OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NMRによる膜作用性分子の構造解析
Author(s)	松森, 信明; 大貫, 惇睦
Citation	大阪大学低温センターだより. 2006, 136, p. 7-11
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/8868
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

NMRによる膜作用性分子の構造解析

理学研究科　松　森　信　明（内線5569）

１．はじめに

生理活性を有する有機化合物の中には、生体膜や膜蛋白質を標的として作用するものが多数存在している。特に近年の新薬の開発は膜タンパク質をターゲットとしたものも多く、有機分子と脂質膜系との相互作用の解析は、薬物活性や毒性、さらには薬物動態の解明に不可欠である［1］。しかし、脂質膜に結合した状態での構造解析法は未だ確立されたとは言い難い。これは、膜中での構造研究に溶液**NMR**や**X**線結晶構造解析の適用が一般に困難なためである。近年固体**NMR**の進歩に伴い、一部の膜タンパク質や膜ペプチドで固体**NMR**を用いた構造研究が行われているものの［2］、有機化合物での検討は極めて少ない。これは、固体**NMR**の適用は安定同位体による標識化が必須であり、標識化が比較的容易なペプチドに比べ有機化合物の標識化が困難であることが大きな理由となっている。

一方で、最近バイセルと呼ばれる脂質集合体が注目を集めている［3］。バイセルは長鎖のリン脂質と短鎖のリン脂質からなるディスク状の脂質会合体であり、長鎖リン脂質が形成する平面部分は二重膜構造を有していることから、最小の二重膜モデルと考えられている（図**1**）。短鎖リン脂質に対する長鎖リン脂質の割合が多いバイセルは外部磁場に対し配向する性質を示す。一方、短鎖リン脂質の割合が**1**以上になると、ディスク状の形状を保ったまま磁場に対して等方的に存在することが知られている［4］。この等方性（**isotropic**）バイセルに膜作用性物質を含有させることにより、

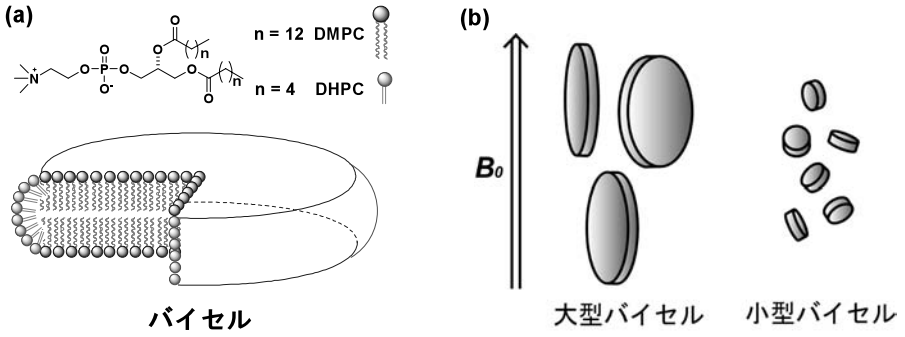

図**1**．バイセルの模式図

（**a**）長鎖リン脂質はバイセルの平面部分に存在し、二重膜を形成する。一方、短鎖リン脂質は縁に存在している。

（**b**）大型のバイセルは磁場配向性を有するが、小型バイセルは等方的に存在する。バイセルのサイズは長鎖と短鎖脂質の割合によって変えることができる。

脂質二重膜に結合した状態での溶液**NMR**による高分解能スペクトル測定が可能となる。

我々はこれまで膜作用性有機分子の膜中での構造について、溶液**NMR**および固体**NMR**それぞれを用いて検討を行ってきた。上述のように固体**NMR**を用いる場合は有機分子の標識化が必須であるが、バイセルを用いる場合は特に標識化を行わなくても**NMR**測定が可能であることから、比較的汎用性が高いと考えられる。そこで今回はこのバイセルを用いた膜作用性化合物の構造解析について、最近の我々の研究を紹介する。

2．バイセル中におけるエリスロマイシンの構造解析[5]

まず我々は膜作用性物質としてエリスロマイシン**A**について検討を行い、膜中での配座および膜中での存在状態の解明を試みた。エリスロマイシン**A**はグラム陽性菌に対し効果的なマクロライド系抗生物質で、細菌のリボソームに結合しタンパク合成を阻害することにより活性を発現する。一方で、酸性リン脂質膜と結合し、脂質分解酵素ホスホリパーゼ**A**を阻害することでリン脂質が蓄積するリン脂質症を副作用として引き起こす可能性が指摘されている[6]。しかし、その阻害機構はまだ充分に解明されておらず、したがってエリスロマイシン**A**の膜中での配座解析は臨床的な意義を有すると考えられる。

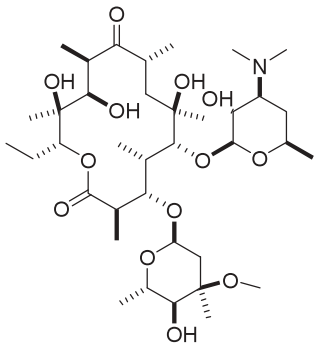

図 **2**．エリスロマイシン**A**の構造

エリスロマイシン**A**由来の**NMR**シグナルの観測を容易にするために、等方性バイセルはアシル鎖が重水素化されたリン脂質を用いて調製した。混合比率は長鎖脂質と短鎖脂質（**DHPC-d_{22}**）の比を **1**：**2** とした。エリスロマイシン**A**は酸性リン脂質と強く相互作用するので、長鎖脂質は**DMPC-d_{54}**に酸性リン脂質**DMPG-d_{54}**を **9**：**1** で混合した。またエリスロマイシン**A**は全脂質に対し **8 mol**%含有させた。

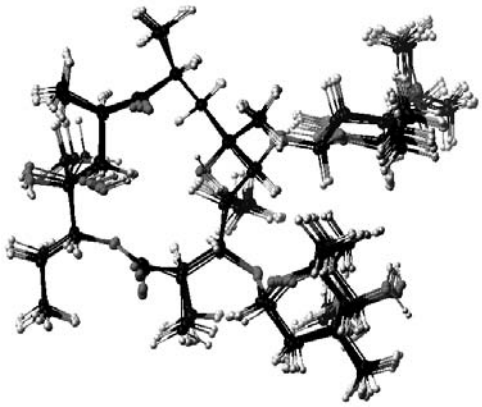
図 **3**．エリスロマイシン**A**のバイセル中での配座

このようにして調製したサンプルに対し、主に **2** 次元**NMR**の**NOESY**および**DQF-COSY**測定を行い、距離情報および二面角情報を得た。これらの制限情報をもとに分子動力学計算を行い、バイセル中におけるエリスロマイシン**A**の三次元立体構造を求めた（図 **3**）。

3．エリスロマイシンAのバイセル中における存在位置[5]

次に常磁性物質を用いてエリスロマイシン**A**のバイセル膜中での存在位置を決定した。水素原子の縦緩和時間は、常磁性部位からの距離が近いほど大きく減少する。今回、常磁性物質として**Mn^{2+}**、**5-DOXYL-PSPC**、**12-DOXYL-PSPC**をそれぞれ添加し、影響を受けるエリスロマイシン**A**の水素原子を特定した（図 **4**）。その結果、ジメチルアミノ基水素の縦緩和時間は**Mn^{2+}**添加時に大きく

減少したため、この部分は膜表面付近に存在していると考えられる。一方、ラクトン環部分の水素原子は**DOXYL-PSPC**添加時に影響が大きく、膜疎水部に存在しているものと推定した。

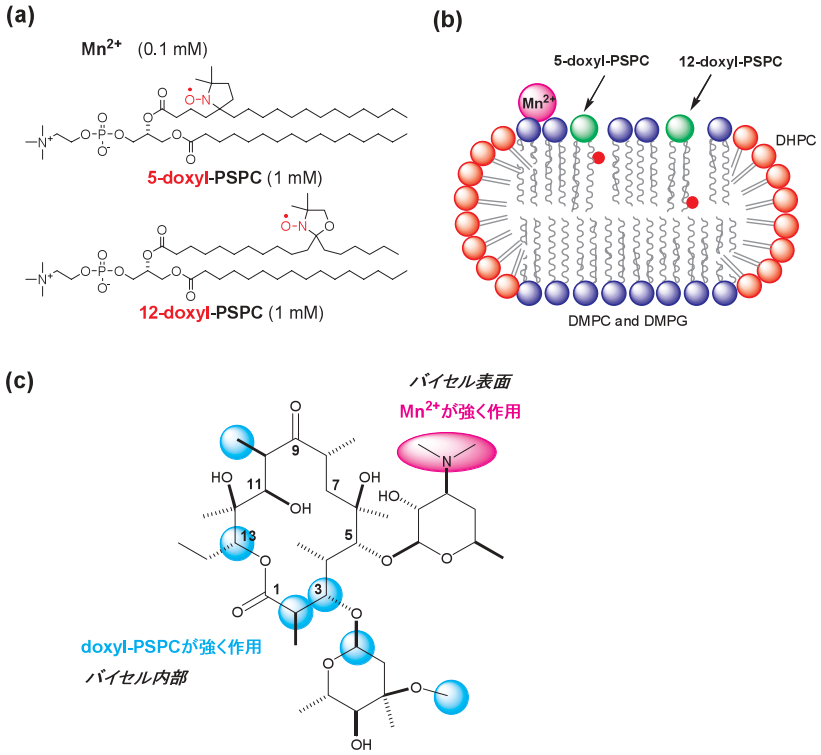

図 **4**．常磁性試薬を用いたエリスロマイシン存在位置の決定
（**a**）実験に用いた常磁性試薬
（**b**）模式的に表したバイセル中での常磁性試薬の存在位置
（**c**）常磁性試薬が強く作用したエリスロマイシン**A**の部位

次に、上で推定したバイセル中でのエリスロマイシン**A**の存在位置を確認するために、エリスロマイシン**A**と脂質分子間の**NOE**の観測を試みた。測定には微弱な**NOE**を観測するために**GOESY**法[7]を用い、またリン脂質は重水素体ではなく、非標識体を用いた。その結果、ジメチルアミノ基とリン脂質極性基の間に分子間**NOE**が観測された（図 **5**）。この結果は上記のMn^{2+}イオンを用いた緩和実験の結果を支持している。

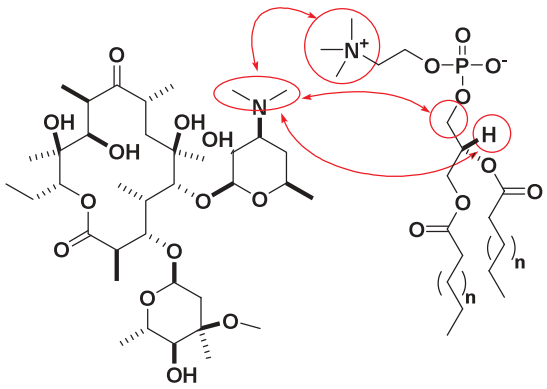

図 **5**．エリスロマイシン**A**とリン脂質間の分子間**NOE**

冒頭で述べたようにバイセルは平面部分とその周りの縁の部分から構成されているため、続いてエリスロマイシン**A**のバイセル中での分布について検討した。これには上記の分子間**NOE**を利用し、非標識**DMPC**の代わりに極性基部分が重水素標識された**DMPC**を用いたところ、**NOE**強度が極端に減少することを確認した。これは、分子間**NOE**がエリスロマイシン**A**と**DHPC**間ではなく、エリスロマイシン**A**と**DMPC**間に由来することを示している。すなわち、**DMPC**で構成されるバイセル平面部分にエリスロマイシン**A**が多く分布し

ていることが明らかとなった。

以上の結果から、バイセル中でのエリスロマイシン**A**の存在状態を図 **6** のように推定した。エリスロマイシン**A**は脂質二重膜を形成しているバイセル平面部分に存在していることから、今回得られたエリスロマイシン**A**のバイセル膜中での構造は、実際の生体膜中での構造および存在状態をほぼ再現しているものと考えられる。上述のようにエリスロマイシン**A**は脂質膜に結合し、脂肪酸エステルを加水分解する酵素ホスホリパーゼ**A**の働きを阻害する可能性が示唆されている。図 **6** に示すようにエリスロマイシン**A**のマクロライド環はリン脂質のエステル付近に存在していることから、ホスホリパーゼ**A**の脂質エステルへの接近を立体的に阻害している可能性が考えられる。

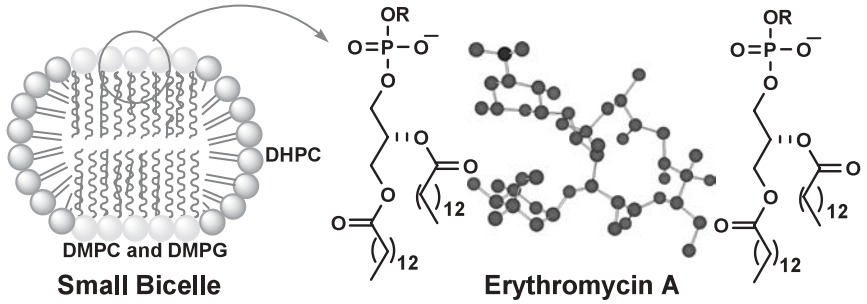

図 **6**．バイセル中でのエリスロマイシン**A**の推定構造

最後にミセルについても言及しておく。溶液**NMR**による構造解析は、膜作用性分子をミセルに含有させた場合も可能であり、非常に多くの研究例がある。しかし、ミセルは両親媒性分子の球状会合体であることから、脂質二重膜を正確に再現しているとは言えず、そこに含まれる分子の配座や存在位置は脂質二重膜でのそれと必ずしも一致しない場合がある。実際我々も別の抗生物質に関して**SDS**ミセルとバイセルで構造が異なることを見出している。一方で、含有させる分子によってはバイセルがディスク状の形状を取り得ないこともあるので、バイセルの適用にも注意が必要である。

4．おわりに

冒頭にも述べたように、多くの有機低分子薬剤が直接または間接的に脂質膜もしくは膜タンパク質に作用することを鑑みると、薬剤－脂質膜相互作用の解析は今後ますますその重要性を増していくものと考えられる。我々の研究はまだ限られた系での検討に過ぎないが、薬剤－脂質膜や薬剤－膜タンパク質間の相互作用解析における有機化学的アプローチの端緒になればと願っている。

最後に、この研究は大阪大学大学院理学研究科生体分子化学研究室で行われたものであり、村田道雄教授、大石徹助教授、そして実際に研究を行ってくれた諸岡篤修士（現富士フィルム）に深く感謝する。

参考文献

［1］J. K. Seydel, M. Wiese, ***Drug-Membrane Interactions***; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, pp 1-31（2003）.

［2］総説 S. J. Opella, F. M. Marassi, ***Chem. Rev.***, 104, 3587（2004）.

［3］I. Marcotte, M. Auger, ***Concepts Magn. Reson.*** A., 24, 17（2005）.

［4］K. J. Glover, J. A. Whiles, G. H. Wu, N. J. Yu, R. Deems, J. O. Struppe, R. E. Stark, E. A. Komives, R. R. Vold, ***Biophys. J.***, 81, 2163（2001）. P. A. Luchette, T. N. Vetman, R. S. Prosser, R. E. W. Hancock, M. P. Nieh, C. J. Glinka, S. Krueger, J. Katsaras, ***Biochim. Biophys. Acta***, 1513, 83（2001）. L. van Dam, G. Karlsson, K. Edwards, ***Biochim. Biophys. Acta***, 1664, 241（2004）.

［5］N. Matsumori, A. Morooka, M. Murata, ***J. Med. Chem.***, 49, 3501（2006）.

［6］J. P. Montenez, F. Van Bambeke, J. Piret, R. Brasseur, P. M. Tulkens, M. P. Mingeot-Leclercq, ***Toxicol. Applied Pharmacol.***, 156, 129（1999）.

［7］J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A. J. Shaka, ***J. Am. Chem. Soc.*** 116, 6037（1994）.

保　安　組　織

低温センターにおけるヘリウム液化等の業務は、高圧ガス保安法の定める高圧ガス製造に該当します。このため、同法により保安組織を設けることが義務付けられています。

2006（平成18）年10月1日現在の保安組織は以下の通りです。

	吹田分室	豊中分室
保安係員	牧山博美	竹内徹也
〃　代理	大寺　洋	古木良一