「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、細胞外側からの物理的および化学的刺激により活性化され、細胞内での酵素活性や無機イオン濃度の変化により細胞内での化学反応カスケードを引き起こす。一方、一般に一過性である活性化状態の立体構造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、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）分光学、顕微鏡観察、化学標識、あるいは計算化学といった多面的アプローチによる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、縮環型ポリ環状エーテル分子と膜タンパク質との脂質二重膜内での複合体形成を念頭に置き、有機合成および天然物からの調製によるポリ環状エーテル分子種の集積を進めている。

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

新たに培養した渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus* の藻体抽出物より、GTP2-toxinと仮称した有毒成分を300μg単離した。クロマトグラム挙動とMSおよびNMR分析より、本化合物は同生物種より単離構造決定されているポリエーテル毒マイトトキシンの40位硫酸エステルが脱離したものと推定された。GTP2-toxinのマウス致死毒性は、600 ng/kgと、マイトトキシンの1/10以下であることから、硫酸エステルがマイトトキシンと膜タンパク質との相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

渦鞭毛藻*Symbidodinium* sp.培養株より単離した複数の新規ポリオール化合物は、同種より単離構造決定されているゾーサンテラミドに近い挙動および分子量を示し、これらの構造解明を進めている。

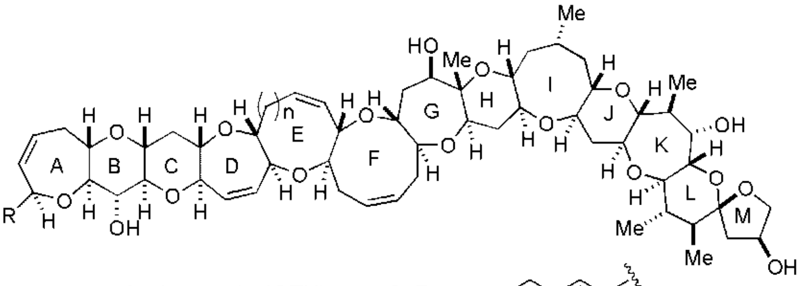
(2) シガトキシンおよび関連ポリ環状エーテル系天然物の全合成研究

膜タンパク質である電位依存性ナトリウムチャネルに最も強い親和性を有するシガトキ

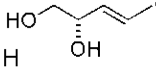
シン（1）、および関連ポリエーテル系天然物の全合成研究を昨年度に引き続き展開した。シガトキシン類縁体、51-ヒドロキシCTX3C（2）の全合成に関して当初の合成計画を一部変更して、ABCD環部とGHIJKLM環部とをEF環を介して連結するためのモデル合成について検討するとともに、ABCD環部を効率的に供給するための改良合成法を確立した。

ガンビエロール（3）に関しては、昨年度合成した(*Z*)-ビニルブロミド4の脱保護により得られるトリオール5と(*Z*)-ビニルスズ6の$Pd(PPh_3)_4$/CuCl/LiCl触媒系を用いたStille反応によりトリエン側鎖を導入し、最初の全合成を達成した。これにより生物活性を詳細に検討するためのガンビエロールの試料調達が可能となった。まずマウスに対する経口毒性の評価と組織損傷部位の病理観察を行った結果、合成ガンビエロールが天然物同様に強い経口毒であること、その標的臓器が心臓であることが示唆された。また、本全合成経路を利用して天然物からは誘導不可能なH環と側鎖に関する数種の構造類縁体の合成を行い、マウス致死毒性を指標とした構造活性相関を展開し、ガンビエロールの強い毒性発現にはH環二重結合と、C32-C33二重結合を含む側鎖の存在が必須であることを初めて明らかにした。これらの知見に基づき、標的タンパク質を同定する目的で分子左端への放射性同位元素および光反応基による標識の検討を開始した。

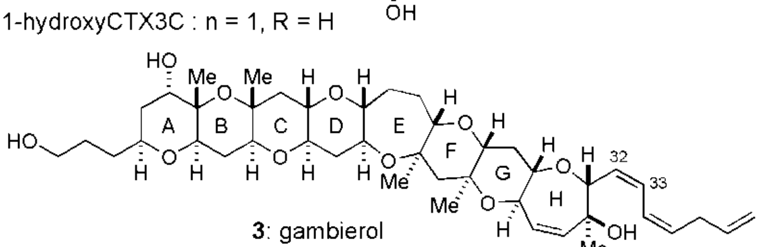
既にFGHIJKLMN環8の収束的合成を*B*-アルキル鈴木・宮浦反応を基盤とするポリエーテル骨格構築法により完了していた細胞毒性ポリエーテル化合物ギムノシン-A（7）の合成については、より効率的な改良合成法の開発とともに、全合成に向けてABCD環部9の合成を達成した。さらにギムノシン-Aの全合成達成に向けて両フラグメントの効率的なカップリング反応条件を検討中である。



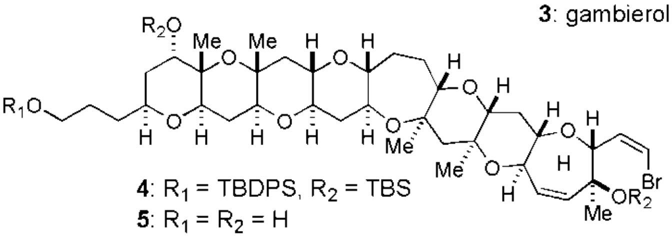
1: ciguatoxin (CTX) : n = 0, R =



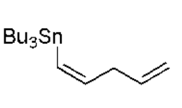
2: 51-hydroxyCTX3C : n = 1, R = H



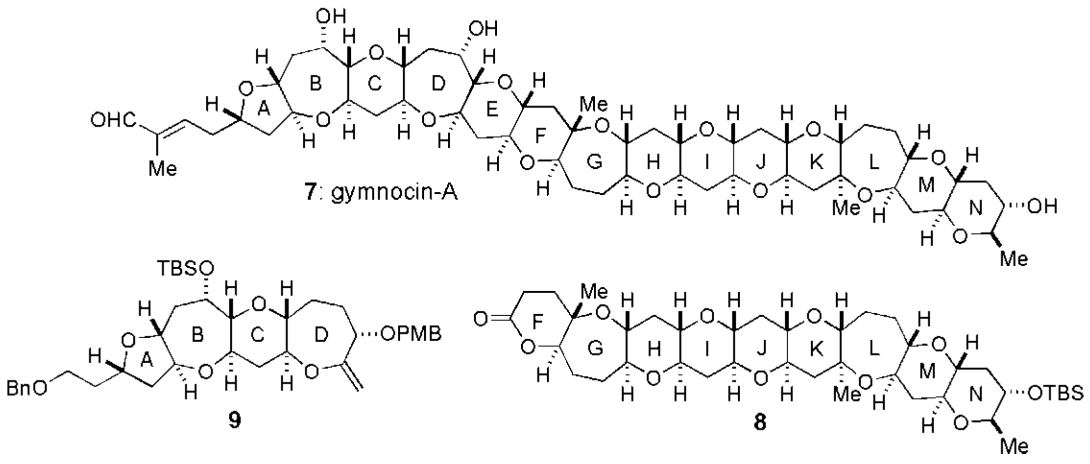
3: gambierol



4: R_1 = TBDPS, R_2 = TBS
5: R_1 = R_2 = H



6



7: gymnocin-A

9　　8

(3) 縮環型ポリ環状エーテルと膜タンパク質との一般的親和性の検証を指向したコンビナトリアル型合成の試み

電位依存性ナトリウムチャネルに作用するとされるブレベトキシンがこのチャネルとは異なるマイトトキシンの未同定標的膜タンパク質に親和性を示すことで後者の作用を阻害すること、天然物のポリ環状構造部分の分子長が細胞膜の厚さにほぼ対応することより、本課題は当初より「これら天然物に見られる縮環型ポリエーテル分子構造は膜タンパク質一般の膜貫通ヘリックス部位に対する親和性を担い、環サイズの配列と置換基や二重結合等の精密構造がこれらの中から標的膜タンパク質を結合相手として選択する特異性を担っている」という作業仮説に基づいて進めてきている。このうち、適切な分子長を有するポリ環状エーテル構造と膜タンパク質との一般的親和性を検証する目的で、迅速かつ量的な調達が容易なオリゴ環状エーテルを合成し、上記の天然物合成で有効性がすでに示されている鈴木・宮浦カップリングによる縮環型オリゴ環状エーテルの収束的連結により、これらの順列組合せによる多数のポリ環状エーテルの合成を計画した。これに基づき現在までに7/6員環が縮環した２環性分子の連結により、続く鈴木カップリングに用いる２種の５環性ポリエーテルを得ている。

(4) タンパク質膜貫通部位モデル系の開発

膜貫通型４量体によりチャネルを形成することが提唱されているハチ毒ペプチド、メリチンに同位体標識した試料を化学合成し、これをディスク状脂質二重膜であるバイセルに再構成することで標記モデル系の構築を試みた。NMRと示唆熱量測定を用いてバイセルとしての存在形態に適切な脂質構成と観測温度を調べた結果、本来は膜撹乱性である上記メリチンがコレステロール含有バイセル中ではこれを壊すことなく安定に存在すること、古細菌の光収集膜タンパク質であるバクテリオロドプシンをバイセルに再構成したものがミセル可溶化系に比べてより細胞膜中での光吸収を反映した構造を持つことを見出した。

(5) チャネル活性化による膜電位変化検出法の開発

電位依存性ナトリウムチャネルの活性化を、電波を遮断した装置環境と熟練技術を要する電気生理学的実験なしに観測する実験系として、デンキウナギ発電器官より精製したチ

ャネルタンパク質のリン脂質二重膜再構成リポソーム内外のイオン分布を操作することでこれに膜電位を発生させ、この脱分極を電位感受性蛍光剤でモニターする実験系を本課題遂行の初期に構築した。これを用いてプレベトキシンによる脱分極が観測できたが、再構成系の調製ロット間での再現性が得られていなかった。そこで本年度に同様の膜電位発生法と蛍光剤による脱分極モニターをラット・シナプトソーム（神経の細胞膜画分）に適用したところ、同チャネル上での別の部位に作用しこれを活性化することが知られている植物毒ベラトリジンの活性発現濃度以下の共存下にて、再現性が改善され濃度依存性も得られた。

(6) 膜タンパク質構造解析の方法論開発

リン脂質に結合することによって会合体を形成し生理活性を発現する抗真菌物質アンフォテリシンB（AmB）につき、生理活性発現時に細胞膜内でAmBと相互作用するとされているステロール、および細胞膜での媒体であるリン脂質との連結分子を化学的に調製した。連結分子の膜透過性亢進活性を測定したところ、リンカーを含むわずかな構造の差異で活性は顕著に異なることが明らかとなり、AmB・リン脂質・ステロールの間で厳密な分子認識なされていることが明らかとなった。さらにリン脂質のリン酸部分との距離を固体NMRで測定したところ、チャネル会合体においてAmBは膜に垂直に配向していることが示された。

神経特異的な新規ナトリウムチャネル毒ペプチドPMTXの結合部位を同定した知見を活かし、PMTXとの比較からによる電位感受性部位近傍を介したチャネル作用機構の解析を目的に、ペプチド固相合成法により種々のPMTXの配列アナログを合成した。この結果神経型Naナトリウムチャネル選択的ペプチドブロッカーp7を作出できた。

未達成であるL型カルシウムチャネルの三次元結晶解析をめざし、５種の全サブユニットを含む本膜タンパク質の精製の結晶化条件を検討した。この結果カルシウムチャネル活性を比較的長く維持できる界面活性剤が選択できたが結晶化には至らず、本チャネルタンパク質の結晶化は極めて困難という結論を得た。

ロドプシンの結晶構造を用いて光活性中間体構造（ルミロドプシンおよびメタロドプシンI）におけるレチナールクロモフォアの構造変化をコンピュータによりシミュレートし、振動スペクトルから得られている構造情報が説明可能な構造変化の様式を見いだした。さらに、生理活性ペプチドのレセプターモデルを作成し、リガンド認識について検討した。これによって、ペプチドの溶液中の構造とレセプター結合構造とを関連づけることが可能となった。

3.研究実施体制

複合体構造解析グループ

①　研究分担グループ長：橘　和夫（東京大学大学院理学系研究科、教授）

②　研究項目：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 研究分担グループ長：安元　健（日本食品分析センター多摩研究所、学術顧問）

② 研究項目：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 研究分担グループ長：大場　裕一（名古屋大学大学院生命農学研究科、助手）

② 研究項目：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 研究分担グループ長：中山　仁（熊本大学医学薬学研究部、教授）

② 研究項目：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 研究分担グループ長：石黒　正路（サントリー生物有機科学研究所、部長研究員）

② 研究項目：モデリングと機器分析による複合体構造解析を担当

4.主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

○ M. Sasaki, T. Noguchi, and K. Tachibana: "Intramolecular radical cyclization‒ ring-closing metathesis approach to fused polycyclic ethers. Convergent synthesis and conformational analysis of the (E)FGH ring system of ciguatoxin", *J. Org. Chem.*, **67**, 3301-3310 (2002).

○ M. Sasaki, C. Tsukano, and K. Tachibana: "Studies toward the synthesis of gymnocin A, a cytotoxic polyether: A highly convergent entry to the F-N ring fragment", *Org. Lett.*, **4**, 1747-1750 (2002).

○ N. Yamaji, N. Matsumori, S. Matsuoka, T. Oishi, and M. Murata: "Amphotericin B dimers with bisamide linkage bearing powerful membrane-permeabilizimg activity", *Org. Lett.*, **4**, 2087-2089 (2002).

○ H. Takakura, M. Sasaki, S. Honda, and K. Tachibana: "Progress toward the total synthesis of ciguatoxins: A convergent synthesis of the FGHIJKLM ring fragment", *Org. Lett.*, **4**, 2771-2774 (2002).

○ H. Fuwa, M. Sasaki, M. Satake, and K. Tachibana: "Total synthesis of gambierol", *Org. Lett.*, **4**, 2981-2984 (2002).

○ H. Fuwa, N. Kainuma, K. Tachibana, and M. Sasaki: "Total synthesis of (−)-gambierol", *J. Am. Chem. Soc.,* **124**, 14983-14992 (2002).

○ M. Satake, M. Shoji, Y. Oshima, H. Naoki, T. Fujita, and T. Yasumoto: "Gymnocin-A, a cytotoxic polyether from the notorious red tide dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi*", *Tetrahedron Lett.*, **43**, 5829-5832 (2002).

○ S. Matsuoka and M. Murata: "Cholesterol markedly reduces ion permeability

induced by membrane-bound amphotericin B", *Biochim. Biophys. Acta*, 1564, 429-434 (2002).

○ T. Ukena, M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, T. Fujita, H. Naoki, and T. Yasumoto: "Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 2387-2393 (2002).

○ T. Hirano, I. T. Lim, D. M. Kim, X.-G. Zheng, K. Yoshihara, Y. Oyama, H. Imai, Y. Shichida, and M. Ishiguro: "Constraints of opsin structure on the ligand-binding site: Studies with ring-fused retinals", *Photochem. Photobiol.*, 76, 606 (2002).

○ H. Yoshikawa, E. Shimizu, K. Kawahara, A. Kuniyasu, T. Shibano, and H. Nakayama: "Photochemical identification of the binding region for (*S*)-semotiadil on sodium channels: Comparison with that for (*R*)-semotiadil on skeletal muscle calcium channel", *Heterocycles,* 59, 613-622 (2003).

○ M. Ishiguro, T. Hirano, and Y. Oyama: "Modelling of photointermediates suggests a mechanism of the flip of the β-ionone moiety of the retinylidene chromophore in the rhodopsin photocascade", *ChemBioChem,* 4, 228-231 (2003).

(2) 特許出願

Ｈ１４年度特許出願件数：１件（研究機関累積件数：７件）