

「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

細胞膜に結合している膜タンパク質の多くは、細胞外側からのメッセンジャー分子や他細胞の表層糖鎖との結合、あるいは神経、筋肉での膜電位、網膜での光といった刺激により活性化され、細胞内での酵素活性の変化や無機イオン流入により細胞内での一連の生理変化をもたらす。しかしこの細胞内への情報増幅伝達が達成されると同時にこれらは静止状態にあるため、この一過的活性化状態に関する立体構造情報は推定の域を出るものはない。

本研究課題では、膜タンパク質の活性化状態に強い親和性を示す天然毒などの外因性分子を用いて、寿命を延ばした活性化状態での立体構造情報を取得解析し、膜タンパク質の活性化に関する構造的根拠を解明することを目的とする。

このため、(1)天然物の単離と有機合成による膜タンパク質親和性分子の調達、および(2)脂質二重膜内での複合体に関する構造情報取得のための方法論の開発の双方の攻め口により研究を進めている。具体的な対象分子複合体として、膜系では最も強い会合定数を有するものの一つであるポリ環状エーテル天然物シガトキシンと電位依存性ナトリウムチャンネルタンパク質との複合体を念頭に置き、本天然物の有機合成による調達をはかるとともに、ここで想定される複合体形成様式の一般性を検証する目的でポリ環状エーテル分子種の集積を行なっている

### 2. 研究実施内容

#### (1) ポリ環状エーテル天然物の単離・構造決定

仏領ポリネシア産ウツボの内臓および渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus*中のシガトキシン同族体23成分を得た。得られた各成分はいずれも0.01 mg以下の微量なので、確立しているシガトキシンの化学構造(次項に構造式)に基づき、ナトリウム付加イオンを前駆イオンとするFAB/MS/MSによって構造解析を行った。その結果、化学構造の修飾は分子の両末端で起きており、酸化による水酸基やケトンの導入と環の解裂が見られた。これらの分子はいずれもマウス毒性を示し、特に培養によって得られるM環解裂体は標識化誘導体の調製に有用であると考えられる。

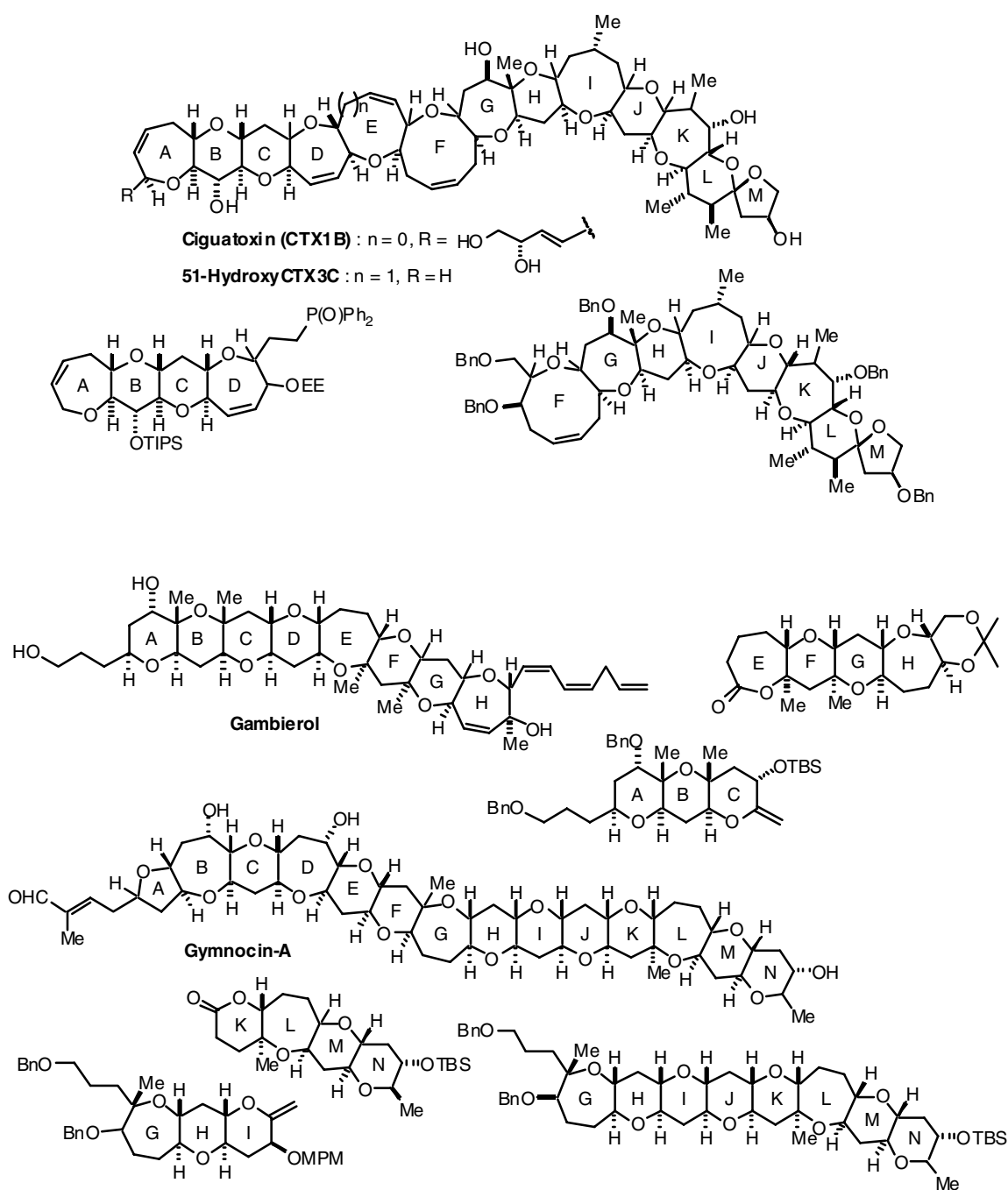
以上とは別に、瀬戸内海産の赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* から単離されていた新規ポリ環状エーテル化合物ギムノシン - A の立体構造決定を行なった結果、これは末端側鎖に共役アルデヒドを有し、14個のエーテル環が梯子状に連結した新規ポリエーテル化合物と推定できた。連続して縮環した環状エーテル数としてはこれまで知られるもので最多であり、何らかの膜タンパク質との結合により毒性を発現していると思われる。

(2) シガトキシンおよび関連ポリエーテル系天然物の全合成研究

シガトキシンに関して、昨年度に引き続きラクトン由来のエノールトリフラートあるいはリン酸エステル *B*-アルキル鈴木カップリング反応を基盤とする収束的エーテル環連結法を用いてシガトキシンおよび関連化合物の全合成研究を進めた。シガトキシン *GHI*環部と *KLM*環部をそれぞれ合成し、両者を鈴木カップリング反応により連結することにより *GHIJKLM*環部の立体選択的合成を達成した。また、ラクトン由来エノールリン酸エステルの  $\text{Pd}(0)$ 触媒によるカルボニル化反応を用いた中員環エーテルの新規合成法により *F*環部の構築法を開発し、これを用いて *FGHIJKLM*環部の合成を検討した。しかし、*F*環構築後の保護基の変換において問題点に遭遇したため、*FG*と *IJKLM*環の連結によりこの量的調達を試みた。*GH*核間メチル基導入の立体選択性が従来と異なる問題に遭遇したものの、*FGHIJKLM*環部の合成を達成した。今後すでに合成を完了している *ABCD*環部と *E*環を介して連結することで、全合成を達成する予定である。

すでに合成を報告したガンビエロール *FGH*環部から立体選択的な四級炭素の導入を経て、*EFGH*環部の合成を達成した。また、*ABC*環部の合成を行い、*EFGH*環部との鈴木カップリング反応による連結と *H*環側鎖の導入による全合成を検討中である。

前項で立体構造が決定され、鈴木カップリングの適用が容易と思われることで新規合成標的として設定した細胞毒性新規ポリエーテル化合物ギムノシン-Aに関して、この *GHI*および *KLMN*環部の合成、両者の連結による *GHIJKLMN*環の合成を上記方法論により達成した。



### (3) タンパク質膜貫通部位モデル系の開発

従来プレベトキシンを指標に用いて構築を行ってきた電位依存性ナトリウム膜再構成系は、上記に全合成達成が予定されるシガトキシンの複合体研究に用いるには最適と思われるが、材料の電気ウナギの調達が安定しておらず、その後の調製も実験技術を要する。本チャンネルタンパク質でのシガトキシンの作用部位を特定した後は安定同位体を含むこの部位を合成することで複合体の構造研究に進む予定であるが、想定しているポリ環状エーテル分子と膜貫通ヘリックスとの

一般的な親和性を検証する目的で、膜中での自己会合によるチャネル形成が提唱されているミツバチ毒のペプチド成分であるメリチン（26残基）を含むリポソームの作成を新たに試みた。この結果、非結合メリチンとゲルろ過にて容易に分離可能な膜結合メリチンを調製することができた。しかし高濃度で放置するとメリチンが一部遊離するなどの問題も残っており、タンパク質膜貫通部位に知られるいくつかのペプチド配列を化学合成し、安定かつ調製容易な再構成系を見出すべく、このアプローチを続ける予定である。なお、磁場に対しての配向が知られる脂質二重膜であるバイセルにC-13ラベルしたメリチンを共存させて溶液NMRを測定したところ、バイセルの会合と思われる理由によりメリチンのシグナルは観測できなかった。

#### (4) 膜タンパク質構造解析の方法論開発

L型カルシウムチャネルについて、電子顕微鏡を用いた $\alpha 1$ - $\beta$ 複合体および全サブユニットから成る複合体のsingle particleの解析を行った結果、各サブユニットの3次元空間的配置についての知見が得られた。これに基づき構造モデルを作成することで、ここに作用する薬物との複合体構造解析に進む予定である。

また、膜貫通部位の空間配置に関して多くの知見が得られている光受容膜タンパク質であるロドプシンの3次元構造を用いて、光によるロドプシンの活性化の機構をそのリガンドであるレチナールの光異性化について分子動力学法により検討し、光異性化により生じるレチナールの構造のひずみが解消される経路をコンピュータによりシミュレートした。その結果、活性化された構造（メタロドプシンII）およびこの構造にいたる中間体の構造モデルが作成できた。

膜含有ステロールやリン脂質と複合体を形成することによってイオン透過性チャネルを形成するとされているアンフォテリシンBに関し、二分子の共有結合体、およびステロールもしくはリン脂質との連結分子を調製し、これらの膜透過性増大作用を検証した。またこれらにより形成されるチャネルはアンフォテリシンB自身のものと同様であることが推定できた。現在、固体NMRを使ったC-13標識体の観測により、これら誘導体の膜中における存在状態を検討している。

#### (5) ナトリウムチャネル阻害ペプチド

前年までにナトリウムチャネル阻害活性を維持した修飾体の得られている $\mu$ -コノトキシンに関して、さらに活性中心のアミノ酸側鎖を改変したペプチドと、活性中心の反対に位置するアミノ酸にタグを付けたものを合成し、筋収縮活性阻害を観測した。その結果、ナトリウムチャネルに対する阻害活性は活性中心のアミノ酸では側鎖の厳密な位置が規定されていること、また活性中心と反対側にタグを導入したものではナトリウムチャネルとの複合体形成部位にある程度の深さがあることが明らかになった。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

A, Morohashi, M. Satake, Y. Oshima, and T. Yasumoto : “ Absolute configuration at C45 in 45hydroxyessotoxin, a marine polyether toxin isolated from shellfish ”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64, 1761-1763( 2000 )

M. Sasaki, T. Koike, R. Sakai, and K. Tachibana : “ Total synthesis of ( - ) dysiherbaine, a novel neuroexcitotoxic amino acid ”, *Tetrahedron Lett.*, 41, 3923-3926( 2000 )

M. Sasaki, S. Honda, T. Noguchi, H. Takakura, and K. Tachibana : “ Palladium-catalyzed carbonylation of lactone-derived enol phosphates : Stereoselective construction of functionalized cyclic ethers from lactones ”, *Synlett*, 2000, 838-840.

H. Fuwa, M. Sasaki, and K. Tachibana : “ Synthetic studies on a marine polyether toxin, gambierol : Stereoselective synthesis of the FGH ring system via *B*-alkyl Suzuki coupling ”, *Tetrahedron Lett.*, 41, 8371-8375( 2000 )

T. Yasumoto, T. Igarashi, A.-M. Legrand, P. Cruchet, M. Chinain, T. Fujita, and H. Naoki : “ Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy ”, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 4988-4989 ( 2000 )

A. Morohashi, M. Satake, H. Nagai, and T. Yasumoto : “ The absolute configuration of gambieric acids A-D, potent antifungal polyethers isolated from the marine dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* ”, *Tetrahedron*, 56, 8995-9001 ( 2000 )

K. Konoki, N. Sugiyama, M. Murata, K. Tachibana, and Y. Hatanaka : “ Development of biotin-avidin technology to investigate okadaic acid-promoted cell signaling pathway ”, *Tetrahedron*, 56, 9003-9014( 2000 )

K. Murata, N. Odahara, A. Kuniyasu, Y. Sato, H. Nakayama, and K. Nagayama : “ Asymmetric arrangement of auxiliary subunits of skeletal muscle voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channel ”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 284-291 ( 2001 )

H. Takakura, K. Noguchi, M. Sasaki, and K. Tachibana : “ Synthetic studies on ciguatoxin : A highly convergent synthesis of the GHIJKLM ring system via *B*-alkyl Suzuki coupling ”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40, 1090-1093( 2001 )

佐々木 誠、井上将行 : “ ポリエーテル系天然物の化学合成- 新しい中員環エーテルの構築法とエーテル環連結法の開発 , 有機合成化学協会誌 ”, 59, 193-205( 2001 )

E. Kinoshita, H. Maejima, K. Yamaoka, K. Konno, N. Kawai, E. Shimizu,, S. Yokote, H. Nakayama, and I. Seyama : “ Novel Wasp Toxin Discriminates

between Neuronal and Cardiac Sodium Channels ”, Mol. Pharmacol., in press,  
( 2001 )