

Title	固体NMRによるアンフォテリシンB複合体の相互作用解析
Author(s)	土川, 博; 梅川, 雄一; 松森, 信明 他
Citation	大阪大学低温センターだより. 2012, 158, p. 14-17
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/7007
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

固体NMRによるアンフォテリシンB複合体の相互作用解析

理学研究科 †梅川 雄一（内線5789）

土川 博

松森 信明

村田 道雄

† E-mail: yumegawa@chem.sci.osaka-u.ac.jp

1 . はじめに

生体膜中における分子間の相互作用は細胞内外の情報伝達、膜電位の調整など生命活動の重要な役割を担っている。また、近年の脂質ラフトに関する研究に代表されるように、脂質二重膜は細胞内外を分けるための単なる壁としてではなく、脂質分子そのものが重要視されるようになっている。しかし、その重要性とは裏腹にこれら膜中での相互作用、特に原子レベルでの相互作用はほとんど明らかにされていないのが現状である。その要因の一つは生体膜が非結晶性であり、また異方的な環境であるといった膜環境特有の問題から、X線結晶解析や溶液 NMR といった従来法の適用が困難なためである。

そこで、生体膜における原子レベルでの分子間相互作用解析法の確立を目指し、モデル化合物として膜作用物質であるアンフォテリシンB (AmB) に着目、研究を開始した。抗真菌物質アンフォテリシンBは放線菌*Streptomyces nodosus*から単離された抗生物質で、強力な抗カビ活性と耐性菌のできにくい性質から発見以来50年を経た現在でも医療用抗真菌剤として広く感染症治療に用いられている。その生理活性は細胞膜中で形成されるイオン透過性チャネル会合体に由来し、また選択毒性は、AmBがコレステロールよりも真菌の膜含有エルゴステロールに対して強い親和性を持つことに起因するとされている。このチャネル会合体として、DemelらによりAmB分子が円形に並んだ樽板モデルが提唱された(図1)^[1]。このモデルをもとにUV/CDスペクトル測定、分子動力学計算をはじめ実に多くの研究がなされてきたが、これらの手法では原子レベルの解析や直接的な証拠を得ることができず、未だに会合体の詳細な構造は不明である。

2 . 固体NMRによるAmB複合体の構造解析

近年では固体NMRでも、装置および手法の改良により高分解能のスペクトルを得ることが可能となり、脂質膜への応用が報告されるようになった。特に固体NMRでは構造解析に有用な膜中での運動性や配向、原子間距離といった情報の取得が可能であり、溶液NMRに対するアドバンテー

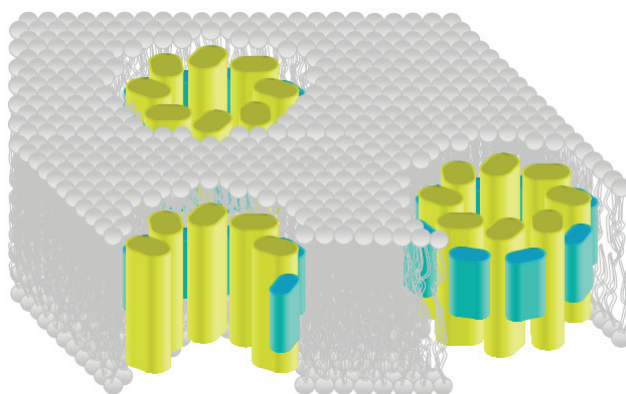


図1．樽板モデルの模式図

樽板モデルの概念図。AmB分子（黄色）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（水色）やリン脂質（灰色）と相互作用している。

ジとなる。そこで、我々も固体NMR、特に原子間距離測定法（REDOR法、図2-a）^[2]に着目し、AmB複合体構造の解析を行うことにした。即ち、¹³Cまたは¹⁹Fで標識されたAmBを調製し、リン脂質膜中で複合体を形成させ、その時の原子間距離を測定することにした（図2-b）。

REDOR法は異種核間距離測定法の一つで、マジック角回転により消失した距離に関する情報を復活させる方法である。この測定では¹⁹F核にパルス照射すると¹⁹F核の近傍にある¹³C核のシグナル強度が減衰する。この減衰の割合から¹⁹F-¹³Cの距離を求めることができる。

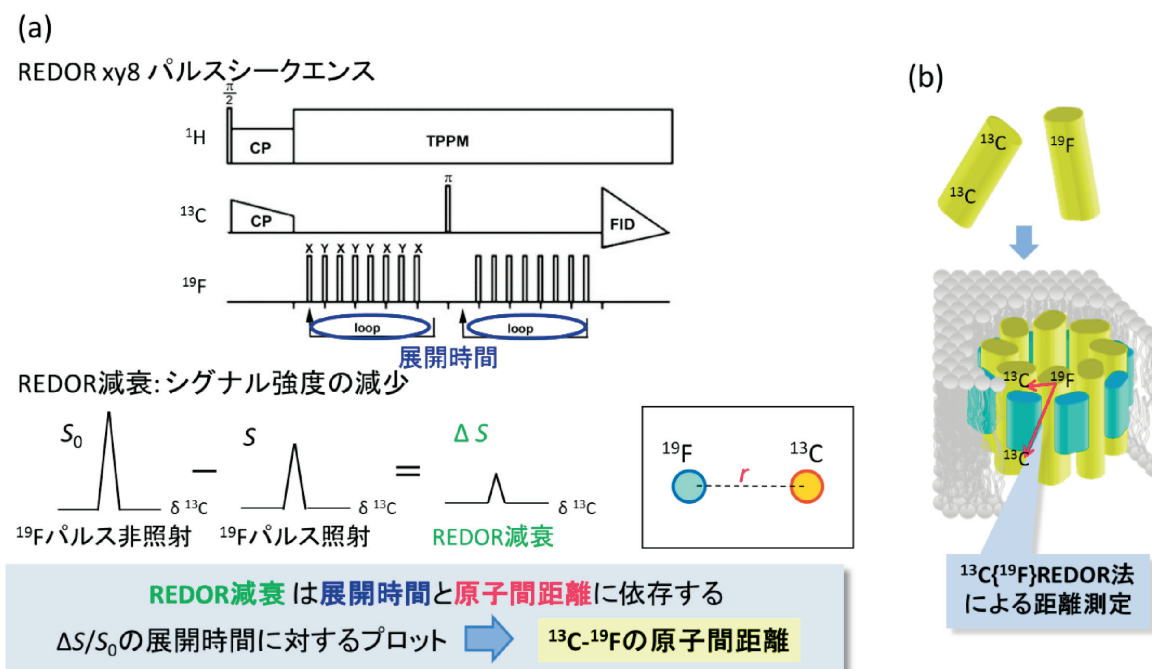
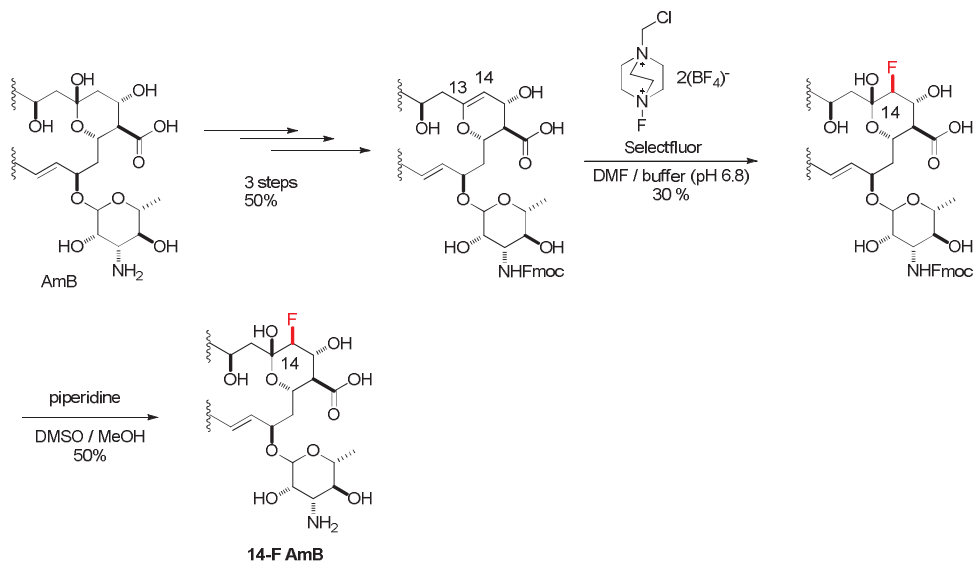


図2 . (a) REDORパルスシーケンス。¹⁹Fパルス非照射 (S_0) および照射スペクトル (S) を測定する。2つのスペクトルの強度変化 (S) から原子間距離を求めることができる。(b) REDOR法によるAmB複合体の構造解析。

3．標識体の調製

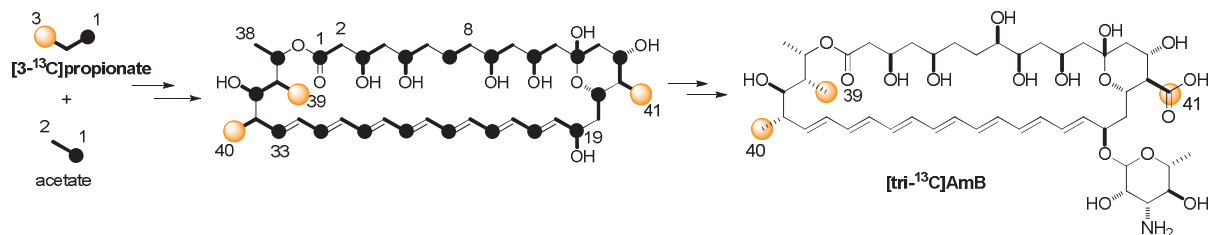
¹⁹F標識体はスキーム1に従い、AmBより化学合成的に誘導化し調製を行った。生物活性および

チャンネル活性試験の結果から非標識のAmBと同程度の活性を保持していることを確認した^[3]。



スキーム 1 . 14-F AmBの調製

¹³C標識体に関して、AmBの炭素骨格を化学合成的に¹³C標識することは非常に困難なである。そこでAmB生産菌に標識化前駆体を取り込ませることにより、生合成的に得ることとした。前駆体に[3-¹³C]プロピオン酸ナトリウムを用いることで、39, 40, 41位を選択的に¹³C標識した[tri-¹³C]AmBをえた。なお¹³Cの取り込み率は15%程度であった。



スキーム 2 . [tri-¹³C]AmBの調製

4 . ¹³C{¹⁹F}REDOR法による原子間距離測定^[4]

上記の¹⁹Fおよび¹³C標識体を 1:1 の比でコレステロール、またはエルゴステロール含有POPC膜に取り込ませ、¹³C{¹⁹F}REDOR測定を行うことで、2種類のスレオールがAmB分子間距離に与える影響を観察した。エルゴステロール膜でのスペクトルを図3に示す。その結果、[tri-¹³C]AmBの41位の炭素(171 ppm)でREDOR減衰が観測された。このことは14-F AmBと[tri-¹³C]AmBがお互いに近接している、即ちチャンネル複合体を形成していることを意味している。このREDOR減衰から14-F/C41の原子間距離を計算するため、複数の展開時間において同様の測定を行った。その結果、コレステロール含有膜での原子間距離は 10.3 ± 0.5 である一方、エルゴステロール含有膜では 12.1 ± 1 となり、エルゴステロール存在下ではAmB二分子間の距離が増加することが明らかになった(図4)。これはAmBとエルゴステロールの直接的な相互作用を示唆している。

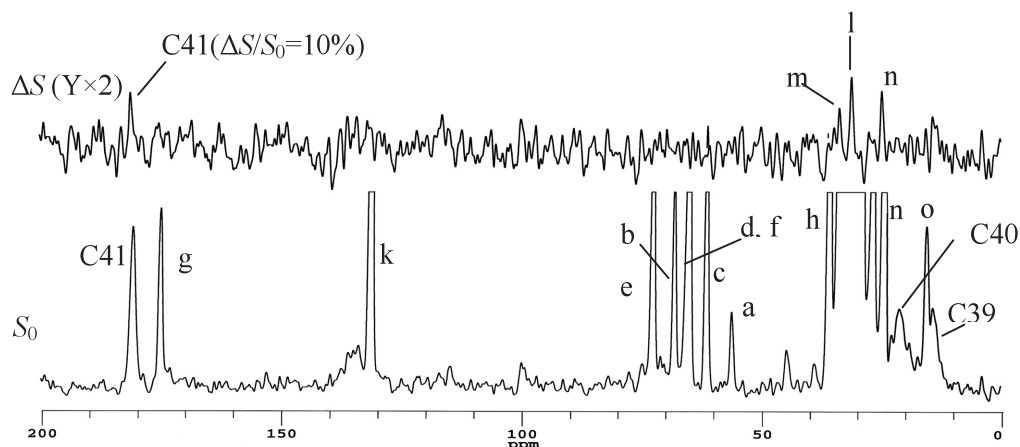


図3 . [tri-¹³C]AmB / 14-F AmB / エルゴステロール / POPC=1/1/2/18の¹³C{¹⁹F}REDORスペクトル (下：非照射スペクトル、上：差スペクトル)。図中のアルファベットはPOPC由来のシグナル (図2-1参照)。測定温度30、MAS速度5 kHz、展開時間12.8 ms、積算回数61440回。

また、エルゴステロール含有膜においてのみ、AmB-POPC間のREDOR減衰が観測され (図3) この2分子間の相互作用が安定に存在することが示唆された。従って、AmB - エルゴステロール - POPCの三者複合体が形成されており、この複合体が薬理活性の本体であると考えられる。

5 . まとめ

固体NMRを用いることで具体的な距離情報を伴ったAmB複合体の構造解析が可能になった。ただし、1組の標識体から得られる情報量は決して多くなく、現在更なる距離情報取得のため、新たな標識体の組み合わせでの実験を行っている。

参考文献

- [1] De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* 1974, 339, 57-70.
- [2] (a) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* 1989, 13, 57-83. (b) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* 1989, 81, 196-200.
- [3] Matumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 3565-3567.
- [4] Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* 2008, 47, 13463-13469.

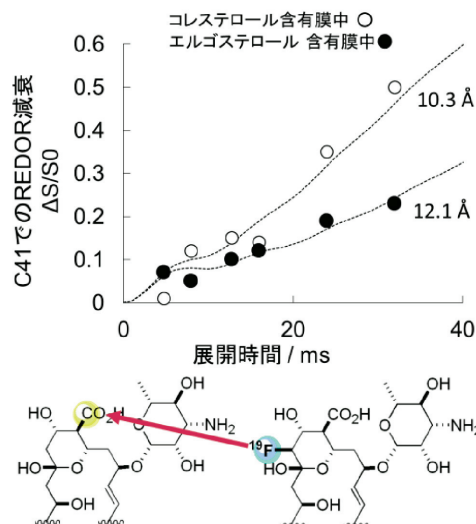


図4 . C41位でのREDOR減衰と原子間距離。膜に含まれるステロールの違いにより、原子間距離が変化。