

氏 名	いし ぐろ りょう 石 黒 亮
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1759 号
学位授与の日付	平成 8 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	膜融合活性ペプチドと脂質二重膜との相互作用に関する分光学的研究

論文調査委員 (主 査)  
教授 高橋 徹 教授 前田章夫 教授 金久 實

### 論 文 内 容 の 要 旨

インフルエンザウイルスは生体膜の融合を誘起する。これはこのウイルスの持つタンパク質、ヘムアグ ルチニンによるが、膜融合に直接かかわっているのはこのタンパク質のサブユニットの一つである HA2 の N-末端部であるといわれている。実際に、この部分のアミノ酸配列を持つ20残基程度の合成ペプチド、すなわち膜融合活性ペプチドによっても人工のリン脂質小胞間の融合を起こすことが出来る。これらの膜融合は pH 依存的であるが、それは含まれる酸性アミノ酸残基の解離が関係しているからであると考えられる。膜融合活性ペプチドはその両親媒性によってリン脂質膜に結合し、外的環境に応じた疎水性の変化もしくはリン脂質膜内での配向の変化によって膜融合過程を誘起する。疎水性ペプチドは数あるけれども膜融合活性のあるものはそのごく一部にすぎないので、ペプチドのリン脂質膜内での配向が融合の誘起に大きく関係しているはずである。本申請論文では膜融合の開始に伴う膜融合活性ペプチドの膜内配向の変化を決定しようとしたものである。

膜融合活性ペプチドはリン脂質膜に結合してアルファヘリックス構造を作るが、アルファヘリックスにおいてはペプチド結合のカルボニル基はペプチド軸にほぼ平行している。従ってある方向に配向したアルファヘリックスにおいて、ヘリックス軸に平行もしくは直交する偏光入射光に対するカルボニル基の伸縮振動の吸収強度は異なるのでこれを利用してアルファヘリックス、すなわちペプチドの配向を決定することが出来る。しかしながらリン脂質膜はいわば二次元の環境であり、その中に分布する分子の状態決定はきわめて高感度の技術を必要とする至難のものである。申請者は現在考えられる唯一の方法として減衰全反射 (ATR) 赤外吸収スペクトル法を取り上げ、フーリエ変換型赤外分光光度計の活用により、種々の困難を乗り越えて現在の問題に適用し、重要な結果を得ることに成功した。

申請者はまずゲルマニウム製の ATR プリズム上に沈積させたリン脂質二重層多層膜中の膜融合活性ペプチドのアミド I 吸収帯の偏光 (プリズム面に平行および直交) ATR スペクトルを測定した。両偏光スペクトルの差から、このペプチドの ATR プリズムに対する配向のオーダーパラメータを求めることが出

来る。ATR プリズム上のリン脂質膜は、リン脂質分子の主軸がプリズム面に垂直であるように配向しているから、二つの偏光に対するオーダーパラメーターは、多層膜内でのアルファヘリックスが膜面に対して平行にヘリックス軸を向けているか直交するように向けているかに対応しており、従ってペプチドの膜内配向が決定された。このペプチドは pH に依存する膜融合活性を持つが、得られた結果は予想と異なり、ペプチド軸の配向は pH に無関係にリン脂質膜平面に対し約30度であった。

リン脂質二重層多層膜での実験は初めの試みとしては測定系の感度上の制限からやむを得ないものであったが、しかし実際の生体膜（リン脂質二重層の一層だけである）のモデルとしては不適当なものであり、スペクトルの測定も生理的条件とは全く異なって水溶液中で行われたものではなかった。この点を克服するため、リン脂質二重層一層膜へ実験系を拡張した。ここにおいては測定対象となる分子はまさに二次元上に分散しているわけで、きわめて高感度の測定が要求されるが、水溶液存在下で実験できることも含め、現実の生体膜のモデルとして最適のものである。必要とされる感度はフーリエ変換型分光器の特徴を生かし、偏光 ATR スペクトルの積算を6,000回以上行うことによって解決した。更に、この測定系においては水溶液中からリン脂質膜へのペプチドの移行の過程についても情報を得ることが出来た。対象となるペプチドも膜融合活性のあるもののみにとどまらず、活性のないものも測定することによって、両者の膜との相互作用の様相の違いも明らかにしている。それらの結果によると、活性ペプチドでは融合活性のある酸性環境下において、ペプチドは2分子が協同的に膜に結合し、ペプチド軸の配向は膜にはほぼ平行であった。融合活性のない中性 pH ではペプチド膜への結合に協同性はみられず、ペプチドの膜内での配向性の程度も低下した。融合活性のないペプチドについては酸性 pH においても後者の場合と同様であった。これらの結果から、ペプチドが誘起する膜融合過程の最初の段階において、ペプチドは協同的に膜に結合して会合体を作り、ペプチドは膜に対して平行に配位することが融合誘起に必須であると結論された。多層膜を用いた実験系と一層膜の場合とを比較すると、後者の実験系が決定的に必要であることも明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

生体膜の融合は生物機能の発現の場においてきわめて重要な役割を果たしている。たとえば細胞外から細胞内への物質の取り込み（ウイルスの細胞への感染も含まれる）は、細胞膜に結合した物質を取り込むように細胞膜の一部から小胞が形成され、この小胞が細胞質に輸送されて後に内部の物質が細胞質内に放出される。このときの小胞の形成は細胞膜局部での膜融合による。細胞内での物質輸送も、輸送小胞と呼ばれる膜小胞を介する場合が多い。細胞分裂も大域的に起こった膜融合である。このような生体膜融合は一般にある特異的な蛋白質によって起こる。膜融合そのものはリン脂質二重層間の融合という比較的簡単な物理化学的現象であり、生物における膜融合の重要性の故にこれまで実に多数の研究が行われてきたにも関わらず、膜融合誘起蛋白質の作用の実体については全く不明であった。

リン脂質二重膜はいわば二次元的な場であり、従って融合そのものの誘起に際し、蛋白質が関与するにしても蛋白質全体が関わるはずはない。この見地から膜融合蛋白質の一部を模した合成ペプチドによる膜融合の可能性が試みられ、現在成功するにいたっている（この研究の一部には本申請者もその参考論文に

において貢献している)。蛋白質全体を対象としないので、膜融合活性ペプチドとリン脂質膜との相互作用の研究、ことに現在もっとも有力な実験手段である分光学を用いた研究はその物理化学的実体を捉えるために非常に有望であると考えられる。

申請者はインフルエンザウィルスの膜融合誘起蛋白質であるヘムアグルチニンの融合ペプチドに着目した。この融合ペプチドに相当する20もしくは21残基の合成ペプチドは人工膜小胞の融合を誘起できることがわかっている。そしていろいろなアミノ酸配列を持つ合成ペプチドの研究をもとにして、融合活性に必要な条件、たとえば両親媒性アルファヘリックスであること、などが知られるにいたった。しかし両親媒性アルファヘリックスのすべてが膜融合活性を持つなどということはもちろんなく、どのような条件が活性を持つために必要であるか、そのとき膜融合活性両親媒性ヘリックスが生体膜とどのように相互作用しているのかが明らかにされなくてはならない。アルファヘリックスであればヘリックス軸の向きにアミド I 吸収帯の遷移能率があるから、偏光赤外線の色性の観測からその配向を求めることが可能であろう。申請者はこの考えのもとに、ATR プリズムの上に多層または単層のリン脂質二重膜を吸着させ、これと膜融合活性ペプチドとの相互作用を減衰全反射吸収赤外分光法を用いて研究した。多層リン脂質二重膜を使った実験は赤外分光器の感度を考えると最初の試みとしてはやむを得ないものであったが、単層二重膜での実験に成功してみると、生体膜のモデルとしてはやはり水溶液と平衡状態にある単層二重膜でない且不十分であることが結果の解釈から結論されている。この単層二重膜でのペプチドの吸着及び配向実験から、膜融合活性ペプチドは融合を起こす溶液条件においては脂質二重膜への結合に協同性があること、二重膜内においてペプチドは膜平面にほぼ平行に配向していること、活性ペプチドでも融合を起こさない条件下、もしくは膜融合活性を持たないペプチドにおいては二重膜への結合に協同性もなく、ペプチドの膜内配向もよりランダムに近いことが明らかになった。これらの結果は膜融合ペプチドの作用機序について具体的基礎を与えたものとして世界でも初めてのものであり、これによってペプチドが誘起する膜融合を具体的に考えていくことが初めて可能になった点、極めて高く評価される。また単層リン脂質二重膜での赤外分光学そのものが Tam によって試みられて以来、世界的にみて二番目のものであり、困難な実験系を確立したものとして価値の高いものである。特に二次元配向分子の配向方向の決定は三次元に分散した系と異なり、対象とする分子数が著しく少なく、本申請論文で扱われたようなただ1枚のリン脂質二重膜での分光実験は論文審査の過程において審査員全員の非常に高い評価を得た。

このように本申請論文は、方法、結果、内容ともに斯学に対する貢献度は高く、参考論文においての膜融合系全体に対する考察も含めて、博士（理学）に要求される水準を十分に満足しており、合格と判定した。