

「分子複合系の構築と機能」

平成 10 年度採択研究代表者

橘 和夫

(東京大学大学院理学系研究科 教授)

「複合体形成に基づく膜タンパク質の機能制御」

1. 研究実施の概要

レセプターやイオンチャネルなどの膜結合タンパク質は、生命活動の根源とも言える細胞内外のシグナル伝達に深く関与している。これらの生理機能を分子構造レベルで理解するためには静止時および活性化状態それぞれの立体構造を知る必要があるが、これらは一般にX線結晶解析やNMR分光法に適さず、構造研究が著しく遅れている。

特にこれらの膜貫通部位は、細胞外でのリガンドの結合による構造変化を細胞内での酵素活性の制御として伝えるなど、その膜内における相対配置が重要であるにも拘らず、NMRによる原子配置情報が異方性と緩和時間の関係で従来取得困難であったために、その構造研究は大きく立ち遅れている。

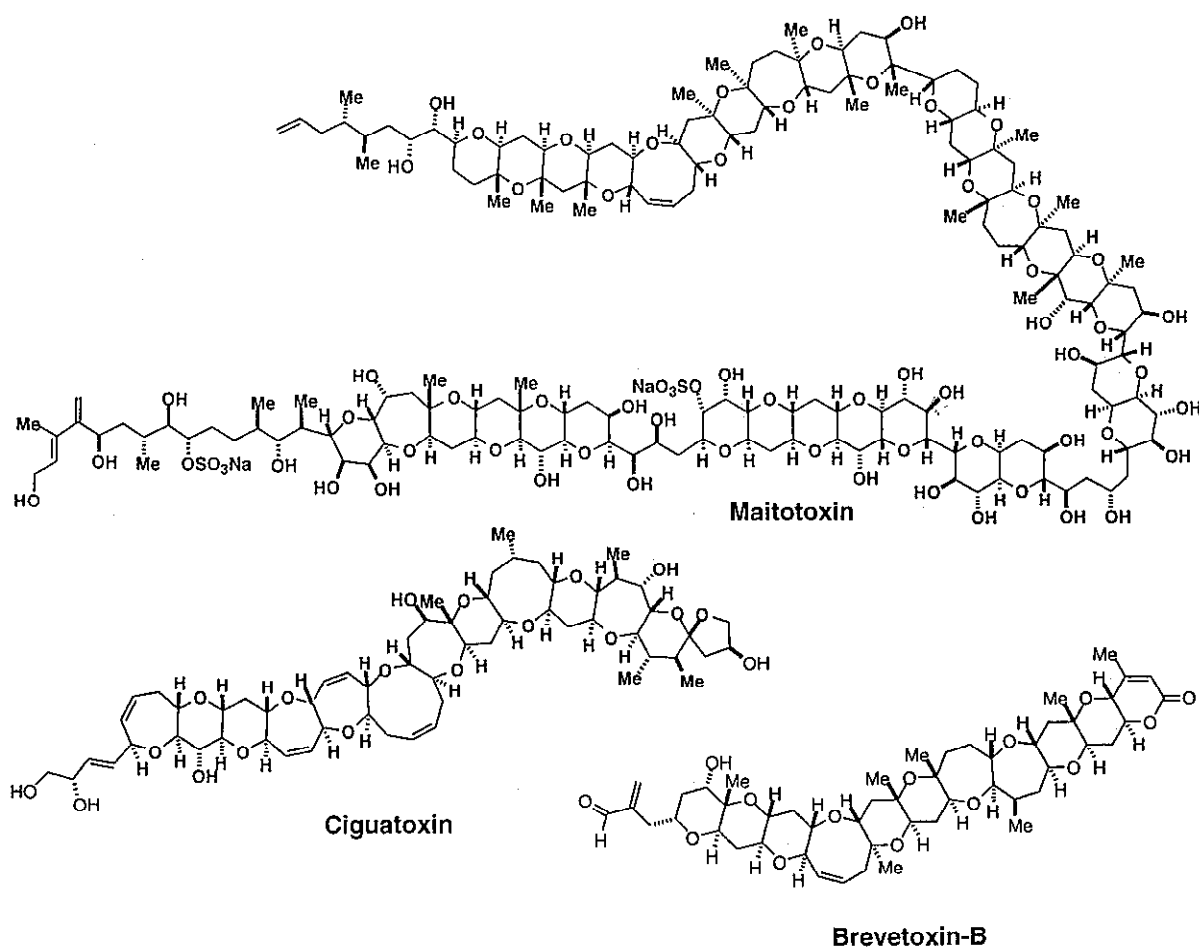
我々がこれまで構造解析、作用機構、および有機合成の各研究対象としてきた海産毒である梯子状ポリ環状エーテル系天然物は、その分子長と生物活性との相関、および他の研究者の成果を含めた作用研究の実験結果より、膜タンパク質の膜貫通部位に特異的に結合して強力な生物活性を発現すると推定できる。特にこのうちその入手が比較的容易なブレベトキシンは、神経伝達の主役として知られる膜タンパク質である電位依存性ナトリウムチャネルの活性化状態に親和性を有する一方、他の膜結合タンパク質へはその静止状態に親和性を有する事実を見出した。

本研究課題ではまず、ブレベトキシンと同じ様式、かつその数 10 倍の親和性で本チャネルタンパク質に作用するシガトキシンの全合成を皮切りに、合成的手法によりその構造を自在に改変して類縁体を用いてこれら相互の認識とその特異性に関する知見を蓄積する。また、NMR技術の進展により可能になってきている細胞膜中での原子間距離に関する情報取得技術を取り入れることで、ポリ環状エーテル化合物を介した膜タンパク質の静止状態と活性化状態の相違を、膜貫通部位の空間配置のレベルで解明することを目的とする。さらに得られた知見に基づき、膜タンパク質の機能を特異的に制御することが可能な分子のデザイン、創製をめざす。

2. 研究実施内容

本研究ではまず、ブレベトキシシンおよびシガトキシシンが認識、活性化することが知られる電位依存性ナトリウム・チャンネルタンパク質での認識部位と、これに必要な梯子状ポリエーテル側での構造モチーフを明らかにする。特に、非常に強い認識能が報告されているにも拘わらず天然からの量的調達が困難なシガトキシシンに関して、上記の目的で全合成研究を進めてきた。これまでに構造右側8環を含む10環性モデルの合成を達成しているが、チャンネルタンパク質への認識能は認められなかった。

一方、赤血球を含む広範囲の細胞に極低濃度で Ca^{2+} 流入を惹起するマイトトキシシンに関して、その標的タンパク質は未だ同定されていない。しかしこの作用がマイトトキシシンの一部の類似構造のみられるブレベトキシシンにより阻害されることにより、標的タンパク質は異なるもののナトリウム・チャンネルの場合と共通の膜タンパク質と梯子状ポリエーテルとの認識様式が想定できる。ここで上記の10環性モデルもマイトトキシシンの作用を制御することが認められ、一連のシガトキシシン類縁体の合成はナトリウム・チャンネルに留まらず膜タンパク質一般への作用でのプローブをも供給することが期待できる。これらの目的達成に向け、本年度は以下の研究を実施した。



(1) 膜タンパク質の再構成系を用いたポリエーテル評価系の構築

生理活性分子の作用機構は、これまでその細胞生理に与える影響より標的細胞成分を推定し、これを発現する細胞系を用いて結合実験や活性化による細胞現象を観測することでその作用を評価してきている。しかし多くのタンパク質を発現し複雑な細胞内情報伝達系を有する細胞系では、個々のタンパク質に対する作用を個別に評価していることは保証されない。本研究課題は細胞膜でのポリエーテル分子による膜タンパク質の認識と活性化という素過程を対象としており、この過程のみを評価する試験系の開発を試みた。最終的には膜タンパク質のうち、この過程に関わる合成セグメントを用いた研究を予定しており、この方法論は本研究課題の達成に必須である。

本年度はブレベトキシンを用いて、電位依存性ナトリウム・チャンネルの再構成系に対する評価の有効性を、予備的にはあるが検証、確認した。即ち、本タンパク質の効率的供給源として知られている電気うなぎ発電器官よりチャンネル・タンパク質を抽出、既知法により精製し、リン脂質であるアゾレクチンに再構成した。これに対してトリチウム化ブレベトキシンを用いた結合実験を行ったところ、ラット・シナプトソームにて得られている1 nM程度の解離定数での強い結合が認められた。なお、本再構成系は電気泳動により単一のタンパク質を含有するが、その結合量より求められた被認識能を維持するタンパク質の収率は数%程度であった。

次に、この認識におけるチャンネル活性化が起こっているかを検証する目的で、カリウム・イオン存在下で再構成リポソームを調製、これをナトリウム・イオン含有緩衝液にて希釈後、カリウム特異的イオノフォアであるバリノマイシンを加えて、リポソーム膜内外に分極電位を発生させた。なお、膜電位は脂質膜に含有させた電位依存性蛍光指示薬でモニター可能であった。ここにブレベトキシンを投与したところ脱分極が観測され、これは本チャンネルの不活性化剤であるテトロドトキシンにより阻害された。なお、対照としてナトリウム・チャンネル非存在下で同様に作製した分極リポソームはブレベトキシンにより脱分極されず、上記の現象はブレベトキシンとチャンネル・タンパク質との結合によるものであることが示された。

(2) マイトトキシン標的タンパク質の光親和性ラベル

未同定であるマイトトキシンの標的タンパク質の特定に向け、本分子末端共役ジエン部での Diels-Alder 反応により、光反応性トリフルオロジアジリン構造を結合させ、さらにリンカーを介して検出用のビオチン構造を導入した。本誘導体存在下赤血球を照射したところ、光ラベルされた数個のタンパク質が電気泳動上でのビオチン特異的検出により認められた。また、これらのラベル化はブレベトキシンにより阻害された。今後、これらの中から Ca^{2+} 流入に関与するものを特定していく予定である。

(3) シガトキシンの全合成研究

シガトキシン天然同族体のうち、左側側鎖4炭素を欠くもの(51-HO-CTX3C)がシガトキシン(CTX1B)と同程度の活性を有することが報告されているため、当面の合成標的をこの分子に設定し、左側4環部の合成を行ない4番目のエーテル環(D環)のオレフィン導入を除いてこれを達成した。上述の10環性モデルの合成で得られている知見をもとに残りの部分を合成し、この4環性構造と繋げることで、51-HO-CTX3Cの全合成を達成する予定である。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

1件