

「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

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との結合、神経筋肉での膜電位変化、あるいは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。しかしこの活性化状態は生理的条件下で一過性であり。活性化に伴う立体構造変化に関する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活性化状態の寿命を延ばすことでそ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から研究を進めている。研究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図っている。

### 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

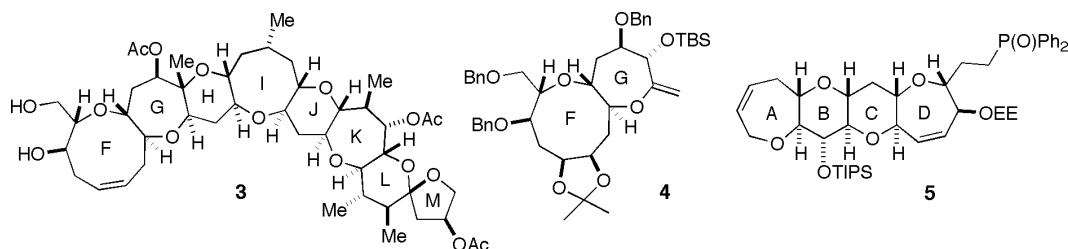
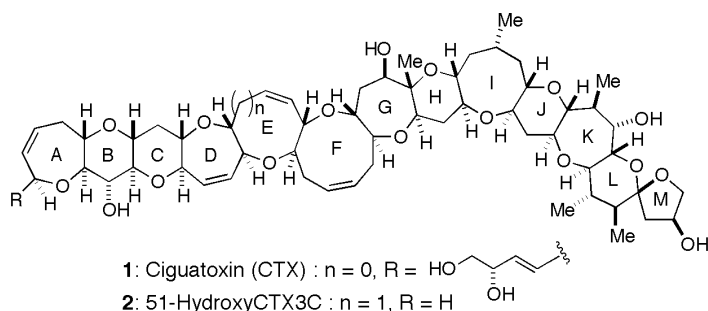
瀬戸内海産の赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* から単離・構造決定され、これまで知られるもので最多である 14 個のエーテル環が梯子状に連結した新規ポリエーテル化合物であるギムノシン-A の生理作用を調べたところ、マウスリンパ腫細胞に対する毒性が見られたがナトリウムチャネル活性化能は見られなかった。異なる作用様式での共通の分子認識機構を抽出する上でこの分子の有用性が期待され、有機合成での調達により標的タンパク質の同定に用いていく予定である。

渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. 培養株より新規ポリオール化合物を単離し、その平面構造を概ね決定した。この構造はカルシウムの膜透過性を亢進するゾーサンテラトキシンと類似性を示す反面、大環状ラクトン構造を欠くなどの相違も認められた。

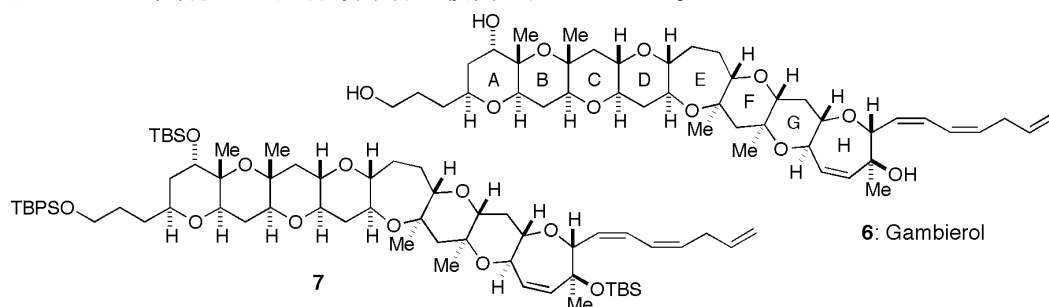
#### (2) シガトキシンおよび関連ポリエーテル系天然物の全合成研究

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

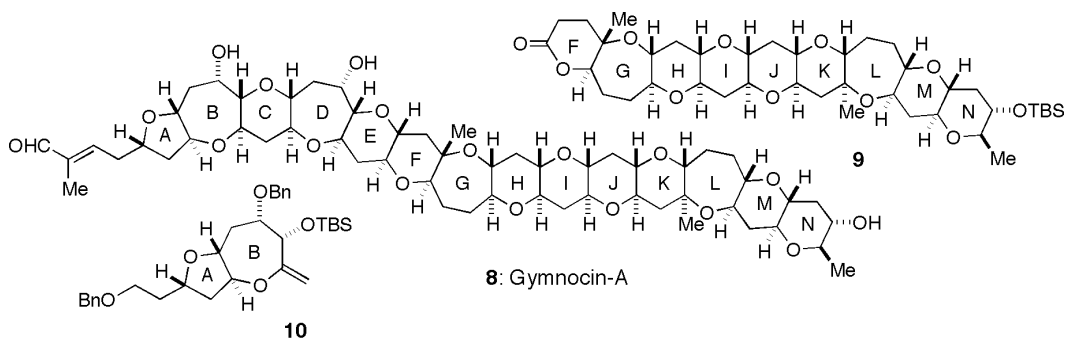
木-宮浦反応を基盤とする収束的エーテル環連結法を鍵反応としてシガトキシン(1)および関連ポリエーテル系天然物の全合成研究を進めた。シガトキシン類縁体、51-ヒドロキシ CTX3C(2)の全合成に関して当初、既に合成している GHIJKLM 環部からの FGHIJKLM 環部 3 の合成を検討したが F 環の官能基化に問題を残した。そこで、ラクトン由来エノールリン酸エステルの Pd(0)触媒によるカルボニル化反応を用いた中員環エーテルの新規合成法により、二重結合を保護した FG 環 4 を合成し、これに I 環、KLM 環を順次連結するより収束性の高い合成経路を確立し、FGHIJKLM 環部 3 の合成を達成した。これを ABCD 環部 5 と E 環を介して連結することにより 2 の全合成を達成する予定であるが、想定外であった F 環側連結部位の立体障害が判明し、現在この解決を図っている。



ガンビエロール(6)に関して、既に報告した EFGH 環部に別途合成した ABC 環部を上記方法論により連結することにより8環性ポリエーテル骨格の合成を達成し、さらに、H 環の官能基化と Stille 反応によるトリエン側鎖の導入を行い、ガンビエロール保護体 7 を得た。現在この全合成の効率化を図るとともに、最終的な脱保護条件の検討を行なっている。



前項で述べた細胞毒性ポリエーテル化合物ギムノシン-A(8)の合成に関して、FGHIJKLMN 環 9 の収束的合成を上記方法論により達成した。また、7員環エーテル上での立体選択的ヒドロキシ基導入と分子内ラジカル環化反応による5員環エーテルの構築を経て AB 環 10 の合成を行った。現在、D 環との連結による ABCD 環の合成を進めている。



### (3) タンパク質膜貫通部位モデル系の開発

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、これまでポリエーテルによる認識能の測定に用いてきた電気ウナギ由来の再構成ナトリウムチャンネルに加えて、脂質二重膜貫通構造の形成が可能なモデルペプチドによる膜タンパク質モデル作成を試みている。このうち、ミツバチ毒のペプチド成分であるメリチン(26 残基)C-13,N-15 標識体に関し、磁場に対する配向が知られる脂質二重膜であるバイセル共存下で NMR を測定したところ、高濃度で形成する4量体に対応する二次構造をとることが示唆された。また同様の二次構造をとると思われるミセル共存下よりも高感度であり、磁場に対する配向有効性が検証された。

メリチンに加えてモデル系として使用すべく、カリウムチャンネル膜貫通部位を含むペプチド(69 残基)を合成し、現在このバイセル再構成系の作成を試みている。

### (4) 膜タンパク質構造解析の方法論開発

分子動力学法により昨年度に得られた光受容膜タンパク質ロドプシンのレチナル光異性化による構造変化モデルを用いて、他の G タンパク質共役受容体膜タンパク質のリガンド認識による構造変化モデルと関連づけることができた。

リン脂質中で膜含有ステロールと複合体を形成することでイオン透過性チャン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、エルゴステロールおよびコレステロールそれぞれとの連結体を調製し二重膜中での分子認識を調べた結果、前者に顕著な認識能が認められた。そこでこの分子を同位体標識し、固体 NMR による膜中での認識様式の観測に用いるべく検討している。

## 3. 研究実施体制

### 複合体構造解析グループ

- ① 橘和夫(東京大学大学院理学系研究科、教授)
- ② ポリエーテル合成、複合体構造解析を担当

### 新規ポリエーテル天然物グループ

- ① 安元健(日本食品分析センター多摩研究所、学術顧問)
- ② 新規海産ポリエーテルの探索、構造決定を担当

### ポリオール・ペプチド毒グループ

- ① 大場裕一(名古屋大学大学院生命農学研究科、助手)
- ② 非ポリエーテル毒の作用解析を担当

#### 活性化評価グループ

- ① 中山仁(熊本大学薬学部、教授)
- ② イオンチャンネルの精製、活性化評価を担当

#### 計算化学グループ

- ① 石黒正路(サントリー生物有機科学研究所、部長研究員)
- ② モデリングと機器分析による複合体構造解析を担当

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- T. Yasumoto: “The Chemistry and biological function of natural marine toxins”, *Chem. Rec.*, **3**, 228–242 (2001).
- H. Fuwa, M. Sasaki, and K. Tachibana: “Synthetic studies on a marine polyether toxin, gambierol: stereoselective synthesis of the EFGH ring System via  $\beta$ -alkyl Suzuki coupling”, *Tetrahedron*, **57**, 3019–3033 (2001).
- R. Sakai, T. Koike, M. Sasaki, K. Shimamoto, C. Oiwa, A. Yano, K. Suzuki, K. Tachibana, and H. Kamiya: “Isolation, structure determination and synthesis of neodysiherbine A, a new excitatory amino acid from a marine sponge”, *Org. Lett.*, **3**, 1479–1482 (2001).
- M. Sasaki, T. Shida, and K. Tachibana: “Synthesis and stereochemical confirmation of the HI/JK ring system of prymnesins, potent hemolytic and ichthyotoxic glycoside toxins isolated from the red tide alga”, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5725–5728 (2001).
- K. Kawahara, T. Gotoh, S. Oyadomari, A. Kuniyasu, S. Kohsaka, M. Mori, and H. Nakayama: “Nitric oxide inhibits the proliferation of murine microglial MG5 cells by a mechanism involving p21 but independent of p53 and cyclic guanosine monophosphate”, *Neurosci. Lett.*, **310**, 89–92 (2001).
- T. Ukena, M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, T. Yasumoto, T. Fujita, and Y. Kan: “Structure elucidation of ostreocin-D, a palytoxin analog, isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 2585–2588 (2001).
- M. Nakamura, Y. Niwa, Y. Ishida, T. Kohno, K. Sato, Y. Oba, and H. Nakamura: “Modification of Arg-13 of  $\mu$ -conotoxin GIIIA with piperidinyl-Arg analogs and their relation to the inhibition of sodium channels”, *FEBS Lett.*, **503**, 107–110 (2001).
- H. Fuwa, M. Sasaki, and K. Tachibana: “Synthetic studies toward gambierol. Convergent synthesis of the octacyclic polyether core”, *Org. Lett.*, **3**, 3549–3552 (2001).
- M. Sasaki, M. Ishikawa, H. Fuwa, and K. Tachibana: “A general strategy for the convergent synthesis of fused polycyclic ethers via  $B$ -alkyl Suzuki coupling. Synthesis of the ABCD ring fragment of ciguatoxins”, *Tetrahedron*, **58**, 1889–1911 (2002).
- N. Matsumori, N. Yamaji, S. Matsuoka, T. Oishi, and M. Murata: “Amphotericin B covalent

dimers forming sterol-dependent ion-permeable membrane channels”, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4180–4181 (2002).

( Proceedings )

- M. Nakamura, Y. Niwa, Y. Ishida, T. Kohno, K. Sato, Y. Oba, and H. Nakamura: “Modification to Arg-13 of  $\mu$ -conotoxin GIIIA with piperidyl-Arg analogs and their evaluations”, *Peptide Science 2001*, ed. H. Aoyagi, pp. 203–204 (2001).
- M. Nakamura, Y. Oba, K. Sato, Y. Ishida, T. Mastuda, and H. Nakamura: “Generation of polyclonal antibody against peptide toxin  $\mu$ -conotoxin GIIIA”, *Peptide Science 2001*, ed. H. Aoyagi, pp. 385–386 (2001).

(2) 特許出願(海外)

H13 年度: 1件