

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	能代 大輔
論文題目	外部刺激により会合制御可能なチャンネルペプチドの創製		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>天然のイオンチャンネルタンパク質の機能を、より単純な構造をもつチャンネルペプチドを用いて具現化することは、イオンチャンネルの構造と機能の相関の解明のみならず、機能性ナノ素子の開発という観点からも魅力的である。代表的なチャンネルペプチドの一つであるアラメチシン (Alm) は、異常アミノ酸α-aminoisobutyric acid (Aib)を含む20アミノ酸残基から成り、複数の分子が脂質膜中で会合することにより、イオンチャンネルを形成することが知られている。筆者は、Almを元に、特定の外部刺激によって、その会合状態および活性を制御できるチャンネルペプチドの創出を試みた。</p> <p>第一章 ヒスチジン残基導入による金属依存的な会合安定化</p> <p>本章では、AlmのN末端に、金属イオンとのキレート形成能を有するヒスチジン (His)残基を導入したAlm誘導体HG-Almの性質について述べる。チャンネル電流の測定は、脂質平面膜法により行った。HG-Almは、金属イオン非存在下では、頻繁に変化する複数の電流レベルを与え、膜中で特定の安定な会合状態を形成しないことが示唆された。一方、Zn^{2+}の存在下においては、特定の電流レベルのチャンネル開口時間が、Zn^{2+}非存在下に比べ20倍以上延長され、Zn^{2+}により特定の会合状態が安定化されることが分かった。さらに、Alm 2量体との比較により、8分子以上の偶数のHG-Almによってこの会合体が形成されていることが明らかとなった。Zn^{2+}存在下でチャンネル電流が増加することから、本系は、Zn^{2+}を感知するセンサーとしても機能しうることが示唆された。</p> <p>第二章 リポソーム内に封入された低分子化合物の膜透過を金属により制御できるチャンネルペプチドの創製</p> <p>本章では、前章で作製したHG-Almに含まれるすべてのAib残基を、側鎖の炭素数の異なるアミノ酸leucine (Leu), norleucine (Nle), norvaline (Nva)にそれぞれ置換したAlm誘導体HG-[Leu]Alm, HG-[Nle]Alm, HG-[Nva]Almの性質に関して述べる。これらのペプチドの膜への作用様式を、蛍光色素封入りポソームを用いたリーケージアッセイにより調べた。その結果、HG-AlmおよびHG-[Nva]Almについては、Zn^{2+}によるリーケーシ活性の顕著な増大が観察されたが、HG-[Leu]AlmおよびHG-[Nle]Almについては、逆に、Zn^{2+}によるリーケーシ活性の著しい阻害が観察された。</p>			

第三章 膜外配列の構造変化により膜電流を制御するCa²⁺感受性人工イオンチャネルの創製

本章では、pH非依存性のAlm (Rf50)に、Ca²⁺によって構造変化を起こすことが知られているカルモジュリンC末端ドメイン(CaMc)を膜外配列として連結させた人工イオンチャネルRf50-CaMcの性質について述べる。酸性アミノ酸を多く含むCaMc同士の間で静電反発によるチャネル形成阻害を防ぐため、チャネル電流の測定は、pH 5.4の電解質溶液中で行った。初めに、CD測定により、Ca²⁺によってRf50-CaMcの膜外領域が構造変化を起こすことを確認した。また、8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS)を用いた蛍光測定により、Ca²⁺の結合によってCaMcの構造変化が起こり、タンパク質内部に埋もれていた疎水性部分が表面に露出することを確認した。Rf50-CaMcのチャネル電流測定の結果、Ca²⁺非存在下においては、開口時間の極めて短いバースト様の電流が観測されたが、Ca²⁺存在下においては、特定の会合状態の開口時間が顕著に延長し、結果として平均チャネル電流が6倍程度まで増加することが分かった。

本研究の結果は、外部刺激により、膜にチャネルを形成するペプチドの会合を制御することによって、チャネルポアを通るイオンの流れや物質の透過を制御できることを示すものであり、天然のチャネルの構造と機能に関する理解や、機能性センサー素子の開発に有用な知見を与えるものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ペプチドをベースにした人工イオンチャネルの設計は、チャネルタンパク質の基本的な機能と構造に関する理解だけでなく、新規のセンシングデバイスの開発にも有用である。申請者は本論文において、代表的なチャネルペプチドであるアラメチシン (Alm) を利用して、センサー機能を備えた人工イオンチャネルの創出、およびリポソーム膜の透過性の制御が可能なチャネルペプチドの創出を目指して研究を行い、以下に示すような価値ある知見を得ている。

第一章では、脂質平面膜法を用いたチャネル電流測定により、AlmのN末端へHis残基を導入したペプチドHG-Almの特定の会合状態が、 Zn^{2+} 添加により安定化されることを見出した。類縁体を用いた検討から、この会合体は8分子以上の偶数のAlm分子によって形成されることや、HG-AlmのHis側鎖のイミダゾールとともに、N末端アミノ基も会合安定化に重要であることを示した。さらに、 Zn^{2+} の添加により会合構造が安定化され、平均チャネル電流が3~4倍増加することを示した。

第二章では、HG-Almに含まれるAib残基を、側鎖の炭素数の異なるアミノ酸Leu, Nle, Nvaにそれぞれ置換した誘導体HG-[Leu]Alm, HG-[Nle]Alm, HG-[Nva]Almの膜との作用様式に関して、 Zn^{2+} により、HG-AlmおよびHG-[Nva]Almの蛍光色素封入リポソームの溶出活性は増大するのに対し、HG-[Leu]AlmおよびHG-[Nle]Almの溶出活性は著しく低下することを見出した。また、これらのHG-Alm誘導体を用いて、 Zn^{2+} の添加と除去による溶出制御が可能であることを示した。

第三章では、 Ca^{2+} によって構造が変化するカルモジュリンC末端ドメイン(CaMc)を、Alm (Rf50)の膜外領域として用いたRf50-CaMcを創出した。Rf50-CaMcのチャネル電流は、 Ca^{2+} 非存在下においては、開口時間が極めて短く、一定のチャネルコンダクタンス値を示さないが、 Ca^{2+} 存在下においては、特定の会合状態の開口時間が顕著に延長し、平均チャネル電流が6倍程度まで増加することを示した。

以上、本論文は、金属配位状態や膜外構造の変化を利用したチャネル形成ペプチドの会合調節に基づき開口や溶出を制御できる新規イオンチャネルの創製に成功した。本論文の会合状態を制御する方法論は、新規のセンシングシステムの開発のみならず、膜タンパク質の機能の人為的な制御にも展開可能なものであり、多くの有益な知見を提供すると考えられる。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：平成25年3月31日以降