

Title	分子内構造情報に着目したアンフォテリシンBチャンネル複合体の構造解析
Author(s)	山本, 智也
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61512
rights	Reproduced in part with permission from Yamamoto T., Umegawa Y., Yamagami M., et al. The Perpendicular Orientation of Amphotericin B Methyl Ester in Hydrated Lipid Bilayers Supports the Barrel-Stave Model. <i>Biochemistry</i> 58, 2282 (2019); https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00180 . Copyright 2019 American Chemical Society.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山 本 智 也)

論文題名 分子内構造情報に着目したアンフォテリシンBチャネル複合体の構造解析

論文内容の要旨

アンフォテリシンB (AmB 図1 a)は放線菌*Streptomyces nodosus*が生産するポリエンマクロライド系抗真菌剤である。AmBは真菌の細胞膜中でエルゴステロール (図1 b) と相互作用し、樽板型のチャネル複合体を形成することで抗真菌活性を発現する。これまでに、主に固体NMRを用いた原子間距離測定によって、チャネル複合体の構造解析が試みられてきた。一方、チャネル複合体の構造解析には、原子間距離情報に加えて、チャネル複合体中におけるAmBの配座や、脂質膜中におけるAmBの配向といった分子内構造情報が必要である。そこで本研究では、構造活性相関研究や固体NMR測定を用いて、AmBのチャネル複合体中における立体配座や膜に対する配向といった分子内構造情報を取得することを研究目的とした。

(1) ポリオール部分の構造活性相関研究

AmBは全体的に強固な骨格構造を有するか、そのなかにあつて、ポリオール部分のC6-C7結合において*anti-gauche*の配座交換が生じることによって分子全体の立体配座が変化することが示唆されていた。そこでポリオール部分の構造を変化させた新規類縁体7 α -OH-AmBと7 β -OH-AmBを調製した。マクロモデルによる配座探索では、7 β -OH-AmBは*anti*配座のみを、7 α -OH-AmBは*gauche*配座のみを形成すると推定された。次にこれら類縁体のイオン透過活性を比較した結果、7 β -OH-AmBはステロール選択性を保持していた一方、7 α -OH-AmBはステロール選択性が失われていた。このことから、エルゴステロールとの会合にはC6-C7結合が*anti*型配座を取ることが重要であり、AmBはチャネル複合体中では*anti*型配座が優位であることが示唆された。また、両新規類縁体はAmBと比較すると生物活性が低下していることから、C6-C7結合について*anti*型と*gauche*型の配座交換に起因する分子配座の変化が活性に重要であるという新たなモデルを提唱することができた。

(2) ^2H 、 ^{19}F NMRによる脂質膜中におけるAmBの配向解析

AmBの脂質膜中における配向を決定するために、新規標識体である14 β -F-*ds*-AMEを合成し、脂質と混合して水和二重膜を調製した後、固体NMRによって膜面に対する分子配向を解析した。標識体の ^{19}F 化学シフト異方性、 ^2H 四極子相互作用を詳細に解析した結果、AmBの分子軸は膜法線に対してほぼ平行であり、またマイコサミン部分が脂質膜表面に近接するように配向すると推定された。このことは、近年AmBの活性構造として提唱されているステロールスポンジモデルよりも従来の樽板型モデルと合致しており、これらモデルの違いを実験的に検証することができた。また、これまでの分子間距離情報と今回の結果を組み合わせることで、より実際の構造に近いチャネル構造を推定することができた。

(3) β グリコシド結合の配座解析

AmBの β -グリコシド結合の配座解析を目指して、新規二重標識体19-*d*₁-1'- ^{13}C -AmBを、 β グリコシル化を経由する新規合成経路によって合成した。次に、この標識体のリボソーム中における ^{13}C 固体NMR測定を行ったところ、リボソーム中のエルゴステロール濃度に依存して標識体の ^{13}C 核に由来するピークが先鋭になり、マイコサミンの周辺環境や配座が均一になることが示された。さらに、分子内 $^{13}\text{C}\{^2\text{H}\}$ REDOR測定から標識原子間距離を見積り、その距離情報と過去の構造活性相関研究等の情報とを組み合わせることによって、チャネル複合体中における β -グリコシド結合の配座(D19-C19-O-C1')を推定した。今回得られた立体配座やマイコサミン周辺の環境がエルゴステロールによって均一化される現象は、過去に提唱されたエルゴステロール-マイコサミン間の相互作用を支持する結果となった。

本研究によって得られた分子内構造情報と、これまでに得られた分子間構造情報を組み合わせることによって、より精密なチャネル複合体構造を推定することができた。このチャネル構造を基盤として、AmBのイオン透過活性やステロール選択性の詳細な機構が解明できると予想される。

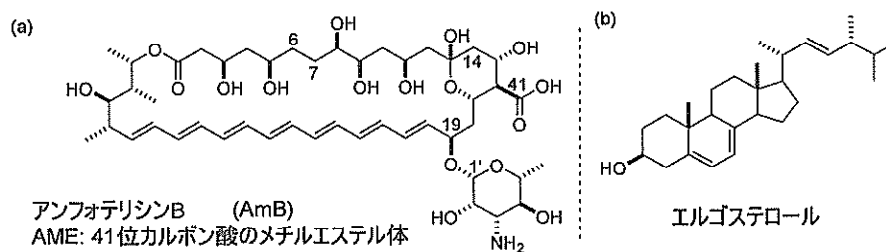


図1 アンフォテリシンB (AmB) とエルゴステロール

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 本 智 也)			
	(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	笹井宏明
論文審査の結果の要旨			
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真菌抗生物質である。その生物活性は、細胞膜において真菌ステロール依存的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。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。アンフォテリシン B 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い。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。このようななか山本氏は、固体 NMR に着目し、標識体を巧みに化学合成することによって、アンフォテリシン B が脂質膜中形成する分子複合体における分子配座と配向の解析を試みた。具体的には、ポリオール部分の構造活性相関、マクロライド環の配向解析、マイコサミン-B-グリコシド結合の配座解析に焦点を当てて研究を進めることによって、先行研究結果からの大幅な進歩をもたらした。以下に、博士論文研究における重要成果の概要について述べる。 山本氏は、まず、アンフォテリシン B の親水性部分であるポリオール鎖について、ヒドロキシ基の数および立体配置について構造活性相関研究を行い、それらを溶液中及び膜中における立体配座と関連付けることに成功した。その結果、本化合物のマクトライド環の膜中における配座を明らかにした。また、本化合物の脂質膜中における配向を決定するために同位体標識を施した誘導体を調製し、水和二重膜における分子配向を解析した。^{19}F 化学シフト異方性および ^2H 四極子相互作用を詳細に解析した結果、本化合物の分子軸は膜法線に対してほぼ平行であり、またマイコサミン部分が脂質膜表面に近接するように配向すると推定することに成功した。さらに、マクロラクトン環の配向からは決定できないマイコサミン部分の立体配座については、重水素および炭-13 の二重標識体を、β グリコシル化を経由する新規合成経路によって化学合成した。この標識体の脂質膜中における ^{13}C 固体 NMR 測定によって標識原子間の距離を見積り、過去の構造情報と組み合わせることによって、チャネル複合体中におけるマイコサミン部分の立体配座を解明することに成功した。本研究によって得られた分子内構造・配座情報と、これまでに得られた分子間構造情報を組み合わせることによって、より精密なチャネル複合体構造を推定している。このチャネル構造は、アンフォテリシン B 生物活性の本質であるイオン透過活性の詳細な機構解明に直接資するものである。 このように山本氏は、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、標識体の合成法や固体 NMR 方法論の確立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。			