

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750383

研究課題名(和文) 固体NMRによるアンフォテリシンBチャンネル複合体の構造解明

研究課題名(英文) Structural analysis of amphotericin B channel complex using solid-state NMR

研究代表者

梅川 雄一 (Umegawa, Yuichi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20587779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：ステロールの側鎖もしくはステロイド骨格の構造が異なる誘導体を合成し、アンフォテリシンBとの親和性をイオン透過活性試験などにより評価した。その結果、AmBとエルゴステロールは面と面のファンデルワールス力により相互作用していることが示唆された。また、炭素13やフッ素19で標識されたAmBやエルゴステロールを合成し、固体NMR測定から分子間距離や複合体構造の情報取得を試みた。

研究成果の概要(英文)：Sterol derivatives which have different side-chain or alicyclic structures were synthesized, and their affinities to amphotericin B (AmB) were evaluated by using ion-flux assay. The results indicated that face-face Van der Waals interactions stabilized the AmB-ergosterol complex. Solid-state NMR using fluorine 19 or carbon 13 labeled AmB and/or ergosterol were examined to obtain intermolecular distance information.

研究分野：天然物化学

キーワード：アンフォテリシンB リン脂質二重膜 固体NMR

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜中における分子間の相互作用は細胞内外の情報伝達、膜電位の調整など生命活動の重要な役割を担っている。一方で膜中での相互作用を原子レベル解析することは困難であり、その手法の確立が急務となっている。その要因の一つは生体膜が非結晶性であり、また異方的な環境であるといった膜環境特有の問題から X 線結晶解析や溶液 NMR といった従来法の適用が困難なためである。そこで、生体膜における原子レベルでの分子間相互作用解析法の確立を目指し、モデル化合物として膜作用物質であるアンフォテリシン B (AmB, 図 1) に着目、研究を行ってきた。AmB は脂質二重膜中でステロール分子と共に自己会合することで、イオン透過性チャンネルを形成する。また膜に含まれるステロール (即ち哺乳類ではコレステロール、真菌ではエルゴステロール) の違いを認識し、真菌に対して選択毒性を発現するとされている。一方でステロールの認識はそれほど厳密ではなく、その結果として、ヒトに対しても深刻な副作用をもたらす。よって、膜中での自己会合体の構造解析という基礎化学的な観点、および副作用の低減という薬理的、社会的観点から多くの研究者の注目を集めてきた。中でも 1970 年代に提唱された AmB 分子とエルゴステロール分子が円形に並んだ樽板モデル (図 1) [1] は多くの支持を得ており、以降の実験結果解釈の基礎となっている。一方で、樽板モデルのような複合体構造を直接観測した実験はほとんど無く、モデルの直接的な証明には至っていない。

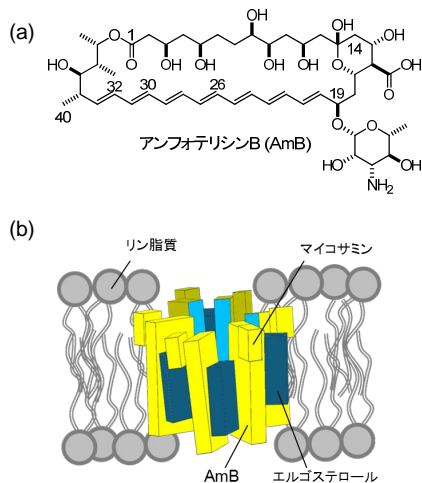


図 1 アンフォテリシン B の化学構造(a)と樽板モデル(b)

### 2. 研究の目的

本研究では、化学合成により AmB やステロール分子の誘導体や標識体を調製し、それらをイオン透過活性試験や固体 NMR で詳細に解析することで、アンフォテリシン B がリン脂質膜中でエルゴステロールと共に形成するチャンネル複合体を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

AmB チャンネル複合体は AmB-AmB、AmB-エルゴステロール、AmB-リン脂質の主に 3 つの相互作用が複雑にバランスを取り合うことで形成されていると考えられる。従って、一度にこれらの相互作用を評価することは非常に困難である。そこで、まず構造活性相関研究から大まかな分子間の相互作用様式を見積もり、その後、固体 NMR によるピンポイントな距離情報を得ることにした。

#### (1)構造活性相関

AmB-ステロールの相互作用を解明するため、側鎖またはステロイド骨格が異なるステロール誘導体を複数合成した。次にそれら誘導体を含有する POPC リポソームを作成し、AmB との親和性をチャンネル活性試験や SPR を用いて評価した。

#### (2)固体 NMR 測定

固体 NMR 測定には分子の標識化が必須である。そこでまず AmB およびステロールに  $^{13}\text{C}$  や  $^{19}\text{F}$  を化学合成で導入した。次にこれらをリン脂質膜中で混合することでチャンネル複合体を形成させ、固体 NMR の REDOR 法や CODEX 法適用することで、標識部位間の正確な原子間距離や分子会合数を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1)構造活性相関による AmB-エルゴステロールの相互作用解析

##### ステロール側鎖に関する研究

エルゴステロールを基本構造とし、その側鎖構造を変化させた誘導体(図 2)を化学的に合成した。

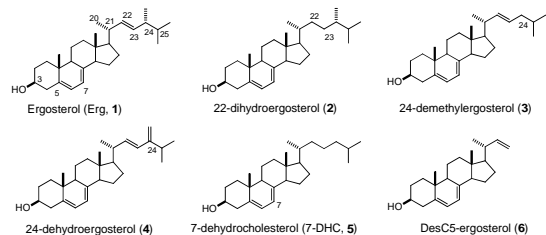


図 2 ステロール側鎖誘導体の化学構造

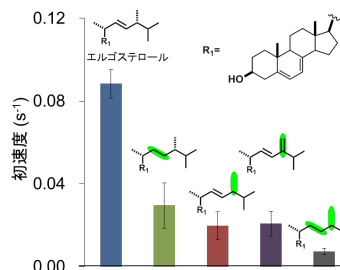


図 3 各ステロール誘導体を含む POPC 膜に対する AmB のチャンネル活性

次にこれら誘導体の AmB チャンネル形成促進能を評価した。図 3 には 5% の誘導体を含む POPC リポソームに対する AmB のチャンネル形成能を示した。この結果からエルゴステロール側鎖が最も AmB のチャンネル形成を促進し、二重結合やメチル基が欠けた側鎖はその機能が低下することが明らかになった。このことは AmB とステロール側鎖間には密接な相互作用があることを示している。更に配座計算なども合わせることで、側鎖のメチル基は疎水性側鎖の面積を増大させ、二重結合は配座を固定することで、効率良く AmB とファンデルワールス(VDW)相互作用していることを明らかにした。この結果は Y. Nakagawa, Y. Umegawa, T. Takano, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Murata *Biochemistry* **2014**, *53*, 3088-3094. として報告した。

#### ステロイド骨格に関する研究

と同様に、ステロイド骨格の影響を調べるため、側鎖構造をエルゴステロール、もしくはコレステロールと同じもので固定し、ステロイド骨格の構造が異なるものを合成し(図 4)、構造活性相関を行った(図 5)。

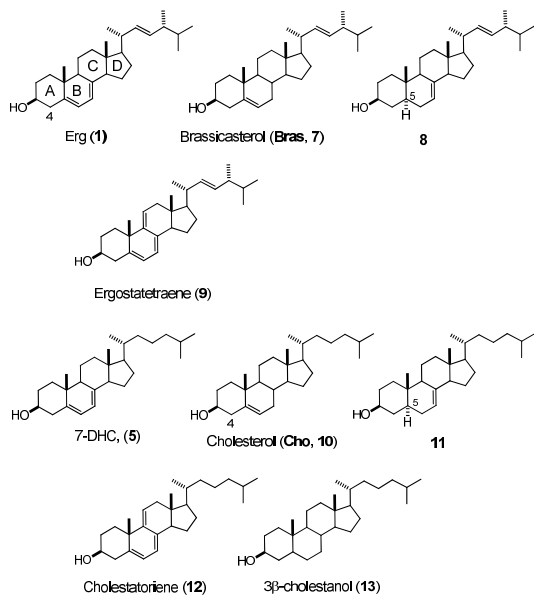


図 4 ステロイド骨格誘導体の化学構造

その結果、ステロイド骨格により AmB のチャンネル形成誘導能が明確な差が見られ、また従来考えられていた二重結合の数よりも、その 3 次元的な構造が重要であることが示唆された。そこで、計算化学的手法により各誘導体の立体構造を求め、AmB との親和性を考察したところ、7 位のアキシャル水素の有無が AmB との親和性に大きな影響を与えていることが推察された。固体 NMR により直接 AmB とステロールの分子間距離を見積もったところ、7 位のアキシャル水素を持たないエルゴステロールの方が、アキシャル水素をもつコレステロールよりも AmB に近接していることが示され、より強く相互作用可

能であることが分かった。この結果は Y. Nakagawa, Y. Umegawa, K. Nonomura, N. Matsushita, T. Takano, H. Tsuchikawa, S. Hanashima, T. Oishi, N. Matsumori, M. Murata *Biochemistry* **2015**, *54*, 303-312. として報告した。

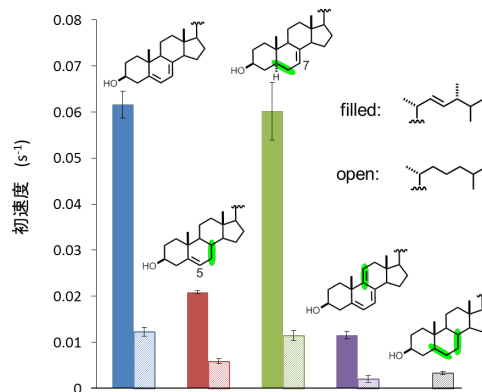


図 5 各ステロール誘導体を含む POPC 膜に対する AmB のチャンネル活性

#### (2) AmB-エルゴステロールの分子間距離測定

上記の構造活性相関研究により大まかな AmB-エルゴステロールの相互作用様式が明らかになったので、次により詳細な分子間距離情報を得るため、固体 NMR 測定を行った。測定には 32 位もしくは 14 位にフッ素を導入した AmB と 4 位もしくは 26,27 位に <sup>13</sup>C を導入したエルゴステロールを混合し、POPC 膜中で複合体を形成させたものを用いた。

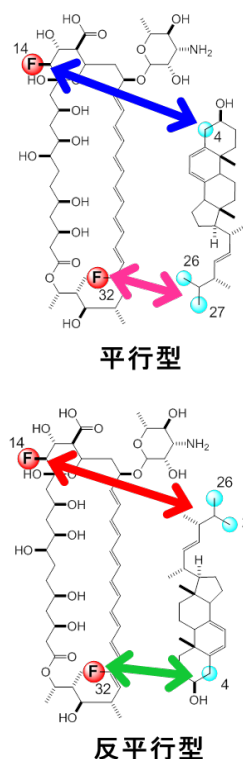


図 6 AmB-エルゴステロールの分子間 REODR 測定。平行型(a)と反平行型(b)の相互作用様式についてそれぞれ 3 カ所の距離を求めた。

$^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR 測定により  $^{13}\text{C}$  と  $^{19}\text{F}$  間の原子間距離を測定した結果、平行型、反平行型共に 3 カ所での原子間距離の取得に成功した。さらに平行型と反平行型が 7:3 の比率で共存していることも明らかになった。これらの距離情報を制限情報とすることで、AmB-エルゴステロールの位置関係を計算により求めることに成功した(図 6)。この結果は現在、論文投稿に向けて準備中である。

### (3)AmB-AmB の相互作用

AmB 分子間の相互作用は AmB チャネルにおいてコアとなる重要な要素である。本研究では AmB の会合数と分子間距離測定、また新規標識体の調製を行った。

#### $^{19}\text{F}$ -CODEX 法による会合数の決定

AmB が 1 つのチャネルを形成するために必要な分子数は非常に重要な情報であるが、これまで実験的に直接観測した例はなかった。そこで固体 NMR の手法の 1 つである  $^{19}\text{F}$ -CODEX 法を適用することで会合数の推定を行った。試料には 14 位がフッ素で標識された AmB をリン脂質膜に混合した物を用いた。測定の結果、更なる検討の余地はあるものの、おおよそ 6 から 10 分子程度が会合しているという結果が得られた。

#### AmB 分子間距離の測定

これまでに固体 NMR を用いることで AmB 分子間の距離情報の取得に成功していたが、解析には複数点でも情報が必要である。そこで、AmB の 26 位および 40 位に  $^{13}\text{C}$  を導入した 26,40- $^{13}\text{C}_2$ -AmB と 32 位に  $^{19}\text{F}$  を導入した 32-F-AmB を化学合成し、両者をリン脂質膜中で混合させ、 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR 測定を行った。この測定により初めて AmB のテイル側での距離情報の取得に成功した。

#### 配向解析を目指した新規標識体の合成

AmB のリン脂質膜中での配向に関する情報はこれまでのところ計算化学的な手法以外に報告例がない。そこで固体 NMR の手法によるアプローチを行うため、 $^2\text{H}$  を AmB の 19 位に導入する手法の開発を行った。種々検討の結果、合成の収率等に問題点は残っているが、活性を保持した新規  $^2\text{H}$  標識 AmB 誘導体の合成に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Y. Nakagawa, Y. Umegawa, K. Nonomura, N. Matsushita, T. Takano, H. Tsuchikawa, S. Hanashima, T. Oishi, N. Matsumori, M. Murata, Axial Hydrogen at C7 Position and Bumpy Tetracyclic Core Markedly Reduce Sterol's Affinity to Amphotericin B in Membrane. *Biochemistry* **2015**, *54*, 303-312. 査読有

DOI: 10.1021/bi5012942

Y. Nakagawa, Y. Umegawa, T. Takano, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Murata, Effect of Sterol Side Chain on Ion Channel Formation by Amphotericin B in Lipid Bilayers. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3088-3094. 査読有

DOI: 10.1021/bi500122c

〔学会発表〕(計 9 件)

山本智也、梅川雄一、土川博史、花島慎弥、村田道雄、松森信明、Patrick Caffrey, ポリオール部分の相互作用解析を目指した新規アンフォテリシン B 誘導体の調製とイオンチャネル活性, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 03 月 26 日 ~ 2015 年 03 月 29 日, 日本大学

T. Yamamoto, Y. Uegawa, H. Tsuchikawa, S. Hanashima, N. Matsumori, M. Murata. New synthetic route for labelled Amphotericin B derivative via  $\beta$  glycosidation, The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, 2014 年 10 月 28 日 ~ 2014 年 10 月 29 日, 千里ライフサイエンスセンター.

T. Yamamoto, Y. Umegawa, H. Tsuchikawa, S. Hanashima, N. Matsumori, M. Murata, Synthesis of deuterated Amphotericin B derivative via beta-glycosidation, Gordon Research Conference: Natural Product, 2014 年 07 月 20 日 ~ 2014 年 07 月 25 日, Andover, NH, USA.

Y. Nakagawa, Y. Umegawa, K. Nonomura, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Murata, Interactions of synthetic ergosterol analogues with amphotericin B toward understanding drug's selective toxicity, 15th Tetrahedron symposium, 2014 年 06 月 25 日 ~ 2014 年 06 月 27 日, London, UK.

山本智也、梅川雄一、土川博史、花島慎弥、松森信明、村田道雄 新規重水素化アンフォテリシン B 誘導体の合成と固体 NMR による配向解析, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 03 月 30 日, 名古屋大学.

中川泰男、野々村健一、梅川雄一、土川博史、松森信明、村田道雄, 分子間距離情報に基づく脂質二重膜に形成されるアンフォテリシン B 複合体の構造解析, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 03 月 29 日, 名古屋大学.

梅川雄一, 固体 NMR による脂質二重膜中での複合体構造解析, 「天然物ケミカルバイオロジー」第 3 回若手研究者ワークショップ, 2013 年 05 月 27 日, 東京.

Y. Nakagawa, Y. Umegawa, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Murata, Solid-state NMR based analysis of interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayer, 14th Tetrahedron symposium Asia edition, 2013 年 10 月 22 日, Soul, Korea.

Y. Nakagawa, Y. Umegawa, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Murata, Solid-state NMR-based structure elucidation of ion channel assembly formed by amphotericin B in lipid Bilayers, 3rd Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia, 2013 年 11 月 13 日, 千葉.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

梅川 雄一 (UMEGAWA, Yuichi)  
大阪大学・理学研究科・特任助教  
研究者番号：20587779

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

無し

### (4)研究協力者

村田道雄 (MURATA, Michio)  
大阪大学・理学研究科・教授  
研究者番号：40183652

松森信明 (MATSUMORI, Nobuaki)  
九州大学・理学研究院・教授  
研究者番号：50314357