



Title	液胞型ATPアーゼ阻害剤バフィロマイシンの作用機構と脂質二重膜における分子挙動に関する化学的研究
Author(s)	林, 達
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73515
rights	
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 (林 達)	
論文題名	液胞型ATPアーゼ阻害剤バフィロマイシンの作用機構と脂質二重膜における分子挙動に関する化学的研究

論文内容の要旨

バフィロマイシン(Baf, 図1左)は放線菌より単離された天然物であり、膜タンパク質である液胞型ATPアーゼ(V-ATPアーゼ)の膜貫通領域に結合し、その機能を特異的に阻害することが知られている。近年、骨粗鬆症やがんなどの疾病へのV-ATPアーゼの関与が示唆されたことから、BafによるV-ATPアーゼ阻害機構に興味を持たれているが、その分子基盤は未だ明らかになっていない。またBafの生物活性はV-ATPアーゼ周辺的环境によって大きく変化することが報告されているが、その詳細についても未解明のままである。そこで本研究では膜タンパク質の周囲を取り巻く脂質二重膜に着目し、脂質膜環境下におけるBafの挙動が生物活性にどのように寄与しているか評価することを研究目的に設定した。すなわち、Bafおよび構造・活性が異なる誘導体について脂質膜環境下における動態や立体配座を比較することで、Bafの構造と膜中挙動、さらには生物活性との相関を明らかにすることを目指した。

Bafおよびその誘導体(図1中央・右)について物性比較を実施した。なお、これらの誘導体は脂質膜系における構造解析に有効な固体NMR法に用いるプローブ分子として合成された化合物であり、23位にトリフルオロメチル基を有するFBafはBafとほぼ同等の生物活性を持つのに対し、6位・8位のメチル基がないdesFBafはほぼ活性を示さない。これらの分子について脂溶性、膜親和性や膜挿入・離脱速度について評価したところ、desFBafはBafに比べて膜親和性が一桁程度低く、脂質膜中で比較的不安定であることが示された。また固体NMR解析の結果から、desFBafはメチル基があるものに比べて脂質膜環境下における分子の運動性が高いことが示唆された。

以上の結果について分子構造の観点から考察するために、BafとdesFBafについて溶液NMRや分子動力学計算により立体配座の自由度を評価した。その結果、desFBafはカルボニル基を含む共平面やTHP環との連結部分の配座自由度が増加しており、Bafのように剛直かつ平面的な立体配座を安定に保持していないことが示された。この結果はBafの特徴的な構造がV-ATPアーゼに対する結合親和性のみならず脂質膜に対する親和性向上に寄与していることを示唆している。またBafはその特徴的な構造により高い膜親和性を獲得することで、V-ATPアーゼ周辺における有効濃度を上昇させ、V-ATPアーゼ阻害活性を向上させていると考えられる。

本研究は従来深く議論される機会の少なかった「リガンド分子の構造が脂質膜親和性に及ぼす寄与」を実験的に詳細に評価したものであり、本研究で得られた知見、確立された方法論は膜タンパク質を標的とするリガンド分子の活性発現機構の解明につながることを期待される。

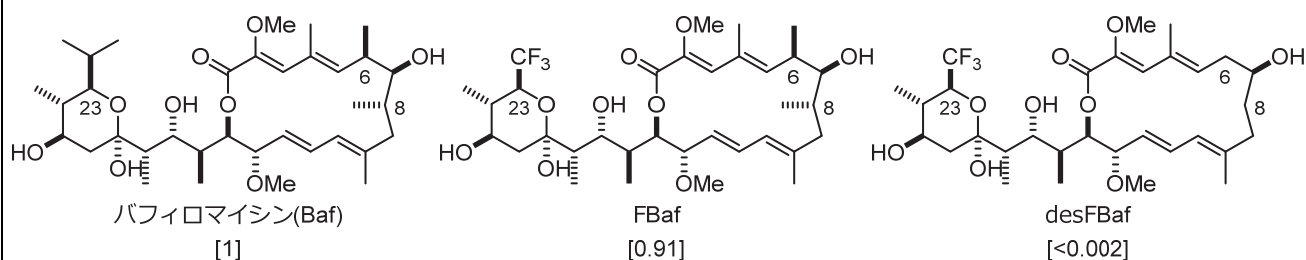


図1：バフィロマイシン(Baf)および誘導体の構造と生物活性
 []内の数字はBafの生物活性を1とした時の各化合物の活性を表す。
 また化合物中の数字は炭素番号を表している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （ 林 達 ）		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教 授 村 田 道 雄
	副 査	教 授 久 保 孝 史
	副 査	教 授 高 尾 敏 文

論文審査の結果の要旨

林氏が学位論文研究において着目した放線菌の抗生物質バフィロマイシン(bafilomycin A₁, 以下 Baf) は、強力な液胞型 ATP アーゼ(V-ATP アーゼ)の阻害剤として、研究分野で重用されている天然有機化合物である。同氏は Baf の阻害作用が膜脂質と接する V-ATP アーゼのドメインへの結合に介していることに着目し、複雑な構造を有する Baf が生体膜へ結合する際の構造変化を詳しく解析した。その結果、立体配座変化による膜配向性の向上と極性減少が脂質二重膜に対する親和性を高めることが、強力な生物活性の発現に寄与していることを明らかにした

林氏は、各種 Baf 誘導体の脂質膜環境下における挙動を化学的に解析した結果、マクロラクトン環の2つメチル化が欠損した誘導体 desFBaf が他の誘導体では見られない顕著な生物活性の低下を示した(本誘導体にはさらにフッ素が置換しているが、活性の低下はこのメチル基の欠損によることは明らかである。Baf の立体配座が生体膜への親和性に大きく影響することを実験的に明らかにするために、同氏は全合成的手法によって Baf の標識体を合成し、これらを用いてモデル脂質二重膜の固体 NMR 実験、膜親和性実験、疎水性パラメータ測定、計算化学などを実施した。また、これら測定結果を Baf と詳細に比較した。詳細な NMR 実験の結果、分子内水素結合によって形作られている Baf の特徴的な立体構造が V-ATP アーゼへの結合親和性のみならず、高い膜親和性の発現にも貢献していることが示唆された。また、膜透過性を測定する手法(PAMPA)をこの両者に適応し、同氏が定式化した速度論的解析法によって、脂質二重膜に対する親和性を解析した結果、有機溶媒に対しては同程度の親和性を示す市販の合成薬物・ベラトリジンに比べて、Baf は脂質二重膜に対して顕著に高い親和性を有することを明らかにした。これら知見は、膜中に結合部位を持つ脂溶性薬物の作用機構解明に資するものであり、薬物の膜分配・膜透過研究に示唆を与えるものである。本研究で得られた知見をもとに、膜中での作用標的である V-ATP アーゼのサブユニットへの結合過程を詳細に解析し、Baf 誘導体間の活性の違いや結合時の立体配座などを解析することができれば、Baf の強力な阻害活性の分子機構の全貌が解明できると期待される。

本研究は、全合成的手法による標識導入および固体 NMR 測定などを通じて、Baf の強力な生物活性が生体膜への効率的な結合によって担われていることを初めて明らかにした点で高く評価できる。

以上のように、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。