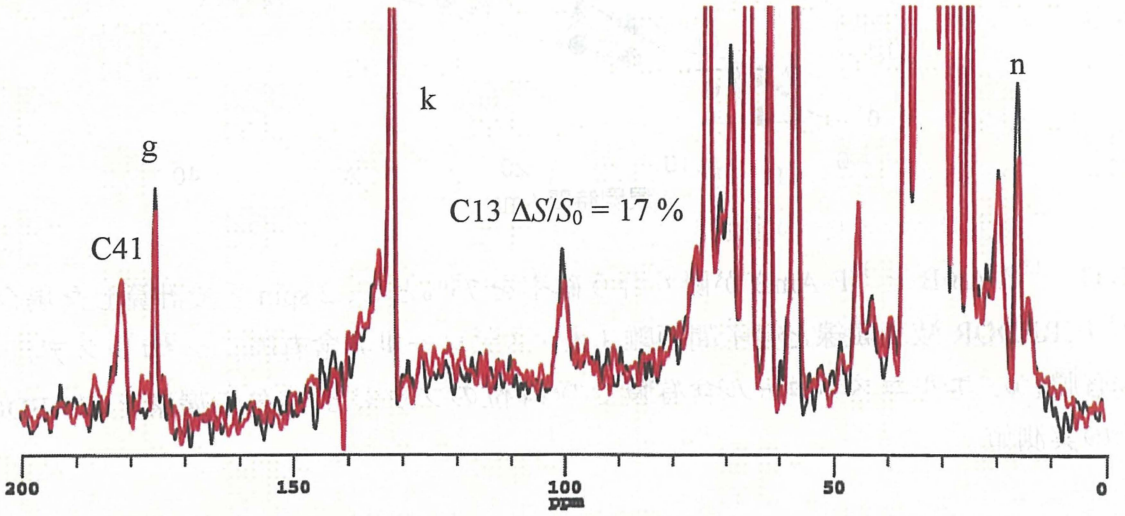


図 2-12　^{13}C-AmB(**5**)/^{19}F-AmB(**8**)/ergosterol/POPC=1/1/2/18 の ^{13}C{^{19}F}RDX スペクトル（黒：非照射スペクトル、赤：照射スペクトル）。図中のアルファベットは POPC 由来のシグナル(図 2-1 参照)。MAS 速度 6 kHz、展開時間 16ms、積算回数 134272 回。

その結果、AmB の 13 位の炭素に顕著な REDOR 減衰(17%)が観測された。2-3 の実験においてエルゴステロール含有膜では 14-F AmB の 14 位のフッ素と[tri-^{13}C]AmB の 41 位の炭素が近接した"head-to-head"の相互作用をしていることが明らかになっている。本測定で REDOR 減衰が観測された 13 位の炭素も 41 位の炭素と同様に AmB のヘッドグループに位置しており、この結果は"head-to-head"の相互作用を支持するものである。次に減衰の値から F14-C13 の原子間距離を計算した。[U-^{13}C]AmB の標識率

は50%なので、14-F AmB 分子内の REDOR 減衰の影響は 1.1/(50+1.1)=2%と考えられる。また AmB の結晶構造から F14-C13 分子内距離は 2.32 Å となった[8]。14-F AmB と [U-^{13}C]AmB の隣り合う確率を 75%(2-3-e 参照)として 2 式による実験値のフィッティングを行った。

$\Delta S/S_0$ = {分子内(2.32 Å)由来の減衰×}2%+{分子間(r)由来の減衰×75%}×98% ・・・(2)

その結果原子間距離は 7～8 Å となり(図 2-13)、[tri-^{13}C]AmB を用いた場合の F14-C41 の 12 Å よりも小さい値となった。AmB が樽板型の会合体を形成していると考えると、14 位のフッ素はチャネル内部に位置しており、同様にチャネル内部に位置する 13 位の炭素の方が 41 位の炭素よりも距離が近いことは妥当である(図 2-14)。

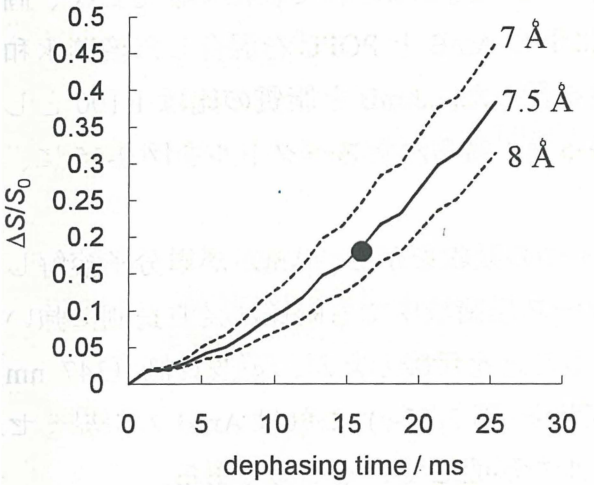


図 2-13　^{13}C-AmB と ^{19}F-AmB が隣り合う確率を 75%として計算した場合の ^{13}C{^{19}F}RDX 減衰曲線と分子間距離。
●: 実測値

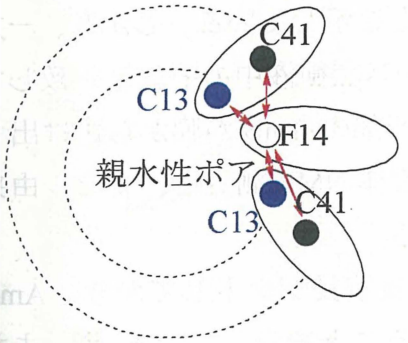


図 2-14　AmB が樽板モデル構造している場合の 14 位のフッ素と 13 位と 41 位の炭素の位置関係(チャネルを上から見た図)。F14-C13 の方が F14-C41 より近い位置関係にある。

[tri-^{13}C]AmB を用いた場合に観測された 41 位での減衰が観測されていないが、展開時間 16 ms、原子間距離 12 Å を想定すると予想される減衰は 2%とわずかなため、明確な減衰が観測されなかったものと考えられる。また、POPC の末端メチル基にも顕著な減衰が起こっており、AmB のヘッドグループと POPC のアシル鎖末端部位が近

接していることが再確認された。ただし、図 2-7 の結果と減衰が起きた炭素が異なっており、具体的な AmB-POPC の相互作用の解明にはさらなる検討が必要と思われる。

2-5　POPC 膜中での UV 吸収スペクトル測定

固体 NMR 測定により、ステロールは AmB と POPC 膜の親和性を上げ、更にエルゴステロールは AmB 分子間距離を増加させることが示唆された。この結果を別の手法でも再現できるかどうかは非常に重要である。序論で述べたように AmB のヘプタエンは UV スペクトルにおいて特徴的な吸収スペクトルを与え、その形状が AmB の会合状態に依存して変化することから、多くの研究がなされてきた [15)]。そこで、固体 NMR 測定の結果を検証するために、同様に予め AmB と POPC を混合した後に水和を行った MLV を用いて UV スペクトル測定を行った。AmB と脂質の比は 1:100 とし、サンプル中の AmB の濃度は 1.67 μM に保った。得られたスペクトルを図 2-15 に、極大吸収波長を表 2-3 に示した。

メタノール中では長波長側に特徴的な 3 つの吸収を示し、AmB が単分子溶解していることを示している(図 2-15-a)。スクロース緩衝液中でも同様に長波長側に強い吸収を示し、AmB はモノマーで存在していることを示唆したが、短波長側（347 nm）の吸収がメタノール中に比べて強くなっている(図 2-15-a)。これは AmB の限界ミセル濃度が 1 μM 程度であるので、一部がミセルを形成しているためである。

ステロール非含有 POPC 膜のサンプルでは 330 nm 付近に大きな吸収をもち、AmB が会合体を形成してヘプタエン間の距離が近づいたことを示している。しかし、一方で長波長側の吸収も強く、その吸収パターンはスクロース緩衝液中のそれと一致している。このことは、AmB と POPC の相互作用が弱く、一部の AmB が膜から抜け出し水中に分散していることを示唆している。このことは固体 NMR 測定で、ミセル由来と考えられる相互作用が観測された結果と一致している。

コレステロール含有膜では長波長側の吸収が僅かに長波長シフトしており、AmB が疎水的環境下、即ちリン脂質膜中に取り込まれていることを示している [15)]。また 340 nm 付近に強い吸収を示し、AmB 分子が会合状態にあることが示された。この吸収ピークはブロードであることから 2 分子間の相互作用様式は単一ではなく、複数の会合状態が混在していることを示している。

エルゴステロール膜では会合体由来の短波長側のシグナルが長波長シフトしており、またモノマー由来のシグナル強度が上昇している。Gruszecki らの研究によると、

短波長側の吸収はヘプタエン同士の励起子カップリングによるエネルギー順位の分裂に対応している[16]。ヘプタエン同士が近づくとエネルギーの分裂が大きくなり、吸収波長が短波長側に移動する。逆にヘプタエン同士の距離が離れるとエネルギーの分裂は小さくなり吸収波長は長波長側にシフトする。彼らの考察に基づくと、エルゴステロール膜中では、コレステロール膜で見られたような大きな会合体の形成は抑制され、分子間距離が離れたことを意味しており、REDOR 測定の結果とも一致する。また、最も長波長の吸収極大も顕著に長波長シフトしている。この吸収波長のシフトはAmB が疎水的環境下に置かれたためであると解釈されており、AmB 分子が POPC 膜中に取り込まれ、AmB-POPC 間に相互作用が働いていることを示唆している。こちらも REDOR 測定において AmB-POPC の相互作用が観測されたことと一致する結果となった。

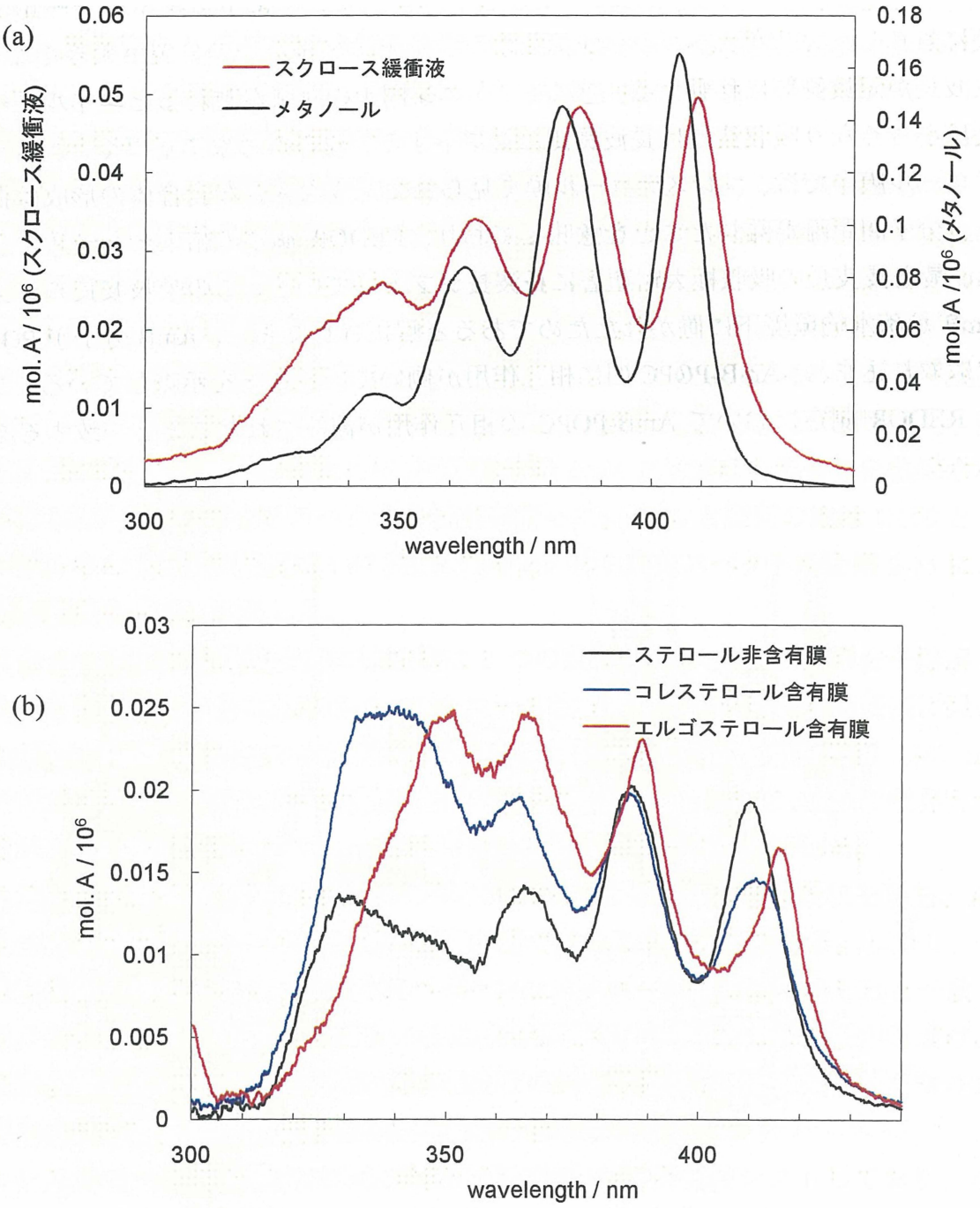


図 2-15　POPC 膜中での AmB の UV スペクトル。

(a) MeOH および緩衝液中での UV スペクトル。(b)POPC 膜中での UV スペクトル。R= AmB/lipid = 10^{-2}、AmB 濃度を 1.67 μM に固定。

表 2-3　AmB の UV スペクトル(図 2-15)の極大吸収波長

サンプル	極大吸収波長 / nm			
メタノール中	345	363	382	405
スクロース緩衝液中	347	365	385	409
ステロール非含有膜中	329	365	386	410
コレステロール含有膜中	340	364	386	411
エルゴステロール含有膜中	351	365	389	416

2-6　POPC 膜中での AmB のチャネル活性試験

固体 NMR 測定および UV スペクトル測定から、リン脂質膜に含まれるステロールが AmB の構造を変化させることが明らかとなった。次に構造の変化と AmB のイオンチャネル活性との関連性を評価するため、^{31}P NMR を用いたチャネル活性試験 [17] を行った。

この手法ではリン酸の ^{31}P NMR の化学シフトの値でリン脂質膜を透過するカチオンの流れを観察することができる(図 2-16)。リポソームを pH = 4.5($H_2PO_4^-$)のリン酸緩衝溶液中で調製し、その後、水酸化カリウム水溶液を加えてリポソームの外液を pH = 7.5(HPO_4^{2-})として pH 勾配つくる。そこに、AmB を加えてインキュベートすることで、リポソームにチャネルを形成させる。チャネルが形成されるとチャネルを介してカリウムイオンが流入し、リポソーム内の正電荷が増加する。一方、プロトンキャリヤー(FCCP)によりプロトンがリポソーム外に流出し、内外の電位差が保たれる。その結果、リポソーム内外の pH 勾配が解消され最終的に内液の pH も 7.5 となる。^{31}P NMR 測定時には Mn^{2+}イオンを加えることにより、リポソーム外のシグナルは消去され、リポソーム内のリン酸のシグナルのみを観察することができる。リン酸のシグナルは pH = 4.5 のとき 1.2 ppm に現れ、pH が 7.5 に近づくにつれてそのシグナルが低磁場にシフトしていき、pH = 7.5 になると 3.1 ppm に移動する。EggPC を用いて行われた実験では、エルゴステロール含有膜で 1.2 ppm と 3.1 ppm に二本シグナルが現れる"all-or-none"タイプと呼ばれるチャネルが形成され、一方、ステロール非含有およびコレステロール含有膜ではブロードなピークの観測される"graded"タイプと呼ばれるチャネルが形成されることが知られている [18]。"all-or-none"タイプのチャネルは開口時間が長くチャネルが形成と同時に K^+-H^+交換が平衡に到達し、"graded"タイプのチャネルは開口時間が短く徐々にリポソーム内の pH が変化すると考えられている [17]。

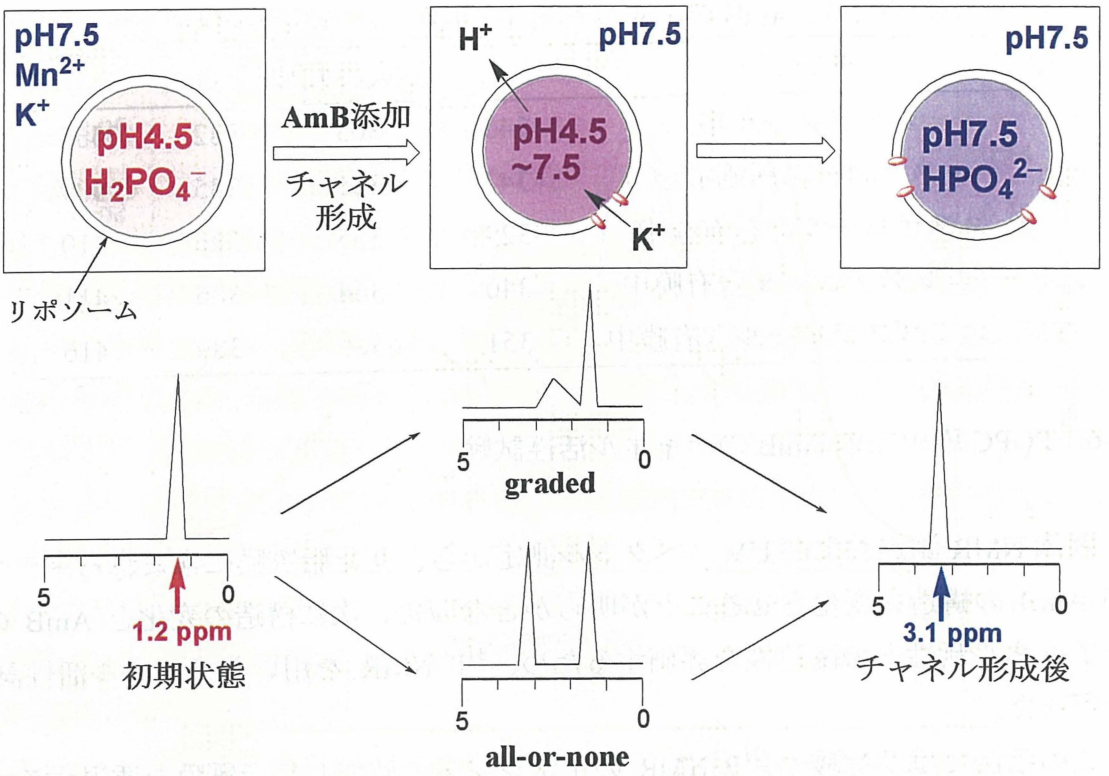


図 2-16　^{31}P NMR によるイオンチャネル活性試験の概略図。AmB チャネルの形成に伴い、リポソーム内部の pH が変化し、リン酸の ^{31}P NMR の化学シフトが変化する。

しかし、EggPC はもともとコレステロールを含んでおり、純粋にステロールの影響を評価することができていなかった。本実験ではリン脂質に純粋な POPC を用いることで、固体 NMR や UV スペクトル測定の条件に近い環境下での観測を行い、ステロールの役割を評価した(図 2-17)。

その結果、ステロール非含有リポソームでは AmB の濃度を高めても 3.1 ppm にシグナルが観測されず、AmB はチャネル活性を殆ど発現していないことが分かった。これは AmB と POPC の親和性が低く、AmB が膜に結合することができていないためだと考えられ、UV スペクトルの結果とも一致する。コレステロール含有膜とエルゴステロール膜で AmB によるチャネルの形成が確認でき、それぞれ、"graded"タイプと"all-or-non"タイプに対応していた。また、エルゴステロール含有膜の $R=10^{-3}$ では、シグナル強度が低下しているが、これは Mn^{2+}がチャネルを通りリポソーム内に入ることで内側のシグナルもクエンチされているためであると考えられる。一方でコレステロール膜では 3.1 ppm のシグナルが残っていることから、AmB の形成するポアサイズは Mn^{2+}が通れるほど大きくないと思われる。

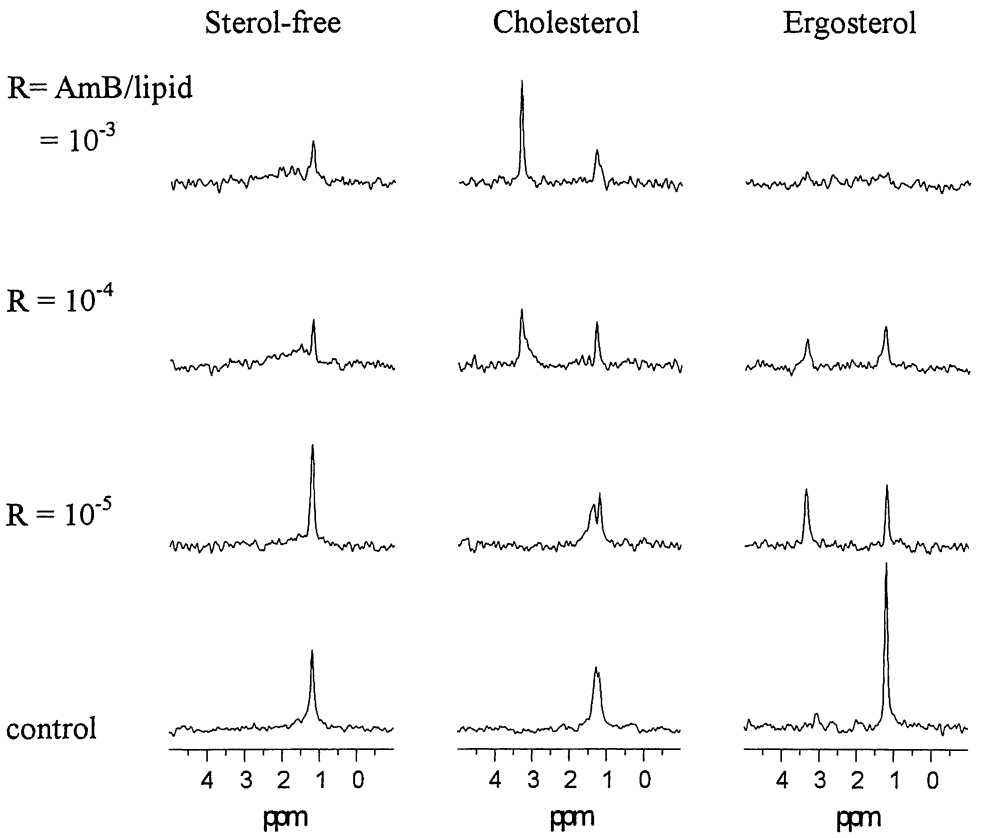


図 2-17　POPC を用いた AmB の K^+透過活性試験の結果

POPC リポソームに AmB を添加、3 時間インキュベート後に ^{31}P NMR を測定。1.2 ppm のシグナルは初期状態のリポソームを表し、AmB のチャネルが形成され、H^+/K^+の交換が起こると 3.1 ppm にシグナルを与える。左の列からステロール非含有、コレステロール含有、エルゴステロール含有膜。AmB/lipid の比は上から 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}。一番下は AmB の代わりに DMSO を添加して行ったコントロール実験。

2-7　AmB-AmB 相互作用と活性発現機構

ステロール非含有膜と AmB との親和性は弱く、活性を発現できずに AmB の多くは水中に存在しミセルを形成していると考えられる。そのミセル状態では少なくとも"head-to-head"と"head-to-tail"の構造をもつことが明らかとなった(図 2-18-a)。

コレステロールまたはエルゴステロールを含有する POPC 膜では AmB 分子は膜に取り込まれる。POPC はアシル鎖に不飽和結合をもつため、二重膜のパッキングは悪

く、アシル鎖の秩序は低い。しかし、ステロールのようにリジッドな骨格をもつ分子が存在すると、アシル鎖の秩序が上昇し、パッキングが密になることが知られている。AmB 分子もヘプタエンを持つ剛直な分子であり、よりパッキングのよいステロール含有膜に対しその親和性が上昇する[19]。この膜への取り込みの過程で、ミセル状態から AmB の配向が変化し、"head-to-head"の相互作用が優先するようになったものと考えられる。

ステロール含有膜中では AmB は自己会合状態にあるが、その様子はステロールの種類により変わる。コレステロール含有膜では AmB-POPC 間の REODR 減衰が観測されなかったこと、UV スペクトルでヘプタエン間の相互作用が強く観測されたことから、AmB は強く自己会合し周りのリン脂質と相分離状態にあると考えられる。このため、明確なポア構造をもったチャネルの形成ができず、イオンが徐々に透過する"graded"タイプの活性が見られたものと考えられる(図 2-18-b)。

一方エルゴステロール含有膜では、AmB 分子間の距離が増加していた。このことはエルゴステロールの影響で AmB 分子間相互作用が弱められたことを意味しており、エルゴステロールが AmB と複合体を形成している可能性を示唆している。また、AmB-POPC 間にも顕著な REDOR 減衰が観測されたことから、AmB-エルゴステロール-POPC の三者による複合体の形成[20]が推測される。この複合体中では AmB はある程度の運動性を持ち、親水性部分が内側に集まった比較的大きなポアを持つチャネルが形成され、イオンを一気に透過する"all-or-non"タイプの活性を発現していると推測される(図 2-18-c)。

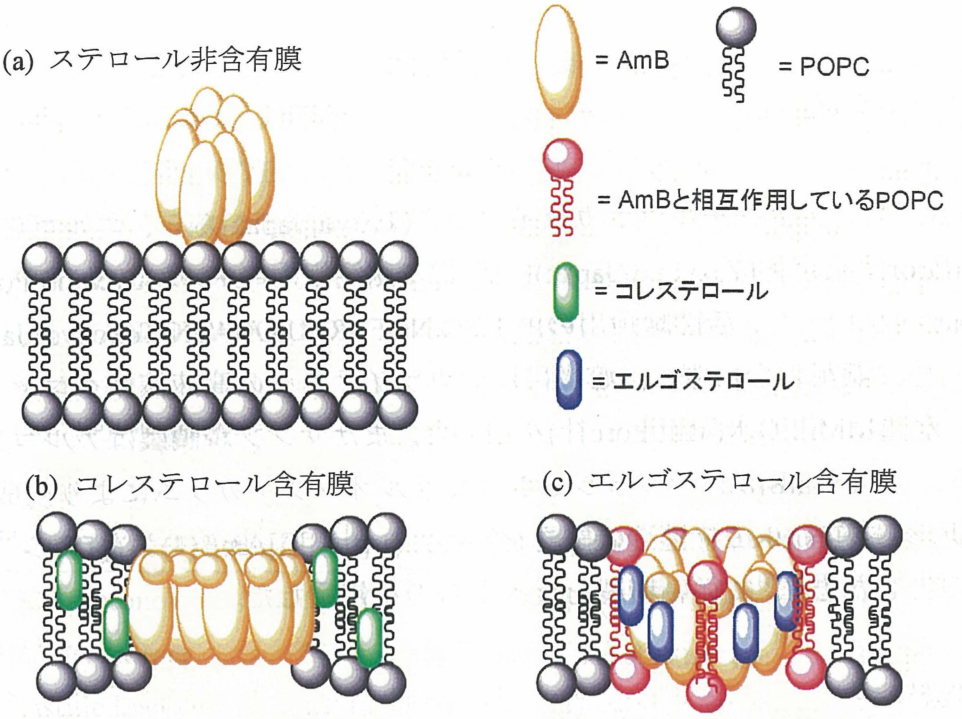


図 2-18　POPC 膜中での AmB 会合体モデルの模式図。(a)ステロール非含有膜では AmB は膜中に入らず、水中のミセル構造を維持している。(b)コレステロール含有膜では AmB が強く自己会合し、周りのコレステロールおよびリン脂質から分離している。(c)エルゴステロール膜中では AmB-エルゴステロール-POPC のチャネル複合体が形成される。また、ステロール含有膜(b, c)では AmB の向きが"head-to-head"で揃っている。

実験項

試薬および溶媒

AmB、コレステロールはナカライテスク(Tokyo, Japan)から、エルゴステロール、Selectfluorは東京化成(Tokyo, Japan)、固体NMR測定用のPOPCはAvanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, AL)から、活性試験用のPOPCはNOF CORPORATION(Tokyo, Japan)から購入した。特に記載のない限り、溶媒にはナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を、水にはMilliQ水(MilliPore社)を用いた。またサンプル調製はアルゴン雰囲気化で行った。14-F AmB(**8**)はフラッシュシリカゲルオープンカラムにより生成を行い、質量分析および^{1}H NMRで構造の確認を行った。[tri-^{13}C]AmB(**4**)および[U-^{13}C]AmB(**5**)は既に報告した方法[6)]に従い精製を行ったものを使用した。

使用機器

放線菌の培養には、東京理化器械のローテンプインキュベーター LTI-601 SD 型を、振等装置には SHAKER SRR-2 を用いた。遠視分離装置は久保田製作所の KUBOTA 5200、溶液 NMR は、ECA-500 (JEOL, 500MHz for ^{1}H NMR)を用いて測定した。NMR 測定溶媒として $CDCl_3$ または DMSO-d_6 を用いた。質量分析には、サーモクエスト社 LCQ-DECA を用いた。HPLC は島津製作所製の SCL-10Avp, SPD-10A*i*, LC-10A*i*, DGU-12A, SCL-10Avp からなる装置を使用し、カラムは YMC-Pack Polymer C18 ϕ10x250 mm、ナカライテスク製の COSMOSIL 5C_{18}-AR-Ⅱ ϕ20x250 mm または ϕ4.6x250 mm を使用した。可視紫外分光光度計は島津製作所製の UV-2500PC、日本分光の V-630 Bio spectrophotometer を使用した。ボルテクスミキサーは Pasolina NS-80 を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。固体 NMR は CMX-300 (Chemagnetics/Varian, 300 MHz for ^{1}H NMR)を用いた。

^{13}C 標識 AmB の生合成的調製

本研究には American Type Culture Collection (株番号：ATCC 14899)より購入した放線菌 *Streptomyces nodosus* を用いた。

培地の作成

培地には ATCC、GYE、FCA の 3 つを用いた。培地成分は以下の表 2-4～2-6 に示すとおりである。ATCC 培地は凍結保存している放線菌の立ち上げ時や継代培養の寒天斜面培地として用いた。GYE は放線菌の増殖培地として、FCA 培地は AmB の生産培地として用いた。蒸留水に培地成分を加え NaOH 水溶液で pH を調整し、オートクレイブで 120 °C、20 分間滅菌した後使用した。寒天斜面培地は ATCC 培地中 1.5%の寒天(Agar Powder, Wako)を含み、加熱して寒天を溶かした後、内径 18 mm の試験管 1 本につき 5 ml を分注し、シリコ栓で蓋をした。また凝縮水の蒸発を防ぐためにシリコ栓の上からラップで覆った。

表 2-4　ATCC 培地成分

Tryptone	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Distilled water	1.0 L
pH	7.0

表 2-5　GYE 培地成分

D-(+)-Glucose	10.0 g
Yeast extract	3.0 g
Distilled water	1.0 L
pH	7.0

表 2-6　FCA 培地成分

用いる標識化前駆体	[3-^{13}C]プロピオン酸ナトリウム	[U-^{13}C] glucose
D-(−)-Fructose	500 mg	250 mg
Dextrin	1.5 g	750 mg
Soy beans	750 mg	375 mg
$CaCO_3$	500 mg	500 mg
Distilled water	50 ml	50 ml
pH	7.0	7.0

標識化前駆体の水溶液の調製

メディウム瓶に[3-^{13}C]プロピオン酸ナトリウム 150 mg をとり、蒸留水 1.4 ml に溶解させた。[U-^{13}C] glucose を用いる場合は 1 g をとり、蒸留水 1.8 ml を加えて溶解させた。その後オートクレイブで 120 °C、20 分間滅菌した。この溶液を 1 feed 当り 200 μl 加えた。

本培養

凍結乾燥してある放線菌を、ATCC の液体培地に加えて試験管ミキサーを用いて分散させ、ATCC の寒天斜面培地に白金耳で接種した。26 °C でインキュベーションすると、3 日ほどでコロニーの形成が見られた。その後、斜面上の放線菌を火炎滅菌したミクロスパチュラでそぎ取り、界面活性剤である 0.02 % TWEEN 80(Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate)を 1 ml 加えて 15 分攪拌し、懸濁させた。この懸濁液 0.7 ml を増殖培地である GYE 培地 5 ml に植え込み、 2 日間 26 °C でインキュベーションした。

続いて AmB を生産させるため FCA 培地 50 ml に対し放線菌を含んでいる GYE 培地を 1.5 ml 加えた。培養容器には 500 ml ひだ付き三角フラスコを用い、6 日間振等培養(26 °C, 200 rpm)を行った。その間、AmB 収穫までに前述の標識化前駆体水溶液を pulse-feed した([3-^{13}C]プロピオン酸ナトリウムの場合は培養開始後 24 時間経過した後から 12 時間間隔で 6 回、[U-^{13}C] glucose の場合は培養開始直後から 8 時間間隔で 9 回)。以上の操作は全て、紫外滅菌したクリーンベンチ内でおこなった。

AmB の抽出と精製

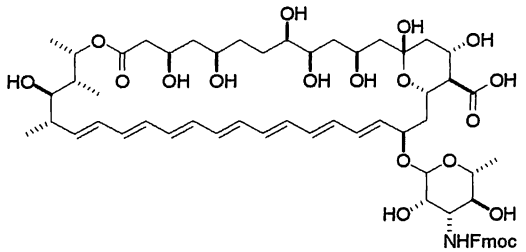
収穫時期を迎えた生産培地を 5 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて、pH を 10.5 に調製した。その後、生産培地量の半量の酢酸エチル(7 %w/v Aliquat 336)を加え、 1 時間ほど激しく撹拌(200 rpm)した。再びその溶液を 5 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 10.5 に合わせた。次に、2000 rpm で 10 分間遠心分離して、上層の酢酸エチル部分をデカンテーションにより得た。この抽出作業は 2 回行った。抽出液を 10~14 日間 4 °C で冷却し、AmB を析出させた。

析出してきた黄色粗生成物を遠心分離により収集し、3 ml アセトン、3 ml ドライアセトン、次いで 2 ml メタノールで洗浄し、アルゴンガスを吹き付け乾燥させた後、真空ポンプで完全に溶媒を除去し、AmB の粗生成物を得た。

この粗生成物を 1 ml の DMF に溶解し、酢酸を加えて酸性とした（DMF 溶液 20 μl に水 20 μl を加えたものの pH が 3.9~4.2)。エーテルを 10 ml 加え、AmB を析出させた。20 分間遠心分離しデカンテーションにより上澄みを取り除いた。エーテルで 2 回洗浄した後、アルゴンガスを吹き付け乾燥させ、真空ポンプで完全に溶媒を除去し、目的の AmB を得た。標識率は質量分析のピークパターンから求めた。

14-F AmB の調製

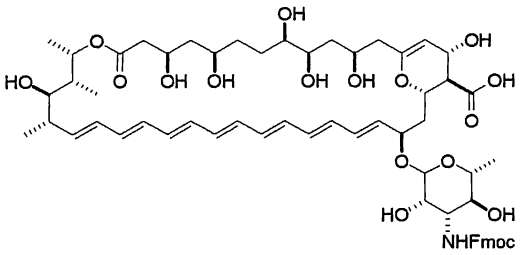
N-Fmoc AmB



AmB(306.0 mg, 331 μmol)及びFmocOSu(188.4 mg, 559 μmol)をDMF(10 ml)に溶解し、ピリジン(150 μl, 6.0 mmol)を加え、室温で 18 時間攪拌した。エーテル 150 ml を加え生成物を沈殿させ、セライトでろ取した。$CHCl_3/MeOH/H_2O$=10/6/1 で回収し、溶媒を除去して目的物(373.4 mg, 99%)を得た。

Rf 0.78 ($CHCl_3$: MeOH : H_2O = 10 : 6 : 1); MS (ESI) m/z 1168.5$(M+Na)^+$

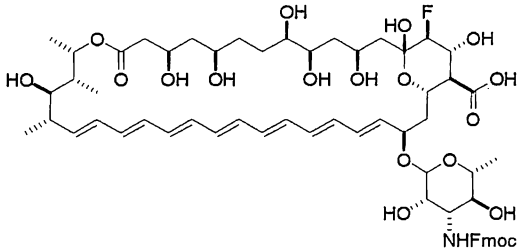
N-Fmoc-13,14-anhydro AmB(**6**)



アルゴン雰囲気下、化合物 **7**(267.9 mg, 0.23 μmol)をジクロロメタン 10 ml に懸濁させ、2, 6-ルチジン(969 μl, 8.3 mmol)続けて TMSOTf(1.17 ml, 6.4 mmol)を滴下し、室温で 40 分攪拌した。反応液を減圧濃縮後、ヘキサンで抽出した。沈殿をセライト濾過で取り除き、濾液を濃縮後、プラスチック容器に移し乾燥させた。アルゴン置換した後、THF5 ml に溶解した。2 M の HF-ピリジン(0.57 g の 40%HF-ピリジンに 3.6 ml のピリジンを加え、THF で全量を 10 ml に希釈したもの)を加え、室温で 2 時間攪拌した。溶液をヘキサン/エーテル(1/1)の混合溶液の中に注ぎ、沈殿を析出させ、セライトでろ取した。沈殿をエーテル、7%リン酸水素二ナトリウム水溶液、水で順次洗浄した後、メタノールで回収し、溶媒を留去した。シリカゲルオープンカラムを用いて精製をし、目的物 **6**(130 mg, AmB より 50%)を得た。

6: Rf 0.15($CHCl_3$: MeOH = 3 : 1); MS (ESI) m/z 1150.5$(M+Na)^+$

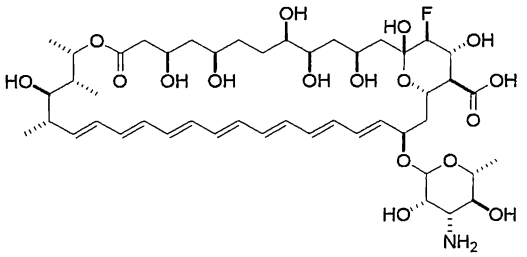
N-Fmoc-14-(S)-fluoro AmB(**7**)



化合物 **6**(100 mg, 88.7 μmol)を DMF3 ml に溶解し、pH 6.8 の緩衝液(0.34%のリン酸二水素カリウムと 0.35%のリン酸水素二ナトリウムを含む)を 1 ml 加えた。Selectfluor(45 mg, 127 μmol)を加え、室温で 40 分攪拌した。ODS カラムで脱塩を行い、MeOH で回収した。溶媒を留去した後、シリカゲルのオープンカラムで精製し、目的物 **7**(35.5 mg, 30%)を得た。

7: Rf 0.32($CHCl_3$: MeOH = 3 : 1); MS (ESI) m/z 1186.7$(M+Na)^+$

14-F AmB(**8**)



化合物 **7**（35.5 mg, 30.5 μmol）を DMSO/MeOH（3/1）の混合液 1.2 ml に溶解し、ピペリジン（18 μl, 183 μmol）を加え、室温で 1 時間攪拌した。エーテル沈殿後、セライトでろ取し、$CHCl_3$/MeOH/H_2O（10/6/1）で回収した。溶媒を留去後、シリカゲルオープンカラムで精製し、目的物を得た（10 mg, 30%）。

8: Rf 0.20($CHCl_3$: MeOH : H_2O = 10 : 6 : 1); ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 4.24 (1H, m, H17), 3.99 (1H, m, H15), 3.78 (1H, dd, *J*=51.5, 9 Hz, H14), 2.00 (1H, t, *J*=10.0, H16), All other ^{1}H signals are identical with those of AmB; ^{19}F NMR (470.40 MHz, DMSO-d_6) δ –199.86 (brd, *J*=51.5 Hz); MS (ESI) m/z 964.6 $(M+Na^+)$

固体 NMR サンプル調製

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB 粉末サンプルの調製

14-F AmB と[tri-^{13}C]AmB をそれぞれ 3.5 mg (3.7 μmol)取り、少量の DMSO に溶解させた。そこに水を加え、AmB ミセルを形成させた後、凍結乾燥を行った。完全に乾燥するまで、水の追加と凍結乾燥の操作を繰り返した。得られた粉末を 5 φ の MAS ローターに詰め、NMR 測定に用いた。

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/POPC リポソームの調製

20 ml ナス型フラスコ中で 14-F AmB(**8**) (1.7 mg, 1.8 μmol)、[tri-^{13}C]-AmB(**4**) (1.7 mg, 1.8 μmol)、POPC (28 mg, 36.8 μmol)を $CHCl_3$/MeOH に溶解後、エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた(ステロール含有サンプルでは 10%の POPC を対応するステロールに置換)。その後、真空下で 8 時間乾燥させることで、完全に溶媒を除去した。リン脂質フィルムに H_2O(1 ml)と 10 mM HEPES 溶液(pH7.0, 31.4 μl)を加え、vortex, sonication によって水和を行い、脂質の分散液とした。凍結融解を 5 回行い MLV を形成させた後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し替え、凍結乾燥し、粉末状態とした。アルゴン雰囲気下、D_2O(31.7 μl)を加え、vortex、凍結融解を繰り返すことでリン脂質を完全に再水和させペースト状にした。サンプルを外径 3 mm のガラスインサートに移し替え、エポキシ樹脂で密封した。このガラスインサートを 5 φ の MAS ローターに入れ、NMR 測定に用いた。

14-F AmB/[U-^{13}C]AmB/Ergosterol/POPC リポソームの調製

20 ml ナス型フラスコ中で 14-F AmB(**8**) (1.7 mg, 1.8 μmol)、[tri-^{13}C]-AmB(**4**) (1.7 mg, 1.8 μmol)、エルゴステロール(1.4 mg, 3.6 μmol)、POPC (24.7 mg, 33 μmol)を $CHCl_3$/MeOH に溶解後、エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた。その後、真空下で 8 時間乾燥させることで、完全に溶媒を除去した。リン脂質フィルムに H_2O(1 ml)と 10 mM HEPES 溶液(pH7.0, 29.5 μl)を加え、vortex, sonication によって水和を行い、脂質の分散液とした。凍結融解を 5 回行い MLV を形成させた後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し替え、凍結乾燥し、粉末状態とした。アルゴン雰囲気下、D_2O(29.5 μl)を加え、vortex、凍結融解を繰り返すことでリン脂質を完全に再水和させペースト状にした。サンプルを外形 3 mm のガラスインサートに移し替え、エポキシ樹脂で密封した。このガラスインサートを 5 φ の MAS ローターに入れ、NMR

測定に用いた。

固体 NMR 測定

測定には 5 mm の 3 チャンネル MAS プローブ(Varian)を用いた。測定時は温度コントローラーと MAS 速度コントローラーにより、温度と MAS 速度を一定に保った。低温測定時には、Polycold Systems Inc.の PGC-150 を用いた。サンプルごとにパルス幅、CP 条件の最適化を行い、異なる展開時間の測定を行うときは、毎回チューニングとマッチングの確認を行った。プロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンスを用いた[21]。フッ素核の位相回しには xy-8[22]を用いた。

各サンプルの測定条件は以下の表(表 2-7～2-11)にまとめた。

$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR

表 2-7　14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB 粉末サンプル測定条件

dephasing time / ms	3.4	5.7	11.4
scans	26896	65088	34096
^{13}C observed frequency / MHz		75.315	
^{19}F irradiation frequency / MHz		281.743	
MAS frequency / Hz		7000 ± 2	
temperature / °C		30 ± 1	
spectral width / kHz		30	
^{1}H $\pi/2$ pulse width / μs		4.3	
^{13}C π pulse width / μs		9.33	
^{19}F π pulse width / μs		12.1	
CP contact time / ms		2	
pulse delay / s		4	
TPPM 1H-decoupling field strength / kHz		71	
^{19}F phase cycling		xy-8	

表 2-8　14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/POPC の ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定条件

dephasing time / ms	4.8	8	12.8	16	24	32
scans	71440	78976	62336	71936	73216	22784
^{13}C observed frequency / MHz	75.315					
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743					
MAS frequency / Hz	5000 ± 2					
temperature / °C	30 ± 1C					
spectral width / kHz	30					
^{1}H $\pi/2$ pulse width / μs	3.8					
^{13}C π pulse width / μs	10.2					
^{19}F π pulse width / μs	11.75					
CP contact time / ms	2					
pulse delay / s	2 s					
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	71 kHz					
^{19}F phase cycling	xy-8					

表 2-9　14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/cholesterol/POPC の ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定条件

dephasing time / ms	4.8	8	12.8	16	24	32
scans	34704	60672	61442	42520	61440	50432
^{13}C observed frequency / MHz	75.315					
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743					
MAS frequency / Hz	5000 ± 2					
temperature / °C	30 ± 1					
spectral width / kHz	30					
^{1}H $\pi/2$ pulse width / μs	4.3					
^{13}C π pulse width / μs	9.93					
^{19}F π pulse width / μs	13.3					
CP contact time / ms	3					
pulse delay / s	2					
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	58					
^{19}F phase cycling	xy-8					

表 2-10　14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC の ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定条件

dephasing time / ms	4.8	8	12.8	16	24	32	12.8
scans	59520	57088	61440	61440	61440	64128	22748
^{13}C observed frequency / MHz	75.315						
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743						
MAS frequency / Hz	5000 ± 2						
temperature / °C	30 ± 1						-20 ± 1
spectral width / kHz	30						
^{1}H $\pi/2$ pulse width /μs	3.8						4.6
^{13}C π pulse width /μs	10.2						9.53
^{19}F π pulse width /μs	11.8						
CP contact time / ms	2						
pulse delay / s	2						3
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	71						
^{19}F phase cycling	xy-8						

$^{13}C\{^{19}F\}$RDX

表 2-11　14-F AmB/[U-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC の $^{13}C\{^{19}F\}$RDX 測定条件

dephasing time / ms	16
scans	134272
^{13}C observed frequency / MHz	75.313
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743
MAS frequency / Hz	5000 + 2
temperature / °C	30 + 1
spectral width / kHz	30
^{1}H $\pi/2$ pulse width /μs	4
^{13}C π pulse width /μs	9.93
^{19}F π pulse width / μs	13.3
CP contact time / ms	1.5
pulse delay / s	2
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	63
^{19}F phase cycling	xy-8
^{13}C phase cycling	$\phi_1(x, y, x, y)_4$, $\phi_2(x, y, -x, -y)_4$
	$\phi_3(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y)_2$
	$\phi_4(-x, -y, x, y, x, y, -x, -y)_2$
	$\phi_5(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y, -x, -y, x, y, x, y, -x, -y)$

REDOR 減衰シミュレーションカーブの作成

2 spin システムの理論曲線の作成は、Bessel 級数による近似式を用いた(Microsoft Excell, k=6 まで計算)。

図 2-13 の RDX 測定における減衰の計算には SIMPSON[23)]を用いた。(2)式(2-4 参照)の 2 項目には以下の条件を追加した。溶液の ^{13}C NMR からの 13 位の炭素のシグナル形状から、13 位の両隣の炭素(12 位、14 位)が ^{13}C で標識されている割合は 25%であり、どちらか一方が ^{13}C で標識されている割合が 50%、両隣とも ^{12}C である割合が 25%であると決定した。また、12 位と 13 位の J-カップリングの値と、13 位と 14 位の J-カップリングの値は共に 44 Hz とした。これらの条件を SIMPSON の Input ファイル

に記述し、シミュレーションカーブを作成した。

UV スペクトル測定

AmB の DMSO 溶液から 15 nmol を試験管に移し、真空ポンプで溶媒を除去した。その後、MeOH/$CHCl_3$ に溶解させ、1.5 μmol の POPC($CHCl_3$ 溶液)を加えた(ステロール含有サンプルでは 10%の POPC を対応するステロールに置換)。エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた。真空ポンプで終夜乾燥後、8%スクロース溶液 1 ml を加え、voltex, sonication を行い脂質を水和させた。分散液を 4 回凍結融解させることで、MLV を形成させた。最後に分散液 170 μl に対し、1360 μl の 8%スクロース溶液を加えて希釈し、UV スペクトルを測定した。また、AmB を含まないリポソームを同様に調製し、バックグランドとして、AmB 含有リポソームの UV スペクトルデータから差し引いた。

^{31}P NMR による K^+流入活性試験

POPC (164 mg, 221 μmol)を 20 ml のナス型フラスコに量り取り(ステロール含有サンプルでは POPC の 10%を対応するステロールで置換)、クロロホルムに溶解させ、ロータリーエバポレーションで溶媒を留去した。その後室温で 18 時間真空乾燥させ、ナス型フラスコ表面に脂質フィルムを調製した。そこに 3 ml のリン酸緩衝溶液(0.4 M KH_2PO_4 / 1 mM EDTA / 40%D_2O, pH4.5)を加え、ボルテクスミキサーとソニケーターを用いて脂質フィルムを壁面からはがして水和させ、脂質濃度 72 mM の MLV を調整した。凍結融解を 4 回行い、ポアサイズ 200 nm のポリカーボネート製フィルムを用いてリポソファストを 9 回行った。この LUV 1 ml に対し 0.4 M 硫酸カリウム水溶液 5 ml を加えて脂質濃度 12 mM のリポソーム分散液とした。

調製したリポソームに 10 M 水酸化カリウム水溶液を加えて外液の pH を 4.5 から 7.5 に調節した。これを 750 μl 取り、10 mM FCCP エタノール溶液を 2μl 加え、DMSO に溶かしたサンプル(0.09, 0.9, 9 nmol)を加えて室温で 3 時間インキュベートした。その後、NMR チューブに 550 μl をとり、100 mM 塩化マンガン水溶液 4.4 μl を加えて外液の ^{31}P のシグナルをクエンチしてから ^{31}P NMR の測定を行った。

^{31}P NMR 測定条件

^{31}P NMR 測定装置は ECA-500 (JEOL, 500MHz for ^{1}H NMR)を用いた。測定条件は表 2-12 にまとめた。

表 2-12　^{31}P NMR 測定条件

Experiment	single_pulse_dec
Solvent	D_2O
X_domain	^{31}P
X_freq	202.4683
X_sweep / kHz	25.406
X_points	16384
Irr_domain	^{1}H
Scans	256
X_90_width / μs	15
Temp_get / °C	30
Relaxation_delay / s	2

参考文献

1) Mutter, M.; Vuilleumeir, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535-554.

2) 山本寛子　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 18 年度修士論文

3) Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807-7815.

4) 多原主哲　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 20 年度修士論文

5) (a) McNamara, C. M.; Box, S.; Crawforth, J. M.; Hickman, B. S.; Norwood, T. J.; Rawlings, B. J. *J.Chem.Soc., Perkin Trans 1* **1998**, 83-87. (b) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704-710.

6) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614.

7) Matumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.

8) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564

9) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63-78.

10) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 439-434.

11) Nguyen, Thanh-Son; Weers, P. M. M.; Raussens V.; Wang, Z.; Ren G.; Sulchek, T.; Hoeprich Jr, P. D.; Ryan, R. O. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 303-312.

12) Kleinberg, M. E.; Finkelstein, A. *J. Membr. Biol.* **1984**, *80*, 257-269.

13) (a) Matsuoka, S.; Matsumori, N.; and Murata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3882–3884. (b) Matsuoka, S.; and Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109-115.

14) Mehta, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 188-191.

15) Fujii, G., Chang, J. E., Coley, T., and Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968.

16) Gagoś, M., Koper, R., and Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90-98.

17) Herve, M.; Cybulska, B.; Gray-Bobo, C. M. *Eur. Biophys. J.* **1985**, *12*, 121-128.

18) 植野嘉之　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 14 年度修理論文

19) Coutinho, M. A. R. B.; Prieto, M. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 2541-2547.

20) (a) Fournier, I.; Barwicz, J.; Auger, M.; Tancre`de, P. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *151*, 41–50. (b) Paquet, M.-J.; Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancre`de, P.; Auger, M. *Chem. Phys. Lipids* **2008,** *2002 119*, 1–11.

21) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958.

22) Gullion, T.; Baker, D. B.; Conradi, M. S. *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 479–484.

23) Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296–330.

補章

1. 距離計算の補足(14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB の分子間距離計算について、2-3-e 参照)

AmB 分子を樽板モデルに従って配置した場合、実際には標識位置は AmB 分子の中心ではないため、表側に来る AmB と裏側に来る AmB の間で距離が異なる。また ^{13}C 標識体が ^{19}F 標識体に挟まれた場合は 3 spin 系での計算が必要になり、F-C-F のなす角 θ も REDOR 減衰に影響を与える(図 S-1)。これらを考慮した場合距離の計算結果にどの程度影響を与えるかを把握しておくことは重要である。以下に、それらを考慮した場合の計算を例示する。

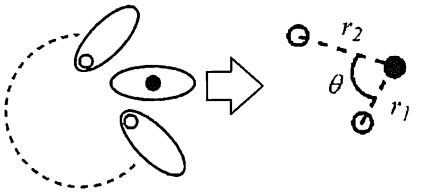


図 S-1 実際のスピンシステム

●: ^{13}C, ○: ^{19}F

REDOR 減衰は厳密には二つの ^{13}C -^{19}F 原子間距離(r_1, r_2)とその間の角度(θ)に依存する。

【2 つの距離を仮定した 2 spin 系での計算】

Baginski らの分子動力学計算等の結果から r_1, r_2 では 3 Å 程度差がある可能性がある[1)]。そこで、REDOR 減衰をそれぞれの寄与に分けて計算した。このとき、^{13}C が 2 つの ^{19}F にはさまれる場合(図 2-10-③)は、距離の短い方からの寄与を主に受けるとして、2 spin 系で計算を行った((2)式)。

$\Delta S/S_0$＝{分子内 4.9 Å×6.8%} + {短い距離(r_1)×50%×93.2%}

+ {長い距離(r_2)×25%×93.2%} ・・・(2)

距離の差を 3 Å とすると、コレステロール膜では(r_1, r_2)=(9.7 Å, 12.7 Å)、エルゴステロール含有膜では(r_1, r_2)=(11.4 Å, 14.4 Å)となった(図 S-2)。

2 つの距離の差が大きい場合にはこの計算方法で特に問題は無いと考えられる。ちなみに完全な 2 スピン系(遠い方の双極子相互作用は無視できる)として計算した場合は、コレステロール膜で 9.5 Å、エルゴステロール膜で 11.2 Å になる。

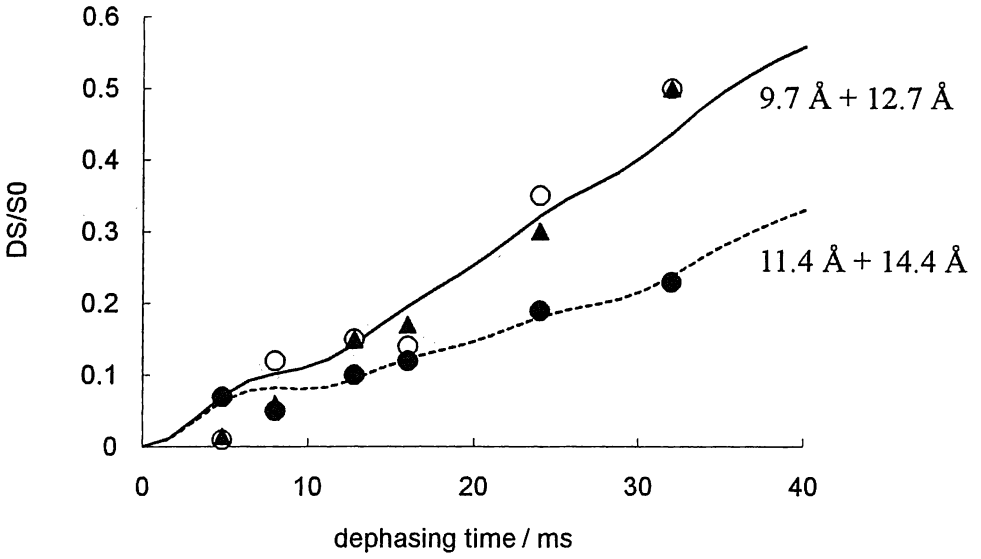


図 S-2　2 つの距離をもつ 2 spin 系での計算結果

▲: ステロール非含有膜、○: コレステロール含有膜、●: エルゴステロール含有膜での 14 位のフッ素と 41 位の炭素との REDOR 減衰の実測値。

【1 種類の距離で 3 spin 系を仮定した場合の計算】

^{13}C が複数の ^{19}F に囲まれた場合、REDOR 減衰は原子の位置関係により変化し、図 2-10-③がこの系に相当する。そこで、REDOR 減衰を(3)式で計算した。

$\Delta S/S_0$ = {分子内(4.9 Å)×6.8%}＋{分子間 2 spin(r)×50%×93.2%}

＋{分子間 3 spin(r, θ)×25%×93.2%}　・・・(3)

Baginski らの樽板モデルでは θ は 70 °程度であるので、この値で角度を固定し距離を変化させると、コレステロール膜で 10.7 Å、エルゴステロール膜で 12.5 Å のときに実験値に近い曲線を与えた。次に角度を変化させ、展開時間 32 ms における角度 θ の影響を計算したものを図 S-5 に示した。AmB の会合体を考えたとき、θ は 30°～130° の範囲にあると考えられる(図 S-4)。この範囲では角度 θ が REDOR 減衰に与える影響は 10.7 Å の減衰曲線で 9%程度、12.5 Å では 2.4%以下となり、比較的影響は少ない。図 S-5 にはこの範囲で最大と最小をとる REDOR 減衰曲線を示した。

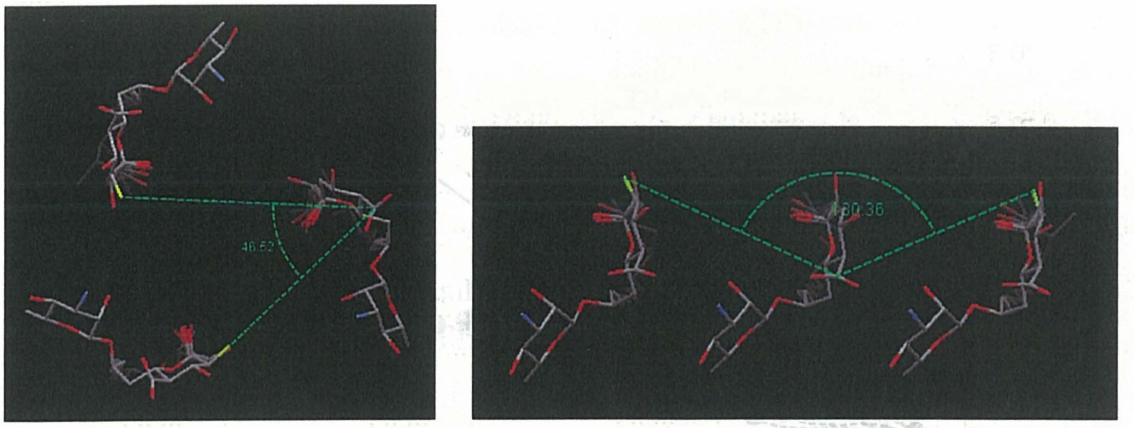


図 S-3　AmB の会合状態と角度 θ の関係

AmB3 分子が親水性部位を内側に集合した場合(左)、平行に並んだ場合(右)。

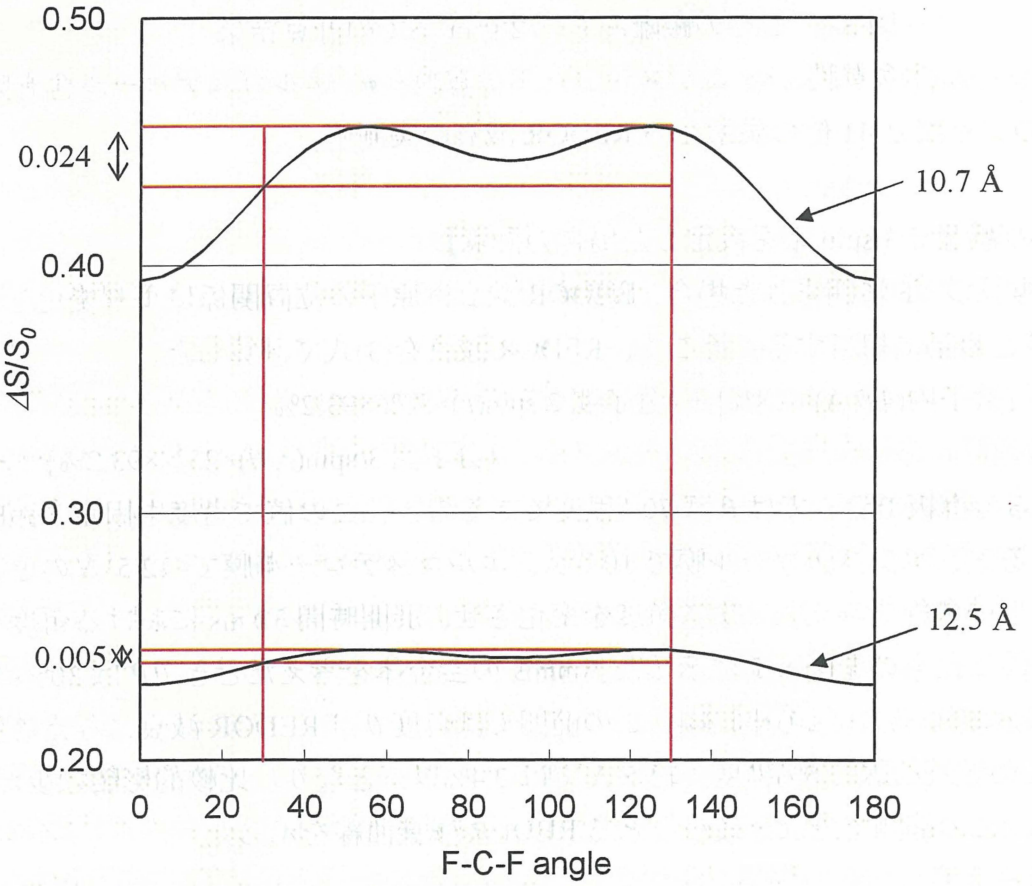


図 S-4　展開時間 32 ms における REDOR 減衰の角度依存性。F-C-F のなす角の影響は AmB の分子間距離が 10.7 Å の時には 6 %、12.5 Å の時には 2.4%に納まっている(赤枠)。

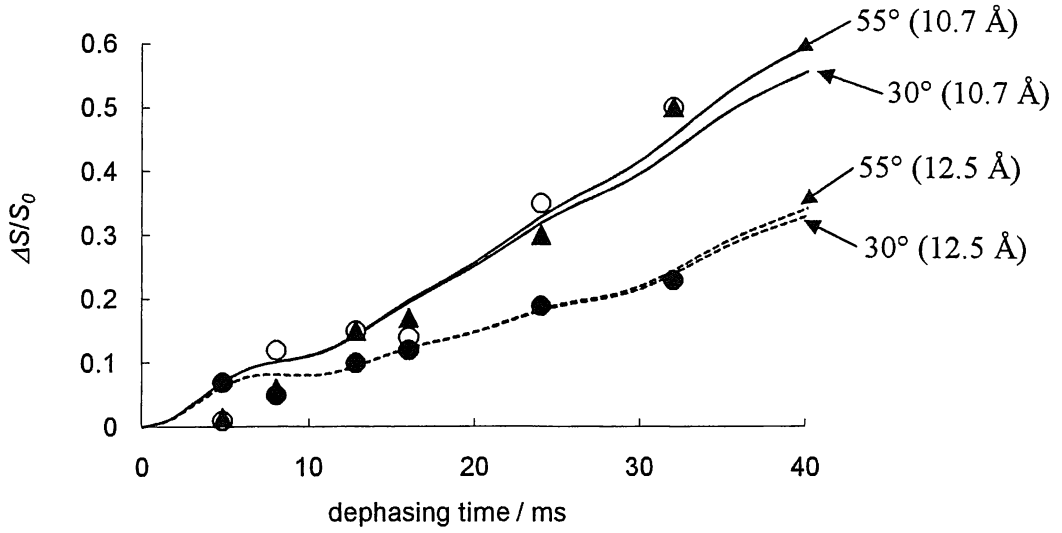


図 S-5　3spin を考慮した際のフィッティング

▲: ステロール非含有膜、o: コレステロール含有膜、●: エルゴステロール含有膜での 14 位のフッ素と 41 位の炭素との REDOR 減衰の実測値。

【2 種類の距離を持つ 3 spin 系での計算】

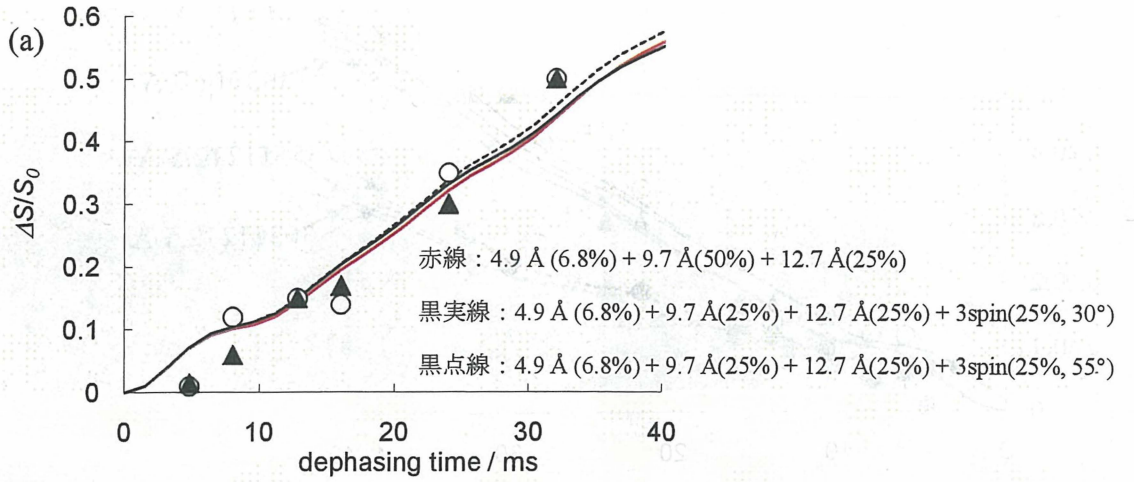
最後に前述の 2 種類の距離の計算結果(図 S-5)が 3spin 系を考慮することでどの程度影響を受けるかを見積もった。

$\Delta S/S_0$ = {分子内 4.9 Å×6.8%}＋{短い距離(r_1)×25%×93.2%}

＋{長い距離(r_2)×25%×93.2%}＋{3 spin(r_1, r_2, θ)×25%×93.2%}　・・・(4)

先ほどと同様に REDOR 減衰が最少と最大となる 2 種の角度についての曲線を図に示した。ステロール非含有、コレステロール膜では 9.7 Å と 12.7 Å (図 S-6-a)、エルゴステロール膜では 11.4 Å と 14.4 Å となった(図 S-6-b)。共に、展開時間 32 ms まででは、2spin 系と 3spin 系の $\Delta S/S_0$ の差は 2%程度に収まっている。2 種類の距離の差が大きな場合は 2 spin 系の計算で距離を求めても大きな違いはでない。

以上、複数のモデルについて原子間距離の計算を行ったが、計算結果の最小値と最大値は、ステロール非含有およびコレステロール含有膜で 9.5 Å と 11.2 Å (9.7 Å と 12.7 Å の平均値)、エルゴステロール含有膜で 11.2 Å,と 12.9 Å (11.4 Å と 14.4 Å の平均値)であった。これは 2 章で求めた原子間距離 10.3 ± 0.5 Å (ステロール非含有およびコレステロール含有膜)と 12.1 ± 1 Å と大きな差はないため、2 章での計算値を用いて議論しても問題無いと考えられる。



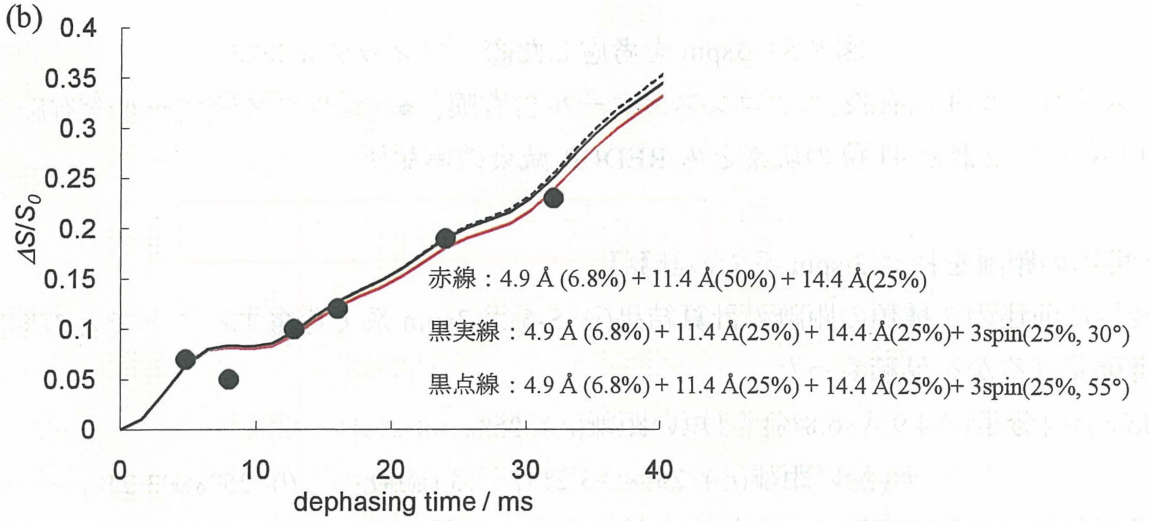


図 2-17　2 種類の距離と角度を考慮した計算結果

(a)ステロール非含有、コレステロール含有膜での REDOR 減衰曲線

(b)エルゴステロール含有膜での REODR 減衰曲線

▲: ステロール非含有膜、○: コレステロール含有膜、●: エルゴステロール含有膜での 14 位のフッ素と 41 位の炭素との REDOR 減衰の実測値。

本章での REDOR 減衰曲線の計算は SIMPSON[2)]を用いて行った。

1) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63-78.

2) Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296–330.

SIMPSON input files

$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR

```
# CF_REDOR_xy-8

spinsys {
  channels 13C 19F
  nuclei   13C 19F
  dipole   1 2 -94.5 0 0 0
  shift    1 10p 100p 0.5 50 20 10
}

par {
  proton_frequency 300e6
  spin_rate        5000
  sw               spin_rate/8
  np               32
  crystal_file     rep168
  gamma_angles     18
  start_operator   I1x
  detect_operator  I1p
  verbose          1101
  variable rf      150000
}

proc pulseq {} {
  global par

  maxdt 1.0

  set t180 [expr 0.5e6/$par(rf)]
  set tr2 [expr 0.5e6/$par(spin_rate)-$t180]
  set tr [expr 1.0e6/$par(spin_rate)-$t180/2]

  reset
  acq

  reset
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  store 1

  reset
  delay $tr
  pulse $t180 $par(rf) x 0 x
  delay $tr
  store 2

  reset
```

```
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) y
  delay $tr2
  pulse $t180 0 x $par(rf) x
  delay $tr2
  store 3

  for {set i 1} {$i < $par(np)} {incr i} {
    reset
    prop 1
    prop 2
    prop 3
    store 2
    acq
  }
}

proc main {} {
  global par
```

```
#  puts [join [lsort [info commands]] ¥n]
  set f [fsimpson]
  fsave $f $par(name).fid
  faddlb $f 100 0
  fft $f
  fsave $f $par(name).spe
}
```

$^{13}C\{^{19}F\}RDX$

```
# CF_RDX

spinsys {
  channels 13C 19F
  nuclei   13C 19F
  dipole   1 2 -82 0 0 0
  shift 1 -2000 0 0 0 0 0
}

par {
  proton_frequency 300e6
  spin_rate        6000
  sw               spin_rate/16.0
  np               20
  crystal_file     rep168
  gamma_angles     9
  start_operator   I1x
  detect_operator  I1p
  verbose          1101
  variable rf      150000
}

proc pulseq {} {
  global par

  maxdt 2.0

  set t180 [expr 0.5e6/$par(rf)]
  set t90  [expr $t180/2]
  set t45  [expr $t90/2]
  set tr1  [expr 0.5e6/$par(spin_rate)-$t90]
  set tr2  [expr 0.5e6/$par(spin_rate)-$t180]
  set tr3  [expr 0.5e6/$par(spin_rate)-$t45-$t90]
  set tr4  [expr 1e6/$par(spin_rate)-$t90]

  reset
  acq
  store 1
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  delay $tr2
  pulse $t90 0 0 $par(rf) x
  store 2

  for {set i 1} {$i < $par(np)} {incr i} {

    reset
    delay $tr1
    pulse $t90 0 0 $par(rf) x
    pulse $t90 0 0 $par(rf) x
    delay $tr2
    pulse $t90 0 0 $par(rf) x

    prop 1
```

```
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr3
pulse $t45 $par(rf) x 0 0
pulse $t45 $par(rf) x 0 0
delay $tr3
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr3
pulse $t45 $par(rf) x 0 0
pulse $t45 $par(rf) x 0 0
delay $tr3
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
```

```
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr3
pulse $t45 $par(rf) -x 0 0
pulse $t45 $par(rf) -x 0 0
delay $tr3
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
```

```
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x

prop 1

pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr2
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
pulse $t90 0 0 $par(rf) x
delay $tr3
pulse $t45 $par(rf) x 0 0
pulse $t45 $par(rf) x 0 0
delay $tr3
pulse $t90 0 0 0 0
pulse $t90 0 0 0 0
delay $tr2
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
pulse $t90 $par(rf) x 0 0
delay $tr4
acq

reset
prop 2
prop 1
store 1
}
}
```

```
proc main {} {
  global par

  set f [fsimpson]
  fsave $f $par(name).fid
}
```

第 3 章　AmB-エルゴステロールの分子間相互作用解析とチャネル複合体モデル

3-1　AmB とエルゴステロールの分子間相互作用

AmB とエルゴステロールの相互作用は、その選択毒性発現の由来として、多くの研究者の注目を集め、さまざまなアプローチがなされてきた。Clejan らは様々な構造を持つステロールの類縁体を AmB 含有リポソームに対して添加し、その親和性を AmB の UV 吸収スペクトルの変化から評価した。その結果、7 位と 8 位の間の 2 重結合が AmB との相互作用に重要であることを見出し、ジエン構造を持つことがエルゴステロールがコレステロールよりも AmB との親和性が高い理由であると提唱した [1)]。また、Paquet らは重水素化 DPPC を用い、ステロールや AmB がリン脂質の運動性に与える影響を調べた [2)]。固体 ^{2}H-NMR スペクトルから得られる四極子分裂幅は分子の運動性の影響を受け、運動性が高い場合は分裂幅が狭く、逆に分子運動が遅い場合は分裂幅が大きくなる。そこで、重水素化 DPPC、ステロールと AmB から成るリポソームを調製し、重水素化 DPPC の運動性を評価したところ、コレステロール含有膜では AmB はアシル鎖の秩序を増加させるが、エルゴステロールでは逆に減少させる結果となった。この結果から彼らは、エルゴステロールが AmB と強く相互作用し、リン脂質の秩序を上げる効果が妨げられていると考察した。

しかし、この 2 分子間の相互作用を直接的な手法により観測した例はほとんど無い。前章での固体 NMR を用いた AmB 分子間の相互作用解析の結果、エルゴステロールが AmB 分子間の相互作用に影響を与え、会合状態を変化させることが明らかになった。そこで、この ^{13}C{^{19}F}REDOR 法を AmB-エルゴステロールの分子間に適用し、直接的な相互作用が観測されるかどうかを検証することにした。

当研究室では以前にも AmB とステロールの分子間相互作用を REDOR 法で観測する試みが行われており、1 章で述べたように AmB-ステロール連結体を用いることで AmB-エルゴステロール間の REDOR 減衰の観測に成功した [3)]。しかし、リン脂質に DMPC を用いた場合は、非連結状態での AmB-ステロールの直接的な相互作用は観測できなかった。これは AmB と DMPC の相互作用が強く、AmB-エルゴステロールの相互作用が相対的に弱められることが原因であると考えられた。しかし、リン脂質に POPC を用いた場合は、図 2-2 に示したように AmB の添加によりエルゴステロールの運動性が低下しており、REDOR 測定に必要なミリ秒のオーダーで AmB-エルゴステロール複合体が形成されている可能性がある。そこで、リン脂質に POPC を用いて

AmB-エルゴステロールの相互作用を強めることで、REDOR による観測を試みた。

3-2　標識体の調製

AmB-エルゴステロール分子間の REDOR 測定には、フッ素を AmB 分子に導入し、エルゴステロール側を観測する方法と、エルゴステロールにフッ素を導入し、AmB 側を観測する方法の 2 種類の測定が可能であり、それぞれの測定を行うことで相補的に相互作用情報を得ることが期待できる。

AmB の標識体には前述の 14-F AmB(**4**)[4]と[U-^{13}C]AmB(**5**)[5]を用いることにした(図 3-1 上)。またエルゴステロールの標識体についても当研究室で調製法が確立されており、^{13}C 標識体として、酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* を[2-^{13}C]酢酸ナトリウムを含む ^{13}C 強化培地で培養し、1 つ置きに ^{13}C が導入された $^{13}C_{15}$-Ergosterol を新たに調製した[6, 7]。また、^{19}F 標識体として、エルゴステロールから化学的に誘導化を行い 6 位に ^{19}F を導入した 6-F Ergosterol(**10**)[3]を用いた(図 3-1 下)。

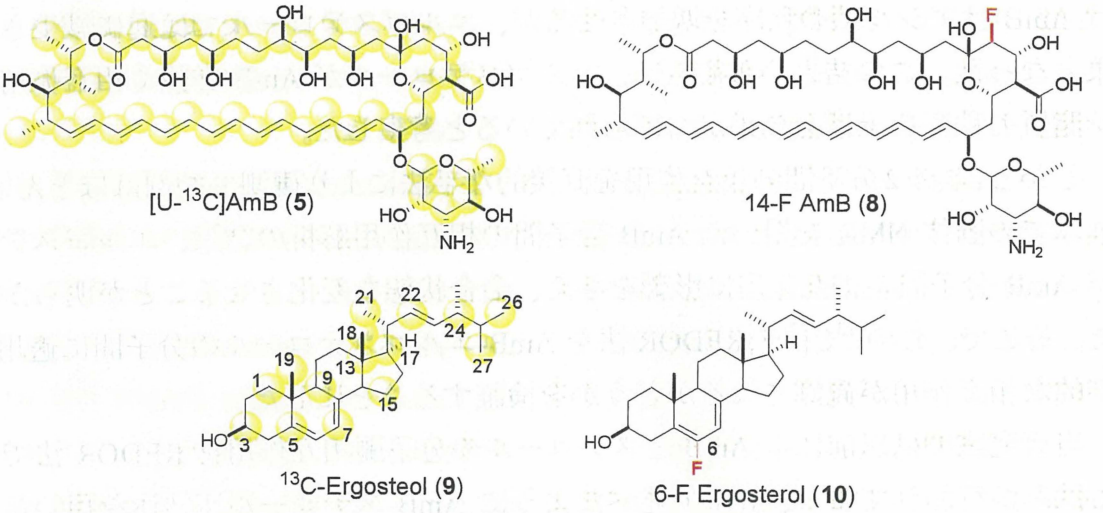


図 3-1　本実験で用いた標識体の化学構造

3-3　14-F AmB/^{13}C-Ergosterol/POPC の ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定

3-3-a　^{13}C{^{19}F}REDOR 測定と AmB-エルゴステロール相互作用様式

まず、14-F AmB と ^{13}C-Ergosterol の組み合わせで測定を行うことにした。この組み

合わせではフッ素が AmB 会合体の親水性ポア付近、かつヘッドグループに存在することから、これに近接するエルゴステロールの部位を特定することが可能である。14-F AmB(**8**)/^{13}C-Ergosterol(**9**)/POPC を 1/1/9 の比で混合し、REDOR 測定を行った。得られたスペクトルを図 3-2 に示した。

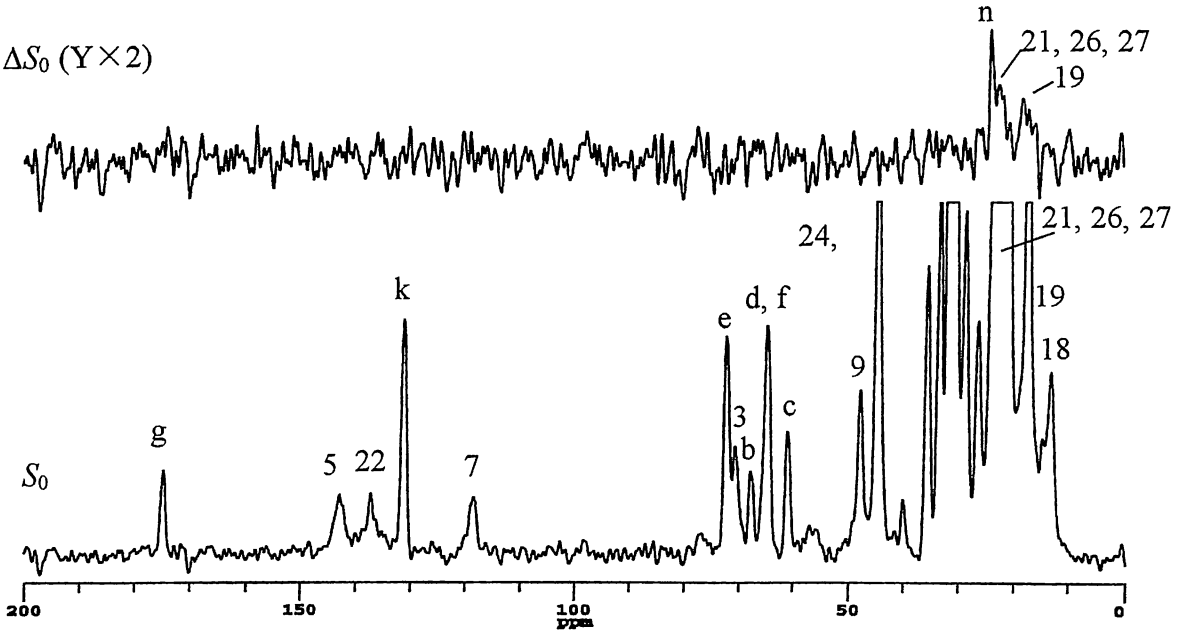


図 3-2　14-F AmB(**8**)/^{13}C-Ergosterol(**9**)/POPC=1/1/9 の ^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル（下：非照射スペクトル、上：差スペクトル）。図中のアルファベットは POPC 由来のシグナル(図 2-1 参照)。測定温度 30°C、MAS 速度 5 kHz、展開時間 12.8 ms、積算回数 35456 回。

測定の結果、エルゴステロールの角間メチル基の 19 位の炭素と、側鎖末端のメチル基の 21, 26, 27 位の炭素に REDOR 減衰が観測された。樽板モデルではエルゴステロールのヒドロキシ基と AmB のマイコサミン部のヒドロキシ基が水素結合することで、複合体を形成していると考えられてきた(図 3-3 左) [8]。また、当研究室で行われたマイコサミン部位の配座と AmB のエルゴステロールの選択性を調べた結果も、マイコサミン部位の 2'のヒドロキシ基がエルゴステロールのヒドロキシ基と相互作用していることを示唆している [9]。よって、19 位の炭素の REDOR 減衰は従来から示唆されてきた相互作用様式を反映しているものと考えられる。

一方で、21, 26, 27 位の炭素は全て、エルゴステロールの側鎖に位置している。シグナルが重複しており、REDOR 減衰が観測された炭素を正確に特定することは困難で

あるが、この側鎖部位に REDOR 減衰が観測されたことは AmB のヘッドグループとエルゴステロールの末端側鎖が近接していることを示唆している。この結果は従来の様式とは逆である(図 3-3 右)。2 章での結果から、エルゴステロール含有膜では POPC がインターディジット構造をしていることが示唆されおり、この過程で二重膜の裏側のエルゴステロールが AmB と相互作用しているものと考えられる。この配向ではエルゴステロールのヒドロキシ基は POPC のヘッドグループまたは、AmB の 35 位のヒドロキシ基と相互作用しており、またジエン部位が AmB のヘプタエンと疎水的な相互作用することで、複合体を安定化しているものと考えられる。

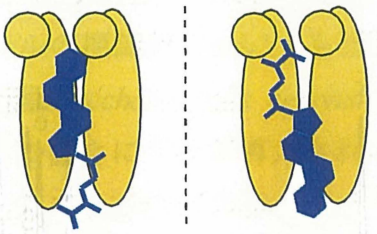


図 3-3　エルゴステロールと AmB の配向（左：従来の AmB 複合体モデルで考えられていた"head-to-head"相互作用様式、右：固体 NMR 測定から新たに予想される"head-to-tail"配向）

3-3-b　14-F AmB のフッ素とエルゴステロールの炭素の原子間距離の計算

図 3-2 で得られた REDOR 減衰を基に原子間距離の計算を試みた。REDOR 減衰が観測された 19 位や 21, 26, 27 位の付近はシグナルの重複が激しく、積分値を正確に求めることが困難であった。そこで、シグナルを多数のガウス分布の重ね合わせでフィッティングすることで各成分に分離し、NMR シグナル強度を求めた。その結果、19 位の炭素の REDOR 減衰は 10%となり、21, 26, 27 位の炭素では 13%となった。また異なる展開時間(8, 16 ms)で同様の測定を行い REDRO 減衰の変化を調べた。

まず 21, 26, 27 位の炭素と AmB の 14 位のフッ素間について距離を見積もることにした。21, 26, 27 位の炭素に観測された REDOR 減衰は 13%が最大値であった(表 3-1)。もし、すべてのエルゴステロール分子が 14-F AmB と複合体を形成しているとすると、REDOR 減衰の最大値は 100%になる筈である。しかし、本測定の結果は 13%で最大となりその後減少していた。一般にサンプル調製に用いた全エルゴステロールが AmB と複合体を形成しているとは考えにくい。つまり、サンプル中には AmB と相互作用して運動性が低下したエルゴステロールと、AmB と相互作用せず、POPC 膜中で速い

軸回転運動をしているエルゴステロールがあると考えられる。この様な系に REDOR 法を適用すると、展開時間を延ばすことで運動性の遅い成分、即ち、AmB と相互作用し REDOR 減衰を引き起こしている成分が、運動性の高い成分よりも先に緩和してしまい、観測されるシグナル強度に与える寄与が実際の割合よりも低下する。本測定で展開時間を長くすると REDOR 減衰が減少しのもこのことに由来すると考えられる。

そこで大まかに距離を見積もるため、エルゴステロール分子のうち少なくとも 13% が AmB と"head-to-tail"で相互作用していると考え、距離の計算を行った。この仮定を基に REDOR 減衰の理論曲線によるフィッティングを行うと 7±1 Å 程度となった(図 3-4)。前章でエルゴステロール含有膜中では AmB 分子間(F14-C41)の距離が 12 Å と求められたので、本測定の結果はその中間の距離となり、AmB 分子間にエルゴステロールが存在する樽板モデルと一致している。

一方、19 位の炭素では REDOR 減衰の再現性が得られず、具体的な距離の計算には至らなかった。しかし"head-to-head"の配向も上述の"head-to-tail"の配向と同程度存在すると仮定すると、展開時間 12.8 ms の REDOR 減衰(図 3-3、10%)は、AmB の F14 とエルゴステロールの 19 位の炭素の原子間距離が 7 Å である場合に対応する。

表 3-1　21, 26, 27 位の炭素での REDOR 減衰の値

展開時間 / ms	$\Delta S/S_0$
8	0.012
12.8	0.13
16	0.08

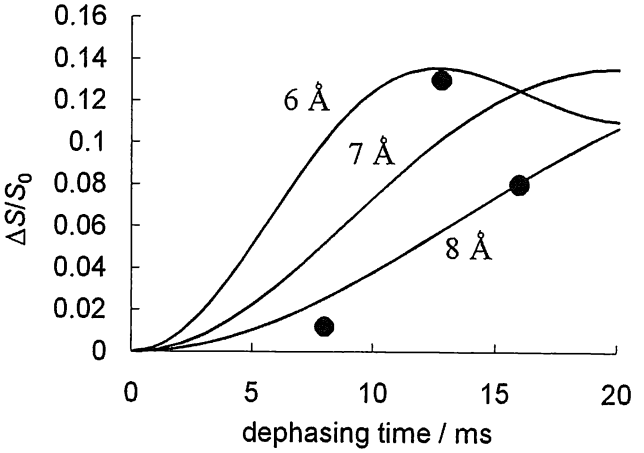


図 3-4　21, 26, 27 位の炭素での REDOR 減衰曲線と分子間距離。最大値を 0.13 として REDOR 曲線を作成した。●: 実測値

3-4　[U-^{13}C]AmB/6-F-Ergosterol/POPC の ^{13}C{^{19}F}RDX 測定

エルゴステロールの側鎖部分が AmB のヘッドグループに近接していることが明らかになったが、ステロイド骨格部分の情報は得られなかった。そこで、^{13}C 標識体に [U-^{13}C]AmB を ^{19}F 標識体に 6-F Ergosterol を用いて測定を行った。6-F Ergsoterol はステロイド骨格 B 環にフッ素が存在するため、ステロイド骨格が AmB のどの部位と近い位置に存在しているかを確認することができる。

3-4-a　6-F Ergosterol の AmB 複合体形成能の評価

6-F Ergosterol[3)]は AmB のステロール選択性に重要であると考えられているジエン部位にフッ素が導入されており、EggPC を用いた活性試験の結果、エルゴステロール含有膜に比べ AmB の活性が低下することが明らかになっている[10)]。そこで、今回は固体 NMR 測定と同様に純粋な POPC を用いたリポソームで 6-F Ergosterol の効果を確認するため、2 章で行った K^+イオン透過活性[11)]と UV スペクトルの測定を行った。

POPC 膜での AmB チャネル活性試験の結果(図 3-5)、EggPC 膜での結果と同様に 6-F Ergosterol はコレステロールに近い振る舞いを示し、エルゴステロール含有膜に比べて 6-F Ergosterol 含有膜では AmB のチャネル形成能が低下していることが確認された。

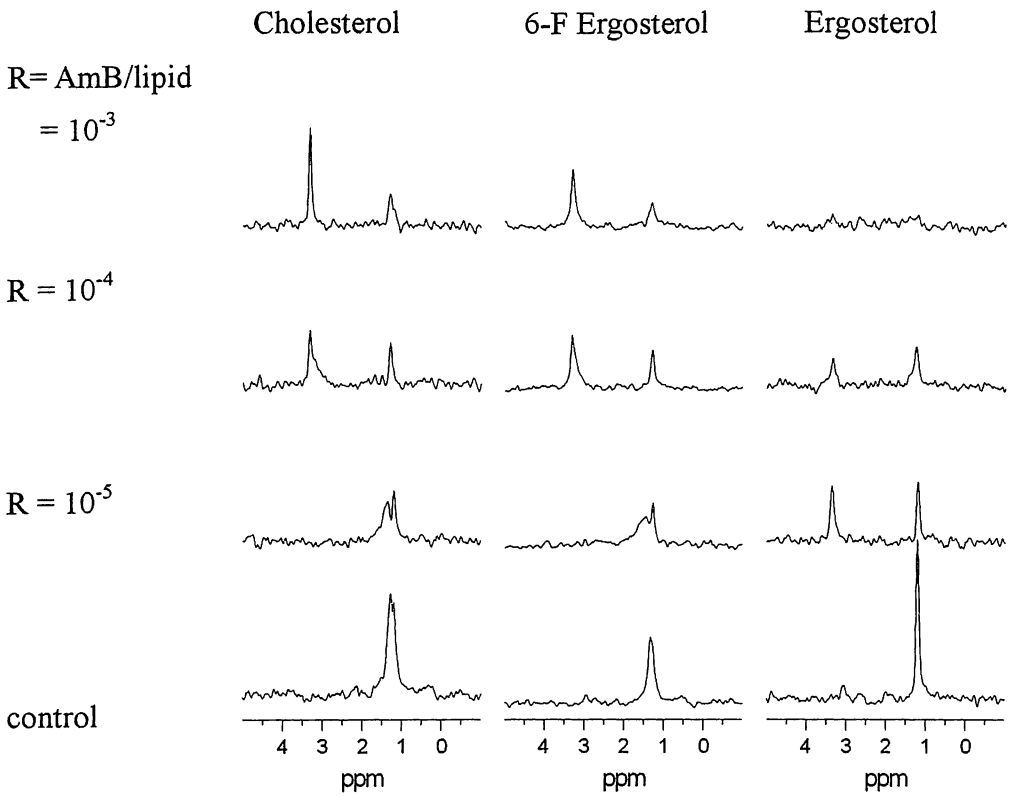


図 3-5　K^+の流入活性試験の結果

POPC リポソームに AmB を添加、3 時間インキュベート後に ^{31}P NMR を測定。1.2 ppm のシグナルは初期状態のリポソームを表し、AmB のチャネルが形成され、H^+/K^+の交換が起こると 3.1 ppm にシグナルを与える。左の列からコレステロール含有、6-F Ergosterol(**10**)含有膜、エルゴステロール含有膜。POPC と各ステロールの比率は 9:1 に固定した。AmB/lipid の比は上から 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}。一番下は AmB の代わりに DMSO を添加して行ったコントロール実験。

POPC 膜またはステロール含有 POPC 膜に AmB を 10^{-2} mol%加え、UV スペクトルを測定した結果(図 3-6)、6-F Ergosterol はコレステロールとエルゴステロールの中間的なスペクトルを示したことから、K^+の透過活性試験が行われた R 値(10^{-3})以上ではエルゴステロールに近い性質を示すことが示唆された。また、6-F Ergosterol はコレステロール膜に比べ、会合状態を示す 340 nm 付近の吸収が明らかにシフトしており [12]、また長波長領域でもエルゴステロールに見られるような AmB が疎水的環境下に置かれたことを示す長波長シフトが観測されていることから [13]、一部の 6-F Ergosterol は AmB と複合体を形成し、膜中に分散していると考えられる。よって固体 NMR による

AmB－6-F Ergosterol の相互作用観測は十分可能であると考えた。

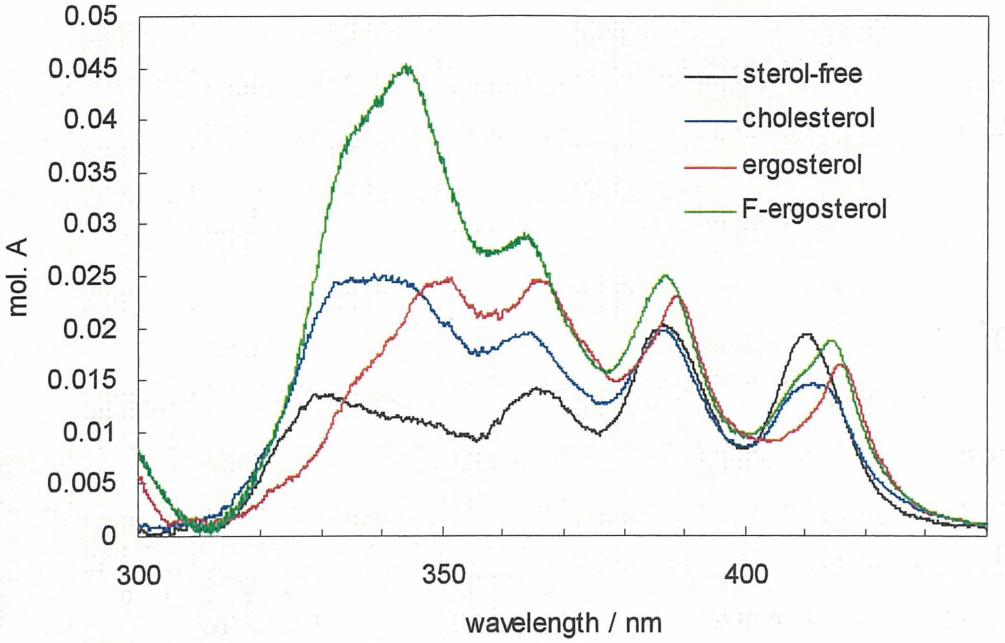


図 3-6　6-F Ergosterol(**10**)/ POPC 膜中での AmB の UV 吸収スペクトル。AmB の濃度は 1.67 μM、R 値は 10^{-2} に設定。その他のスペクトルは 2 章の図 2-15 と同じ。

3-4-b　$^{13}C\{^{19}F\}$RDX 測定

ステロールと複合体を形成した AmB を選択的に観測するため、ステロールの割合を増やし、[U-^{13}C]AmB/6-F-Ergosterol/POPC=1/2/8 で標識体を混合した試料を調製し、測定を行った。本測定では全炭素標識体[U-^{13}C]AmB を用いるため、2-4 での実験と同様の理由により RDX 法を用いた。得られたスペクトルを図 3-7 に示した。

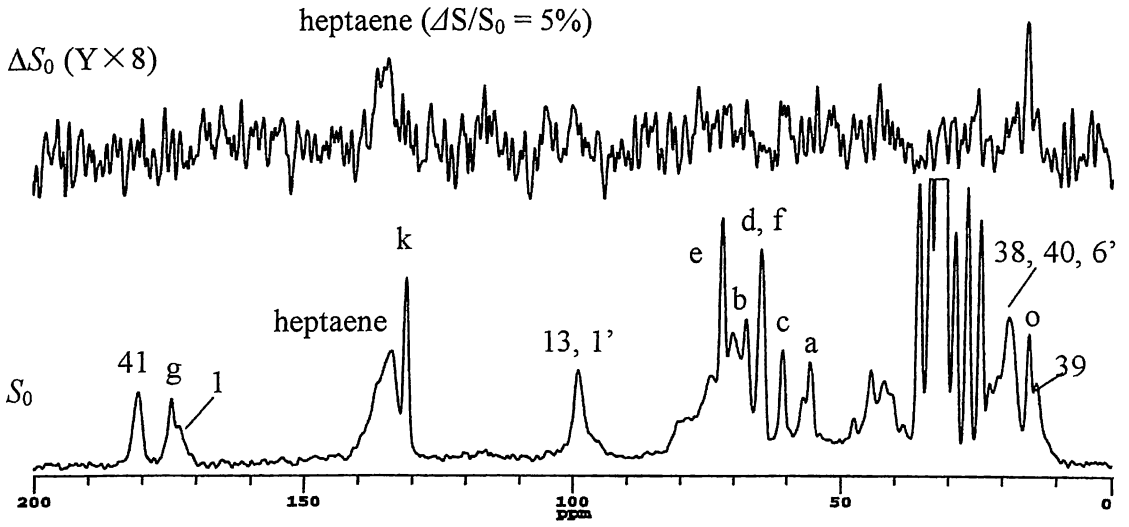


図 3-7　[U-^{13}C]AmB(**5**)/6-F-Ergosterol(**10**)/POPC=1/2/8 の ^{13}C{^{19}F}RDX スペクトル（下：非照射スペクトル、上：差スペクトル）。図中のアルファベットは POPC 由来のシグナル(図 2-1 参照)。測定温度 30 °C、MAS 速度 6 kHz、展開時間 6.7 ms、積算回数 35840 回。

15 ppm 付近に鋭い減衰が観測されたが、こちらは 6-F Ergosterol の角間メチル基(19 位)に由来する分子内 REDOR 減衰である。

また、130～140 ppm にわずかではあるが明確な REDOR 減衰（$\Delta S/S_0$=5%）が観測された。この領域には AmB のヘプタエン部位、6-F Ergosterol の側鎖の 22, 23 位がシグナルを与える。しかし、AmB の標識率は 50%であり、かつ 14 個の炭素のシグナルが重なっている。一方 6-F Ergosterol 由来の ^{13}C は天然存在比(1.1%)で存在するのみである。従ってこの領域で観測されたシグナルはほぼ[U-^{13}C]AmB 由来であると考えられる。また 6 位のフッ素と側鎖二重結合部は 9 Å 以上離れており、展開時間 6.7 ms ではほとんど REDOR 減衰しない(6-F Ergosterol が与えるシグナル強度の 2%以下)。よって、この 5%の減衰は[U-^{13}C]AmB と 6-F Ergosterol の分子間 REDOR であると考えられ、AmB のヘプタエン部位とエルゴステロールのジエン部位が疎水的な相互作用をしていることを直接的に明らかにすることができた。また異なる展開時間(10.8 ms)の測定においてもヘプタエン領域で REDOR 減衰(10%)が観測された。具体的な距離計算は、14 個のヘプタエン炭素が重なっており、フッ素原子との距離だけでなく位置関係も影響してくるため不可能であった。

また、AmB のヘッドグループに近い 98 ppm 付近の 13, 1'位や、182 ppm の 41 位の炭素でも減衰が観測されることがあり、"head-to-head"の構造(3-3-a 参照)の存在も確認

された。

3-5　AmB-Ergosterol の相互作用

本実験により初めて非連結状態での AmB-エルゴステロールの分子間 REDOR 測定に成功し、AmB-エルゴステロールの相互作用には AmB のヘッドグループとエルゴステロールのヒドロキシ基が近接した配向と、逆に AmB のヘッドグループにエルゴステロール側鎖末端が近接した配向の 2 種類が存在することが示唆された。また、ステロイド骨格部分は AmB のヘプタエン部分と相互作用している可能性が示されたこと、および前章で述べたように AmB に近接した POPC はインターディジット構造を取っていることから、AmB-エルゴステロール-POPC 複合体として図 3-8 に示したモデル構造が考えられる。

AmB 誘導体や、ポリエンマクロライド化合物は結晶中で"head-to-tail"の配向をしていることが明らかになっている[14, 15]。これは分子間の双極子モーメントの反発を避けるためであると考えられている。しかし、AmB チャネルは"head-to-head"構造で会合していることが 2 章の実験により明らかになった。そこで、エルゴステロール分子の一部が AmB 分子に対して"head-to-tail"の配向で相互作用することにより、チャネル全体としての双極子モーメントの大きさを減少させ、複合体を安定化していると考えられる。

しかし一方で、固体 NMR に用いたサンプルには脂質二重膜の表と裏の区別がないため、2 つのチャネル間に挟まれたエルゴステロールが一方のチャネルとは"head-to-head"で、もう一方とのチャネルとは"head-to-tail"で近接している可能性も否定できず、AmB-エルゴステロールの具体的な相互作用については更なる検討が必要である。しかしながら、本実験により非連結状態においても AmB とエルゴステロールの分子間 REDOR 測定が行えたことは重要な結果であり、今後、選択的標識化 AmB やエルゴステロールを用いていることで、よりピンポイントな距離測定が期待される。

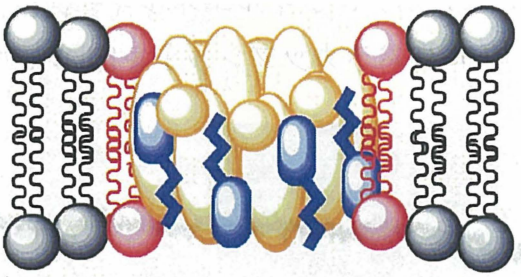


図 3-8　AmB-エルゴステロール-POPC 複合体のモデル。AmB(橙)のヘッドグループ側(マイコサミンを橙の球で示した)にエルゴステロール(青)の側鎖が近接したものと、ヒドロキシ基が近接した 2 種類の配向が存在し、AmB の近傍の POPC(赤)はインターディジット構造をしている。

3-6　分子動力学計算によるエルゴステロール-POPC 膜中での複合体モデルの検証

2 章および 3 章の固体 NMR 測定により図 3-8 に示した複合体モデルを提唱した。そこで、このモデルの妥当性を分子動力学計算(MD 計算)により評価した。これまでにも分子動力学計算によるチャネル複合体の解明の研究は報告されているが[16]、本研究では実際の実験に基づいた距離情報を制限情報として用いることができるため、よりチャネルの実態に迫れるものと期待される。

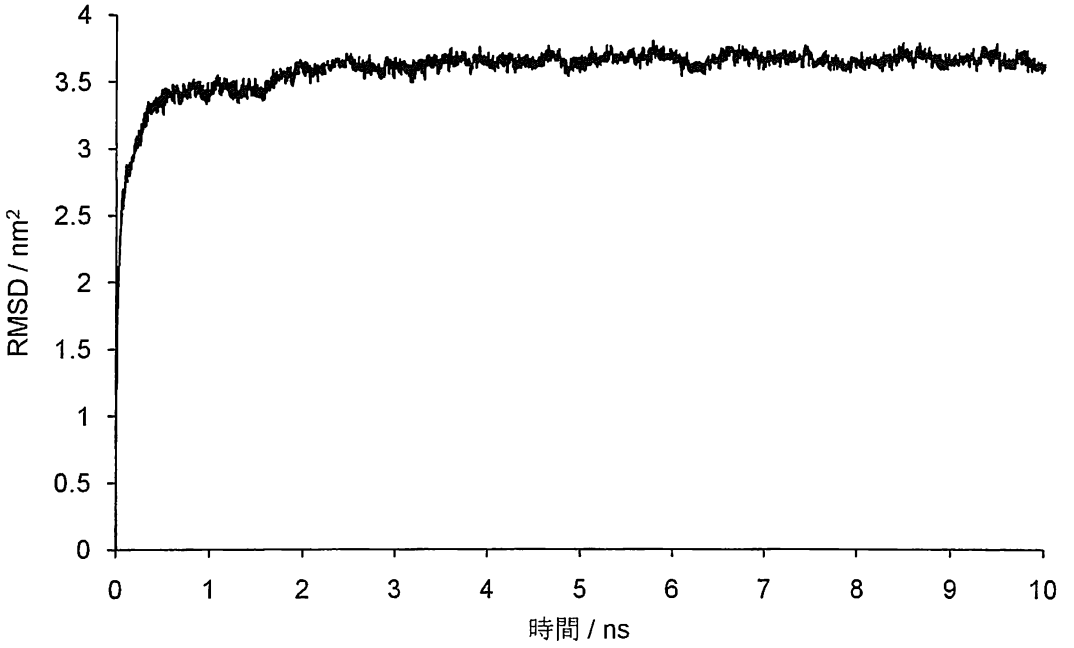
3-6-a　初期構造の設定と分子動力学計算

2 章の AmB 分子間 REDOR 測定の結果(図 2-11)に基づき、AmB の 14 位の炭素とその隣の AmB の 41 位の炭素の原子間距離が 11 Å 程度になるよう AmB6 分子を円形に並べた。この AmB6 分子を POPC64 分子、エルゴステロール 44 分子、水 3655 分子からなる脂質二重膜の中心に挿入した。その後、AmB とリン脂質間の空隙を埋め、且つ AmB チャネルの内部を水和させるため、1 ns のシミュレーションを行った。この際、AmB の座標は固定し、また、POPC の二重膜構造が壊れないように、POPC とエルゴステロールが膜平面方向にのみ移動できるように制限をかけた。

AmB チャネルの内部が水分子で水和されたことを確認後、分子動力学計算を 10 ns 間行った。本シミュレーションの目的は AmB と脂質分子の相互作用であるので、AmB の原子座標は固定した条件でシミュレーションを行った。

シミュレーション系の RMSD とポテンシャルエネルギーの時間変化を図 3-9 に示し

た。4 ns あたりで、RMSD とポテンシャルエネルギー共にほぼ一定となっていることが確認できた。また、10 ns 後のスナップショットを図 3-10 に示した。



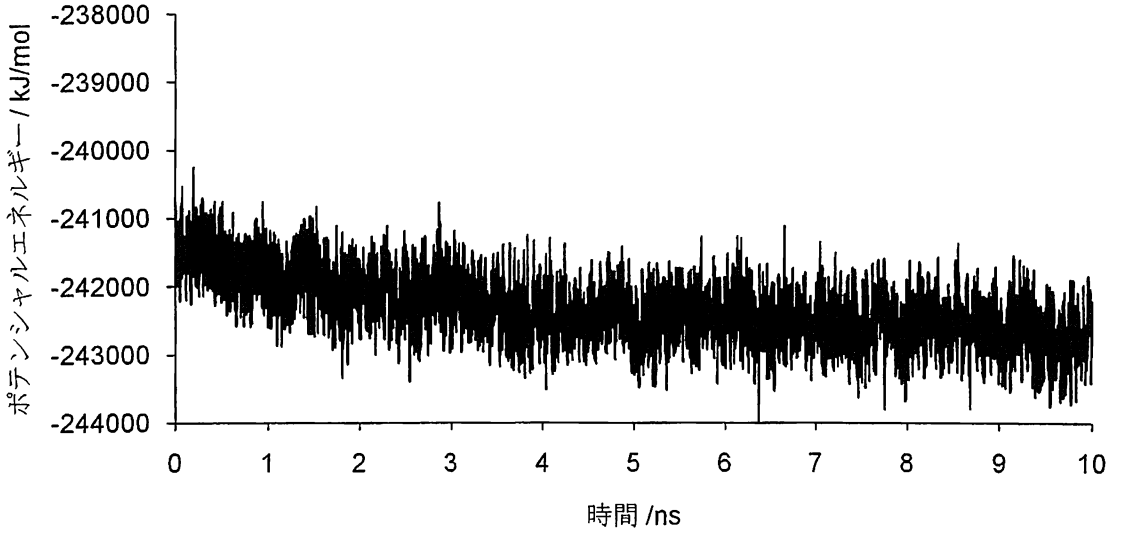


図 3-9　シミュレーションの RMSD(a)とポテンシャルエネルギー(b)の時間変化
4 ns 以降では一定となり、系が安定状態にある。

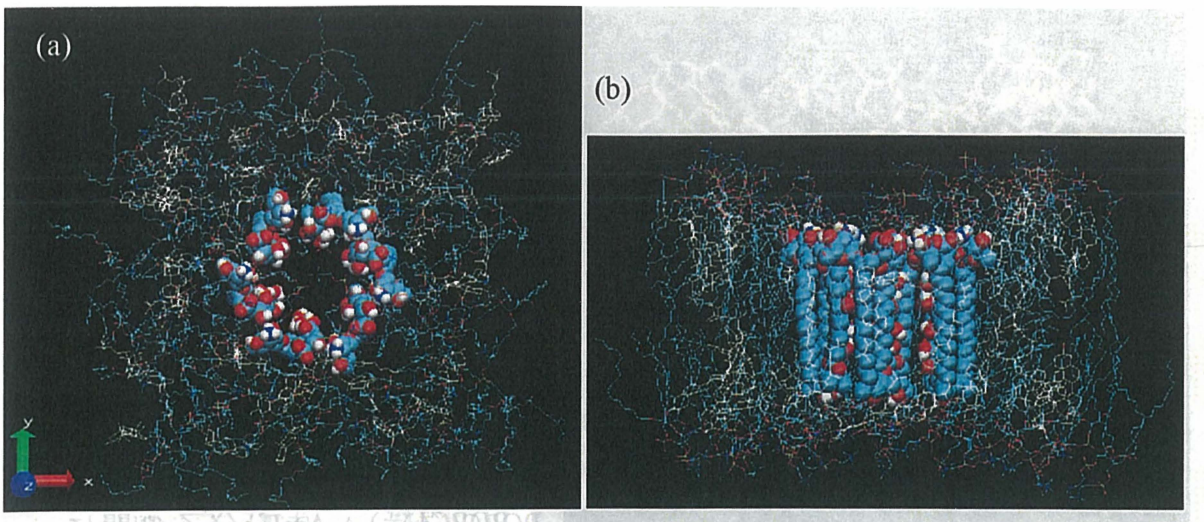


図 3-10　分子動力学計算を 10 ns 行った後のスナップショット(水は表示させていない)。AmB は空間充填モデルで、POPC は針金モデルで示した。水色: 炭素、白: 水素、赤: 酸素、青: 窒素、茶: リン。エルゴステロールは白色の針金モデルで示した。(a) 脂質二重膜を上から見た図。(b) 脂質二重膜を横から見た図。

3-6-b　AmB とリン脂質間の相互作用

2 章のエルゴステロール含有 POPC 膜での固体 NMR 測定の結果(図 2-7)から 14-F AmB のフッ素の近傍に POPC のアシル鎖の末端付近が近接していることが明らかになり、POPC がインターディジット構造をして、二重膜の厚さを調節している可能性が示唆されていた。本 MD 計算の結果、AmB に近接する POPC のアシル鎖がチャネルの内側まで挿入された構造が確認された(図 3-11)。またその POPC は膜の裏側に位置しており、アシル鎖の末端が AmB のヘッドグループ側に近付いていた。この POPC に注目し、AmB と 14 位の炭素とアシル鎖末端から 2 番目の炭素(POPC の 2 本のアシル鎖のうち AmB 間に挿入されている側のみ)との距離の経時変化を調べた(図 3-12)。その結果、一部の POPC は一度 AmB と近接すると安定な複合体を形成していることが確認できた。そして、そのアシル鎖末端付近の炭素と AmB の 14 位の炭素との距離が REDOR 減衰を起こしうる距離にあることが示唆され、固体 NMR 測定の結果を支持する結果が得られた。AmB 分子間距離が離れているため、その空隙を POPC のアシル鎖が埋めているものと考えられる。

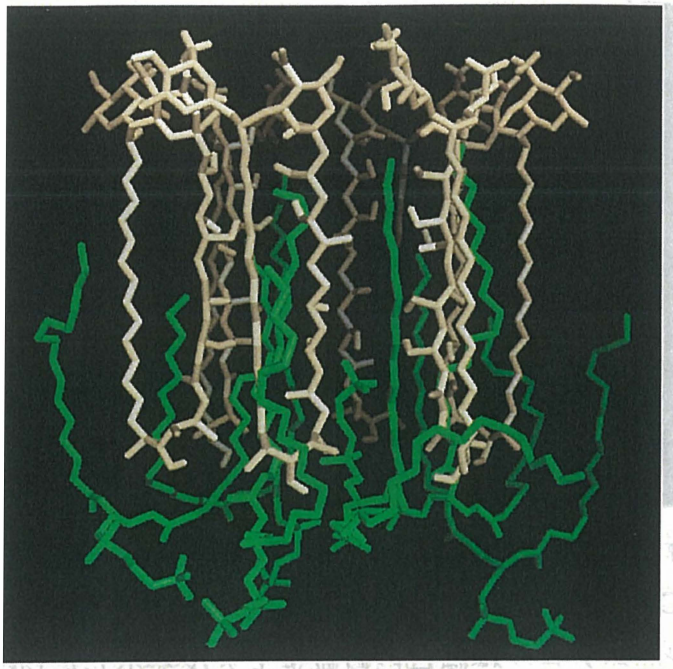


図 3-11　AmB(白)その近傍の POPC(緑)。AmB 分子の間に POPC のアシル鎖が挿入されている。

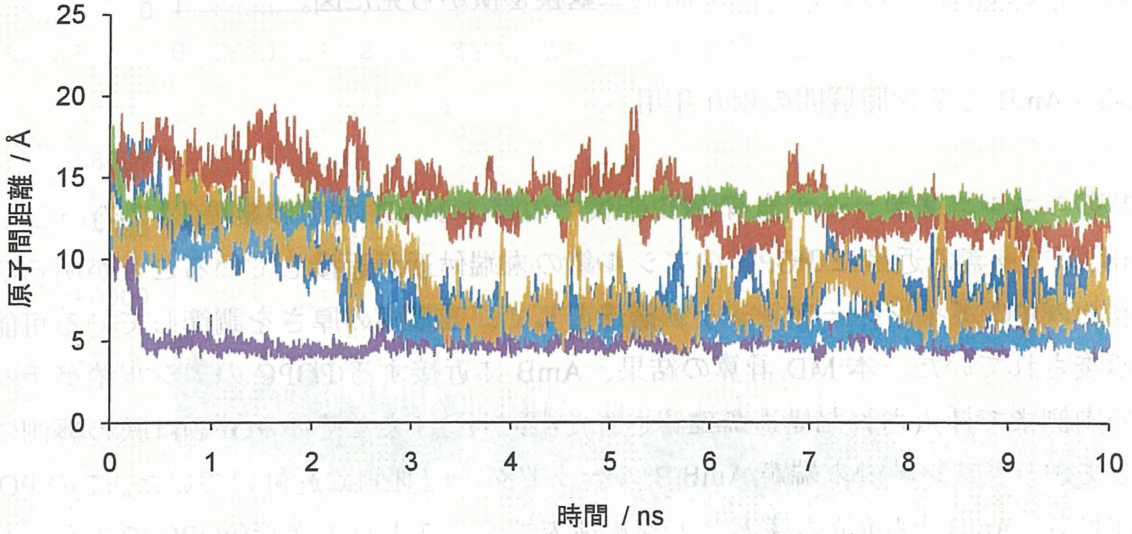


図 3-12　POPC のアシル鎖の炭素とそれに近接する AmB の 14 位の炭素との原子間距離の経時変化。6 つの色が 6 組の AmB-POPC 間の原子間距離にそれぞれ対応している。

さらに、POPC 膜の厚さを調べるために、POPC に含まれる ^{31}P の座標分布を調べた。AmB 付近に位置している POPC と AmB 分子から離れた位置にある POPC をそれぞれ 14 分子ピックアップし、その ^{31}P の座標分布を調べた(図 3-13)。その結果、AmB の近傍に存在する POPC 分子(図 3-13 赤)は、AmB と離れた位置に存在する POPC(図 3-13

黒)に比べて、膜中心部に分布しており、膜表側と裏側の原子間距離が平均で 0.6 nm 近づいていた。これは AmB 分子の厚さに合わせて二重膜の厚みが減少していることを意味している。図 3-11 に示したように、裏側にある POPC 分子が AmB 分子の間に入ってくることで、膜の厚さが減少しているものと考えられる。

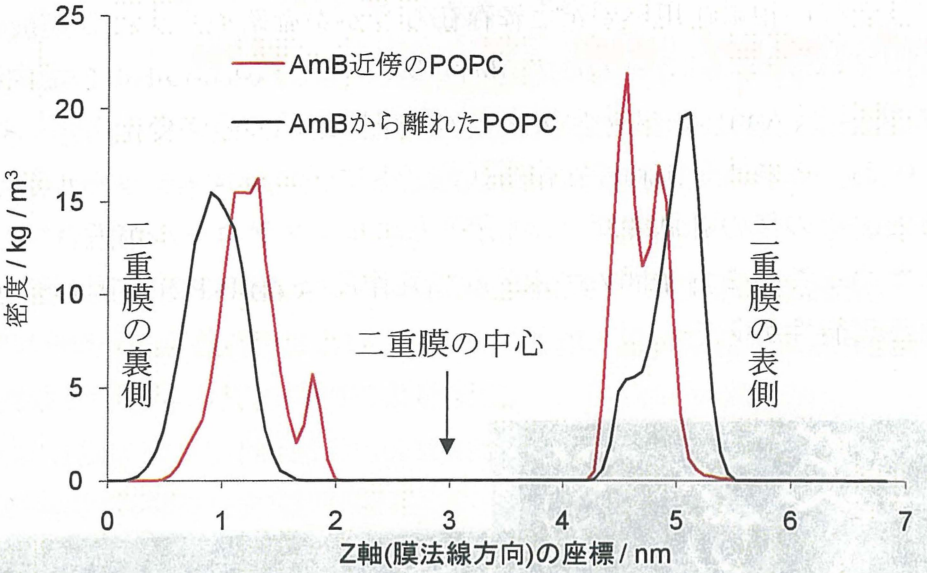


図 3-13　POPC の ^{31}P の Z 軸(膜法線方向)に対する密度分布。AmB に近接している POPC14 分子(赤)と AmB から離れた位置にある POPC14 分子(黒)をピックアップし、プロットした図。

3-6-c　AmB とエルゴステロールの相互作用

本章の AmB-エルゴステロール分子間の固体 NMR に測定により、AmB とエルゴステロールの配向には、エルゴステロールのヒドロキシ基が AmB のヘッドグループ方向に向いた"head-to-head"タイプと AmB の末端側に向いた"head-to-tail"タイプが混在することが示唆された。そこで、MD 計算後の AmB とエルゴステロールの位置関係を調べた。全ての AmB 分子がエルゴステロールと相互作用していたわけではなかったが、一部に AmB と相互作用していると思われる構造が得られた(図 3-14-a)。またその配向にも"head-to-head"と"head-to-tail"の二つのタイプが確認できた。"head-to-head"タイプでは、エルゴステロールの角間メチルの 19 位がチャネルの内側を向いており(図 3-12-b 左のエルゴステロール)、図 3-2 で観測された 19 位での REDOR 減衰に対応

していると考えられる。また、”head-to-tail”の相互作用では、エルゴステロールの末端メチル基と AmB の 14 位の炭素が 8 Å以内にあり(図 3-14-b 右のエルゴステロール)、図 3-2, 3-4 の 26, 27 位の炭素での REDOR 減衰と予測される原子間距離(7±1 Å)を支持する結果である。さらに、両配向ともステロイド骨格は AmB のヘプタエンに近接しており、図 3-7 のヘプタエン領域に観測された REDOR 減衰から示唆されたヘプタエン-ジエン間の相互作用を支持している。

また、これらの相互作用が安定に存在しうるかを確かめるため、”head-to-head”の配向に関してはエルゴステロールの 19 位の炭素と、”head-to-tail”の配向に関しては 26, 27 位の炭素と、AmB の 14 位の炭素との原子間距離の経時変化をそれぞれプロットした(図 3-15)。その結果、両相互作用様式ともに、エルゴステロールが AmB と一度近接すると、その後の計算時間では AmB とエルゴステロールが離れてしまうことはなかったため、この 2 分子間の疎水的な相互作用は AmB-POPC 間の相互作用よりも安定である可能性がある。

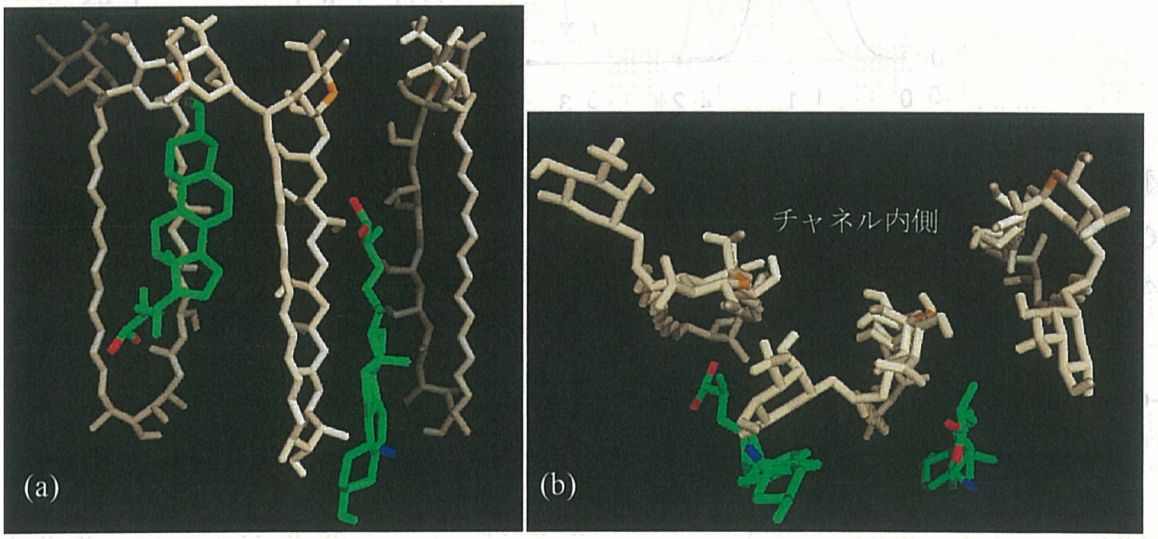


図 3-14　MD 計算により得られた AmB(白)-エルゴステロール(緑)の相互作用。AmB と相互作用しているエルゴステロールを抜き出して表示させた図。AmB の 14 位の炭素を橙色で、また、エルゴステロールの 19 位の炭素を青色、26、27 位の炭素を赤色で示した。(a)左のエルゴステロールは”head-to-head”タイプで相互作用しており、右側のエルゴステロールは”head-to-tail”タイプで相互作用している。(b)上から見た図。左のエルゴステロールの 19 位のメチル基はチャネルの内側を向き、右側のエルゴステロールの 19 位は外側を向いている。

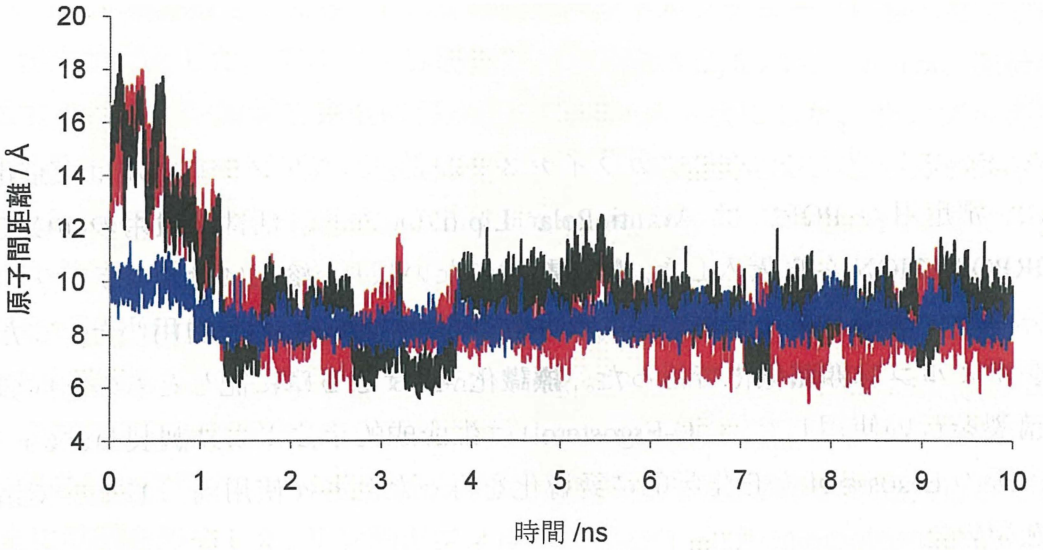


図 3-15　エルゴステロールと AmB の原子間距離の時間変化

エルゴステロールの 19 位(青)および、26、27 位(赤、黒)の炭素と最も近接する AmB の 14 位の炭素との距離の計算時間による変化。

3-6-d　AmB-エルゴステロール-POPC チャネルモデルの妥当性

2 章の実験で観測された AmB-POPC の分子間 REDOR 減衰から予測された AmB ヘッドクループと POPC アシル鎖末端部位の接近や、3 章で行った AmB-エルゴステロールの分子間 REDOR 測定から得られた AmB-エルゴステロールの"head-to-head"と"head-to-tail"の二種類の相互作用の混在を MD 計算により再現することがでた。これら全く異なる手法において共通の結果が得られたことは、図 3-8 に示したモデル構造が AmB チャネル複合体として妥当であると考えることができる。MD 計算には、計算速度向上のための簡略化や、計算可能時間が実際に分子が平衡状態に達するまでに要する時間よりも短いといった問題もあるが、今後、固体 NMR 等から得られる距離情報を制限情報として取り込むことで正確性を向上させ、AmB チャネル複合体の実態に迫れるものと期待される。

実験項

試薬

AmB、コレステロールはナカライテスクから、エルゴステロールは東京化成、固体NMR 測定用の POPC は Avanti Polar Lipid Inc.から、活性試験用の POPC は NOF CORPORATION から購入した。特に記載のない限り、溶媒にはナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を、水には MilliQ 水(MilliPore 社)を用いた。またサンプル調製はアルゴン雰囲気化で行った。標識化 AmB は 2 章に記したものと同様の調製及び精製を行い使用した。^{13}C-Ergosterol は生合成的手法により調製し、6-F Ergosterol は市販の Ergosterol から化学的に誘導化を行った。各々使用前に HPLC で精製したものを用いた。

使用機器

溶液 NMR は、ECA-500 (JEOL, 500MHz for ^{1}H NMR)を用いて測定した。NMR 測定溶媒として $CDCl_3$ または DMSO-d_6 を用いた。質量分析には、サーモクエスト社 LCQ-DECA を用いた。HPLC は、島津製作所製の SCL-10Avp, SPD-10A*i*, LC-10A*i*, DGU-12A, SCL-10Avp からなる装置を使用し、カラムは YMC-Pack Polymer C18 ϕ10x250 mm、ナカライテスク製の COSMOSIL 5C_{18}-AR-Ⅱ ϕ20x250 mm または ϕ4.6x250 mm を使用した。可視紫外分光光度計は島津製作所製の UV-2500PC、日本分光の V-630 Bio spectrophotometer を使用した。ボルテクスミキサーは Pasolina NS-80 を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。固体 NMR は CMX-300 (Chemagnetics/Varian, 300 MHz for ^{1}H NMR)を用いた。

固体 NMR サンプル調製

14-F AmB/^{13}C-Ergosterol/POPC リポソームの調製

20 ml ナス型フラスコ中で 14-F AmB (2.7 mg, 2.9 μmol)、^{13}C-Ergosterol(1.16 mg, 2.9 μmol)、POPC (19.6 mg, 25.8 μmol)を $CHCl_3$/MeOH に溶解後、エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた。その後、真空下で 8 時間乾燥させることで、完全に溶媒を除去した。リン脂質フィルムに H_2O(1 ml)と 10 mM HEPES 溶液(pH 7.0, 23.5 μl)を加え、vortex, sonication によって水和を行い、脂質の分散液とした。凍結融解を

5 回行い MLV を形成させた後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し替え、凍結乾燥し、粉末状態とした。アルゴン雰囲気下、D_2O(23.5 μl)を加え、vortex、凍結融解を繰り返すことでリン脂質を完全に再水和させペースト状にした。サンプルを外径 3 mm のガラスインサートに移し替え、エポキシ樹脂で密封した。このガラスインサートを 5 φ の MAS ローターに入れ、NMR 測定に用いた。

[U-^{13}C] AmB/6-F Ergosterol/POPC リポソームの調製

20 ml ナス型フラスコに[U-^{13}C] AmB (3 mg, 3.2 μmol)、6-F Ergosterol (2.6 mg, 6.3 μmol)、POPC (19.3 mg, 25.4 μmol)をとり、$CHCl_3$/MeOH に溶解後、エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた。その後、真空下で 8 時間乾燥させることで、完全に溶媒を除去した。リン脂質フィルムに H_2O(1 ml)と 10 mM HEPES 溶液(pH7.0, 24.9 μl)を加え、vortex, sonication によって水和を行い、脂質の分散液とした。凍結融解を 5 回行い MLV を形成させた後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し替え、凍結乾燥し、粉末状態とした。アルゴン雰囲気下、D_2O(24.9 μl)を加え、vortex、凍結融解を繰り返すことでリン脂質を完全に再水和させペースト状にした。サンプルを外径 3 mm のガラスインサートに移し替え、エポキシ樹脂で密封した。このガラスインサートを 5 φ の MAS ローターに入れ、NMR 測定に用いた。

固体 NMR 測定

測定には 5 mm の 3 チャンネル MAS プローブ(Varian)を用いた。測定時は温度コントローラーと MAS 速度コントローラーにより、温度と MAS 速度を一定に保った。サンプルごとにパルス幅、CP 条件の最適化を行い、異なる展開時間の測定を行うときは、毎回チューニングとマッチングの確認を行った。プロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンスを用いた [17]。フッ素核の位相回しには xy-8[18]を用いた。

各サンプルの測定条件は以下の表 3-2 にまとめた

固体 MMR 測定条件

表 3-2　固体 NMR 測定条件の一覧

sample	14-F AmB /^{13}C-Ergosteol/POPC			[U-^{13}C]AmB/6-F Ergosterol/POPC	
method	^{13}C{^{19}F}REDOR			^{13}C{^{19}F}RDX	
dephasing time / ms	8	12.8	16	6.7	9.3
scans	17616	35456	23248	35840	60964
^{13}C observed frequency / MHz	75.314			75.314	
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743			281.767	
MAS frequency / Hz	5000 ± 2			6000 ± 2	
temperature / °C	30			30 ± 1	
spectral width / kHz	30			30	
^{1}H $\pi/2$ pulse width /μs	4.0			3.5	
^{13}C π pulse width /μs	10.67			8.67	
^{19}F π pulse width / μs	9.0			9.2	
CP contact time / ms	1.0			1.0	
pulse delay / s	2			2	
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	63			83	
^{19}F phase cycling	xy-8			xy-8	
^{13}C phase cycling	-			$\phi_1(x, y, x, y)_4$, $\phi_2(x, y, -x, -y)_4$ $\phi_3(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y)_2$ $\phi_4(-x, -y, x, y, x, y, -x, -y)_2$ $\phi_5(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y, -x, -y, x, y, x, y, -x, -y)$	

REDOR 減衰シミュレーションカーブの作成

REDOR 測定の理論曲線の作成は、Bessel 級数による近似式 [19]を用いた(Microsoft Excell, k=6 まで計算)。RDX 測定における減衰の計算には SIMPSON[20]を用いた。

UV スペクトル測定

AmB の DMSO 溶液から 15 nmol を試験管に移し、真空ポンプで溶媒を除去した。その後、MeOH/$CHCl_3$ に溶解させ、6-F Ergosterol (150 nmol)と POPC (1.35 μmol)の $CHCl_3$ 溶液を加えた。エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた。真空ポンプで終夜乾燥後、8%スクロース溶液 1 ml を加え、voltex, sonication を行い脂質を水和させた。分散液を 4 回凍結融解させることで、MLV を形成させた。最後に分散液 170 μl に対し、1360 μl の 8%スクロース溶液を加えて希釈し、UV スペクトルを測定した。また、AmB を含まないリポソームを同様に調製し、バックグランドとして、AmB 含有リポソームの UV スペクトルデータから差し引いた。

^{31}P NMR による K^+流入活性試験

サンプル調製

POPC (73.8 mg, 97.1 μmol)、6-F Ergosterol (4.3 mg, 10.4 μmol)を 20 ml のナス型フラスコに量り取り、クロロホルムに溶解させ、ロータリーエバポレーションで溶媒を留去した。その後室温で 18 時間真空乾燥させ、脂質フィルムを調製した。そこに 1.5 ml のリン酸緩衝溶液(0.4 M KH_2PO_4 / 1 mM EDTA / 40%D_2O, pH4.5)を加え、ボルテクスミキサーとソニケーターを用いて脂質フィルムを壁面からはがして水和させ脂質濃度 72 mM の MLV を調整した。凍結融解を 4 回行い、ポアサイズ 200 nm のポリカーボネート製フィルムを用いてリポソファストを 9 回行った。この LUV 500 ml に対し 0.4 M 硫酸カリウム水溶液 2.5 ml を加えて脂質濃度 12 mM のリポソーム分散液とした。

調製したリポソームに 10 M 水酸化カリウム水溶液を加えて外液の pH を 4.5 から 7.5 に調節した。これを 750 μl 取り、10 mM FCCP エタノール溶液を 2 μl 加え、DMSO に溶かしたサンプル(0.09, 0.9, 9 nmol)を加えて室温で 3 時間インキュベートした。その後、NMR チューブに 550 μl をとり、100 mM 塩化マンガン水溶液 4.4 μl を加えて外液の ^{31}P のシグナルをクエンチしてから ^{31}P NMR の測定を行った。

^{31}P NMR 測定条件

^{31}P NMR 測定装置は ECA-500 (JEOL, 500MHz for ^{1}H NMR)を用いた。測定条件は表 3-3 にまとめた。

表 3-3　^{31}P NMR 測定条件

Experiment	single_pulse_dec
Solvent	D_2O
X_domain	^{31}P
X_freq	202.4683
X_sweep / kHz	25.406
X_points	16384
Irr_domain	^{1}H
Scans	256
X_90_width / μs	15
Temp_get / °C	30
Relaxation_delay / s	2

分子動力学計算

エネルギー最小化と MD 計算は GROMACS-3.3.1[21)]を用いて行った。POPC のトポロジーと力場ファイルには一般的に使用される脂質のパラメータセット[22)]を用いた。エルゴステロールのトポロジーと力場ファイルにはコレステロールを基にエルゴステロール用に書き換えて使用した。AmB の構造には *N*-iodoacetyl-AmB の X 線結晶構造を用い[23)]、原子の電荷以外の力場パラメータとトポロジーファイルは PRODRG サーバー(http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta)[24)]で発生させた。原子の電荷は CS Gamess(http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/GAMESS.html)を用いて Closed-Shell Restricted Hartree-Fock 法により計算した。

初期構造の作成

まず、Zhao らの POPC 二重膜(POPC128 分子、水 3655)[25)]の POPC 分子のうちランダムに 44 個をエルゴステロールに置換した(replace プログラムを使用、http://www.gromacs.org/component/option,com_docman/Itemid,26/)。その後、エネルギー最小化と MD 計算(2 ns)を行い、POPC-エルゴステロール膜を形成させた。この膜の中心に、POPC とエルゴステロールの膜法線方向の座標を制限した状態で直径 2.3 nm の穴を開け(mdrun_make_hole プログラムを使用、http://www.gromacs.org/component/

option,com_docman/Itemid,26/)、そこにあらかじめ円形状に配置した AmB6 分子を挿入した。AmB 分子はポリオール側を内側に向け、14 位の炭素と隣の AmB 分子の 41 位の炭素間が 11 Å 程度になるように配置した。その後、AmB の原子座標と POPC、エルゴステロールの膜法線方向の座標を制限した状態で、MD 計算(1 ns)を行い AmB チャネル内部を水和し、AmB と脂質二重膜間の空隙を埋めた。この構造を初期構造として用いた。各工程の MD 計算の条件は下記と同じものを用いた。

MD 計算の条件

計算時間は 10 ns に設定した。力場は GROMACS force field、ffgmx を用いた。アンサンブルには NPT アンサンブルを用い、Berendsen week coupling 法[26]により温度は 323 K(緩和時間 0.1 ps)、圧力は 1 bar(緩和時間 1 ps)に保った。また pressure coupling のタイプには semiisotropic を用いた。共有結合長は POPC、エルゴステロール、AmB に対しては SHAKE アルゴリズムにより制限をかけ、水分子に対しては SETTLE スキームを用いて制限した。周期境界条件は x, y, z 方向すべてに設けた。クーロン力のタイプには PME を用い、カットオフ半径は 1 nm、Van der Waals 相互作用のカットオフ半径は 1 nm とした。MD 計算は 2 fs 刻みで行い、1000 ステップごとに原子座標を記録した。また、シミュレーションボックスの大きさは x, y, z すべての方向に可変とした。MD 計算は Intel Xeon プラットフォームを用いて行った(1 ns の計算に 17 時間程度)。計算結果の表示には Visual Molecular Dynamics(VMD, http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)または PyMOL(http://pymol.sourceforge.net/)を用いた。

参考文献

1) Clejan, S.; Bittoman, R. *J. Biol. Chem.* **1985**, *250*, 2884-2889.

2) Paquet, M. J.; Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancrède P.; Auger, M. *Chem. Phys. Lip.* **2002**, *119*, 1-11.

3) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.

4) Matumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.

5) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614.

6) Seo, S.; Uomori, A.; Yoshimura, Y.; Takeda, K.; Seto, H.; Ebizuka, Y.; Noguchi, H.; Sankawa, U. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1988**, *1*, 2407-2414.

7) 多原主哲　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 20 年度修士論文

8) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57–70.

9) Matusmori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667-10765.

10) 植野嘉之　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 14 年度修士論文

11) Herve, M.; Cybulska, B.; Gray-Bobo, C. M. *Eur. Biophys. J.* **1985**, *12*, 121-128

12) Gagoś, M., Koper, R., and Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90-98

13) Fujii, G., Chang, J. E., Coley, T., and Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968.

14) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564.

15) In, Y.; Ohishi, H.; Miyagawa, H.; Kitamura,K.; Igarashi, Y.; Ishida, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 126-133.

16) Baginski, M.; Resat, H.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 63-78.

17) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958.

18) Gullion, T.; Baker, D. B.; Conradi, M. S. *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 479–484.

19) Mueller, K. T. *J. Magn. Reson.* **1995**, *113*, 81-93.

20) Bak, M.; Rasmussen, J. T.; Nielsen, N. C. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296–330.

21) Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 306–317.

22) Berger, O.; Edholm, O.; Jahnig, F. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2002-2013.

23) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Schaffner C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*,

4560-4564

24) Schuettelkopf, W.; Van Alten, D. M. F. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol, Cryst.* **2004**, *60*, 1355-1363.

25) Zhao, W.; Rog, T.; Gurtovenko, A. A.; Vattulainen, I.; Karttunen, M. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1114-1124.

26) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Dinola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.

第 4 章　リン脂質に DMPC を用いた場合の AmB 分子間相互作用の解析

4-1　AmB と DMPC の相互作用

AmB のチャネル形成には AmB-AmB、AmB-ステロールだけでなく AmB-リン脂質の相互作用も重要であることが先の POPC 膜を用いた実験により示唆された。DMPC(図 4-1)は AmB と高い親和性を持つことが知られており、当研究室でもリン脂質に DMPC を用いた固体 NMR 測定がおこなわれ、序論でも述べたように AmB と DMPC の分子間 REDOR 測定に成功している [1)]。また、毛利らは表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた測定から、DMPC 膜は POPC 膜に比べて AmB の吸着量が増加することを見出した [2)]。土川らは、AmB のヘプタエンの 28 位にフッ素を導入した AmB の標識体を調製し、DMPC 膜中、[U-^{13}C]AmB との間で分子間 REDOR 測定を行った。その結果、エルゴステロールの有無にかかわらず、同程度の REDOR 減衰が観測された [3)]。さらに、3 章(3-4)で行った[U-^{13}C]AmB と 6-F Ergosterol を用いた AmB-エルゴステロール分子間 REDOR 測定を DMPC 膜中で行うと、分子間 REDOR 減衰が観測されなかった。これらの実験結果は、AmB との親和性がエルゴステロールよりも DMPC の方が高いことに起因すると考えられる。そこで、DMPC 膜における AmB 分子間の REDOR 測定を行うことで、エルゴステロール以上に親和性の高いリン脂質が存在するときの AmB の会合状態を調べることにした。この結果と POPC 膜中での結果を比較することで、AmB チャネルの形成に必要な分子の親和性やステロール分子の効果に関する情報が得られると期待される。

4-2　14-F AmB と[tri-^{13}C]AmB の分子間 REDOR 測定

2 章での手法と同様に、まず AmB 分子間の相互作用情報を得るため、標識体に 14-F AmB(**8**) [4)] (図 4-1)と[tri-^{13}C]AmB(**4**) [1a)] (図 4-1)を用いた固体 NMR 測定を行った。サンプルはステロール非含有、およびエルゴステロール含有の 2 種類を調製し、それぞれの割合は、ステロール非含有 DMPC サンプルで 14-F AmB(**8**)/[tri-^{13}C]AmB(**4**)/DMPC =1/1/20、エルゴステロール含有 DMPC サンプルで、14-F AmB(**8**)/[tri-^{13}C]AmB(**4**) /ergosterol/DMPC = 1/1/2/18 とした。

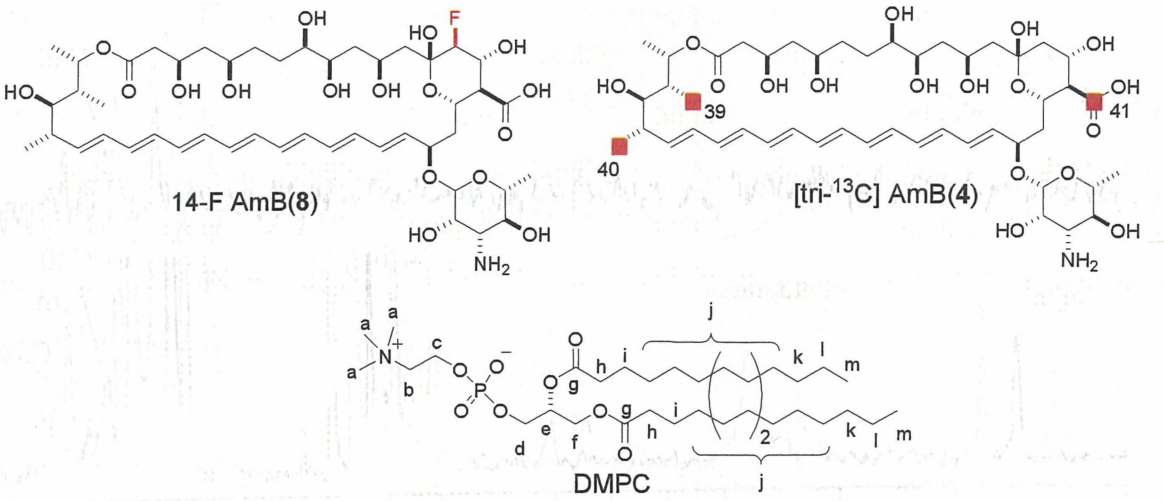


図 4-1　固体 NMR 測定に用いた標識化 AmB と DMPC の化学構造

ステロール非含有DMPC膜での測定結果を図4-2-aに、エルゴステロールを10%含むDMPC膜中での結果を図4-2-bに示した。POPC膜での結果と異なり、両サンプルにおいてAmBとDMPCのアシル鎖の間に顕著なREDOR減衰が観測された(図4-2の図中のj, k, l, m)。この結果は、AmBとDMPCの親和性が強いというこれまでの研究結果と一致している。

また、AmB分子間のREDOR減衰として、AmBのヘッドグループに位置する41位や13位の炭素だけでなく、AmBの末端に位置する40位の炭素との減衰が両サンプルにおいて観測された。また、異なる展開時間の測定では39位の炭素との間にもREDOR減衰が観測された。このことは、DMPC膜中ではステロールの有無にかかわらず、"head-to-head"と"head-to-tail"のAmB分子間相互作用が混在していることを意味している。POPC膜での実験(3章)では、ステロールが"head-to-head"のAmB分子間相互作用を有利にさせることが示唆されたが、DMPC膜中ではステロールとAmBの相互作用が弱いため、AmBの配向が統一されていないと考えられる。

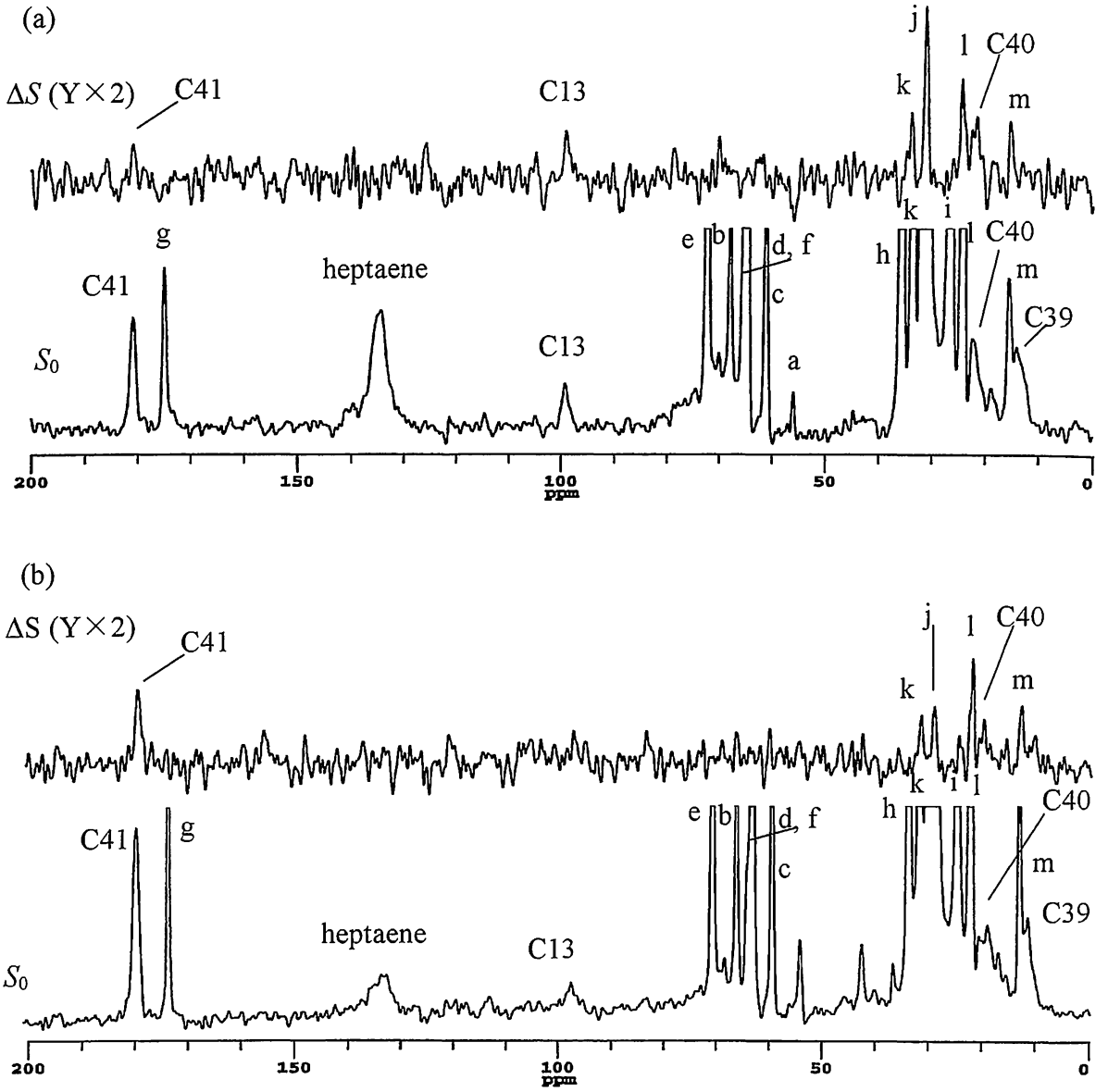


図 4-2　(a) 14-F AmB(**8**) / [tri-^{13}C]AmB(**4**) / DMPC=1/1/20 の ^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル。(b) 14-F AmB / [tri-^{13}C]AmB / Ergosterol / DMPC=1/1/2/18 の ^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル(上：差スペクトル、下：非照射スペクトル)。MAS 速度は 5 kHz、展開時間 8 ms、温度は 30°C で測定。図中のアルファベット a～m はDMPC 由来(図 4-1 参照)。

シグナルの分離のよい41位の炭素に着目し、2章と同様にREDOR測定の展開時間を変化させ、減衰の割合を調べた(図4-3)。得られた結果を2章の2-3-eで用いた方法と同様に、14-F AmBと[tri-13C]AmBが隣り合う確率を75%、14-F AmBの分子内REDOR減衰の寄与を6.8%として理論曲線によるフィッティングを試みた。その結果、14-F AmB

の14位のフッ素とその分子と隣り合う[tri-^{13}C]AmBの41位の炭素との原子間距離は、ステロール非含有膜、エルゴステロール含有膜でそれぞれ8.5、9.0 Åとなり、POPCよりも近い値となった。よって、AmBはPOPC膜中より近接した状況にあると考えられる。しかし、実測値と理論曲線の値が一致せず、特にエルゴステロール含有膜では、距離の近い成分と遠い成分の混在を示唆するような実験値となっている。ただし、傾向としてはPOPC膜と同様にエルゴステロールの添加により平均的な分子間距離は増加していた。

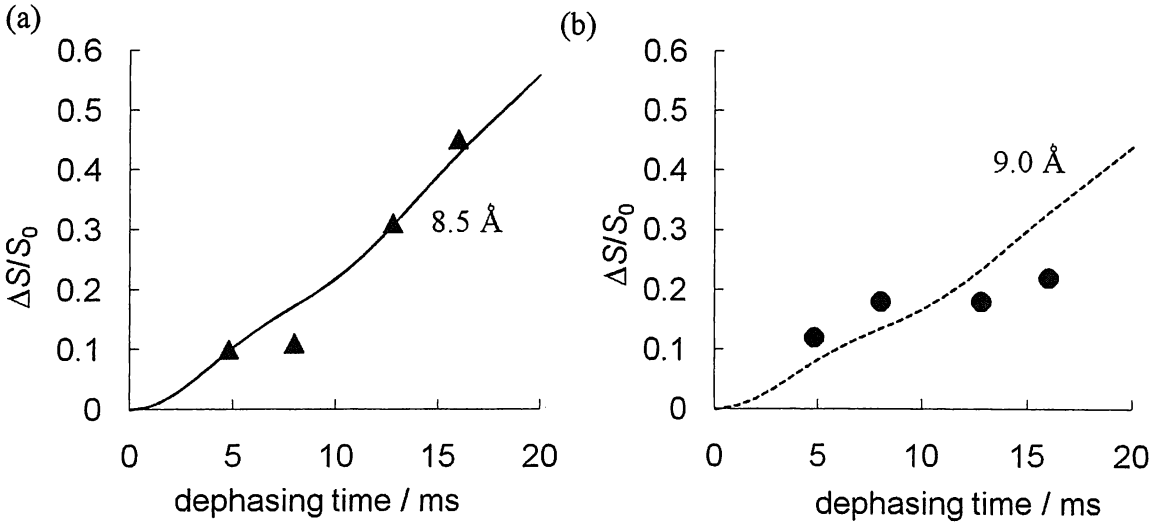


図 4-3　41 位での REDOR 減衰の割合と理論曲線

(a)ステロール非含有 DMPC 膜での REDOR 減衰(▲)と理論曲線。(b)エルゴステロール含有膜での REDOR 減衰(●)と理論曲線。

4-3　UV スペクトル測定

AmB の UV スペクトルパターンは AmB の会合状態や AmB の周囲の環境に依存することが知られている[5-7]。そこで、次に DMPC 膜中での AmB の会合状態に関する情報を UV スペクトルからも得ることにした(図 4-4)。観測された極大吸収波長を表 4-1 にまとめた。

まず、ステロール非含有DMPC膜について検証した。POPC膜での実験(2 章, 図2-15)では、ステロール非含有膜は AmB との親和性が低く、水中でミセルを形成していることが示唆されていた。しかし、DMPC を用いた場合では 332 nm に強い吸収が見られた。この吸収は AmB のヘプタエン同士が分子間相互作用することで現れる吸収で

あり[7]、AmB が大きな会合体を形成していることを示唆している。また、長波長側の吸収(415 nm)が POPC 膜(410 nm)に比べて顕著に長波長シフトしていた。この長波長シフトは AmB が疎水的環境下にあることを意味しており[5]、AmB が DMPC 膜に取り込まれていることを示唆している。これは DMPC と AmB の相互作用が強いという以前の研究結果や[1]、図 4-2-a の AmB-DMPC 間の REDOR 測定の結果を支持している。またコレステロール含有 POPC 膜での結果(図 2-15-b)に近いようにも見えるが、長波長側の極大波長(415 nm)はコレステロール含有 POPC 膜の結果(410 nm)よりも長波長シフトしていることから、DMPC 膜中では、AmB 分子が大きな会合体を形成しつつも、DMPC と相互作用しているものと考えられる。

エルゴステロール含有 DMPC 膜では、ステロール非含有膜で見られていた大きな会合体に相当する 332 nm の吸収は 353 nm にシフトしており、また吸収強度も低下している。これは、ヘプタエン間の距離が離れ、励起子相互作用が弱くなったことを意味している[7]。この傾向は POPC 膜での結果とも一致していたが(図 2-15)、DMPC 膜の方が AmB のモノマー由来のシグナル(367, 389, 416 nm)が強く、AmB が脱会合していることが示唆された。REDOR 測定から得られた結果(図 4-3)とも一致しており、AmB 分子間の平均距離がエルゴステロールの添加により増加することが示された。

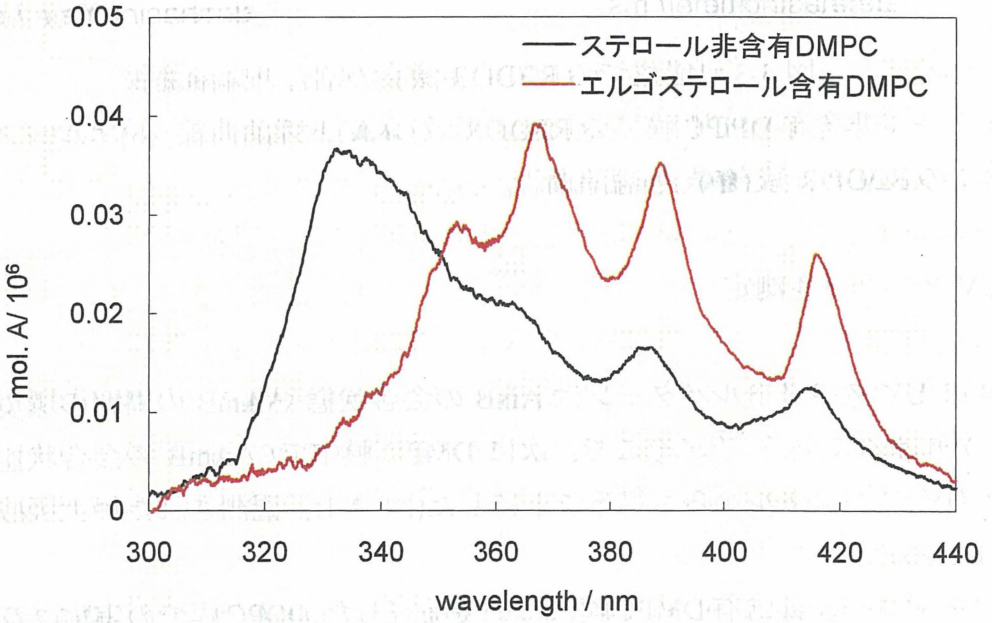


図 4-4　DMPC 膜中における AmB の UV 吸収スペクトル。AmB/lipid = 10^{-2}、エルゴステロール含有膜では DMPC の 10%をエルゴステロールに置換。AmB の濃度は 1.67 μM に設定。

表4-1　DMPC膜中でのAmBのUV極大吸収波長 / nm

ステロール無し	332	362	386	415
エルゴステロール	353	367	389	416

4-4　DMPC膜中でのAmB会合体とエルゴステロールの相互作用

以上の結果から、DMPC膜中でのAmB会合体とエルゴステロールの相互作用について考察した。

4-4-a　AmB分子間相互作用

2章のREDOR測定およびUVスペクトル測定から、AmBが水中で形成するミセルには"head-to-head"と"head-to-tail"の構造が存在することが明らかになっている。DMPC膜中でも同様の相互作用が観測されたことから、ミセル中のAmBの相互作用様式が残っていると考えられる。POPCではAmBとの親和性が低くAmBがミセル状態では膜に挿入されないが、DMPCはAmBとの親和性が高いためにミセル状態のまま膜に挿入された結果であると推測される。またAmB-DMPCの分子間REDORが観測されたこと、UVスペクトルの長波長側(416 nm)の吸収が長波長シフトしておりAmBが疎水的環境下にあることから、この会合体中にはDMPCも含まれているものと考えられる。

エルゴステロール含有膜でも基本的な相互作用様式に変化はなく、"head-to-head"と"head-to-tail"の両方の相互作用があるが、会合体を形成するAmBの分子数はエルゴステロールの存在によって減少していると考えられる。実際、UVスペクトル測定において、会合体由来の330 nm付近の吸収が減少し、モノマー由来の吸収(367, 389, 416 nm)が強く観測されている。また当研究室の山本らは^{2}H標識化AmBを用いた固体^{2}H NMR測定から、エルゴステロール含有DMPC膜中ではAmBの運動性が増加することを明らかにしている[8)]。本REDOR測定で、エルゴステロール含有膜で減衰の割合が減少したのは、AmB分子間の距離の増加に加え、運動性増加の影響も受けている可能性がある。

4-4-b　AmB-エルゴステロール相互作用

エルゴステロールの存在により、REDOR 減衰の割合(図 4-3)や、UV スペクトルのパターン(図 4-4)が顕著に異なるのに反して、現在まで DMPC 膜中で AmB-エルゴステロールの直接的な相互作用の検出には至っていない。例えは、4-1 でも述べたように AmB-エルゴステロール間の REDOR 測定では、POPC を用いた場合は分子間 REDOR 減衰が観測されたが(2 章)、DMPC を用いた場合では分子間 REDOR 減衰が観測されなかった。

また、山本らは ^{2}H 標識化エルゴステロール(図 2-1 参照)を用いて、DMPC 膜中でのエルゴステロール分子の運動性を評価した [8)]。その結果、AmB の有無にかかわらずエルゴステロールは速い軸回転運動を示した。このことは、2 章の図 2-2 に示した多原らが行った POPC 膜での実験結果 [9)](エルゴステロールの運動性が AmB の添加により減少する)とは異なり、AmB-エルゴステロールの複合体の寿命が極めて短い(μs 以下)、若しくは複合体が形成されていないことを意味している。さらに、毛利らは表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、ステロール非含有 DMPC 膜およびエルゴステロール含有 DMPC 膜に対する AmB の結合量を調べている [2)]。その結果、エルゴステロール含有膜の方が、ステロール非含有膜よりも AmB の結合量が低下することを見出した。これは同実験を POPC 膜で行った場合と逆であった。

以上のことから、DMPC 膜では POPC 膜で示唆されたような AmB-エルゴステロール複合体は形成されず、むしろエルゴステロールが DMPC の相状態を変化させることで、二次的な効果として AmB の会合状態に影響を与えている可能性が高い。

4-4-c　DMPC 膜中での AmB 会合体モデル

以上の結果を基に DMPC 膜中での AmB 会合体のモデル構造を図 4-5 に示した。

純粋な DMPC 膜では AmB は DMPC 膜中で"head-to-head"と"head-to-tail"構造を含むは大きな会合体を形成している。またこの会合体中には POPC 分子も含んでいる(図 4-5-a)。POPC 膜のコレステロール含有膜での状態(図 2-18-b 参照)にも近いが、"head-to-tail"構造を含んでいる点とリン脂質分子がともに会合体を形成している点が異なる。

エルゴステロール含有膜では"head-to-head"と"head-to-tail"を持つ点ではステロール非含有膜と同じであるが、その会合数が減少している。これはエルゴステロールの二

次的な効果によると考えられる。エルゴステロール含有 POPC 膜と比べて、AmB の配向がそろっていない、エルゴステロールとの複合体が形成されていない点が異なっている(図 2-18-c 参照)。

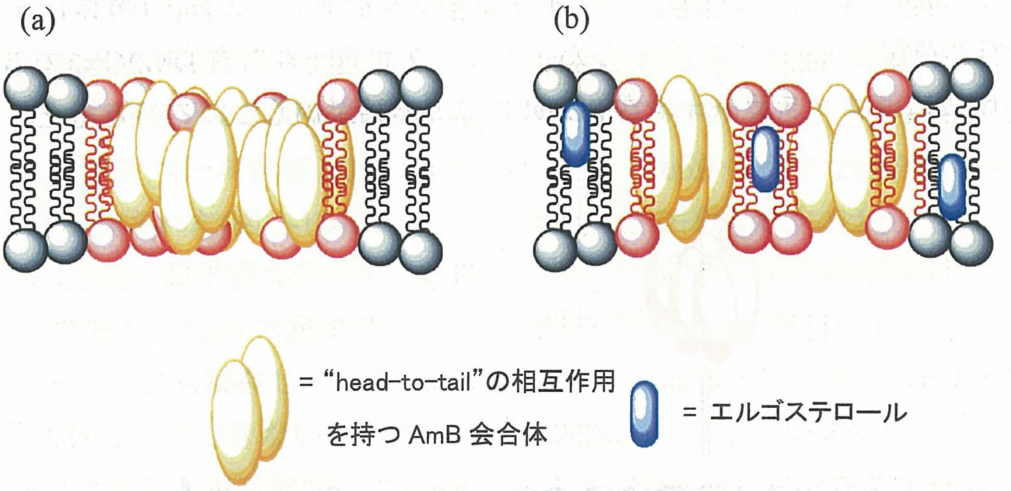


図 4-5　DMPC 膜中における AmB 会合体モデル

赤いリン脂質は AmB と相互作用している DMPC を表す。(a) ステロール非含有 DMPC 膜中での会合体モデル。ステロールを含まない DMPC を用いた場合、AmB と DMPC のドメインが形成される。純粋な POPC 膜(図 2-18-a 参照)と比べると AmB が膜に挿入されている点が異なる。またコレステロール含有膜 POPC 膜(図 2-18-b 参照)と比べると、AmB の配向が統一されていない点、および会合体にリン脂質を含む点が異なっている。(b)エルゴステロール含有 DMPC 膜中での会合体モデル。AmB は DMPC 膜中に分散するが、"head-to-tail"の相互作用を保持している。エルゴステロール含有 POPC 膜(図 2-18-c 参照)とは、AmB の配向が統一されていない点、エルゴステロールとの複合体が形成されていない点が異なる。

4-5　DMPC と POPC の比較とステロールの役割

DMPC 膜と POPC 膜の AmB に対する親和性の違いは、それぞれのリン脂質のアシル鎖の秩序の違いとして説明される。DMPC は飽和脂質であるため、アシル鎖のパッキングがよく秩序が高い。よって、AmB のように剛直な構造を持つ分子を取り込みやすい。一方で POPC はアシル鎖に不飽和結合をもつため、アシル鎖の秩序が低い。したがって AmB との親和性も DMPC に比べ低下している。

また、AmB の活性発現機構は主に 2 つの段階、AmB の膜への取り込みとチャネル

の形成、からなることが明らかになっている(図 4-6)[10]。本論文で行ったリン脂質とステロールの組み合わせ(POPC、コレステロール含有 POPC、エルゴステロール含有 POPC、DMPC、エルゴステロール含有 DMPC)の中では、ステロール非含有 POPC 膜のみが、AmB が膜に分配されず、水中でミセルを形成しており(図 2-18-a, 4-5 参照)、1 段階目が律速となっている。したがって、ステロール非含有 DMPC での AmB 会合体の比較にはコレステロール含有 POPC 膜での結果が適していると考えた。

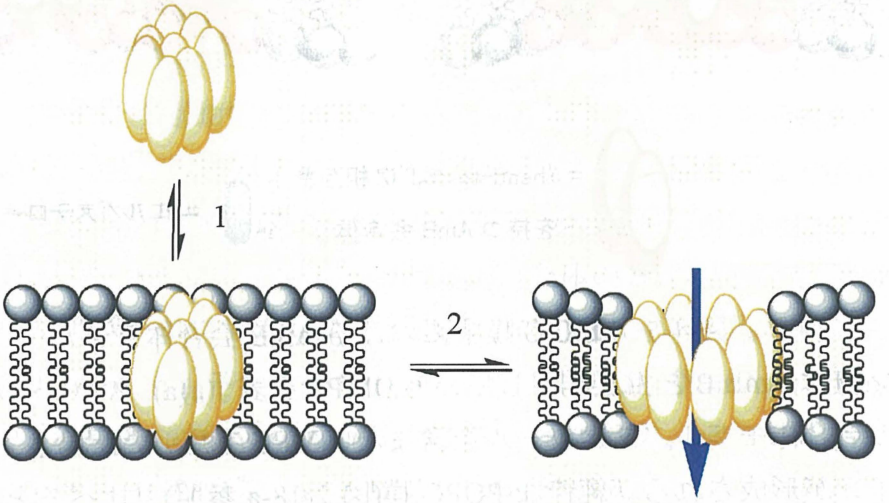


図 4-6　AmB チャネルの生成過程

AmB は膜への分配(1)と膜中でのチャネルの形成(2)の 2 段階から成る。ステロール非含有 POPC のみ、1 段階目が律速となっている(図 2-18-a 参照)。

DMPC 膜中で形成された会合体が POPC 膜の時と同様にチャネルとしての機能を持つかどうかは大変興味の持たれる点であるが、DMPC で調製したリポソームはリポソーム内外の pH 勾配に弱く壊れてしまうため、2 章および 3 章で用いた ^{31}P NMR による K^+透過活性試験[11]が適用できない。したがって、DMPC 膜およびエルゴステロール含有 DMPC 膜中での AmB 活性については不明である。しかし、ステロール非含有 DMPC での AmB の活性はある程度予測可能である。当研究室の松岡らが行った実験によると[12]、EggPC と DMPC の混合リポソームを用いた K^+透過活性試験で、DMPC 混合 EggPC リポソームと EggPC のみのリポソームに対する AmB の活性に殆ど違いは観測されなかった。また、DMPC-Egg PC 混合リポソームにおける AmB チャネルは"graded"タイプ(2 章 2-6 参照)であった。一方で DMPC(C_{14})よりもアシル鎖の短い DLPC(C_{12})を用いると、顕著に AmB の K^+透過活性が増加し、逆にアシル鎖の長い

DSPC(C_{18})を用いると AmB の活性は低下した。これらのことから、DMPC が AmB の活性に与える影響は中立的であると考えられる。EggPC の主成分が POPC であり、若干のコレステロールを含んでいること、また、POPC と DMPC 二重膜の疎水性部位の厚みはそれぞれ、25.8, 23 Å(25 °C)[13, 14]とほぼ同じであることを考慮すると、コレステロール含有 POPC 膜と DMPC 膜で AmB の活性に大きな違いは無いと考えられる。

固体 NMR 測定(2 章 2-3 および 4 章 4-2)や UV スペクトル測定から(2 章 2-5 および 4 章 4-3)、コレステロール含有 POPC 膜と DMPC 膜で AmB は大きな会合体を形成していることが示唆された(図 2-18-b および図 4-5-a)。この様な状態では AmB は POPC、DMPC に関係なく似た様なチャネルを形成し、"graded"タイプの活性を示すものと推察される。ただし、AmB の配向が POPC 膜では"head-to-head"が優位であるが、DMPC 膜では"head-to-tail"も混在している。よって AmB 分子は単に膜に挿入されるだけでは向きを揃えることができないと考えられる。POPC 膜ではコレステロールの一部が AmB と弱いながらも相互作用して AmB 分子を再配向させている可能性がある。また DMPC 膜では DMPC 分子が会合体に取り込まれているが、こちらは AmB と DMPC の親和性が強いためである。

エルゴステロール含有 POPC 膜とエルゴステロール含有 DMPC 膜では、前述の SPR や ^{2}H-NMR の結果が示すように POPC と DMPC で異なる結果が多数得られており、エルゴステロールの働きや、AmB 会合体は全く異なるものであると考えることが妥当である。POPC 膜ではエルゴステロールが AmB と直接相互作用し、配向を"head-to-head"に揃え、かつ AmB の大きな会合体の形成を抑制している(図 3-8)。DMPC 膜でもエルゴステロールは AmB を脱会合させる方向に働くが、それは DMPC の相状態の変化を介した 2 次的な作用であるため、直接相互作用により起こる AmB 分子の"head-to-head"への再配向が観測されていないと推測される(図 4-5)。

本章の実験により、ステロール分子は POPC 膜で AmB の配向を"head-to-head"に揃える効果をもつものと考えられる。またエルゴステロール含 DMPC 有膜において AmB-エルゴステロールの複合体が形成されていない可能性があること、および活性試験との比較が困難であることから、AmB チャネル複合体の再現の場としては POPC 膜の方が DMPC 膜よりも適切であると考えられる。しかし、AmB との相互作用が POPC より強いにもかかわらず、DMPC は POPC と同様な部位(アシル鎖末端付近)に REDOR 減衰を与えたことから(図 2-7, 4-2 参照)、AmB とリン脂質の相互作用という点に焦点を絞れば DMPC も有用なリン脂質であると考えられる。

実験項

試薬および溶媒

AmB はナカライテスクから、エルゴステロールは東京化成、DMPC は Avanti Polar Lipid Inc.から購入した。特に記載のない限り、溶媒にはナカライテスクの高速液体クロマトグラフィー用を、水には MilliQ 水(MilliPore 社)を用いた。またサンプル調製はアルゴン雰囲気化で行った。14-F AmB(**8**)はフラッシュシリカゲルオープンカラムにより生成を行い、質量分析および ^{1}H NMR で構造の確認を行った。[tri-^{13}C]AmB(**4**)は既に報告した方法 [1a)]に従い精製を行ったものを使用した

使用機器

溶液 NMR は、ECA-500 (JEOL, 500MHz for ^{1}H NMR)を用いて測定した。NMR 測定溶媒として $CDCl_3$ または DMSO-d_6 を用いた。質量分析には、サーモクエスト社 LCQ-DECA を用いた。HPLC は、島津製作所製の SCL-10Avp, SPD-10A*i*, LC-10A*i*, DGU-12A, SCL-10Avp からなる装置を使用し、カラムは YMC-Pack Polymer C18 ϕ10x250 mm、ナカライテスク製の COSMOSIL 5C_{18}-AR-Ⅱ ϕ20x250 mm または ϕ4.6x250 mm を使用した。可視紫外分光光度計は島津製作所製の UV-2500PC を使用した。ボルテクスミキサーは Pasolina NS-80 を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。固体 NMR は CMX-300 (Chemagnetics/Varian, 300 MHz for ^{1}H NMR)を用いた。

固体 NMR サンプル調製

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/DMPC リポソームの調製

20 ml ナス型フラスコ中で 14-F AmB (1.7 mg, 1.8 μmol)、[tri-^{13}C]-AmB(1.7 mg, 1.8 μmol)、DMPC (25 mg, 36.9 μmol)を $CHCl_3$/MeOH に溶解後、エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた(ステロール含有サンプルでは 10%の DMPC を対応するステロールに置換)。その後、真空下で 8 時間乾燥させることで、完全に溶媒を除去した。リン脂質フィルムに H_2O(800 μl)と 10 mM HEPES 溶液(pH7.0, 28.4 μl)を加え、vortex, sonication によって水和を行い、脂質の分散液とした。凍結融解を 5 回

行い MLV を形成させた後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し替え、凍結乾燥し、粉末状態とした。アルゴン雰囲気下、D_2O(28.4 μl)を加え、vortex、凍結融解を繰り返すことでリン脂質を完全に再水和させペースト状にした。サンプルを外径 3 mm のガラスインサートに移し替え、エポキシ樹脂で密封した。このガラスインサートを 5 φ の MAS ローターに入れ、NMR 測定に用いた。

固体 NMR 測定

測定には 5 mm の 3 チャンネル MAS プローブ(Varian)を用いた。測定時は温度コントローラーと MAS 速度コントローラーにより、温度と MAS 速度を一定に保った。サンプルごとにパルス幅、CP 条件の最適化を行い、異なる展開時間の測定を行うときは、毎回チューニングとマッチングの確認を行った。プロトンデカップリングには TPPM パルスシークエンスを用いた[15]。フッ素核の位相回しには xy-8[16]を用いた。

各サンプルの測定条件は以下の表(表 4-2, 4-3)にまとめた。

固体 NMR 測定条件

$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR

表 4-2　14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/DMPC の $^{13}C\{^{19}F\}$REDOR 測定条件

dephasing time / ms	4.8	8	12.8	16
scans	47088	71440	71440	71936
^{13}C observed frequency / MHz	75.315			
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743			
MAS frequency / Hz	5000 ± 2			
temperature / °C	30 ± 1			
spectral width / kHz	30			
^{1}H π/2 pulse width / μs	3.5			
^{13}C π pulse width / μs	8.66			
^{19}F π pulse width / μs	11			
CP contact time / ms	2			
pulse delay / s	2			
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	71 kHz			
^{19}F phase cycling	xy-8			

表 4-3　14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/erogosterol/DMPC の ^{13}C{^{19}F}REDOR 測定条件

dephasing time / ms	4.8	8	12.8	16
scans	71440	71440	71440	71440
^{13}C observed frequency / MHz	75.315			
^{19}F irradiation frequency / MHz	281.743			
MAS frequency / Hz	5000 ± 2			
temperature / °C	30 ± 1			
spectral width / kHz	30			
^{1}H $\pi/2$ pulse width / μs	4			
^{13}C π pulse width / μs	9.33			
^{19}F π pulse width / μs	12.2			
CP contact time / ms	2			
pulse delay / s	2			
TPPM ^{1}H-decoupling field strength / kHz	71 kHz			
^{19}F phase cycling	xy-8			

REDOR 減衰シミュレーションカーブの作成

図 4-3 の理論曲線の作成は、Bessel 級数による近似式を用いた [17] (Microsoft Excell, k=6 まで計算)。

UV スペクトル測定

AmB の DMSO 溶液から 15 nmol を試験管に移し、真空ポンプで溶媒を除去した。その後、MeOH/$CHCl_3$ に溶解させ、1.5 μmol の DMPC($CHCl_3$ 溶液)を加えた(ステロール含有サンプルでは 10%の POPC を対応するステロールに置換)。エバポレーターで溶媒を留去し、脂質フィルムを形成させた。真空ポンプで終夜乾燥後、8%スクロース溶液 1 ml を加え、voltex, sonication を行い脂質を水和させた。分散液を 4 回凍結融解させることで、MLV を形成させた。最後に分散液 170 μl に対し、1360 μl の 8%スクロース溶液を加えて希釈し、UV スペクトルを測定した。また、AmB を含まないリ

ポソームを同様に調製し、バックグランドとして、AmB 含有リポソームの UV スペクトルデータから差し引いた。

参考文献

1) (a) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704-710.
(b) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614.

2) 毛利良太　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 20 年度博士論文

3) 土川博史　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 18 年度博士論文

4) Matumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.

5) Fujii, G., Chang, J. E., Coley, T., and Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968.

6) Bolard, J.; Legrand, P.; Heitz, F.; Cybulska, B. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5707-5715.

7) Gagoś, M., Koper, R., and Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90-98

8) 山本寛子　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 18 年度修理論文

9) 多原主哲　大阪大学大学院理学研究科化学専攻　平成 20 年度修士論文

10) Matsuoka, S; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 429-434.

11) Herve, M.; Cybulska, B.; Gray-Bobo, C. M. *Eur. Biophys. J.* **1985**, *12*, 121-128.

12) Matsuoka, S; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109-115.

13) Nezil, F. A.; Bloom, M. Biophys. J. 1992, 61, 1176-1183.

14) Lewis, B. A.; Engelman, D. M. J. Mol. Biol. 1983, 166, 211-217.

15) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958.

16) Gullion, T.; Baker, D. B.; Conradi, M. S. *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 479–484.

17) Mueller, K. T. *J. Magn. Reson.* **1995**, *113*, 81-93.

第5章　結論

固体NMRの手法をAmB複合体に応用することで、AmBチャネル複合体を形成する分子間の相互作用情報の取得に成功した。

^{13}C-AmBと^{19}F-AmBを用いた分子間REDOR測定により、AmB分子間の距離を具体的に求めることに成功した。またステロールの違いによりAmB分子間の距離が変化することを明らかにした。

^{19}F-AmBと^{13}C-Ergosterolおよび^{13}C-AmBと^{19}F-Ergosterolを用いた固体NMR測定をPOPC膜中で行うことで、分子間のREODR測定に初めて成功した。

以上の測定結果からAmBチャネル複合体について以下の情報が得られた。

AmB分子とPOPCの親和性は低く、AmBは水中でミセルを形成している。このミセル中には少なくとも"head-to-head"と"head-to-tail"の構造を持つことが明らかになった。コレステロール含有膜では、AmBの脂質膜に対する親和性が増加し、AmBは膜に取り込まれる。この過程において、AmB の配向は"head-to-head"が優位となり、イオンを透過する会合体となる。しかし、AmB 分子は強く自己会合しており、周りのリン脂質とは相分離状態にあり、大きなコンダクタンスを持つチャネルの形成は困難であると考えられる。エルゴステロール含有膜では、AmB-エルゴステロール-POPCの三者による複合体が形成される。また、AmB とエルゴステロールの配向には一部"head-to-tail"を含み、かつ周りの POPC はインターディジット構造をとることで、AmB の分子長にリン脂質膜の厚さを合わせ、よりイオンの透過性の高い"all-or-none"タイプのチャネルを形成していることが示唆された。

AmB-エルゴステロール-POPC複合体についてMD計算を行った。その結果、固体NMRから示唆されたAmBのヘッドグループとPOPCのアシル鎖末端の接近や、エルゴステロールの配向は2種類あるといった複合体モデルを再現することができ、その妥当性を示すことができた。

AmBとの親和性がエルゴステロール以上に強いDMPCを用いると、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、ミセル状態の相互作用を保持したままでも膜中に取り込まれ、AmB 分子の向きを揃えるためにはステロールとの直接的な相互作用が必要であることを意味している。このことから、ステロール分子にはAmBの配向をそろえる効果があり、DMPC膜中ではその効果が抑制されていると考えられる。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。

本研究により、固体 NMR の手法が、AmB-ステロール-リン脂質の 3 者による複雑な系にも適用可能であることを示すことができ、これまで困難であった AmB 複合体の具体的な距離情報を伴った構造解析が可能になった。そして、AmB の複合体の構造とチャネル活性の間に明確な相関が得られ、選択毒性発現機構の一端を明らかにすることができた。今後、本研究で提唱した AmB 複合体モデルの構造を基に、位置特異的な標識体を用いたピンポイントな距離測定を行うことで、より詳細に複合体構造を解析することが可能になると期待される。

また、本研究の一連の手法により、生体膜を介した分子の相互作用を原子レベルで解析することが可能になり、今後、膜タンパクと小さなリガンドや、脂質分子同士の相互作用の解析等に適用することで生命活動の最も基本的な部分を理解することが可能になると期待される。

NMR スペクトル

化学シフト一覧

2 章

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/POPC

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C,	展開時間	4.8 ms (S_0, S, ΔS)
		8.0 ms (S_0, S, ΔS)
		12.8 ms (S_0, S, ΔS)
		16.0 ms (S_0, S, ΔS)
		24.0 ms (S_0, S, ΔS)
		32.0 ms (S_0, S, ΔS)

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/cholesterol/POPC

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C,	展開時間	4.8 ms (S_0, S, ΔS)
		8.0 ms (S_0, S, ΔS)
		12.8 ms (S_0, S, ΔS)
		16.0 ms (S_0, S, ΔS)
		24.0 ms (S_0, S, ΔS)
		32.0 ms (S_0, S, ΔS)

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C,	展開時間	4.8 ms (S_0, S, ΔS)
		8.0 ms (S_0, S, ΔS)
		12.8 ms (S_0, S, ΔS)
		16.0 ms (S_0, S, ΔS)
		24.0 ms (S_0, S, ΔS)
		32.0 ms (S_0, S, ΔS)
^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, -20 °C,	展開時間	12.8 ms (S_0, S)

14-F AmB/[U-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC

^{13}C{^{19}F}RDX スペクトル, 30 °C, 展開時間 16.0 ms (S_0, S)

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB 粉末サンプル

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C, 展開時間 5.7 ms (S_0, S, ΔS)

3 章

14-F AmB/^{13}C-ergosterol/POPC

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C, 展開時間 12.8 ms (S_0, S, ΔS)

6-F Ergosterol の ^{13}C NMR スペクトル($CDCl_3$ 中)

[U-^{13}C]AmB/6-F ergosterol/POPC

^{13}C{^{19}F}RDX スペクトル, 30 °C, 展開時間 6.7 ms (S_0, S, ΔS)

4 章

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/DMPC

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C, 展開時間 4.8 ms (S_0, S, ΔS)
8.0 ms (S_0, S, ΔS)
12.8 ms (S_0, S, ΔS)
16.0 ms (S_0, S, ΔS)

14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/ergosterol/DMPC

^{13}C{^{19}F}REDOR スペクトル, 30 °C, 展開時間 4.8 ms (S_0, S, ΔS)
8.0 ms (S_0, S, ΔS)
12.8 ms (S_0, S, ΔS)
16.0 ms (S_0, S, ΔS)

化学シフト一覧

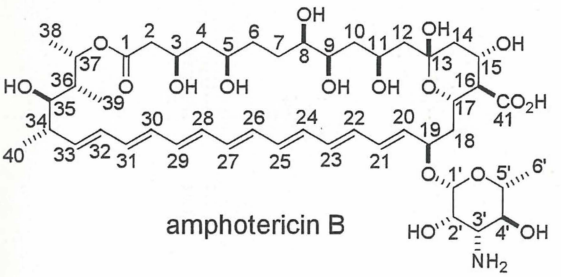
リン脂質膜中での ^{13}C NMR 化学シフト

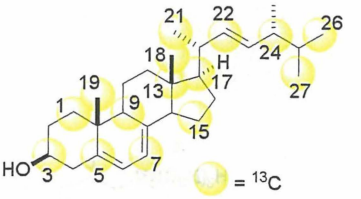
Amphotericin B

position	δ/ppm	position	δ/ppm
1	174.1	19	78.7
2	41.6	20	136.9
3	70.3	21-32	130-140
4	44.1	33	134.3
5	74.3	34	44.6
6	36.6	35	78.9
7	34.0	36	41.9
8	75.5	37	71.6
9	76.7	38	17.9
10	41.2	39	15.4
11	70.3	40	20.8
12	48.2	41	181.1
13	98.9	1'	97.9
14	45.6	2'	68.7
15	67.6	3'	57.2
16	61.1	4'	70.1
17	70.3	5'	74.4
18	42.0	6'	19.2

^{13}C-ergosterol

position	δ/ppm
1	40.0
3	70.7
5	142.6
7	118.6
9	47.6
13	44.7
15	24.6
17	57.2
18	13.5
19	17.4
21	22.8.
22	137.4
24	44.7
26	21.1
27	21.1





^{13}C-Ergosteol

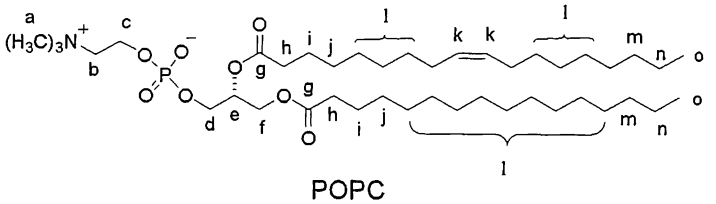
リン脂質の ^{13}C NMR 化学シフト

POPC

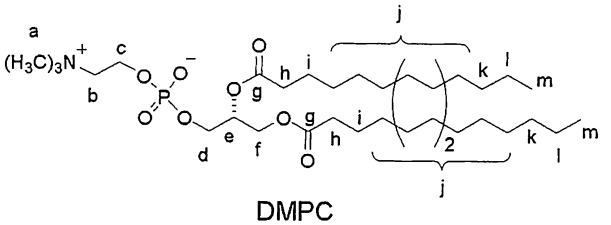
position	δ/ppm
a	55.8
b	67.8
c	61.0
d	65.2
e	72.3
f	64.7
g	175
h	35.7
i	26.6
j	28.8
k	131.2
l	31.4
m	33.5
n	24.1
o	15.3

DMPC

position	δ/ppm
a	55.7
b	67.7
c	61.0
d	67.7
e	72.2
f	64.7
g	174.8
h	35.6
i	26.5
j	31.4
k	24.0
l	33.5
m	15.1



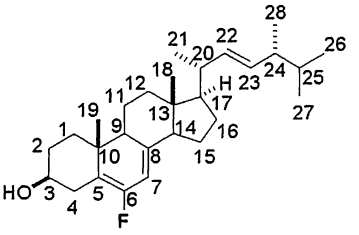
POPC



DMPC

6-F ergosterol の溶液 ^{13}C NMR 化学シフト

position	δ	position	δ
1	38.85	15	22.88
2	31.38	16	28.16
3	69.5	17	55.74
4	30.45($^3J_{CF}$ = 4.8 Hz)	18	12.11
5	113.23 ($^2J_{CF}$ = 9.60 Hz)	19	16.69
6	152.05($^1J_{CF}$ = 242.32 Hz)	20	40.32
7	112.71($^2J_{CF}$ = 37.19 Hz)	21	21.1
8	145.21($^3J_{CF}$ = 10.80 Hz)	22	135.37
9	46.29	23	132.22
10	38.55	24	42.85
11	20.99	25	33.1
12	38.55	26, 27	19.65
13	42.85		19.94
14	54.53	28	17.6

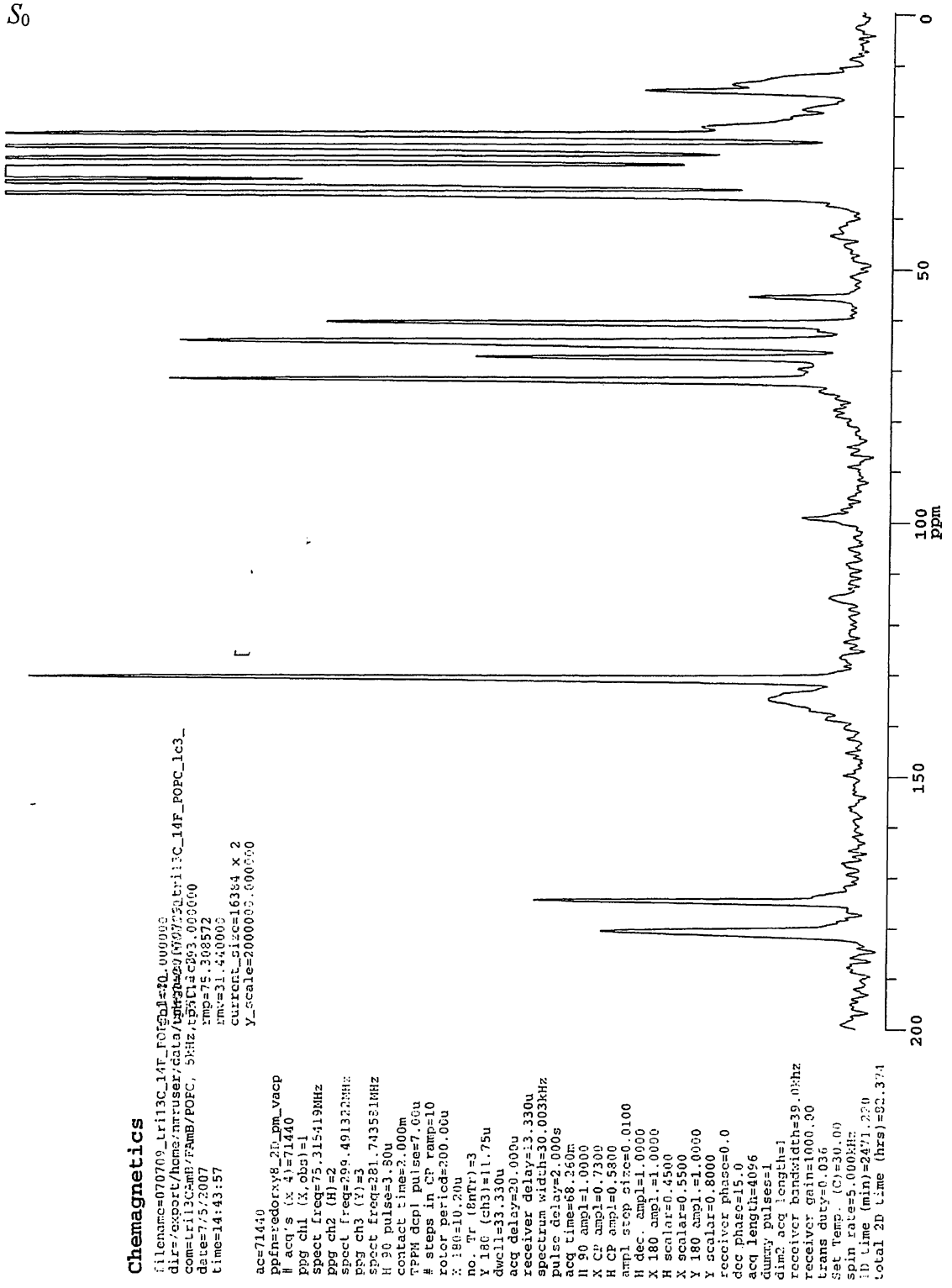


6-F Ergosterol

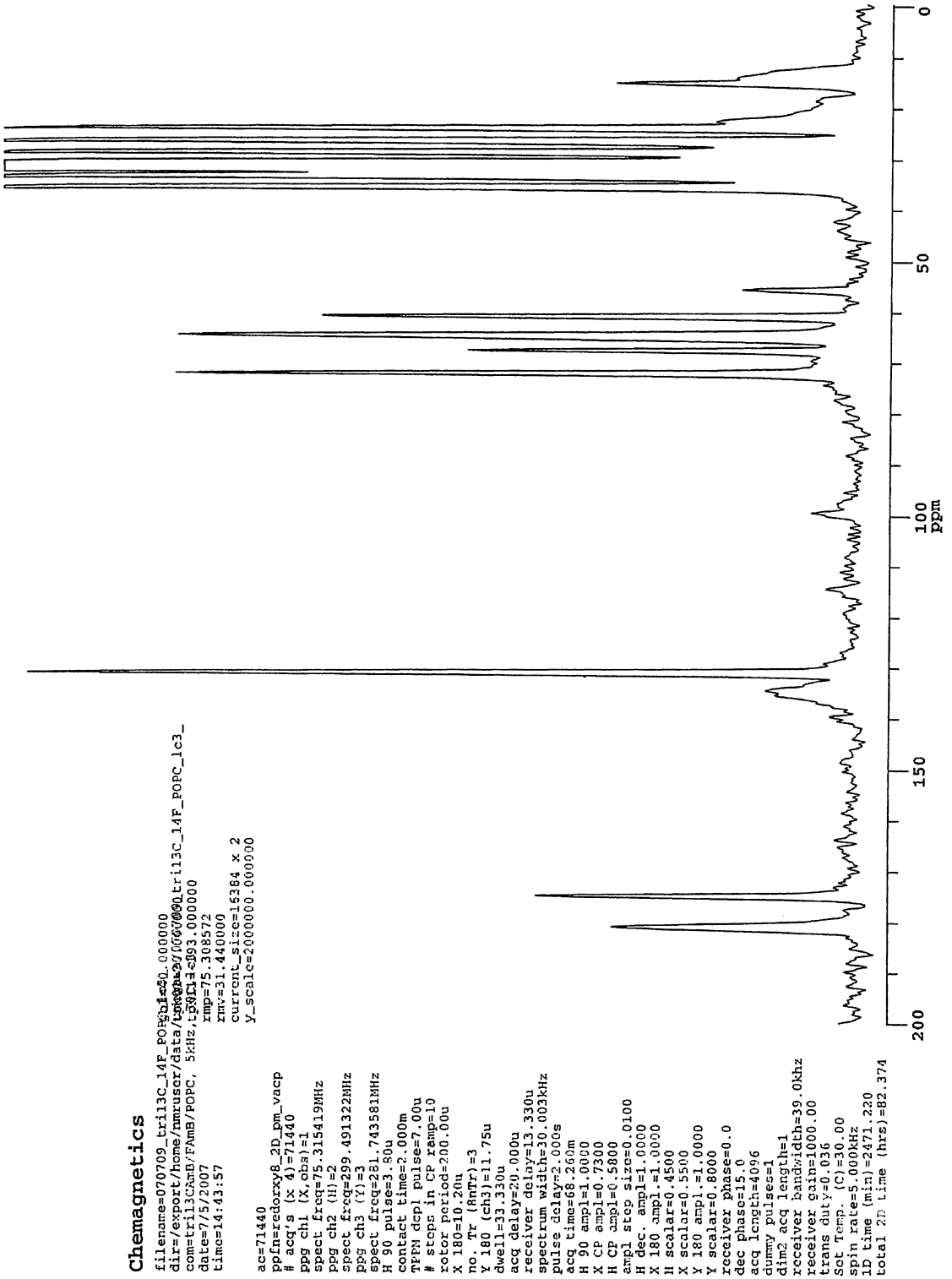
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

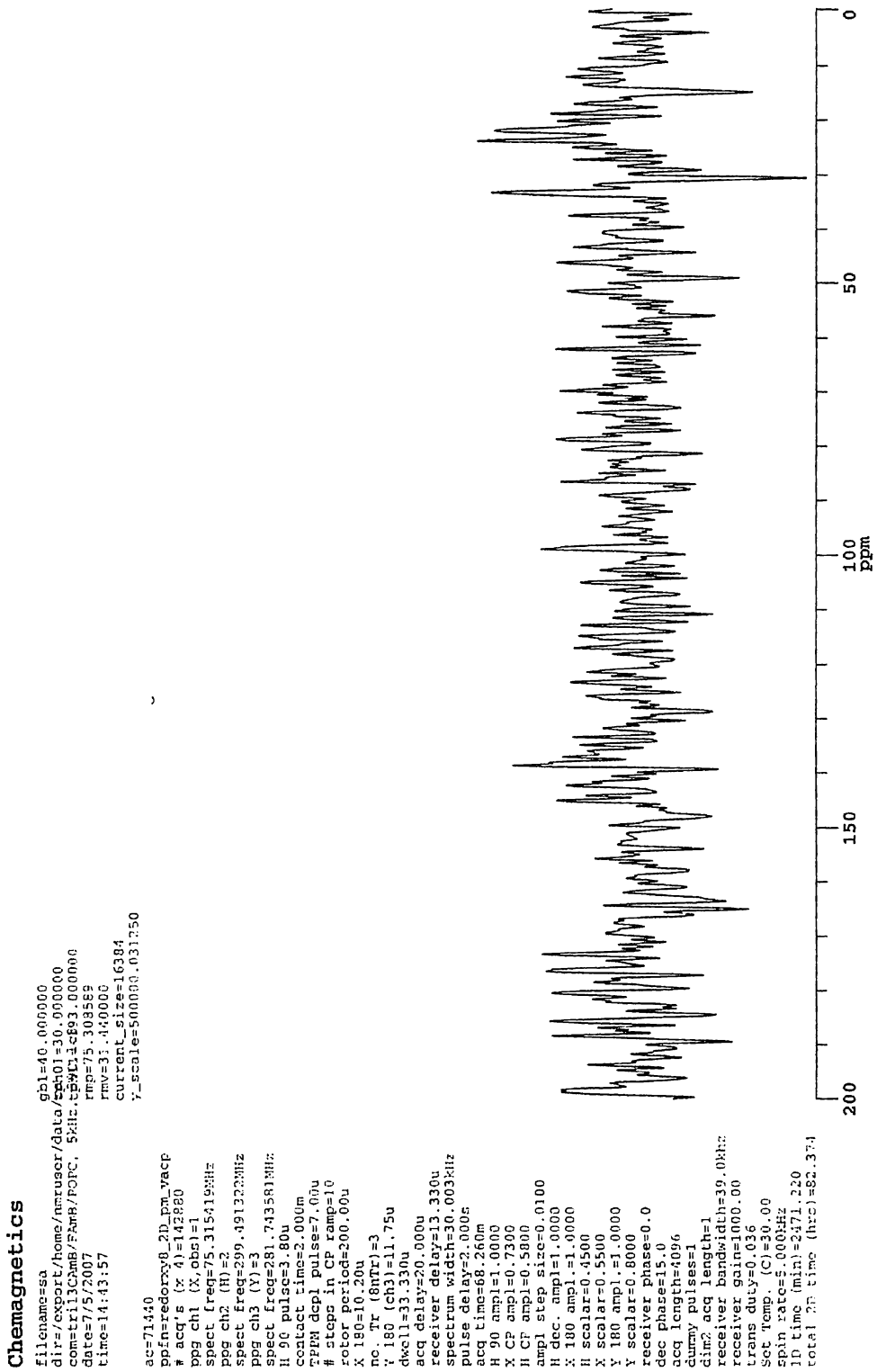
S_0



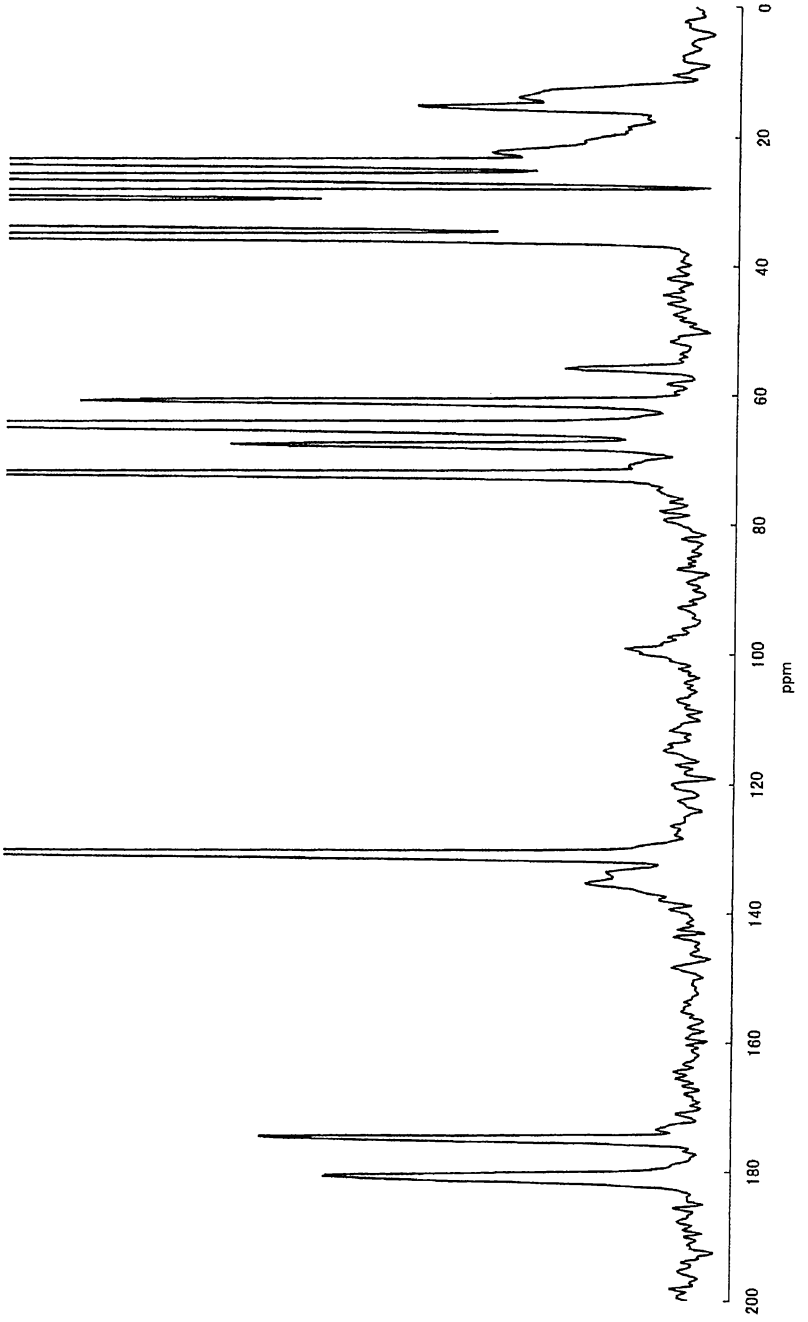
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
S



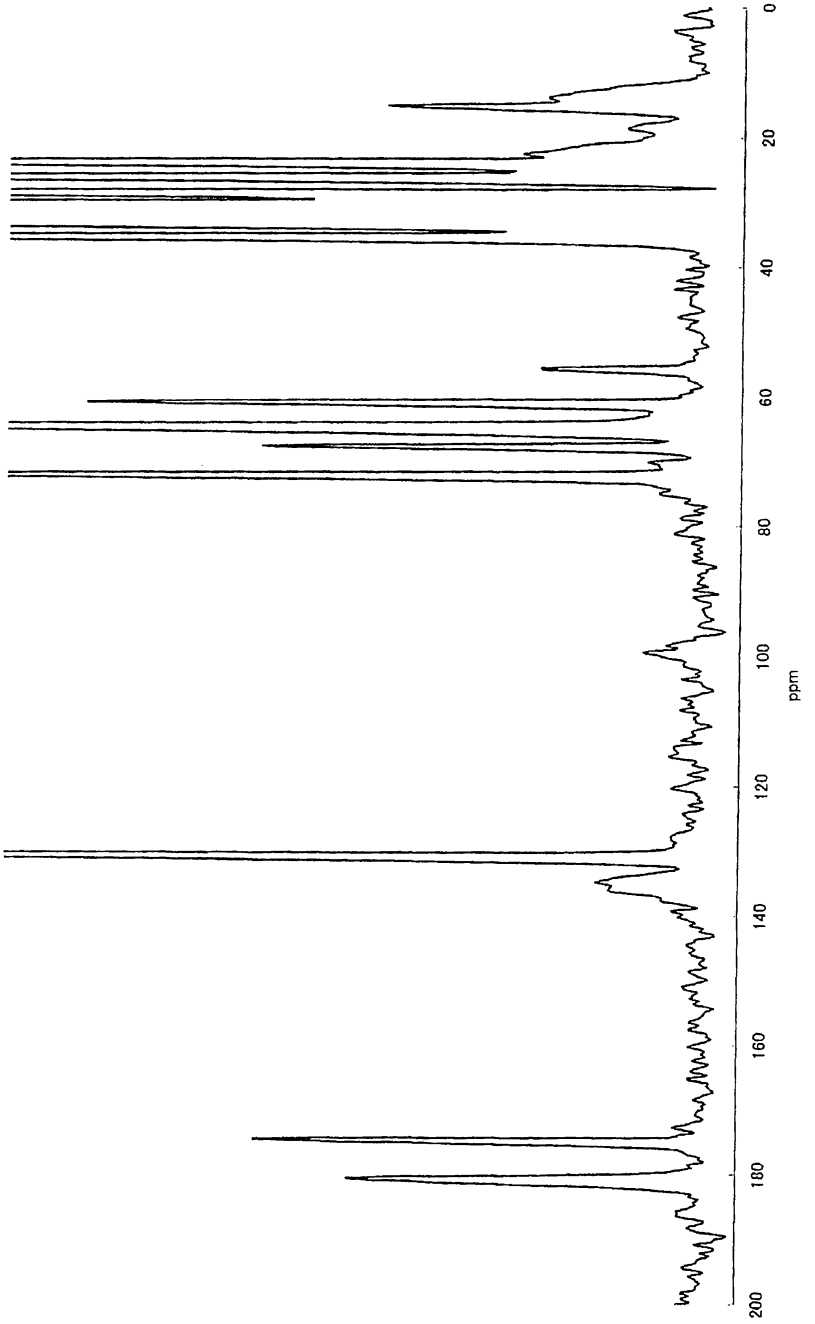
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2.5)



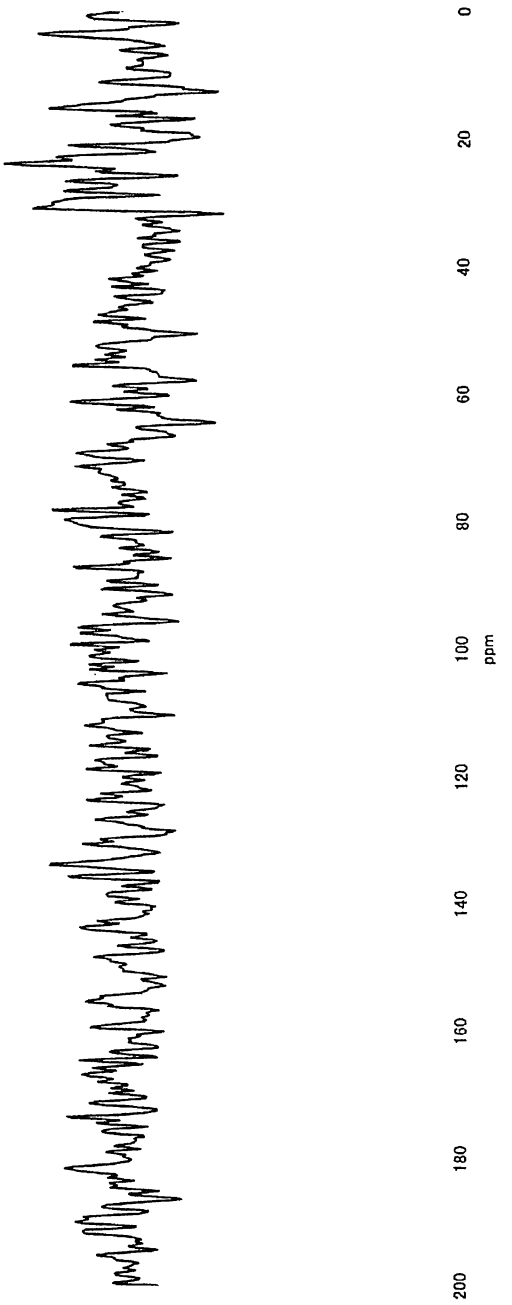
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
S_0



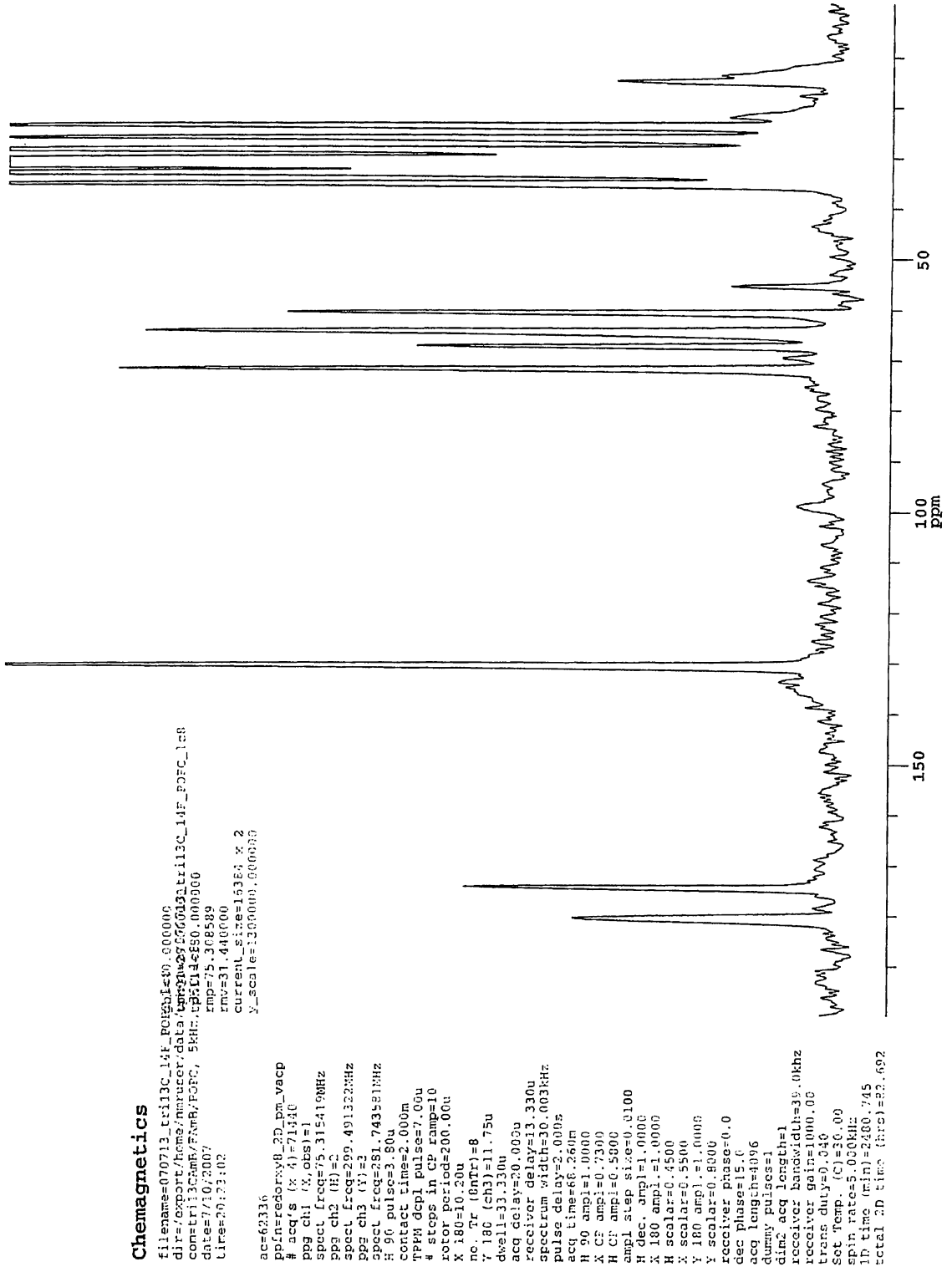
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
S



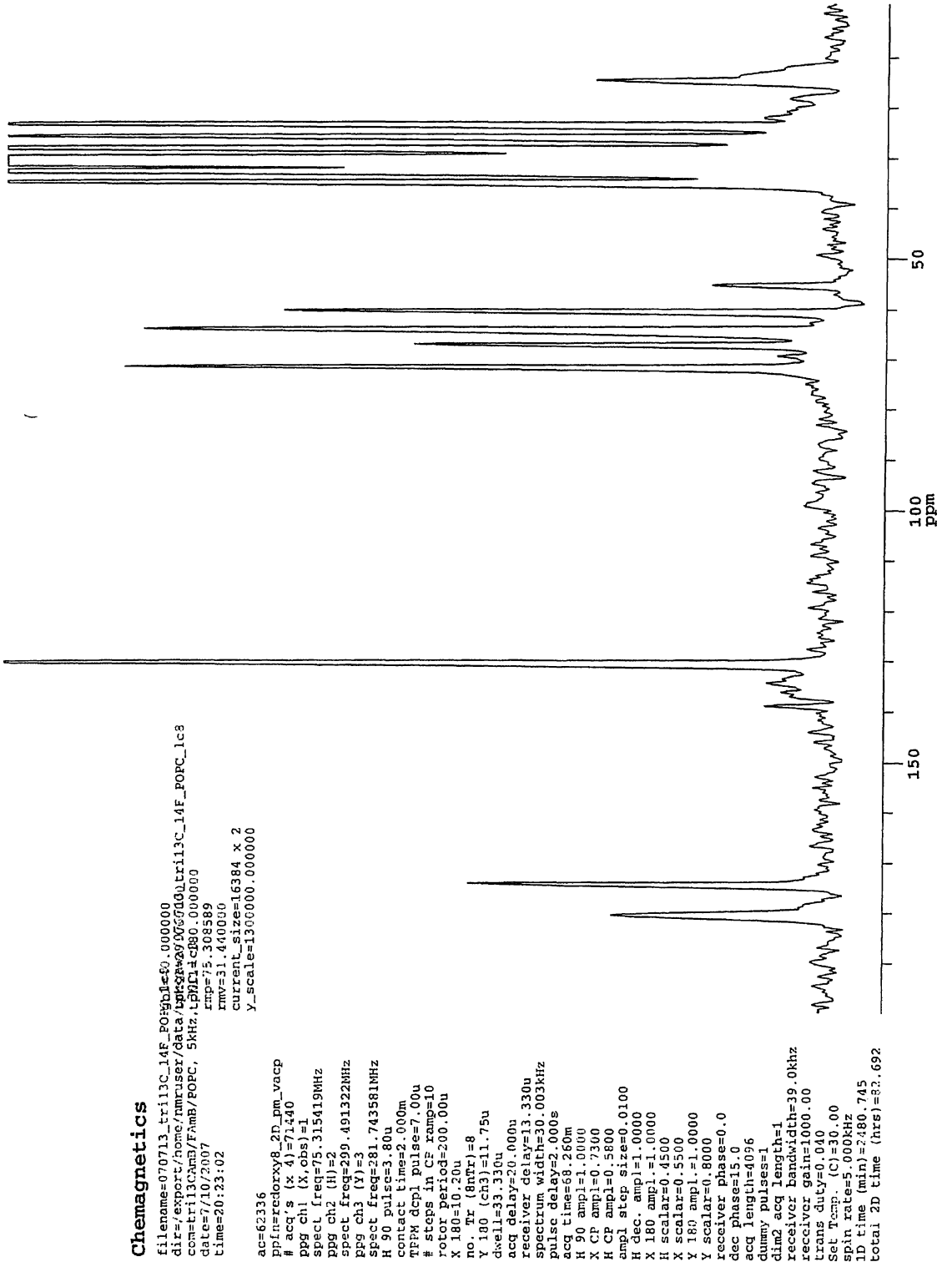
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



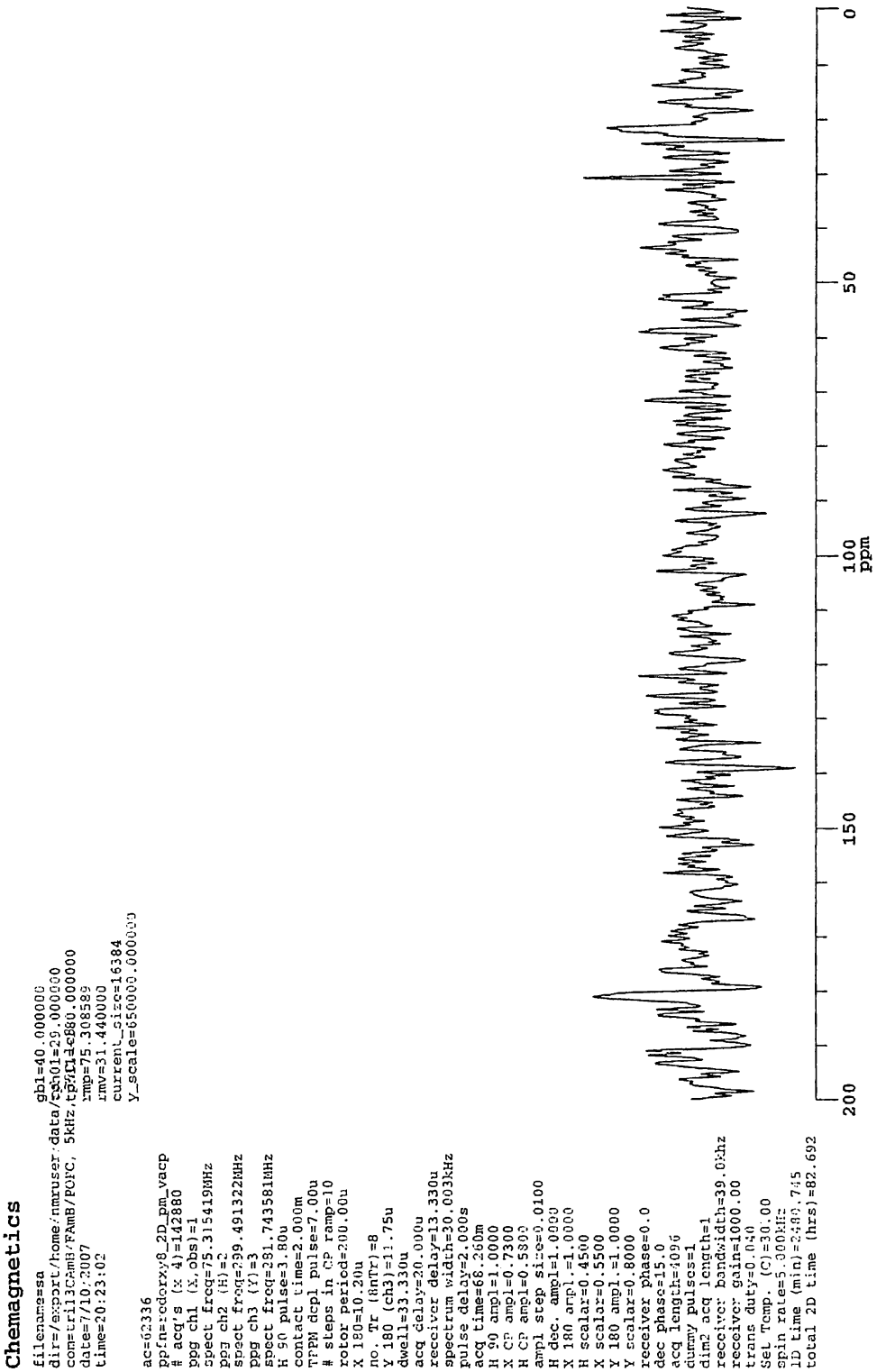
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
S_0



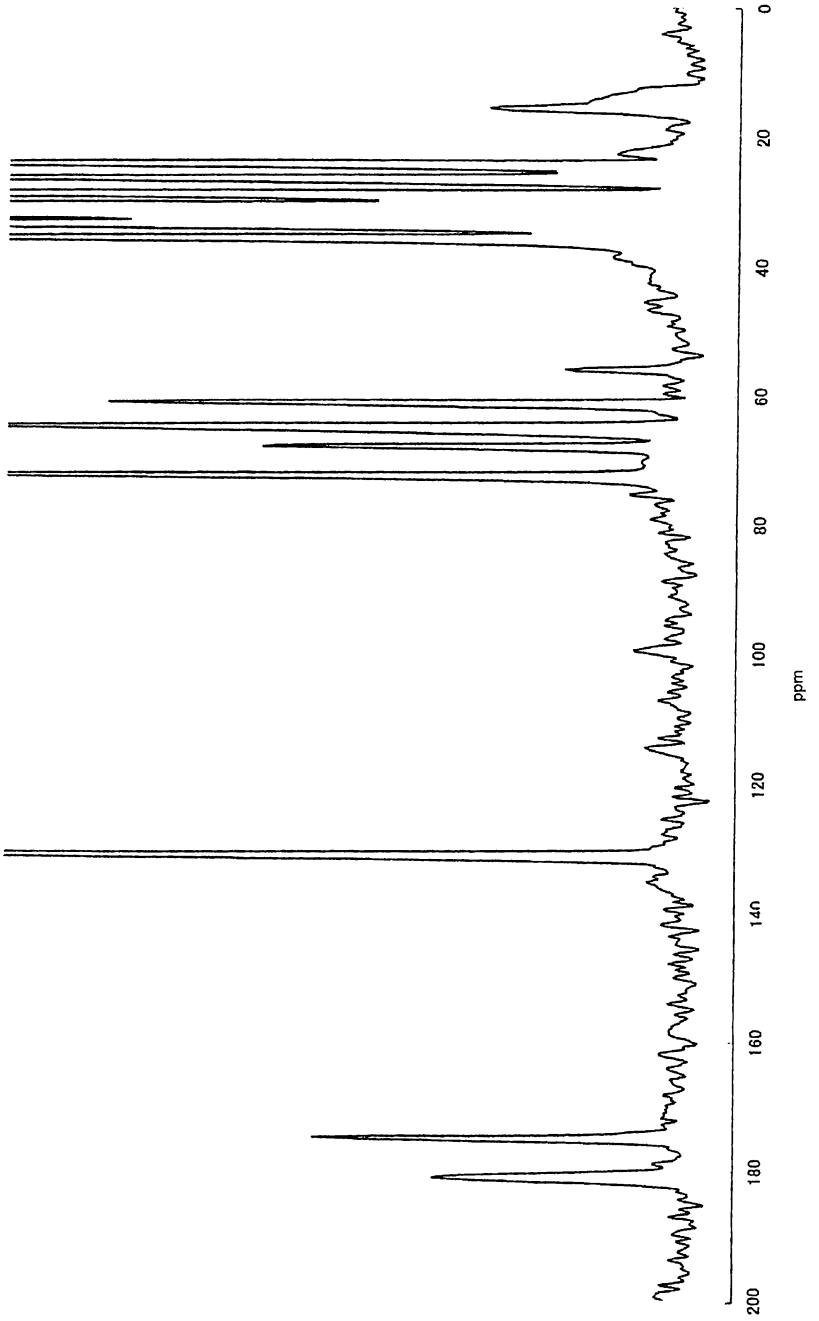
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
S



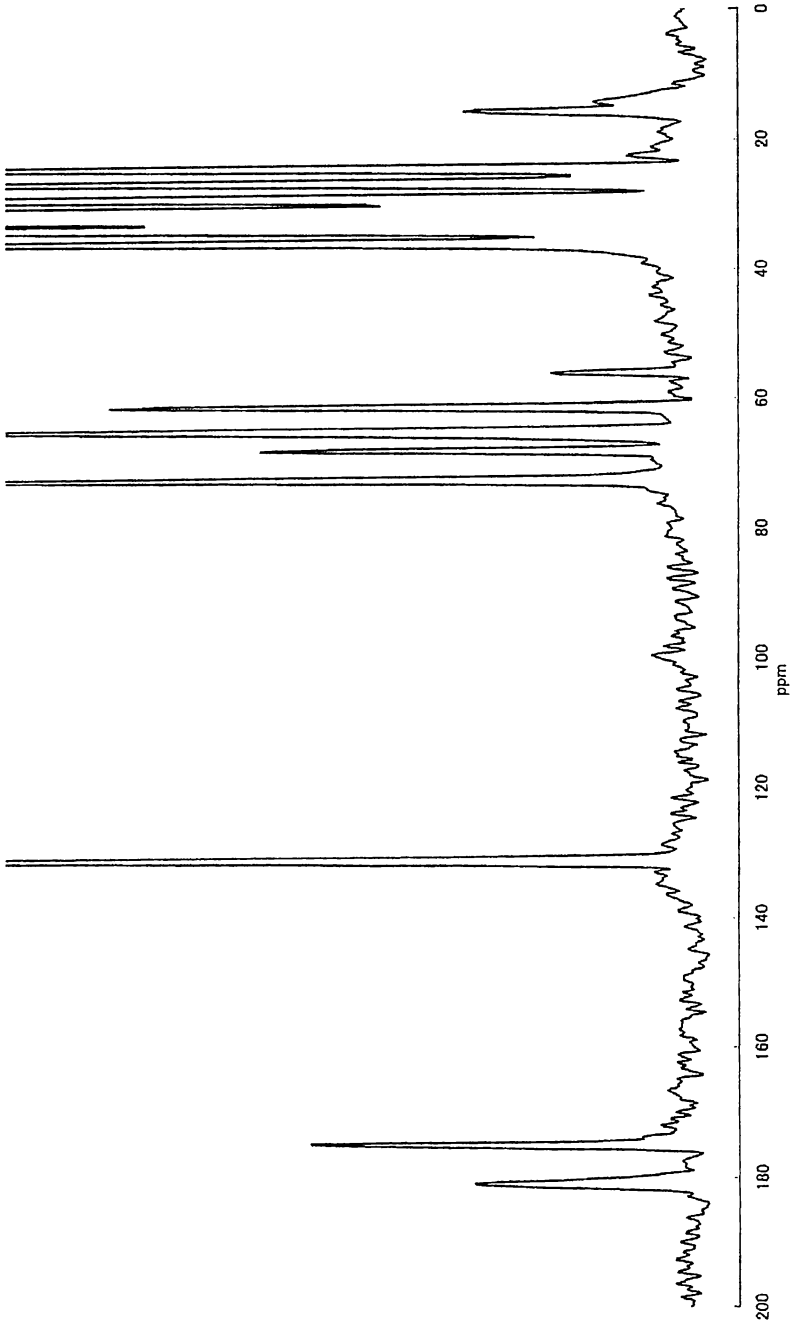
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



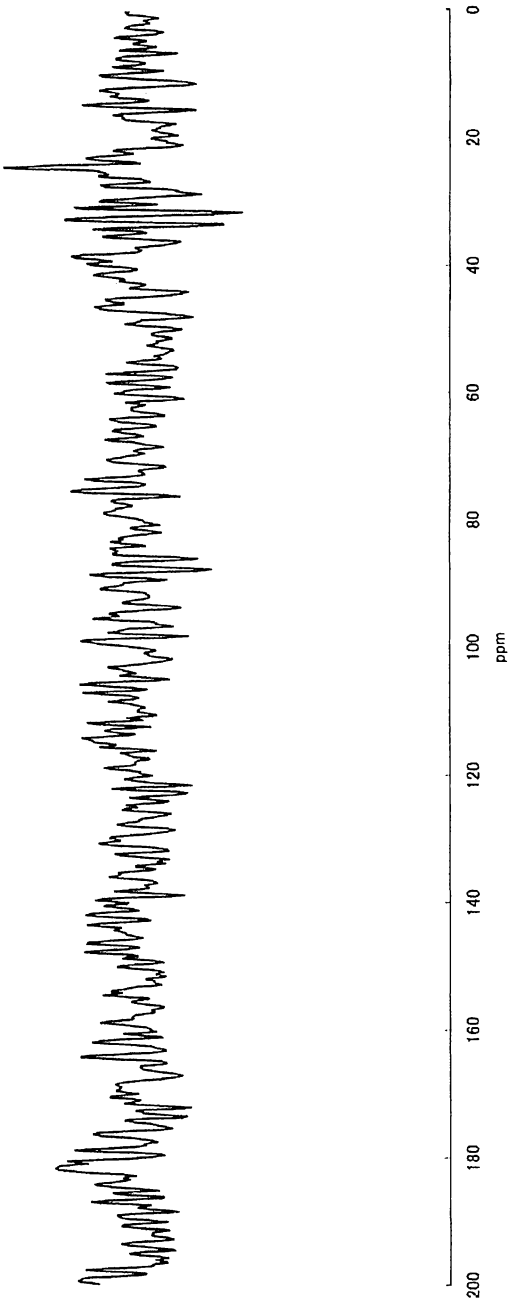
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S_0



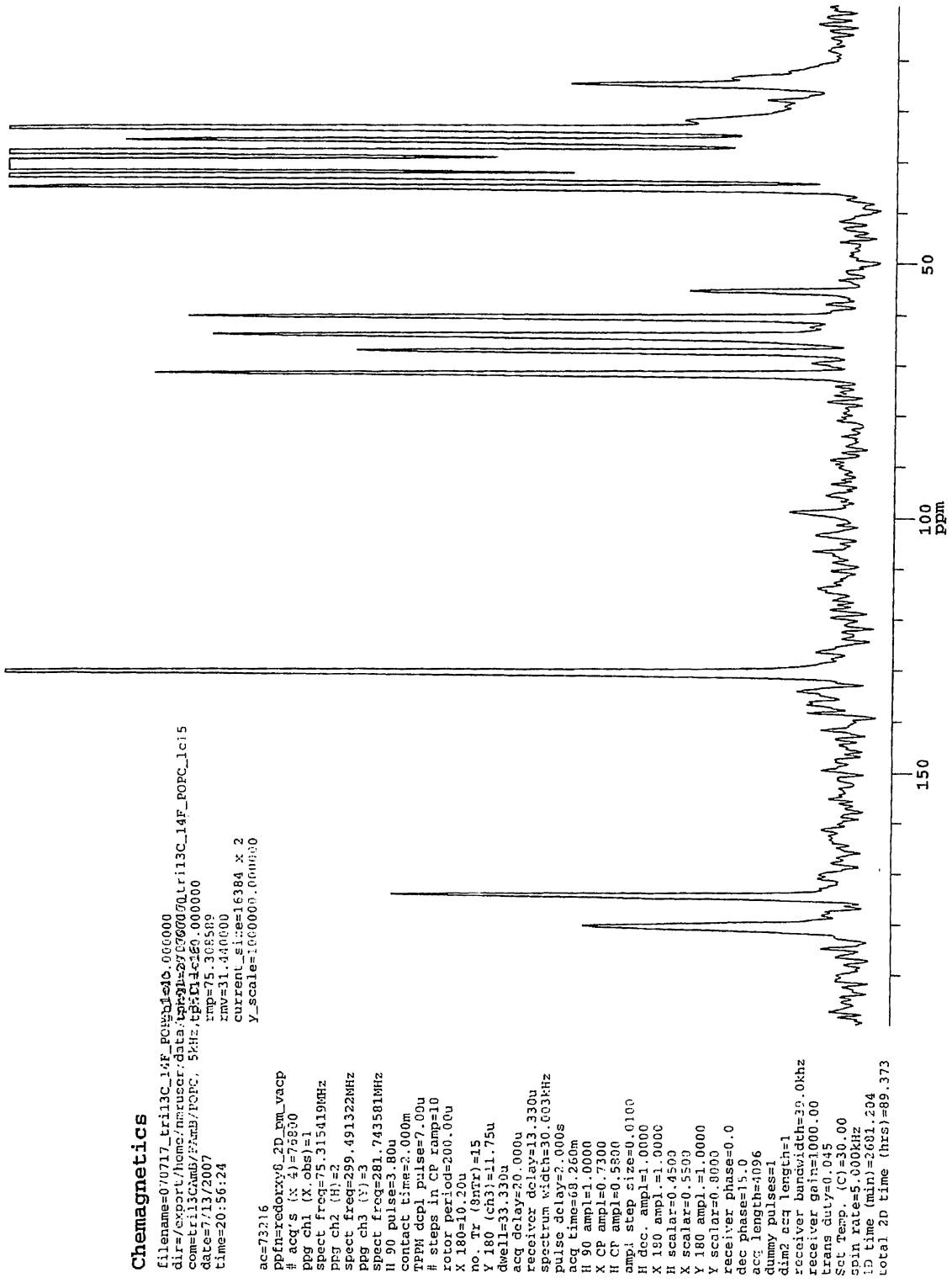
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S



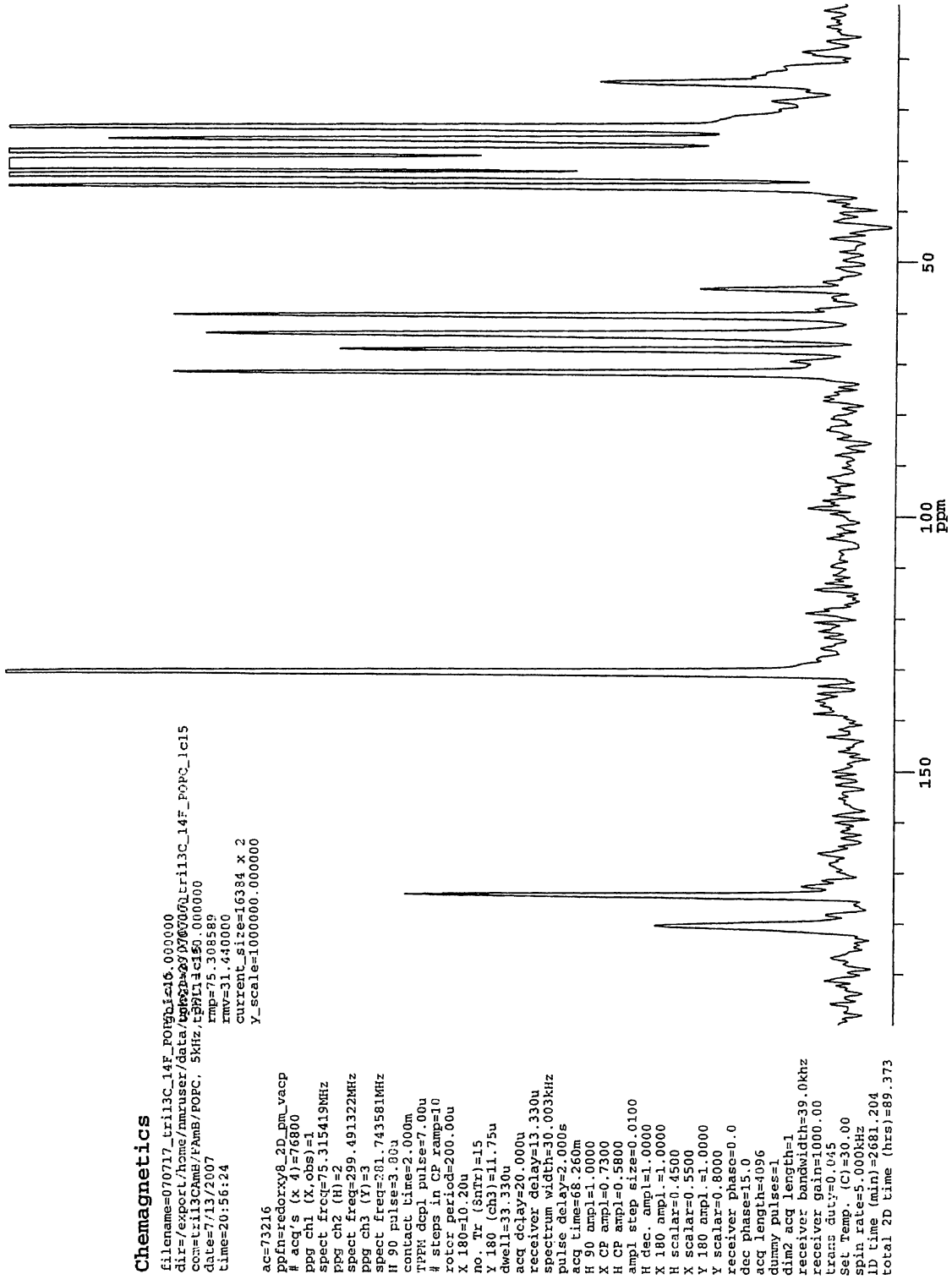
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



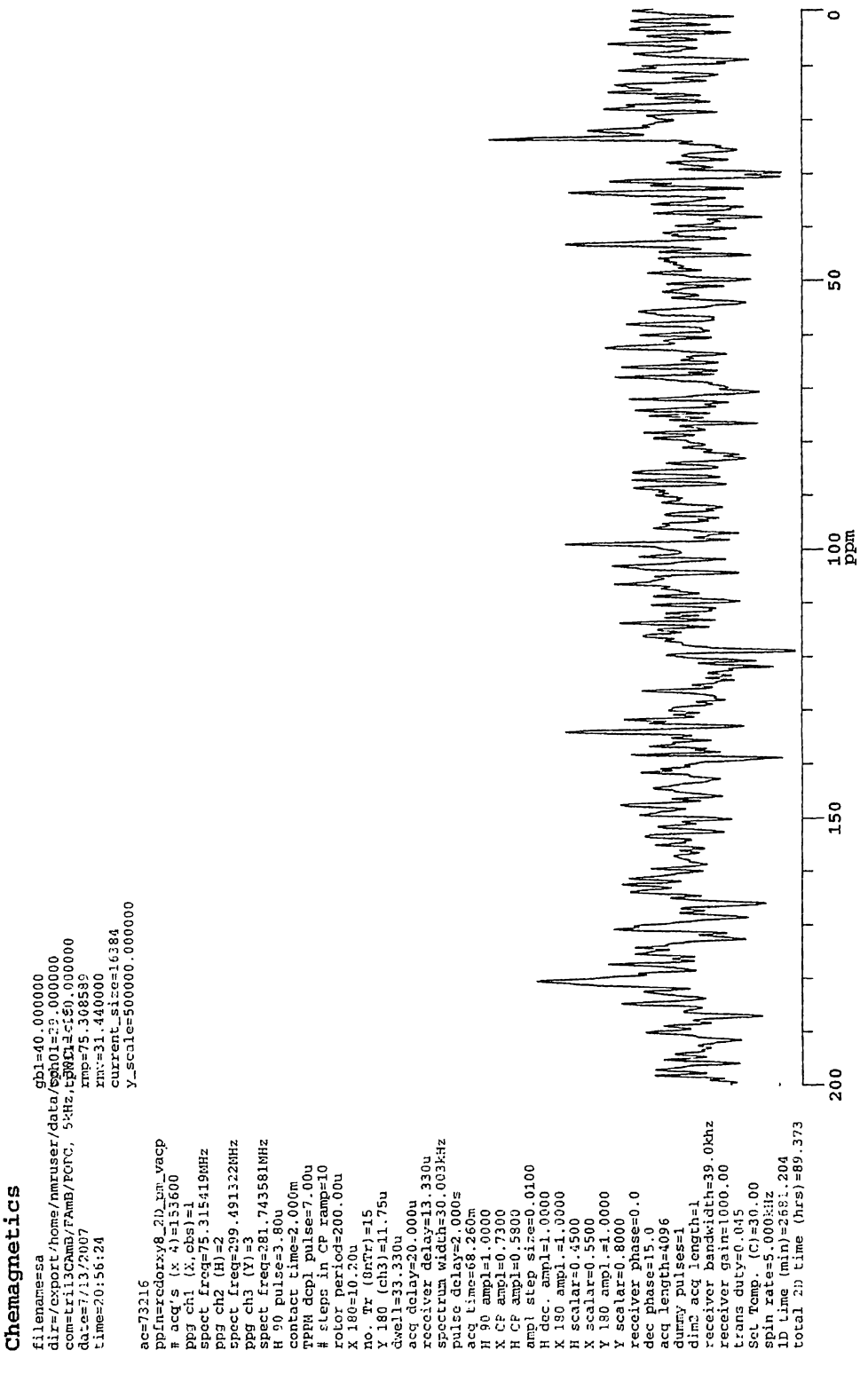
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
S_0



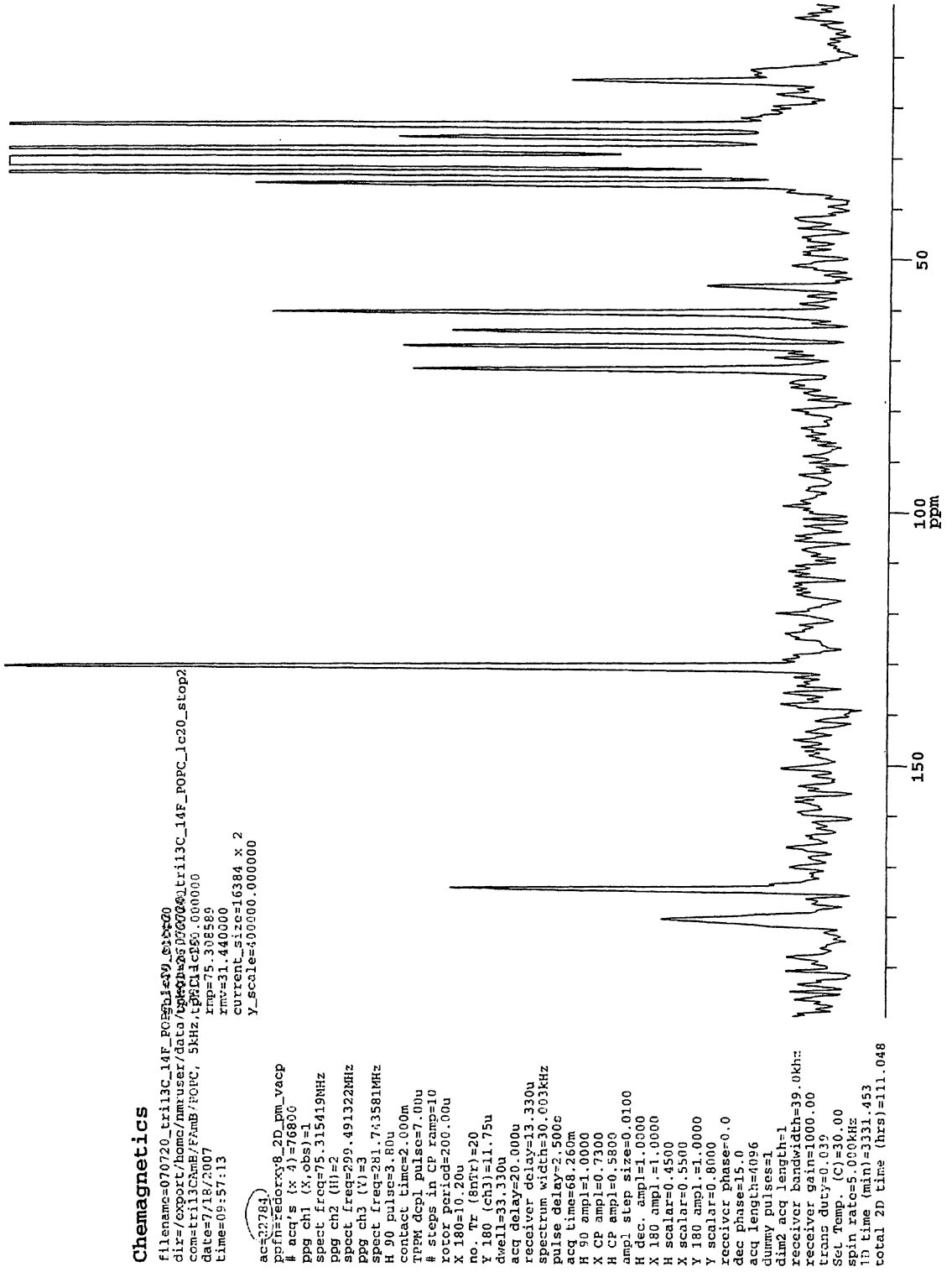
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
S



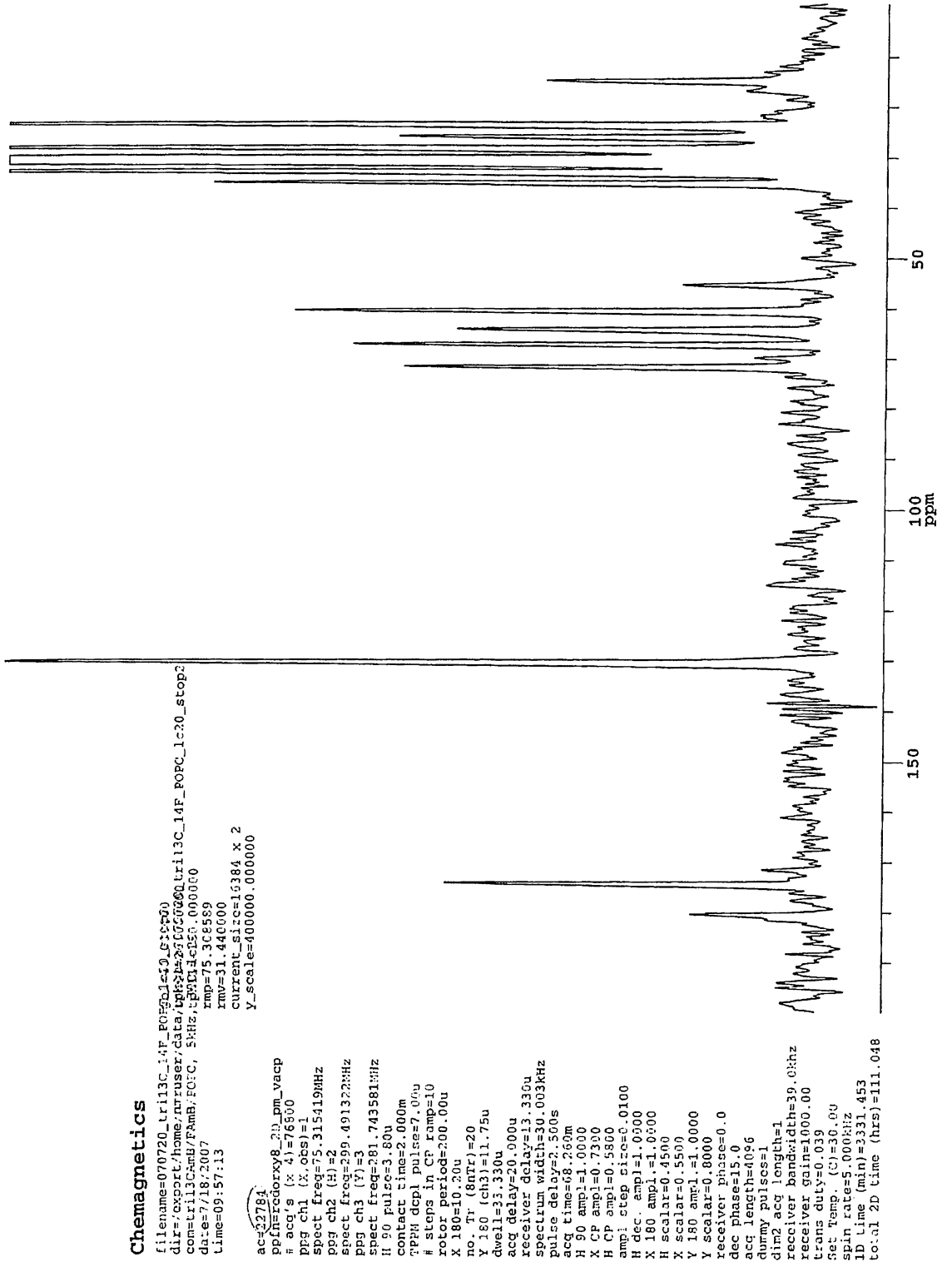
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



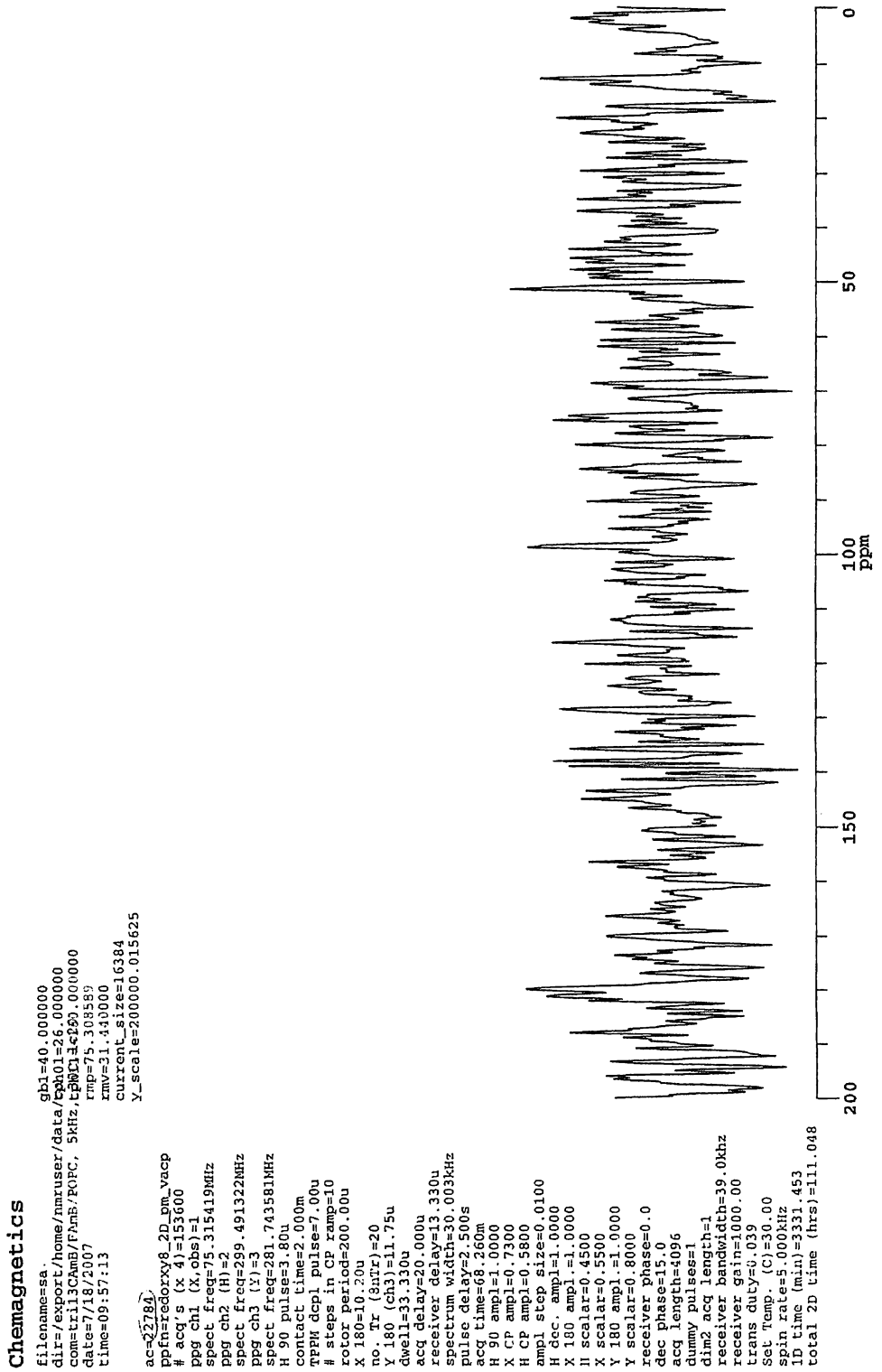
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
S_0



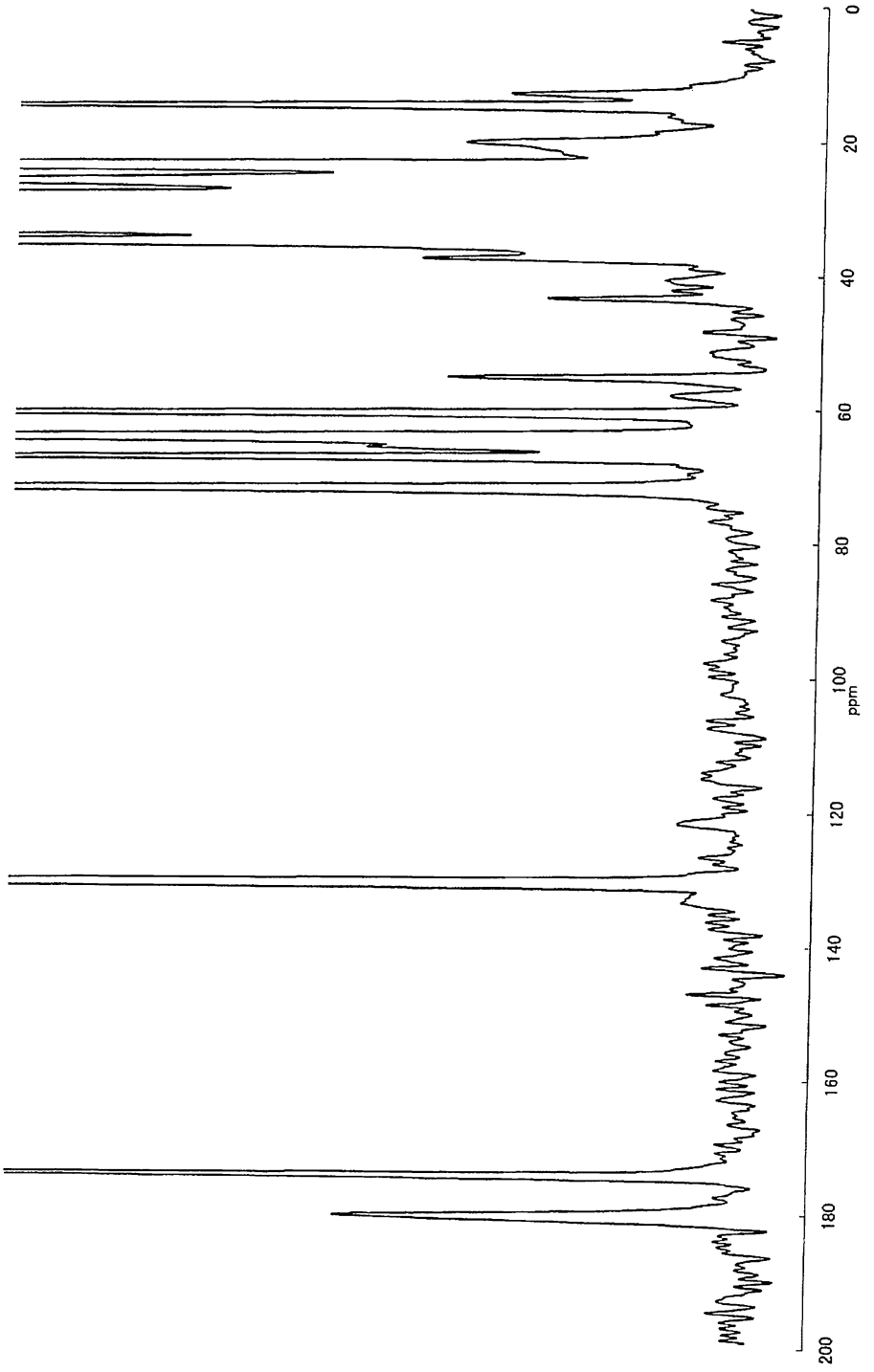
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
S



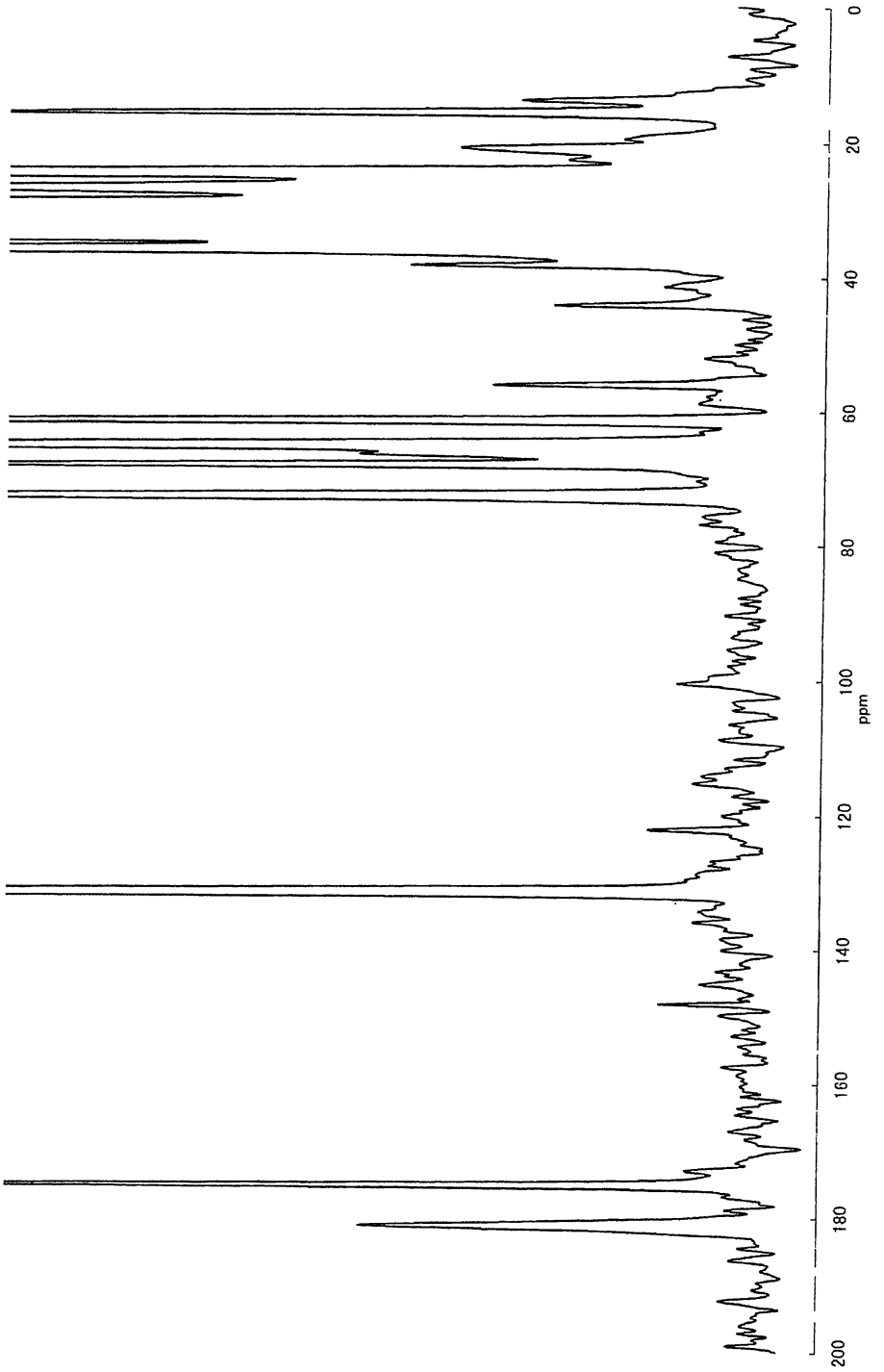
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



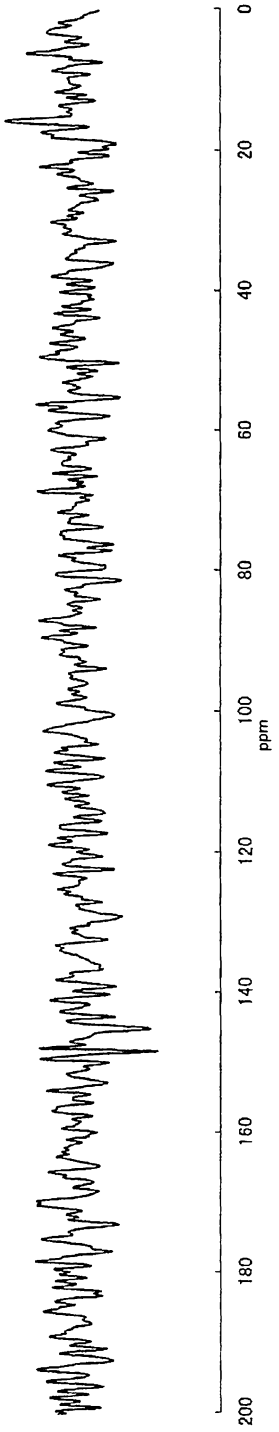
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
S_0



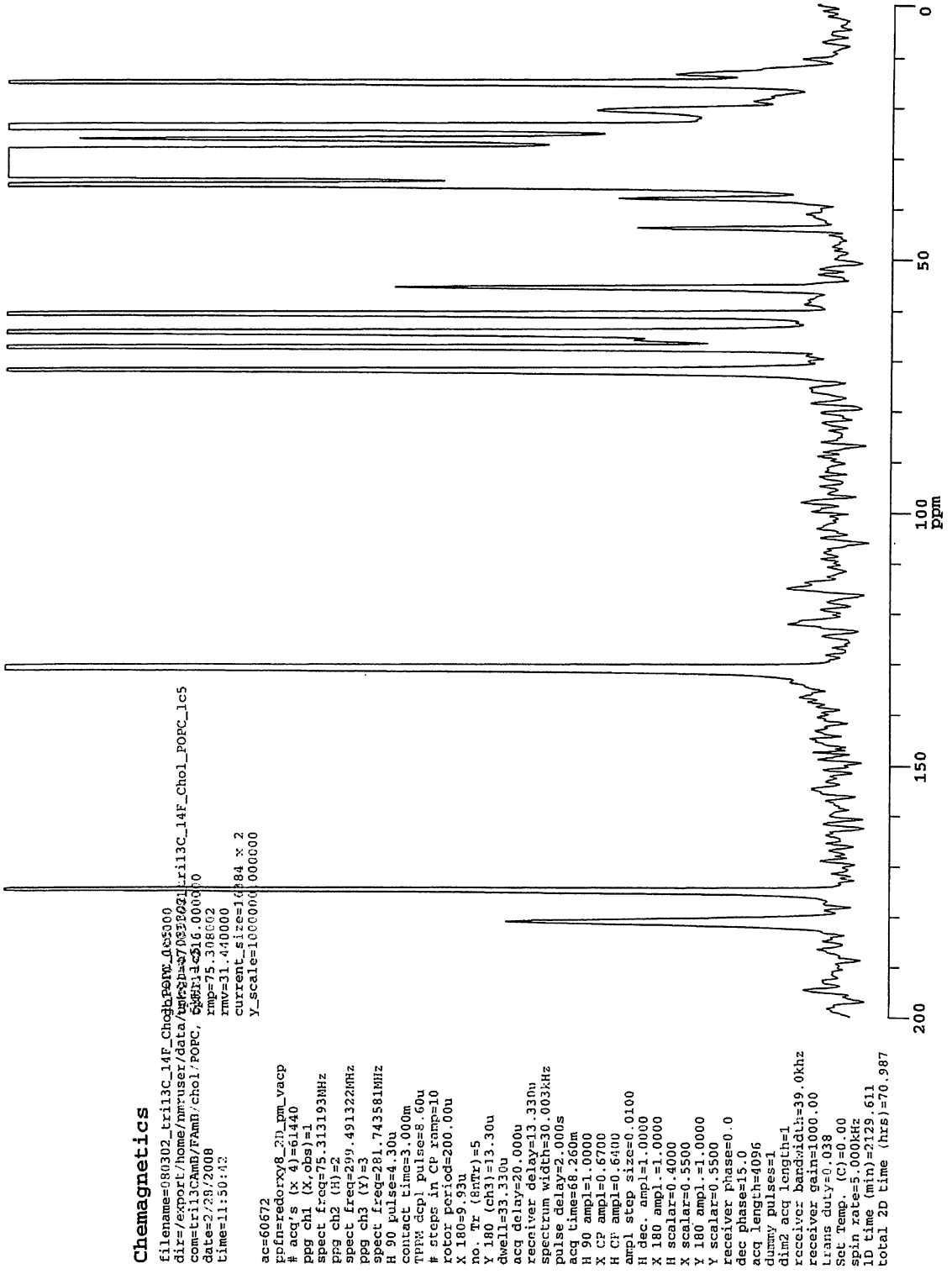
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
S



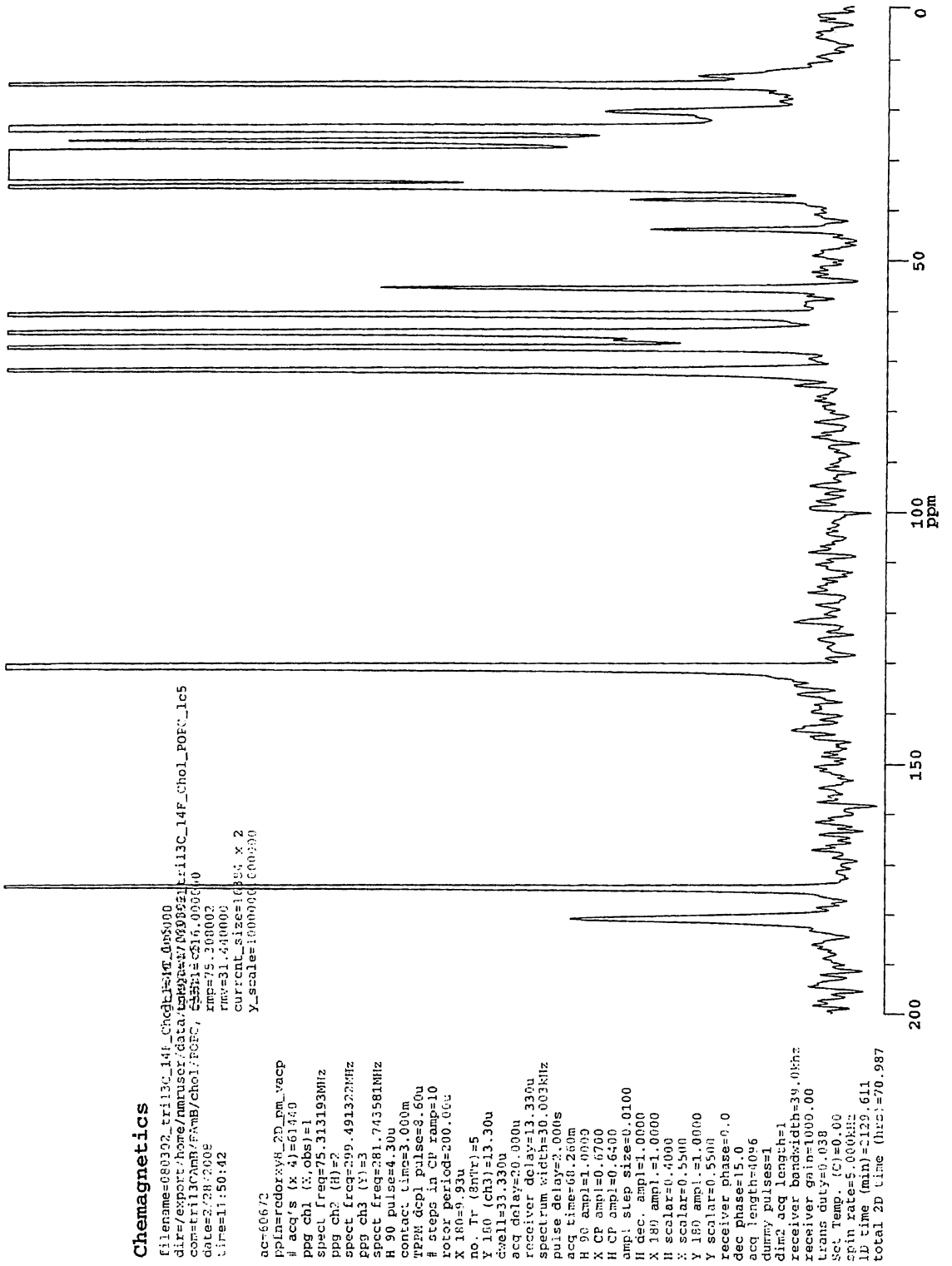
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



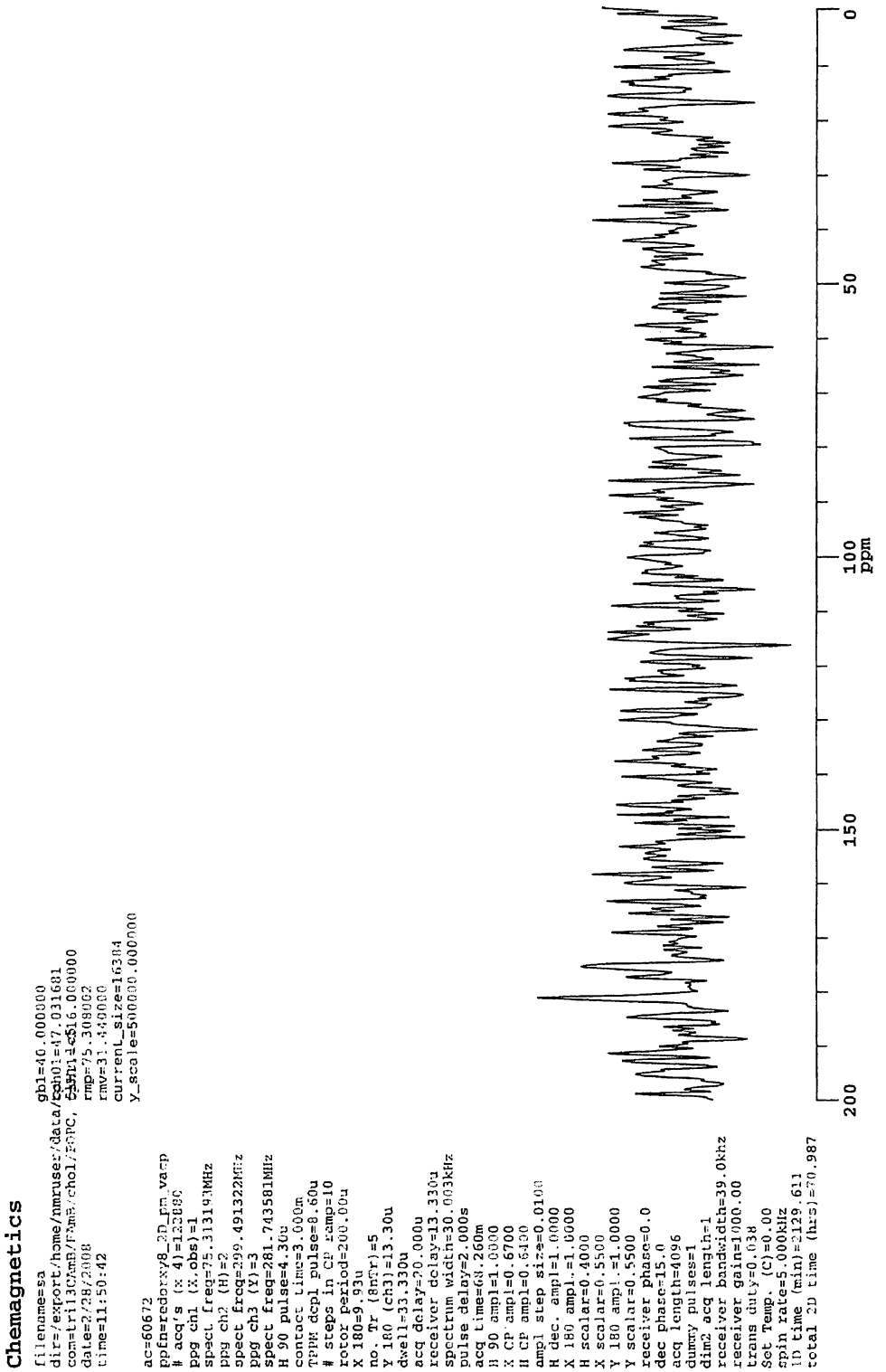
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
S_0



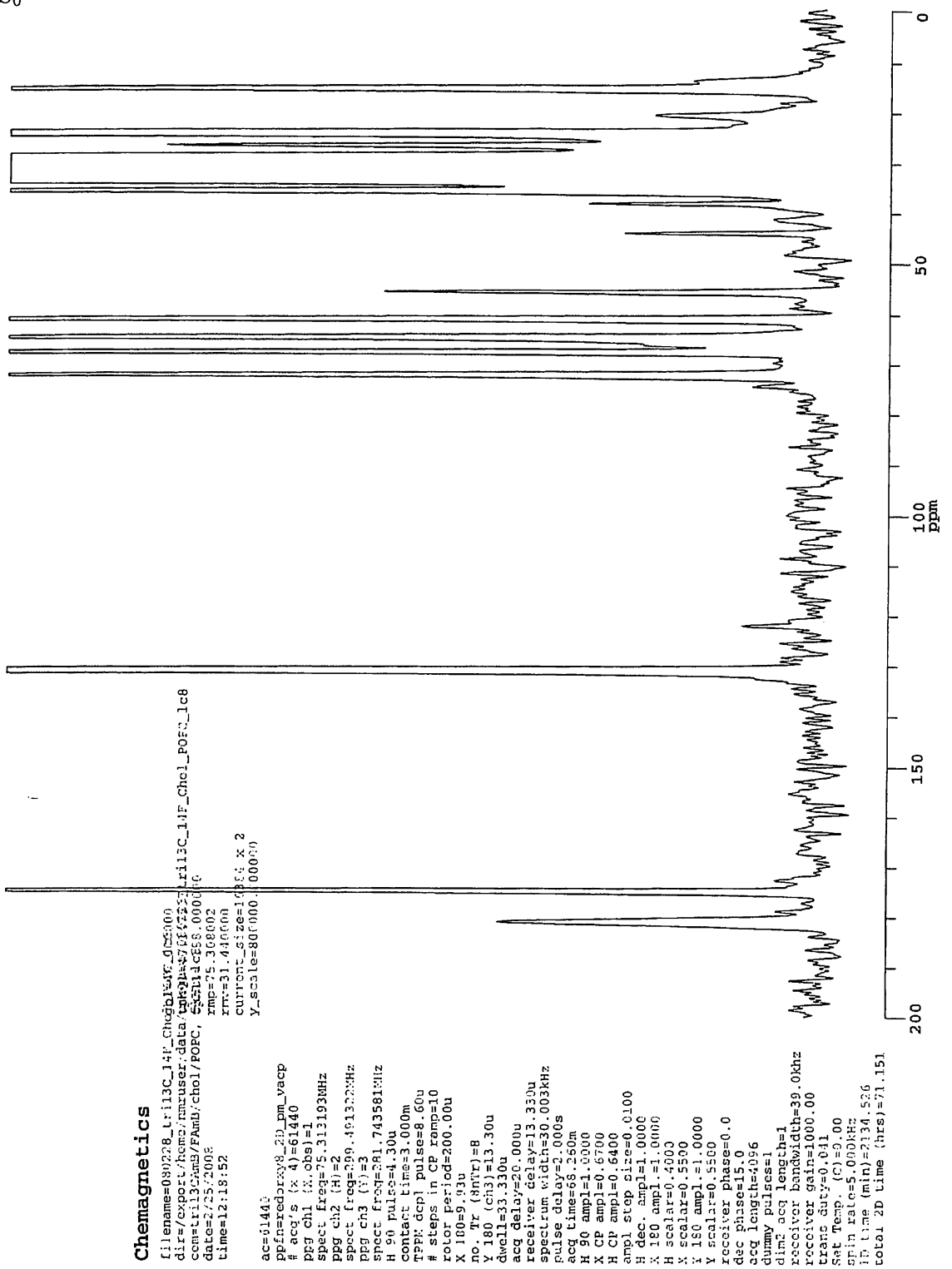
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
S



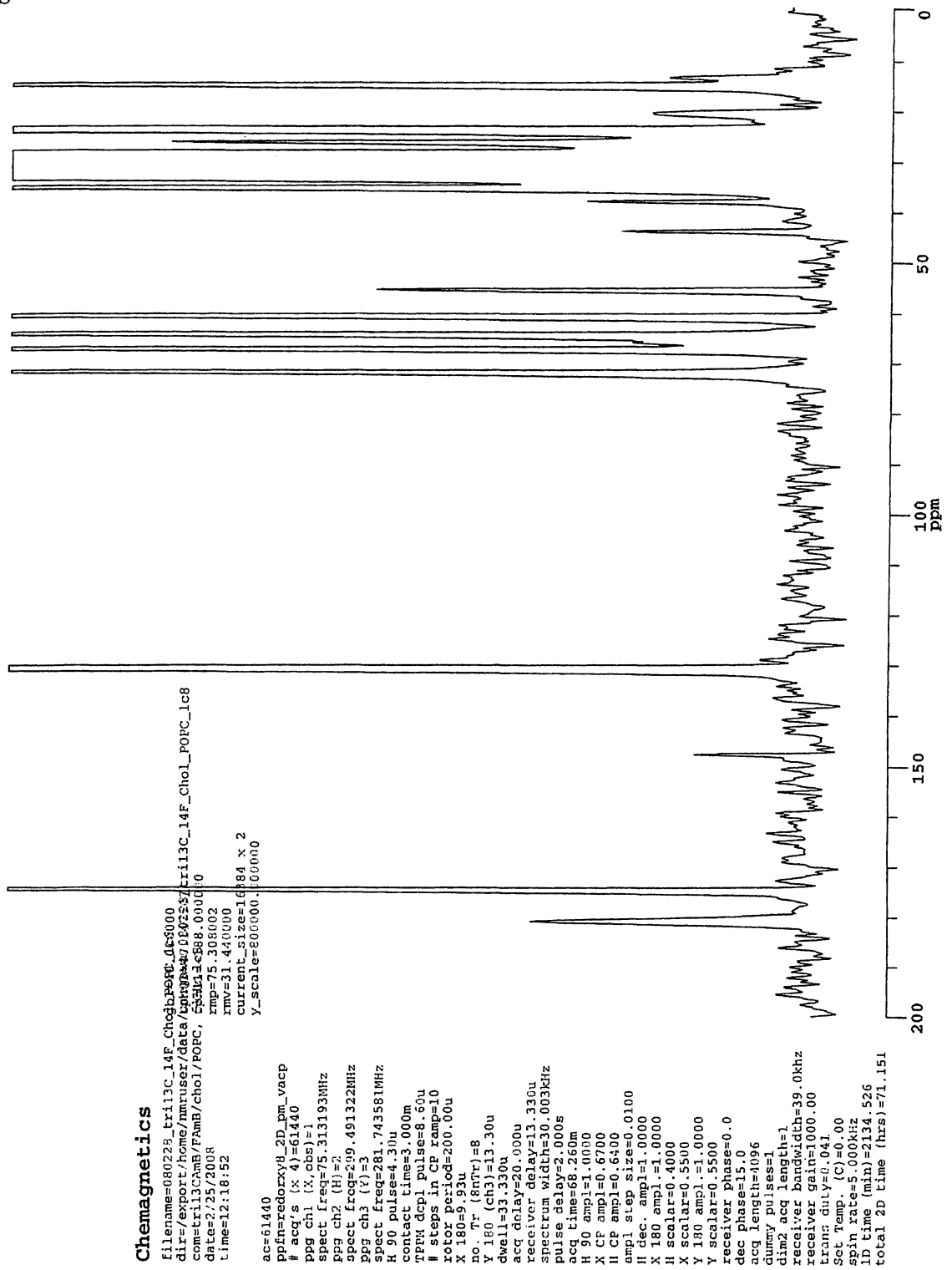
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



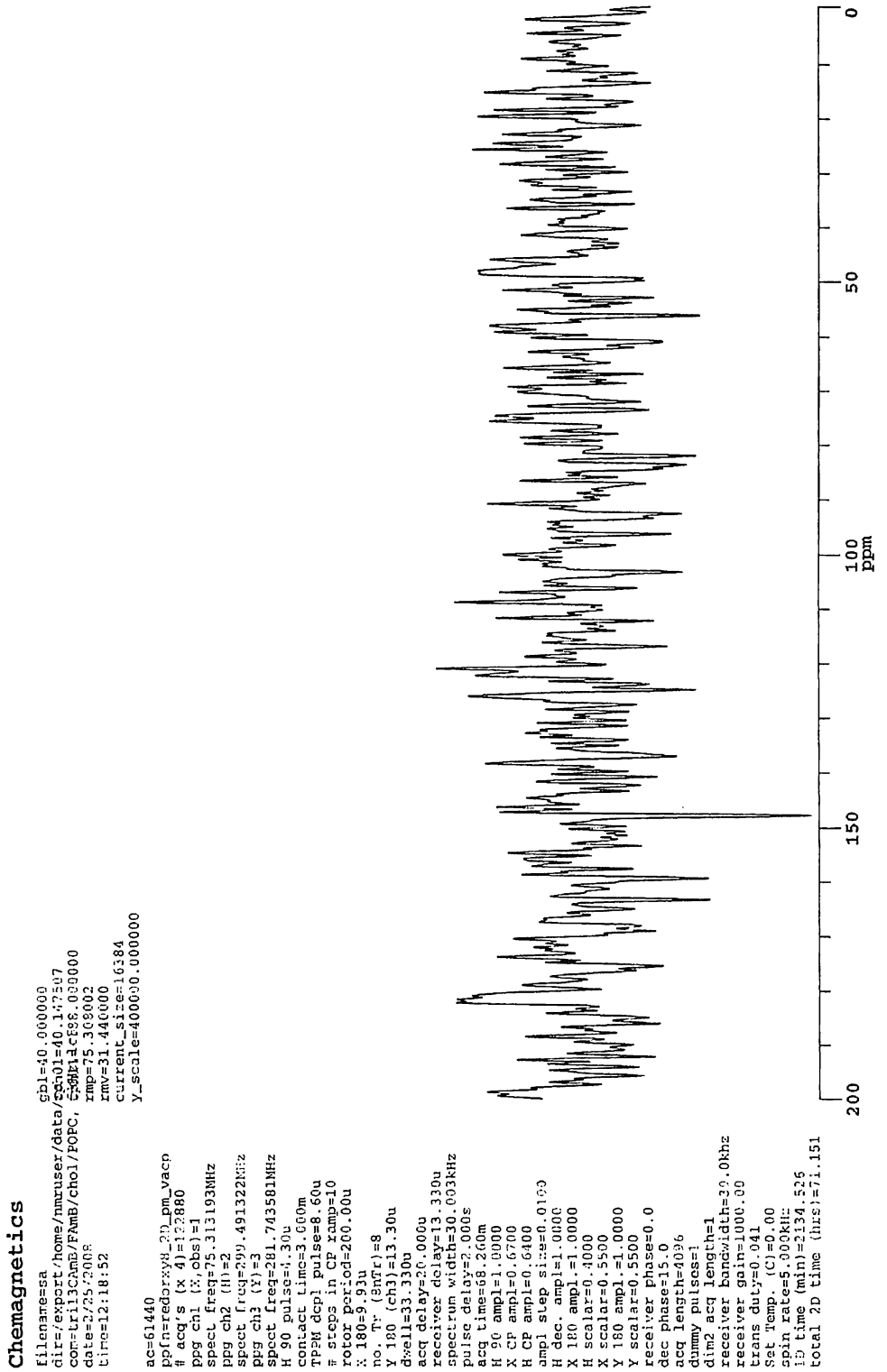
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
S_0



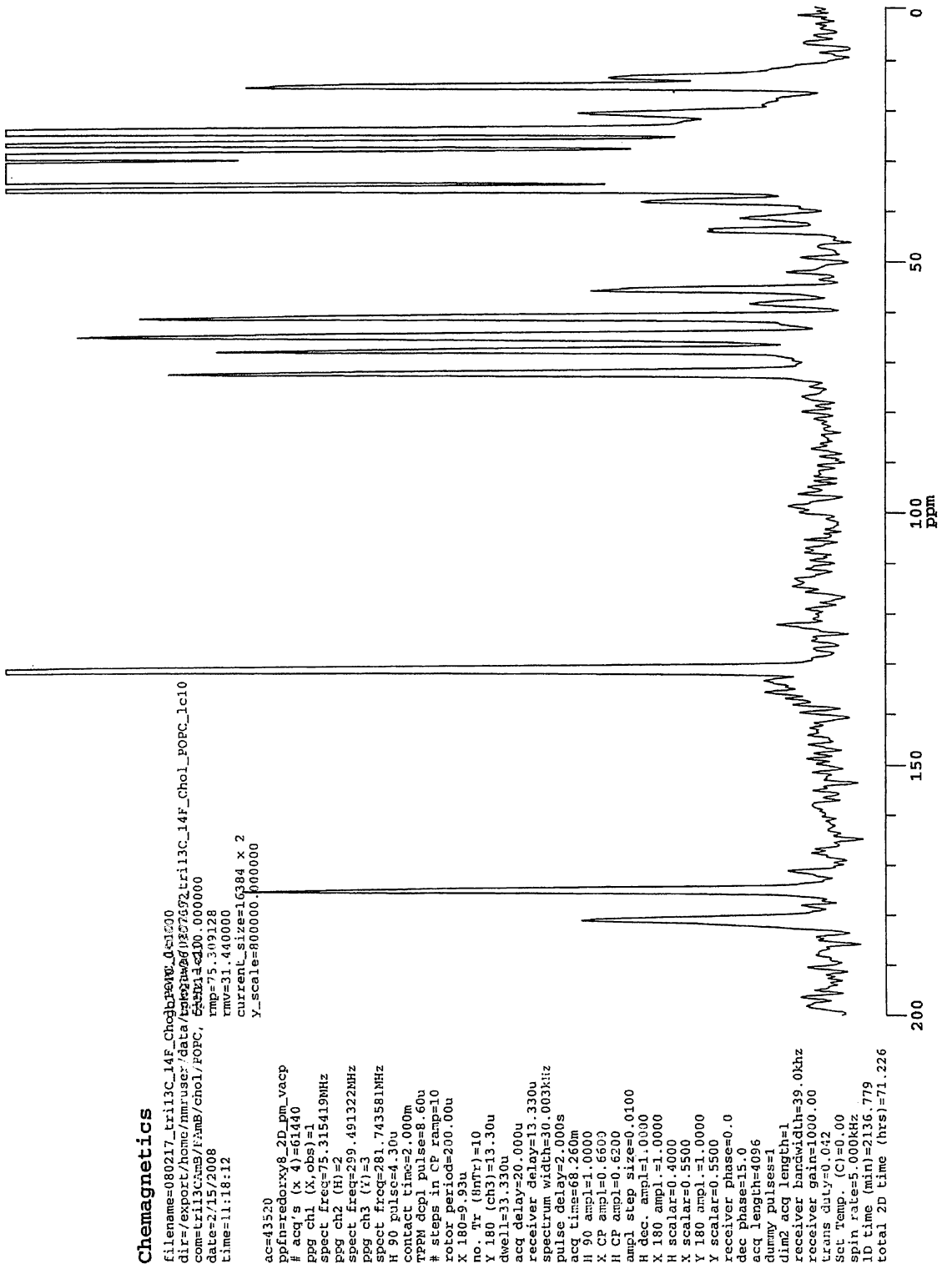
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
S



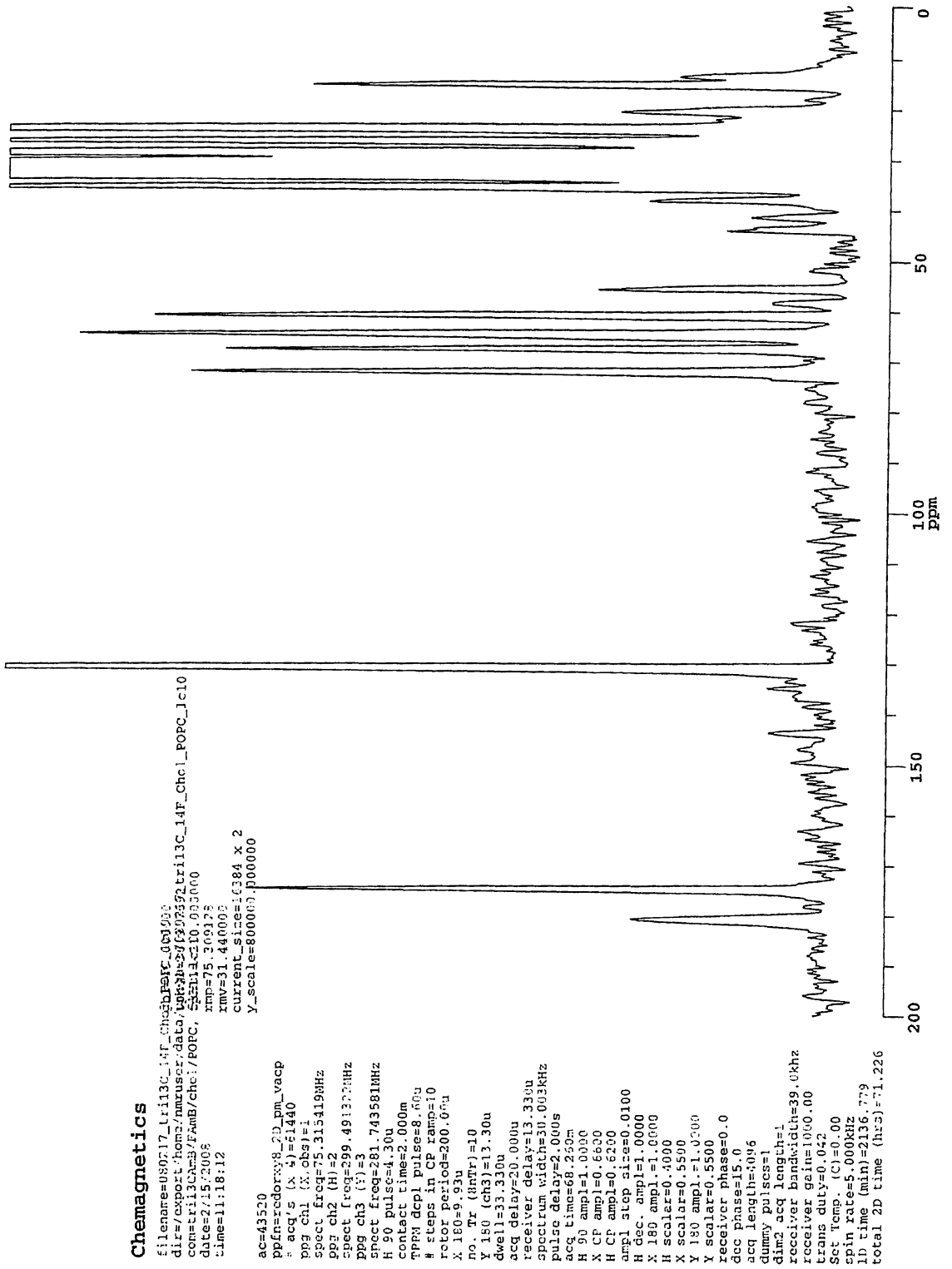
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



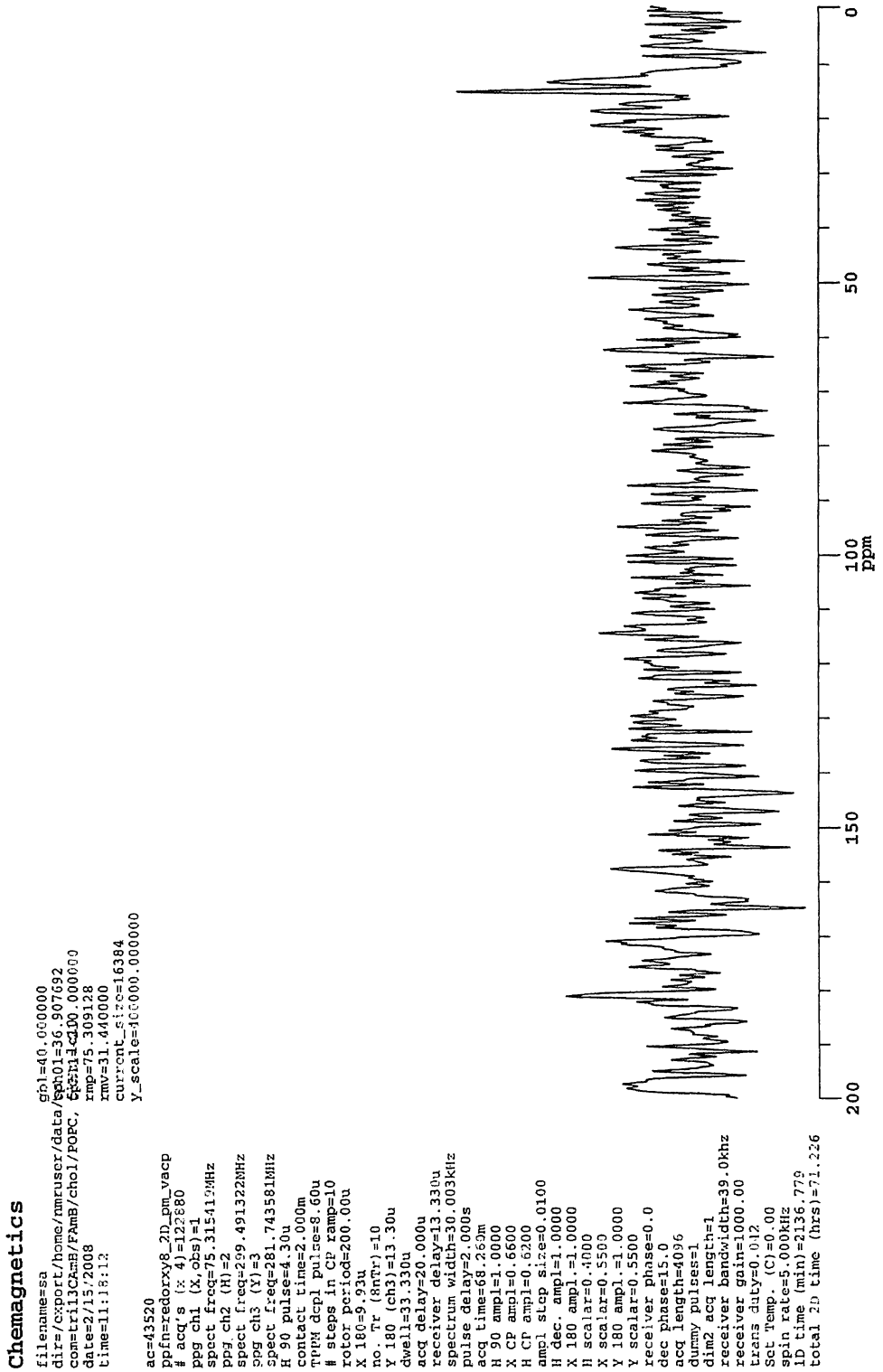
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S_0



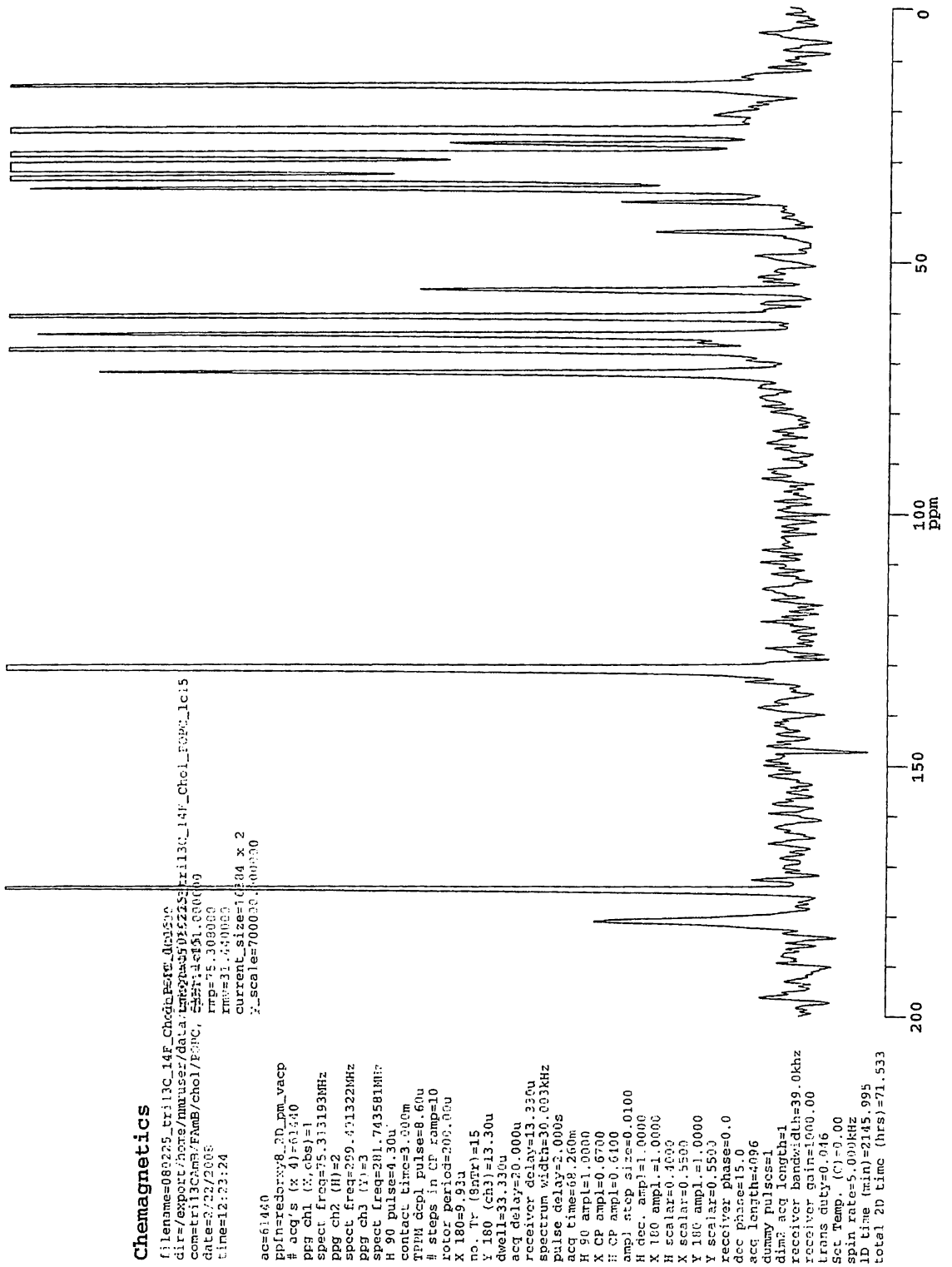
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S



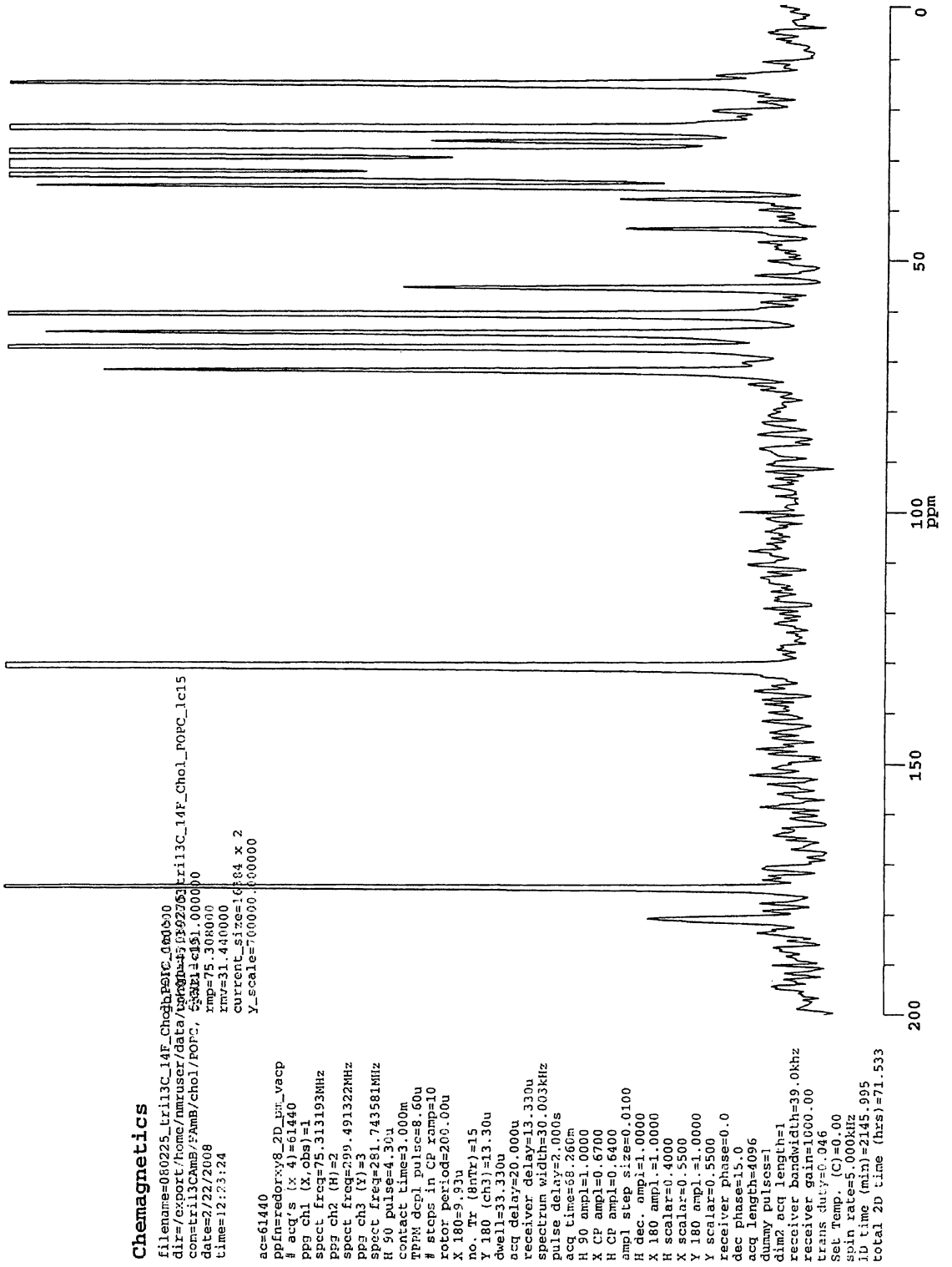
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



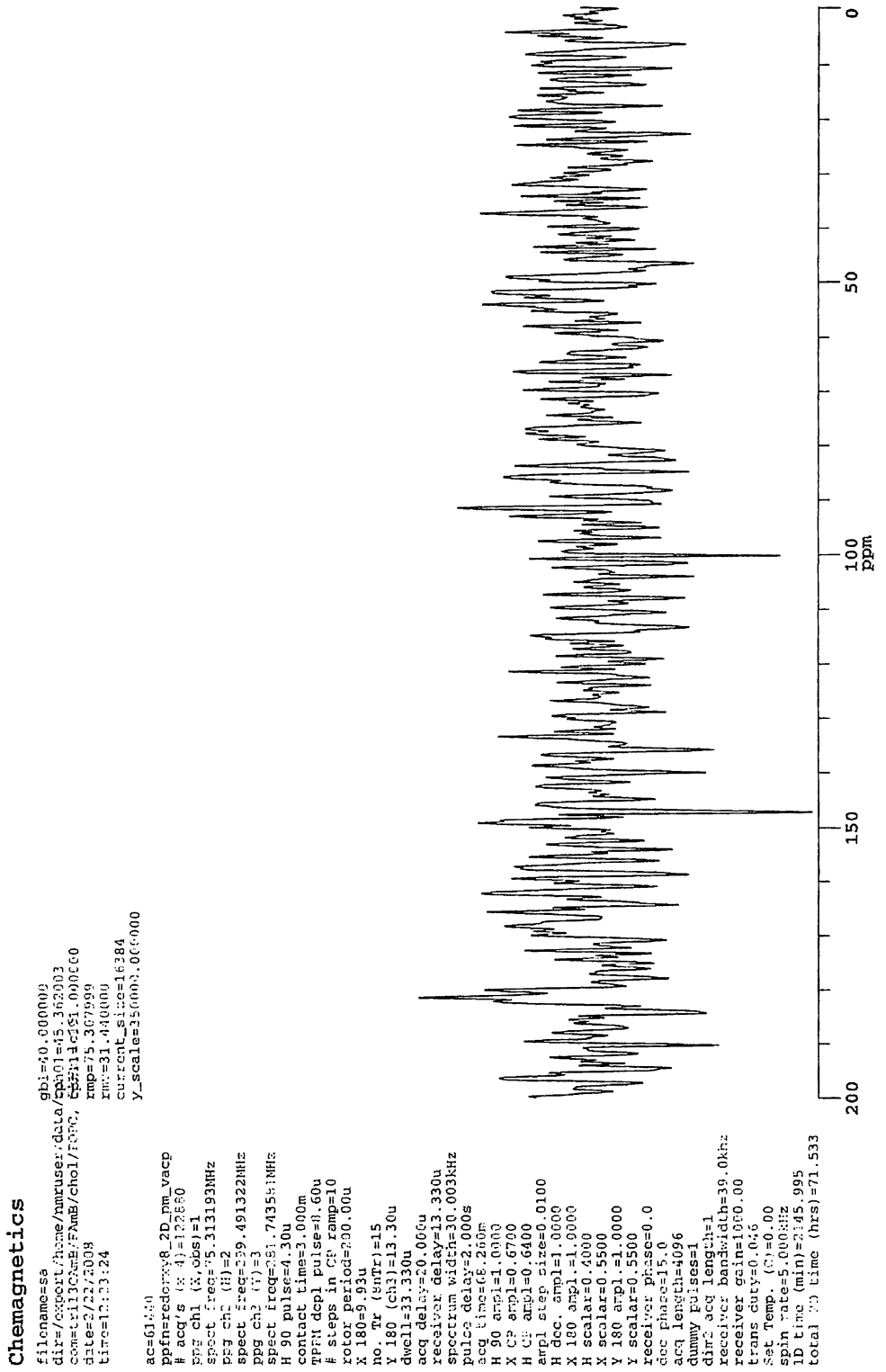
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
S_0



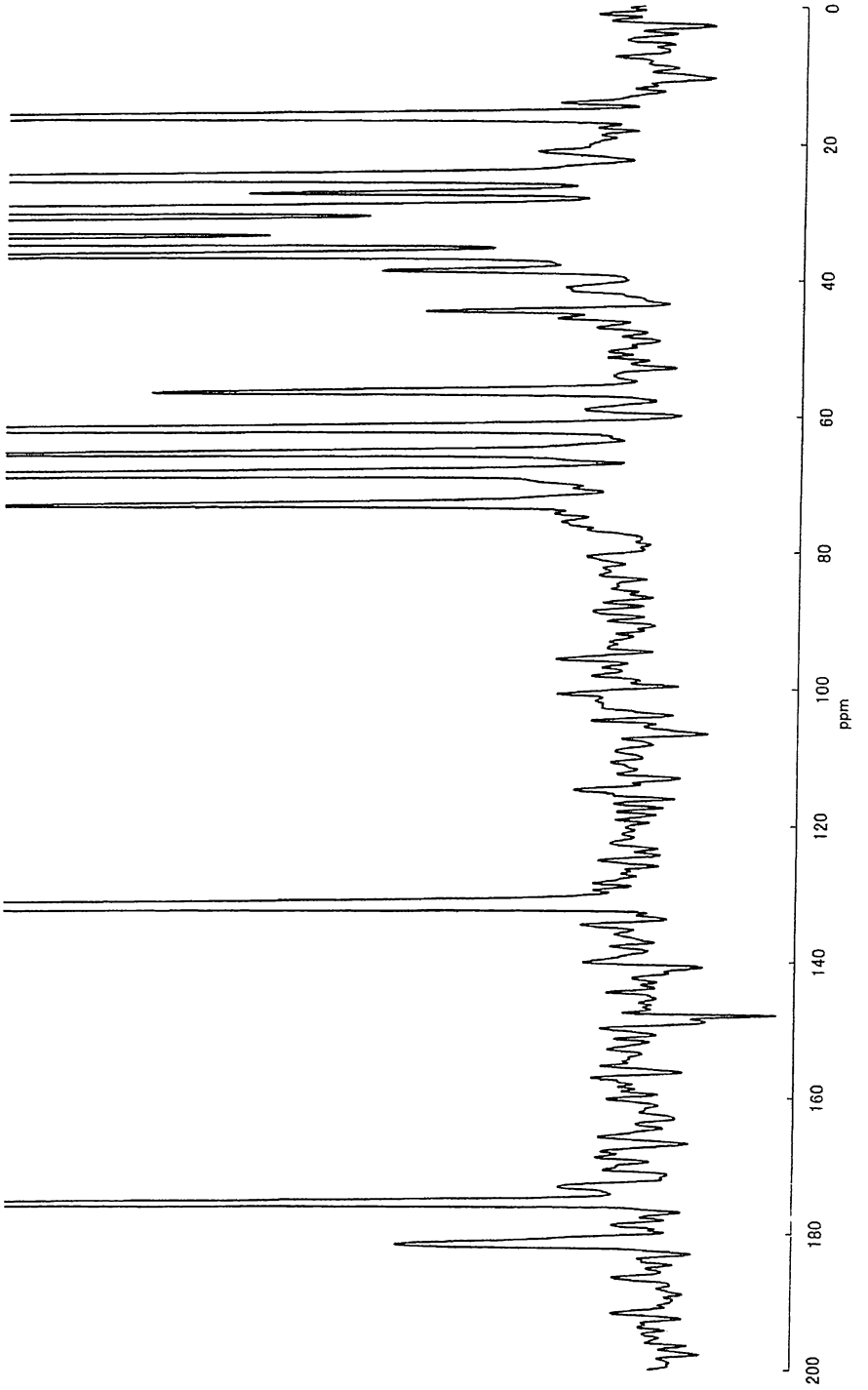
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
S



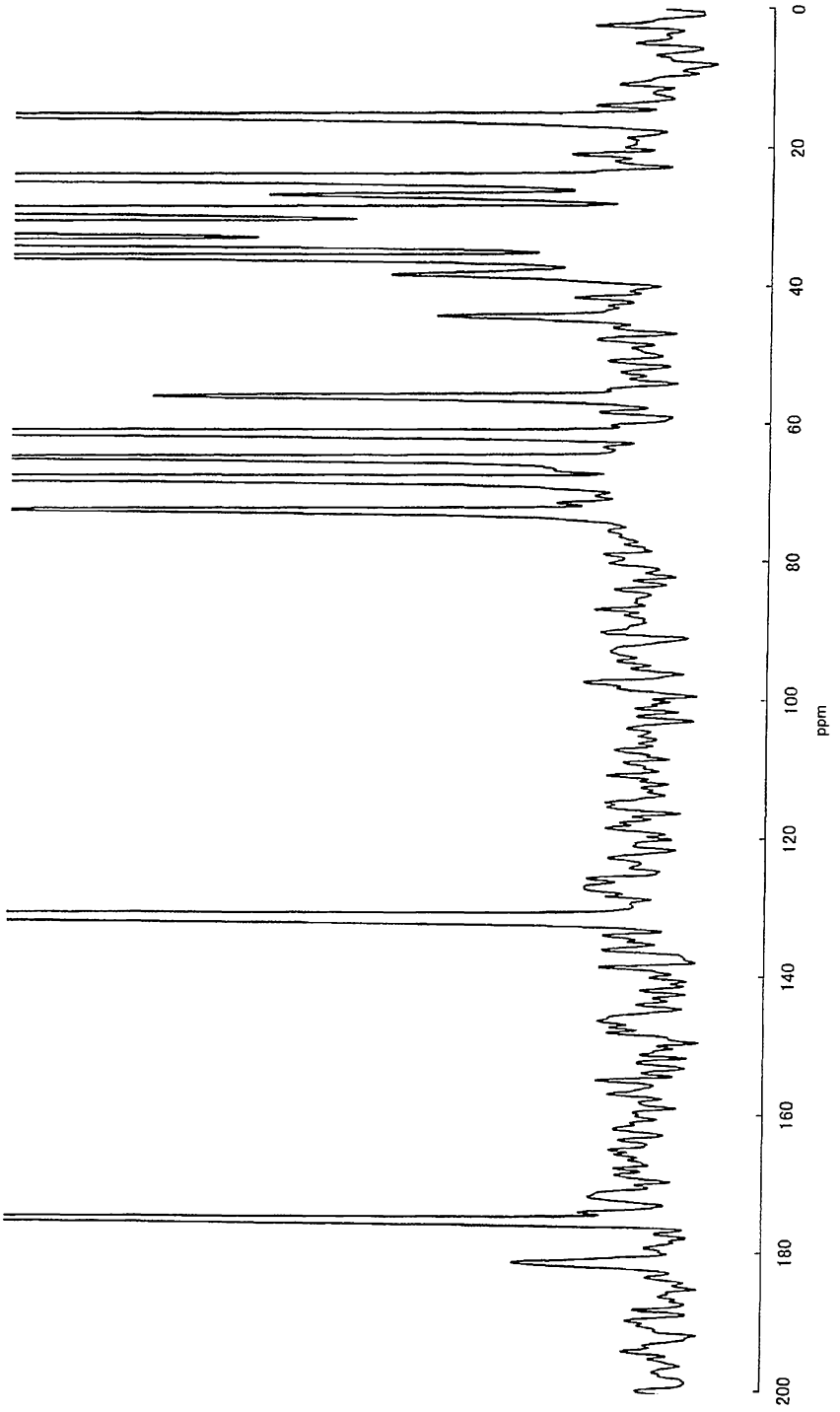
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



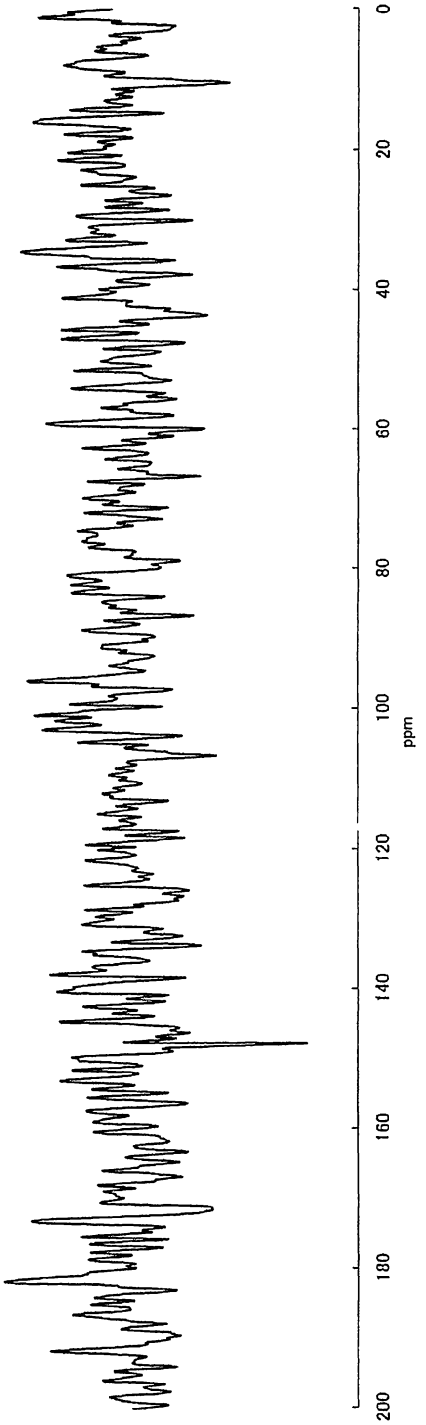
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
S_0



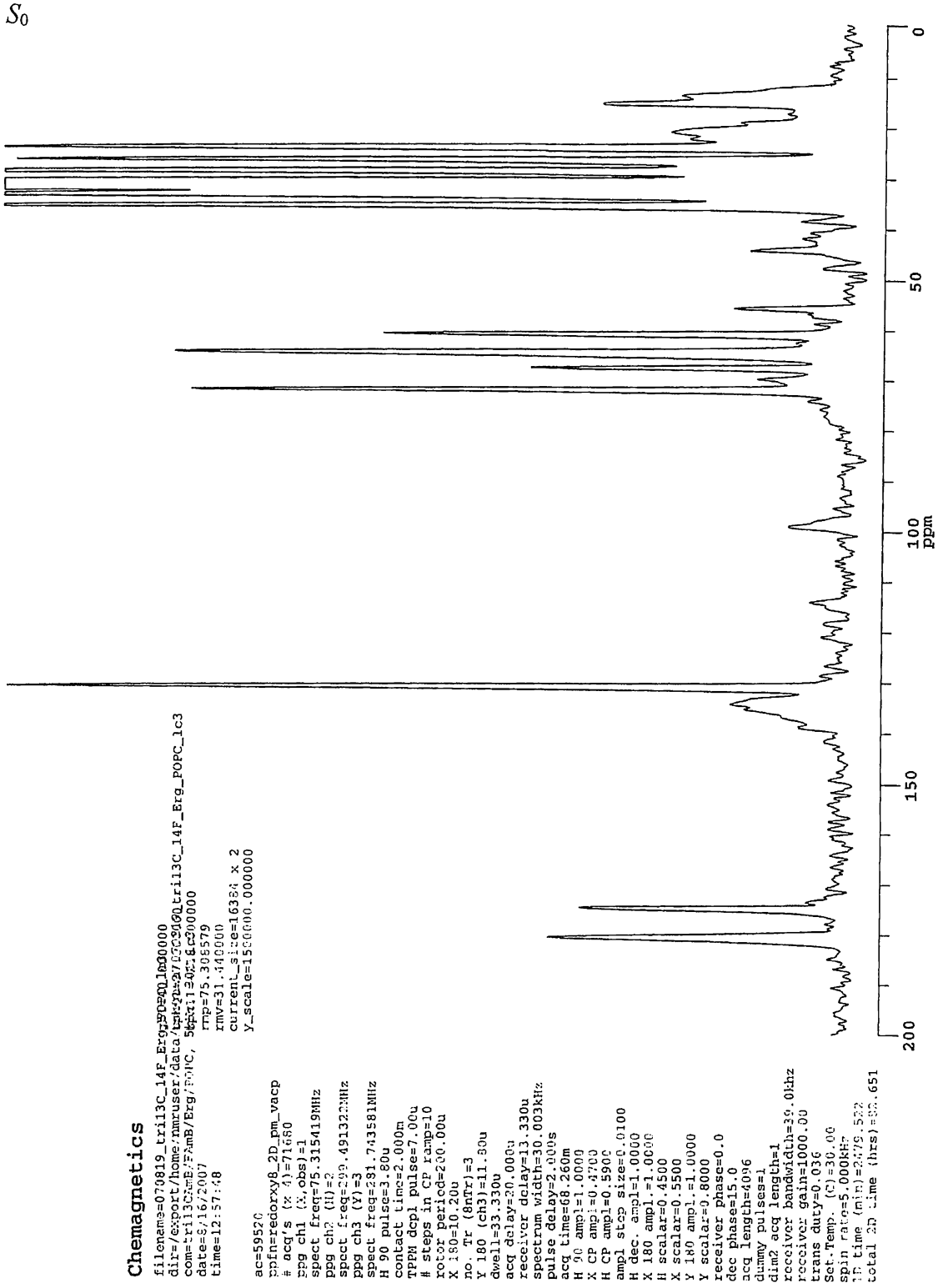
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
S



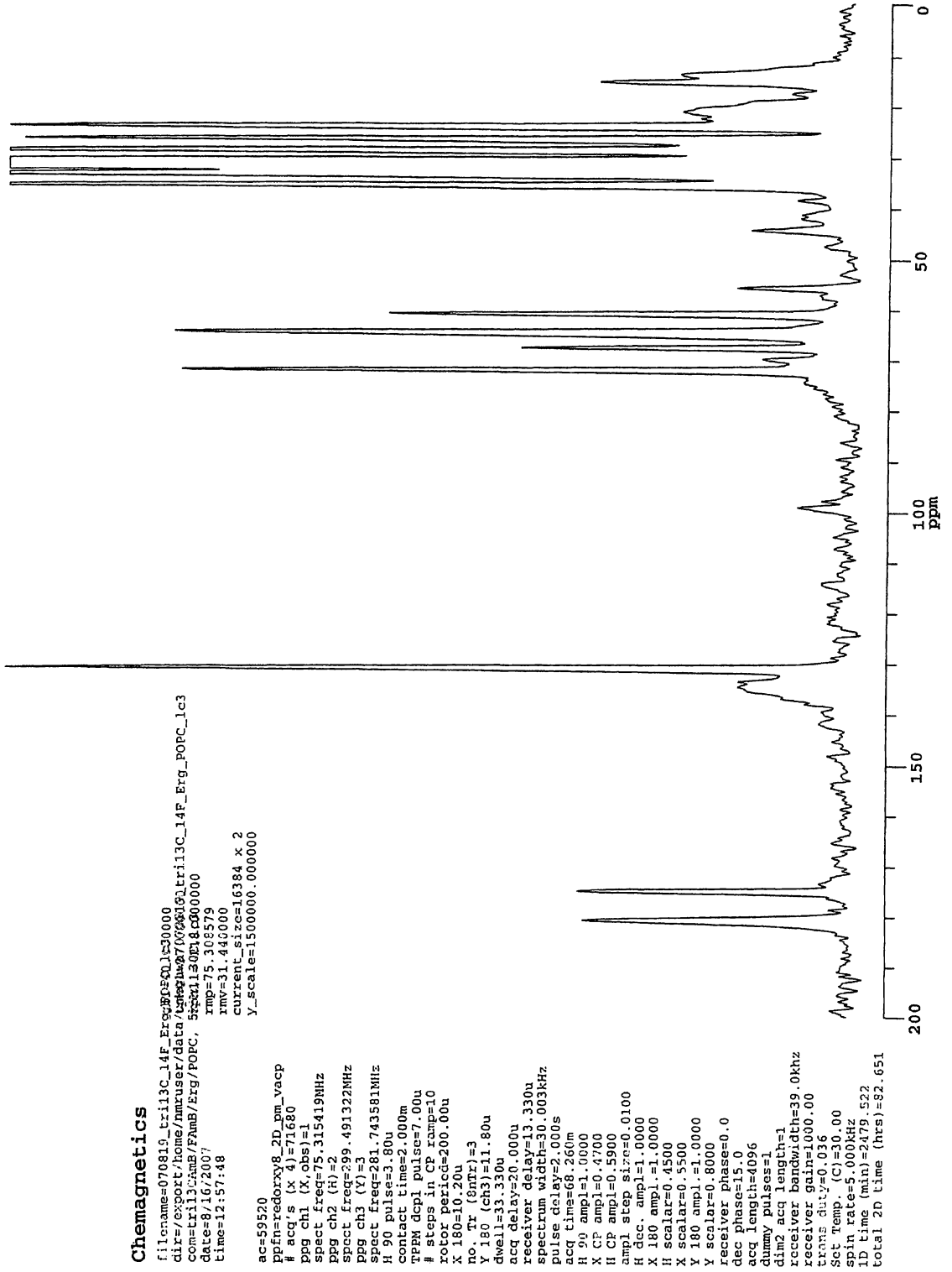
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/cholesterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



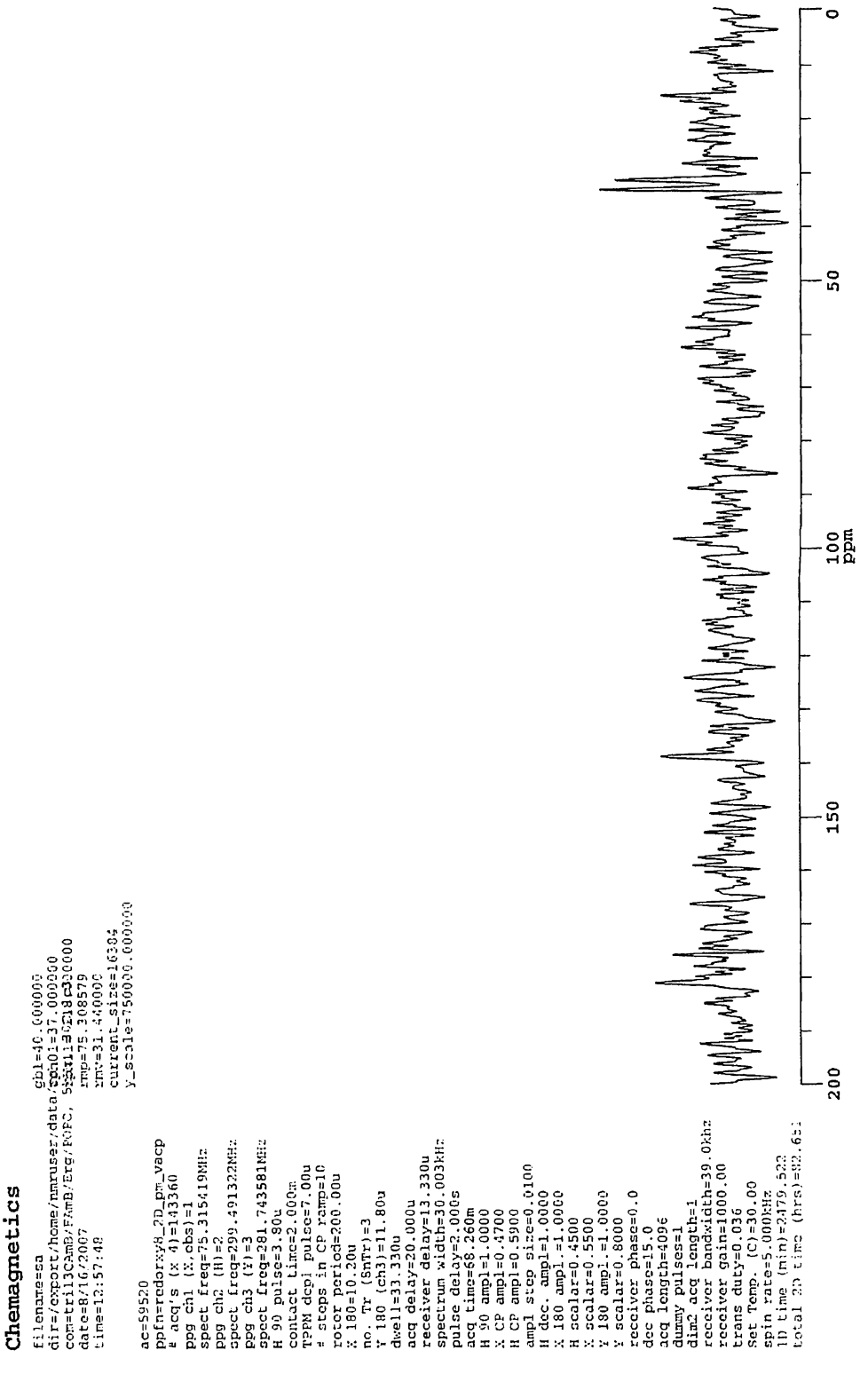
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
S_0



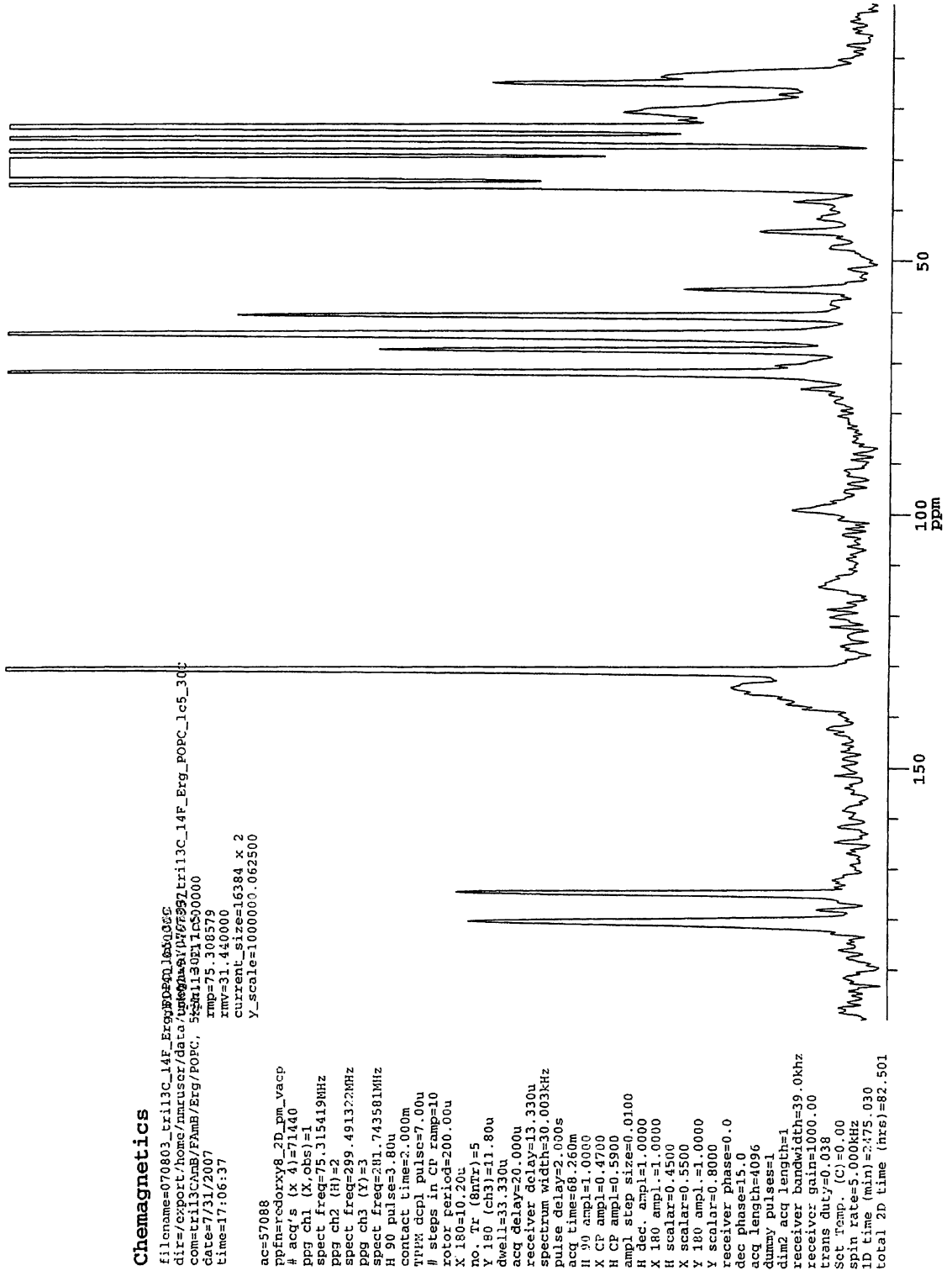
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
S



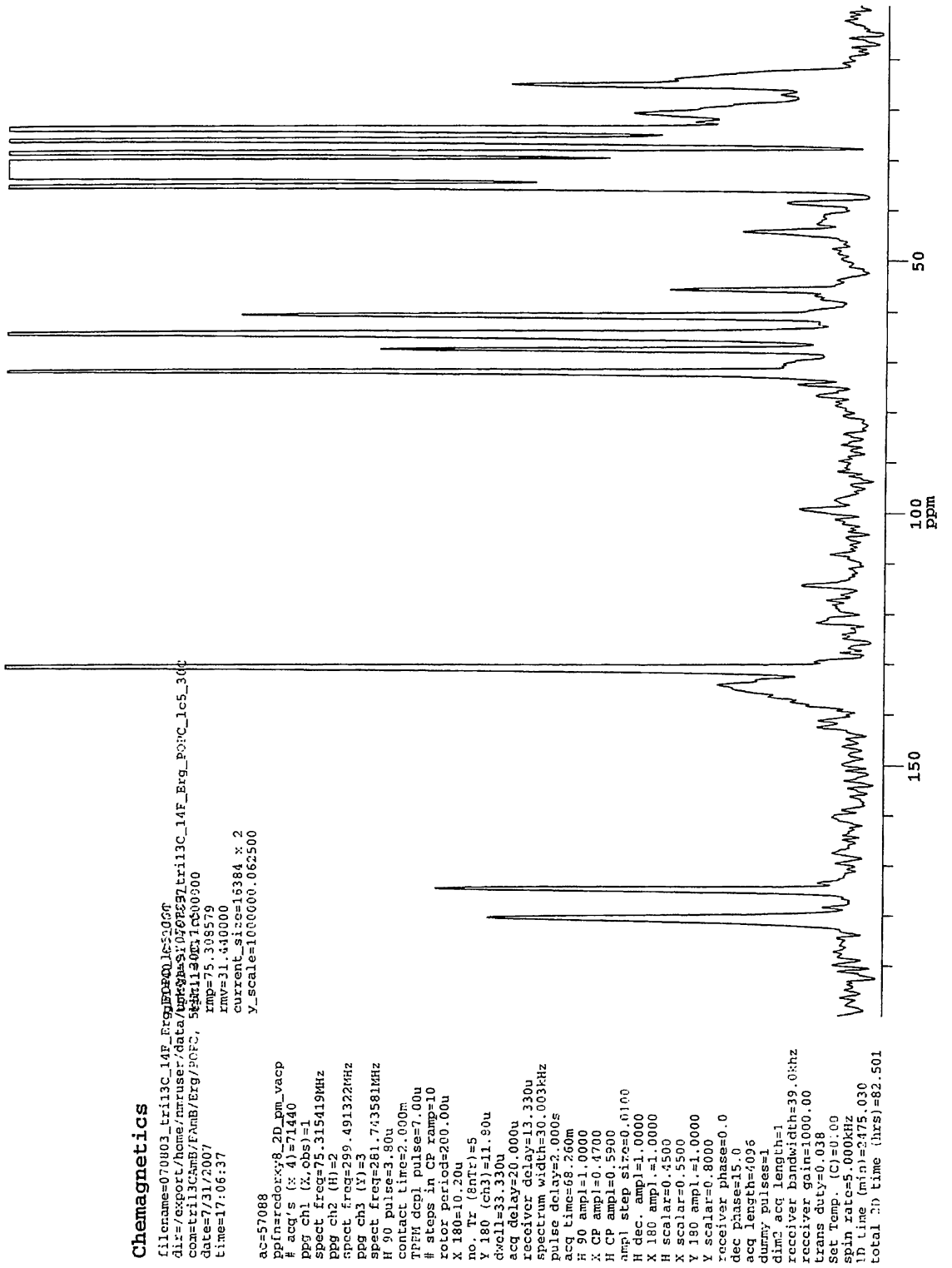
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



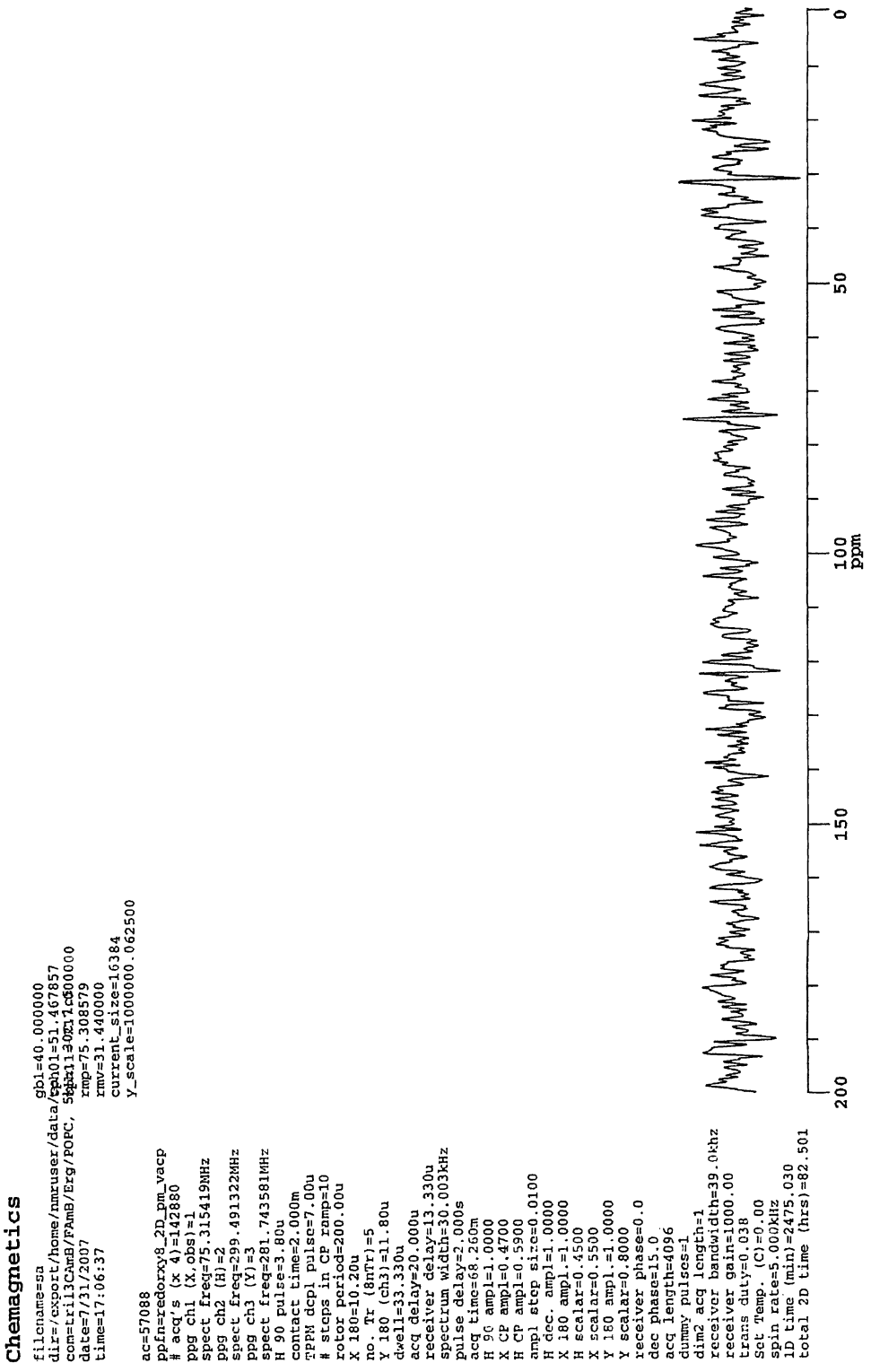
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
S_0



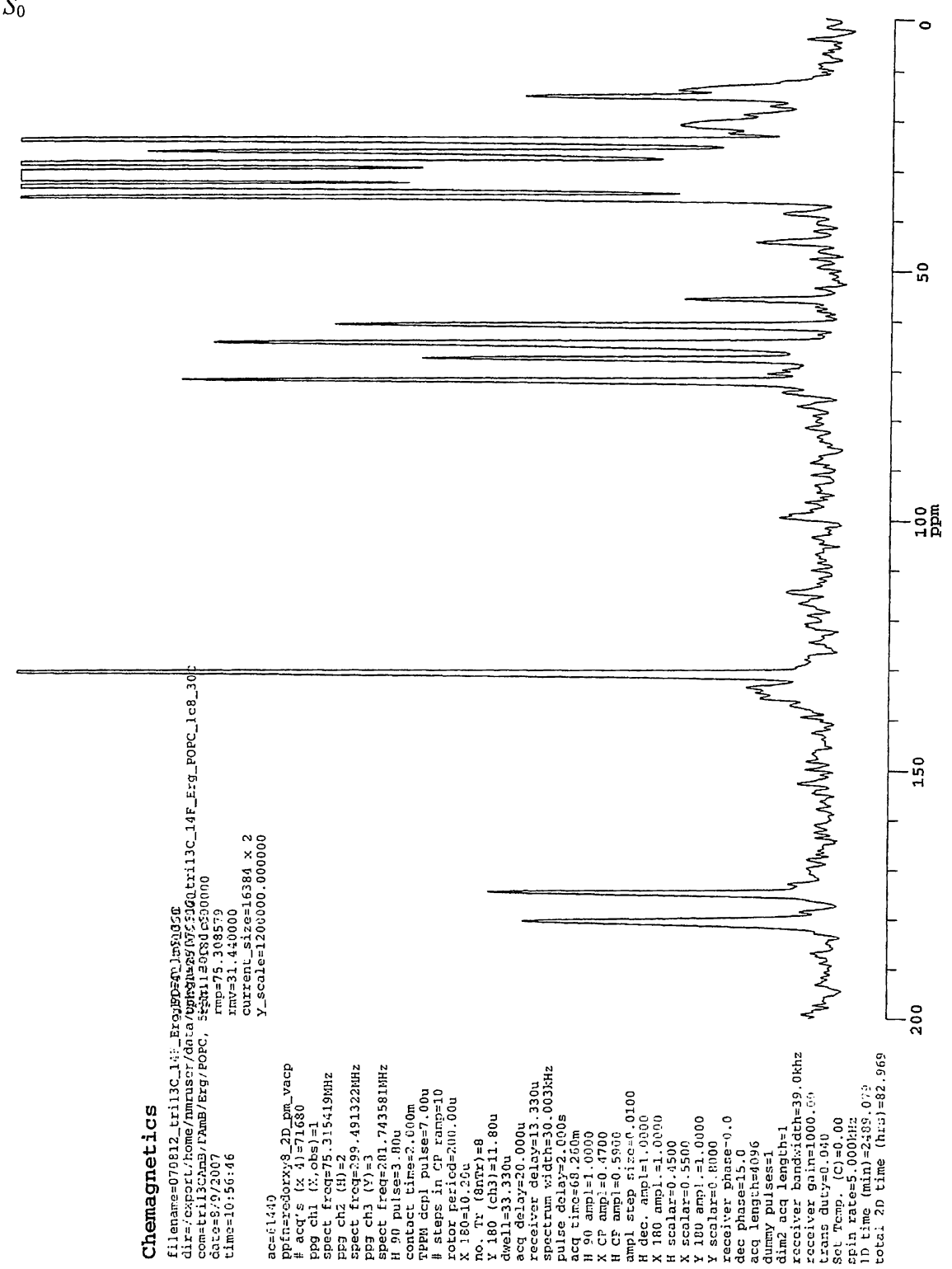
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
S



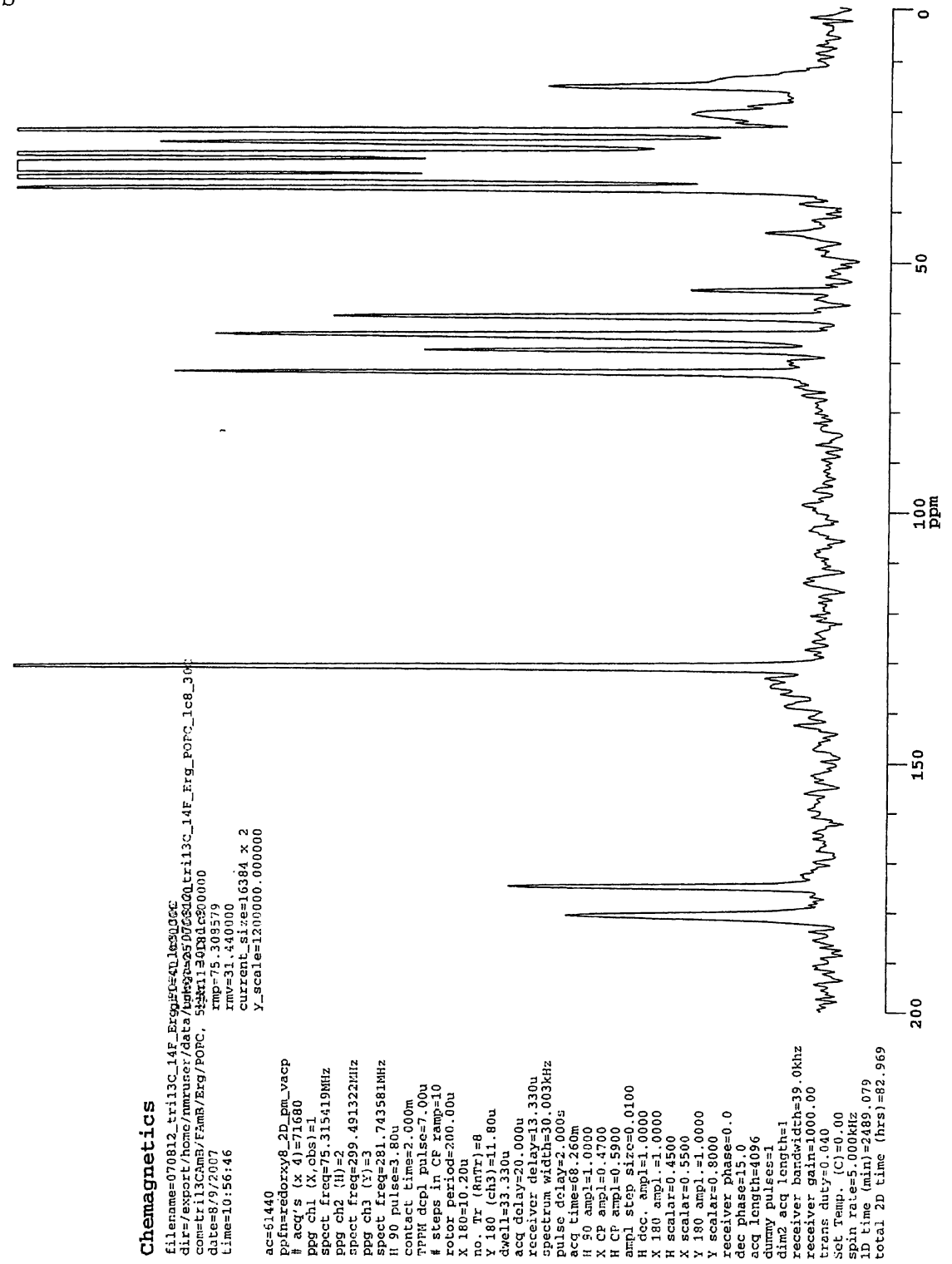
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



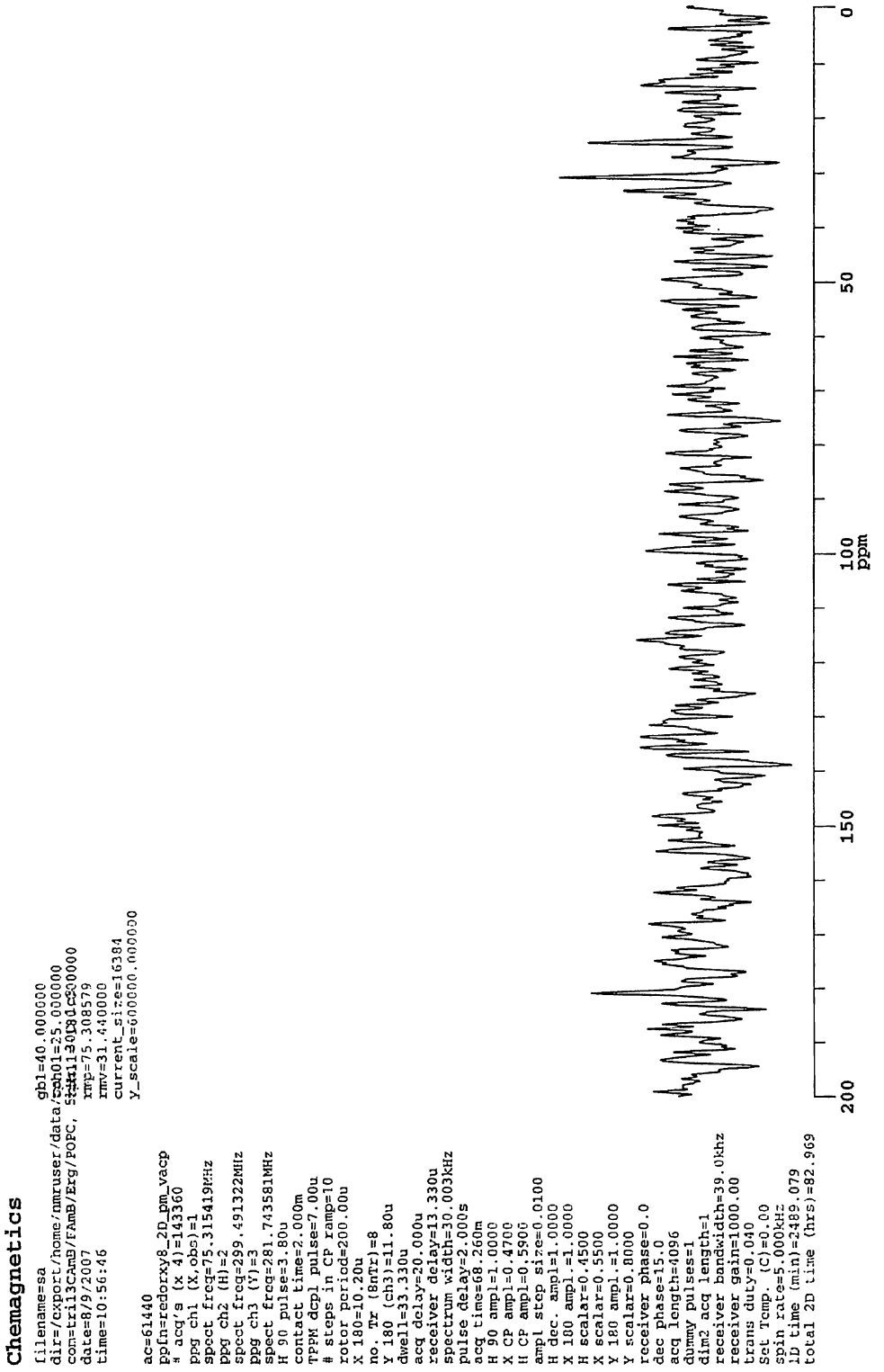
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
S_0



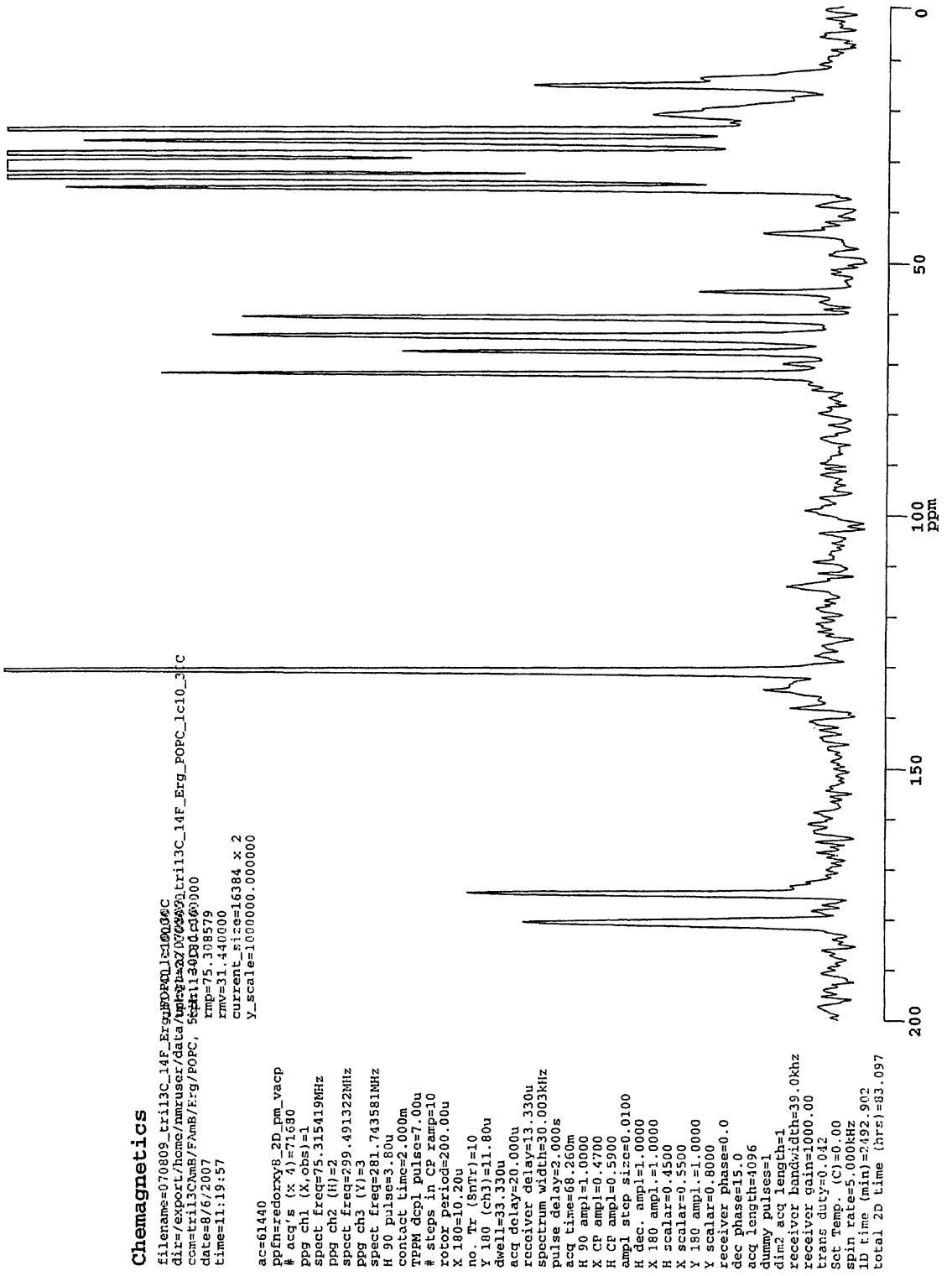
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
S



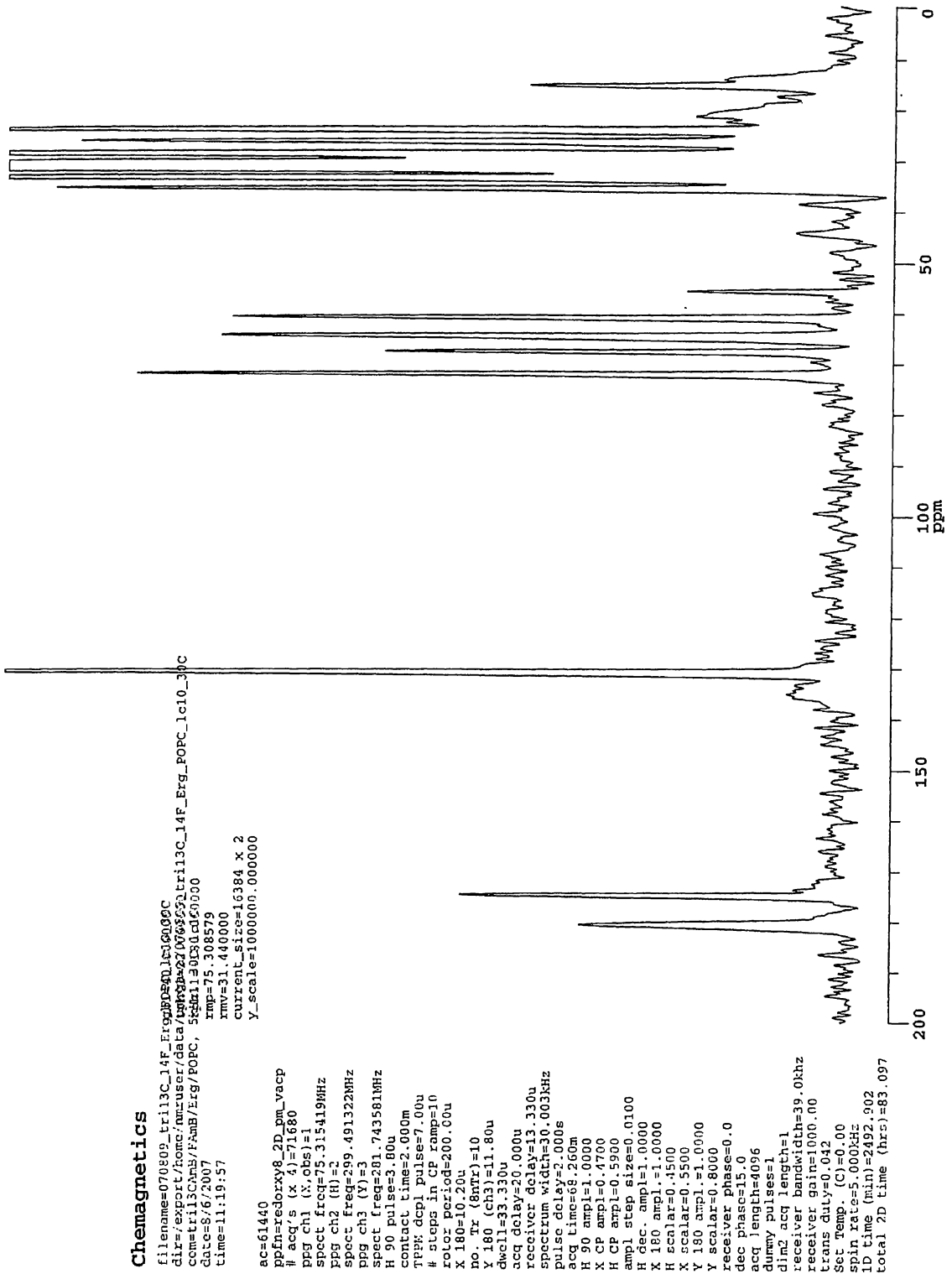
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



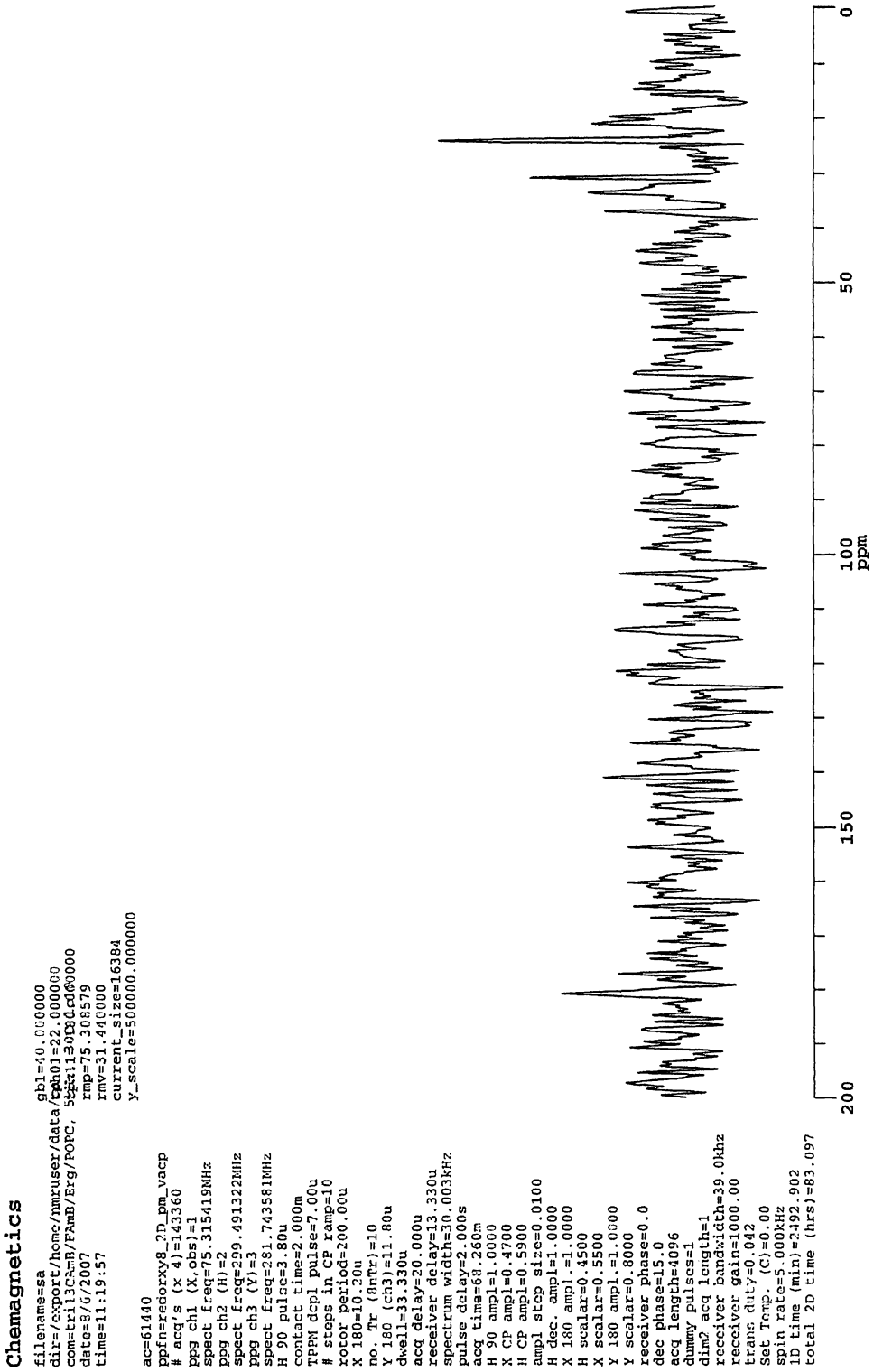
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S_0



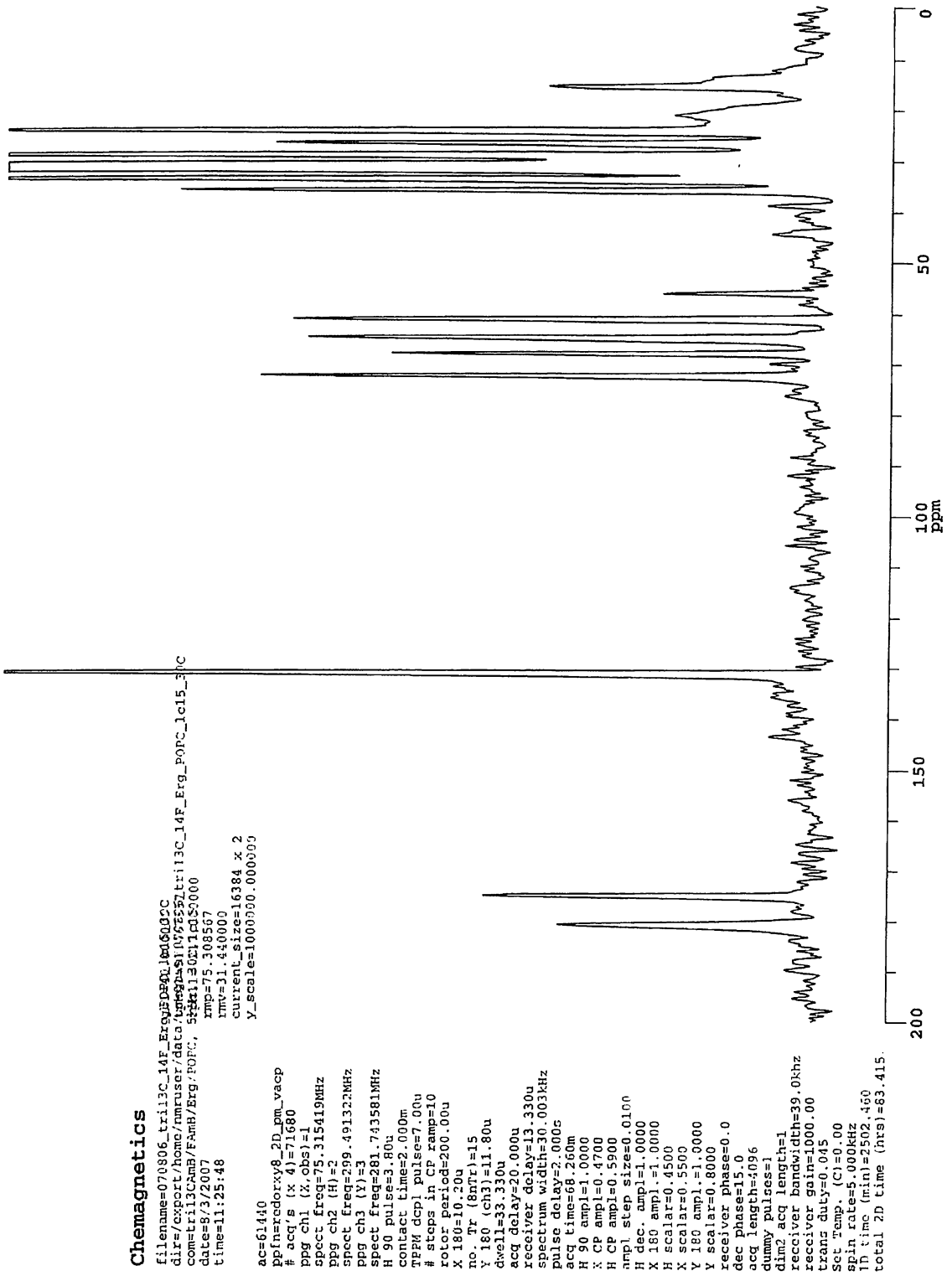
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S



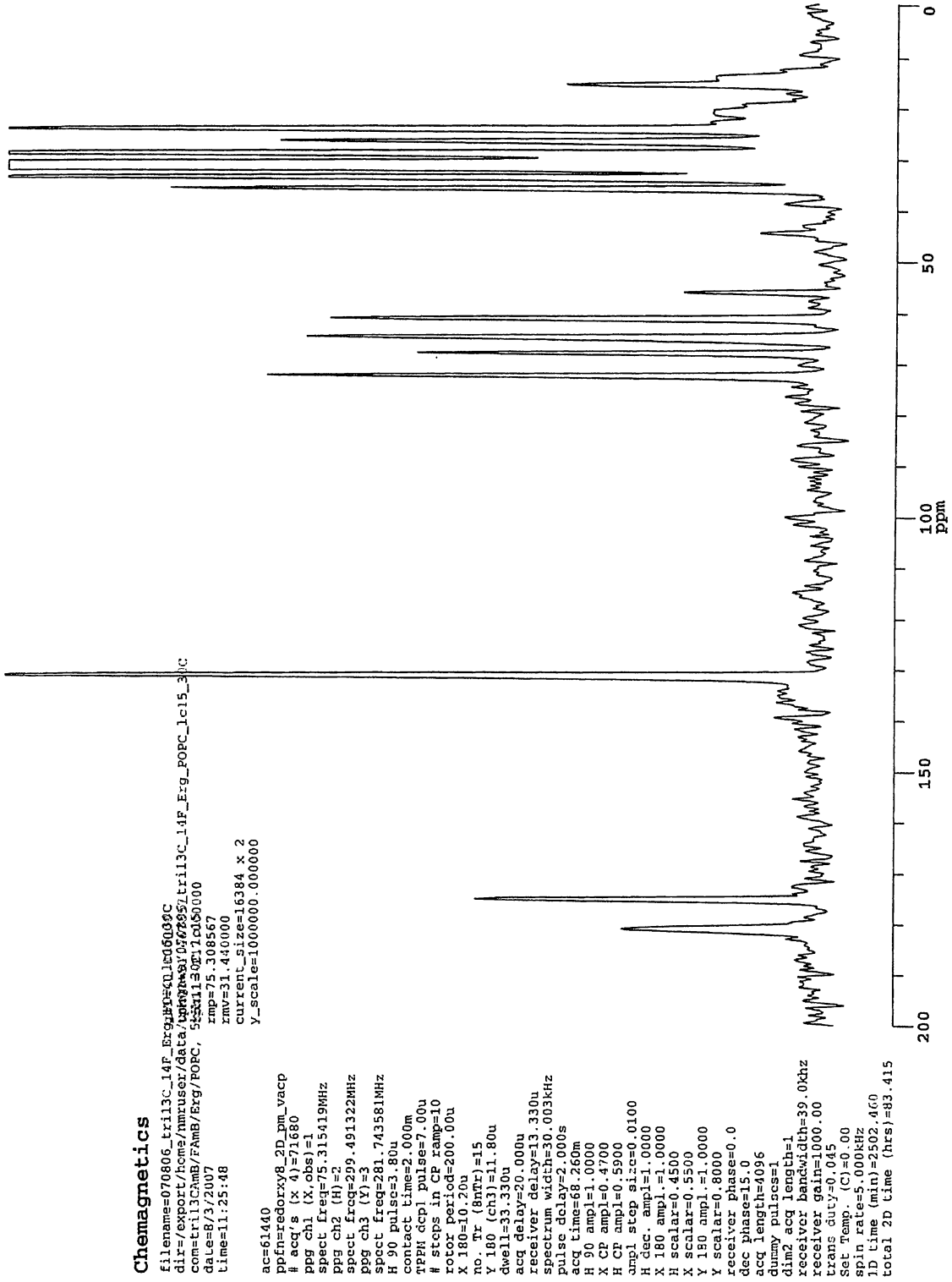
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



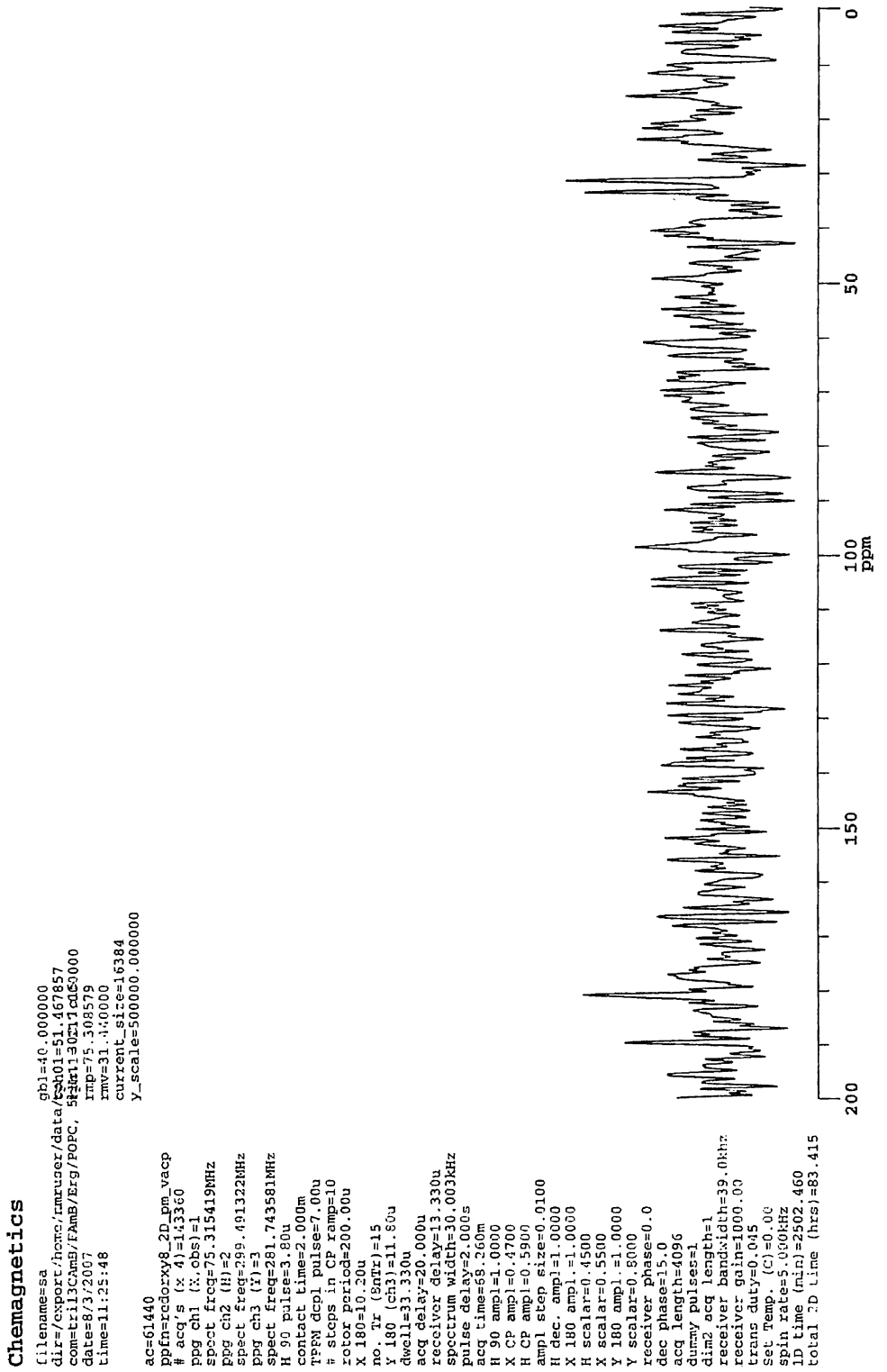
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
S_0



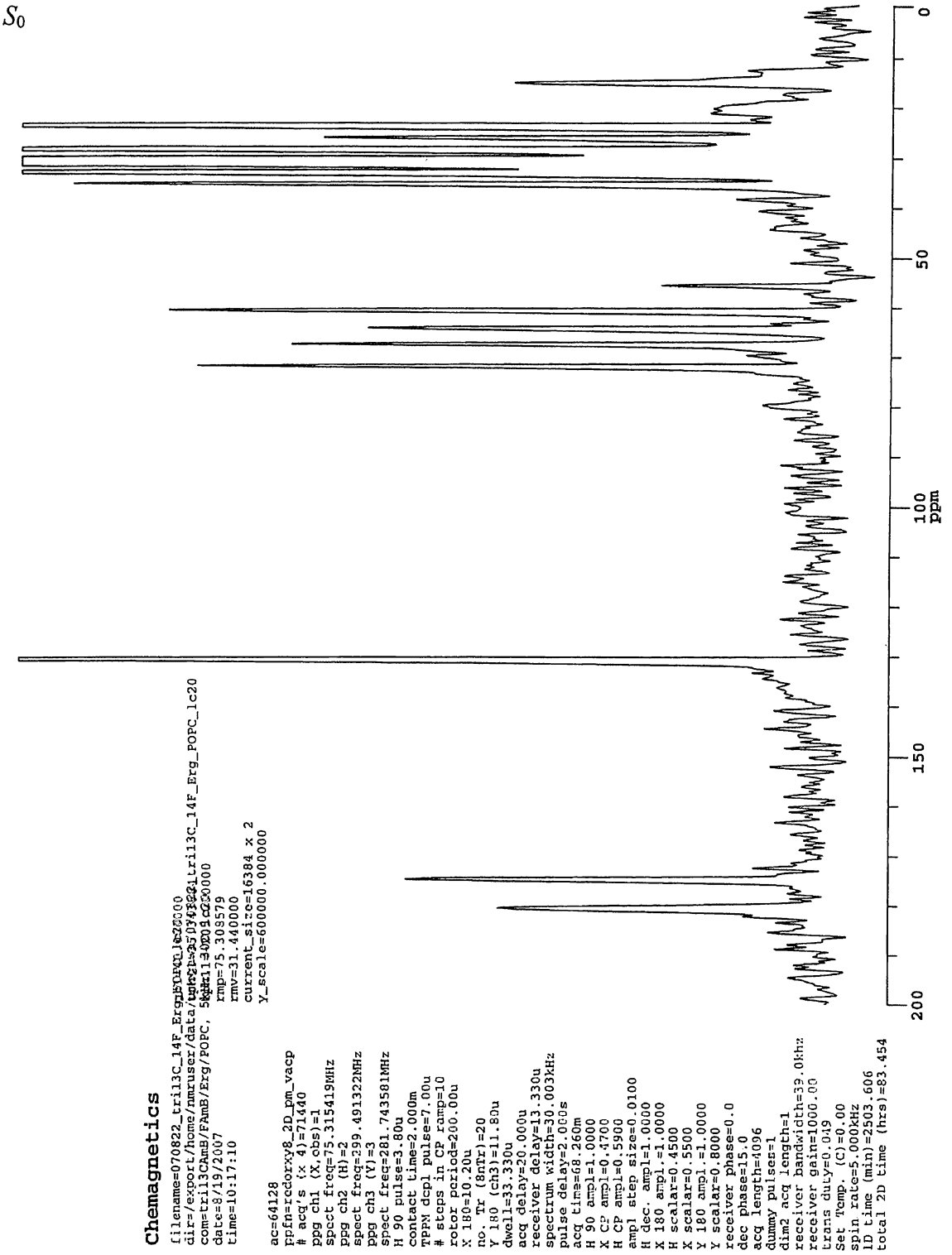
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
S



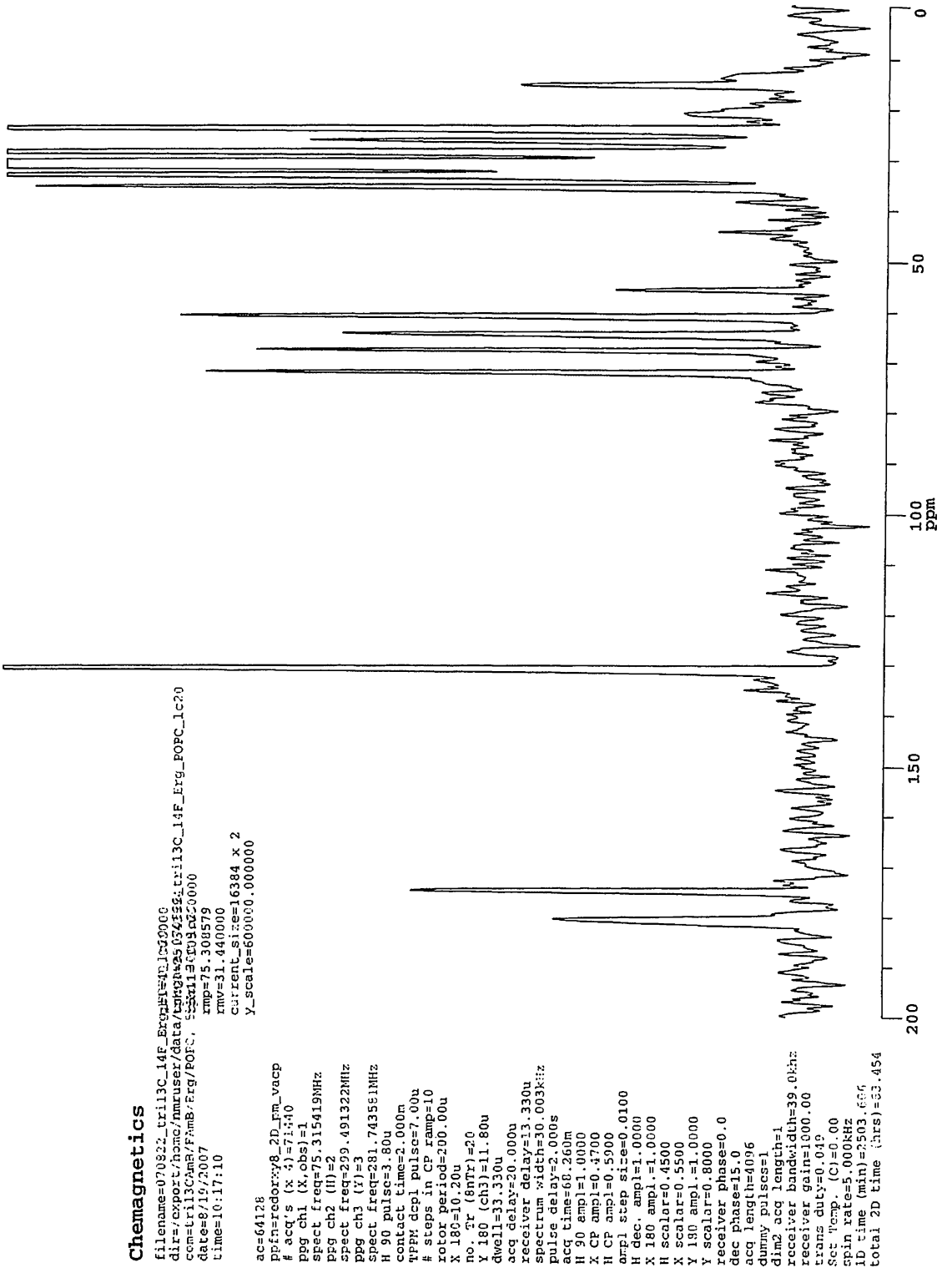
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 24.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



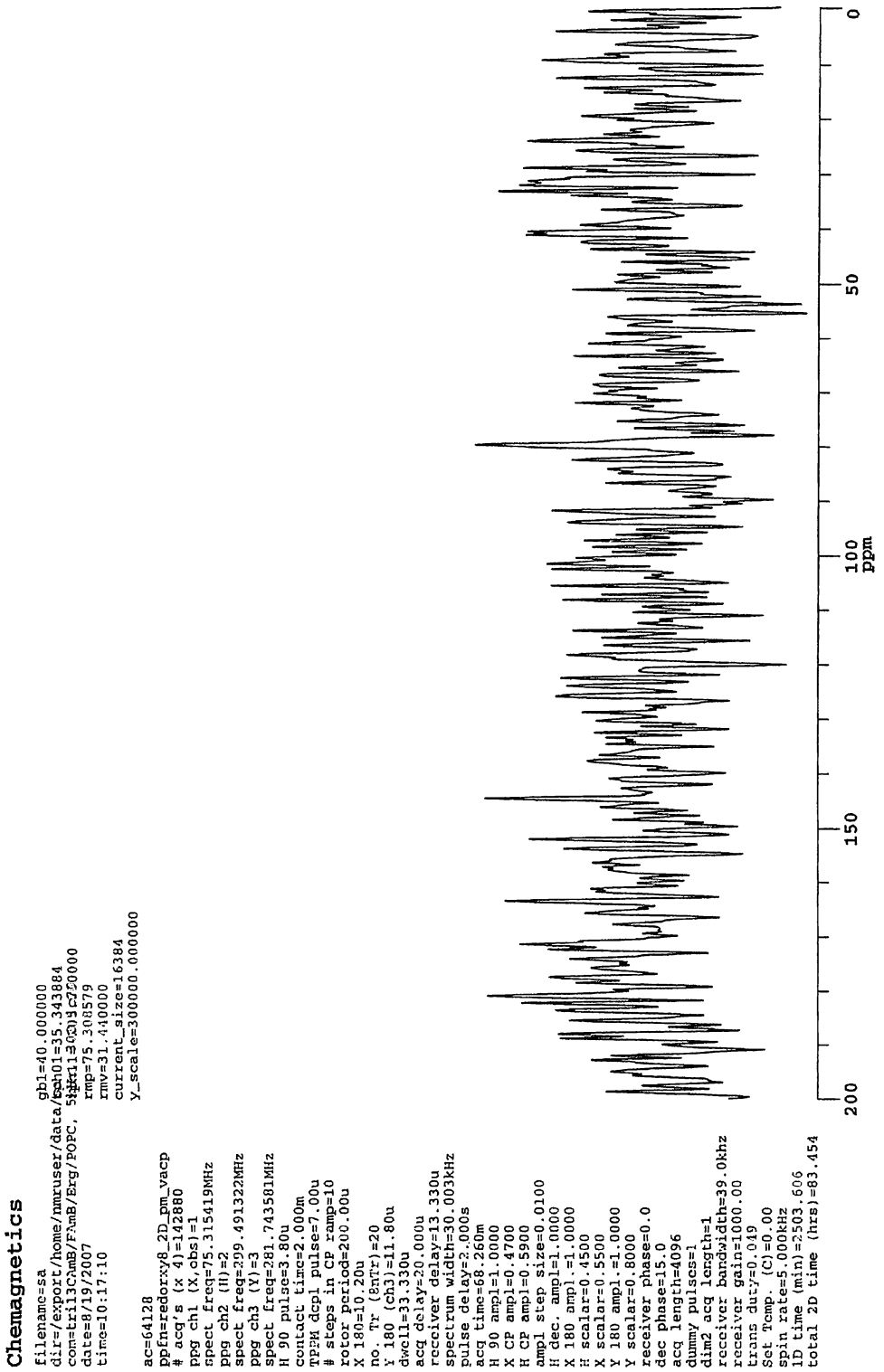
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
S_0



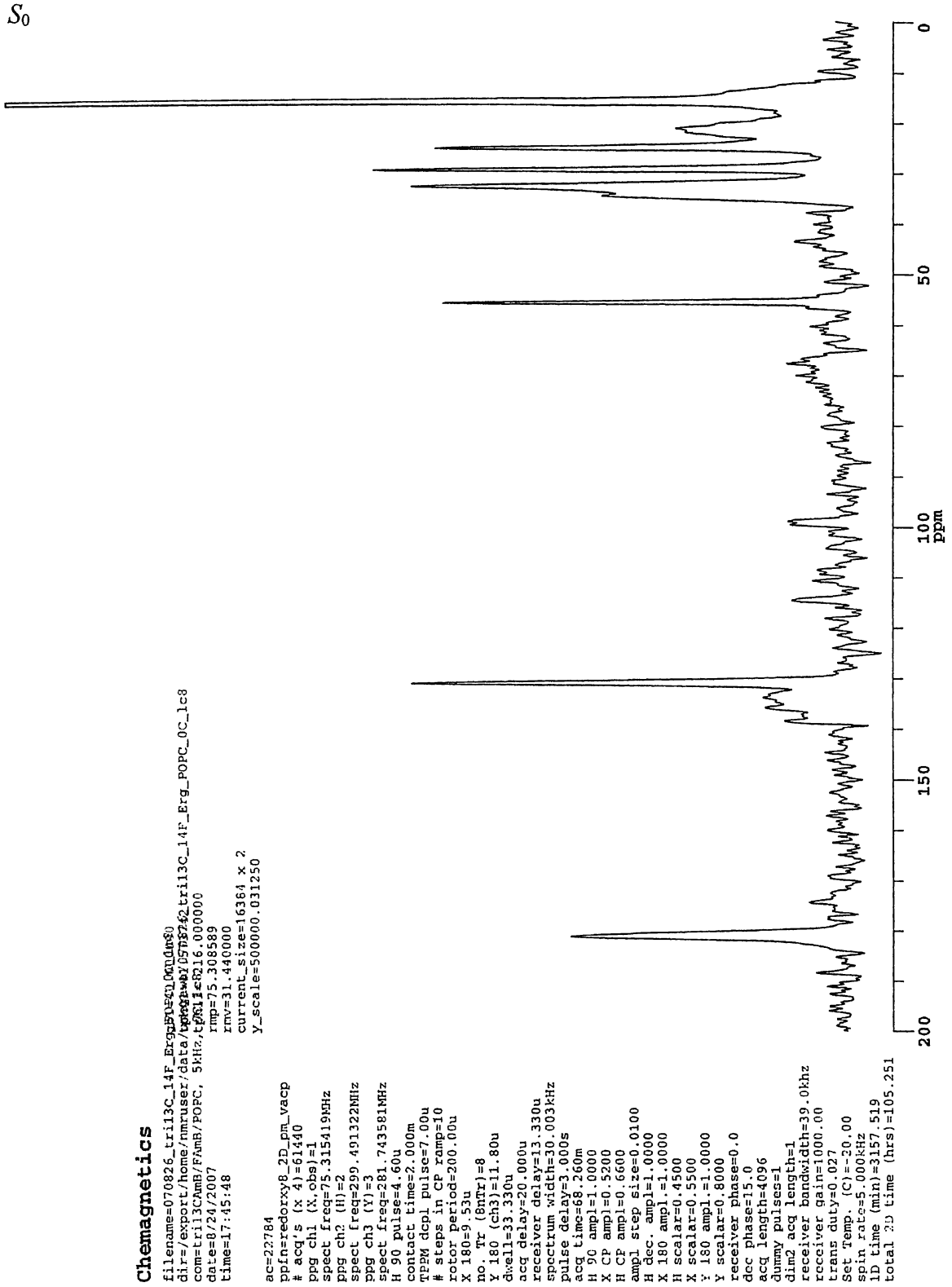
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
S



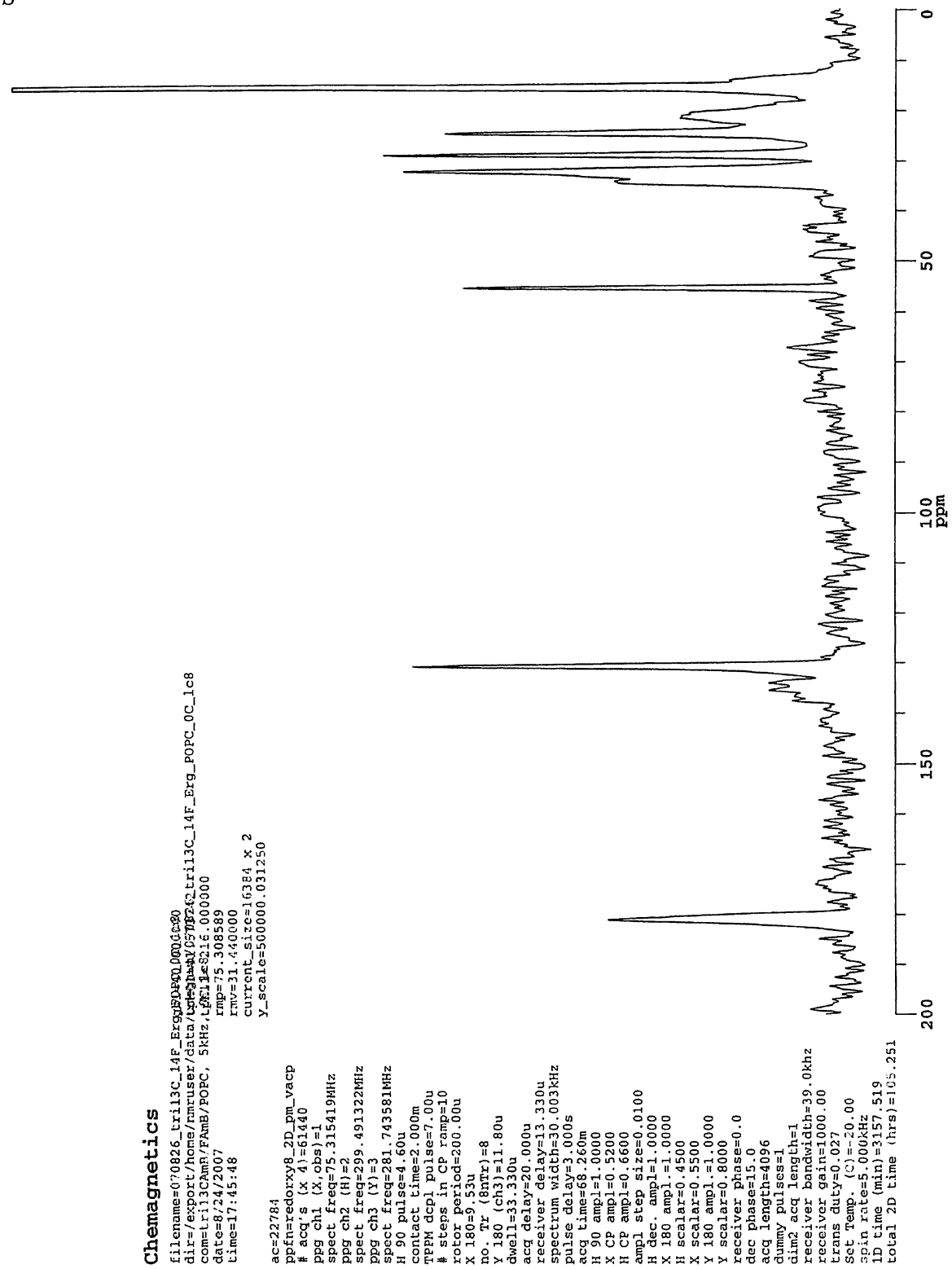
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 32.0 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



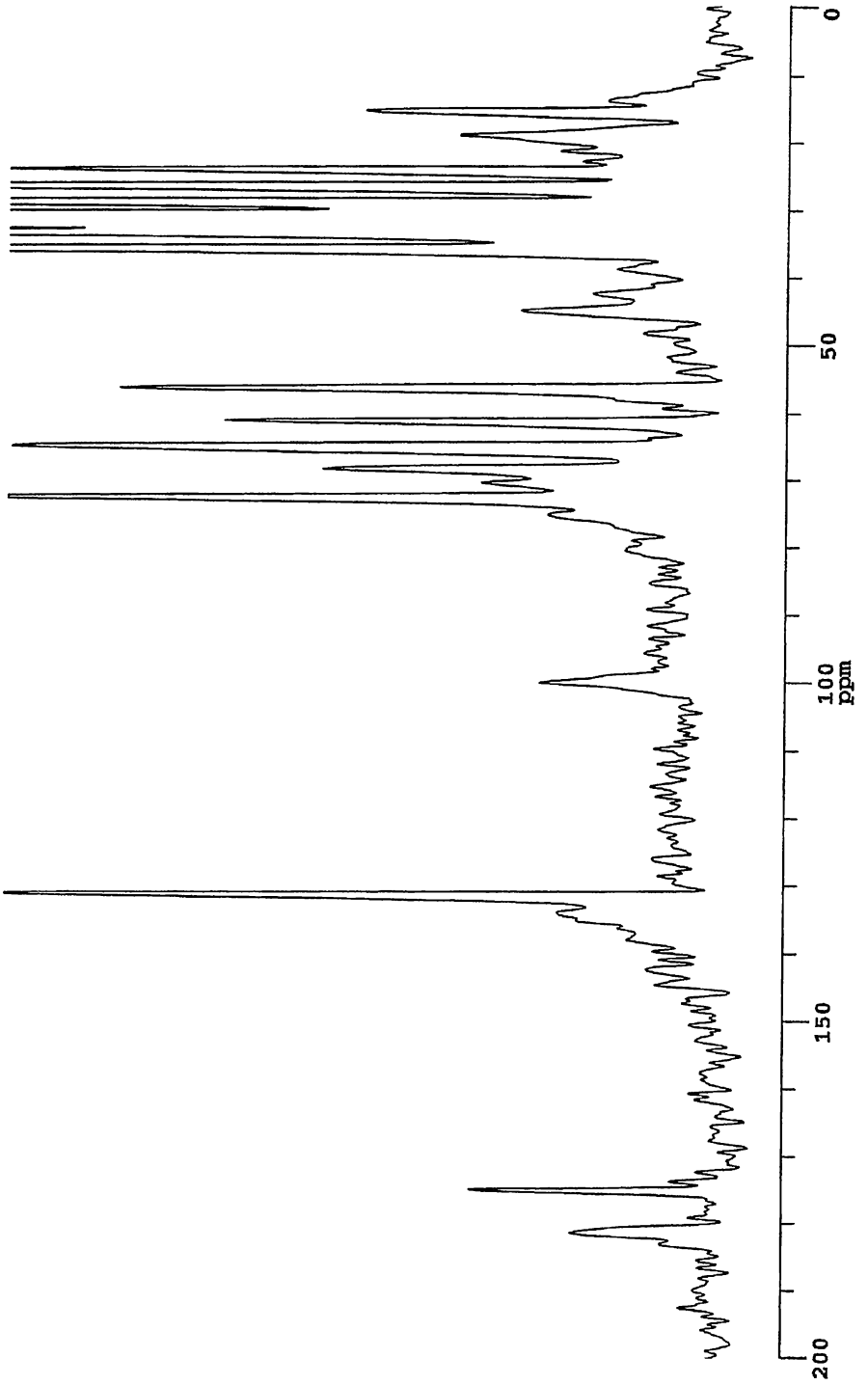
14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: -20 °C
S_0



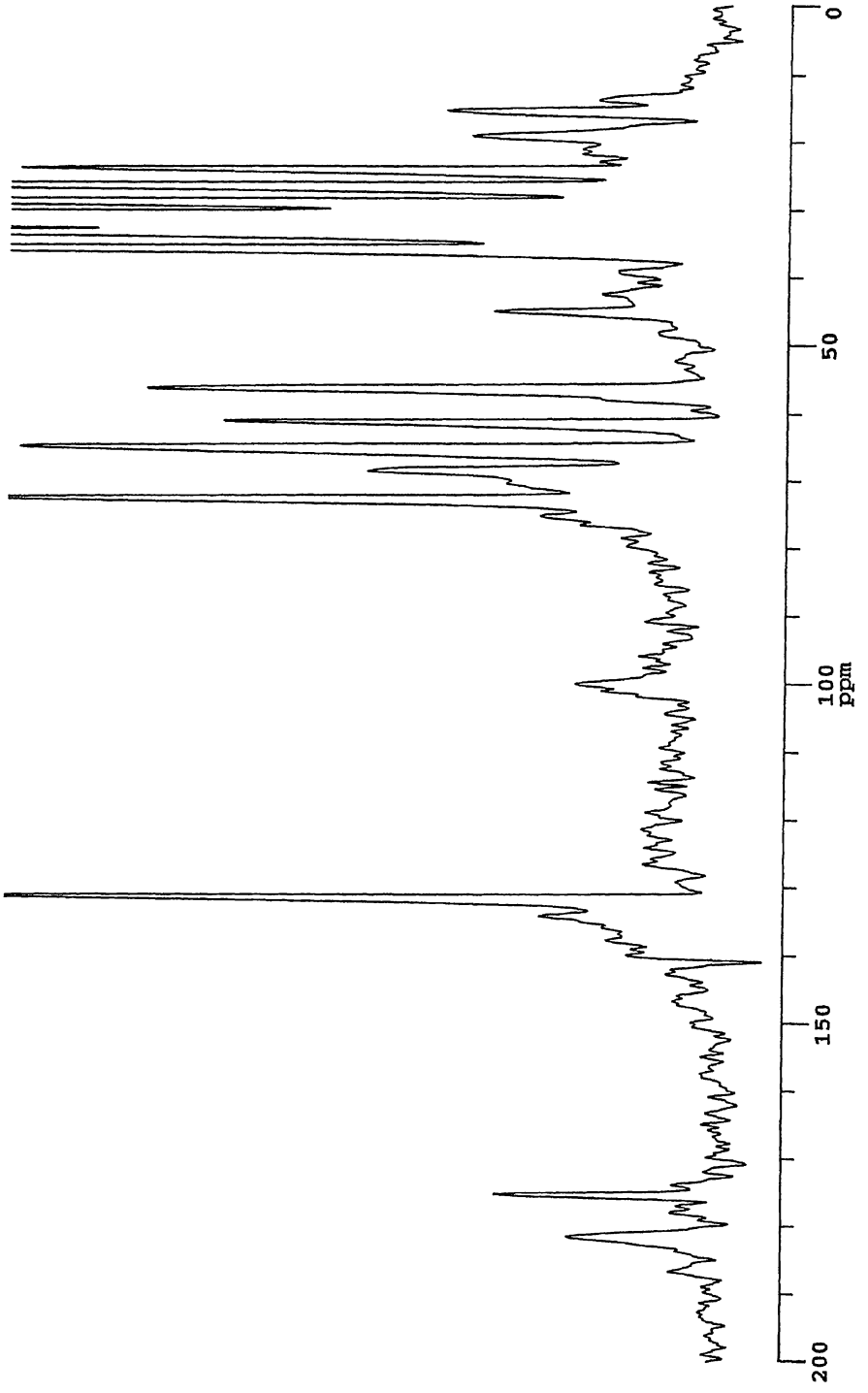
14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: -20 °C
S



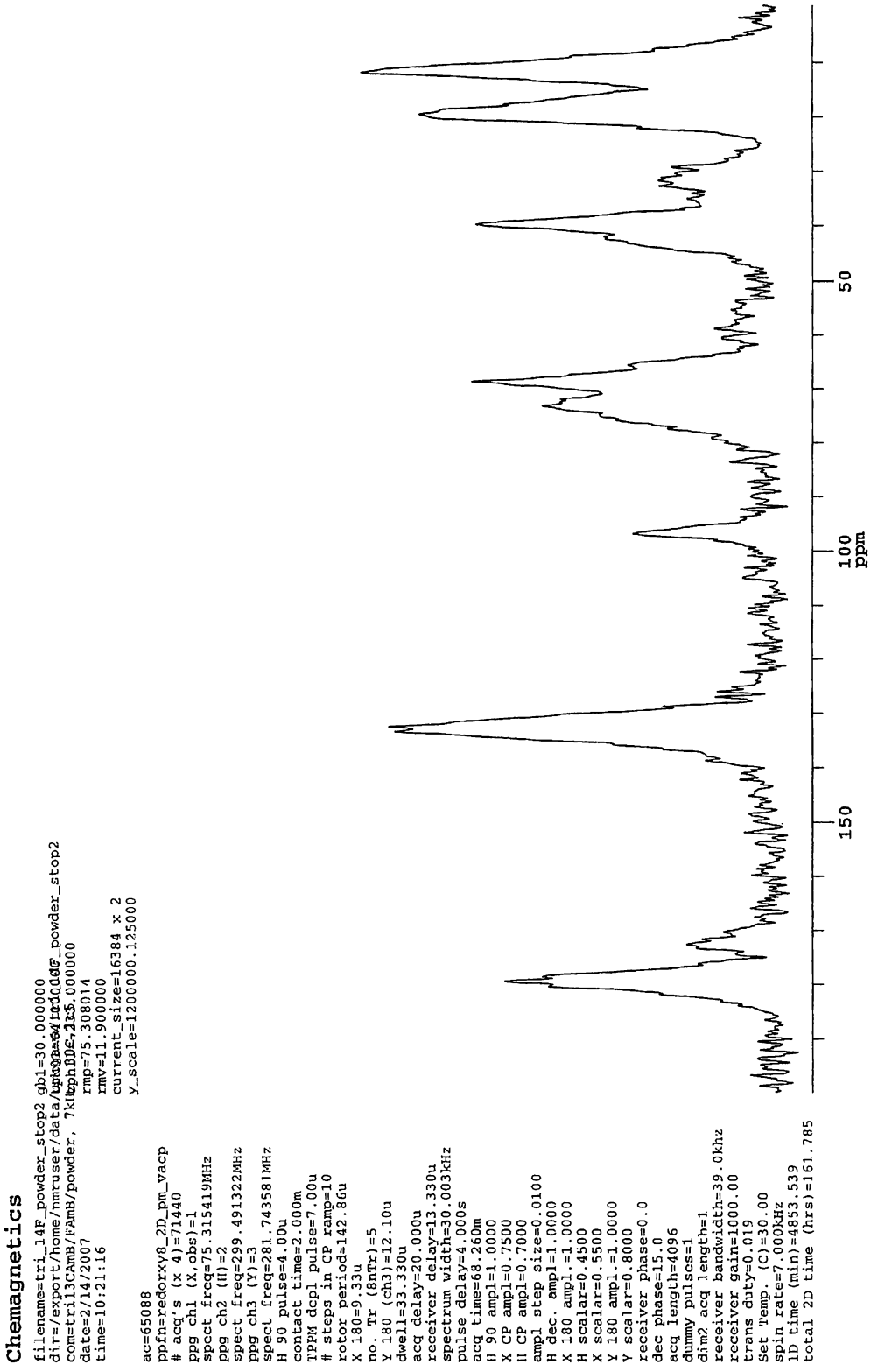
14-F AmB/[U-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S_0



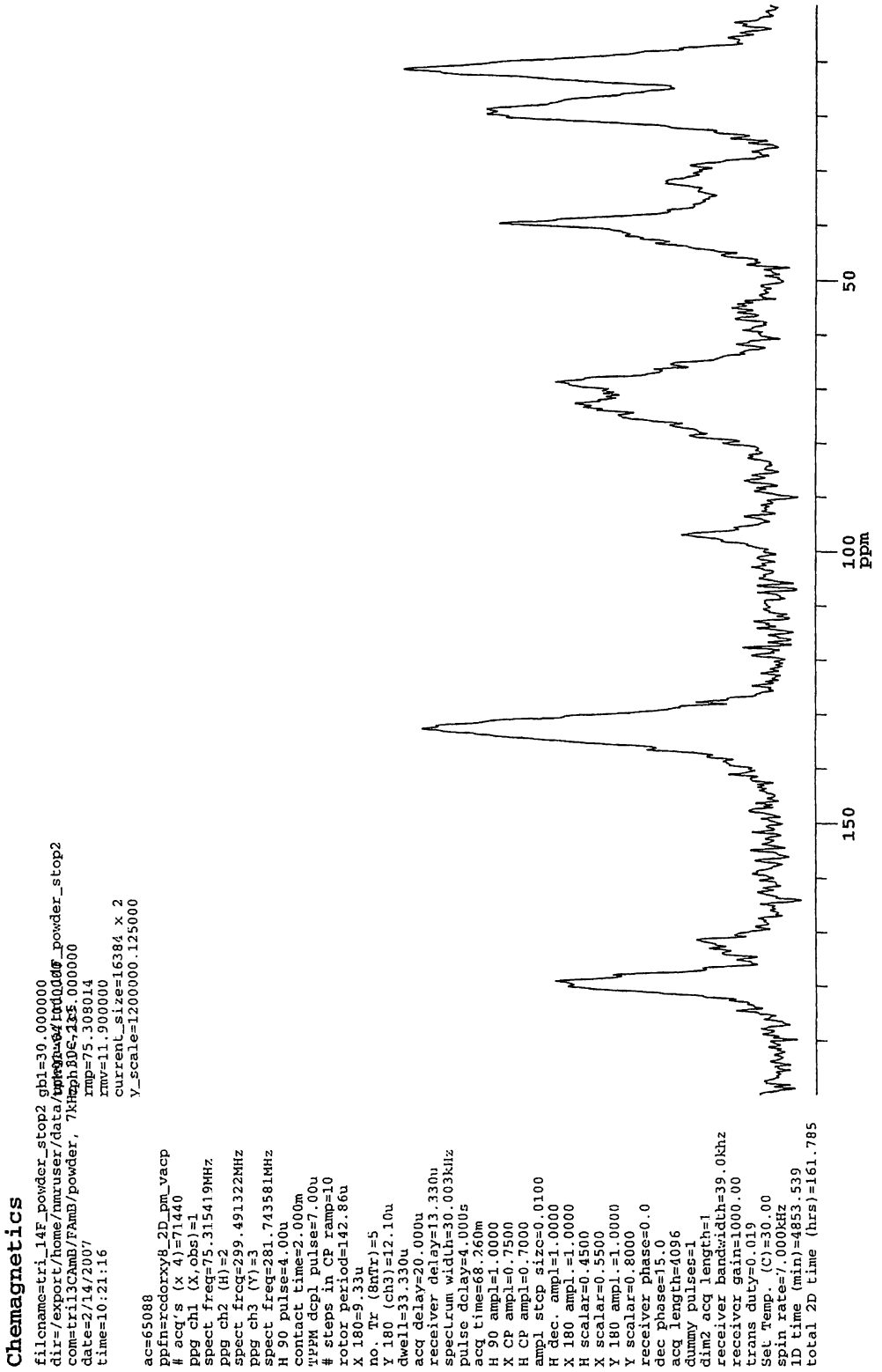
14-F AmB/[U-^{13}C]AmB/ergosterol/POPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 16.0 ms, temp: 30 °C
S



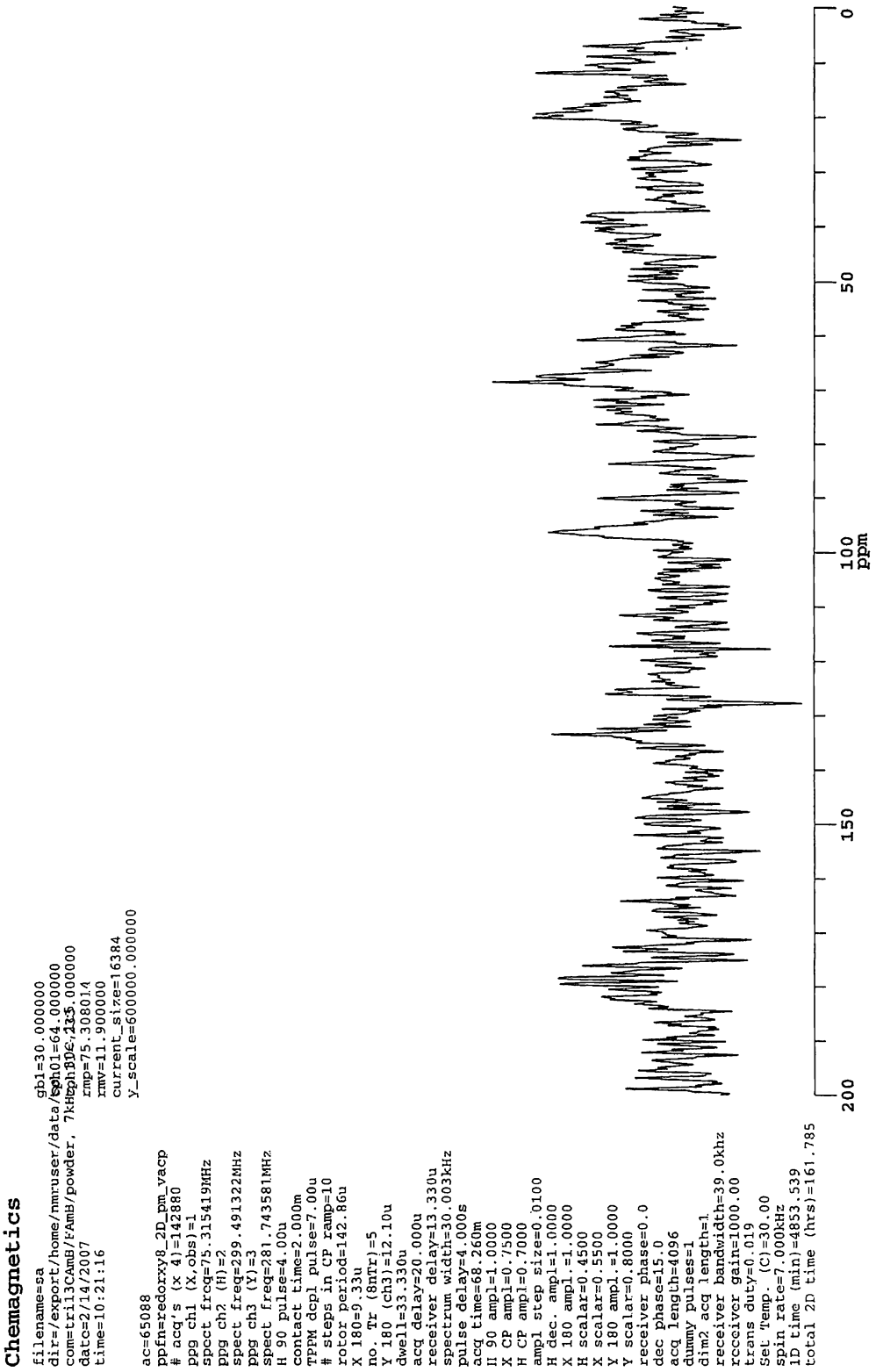
14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB powder
MAS: 7 kHz, dephasing time: 5.7 ms, temp: 30 °C
S_0



14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB powder
MAS: 7 kHz, dephasing time: 5.7 ms, temp: 30 °C
S



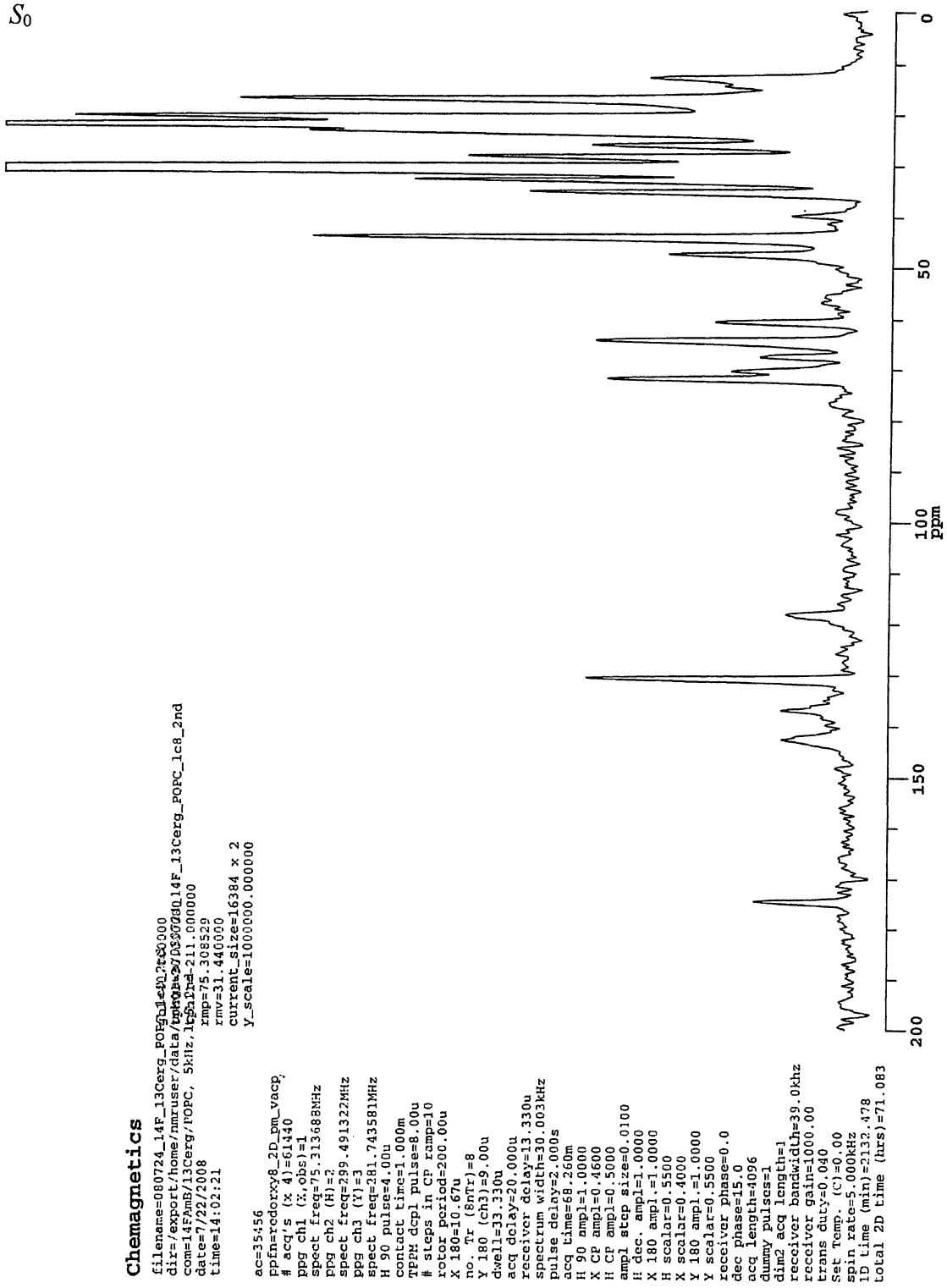
14-F AmB/[tri-^{13}C]AmB powder
MAS: 7 kHz, dephasing time: 5.7 ms, temp: 30 °C
ΔS(Yx2)



14-F AmB/^{13}C-ergosterol/POPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

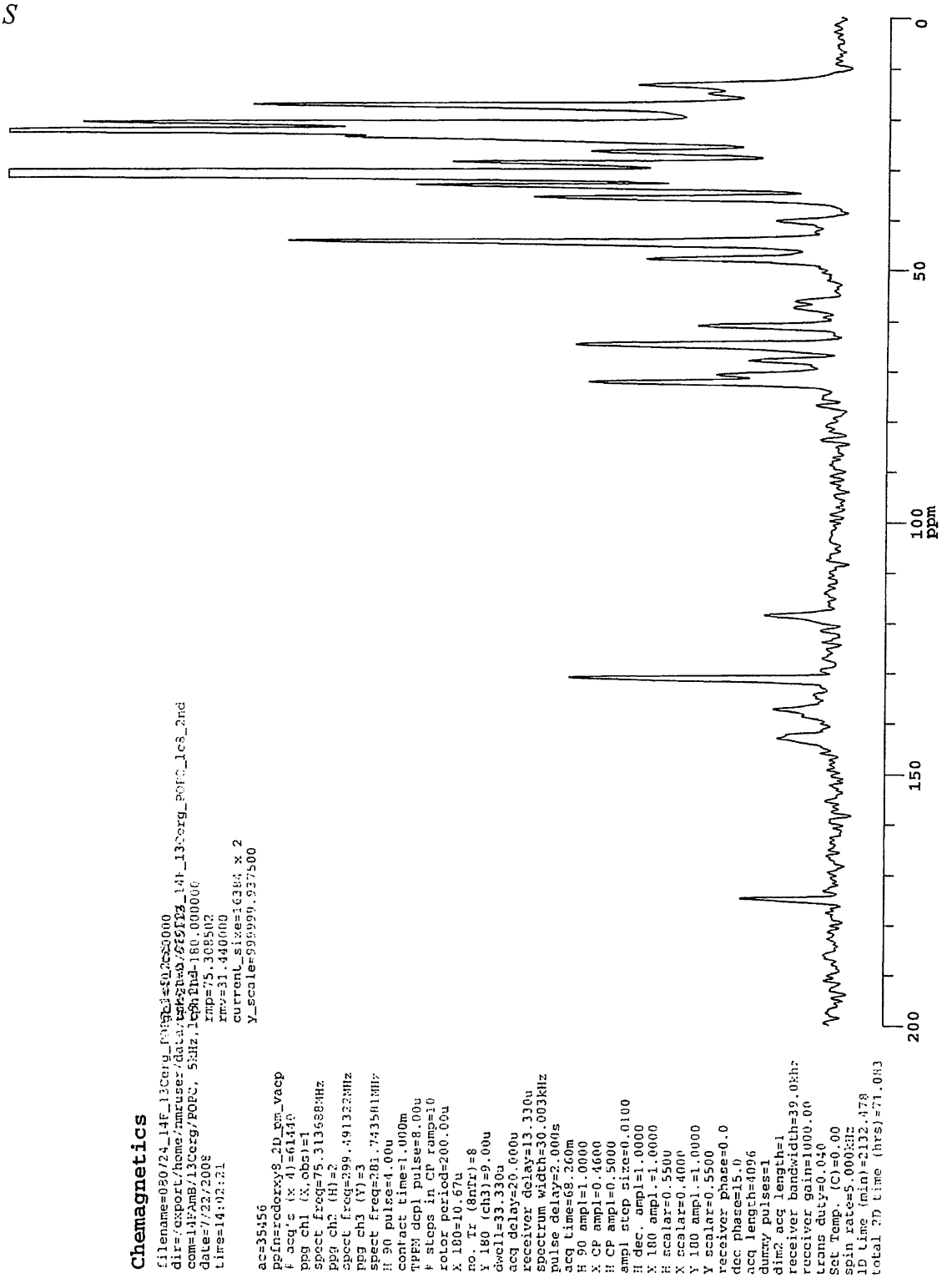
S_0



14-F AmB/^{13}C-ergosterol/POPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

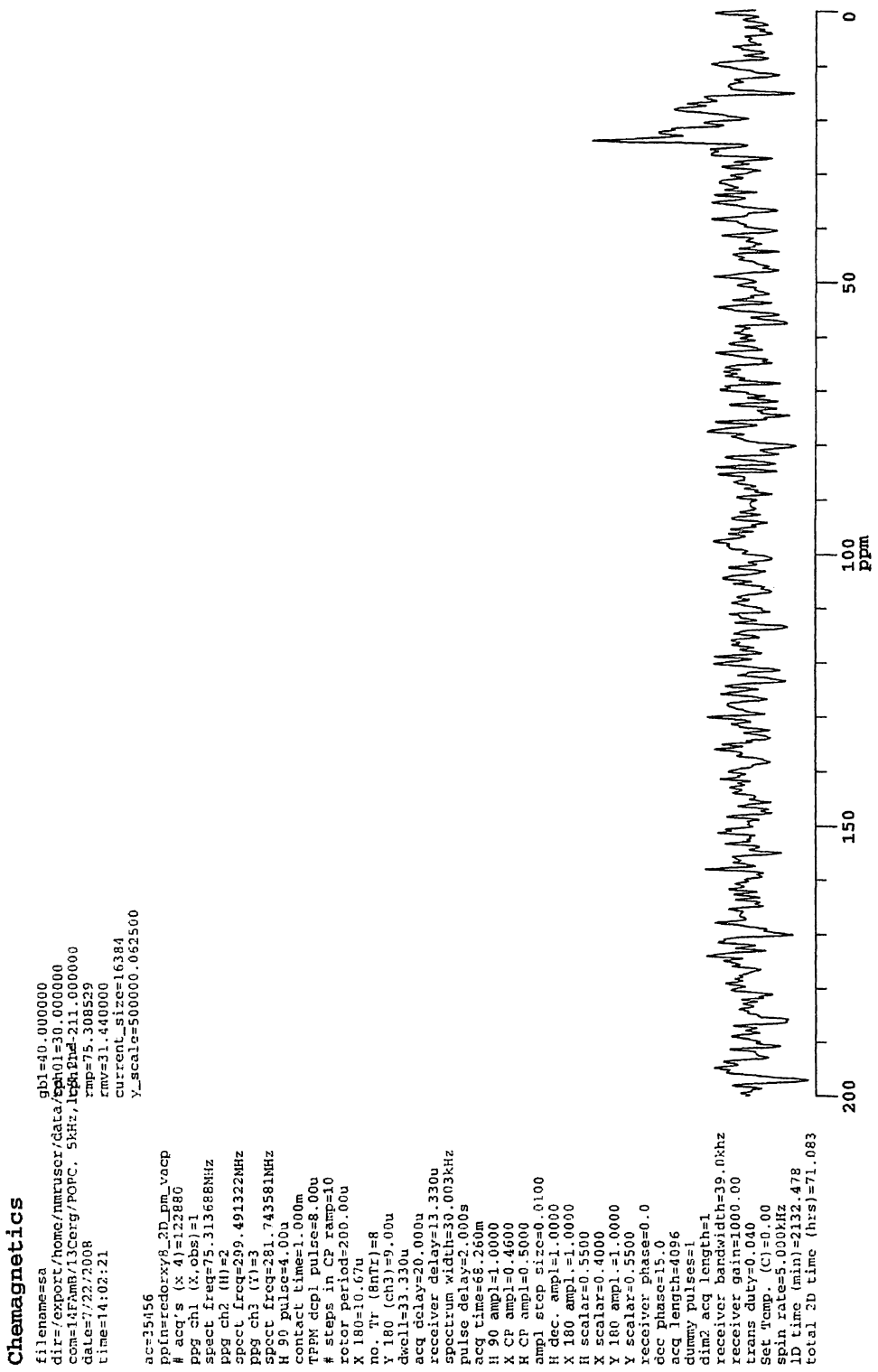
S



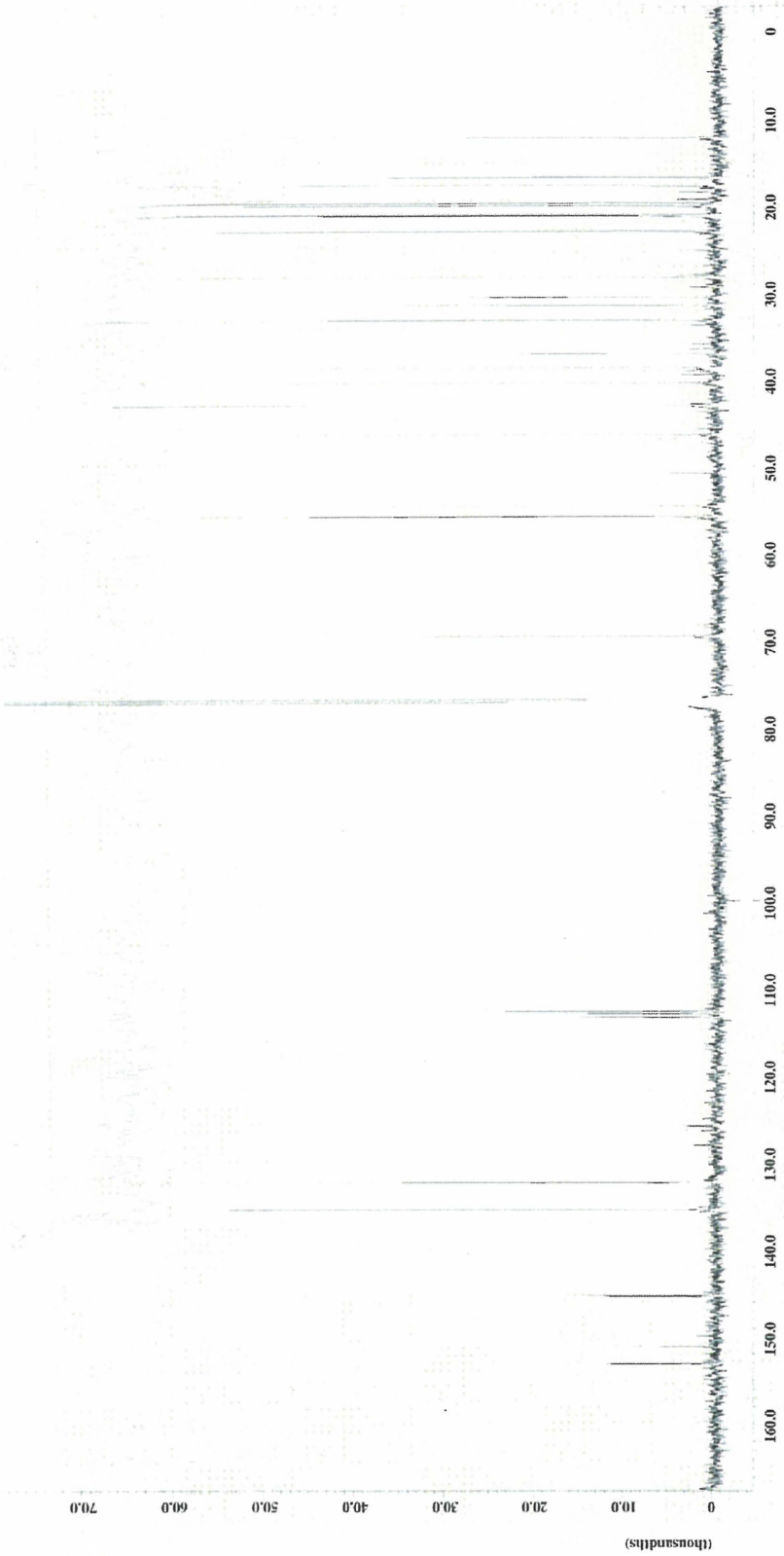
14-F AmB/^{13}C-ergosterol/POPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

ΔS(Yx2)



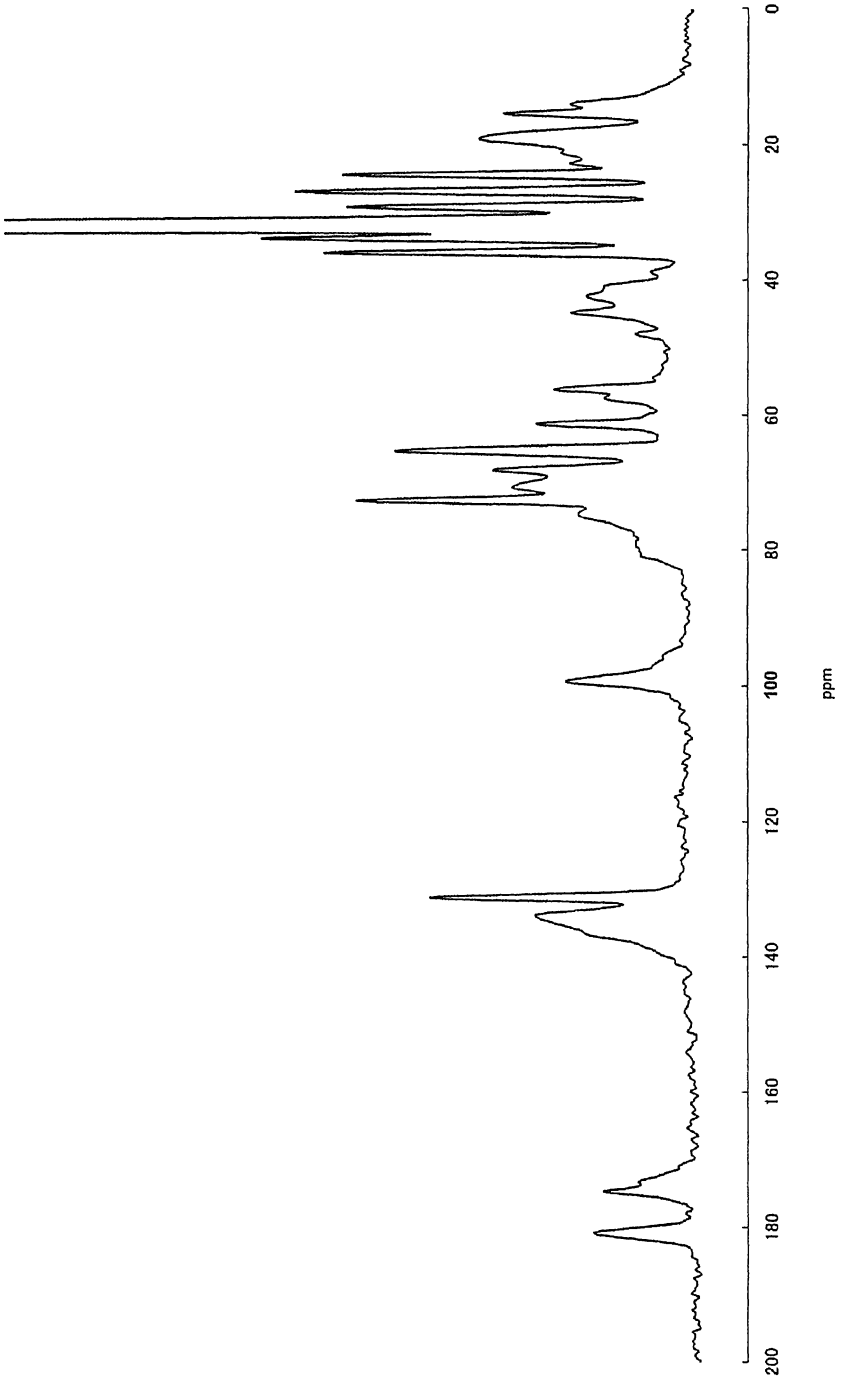
6-F ergosterol の ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 中)



[U-^{13}C]AmB/6-F ergosterol/POPC

MAS: 6 kHz, dephasing time: 6.7 ms, temp: 30 °C

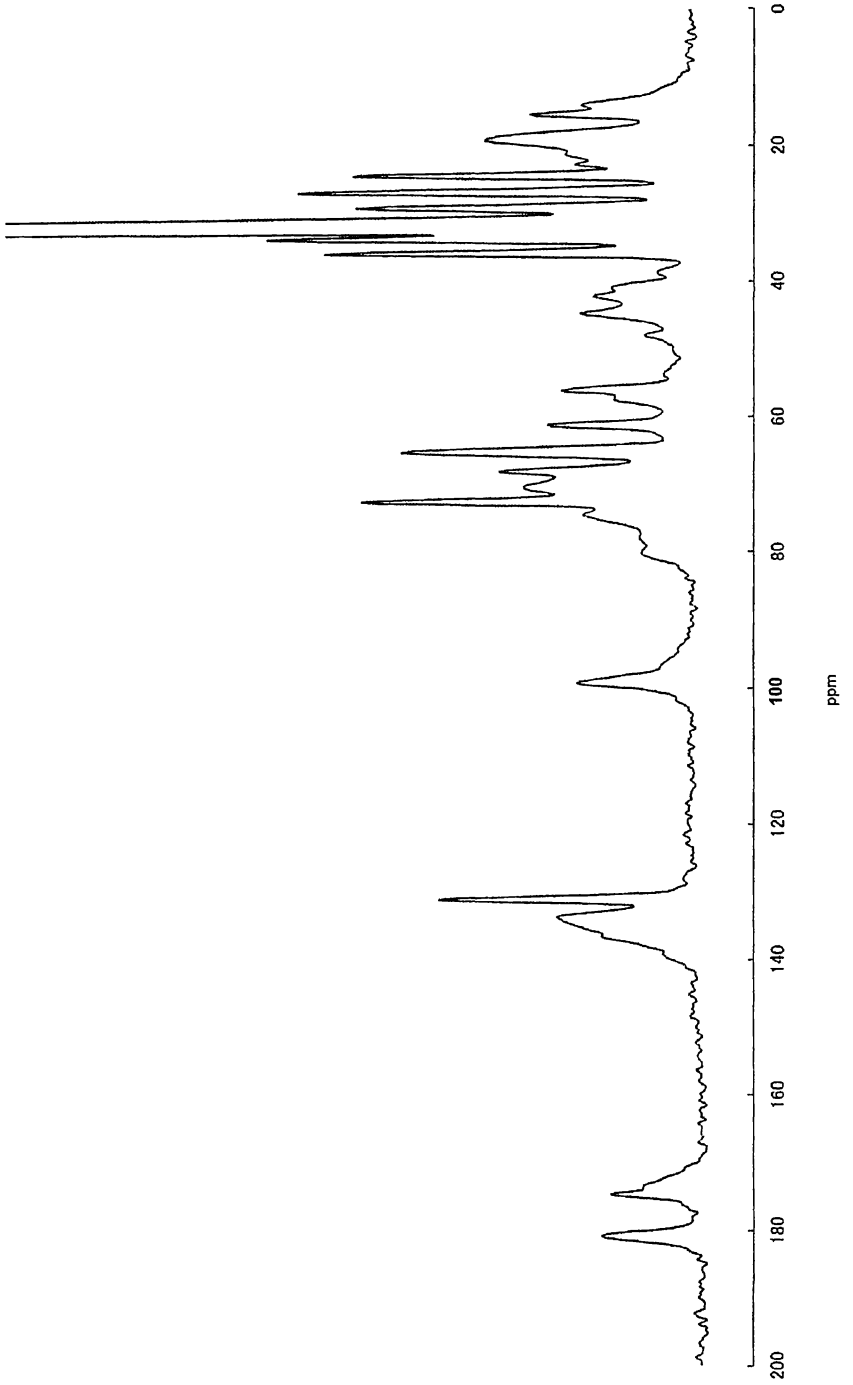
S_0



[U-^{13}C]AmB/6-F ergosterol/POPC

MAS: 6 kHz, dephasing time: 6.7 ms, temp: 30 °C

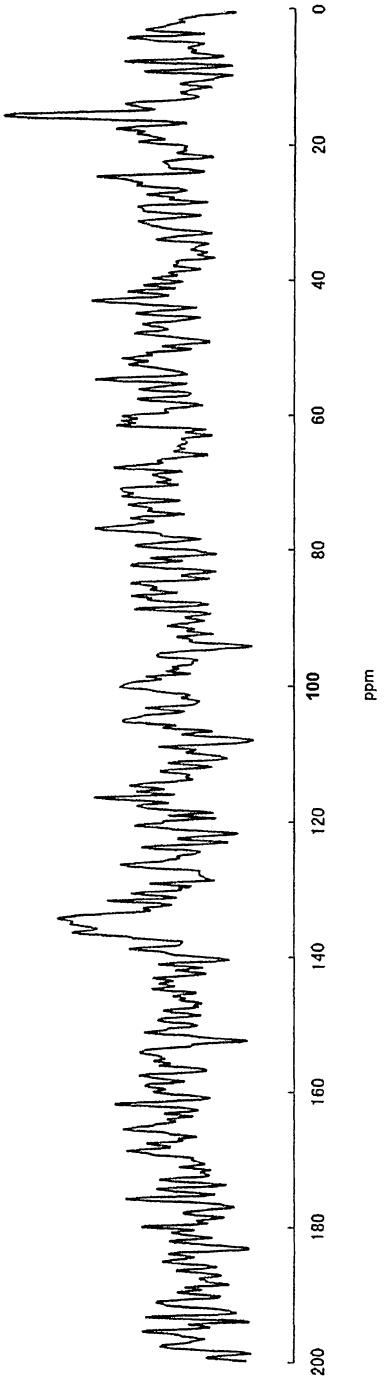
S



[U-^{13}C]AmB/6-F ergosterol/POPC

MAS: 6 kHz, dephasing time: 6.7 ms, temp: 30 °C

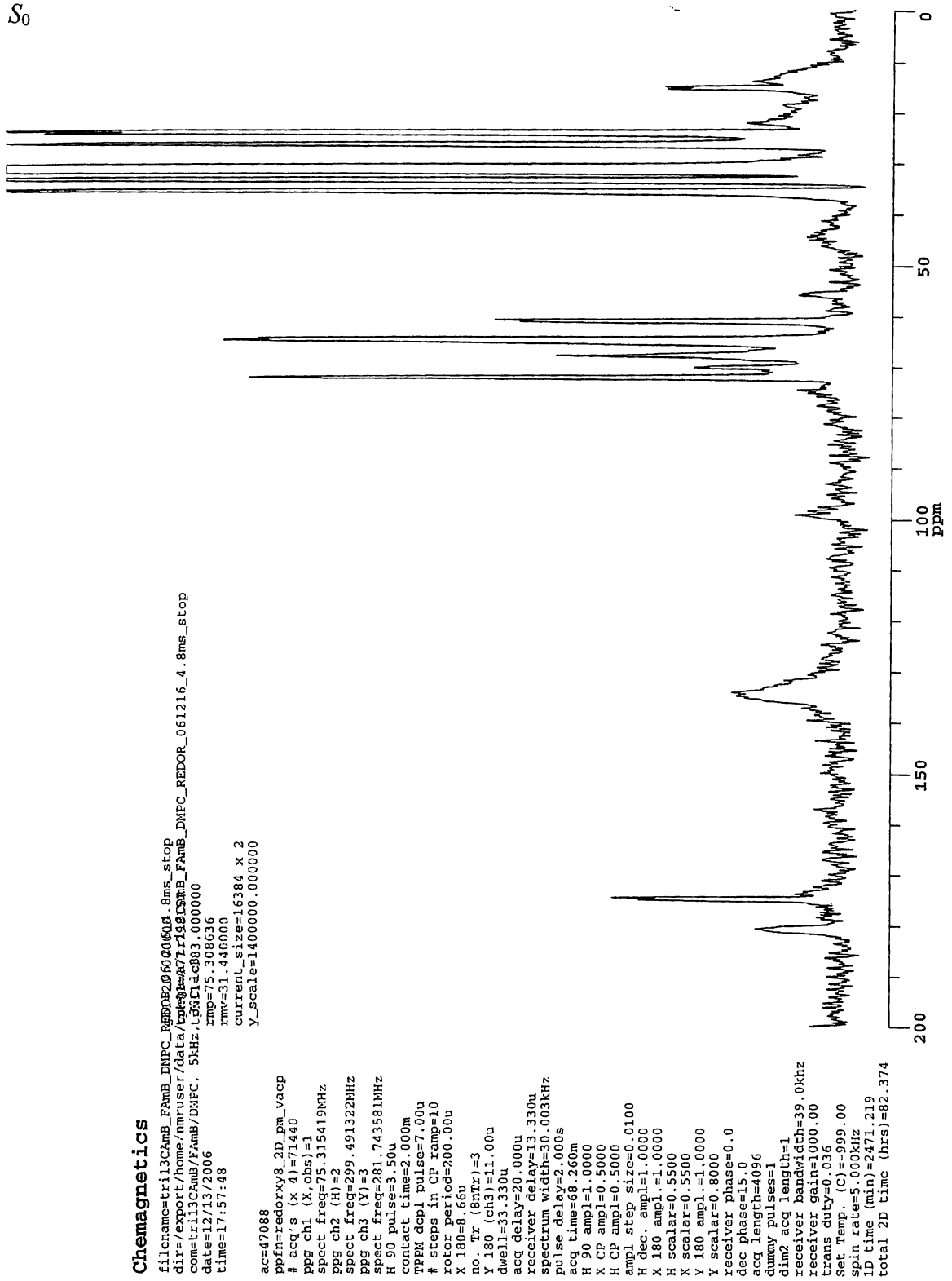
ΔS(Yx8)



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

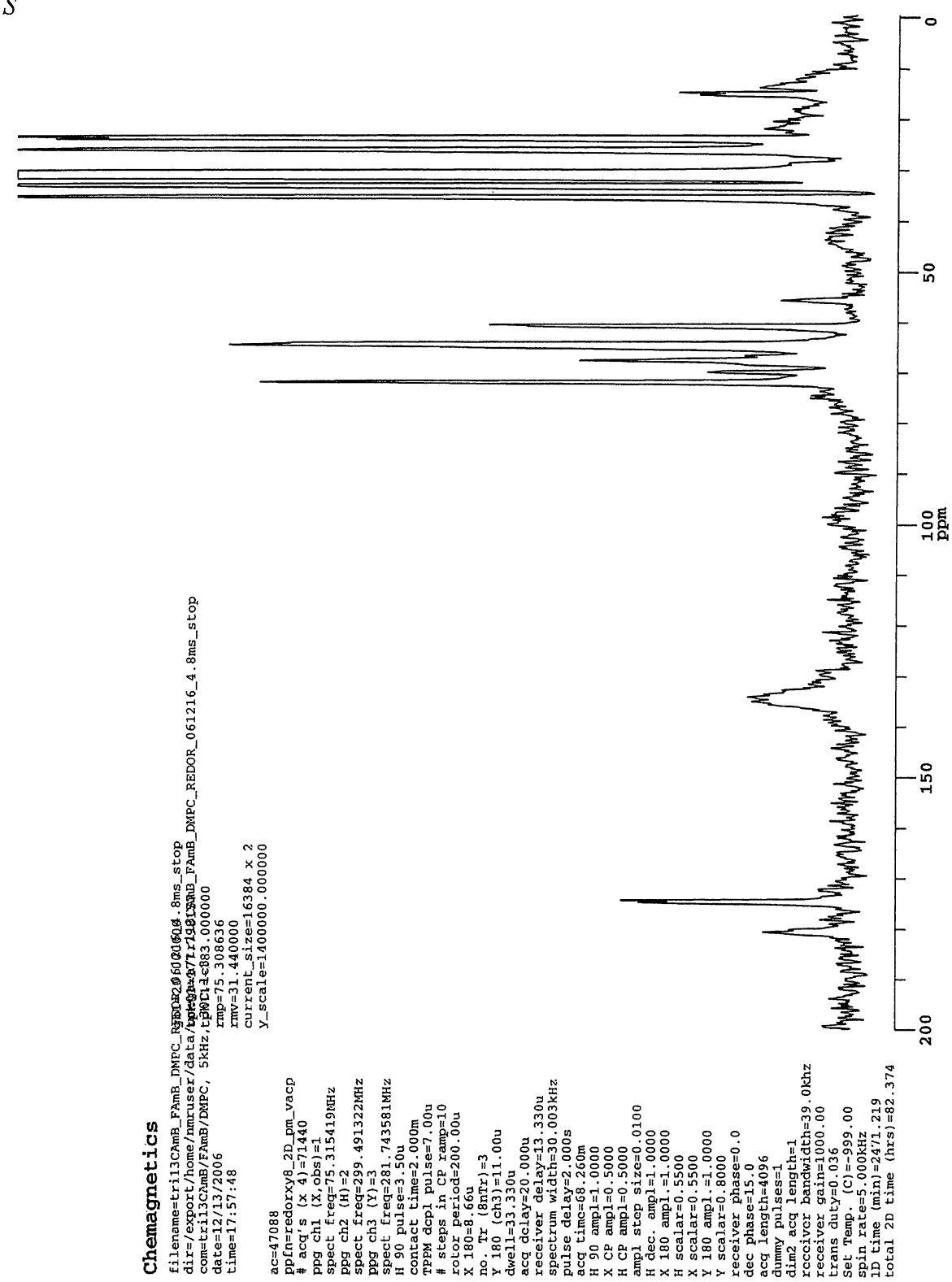
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

S



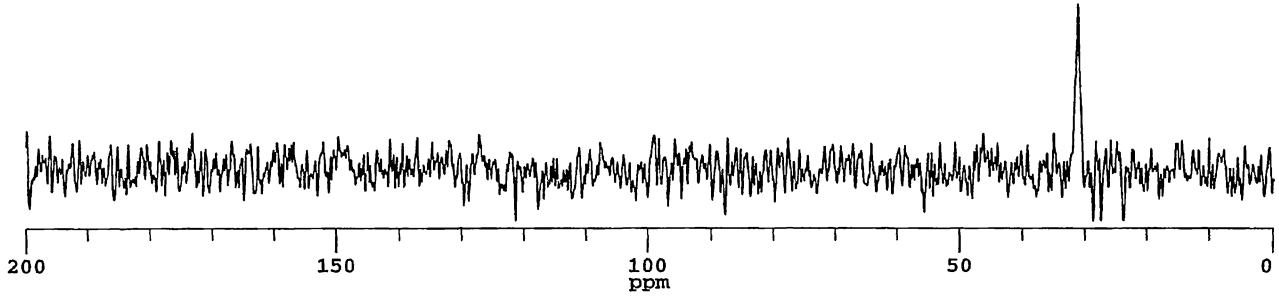
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

ΔS

Chemagnetics

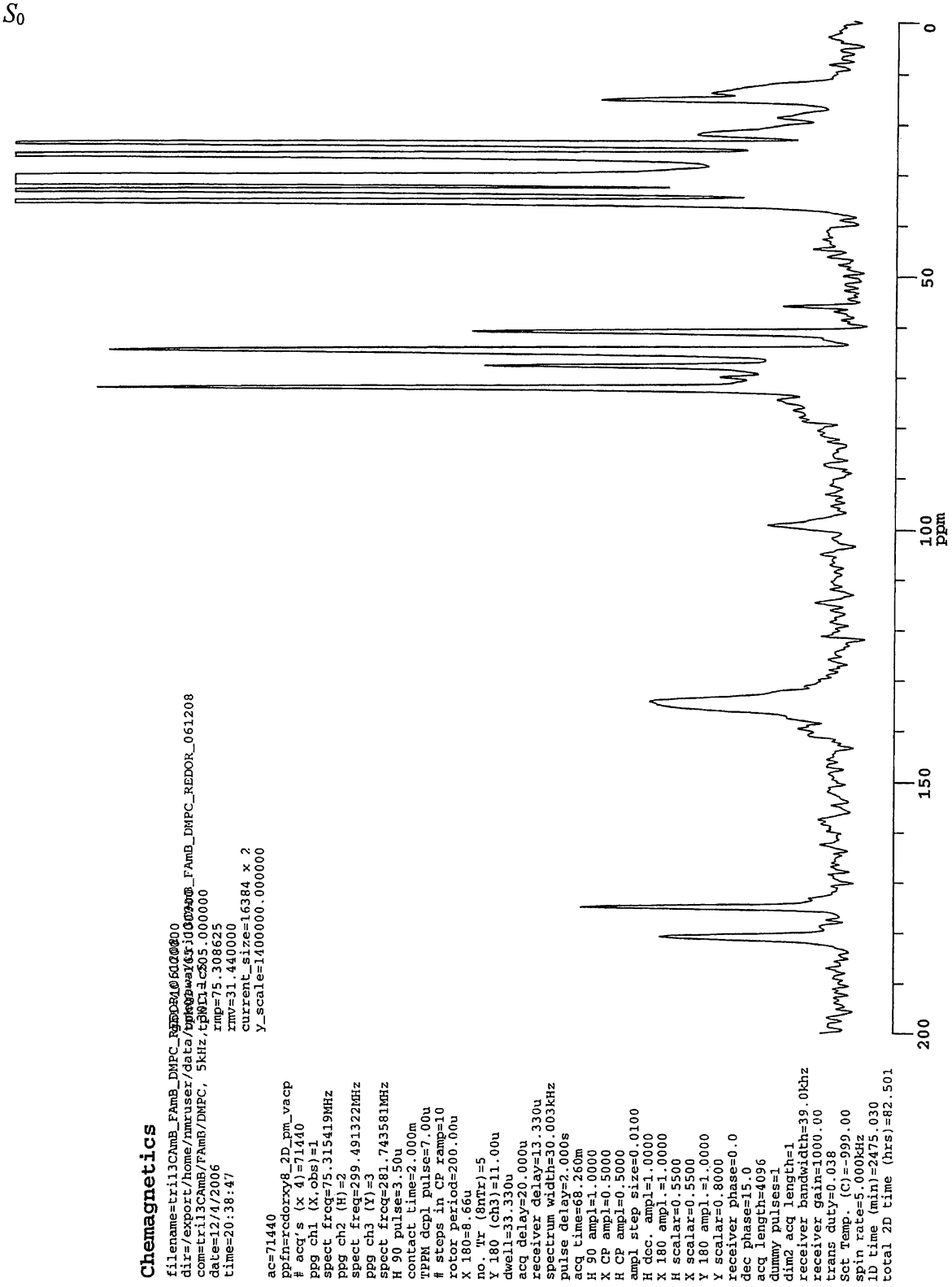
```
filename=none
dir=/export/home/nmruser/data/sa
com=tri13CAmB/FAmB/DMPC, 5kHz, 30C,1c3
date=12/13/2006
time=17:57:48

ac=47088
ppfn=cp180X_3ch
# acq's (x 4)=64
ppg ch1=3
spect freq=75.3112191MHz
ppg ch2=2
ppg ch3=1
spect freq=299.4940000MHz
spect freq=30.3483670MHz
H 90 pulse=3.04u
contact time=0.210m
X 90 pulse=0.10u
receiver delay=13.33u
dwell=33.330u
acq delay=20.00u
spectrum width=30.003kHz
pulse delay=5.000s
acq time=68.260m
X 90 ampl=1.0000
H rf ampl=1.0000
X CP ampl=1.0000
H CP ampl=0.5500
X scalar=0.6500
H dec. ampl=1.0000
receiver phase=90.0
H scalar=0.4700
acq length=2048
dummy pulses=0
receiver bandwidth=39.0khz
receiver gain=1000.00
trans duty=0.014
Set Temp. (C)=-999.00
spin rate=3.500kHz
1D time (min)=21.626
gb1=20.000000
tph01=177.798157
tph11=-183.000000
rmp=75.308636
rmv=31.440000
current_size=16384
y_scale=1399999.875000
```



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 8 ms, temp: 30 °C

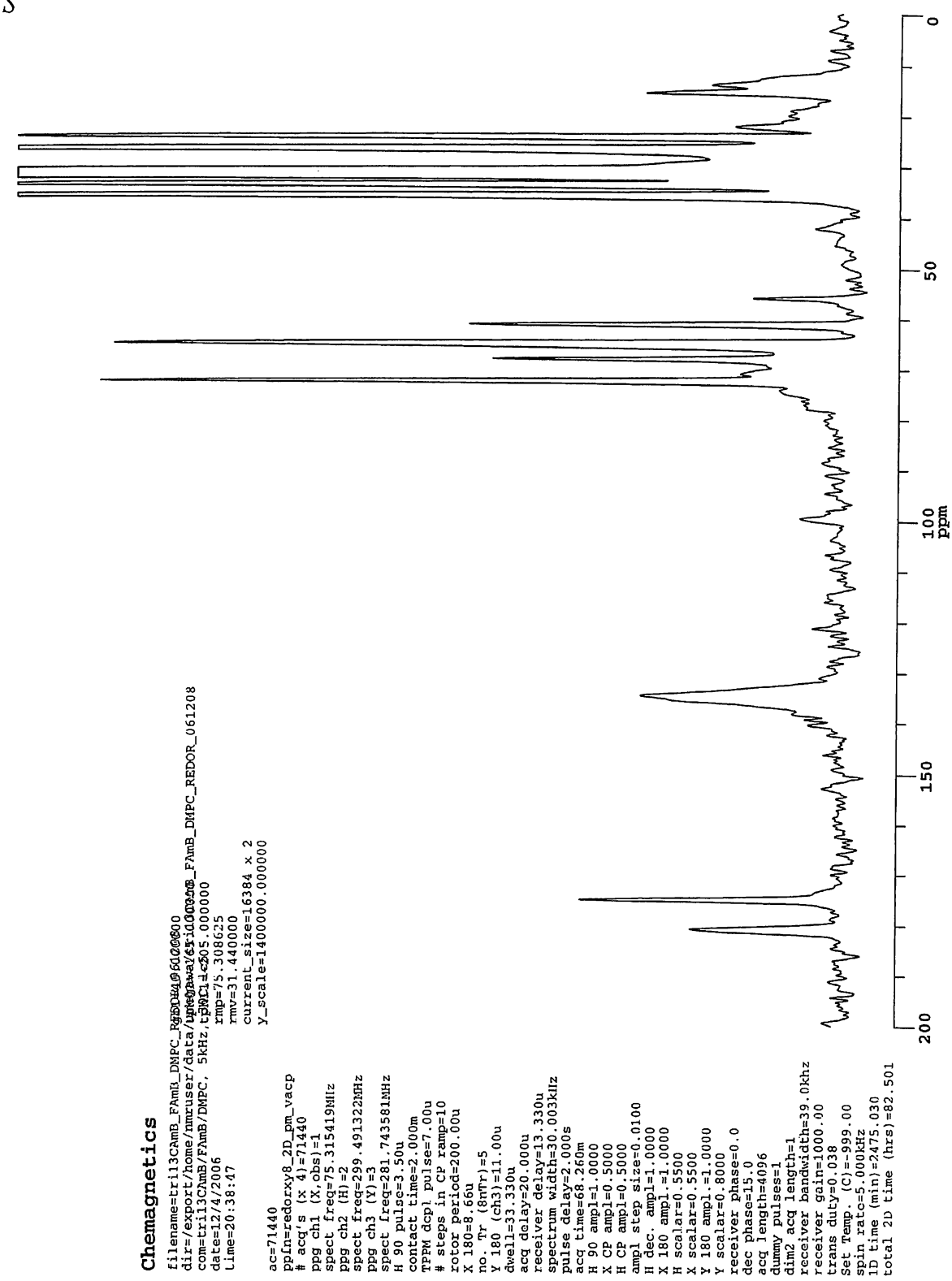
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 8 ms, temp: 30 °C

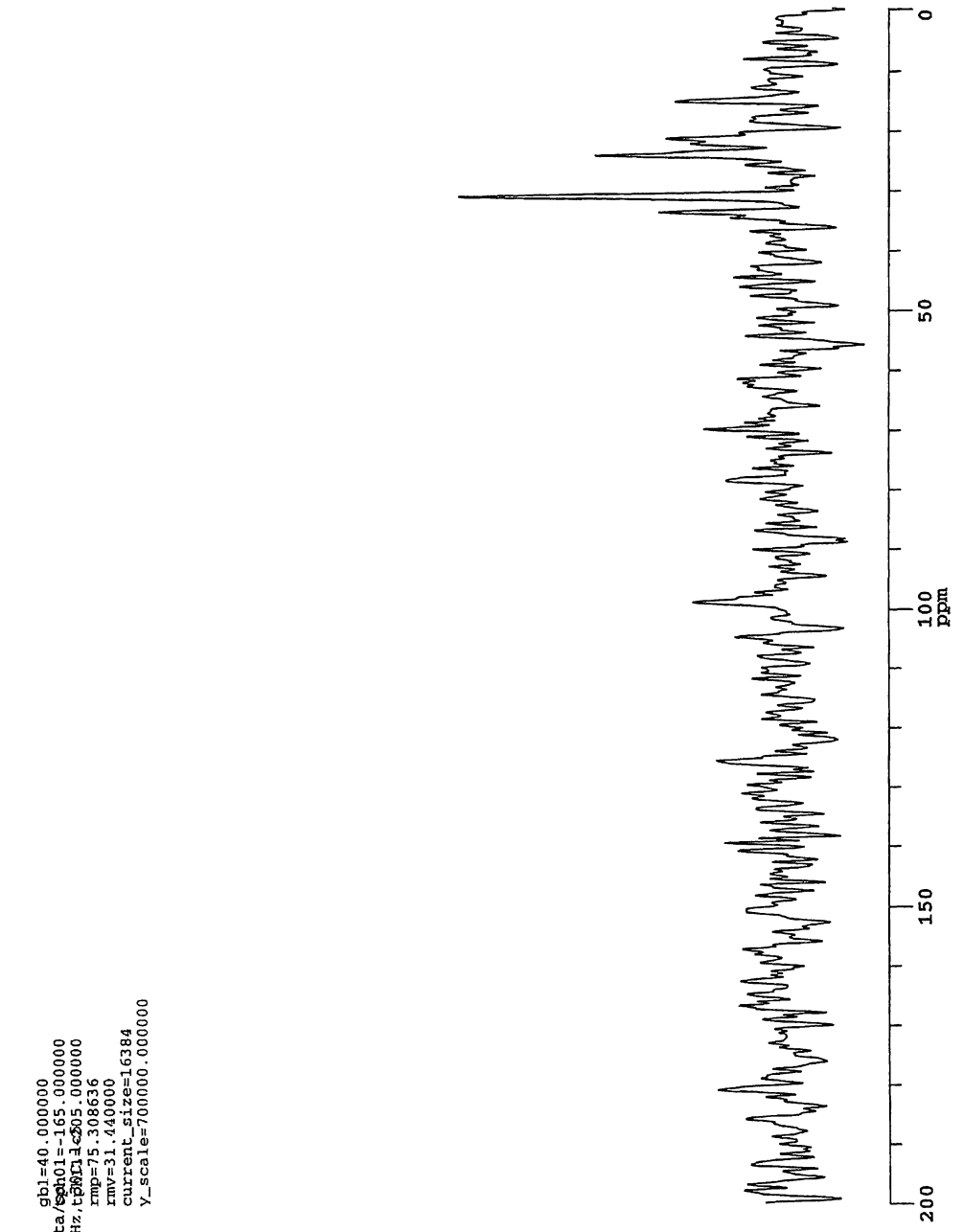
S



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 8 ms, temp: 30 °C

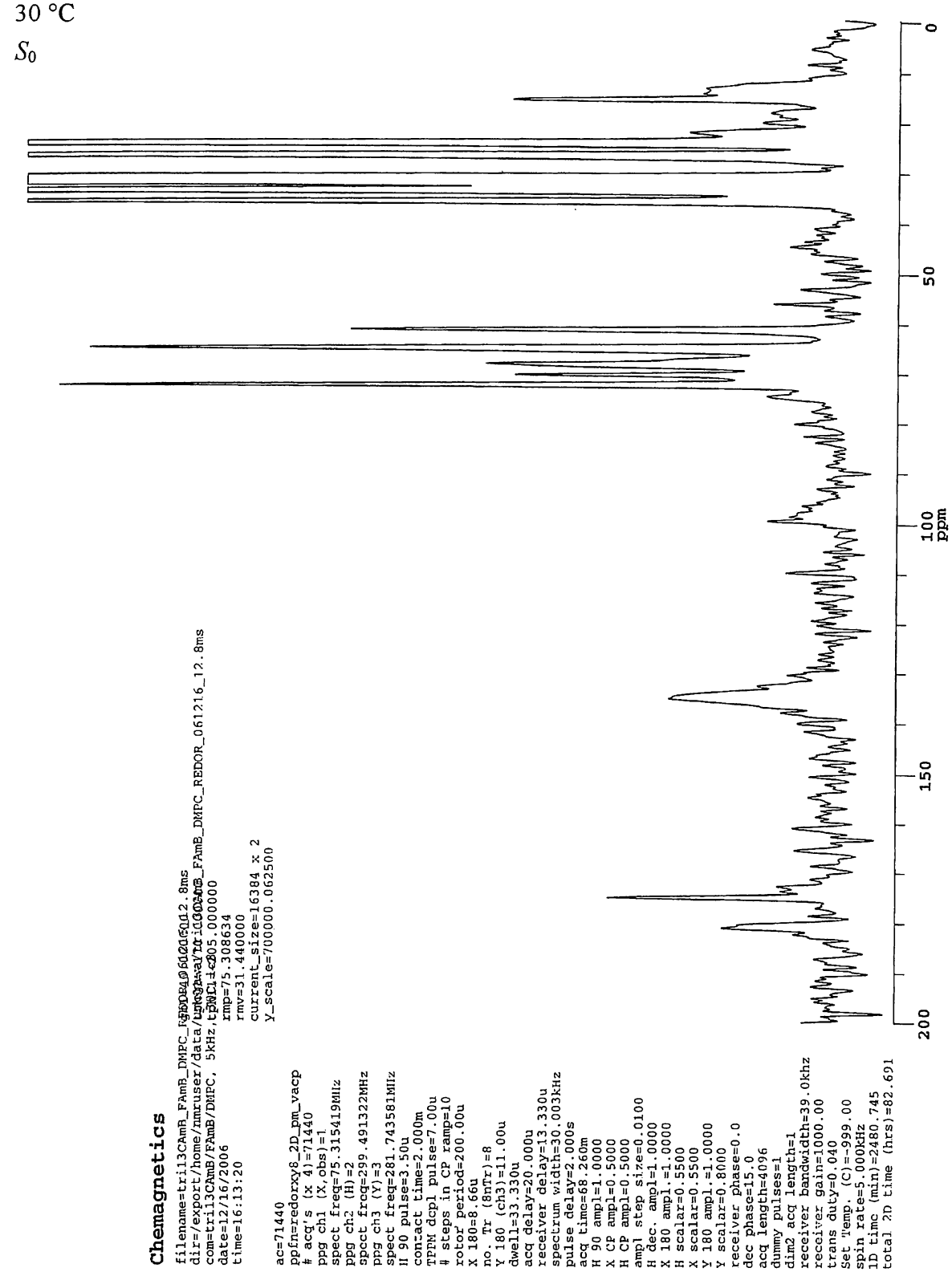
ΔS (Y×2)



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

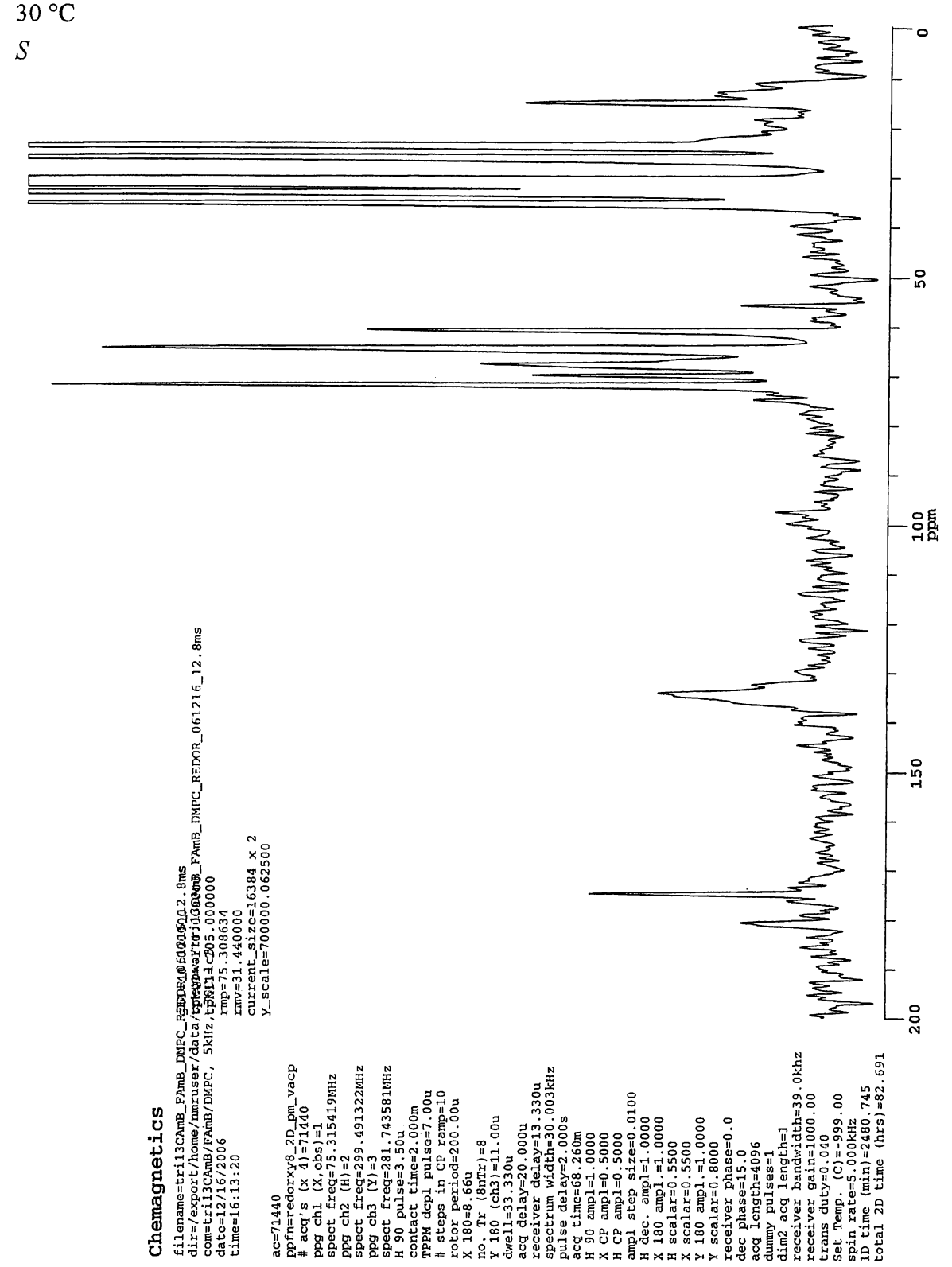
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

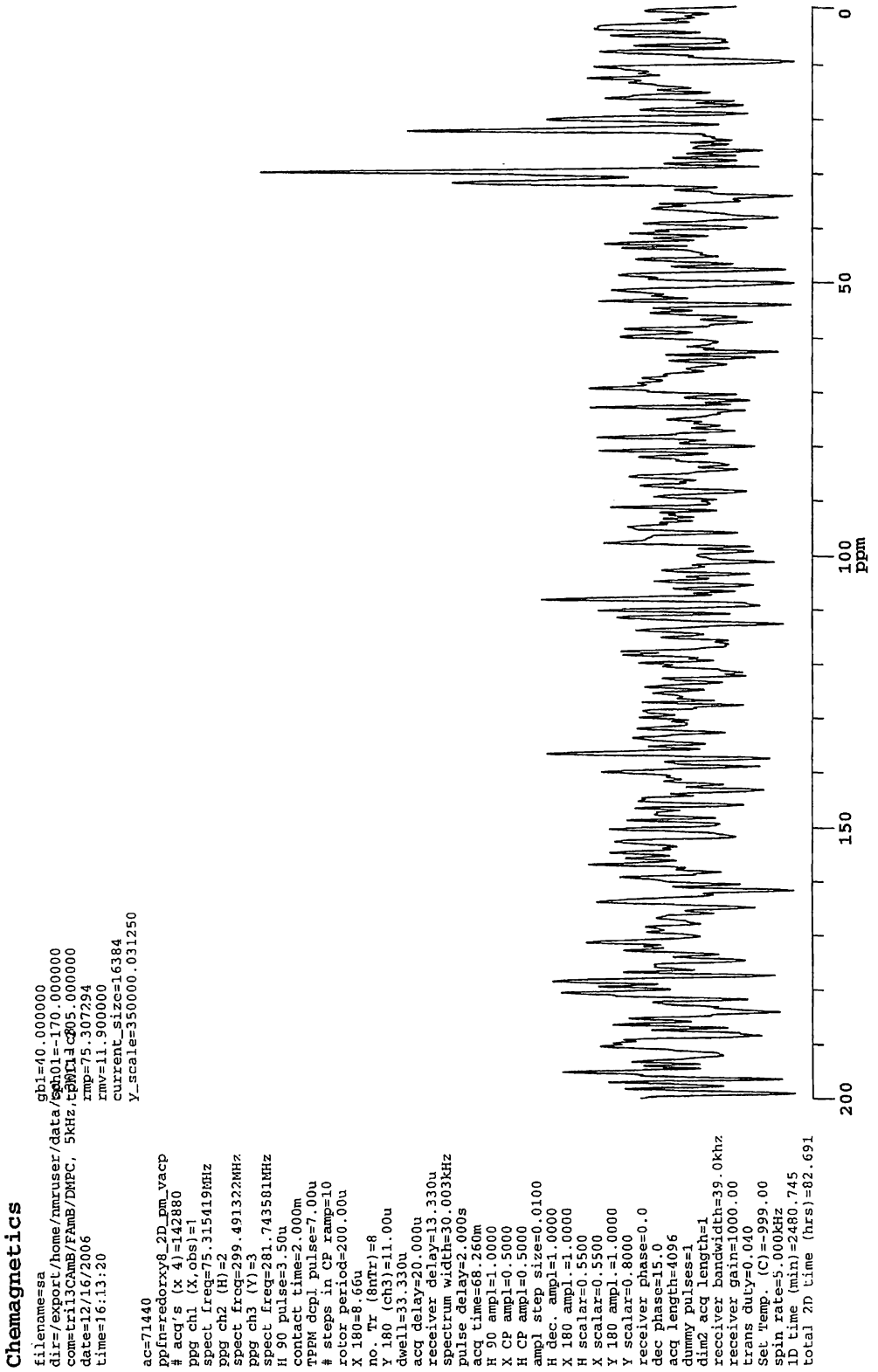
S



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

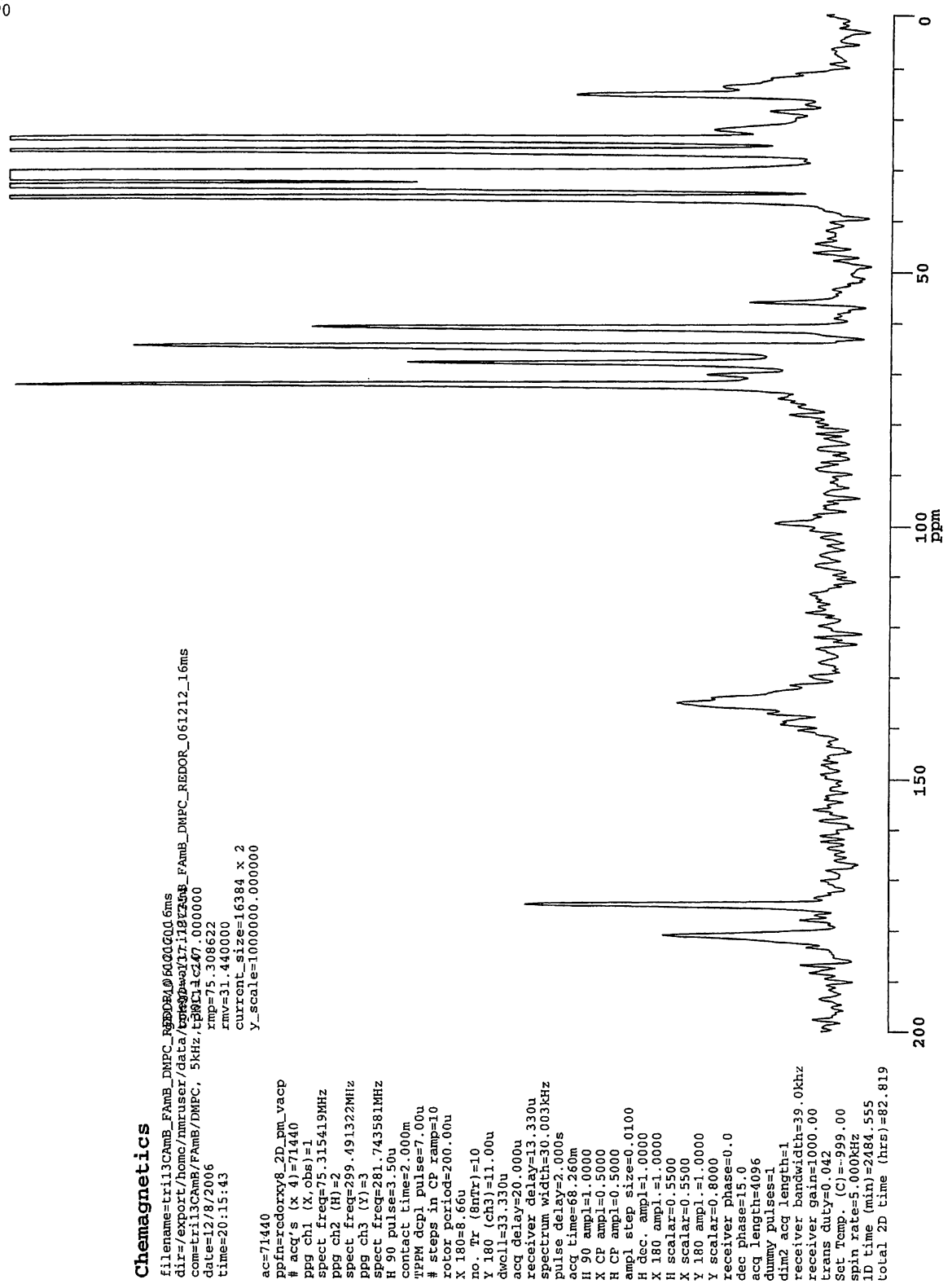
ΔS (Y×2)



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 16 ms, temp: 30 °C

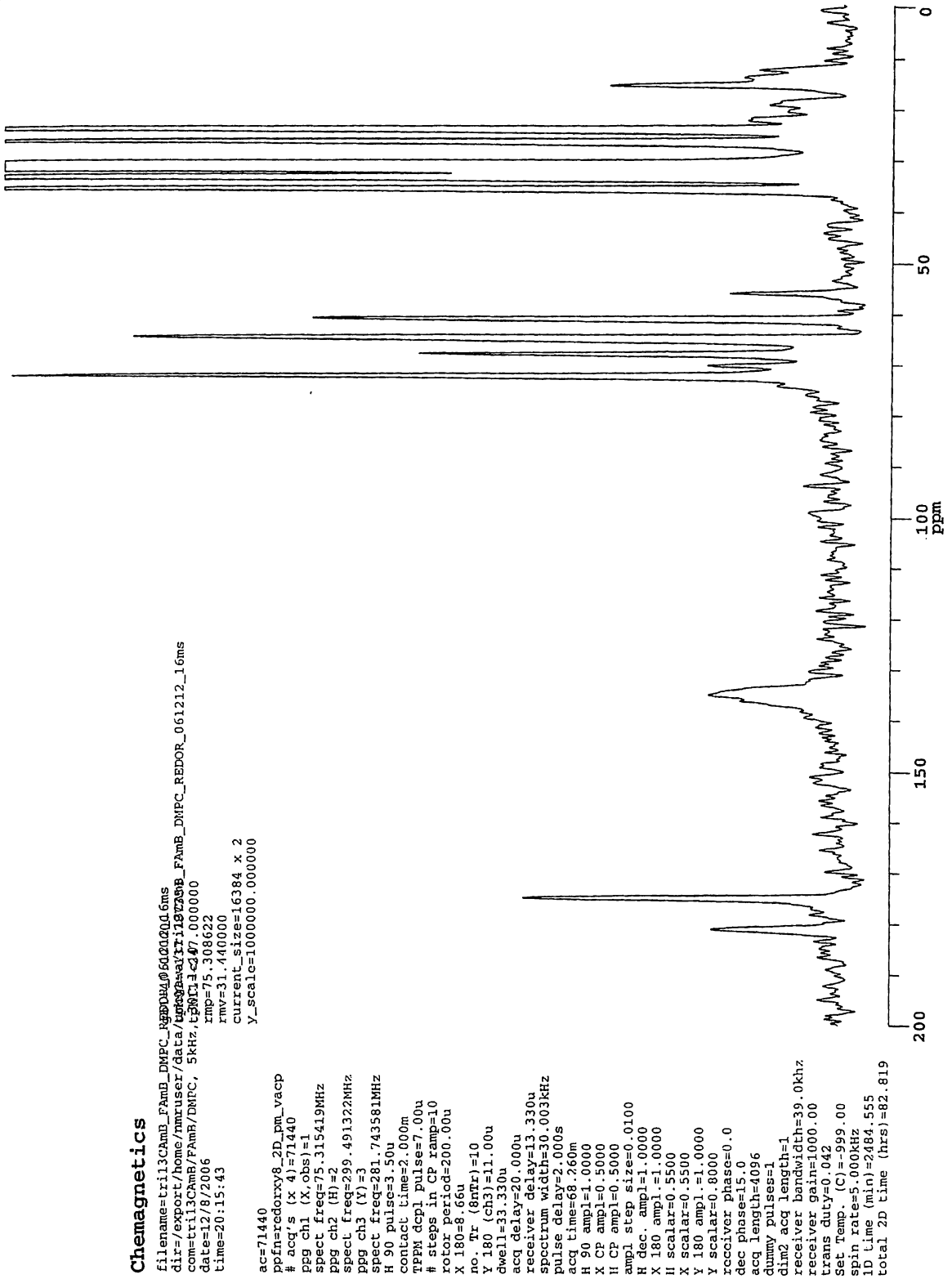
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 16 ms, temp: 30 °C

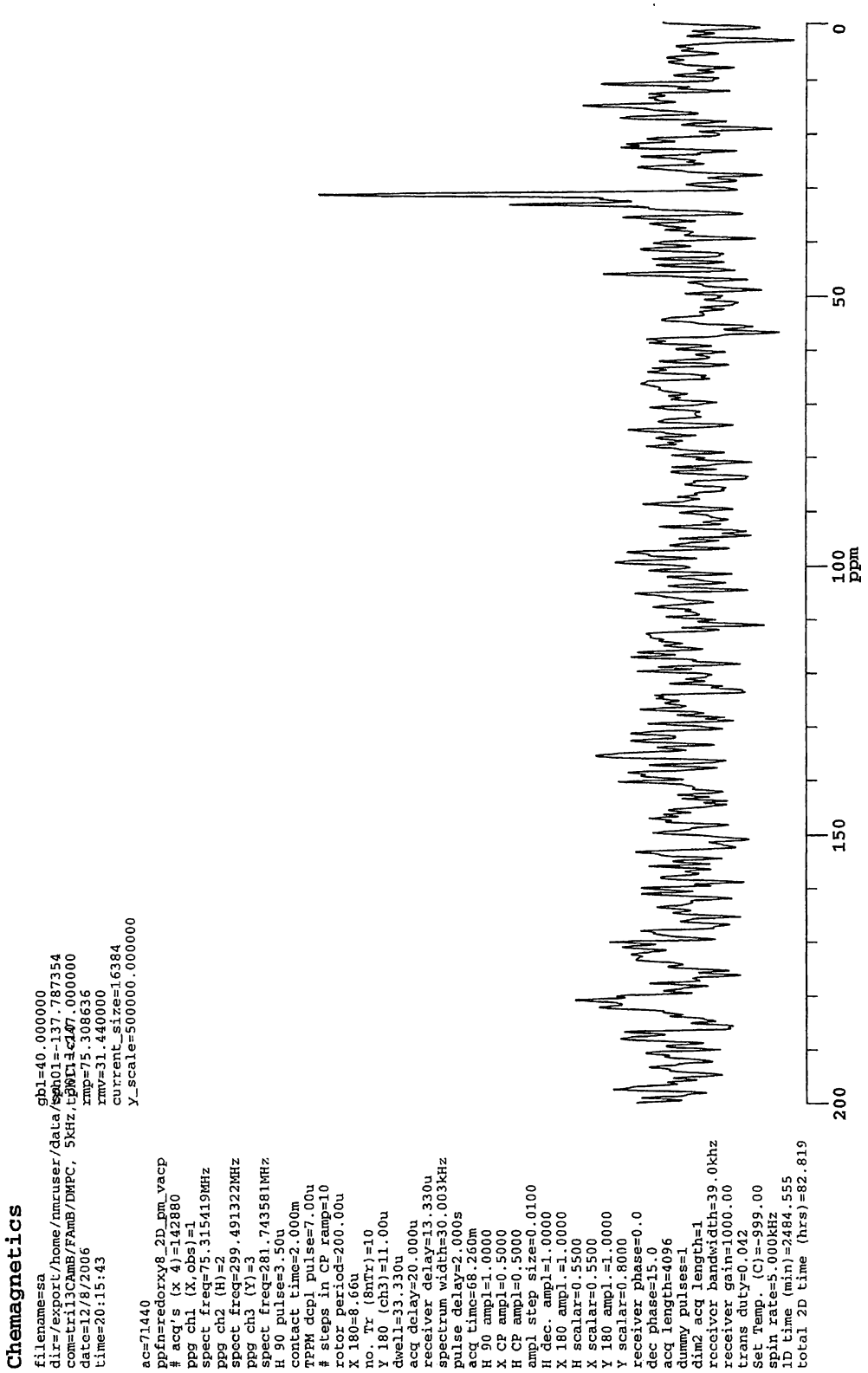
S



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 16 ms, temp: 30 °C

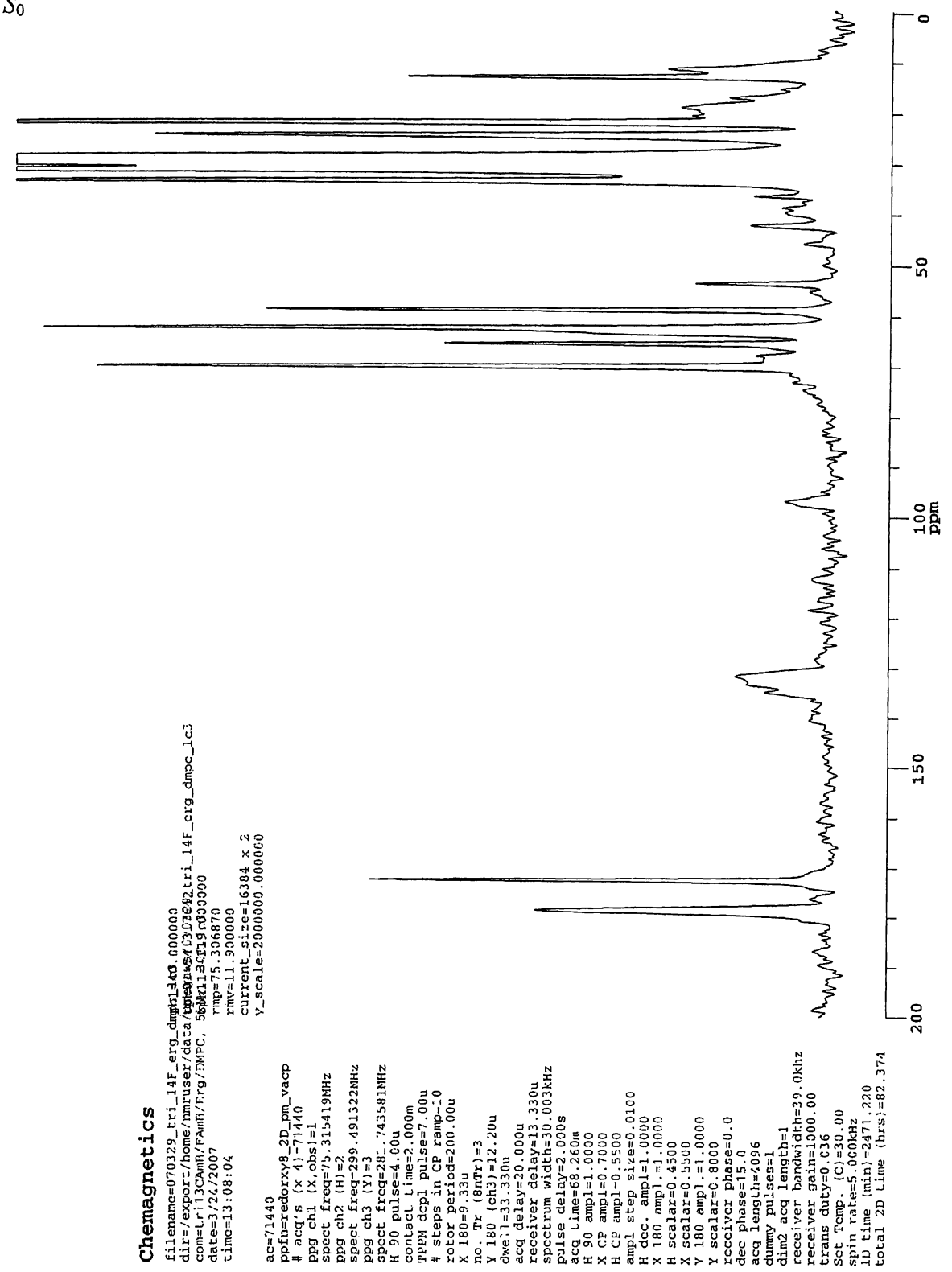
ΔS (Y×2)



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

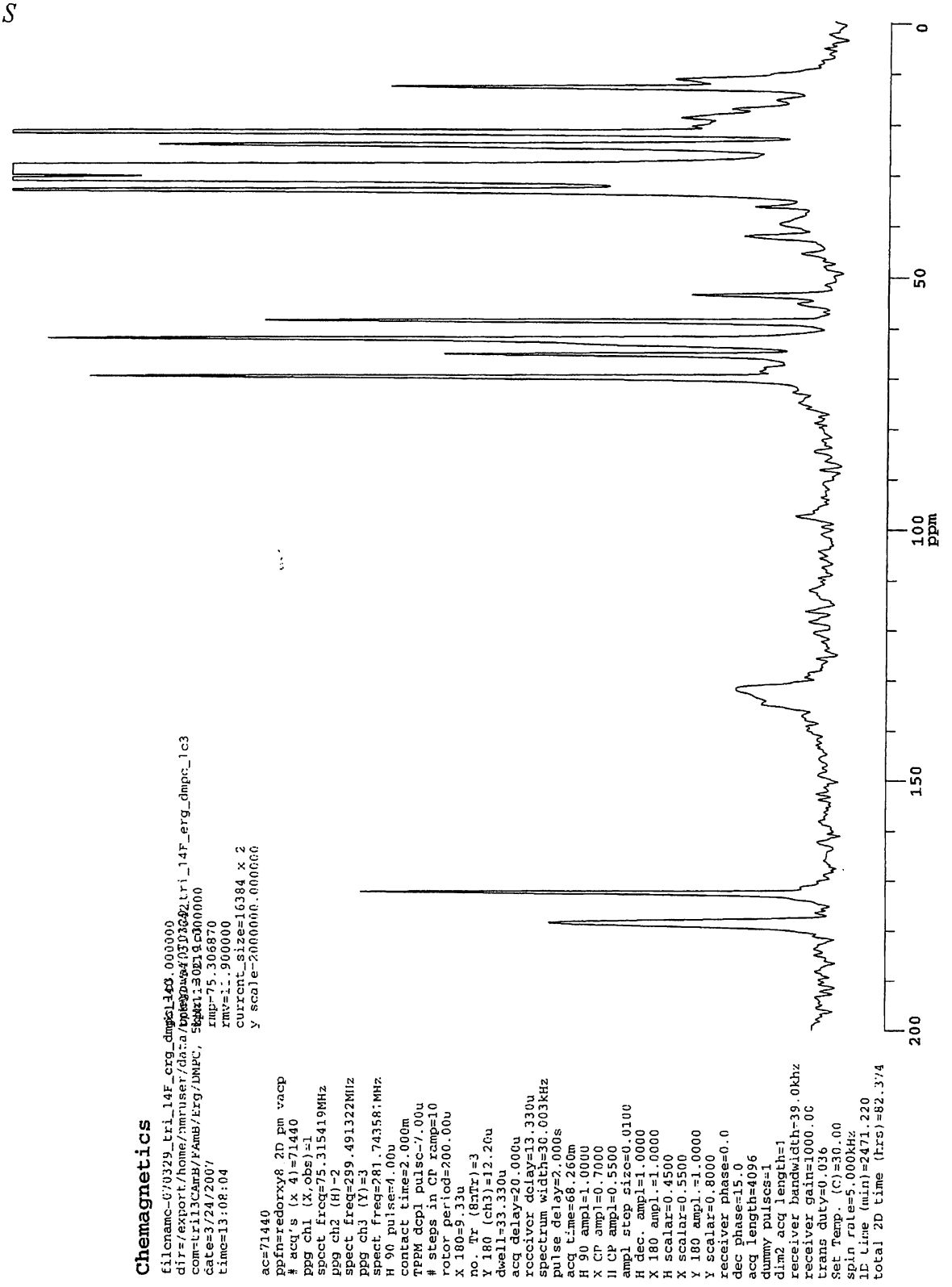
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

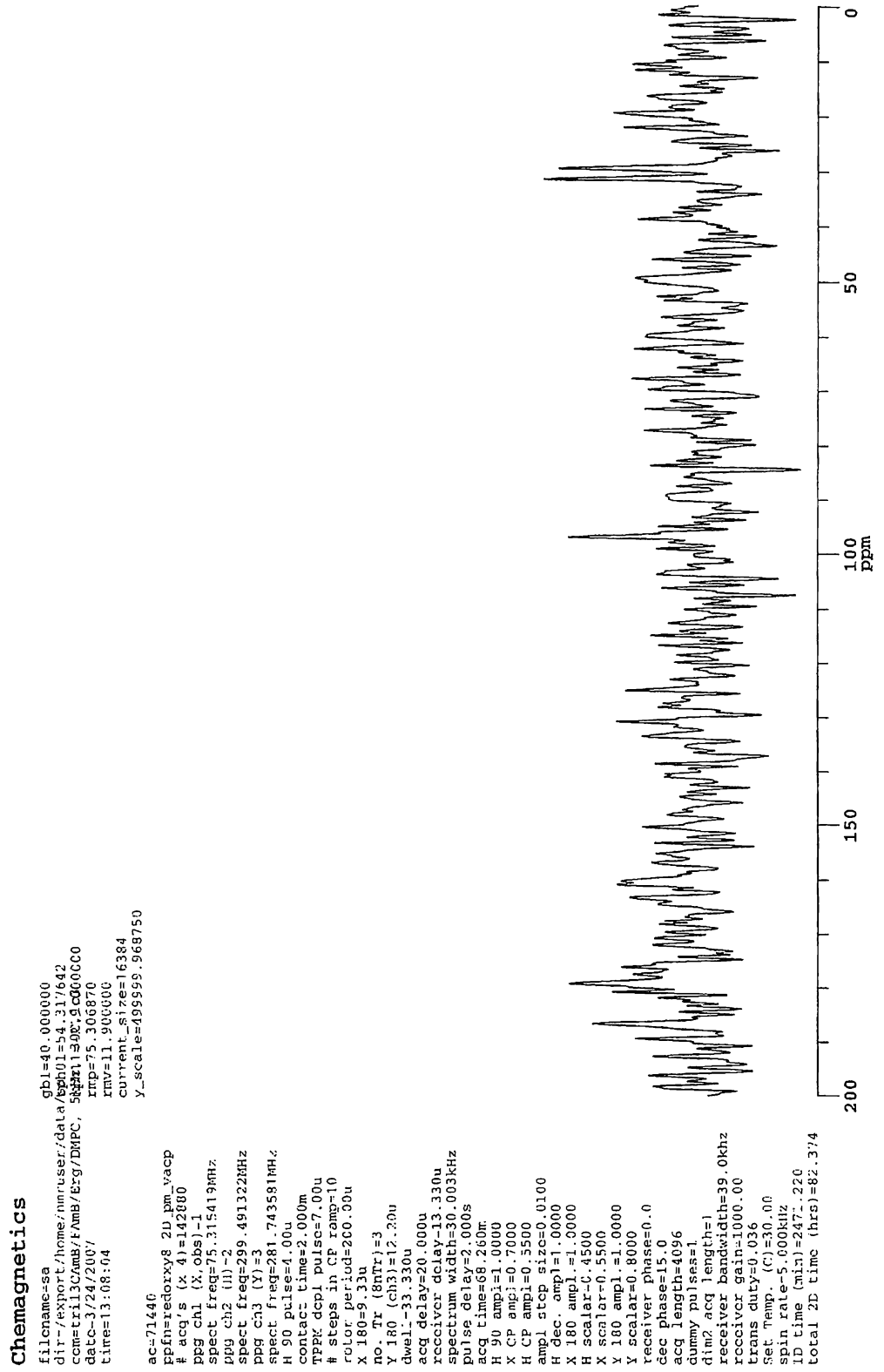
S



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 4.8 ms, temp: 30 °C

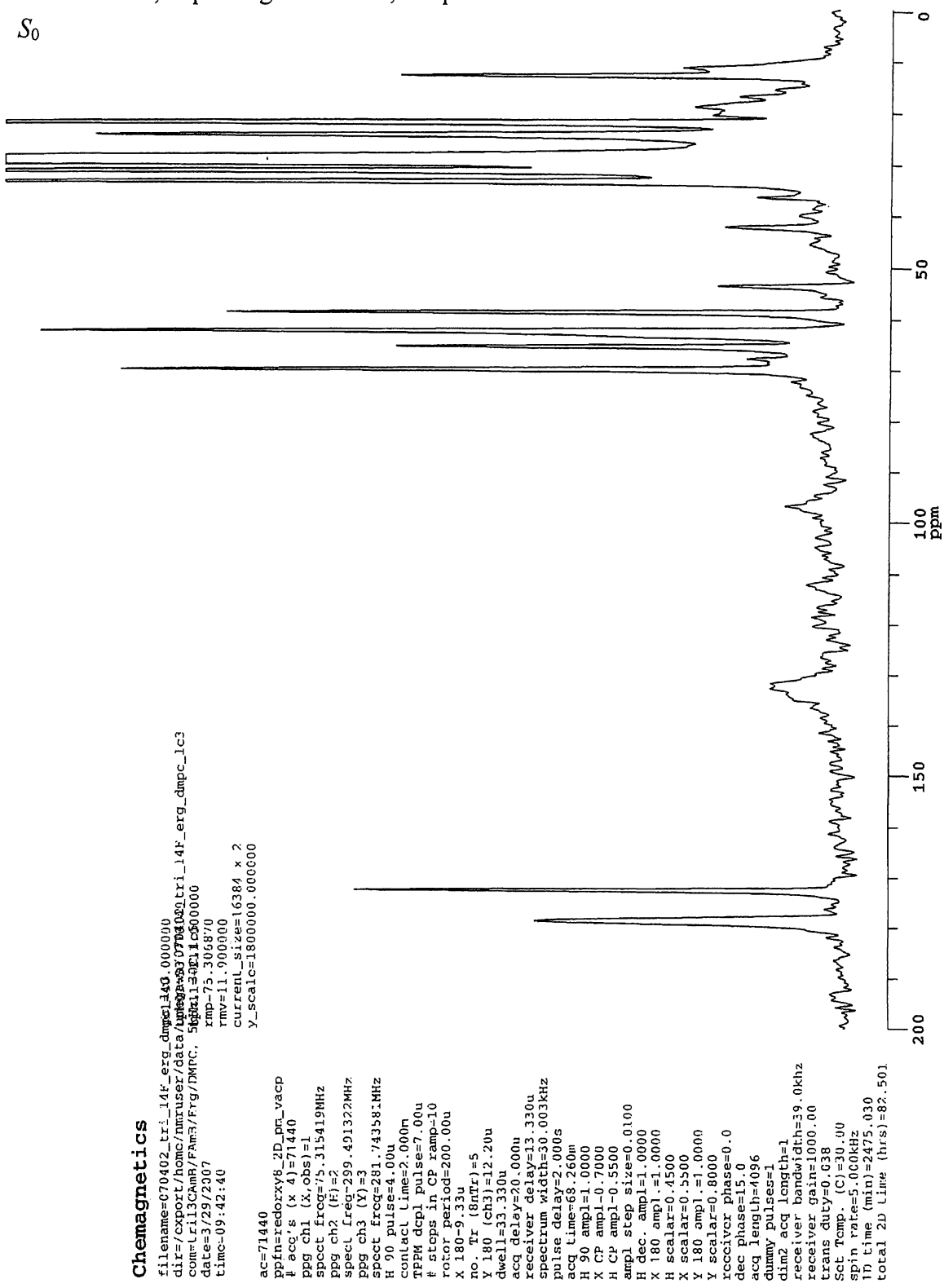
ΔS (Y×2)



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 8 ms, temp: 30 °C

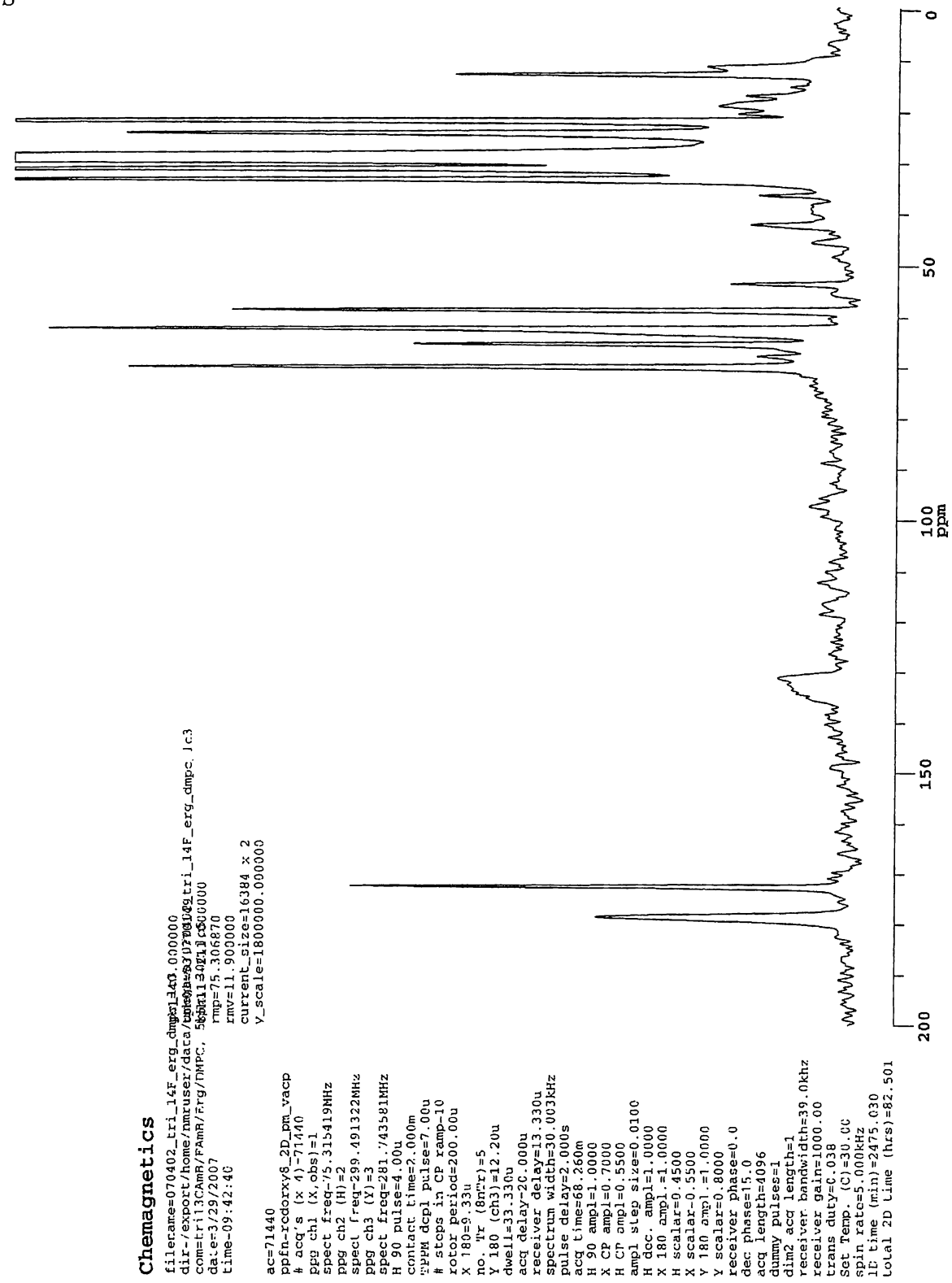
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 8 ms, temp: 30 °C

S



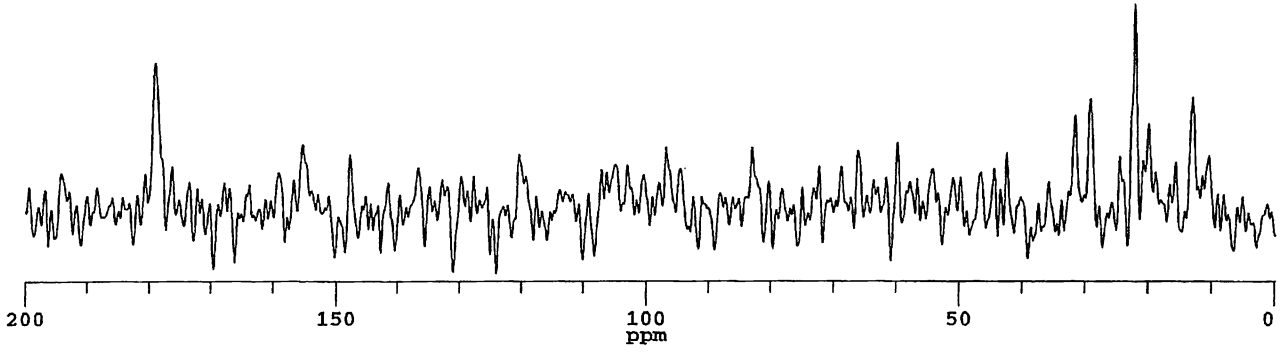
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 8 ms, temp: 30 °C
ΔS (Y×2)

Chemagnetics

filename=sa
dir=/export/home/nmruser/data/
com=tri13CAmB/FAmB/Erg/DMPC,
date=3/29/2007
time=09:42:40

gbl=40.000000
spn01=53.770149
rmp=75.306870
rmv=11.900000
current_size=16384
y scale=900000.000000

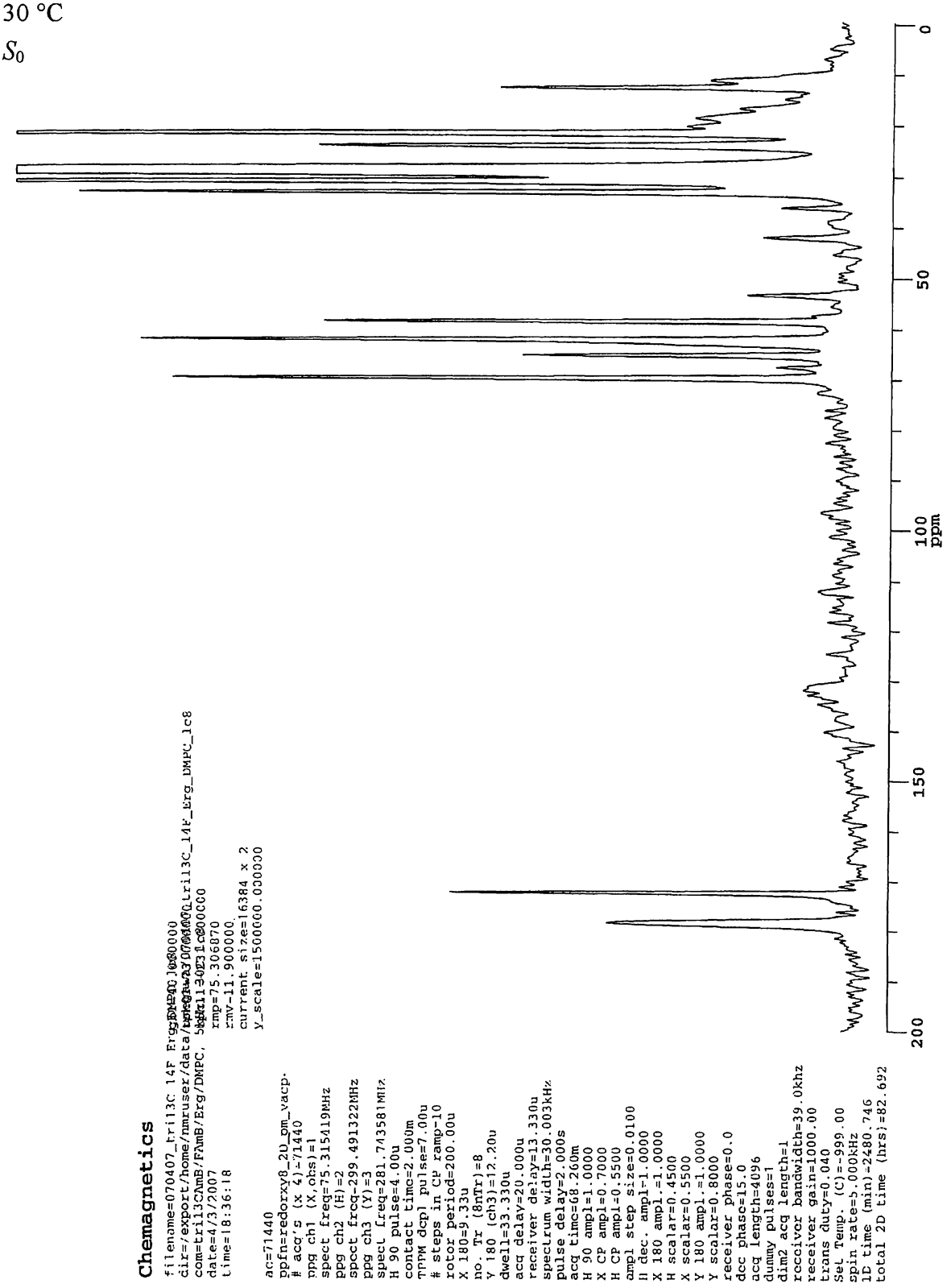
ac=71440
ppfn-redorxy8 2D.pm vacp
acq's (x 4)=142880
ppg ch1 (X,obs)-1
spect freq=75.315419MHz
ppg ch2 (H)-2
spect freq=299.491322MHz
ppg ch3 (Y)=3
spect freq=281.743581MHz
H 90 pulse=4.00u
contact time=2.000m
TPPM dcpl pulse=7.00u
steps in CP ramp=10
rotor period=200.00u
X 180=9.33u
no. Tr (8nTr)=5
Y 180 (ch3)=12.20u
dwell=33.330u
acq delay=20.000u
receiver delay-13.330u
spectrum width=30.003kHz
pulse delay=2.000s
acq time=68.260m
H 90 ampl=1.0000
X CP ampl=0.7000
H CP ampl=0.5500
ampl step size=0.0100
H dec. ampl=1.0000
X 180 ampl.=1.0000
H scalar=0.4500
X scalar=0.5500
Y 180 ampl.=1.0000
Y scalar=0.8000
receiver phase=0.0
dec phase=15.0
acq length=4096
dummy pulses=1
dim2 acq length=1
receiver bandwidth=39.0khz
receiver gain=1000.00
trans duty=0.038
Set Temp. (C)=30.00
spin rate=5.000kHz
1D time (min)=2475.030
total 2D time (hrs)=82.501



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

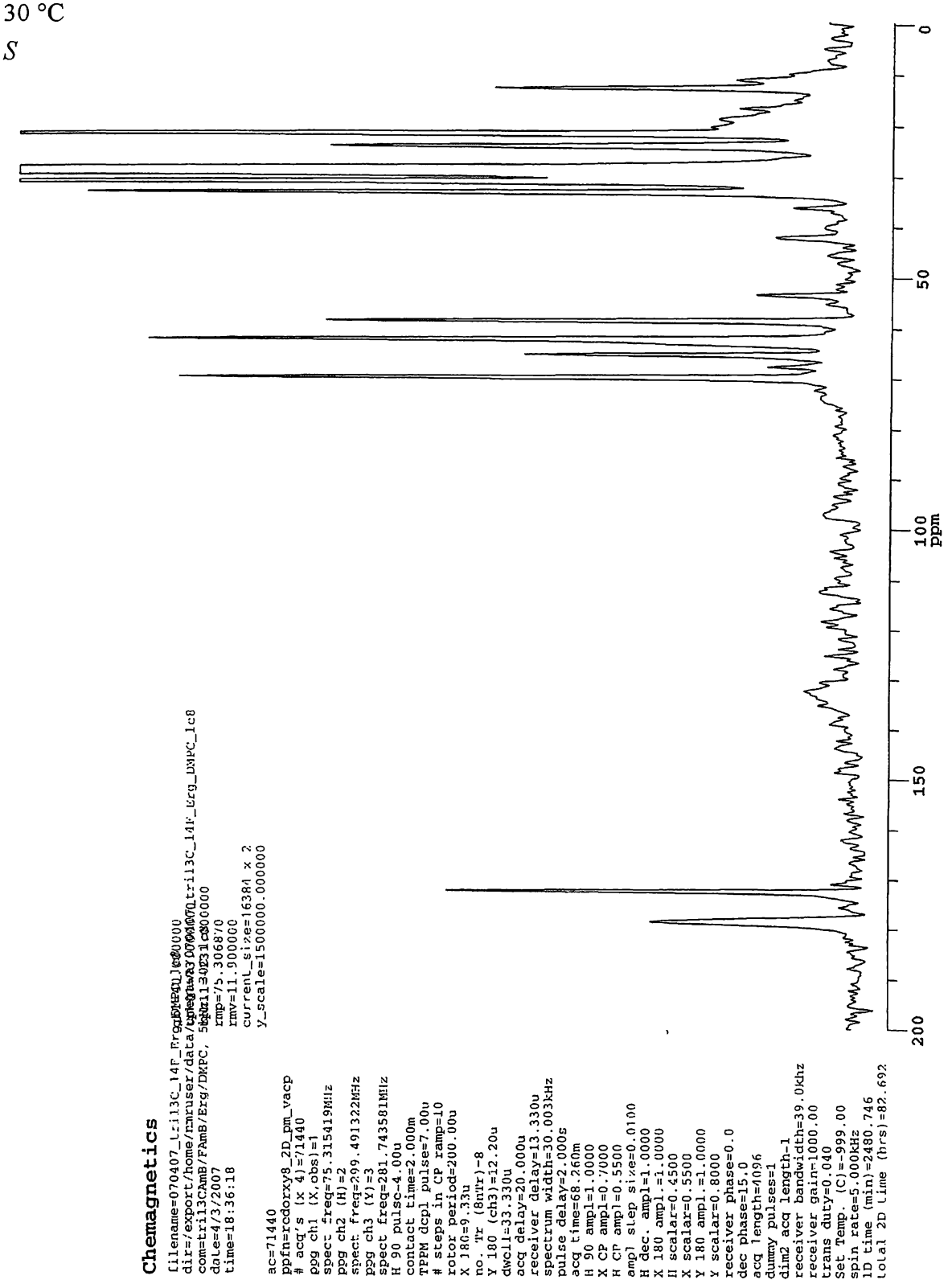
S_0



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C

S



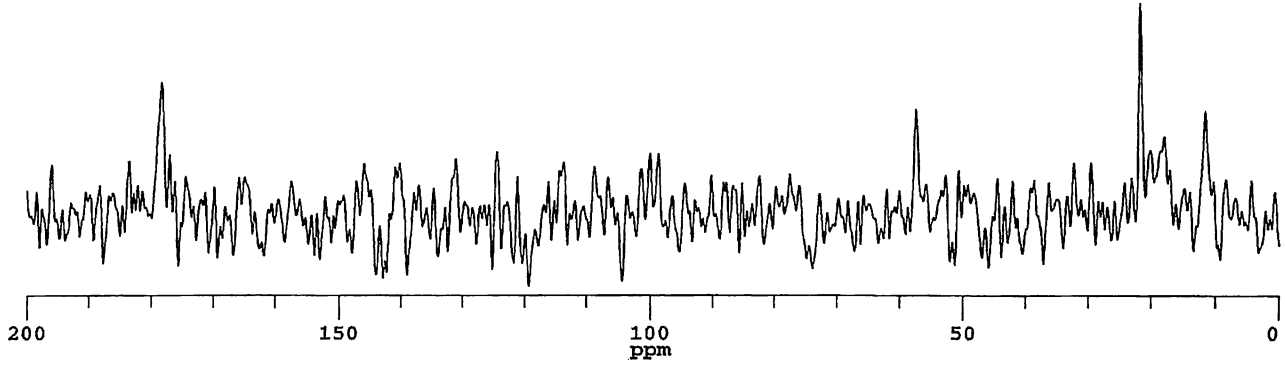
[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC
MAS: 5 kHz, dephasing time: 12.8 ms, temp: 30 °C
ΔS

Chemagnetics

filename=sa
dir=/export/home/nmruser/data/spin01=73.000000
com-tri13CAmB/FAmB/Erg/DMPC, 5kHz11=40.231000000
date-4/3/2007
time=18:36:18

gb1=40.000000
rmp=75.3068770
rmv=11.900000
current_size=16384
y_scale=749999.937500

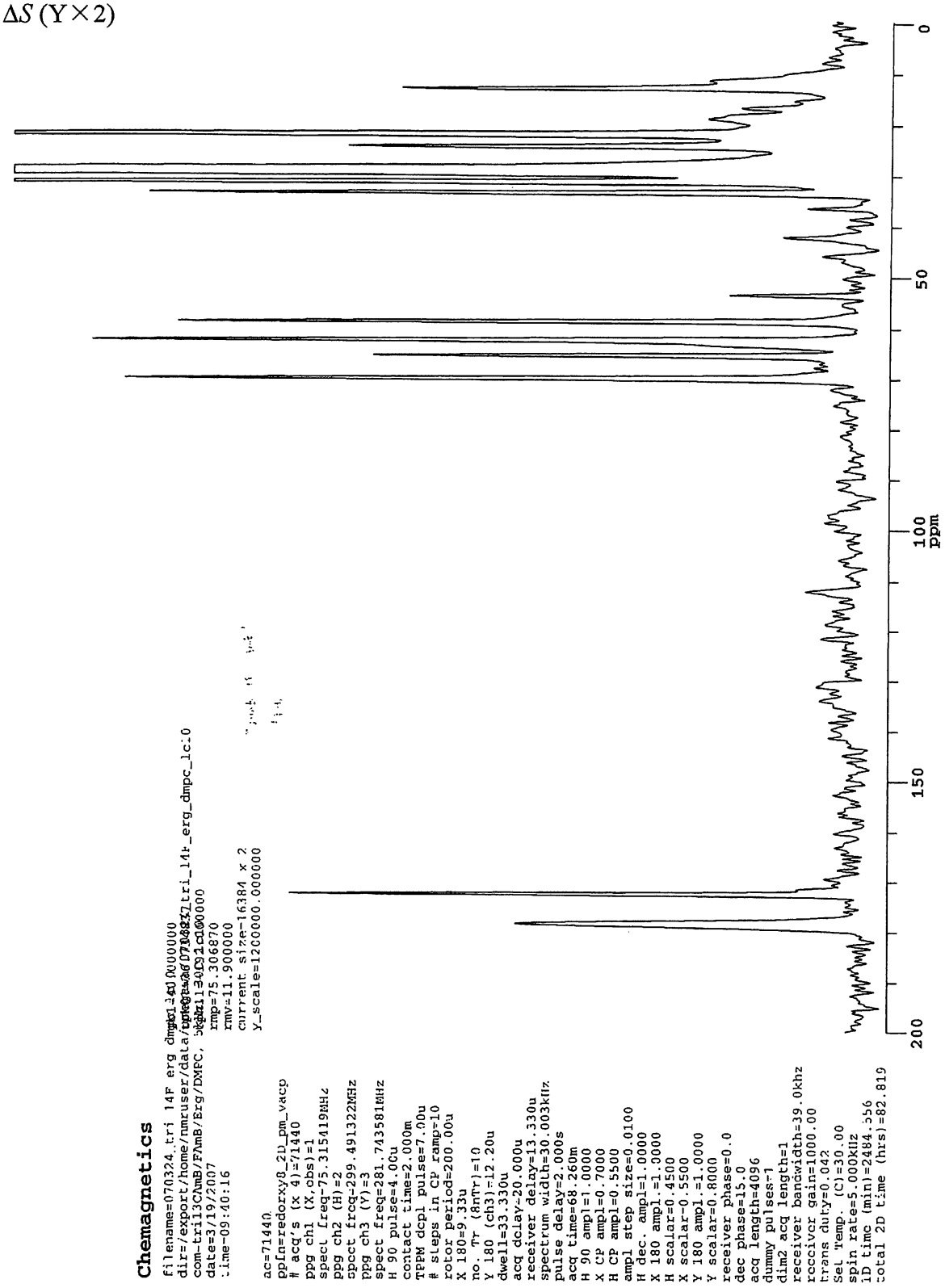
ac=71440
ppfn=redorxy8_2D_pm_vacp
# acq's (x 4)=142880
ppg ch1 (X,obs)=1
spect freq=75.315419MHz
ppg ch2 (H)=2
spect freq=299.491322MHz
ppg ch3 (Y)=3
spect freq=281.743581MHz
H 90 pulse=4.00u
contact time=2.000m
TPPM dcpl pulse=7.00u
steps in CP ramp=10
rotor period=200.00u
X 180=9.33u
no. Tr (8nTr)=8
Y 180 (ch3)=12.20u
dwell=33.330u
acq delay=20.000u
receiver delay=13.330u
spectrum width=30.003kHz
pulse delay=2.000s
acq time=68.260m
H 90 ampl=1.0000
X CP ampl=0.7000
H CP ampl=0.5500
ampl step size=0.0100
H dec. ampl=1.0000
X 180 ampl.=1.0000
H scalar=0.4500
X scalar=0.5500
Y 180 ampl.=1.0000
Y scalar=0.8000
receiver phase=0.0
dec phase=15.0
acq length=4096
dummy pulses=1
dim2 acq length=1
receiver bandwidth=39.0khz
receiver gain=1000.00
trans duty=0.040
Set Temp. (C)=-999.00
spin rate=5.000kHz
1D time (min)=2480.746
total 2D time (hrs)=82.692



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 16 ms, temp: 30 °C

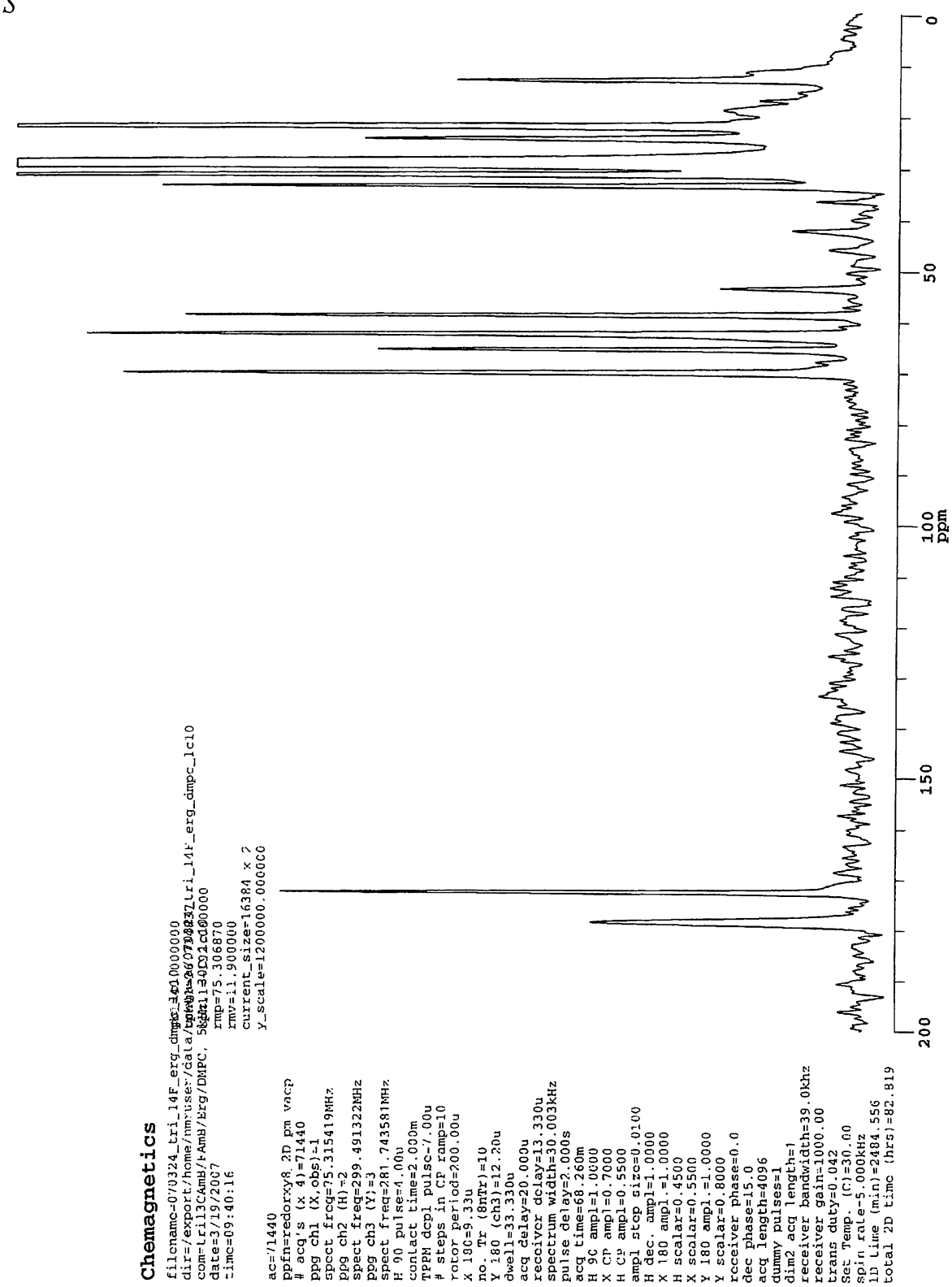
ΔS (Y×2)



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 16 ms, temp: 30 °C

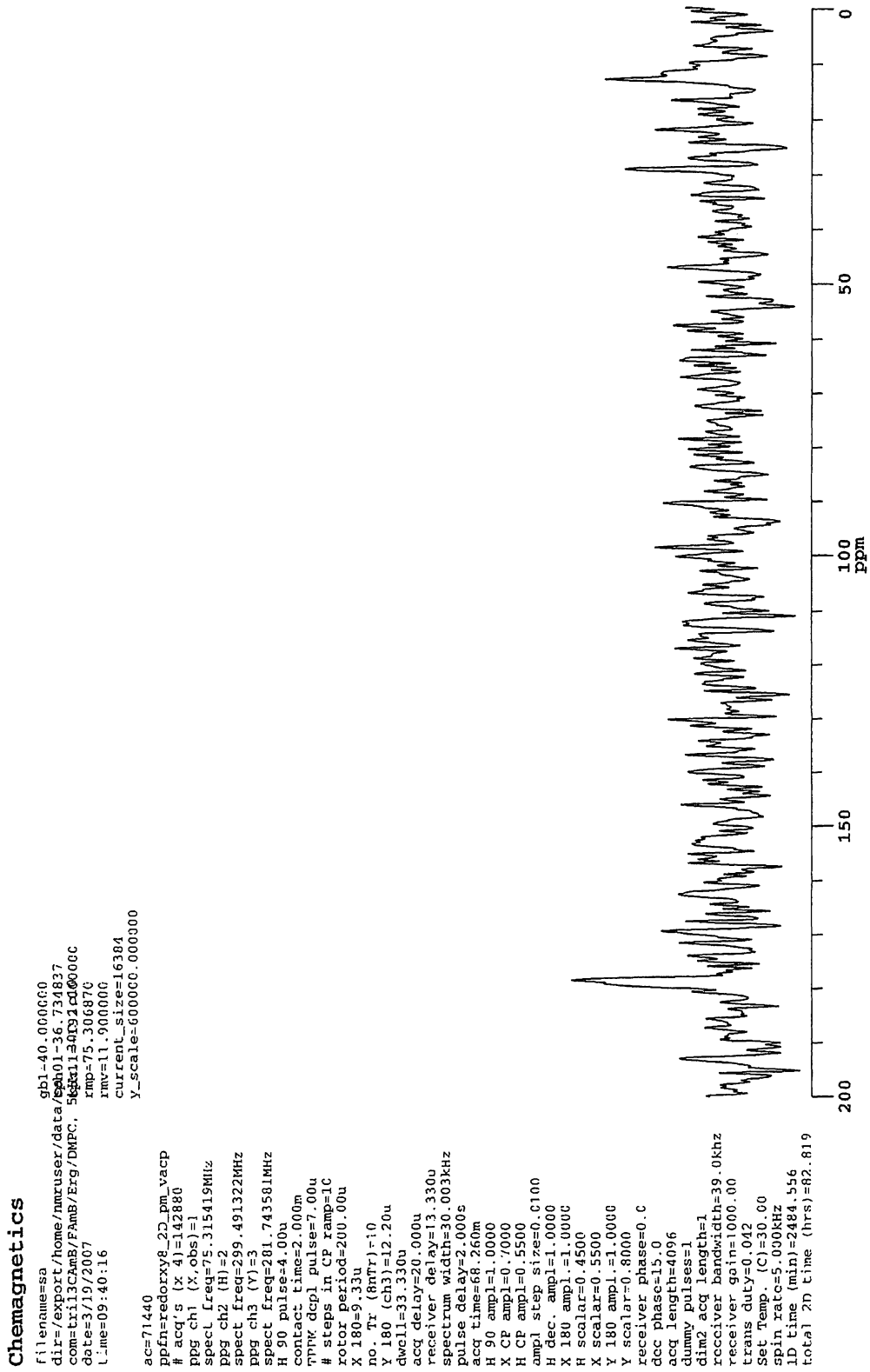
S



[tri-^{13}C]AmB/14-F AmB/ergosterol/DMPC

MAS: 5 kHz, dephasing time: 16 ms, temp: 30 °C

ΔS (Y×2)



謝辞

本研究を行うにあたり、大変多くの方々の御指導、御協力を賜りましたことに対し、ここに感謝の意を表明させて頂きます。

本研究は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で行われたものであり、大変興味あるテーマを与えて下さると共に、終始御指導下さいました本研究室、村田道雄教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたって接御指導賜りました松森信明助教に深く感謝いたします。また有益な御助言、御検討頂きました大石徹助准教授に深く感謝いたします。

固体 NMR 測定において、御指導、御検討頂きました松岡茂博士、葛西祐介博士に心から感謝いたします。また、貴重な標識体を御恵与下さった本研究室の多原主哲修士、野々村健一氏に感謝いたします。

その他、研究のみならず日常生活においても多くの御助言と御協力を頂きました同期の松下直弘博士、毛利良太博士、ならびに本研究室の皆様にも深く感謝いたします。

最後に、経済的、精神的に支えて下さいました両親に深く感謝いたします。

付録

公表論文

Ergosterol increases intermolecular distance of amphotericin B in membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR. Umegawa, Y., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47,* 13463–13469.

参考文献

Bioactive fluorinated derivative of amphotericin B. Matsumori, N., Umegawa, Y., Oishi, T. and Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.

Amphotericin B covalent dimers with carbonyl-amino linkage: a new probe for investigating ion channel assemblies. Umegawa, Y., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3393-3396.

Ion channel complex of antibiotics as viewed by NMR. Murata, M., Kasai, Y., Umegawa, Y., Matsushita, N., Tsuchikawa, H., Matsumori, N. and Oishi, T. *Pure Appl. Chem.*, In press.

BIOCHEMISTRY

Subscriber access provided by OSAKA UNIV

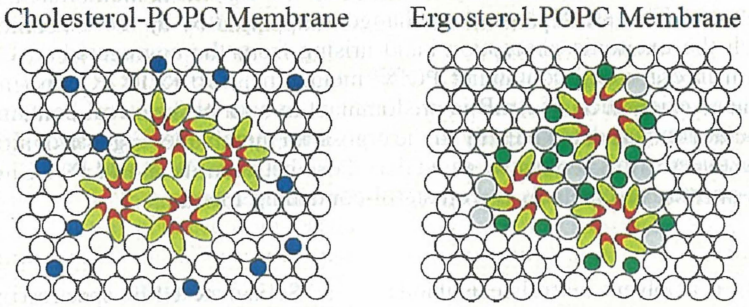
Article

Ergosterol Increases the Intermolecular Distance of Amphotericin B in the Membrane-Bound Assembly As Evidenced by Solid-State NMR

Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, and Michio Murata

Biochemistry, **2008**, 47 (51), 13463-13469 • Publication Date (Web): 24 November 2008

Downloaded from http://pubs.acs.org on December 19, 2008



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

View the Full Text HTML

ACS Publications
High quality. High impact.

Biochemistry is published by the American Chemical Society. 1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

Biochemistry **2008,** *47,* 13463–13469

Ergosterol Increases the Intermolecular Distance of Amphotericin B in the Membrane-Bound Assembly As Evidenced by Solid-State NMR†

Yuichi Umegawa, 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 October 4, 2008; Revised Manuscript Received November 3, 2008

ABSTRACT: Amphotericin B (AmB) exerts its antifungal activity by forming ion-permeable assemblies across lipid bilayers. To investigate AmB−AmB bimolecular interactions in the assembly, we carried out ^{13}C{^{19}F}REDOR experiments using 14-^{19}F- and ^{13}C41-labeled AmBs in sterol-containing and sterol-free palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) membranes and measured the average distance between the labeled sites of AmBs in membrane-bound forms. The REDOR results suggested that the intermolecular distance of AmB molecules is significantly increased in the ergosterol membrane as compared with the cholesterol membrane. This sterol-dependent change was supported by the UV spectra of AmB in lipid bilayers, in which the excitonic absorption band arising from the aggregated state of AmB shifted to longer wavelength in ergosterol-containing POPC membrane. The REDOR experiments also disclosed that the head-to-head orientation of AmB is predominant in both of the sterol-containing membranes and AmB−POPC interaction was detected only in the ergosterol membrane. Ergosterol significantly influences the interactions between AmB molecules as well as those between AmB and POPC, which may facilitate formation of ion-permeable channels in ergosterol-containing membrane.

Amphotericin B (AmB)[1] is a polyene macrolide antibiotic isolated from *Streptomyces nodosus* and used for treatments of systemic fungal infections (*1, 2*). It is known that AmB forms ion-permeable channels in cell membranes in a sterol-dependent manner, where higher affinity to ergosterol than to cholesterol is thought to be responsible for selective toxicity to fungi. The architectures of this AmB ion channel have been extensively studied so far, which include the famous "barrel-stave" model (*3*), where the polyhydroxy part of AmB comes close together to form a hydrophilic pore and the hydrophobic polyene region faces outside to interact with sterol and phospholipid. Based on this channel model, a number of *in silico* studies have been carried out to provide more plausible channel architectures; e.g., Baginski et al. have performed computer simulations for AmB assemblies (*4*) and deduced that the amino group of AmB interacts with the carboxylic acid of a neighboring AmB molecule, which leads to the "head-to-head" interaction in the assembly. However, details of the intermolecular interactions remain largely unknown chiefly due to the luck of proper experimental methodologies to examine the molecular recognitions among membrane-bound entities.

Solid-state NMR spectroscopy provides a versatile tool for the structural elucidation of biological molecules in membranes (*5*−*7*). The rotational echo double resonance (REDOR) experiment is one of the important techniques frequently used for measurement of interatomic distance (*8, 9*). In particular, ^{13}C{^{19}F}REDOR makes it possible to measure long-range ^{13}C−^{19}F distances over 10 Å (*10*) since the ^{19}F nucleus possesses favorable features such as high gyromagnetic ratio, 100% natural abundance, and low background signals. Application of this technique is, however, mostly limited to small peptides mainly due to the feasibility of preparing ^{13}C- and ^{19}F-labeled compounds. Therefore, it is still challenging to explore the applicability of REDOR techniques for nonpeptidic compounds such as AmB.

In the previous studies, we examined the AmB−phospholipid (*11, 12*) and AmB−sterol (*13*) interactions using solid-state NMR and demonstrated the utility of this method for the structural elucidation of membrane-bound assemblies at the atomic level. In those reports we proposed that AmB forms a single-length channel, which is surrounded by ergosterol molecules. However, the AmB−AmB interaction remains unanswered. In this study we report the first direct observation of the bimolecular interaction of AmB in membrane-bound forms using ^{13}C{^{19}F}REDOR techniques.

MATERIALS AND METHODS

Materials. AmB and cholesterol were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Ergosterol was from Tokyo Kasei (Tokyo, Japan), and palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) was from Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, AL). [tri-^{13}C]AmB (**1**) was prepared as reported previously (*11*). Briefly, the AmB-producing species *S. nodosus* was

† This work was supported by Grant-In-Aids for Young Scientists (A) (Grant 17681027), for Scientific Research (B) (Grant 20310132) and (S) (Grant 18101010) from MEXT, Japan, and Grants in Aid for Scientific Research from JSPS.

* Corresponding authors. Tel/Fax: +81-6-6850-5774. E-mail: murata@ch.wani.osaka-u.ac.jp; matsumori@ch.wani.osaka-u.ac.jp.

[1] Abbreviations: AmB, amphotericin B; DPPC, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; PC, phosphatidylcholine; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; HEPES, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid; MAS, magic angle sample spinning; REDOR, rotational echo double resonance.

10.1021/bi801875y CCC: $40.75 © 2008 American Chemical Society
Published on Web 11/24/2008

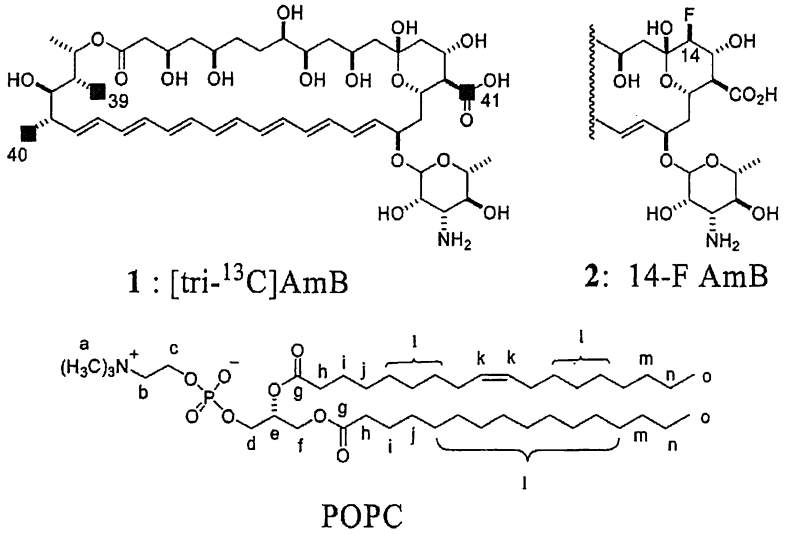


FIGURE 1: Structures of labeled AmBs and phospholipid: **1**, [tri-^{13}C]AmB that is ^{13}C-labeled at the positions indicated by squares; **2**, 14-F AmB; and POPC, palmitoyloleoylphosphatidylcholine.

obtained from American Type Culture Collection (ATCC 14899) and cultured in FCA medium containing sodium [3-^{13}C]propionate to produce site-specifically 39-, 40-, 41-labeled AmB. About 20 mg of **1** with average 15% ^{13}C enrichment at C39, C40, and C41 was obtained from 50 mL of the culture. 14-F AmB (**2**) was chemically derived from AmB as reported previously (*14*). 14-F AmB was purified by silica gel open column chromatography, and its structural identity was confirmed by mass spectrometry and ^{1}H NMR.

Solid-State NMR Measurements. The labeled AmBs **1** (1.8 μmol), **2** (1.8 μmol) and POPC (36.8 μmol) were dissolved in $CHCl_3$/MeOH (10% of POPC was replaced with ergosterol or cholesterol for sterol-containing samples), and the solvent was evaporated to afford a thin film. After drying in vacuo for 8 h, the membrane was hydrated with 31.4 μL of 10 mM HEPES buffer and 1 mL of H_2O and dispersed by vortexing and sonication. Then, the lipid suspension was freeze–thawed five times to produce large vesicles. The suspension was lyophilized, rehydrated with D_2O (31.4 μL), and packed into a glass tube. The glass tube was sealed with epoxy glue and inserted into a ϕ 5 mm MAS rotor. ^{13}C{^{19}F}REDOR spectra were recorded at 75.315 MHz for ^{13}C with ^{19}F irradiation at 281.743 MHz on a CMX300 (Varian/Chemagnetics) spectrometer with the MAS frequency of 5000 ± 2 Hz. The rotor temperature was maintained at 30 ± 1 °C with a temperature controller. The spectral width was 30 kHz. Typically, the $\pi/2$ pulse width for ^{1}H NMR was 4 μs, and the π pulse widths for ^{13}C and ^{19}F were 10 and 12 μs, respectively. The contact time for cross-polarization transfer was set to be 1.5 ms. The REDOR spectra were acquired with a recycle delay of 2 s under TPPM ^{1}H-decoupling with field strength of 71 kHz (*15*). The dephasing times of the REDOR measurements were 4.8, 8, 12.8, 16, 24, and 32 ms, and xy-8 phase cycling was used for ^{19}F irradiation (*16*).

UV Spectral Measurements. AmB (15 nmol) and POPC (1.5 μmol) were dissolved in $CHCl_3$/MeOH (10% of POPC was replaced with corresponding sterols for sterol-containing samples), and the solvent was evaporated to afford a thin film. After drying in vacuo for 8 h, the lipid film was suspended to 8% sucrose buffer (1 mL) by vortexing and sonication. Then the lipid suspension was freeze–thawed four times to produce large vesicles. An aliquot of the resultant suspension (170 μL) was diluted with 1360 μL of 8% sucrose buffer, and UV spectra were recorded on a UV-2500 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a 1.0 cm path length quartz cell at ambient temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Solid-State NMR Measurements. We have recently carried out the kinetic analysis (*17*) for interactions between AmB and sterol-free or sterol-containing membrane using surface plasmon resonance techniques and found that AmB has significantly higher affinity to sterol-containing palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) membrane than sterol-free POPC membrane. Therefore, in order to pick up minute differences of AmB–AmB interactions possibly induced by sterols, we adopted POPC as a membrane constituent. For the REDOR experiments, a 1:1 mixture of **1** and **2** (Figure 1) was incorporated into POPC membranes at a **1**/**2**/POPC molar ratio of 1/1/20 and into sterol-containing POPC membranes at a **1**/**2**/sterol/POPC molar ratio of 1/1/2/18. Since the REDOR dephasing effects depend mainly on ^{13}C–^{19}F distance, its magnitude should reflect the intermolecular distance between AmBs in membrane-bound forms.

Figure 2 shows the full-echo (S_0) and difference (ΔS) spectra of the ^{13}C{^{19}F}REDOR which were recorded in sterol-free POPC bilayers at a dephasing time of 12.8 ms. Signals appearing at 181, 22, and 13 ppm correspond to C41, C40, and C39 of **1**, respectively (*11*). In the ΔS spectrum, significant dephasing effects were observed for the C41 and C40 positions. A peak reduction of the C41 signal indicates that headgroups of **1** and **2** are close to each other to undergo the "head-to-head" interaction. On the other hand, the REDOR dephasing at C40 indicated that the "head-to-tail" interaction also occurs under these conditions, suggesting that two or more different types of bimolecular interactions are involved in the sterol-free POPC bilayers. Based on the barrel-stave model reported by Baginski et al. (*4*) an AmB assembly consists of "head-to-head" interactions, and therefore, the head-to-tail orientation may arise from AmB

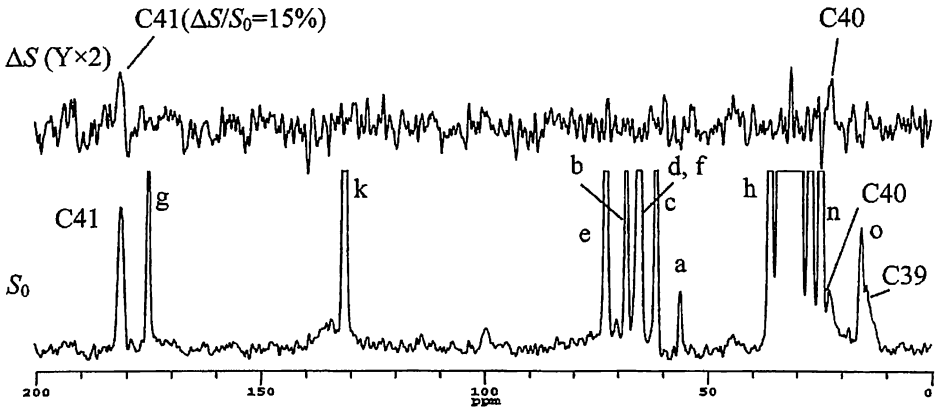


FIGURE 2: $^{13}C\{^{19}F\}$REDOR spectra of the sterol-free POPC membrane in the presence of ^{13}C- and ^{19}F-labeled AmBs **1** and **2** at 30 °C. The labeled AmBs were present at the ratio of **1**/**2**/POPC (1:1:20) in 10 mM HEPES/D_2O (50% wt) at pH 7.0. ΔS is a difference spectrum and S_0 is a full echo spectrum. Small alphabets are ^{13}C signals of POPC. These spectra were obtained after 64 rotor cycles of ^{19}F dephasing (12.8 ms). The number of scans was 62336.

molecular aggregates different from the channel structure. In fact, the crystal packing of *N*-iodoacetyl-AmB predominantly follows the head-to-tail orientation (*18*). We carried out the REDOR experiments with a dry powder sample of a 1:1 mixture of ^{13}C- and ^{19}F-AmB without phospholipid and found that both head-to-head and head-to-tail orientations occurred; the REDOR dephasing with 40 rotor cycles (5.7 ms) was observed for C41 at 21% and for C40 at 16% (see Supporting Information for spectra). AmB in the powder state is, therefore, supposed to form randomly oriented aggregates rather than channel-like assemblies. Similar aggregates to those in the powder state may partly remain in the sterol-free membrane, consequently giving rise to the head-to-tail interaction. As described later, the UV spectra of AmB in sterol-free membrane (Figure 5) further imply the presence of AmB weakly interacting with the membrane constituents. The bands at 408, 386, and 365 nm are characteristic of monomeric AmB in an aqueous medium (*19*), which provides no signal in the REDOR spectrum due to its high mobility. These seemingly contradicting results may be accounted for by the multiple states of AmB molecules in the POPC preparation, which may comprise AmBs in large aggregates, those dissolved in an aqueous medium, and probably those bound to membrane.

$^{13}C\{^{19}F\}$REDOR spectra of **1** and **2** in cholesterol-containing POPC membrane are shown in Figure 3a. In contrast to the sterol-free membrane, REDOR dephasing was observed for C41 but not for C40. The result indicates that "head-to-head" interaction between AmBs is dominant in cholesterol-containing membrane. Meanwhile, the REDOR dephasing ratio at C41 is comparable with that of sterol-free membrane (Figures 2 and 3a), which reveals that cholesterol hardly affects the intermolecular distance between AmBs in the "head-to-head" orientation.

We next recorded the REDOR spectra of **1** and **2** in the ergosterol-containing membrane (Figure 3b). The dephasing effect was also observed at C41 as in the case of the cholesterol membrane although the dephasing ratio was significantly decreased (Figure 3). The attenuated REDOR effect may be caused by the higher mobility and/or larger intermolecular distance of AmBs in the ergosterol membrane. To examine the possibility of molecule motion, we carried out the same REDOR experiments at −20 °C (see Supporting Information) and found that the obtained dephasing ratio for C41 was virtually same as that at 30 °C. Therefore, the reduced dephasing ratio for C41 in the presence of ergosterol is largely ascribable to increased intermolecular distance between AmBs. Additionally, the dephasing effects were also observed for the terminus of POPC acyl chains (signals m and n) in the ergosterol-containing membrane (Figure 3b); similar effects for the acyl-chain signals were detected in the different dephasing times of 24 and 32 ms. These effects were detected in neither choresterol-only nor PC-only membrane, suggesting that interaction between AmB and POPC is enhanced by ergosterol. Interestingly, ^{13}C atoms dephased by ^{19}F-AmB were located at the tail portions of POPC acyl chains. This may indicate that POPC interacting with AmB molecules forms an interdigitated bilayer to adjust its hydrophobic length to the molecular of AmB; the length of hydrophobic side is approximately 22 Å (*18*). The result is consistent with the report by Nguyen et al. that the introduction of AmB induces bilayer interdigitation (*20*). We have also shown the importance of hydrophobic length of PC in formation of ion channels by AmB using covalently linked AmB−PC conjugates (*21*). Moreover, it is reported (*11*) that the C39/C40 methyl groups of AmB come close to the polar head of PC. These results imply that interactions between the tail part of AmB and the polar head of PC (and vice versa) play an important role in forming a stable assembly in the membrane.

Intermolecular Distance Calculation. The REDOR results revealed that the average distance between neighboring AmBs in the membrane is significantly increased by ergosterol. In the next step, we aimed to determine the intermolecular distance between 14-F and C41 from the REDOR data. Since the ^{13}C enrichment in C41 of **1** is approximately 15%, the *intra*molecular interaction derived from natural abundance ^{13}C (1.1%) in **2** is not negligible. Therefore, the observed dephasing ratios at C41 should be treated as the sum of intramolecular and intermolecular contributions. For estimating the intramolecular effect, we used the 14-F/C41 distance of 4.9 Å that was derived from X-ray crystallography (*18*). For determining the intermolecular 14-F/C41 distance from the REDOR dephasing, we assumed that a neighboring pair of ^{13}C- and ^{19}F-labeled AmBs largely induced REDOR dephasing, and long-range AmB−AmB interactions beyond the closest AmB molecules were negligible since, judging from computer simulation results (*4*),

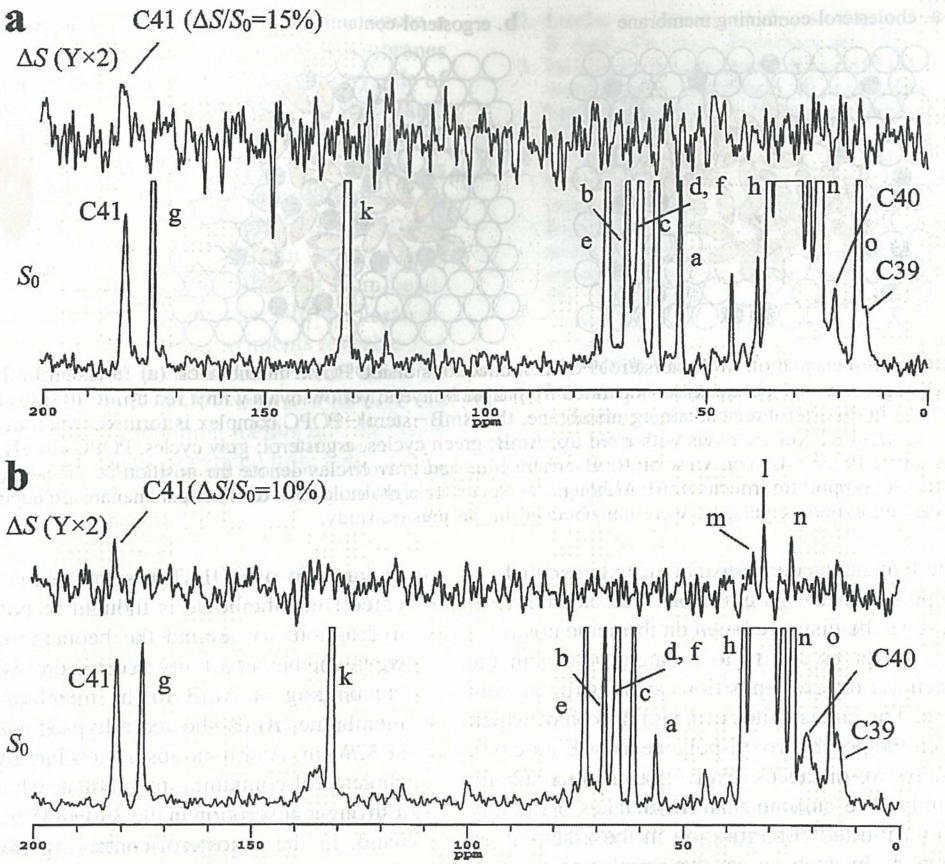


FIGURE 3: $^{13}C\{^{19}F\}$REDOR spectra of cholesterol-containing (a) and ergosterol-containing (b) POPC membranes in the presence of ^{13}C- and ^{19}F-labeled AmBs **1** and **2** at 30 °C. The labeled AmBs were present at the ratio of **1**/**2**/sterol/POPC (1:1:2:18) in 10 mM HEPES/D_2O (50% wt) at pH 7.0. ΔS is a difference spectrum and S_0 is a full echo spectrum. Small alphabets are ^{13}C signals of POPC. These spectra were obtained after 64 rotor cycles of ^{19}F dephasing (12.8 ms). The number of scans of each experiment was 61440.

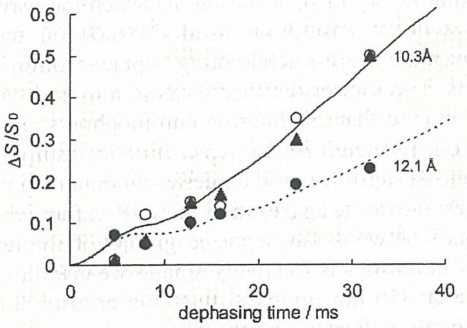


FIGURE 4: Experimental $^{13}C\{^{19}F\}$REDOR dephasing values ($\Delta S/S_0$) of C41 in sterol-free POPC (▲), cholesterol-containing POPC (○), and an ergosterol-containing sample (●). Solid and dashed lines are best fit curves of $^{13}C-^{19}F$ distance calculated in two spin systems for 10.3 and 12.1 Å, respectively. When the S/N ratios of the REDOR spectra (Figure 3) are taken into account, these distances should include standard errors of 10.3 ± 0.5 and 12.1 ± 1.0 Å.

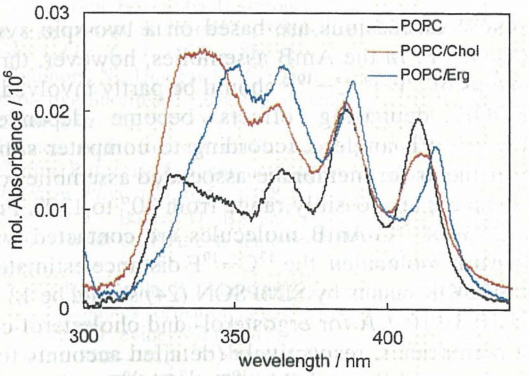


FIGURE 5: UV spectra of AmB in POPC membranes at the AmB/lipid molar ratio of 0.01. The molar ratio of POPC/sterol was 9:1. The concentration of AmB was kept at 1.67 μM in each sample.

the distance in such cases was estimated to exceed 15 Å. We made another assumption that ^{13}C- and ^{19}F-AmB molecules are randomly arranged in the assemblies, judging from the similarities between 14-F AmB **2** and AmB in biological activities and spectroscopic properties (*14*). Therefore, the maximum intermolecular dephasing ratio was set at 0.75 (the effects of $^{19}F-^{13}C-^{19}F$ spin systems are discussed below). On the basis of these assumptions, we calculated theoretical dephasing curves as shown in Figure 4 using a Bessel function expression (*22*). Consequently, the average distance between intermolecular 14-F and C41 was estimated to be about 10 Å for the sterol-free and cholesterol-containing membrane. On the other hand, in the ergosterol-containing membrane, the distance was increased to 12 Å, implying that the dense aggregation of AmB molecules is prevented by ergosterol. The short AmB−AmB distance in the sterol-free or cholesterol-containing membranes and the long distance in the ergosterol membrane support the previous results that AmB has no direct interaction with cholesterol in the membrane (*19, 23*), whereas possessing high affinity with ergosterol (*13, 17*).

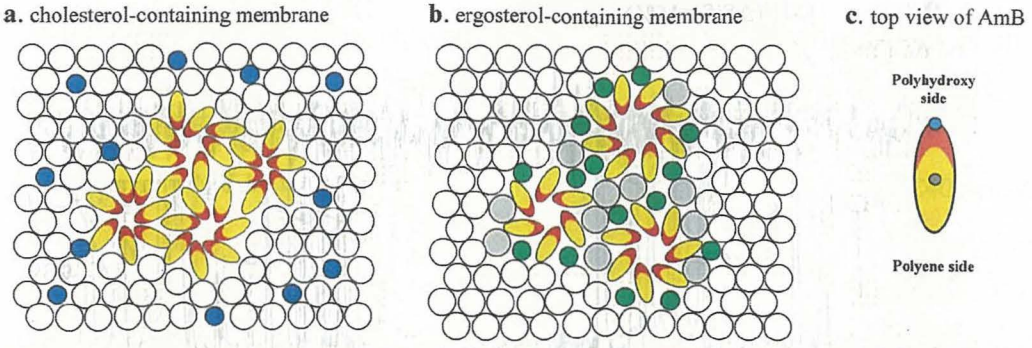


FIGURE 6: Schematic representation of AmB/sterol/POPC interactions inside POPC membranes. (a) In cholesterol-containing membrane, AmB forms large aggregates which are phase-separated from lipid bilayers; yellow ovals with a red tip, AmB; blue cycles, cholesterol; and open cycles, POPC. (b) In ergosterol-containing membrane, the AmB−sterol−POPC complex is formed, which may correspond to an ion conductive "active" channel; yellow ovals with a red tip, AmB; green cycles, ergosterol; gray cycles, POPC closely interacting with AmB; and open cycles, other POPC. (c) Top view of AmB, where blue and gray circles denote the position of ^{19}F-labeled C14 and ^{13}C-labeled C41, respectively (see Supporting Information). Although six, seven, or eight molecules of AmB per channel are depicted according previous reports (*3, 4*), relevant experimental data were not obtained in the present study.

There can be two intermolecular distances between 14-F and ^{13}C41 in a point-symmetric assembly such as the barrel-stave model, where the distance between the same positions in neighboring AmBs gives rise to a single value but the distance between the different positions such as the present case is not same. The labeled sites of **1** and **2**, both of which are positioned on the polyhydroxyl-polyene axis (Figure 6c), should make these two distances relatively close in a radially oriented assembly. We assume that AmB takes a radially arranged or slightly tilted configuration in the assembly as shown in Figure 6. In such cases, the smaller of the two distances should be close to those estimated from REDOR with a deviation less than +0.7 Å (detailed descriptions of the REDOR curves for these systems are given in Supporting Information).

These discussions are based on a two-spin system of ^{13}C and ^{19}F. In the AmB assemblies, however, three spin systems of ^{19}F−^{13}C−^{19}F should be partly involved, where REDOR dephasing effects become dependent on ^{19}F−^{13}C−^{19}F angles. According to computer simulation experiments for membrane-associated assemblies of AmB (*4*), the angles possibly range from 30° to 130°. Provided ca. 25% of ^{13}C-AmB molecules are contacted with two ^{19}F-AmB molecules, the ^{13}C−^{19}F distance estimated from the REDOR results by SIMPSON (*24*) should be 12.1−12.5 and 10.3−10.7 Å for ergosterol- and cholesterol-containing membranes, respectively (detailed accounts for three spin systems with possible ^{19}F−^{13}C−^{19}F angles are given in Supporting Information). The contribution of three spin systems to the estimated ^{13}C−^{19}F distance is thus relatively small, and the difference in the distances between the two sterol membranes does not heavily depend on the spin systems. Therefore, for further discussion, we will use the distance based upon two spin systems.

UV Spectral Measurements. To further examine the interactions between AmBs in POPC membranes, we recorded the UV spectra of large multilamellar vesicles. It is known that intense absorption maxima of AmB at 408, 384, and 370 nm are due to the monomeric state while hypsochromically shifted absorption bands at 317−350 nm are ascribable to AmB in the oligomeric state (*25*). Figure 5 showed the UV spectra of AmB in sterol-free POPC and in 10% sterol-containing POPC membranes at an AmB/lipid molar ratio of 0.01. The small red shift at 408 nm in the ergosterol membrane is thought to be caused by increased hydrophobicity around the heptaene group of AmB (*25*), where the higher affinity to ergosterol is supposed to stabilize the binding of AmB to the membrane. In the sterol-free membrane, AmB showed a hypsochromically shifted band at 329 nm. A similar absorption band was observed for the cholesterol-containing membrane, where AmB gave rise to a stronger absorption in the 330−345 nm range. On the other hand, in the ergosterol-containing membrane, a different absorption band was observed, which was significantly shifted to a longer wavelength centered at 350 nm. Gagoœ et al. have reported that the hypsochromic shift in the aggregate form of AmB can be accounted for by the exciton splitting theory (*26*), according to which the wavelength of the excitonic absorption band depends on the distance between the nearest neighboring heptaene chromophores of AmBs. The shorter distance leads to a more hypsochromic shift in case that neighboring chromophores are parallel to each other. Therefore, the hypsochromic absorptions around 330 nm in sterol-free and cholesterol-containing membranes suggest the dense aggregation of AmB is formed, where the distance between the heptaene groups of the neighboring AmB molecules is relatively small. Meanwhile, the absorbance at 350 nm observed with the ergosterol-containing membrane indicates that the distance between AmB chromophores is larger than those in sterol-free and cholesterol-containing membranes. These results are quite consistent with the REDOR experiments.

Figure 5 further shows that the absorbance at 329 nm in the sterol-free membrane is significantly low as compared with those at 330−345 and 350 nm for respective cholesterol- and ergosterol-containing membranes. The intensity ratio at 329 and 410 nm represents the relative proportion between the monomeric and aggregated forms (*26*), thus indicating lower aggregation level in the sterol-free membrane. A possible explanation for this result is that a significant proportion of AmB molecules escaped from the sterol-free membrane and stayed in an aqueous phase. In fact, AmB as a monomeric form in an aqueous suspension gave rise to a similar triplet absorption band in the longer wavelength region (Supporting Information), which closely resembles that of the sterol-free membrane in Figure 5.

In view of these observations, we attempt to propose a model for AmB−AmB interactions in POPC membranes (Figure 6). Since 14-F is located in the polyhydroxy side of the AmB molecule, the fluorine atom should be segregated from the other assemblies when the AmBs form a barrel-stave assembly (Figure 6). If this type of assembly is composed of AmB molecules with the same orientation as suggested by previous reports (*4, 27*), the REDOR effects from 14-F should be derived largely from head-to-head interaction in an *intra*assembly manner but not from head-to-tail one in an *inter*assembly manner. In cholesterol-containing membrane, the REDOR experiments revealed that AmB forms dense aggregates predominantly with "head-to-head" orientations. Since AmB−POPC interactions were not observed in the cholesterol-containing membrane, the AmB assemblies may be largely phase-separated from surrounding lipid bilayers (Figure 6a). In the ergosterol-containing membrane (Figure 6b), since the distance between AmB molecules was significantly increased and the interaction between AmB and the fatty acyl chains was detected, POPC and ergosterol are plausibly incorporated into AmB assemblies and consequently increase the average distance among AmB molecules. Recently, an IR study disclosed the close vicinity of ergosterol to AmB in the DPPC membrane (*28*). The mixed assembly formed in the ergosterol-containing membrane may possibly act as an ion-permeable channel (Figure 6b).

In conclusion, we examined AmB−AmB bimolecular interactions in bilayer membranes by solid-state NMR using ^{13}C- and ^{19}F-labeled AmB. In cholesterol- or ergosterol-containing POPC membranes, REDOR dephasing effects were observed between the headgroups of AmB molecules, indicating the dominant "head-to-head" interactions in membrane assemblies. The REDOR dephasing effect was significantly reduced in the ergosterol-containing membrane. Additionally, AmB−POPC interactions were detected in the ergosterol-containing membrane. These results suggest that ergosterol increases the distances between AmBs by directly interacting with AmB and facilitates formation of an AmB−sterol−PC assembly, which may correspond to "an active ion channel". To examine the AmB−ergosterol interactions in more detail, solid-state NMR experiments using ^{19}F-labeled AmB and ^{13}C-labeled ergosterol (and vice versa) are currently underway.

ACKNOWLEDGMENT

Y.U. expresses special thanks for The Global COE (center of excellence) Programs "Global Education and Research Center for Bio-Environmental Chemistry" of Osaka University.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

REDOR spectra of labeled AmBs **1** and **2** in the powder state at 30 °C and in ergosterol-containing POPC at −20 °C, REDOR dephasing curves for F−C−F spin systems and for two difference C−F distances, and UV spectrum of AmB in 8% sucrose buffer. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

REFERENCES

1. Hartsel, S., and Bolard, J. (1996) Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends Pharmacol. Sci. 17*, 445–449.
2. Lemke, A., Kiderlen, A. F., and Kayser, O. (2005) Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 68*, 151–162.
3. De Kruijff, B., and Demel, R. A. (1974) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and Lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibioticcholesterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta 339*, 57–70.
4. (a) Baginski, M., Resat, H., and McCammon, J. A. (1997) Molecular properties of amphotericin B membrane channel: A molecular dnamics simulation. *Mol. Pharmacol. 52*, 560–570. (b) 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.
5. Opella, S. J., and Marassi, F. M. (2004) Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. *Chem. Rev. 104*, 3587–3606.
6. Strandberg, E., and Ulrich, A. S. (2004) NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts Magn. Reson. A 23*, 89–120.
7. Watts, A. (2005) Solid-state NMR in drug design and discovery for membrane-embedded targets. *Nat. Rev. Drug Discovery 4*, 555–568.
8. Gullion, T., and Schaefer, J. (1989) Detection of weak heteronuclear dipole coupling by rotational-echo double-resonance nuclear magnetic resonance. *Adv. Magn. Reson. 13*, 57–83.
9. Gullion, T., and Schaefer, J. (1989) Rotational-echo double resonance NMR. *J. Magn. Reson. 81*, 196–200.
10. Li, Y., Poliks, B., Cegelski, L., Poliks, M., Gryczynski, Z., Piszczek, G., Jagtap, P. G., Studelska, D. R., Kingston, D. G. I., Schaefer, J., and Bane, S. (2000) Conformation of microtubule-bound paclitaxel determined by fluorescence spectroscopy and REDOR NMR. *Biochemistry 39*, 281–291.
11. Matsuoka, S., Ikeuchi, H., Matsumori, N., and Murata, M. (2005) Dominant formation of a single-length channel by amphotericin B in myristoylphosphatidylcholine membrane evidenced by ^{13}C-^{31}P rotational echo double resonance. *Biochemistry 44*, 704–710.
12. Mstuoka, S., Ikeuchi, H., Umegawa, Y., Matsumori, N., and Murata, M. (2006) Membrane interaction of amphotericin B as single-length assembly examined by solid state NMR for uniformly ^{13}C-enriched agent. *Bioorg. Med. Chem. 14*, 6608–6614.
13. 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: Bimolecular interactions as evidenced by solid-state NMR and CD spectra. *Chem. Eur. J. 14*, 1178–1185.
14. Matumori, N., Umegawa, Y., Oishi, T., and Murata, M. (2005) Bioactive fluorinated derivative of amphotericin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett. 15*, 3565–3567.
15. Bennett, A. E., Rienstra, C. M., Auger, M., Lakshmi, K. V., and Griffin, R. G. (1995) Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys. 103*, 6951–6958.
16. Gullion, T., Baker, D. B., and Conradi, M. S. (1990) New, compensated Carr-Purcell sequences. *J. Magn. Reson. 89*, 479–484.
17. Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T., and Murata, M. (2008) Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membrane as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry 47*, 7807–7815.
18. Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W., and Schaffner, C. P. J. (1971) Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the *N*-iodoacetyl derivative. *J. Am. Chem. Soc. 93*, 4560–4564.
19. Hartsel, S. C., Benz, S. K., Peterson, R. P., and Whyte, B. S. (1991) Potassium-selective amphotericin B channels are predominant in vesicles regardless of sidedness. *Biochemistry 30*, 77–82.
20. Nguyen, T.-S., Weers, P. M. M., Raussens, V., Wang, Z., Ren, G., Sulchek, T., Hoeprich, P. D., Jr., and Ryan, R. O. (2008) Amphotericin B induces interdigitation of apolipoprotein stabilized nanodisk bilayers. *Biochim. Biophys. Acta 1778*, 303–312.
21. (a) 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. (b) 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.
22. Mueller, K. T. (1995) Analytic solutions for the time evolution of dipolar-dephasing NMR signals. *J. Magn. Reson. 113*, 81–93.

23. Matsuoka, S., and Murata, M. (2002) Cholesterol markedly reduced ion permeability induced by membrane-bound amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta 1564*, 429–434.
24. Bak, M., Rasmussen, J. T., and Nielsen, N. C. (2000) SIMPSON: A general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. 147*, 296–330.
25. Fujii, G., Chang, J. E., Coley, T., and Steere, B. (1997) The formation of amphotericin B ion channel in lipid bilayers. *Biochemistry 36*, 4959–4968.
26. Gagoœ, M., Koper, R., and Gruszecki, W. I. (2001) Spectrophotometric analysis of organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta 1511*, 90–98.
27. Caillet, J., Berges, J., and Langlet, J. (1995) Theoretical study of the self-association of amphotericin B. *Biochim. Biophys. Acta 1240*, 179–195.
28. (a) Fournier, I., Barwicz, J., Auger, M., and Tancrède, P. (2008) The chain conformation order of ergosterol- or cholesterol-containing DPPC bilayers as modulated by Amphotericin B: a FTIR study. *Chem. Phys. Lipids 151*, 41–50. (b) Paquet, M.-J., Fournier, I., Barwicz, J., Tancrède, P., and Auger, M. (2008) The effect of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by ^{2}H NMR. *Chem. Phys. Lipids 2002 119*, 1–11.

BI801875Y