

氏名	矢野 義明
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第559号
学位授与の日付	平成17年3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	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Fundamental Studies on Membrane Protein Folding Using Model Transmembrane Helices (モデル膜貫通ヘリックスを用いた膜タンパク質フォールディングに関する基礎的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 松崎勝巳 教授 加藤博章 教授 半田哲郎

論文内容の要旨

創薬ターゲットとして最重要の生体分子である受容体をはじめとする膜タンパク質の構造形成原理は水溶性タンパク質のそれと大きく異なると予想されるが、その一般原理は未だに殆ど未解明である。水溶性タンパク質の場合、変性剤や熱による可逆的な変性からその構造の熱力学的安定性を調べる手法がしばしば用いられるが、膜タンパク質を可逆的かつ完全に変性させることは一般に困難なため、この方法は不相当である。膜タンパク質の多くは、安定な膜貫通ヘリックス構造を基本骨格として組み上げられているため、その構造形成を理解する上で重要なのは、むしろ膜貫通ヘリックス間およびヘリックス-脂質間相互作用を解明することにあると言える。さらに、それらの相互作用の駆動力を系統的に解明するためには、取扱いの困難な天然の膜タンパク質から出発する代わりに、特定の相互作用をなるべく持たない inert な膜貫通ヘリックスをホスト配列として用い、そこに水素結合、塩結合、ロイシンジッパーなどの会合モチーフ配列をゲストとしてそれぞれ導入しそれらの影響を調べるのがよい。多種かつ複雑な相互作用を含む天然の膜貫通配列に変異を加えていった場合、個々の駆動力を分離して解釈するのが難しいのに比べて、この戦略は極めて明快な情報を与える。

このアプローチの第一歩として、ロイシンとアラニン残基のみからなる完全に inert なモデルペプチド X-(LALAAA)₃-NH₂[X=NBD(I) or X=Rhodamine(II)]を、ホスト配列として世界で初めてデザイン、合成し、パルミトイルオレオイルフォスファチジルコリン(C16:0/C18:1PC)二分子膜中での基本的性質を調べた。偏光一赤外全反射吸収スペクトル測定及びNBDの消光剤であるジチオナイトを用いた実験より、このペプチドは、両端に膜界面へのアンカーとなる親水性や芳香族の残基を持たないにもかかわらず安定なトポロジーを持つ膜貫通ヘリックスを形成する事がわかった。(I)から(II)への蛍光励起エネルギー移動(FRET)を利用して、このヘリックスの膜中での自己会合を測定した。このヘリックスは膜中で単量体-逆平行型2量体間平衡にあり、その会合自由エネルギー(ΔG_a)は約-13kJ/molであった。またスピンラベル脂質を用いて、このヘリックスの周囲に運動性の制限された脂質が存在する事を示した。

ヘリックスの水相から膜相への挿入、あるいは膜からの解離過程も、膜タンパク質フォールディングの解明に重要な過程である。C16:0/C18:1PCからなるドナーリポソーム中でRhodamineラベル脂質により消光されている(I)のNBD蛍光が、Rhodamineラベル脂質を含まないアクセプターリポソームに移動した際に回復することを利用し、このヘリックスが非常にゆっくりとした速度で膜から水相へ解離し、再び膜挿入する性質を持つことを実証した。膜間移行の速度定数はヘリックスの膜からの解離過程を示すと考えられる。移行の温度依存性から解離の活性化エネルギーを測定(+74.3kJ/mol)することに成功した。また、ヘリックスが膜へ挿入する際に、膜電位とヘリックスマクロ双極子との相互作用により、挿入のトポロジーが大きく影響を受けていることを示した。

膜タンパク質のフォールディングを理解する上で、多種多様な脂質環境が膜貫通ヘリックス間およびヘリックス-脂質間相互作用へどのように影響するのかを解明する視点も極めて重要である。脂質組成によって膜タンパクの活性やコンフォメーションが影響を受ける例は数多くあるが、その一般原理も殆どわかっていない。

今回、膜貫通ヘリックスの疎水部の長さと同疎水部の厚さのマッチングに焦点をあて、ヘリックスの自己会合および膜への分配が膜厚にどのように影響を受けるかを調べた。モデル膜貫通ヘリックスとして、上述のものと同組成は同じであるが対称な配列に変更したペプチド $X-(AALALAA)_3-Y$ [$X=NBD$, $Y=NH_2$ (Ⅲ) or $X=Ac$, $Y=DABMI$ (Ⅳ)]を用いた(長さ約 30\AA のヘリックスを形成)。膜疎水部の厚さは、不飽和結合を1つ持つアシル鎖を2本持つフォスファチジルコリン (diC (X:1) PCs, $X=14, 16, 18, 20, 22$, X はアシル鎖炭素数)を用いて、 20\AA から 34\AA まで変化させた。膜厚を変えても膜貫通ヘリックス構造と配向に殆ど変化はなかった。(Ⅲ)から(Ⅳ)へのFRETを利用して、このヘリックスの膜中での逆平行型2量体の形成を精度良く測定できた。会合は薄い膜中では弱く (diC (14:1) PCで ΔG_a は約 -10kJ/mol)、膜が厚くなるほど強くなる (diC (22:1) PCで ΔG_a は約 -20kJ/mol) 傾向にあった。また会合の温度依存性から、この会合がエンタルピー駆動であることがわかった。ヘリックスマクロ双極子間引力が主要な駆動力だと考えられた。C16:0/C18:1PCから厚さの異なる膜への分配自由エネルギー ΔG_t は、C16:0/C18:1PCをドナーリポソーム、diC (X:1) PCsをアクセプターリポソームとして、ヘリックス移行率の平衡値を求めることで計測に成功した。ヘリックス会合とは対照的に、疎水性ミスマッチが存在する場合、即ち膜厚がヘリックス長より薄すぎる、あるいは厚すぎる場合に、ヘリックスの膜への分配は減少した (diC(14:1)PC, diC (22:1) PCでそれぞれ約 $+2\text{kJ/mol}$, 約 $+8\text{kJ/mol}$ の ΔG_t)。薄い膜ではエントロピーの減少、厚い膜ではエンタルピーの増加により分配が妨げられていることが明らかになり、薄い膜と厚い膜での疎水性ミスマッチに対する応答は大きく異なることが示唆された。さらに、最も分配しやすい膜疎水部の厚さは、ヘリックス長(約 30\AA)よりも薄かった(約 25\AA)。膜厚の変化によってヘリックス末端の極性環境が変わると仮定することで、膜-水相界面領域におけるヘリックスマクロ双極子間相互作用、ヘリックスマクロ双極子由来の末端部分電荷のボルンエネルギー、ヘリックス側鎖の満たす疎水性相互作用などの概算値が計算でき、それらを用いて測定された会合や分配の熱力学的パラメータを上手く説明することができた。

本研究では、新規にデザイン、合成した inert なモデルペプチドと脂質二分子膜との相互作用をヘリックス間、ヘリックス-脂質間相互作用の熱力学の観点から解明した。膜貫通ヘリックスの会合や膜への分配、膜からの解離などの熱力学量を詳細に計測可能な他に類を見ない実験系を初めて確立するとともに、このペプチドが将来ゲスト配列を導入可能なホスト配列として有用であることを示した。今後ゲスト配列を導入したペプチドを用いて、膜タンパク質一般に適用可能な構造形成の駆動力のエネルギー論に踏み込んでいく。

論文審査の結果の要旨

創薬ターゲットとして最重要の生体分子である受容体をはじめとする膜タンパク質の構造形成原理は水溶性タンパク質のそれと大きく異なる予想されるが、その一般原理は未だに殆ど未解明である。水溶性タンパク質の場合、変性剤や熱による可逆的変性からその構造の熱力学的安定性を調べる手法がしばしば用いられるが、膜タンパク質を可逆的かつ完全に変性させることは一般に困難なため、この方法は不相当である。膜タンパク質の多くは、安定な膜貫通ヘリックス構造を基本骨格として組み上げられているため、その構造形成を理解する上で重要なのは、むしろ膜貫通ヘリックス間およびヘリックス-脂質間相互作用を解明することにあると言える。さらに、それらの相互作用の駆動力を系統的に解明するためには、取扱いの困難な天然の膜タンパク質から出発する代わりに、特定の相互作用をなるべく持たない inert な膜貫通ヘリックスをホスト配列として用い、そこに水素結合、塩結合、ロイシンジッパーなどの会合モチーフ配列をゲストとしてそれぞれ導入しそれらの影響を調べるのがよい。

このアプローチの第一歩として、ロイシンとアラニン残基のみからなる完全に inert なモデルペプチド $X-(LALAAAA)_3-NH_2$ [$X=NBD$ (Ⅰ) or $X=Rhodamine$ (Ⅱ)]を、ホスト配列として世界で初めてデザイン、合成し、バルミトイルオレオイルフォスファチジルコリン (C16:0/C18:1PC) 二分子膜中での基本的性質を調べ、このペプチドは、1) 両端に膜界面へのアンカーとなる親水性や芳香族の残基を持たないにもかかわらず安定なトポロジーを持つ膜貫通ヘリックスを形成する、2) 膜中で単量体-逆平行型2量体間平衡にあり、その会合自由エネルギー (ΔG_a)は約 -13kJ/mol である、3) 周囲に運動性の制限された脂質が存在する事を示した。

次に、ヘリックスの水相から膜相への挿入、あるいは膜からの解離過程に関しても研究を行い、解離の活性化エネルギー

を測定 (+74.3kJ/mol) することに成功するとともに、膜挿入する際に、膜電位とヘリックスマクロ双極子との相互作用により、挿入のトポロジーが大きく影響を受けていることを示した。

さらに、膜タンパク質のフォールディングを理解する上で重要な多種多様な脂質環境が膜貫通ヘリックス間およびヘリックス-脂質間相互作用に与える影響を検討した。膜貫通ヘリックスの疎水部の長さや膜疎水部の厚さのマッチングに焦点をあて、ヘリックスの自己会合および膜への分配が膜厚にどのように影響を受けるかを調べた。モデル膜貫通ヘリックスとして、上述のものと同組成であるが対称な配列に変更したペプチド X-(AALALAA)₃-Y[X=NBD, Y=NH₂(Ⅲ) or X=Ac, Y=DABMI(Ⅳ)] (長さ約 30Å のヘリックスを形成) と不飽和結合を 1 つ持つアシル鎖を 2 本持つフォスファチジルコリン (diC (X:1) PCs, X=14, 16, 18, 20, 22, X はアシル鎖炭素数, 疎水部厚 20Å~34Å) を用いて、1) 膜厚を変えても膜貫通ヘリックス構造と配向に殆ど変化はない、2) 逆平行型 2 量体の形成は薄い膜中では弱く (diC (14:1) PC で ΔG_a は約 -10kJ/mol), 膜が厚くなるほど強くなる (diC (22:1) PC で ΔG_a は約 -20kJ/mol) 傾向にある、3) この会合はエンタルピー駆動であり、ヘリックスマクロ双極子間引力が主要な駆動力だと考えられる、4) C16:0/C18:1PC から厚さの異なる膜への分配自由エネルギー ΔG_t は、ヘリックス会合とは対照的に、疎水性ミスマッチが存在する場合、ヘリックスの膜への分配は減少する (diC (14:1) PC, diC (22:1) PC でそれぞれ約 +2kJ/mol, 約 +8kJ/mol の ΔG_t), 5) 薄い膜ではエントロピーの減少、厚い膜ではエンタルピーの増加により分配が妨げられており、薄い膜と厚い膜での疎水性ミスマッチに対する応答は大きく異なる、6) 最も分配しやすい膜疎水部の厚さは、ヘリックス長 (約 30Å) よりも薄い (約 25Å) などの重要な結論が得られ、膜厚の変化によってヘリックス末端の極性環境が変わると仮定することで、膜-水相界面領域におけるヘリックスマクロ双極子間相互作用、ヘリックスマクロ双極子由来の末端部分電荷のボルンエネルギー、ヘリックス側鎖の満たす疎水性相互作用などの概算値が計算でき、それらを用いて測定された会合や分配の熱力学的パラメータを上手く説明することができることを統一的に示した。

以上、本研究では、新規にデザイン、合成した inert なモデルペプチドと脂質二分子膜との相互作用をヘリックス間、ヘリックス-脂質間相互作用の熱力学の観点から解明し、膜貫通ヘリックスの会合や膜への分配、膜からの解離などの熱力学量を詳細に計測可能な他に類を見ない実験系を世界で初めて確立するとともに、このペプチドが将来ゲスト配列を導入可能なホスト配列として有用であることを示した。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

さらに平成17年2月28日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。