

氏名	まつもとともはる 松本友治
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2235号
学位授与の日付	平成12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	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	The membrane destabilizing activity and the critical glycine residue of the influenza virus hemagglutinin fusion peptide-based synthetic peptide (インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンの膜融合ペプチドを基にした合成ペプチドにおける膜を不安定化する活性と決定的に重要なグリシン残基)

論文調査委員 (主査) 教授 藤吉好則 教授 七田芳則 教授 平野丈夫

論文内容の要旨

本論文において申請者は、インフルエンザウイルスの膜糖蛋白質ヘムアグルチニン由来のペプチドと、リン脂質膜との相互作用を丹念に研究した。インフルエンザウイルスの膜糖蛋白質ヘムアグルチニン(HA)がpHの低下に伴って膜融合を引き起こし、感染を成立させるメカニズムについては様々な仮説が提出されているが、膜融合ペプチドと呼ばれるHA2鎖のN末端20残基程の領域が脂質膜と直接に相互作用する部分であるとする点では異論が無い。ウイルス系統A/PR/8/34の膜融合ペプチドに基づいて設計された20残基から成る合成ペプチドはペプチドIIIと名付けられている。このペプチドのみで膜小胞の融合を引き起こし、その際に両親媒性 α ヘリックス構造をとることが報じられて、脂質膜との相互作用に関与するペプチドの構造上の特徴を調べるのにこのペプチドは利用されてきている。しかし、申請者の丹念な追試の結果、ペプチド単独での膜融合の有無、および、膜融合に先立つ膜の不安定化機構について再検討が必要なることが明らかになってきた。

本論文では、ペプチドの構造上の因子として側鎖のかさ高さに着目し、両親媒性 α ヘリックスになり得るという特徴は残しつつペプチドIIIを構成するアミノ酸20残基各々について側鎖のかさ高さを変えると残基置換を系統的に行ない、得られた残基置換体の活性を元のペプチドIIIと比較した。すなわち基本的には各残基一つずつをアラニンへと置換したが、グリシンやアラニンについては疎水面側に位置する場合はロイシンへ、親水面側に位置する場合はグルタミンへと置換したペプチドを設計し、固相法により合成した。また、本論文では、蛍光標識法によりペプチドIIIの膜小胞に対する脂質混合活性が確認されたと報告されているこれまでの結果、すなわち、水相混合活性は確認できず、厳密な意味での膜融合は認められなかった。しかし、内水相の漏れは明確に認められ、ペプチド単独での主たる活性は膜融合ではなく脂質膜の不安定化だとする見解を支持する結果を報告している。従って、20種の残基置換体とペプチドIIIとの活性の比較は膜小胞からの内水相の漏れの測定に絞って行うべきであることを明確に示している。

以上の検討に基づいて進められた実験により、ペプチドの親水面側での残基置換は活性に及ぼす影響が少ない一方、疎水面側でかさ高い疎水性側鎖を除去する残基置換では明らかに活性が低下していること、また、N末端にかさ高い親水性側鎖を配する残基置換G1Qや、C末端にかさ高い疎水性側鎖を配する残基置換G20Lでも活性が低下することを明らかにした。これらの結果は、ヘリックスの主に疎水面側が脂質膜と相互作用する段階があり、活性の高いペプチドではN末端側がより深く膜内に挿入されるよう膜面に対してヘリックス軸が傾くとする従来の知見を支持している。さらに興味深い結果として、残基置換G13Lは疎水面側の疎水性を更に増大させるにも関わらず活性を著しく低下させたことである。円二色性スペクトルの測定によれば、他のペプチドではpHの低下に伴って α ヘリックス含量が低い状態から高い状態へと変化するのに対し、G13Lでは始めから α ヘリックス含量が高い状態にあるという結果が得られた。これは α ヘリックス含量の単なる多寡と脂質膜を不安定化する活性とが単純に対応している訳ではないことをきれいに証明した。

また、本論文により、インフルエンザウイルスの膜糖蛋白質ヘムアグルチニン由来の20アミノ酸から成るペプチドIIIにおいて、13残基目のグリシンがこのペプチドの活性ならびに α ヘリックス含量を左右する要となっていることがはじめて明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

地球上のすべての生物は、基本的に細胞膜で囲まれた細胞を基に形作られている。細胞が外界から物質を取り込んだり排出したりするとき、膜融合機能は1つの中心的な役割を担っている。そのみならず、神経細胞のシナプスなどにおける神経伝達物質の放出も、膜融合機能が決定的に重要な役割を担っている。また、我々が風邪のウイルスに冒される時の機構も、この膜融合活性が深く関わっている。それにも関わらず、膜融合の詳細な機構は、いまだ明らかにされていない。本申請論文により、申請者は、この膜融合活性を持つとされるインフルエンザウイルスの膜糖蛋白質ヘムアグルチニン由来のペプチドと、リン脂質膜との相互作用を丹念に研究し、解析した。

まず申請者は、インフルエンザウイルスの膜糖蛋白質ヘムアグルチニン(HA)がPHの低下に伴って膜融合を起こす機能部分である膜融合ペプチドと呼ばれるHA2鎖のN末端20残基程の領域に着目した。脂質膜と直接に相互作用するウイルス系統A/PR/8/34の膜融合ペプチドに基づいて、ペプチドIIIと名付けられた20残基から成る合成ペプチドを用いることにした。蛍光標識法によりペプチドIIIの膜小胞に対する脂質混合活性が確認されたと報告されているこれまでの実験結果、および、その解釈の問題点を明らかにし、このペプチドでは水相混合活性は確認できず、厳密な意味での膜融合は認められないことを証明した。ただし、内水相の漏れは明確に認められ、ペプチド単独での主たる活性は膜融合ではなく脂質膜の不安定化であることを示した。本研究は、膜融合活性において重要となるであろうペプチドによる脂質膜の不安定化の機構の研究に重要な貢献をした研究であると評価できる。

また、申請者は、ペプチドIIIの構造上の因子として側鎖のかさ高さに着目し、両親媒性 α ヘリックスになり得るという特徴は残しつつ、ペプチドIIIを構成するアミノ酸20残基各々について側鎖のかさ高さを変えるとという残基置換を系統的に行った。得られた残基置換体の活性を元のペプチドIIIと比較した。すなわち基本的には各残基一つずつをアラニンへと置換した

が、グリシンやアラニンについては疎水面側に位置する場合はロイシンへ、親水面側に、位置する場合はグタミンへと置換したペプチドを設計し合成した。申請者は系統的で注意深い実験により、ペプチドの親水面側での残基置換は活性に及ぼす影響が少ない一方、疎水面側でかさ高い疎水性側鎖を除去する残基置換では明らかに活性が低下していること、また、N末端にかさ高い親水性側鎖を配する残基置換G1Qや、C末端にかさ高い疎水性側鎖を配する残基置換G20Lでも活性が低下することを明らかにした。これらの結果は、ヘリックスの主に疎水面側が脂質膜と相互作用する段階があり、活性の高いペプチドではN末端側がより深く膜内に挿入されるよう膜面に対してヘリック軸が傾くとするモデルを支持するものである。

さらに申請者は、G13Lという残基置換は疎水面側の疎水性を増大させるにも関わらず、活性を著しく低下させることを発見した。円二色性スペクトルの測定によれば、他のペプチドではPHの低下に伴って α ヘリックス含量が低い状態から高い状態へと変化するのに対し、G13Lでは始めから α ヘリックス含量が高い状態にあるという結果が得られた。これは α ヘリックス含量の単なる多寡と脂質膜を不安定化する活性とが単純に対応している訳ではないことをきれいに証明した結果である。この結果から、13残基目のグリシンがペプチドIIIの活性ならびに α ヘリックス含量を左右する要となっていることがはじめて明らかとなった。このグリシン残基はL型アミノ酸では取り得ないコンフォメーションを取ることでペプチドのN末端側に形成される α ヘリックスをペプチド中央部で止めるものと考えられる。ペプチドの活性にとって、N末端側とC末端側が別々の二次構造要素として振る舞い、酸性環境下で α ヘリックスがペプチド全体に伸びた状態へと変化し得る自由度を残していることが重要であることを示唆している。モデルペプチドを用いて機能上重要な位置を占めていることが見出されたこのグリシン残基は、天然に見いだされたヘムアグルチニンのアミノ酸配列上でも極めて高度に保存されていることから、申請者の発見は支持される。以上の研究は、膜融合の基礎となると考えられているペプチドによる膜の不安定化機構を明らかにしたもので、膜融合の研究において、重要な貢献をしている。

よって、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論分に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について諮問した結果、合格と判定した。