

Title	アンフォテリシンBが脂質二重膜に形成するチャンネル様会合体の固体NMRによる構造解析
Author(s)	中川, 泰男
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52272
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (中 川 泰 男)

論文題名

アンフォテリシンBが脂質二重膜に形成するチャンネル様会合体の固体NMRによる構造解析

論文内容の要旨

アンフォテリシンB (AmB、図A) は臨床で広く用いられている抗真菌薬であり、真菌細胞膜中でエルゴステロール (図B) と共にイオン透過性のチャンネル複合体を形成することでその薬理活性を発現する。しかしながら、AmBの選択毒性は不完全であり重篤な副作用を引き起こすことがある。そのため、薬理的な観点からもAmB複合体の詳細な構造解析は重要であるといえる。また、脂質二重膜環境下で低分子が形成する複合体の構造解析は未だ非常に困難であり、その方法論の確立が求められている。近年、固体NMRは脂質膜環境下での構造解析法として注目を集めており、その測定法の一つであるREDOR測定ではフッ素と炭素13の原子間距離を測定できる。また、CODEX測定では会合体を形成する分子数を決定できる。そこで本研究ではこれらの固体NMR法を中心とした種々の手法によりAmBとエルゴステロールが形成する複合体の構造解析を行った。

1. AmBとステロール誘導体の親和性評価

まず、部分的に構造を改変したエルゴステロール誘導体を化学合成し、それらとAmBの親和性を評価した。その結果、エルゴステロールの側鎖に存在する24位のメチル基は側鎖の疎水性を増加させ、22位の二重結合は側鎖が伸長した配座を安定化することで、AmBとのファンデルワールス相互作用を最大化していると推定された。また、ステロイド環の角間メチルとは逆側の面 (α 面) に突出したA環や7位のアキシャル水素を持つ誘導体はAmBとの親和性が大きく低下したことから、エルゴステロールの炭素環 α 面の平面性が、同様に平らなAmBのマクロライドと密に接することによって相互作用を強めていることが示唆された。

2. 分子間距離情報に基づくAmB-エルゴステロールの分子間相互作用解析

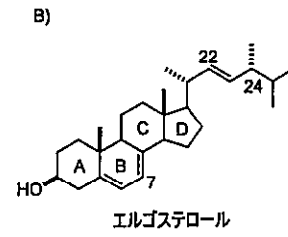
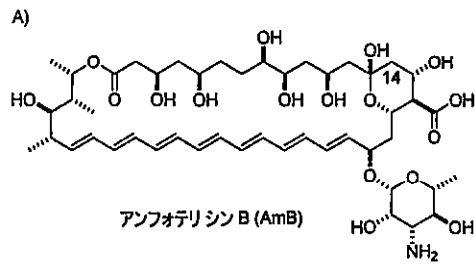
次に、天然物より化学的調製したAmBの位置特異的標識体 (F-AmBおよび ^{13}C -Ergosterol) を用いてREDOR測定を行った。その結果、AmBとエルゴステロールが平行型と反平行型の両方の向きで相互作用していることを明らかにすると共に、両配向の存在比を決定することができた。さらに、平行型と反平行型におけるAmBとエルゴステロールの分子間距離をそれぞれ3ヶ所ずつ取得することに成功した。得られた分子間距離を束縛条件として分子力学計算によるジオメトリー探索を行い、AmBとステロール誘導体の親和性評価の結果と比較することで、複合体中におけるAmBとエルゴステロールの位置関係を原子レベルで推定することに成功した。その結果、エルゴステロールはAmBのマクロライド側面と密に接することで、面と面による強固なファンデルワールス相互作用を可能にし、安定な複合体を形成していることが示唆された。

3. AmB-AmBの分子間相互作用解析

会合体の構造決定において最も重要であるAmB二分子間の相対位置を解明するために、F-AmBおよび ^{13}C -AmBを用いて固体NMRを測定した。その結果、14-F-AmBを用いたCODEX測定から複合体を形成するAmBのおおよその分子数を推定するとともに、REDOR測定によりAmB二分子間の距離情報を複数取得した。さらに、得られた会合数と分子間距離を最も再現するようにAmBを配置することでチャンネル構造におけるAmB二分子の位置関係を決定した。そして、決定したAmB-エルゴステロールおよびAmB-AmB二分子間の位置関係に基づきAmBとエルゴステロールが脂質二重膜中で形成するチャンネル複合体の全体像を推定した。チャンネル会合体においてAmBは脂質膜法線から傾いて並んでおり、エルゴステロールはAmB同士の隙間を埋めるように挿入されていた。これらの結果は、過去に得られている情報ともある程度一致を示しており、本研究で推定した会合体構造の妥当性が示唆された。

本研究は、NMRをはじめとする分光学的手法と有機合成化学を組み合わせることによって、従来困難視されていた

膜中の分子会合体の構造解析が可能であることを示した。これらの研究例が端緒となり、生体膜における分子間相互作用の構造生物学的研究が飛躍的に発展することが期待される。



論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中川 泰男)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	村田 道雄
	副 査	教 授	小川 琢治
	副 査	教 授	中谷 和彦
論文審査の結果の要旨			
<p>アンフォテリシン B は発見以来 50 年を経ても今なお重要な抗生物質である。その生物活性は、真菌の細胞膜にイオン透過性チャネルを形成することによって発現することが知られている。しかし、長年の研究にもかかわらず、そのイオンチャネル構造の詳細は不明である。本化合物は、深在性真菌感染症の治療薬として重用されており、その作用機構の解明は社会的にも意義深く、膜中で形成されるチャネル複合体の構造解析の重要性が強く認識されている。しかし、脂質膜中でしか再現されない分子間相互作用を通常の方法論で観測するのは極めて困難であり、研究手法の確立が待たれていた。このようななか中川氏は、固体 NMR に着目し、標識体を巧みに調製することによって、アンフォテリシン B が脂質膜中形成する分子複合体の構造解析を試みている。</p> <p>中川氏は、まず、固体 NMR の測定に最適なアンフォテリシン B フッ素標識体の短段階かつ効率的な調製方法を確立した。ついで、ポリエン側にフッ素導入した誘導体を新たに調製し、固体 NMR の原子間距離測定法の一つである REDOR 実験を、フッ素標識体と ^{13}C-標識体を脂質二重膜に混合した試料について行った。その結果、フッ素原子との空間的な近接を示す顕著なシグナルの減衰が、アンフォテリシン B の ^{13}C-標識シグナルに認められ、チャネル複合体の構造を推定するために必要な情報を取得することに成功した。加えて中川氏は、抗生物質作用の源となる選択毒性に関して、アンフォテリシン B と真菌のステロールであるエルゴステロールの相互作用についても同様の構造解析を行い、二分子の相互作用の分子基盤の解明に成功した。これらの新知見に、イオンチャネル機能についての既知情報を加味し、リン脂質二重膜中に形成されるアンフォテリシン B とエルゴステロールの会合体の構造を推定した。この成果は、タンパク質およびペプチド以外の脂質膜中会合体に、固体 NMR を適応した初めての例であり、方法論の開発という面でも積極的に評価できる。生体膜中に形成される分子複合体の構造解析に、固体 NMR が適用される事例が増加しているが、構造生物学的研究手法としての固体 NMR の有効性を示した本論文は、理学的研究としても意義深いと考える。</p> <p>このように中川氏は、アンフォテリシン B の形成するイオンチャネルの構造研究を推進するとともに、方法論の実践という点でも貴重な成果を挙げた。したがって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			

