

氏 名	なが おか やす お 長 岡 康 夫
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 556 号
学位授与の日付	平 成 8 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ペプタイボール, Trichosporin-B 類の電圧依存性イオンチャンネル形成機構に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 富 岡 清 教 授 宮 嶋 孝 一 郎 教 授 藤 井 信 孝
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

Trichosporin (TS)-B はシイタケ栽培に大きな被害を与えた木材腐朽菌 *Trichoderma polysporum* (TMI 60146) より単離されたペプチド群である。このペプチドは異常アミノ酸, α -aminoisobutyric acid (Aib) や isovaline (Iva) を高率に含み N-末端は acetyl (Ac) 基, C-末端は phenylalaninol (Pheol) で保護され, アミノアルコールを含め20残基より構成されている。これらの特徴から TS-B 類は脂質二分子膜に電圧依存性のイオンチャンネルを形成する peptaibol に分類される。Peptaibol によるイオンチャンネルの形成機構は生体のイオン透過と関連して興味が持たれている。

そこで著者は TS-B のイオンチャンネルの形成機構の解明を目的として, TS-B-VIa, -VIb およびその誘導体の合成を完成した。さらに, これら化合物の詳細な二次構造とチャンネル形成特性を調べた。また, TS-B 類の牛副腎髄質細胞に対するカテコールアミン分泌活性ならびにミトコンドリアに対する脱共役活性について検討した。さらに, 構造とイオンチャンネル形成特性ならびに, 生物活性との相関性について考察した。

1. Trichosporin-B-VIa, -VIb およびその誘導体の合成

TS-B 類の中でカテコールアミン放出活性の強い TS-B-VIa および-VIb (Fig. 1) を合成した。TS-B-VIa は14位 Pro における折れ曲がり構造をとると予想される。この Pro の機能的役割を調べるため, Pro を Aib に置換した直線状のペプチド ([14-Aib]) を合成した。また, 分子の長さとの相関性を調べるため, TS-B-VIa の N-末端に Aib を 1 から 3 残基加えた誘導体 ([+1]~[+3]) と TS-B-VIa の N-末端アミノ酸を順次一残基ずつ減少させた誘導体 ([-1]~[-4]) を合成した (Fig. 1)。

2. Trichosporin-B-VIa およびその誘導体の溶液中の二次構造

TS-B-VIa およびその誘導体の CD 曲線は全て, 右旋性ヘリックス構造に特徴的なダブルミニマムの負のコットン効果を示した。さらに, TS-B-VIa と [14-Aib] については, $^1\text{H-NMR}$ における NOE,

アミドプロトンの J 値, 温度変化による化学シフト移動, H-D 交換速度の測定により, Fig. 2 に示す分子内水素結合様式を与えることを見出した。この結果から, TS-B-VIa は 3_{10} -helix 部分と α -helix 部分より構成された構造を有し, 14 位 Pro 周辺において helix の折れ曲がりを持つことが明らかになった。一方, [14-Aib] は主に α -helix 構造を有し, 直線状の構造を持つことが明らかになった。

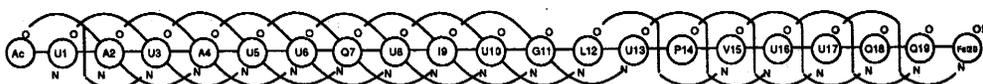
3. Trichosporin-B-VIa とその誘導体の脂質二分子膜に対するイオンチャンネル形成特性

TS-B-VIa を脂質二分子膜に作用させると, 電圧依存性の膜電流が誘導された。この膜電流の巨視的な電流-電圧特性およびシングルチャンネルコンダクタンスの解析の結果, TS-B-VIa は主に 7 分子が束状に会合し, イオンチャンネルポアを形成すると考えられる (Fig. 3)。[14-Aib] も TS-B-VIa と同様に電圧依存性のイオンチャンネルを形成した。しかし, チャンネルを構成する分子の数は主に 4 と少なくなると共に, チャンネル寿命も短くなった。長さを変化させた誘導体もすべて電圧依存性の膜電流を誘導した。シングルチャンネルレベルの電流を観測すると, [+1] は TS-B-VIa と同様のチャンネル挙動を示したが, その他のものは安定したチャンネル挙動を示さなかった。以上の結果は, TS-B-VIa の

- (+3) Ac-Aib-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- (+2) Ac-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- (+1) Ac-Aib-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- TS-B-VIa Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- TS-B-VIb Ac-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Iva-Gln-Gln-Pheol
- (-1) Ac-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- (-2) Ac-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- (-3) Ac-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- (-4) Ac-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
- 14-Aib Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Ile-Aib-Gly-Leu-Aib-Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol

Fig. 1

(a) TS-B-VIa



(b) [14-Aib]

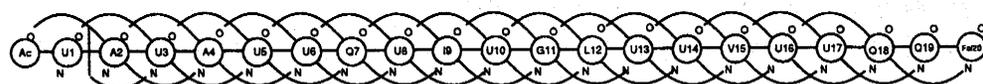


Fig. 2

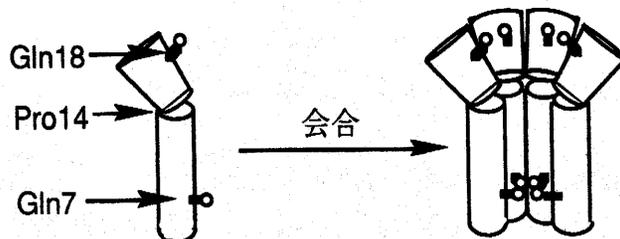


Fig. 3

helix 構造の折れ曲がりや20残基の分子の長さが電圧依存性の膜電流の誘導には必須ではないことを示している。しかし、安定なチャンネルの形成には、14位 Pro での折れ曲がり構造が重要な要素として働き、さらに、分子の長さが20か21残基に厳密に限定されていることがわかった。TS-B-VIa と誘導体の二次構造の情報をもとに、束状のチャンネルモデルを考えたとき、誘導体のチャンネルは TS-B-VIa のそれよりもペプチド間、脂質—ペプチド間、および電場—ペプチド双極子間の相互作用が減少することが示唆された。これらが誘導体のチャンネルの不安定化の要因と考えられる。

4. Trichosporin-B のカテコールアミン分泌活性と脱共役活性

TS-B 類を培養した牛副腎髄質細胞に作用させると、細胞内への Ca^{2+} 流入に伴うカテコールアミン分泌が観測された。さらに、ラット肝ミトコンドリアに対し、脱共役活性を示した。これらの活性と TS-B 分子の脂溶性 (HPLC の保持比) との間に一次のよい相関性を示した。同様の相関性が脂質二分子膜のコンダクタンス値と分子の脂溶性との間にも認められた。これらの結果は、TS-B の脂溶性が強いほど人工膜や生体膜にチャンネルを形成しやすいことを示している。

論文審査の結果の要旨

論文審査申請者の論文題目は「ペプタイボール、Trichosporin-B 類の電圧依存性イオンチャンネル形成機構に関する研究」である。

Trichosporin(TS)-B 類は木材腐朽菌 *Trichoderma polysporum* より単離されたペプタイボールの一種であり、脂質二分子膜に電圧依存性のイオンチャンネルを形成する。Peptaibol によるイオンチャンネルの形成機構は生体のイオン透過と関連して興味を持たれている。

本論文では以下の1～4についての研究を行い、得られた結果から TS-B 類の電圧依存性イオンチャンネル形成機構について考察している。

1. TS-B-VIa, -VIb およびその誘導体の合成

申請者は2種の TS-B 類、TS-B-VIa および -VIb を合成した。さらに、TS-B-VIa の14位 Pro の機能的役割を調べるため、Pro を Aib に置換した直線状のペプチド ([14-Aib]) を合成し、分子の長さ と活性との相関性を調べるため、TS-B-VIa の N-末端に Aib を1から3残基加えた誘導体 ([+1]～ [+3]) と TS-B-VIa の N-末端アミノ酸を順次一残基ずつ減少させた誘導体 ([-1]～[-4]) を合成した。

2. TS-B-VIa およびその誘導体の二次構造

TS-B-VIa およびその誘導体の CD および NMR の結果から、TS-B-VIa は2種類のヘリックス (3_{10} -helix と α -helix) 部分より構成された構造を有し、14位 Pro 周辺において helix の折れ曲がりを持つことを明らかにした。一方、[14-Aib] は主に α -helix 構造を有し、直線状の構造を持つことを明らかにした。

3. TS-B-VIa とその誘導体の脂質二分子膜に対するイオンチャンネル形成特性

TS-B-VIa および誘導体を脂質二分子膜に作用させたときの膜電流解析の結果、(i)TS-B-VIa は主

に7分子が会合し、チャンネルを形成すること、(ii)[14-Aib]もTS-B-VIaと同様に電圧依存性のイオンチャンネルを形成するが、チャンネル構成分子の数は4と少なく、チャンネル寿命も短くなること、(iii)長さを変化させた誘導体もすべて電圧依存性の膜電流を誘導するが、シングルチャンネル電流の観測から、[+1]以外は安定したチャンネル挙動を示さないことを明らかにした。

4. TS-Bのカテコールアミン分泌活性と脱共役活性

TS-B類の牛副腎髄質細胞に対するカテコールアミン分泌活性およびラット肝ミトコンドリアに対する脱共役活性がTS-B分子の脂溶性および脂質二分子膜のコンダクタンス値との間に一次のよい相関性を有することを明らかにした。

以上1～4の結果から、安定なチャンネルの形成には、14位Proでの折れ曲がり構造が重要な要素として働き、さらに、分子の長さが20か21残基に厳密に限定されていること。誘導体のチャンネルはTS-B-VIaのそれよりもペプチド間、脂質—ペプチド間、および電場—ペプチド双極子間の相互作用が減少することが示唆され、これらが誘導体のチャンネルの不安定化の要因であること。また、TS-Bの脂溶性が強いほど人工膜や生体膜にチャンネルを形成しやすいことを明らかにしている。

以上の新所見は脂質二分子膜に作用するペプチドの高次構造と機能との相関についての基礎知識を与えると共に、生体チャンネルやトランスポーターなどの機能の解明に寄与することが期待できる。

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。

更に、平成8年8月30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。