

「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

本研究課題では、本来短寿命である膜タンパク質の活性化状態を、これに親和性を有する梯子状ポリ環状エーテル系海産毒を始めとする低分子で安定化させ、この複合体の三次元構造を通して膜タンパク質の活性化に関する構造的根拠を得ることを目的とする。このため、この目的に最も適すると判断できるにも拘らず、天然よりの調達が困難なシガトキシンを化学合成し、加えてこれより得られる知見をもとに一連の構造改変体を合成して結合および活性化作用と構造との相関を得る予定である。

当面はシガトキシンよりは弱いながらナトリウムチャンネルに対して同一の作用様式で活性化することが知られるブレベトキシンを用い、作用検定法の精密化、光親和性標識による結合部位の決定を進めている。また分子中に同様の部分化学構造を持ちシガトキシンとは異なる未同定膜タンパク質を標的とするマイトトキシンの作用が上記ブレベトキシンにより阻害を受けることに着目し、こうしたポリ環状エーテル構造とタンパク質膜貫通部位との一般的認識機構の存在を想定し、その解明も目指している。こうした一連の研究に用いるべく、新規天然物を含めた膜タンパク質結合性環状ポリエーテル分子のライブラリー化を進める一方、光親和性標識タンパク質のタンデム質量分析による配列決定と標識部位の特定、マジック角回転などを用いる膜結合分子に関する結合様式の特定および三次元配置決定など、方法論の開発、検証、および最適化を進めている。

2. 研究実施内容

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。またこの細胞内への情報増幅伝達が達成されると同時に、活性化された膜タンパク質は脱感作と呼ばれるメッセンジャー分子との親和性低下、電位感受性の低下などにより静止状態に戻り、このため膜タンパク質の活性化状態は一過的であり、この状態に関する立体構造情報は推定の域を出るも

のではない。

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ことで脱感作を受けない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、これを静止状態での構造と比較する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。この中で特に、こうしたタンパク質の膜貫通部位に結合して、これを活性化することが想定されているシガトキシンなどの梯子状ポリ環状エーテル系海産毒をプローブ分子として用い、これらが結合する膜タンパク質との複合体に関する構造解明を当初の目標として以下の研究を実施した。

(1) 電位依存性ナトリウムチャンネル

神経や筋肉の細胞膜に存在するこの膜タンパク質は、膜電位の低下による構造変化により細胞内ナトリウム流入をもたらす、これにより神経軸索では「神経電流」の伝播、筋肉では細胞質カルシウム濃度増大による筋収縮の入力信号として機能している。フグ毒テトロドトキシンはこのナトリウム流入口に蓋をしてこの機能を阻害することが知られるが、逆にこれを活性化することが知られているいくつかの天然毒では、シガテラ主要毒のシガトキシンがもっとも高い親和性を有する。そこでシガトキシンとこの一連の構造改変体を有機合成により調達し（後述）、活性化状態の構造解明に用いる予定であるが、この達成までの間、チャンネルタンパク質での結合部位をこれと共有する赤潮鞭毛藻由来のブレベトキシンを用いた方法論の検証を行なっている。昨年度は電気ウナギ発電器官より本タンパク質を精製、これを脂質二重膜に再構成させたリポソームがブレベトキシンによる強い親和性とナトリウム流入を再現することを検証した。さらにこの再構成系を用いて、光反応性ジアジリンと特異検出のためのビオチンを含むリガンドをブレベトキシン分子末端に共有結合で繋げて光親和性標識を試みたが、チャンネル標識体の検出には至っていない。そこでラット・シナプトソームを用いて同様の光照射実験を行なったところ、ナトリウムチャンネル標識体と思われる複数のタンパク質がビオチン特異検出により確認された。現在この標識体の単離を試みている。

将来シガトキシンと併用する目的で、ナトリウムチャンネルの活性化を阻害するイモガイ由来のペプチドである μ -コノトキシンに、ビオチン、あるいは蛍光剤フルオレセインを導入し、これらが阻害活性を維持していることが確認できた。

(2) マイトトキシンの標的膜タンパク質

昨年度に上記の光反応性リガンドをDiels-Alder反応によりマイトトキシンに結合させ、赤血球共存下での光照射により標識されたタンパク質を、今年度はさらに二次元電気泳動上に展開して、マイトトキシンの標的である未同定膜タンパク質に競合的に結合して、そのカルシウム流入作用を阻害することが分かっている

ブレベトキシンによる標識阻害を確認した。この標識タンパク質の単離をビオチンを親和性マーカーとする既知法にて試みたところ、界面活性剤存在下での精製ではこれが適用困難であることが判明した。現在、こうした標識タンパク質に関する一般的単離法の開発を検討している。

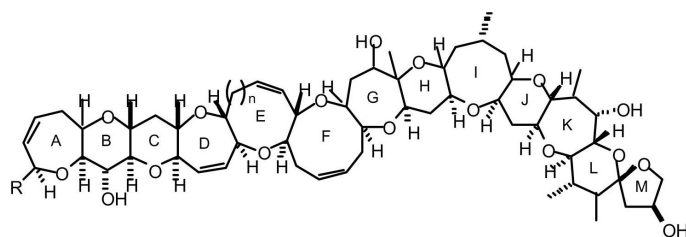
(3) 質量分析を用いた光親和性標識タンパク質の配列解析

上述の光標識膜タンパク質の精製と並行して、これらが達成された後に予定されるタンデム質量分析による標識部位同定法の有効性を検証する目的で、クロイソカイメンより単離したポリエーテル分子であるオカダ酸と、その標的タンパク質である2A型タンパク質脱リン酸化酵素 (PP2A) の光親和性標識を行なった。まず、オカダ酸の各種ビオチン化誘導体を合成して表面プラズモン共鳴によりPP2Aとの親和性を調べ、親和性低下の最も小さい誘導化部位を決定した。次にこの位置に光反応性リガンドを繋げ、ウサギ骨格筋より新たに単離したPP2A共存下での照射で、SDS電気泳動上でのビオチン特異的検出法により単一バンドを検出した。これを単離精製、酵素消化後、タンデム質量分析に供する予定である。

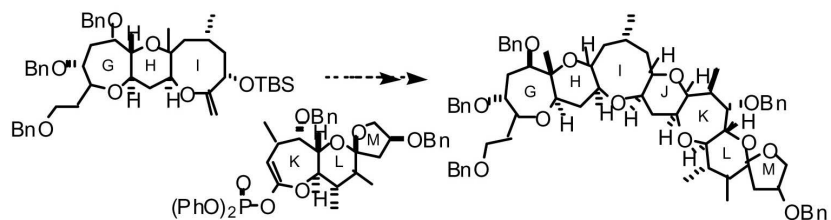
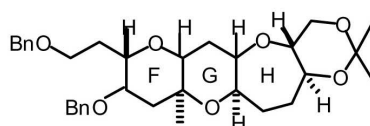
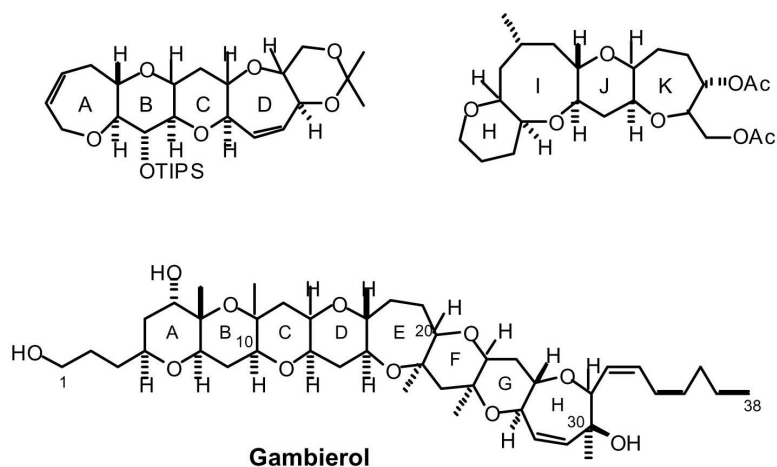
(4) シガトキシンおよび関連ポリエーテル系天然物の全合成研究

シガトキシンの全合成の骨格構築の最終段階に用いる合成戦略として、環状ケテンアセタールリン酸エステルとアルキルボランの間での鈴木クロス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開発し、これを用いてシガトキシンCTX3C類のABCD環部およびHIJK環部モデルの立体選択的合成を達成した(下図)。また、環状ケテンアセタ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が収率良く α, β -不飽和エステルを与えることを見出し、本反応によりラクトンから官能基化された中員環エーテルの新規合成法を開発することができた。現在、すでに合成を完了しているGHI環部と置換基を配備したKLM環部の鈴木カップリングによるGHIJKLM環部の合成を検討しており、この左側にF環部を延ばして上記ABCD環部とE環を介して繋げることで、全合成を達成する予定である。

新規合成標的として、渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus*からマウス致死成分として単離・構造決定されたポリエーテル化合物ガンビエロールの全合成を設定、上記反応を用いて現在までにFGH環部骨格の合成を達成した。



Ciguatoxin (CTX1B) : $n = 0$, $R = \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}=\text{CH}_2$
 51-HydroxyCTX3C : $n = 1$, $R = \text{H}$



(5) 新規梯子状ポリ環状エーテル天然物

瀬戸内海の赤潮毒として *Gymnodium mikimotoi* より単離されていたジムノシンの化学構造が、シガトキシン様ポリ環状エーテルと決定され、現在立体配置の確定を行なっている。また、種々のシガテラ毒化魚より新規シガトキシン類縁体を微量単離し、タンデム質量分析によりこれらの構造を推定できた

(6) 脂質二重膜に結合した分子のNMR解析

赤血球細胞膜の内層に蓄積することで溶血を起こすことが知られるアミノ基含有の向精神薬であるクロルプロマジンに¹³Cを導入し、内層に酸性脂質を偏在させたりポソームを作成してこれを結合させた。外液に常時性希土類金属イオンを添加して¹³C NMRを測定したところ、同位体ラベル化クロルプロマジンが外層から内層に移行する経時変化の観測に成功した。

マジック角回転下での回転エコー二重共鳴法 (REDOR) によるNMR測定を用

いて脂質二重膜に結合した分子間での原子間距離を得る方法の有効性を検証する
目的で、膜貫通型結合が提唱されるポリエンマクロリド系抗カビ抗生物質、アン
ホテリシンの二量体、およびこれとリン脂質との共有結合体を合成した。今後は
この位置特異的同位体ラベル化を進め、NMR測定に用いる予定である。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

- Masayuki Inoue, Makoto Sasaki and Kazuo Tachibana "A Convergent Synthesis of the trans-Fused Hexahydrooxonine Ring System and Reproduction of Conformational Behavior Shown by Ring F of Ciguatoxin" *Tetrahedron*, 55:(36) 10949-10970 (1999).
- Makoto Sasaki, Masayuki Inoue, Kuniyuki Takamatsu and Kazuo Tachibana "Stereocontrolled Synthesis of the JKLM Ring Fragment of Ciguatoxin" *The Journal of Organic Chemistry*, 64:(26) 9399-9415 (1999).
- Masayuki Inoue, Makoto Sasaki, and Kazuo Tachibana "A Convergent Synthesis of Decacyclic Ciguatoxin Model Containing the F-M Ring Framework" *The Journal of Organic Chemistry*, 64:(26) 9416-9429 (1999).
- Makoto Sasaki, Haruhiko Fuwa, Makoto Ishikawa, and Kazuo Tachibana "A General Method for Convergent Synthesis of Polycyclic Ethers Based on Suzuki Cross-Coupling; Concise Synthesis of the ABCD Ring System of Ciguatoxin" *Organic Letters*, 1:(7) 1075-1077 (1999).
- Keiichi Konoki, Masaki Hashimoto, Michio Murata, and Kazuo Tachibana "Maitotoxin-induced Calcium Influx in Erythrocyte Ghosts and Rat Glioma C6 Cells, and Blockade by Gangliosides and Other Membrane Lipids. " *Chemical Research in Toxicology*, 12:(10) 12993-1001 (1999).
- Masaji Ishiguro "A Mechanism of Primary Photo-activation Reactions of Rhodopsin: Modeling for the Intermediates in the Rhodopsin Photocycle" *Journal of the American Chemical Society*, 122:(3) 444-451 (2000).
- Makoto Sasaki, Katsuhiko Noguchi, Haruhiko Fuwa, and Kazuo Tachibana "Convergent synthesis of an HIJK ring model of ciguatoxin via Suzuki cross-coupling reaction" *Tetrahedron Letters*, 41:(9) 1425-1428 (2000).
- Yoshimasa Kobayashi and Kazuo Tachibana "NMR Observation on Transbilayer Distribution of N-[¹³C]methylated Chlorpromazine in Asymmetric Lipid Bilayer of Unilamellar Vesicles" *Chemistry Letters*, 4 302-303 (2000).