

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | マジック角試料回転を利用した液晶二次元NMR法の開発と応用に関する研究   |
| Author(s)    | 木村, 敦臣  |
| Citation     |   |
| Issue Date   |   |
| Text Version | ETD   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3110017">https://doi.org/10.11501/3110017</a> |
| DOI          | 10.11501/3110017  |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 木村敦 臣   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学)  |
| 学位記番号      | 第 12448 号   |
| 学位授与年月日    | 平成8年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科薬品化学専攻                               |
| 学位論文名      | マジック角試料回転を利用した液晶二次元NMR法の開発と応用に関する研究                       |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 大森 秀信<br><br>(副査)<br>教授 小林 資正 教授 藤原 英明 教授 北 泰行 |

## 論文内容の要旨

生体膜を標的とする生理活性物質の中には、膜との相互作用が活性発現に重要な鍵を握るものがあり、そのような物質としてイオンの膜透過に関与する天然イオノホアと総称される一群の抗生物質、あるいは、一部のペプチド性のホルモンや神経伝達物質などが知られている。これら膜作用性薬物の機能と膜中の構造との相関、あるいはそれに与える膜物性の影響を探ることは単に作用機序の解明のみならず、新しい医薬品を開発する上でも非常に意義深い。しかし、膜のような非晶質媒体中における分子の機能の発現機構や構造を解明するには多くの困難を伴い、それらを克服するための有効な実験手段の開発が望まれている。このような背景のもと、本研究では最近急速に発達してきたNMR法に焦点を絞り、リポソーム溶液やリोटロピック液晶を生体膜の一つのモデルとしてみなして媒質として用い、その中で金属イオンの膜透過や二、三の生理活性物質の構造および配向を調べることとした。その結果、新しい測定手法の開発を行うことができた。

リポソーム系における $\text{Na}^+$ イオンの膜透過は $^{23}\text{Na}$ -NMRにより有効に追跡できるが、この方法を包括的に検証し、膜透過速度が広範囲にわたって精度良く求められることを確かめた。即ち、一次元および二次元の $^{23}\text{Na}$ -NMR測定により $10^{-4}\sim 10^3$  ( $\text{sec}^{-1}$ )の広い範囲の膜透過速度を求め、さらに、この手法を用いてキャリアー型イオノホアに分類される monensin 及び lasalocid A とチャンネル型に分類される gramicidin A, amphotericin B 及び nystatin による担体輸送機能に関して温度可変実験を行い、エネルギー的側面から幅広く議論した。その結果、 $\text{Na}^+$ イオンのリポソーム膜輸送に関して amphotericin B 及び nystatin では他のイオノホアと異なり、その輸送能が温度の上昇とともに抑制されることが分かった。これは、温度の上昇によりチャンネル周囲の膜構成分子が熱運動により摂動され、チャンネルが攪乱されることに起因すると考えられた。膜流動性を高める効果を持ち麻酔剤である benzyl alcohol を、amphotericin B の共存するリポソーム系に添加すると同様に膜輸送能が阻害され、このこともその機能の発現には膜流動性という膜物性が大きく関与することを支持した。

NMR法による構造解析は、ごく最近になってミセルやリポソームなどの生体膜モデル系に応用が試みられるようになった。しかし、ミセルは表面の曲率が非常に大きいという問題があり、またリポソームなどの二分子膜系では一般的に適用できる有用な測定手法は現在のところ知られておらず、膜中の構造に関して知見を集積するには基本的な測定手法の開発が緊急の課題となっている。

このような状況に対し、膜中の分子の構造を議論するために溶媒として液晶を用いる液晶NMR法が近年注目され

ている。液晶のNMRスペクトルには等方溶液あるいはミセルにおけるスペクトルには見られない磁気双極子間の直接結合による分裂が現れる。この直接結合定数は有用な構造情報を含むが、一般的に適用しようとすると複雑なスペクトルパターンのため解析困難となり、これまでのところその適用範囲は通常9スピン程度以下の小分子に限られている。

筆者は上述のイオノホアである lasalocid A の液晶中の構造と配向を決定するため、液晶NMR法の改良を行った。液晶NMR法の適用性を高めるためには直接結合を含むスペクトルを簡略化する必要がある。一方、固体NMR法においてそのスペクトルを簡略化するために、近年マジック角試料回転 (Magic-Angle-Spinning : MAS) 法が開発された。筆者はこのMAS法を液晶NMR法に応用し、二次元NMR法を導入したMAS液晶二次元NMR法を開発し構造解析への応用を試みた。その結果、MAS条件化でのCOSY (COSY/MAS) 及びROESY (ROESY/MAS) 実験により、二面角および距離束縛条件という構造情報を首尾良く得ることができ、これらの構造情報をもとにディスタンスジオメトリ法により液晶中の lasalocid A の立体構造を決定した。また、ミセル中の立体構造も併せて決定し両者を比較検討したところ、その構造には配向場の変化に感応してヒンジとなる結合が存在することを明らかにすることができた。

一方、上述の生理活性ペプチドが受容体と結合して活性発現に至る過程には種々のモデルが提唱されている。その中で、膜中に溶解して活性型コンホメーションに変化した後、受容体と結合するという説がある。したがって、これらの生理活性ペプチドの膜との相互作用にもとづいたコンホメーションを解析することは、重要な研究課題である。そこで、enkephalin を例として液晶中の構造解析を行うこととしたが、MAS法を導入した上述の方法は配向に関する情報を消去してしまうので、この情報を復活させるべくマジック角近くでの試料回転 (Near-Magic-Angle-Spinning : NMAS) を導入した。こうして、NMA S液晶二次元NMR法を新しく開発し、液晶NMR法の適用範囲を限定している直接結合情報を選択的かつ積極的に利用することを可能とした。そこで、このMAS及びNMA S液晶二次元NMR法をMet-enkephalin 及びLeu-enkephalin に適用し、液晶中において距離束縛条件および直接結合定数という構造と配向に関する情報を導出することができた。また、直接結合定数を利用した目的関数法を構築し、これまでの適用範囲を越える大分子にも有効な構造計算法を開発することにより、enkephalin の液晶中における構造と配向を決定することができた。その結果、液晶中においてMet-及びLeu-enkephalin はともに $\beta$ ターン構造に近い形をとっているが、前者の方が後者よりも大きな配向性を示し、液晶を構成する分子集合体と強く相互作用していることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

生理活性物質の構造研究は、その機能と作用機序の解明に不可欠で重要な研究課題である。この目的では、現在のところ、対象物質を単結晶として単離するか、水溶液などとして構造解析するのが常法とされている。本研究では、リポソーム膜を通しての金属イオンの透過の熱力学を研究の端緒とし、液晶系を生体膜の一つのモデルと見なし、その中で構造解析を容易とする測定方法の検討を行った。そこでは、従来の液晶NMR法が、せいぜい9スピンまでを適用限界とすることを考慮し、これに、固体高分解能NMRで用いられるMAS (試料のマジック角回転) と、溶液のNMRで用いられる種々の二次元法を採り入れ、さらに、計算法として擬エネルギー関数の最小化を採用することにより改良を加え、その制限を大きく取り除き得ることを明らかにした。この新たに開発した方法を、実際に膜関連生理活性物質であるラザロシッドA および2, 3のエンケファリン誘導体に適用し、液晶中のコンホメーションを決定し、構造化学と配向に関する考察を行っている。

以上の結果は、博士(薬学)の学位論文として充分価値あるものと認められる。