

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名

複合体形成に基づく膜タンパク質の機能制御

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 橘 和夫（東京大学大学院理学系研究科、教授）

主たる研究参加者

安元 健（日本食品分析センター多摩研究所 研究顧問）

佐々木誠（東北大学大学院生命科学研究科 教授）

村田道雄（大阪大学大学院理学研究科 教授）

中山 仁（熊本大学大学院医学薬学研究部 教授）

石黒正路（サントリー生物有機科学研究所 部長研究員）

3. 研究内容及び成果：

3-1 研究構想

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のような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。しかし情報伝達の達成と同時にこれらは静止状態に戻るため、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してきた。

このためここでの研究遂行の骨子は、（1）同位体など構造情報取得の手掛りが導入可能な有機合成によるリガンド分子の調達、および（2）リガンドが調達された場合での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二つに大別される。具体的な対象分子複合体として、サンゴ礁領域での魚による食中毒シガテラの主原因化合物であり膜系では最も強い会合定数（ ≤ 10 pM）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、この分子の毒性発現の際の標的細胞成分とされ、神経細胞および筋肉に発現している電位依存性ナトリウムチャンネルタンパク質（Voltage-sensitive sodium channel; 以下VSSC）の組合せを念頭に置き、天然からの量的調達が望めないこのリガンドを合成により調達するとともに、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細胞膜貫通長を有するポリ環状エーテル分子種の集積を行なうことを前提としてきた。ここで強い親和性が見出された複合体の構造情報は主として（1）光親和性標識法と質量分析を用いるタンパク質での結合部位の特定、（2）特定された膜貫通部位とリガンド分子の双方への同位体標識、（3）膜への再構成による複合体の調製、（4）NMRによる標識部位間の距離情報の取得、（5）そして以上で得られた知見に基づく計算化学による脂質二重膜中内でのドッキング・モデルの作成というスキームにより得る計画であった。以下に、得られた成果のうち、主要

なものに関して述べる。

3-2 研究成果

3-2-1 ポリ環状エーテル天然物の単離・構造決定

シガテラ中毒の多発する仏領ポリネシア産のウツボ内臓および生産生物である渦鞭毛藻*Gambierdiscus toxicus*中のシガトキシン新規同族体16成分の構造を得た。また食中毒の原因貝類より電位依存性ナトリウムチャネル(以下VSSC)に親和性を有するブレベトキシン新規同族体3種を単離・構造決定し、以上に関してマウス毒性とVSSCに対する親和性における構造活性相関を得た。加えて、魚の大量斃死をもたらす瀬戸内海産の赤潮鞭毛藻*Gymnodinium mikimotoi*に一連のポリ環状エーテル、ギムノシン類の存在を認め、これらがこれまでこの類の分子では報告のないVSSCに依存しない細胞毒性を有することが示された。このうち主要成分であるギムノシン-Aを単離し、構造決定を達成した。また、次項に述べるように本分子の全合成も達成している。

3-2-2 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

本プログラム以前に見出していたラクトン由来エノールエステルの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に関して、連結する分子の種類に応じた反応条件の多様化、最適化によりこれを一般化することが出来た。これを鍵反応として、シガトキシン分子群のうち現在最も毒性の強い51-ヒドロキシCTX3Cの全合成を進め、現在までにFGHIJKLM環部の合成を達成した。これをABCD環部とE環を介して連結することによりCTX3C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。

シガトキシン生産生物の培養により単離構造決定され中程度のマウス毒性を有するガンビエロールに関しては、各々合成した部品を上記方法論によりF環で連結することにより8環性ポリエーテル骨格を合成し、さらに、H環の官能基化とトリエン側鎖の導入を行い、全合成を達成した。この方法により合成したH環オレフィン、メチル基、および側鎖に関するいくつかの合成類縁体に関してマウス毒性を調べたところ、この部分の構造の毒性に対する関与がかなりあるという知見を得た。この一方、A環側の改変は生理活性への影響が少ないことが確認され、本全合成で供給可能となった本分子のこの部位での修飾による標的生体分子の同定等が可能であることが示された。

また、鈴木-宮浦反応を活用することで、本プログラムで単離構造決定された細胞毒性ポリエーテル化合物ギムノシン-Aの全合成を達成した。

3-2-3 チャネル活性化の新規モニター系およびタンパク質膜貫通部位モデル系の開発

細胞膜中で形成した複合体の構造解析を行なうためには、膜中での対象タンパク質の純度と濃度を高めた再構成系の供給が望ましい。そこで既報に従い電気ウナギ発電器官よりVSSCを精製し透析によりこれをリン脂質二重膜に再構成したところ、ブレベトキシンによる強い親和性が再現できた。次に二重膜内外のイオン分布を操作することで、電位感受性蛍光剤によりモニター可能な膜電位を有するリポソームを調製した。ここにブ

レベトキシンを投与した結果、再現性に問題を来しているもののVSSC活性化による脱分極が観測された。その後これにVSSC活性化作用を有するアルカロイドであるベラトリジンと共存させることで再現性が上がることを見出した。この結果を踏まえ、本法をシナプトソームおよび組換えDNAによりVSSCを発現させた動物細胞に用いたところ、再構成リポソームと比較して高い再現性およびプレベトクシン濃度への依存性を与えることを見出し、これにより電気生理的手法を用いないチャンネル機能のモニターが可能となることが示された。

ポリ環状エーテル分子と膜タンパク質との親和性は、後者に共通する膜貫通ヘリックスの束への前者の挿入により、これが束の中での相対三次元構造の変化を伴う場合に活性化をもたらすものと想定している。この作業仮説が正しければ膜タンパク質に非特異的な一般的親和性を有するはずであり、これを検証する目的で、上記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、膜貫通オリゴマーによるチャンネル形成が提唱されているミツバチ毒のペプチド成分メリチン（26残基）に関し、コレステロールの添加により二重膜との複合体構造が安定化されることを見出した。

3-2-4 膜タンパク質構造解析の方法論開発

同位体標識した試料を用いる固体NMRによる膜中での認識様式観測の有効性を検証するモデルとして、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ホテリシンB (AmB) 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配向性を調べた結果、前者に顕著なイオン透過性増大活性が認められた。AmBに C_{13} 標識したリン脂質との連結体を脂質二重膜に再構成した系の固体NMR (REDOR) による原子間距離測定により、従来AmBに提唱されていたモデルのうちsingle-lengthチャンネルを支持する結果を得た。

低分子と膜タンパク質の複合体構造解析に際し、チャンネルタンパク質に作用することが知られる薬物semotiadil誘導体による光親和性標識の結果、標識体に関するESI-MS/MS解析がきわめて有効であることを見出した。また、L型カルシウム・チャンネルに関して、液体ヘリウム温度での電子顕微鏡による単分子構造解析により、従来提唱された本チャンネルタンパク質の構造モデルを支持する結果を得た。

計算化学的なアプローチとして、静的状態の結晶構造に基づく分子動力学法により得た光受容膜タンパク質ロドプシンのレチナール光異性化による構造変化モデルを用いて、他のGTP結合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。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

グループ全体として外部発表は、総説等を含み日本語論文4件、外国語論文57件である。口頭発表は国内75件、国外26件である。また、特許出願は国内6件、海外1

件であった。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

鞭毛藻の培養藻体からマウス致死成分として単離・構造決定されシガテラ中毒への関与が推定されているガンビエロールの最初の全合成を達成した。全合成によって試料供給が初めて可能となり、マウスに対する組織病理学的研究および構造活性相関について有用な知見を得ることができた。また、赤潮渦鞭毛藻の生産する細胞毒gymnocin-Aおよびgymnocin-Bを単離した。その構造決定は多くの困難を伴ったが、これらの問題を解決して成功するなどの成果を上げた。しかし、本事業に採択された時点で設定した「戦略目標」や「研究終了時に得られると期待された研究成果」の大半は終了時点で達成されていない。

シガトキシンの全合成に関しては、本研究者らまたは他所によりすでに成功例があるものを用いる合成スキームを設定した箇所、鍵段階として想定した部分以外での困難な点が結果的には大きな障害となった。同様のサイズの天然物全合成におけるこれまでの例を見ればこれは当然予見すべきことであったのも事実である。シガトキシンの合成はすでに東北大学平間研で達成されていることでもあり、今後は達成後の構造多様化を考慮したルートを意識して進めるとともに、すでに達成したガンビエロールとギムノシン-Aの合成実績を踏まえて、膜タンパク質との複合体形成に関する研究部分にて得られる知見をもとに設計された同位体標識物を含むポリエーテルの合成を目標にして進めてほしい。

さらに、次項で述べるような事情で、研究室所属の教官の交代により（これに関しても当初から予見すべきであった点である）、研究室としての新規テーマの継続性を維持することが困難であったため、膜タンパク質の関わる分子認識を始めとして研究室としてこれから確立すべき方法論への挑戦が不十分であった。当初から指摘されていたところであるが、合成に関しポストドクトラルフェローをもっと活用すべきであった。

研究期間内では達成できなかったが、本研究の目標は全合成で供給されるシガトキシンの用いた構造解析であり、このためこれまでに得られた情報に基づきポリエーテル認識部位ペプチドモデルをデザイン、合成し、固体NMRに使用するための同位体標識を可能とすること、さらに得られる情報と確立した有機合成法を用いて膜貫通ペプチドとポリエーテルの双方に関して構造デザインでのチューニングを進めることで、複合体形成機構の一般的機構解明を行なうという長期目標に挑戦していただきたい。

4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

共同研究者安元健が第94回日本学士院賞・恩賜賞を受賞した。共同研究者村田道雄が東京大学大学院理学研究科助教授から大阪大学大学院理学研究科教授に、同じく、佐々木誠が東京大学大学院理学研究科助教授から東北大学大学院生命科学研究科教授に転出した。